รายงานผลการดำเนินงาน

ปีงบประมาณ 2558

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

การแยกเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนจากปะการังและหอยสองฝา

ผู้รับผิดชอบโครงการ
รองศาสตราจารย์ ดร. ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2556 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี และ หน่วยบัญชาการสงครามพิเศษทางเรือ กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ ที่ให้การสนับสนุนและอำนวยความสะดวกในการทำงานวิจัยในพื้นที่ ขอขอบคุณ ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และผู้ร่วมงานทุกท่านที่ได้ให้ความร่วมมือในการปฏิบัติงานภาคสนามมาเป็นอย่างดี

บทคัดย่อ

อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและความเค็มที่ลดลงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวในปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆที่มี zooxanthellae ร่วมอาศัยอยู่ด้วย เพื่อให้ทราบผลของปัจจัยดังกล่าวการวิจัย 6 เดือนแรกของปีงบประมาณ 2558 จึงได้ทำการแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*, ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites* ดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. เพิ่มเติม รวมทั้งสามารถแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากปะการังเขากวาง *Acropora millepora* ซึ่งเป็นปะการังชนิดที่อ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมได้สำเร็จตลอดจน ปะการังรังผึ้ง *Goniastrea* sp. และ ปะการังอ่อน ได้สำเร็จพร้อมจะนำไปศึกษาในปีงบประมาณต่อไป

การวิจัย 6 เดือนสุดท้ายของปีงบประมาณ ได้ทำการทดลองเรื่องผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการฟอกขาวของปะการัง โดยนำกิ่งปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ขนาดใกล้เคียงกันมาวางในโหลแก้วที่มีน้ำทะเลกรองท่วมกิ่งปะการัง ซึ่งมีอุณหภูมิแตกต่างกัน ดังนี้ 28 31 และ34 องศาเซลเซียส โดยแต่ละระดับอุณหภูมิทำการทดลองที่สามระดับความเค็มคือ 10 20 และ 33 psu ตามลำดับ พบว่า ที่อุณหภูมิปกติและที่ระดับความเค็มต่ำเท่านั้นจะส่งผลต่อ zooxanthellae และปะการัง โดยทำให้ zooxanthellae หลุดออกมาในมวลน้ำปริมาณมากเมื่อเทียบกับความเค็มปกติ ส่วนที่อุณหภูมิสูง ทุกระดับความเค็ม zooxanthellae ได้รับผลกระทบ แม้จะเป็นความเค็มควบคุมก็ตาม และที่ระดับอุณหภูมินี้ความหนาแน่นเซลล์ของ zooxanthellae ที่หลุดออกมาในมวลน้ำมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับระดับอุณหภูมิอื่น ทำให้ปะการังฟอกขาวและตายในที่สุด

คำสำคัญ: อุณหภูมิ, ความเค็ม, zooxanthellae, *Pocillopora damicornis*

Abstract

The elevated water temperature and decreased water salinity cause bleaching in coral and other marine invertebrates. To clarify the effect of those factors on coral bleaching, the study in the first 6 months of the fiscal year was conducted on isolation and cultivation of zooxanthellae from *Pocillopora damicornis*, *Fungia* sp., *Epiactis* sp., *Acropora millepora*, *Goniastrea* sp. and one soft coral species.

The effects of temperature and salinity on coral bleaching in *Pocillopora damicornis* has been conducted in the last 6 months of the fiscal year. *Pocillopora damicornis* has been treated in the small aquarium at temperature of 28, 31 and 34 $^{\circ}$C. At each temperature level there are three treatments of salinity 10, 20 and 33 psu. The results have been clearly showed that the degree of coral bleaching increase with the increasing of temperature in conjunction with low salinity.

Keywords: temperature, salinity, zooxanthellae, *Pocillopora damicornis*

สารบัญเรื่อง

ชื่อเรื่อง การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนจากปะการังและหอยสองฝา
Isolation and culture of thermal tolerance stain of zooxanthellae from corals and marine bivalve

กิตติกรรมประกาศ i
บทคัดย่อภาษาไทย ii
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ iii
สารบัญเรื่อง iv
สารบัญรูป v

บทนำ 1
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2
วัตถุประสงค์ 6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 6
วิธีดำเนินการศึกษา 6
ผลการศึกษา 11
สรุปและอภิปรายผลการศึกษา 15
เอกสารอ้างอิง 14
ภาคผนวก 18

สารบัญรูป

รูปที่ 1 zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* 3
รูปที่ 2 zooxanthellae ที่อยู่ภายในไข่ของปะการัง(Hirose et al.,2000) 3
รูปที่ 3 ปะการังเขากวางฟอกขาวที่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี 5
รูปที่ 4 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร 6
รูปที่ 5 ปะการัง *Pocillopora damicornis* ใช้ในการแยก zooxanthellae 7
รูปที่ 6 ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites* ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae 7
รูปที่ 7 ดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae 8
รูปที่ 8 ปะการังเขากวาง *Acropora millepora* ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae 8
รูปที่ 9 ปะการังรังผึ้ง *Goniastrea* sp. ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae 8
รูปที่ 10 ปะการังอ่อน ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae 9
รูปที่ 11 การตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ศึกษา 9
รูปที่ 12 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 28 °C 13
รูปที่ 13 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 31 °C 14
รูปที่ 14 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 34 °C 14

ชื่อเรื่อง ภาษาไทย การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนจากปะการังและหอยสองฝา

ภาษาอังกฤษ Isolation and culture of thermal tolerance stain of zooxanthellae from corals and marine bivalve

ชื่อผู้วิจัย รศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ

บทนำ

ไดโนแฟลกเจลเลตในสกุล *Symbiodinium* ชื่อสามัญ zooxanthellae มักพบอาศัยในเนื้อเยื่อปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด ลักษณะเซลล์กลมมีขนาดตั้งแต่ 6-15 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลอมเหลือง zooxanthellae ที่อาศัยในเนื้อเยื่อปะการังจะพบ clade C เป็นส่วนมาก ในบางกรณีอาจพบ clade A, B, D, F และ G ด้วย โดย clade C จะพบกระจายเป็นวงกว้างในเขตร้อน clade D สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมได้ดีที่สุด สำหรับ clade B จะพบเฉพาะในเขตอบอุ่น ซึ่งมีแสงและอุณหภูมิน้ำทะเลต่ำ(Stambler, 2011)

ความสัมพันธ์ระหว่างปะการังกับ zooxanthellae เป็นแบบพึ่งพาซึ่งกันและกันได้ประโยชน์ด้วยกันทั้งคู่ โดย zooxanthellae จะนำคาร์บอนไดออกไซด์และธาตุอาหารที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของปะการังมาใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้ผลผลิตเป็นออกซิเจนและสารอาหารกลับคืนให้ปะการัง (Trench, 1979) คิดเป็น90 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานและสารอาหารทั้งหมดที่ปะการังได้รับ (Muscatine and Porter, 1977) เมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลจะสูงขึ้นกว่าปกติ 1-2 องศาเซลเซียส หรือ ความเค็มลดต่ำลง zooxanthellae จะออกจากเนื้อเยื่อปะการัง เป็นสาเหตุทำให้เกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว(coral bleaching) ปะการังที่ปราศจาก zooxanthellae จะอ่อนแอเพราะไม่ได้รับสารอาหารที่เพียงพอ และอาจตายหากมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นระยะเวลานาน (Podesta and Glynn, 1997) แม้ว่าการสูญเสีย zooxanthellae อาจจะเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น, ความเข้มแสงเพิ่มมากขึ้น, ความเค็มเปลี่ยนจากเดิม หรือ ติดเชื้อแบคทีเรีย (Fagoonee *et al*., 1999) เป็นต้น แต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อ zooxanthellae มากที่สุด เช่น เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มขึ้นจากปกติ 27 องศาเซลเซียส เป็น 32 องศาเซลเซียส พบว่า zooxanthellae จะมีสีจางลงและมีจำนวนต่อพื้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และหากเพิ่มอุณหภูมิเป็น 34 องศาเซลเซียส ปะการังจะตายภายใน 8 ชั่วโมง (Hoegh-Guldberg and Smith, 1989) การที่ปะการังมีสีซีดจางลงเนื่องจาก zooxanthellae ถูกขับออกมาภายนอกปะการังหรือตัวสาหร่ายเองสูญเสียรงควัตถุไป ในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยรุนแรง ปะการังจะมีสีขาวอย่างสมบูรณ์ (completely bleaching)

อย่างไรก็ตามพบว่าปะการังแต่ละชนิดจะตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแตกต่างกัน และแม้แต่ในโคโลนีเดียวกันก็อาจพบการฟอกขาวเป็นบางส่วน แสดงให้เห็นว่าอาจมี zooxanthellae หลายสายพันธุ์ทั้งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงได้และที่ทนไม่ได้อาศัยอยู่ร่วมกันในปะการังชนิดเดียวกัน

ความเค็มเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่ส่งผลต่อ zooxanthellae โดยความเค็มต่ำจะทำให้ความทนทานของ zooxanthellae ลดลง (Sakami, 2000) เนื่องจากอัตราการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่อความเค็มเปลี่ยนแปลงจากเดิม โดยความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงได้ง่ายกว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้น (Pages et al., 1999) ผลจากการศึกษาความเค็มที่ต่ำลงต่ออัตราการสูญเสีย zooxanthellae ของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* พบว่า zooxanthellae จะออกจากดอกไม้ทะเล *A. elegantissima* เพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีความเค็มต่ำเป็นระยะเวลานาน (Engebretson and Martin, 1994) สำหรับการเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกได้จากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ไม่เปลี่ยนแปลงในความเค็มต่ำ (15-20 psu) ที่อุณหภูมิเป็นปกติ (28-32 องศาเซลเซียส) แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 36 องศาเซลเซียส อัตราการเติบโตของ zooxanthellae จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า อาจมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ zooxanthellae

จากการสำรวจการเกิดปะการังฟอกขาวในพื้นที่ศึกษาพบว่าปะการังมีการฟอกขาวเพียงบางส่วนของก้อนปะการัง จึงตั้งสมมติฐานว่าอาจเป็นเพราะมี zooxanthellae ทั้งสายพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มอาศัยอยู่ร่วมกันในปะการังชนิดเดียวกัน ดังนั้นจึงทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเกิดปะการังฟอกขาว ตลอดจนทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม จากปะการัง และหอยสองฝา

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zooxanthellae เป็นแพลงก์ตอนพืช อยู่ในลำดับอนุกรมวิธาน ดังนี้

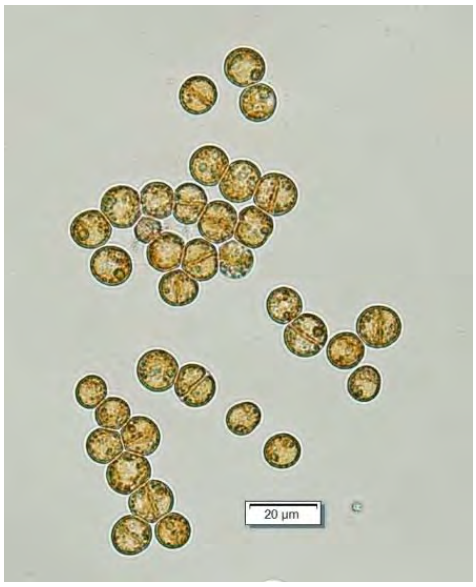
Division Dinoflagellata

Class Dinophyceae

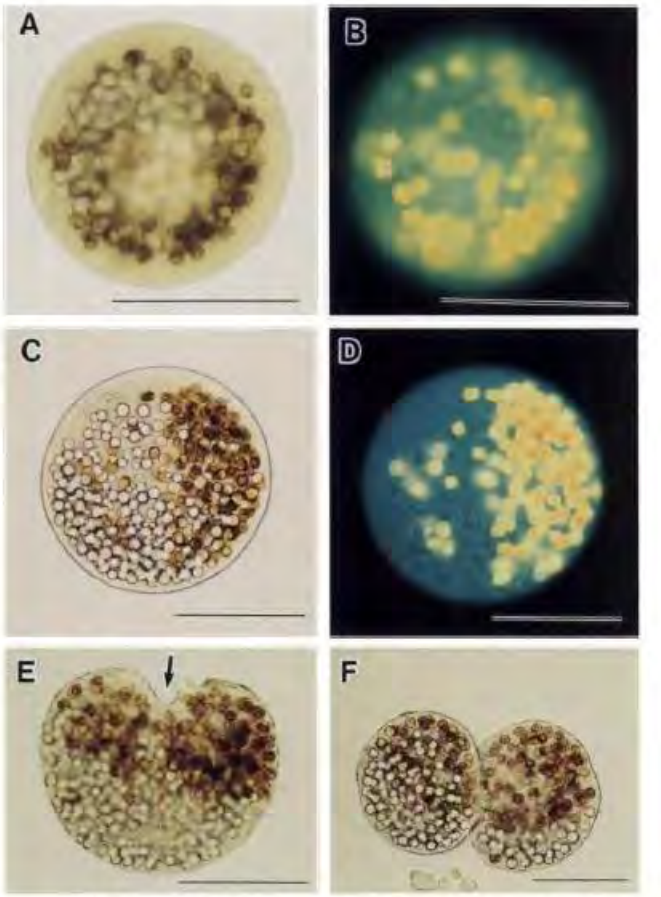
Order Suessiales

Family Symbiodiniaceae

Genus *Symbiodinium*



รูปที่ 1 zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*



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.

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

Symbiodinium sp. หรือ zooxanthellae อยู่ใน Division Dinophyta (Granados et al., 2008) เป็น dinoflagellate ขนาดประมาณ 6-15 ไมโครเมตร(รูปที่ 1) มีสีน้ำตาลทองดำรงชีวิตแบบพึ่งพา(symbiosis) ในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด (Raechel et al.,2008) เช่น ดอกไม้ทะเล ทากเปลือย หอยมือเสือ ปะการัง เป็นต้น (Venn et al., 2008) โดยจะมีลักษณะกลม ไม่เคลื่อนที่ (coccoid form) เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ และมีลักษณะเช่นเดียวกับ dinoflagellate โดยทั่วไปคือ เป็น gymnodiniod form มีการสร้าง flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในมวลน้ำ

Zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อของปะการังมีบทบาทสำคัญในการดึงแคลเซียมคาร์บอเนตในมวลน้ำเพื่อให้ปะการังใช้ในการสร้างโครงร่างแข็ง ดังสมการที่แสดงต่อไปนี้

$Ca^{2+} + 2HCO^{-} \longrightarrow Ca(HCO_3)_2$ (สมการที่ 1-1)

จากนั้น $Ca(HCO_3)_2$ จะสลายตัวและให้ calcium carbonate และ carbon acid originate ซึ่ง calcium carbonate จากสมการนี้จะเป็นที่เป็นโครงร่างแข็งของปะการัง ดังสมการที่ 1-2

$Ca(HCO_3)_2 \longrightarrow CaCO_3 + H_2CO_3$ (สมการที่ 1-2)

จากนั้น carbon cid originate จะสลายตัวเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุดดังสมการ1-3

$H_2CO_3 \longrightarrow CO_2 + H_2O$ (สมการที่ 1-3)

นอกจากการช่วยนำแคลเซียมเพื่อใช้ในการสร้างโครงร่างแข็งแล้ว zooxanthellae ยังเป็นแหล่งสร้างอาหารที่สำคัญให้กับกลุ่มดอกไม้ทะเลและปะการังสูงถึง95 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งอาหารทั้งหมดโดยผ่านกระบวน การสังเคราะห์แสง (Lesser M P, 2003)

zooxanthellae เข้าสู่ปะการังได้ 2 ลักษณะด้วยกัน คือ

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

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

ดังนั้นการเลี้ยง zooxanthellae จึงมีความสำคัญและเป็นประโยชน์ต่อการเพาะเลี้ยงปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกชนิดอื่นๆ ที่มี zooxanthellae เป็นผู้อาศัย

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว (Coral Bleaching)

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว หรือ coral bleaching เป็นปรากฏการณ์ที่เป็นสาเหตุให้ปะการังตายเป็นจำนวนมาก เริ่มมีการสนใจศึกษาตั้งแต่ปี 1980 พบว่าปรากฏการณ์ดังกล่าวมีสาเหตุมาจากหลายปัจจัย ปัจจัยที่สำคัญคือการที่อุณหภูมิเฉลี่ยผิวน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น (Baker et al., 2008) ส่งผลให้

zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพาภายในตัวปะการัง (endosymbiosis) ไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงออกจากเนื้อเยื่อปะการังทำให้ปะการังมีสีขาว ส่งผลให้ปะการังขาดแคลนอาหารและตายลงในที่สุด ปรากฏการณ์นี้ไม่ได้พบเฉพาะแต่ในปะการังเท่านั้น ยังพบในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ที่มี zooxanthellae เป็นผู้อาศัยเช่น ฟองน้ำ ทากเปลือย และดอกไม้ทะเล เป็นต้น ก็พบการฟอกขาวด้วยเช่นกัน การศึกษาของ Rowan ในปี 1997 พบว่า การฟอกขาวที่เกิดขึ้นในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของ zooxanthellae ที่สามารถแบ่งได้เป็นหลาย clade ด้วยกัน ส่งผลให้ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละเจ้าบ้าน (Host) (Louis et al., 2002)

รูปที่ 3 ปะการังเขากวางฟอกขาวที่เกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี

ปัจจุบันการเกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวมีความรุนแรงมากขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2553 เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาว เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้นจาก 29 องศาเซลเซียส เป็น 30 องศาเซลเซียส ตั้งแต่ปลายเดือนมีนาคม 2553 สามสัปดาห์ต่อมาได้เกิดปะการังฟอกขาวเป็นวงกว้างทั้งอ่าวไทยและทะเลอันดามัน พบว่าแนวปะการังได้รับความเสียหายมากที่สุดเป็นประวัติการณ์ (นลินี ทองแถม และ นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ, 2553)

ความเค็มต่ำก็ส่งผลให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวเช่นเดียวกัน เมื่อทำการทดลองโดยเปลี่ยนแปลงระดับความเค็มโดยทันที พบว่าปะการังอ่อน *Sarcophyton* spp. ที่เก็บจากบริเวณค่ายพระมหาเจษฎาราชเจ้า อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี มีการฟอกขาวที่ระดับความเค็ม 20 psu และเมื่อทำการทดลองแบบเรื้อรังปะการังอ่อน *Sarcophyton* spp. จะฟอกขาวที่ระดับความเค็ม 10 psu (Chavanich *et al.*,

2009) ทั้งนี้ความเค็มที่เริ่มทำให้เกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวในช่วงการเกิดอุทกภัยปี 2554 บริเวณเกาะค้างคาว จังหวัดชลบุรี มีค่าเท่ากับ 11 psu (ธรรมศักดิ์ ยีมิน และคณะ, 2554)

วัตถุประสงค์ของโครงการ

เพื่อทำการศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเกิดปะการังฟอกขาวตลอดจนคัดเลือก zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อน เพื่อใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวและการฟื้นฟูปะการัง

ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาและเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ zooxanthellae ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มที่แยกได้จากปะการัง หอยสองฝาบางชนิดหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น

วิธีดำเนิการวิจัย

พื้นที่ศึกษา

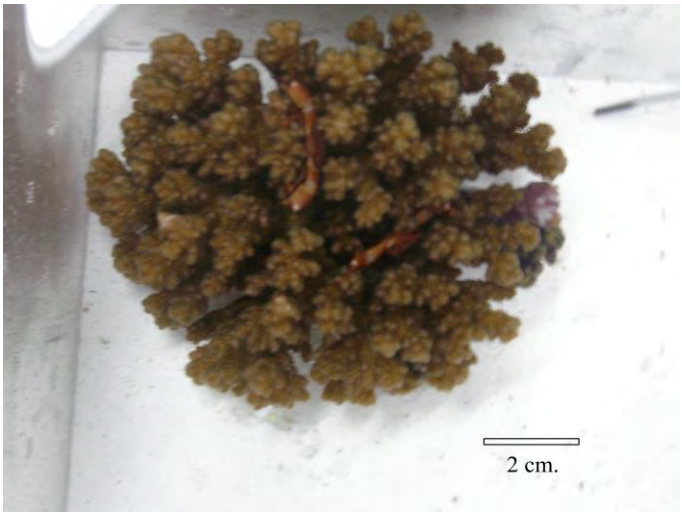
ทำการศึกษาในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร เกาะปลาหมึกและเกาะจระเข้ซึ่งอยู่ห่างจากเกาะปลาหมึกไปทางทิศตะวันตกเฉียงเหนือประมาณ 3 ไมล์ทะเล

รูปที่ 4 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร

1. การเก็บตัวอย่าง

ปีงบประมาณ 2558

เก็บตัวอย่างปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*(รูปที่ 5) ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites*(รูปที่ 6) ดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. (รูปที่ 7) *Acropora millepora*(รูปที่ 8) *Goniastrea* sp. (รูปที่ 9) และ ปะการังอ่อน(รูปที่ 10) แบบสุ่มโดยวิธีการดำน้ำที่ระดับความลึก 3-6 เมตร ในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เป็นประจำเดือนเว้นเดือนตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2557-กันยายน 2558 รวมเก็บตัวอย่างทั้งสิ้น 6 ครั้ง นำตัวอย่างสัตว์ทะเลดังกล่าวไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae



รูปที่ 5 ปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

รูปที่ 6 ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites* ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

รูปที่ 7ดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

รูปที่ 8 ปะการังเขากวาง *Acropora millepora* ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

รูปที่ 9 ปะการังรังผึ้ง *Goniastrea* sp. ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

รูปที่ 10 ปะการังอ่อน ที่ใช้ในการแยก zooxanthellae

2. การตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อม

ตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อม ได้แก่ อุณหภูมิ, ความเค็ม, ปริมาณออกซิเจนละลายน้ำ (DO), ค่าการนำไฟฟ้า และความเป็นกรด-เบส ที่ระดับความลึกทุก 1 เมตร โดยใช้เครื่องมือ YSI Model 600 XL

รูปที่ 11 การตรวจวัดปัจจัยสิ่งแวดล้อมในพื้นที่ศึกษา

3. การเก็บตัวอย่าง

ทำการสำรวจตัวอย่างก่อนด้วยวิธีดำน้ำตื้น จากนั้นจึงทำการเก็บตัวอย่างด้วยวิธีดำน้ำลึกที่ระดับความลึก 3-6 เมตร นำตัวอย่างใส่ในลังโฟม โดยให้ตัวอย่างจมอยู่ใต้น้ำทะเลตลอดเวลาเพื่อนำแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae ในห้องปฏิบัติการ

4. การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

ทำการแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากตัวอย่างที่เก็บได้โดยวิธี capillary technique ที่ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ

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

2 การทำน้ำทะเลกรองสำหรับเลี้ยง zooxanthellae

น้ำทะเลที่นำมากรองเพื่อใช้ในการเลี้ยง zooxanthellae เป็นน้ำทะเลธรรมชาติบริเวณใกล้เคียงที่ทำการเก็บตัวอย่างปะการัง นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาด 150 ไมโครเมตรเพื่อกรองเอาขยะออก จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

3 การแยก zooxanthellae จากปะการังและดอกไม้ทะเล

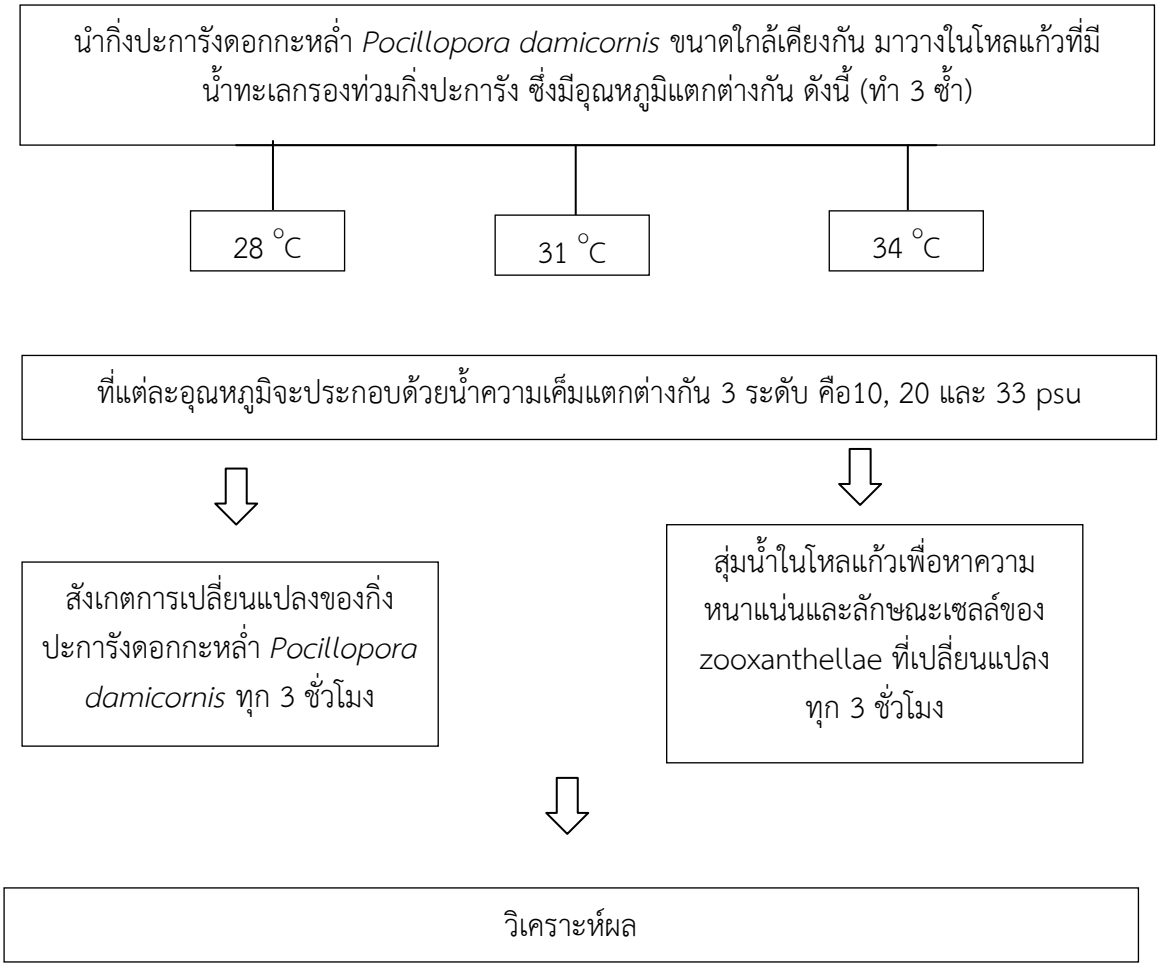
3.1 นำน้ำทะเลกรองใส่ในกระบอกฉีดน้ำสำหรับรีดผ้าปรับหัวฉีดให้น้ำออกเพียงรูเดียว ทำการฉีดลงบนตัวอย่างด้วยความรวดเร็ว โดยมีบีคเกอร์รองรับน้ำที่ฉีดผ่านปะการัง zooxanthellae จะหลุดออกจากปะการังพร้อมเนื้อเยื่อและเมือก จะสังเกตุเห็นน้ำทะเลในบีคเกอร์มีสีน้ำตาลซึ่งเป็นสีของ zooxanthellae

3.2 นำน้ำที่ได้จาก 2.3.1 กรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 125 20 และ 15 ไมโครเมตร ตามลำดับเพื่อกรองเอาเมือกที่มาจากปะการังออกและแพลงก์ตอนอื่นที่ปนเปื้อนออกให้มากที่สุด

3.3 ทำการเหวี่ยงตะกอนน้ำส่วนที่ผ่านการกรองในข้อ 2.3.2 จะได้ zooxanthellae ตกตะกอนที่ก้นหลอด นำ zooxanthellae ที่ได้มาทำการแยกด้วยเทคนิค pasteur pipette single cell isolate เพื่อแยก zooxanthellae และเพาะเลี้ยงแบบปลอดเชื้อในอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร Daigo’ IMK

(Nihon Pharmaceutical CO., Ltd) ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส ความเข้มแสงประมาณ 4,000 ลักซ์ ช่วงมืด: สว่าง 12:12 ชั่วโมง

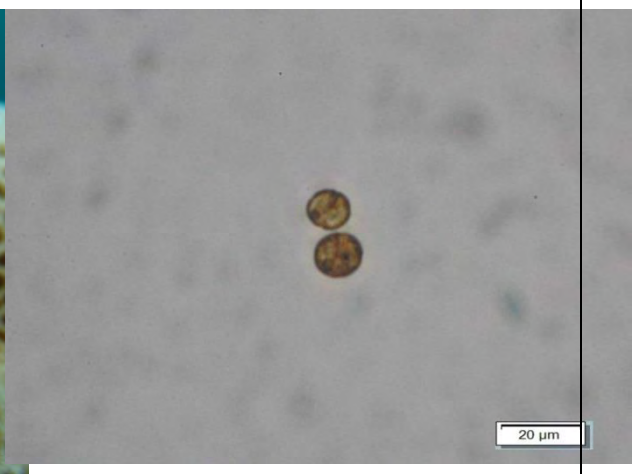
4. การทดลองผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการฟอกขาวของปะการัง



ผลการศึกษา

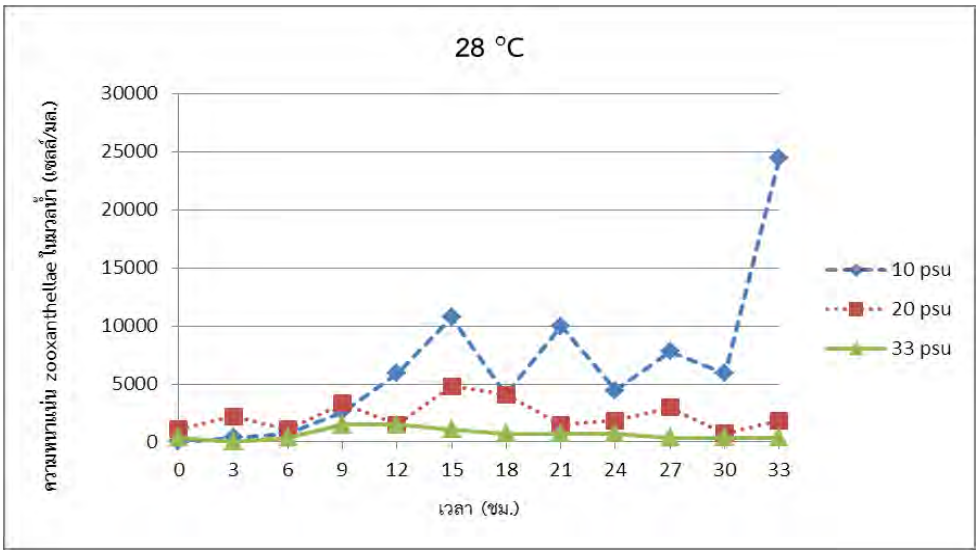
1.การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

หลังจากที่สามารถแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*, ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites* และ ดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. และนำไปทำการทดลองผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเติบโตและลักษณะเซลล์ในปีงบประมาณ 2557 แล้ว ในปีงบประมาณ 2558 สามารถแยกและเลี้ยง zooxanthellae ได้เพิ่มเติมจากปะการังเขากวาง *Acropora millepora* (ซึ่งเป็นปะการังชนิดที่อ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อม) *Goniastrea* sp. และ ปะการังอ่อน ได้สำเร็จ และพร้อมจะนำไปศึกษาในปีงบประมาณ 2559

ผู้ให้อาศัย (host)	เซลล์ zooxanthellae
1.ปะการังเขากวาง *Acropora* sp.	
2.ปะการังรังผึ้ง *Goniastrea* sp.	
	
3.ปะการังอ่อน	

2. ผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการฟอกขาวของปะการัง

ที่อุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส(รูปที่ 12) ระดับความเค็มปกติ (33 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำน้อย และไม่พบการฟอกขาว เมื่อความเค็มลดต่ำลงที่ระดับความเค็ม 20 psu พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำมากขึ้นเมื่อเทียบกับที่ความเค็มปกติ และไม่พบการฟอกขาว ที่ระดับความเค็มต่ำที่สุด (10 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำเป็นปริมาณมาก และมากที่สุดเมื่อเวลาผ่านไป 33 ชั่วโมง แต่ยังไม่พบการฟอกขาวของปะการัง

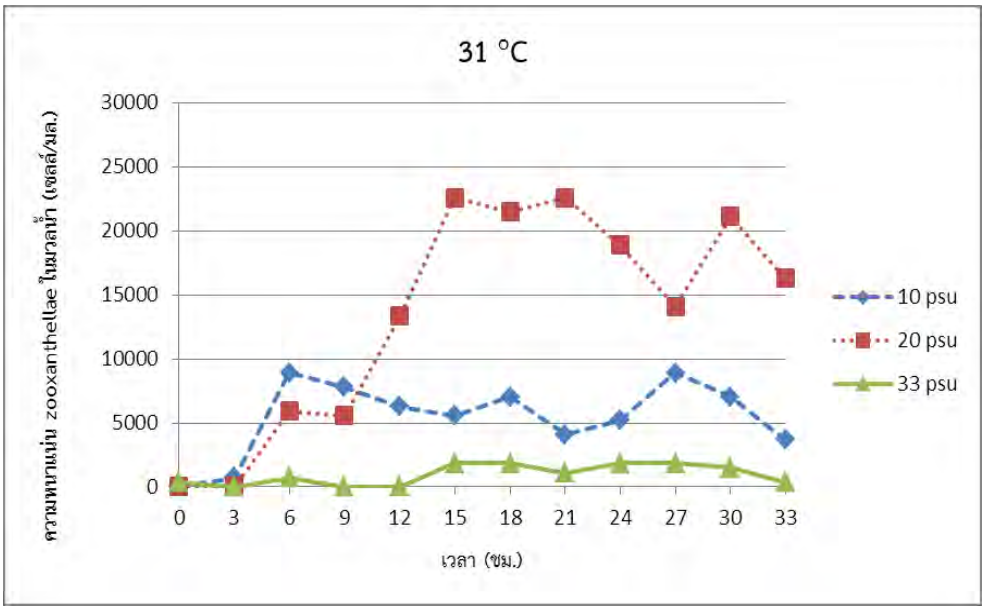


รูปที่ 12 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 28 °C

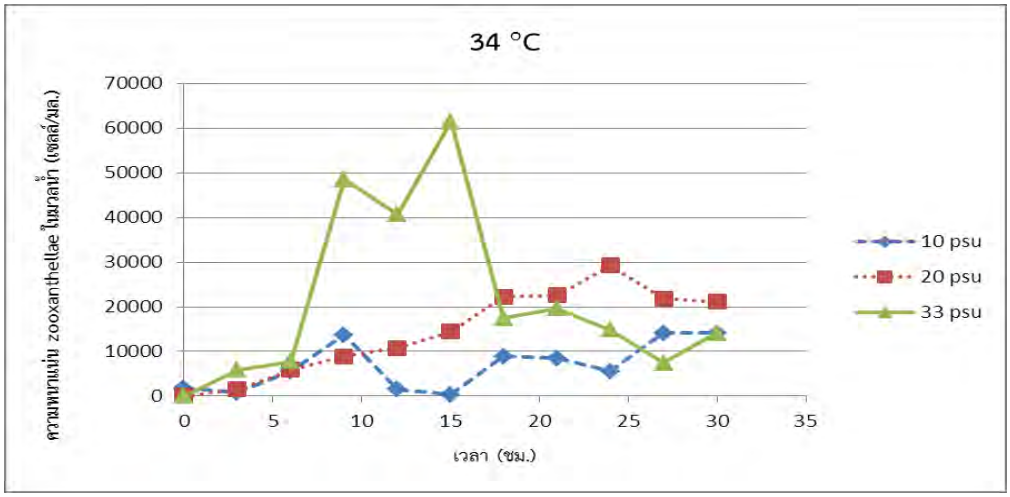
ที่อุณหภูมิที่ 31 องศาเซลเซียส(รูปที่ 13) ระดับความเค็มปกติ (33 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำน้อย และไม่พบการฟอกขาว เมื่อความเค็มลดต่ำลงที่ระดับความเค็ม 20 psu พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำมากขึ้นเมื่อเทียบกับที่ความเค็มปกติ และไม่พบการฟอกขาว ที่ระดับความเค็มต่ำที่สุด (10 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำเป็นปริมาณมาก และพบการฟอกขาว 50% ของก้อนปะการังเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ที่อุณหภูมิที่ 33 องศาเซลเซียส(รูปที่ 14) ระดับความเค็มปกติ (33 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำน้อยในช่วงแรก และหลุดออกมาในมวลน้ำมากที่สุดในชั่วโมงที่ 9-15 พบการฟอกขาว 50% ในชั่วโมงที่ 12 และฟอกขาวเพิ่มมากขึ้นจนพบการฟอกขาว 100% ในชั่วโมงที่ 30 ที่ระดับความเค็ม 20 psu พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำในมวลน้ำปานกลาง พบการฟอกขาว 40% ในชั่วโมงที่ 15 หลังจากนั้นมีการฟอกขาวอย่างรวดเร็ว พบการฟอกขาว 80% ในชั่วโมงที่ 18 และพบการฟอกขาว 100% ในชั่วโมงที่ 27 และที่ระดับความเค็มต่ำที่สุด

(10 psu) พบ zooxanthellae ออกจากปะการังดอกกะกล่ำมาอยู่ในมวลน้ำน้อย แต่พบการฟอกขาว 40% ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 12 และฟอกขาวเพิ่มมากขึ้นจนพบการฟอกขาว 100% ในชั่วโมงที่ 30



รูปที่ 13 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 31 °C



รูปที่ 14 ความหนาแน่นของ zooxanthellae ในน้ำทะเลต่างระดับความเค็มที่อุณหภูมิ 34 °C

สรุปและอภิปรายผลการศึกษา

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิปกติและที่ระดับความเค็มต่ำเท่านั้นจะส่งผลต่อ zooxanthellae และปะการัง โดยทำให้ zooxanthellae หลุดออกมาในมวลน้ำปริมาณมากเมื่อเทียบกับความเค็มปกติ ส่วนที่อุณหภูมิสูง ทุกระดับความเค็ม zooxanthellae ได้รับผลกระทบ แม้จะเป็นความเค็มควบคุมก็ตาม และที่ระดับอุณหภูมินี้ความหนาแน่นเซลล์ของ zooxanthellae ที่หลุดออกมาในมวลน้ำมีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับระดับอุณหภูมิอื่น ทำให้ปะการังฟอกขาวและตายในที่สุด ทั้งนี้เนื่องจากความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae (Ferrier-Pages *et al*., 1999) และความหนาแน่นเซลล์รวมถึงประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิสูง (Rodolfo-metalpa *et al*., 2006; Warner *et al*., 1996)

เอกสารอ้างอิง

นลินี ทองแถม และ นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ (2553). บันทึกจากทะเล 2554. ภูเก็ต, สถาบันวิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเล ชายฝั่งทะเล และป่าชายเลน.

รณวัน บุญประกอบ, ปิยะโชค สินอนันต์ และ สุวิชา ใจเปี่ยม (2553). ผลของปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวต่อแนวปะการังจังหวัดตราด. รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่39**:** 97-103.

ธรรมศักดิ์ ยีมิน และคณะ (2554). Climate change impacts and implications. โครงการการประมวลสถานการณ์และองค์ความรู้ด้านผลกระทบ การฟื้นตัว และการจัดการแนวปะการังจากปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว.

อุกกฤต สตภูมินทร์ (2536). การตอบสนองของปะการังและแนวปะการังต่อเหตุการณ์ฟอกขาวของแนวปะการังปี 2534 ในทะเลอันดามัน ประเทศไทย. ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต.

Berkelmans, R. and Van open, M. 2006. The role of zooxanthellae in the thermal tolerance of corals : a“nugget of hope” for coral reefs in an era of climate change. *The Royal Society*: 2305-2312.

Brown, B.E., Dunne, R.P., and Chansang H. 1996. Coral bleaching relative to elevated seawater temperature in the Andaman Sea (Indian Ocean) over the last 50 years. *Coral Reefs*, 15: 151- 152.

Drew, E.A. 1972. The biology and physiology of alga-invertebrate symbioses.II. The density of symbiotic algae cells in number of hermatypic hard corals and alcyonarians from various depths. J.Exp.Mar.Biol. 9: 71-75.

Engebretson, H., and Martin, KLM. 1994. Effects of decreased salinity on expulsion of zooxanthellae in the symbiotic sea anemone *Anthopleura elegantissima*. Pacific Science (PAC.SCI.) 48: 446-457.

Fagoonee, I., Wilson, H.B., Hassell, M.P., and Turner, J.R. 1999. The dynamics of zooxanthellae populations : A long term study in the field. Science 283: 843.

Ferrier-Pages, C., Gattuso, J-P., and Jaubert, J. 1999. Effects of small variations in salinity on the rates of photosynthesis and respiration of the zooxanthellae coral *Stylophora pistillata*. *Marine Ecology Progress* Series, 181: 309-314.

Guillard, R. 1973. Division rates, pp. 289-374. In Stein, J.R. (ed.). Culture methods and growth measurements, Canada.

Hoegh-Glidberg, O., and Smith, G. 1989. The effect of sudden changes in temperature, light, and salinity on the population density and export of zooxanthellae from the reef corals *Stylophora pistillata* and *Seriatopora hystrix*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 129: 279-303.

Jones, R. J., Hoegh-Glidberg, O., Larcum, A. W. D. and Schreiber, U. 1998. Temperature-induced bleaching of corals begins with impairment of the CO_2 fixation mechanism in zooxanthellae. *Plant, Cell Environ*, 21: 1219-1230.

Muscatine, L., and Porter, J. W. 1977. Reef corals- mutualistic symbioses adapted to nutrient-poor environments. *Bioscience*, 27: 454-460.

Noga Stamber. 2011. Zooxanthellae : The yellow symbionts inside animals. Coral Reefs: An Ecosystem in Transition: 87-106.

Pilley, R., Willis, B., and Terashima, H.2005. Trends in the sensity of zooxanthellae in *Acropora millepora* at the Palm Island Group, Great barrier reef, Australia. Symbiosis 38: 209-226.

Podesta, G.P., and Glynn, P.W. 1997. Sea surface temperature variability in Panama and Galapagos : Extreme temperature causing coral bleaching. J.Geophysic.Res.C. *Oceans,* 102: 15749-15759.

Rodolfo-Metalpa, R., Richard, C., Allemand, D., Bianchi, C. N., Morri, C., and Ferrier-Pages, C. 2006. Response of zooxanthellae in symbiosis with the Mediterranean corals *Cladocora caespitosa* and *Oculina patagonica* to elevated temperatures. *Mar. Biol.*, 150: 45-55.

Sakami, T. 2000. Effects of temperature, irradiance, salinity and inorganic nitrogen concentration on coral zooxanthellae in culture. *Fisheries Science*, 66: 1006-1013.

Saunders, BK., and Muller-Parker, G., 1997. The effects of temperature and light on two algal populations in the temperate sea anemone *Anthopleura elegantissima*. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 211: 213-224.

Strychar, KB., and Sammarco PW., 2009. Exaptation in corals to high seawater temperatures: Low concentrations of apoptotic and necrotic cells in host coral tissue under bleaching conditions. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 369: 31-42

Stimson, J. 1997. The annual cycle of density of zooxanthellae in the tissues of field and laboratory held *Pocillopora damicornis*. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 214: 35-48.

Trench, R.K. 1979. The cell biology of plant-Animal symbiosis. *Plant Physiol*., 30: 485-531.

Venn, A.A., Loram, J.E., and Douglas, A.E. 2008. Photosynthetic symbioses in animals. Journal of Experimental Botany 59: 1069-1080.

Warner, M., Fitt, W., and Schmidt, G. 1996. The effects of elevated temperature on the photosynthetic efficiency of zooxanthellae in hospite from four different species of reef coral : a novel approach. *Plant, Cell & Environment*, 19: 291-299.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก. สูตรอาหารสำเร็จรูป Daigo

สารอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงแพลงค์ตอน เตรียมจากสูตรสำเร็จรูป Daigo โดยทำเป็นสารละลายเข้มข้น (Stock solution) ในปริมาตร 100 มิลลิลิตร เมื่อใช้งานจึงนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ในน้ำทะเลกรอง 1000 มิลลิลิตร อาหารสำเร็จรูปมีองค์ประกอบของธาตุอาหารต่างๆ ดังนี้

อัตราส่วน mg /1,000 mL

$NaNO_3$	200
Na_2HPO_4	1.4
K_2HPO_4	5
NH_4Cl	2.68
Fe-EDTA	5.2
Mn-EDTA	0.332
Na_2-EDTA	37.2
$ZnSO_4$ .7H_2O	0.023
$CoSO_4$ .7 H_2O	0.014
Na_2MoO_4 .2 H_2O	0.0073
$CuSO_4$ .7 H_2O	0.0025
H_2SeO_3	0.0017
Thiamin-HCl	0.2
Biotin	0.0015
Vitamin B_{12}	0.0015
$MnCl_2$ .4 H_2O	0.018