รายงานวิจัย
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2555

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

การจำแนกชนิดของโพรติสต์บางชนิดที่พบในเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยวิธีทางชีวโมเลกุล

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

อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี
สุชา เฉยศิริ
รองศาสตราจารย์ ดร.มาลินี ฉัตรมงคลกุล

ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดา ฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ตลอดจนเจ้าหน้าที่ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ และขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในทุกๆ ด้าน

บทคัดย่อ

การจำแนกและระบุชนิดของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่ถูกต้องบ่อยครั้งต้องอาศัยความช่วยเหลือจากผู้เชี่ยวชาญหรือการใช้เทคนิคพิเศษช่วยในการศึกษา เช่น การย้อมสี และ การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน งานวิจัยชิ้นนี้ศึกษาศักยภาพในการใช้วิธีการทางสัณฐานวิทยาร่วมกับวิธีการทางอณูชีววิทยาในการระบุชนิดของซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายหน้าดินบริเวณชายฝั่งทะเล โดยทำการเก็บตัวอย่างทรายจากพื้นที่หาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ระหว่างปี 2554-2555 ทำการสกัดโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตออกจากทรายตัวอย่างโดยการไล่ด้วยน้ำทะเลแข็ง จากนั้นทำการสำรวจตัวอย่างภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงและเพาะเลี้ยงซิลิเอตบางส่วนด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-Si เพื่อใช้ศึกษาในขั้นต่อไป จากการศึกษาพบซิลิเอตจำนวน 46 ชนิด ได้แก่ *Aspidisca* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps pulcher*, *Coleps tesselatus*, *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* มาศึกษาเพิ่มเติมในระดับอณูชีววิทยา การเพิ่มจำนวนยีนด้วยเทคนิคพีซีอาร์และหาลำดับนิวคลีโอไทด์ด้วยไพรเมอร์ที่ออกแบบใหม่สำหรับยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเอตทั้ง 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 การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้ข้อมูลทางสัณฐานวิทยาร่วมกับข้อมูลทางอณูชีววิทยาในการแยกและระบุชนิดของซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทรายชายฝั่งทะเล 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 cilates. 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 tesselatus*, *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
การศึกษาซิลิเอตในระดับอณูชีววิทยาด้วยรหัสดีเอ็นเอ	30
วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา	37
เอกสารอ้างอิง	40
ประวัตินักวิจัยและคณะ	43

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	รายชื่อซิลิเอตที่พบบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี.....	20
ตารางที่ 2	ชนิดของซิลิเอตบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่สามารถเพาะเลี้ยงอยู่รอดได้ในห้องปฏิบัติการ.....	30

สารบัญภาพ

		หน้า
ภาพที่ 1	พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกลมที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี	3
ภาพที่ 2	อุปกรณ์ภาคสนามที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทราย	4
ภาพที่ 3	การสกัดโพรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีการไล่ด้วยน้ำแข็ง	5
ภาพที่ 4	พื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกลมโดยทั่วไป	14
ภาพที่ 5	พื้นที่เก็บตัวอย่างและหาดทรายบริเวณหาดลูกลม	15
ภาพที่ 6	ขั้นตอนการบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกลม	16
ภาพที่ 7	ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกลมโดยใช้ช้อนพรวน	17
ภาพที่ 8	พื้นที่เก็บตัวอย่างทรายบางบริเวณของหาดลูกลมที่ทรายมีลักษณะเนื้อทรายค่อนข้างหยาบและมีก้อนกรวดและหินขนาดใหญ่แทรกอยู่จำนวนมาก	18
ภาพที่ 9	การเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่ห่างออกไปจากชายฝั่งเล็กน้อย	19
ภาพที่ 10	*Aspidisca* sp.	22
ภาพที่ 11	*Blepharisma* sp.	22
ภาพที่ 12	*Coleps pulcher*	22
ภาพที่ 13	*Coleps tesselatus*	22
ภาพที่ 14	*Coleps* sp.	23
ภาพที่ 15	*Condylostoma arenarium*	23
ภาพที่ 16	*Condylostoma enigmatica*	23
ภาพที่ 17	*Diophrys* sp.	23
ภาพที่ 18	*Euplotes* sp. 1	24
ภาพที่ 19	*Euplotes* sp. 2 สายพันธุ์ SS.1.L	24
ภาพที่ 20	*Euplotes* sp. 3 สายพันธุ์ SS.3.L	24
ภาพที่ 21	*Euplotidium* sp.	24
ภาพที่ 22	*Frontonia* sp.	25
ภาพที่ 23	hypotrich 01	25
ภาพที่ 24	hypotrich 02	25
ภาพที่ 25	hypotrich 03 (*Holosticha* sp.)	25
ภาพที่ 26	hypotrich 04	26
ภาพที่ 27	hypotrich 05	26
ภาพที่ 28	karyorelictean 01	26
ภาพที่ 29	karyorelictean 02	26
ภาพที่ 30	karyorelictean 03	27
ภาพที่ 31	karyorelictean 04	27
ภาพที่ 32	karyorelictean 06	27
ภาพที่ 33	*Litonotus* sp.	27

สารบัญภาพ (ต่อ)

หน้า

ภาพที่ 34 *Loxophyllum* sp. 28
ภาพที่ 35 *Mesodinium* sp. 28
ภาพที่ 36 *Pleuronema* sp. 28
ภาพที่ 37 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.2.L 28
ภาพที่ 38 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (1) 29
ภาพที่ 39 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (2) 29
ภาพที่ 40 *Uronema* sp. สายพันธุ์ SS.3.L (3) 29
ภาพที่ 41 *Uronychia* sp. 29
ภาพที่ 42 ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ปรากฏบนเจล หลังจากนำไปย้อมด้วยสารละลาย ethidium bromide 31

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

ชิดชัย 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, Phyathai Road, Pathumwan, Bangkok, 10330

บทนำและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ความเหมือนกันทางสัณฐานวิทยา รูปร่างที่แตกต่างกันของแต่ละช่วงวัยในวงชีวิต ตลอดจนขนาดตัวซึ่งบางกลุ่มอาจมีขนาดไม่ใหญ่นัก สิ่งเหล่านี้ล้วนเป็นอุปสรรคต่อการจำแนกและระบุชนิดของสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่มีขนาดเล็ก เช่น โพรติสต์ สาหร่ายขนาดเล็ก (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) จากการศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี พบความหลากหลายทางชีวภาพของสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้เป็นจำนวนมาก (มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ คณะ, 2544, 2546) จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะประยุกต์ใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลช่วยในการศึกษาและระบุชนิดโพรติสต์ที่พบในบริเวณเกาะแห่งนี้ อันจะเป็นข้อมูลเชิงลึกที่จะนำไปสู่การนำสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการจำแนกและระบุชนิดที่ถูกต้องจากพื้นที่แห่งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแขนงอื่นๆ เช่น เซลล์วิทยาและวิวัฒนาการต่อไป

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

Hebert et al. (2003a) ทดลองใช้ลำดับดีเอ็นเอสายสั้นๆ อย่างน้อย 400 คู่เบสของยีน cytochrome *c* oxidase subunit 1 (*cox1*) จากจีโนมของไมโตคอนเดรีย (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 สาหร่ายไดโน-แฟลกเจลเลต (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

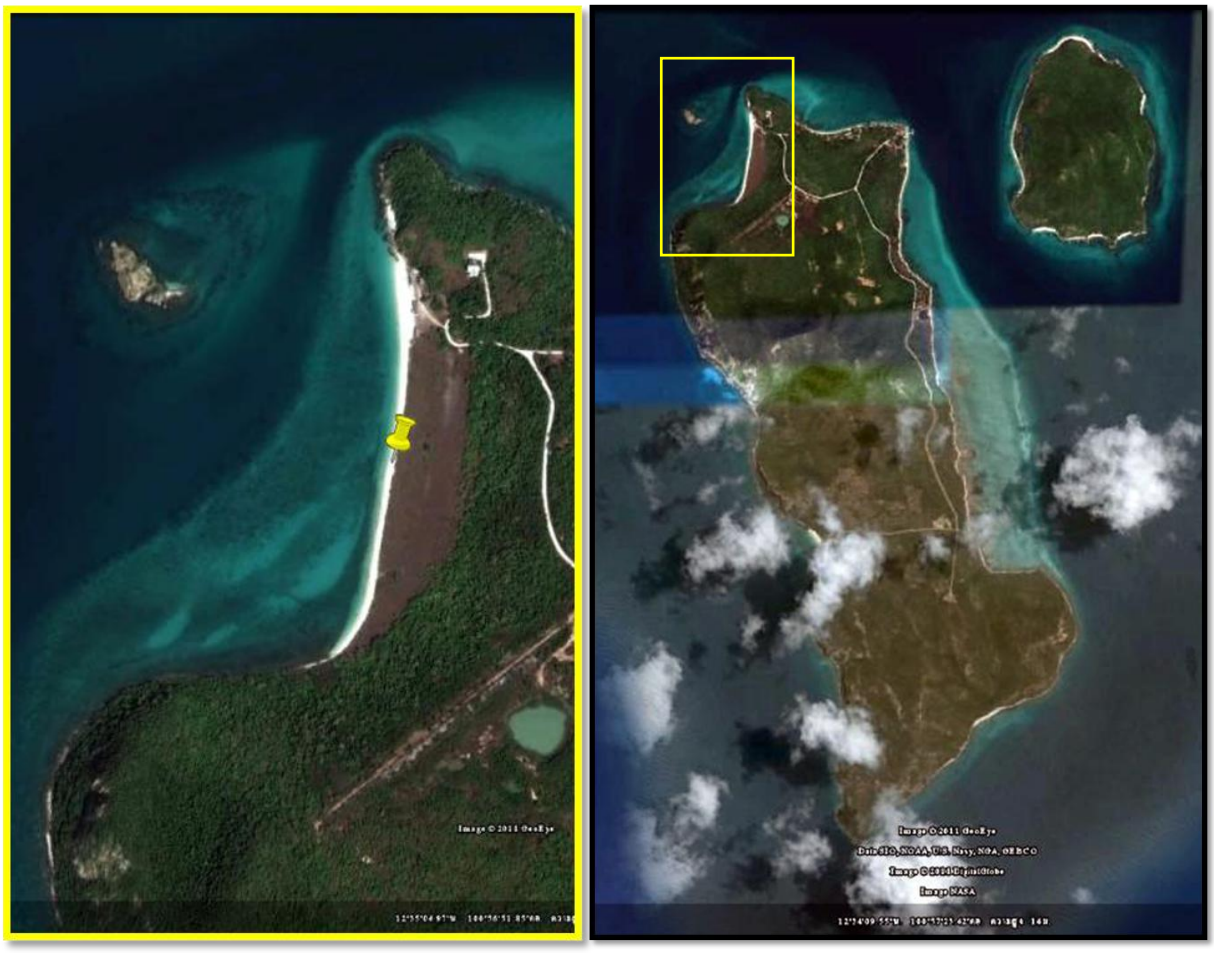
ศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์ที่ดำรงชีวิตตามหน้าดิน บริเวณหาดทรายชายฝั่งทะเลของเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยอาศัยข้อมูลทางสัณฐานวิทยาและทางอณูชีววิทยาโดยใช้รหัสดีเอ็นเอของไรโบโซมอลดีเอ็นเอ (ribosomal DNA)

วิธีดำเนินการวิจัย

ทำการศึกษาวิจัยโพรติสต์ที่พบบริเวณพื้นที่เกาะแสมสารเป็นเวลา 1 ปี (ตั้งแต่ตุลาคม 2554 ถึง กันยายน 2555)

1. การปฏิบัติงานในภาคสนาม

พื้นที่เก็บตัวอย่างคือ บริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยตัวหาดเป็นหาดทรายที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะ (ภาพที่ 1) การเก็บตัวอย่างเริ่มต้นด้วยการสังเกตและบันทึก ลักษณะ สี และตำแหน่งของพื้นที่เก็บตัวอย่าง เก็บตัวอย่างทรายที่ยังมีความชื้นหรือน้ำทะเลท่วมถึงด้วยช้อนพรวนลงในกล่องพลาสติกที่มีความจุปริมาตร 750 มิลลิลิตร จำนวน 12 กล่อง ต่อการเก็บตัวอย่างในแต่ละครั้ง (ภาพที่ 2) เนื่องจากไม่มีการรักษาสภาพตัวอย่าง ดังนั้นจึงนำตัวอย่างกลับมาศึกษาในห้องปฏิบัติการหลังการเก็บทันที



ภาพที่ 1 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกลม (ซ้าย) ที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร (ขวา; กรอบสีเหลือง) ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี (ภาพจาก Google Earth, 2011)

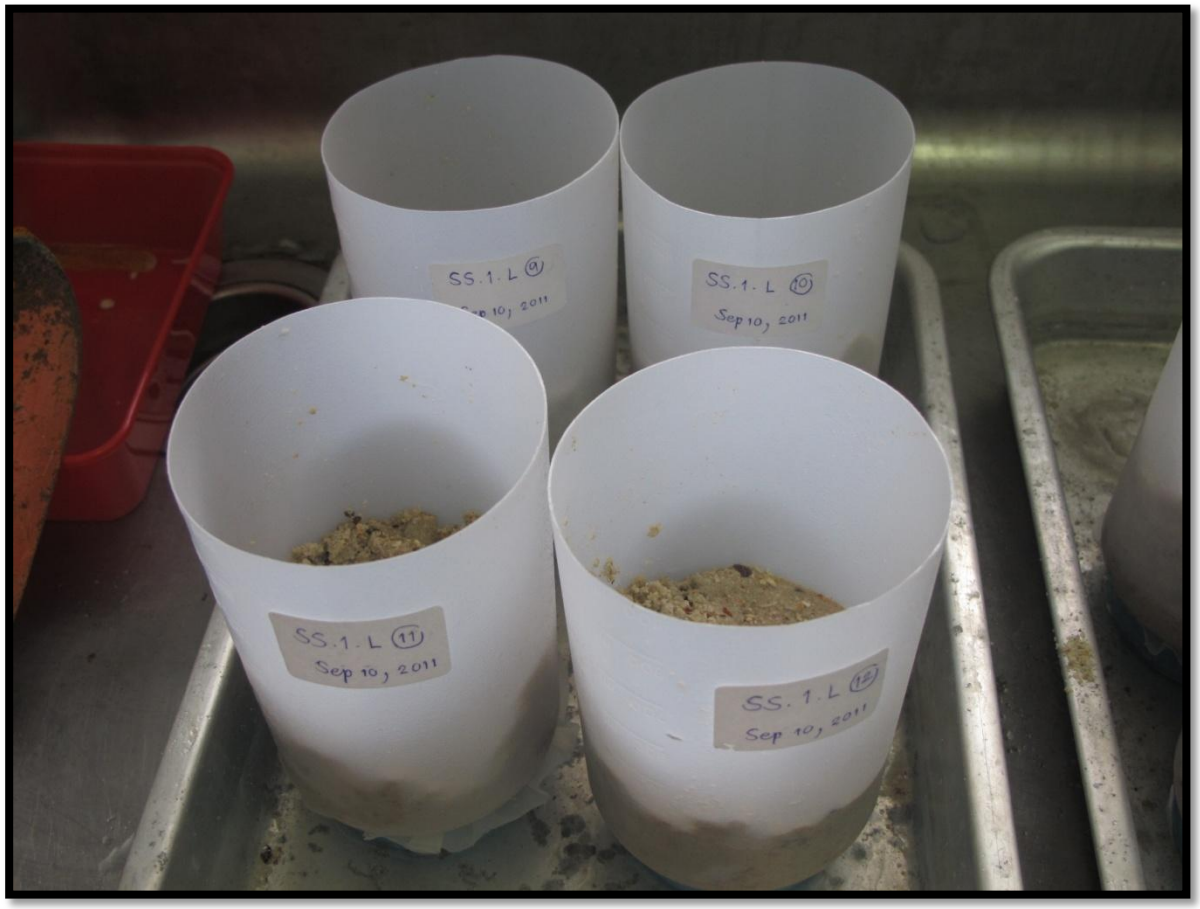
ภาพที่ 2 แสดงอุปกรณ์ภาคสนามที่ใช้ในการเก็บตัวอย่างทราย ได้แก่ กล่องพลาสติกและช้อนพรวน

2. การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการ

การปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการแบ่งออกเป็น 2 ส่วนหลักๆ คือ การศึกษาในระดับสัณฐานวิทยาและการศึกษาในระดับโมเลกุล

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

I) การศึกษาสัณฐานวิทยาของตัวอย่างโพรติสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสง (light compound microscope) ที่กำลังขยายต่างๆ พร้อมบันทึกภาพ ในกรณีที่พบตัวอย่างโพรติสต์จำนวนมาก สามารถศึกษาตัวอย่างได้โดยใช้ปิเปตต์แก้วดูดและหยดน้ำตัวอย่างได้โดยตรงลงบนกระจกสไลด์ 1-2 หยด จากนั้นปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ที่เคลือบยกขอบทั้ง 4 ด้านด้วยวาสลีนบางๆ เพื่อป้องกันการระเหยของน้ำตัวอย่าง บันทึกภาพตัวอย่างด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิตอลที่ต่อเข้ากับกล้องจุลทรรศน์ ในกรณีที่พบตัวอย่างโพรติสต์จำนวนไม่มากนักต้องทำการแยกเซลล์ที่ต้องการศึกษาออกมาทีละเซลล์ โดยใช้ปิเปตต์แก้วลนไฟดึงปลายให้แหลม จากนั้นใช้ปิเปตต์ปลายแหลมนี้ทำการแยกเซลล์ภายใต้



ภาพที่ 3 แสดงการสกัดโพรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีการไล่ด้วยน้ำแข็ง

กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับ (inverted compound microscope) วางลงบนสไลด์ที่มีหยดน้ำทะเลอยู่ ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์และศึกษาตัวอย่างตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น ตัวอย่างสดบางส่วนที่อยู่ในจานเพาะเลี้ยงสามารถศึกษาได้โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับ พร้อมบันทึกภาพนิ่งภาพเคลื่อนไหว และวัดขนาดตัวอย่างเพื่อใช้ประกอบในการระบุสกุลและชนิดของตัวอย่างต่อไป

II) การเพาะเลี้ยงโพรติสต์บางชนิดจากทรายตัวอย่าง (enrichment method) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica (Guillard, 1975; Guillard and Ryther, 1962) ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงที่นิยมใช้ในการเพาะเลี้ยงโพรติสต์ที่อาศัยอยู่ตามหน้าดินชายฝั่งทะเลหลายชนิด โดยมีขั้นตอนดังนี้

(1) เติมอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica ลงในจานเพาะเชื้อขนาด 24 หลุมๆ ละ ประมาณ 1 มิลลิลิตร

(2) ใส่ทรายตัวอย่างที่เก็บมาขนาดประมาณเท่าเม็ดถั่วเขียวลงไปในหลุมที่มีอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ จากนั้นเติมยีสต์ผงที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลงไปเล็กน้อย ปิดฝาจานเพาะเชื้อแล้วพันด้วยพาราฟิล์ม เพื่อป้องกันการระเหยของอาหารเลี้ยง

(3) วางจานเพาะเลี้ยงตัวอย่างไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(4) ตรวจสอบการเพิ่มจำนวนของโพรติสต์ในจานเพาะเลี้ยงภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือแบบเลนส์ประกอบหัวกลับทุกวัน

(5) เมื่อพบว่ามีโพรติสต์ชนิดไหนเพิ่มขึ้นเป็นจำนวนมาก จึงทำการสกัดแยกโพรติสต์ชนิดนั้นให้บริสุทธิ์

III) การสกัดแยกและเพาะเลี้ยงโพรติสต์ให้บริสุทธิ์โดยเริ่มจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว

(1) นำปาสเจอร์ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ดึงปลายให้แหลมโดยใช้ความร้อนจากตะเกียงแอลกอฮอล์

(2) ใช้ปิเปตต์ดูดตัวอย่างเซลล์จากการเพาะเลี้ยงข้างต้นหยดลงบนสไลด์หลุมที่ผ่านการทำความสะอาดด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70%

(3) ใช้ปิเปตต์ปลายแหลมดูดเซลล์โพรติสต์ที่สนใจภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอมาเพียง 1 เซลล์

(4) ล้างเซลล์โพรติสต์ด้วยน้ำทะเลกรองที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

(5) นำเซลล์โพรติสต์ที่สะอาดแล้วใส่ลงในจานพลาสติกชนิด 96 หลุม ตรวจส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับแบบใช้แสงว่าในแต่ละหลุมมีเซลล์โพรติสต์ที่ต้องการเพียงเซลล์เดียว

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

(7) ทำการตรวจดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์โพรติสต์ที่คัดแยกไว้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอหรือกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับแบบใช้แสงทุกวัน

(8) ติดตามสังเกตปริมาณของเซลล์โพรติสต์และทำการย้ายเซลล์โพรติสต์ไปเลี้ยงในจานเพาะเชื้อพลาสติกชนิด 24 หลุม เมื่อพบว่ามีจำนวนเซลล์โพรติสต์หนาแน่นในแต่ละหลุม โดยใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดเซลล์โพรติสต์ที่เลี้ยงไว้จากจานเพาะเชื้อชนิด 96 หลุม ประมาณ 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในจานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม เติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(9) ทำการตรวจดูการเพิ่มจำนวนของเซลล์โพรติสต์ที่คัดแยกไว้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอทุกวัน และทำการย้ายเซลล์โพรติสต์ไปเลี้ยงในหลอดทดลองฝาเกลียว เมื่อพบว่ามีจำนวนเซลล์โพรติสต์หนาแน่นในแต่ละหลุม โดยใช้ปาสเจอร์ปิเปตต์แก้วที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์โพรติสต์ที่เลี้ยงไว้จากจานเพาะเชื้อชนิด 24 หลุม มาประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้นใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 10 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ f/2-silica แล้วเติมยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง

(10) เปลี่ยนถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่และเติมอาหารใหม่ เมื่อพบว่าเซลล์โพรติสต์เริ่มโตช้าหรือมีจำนวนลดลง

(11) เลี้ยงและรักษาเซลล์โพรติสต์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ เพื่อการศึกษาในระดับอณูชีววิทยาขั้นต่อไป

ข) การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพในระดับโมเลกุลของตัวอย่างโพรติสต์

I) การสกัดดีเอ็นเอของตัวอย่างโพรติสต์ โดยใช้ชุดสกัดดีเอ็นเอ MasterPure™ Complete DNA & RNA Purifiction Kit ของ EPICENTRE (Madison, WI, USA, Cat. No. MC85200) ซึ่งมีขั้นตอนการสกัด ดังนี้

(1) ทำการแยกเซลล์โพรติสต์ที่พบและต้องการศึกษาเป็นเซลล์ๆ โดยใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วลนไฟดึงปลายจนแหลมเล็ก

(2) ล้างเซลล์ที่แยกออกมาในน้ำทะเลที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว 2 ครั้ง

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

(4) ในกรณีของโพรติสต์ที่สามารถเพาะเลี้ยงได้ จะใช้ปิเปตต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วดูดเซลล์ที่เลี้ยงไว้ในหลอดเพาะเลี้ยงฝาเกลียวประมาณ 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 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) นำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่มีตัวอย่างไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อน (heat block) ที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที และทำการเขย่าทุกๆ 5 นาที

(10) นำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่มีตัวอย่างไปแช่บนน้ำแข็ง เพื่อลดอุณหภูมิเป็นเวลา 3-5 นาที

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

(12) ใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสไปใส่หลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ขนาด 1.5 มิลลิลิตรหลอดใหม่ ทิ้งส่วนตะกอนก้นหลอดไป

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

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

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

(16) นำหลอดตัวอย่างไปตั้งโดยเปิดฝาไว้บนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนกระทั่งเอทานอลในหลอดระเหยออกไปจนหมด

(17) เติมสารละลายบัฟเฟอร์ทีอี (Tris EDTA buffer: TE) ปริมาตร 30 ไมโครลิตร เพื่อละลายตะกอนดีเอ็นเอ นำตัวอย่างดีเอ็นเอไปเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะใช้ในการทำปฏิกิริยาขั้นต่อไป

II) การทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรส (polymerase chain reaction: PCR) หรือพีซีอาร์

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

[1] 5X KAPA2G Buffer A	10	ไมโครลิตร
[2] $MgCl_2$ (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

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง 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	จนกว่าจะนำปฏิกิริยาออกจากเครื่อง		

(2) นำปฏิกิริยาพีซีอาร์ที่ได้จากการทำปฏิกิริยาครั้งแรก (primary PCR) ข้างต้นไปใช้เป็นแม่พิมพ์ในการทำปฏิกิริยาพีซีอาร์ขั้นต่อไป (secondary PCR) โดยเติมสารในการทำปฏิกิริยาตามลำดับ ดังนี้

[1] 5X KAPA2G Buffer A	5	ไมโครลิตร
[2] $MgCl_2$ (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 µM	2	ไมโครลิตร
[6] ดีเอ็นเอจากปฏิกิริยาพีซีอาร์ครั้งแรกข้างต้น	2	ไมโครลิตร
[7] PCR grade water	12.8	ไมโครลิตร
[8] KAPA2G Robust HotStart DNA Polymerase (5 units/µl)	0.2	ไมโครลิตร
ปริมาตรสุดท้าย	25	ไมโครลิตร

นำหลอดพีซีอาร์ที่เติมสารเรียบร้อยแล้วใส่ลงในเครื่อง 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 จากนั้นตรวจดูผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ได้ภายใต้แสงยูวี พร้อมบันทึกภาพ

(6) ทำปฏิกิริยาซ้ำในข้อ (1)-(5) เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่มีความเข้มข้นมากพอในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอของตัวอย่างโพรติสต์ที่คัดแยกได้

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

(8) นำแผ่นเจลไปตรวจดูภายใต้แสงยูวีและใช้ใบมีดที่สะอาดตัดเอาเฉพาะเจลในส่วนที่มีแถบดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการใส่ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วขนาด 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 ลงหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ที่มีแถบเจลดีเอ็นเอขนาดที่ต้องการบรรจุอยู่ ผสมให้เข้ากัน

(2) นำหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ไปตั้งบนเครื่องให้ความร้อนที่อุณหภูมิ 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 ลงในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์ 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 จากนั้นใช้ปิเปตต์อัตโนมัติดูดส่วนน้ำใสที่มีดีเอ็นเอละลายอยู่ไปใส่ในหลอดไมโครเซ็นตริฟิวก์หลอดใหม่ ระวังอย่าให้ส่วนของ ULTRA BIND ดูดติดมากับส่วนน้ำใส

(12) นำตัวอย่างดีเอ็นเอที่ได้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะส่งไปหาลำดับนิวคลีโอไทด์ต่อไป

IV) การหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (DNA sequencing) ของยีนที่ต้องการด้วยไพรเมอร์ที่เหมาะสม โดยใช้เทคนิคการหาลำดับนิวคลีไทด์อัตโนมัติแบบธรรมดา (normal automatic sequencing) ด้วยเครื่อง 3730XL DNA sequencer โดยทำการส่งผลิตภัณฑ์ที่ได้จากปฏิกิริยาลูกโซ่โพลิเมอร์เรสหรือผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ที่ทำความสะอาดแล้วไปยังบริษัท Macrogen ประเทศเกาหลี เพื่อทำการหาลำดับนิวคลีโอไทด์

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

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

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

สถานที่ทำการวิจัยและเก็บข้อมูล

ภาคสนาม: บริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยตัวหาดเป็นหาดทรายที่ตั้งอยู่ทางด้านทิศเหนือของเกาะแสมสาร

ห้องปฏิบัติการ: ห้องปฏิบัติการ Protistology Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษา

1. การปฏิบัติงานในภาคสนาม

การปฏิบัติงานในภาคสนาม แบ่งการเก็บตัวอย่างออกเป็น 2 ช่วง คือ

1.1 ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง เพื่อการวางแผนงานวิจัยและประเมินความหลากหลายเบื้องต้นของโพรติสต์ บริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บตัวอย่าง 2 ครั้ง คือ วันที่ 24 เดือนมีนาคม และ 21 พฤษภาคม พ.ศ. 2554 (ภาพที่ 4-9; ตารางที่ 1) โดยทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาบางส่วนและบันทึกภาพของโพรติสต์กลุ่มต่างๆ พบโพรติสต์ทั้งในกลุ่มโพรโตซัวและสาหร่ายขนาดเล็ก จากการสำรวจสองครั้งในช่วงเดือนมีนาคมและพฤษภาคม พ.ศ. 2554 พบว่าบริเวณหาดลูกลม มีความหลากชนิดของซิลิเอตสูง เมื่อเปรียบเทียบกับหาดอื่นที่อยู่ในบริเวณใกล้เคียง ดังนั้นงานวิจัยชิ้นนี้จะมุ่งเน้นการศึกษาความหลากหลาย และการจำแนกชนิดของซิลิเอตโดยวิธีทางชีวโมเลกุลที่พบบริเวณหาดลูกลมเป็นหลัก โดยทำการจัดจำแนกกลุ่มและระบุชนิดของซิลิเอต โดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยาอ้างอิงจากหนังสือ Marine interstitial ciliates (Carey, 1992) ตลอดจนเอกสารและรูปวิธานอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง โดยใช้ลักษณะของรูปร่าง, ขนาด, จำนวนและตำแหน่งของนิวเคลียส, ร่องปาก และการจัดเรียงตัวของซิเลียฯลฯ ในการจัดจำแนก ในกรณีที่ไม่สามารถจัดจำแนกได้ถึงระดับชนิดจะทำการระบุเป็นระดับสกุล

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

จากการสำรวจพื้นที่ศึกษาบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร ในช่วงทดลองเก็บตัวอย่างและช่วงเก็บตัวอย่างจริง (ภาพที่ 4-9) และทำการเก็บทรายตัวอย่างเพื่อนำมาสกัดโพรติสต์ออกจากทรายด้วยวิธีสกัดไล่โดยใช้น้ำแข็งของ Uhlig (1964) การส่องตรวจตัวอย่างโพรติสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบแบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์เลนส์ประกอบหัวกลับโดยอาศัยลักษณะทางสัณฐานวิทยา พบซิลิเอตจำนวน 46 ชนิด ได้แก่ *Aspidisca* sp., *Blepharisma* sp., *Coleps pulcher*, *Coleps tesselatus*, *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 µm 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

จากการสำรวจศึกษาพื้นที่บริเวณหาดลูกลมพบว่า ความหลากชนิดและจำนวนของโพรติสต์จะเพิ่มขึ้นในตัวอย่างทรายที่เก็บห่างออกไปจากชายฝั่ง ดังนั้นในการเก็บตัวอย่างแต่ละครั้งได้ทำการเก็บในบริเวณที่ไกลที่สุดที่สามารถไปถึงได้และในช่วงที่น้ำลดลงต่ำสุดของวัน

2.2 การเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่ศึกษาให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์

จากการทดลองเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่ศึกษาให้ได้สายพันธุ์บริสุทธิ์โดยเริ่มต้นจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว (clonal and pure culturing) ของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่สำรวจพบ โดยทำการคัดแยกซิลิเอตที่สนใจหลายสายพันธุ์ (isolate) และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงสูตร f/2-Si ของ Guillard (1975) และ Guillard และ Ryther (1962) โดยใช้ยีสต์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้วเป็นอาหาร 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 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างบริเวณหาดลูกลมโดยทั่วไป ซึ่งเป็นหาดที่ยังคงความเป็นธรรมชาติอยู่มาก น้ำทะเลมีสีเขียวอมฟ้าค่อนข้างใส เนื่องจากมีปริมาณนักท่องเที่ยวที่ไปดำน้ำชมปะการังบริเวณหาดนี้ไม่มากนัก ลักษณะทรายที่พบบริเวณหาดนี้มีสีค่อนข้างขาวเนื้อละเอียดปนกับก้อนกรวดขนาดใหญ่

ภาพที่ 5 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างและหาดทรายบริเวณหาดลูกลม ลักษณะทรายที่พบบริเวณหาดนี้มีสีค่อนข้างขาวเนื้อละเอียดปนกับก้อนกรวดขนาดใหญ่ (ภาพบน) และมีสาหร่ายขนาดใหญ่ซึ่งถูกน้ำทะเลพัดเข้าฝั่งกระจายอยู่ทั่วไปตลอดแนวหาด (ภาพล่าง)

ภาพที่ 6 แสดงขั้นตอนการบันทึกข้อมูลและเก็บตัวอย่างทรายที่บริเวณหาดลูกลม (ภาพบน) การเก็บตัวอย่างจะใช้ช้อนพรวนตักทรายเนื้อละเอียดและหยาบใส่ลงในกล่องพลาสติก โดยเลือกเก็บทรายบริเวณที่มีน้ำทะเลท่วมถึงและตักน้ำทะเลใส่ลงในกล่องเล็กน้อยให้ตัวอย่างทรายมีน้ำหล่อเลี้ยง (ภาพล่าง)

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

ภาพที่ 8 แสดงพื้นที่เก็บตัวอย่างทรายบางบริเวณของหาดลูกลมที่ทรายมีลักษณะเนื้อทรายค่อนข้างหยาบและมีก้อนกรวดและหินขนาดใหญ่แทรกอยู่จำนวนมาก (ภาพบน) การเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่มีลักษณะเช่นนี้จะเลือกเก็บเฉพาะเนื้อทรายโดยไม่เก็บส่วนของก้อนกรวดรวมมาด้วย (ภาพล่าง)

ภาพที่ 9 แสดงการเก็บตัวอย่างทรายบริเวณที่ห่างออกไปจากชายฝั่งเล็กน้อย โดยการดำน้ำและใช้ช้อนพรวนตักทรายบริเวณพื้นท้องทะเล (ภาพบน) ใส่ลงในกล่องพลาสติก (ภาพล่าง) จากการศึกษาพบว่าทรายในบริเวณนี้เมื่อเทียบกับบริเวณอื่นจะพบซิลิเอตและโพรติสต์อื่นๆ อาศัยอยู่เป็นจำนวนมาก

ตารางที่ 1 แสดงรายชื่อซิลิเอตที่พบบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่ได้ศึกษาจากการสำรวจจำนวน 7 ครั้ง

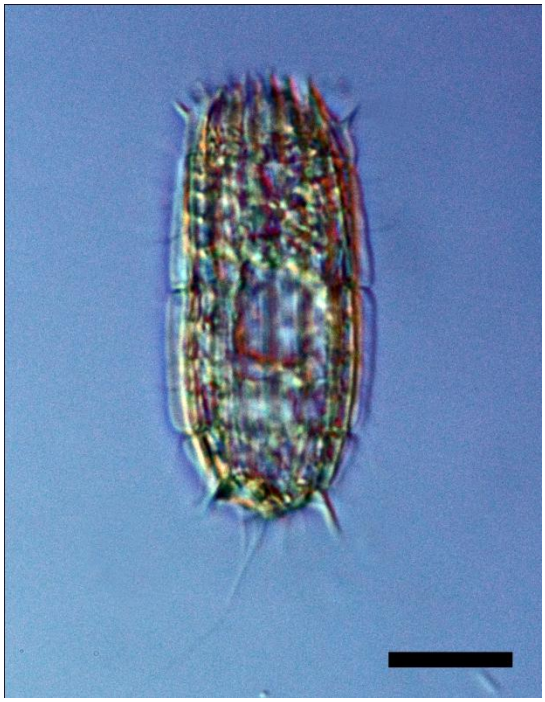
ลำดับที่	สกุล/ชนิด	ช่วงทดลองเก็บตัวอย่าง		ช่วงเก็บตัวอย่างจริง				
		มี.ค. 2554	พ.ค. 2554	ก.ย. 2554	ม.ค. 2555	มี.ค. 2555	พ.ค. 2555	ก.ค. 2555
1	*Aspidisca* sp.	✓	✓		✓	✓	✓	✓
2	*Blepharisma* sp.					✓		
3	*Coleps pulcher*				✓	✓		
4	*Coleps tesselatus*			✓	✓	✓		
5	*Coleps* sp.	✓				✓		
6	*Condylostoma arenarium*		✓			✓		✓
7	*Condylostoma enigmatica*							✓
8	*Diophrys* sp.			✓	✓	✓	✓	✓
9	*Euplotes* sp. 1			✓				
10	*Euplotes* sp. 2	✓	✓	✓	✓	✓	✓	✓
11	*Euplotes* sp. 3					✓		
12	*Euplotidium* sp.		✓					
13	*Frontonia* sp.		✓		✓			✓
14	hypotrich 01			✓		✓		
15	hypotrich 02			✓				
16	hypotrich 03 (*Holosticha* 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	*Kentrophoros* sp.		✓			✓	✓	✓
36	*Litonotus* sp.		✓					
37	*Loxodes* sp. 1		✓			✓	✓	✓
38	*Loxodes* sp. 2		✓				✓	✓
39	*Loxodes* sp. 3		✓			✓		✓
40	*Loxophyllum* sp.			✓	✓			
41	*Mesodinium* sp.			✓	✓	✓		
42	*Pleuronema* sp.	✓	✓			✓		
43	*Protocruzia* sp.						✓	✓
44	*Stichotricha* sp.		✓				✓	✓
45	*Uronema* sp.				✓	✓	✓	✓
46	*Uronychia* 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 tesselatus*

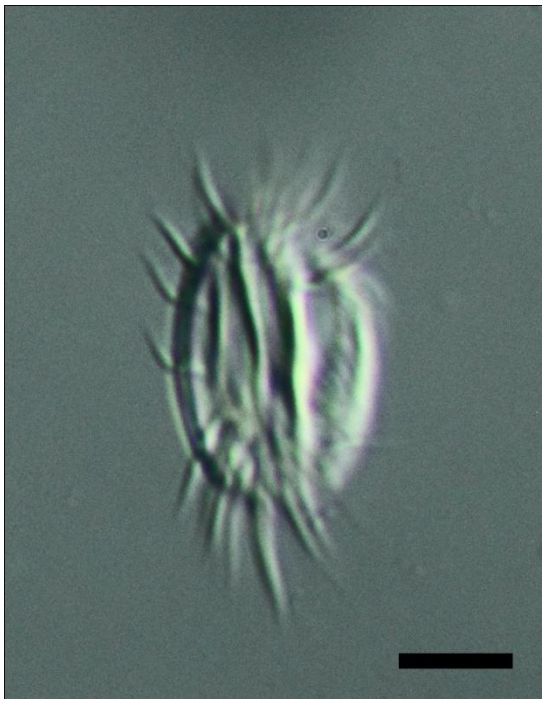
ภาพที่ 14 *Coleps* sp.

ภาพที่ 15 *Condylostoma arenarium*; 100 µm

ภาพที่ 16 *Condylostoma enigmatica*; 100 µm

ภาพที่ 17 *Diophrys* sp.

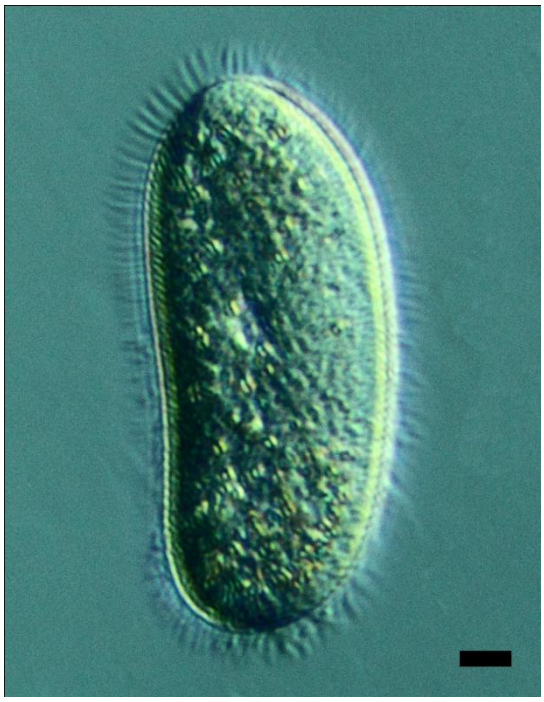
ภาพที่ 18 *Euplotes* sp. 1



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

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

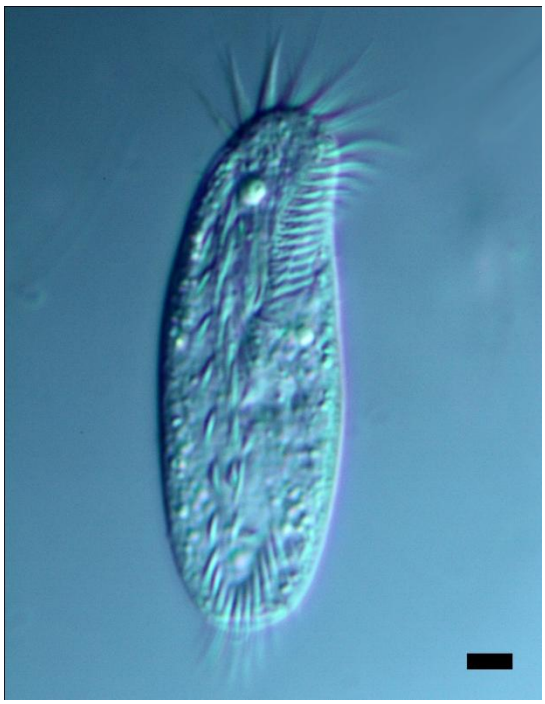
ภาพที่ 21 *Euplotidium* sp.



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

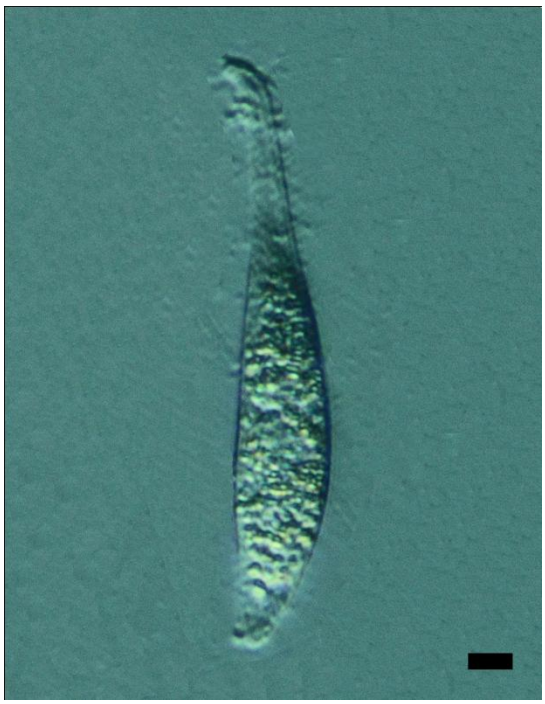
ภาพที่ 28 karyorelictean 01; 100 µm

ภาพที่ 29 karyorelictean 02; 50 µm

ภาพที่ 30 karyorelictean 03; 30 µm

ภาพที่ 31 karyorelictean 04; 100 µm

ภาพที่ 32 karyorelictean 06; 100 µm

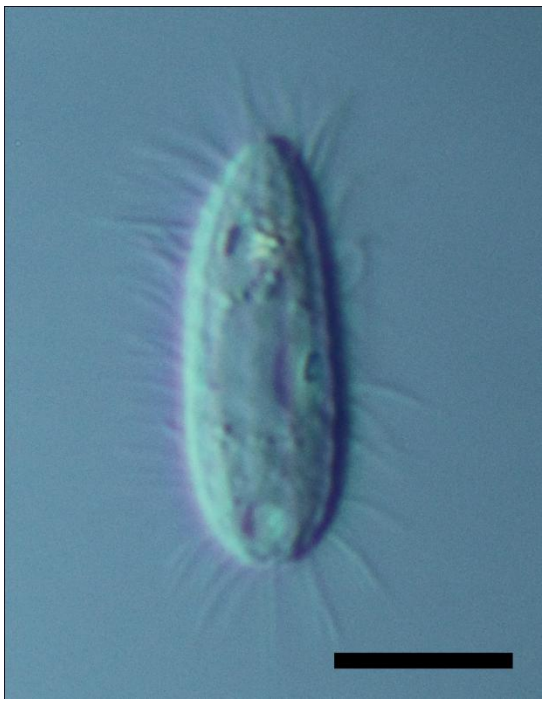


ภาพที่ 33 *Litonotus* sp.

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 แสดงชนิดของซิลิเอตบริเวณหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ที่สามารถเพาะเลี้ยงอยู่รอดได้ในห้องปฏิบัติการ

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

2.3 การศึกษาซิลิเอตในระดับอณูชีววิทยาด้วยรหัสดีเอ็นเอ

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

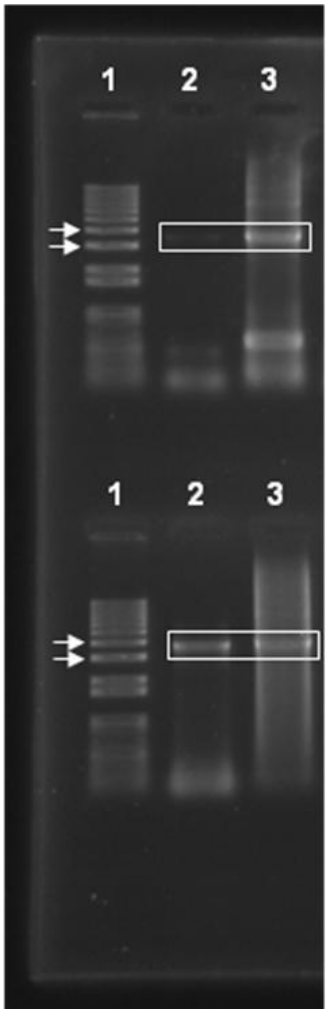
การตรวจสอบลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ด้วยโปรแกรม FinchTV เพื่อเช็คสัญญาณอ่านลำดับนิวคลีโอไทด์ว่าอยู่ในลักษณะที่ดีอ่านได้ถูกต้อง แล้วจึงนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ให้สัญญาณดีนี้ไปใช้ในการทดลองหาชนิดของซิลิเอตสายพันธุ์ที่คัดแยกได้เบื้องต้นกับฐานข้อมูลของ National Center for Biotechnology Information (NCBI) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเพิ่มจำนวนยีน 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 GTCGTTCGGC TTTACTCGCC TCATAATCCC CGCTGGGCCA GAGCCTTGGC
301 ATCACTCAGT GGGAGCCTGT GGCGGGTGAG GCCGAGGGAC CTTCGATGTT TTCCTACCGA
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 AAACTCTTGT GGAAGCCCGA AGCGGTACTG
```

```
601 ACGTGCAAAT CGTTCGTCAA ACTTGAGTGT AGGGGCGAAA GACTAATCGA ACCATCTAGT
661 AGCTGGTTCC CTCCGAAGTT TCTCTCAGGA TAGCAAGGAC AGTTAAAGCA GTTTTTATCA
721 ATTAGGTAAA GAATAAATGA TTAGAAGATC CGGGAGTTTT ATAGTGTTCT CGACTTAGTT
781 CTCAAACTCT 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) ที่แยกได้จากหาดลูกลม โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนยีน ด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL3 และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งสองที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกในช่องที่ 2 เป็นแม่พิมพ์และเพิ่มจำนวนยีนด้วย ไพรเมอร์ 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) ที่แยกได้จากหาดลูกลม โดยผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 2 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกที่เกิดจากการเพิ่มจำนวนยีนด้วยไพรเมอร์ SSU-NPF1 และ 28S-1316R ด้วยโปรแกรม CIL3 และผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ในช่องที่ 3 เป็นผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งสองที่เกิดจากการใช้ผลิตภัณฑ์พีซีอาร์ครั้งแรกในช่องที่ 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 AAGGAACCCT TGATTTTTCC TACCGACCCG TCTTGAAACA CGGACCAAGG
121 AGTCTAACAG ACATGCGATT ATGTTGGTGC TTTGGAAACC ATACATGAGC AATGAAAGTA
181 AGCGGTGCCA ATCGTAAGAT GCAGCATCGG CCAGTTGTGA TCCTCTGGAG AAGCGTACTG
241 GCTGCGAGCA TATCTGTTAG GACCCGAAAG ATGGTGAACT ACGCTTGAGT AGGGTGAAGC
301 CAGGGGAAAC TCTTGTGGAA GCCCGAAGCG GTACTGACGT GCAAATCGTT CGTCAAACTT
361 GAGTGTAGGG GCGAAAGACT AATCGAACCA TCTAGTAGCT GGTTCCCTCC GAAGTTTCTC
421 TCAGGATAGC AAGGACAGTT AAAGCAGTTT TTATTTCAAT TAGGTAAAGA ATAAATGATT
481 AGAAGCATCT GGGGGCGTTT TAGTGTTCTC GACTTAGTTC TCAAACTCTA AATATTTGTA
541 ATAACTCGGT ATTCCTTAAC TGAAGATCGA GGCAGAATGC TTGTCCTTAG TGGGCCATTT
601 TTGGTAAGCA GAACTGGCGA TGAGGGATGA ACCTAACTCT GGGTTAAGGT GCCCAACTGC
661 ACGCGCATCA GATACCTCAA AGGGTGTGTT GATTCATTTA GACAGCAGGA C
```

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 711 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Euplotes charon* (GenBank accession no. JF694066) ในฐานข้อมูลของ NCBI มากที่สุด โดยมีความเหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ เท่ากับ 96% และมีช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายจำนวน 1 ช่อง

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

```
1   ATTGTTGAGA AGGAAGTGGT TAAAGAGTAA TCATTTGTAT ACGATAAATG TTTCGCTTCC
61  CTGGCTTTGG CATGCTTTAG TACTTCATAG GCTGTGTGTG TCAAACGTTA GGTAGCTAGG
121 CTGTCTTCGT ATGCAAGAGG CAACATGAAG TTTGGAGCCG GGAATAAACT AGTAGAACGC
181 CCCAGCAATG GAGTCTATTA GTGAAACCGG CATCGAGCTT GAGGGGCCTG AGGGCGATGT
241 TGTCAAAATG GCTTTAACTG TCCCGTCTTG AAACACGGTC CATGGAGTGT AACCTACGCG
301 CAAGTGTTAG GGTGGAAAAA CCCGAACGCA TAAGGAAACT AAGGATAAGT TGTTTACAGC
361 AACAGCGGAC CTAGCGTCTC TGACAAAGGG CTCCAGCAAG AGCGAGTATG TTACGACCCG
421 AAAGATGATG AACTTTACTT GAGTAGGGTG AAGCCAGGGG AAACTCTGGT GGAAGCTCGC
481 AAGATCTTCT GACGTGCAAA TCGATTTCCA AACTTGAGTA AAGGGGCGAA AGACTAATCG
541 AATCATCTAG TAGCTGGTTC CCTCTGAAGT TTCTCTCAGG ATAGCTGGAA CAAACCAAGC
601 AGTTTTATTA GGTAAAGCGA ATGATTAGAG GAATCGGAGC TCAAAGAGTT TTGACCTATT
661 CTCAAACTTT AAATTGGTAA GAACCGGGGG TTAACTTAAT TGAACCTCTG GGCAGAATGC
721 TTGTTCCAAG TGGGCCATTT TTGGTAAGCA GAACTGGCGA TGAGGGATGA ACCTAACGCT
781 TAGATAAGGT TCCTAAGTAT GCATTCATGA GATCCCACAA AAGGTGTTGG TTCATTAACA
841 CAGCAGGACA
```

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 850 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *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 TGGAGTGTAA 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 CTTGAGTAAA GGGGCGAAAG ACTAATCGAA TCATCTAGTA
301 GCTGGTTCCC TCTGAAGTTT CTCTCAGGAT AGCTGGAACA AACCAAGCAG TTTTATTAGG
361 TAAAGCGAAT GATTAGAGGA ATCGGAGCTC AAAGAGTTTT GACCTATTCT CAAACTTTAA
421 ATTGGTAAGA ACCGGGGGTT AACTTAATTG AACCTCTGGG CAGAATGCTT GTTCCAAGTG
481 GGCCATTTTT GGTAAGCAGA ACTGGCGATG AGGGATGAAC CTAACGCTTA GATAAGGTTC
541 CTAAGTATGC ATTCATGAGA TCCCACAAAA GGTGTTGGTT CATTAACACA GCAGGACAGT
601 GG
```

โดยลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้นี้เป็นส่วนของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอความยาว 602 คู่เบส และมีความคล้ายคลึงกับลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของซิลิเอตในฐานข้อมูลของ 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   AAACTTCTTC 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 AGTGAAACCG GCATCGAGCT TGAGGGGCCT 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 TGGAAGCTCG CAAGATCTTC TGACGTGCAA
601 ATCGATTTCC AAACTTGAGT AAAGGGGCGA AAGACTAATC GAATCATCTA GTAGCTGGTT
661 CCCTCTGAAG TTTCTCTCAG GATAGCTGGA ACAAACCAAG CAGTTTTATT AGGTAAAGCG
721 AATGATTAGA GGAATCGGAG CTCAAAGAGT TTTGACCTAT TCTCAAACTT TAAATTGGTA
781 AGAACCGGGG GTTAACTTAA TTGAACCTCT GGGCAGAATG CTTGTTCCAA GTGGGCCATT
841 TTTGGTAAGC AGAACTGGCG ATGAGGGATG AACCTAACGC TTAGATAAGG TTCCTAAGTA
901 TGCATTCATG AGATCCCACA AAAGGTGTTG GTTCATTAAC ACAGCAGGAC A
```

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

เหมือนระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสายในความยาวที่สามารถเทียบกันได้ เท่ากับ 99% และไม่พบช่องว่างระหว่างลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งสองสาย

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอในส่วนที่อยู่ในบริเวณเดียวกันความยาว 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)

```
Euplotes sp. 2 SS.1.L  CGCCTCATAA TCCCCGCTGG GCCAGAGCCT TGGCATCACT  40
Euplotes sp. 3 SS.3.L  ...T...A.. G..TGT.... .T.....GT. G.........  40

Euplotes sp. 2 SS.1.L  CAGTGGGAGC CTGTGGCGGG TGAGGCCGAG GGACCTTCGA  80
Euplotes sp. 3 SS.3.L  ...GCA...A A...T....T C.....TA.. .A...C.T..  80

Euplotes sp. 2 SS.1.L  TGTTTTCCTA CCGACCCGTC TTGAAACACG GACCAAGGAG  120
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .-........ .......... .......... ..........  119

Euplotes sp. 2 SS.1.L  TCTAACATAT ACGCGATTAT GTTGGTGTTT TCGAAACCAA  160
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......G.C .T........ .......C.. .G.......T  159

Euplotes sp. 2 SS.1.L  ACATGAGCAA TGAAAGTGAG CGGTGCCAAT CGCAAGATGC  200
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......A.. .......... ..T.......  199

Euplotes sp. 2 SS.1.L  AGCATCGGCC AGTTGTGATC CTCTGGAGAA GCGTACTGGC  240
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... ..........  239

Euplotes sp. 2 SS.1.L  TACGAGCGTA TCTGTTAGGA CCCGAAAGAT GGTGAACTAC  280
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .G.....A.. .......... .......... ..........  279

Euplotes sp. 2 SS.1.L  GCTTGAGTAG GGTGAAGCCA GGGGAAACTC TTGTGGAAGC  320
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... ..........  319

Euplotes sp. 2 SS.1.L  CCGAAGCGGT ACTGACGTGC AAATCGTTCG TCAAACTTGA  360
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... ..........  359

Euplotes sp. 2 SS.1.L  GTGTAGGGGC GAAAGACTAA TCGAACCATC TAGTAGCTGG  400
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... ..........  399

Euplotes sp. 2 SS.1.L  TTCCCTCCGA AGTTTCTCTC AGGATAGCAA GGACAGTTAA  440
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... ..........  439

Euplotes sp. 2 SS.1.L  AGCAGTTTTT AT--CAATTA GGTAAAGAAT AAATGATTAG  478
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... ..TT...... .......... ..........  479

Euplotes sp. 2 SS.1.L  AAG-ATCCGG GAGTTTTATA GTGTTCTCGA CTTAGTTCTC  517
Euplotes sp. 3 SS.3.L  ...C...T.. .G.CG..T.. .......... ..........  519

Euplotes sp. 2 SS.1.L  AAACTCTAAA TATTTGTAAT AACTCGATAT TCCTTAACTG  557
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... ......G... ..........  559

Euplotes sp. 2 SS.1.L  AAGATCGAGG TAGAATGCTT GTCCTTAGTG GGCCATTTTT  597
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... C......... .......... ..........  599
```

```
Euplotes sp. 2 SS.1.L  GGTAAGCAGA ACTGGCGATG AGGGATGAAC CTAACTCCGA  637
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... .......T.G  639

Euplotes sp. 2 SS.1.L  GTTAAGGTGC CCAACTGCAC GCGCATCAGA TACCTTAAAG  677
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... .....C....  679

Euplotes sp. 2 SS.1.L  GGTGTGTTGA TTCATTTAGA CAGCAGGAC 706
Euplotes sp. 3 SS.3.L  .......... .......... .......... 708
```

การเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอในส่วนที่อยู่ในบริเวณเดียวกันความยาว 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

```
Uronema sp. SS.2.L      TTTAACTGTC CCGTCTTGAA ACACGGTCCA TGGAGTGTAA  40
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  40
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  40

Uronema sp. SS.2.L      CCTACGCGCA AGTGTTAGGG TGGAAAAACC CGAACGCATA  80
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  80
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  80

Uronema sp. SS.2.L      AGGAAACTAA GGATAAGTTG TTTACAGCAA CAGCGGACCT 120
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 120
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 120

Uronema sp. SS.2.L      AGCGTCTCTG ACAAAGGGCT CCAGCAAGAG CGAGTATGTT 160
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 160
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 160

Uronema sp. SS.2.L      ACGACCCGAA AGATGATGAA CTTTACTTGA GTAGGGTGAA 200
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 200
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 200

Uronema sp. SS.2.L      GCCAGGGGAA ACTCTGGTGG AAGCTCGCAA GATCTTCTGA 240
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 240
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 240

Uronema sp. SS.2.L      CGTGCAAATC GATTTCCAAA CTTGAGTAAA GGGGCGAAAG 280
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 280
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 280

Uronema sp. SS.2.L      ACTAATCGAA TCATCTAGTA GCTGGTTCCC TCTGAAGTTT 320
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 320
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 320

Uronema sp. SS.2.L      CTCTCAGGAT AGCTGGAACA AACCAAGCAG TTTTATTAGG 360
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 360
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 360

Uronema sp. SS.2.L      TAAAGCGAAT GATTAGAGGA ATCGGAGCTC AAAGAGTTTT 400
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... .......... 400
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... .......... 400
```

```
Uronema sp. SS.2.L      GACCTATTCT CAAACTTTAA ATTGGTAAGA ACCGGGGGTT  440
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  440
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  440

Uronema sp. SS.2.L      AACTTAATTG AACCTCTGGG CAGAATGCTT GTTCCAAGTG  480
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  480
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  480

Uronema sp. SS.2.L      GGCCATTTTT GGTAAGCAGA ACTGGCGATG AGGGATGAAC  520
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  520
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  520

Uronema sp. SS.2.L      CTAACGCTTA GATAAGGTTC CTAAGTATGC ATTCATGAGA  560
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ..........  560
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ..........  560

Uronema sp. SS.2.L      TCCCACAAAA GGTGTTGGTT CATTAACACA GCAGGACA 598
Uronema sp. SS.3.L (1)  .......... .......... .......... ........ 598
Uronema sp. SS.3.L (2)  .......... .......... .......... ........ 598
```

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่อาศัยอยู่ตามช่องว่างระหว่างเม็ดทราย บริเวณหาดทรายชายฝั่งทะเลของหาดลูกลม เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี โดยทำการเก็บทรายตัวอย่างทั้งหมด 7 ครั้ง พบซิลิเอตกว่า 46 ชนิด โดยความหลากชนิดของซิลิเอตที่พบในการศึกษาครั้งนี้มีจำนวนเพิ่มขึ้นจากการศึกษาที่มีมาก่อนหน้านี้ของ สุชา เฉยศิริ และคณะ (2554) ที่ทำการสำรวจความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรติสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเล บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี ในเดือนธันวาคมของปี 2552 และรายงานการพบโพรติสต์กว่า 71 ชนิด ในจำนวนนี้เป็นซิลิเอตจำนวน 22 ชนิด โดยสกุลของซิลิเอตที่พบจากการศึกษาทั้งสองครั้งมีความเหมือนกันในบางส่วน กล่าวคือ *Aspidisca*, *Coleps*, *Euplotes*, *Mesodinium* และ *Uronychia* เป็นสกุลซิลิเอตที่พบจากการศึกษาทั้งสองครั้ง อย่างไรก็ตามการศึกษาในครั้งนี้ พบซิลิเอตเพิ่มขึ้นกว่า 13 สกุลที่ไม่ได้พบรายงานไว้ในการศึกษาของ สุชา เฉยศิริ และคณะ (2554) ได้แก่ *Blepharisma*, *Condylostoma*, *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 ที่บริเวณหาดลูกลม จึงเป็นเครื่องบ่งชี้ถึงแหล่งทรัพยากรที่มีค่า อันจะนำไปสู่กุญแจไขความเข้าใจทางวิวัฒนาการของซิลิเอตกลุ่มนี้และกลุ่มอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง หากได้มีการศึกษาในรายละเอียดเชิงลึกเพิ่มเติมต่อไป

การศึกษาโดยทำการเพาะเลี้ยงซิลิเอตที่สกัดแยกได้ เพื่อนำมาศึกษาเชิงลึกในระดับอณูชีววิทยา โดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ สามารถเพาะเลี้ยงซิลิเอตได้จำนวน 8 สายพันธุ์ จาก 3 สกุล ได้แก่ *Euplotes*, *Protocruzia* และ *Uronema* ในจำนวนนี้ 5 สายพันธุ์ได้ทำการเพิ่มจำนวนไรโบโซมอลดีเอ็นเอและหาลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนของยีนดังกล่าว เพื่อตรวจสอบบริเวณที่เหมาะสมเพื่อใช้เป็นรหัสดีเอ็นเอในการระบุและจำแนกชนิดของซิลิเอตที่พบ โดยสภาวะในการทำปฏิกิริยาและไพรเมอร์บางตัวที่ได้ออกแบบเฉพาะเพื่อการศึกษาในครั้งนี้ สามารถใช้เพิ่มปริมาณยีนไรโบโซมอลดีเอ็นเอได้ แต่พบมีปัญหาในการหาลำดับนิวคลีโอไทด์จากยีนดังกล่าว อย่างไรก็ดี ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอที่ได้บางส่วน 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 ถึงแม้ว่าการเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากบริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอกับฐานข้อมูล 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*) จากไมโตคอนเดรียในการจำแนกและระบุชนิดของซิลิเอตสกุล *Tetrahymena* พบว่า *Tetrahymena* ซึ่งมีสมาชิกในสกุลมีความใกล้ชิดกันสูง แม้ใน *Tetrahymena* ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์หรือเก็บมาจากคนละพื้นที่กันจะมีความเหมือนกันของลำดับนิวคลีโอไทด์ของยีน *cox1* มากกว่า 99% นอกจากนี้ เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์บางส่วนจากบริเวณส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *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

ในทางกลับกันการเปรียบเทียบลำดับนิวคลีโอไทด์ส่วนต้นของลาร์จซับยูนิตไรโบโซมอลดีเอ็นเอของ *Uronema* sp. ทั้ง 3 สายพันธุ์ ได้แก่ SS.2.L, SS.3.L (1) และ SS.3.L (2) พบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ของทั้ง 3 สายพันธุ์ ไม่มีความแตกต่างของลำดับเลยแม้แต่ตำแหน่งเดียว แสดงให้ว่า *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. ที่สกัดแยกและเพาะเลี้ยงจนบริสุทธิ์ได้จากการศึกษาในครั้งนี้น่าจะมีความใกล้เคียงสูงมากกับ *Parauronema virginianum* หรือ *Uronema marinum* ซึ่งควรมีการตรวจสอบในรายละเอียดทั้งในทางสัณฐานวิทยาและในทางอณูชีววิทยาเพิ่มเติม เพื่อยืนยันสถานภาพที่ถูกต้องของ *Uronema* sp. ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ต่อไป

จากการเก็บตัวอย่างทราย คัดแยกเซลล์โพรติสต์ และทำการศึกษาตัวอย่างที่เก็บมาทั้งในระดับสัณฐานวิทยาและระดับอณูชีววิทยาแสดงให้เห็นว่า การผนวกข้อมูลทั้งสองระดับเข้าด้วยกันจะนำไปสู่การประเมินความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์กลุ่มซิลิเอตให้มีความถูกต้องมากยิ่งขึ้น โดยจะได้มีการศึกษาต่อไปในส่วนของตัวอย่างที่ได้มีการเก็บเพิ่มเติม รวมถึงตัวอย่างที่เก็บไว้แล้วทั้งในรูปของดีเอ็นเอที่ได้สกัดเก็บไว้และในส่วนของตัวอย่างที่สามารถเพาะเลี้ยงจนบริสุทธิ์ได้ อีกทั้งควรมีการหาลำดับนิวคลีโอไทด์ของไรโบโซมอลดีเอ็นเอให้ได้ครบสมบูรณ์ทั้งสาย เพื่อที่จะนำข้อมูลที่ได้เพิ่มเติมในส่วนนี้มาทำการวิเคราะห์หาช่วงลำดับนิวคลีโอไทด์ที่เหมาะสม และใช้เป็นรหัสดีเอ็นเอในการจำแนกและระบุชนิด

โพรติสต์กลุ่มซิลิเอตที่พบในบริเวณเกาะแห่งนี้ อันจะเป็นข้อมูลเชิงลึกนำไปสู่การนำสิ่งมีชีวิตที่ได้รับการจำแนกและระบุชนิดที่ถูกต้องจากพื้นที่แห่งนี้ไปประยุกต์ใช้ในการศึกษาแขนงอื่นๆ ต่อไป เช่น เซลล์วิทยาและวิวัฒนาการ อีกทั้งนำไปสู่การพัฒนาประยุกต์ใช้ซิลิเอตเหล่านี้ในด้านอื่นๆ เช่น ใช้เป็นอาหารของสัตว์เลี้ยงวัยอ่อน ใช้ในการทดสอบความไวต่อความเป็นพิษของโลหะหนักที่อาจมีการปนเปื้อนเกิดขึ้นได้ในทะเล เป็นต้น

เอกสารอ้างอิง

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ คณะ. 2544. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ. *การประชุมวิชาการทรัพยากรไทย อนุรักษ์และพัฒนาด้วยจิตสำนึกแห่งนักวิจัยไทย (21-23 มิถุนายน 2544) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย*. หน้า 117–124.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล อารมณ์ รัศมิทัต นภดล สว่างนาวิน สุกัญญา ป่องทอง พลาใด ทรัพย์สมบูรณ์ และ ทวีชัย สัจจาริยรักษ์. 2546. ความสัมพันธ์ระหว่างแพลงก์ตอนกับปัจจัยทางกายภาพและเคมี. *ประชุมวิชาการทรัพยากรไทย: ธรรมชาติแห่งชีวิต (10-12 พฤษภาคม 2546) สำนักพระราชวังพระราชวังดุสิต*. หน้า 69–80.

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี, ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน 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.

Corliss, 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 Phyllophoraceae (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*. 3rd 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. หน่วยงานและสถานที่อยู่ที่ติดต่อได้สะดวก
   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 การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลามีเกล็ดในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี, งบแผ่นดินปี 2552
   7.2.2 ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จังหวัดสตูล, งบแผ่นดินปี 2552
   7.2.3 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 2553-2554
   7.2.4 การสำรวจเบื้องต้นของเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลาที่รับประทานเป็นอาหารในพื้นที่เขื่อนวชิราลงกรณ จังหวัดกาญจนบุรี, งบแผ่นดินปี 2554
   7.2.5 สัณฐานวิทยาและพยาธิสภาพของปรสิตบางชนิด, งบแผ่นดินปี 2555
   7.3 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย
   7.3.1 ความหลากหลายของโพรโทซัวและแพลงก์ตอน พื้นที่โครงการ อพ.สธ., งบแผ่นดินปี 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 ชิดชัย จันทร์ตั้งสี. 2548. *แพลงก์ตอน*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัท เวิร์ค สแควร์ จำกัด กรุงเทพฯ. 352 หน้า.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ พงชัย หาญยุทธนากร. 2554. *สิ่งมีชีวิตขนาดเล็กบางชนิดในแหล่งน้ำจืด*. โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. บริษัทสิรบุตรการพิมพ์ จำกัด กรุงเทพฯ. 71 หน้า.

7.4.2 Journal articles

ผุสตี ปริยานนท์, มาลินี ฉัตรมงคลกุล และ อนุสรณ์ ปานสุข. 2548. การเปลี่ยนแปลงของประชากรสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบก ในพื้นที่โครงการสร้างป่าตามแนวพระราชดำริ และป่าอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อุทยานแห่งชาติทับลาน อำเภอครบุรี จังหวัดนครราชสีมา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 50.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, ผุสตี ปริยานนท์ และ สัมฤทธิ์ สิงห์อาษา. 2548. ปรสิตของกิ้งก่าบิน (*Draco* spp.) พื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืช อันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 2 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. นครราชสีมา*. หน้า 124–125.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสตี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดกิ้งก่าบินจากเกาะกูด จ.ตราด. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาชีฯว จ. ชลบุรี*. หน้า 64.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, กรณ์รวี เอี่ยมสมบูรณ์, พงชัย หาญยุทธนากร และ วิมล เหมะจันทร. 2554. การสำรวจชนิดของปลาและเมตาเซอคาเรียของพยาธิใบไม้ในปลา ในอ่างเก็บน้ำของเขื่อนศรีนครินทร์ จังหวัดกาญจนบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 448–456.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, วิเชฏฐ์ คนซื่อ, พงชัย หาญยุทธนากร และผุสตี ปริยานนท์. 2550. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะกูด จังหวัดตราด. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 3 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. พิพิธภัณฑ์ธรรมชาติวิทยาเกาะและทะเลไทย อำเภอสัตหีบ จ. ชลบุรี*. หน้า 300.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และผุสตี ปริยานนท์. 2552. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากเกาะอาดัง จ.สตูล. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 4 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ สวนสัตว์เปิดเขาขียว จ. ชลบุรี*. หน้า 108.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของสัตว์เลื้อยคลานจากพื้นที่หมู่เกาะสิมิลัน จังหวัดพังงา. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 442–447.

มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร, วิเชฎฐ์ คนซื่อ และ ผุสตี ปริยานนท์. 2554. ปรสิตในเลือดของสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกจากหมู่เกาะอ่างทอง จังหวัดสุราษฎร์ธานี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา.* หน้า 457–464.

ทัศนธร ภูมิยุทธิ์ และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในป่าชายเลนปลูกบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 277–284.

ศรัณย์ อัศวานุชิต, มาลินี ฉัตรมงคลกุล, พงชัย หาญยุทธนากร และ นิพาดา เรือนแก้ว ดิษยทัต. 2554. ความหลากหลายของแพลงก์ตอนในสภาพที่มีสาหร่ายไกในแม่น้ำน่าน จังหวัดน่าน. *การประชุมวิชาการประจำปีครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 758–768.

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน อ. เมือง จ. นครราชสีมา*. หน้า 36–47.

Chutmongkonkul, M and Pariyanonth, P. 2005. Endoparasites of five species of anurans in Thailand. *5th 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. *31st 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 14th 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. *31st 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 Kaewviyudth, S. 2006. Helminths infection in snake skin gourami *Trichogastor pectoralis* (Regan, 1910). In Comparative Endocrinology and Biodiversity in Asia and Oceania, *Proceedings of the 5th 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., Satetasit, 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.

Satetasit, 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, Thailalnd. *Proceedings of the 8th Chulalongkorn University Veterinary Annual Conference*, April 3, 2009: 84.

2. อาจารย์ ดร.ชิดชัย จันทร์ตั้งสี

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายชิดชัย 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 ความหลากหลายทางชีวภาพและการระบุชนิดของโพรติสต์บริเวณเกาะสีชัง จังหวัดชลบุรี ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุลโดยอาศัยรหัสดีเอ็นเอ

7.2 ผู้ร่วมวิจัย: ชื่อโครงการวิจัย

7.2.1 ความหลากหลายของโพรโตซัวและแพลงก์ตอนในพื้นที่ อพ.สธ.

7.2.2 ปรสิตในสัตว์สะเทินน้ำสะเทินบกและสัตว์เลื้อยคลานในพื้นที่ อพ.สธ.

7.3 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว (ผลงานวิจัย)

7.3.1 Book

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

7.3.2 Journal articles

สุชา เฉยศิริ, ชิดชัย จันทร์ตั้งสี และ มาลินี ฉัตรมงคลกุล. 2554. ความหลากหลายและการกระจายตัวของโพรทิสต์ในหาดทรายชายฝั่งทะเลบริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี. *การประชุมวิชาการประจำปี, ครั้งที่ 5 ชมรมคณะปฏิบัติงานวิทยาการ อพ.สธ. ณ ห้องประชุมวิชาการ ศูนย์ฝึกหนองระเวียง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลอีสาน 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.

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.