

ชื่อเรื่อง ภาษาไทย	การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนจากปะการังและหอยสองฝา
ภาษาอังกฤษ	Isolation and culture of thermal tolerance stain of zooxanthellae from corals and marine bivalve
ชื่อผู้วิจัย	รศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ์ ผศ.ดร.วรรณพ วัยกาญจน์

บทนำ

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว(coral bleaching) คือ ปรากฏการณ์ที่ปะการังมีสีซีดจางลงเนื่องจาก zooxanthellae ซึ่งเป็นสาหร่ายขนาดเล็กกลุ่ม dinoflagellate ที่อาศัยแบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อของปะการังถูกขับออกมาภายนอกปะการังหรือตัวสาหร่ายเองสูญเสียรงควัตถุไป เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยสิ่งแวดล้อมรุนแรงปะการังจะมีการฟอกขาวอย่างสมบูรณ์(completely bleaching) สาเหตุของการเกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวมีหลายประการเช่น การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิอย่างผิดปกติ การเปลี่ยนแปลงความเค็มเป็นต้น(Meehan และ Ostrander 1997) ตลอดช่วงสองทศวรรษที่ผ่านมาปรากฏการณ์นี้เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องและมีแนวโน้มรุนแรงขึ้นตามลำดับโดยมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากอุณหภูมิน้ำที่สูงกว่าค่าเฉลี่ยปกติ 1-2 องศาเซลเซียส

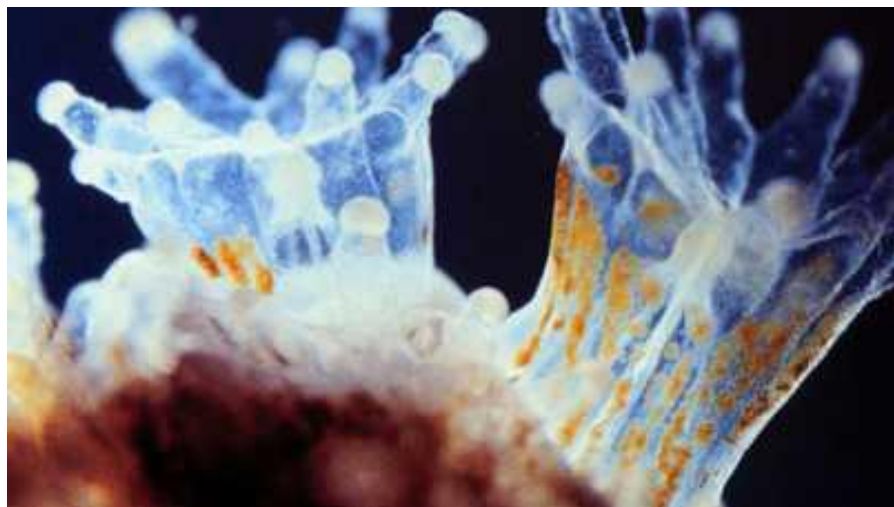
อย่างไรก็ตามพบว่าปะการังมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นแตกต่างกัน แม้นในโคลนเดียวกันก็อาจพบบางส่วนไม่ฟอกขาว แสดงให้เห็นว่าอาจมี zooxanthellae หลายสายพันธุ์ทั้งที่ทนและไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่สูงขึ้นอาศัยอยู่ร่วมกัน ดังนั้นหากสามารถแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิได้ก็อาจจะสามารถนำไปใช้ในการบรรเทาการเกิดปะการังฟอกขาวได้

ปะการังเป็นระบบนิเวศทางทะเลที่สำคัญ มีความอุดมสมบูรณ์และซับซ้อน มีความหลากหลายของสิ่งมีชีวิตมากมาย เป็นแหล่งอาศัยแหล่งเลี้ยงตัวอ่อนแหล่งอาหารและแหล่งหลบภัยของสิ่งมีชีวิตมนุษย์ใช้ประโยชน์จากแนวปะการังหลายประการเช่น เป็นแหล่งอาหาร แหล่งท่องเที่ยว เป็นต้น ปัจจุบันปัญหาโลกร้อนได้โน้มนำให้เกิดปัญหาปะการังฟอกขาวทั่วโลก ในประเทศไทย อุกกฤต สดภูมินทร์(2536) ศึกษาปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวที่เกิดขึ้นในทะเลอันดามันในปี พ.ศ. 2534 พบว่าปะการังแต่ละชนิดจะมีความไวและได้รับผลกระทบแตกต่างกันโดย *Acropola* spp. เป็นกลุ่มที่ไวและได้รับผลกระทบมากที่สุด Marshall และ Baird (2000)ทำการศึกษาบริเวณ Great Barrier Reef พบว่า กลุ่ม Acroporid และ Pocilloporids เป็นกลุ่มที่ผลกระทบมากในขณะที่กลุ่ม Poritids และ Favids ซึ่งมีการเติบโตต่ำกว่ากลับได้รับผลกระทบน้อยกว่า ดังนั้นการเกิดฟอกขาวในปะการังแต่ละชนิดจึงอาจจะมีสาเหตุมาจาก zooxanthellae ที่อยู่ในปะการังมีหลายสายพันธุ์อาศัยอยู่ร่วมกันทั้งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นได้และที่ทนไม่ได้ หรืออาจมีบางส่วนที่สามารถปรับตัวให้ทนต่อการเปลี่ยนแปลง (Kinzie และ

Takayama et al. 2001) จากกรณีที่กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม โดยกรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งได้รายงานผลการสำรวจสถานการณ์ปะการังฟอกขาวว่า งานวิจัยเกี่ยวกับปะการังฟอกขาวที่ทำกันมาอย่างต่อเนื่อง ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2534 พบว่าสถานะของปะการังฟอกขาวในปี 2553 เป็นการฟอกขาวที่รุนแรงที่สุดเป็นประวัติการณ์ ซึ่งเป็นเรื่องที่น่าวิตกอย่างยิ่งสำหรับท้องทะเลไทย (ผู้จัดการออนไลน์ 14 มิถุนายน 2553) ในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งสมมติฐานว่ามี zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนร้อนอาศัยอยู่ในปะการังและหอยสองฝาบางชนิด ดังนั้นการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนร้อนได้ จะสามารถนำมาใช้ในการแก้ปัญหาปะการังฟอกขาวที่เกิดขึ้น

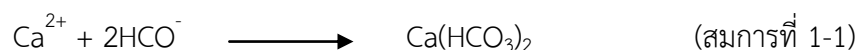
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Symbiodinium sp. หรือ zooxanthellae อยู่ใน Division Dinophyta (Granados et al., 2008) เป็น dinoflagellate ขนาดประมาณ 10 - 20 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลทอง ดำรงชีวิตแบบพึ่งพา (symbiosis) ในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Raechel et al., 2008) เช่น ดอกไม้ทะเล ทาก เปลือกหอย หอยมือเสือ ปะการัง เป็นต้น (Venn et al., 2008) โดยจะมีลักษณะกลม ไม่เคลื่อนที่ (coccoid form) เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ และมีลักษณะเช่นเดียวกับ dinoflagellate โดยทั่วไปคือ เป็น gymnodinoid form มีการสร้าง flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในมวลน้ำ



รูปที่ 1 การดำรงชีพแบบพึ่งพาของ zooxanthellae ในเนื้อเยื่อปะการัง
(ที่มา: <http://serc.carleton.edu/eslabs/corals/2b.html>)

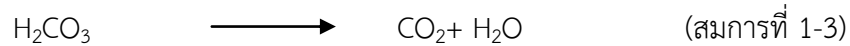
Zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อของปะการังมีบทบาทสำคัญในการดึงแคลเซียมคาร์บอเนตในมวลน้ำเพื่อให้ปะการังใช้ในการสร้างโครงสร้างแข็ง ดังสมการที่แสดงต่อไปนี้



จากนั้น $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ จะสลายตัวและให้ calcium carbonate และ carbon acid originate ซึ่ง calcium carbonate จากสมการนี้จะเป็นที่เป็นโครงสร้างแข็งของปะการัง ดังสมการที่ 1-2



จากนั้น carbon acid originate จะสลายตัวเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุดดังสมการ 1-3



นอกจากการดึงแคลเซียมเพื่อสร้างโครงสร้างแข็งแล้ว zooxanthellae ยังเป็นแหล่งสร้างอาหารที่สำคัญให้กับกลุ่มดอกไม้ทะเลและปะการังสูงถึง 95 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งอาหารทั้งหมดโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง (Lesser M P, 2003)

zooxanthellae เข้าสู่ปะการังได้ 2 ลักษณะด้วยกัน คือ

ระบบปิด หรือถ่ายทอดจากแม่สู่ลูกโดยตรง โดยการส่งผ่านจากไปยังไข่และตัวอ่อน ในที่สุด (Hirose *et al.*, 2000)

ระบบเปิด เป็นการที่ตัวอ่อนของปะการังได้รับเซลล์ zooxanthellae ที่ว่ายในมวลน้ำ (gymnodinoid cell) (Raechel *et al.*, 2008)

รูปที่ 2 zooxanthellae ที่อยู่ภายในไข่ของปะการัง (Hirose *et al.*, 2000)

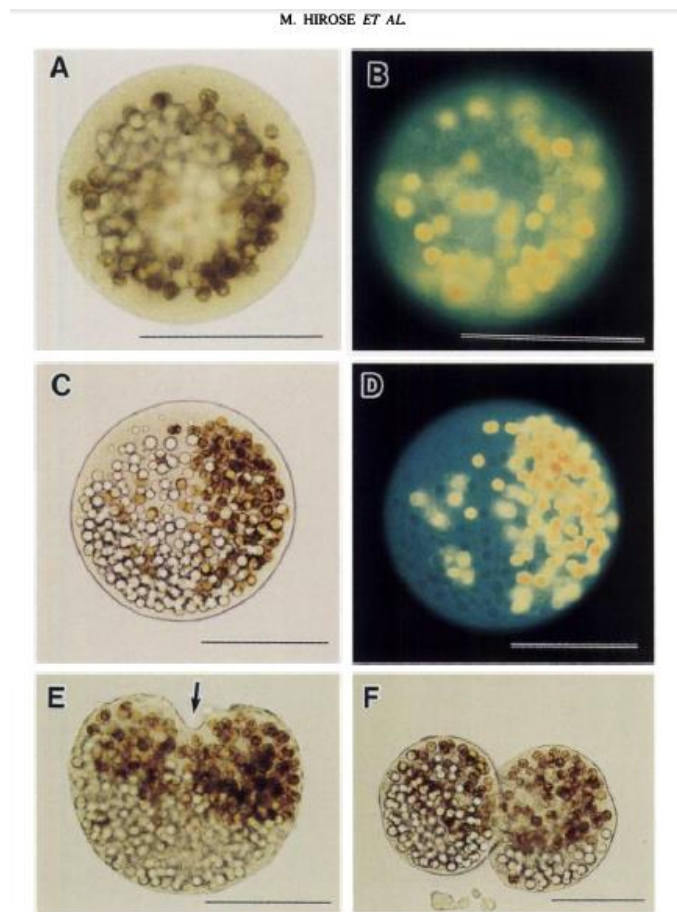


Figure 1. Early development of *Pocillopora verrucosa*: from unfertilized egg to two-cell stage. (A) Oocyte isolated from the gonad. Zooxanthellae are distributed evenly in the cytoplasm. The germinal vesicle is at the center of the oocyte. (B) Oocyte viewed under epifluorescence (BV excitation). The red fluorescence is due to algal chlorophyll. Cytoplasm of the oocyte exhibits blue-green autofluorescence. (C) Spawned egg. Zooxanthellae are mainly located in the right hemisphere and lipid droplets in the left hemisphere. (D) The same egg, observed under epifluorescence (BV excitation). (E) First cleaving stage. Cleavage furrow (arrow) starts at the hemisphere that contains the zooxanthellae. (F) Two-cell stage. Zooxanthellae are divided equally into the two blastomeres. Bars = 100 μm .

ดังนั้นการเลี้ยง zooxanthellae จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปะการัง และสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว (Coral Bleaching)

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว หรือ coral bleaching เป็นปรากฏการณ์ที่เป็นสาเหตุให้ปะการังตายเป็นจำนวนมาก เริ่มมีการสนใจศึกษาตั้งแต่ปี 1980 ซึ่งในสมัยนั้นพบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวเป็นผลมาจากการเกิด El Nino-Southern Oscillation (ENSO) ทำให้ปะการังตายเป็นจำนวนมาก ต่อมาเมื่อมีการศึกษามากขึ้นพบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญคือการที่อุณหภูมิเฉลี่ยผิวน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น (Baker et al., 2008) ส่งผลให้ zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพารวมกันในตัวปะการัง (endosymbiosis) ไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงออกจากเนื้อเยื่อปะการังทำให้ปะการังมีสีขาวกลายเป็นสีขาวส่งผลให้ปะการังขาดแคลนอาหารและตายลงในที่สุด ซึ่งปรากฏการณ์นี้ไม่ได้พบเฉพาะแต่ในปะการังเท่านั้น ยังพบในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ที่มี zooxanthellae อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะเป็นฟองน้ำ หากเปลี่ยน หรือในดอกไม้ทะเลเองก็พบการฟอกขาวด้วยเช่นกัน การศึกษาของ Rowan ในปี 1997 พบว่า การฟอกขาวที่เกิดขึ้นในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของ zooxanthellae ที่สามารถแบ่งได้เป็นหลาย clade ด้วยกัน ส่งผลให้ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละเจ้าบ้าน (Host) ทำให้อัตราการฟอกขาวในปะการังสูงกว่าในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ (Louis et al., 2002)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนร้อน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนร้อน เพื่อใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวและการฟื้นฟูปะการัง

วิธีดำเนินการวิจัย

1. พื้นที่ศึกษา

ทำการศึกษาในแนวปะการังบริเวณเกาะปลาหมึก หมู่เกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี



รูปที่ 3 สถานที่เก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร

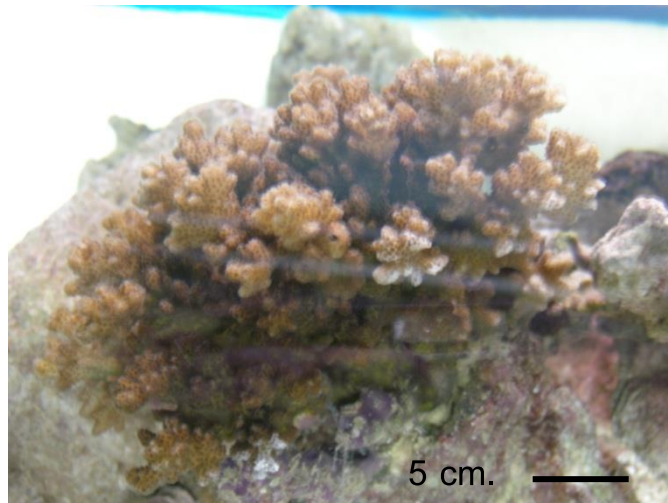
2. การเก็บตัวอย่าง

ปีงบประมาณ 2555

ทำการเก็บตัวอย่างปะการังและหอยสองฝา หรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นอย่างน้อย 3 ครั้ง ต่อปี จากแนวปะการังบริเวณเกาะเสม็ดสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยจะทำการเก็บตัวอย่างสัตว์ทะเลดังกล่าวกลับไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

3. การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

ทำการแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากปะการัง *Pocillopora damicornis* และดอกไม้ทะเล ที่เก็บจากแนวปะการังบริเวณเกาะเสม็ดสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี โดยวิธี capillary technique ที่ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้



รูปที่ 4 ปะการัง *Pocillopora damicornis* ใช้ในการแยก zooxanthellae



รูปที่ 5 ดอกไม้ทะเลที่ *Anthopleura* sp. ใช้ในการแยก zooxanthellae
(ที่มา: <http://www.krunok.net/index2.php/?p=1388>)

3.1 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

เครื่องแก้วและอุปกรณ์ต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงผ่านการทำความสะอาดด้วยน้ำยาทำความสะอาด (Detergent) แล้วแช่ด้วยกรดเกลือความเข้มข้น 10% จากนั้นล้างด้วยน้ำสะอาด ตามด้วยน้ำกลั่น แล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในตู้อบไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.25 บรรยากาศ เวลา 20 นาที

3.2 การทำน้ำทะเลกรองสำหรับเลี้ยง zooxanthellae

น้ำทะเลที่นำมากรองเพื่อใช้ในการเลี้ยง zooxanthellae เป็นน้ำทะเลธรรมชาติบริเวณใกล้เคียงที่ทำการเก็บตัวอย่างปะการัง นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาด 150 ไมโครเมตรเพื่อกรองเอาขยะออก จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

3.3 การแยก zooxanthellae จากปะการังและดอกไม้ทะเล

สำหรับการแยก zooxanthellae ในระยะแรกนั้น ได้ทำการทดลองแยกโดยการสั่นสะเทือนด้วยเครื่อง sonicator โดย มีขั้นตอนดังนี้

3.3.1 หักปะการังเป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำทะเลกรองแล้วนำบีกเกอร์ไปใส่ในเครื่อง sonicator ทำการ sonicate เป็นเวลา 5 – 10 นาที zooxanthellae จะหลุดออกจากเนื้อเยื่อปะการังมาอยู่ในมวลน้ำ จะสังเกตเห็นน้ำทำเลกรองมีสีน้ำตาลซึ่งเป็นสีของ zooxanthellae

3.3.2 นำน้ำที่ได้จาก 3.3.1 กรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตร เพื่อกรองเอาเมือกที่มาจากปะการังออก และกรองอีกครั้งด้วยผ้ากรองขนาด 20 ไมโครเมตรเพื่อเอาแพลงก์ตอนอื่นที่ปนเปื้อนออกให้มากที่สุด

3.3.3 ทำการเหวี่ยงตะกอนน้ำส่วนที่ผ่านการกรองในข้อ 3.3.2 จะได้ zooxanthellae ตกตะกอนที่ก้นหลอด นำ zooxanthellae ที่ได้มาทำการแยกด้วยเทคนิค pasteur pipette single cell isolate แล้วนำเซลล์ที่แยกได้ลงเลี้ยงใน multiwell plate ด้วยสูตรอาหารชนิดต่างๆ

*การแยก zooxanthellae จากดอกไม้ทะเลใช้วิธีแยกดังกล่าวในข้างต้น

3.3.4 ศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง zooxanthellae ในห้องปฏิบัติการ

การศึกษาค่าเติบโตของ zooxanthellae ในอาหารสูตรต่างๆ จากเซลล์ที่แยกได้จากข้อ 3.3.3 สูตรสารอาหารที่ใช้เลี้ยงในการทดลองในครั้งนี้มีสูตรต่างๆ ดังนี้

3.3.4.1 สูตรอาหาร T1 (ฐิติมา ทนกลั่น, 2551)

3.3.4.2 สูตรอาหาร T1 เพิ่มธาตุอาหารซิลิเกต

3.3.4.3 สูตรอาหาร ESM (Okaichi et al. 1982)

3.3.4.4 สูตรอาหาร Daigo (ดังแสดงรายละเอียดของสูตรอาหารในภาคผนวก หน้า 19)

ในการเตรียมน้ำทะเลสำหรับการเพาะเลี้ยงให้ใช้น้ำทะเลกรองที่ได้จากข้อ 3.2 ทุกสูตรอาหารทำการละลายเก็บเป็นสารละลายเข้มข้น เมื่อใช้งานจึงนำมาเจือจางตามต้องการ จากนั้นปรับ pH ตามการทดลองคือ pH 6, 6.5, 7, 7.5 และ pH 8 ด้วย HCl 1.0 M จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อด้วยตู้อบไอน้ำ (autoclave) อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.25 บรรยากาศ เวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น และนำไปเลี้ยงแพลงก์ตอน โดยใช้ฟาสเจอร์ปิเปตที่ดัดแปลงแล้ว ดึงเซลล์ Zooxanthellae ที่แยกจากปะการังและดอกไม้ทะเล ใส่ลง Multiwell plate ขนาด 48 หลุม ที่มีอาหารสูตรต่างๆ ที่ต้องการทดลอง ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ในห้องบ่มเชื้อที่ปัจจัยสภาพแวดล้อมดังแสดงในข้อ 3.4

ทำการสัมนับทุกวัน เพื่อนับจำนวนเซลล์ และสังเกตลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไป ด้วยกล้องจุลทรรศน์

3.4 สภาพแวดล้อมของตู้อบเชื้อ

ทำการทดลองอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ความเข้มแสง 5000 ลักซ์ และช่วงเวลาให้แสงสว่าง : ช่วงมืด เท่ากับ 12 : 12 ชั่วโมง

3.5 ศึกษาช่วงเวลาในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ Zooxanthellae ในรอบ 24 ชั่วโมง

นับเซลล์เริ่มต้นในหลุมทดลอง จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ในรูป Coccoid cell ทุกต้น ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ระหว่าง coccoid cell : gymnoidinoid cell

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

3.6.1 หาค่าอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate)

คำนวณจากสมการ (Janet R. S., 1973)

$$\mu = (\ln N_t - \ln N_0) / (t_t - t_0) \quad \text{วัน}^{-1}$$

เมื่อ μ คือสัมประสิทธิ์เติบโตของเซลล์

t คือเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง(วัน)

N_0 และ N_t (เซลล์/มล.) คือจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เวลา t_0 และจำนวนเซลล์ที่เวลา t_t

ตามลำดับ

ทำการหาเวลาที่จำนวนเซลล์ zooxanthellae เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า (Generation time) โดยคำนวณได้จากสมการ (Janet R. S., 1973)

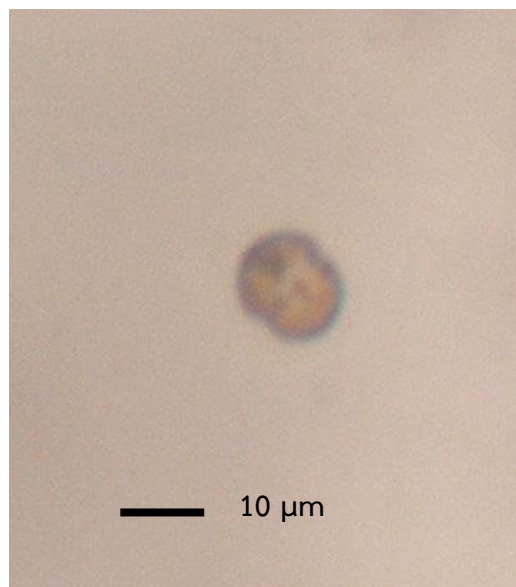
$$T = \ln 2 / \mu \quad \text{วัน}$$

ผลการดำเนินการ

1. zooxanthellae ที่แยกได้จากปะการัง

การศึกษาในปี 2555 ยังไม่สามารถเพาะเลี้ยง zooxanthellae ที่แยกได้จากปะการังได้สำเร็จ เนื่องจากมีการปนเปื้อนของแบคทีเรียมากทำให้เซลล์ที่แยกได้ตาย อย่างไรก็ตามจากการสังเกตเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์พบเซลล์ zooxanthellae ได้ทั้ง 2 รูปแบบ ขนาดเซลล์ประมาณ 10 ไมโครเมตร คือ เซลล์ลักษณะกลมไม่เคลื่อนที่ coccoid cell และ gymnodinoid cell ที่สามารถว่ายน้ำได้เซลล์มี flagella และสังเกตเห็นส่วนของ epicone และ hypocone ได้ชัดเจน ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญโดยทั่วไปของไดโนแฟลกเจลเลต(รูปที่ 6 และ 7)

ผลของปัจจัยต่างๆต่อการเพาะเลี้ยง แม้ว่า zooxanthellae ที่แยกจากปะการังจะไม่มี การเติบโตในอาหารทั้ง 4 สูตร แต่ในสูตร Daigo ลักษณะเซลล์สมบูรณ์มากที่สุด โดยสังเกตจากรูปร่าง และสีของ zooxanthellae การทดลองเลี้ยงใน pH ต่างๆ พบว่า Zooxanthellae จากปะการังในอาหารสูตร Daigo ไม่มีการเจริญเติบโตเช่นกัน แต่ลักษณะเซลล์จะสมบูรณ์ใน pH 6.5, 7 และ pH 8



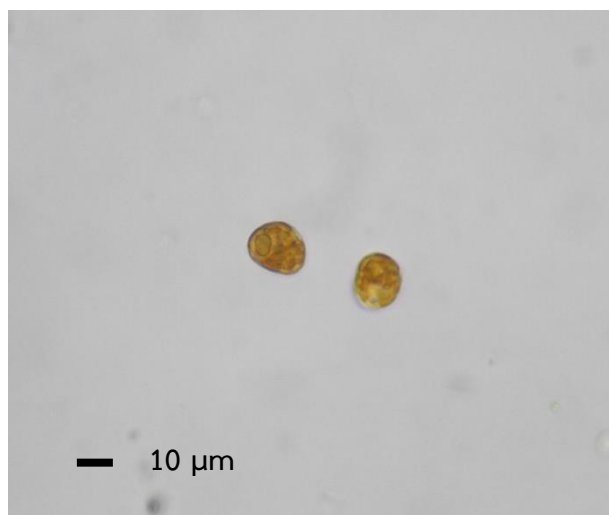
รูปที่ 6 gymnodinoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง



รูปที่ 7 coccoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง

2. zooxanthellae ที่แยกได้จากดอกไม้ทะเล

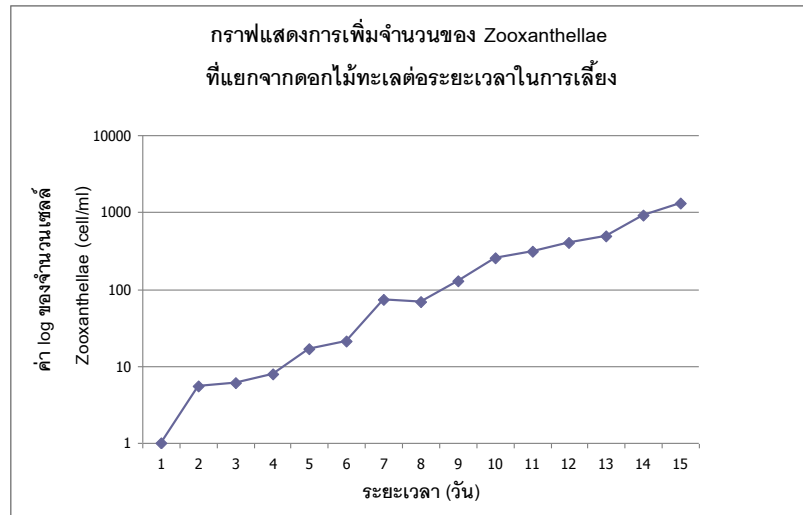
การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae จากตัวอย่างดอกไม้ทะเล (*Anthopleura* sp.) ทั้งสิ้น 3 ครั้ง พบว่า zooxanthellae ที่แยกได้นั้นเติบโตได้ดีใน Daiko Medium (รูปที่ 8) แต่ไม่สามารถเติบโตในอาหารสูตรอื่นๆ



รูปที่ 8 coccoid cell ของ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Anthopleura* sp.

3. ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล

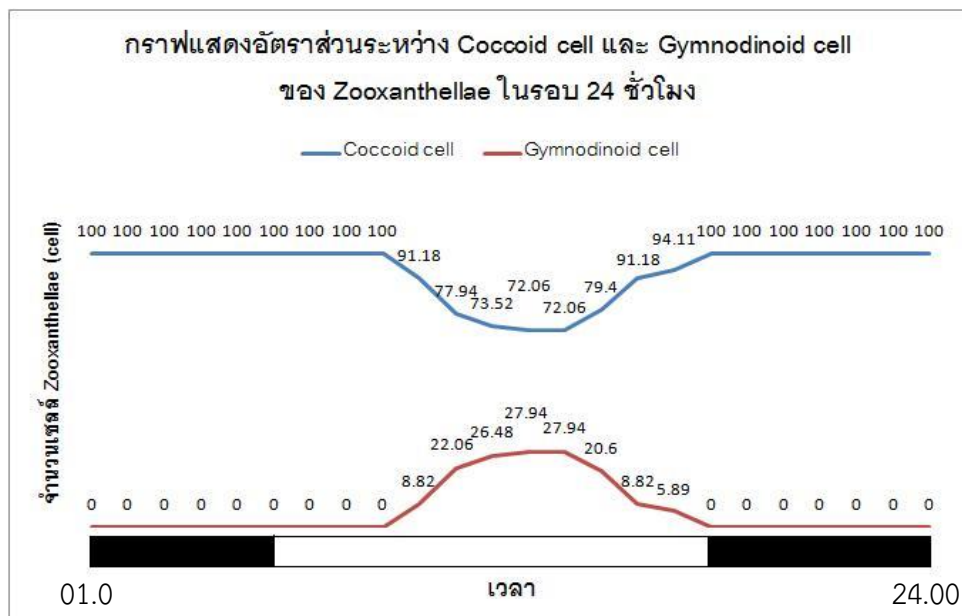
การทดลองหาอัตราการเจริญเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเลเป็นเวลา 15 วัน พบว่า มีค่าสัมประสิทธิ์การเติบโต 0.43 ต่อวัน และใช้เวลาในการเพิ่มจำนวนเซลล์เป็นสองเท่า 0.71 วัน ดังแสดงการเติบโตของ zooxanthellae ในรูปที่ 9



รูปที่ 9 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ zooxanthellae กับระยะเวลาที่ทำการเลี้ยง

4. ศึกษาการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์ zooxanthellae ในรอบ 24 ชั่วโมง

การสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเซลล์พบว่า zooxanthellae สามารถเปลี่ยนรูปร่างไปมา ระหว่าง coccoid cell และ gymnodinoid cell โดยในช่วงที่มีแสงสว่างเซลล์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น gymnodinoid cell ในทางตรงกันข้ามเมื่อเข้าสู่ช่วงไม่มีแสงเซลล์ส่วนใหญ่จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น coccoid cell ดังแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 10 อัตราส่วนร้อยละ ระหว่าง coccoid cell ต่อ gymnodinoid cell ใน 24 ชั่วโมง

Zooxanthellae จะเปลี่ยนรูปร่างเป็น gymnodinoid cell ในบางช่วงเวลาของวันเท่านั้น พบว่าหลังจากได้รับแสงประมาณ 2-3 ชั่วโมง คือช่วงเวลา 10.00 น. เป็นต้นไป Zooxanthellae จึงเริ่มมีการเปลี่ยนรูปร่างเป็น gymnodinoid cell ว่ายอยู่ในมวลน้ำ สามารถมองเห็นได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อย่างชัดเจน และมีปริมาณสูงสุดในช่วงเวลา 13.00 น.-14.00 น. จากนั้นจะเปลี่ยนรูปร่างกลับสู่ coccoid cell ประมาณเวลา 18.00 น. ซึ่ง coccoid cell จะเห็นเป็นเซลล์ลักษณะกลมบางติดอยู่ที่ผิวพื้นของ multiwell plate อย่างไรก็ตามปริมาณของ coccoid cell จะพบมากกว่า gymnodinoid cell เสมอทุกช่วงเวลา

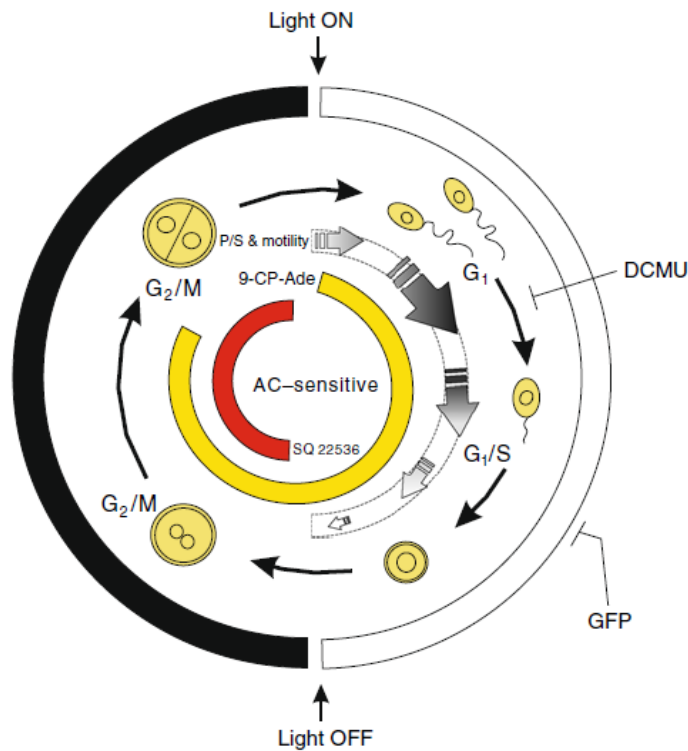
ในระหว่างทำการทดลองสังเกตพบว่า zooxanthellae จะเริ่มมีการแบ่งเซลล์ในช่วงเวลากลางคืน โดยจะสังเกตพบเซลล์มีลักษณะคอดตรงกลางชัดเจนในเวลาประมาณ 03.00 น. และไปสิ้นสุดขั้นตอนการแบ่งเซลล์ในเวลากลางวัน ทั้งนี้จะพบการแบ่งเซลล์ที่สมบูรณ์มากในเวลา 13.00 น. - 14.00 น. การแบ่งเซลล์ดังกล่าวจะเกิดใน coccoid cell และเมื่อแบ่งเซลล์สิ้นสุด เซลล์ที่แบ่งออกมาใหม่นั้นจะเปลี่ยนรูปร่างเป็น gymnodinoid cell ซึ่งเซลล์ที่หลุดออกมาก่อนจะว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำเป็นลำดับแรก จากนั้นไม่นานอีกเซลล์ก็จะว่ายขึ้นสู่ผิวน้ำ ทำให้พบเซลล์รูปร่าง gymnodinoid cell ในช่วงเวลาดังกล่าวเป็นจำนวนมาก

วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาลักษณะเซลล์ Zooxanthellae ได้กล้องจุลทรรศน์ พบว่าลักษณะเซลล์ของ zooxanthellae ที่แยกได้ในห้องปฏิบัติการมีลักษณะเซลล์ 2 รูปแบบด้วยกัน คือในรูปแบบที่เป็น Free-living อาศัยในมวลน้ำ (gymnodinoid cell) มีลักษณะเป็น Dinoflagellate คือเห็นร่อง Cingulum พาดกลางลำตัวลักษณะคล้ายเลข 8 อีกรูปแบบคือรูปแบบเซลล์ที่ไม่เคลื่อนที่ อาศัยอยู่ภายในเซลล์ของเจ้าบ้านหรือ coccoid cell มีลักษณะกลม สีน้ำตาลทอง ขนาดประมาณ 10 μm เช่นเดียวกับการศึกษาของ Raechel และคณะ ในปี ค.ศ.2008 และ Hagedorn และคณะ ในปี ค.ศ. 2010 การศึกษาของทั้งสองงานวิจัยพบว่า Zooxanthellae มีขนาดประมาณ 10 - 20 μm

เมื่อทำการเลี้ยง Zooxanthellae ที่แยกจากปะการังในสูตรอาหารทั้ง 4 สูตร คือ T1, T1 เพิ่มธาตุซิลิเกต, ESM และ Daigo พบว่าไม่มีการเติบโตของ zooxanthellae ทั้งที่การทดลองของ Carlos และคณะ (1999) สามารถเลี้ยง zooxanthellae และมีการเจริญเติบโตได้ในอาหารสูตร ESM คาดว่ามีสาเหตุจากการที่ zooxanthellae เองมีหลายสายพันธุ์ และปะการังที่ใช้ในการทดลองมาจากคนละบริเวณซึ่งอาจทำให้มีความแตกต่างของสายพันธุ์ ส่วนการทดลองความเหมาะสมของ pH ที่ใช้เลี้ยง zooxanthellae นั้นจากการทดลองเลี้ยงของ Masuda และคณะ (1994) พบว่า zooxanthellae สามารถเลี้ยงได้ใน pH 6.5 – 9 โดยเติบโตได้ดีใน pH 8 ซึ่งผลที่ได้ตรงกับการทดลองในห้องปฏิบัติการ pH ที่เหมาะสมต่อการเลี้ยง zooxanthellae คือ pH 6.5, 7 และ pH 8 จึงใช้อาหารสูตร Daigo ที่ pH 8 ทำการเลี้ยง zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเลเพื่อหาอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.43 วัน และมี generation time หรือระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเพิ่มจำนวนเป็นสองเท่าของจำนวนเซลล์เดิม มีค่าเท่ากับ 0.71 วัน ซึ่งการศึกษาของ Stephen และคณะ ในปี 1986 พบว่าอัตราการแบ่งเซลล์ของ zooxanthellae มีค่าเท่ากับ 0.39 ± 0.18 ต่อวัน ซึ่งมีความแตกต่างกันมากระหว่างสองการทดลอง

ระหว่างศึกษาอัตราการเจริญเติบโตพบว่า zooxanthellae มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในรอบวัน ระหว่าง coccoid cell และ gymnodinoid cell จึงทำการศึกษาอัตราการเปลี่ยนแปลงรูปร่างในรอบ 24 ชั่วโมง พบว่าหลังจากที่ coccoid cell ได้รับแสงประมาณ 3 ชั่วโมง จะมีบางเซลล์เปลี่ยนรูปมาเป็น gymnodinoid cell และกลับไปเป็น coccoid cell อีกครั้งเมื่อไม่มีแสง สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang และคณะ ในปี 2008 ที่ได้ศึกษาวงชีวิตของ zooxanthellae ในช่วงเวลากลางวันและกลางคืน พบว่าเซลล์ของ zooxanthellae เริ่มมีการแบ่งเซลล์ในช่วงกลางคืน และแบ่งเซลล์สิ้นสุดในเวลากลางวัน ทำให้พบเห็นเซลล์ zooxanthellae ที่มีรูปร่าง gymnodinoid cell ในช่วงเวลาดังกล่าว ดังแสดงในรูปที่



รูปที่ 11 แสดงวงจรชีวิตของ zooxanthellae (Wang et al.,2008)

ซึ่งข้อมูลเหล่านี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานที่ใช้ประกอบการเลี้ยง zooxanthellae และงานวิจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง นอกจากนั้นข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงตัวอ่อนปะการังตามที่มีการศึกษาพบว่า zooxanthellae เข้าไปมีบทบาทต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อนปะการังตั้งแต่วัยที่เป็นไข่ (Hirose et al.,2000) ตลอดจนมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของปะการัง รวมทั้งการศึกษาเพื่อการฟื้นฟูปะการังภายหลังการเกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวที่สร้างความเสียหายอย่างยิ่งต่อแนวปะการังทั้งในประเทศไทย และต่างประเทศ

งานที่จะดำเนินการในขั้นต่อไป

1. จะทำการปรับวิธีการในการแยก zooxanthellae จากปะการังใหม่เนื่องจากการแยกเลี้ยงที่ผ่านมาพบว่าการปนเปื้อนเมือกที่ปะการังขับออกมาและแบคทีเรียเติบโตเร็วมาก
2. จะทำการแยก zooxanthellae จากสัตว์ทะเลที่กำหนดในวิธีการศึกษาให้ได้มากสายพันธุ์เพื่อทดสอบสายพันธุ์ที่ทนร้อนต่อไป

เอกสารอ้างอิง

- อุกกฤต สตมณีนทร์ 2536. การตอบสนองของปะการังและแนวปะการังต่อเหตุการณ์การฟอกขาวของแนวปะการัง พ.ศ. 2534 ในทะเลอันดามัน ประเทศไทย วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 117 หน้า
- Baker, A. C., Glynn, P.W. and Riegl, B. 2008. Climate change and coral reef bleaching: An ecological assessment of long-term impacts, recovery trends and future outlook. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 80, 435-471
- Edmunds, P. J., Gates, R. D., Leggat, W., Hoegh-Guldberg, O. and Allen-Requa, L. 2005. The effect of temperature on the size and population density of dinoflagellates in larvae of the reef coral *Porites astreoides*. *Invertebrate Biology*, 124, 185-193.
- Granados, C., Camargo, C., Zea, A. and Sanchez, J.A. 2008. Phylogenetic relationship among zooxanthellae (*Symbiodinium*) associated to excavating sponges (*Cliona* spp.) reveal an unexpected lineage in the Caribbean. *Molecular Phylogenetic and Evolution*, 49, 554-560
- Hagedorn, M.C., Carter, V.L., Leong, J.C. and Kleinhans, F.W. 2010. Physiology and cryosensitivity of coral endosymbiotic algae (*Symbiodinium*). *Cryobiology*. 60. 147 - 158
- Hirose, M., Kinzie, R.A. and Hidaka, M. 2000. Early Development of Zooxanthella-Containing Eggs of the Corals *Pocillopora verrucosa* and *P. eydouxi* with Special Reference to the Distribution of Zooxanthellae. *Biol Bull.* 199. 68 - 75
- How Reefs are Built. *Oracle Education Foundation*. http://library.thinkquest.org/25713/reefs_made1.html (สืบค้นเมื่อ วันที่ 26 กุมภาพันธ์ 2554)
- Khalesi, M.K. 2008. Cell cultures from the symbiotic soft coral *Sinularia flexibilis*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Animal*, 44, 330-338.
- Kinzie, R. A., and Takayama, M. 2001. The adaptive bleaching hypothesis: Experimental tests of critical assumptions. *Biological Bulletin* 200(1): 51-58.
- Leggat, W., Whitney, S. and Yellowless, D. 2004. Is coral bleaching due to the instability of the zooxanthellae dark reactions? *Symbiosis*, 37, 137-153.
- Lesser, M. P. 2004. Experiment biology of coral reef ecosystems. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 300, 217-252
- Louis, C. and Schleyer, M. H. 2002. Coral bleaching on high-latitude marginal reef at Sodwana Bay, South Africa. *Marine Pollution Bulletin*, 44, 1380-1387
- McLaughlin, J.J.A. and Zahl, P.A. 1959. Axenic zooxanthellae from various invertebrate hosts. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 77. 55-72
- Meehan, W. J. and Ostrander, G. K. 1997. Coral bleaching: A potential biomarker of environmental stress. *Journal of Toxicology and Environmental Health* 50(6):

529-552.

- Raechel, A., Littman, J. H. van., Oppen, Bette, L. and Willis, Y. 2008. Methods for sampling free-living *Symbiodinium* (Zooxanthellae) and their distribution and abundance at Lizard Island (Great Barrier reef). *Journal of experimental of Marine Biology and Ecology*, 364, 48-53.
- Stephen, L.D. and Christopher, F.D. 1986. Cell-Size distributions of zooxanthellae in culture and symbiosis. *Biol. Bull.* 170. 519 - 525
- Strychar, K. B., M. Coates, et al. (2005). Loss of *Symbiodinium* from bleached soft corals *Sarcophyton ehrenbergi*, *Sinularia* sp. and *Xenia* sp. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 320(2): 159-177.
- VENN, A.A., LORAM, J.E. & DOUGLAS, A.E. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. *Journal of Experimental Botany*, 59, 1069-1080.
- Wang, L.H., Liu, E.Y., Ju, Y.M., Hsiao, Y.Y. Fang, L.S. and Chen, C.S. 2008. Cell cycle propagation is driven by light-dark stimulation in a cultured symbiotic dinoflagellate isolated from corals. *Coral*. 27. 823 – 835

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. สูตรอาหารสำเร็จรูป Daigo

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงก์ตอน เตรียมจากสูตรสำเร็จรูป Daigo โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ในปริมาตร 10 มิลลิลิตร เมื่อใช้งานจึงนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ในน้ำทะเลกรอง 1000 มิลลิลิตร อาหารสำเร็จรูปมีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ดังนี้

อัตราส่วน mg /1,000 mL

NaNO ₃	200
Na ₂ HPO ₄	1.4
K ₂ HPO ₄	5
NH ₄ Cl	2.68
Fe-EDTA	5.2
Mn-EDTA	0.332
Na ₂ -EDTA	37.2
ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.023
CoSO ₄ .7 H ₂ O	0.014
Na ₂ MoO ₄ .2 H ₂ O	0.0073
CuSO ₄ .7 H ₂ O	0.0025
H ₂ SeO ₃	0.0017
Thiamin-HCl	0.2
Biotin	0.0015
Vitamin B ₁₂	0.0015
MnCl ₂ .4 H ₂ O	0.018

ภาคผนวก ข. ค่าเฉลี่ยการเพิ่มจำนวนของ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล

ระยะเวลา (วัน)	จำนวนเซลล์ (cell/ml)
1	1
2	6
3	6
4	8
5	17
6	21
7	73
8	68
9	127
10	253
11	312
12	401
13	491
14	902
15	1314

ภาคผนวก ค. ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์แสดงสัดส่วนระหว่าง Coccoid cell : Gymnodinoid cell

เวลา	% Coccoid cell	% Gymnodinoid cell
01.00	100	0
02.00	100	0
03.00	100	0
04.00	100	0
05.00	100	0
06.00	100	0
07.00	100	0
08.00	100	0
09.00	100	0
10.00	91.18	8.82
11.00	77.94	22.06
12.00	73.52	26.48
13.00	72.06	27.94
14.00	72.06	27.94
15.00	79.4	20.6
16.00	91.18	8.82
17.00	94.11	5.89
18.00	100	0
19.00	100	0
20.00	100	0
21.00	100	0
22.00	100	0
23.00	100	0
24.00	100	0