

การระบุชนิดของยีสต์ที่คัดแยกได้จากป่าเขาพลวงตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์ด้วย
การวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ในบริเวณ ITS และ D1/D2

IDENTIFICATION OF YEASTS ISOLATED FROM KHAOPLOUNG FOREST
BY COMPARATIVE ITS AND D1/D2 SEQUENCE ANALYSIS

เปมิกา ขำวีระ^{1*} ณัฐวดี บำรุง² และ สิริลักษณ์ พุกมาก²

¹สาขาวิชานวัตกรรมและเทคโนโลยีผลิตภัณฑ์ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร

²สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร กรุงเทพมหานคร

Pemika Khamweera^{1*}, Natthawadee Bamrong² and Sirilak Pookmak²

¹Product Innovation and Technology program, Faculty of Science and Technology,
Phranakhon Rajabhat University, Bangkok.

²Biology program, Faculty of Science and Technology, Phranakhon Rajabhat University, Bangkok.

*E-mail: pemika@pnru.ac.th

Received: 2021-06-08

Revised: 2022-05-12

Accepted: 2022-05-20

บทคัดย่อ

งานวิจัยเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดของกลุ่มยีสต์เพื่อระบุสายพันธุ์ที่พบในพื้นที่ป่าเขาพลวงด้วยหลักการระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์ ผลการศึกษาตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บจากการแบ่งพื้นที่ตามวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบง่ายร่วมกับการใช้วิจารณ์ฐาน พบยีสต์ที่เจริญบนอาหารสูตร acidified yeast extract malt extract agar ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์ฟอนิก ร้อยละ 0.1 ปรับความเป็นกรดเบสเท่ากับ 3.7 จำนวน 126 ไอโซเลท เมื่อศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS พบยีสต์ 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Candida tropicalis* PRUCT1, *Trichosporon asahii* PRUTA1, และ *Pichia* sp. PRUPS1 โดยมีร้อยละความเหมือน 100, 100 และ 99.12 ตามลำดับ และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ D1/D2 domain ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) หรือ 26S rDNA พบยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Dipodascus albidus* PRUDA1 โดยมีร้อยละความเหมือน 91.47

คำสำคัญ: ยีสต์พื้นถิ่น ป่าเขาพลวง ITS D1/D2 domain

ABSTRACT

The objective of this research was to identify the yeast species found in the Khaoplung forest area. The results showed that the 126 isolated yeasts were grown on acidified yeast extract

malt extract agar which contained the antibiotic chloramphenicol at the concentration of 200 mg / l and 0.1 % propionic acid (pH 3.7). In a comparative study of the nucleotide sequences of ITS, 3 yeast species were identified; namely, *Candida tropicalis* PRUCT1, *Trichosporon asahii* PRUTA1, and *Pichia* sp. PRUPS1, with similarity percentage at 100, 100 and 99.12, respectively, and the nucleotide sequence of the D1/D2 domain of large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) or 26S rDNA was found in *Dipodascus albidus* PRUDA1 with a percentage of similarity at 91.47.

Keywords: Local yeast, Khaoplung forest, ITS, D1/D2 domain

บทนำ

ยีสต์ (yeast) เป็นจุลินทรีย์ในอาณาจักรเห็ดรา (Fungi) มีลักษณะการเจริญแบบเซลล์เดี่ยว (unicellular) บางชนิดพบการสร้างกลุ่มใยคล้ายรา โดยพบทั้งกลุ่มใยแท้ (true mycelium) และกลุ่มใยเทียม (pseudomycelium) ทั้งนี้สามารถพบได้ทั้งในน้ำ ทะเล บรรยากาศ และบนบก (Kurtzman et al., 2011) การศึกษาความหลากหลายของยีสต์อาจทำได้โดยแยกยีสต์จากแหล่งที่มา และนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ ซึ่งการจัดจำแนกทำได้โดยหลักอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิม (conventional taxonomy) และอนุกรมวิธานระดับโมเลกุล (molecular taxonomy) หรือใช้อนุกรมวิธานหลายแบบร่วมกัน ที่เรียกว่า polyphasic taxonomy (Vandamme et al., 1996) โดยอนุกรมวิธานแบบดั้งเดิมที่ใช้ในการจำแนกประเภท (classification) และการจัดจำแนกยีสต์นั้นอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยา ซึ่งอาจให้ผลที่ไม่แน่นอนเพราะขึ้นอยู่กับสภาวะการเลี้ยง ในขณะที่อนุกรมวิธานระดับโมเลกุลสามารถช่วยแก้ปัญหาความไม่แม่นยำ และขัดข้องได้แก่ในการจำแนกได้ (Sawitree, 2013; Kurtzman & Robnett, 1998; Fell et al., 2000; Lopandic & Prillinger, 2001; Oslan et al., 2012; Haelewaters et al., 2020; Li et al., 2020) ดังนั้นลำดับนิวคลีโอไทด์จึงสามารถนำมาใช้เพื่อบ่งชี้ความสัมพันธ์ในบรรดา ยีสต์ได้ โดยเฉพาะการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของ nuclear rRNA gene ใช้มากสำหรับการประเมินความสัมพันธ์ทางวิวัฒนาการของสิ่งมีชีวิต เนื่องจากมีทั้งส่วนที่มีวิวัฒนาการน้อย หรือบริเวณอนุรักษ์ (conserved region) และส่วนที่วิวัฒนาการมาก ที่เรียกว่าบริเวณผันแปร (variable region) ทำให้สามารถใช้บริเวณอนุรักษ์เป็นจุดอ้างอิง เพื่อเทียบหาความแตกต่างของบริเวณผันแปรได้ ในบรรดา nuclear rRNA gene นั้น D1/D2 domain ของ large subunit (LSU) rRNA gene ช่วยในการแยกสปีชีส์ของยีสต์ส่วนใหญ่ได้ดีกว่าบริเวณอื่น ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักสำหรับการจัดจำแนกยีสต์อย่างรวดเร็ว รายงานวิจัยแสดงให้เห็นว่ามีการจำแนกยีสต์และรายงานยีสต์จากแหล่งต่าง ๆ จำนวนมาก และได้ค้นพบและเสนอยีสต์สปีชีส์ใหม่มากกว่า 50 สปีชีส์ เช่น *Candida phayaonensis* sp. nov., *C. sakaeensis* sp. nov., *C. sirachaensis* sp. nov., *C. uthaithanina* sp. nov., *Metschnikowia lopburiensis* sp. nov., *M. saccharicola* sp. nov., *Ogataea kanchanaburiensis* sp. nov., *O. wangdongensis* sp. nov., *Wickerhamomyces siamensis* sp. nov., *W. xylosica* sp. nov., *Yamadazyma phyllophila* sp. nov. และ *Y. siamensis* sp. nov. (Limtong, 2013) โดย Sumpradit et al. (2015) ได้ศึกษาความหลากหลายชนิดของยีสต์ป่าในดินป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์โดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยง (culture-dependent) เพื่อบ่งบอกความหลากหลายของยีสต์และประเมินบทบาทเชิงนิเวศของยีสต์ในดินป่าธรรมชาติของอุทยานแห่งชาติแม่วงก์ โดยคัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินป่าเบญจพรรณและดินป่าดิบแล้ง จำนวน 16 และ 29 สายพันธุ์ ตามลำดับ ผลการพิสูจน์เพื่อระบุชื่อชนิดของยีสต์โดยใช้หลักการระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic identification) พบว่า ยีสต์

16 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าเบญจพรรณ เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 11 ชนิด คือ *Candida albicans*, *C. diversa*, *C. maltose*, *Galactomyces geotrichum*, *Kloeckera apiculata*, *Millerozyma phetchabunensis*, *Pichia kluyveri*, *Saccharomyces cerevisiae*, *S. pastorianus*, *Tetrapisispora namnaonensis* และ *T. phaffii* และยีสต์ 29 สายพันธุ์ที่คัดแยกจากดินป่าดิบแล้ง เป็นยีสต์ที่มีความแตกต่างกัน 13 ชนิด คือ *C. albicans*, *C. diversa*, *Debaryomyces hansenii*, *Geotrichum candidum*, *Hanseniaspora uvarum*, *Kazachstania humatica*, *Kloeckera lindneri*, *P. kluyveri*, *S. cerevisiae*, *T. namnaonensis*, *T. phaffii* และ *Yarrowia lipolytica* ความหลากหลายชนิดของยีสต์ทั้งหมดมีผลต่อการทำหน้าที่ในระบบนิเวศในป่าไม้ ซึ่งยีสต์แต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่มมีแหล่งที่อยู่ (habitat) จำเพาะ การปรากฏของยีสต์แต่ละชนิดในแหล่งที่อยู่นั้นขึ้นอยู่กับลักษณะทางสรีรวิทยาของยีสต์นั้น ๆ ได้แก่ ความสามารถในการใช้สารประกอบบางชนิด และความสามารถในการเจริญในสภาวะแวดล้อม เช่น *Candida sonorensis* พบในเนื้อเยื่อกระบอกเพชร ยีสต์ที่ชอบอุณหภูมิต่ำ (psychrophilic yeast) และยีสต์จากเศษอาหาร (Kuncharoen et al, 2020) ในแถบขั้วโลก ดังนั้นสารประกอบอินทรีย์ที่ทำหน้าที่เป็นแหล่งคาร์บอนและสารอาหาร และสภาวะแวดล้อมของแหล่งที่อยู่เหล่านั้น จะร่วมกันกำหนดชนิดของยีสต์ที่พบ ดังนั้นการแพร่กระจายของยีสต์ในธรรมชาติอาจเกิดโดยละอองลอยในอากาศ มีสัตว์เป็นพาหะและกิจกรรมของมนุษย์ ตลอดจนส่งเสริมการเจริญของพืช (Kurtzman & Robnett, 1998; Tapia-Vázquez et al., 2020) ยีสต์ที่พบบนดอกไม้ เช่น สายพันธุ์ *Candida phlcherrima* และ *Cryptococcus* sp. ยีสต์ที่พบบนผลไม้ เช่น สายพันธุ์ *Hanseniaspora uvarum* และ *Pichia kluyveri* ยีสต์ที่พบบนใบพืช เช่น สายพันธุ์ *Cryptococcus* sp. และ *Rhodotorula* sp. แม้กระทั่งยางไม้หลายชนิดก็ยังสามารถพบยีสต์ได้ เช่น สายพันธุ์ *Saccharomycodes ludwigii* ยีสต์หลายชนิดพบอยู่ในดินชนิดที่มีความแตกต่างกันทั้งองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ ยีสต์สกุล *Liomyces* และ *Debaryomyces* (Alfred, 2011; Yurkov, 2018) การนำยีสต์มาใช้ประโยชน์ก็พบในหลากหลายผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากงานวิจัย เช่น การพัฒนาผลิตภัณฑ์โยเกิร์ตผสมลูกจากเชื่อม (Sasiapa, 2021) ซึ่งเกิดจากบทบาทของยีสต์ในการบวกรวมกัน เป็นต้น วิทยาลัยพยาบาลพัฒนาเป็นพื้นที่ของมหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร ซึ่งตั้งอยู่ในพื้นที่ตำบลชัยบาดาล อำเภอย้ายบาดาล จังหวัดลพบุรี โดยมีพื้นที่ทางด้านทิศใต้เป็นภูเขาชื่อว่า “เขาพลวง” จัดเป็นป่าอนุรักษ์ที่มีระบบนิเวศที่ยังคงความสมบูรณ์ เนื่องจากไม่มีการรบกวนของมนุษย์ในพื้นที่ มีความหลากหลายทางธรรมชาติอยู่สูงเหมาะแก่การนำมาศึกษา สำรวจ เก็บรวบรวมทรัพยากรชีวภาพของประเทศไทย โดยเฉพาะความหลากหลายของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีจำนวนชนิดมากที่สุดเมื่อเทียบกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น รวมไปถึงจุลินทรีย์มีความหลากหลายทางชีวภาพ ในเชิงความหลากหลายของชนิดพันธุ์ (species diversity) ความหลากหลายทางพันธุกรรม (genetic diversity) และความหลากหลายทางนิเวศวิทยา (ecological diversity) (Rungcharoen et al., 2019) ดินมีลักษณะเป็นดินที่เกิดจากการผุร่อนของหินภูเขาไฟ ซึ่งพบเศษหินกระจายอยู่ทั่วไป บริเวณพื้นที่นี้มีลักษณะอุณหภูมิอากาศค่อนข้างร้อนและแห้งแล้งในฤดูแล้งพืชพรรณที่พบส่วนใหญ่จึงมีขนาดของลำต้นและความสูงไม่มากนัก (Bamrungsawad, 2012) อย่างไรก็ตามพื้นที่ป่าเขาพลวงมีความสำคัญด้านการเป็นพื้นที่ป่าปกปักษ์ในโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร (อพ. สธ.-มรภ. พระนคร) เป็นพื้นที่ที่ไม่มีการศึกษาชนิดของยีสต์มาก่อน นำมาสู่การสำรวจและเก็บรวบรวมข้อมูลการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรชีวภาพที่มีศักยภาพและสามารถนำมาพัฒนาและใช้ประโยชน์ตามภูมิปัญญาท้องถิ่นด้านต่าง ๆ ได้ สอดคล้องกับปรัชญา วิสัยทัศน์ และพันธกิจของวิทยาลัยพยาบาลพัฒนาที่มุ่งเน้นการพัฒนาตามความต้องการของท้องถิ่น พัฒนาด้านการเรียนรู้โดยมุ่งเน้นการวิจัยและนำกระบวนการวิจัยมาใช้เป็นหลักการศึกษา ค้นคว้าพัฒนาด้าน

ความรู้ของท้องถิ่นและสร้างเครือข่าย ใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติสิ่งแวดล้อมอย่างสมดุลและยั่งยืน สืบสานโครงการอันเนื่องมาจากพระราชดำริในการปฏิบัติการกิจของมหาวิทยาลัยเพื่อพัฒนาท้องถิ่น (Chongsuwat W., 2011) จึงทำให้ผู้วิจัยสนใจการคัดแยกสายพันธุ์ยีสต์ในพื้นที่แห่งนี้เพื่อจัดเก็บข้อมูลไว้เพื่อประโยชน์ต่อการวิจัยที่เป็นประโยชน์ต่อชุมชนท้องถิ่นต่อไปในอนาคต ทั้งในด้านการนำวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมาเพื่อผลิตน้ำมันไบโอดีเซล การทำน้ำหมักชีวภาพ ตลอดจนคาดหวังว่าอาจพบสายพันธุ์ใหม่ในพื้นที่ป่าแห่งนี้อีกด้วย

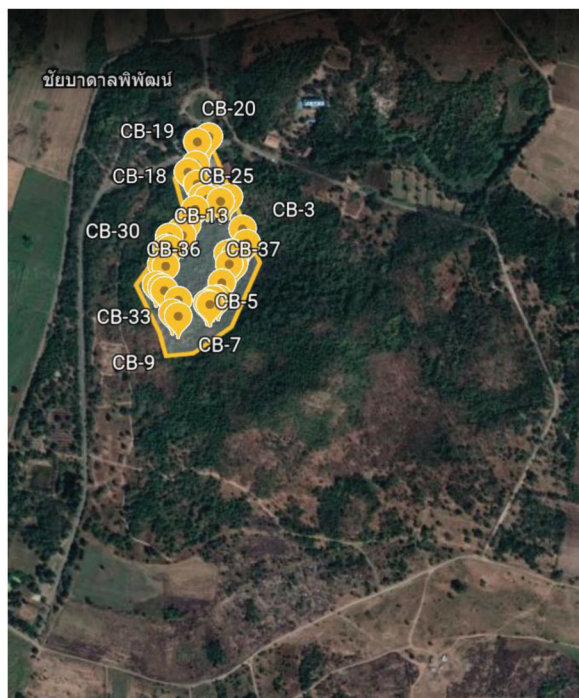
วิธีการ

1. การสุ่มเก็บตัวอย่างดิน

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจากพื้นที่ป่าเขาพลวง วิทยาลัยชัยบาดาลพิพัฒน์ จังหวัดลพบุรี (ภาพที่ 1) ในช่วงเดือนมิถุนายนและเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2563 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว โดยสุ่มเก็บดินจากการแบ่งพื้นที่ตามวิธีวิธีการสุ่มเก็บตัวอย่างแบบง่าย (simple random sampling) ร่วมกับการใช้วิจารณญาณ (judgment method) ทุก ๆ ระยะ 100 - 200 เมตร บริเวณใต้ต้นไม้ที่มีใบไม้ทับถมหรือมีลูกไม้ตก และบริเวณหน้าผาหินมีความชื้น (Yurkov, 2018) ตามพิกัดเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติเขาพลวง ระยะทาง 1 กิโลเมตร คำนวณพื้นที่ด้วยโปรแกรม Google Earth Pro (เวอร์ชัน 7.3.4.8573, บริษัท Google, สหรัฐอเมริกา) คิดเป็นพื้นที่ 53,564.78 ตารางเมตร ดังแสดงในภาพที่ 2 จากนั้นใช้พลั่วขุดจากหน้าดินลึกลงไป 0-15 เซนติเมตรเป็นรูปตัว V เก็บตัวอย่างดินปริมาณ 50 กรัม จำนวน 40 จุดเก็บ กำหนดรหัส Chaibadan (CB)-1 ถึง Chaibadan (CB)-40 บรรจุใส่ถุงพลาสติกซิปล็อค เก็บที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียส ก่อนนำมาศึกษาต่อไป



ภาพที่ 1 แผนที่ป่าเขาพลวง วิทยาลัยชัยบาดาลพิพัฒน์ จังหวัดลพบุรี



ภาพที่ 2 พื้นที่เก็บตัวอย่างดินตามพิกัดเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติป่าเขาพลวง

2. การคัดแยกยีสต์จากดินโดยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเชื้อ (culture-dependent method)

คัดแยกยีสต์จากตัวอย่างดินที่สุ่มเก็บด้วยเทคนิคการเพิ่มจำนวน (Enrichment Culture Technique) ร่วมกับการใช้อาหารคัดเลือกจำเพาะ (Selective media) และบ่มในสภาวะที่เหมาะสมกับการเจริญของยีสต์ โดยใส่ตัวอย่างดินปริมาณ 5 กรัม ลงในอาหารเหลวสูตร Acidified Yeast Extract Malt Extract Broth ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอล เข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์โอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 บ่มบนเครื่องเขย่าที่ความเร็ว 160 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส นาน 2-7 วัน จากนั้นแยกยีสต์ที่เจริญบนอาหารดังกล่าวมาเลี้ยงต่อบนอาหารกึ่งแข็งสูตร Acidified Yeast Extract Malt Extract Agar ที่มีสารปฏิชีวนะคลอแรมเฟนิคอลเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อลิตร และกรดโพธิ์โอนิก 0.1 เปอร์เซ็นต์ ปรับพีเอชเป็น 3.7 ด้วย Spread plate technique บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง คัดเลือกเก็บโคโลนีที่มีความแตกต่างกัน และนำไปทำให้บริสุทธิ์ (Pure culture) ด้วยเทคนิค Cross streak บนอาหารสูตร Yeast Extract Malt Extract (YM) Agar (ดัดแปลงวิธีการจาก Sumpradit et al., (2015) และ Kurtzman & Sugiyama, 2001) เก็บเชื้อยีสต์บริสุทธิ์ไว้ใช้ในการศึกษาลักษณะฟีโนไทป์ที่สำคัญของยีสต์ตามวิธีการมาตรฐานทางอนุกรมวิธานของยีสต์ โดยศึกษาคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา (Barnett et al., 2000) ซึ่งพิจารณาลักษณะโคโลนีของยีสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (Stereo Microscope) และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี Lactophenol Cotton Blue (LPCB) ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Light Microscope)

3. การจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

การระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์เพื่อระบุชนิดยีสต์โดยเปรียบเทียบศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS (White et al., 1990) และลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ D1/D2 domain ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) หรือ 26S rDNA โดยใช้ไพรเมอร์ (Primer) NL1 และ NL4 (Sumpradit, 2005) โดยสกัดดีเอ็นเอของยีสต์ เพิ่มปริมาณดีเอ็นเอบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ของยีสต์ตามวิธีของ Kurtzman & Robnett (1998) วิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) เพื่อรับรองผล

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การแยกยีสต์ในดินป่าเขาพลวง

จากการนำดินที่เก็บมาจากพื้นที่เขาพลวง วิทยาลัยพยาบาลพัฒน มหาววิทยาลัยราชภัฏพระนคร จำนวน 40 ตัวอย่าง ที่สุ่มเก็บดินในช่วงเดือนมิถุนายนและเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2563 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและฤดูหนาว โดยวิธี culture-dependent method พบว่าสามารถคัดเลือกลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันทั้งหมดที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อได้ 126 ไอโซเลท ซึ่งมาจากดินทุกตัวอย่างที่ศึกษา โดยป่าเขาพลวงประกอบด้วยป่าไม้ผลัดใบชนิดป่าเต็งรัง เป็นไม้หลักผสมกับป่าเบญจพรรณที่มีพืชลักษณะเด่นหลายชนิด เช่น มะค่า ตะโก ไผ่เพ็ก ตั้ว พุทราป่า เป็นต้น ดินมีลักษณะเป็นดินที่เกิดจากการผุร่อนของหินภูเขาไฟ ซึ่งพบเศษหินกระจายอยู่โดยทั่วไป ดินมีความชื้นต่ำ เนื่องจากพื้นที่บริเวณนี้มีลักษณะภูมิอากาศค่อนข้างร้อนและแห้งแล้งในฤดูแล้งมีค่าความเป็นกรดเป็นด่างอยู่ระหว่าง 6.4-6.8 พืชพรรณที่พบส่วนใหญ่จึงมีขนาดของลำต้นและความสูงไม่มาก และบางจุดก็มีการกำหนดปักต้นไม้ โดย Siringam et al. (2019) ซึ่งลักษณะกายภาพของดินที่สุ่มเก็บมีสีน้ำตาลเข้ม ร่วนซุย มีเศษหินขนาดเล็กปนอยู่ และมีเศษรากไม้กับเศษใบไม้ทับถมหรือมีลูกไม้ตก และบริเวณหน้าผาผิวดินมีความชื้น ซึ่งเป็นดินที่มีความเหมาะสมแก่การเจริญของยีสต์ อ้างอิงจากผลงานวิจัยของ Jamai & Ettayebi (2013) ซึ่งรายงานว่ายีสต์สามารถพบได้ในดินหลากหลายชนิดและบริเวณที่พบจะมีการย่อยสลายของสารอินทรีย์เนื่องจากยีสต์เป็นผู้ย่อยสลายสารอินทรีย์และยีสต์ที่ยังมีชีวิตอยู่สามารถเจอได้ตั้งแต่ผิวดินลึกถึง 100 เซนติเมตร ยิ่งความลึกมากยิ่งขึ้นจำนวนน้อย (Yurkov, 2018) เมื่อนำดินตัวอย่างมาบ่มในอาหารสูตร acidified yeast extract malt extract broth ซึ่งมีการเติมสารปฏิชีวนะ คลอแรมเฟนิคอล และกรดโพทิโอนิก ลงในอาหารส่งผลในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราบางชนิด และช่วยรักษาสภาพของเซลล์ให้อยู่ในสภาพพร้อมใช้งานและเป็นการเพิ่มจำนวน

2. ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์บริสุทธิ์

ผลการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์บริสุทธิ์ โดยพิจารณาจากลักษณะโคโลนีของยีสต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ และลักษณะทางสัณฐานวิทยาด้วยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสี Lactophenol Cotton Blue (LPCB) ศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แสดงให้เห็นลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน 4 ชนิด ดังสรุปในตารางที่ 1

3. ผลการจัดจำแนกยีสต์โดยอาศัยอนุกรมวิธานระดับโมเลกุลด้วยการระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์

ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์โดยศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.) รายงานว่าการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยการวิเคราะห์ลำดับเบสในส่วน ITS พบยีสต์ 3 สายพันธุ์ คือ *Trichosporon asahii*, *Candida tropicalis*, และ *Pichai* sp. และในส่วนของ D1/D2 LSU rDNA พบยีสต์ 1 สายพันธุ์ คือ *Dipodascus albidus* โดยแสดงร้อยละความเหมือน (% Similarity) และความยาวของนิวคลีโอไทด์ในตารางที่ 2 ซึ่งการเปรียบเทียบความเหมือนของลำดับนิวคลีโอไทด์ในส่วน ITS และบริเวณ D1/D2 ของ 26S rRNA gene ซึ่งมีขนาดประมาณ 500-600 นิวคลีโอไทด์ เป็นบริเวณที่มีวิวัฒนาการเร็ว จึงเป็นบริเวณที่มีความแตกต่างมากในลำดับนิวคลีโอไทด์ของ rRNA gene ความแตกต่างในบริเวณนี้พอเพียงที่จะแบ่งแยกสปีชีส์ของยีสต์ได้ ซึ่งหลักการพิจารณาตามหลักเกณฑ์การระบุสปีชีส์ยีสต์ โดยยีสต์ต่างสปีชีส์กันจะมีความแตกต่างกันของลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ D1/D2 domain ของ 26S rDNA มากกว่าร้อยละ 1 หรือประมาณ 6 นิวคลีโอไทด์ แต่ถ้าแตกต่างกัน 0-3 นิวคลีโอไทด์ จัดเป็นสปีชีส์ที่ใกล้ชิดกันมาก ๆ (sister species) และถ้าไม่แตกต่างกันเลย จะจัดว่าเป็นสปีชีส์เดียวกัน (conspecific species) (Sumpradit, 2005; Kurtzman & Robnett, 1998)

ตารางที่ 1 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อและลักษณะทางสัณฐานภายใต้กล้องจุลทรรศน์

จุดเก็บดิน	โคโลนี	ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์
CB-13	ลักษณะกลม (circular) ขอบเป็นเส้นใย	ทรงกระบอกต่อกันเป็นเส้นสายยาวขนาดเล็ก
CB-20	เส้นสั้น ๆ (filamentous) สีขาวขุ่น	สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อเส้นสายกลุ่มใยราเทียม
CB-29	ทึบแสง (white and opaque) มีลักษณะ	(pseudomycelium)
CB-31	นูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร (convex)	
CB-32		
CB-9	ลักษณะกลม ขอบเรียบ (entire) สีขาว	วงกลมขนาดใหญ่ (round and large) สืบพันธุ์แบบ
CB-17	ขุ่นทึบแสง ผิวเรียบด้าน (smooth and	ไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding)
CB-19	dull) ยกตัวนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	
CB-21	ลักษณะคล้ายร่ม (umbonate)	
CB-25		
CB-34		
CB-20	ลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวขรุขระด้าน	หัวแหลมท้ายแหลมคล้ายลูกมะนาวฝรั่งขนาดกลาง
CB-26	(rough) สีขาวขุ่นทึบแสง โคโลนีแบน	สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการแตกหน่อ
	ไปกับผิวหน้าอาหาร (raised)	
CB-21	ลักษณะกลม ขอบเป็นเส้นใยเส้นสั้น ๆ	วงกลมขนาดใหญ่ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการ
CB-34	สีขาวโปร่งแสง (white and translucent)	แตกหน่อ
	โคโลนียกตัวนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร	

ตารางที่ 2 ชื่อสายพันธุ์ยีสต์ ร้อยละความเหมือน และความยาวนิวคลีโอไทด์ของยีสต์

ชื่อสายพันธุ์ยีสต์ (Yeast strain name)	ร้อยละความเหมือน (% Similarity)	ความยาวนิวคลีโอไทด์ (bp)
<i>Trichosporon asahii</i>	100	513
<i>Candida tropicalis</i>	100	494
<i>Pichai sp.</i>	99.12	496
<i>Dipodascus albidus</i>	91.47	1061

หมายเหตุ ผลการพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อระบุชนิดยีสต์จากศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.)

เมื่อพิจารณาลักษณะพื้นฐานวิทยาดังแสดงในภาพที่ 3 (ก) - (ง) พบว่า *Trichosporon asahii* พบที่บริเวณจุดเก็บดิน CB-13, CB-20, CB-29, CB-31 และ CB-32 โคโลนีลักษณะกลม ขอบเป็นเส้นใยเส้นสั้น ๆ สีขาวขุ่น ทึบแสง มีลักษณะนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นทรงกระบอกต่อกันเป็นเส้นสายยาวขนาดเล็ก สืบพันธุ์โดยการแตกหน่อเส้นสายเส้นกลุ่มใยราเทียม (pseudomycelium) *Candida tropicalis* พบที่บริเวณจุดเก็บดิน CB-9, CB-17, CB-19, CB-21, CB-25 และ CB-34 โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ สีขาวขุ่น ทึบแสง ผิวเรียบด้าน ยกตัวนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหารลักษณะคล้ายร่ม ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวงกลมขนาดใหญ่ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ *Pichai sp.* พบที่บริเวณจุดเก็บดิน CB-20 และ CB-26 โคโลนีลักษณะกลม ขอบเรียบ ผิวขรุขระด้าน สีขาวขุ่นทึบแสง โคโลนีแบนไปกับผิวหน้าอาหาร ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นแบบหัวแหลมท้ายแหลมคล้ายลูกมะนาวฝรั่งขนาดกลาง สืบพันธุ์แบบอาศัยเพศโดยการแตกหน่อ และ *Dipodascus albidus* พบที่บริเวณจุดเก็บดิน CB-21 และ CB-34 โคโลนีลักษณะกลม ขอบเป็นเส้นใยเส้นสั้น ๆ สีขาวโปร่งแสง โคโลนียกตัวนูนขึ้นจากผิวหน้าอาหาร ลักษณะเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เป็นวงกลมขนาดใหญ่ สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ

เมื่อพิจารณาการกระจายของยีสต์ที่พบบริเวณป่าเขาพลวง (ตารางที่ 3) แสดงให้เห็นว่าพบ *Candida tropicalis* มากที่สุด 6 ไอโซเลท รองลงมาคือ *Trichosporon asahii* 5 ไอโซเลท, *Pichai sp.* 2 ไอโซเลท และ *Dipodascus albidus* 2 ไอโซเลท ตามลำดับ ซึ่ง *C. tropicalis* เป็นยีสต์กลุ่ม Budding Yeast สืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ (asexual diploid organism) พบได้ทั่วไปโดยเฉพาะในพื้นที่เขตร้อนบริเวณรอบเส้นศูนย์สูตรของโลก และสามารถคัดแยกได้จากตัวอย่างหลากหลายประเภท (Prasatsri, 2006; Boonmak et al., 2009; Chanklan et al., 2012) สามารถย่อยสลายสารอินทรีย์คาร์บอนที่หลากหลายเพื่อใช้เป็นแหล่งคาร์บอนและแหล่งพลังงานในการเจริญ (Jamai, L. & Mohamed, 2013) นอกจากนี้ยังพบว่า *C. tropicalis* หลายสายพันธุ์ที่คัดแยกจากตัวอย่างในธรรมชาติ สามารถย่อยเซลลูโลสหรือไซแลนได้ Soetarto, 1998; Thongekkaew et al., 2011; Sulman & Rehman, 2013; Hermansyah & Wiraningsih, 2016) *Trichosporon asahii* มีความสามารถในการย่อยได้ทั้งแป้ง คาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส และไซแลน (Kaewwichian, R. & Khamthaiklang, S., 2017) และรายงานของ Limtong et al. (2002) ที่พบ *T. asahii* ในลูกแป้งข้าวหมากสามารถผลิตเอนไซม์แอมิเลส (amylase) *Pichai sp.* เกี่ยวข้องกับกระบวนการผลิตอาหารและอาหารสัตว์ ซึ่งสามารถพบได้ในอาหารกลุ่มนี้ เนื่องจากสามารถเจริญได้ในที่ความเป็นกรด-เบส

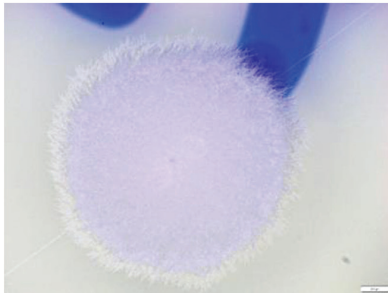
ต่ำ แรงดันออสโมซิสสูง และมีปริมาณออกซิเจนน้อย นอกจากนี้ยังมีความสามารถใช้แหล่งไนโตรเจนและฟอสฟอรัสที่หลากหลาย ส่งผลต่อการลดมลภาวะต่อสิ่งแวดล้อมจากขยะอินทรีย์ทางการเกษตร (Passoth et al., 2005) และ *Dipodascus albidus* เป็นยีสต์กลุ่ม Budding Yeast พบได้จากยางของต้น Puya (Bromeliaceae) ยางของต้น Betula (Corylaceae) (Lagerheim, 1892)

ตารางที่ 3 การกระจายของยีสต์ที่พบบริเวณป่าเขาพลวง วิทยาลัยชัยบาดาลพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

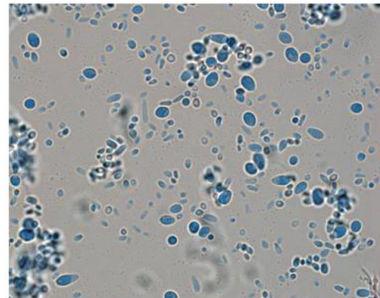
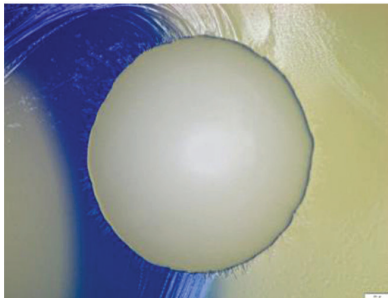
จุดเก็บดิน	ยีสต์			
	<i>Trichosporon asahii</i>	<i>Candida tropicalis</i>	<i>Pichai sp.</i>	<i>Dipodascus albidus</i>
CB-9	-	+	-	-
CB-13	+	-	-	-
CB-17	-	+	-	-
CB-19	-	+	-	-
CB-20	+	-	+	-
CB-21	-	+	-	+
CB-25	-	+	-	-
CB-26	-	-	+	-
CB-29	+	-	-	-
CB-31	+	-	-	-
CB-32	+	-	-	-
CB-34	-	+	-	+

หมายเหตุ เครื่องหมาย + พบ - ไม่พบ

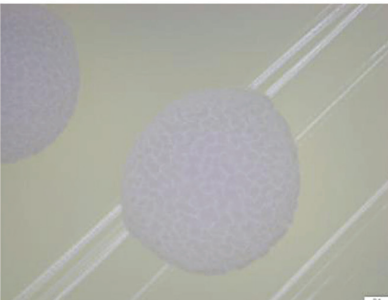
4. การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการ



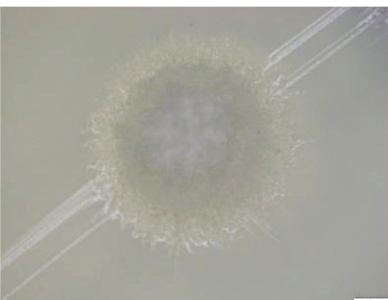
(ก)



(ข)

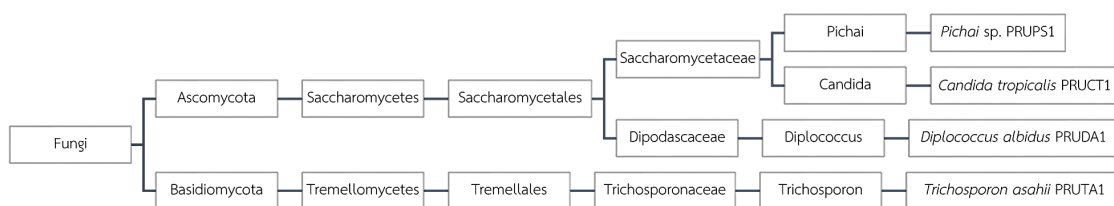


(ค)



(ง)

ภาพที่ 3 ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกันของยีสต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ กำลังขยาย 45 เท่า และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของยีสต์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง กำลังขยาย 60 เท่า
(ก) *Trichosporon asahii* (ข) *Candida tropicalis* (ค) *Pichai* sp. (ง) *Dipodascus albidus*



ภาพที่ 4 แผนภาพสายวิวัฒนาการ (Phylogenetic tree) ของยีสต์ที่พบในดินป่าเขาพลวง
วิทยาลัยชัยบาดาลพิพัฒน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร

สรุป

การระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์เพื่อระบุชนิดของยีสต์ป่าเขาพลวง วิทยาลัยชัยบาดาลพิพัฒน์ มหาวิทยาลัยราชภัฏพระนคร โดยใช้หลักการระบุตามวิวัฒนาการชาติพันธุ์ (phylogenetic identification) ตามพิกัดเส้นทางเดินศึกษาธรรมชาติเขาพลวงจำนวน 40 จุดเก็บ (CB-1 - CB-40) ในช่วงเดือนมิถุนายนและเดือนพฤศจิกายน พ.ศ.2563 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและฤดูหนาวประกอบด้วยการศึกษาฐานวิทยาของกลุ่มยีสต์ และพิสูจน์เอกลักษณ์เพื่อระบุชนิดยีสต์โดยศึกษาเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ ITS พบยีสต์ 3 ชนิด คือ *Candida tropicalis* PRUCT1, *Trichosporon asahii* PRUTA1, และ *Pichia* sp. PRUPS1 และเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนของ D1/D2 domain ของ large subunit ribosomal DNA (LSU rDNA) หรือ 26S rDNA พบยีสต์ 1 ชนิด คือ *Dipodascus albidus* PRUDA1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีบทบาทในระบบนิเวศ ตลอดจนสามารถนำมาใช้ประโยชน์ต่อยอดงานวิจัยเพื่อพัฒนาท้องถิ่นได้ในอนาคต อาทิเช่น การคัดเลือกยีสต์ที่มีสามารถในการสะสมไขมันสูง (Oleaginous Yeast) จากวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรเพื่อผลิตไบโอดีเซล

เอกสารอ้างอิง

- Alfred B. (2011). The importance and ecology of yeasts in soil, **Soil Biology and Biochemistry**, 43(1), 1-8.
- Bamrungsawad, K. (2012). **Development of A Nature Trail in the Khaoploung Forest at Chaibadanpiphat College**, Phranakhon Rajabhat University, Amphur Chai Badan, Lop Buri Province. (Master's thesis). Phranakhon Rajabhat University, Bangkok. (in Thai)
- Barnett, J.A., Payne, R.W. & Yarrow, D. (2000). **Yeasts: Characteristics and Identification**, 3rd edition. Cambridge University, New York.
- Boonmak, C., Jindamorakot, S., Kawasaki, H., Yongmanitchai, W., Suwanarit, P., Nakase, T. & Limtong, S. (2009). *Candida siamensis* sp. nov., an anamorphic yeast species in the *Saturnispora* clade isolated in Thailand. **FEMS: Yeast Research**, 9(4), 668-672.
- Chanklan, R., Kungkaew, P., Am-In, S. & Jindamorakot, S. (2012) Diversity of yeasts in the nature education center for mangrove conservation and ecotourism, Chonburi Province. **Thai Journal of Science and Technology**,1(3), 155-168.

- Chongsuwat, W. (2011) **Study Report No.3 Survey Design and Master Plan Project Chai Badan Phiphat College Phranakhon Rajabhat University.** Phranakhon Rajabhat University, Bangkok. (in Thai)
- Fell, J.W., Boekhout, T., Fonesca, A., Scorzetti, G. & Tallman, A.S. (2000). Biodiversity and systematics of basidiomycetous yeasts determined by large subunit rDNA D1/D2 domain sequence analysis. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, **50**, 1351-1371.
- Haelewaters, D., Toome-Heller, M., Albu, S., & Aime, M. C. (2020). Red yeasts from leaf surfaces and other habitats: three new species and a new combination of *Symmetrospora* (Pucciniomycotina, Cystobasidiomycetes). **Fungal systematics and evolution**, **5**, 187-196.
- Hermansyah, N. & Wiraningsih, M. (2016). Bioethanol production from cellulose by *Candida tropicalis*, as an alternative microbial agent to produce ethanol from lignocellulosic biomass. Sriwijaya. **Journal of Environment**, **1**(1), 10-13.
- Jamai, L. & Ettayebi, M. (2013). Bioethanol production process using the non-conventional yeast *Candida tropicalis*. **International Renewable and Sustainable Energy Conference (IRSEC)**, 477-481.
- Kaewwichian, R. & Khamthaiklang, S. (2017). Yeast in Mangrove Forest Soil from the Central Thailand and Its Ability in the Degradation of Starch, Carboxymethyl cellulose and Xylan. **Burapha Science Journal**, **22**(3). (in Thai)
- Kuncharoen, N., Techo, S., Savarajara, A. & Tanasupawat, S. (2020). Identification and lipolytic activity of yeasts isolated from foods and wastes. **Mycology**, **11**(4), 279-286.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W. & Boekhout T. (2011). **The Yeasts (Fifth Edition)**. Elsevier Science. Inc., Amsterdam.
- Kurtzman, C.P. & 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.
- Kurtzman, C.P. & Sugiyama, J. (2001). Ascomycetous yeasts and yeastlike taxa, In D.J. McLaughlin and P.A. Lemke, eds. **The Mycota VII: Systematics and Evolution Part A**. Springer-Verlag, Berlin. 179-200.
- Lagerheim, G. (1892). *Dipodascus albidus*, eine neue, geschlechtliche Hemiascee. **Jahrb. Wiss. Bot.**, **24**, 549-565.
- Li, A.H., Yuan, F.X., Groenewald, M., Bensch, K., Yurkov, A.M., Li, K., Han, P.J., Guo, L.D., Aime, M.C., Sampaio J.P., Jindamorakot S., Turchetti B., Inacio J., Fungsin B., Wang Q.M., & Bai F.Y. (2020). Diversity and phylogeny of basidiomycetous yeasts from plant leaves and soil: Proposal of two new orders, three new families, eight new genera and one hundred and seven new species. **Studies in Mycology**, **96**, 17-140.

- Limtong, S., Sintara, S., Suwannarit, P., & Lotong, N. (2002). Yeast diversity in Thai traditional fermentation starter (Loog-pang). **Kasetsart Journal (Natural Sciences) (Thailand)**, **36**(2), 149-158.
- Limtong, S. (2013). Yeast genetics and guidelines for utilization. **Thai Journal of Genetics**, **S.1**(S1 (Special Issue 1)), 71-75. (in Thai)
- Lopandic, K. and Prillinger, H. (2001). Genotypic identification and phylogenetic characterization of yeasts from Austrian dairy products. **Fachgruppe Mikrobiologie und Molekularbiologie**. 117-118.
- Oslan S.N., Salleh A.B., Rahman R.N., Basri M. & Chor A.L.T. 2012. Locally isolated yeasts from Malaysia: identification, phylogenetic study and characterization. **Acta Biochimica Polonica** **59**(2). 225-229.
- Passoth V., Fredlund E., ÄdelDruvefors U., & Schnürer J. (2005). Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. **Yeast Research**. 1567-1364
- Prasatsri, K. (2006). **Identification of Yeast isolated from organic matter in mangrove forest by conventional and molecular taxonomy**. Master of Science (Microbiology). Kasetsart University. (in Thai)
- Rungcharoen, C., Phunan, W., Nilsuwan, A., Boonme, N., Keawprasert, K. & Somwong-in. (2019). **Summary report on the performance of the resource protection project in the Khao Phluang forest area Activities to explore biological resources in the mushroom group that are useful in the ecosystem in the Khao Phluang forest area Chai Badan Phiphat College Lopburi. (Academic reports)**. Phranakhon Rajabhat University, Bangkok. (in Thai)
- Sasiapa., (2021). Development of yogurt with *Nypa fruitcans* in syrup. **Phranakhon Rajabhat Research Journal (Science and Technology)**, **16**(2), 1-11. (in Thai)
- Siringam, T., Vanijajiva, O. & Thaweesuk, A. (2019). **Resource Protection Project in the Khao Phluang Forest Area: Survey and Plant Coding, and Coordinating Code Activity at Chaibadanpiphat College, Lopburi Province. (Academic Report)**. Phranakhon Rajabhat University, Bangkok. (in Thai)
- Soetarto, E.S. (1998). Xylan degrading enzymes of the yeast *Candida tropicalis* strain R1. **Indonesian Journal of Biotechnology**. 173-179.
- Sulman, S. & Rehman, A. (2013). Isolation and Characterization of Cellulose Degrading *Candida tropicalis* W2 from Environmental Samples. **Pakistan Journal of Zoology**, **45**(3), 809-816.
- Sumpradit, T. (2005). **Yeast diversity in soils from hill evergreen, mixed deciduous, dry dipterocarp, and pine forests of Nam Nao National Park**. Kasetsart University/Bangkok. Retrieved from DOI: https://doi.nrct.go.th/ListDoi/listDetail?Resolve_DOI= [2021, 23 Jun.]

- Sumpradit, T., Wongvilair, R., & Wiangdao, S. (2015). **Yeast Species Diversity in Soils Collected from the Mixed Deciduous and Dry Evergreen Forests in Mae Wong National Park.** (Master's thesis). Naresuan University, Phitsanulok. (in Thai)
- Tapia-Vázquez, I., Sánchez-Cruz, R., Arroyo-Domínguez, M., Lira-Ruan, V., Sánchez-Reyes, A., Sánchez-Carbente, M.R., Padilla-Chacón, D., Batista-García, R.A., & Folch-Mallol, J.L. (2020). Isolation and characterization of psychophilic and psychrotolerant plant-growth promoting microorganisms from a high-altitude volcano crater in Mexico. **Microbiological Research**, 232.
- Thongekkaew, J., Khumsap, A. & Chatsa-nga, P. (2011). Yeasts in mixed deciduous forest areas of Phujong Nayoy National Park and their ability to produce xylanase and carboxymethyl cellulase. Songklanakarin. **Journal of Science and Technology**, 34 (2), 157-163.
- Vandamme P., Pot B., Gillis M., P de Vos, Kersters K., & Swings, J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. **Microbiological Reviews**, 60(2), 407-438.
- White, T.J., Bruns, T., Lee, S. and Taylor, J.W. (1990). **Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics.** In: Innis M, Gelfand D, Sninsky JJ & White TJ (Eds) PCR protocols Academic Press, San Diego, California. 315–322.
- Yurkov A. M. (2018). Yeasts of the soil - obscure but precious. **Yeast (Chichester, England)**, 35(5), 369–378.

=====