

รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ  
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การจำแนกชนิดของโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี  
โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Molecular Identification of Species of Some Protists  
at Samaesarn Island, Chonburi Province

อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

สุชา เฉยศิริ

รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และ ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

## บทคัดย่อ

การจำแนกและระบุชนิดของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่ถูกต้องบ่อยครั้งต้องอาศัยความช่วยเหลือจากผู้เชี่ยวชาญหรือการใช้เทคนิคพิเศษช่วยในการศึกษา เช่น การย้อมสี และ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาศักยภาพในการใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางอนุชีววิทยาในการระบุชนิดของซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายหน้าดินบริเวณชายฝั่งทะเล โดยทำการเก็บตัวอย่างทรายจากพื้นที่หาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ระหว่างปี 2554-2555 ทำการสกัดโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตออกจากทรายตัวอย่างโดยการไล่ด้วยน้ำทะเลแข็ง จากนั้นทำการสำรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงและเพาะเลี้ยงซิลิเอตบางส่วนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-Si เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป จากการศึกษาพบซิลิเอตจำนวน 46 ชนิด ได้แก่ *Aspidisca* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps pulcher*, *Coleps tessellatus*, *Coleps* sp., *Condylostoma arenarium*, *Condylostoma enigmatica*, *Diophrys* sp., *Euplotes* sp. 1-3, *Euplotidium* sp., *Frontonia* sp., hypotrichs 01-05, karyorelicteans 01-16, *Kentrophoros* sp., *Litonotus* sp., *Loxodes* sp. 1-3, *Loxophyllum* sp., *Mesodinium* sp., *Pleuronema* sp., *Protocruzia* sp., *Stichotricha* sp., *Uronema* sp. และ *Uronychia* sp. อีกทั้งสามารถเพาะเลี้ยงซิลิเอตจนบริสุทธิ์ได้จำนวน 8 สายพันธุ์ ซึ่งอยู่ในสกุล *Euplotes* จำนวน 2 สายพันธุ์, *Protocruzia* 1 สายพันธุ์ และ *Uronema* 3 สายพันธุ์ นำซิลิเอตที่บริสุทธิ์จำนวน 5 สายพันธุ์ คือ *Euplotes* และ *Uronema* มาศึกษาเพิ่มเติมในระดับอนุชีววิทยา การเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพโรเมออร์ที่ออกแบบใหม่สำหรับยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเอตทั้ง 5 สายพันธุ์ โดยบริเวณที่เพิ่มจำนวนนี้จะครอบคลุมส่วนของสมอลซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ, internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S, internal transcribed spacer 2 (ITS2) และ 1,300 คู่เบสแรกของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ พบว่า *Euplotes* 2 สายพันธุ์ที่ทำการศึกษามีลำดับนิวคลีโอไทด์ต่างกันถึง 43 ตำแหน่ง ซึ่งตรงกับลักษณะรูปร่างของทั้งสองสายพันธุ์ที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน สำหรับ *Uronema* ทั้ง 3 สายพันธุ์ พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์เหมือนกัน 100% สอดคล้องกับการตรวจศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่แสดงรูปร่างที่คล้ายคลึงกัน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางอนุชีววิทยาในการแยกและระบุชนิดของซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายชายฝั่งทะเล อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาตัวอย่างซิลิเอตในกลุ่มอื่นเพิ่มเติมและศึกษาลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณอื่นของไรโบโซมอลดีเอ็นเอเพื่อยืนยันถึงศักยภาพในการประยุกต์ใช้สูงสุดของการรวมสองวิธีนี้เข้าด้วยกันในการระบุชนิดของซิลิเอต

คำสำคัญ: การระบุชนิด เทคนิคทางชีวโมเลกุล โพรติสต์ ไรโบโซมอลดีเอ็นเอ อนุกรมวิธาน

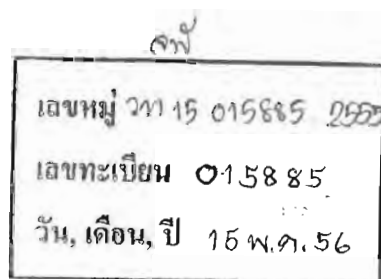
## Abstract

Help of experts and special procedures, such as specific staining and electron microscopy, are often required for correct identification of ciliated protists. Here, we examined the potential use of combined morphological and molecular approaches for identifying marine benthic interstitial ciliates. Sand samples were collected from Look-Lom Beach, Samaesarn Island, Chonburi Province during 2011-2012. Ciliates were extracted from the samples using seawater ice melting method. The organisms were then observed under a light compound microscope and some were cultured in an f/2-Si medium for further study. Forty six species of ciliates were encountered, namely *Aspidisca* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps pulcher*, *Coleps tessellatus*, *Coleps* sp., *Condylostoma arenarium*, *Condylostoma enigmatica*, *Diophrys* sp., *Euplotes* sp. 1-3, *Euplotidium* sp., *Frontonia* sp., hypotrichs 01-05, karyorelicteans 01-16, *Kentrophoros* sp., *Litonotus* sp., *Loxodes* sp. 1-3, *Loxophyllum* sp., *Mesodinium* sp., *Pleuronema* sp., *Protocruzia* sp., *Stichotricha* sp., *Uronema* sp., and *Uronychia* sp. Clonal and pure cultures were successfully established for eight ciliate isolates belonging to three genera [i.e., *Euplotes* (2 isolates), *Protocruzia* (1), and *Uronema* (3)]. Five of these eight pure cultures [i.e., *Euplotes* and *Uronema*] were additionally investigated at molecular level. The PCR amplification and DNA sequencing with newly designed primers were performed to obtain ribosomal DNA (rDNA) sequences of the five ciliates, which cover small subunit (SSU) ribosomal DNA, internal transcribed spacer 1 (ITS1), 5.8S, internal transcribed spacer 2 (ITS2), and the first ~1,300 bp of large subunit (LSU) ribosomal DNA. Sequence analysis of the partial LSU rDNA sequences showed number of nucleotide differences of 43 positions between two isolates of *Euplotes* spp. and nucleotide similarity of 100% among three isolates of *Uronema*. This result is consistent with examination based on light microscopy which suggests their anatomical differences for the former and their similar morphological features for the latter. Our study demonstrated the capability of using combination of morphological and molecular data for discriminating and classifying the marine interstitial ciliates. However, further study of additional ciliate samples and other regions of the rDNA gene should be conducted to ensure ultimate utilization of this combined approach.

**Keywords:** species identification, molecular technique, protist, ribosomal DNA, taxonomy

## สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญเรื่อง.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ.....	2
ขอบเขตของการวิจัย.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	3
การปฏิบัติงานในภาคสนาม.....	3
การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ.....	4
สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล.....	11
ผลการศึกษา.....	12
การปฏิบัติงานในภาคสนาม.....	12
ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง.....	12
ช่วงการเก็บตัวอย่างจริง.....	12
การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ.....	12
การศึกษาตัวอย่างในระดับสัณฐานวิทยา.....	12
การเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่ศึกษาให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์.....	13
การศึกษาซิลิเอตในระดับอนุชีววิทยาด้วยรหัสดีเอ็นเอ.....	30
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา.....	37
เอกสารอ้างอิง.....	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ.....	43



## สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 รายชื่อซิลิเกตที่พบบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี.....	20
ตารางที่ 2 ชนิดของซิลิเกตบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่สามารถเพาะเลี้ยงอยู่ รอดได้ในห้องปฏิบัติการ.....	30

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	ตำบล
พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกกลมที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร	
แสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี.....	3
ภาพที่ 2	4
อุปกรณ์ภาคสนามที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทราย.....	
ภาพที่ 3	5
การสกัดโปรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีการไล่น้ำแข็ง.....	
ภาพที่ 4	14
พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกกลมโดยทั่วไป.....	
ภาพที่ 5	15
พื้นที่เก็บตัวอย่างและหาดทรายบริเวณหาดลูกกลม.....	
ภาพที่ 6	16
ขั้นตอนการบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกกลม.....	
ภาพที่ 7	17
ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกกลมโดยใช้ช้อนพรวน.....	
ภาพที่ 8	18
พื้นที่เก็บตัวอย่างทรายบางบริเวณของหาดลูกกลมที่ทรายมีลักษณะเนื้อทรายค่อนข้างหยาบ	
และมีก้อนกรวดและหินขนาดใหญ่แทรกอยู่จำนวนมาก.....	
ภาพที่ 9	19
การเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่ห่างออกไปจากชายฝั่งเล็กน้อย.....	
ภาพที่ 10	22
<i>Aspidisca</i> sp.....	
ภาพที่ 11	22
<i>Blepharisma</i> sp.....	
ภาพที่ 12	22
<i>Coleps pulcher</i> .....	
ภาพที่ 13	22
<i>Coleps tessellatus</i> .....	
ภาพที่ 14	23
<i>Coleps</i> sp.....	
ภาพที่ 15	23
<i>Condylostoma arenarium</i> .....	
ภาพที่ 16	23
<i>Condylostoma enigmatica</i> .....	
ภาพที่ 17	23
<i>Diophrys</i> sp.....	
ภาพที่ 18	24
<i>Euplotes</i> sp. 1.....	
ภาพที่ 19	24
<i>Euplotes</i> sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L.....	
ภาพที่ 20	24
<i>Euplotes</i> sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L.....	
ภาพที่ 21	24
<i>Euplotidium</i> sp.....	
ภาพที่ 22	25
<i>Frontonia</i> sp.....	
ภาพที่ 23	25
hypotrich 01.....	
ภาพที่ 24	25
hypotrich 02.....	
ภาพที่ 25	25
hypotrich 03 ( <i>Holosticha</i> sp.).....	
ภาพที่ 26	26
hypotrich 04.....	
ภาพที่ 27	26
hypotrich 05.....	
ภาพที่ 28	26
karyorelictean 01.....	
ภาพที่ 29	26
karyorelictean 02.....	
ภาพที่ 30	27
karyorelictean 03.....	
ภาพที่ 31	27
karyorelictean 04.....	
ภาพที่ 32	27
karyorelictean 06.....	
ภาพที่ 33	27
<i>Litonotus</i> sp.....	

## สารบัญภาพ (ต่อ)

	หน้า
ภาพที่ 34 <i>Loxophyllum</i> sp.....	28
ภาพที่ 35 <i>Mesodinium</i> sp.....	28
ภาพที่ 36 <i>Pleuronema</i> sp.....	28
ภาพที่ 37 <i>Uronema</i> sp. สายพันธุ์ SS.2.L.....	28
ภาพที่ 38 <i>Uronema</i> sp. สายพันธุ์ SS.3.L (1).....	29
ภาพที่ 39 <i>Uronema</i> sp. สายพันธุ์ SS.3.L (2).....	29
ภาพที่ 40 <i>Uronema</i> sp. สายพันธุ์ SS.3.L (3).....	29
ภาพที่ 41 <i>Uronychia</i> sp.....	29
ภาพที่ 42 ผลิตภัณฑ์ฟิซีอาร์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล หลังจากนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide.....	31



การจำแนกชนิดของโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี  
โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

Molecular Identification of Species of Some Protists  
at Samaesarn Island, Chonburi Province

ชิตชัย จันทร์ตั้งสี, สุชา เฉยศิริ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล

Chitchai Chantangsi, Sucha Choeisiri, and Malinee Chutmongkonkul

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนพญาไท แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330  
Department of Biology, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Phayathai Road, Pathumwan,  
Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยา รูปร่างที่แตกต่างกันของแต่ละช่วงวัยในวงชีวิต ตลอดจนขนาดตัวซึ่งบางกลุ่มอาจมีขนาดไม่ใหญ่นัก สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่มีขนาดเล็ก เช่น โพรติสต์ สำหรับขนาดเล็ก (Chantangsi et al., 2007; Frézal and Leblois, 2008) ซึ่งการระบุชนิดจำเป็นต้องใช้เทคนิคอื่นเข้าช่วย เช่น การย้อมสี การตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน นอกจากนี้การระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตในบางกลุ่มย่อยอาจต้องอาศัยความชำนาญของผู้เชี่ยวชาญในการจัดจำแนก อย่างไรก็ตาม ความถูกต้องในการจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตนับเป็นสิ่งที่มีความสำคัญยิ่งในการศึกษาเชิงพื้นฐานทางด้านชีววิทยา และการศึกษาเชิงประยุกต์ในศาสตร์แขนงอื่นๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจหรือที่มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับมนุษย์ มีงานวิจัยหลายชิ้นแสดงให้เห็นถึงการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางด้านชีววิทยาเชิงโมเลกุลช่วยในการระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต ซึ่งให้ผลที่ถูกต้องและมีความแม่นยำสูง (Chantangsi et al., 2007; Chantangsi and Leander, 2010; Hebert et al., 2003a, b) จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์บริเวณเกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี พบความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้เป็นจำนวนมาก (มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ คณะ, 2544, 2546) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลช่วยในการศึกษาและระบุชนิดโพรติสต์ที่พบในบริเวณเกาะแห่งนี้ อันจะเป็นข้อมูลเชิงลึกที่จะนำไปสู่การนำสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการจำแนกและระบุชนิดที่ถูกต้องจากพื้นที่แห่งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแขนงอื่นๆ เช่น เซลล์วิทยาและวิวัฒนาการต่อไป

การจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตเป็นสิ่งที่มีความสำคัญยิ่งในการศึกษาด้านชีววิทยาและการศึกษาด้านอื่นๆ ที่ต้องการความถูกต้องในการระบุชนิดเป็นพื้นฐาน อย่างไรก็ตาม การจัดจำแนกและระบุชนิดให้ถูกต้องเป็นเรื่องที่กระทำได้ไม่ย่ายนัก ต้องอาศัยความชำนาญและความเชี่ยวชาญตลอดจนประสบการณ์ เนื่องจากความหลากหลายทางชีวภาพที่มีอยู่สูงในธรรมชาติ (Wilson, 2000, 2003)

Hebert et al. (2003a) ทดลองใช้ลำดับดีเอ็นเอสายสั้นๆ อย่างน้อย 400 คู่เบสของยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) จากจีโนมของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial genome) ในการจัดจำแนกและระบุชนิดของตัวแทนสัตว์จำนวน 2,238 ชนิดจาก 11 ไฟลัม พบว่าลำดับดีเอ็นเอจากยีนนี้สามารถใช้จัดจำแนกและระบุชนิดของสัตว์ได้อย่างถูกต้อง

การใช้รหัสดีเอ็นเอของยีน *cox1* ในการจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตไม่เพียงแต่มีการใช้ในสัตว์เท่านั้น หากแต่มีความพยายามที่จะนำไปใช้ในสิ่งมีชีวิตกลุ่มอื่นๆ ตัวอย่างเช่น โพรติสต์กลุ่มซิลิเอต (ciliates) (Barth et al., 2006; Chantangsi et al., 2007; Lynn and Strüder-Kypke, 2006), สาหร่ายสีแดง (LeGall and Saunders, 2010; Robba et al., 2006; Saunders, 2005) และ สาหร่ายไดโนแฟลกเจลเลต (Lin et al., 2009) การจำแนกชนิดของโพรติสต์ในอดีตจะอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาเป็นหลัก อย่างไรก็ตาม โพรติสต์บางกลุ่มบางสกุลจำเป็นต้องใช้วิธีการเฉพาะช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิด เช่น การย้อมสี การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Chantangsi et al. 2007; Corliss and Daggett, 1983) ยิ่งไปกว่านั้นโพรติสต์หลายสกุลมีวงชีวิตที่ประกอบไปด้วยสัณฐานวิทยาหลากหลายลักษณะ (polymorphic life cycle) สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นปัจจัยที่เพิ่มความยุ่งยากในการจำแนกและระบุชนิดของ โพรติสต์ อีกทั้งการศึกษาหลายชิ้นยังแสดงให้เห็นว่า ความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์ที่แท้จริงแล้วมีมากกว่าที่เราคิดและพบในปัจจุบันมากนัก (Brad et al., 2008; Chen et al., 2008; Massana and Pedrós-Alió, 2008; Park et al., 2008; Piquet et al., 2008; Šlapeta et al., 2005; Tian et al., 2009) วิธีการใช้รหัสดีเอ็นเอในการจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิตที่ประสบความสำเร็จในการใช้ระบุชนิดของสัตว์ จึงนับเป็นอีกทางเลือกที่จะช่วยเพิ่มความถูกต้องแม่นยำในการจำแนกและระบุชนิดของโพรติสต์ โดยงานวิจัยชิ้นนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในเชิงลึกของชนิดของโพรติสต์ที่พบบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยอาศัยข้อมูลทางด้านสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางด้านชีวโมเลกุล

#### วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อศึกษาการใช้ข้อมูลทางชีวโมเลกุลในการระบุชนิดของโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

#### ขอบเขตของการวิจัย

ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์ที่ดำรงชีวิตตามหน้าดินบริเวณหาดทรายชายฝั่งทะเลของเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและทางอนุชีววิทยาโดยใช้รหัสดีเอ็นเอของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA)

## วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการศึกษาวิจัยโพรติสต์ที่พบบริเวณพื้นที่เกาะเสม็ดเป็นเวลา 1 ปี (ตั้งแต่ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555)

### 1. การปฏิบัติงานในภาคสนาม

พื้นที่เก็บตัวอย่างคือ บริเวณหาดลูกกลม เกาะเสม็ด ตำบลเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยตัวหาดเป็นหาดทรายที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะ (ภาพที่ 1) การเก็บตัวอย่างเริ่มต้นด้วยการสังเกตและบันทึก ลักษณะ สี และตำแหน่งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างทรายที่ยังมีความชื้นหรือน้ำทะเลท่วมถึงด้วยข้อปนรวนลงในกล่องพลาสติกที่มีความจุปริมาตร 750 มิลลิลิตร จำนวน 12 กล่อง ต่อการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้ง (ภาพที่ 2) เนื่องจากไม่มีการรักษาสภาพตัวอย่าง ดังนั้นจึงนำตัวอย่างกลับมาศึกษาในห้องปฏิบัติการหลังการเก็บทันที



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกกลม (ซ้าย) ที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะเสม็ด (ขวา; กรอบสี่เหลี่ยม) ตำบลเสม็ด อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ภาพจาก Google Earth, 2011)



ภาพที่ 2 แสดงอุปกรณ์ภาคสนามที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทราย ได้แก่ กล่องพลาสติกและช้อนพรวน

## 2. การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักๆ คือ การศึกษาในระดับชั้นมหาวิทยาลัย และการศึกษาในระดับโมเลกุล

ก) การศึกษาชั้นมหาวิทยาลัยและเพาะเลี้ยงโพรติสต์บางชนิดจากทรายตัวอย่างที่เก็บมา เพื่อตรวจจำแนกกลุ่มสกุลและชนิดของตัวอย่างโพรติสต์ โดยโพรติสต์ที่ดำรงชีวิตแทรกอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายจะทำการสกัดโดยวิธีของ Uhlig (1964) โดยใส่ทรายตัวอย่างลงในกระบอกพลาสติกปลายเปิดที่หุ้มปลายด้านล่างด้วยผ้าตาข่ายขนาดตา 60 ไมครอน วางจานเพาะเชื้อที่บรรจุน้ำทะเลกรองไว้ใต้กระบอกพลาสติกบริเวณที่ติดกับผ้าตาข่าย จากนั้นใส่น้ำแข็งที่ทำจากน้ำทะเลกรองลงบนทรายตัวอย่าง ทิ้งไว้จนน้ำแข็งละลาย โพรติสต์ชนิดต่างๆ ที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายจะเคลื่อนที่ลงมาสะสมในน้ำทะเลกรองภายในจานเพาะเชื้อ (ภาพที่ 3) จากนั้นจึงนำตัวอย่างที่ได้ไปทำการศึกษาในขั้นต่อไป

l) การศึกษาชั้นมหาวิทยาลัยของตัวอย่างโพรติสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (light compound microscope) ที่กำลังขยายต่างๆ พร้อมบันทึกภาพ ในกรณีที่พบตัวอย่างโพรติสต์จำนวนมาก สามารถศึกษาตัวอย่างได้โดยใช้ปิเปตต์แก้วดูดและหยดน้ำตัวอย่างได้โดยตรงลงบนกระจกสไลด์ 1-2 หยด จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เคลือบยกขอบทั้ง 4 ด้านด้วยวาสลินบางๆ เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำตัวอย่าง บันทึกภาพตัวอย่างด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัลที่ต่อเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ ในกรณีที่พบตัวอย่างโพรติสต์จำนวนไม่มากนักต้องทำการแยกเซลล์ที่ต้องการศึกษาออกมาทีละเซลล์ โดยใช้ปิเปตต์แก้วลงไฟดึงปลายให้แหลม จากนั้นใช้ปิเปตต์ปลายแหลมนี้ทำการแยกเซลล์ภายใต้



ภาพที่ 3 แสดงการสกัดโปรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีการไล่ด้วยน้ำแข็ง

กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับ (inverted compound microscope) วางลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำทะเลอยู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และศึกษาตัวอย่างตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น ตัวอย่างสดบางส่วนที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงสามารถศึกษาได้โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับ พร้อมบันทึกภาพนิ่ง ภาพเคลื่อนไหว และวัดขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ประกอบในการระบุสกุลและชนิดของตัวอย่างต่อไป

II) การเพาะเลี้ยงโปรติสต์บางชนิดจากทรายตัวอย่าง (enrichment method) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica (Guillard, 1975; Guillard and Rytter, 1962) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโปรติสต์ที่อาศัยอยู่ตามหน้าดินชายฝั่งทะเลหลายชนิด โดยมีขั้นตอนดังนี้

- (1) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 24 หลุมๆ ละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร
- (2) ใส่ทรายตัวอย่างที่เก็บมาขนาดประมาณเท่าเม็ดถั่วเขียวลงไปในกลุ่มที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ จากนั้นเติมน้ำที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยง
- (3) วางจานเพาะเลี้ยงตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(4) ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของโปรติสต์ในงานเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือแบบเลนส์ประกอบหัวกลับทุกวัน

(5) เมื่อพบว่ามิโปรติสต์ชนิดไหนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก จึงทำการสกัดแยกโปรติสต์ชนิดนั้นให้บริสุทธิ์

III) การสกัดแยกและเพาะเลี้ยงโปรติสต์ให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว

(1) นำปาสเจอร์ปีเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งปลายให้แหลมโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์

(2) ใช้ปีเปตต์ดูดตัวอย่างเซลล์จากการเพาะเลี้ยงข้างต้นหยดลงบนสไลด์หลุมที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%

(3) ใช้ปีเปตต์ปลายแหลมดูดเซลล์โปรติสต์ที่สนใจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมาเพียง 1 เซลล์

(4) ล้างเซลล์โปรติสต์ด้วยน้ำทะเลกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

(5) นำเซลล์โปรติสต์ที่สะอาดแล้วใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 96 หลุม ตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับแบบใช้แสงว่าในแต่ละหลุมมีเซลล์โปรติสต์ที่ต้องการเพียงเซลล์เดียว

(6) เติมหาอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica ลงในหลุมๆ ละ 150 ไมโครลิตร และเติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(7) ทำการตรวจดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์โปรติสต์ที่คัดแยกไว้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับแบบใช้แสงทุกวัน

(8) ติดตามสังเกตปริมาณของเซลล์โปรติสต์และทำการย้ายเซลล์โปรติสต์ไปเลี้ยงในงานเพาะเชื้อพลาสติกชนิด 24 หลุม เมื่อพบว่ามิจำนวนเซลล์โปรติสต์หนาแน่นในแต่ละหลุม โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica ลงในงานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม จากนั้นใช้ปีเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์โปรติสต์ที่เลี้ยงไว้จากงานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในงานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม เติมายีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(9) ทำการตรวจดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์โปรติสต์ที่คัดแยกไว้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุกวัน และทำการย้ายเซลล์โปรติสต์ไปเลี้ยงในหลอดทดลองฝาเกลียว เมื่อพบว่ามิจำนวนเซลล์โปรติสต์หนาแน่นในแต่ละหลุม โดยใช้ปาสเจอร์ปีเปตต์แก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์โปรติสต์ที่เลี้ยงไว้จากงานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม มาประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica แล้วเติมายีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(10) เปลี่ยนถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และเติมหาอาหารใหม่ เมื่อพบว่าเซลล์โปรติสต์เริ่มโตช้าหรือมีจำนวนลดลง

(11) เลี้ยงและรักษาเซลล์โปรติสต์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เพื่อการศึกษาในระดับอนุชีววิทยาขั้นต่อไป

ข) การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในระดับโมเลกุลของตัวอย่างโปรติสต์

1) การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างโปรติสต์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ MasterPure™ Complete DNA & RNA Purification Kit ของ EPICENTRE (Madison, WI, USA, Cat. No. MC85200) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้

(1) ทำการแยกเซลล์โปรติสต์ที่พบและต้องการศึกษาเป็นเซลล์ๆ โดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลนไฟตั้งปลายจนแหลมเล็ก

(2) ล้างเซลล์ที่แยกออกมาในน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

(3) ดูดเซลล์ที่ล้างสะอาดแล้วใส่ลงใน 1X Tissue and Cell lysis buffer ปริมาตร 300 ไมโครลิตร

(4) ในกรณีของโปรติสต์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จะใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดเพาะเลี้ยงฝาเกลียวประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตร

(5) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วที่เหมาะสมเป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง

(6) เติม 2X Tissue and Cell lysis buffer ปริมาตร 150 ไมโครลิตร จากนั้นเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อไปให้ได้ปริมาตรสุดท้าย 300 ไมโครลิตร

(7) ทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างในข้อ (3) และ (6) ในขั้นตอนต่อไป ดังนี้

(8) เติมเอนไซม์ proteinase K 50 µg/µl ปริมาตร 1 ไมโครลิตร ลงในหลอดตัวอย่าง และผสมให้เข้ากันบนเครื่อง vortex mixer

(9) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อน (heat block) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที

(10) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างไปแช่บนน้ำแข็ง เพื่อลดอุณหภูมิเป็นเวลา 3-5 นาที

(11) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดสารละลาย MPC protein precipitation ปริมาตร 150 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่าง เขย่าอย่างต่อเนื่องเป็นเวลาอย่างน้อย 10 วินาที แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที

(12) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทั้งส่วนตะกอนกันหลอดไป

(13) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูด isopropanol ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีตัวอย่างอยู่ กลับหลอดขึ้นลง 30-40 ครั้ง เพื่อตกตะกอนดีเอ็นเอ

(14) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 11,000 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที แล้วเทส่วนน้ำใสทิ้ง เหลือส่วนของดีเอ็นเอที่ตกตะกอนไว้กันหลอด

(15) เติมเอทานอลความเข้มข้น 75% ลงในหลอดตัวอย่างปริมาตร 500 ไมโครลิตร เพื่อล้างตะกอนดีเอ็นเอ แล้วใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเฉพาะส่วนที่เป็นน้ำใสออก ทำซ้ำ 2 ครั้ง

(16) นำหลอดตัวอย่างไปตั้งโดยเปิดฝาไว้บนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเอทานอลในหลอดระเหยออกไปจนหมด

(17) เติมนสารละลายบัฟเฟอร์ทีอี (Tris EDTA buffer: TE) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อละลาย ตะกอนดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทำ ปฏิกริยาขั้นต่อไป

II) การทำปฏิกริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction: PCR) หรือพีซีอาร์

(1) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่เตรียมไว้ข้างต้นเป็นแม่พิมพ์ (template) สำหรับนำไปเพิ่มปริมาณไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA) สำหรับใช้ในการระบุชนิดของโปรตีนที่สกัดดีเอ็นเอไว้ด้วยเทคนิคพีซีอาร์ โดยใช้ KAPA2G™ Robust PCR Kit และ KAPA2G™ Robust HotStart PCR Kit (Kapa Biosystems, Inc., Woburn, MA, USA, Cat. No. KK5017 และ KK5531) โพรเมอร์ (primer) และสภาวะในการทำ ปฏิกริยา ดังต่อไปนี้

[1] 5X KAPA2G Buffer A	10	ไมโครลิตร
[2] MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1	ไมโครลิตร
[3] dNTP mix (10 mM each)	1	ไมโครลิตร
[4] Forward primer: SSU-NPF1 (5'-TGCGCTACCTGGTTGATCC-3')		
ความเข้มข้น 10 µM	4	ไมโครลิตร
[5] Reverse primer: 28S-1316R (5'-ATTCGGCAGGTGAGTTGTTACAC-3')		
ความเข้มข้น 10 µM	4	ไมโครลิตร
[6] ดีเอ็นเอจากข้อ (17)	30	ไมโครลิตร
[7] KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/µl)	0.4	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	50.4	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมนสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

โปรแกรม CIL3:

	Heat	95 °C	เป็นเวลา	5	นาที	
40 รอบ	{	Denaturation step	95 °C	เป็นเวลา	30	วินาที
		Annealing step	64 °C	เป็นเวลา	30	วินาที
		Extension step	72 °C	เป็นเวลา	2	นาที
		Final extension step	72 °C	เป็นเวลา	10	นาที
	Hold step	20 °C	จนกว่าจะนำปฏิกริยาออกจากเครื่อง			

(2) นำปฏิกริยาพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกริยาครั้งแรก (primary PCR) ข้างต้นไปใช้เป็นแม่พิมพ์ ในการทำปฏิกริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป (secondary PCR) โดยเติมนสารในการทำปฏิกริยาตามลำดับ ดังนี้

[1] 5X KAPA2G Buffer A	5	ไมโครลิตร
[2] MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	0.5	ไมโครลิตร
[3] dNTP mix (10 mM each)	0.5	ไมโครลิตร
[4] Forward primer: SSU-RPF1 (5'-ACCTGGTTGATCCTGCCAGT-3')		
ความเข้มข้น 10 µM	2	ไมโครลิตร



[5] Reverse primer: 28S-1316R (5'-ATTCGGCAGGTGAGTTGTTACAC-3')

ความเข้มข้น 10 $\mu$ M	2	ไมโครลิตร
[6] ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรกข้างต้น	2	ไมโครลิตร
[7] PCR grade water	12.8	ไมโครลิตร
[8] KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/ $\mu$ l)	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	25	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เตรียมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง thermal cycler ที่ตั้งโปรแกรมดังนี้

**โปรแกรม CIL4:**

	Heat	95 °C	เป็นเวลา	5	นาที
40 รอบ	{	Denaturation step	95 °C	เป็นเวลา	30 วินาที
		Annealing step	60 °C	เป็นเวลา	30 วินาที
		Extension step	72 °C	เป็นเวลา	2 นาที
		Final extension step	72 °C	เป็นเวลา	10 นาที
	Hold step	20 °C	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง		

โดยยีนและช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ถูกเพิ่มจำนวนขึ้นมา คือ บริเวณ ribosomal DNA (rDNA) ที่ประกอบด้วย ยีน 18S หรือ SSU rDNA (small subunit ribosomal DNA), ช่วงลำดับ ITS1 (internal transcribed spacer 1), ยีน 5.8S, ช่วงลำดับ ITS2 (internal transcribed spacer 2) และยีน 28S หรือ LSU rDNA (large subunit ribosomal DNA) ซึ่งมีขนาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากไพรเมอร์เหล่านี้ประมาณ 3,500 คู่เบส (base pair: bp)

(3) ตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้จากข้อ (1) และ (2) โดยการสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้า (agarose gel electrophoresis) ใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.8% และสารละลายบัฟเฟอร์ทีเออี (Tris Acetate EDTA buffer: TAE) พร้อม molecular marker ชนิด 1 kb plus (Invitrogen, Grand Island, NY, USA, Cat. No. 10787-018) โดยตั้งค่าแรงเคลื่อนไฟฟ้าที่ 100 โวลต์ เป็นเวลา 30 นาที

(4) หลังจากครบ 30 นาที นำแผ่นเจลไปย้อมในสารละลาย ethidium bromide เป็นเวลา 10 นาที

(5) ล้างสารละลาย ethidium bromide ส่วนเกินออกโดยนำแผ่นเจลไปแช่ในน้ำกลั่นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นตรวจสอบผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพ

(6) ทำปฏิกิริยาซ้ำในข้อ (1)-(5) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นมากพอในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวอย่างโปรติสต์ที่คัดแยกได้

(7) นำผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ทั้งหมดจากข้อ (6) ไปสกัดแยกด้วยกระแสไฟฟ้าใน agarose gel ที่ความเข้มข้น 0.8% และสารละลายบัฟเฟอร์ทีเออีตามข้อ (3) จากนั้นนำแผ่นเจลไปย้อมตามข้อ (4)-(5)

(8) นำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสงยูวีและใช้ไบมิทที่สะอาดตัดเอาเฉพาะเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 1.5 มิลลิลิตร

III) การทำความสะอาดผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ด้วย UltraClean™ 15 DNA Purification Kit (MO BIO Laboratories, Inc., CA, USA, Cat. No. 12100-300)

(1) เติม ULTRA SALT ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ที่มีแถบเจลดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการบรรจุอยู่ ผสมให้เข้ากัน

(2) นำหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส เป็นเวลาประมาณ 10-15 นาที ทิ้งไว้ให้เจลละลายจนหมด นำหลอดออกจากเครื่องให้ความร้อน ทิ้งไว้ให้เย็นลงที่อุณหภูมิห้อง

(3) ใส่ ULTRA BIND ปริมาตร 7 ไมโครลิตร ลงในสารละลายเจลข้อ (2) ผสมให้เข้ากันโดยกลับหลอดไปมาเป็นเวลาอย่างน้อย 5 นาที

(4) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและเก็บส่วนตะกอน ULTRA BIND ที่ก้นหลอดไว้

(5) เติม ULTRA WASH ปริมาตร 500 ไมโครลิตร ลงในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์ ดูดสารขึ้นลงให้ ULTRA WASH ผสมกับ ULTRA BIND จนไม่เหลือส่วนของ ULTRA BIND เป็นตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

(6) นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 30 วินาที เทส่วนน้ำใสทิ้งและเก็บส่วนตะกอน ULTRA BIND ที่ก้นหลอดไว้

(7) ทำซ้ำในข้อ (5) และ (6)

(8) นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วน ULTRA WASH ที่เหลืออยู่ในหลอดออกจนหมด

(9) นำหลอดตัวอย่างไปตั้งโดยเปิดฝาไว้บนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส จนกระทั่ง ULTRA WASH ในหลอดระเหยออกไปจนหมด

(10) ละลายดีเอ็นเอออกจาก ULTRA BIND โดยเติมน้ำ ultrapure water ปริมาตร 10-15 ไมโครลิตร ผสมจนเป็นเนื้อเดียวกันให้เข้ากับ ULTRA BIND จากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2-3 นาที

(11) นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นทริฟิวก์หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ส่วนของ ULTRA BIND ตกติดมากับส่วนน้ำใส

(12) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

IV) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีโอไทด์อัตโนมัติแบบธรรมดา (normal automatic sequencing) ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยทำการส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์เรสหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้วไปยังบริษัท MacroGen ประเทศเกาหลี เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

V) การตรวจดูลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม FinchTV (©PerkinElmer, Inc.) และวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้โดยนำไปเทียบเบี่ยงต้นกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology

Information (NCBI) โดยใช้ โปรแกรม BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) เพื่อช่วยในการจัดจำแนกและระบุชนิดของโปรติสต์ที่สำรวจพบ ร่วมกับการตรวจทางสัณฐานวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

VI) การวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์เพื่อหาความหลากหลายด้วยโปรแกรม MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) เวอร์ชัน 5 (Tamura et al., 2011) และ BioEdit (Hall, 1999)

#### สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

ภาคสนาม: บริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยตัวหาดเป็นหาดทรายที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร

ห้องปฏิบัติการ: ห้องปฏิบัติการ Protistology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ผลการศึกษา

### 1. การปฏิบัติงานในภาคสนาม

การปฏิบัติงานในภาคสนาม แบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ช่วง คือ

1.1 ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง เพื่อการวางแผนงานวิจัยและประเมินความหลากหลายเบื้องต้นของโพรติสต์ บริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ วันที่ 24 เดือน มีนาคม และ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2554 (ภาพที่ 4-9; ตารางที่ 1) โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วนและบันทึกภาพของโพรติสต์กลุ่มต่างๆ พบโพรติสต์ทั้งในกลุ่มโพรโตซัวและสาหร่ายขนาดเล็กจากการสำรวจสองครั้งในช่วงเดือนมีนาคมและพฤษภาคม พ.ศ. 2554 พบว่าบริเวณหาดลูกกลม มีความหลากหลายของซิลิเอตสูง เมื่อเปรียบเทียบกับหาดอื่นที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จะมุ่งเน้นการศึกษาความหลากหลาย และการจำแนกชนิดของซิลิเอตโดยวิธีทางชีวโมเลกุลที่พบบริเวณหาดลูกกลมเป็นหลัก โดยทำการจัดจำแนกกลุ่มและระบุชนิดของซิลิเอต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอ้างอิงจากหนังสือ Marine interstitial ciliates (Carey, 1992) ตลอดจนเอกสารและรูปวิธานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ลักษณะของรูปร่าง, ขนาด, จำนวนและตำแหน่งของนิวเคลียส, ร่องปาก และการจัดเรียงตัวของซิลิออลา ในการจัดจำแนก ในกรณีที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับชนิดจะทำการระบุเป็นระดับสกุล

1.2 ช่วงการเก็บตัวอย่างจริง ทำการเก็บตัวอย่างทรายเพื่อระบุชนิดและหารหัสดีเอ็นเอของซิลิเอตที่พบในทรายชายฝั่งทะเล บริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยเริ่มทำการเก็บตัวอย่างทรายจำนวน 5 ครั้ง (ภาพที่ 4-9; ตารางที่ 1) เพื่อระบุชนิดและหารหัสดีเอ็นเอของซิลิเอตที่พบในทรายชายฝั่งทะเล บริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ดังนี้

ครั้งที่ 1 วันที่ 10 กันยายน 2554

ครั้งที่ 2 วันที่ 21 มกราคม 2555

ครั้งที่ 3 วันที่ 28 มีนาคม 2555

ครั้งที่ 4 วันที่ 20 พฤษภาคม 2555

ครั้งที่ 5 วันที่ 21 กรกฎาคม 2555

### 2. การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบ่งออกได้เป็น 2 ส่วน คือ

#### 2.1 การศึกษาตัวอย่างในระดับสัณฐานวิทยา

จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาบริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร ในช่วงทดลองเก็บตัวอย่างและช่วงเก็บตัวอย่างจริง (ภาพที่ 4-9) และทำการเก็บทรายตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดโพรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีสกัดไล่โดยใช้น้ำแข็งของ Uhlig (1964) การส่องตรวจตัวอย่างโพรติสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบซิลิเอตจำนวน 46 ชนิด ได้แก่ *Aspidisca* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps pulcher*, *Coleps tessellatus*, *Coleps* sp., *Condylostoma arenarium*, *Condylostoma enigmatica*, *Diophrys* sp., *Euplotes* sp. 1-3,

*Euplotidium* sp., *Frontonia* sp., hypotrichs 01-05, karyorelicteans 01-16, *Kentrophoros* sp., *Litonotus* sp., *Loxodes* sp. 1-3, *Loxophyllum* sp., *Mesodinium* sp., *Pleuronema* sp., *Protocruzia* sp., *Stichotricha* sp., *Uronema* sp. และ *Uronychia* sp. (ตารางที่ 1; ภาพที่ 10-41 [โดยสเกลบาร์ในภาพมีขนาดเท่ากับ 10  $\mu$ m หรือตามที่ระบุไว้เป็นตัวเลข]) โดยในจำนวนนี้พบซิลิเอตบางกลุ่มที่มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกยากต่อการจัดจำแนกและระบุชนิด เช่น ซิลิเอตในกลุ่ม Karyorelictea ซึ่งมีความยืดหยุ่นของเซลล์ค่อนข้างสูง ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้หลายลักษณะแม้ในชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงทำการจำแนกซิลิเอตกลุ่มนี้ตามลักษณะและรูปร่างที่แตกต่างกันภายนอก

การศึกษาตัวอย่างในระดับสัณฐานวิทยาของตัวอย่างโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่ได้จากการสำรวจทั้ง 7 ครั้ง พบจำนวนชนิดของซิลิเอตดังนี้

ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง:

ครั้งที่ 1 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2554	จำนวน	6	ชนิด
ครั้งที่ 2 เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2554	จำนวน	29	ชนิด

ช่วงเก็บตัวอย่างจริง:

ครั้งที่ 1 เดือนกันยายน 2554	จำนวน	13	ชนิด
ครั้งที่ 2 เดือนมกราคม 2555	จำนวน	12	ชนิด
ครั้งที่ 3 เดือนมีนาคม 2555	จำนวน	28	ชนิด
ครั้งที่ 4 เดือนพฤษภาคม 2555	จำนวน	18	ชนิด
ครั้งที่ 5 เดือนกรกฎาคม 2555	จำนวน	22	ชนิด

จากการสำรวจศึกษาพื้นที่บริเวณหาดลูกกลมพบว่า ความหลากหลายชนิดและจำนวนของโพรติสต์จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างทรายที่เก็บห่างออกไปจากชายฝั่ง ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้ทำการเก็บในบริเวณที่ไกลที่สุดที่สามารถไปถึงได้และในช่วงที่น้ำลดลงต่ำสุดของวัน

## 2.2 การเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่ศึกษาให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่ศึกษาให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว (clonal and pure culturing) ของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่สำรวจพบ โดยทำการคัดแยกซิลิเอตที่สนใจหลายสายพันธุ์ (isolate) และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร f/2-Si ของ Guillard (1975) และ Guillard และ Ryther (1962) โดยใช้สัดที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วเป็นอาหาร พบว่าซิลิเอตจำนวน 8 สายพันธุ์จาก 3 สกุล (ตารางที่ 2) คือ *Euplotes* จำนวน 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L (ภาพที่ 19), *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.4.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L (ภาพที่ 20), *Protocruzia* sp. 1 สายพันธุ์ ได้แก่ *Protocruzia* sp. สายพันธุ์ SS.4.L และ *Uronema* อีก 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.2.L (ภาพที่ 37) และ *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L 3 เซลล์ตั้งต้นซึ่งเป็นคนละเซลล์กัน (ภาพที่ 38-40) โดยซิลิเอตทั้ง 8 สายพันธุ์นี้สามารถอยู่รอดและยังทำการเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนในห้องปฏิบัติการได้



ภาพที่ 4 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกกลมโดยทั่วไป ซึ่งเป็นหาดที่ยังคงความเป็นธรรมชาติอยู่มาก น้ำทะเลมีสีเขียวอมฟ้าค่อนข้างใส เนื่องจากมีปริมาณนักท่องเที่ยวที่ไปดำน้ำชมปะการังบริเวณหาดนี้ไม่มากนัก ลักษณะทรายที่พบบริเวณหาดนี้มีสีค่อนข้างขาวเนื้อละเอียดปนกับก้อนกรวดขนาดใหญ่



ภาพที่ 5 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างและหาดทรายบริเวณหาดลูกกลม ลักษณะทรายที่พบบริเวณหาดนี้มีสีค่อนข้างขาวเนื้อละเอียดปนกับก้อนกรวดขนาดใหญ่ (ภาพบน) และมีสาหร่ายขนาดใหญ่ซึ่งถูกน้ำทะเลพัดเข้าฝั่งกระจายอยู่ทั่วไปตลอดแนวหาด (ภาพล่าง)



ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกลม (ภาพบน) การเก็บตัวอย่างจะใช้ช้อนพรวนตักทรายเนื้อละเอียดและหยาบใส่ลงในกล่องพลาสติก โดยเลือกเก็บทรายบริเวณที่มีน้ำทะเลท่วมถึงและตักน้ำทะเลใส่ลงในกล่องเล็กน้อยให้ตัวอย่างทรายมีน้ำหล่อเลี้ยง (ภาพล่าง)





ภาพที่ 7 แสดงขั้นตอนการเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกกลมโดยใช้ช้อนพรวน (ภาพบน) โดยทำการสุ่มเก็บทรายตัวอย่างใส่ลงในกล่องพลาสติกขนาด 750 มิลลิลิตร จำนวน 12 กล่องต่อการออกภาคสนาม 1 ครั้ง ตลอดแนวหาด (ภาพล่าง)



ภาพที่ 8 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างทรายบางบริเวณของหาดลูกลมที่ทรายมีลักษณะเนื้อทรายค่อนข้างหยาบ และมีก้อนกรวดและหินขนาดใหญ่แทรกอยู่จำนวนมาก (ภาพบน) การเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่มีลักษณะเช่นนี้จะเลือกเก็บเฉพาะเนื้อทรายโดยไม่เก็บส่วนของก้อนกรวดรวมมาด้วย (ภาพล่าง)



ภาพที่ 9 แสดงการเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่ห่างออกไปจากชายฝั่งเล็กน้อย โดยการดำน้ำและใช้ช้อน  
พรวนตักทรายบริเวณพื้นที่ท้องทะเล (ภาพบน) ใส่ลงในกล่องพลาสติก (ภาพล่าง) จากการศึกษาพบว่าทราย  
ในบริเวณนี้เมื่อเทียบกับบริเวณอื่นจะพบซิลิเกตและโพรติสต์อื่นๆ อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก

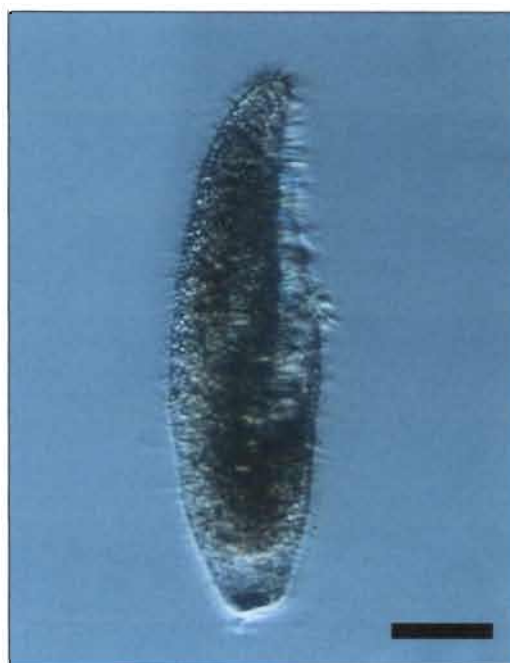
ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อซิลิเอตที่พบบริเวณหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่ได้ศึกษาจากการสำรวจ จำนวน 7 ครั้ง

ลำดับที่	สกุล/ชนิด	ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง		ช่วงเก็บตัวอย่างจริง				
		มี.ค. 2554	พ.ค. 2554	ก.ย. 2554	ม.ค. 2555	มี.ค. 2555	พ.ค. 2555	ก.ค. 2555
1	<i>Aspidisca</i> sp.	✓	✓		✓	✓	✓	✓
2	<i>Blepharisma</i> sp.					✓		
3	<i>Coleps pulcher</i>				✓	✓		
4	<i>Coleps tessellatus</i>			✓	✓	✓		
5	<i>Coleps</i> sp.	✓				✓		
6	<i>Condylostoma arenarium</i>		✓			✓		✓
7	<i>Condylostoma enigmatica</i>							✓
8	<i>Diophrys</i> sp.			✓	✓	✓	✓	✓
9	<i>Euplotes</i> sp. 1			✓				
10	<i>Euplotes</i> sp. 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	<i>Euplotes</i> sp. 3					✓		
12	<i>Euplotidium</i> sp.		✓					
13	<i>Frontonia</i> sp.		✓		✓			✓
14	hypotrich 01			✓		✓		
15	hypotrich 02			✓				
16	hypotrich 03 ( <i>Holosticha</i> sp.)	✓	✓			✓		
17	hypotrich 04				✓	✓		
18	hypotrich 05						✓	✓
19	karyorelictean 01			✓				
20	karyorelictean 02		✓	✓	✓		✓	
21	karyorelictean 03		✓				✓	
22	karyorelictean 04		✓	✓			✓	✓
23	karyorelictean 05		✓	✓			✓	
24	karyorelictean 06		✓			✓		✓

ลำดับที่	สกุล/ชนิด	ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง			ช่วงเก็บตัวอย่างจริง			
		มี.ค. 2554	พ.ค. 2554	ก.ย. 2554	ม.ค. 2555	มี.ค. 2555	พ.ค. 2555	ก.ค. 2555
25	karyorelictean 07		✓			✓	✓	
26	karyorelictean 08		✓			✓	✓	✓
27	karyorelictean 09		✓			✓		
28	karyorelictean 10		✓			✓		
29	karyorelictean 11		✓			✓		
30	karyorelictean 12		✓			✓		
31	karyorelictean 13		✓			✓		✓
32	karyorelictean 14		✓			✓		✓
33	karyorelictean 15		✓					✓
34	karyorelictean 16		✓				✓	✓
35	<i>Kentrophoros</i> sp.		✓			✓	✓	✓
36	<i>Litonotus</i> sp.		✓					
37	<i>Loxodes</i> sp. 1		✓			✓	✓	✓
38	<i>Loxodes</i> sp. 2		✓				✓	✓
39	<i>Loxodes</i> sp. 3		✓			✓		✓
40	<i>Loxophyllum</i> sp.			✓	✓			
41	<i>Mesodinium</i> sp.			✓	✓	✓		
42	<i>Pleuronema</i> sp.	✓	✓			✓		
43	<i>Protocruzia</i> sp.						✓	✓
44	<i>Stichotricha</i> sp.		✓				✓	✓
45	<i>Uronema</i> sp.				✓	✓	✓	✓
46	<sup>c</sup> <i>Uronychia</i> sp.	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
Total	46 ชนิด	6	29	13	12	28	18	22



ภาพที่ 10 *Aspidisca* sp.



ภาพที่ 11 *Blepharisma* sp.



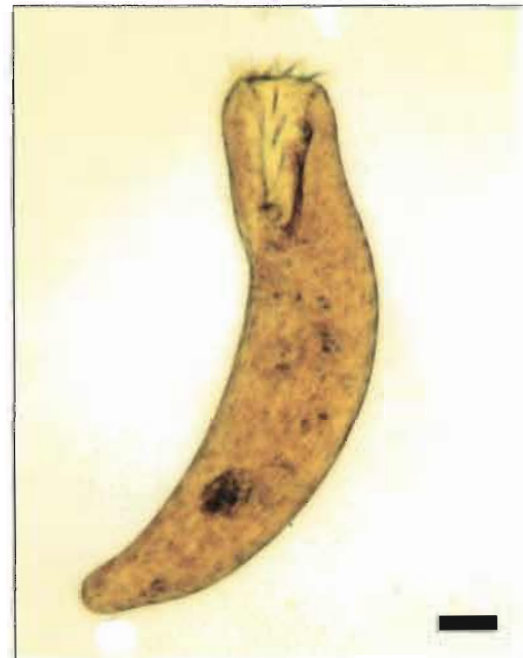
ภาพที่ 12 *Coleps pulcher*



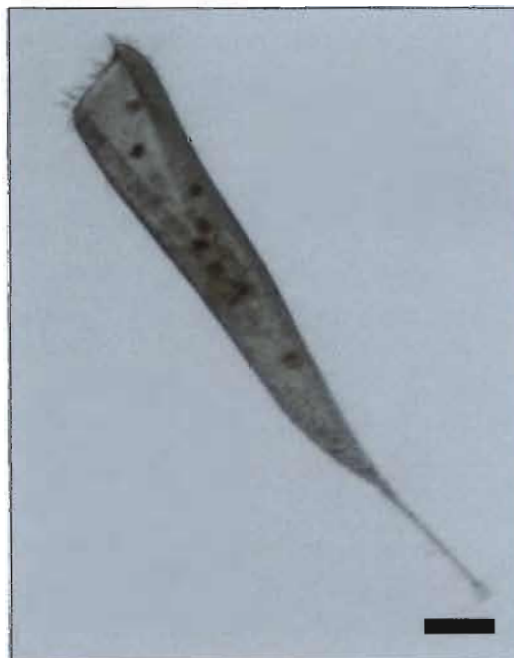
ภาพที่ 13 *Coleps tessellatus*



ภาพที่ 14 *Coleps* sp.



ภาพที่ 15 *Condyllostoma arenarium*; 100  $\mu$ m



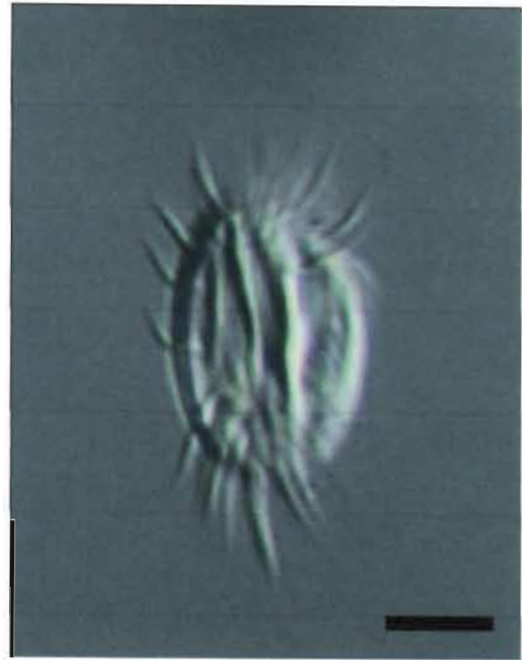
ภาพที่ 16 *Condyllostoma enigmaticum*; 100  $\mu$ m



ภาพที่ 17 *Diophrys* sp.



ภาพที่ 18 *Euplotes* sp. 1



ภาพที่ 19 *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L

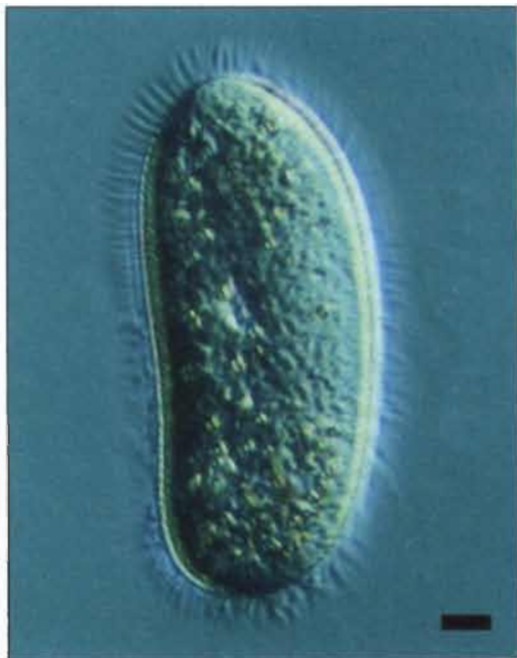


ภาพที่ 20 *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L



ภาพที่ 21 *Euplotidium* sp.

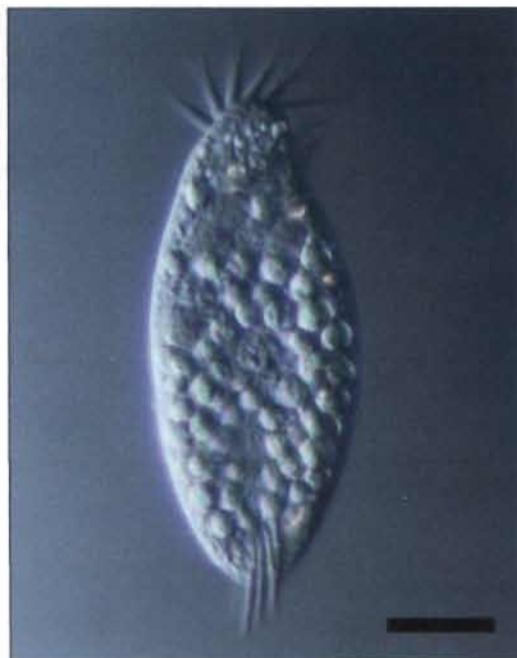




ภาพที่ 22 *Frontonia* sp.



ภาพที่ 23 hypotrich 01



ภาพที่ 24 hypotrich 02



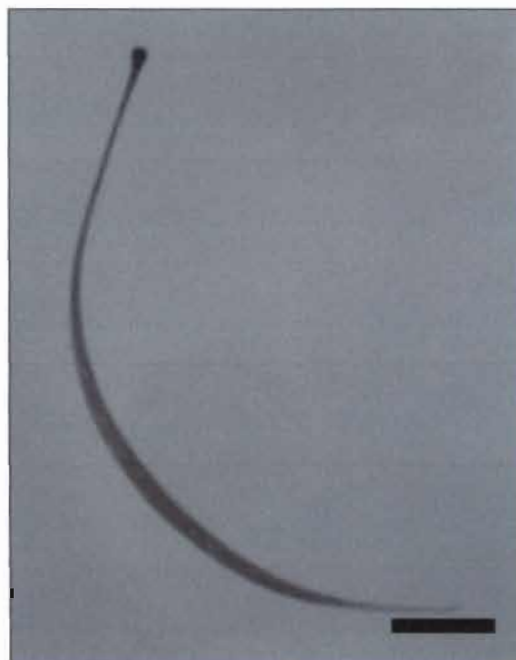
ภาพที่ 25 hypotrich 03 (*Holosticha* sp.)



ภาพที่ 26 hypotrich 04



ภาพที่ 27 hypotrich 05



ภาพที่ 28 karyorelictean 01; 100  $\mu$ m



ภาพที่ 29 karyorelictean 02; 50  $\mu$ m



ภาพที่ 30 karyorelictean 03; 30  $\mu$ m



ภาพที่ 31 karyorelictean 04; 100  $\mu$ m



ภาพที่ 32 karyorelictean 06; 100  $\mu$ m



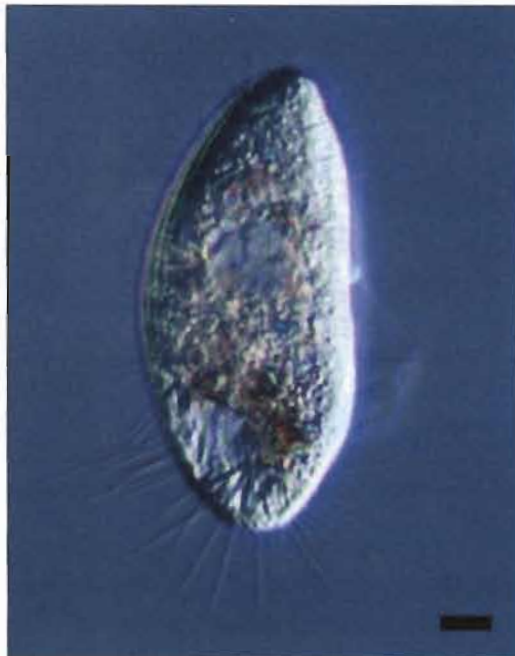
ภาพที่ 33 *Litonotus* sp.



ภาพที่ 34 *Loxophyllum* sp.



ภาพที่ 35 *Mesodinium* sp.



ภาพที่ 36 *Pleuronema* sp.



ภาพที่ 37 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.2.L



ภาพที่ 38 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (1)



ภาพที่ 39 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (2)



ภาพที่ 40 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (3)



ภาพที่ 41 *Uronychia* sp.

ตารางที่ 2 แสดงชนิดของซิติเอตบริเวณหาคูกลม เกาะเสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่สามารถเพาะเลี้ยงอยู่รอดได้ในห้องปฏิบัติการ

ลำดับที่	สกุล/ชนิด	สายพันธุ์	วันที่เก็บตัวอย่าง
1	<i>Euplotes</i> sp. 2	SS.1.L	10 กันยายน 2554
2	<i>Euplotes</i> sp. 2	SS.4.L	20 พฤษภาคม 2555
3	<i>Euplotes</i> sp. 3	SS.3.L	28 มีนาคม 2555
4	<i>Protocruzia</i> sp.	SS.4.L	20 พฤษภาคม 2555
5	<i>Uronema</i> sp.	SS.2.L	21 มกราคม 2555
6	<i>Uronema</i> sp. (3 isolates)	SS.3.L (1), (2) และ (3)	28 มีนาคม 2555

### 2.3 การศึกษาซิติเอตในระดับอนุชีววิทยาด้วยรหัสดีเอ็นเอ

การศึกษาตัวอย่างในระดับอนุชีววิทยา โดยทำการสกัดดีเอ็นเอจากตัวอย่างซิติเอตที่พบและทดลองเพิ่มจำนวนยีนหรือช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่สนใจสำหรับใช้ในการระบุชนิดโดยใช้ปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส และหาสถานะในการทำปฏิกิริยาที่เหมาะสม พบว่า ไพรเมอร์ทั้ง 3 ตัว ได้แก่ SSU-NPF1, SSU-RPF1 และ 28S-1316R ตลอดจนสถานะในการทำปฏิกิริยา คือ โปรแกรมที่ตั้งในเครื่อง thermal cycler CIL3 และ CIL4 สามารถใช้ในการเพิ่มปริมาณยีนบริเวณ rDNA (ribosomal DNA) ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบสได้ (ภาพที่ 42) หลังจากได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดที่ต้องการจึงทำความสะอาดผลิตภัณฑ์ดังกล่าวให้บริสุทธิ์ และส่งผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้วไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ เพื่อยืนยันว่าผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่เพิ่มจำนวนได้นั้นเป็นยีน rDNA ตามที่ต้องการจริง

การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม FinchTV เพื่อเช็คสัญญาณอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าอยู่ในลักษณะที่อ่านได้ถูกต้อง แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้สัญญาณดีนี้ไปใช้ในการทดลองหาชนิดของซิติเอตสายพันธุ์ที่คัดแยกได้เบื้องต้นกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน rDNA ของตัวอย่างที่เพาะเลี้ยงได้จำนวน 5 สายพันธุ์ จากทั้งหมด 8 สายพันธุ์ ได้ลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนดังกล่าว แสดงดังนี้

#### *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L (ภาพที่ 19)

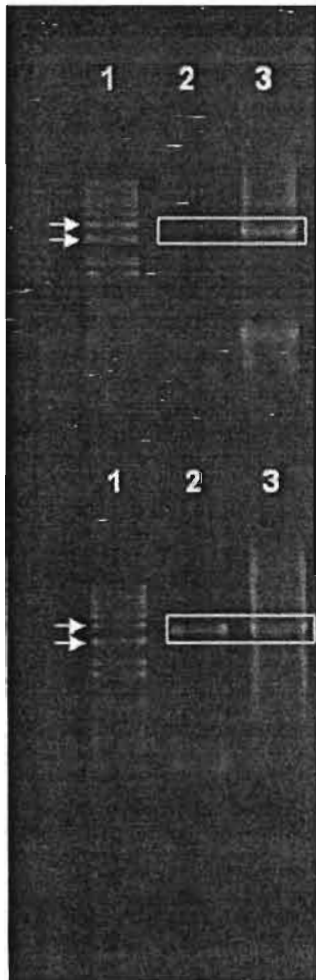
```

1   GAGTCGTGTT GTTCGGGACT GCAGCACTAA GTGGGAGGTA GACTTCTCCT AAGGCTAAAT
61  AACTATGAGA GACCGATAGC GAACAAGTAA TGTGAATGAA AGATGAAAAA TTAATTCCTT
121 CCGTAAGAAC TTTGAATAAA AAGAGAATTA AAGAGACCTG AAACCGTTGA GGAGGAAGCG
181 ATAGGAAGTT TTCCATTTGG CTGGCAGCTG GCAAAGCGGC ATTGCTGCGA GTTTGCTGCC
241 TGTCAAAGCG GTCGTTTCGGC TTTACTCGCC TCATAATCCC CGCTGGGSCCA GAGCCTTGGC
301 ATCACTCAGT GGGAGCCTGT GCGGGGTGAG GCCGAGGGAC CTTTCGATGT TTCCATCGCA
361 CCCGTCTTGA AACACGGACC AAGGAGTCTA ACATATACGC GATTATGTTG GTGTTTTCGA
421 AACCAAACAT GAGCAATGAA AGTGAGCGGT GCCAATCGCA AGATGCAGCA TCGGCCAGTT
481 GTGATCCTCT GGAGAAGCGT ACTGGCTACG AGCGTATCTG TTAGGACCCG AAAGATGGTG
541 AACTACGCTT GAGTAGGGTG AAGCCAGGGG AAACCTTTGT GGAAGCCCGA AGCGGTACTG

```

601 ACGTGCAAAT CGTTCGTCAA ACTTGAGTGT AGGGGCGAAA GACTAATCGA ACCATCTAGT  
 661 AGCTGGTTCC CTCCGAAGTT TCTCTCAGGA TAGCAAGGAC AGTTAAAGCA GTTTTTATCA  
 721 ATTAGGTAAA GAATAAATGA TTAGAAGATC CGGGAGTTTT ATAGTGTTCT CGACTTAGTT  
 781 CTCAAACCTCT AAATATTTGT AATAACTCGA TATTCCTTAA CTGAAGATCG AGGTAGAATG  
 841 CTTGTCCTTA GTGGGCCATT TTTGGTAAGC AGAACTGGCG ATGAGGGATG AACCTAACTC  
 901 CGAGTTAAGG TGCCCAACTG CACGCGCATC AGATACCTTA AAGGGTGTGT TGATTCATTT  
 961 AGACAGCAGG AC

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (large subunit ribosomal DNA หรือ LSU rDNA) ความยาว 972 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Euplotes charon* (GenBank accession no. JF694066) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด โดยมีความเหมือน (identity) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้เท่ากับ 92% และมีช่องว่าง (gap) ระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายจำนวน 10 ช่อง



ภาพที่ 42 แสดงผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจลหลังจากนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide และบันทึกภาพภายใต้แสงยูวี: แถวบน ช่องที่ 1 คือ 1 kb molecular marker (ลูกศรด้านบนแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 4,000 คู่เบสและลูกศรด้านล่างแสดงแถบดีเอ็นเอขนาด 3,000 คู่เบส) ช่องที่ 2-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส ของซิลิเอต *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L (ภาพที่ 19) ที่แยกได้จากหาดลูกกลม โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนยีน ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL3 และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งที่สองที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกในช่องที่ 2 เป็นแม่พิมพ์และเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ SSU-RPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL4 โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 นี้จะสั้นกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรก 6 คู่เบส แต่แถบดีเอ็นเอจะมีความเข้มมากขึ้น แสดงถึงความเข้มข้นของปริมาณดีเอ็นเอที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกเป็นแม่พิมพ์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งที่ 2; แถวล่าง ช่องที่ 1 คือ 1 kb molecular marker ช่องที่ 2-3 คือ ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ขนาดประมาณ 3,500 คู่เบส ของซิลิเอต *Euplotes* sp. 1 (ภาพที่ 18) ที่แยกได้จากหาดลูกกลม โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL3 และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งที่สองที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรก

ในช่องที่ 2 เป็นแม่พิมพ์และเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ SSU-RPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL4 โดยผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่ที่ 2 นี้จะสั้นกว่าผลิตภัณฑ์ที่ได้จากไพรเมอร์คู่แรก 6 คู่เบส

*Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L (ภาพที่ 20)

```

1   GAGCGCTTCA AAAGCCTGTC TGGGTCAGAG GTTGGGCATC ACTCAGGCAG AGAATGTTGC
61  GGTCGAGGCT AAGGAACCCCT TGATTTTTCC TACCGACCCG TCTTGAAACA CGGACCAAGG
121 AGTCTAACAG ACATGCGATT ATGTTGGTGC TTTGGAAACC ATACATGAGC AATGAAAGTA
181 AGCGGTGCCA ATCGTAAGAT GCAGCATCGG CCAGTTGTGA TCCTCTGGAG AAGCGTACTG
241 GCTGCGAGCA TATCTGTTAG GACCCGAAAG ATGGTGAAC TCGCTTGAGT AGGGTGAAGC
301 CAGGGGAAAC TCTTGTGGAA GCCCGAAGCG GTACTGACGT GCAAAATCGTT CGTCAAACCTT
361 GAGTGTAGGG GCGAAAGACT AATCGAACCA TCTAGTAGCT GGTTCCTCC GAAGTTTCTC
421 TCAGGATAGC AAGGACAGTT AAAGCAGTTT TTATTTCAAT TAGGTAAAGA ATAAATGATT
481 AGAAGCATCT GGGGGCGTTT TAGTGTCTC GACTTAGTTC TCAAACCTCTA AATATTTGTA
541 ATAACCGGT ATTCCTAAC TGAAGATCGA GGCAGAATGC TTGTCCCTAG TGGGCCATTT
601 TTGGTAAGCA GAACTGGCGA TGAGGGATGA ACCTAACTCT GGGTTAAGGT GCCCAACTGC
661 ACGCGCATCA GATACCTCAA AGGGTGTGTT GATTCATTTA GACAGCAGGA C

```

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 711 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอของ *Euplotes charon* (GenBank accession no. JF694066) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด โดยมีความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ เท่ากับ 96% และมีช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย จำนวน 1 ช่อง

*Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.2.L (ภาพที่ 37)

```

1   ATTGTTGAGA AGGAAGTGGT TAAAGAGTAA TCATTTGTAT ACGATAAATG TTTTCGCTTCC
61  CTGGCTTTGG CATGCTTTAG TACTTCATAG GCTGTGTGTG TCAAACGTTA GGTAGCTAGG
121 CTGTCTTCGT ATGCAAGAGG CAACATGAAAG TTTGGAGCCG GGAATAAACT AGTAGAACCG
181 CCCAGCAATG GAGTCTATTA GTGAAACCCG CATCGAGCTT GAGGGGCCCTG AGGGCGATGT
241 TGTCAAATG GCTTTAATG TCCCGTCTTG AAACACGGTC CATGGAGTGT AACCTACGCG
301 CAAGTGTAG GGTGGAAAAA CCCGAACGCA TAAGGAAACT AAGGATAAGT TGTTTACAGC
361 AACAGCGGAC CTAGCGTCTC TGACAAAGGG CTCCAGCAAG AGCGAGTATG TTACGACCCG
421 AAAGATGATG AACTTTACTT GAGTAGGGTG AAGCCAGGGG AAACCTCTGGT GGAAGCTCGC
481 AAGATCTTCT GACGTGCAA TCGATTTCCA AACTTGAGTA AAGGGGCGAA AGACTAATCG
541 AATCATCTAG TAGCTGGTTC CCTCTGAAGT TTCTCTCAGG ATAGCTGGAA CAAACCAAGC
601 AGTTTTATTA GGTAAAGCGA ATGATTAGAG GAATCGGAGC TCAAAGAGTT TTGACCTATT
661 CTCAACTTT AAATTGGTAA GAACCGGGG TTAACCTAAT TGAACCTCTG GGCAGAATGC
721 TTGTTCCAAG TGGGCCATTT TTGGTAAGCA GAACTGGCGA TGAGGGATGA ACCTAACGCT
781 TAGATAAGGT TCCTAAGTAT GCATTCATGA GATCCACAA AAGGTGTTGG TTCATTAACA
841 CAGCAGGACA

```

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 850 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอของ *Uronema* sp. WS-2012 สายพันธุ์ XY2009113003 (GenBank accession no. JN885125) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด โดยมีความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ เท่ากับ 98% และไม่พบช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย



*Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (1) (ภาพที่ 38)

1 TTTAACTGTC CCGTCTTGAA ACACGGTCCA TGGAGTGTA CCTACGCGCA AGTGTTAGGG  
 61 TGGAAAAACC CGAACGCATA AGGAAACTAA GGATAAGTTG TTTACAGCAA CAGCGGACCT  
 121 AGCGTCTCTG ACAAAGGGCT CCAGCAAGAG CGAGTATGTT ACGACCCGAA AGATGATGAA  
 181 CTTTACTTGA GTAGGGTGAA GCCAGGGGAA ACTCTGGTGG AAGCTCGCAA GATCTTCTGA  
 241 CGTGCAAATC GATTTCCAAA CTGAGTAAA GGGGCGAAAG ACTAATCGAA TCATCTAGTA  
 301 GCTGGTCCC TCTGAAGTTT CTCTCAGGAT AGCTGGAACA AACCAAGCAG TTTTATTAGG  
 361 TAAAGCGAAT GATTAGAGGA ATCGGAGCTC AAAGAGTTTT GACCTATTCT CAACTTTAA  
 421 ATGGTAAGA ACCGGGGT AACTTAATTG AACCTCTGGG CAGAATGCTT GTTCCAAGTG  
 481 GGCCATTTTT GGTAAGCAGA ACTGGCGATG AGGGATGAAC CTAACGCTTA GATAAGGTTT  
 541 CTAAGTATGC ATTCATGAGA TCCCACAAA GGTGTTGGTT CATTACACA GCAGGACAGT  
 601 GG

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 602 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเอตในฐานข้อมูลของ NCBI 3 สายพันธุ์ ได้แก่ *Parauronema virginianum* สายพันธุ์ PXM2010070302 (GenBank accession no. JN885128), *Uronema* sp. WS-2012 สายพันธุ์ XY2009113003 (GenBank accession no. JN885125) และ *Uronema marinum* สายพันธุ์ PHB20090219 (GenBank accession no. JN885124) โดยมีความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ของทั้ง 4 สาย เท่ากับ 99% และไม่พบช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้ง 4 สาย ตลอดความยาวที่เปรียบเทียบกัน

*Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (2) (ภาพที่ 39)

1 AAACCTCTTC TAAAGCTAAA TATTTATGGG AAACCGATAG CGAACAAGTA CTGCGAAGGA  
 61 AAGGTGAAAA GAACTTTGAA AAGAGGGTTA AAAGACTTGA AATCGTTGAG AAGGAAGTGG  
 121 TTAAAGAGTA ATCATTTGTA TACGATAAAT GTTTCGCTTC CCTGGCTTTG GCATGCTTTA  
 181 GTACTTCATA GGCTGTGTGT GTCAAACGTT AGGTAGCTAG GCTGTCTTCG TATGCAAGAG  
 241 GCAACATGAA GTTTGGAGCC GGGAATAAAC TAGTAGAACG CCCCAGCAAT GGAGTCTATT  
 301 AGTGAACCG GCATCGAGCT TGAGGGGCCCT GAGGGCGATG TTGTCAAAAT GGCTTTAACT  
 361 GTCCCGTCTT GAAACACGGT CCATGGAGTG TAACCTACGC GCAAGTGTTA GGGTGGAAAA  
 421 ACCCGAACGC ATAAGGAAAC TAAGGATAAG TTGTTTACAG CAACAGCGGA CCTAGCGTCT  
 481 CTGACAAAGG GCTCCAGCAA GAGCGAGTAT GTTACGACCC GAAAGATGAT GAACTTTACT  
 541 TGAGTAGGGT GAAGCCAGGG GAAACTCTGG TGGAAAGCTCG CAAGATCTTC TGACGTGCAA  
 601 ATCGATTTCC AAACCTTGAGT AAAGGGGCGA AAGACTAATC GAATCATCTA GTAGCTGGTT  
 661 CCCTCTGAAG TTTCTCTCAG GATAGCTGGA ACAAACCAAG CAGTTTTATT AGGTAAAGCG  
 721 AATGATTAGA GGAATCGGAG CTCAAAGAGT TTTGACCTAT TCTCAAACCT TAAATTGGTA  
 781 AGAACCGGGG GTTAACTTAA TTGAACCTCT GGGCAGAATG CTTGTTCCAA GTGGGCCATT  
 841 TTTGGTAAGC AGAAGTGGCG ATGAGGGATG AACCTAACGC TTAGATAAGG TTCCTAAGTA  
 901 TGCATTATG AGATCCACA AAAGGTGTTG GTTCATTAAC ACAGCAGGAC A

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 951 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอของ *Uronema* sp. WS-2012 สายพันธุ์ XY2009113003 (GenBank accession no. JN885125) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด โดยมีความ

เหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ เท่ากับ 99% และไม่พบช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของลาร์จซัยยูนิตรโบโซมอลดีเอ็นเอในส่วนที่อยู่ในบริเวณเดียวกันความยาว 709 คู่เบส [รวมช่องว่าง (gap) ที่เกิดขึ้นจากลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย โดยลำดับนิวคลีโอไทด์สายล่างที่เหมือนกับสายบนจะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นจุด] ดังแสดงข้างล่าง พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายมีความแตกต่างกัน (number of nucleotide differences) มากถึง 43 ตำแหน่ง มีค่าเปรียบเทียบเป็นคู่ (pairwise comparison) ของค่าความแตกต่าง p-distance เท่ากับ 6.10% และค่าความแตกต่างโดยใช้ Kimura 2-parameter model เท่ากับ 6.39% แสดงให้เห็นว่า *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L น่าจะเป็นคนละชนิดกัน สอดคล้องกับข้อมูลทางสัณฐานทางวิทยาของทั้งสองสายพันธุ์ ซึ่งมีขนาดและรูปร่างแตกต่างกันชัดเจน (ภาพที่ 19-20)

<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	CGCCTCATAA	TCCCCGCTGG	GCCAGAGCCT	TGGCATCACT	40
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . T . . . A . .	G . . TGT . . . .	. T . . . . . GT .	G . . . . . . . . .	40
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	CAGTGGGAGC	CTGTGGCGGG	TGAGGCCGAG	GGACCTTCGA	80
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . GCA . . . A	A . . . T . . . . T	C . . . . . TA . .	. A . . . . C . T . .	80
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	TGTTTTCCCTA	CCGACCCGTC	TTGAAACACG	GACCAAGGAG	120
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	119
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	TCTAACATAT	ACGCGATTAT	GTTGGTGTTT	TCGAAACCAA	160
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . G . C	. T . . . . . . . . .	. . . . . . . C . .	. G . . . . . . . T	159
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	ACATGAGCAA	TGAAAGTGAG	CGGTGCCAAT	CGCAAGATGC	200
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . A . .	. . . . . . . . . .	. . T . . . . . . . .	199
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	AGCATCGGCC	AGTTGTGATC	CTCTGGAGAA	GCGTACTGGC	240
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	239
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	TACGAGCGTA	TCTGTTAGGA	CCCGAAAGAT	GGTGAAGTAC	280
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. G . . . . . A . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	279
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	GCTTGAGTAG	GGTGAAGCCA	GGGGAAACTC	TTGTGGAAGC	320
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	319
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	CCGAAGCGGT	ACTGACGTGC	AAATCGTTCG	TCAAACCTGA	360
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	359
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	GTGTAGGGGC	GAAAGACTAA	TCGAACCATC	TAGTAGCTGG	400
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	399
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	TTCCCTCCGA	AGTTTCTCTC	AGGATAGCAA	GGACAGTTAA	440
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	439
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	AGCAGTTTTT	AT- CAATTA	GGTAAAGAAT	AAATGATTAG	478
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . TT . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	479
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	AAG-ATCCGG	GAGTTTTATA	GTGTTCTCGA	CTTAGTTCTC	517
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . C . . . T . .	. G . CG . T . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	519
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	AAACTCTAAA	TATTTGTAAT	AACTCGATAT	TCCTTAAC TG	557
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . G . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	559
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	AAGATCGAGG	TAGAATGCTT	GTCCTTAGTG	GGCCATTTTT	597
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	. . . . . . . . . .	C . . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	. . . . . . . . . .	599

<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	GGTAAGCAGA	ACTGGCGATG	AGGGATGAAC	CTAACTCCGA	637
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	.....	.....	.....	.....T.G	639
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	GTTAAGGTGC	CCAACCTGCAC	GCGCATCAGA	TACCTTAAAG	677
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	.....	.....	.....	.....C.....	679
<i>Euplotes</i> sp. 2 SS.1.L	GGTGTGTTGA	TTCATTTAGA	CAGCAGGAC		706
<i>Euplotes</i> sp. 3 SS.3.L	.....	.....	.....		708

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของลาร์จซัยยูนิตรอบโซมอลดีเอ็นเอในส่วนที่อยู่ในบริเวณเดียวกันความยาว 598 คู่เบส [โดยลำดับนิวคลีโอไทด์สายล่างที่เหมือนกับสายบนจะแสดงลำดับนิวคลีโอไทด์เป็นจุด] ของ *Uronema* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SS.2.L, SS.3.L (1) และ SS.3.L (2) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างกันเลยแม้แต่ตำแหน่งเดียว แสดงให้ว่า *Uronema* spp. ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้น่าจะเป็นชนิดเดียวกัน ถึงแม้ว่าจะเก็บจากช่วงเวลาที่แตกต่างกันหรือช่วงเวลาเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงเริ่มต้นจากเซลล์ตั้งต้นคนละเซลล์กัน (ตารางที่ 2) ดังแสดงข้างล่าง

<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	TTTAACTGTC	CCGTCTTGAA	ACACGGTCCA	TGGAGTGTA	40
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	40
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	40
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	CCTACGCGCA	AGTGTTAGGG	TGGAAAAACC	CGAACGCATA	80
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	80
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	80
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	AGGAACTAA	GGATAAGTTG	TTTACAGCAA	CAGCGGACCT	120
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	120
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	120
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	AGCGTCTCTG	ACAAAGGGCT	CCAGCAAGAG	CGAGTATGTT	160
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	160
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	160
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	ACGACCCGAA	AGATGATGAA	CTTACTTGA	GTAGGGTGAA	200
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	200
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	200
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	GCCAGGGGAA	ACTCTGGTGG	AAGCTCGCAA	GATCTTCTGA	240
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	240
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	240
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	CGTGCAAATC	GATTTCCAAA	CTTGAGTAAA	GGGGCGAAAG	280
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	280
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	280
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	ACTAATCGAA	TCATCTAGTA	GCTGGTTCCC	TCTGAAGTTT	320
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	320
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	320
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	CTCTCAGGAT	AGCTGGAACA	AACCAAGCAG	TTTTATTAGG	360
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	360
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	360
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	TAAAGCGAAT	GATTAGAGGA	ATCGGAGCTC	AAAGAGTTTT	400
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	400
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	400

<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	GACCTATTCT	CAAACCTTAA	ATTGGTAAGA	ACCGGGGGTT	440
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	440
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	440
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	AACTTAATTG	AACCTCTGGG	CAGAATGCTT	GTTCCAAGTG	480
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	480
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	480
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	GGCCATTTTT	GGTAAGCAGA	ACTGGCGATG	AGGGATGAAC	520
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	520
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	520
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	CTAACGCTTA	GATAAGGTTT	CTAAGTATGC	ATTCATGAGA	560
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	560
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	560
<i>Uronema</i> sp. SS.2.L	TCCCACAAAA	GGTGTGGTT	CATTAACACA	GCAGGACA	598
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (1)	.....	.....	.....	.....	598
<i>Uronema</i> sp. SS.3.L (2)	.....	.....	.....	.....	598

## วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทราย บริเวณหาดทรายชายฝั่งทะเลของหาดลูกกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บทรายตัวอย่างทั้งหมด 7 ครั้ง พบซิลิเอตกว่า 46 ชนิด โดยความหลากหลายชนิดของซิลิเอตที่พบในการศึกษานี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ของ สุชา เฉยศิริ และคณะ (2554) ที่ทำการสำรวจความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรติสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเล บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในเดือนธันวาคมของปี 2552 และรายงานการพบโพรติสต์กว่า 71 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นซิลิเอตจำนวน 22 ชนิด โดยสกุลของซิลิเอตที่พบจากการศึกษาทั้งสองครั้งมีความเหมือนกันในบางส่วน กล่าวคือ *Aspidisca*, *Coleps*, *Euplotes*, *Mesodinium* และ *Uronychia* เป็นสกุลซิลิเอตที่พบจากการศึกษาทั้งสองครั้ง อย่างไรก็ตามในการศึกษาในครั้งนี้ พบซิลิเอตเพิ่มขึ้นกว่า 13 สกุลที่ไม่ได้พบรายงานไว้ในการศึกษาของ สุชา เฉยศิริ และคณะ (2554) ได้แก่ *Blepharisma*, *Condyllostoma*, *Diophrys*, *Euplotidium*, *Frontonia*, *Kentrophoros*, *Litonotus*, *Loxodes*, *Loxophyllum*, *Pleuronema*, *Protocruzia*, *Stichotricha* และ *Uronema* ซึ่งซิลิเอตเหล่านี้หลายสกุลเป็นกลุ่มที่พบแพร่กระจายทั่วไปในลักษณะที่อยู่อาศัยแบบหน้าดิน (benthic habitat) และมีรายงานจากหลายพื้นที่ (Burkovsky and Mazei, 2010; Madoni, 2006)

นอกจากนี้ การศึกษาในครั้งนี้ยังพบซิลิเอตในกลุ่ม Karyorelictea จำนวนหลายรูปร่างหลายชนิด และเป็นกลุ่มที่พบหลักและมีปริมาณมากในการสำรวจหลายครั้งในช่วงที่ได้มีการดำเนินงานวิจัย โดยกลุ่ม Karyorelictea จัดเป็นซิลิเอตที่มีความสำคัญในทางอนุกรมวิธานและวิวัฒนาการ เพราะเชื่อว่าซิลิเอตกลุ่มนี้เป็นกลุ่มดั้งเดิม (primitive) เนื่องจากมีลักษณะหลายประการของสายวิวัฒนาการของซิลิเอตบรรพบุรุษ (ancestral ciliate lineage) (Lynn, 2008) ฉะนั้นการพบความหลากหลายทางชีวภาพอันสูงของซิลิเอตกลุ่ม Karyorelictea ที่บริเวณหาดลูกกลม จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงแหล่งทรัพยากรที่มีค่า อันจะนำไปสู่กุญแจไขความเข้าใจทางวิวัฒนาการของซิลิเอตกลุ่มนี้และกลุ่มอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง หากได้มีการศึกษาในรายละเอียดเชิงลึกเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่สกัดแยกได้ เพื่อนำมาศึกษาเชิงลึกในระดับอนุชีววิทยา โดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ สามารถเพาะเลี้ยงซิลิเอตได้จำนวน 8 สายพันธุ์ จาก 3 สกุล ได้แก่ *Euplotes*, *Protocruzia* และ *Uronema* ในจำนวนนี้ 5 สายพันธุ์ได้ทำการเพิ่มจำนวนโรโบโซมอลดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนดังกล่าว เพื่อตรวจสอบบริเวณที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นรหัสดีเอ็นเอในการระบุและจำแนกชนิดของซิลิเอตที่พบ โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาและไพรเมอร์บางตัวที่ได้ออกแบบเฉพาะเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีนโรโบโซมอลดีเอ็นเอได้ แต่พบมีปัญหาในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนดังกล่าว อย่างไรก็ตาม ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตรโรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้บางส่วน สามารถใช้ในการระบุสกุลและจำแนกแยกสายพันธุ์ของซิลิเอตที่ศึกษาได้ โดย *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L แสดงความใกล้เคียงกับ *Euplotes charon* ที่มีข้อมูลอยู่บนฐานข้อมูล NCBI โดยเมื่อพิจารณาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของ *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L พบว่า ทั้งสองสายพันธุ์เป็นซิ

ลิเอตที่จัดอยู่ในสกุล *Euplotes* อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถที่จะระบุชนิดของซิลิเอตทั้งสองสายพันธุ์นี้ได้ ถึงแม้ว่าการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากบริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล NCBI จะแสดงความใกล้เคียงกับ *Euplotes charon* หากแต่ความใกล้เคียงที่ได้ยังมีค่าไม่สูงพอที่จะบ่งบอกได้ว่า *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L เป็น *Euplotes charon* โดยในการศึกษาของ Chantangsi และคณะ (2007) โดยใช้ยีน cytochrome c oxidase subunit 1 (*cox1*) จากไมโทคอนเดรียในการจำแนกและระบุชนิดของซิลิเอตสกุล *Tetrahymena* พบว่า *Tetrahymena* ซึ่งมีสมาชิกในสกุลมีความใกล้เคียงกันสูง แม้ใน *Tetrahymena* ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์หรือเก็บมาจากคนละพื้นที่กันจะมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* มากกว่า 99% นอกจากนี้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากบริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้มาเปรียบเทียบกัน พบว่ามีความแตกต่างกันถึง 43 ตำแหน่ง จากความยาวของลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมด 709 คู่เบส แสดงให้เห็นว่า *Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L และ *Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L น่าจะเป็นคนละชนิดกัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของทั้งสองสายพันธุ์ที่มีความแตกต่างกันทั้งขนาดและรูปร่างอย่างชัดเจน

ในทางกลับกันการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตโรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Uronema* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SS.2.L, SS.3.L (1) และ SS.3.L (2) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างของลำดับเลยแม้แต่ตำแหน่งเดียว แสดงให้เห็นว่า *Uronema* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้น่าจะเป็นชนิดเดียวกัน ถึงแม้ว่าจะเก็บจากช่วงเวลาที่แตกต่างกันหรือช่วงเวลาเดียวกันแต่เพาะเลี้ยงเริ่มต้นจากเซลล์ตั้งต้นคนละเซลล์กัน ซึ่งสอดคล้องกับลักษณะทางสัณฐานของทั้งสามสายพันธุ์ที่มีความใกล้เคียงกันทั้งขนาดและรูปร่าง อย่างไรก็ตาม การเปรียบเทียบ *Uronema* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์นี้กับฐานข้อมูลของ NCBI พบว่ามีความใกล้เคียงกับ *Parauronema virginianum* สายพันธุ์ PXM2010070302, *Uronema* sp. WS-2012 สายพันธุ์ XY2009113003 และ *Uronema marinum* สายพันธุ์ PHB20090219 จากการศึกษาของ Gao และคณะ (2012) สูงถึง 98-99% แสดงว่า *Uronema* sp. ที่สกัดแยกและเพาะเลี้ยงจนบริสุทธิ์ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ น่าจะมีความใกล้เคียงสูงมากกับ *Parauronema virginianum* หรือ *Uronema marinum* ซึ่งควรมีการตรวจสอบในรายละเอียดทั้งในทางสัณฐานวิทยาและในทางอนุชีววิทยาเพิ่มเติม เพื่อยืนยันสถานภาพที่ถูกต้องของ *Uronema* sp. ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ต่อไป

จากการเก็บตัวอย่างทราย คัดแยกเซลล์โพรติสต์ และทำการศึกษาตัวอย่างที่เก็บมาทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและระดับอนุชีววิทยาแสดงให้เห็นว่า การผนวกข้อมูลทั้งสองระดับเข้าด้วยกันจะนำไปสู่การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดยจะได้มีการศึกษาต่อไปในส่วน of ตัวอย่างที่ได้มีการเก็บเพิ่มเติม รวมถึงตัวอย่างที่เก็บไว้แล้วทั้งในรูปแบบของดีเอ็นเอที่ได้สกัดเก็บไว้และในส่วน of ตัวอย่างที่สามารถเพาะเลี้ยงจนบริสุทธิ์ได้ อีกทั้งควรมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของโรโบโซมอลดีเอ็นเอให้ได้ครบสมบูรณ์ทั้งสาย เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้เพิ่มเติมในส่วนนี้มาทำการวิเคราะห์หาช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม และใช้เป็นรหัสดีเอ็นเอในการจำแนกและระบุชนิด

โพรติสต์กลุ่มซิโลเอตที่พบในบริเวณเกาะแห่งนี้ อันจะเป็นข้อมูลเชิงลึกนำไปสู่การนำสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการจำแนกและระบุชนิดที่ถูกต้องจากพื้นที่แห่งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแขนงอื่นๆ ต่อไป เช่น เซลล์วิทยา และวิวัฒนาการ อีกทั้งนำไปสู่การพัฒนาประยุกต์ใช้ซิโลเอตเหล่านี้ในด้านอื่นๆ เช่น ใช้เป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงวัยอ่อน ใช้ในการทดสอบความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักที่อาจมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ในทะเล เป็นต้น

## เอกสารอ้างอิง

- มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ คณะ. 2544. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ. *การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย อนุรักษ์และพัฒนาด้วยจิตสำนึกแห่งนักวิจัยไทย (21-23 มิถุนายน 2544) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*. หน้า 117-124.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล อารมณ รัศมิทัต นภดล สว่างนาวิณ สุกัญญา ป่องทอง พลาโด ทรัพย์สมบูรณ์ และ ทวีชัย สัจจาริย์รักษ์. 2546. ความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนกับปัจจัยทางกายภาพและเคมี. *ประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ธรรมชาติแห่งชีวิต (10-12 พฤษภาคม 2546) สำนักพระราชวังพระราชวังดุสิต*. หน้า 69-80.
- สุชา ฉะยศิริ, ชิตชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36-47.
- Barth, D., Krenek, S., Fokin, S. I., and Berendonk, T. U. 2006. Intraspecific genetic variation in *Paramecium* revealed by mitochondrial cytochrome c oxidase I sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 20-25.
- Brad, T., Braster, M., van Breukelen, B. M., van Straalen, N. M., and Röling, W. F. 2008. Eukaryotic diversity in an anaerobic aquifer polluted with landfill leachate. *Appl. Environ. Microbiol.* 74: 3959-3968.
- Burkovsky, I. V. and Mazei, Y. A. 2010. Long-term dynamics of marine interstitial ciliate community. *Protistology.* 6: 147-172.
- Carey, P. G. 1992. *Marine interstitial ciliates: An illustrated key*. London: Chapman and Hall.
- Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four new genera and nine new species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1962-1977.
- Chantangsi, C., Lynn, D. H., Brandl, M. T., Cole, J. C., Hetrick, N., and Ikonomi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of genus *Tetrahymena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2412-2425.
- Chen, M., Chen, F., Yu, Y., Ji, J., and Kong, F. 2008. Genetic diversity of eukaryotic microorganisms in Lake Taihu, a large shallow subtropical lake in China. *Microb. Ecol.* 56: 572-583.
- Cortiss, J. O. and Daggett, P.-M. 1983. "Paramecium aurelia" and "Tetrahymena pyriformis": current status of the taxonomy and nomenclature of these popularly



- known and widely used ciliates. *Protistologica*. 19: 307–322.
- Frezal, L. and Leblois, R. 2008. Four years of DNA barcoding: current advances and prospects. *Infect. Genet. Evol.* 8: 727–736.
- Gao, F., Katz, L. A., and Song, W. 2012. Insights into the phylogenetic and taxonomy of philasterid ciliates (Protozoa, Ciliophora, Scuticociliatia) based on analyses of multiple molecular markers. *Mol. Phylogenet. Evol.* 64: 308–317.
- Guillard, R. R. L. 1975. Culture of phytoplankton for feeding marine invertebrates. In Smith, W. L. and Chanley, M. H. (eds). *Culture of marine invertebrate animals*. pp 26–60. New York, USA: Plenum Press.
- Guillard, R. R. L. and Ryther, J. H. 1962. Studies of marine planktonic diatoms. *Can. J. Microbiol.* 8: 229–239.
- Hall, T. A. 1999. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41: 95–98.
- Hebert, P. D. N., Ratnasingham, S., and deWaard, J. R. 2003a. Barcoding animal life: cytochrome *c* oxidase subunit 1 divergences among closely related species. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci. (Suppl.)* 270: 1–4.
- Hebert, P. D. N., Cywinska, A., Ball, S. L., and deWaard, J. R. 2003b. Biological identifications through DNA barcodes. *Proc. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 270: 313–322.
- LeGall, L. and Saunders, G. W. 2010. DNA barcoding is a powerful tool to uncover algal diversity: a case study of the Phylloporaceae (Gigartinales, Rhodophyta) in the Canadian flora. *J. Phycol.* 46: 374–389.
- Lin, S., Zhang, H., Hou, Y., Zhuang, Y., and Miranda, L. 2009. High-level diversity of dinoflagellates in the natural environment, revealed by assessment of mitochondrial *cox1* and *cob* for dinoflagellate DNA barcoding. *Appl. Environ. Microbiol.* 75: 1279–1290.
- Lynn, D. H. 2008. *The ciliated protozoa: characterization, classification, and guide to the literature*. 3<sup>rd</sup> ed. New York, USA: Springer.
- Lynn, D. H. and Strüder-Kypke, M. C. 2006. Species of *Tetrahymena* identical by small subunit rRNA gene sequences are discriminated by mitochondrial cytochrome *c* oxidase I gene sequences. *J. Eukaryot. Microbiol.* 53: 385–387.
- Madoni, P. 2006. Benthic ciliates in Adriatic Sea lagoons. *Eur. J. Protistol.* 42: 165–173.
- Massana, R. and Pedrós-Alió, C. 2008. Unveiling new microbial eukaryotes in the surface ocean. *Curr. Opin. Microbiol.* 11: 213–218.

- Park, S. J., Park, B. J., Pham, V. H., Yoon, D. N., Kim, S. K., and Rhee, S. K. 2008. Microeukaryotic diversity in marine environments, an analysis of surface layer sediments from the East Sea. *J. Microbiol.* 46: 244–249.
- Piquet, A. M. –T., Bolhuis, H., Davidson, A. T., Thomson, P. G., and Buma, A. G. 2008. Diversity and dynamics of Antarctic marine microbial eukaryotes under manipulated environmental UV radiation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 66: 352–366.
- Robba, L., Russell, S. J., Barker, G. L., and Brodie, J. 2006. Assessing the use of the mitochondrial *cox1* marker for use in DNA barcoding of red algae (Rhodophyta). *Am. J. Bot.* 93: 1101–1108.
- Saunders, G. W. 2005. Applying DNA barcoding to red macroalgae: a preliminary appraisal holds promise for future applications. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B, Biol. Sci.* 360: 1879–1888.
- Šlapeta, J., Moreira, D., and López-García, P. 2005. The extent of protist diversity: insights from molecular ecology of freshwater eukaryotes. *Proc. Biol. Sci.* 272: 2073–2081.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., and Kumar, S. 2011. MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using Maximum Likelihood, Evolutionary Distance, and Maximum Parsimony Methods. *Mol. Biol. Evol.* doi: 0.1093/molbev/msr121.
- Tian, F., Yu, Y., Chen, B., Li, H., Yao, Y.-F., and Guo, X.-K. 2009. Bacterial, archaeal and eukaryotic diversity in Arctic sediment as revealed by 16S rRNA and 18S rRNA gene clone libraries analysis. *Polar Biol.* 32: 93–103.
- Uhlig, G. 1964. Eine einfache Methode zur Extraktion der vagilen, mesopsammalen Mikrofauna. *Helgol. Wiss. Meeresunters.* 11: 178–185.
- Wilson, E. O. 2000. A global biodiversity map. *Science.* 289: 2279.
- Wilson, E. O. 2003. The encyclopedia of life. *Trends Ecol. Evol.* 18: 77–80.

## ประวัติคณะวิจัย

### 1. รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

- |  |                             |
|--|-----------------------------|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)                          | นางสาวมาลินี ฉัตรมงคลกุล    |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)                          | Miss Malinee Chutmongkonkul |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน                        | 3 1013 00156 54 0           |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน                                   | รองศาสตราจารย์ ดร.          |
| 4. หน่วยงานและสถานที่ติดต่อได้สะดวก                  |                             |
| ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |                             |
| โทรศัพท์   | 02-218-5265                 |
| โทรสาร   | 02-218-5256                 |
| E-mail   | malinee.c@chula.ac.th       |

### 5. ประวัติการศึกษา

- |                              |                                  |
|------------------------------|----------------------------------|
| 2519 วท.บ. (ชีววิทยา)        | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย            |
| 2525 วท.ม. (สัตววิทยา)       | จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย            |
| 2534 Dr. rer. nat. (Zoology) | University of Bonn ประเทศเยอรมัน |

### 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ปรสิตวิทยา (Parasitology)

### 7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

- 7.1 ผู้อำนวยการแผนงานวิจัย: ชื่อแผนงานวิจัย -
- 7.2 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
  - 7.2.1 การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิตัวแบนในปลาที่มีเกล็ดในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2552
  - 7.2.2 ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จังหวัดสตูล, งบประมาณปี 2552
  - 7.2.3 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ., งบประมาณปี 2553-2554
  - 7.2.4 การสำรวจเบื้องต้นของเมตาเซอคาเรียของพยาธิตัวแบนในปลาที่รับประทานเป็นอาหารในพื้นที่เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, งบประมาณปี 2554
  - 7.2.5 สันฐานวิทยาและพยาธิสภาพของปรสิตบางชนิด, งบประมาณปี 2555
- 7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
  - 7.3.1 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอน พื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบประมาณปี 2553

7.3.2 ความหลากหลายของโปรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 2554

7.3.3 ความหลากหลายของสาหร่ายน้ำจืดบางชนิด, งบแผ่นดินปี 2555

#### 7.4 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

##### 7.4.1 Book

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ พงษ์ชัย หาญยุทธนากร. 2554. *สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิดในแหล่งน้ำจืด*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัทสิริบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

##### 7.4.2 Journal articles

ผุสดี ปริญญาพันธ์, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ อนุสรณ์ ปานสุข. 2548. การเปลี่ยนแปลงของประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 50.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, ผุสดี ปริญญาพันธ์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2548. ปรสิตของกิ้งก่าบิน (*Draco spp.*) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 124-125.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ ผุสดี ปริญญาพันธ์. 2552. ปรสิตในเลือดกิ้งก่าบินจากเกาะกูด จ.ตราด. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ.ชลบุรี*. หน้า 64.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ วิมล เหมะจันทร์. 2554. การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลา ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 448-456.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, วิษณุ คุนซื่อ, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ ผุสดี ปริญญาพันธ์. 2550. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยาการ อพ.สธ. พิพิธภัณฑสถานชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย อำเภอสัตหีบ จ. ชลบุรี*. หน้า 300.

- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐ คนซื่อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จ.สตูล. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะ ปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาเขียว จ. ชลบุรี*. หน้า 108.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐ คนซื่อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของ สัตว์เลี้ยงคานจากพื้นที่หมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะ ปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 442-447.
- มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร, วิเชษฐ คนซื่อ และ ผุสดี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของ สัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 457-464.
- ทัศนธร ภูมิยุทธ์ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในป่าชายเลนปลูก บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงาน วิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 277-284.
- ศรัณย์ อัครวานิชิต, มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงษ์ชัย หาญยุทธนากร และ นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในสภาพที่มีสาหร่ายไก่อในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน. *การประชุมวิชาการ ประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 758-768.
- สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของ โพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคล อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36-47.
- Chutmongkonkul, M and Pariyanonth, P. 2005. Endoparasites of five species of anurans in Thailand. *5<sup>th</sup> World Congress of Herpetology*, 19-24 June 2005, Stellenbosch, South Africa: 125.
- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2005. Helminths and Blood Parasites of Butterfly Lizards, *Leiolepis* spp., in Thailand. *31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand*, 18-20 October 2005, at Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima: 92.
- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2006. Blood parasites of six species of wild amphibians from Khum Mae Kuang forest area, Thailand. *Proceedings of AZWMP 2006*, Chulalongkorn Uni. Fac. of Vet. Sc., Bangkok, Thailand, 26-29 Oct 2006: 48.

- Chutmongkonkul, M. and Pariyanonth, P. 2007. Hematozoa of amphibians in Thailand. *Proceedings Association of Reptilian and Amphibian Veterinarians 14<sup>th</sup> Annual Conference*, New Orleans, Louisiana, April 14–18 2007: 118.
- Chutmongkonkul, M., Pariyanonth, P., Tangtrongpiros, J., and Sailasuta, A. 2005. *Lankesterella* in *Hoplobatrachus rugulosus* in Thailand. *31<sup>st</sup> Congress on Science and Technology of Thailand*, 18–20 October 2005, at Technopolis, Suranaree University of Technology, Nakhon Ratchasima: 89–90.
- Plengpanich, W., Chutmongkonkul, M., Sailasuta, A., and Kaewwiudth, S. 2006. Helminths infection in snake skin gourami *Trichogaster pectoralis* (Regan, 1910). In *Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania, Proceedings of the 5<sup>th</sup> Intercongress Symposium of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology*, 7–10 February 2006, Bangkok, Thailand: 251–255.
- Prasankok, P., Chutmongkonkul, M., and Kanchanakhan, S. 2005. Characterisation of iridovirus isolated from diseased marbled sleepy goby, *Oxyeleotris marmoratus*. In P. Walker, R. Lester, and M. G. Bondad-Reantaso, (eds). *Diseases in Asian Aquaculture V. Fish Health Section*, Asian Fisheries Society, Manila: 197–206.
- Sailasuta, A., Satetasis, J., and Chutmongkonkul, M. 2011. Pathological Study of Blood Parasites in Rice Field Frogs, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1834). *Vet. Med. Int.* doi:10.4061/2011/850568.
- Satetasis, J., Chutmongkonkul, M., and Sailasuta, A. 2009. Blood parasites of the rice field frog, *Hoplobatrachus rugulosus* (Wiegmann, 1835) from Wang Nam Yen district, Sra-kaew province, Thailand. *Proceedings of the 8<sup>th</sup> Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*, April 3, 2009: 84.

## 2. อาจารย์ ดร.ชิตชัย จันทร์ตั้งสี

- |  |  |
|--|--|
| 1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย)                | นายชิตชัย จันทร์ตั้งสี                               |
| ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ)                | Mr. Chitchai Chantangsi                              |
| 2. เลขหมายบัตรประจำตัวประชาชน              | 3 1002 00170 19 1                                    |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน                         | อาจารย์  |
| 4. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก |  |
|  | ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย |
| โทรศัพท์                                   | 02-218-5378  |
| โทรสาร                                     | 02-218-5386  |

E-mail Chitchai.C@Chula.ac.th, chantangsi01@hotmail.com

5. ประวัติการศึกษา

2544 วท.บ. (ชีววิทยา) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2549 M.Sc. (Zoology) University of Guelph ประเทศแคนาดา

2552 Ph.D. (Zoology) University of British Columbia ประเทศแคนาดา

6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ โพรติสต์วิทยา (Protistology)

7. ประสบการณ์ที่เกี่ยวข้องกับการบริหารงานวิจัยทั้งภายในและภายนอกประเทศ

7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.1.1 การประเมินศักยภาพในการกำจัดโลหะหนักของโพรติสต์ที่สกัดจากบ่อบำบัดน้ำเสีย โรงควบคุมคุณภาพน้ำของกรุงเทพมหานคร

7.1.2 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์บริเวณเกาะสี่ซัง จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ

7.2 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความหลากหลายของโพรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่ อพ.สธ.

7.2.2 ปรสิตรัสต์ในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลี้ยงลูกในน้ำในพื้นที่ อพ.สธ.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.3.1 Book

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ ชิตชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

7.3.2 Journal articles

สุชา เฉยศิริ, ชิตชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรติสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติการนิเวศวิทยา อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหัดของระเวียงมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36-47.

Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. An SSU rDNA barcoding approach to the diversity of marine interstitial cercozoans, including descriptions of four new genera and nine new species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 1962-1977.

<sup>4</sup>Chantangsi, C. and Leander, B. S. 2010. Ultrastructure, life cycle and molecular phylogenetic position of a novel marine sand-dwelling cercozoan: *Clautriavia biflagellata* sp. nov. *Protist.* 161: 133-147

- Chantangsi, C., Hoppenrath, M., and Leander, B. S. 2010. Evolutionary relationships among marine cercozoans as inferred from combined SSU and LSU rDNA sequences and polyubiquitin insertions. *Mol. Phylogenet. Evol.* DOI:10.1016/j.ympev.2010.07.007.
- Rueckert, S., Chantangsi, C., and Leander, B. S. 2010. Molecular systematics of marine gregarines (Apicomplexa) from North-eastern Pacific polychaetes and nemerteans, with descriptions of three novel species: *Lecudina phyllochaetopteri* sp. nov., *Difficilina tubulani* sp. nov. and *Difficilina paranemertis* sp. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 60: 2681–2690.
- Okamoto, N., Chantangsi, C., Horák, A., Leander, B. S., and Keeling, P. J. 2009. Molecular phylogeny and description of the novel katablepharid *Roombia truncata* gen. et sp. nov., and establishment of the Hacrobia taxon nov. *PLoS ONE.* 4: e7080. doi:10.1371/journal.pone.0007080.
- Chantangsi, C. and Lynn, D. 2008. Phylogenetic relationships within the genus *Tetrahymena* inferred from the cytochrome c oxidase subunit 1 and the small subunit ribosomal RNA genes. *Mol. Phylogenet. Evol.* 49: 979–987.
- Chantangsi, C., Esson, H. J., and Leander, B. S. 2008. Morphology and molecular phylogeny of a marine interstitial tetraflagellate with putative endosymbionts: *Auranticordis quadriverberis* n. gen. et sp. (Cercozoa). *BMC Microbiol.* 8: 123.
- Chantangsi, C., Lynn, D. H., Brandl, M. T., Cole, J. C., Hetrick, N., and Ikonomi, P. 2007. Barcoding ciliates: a comprehensive study of 75 isolates of genus *Tetrahymena*. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57: 2412–2425.