# รายงานวิจัย

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

เรื่อง

# การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อน จากปะการังและหอยสองฝา ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ

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

รองศาสตราจารย์ ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์

# รายงานผลการดำเนินงาน
# ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2556

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ
สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี
สนองพระราชดำริโดยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เรื่อง

# การแยกและเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อนจากปะการังและหอยสองฝา

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

ในพื้นที่โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ


คณะผู้ดำเนินงาน

รศ.ดร.ไทยถาวร เลิศวิทยาประสิทธิ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์

**บทคัดย่อ**

ปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาวเกิดขึ้นเมื่อมีการลดต่ำลงของความหนาแน่นเซลล์และ/หรือปริมาณของรงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงของซูแซนแทลลี ซึ่งเป็นผู้อาศัยแบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อของปะการัง โดยมีสาเหตุจากสภาวะแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปจากเดิม เช่น เมื่ออุณหภูมิเพิ่มสูงขึ้นและความเค็มลดต่ำลง เพื่อให้ทราบบทบาทความสำคัญของปัจจัยดังกล่าวจึงได้ทำการศึกษาความทนทานต่ออุณหภูมิและความความเค็มในซูแซนแทลลี ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* โดยทำการแยกเลี้ยงเซลล์ซูแซนแทลลีแบบปลอดเชื้อ ที่ 3 ระดับอุณหภูมิ ได้แก่ 25 (ควบคุม), 27 และ 33 องศาเซลเซียส โดยในแต่ละระดับอุณหภูมิประกอบด้วยชุดการทดลอง 5 ระดับความเค็ม ได้แก่ 10, 15, 25, 28 (ควบคุม) และ 33 พีเอสยู ทำการสุ่มนับเซลล์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน และคำนวณอัตราการเติบโตจำเพาะ พบว่าอัตราการเติบโตจำเพาะของซูแซนแทลลีมีค่าลดลงที่อุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำ โดยที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส อัตราการเติบโตของซูแซนแทลลีลดลงในทุกระดับความเค็ม ในขณะที่อุณหภูมิ 25 และ 27 องศาเซลเซียส ซูแซนแทลลีจะมีอัตราการเติบโตลดลงที่ความเค็มต่ำที่ 10 และ 15 พีเอสยู เท่านั้น จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำส่งผลต่อการเติบโตของซูแซนแทลลี ซึ่งอาจจะเกิดจากปัจจัยใดปัจจัยหนึ่ง หรือทั้งสองปัจจัยร่วมกัน

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

**Abstract**

Coral bleaching occurs when cell density and/or the concentration of photosynthetic pigments of the endosymbionts; zooxanthellae are decreased. It has been proposed that the cause of this may be due to environmental stresses such as elevated temperature and decreased in water salinity. This study analysed characteristics of the endosymbiont; *Pocillopora damicornis* to clarify the potential importance of temperature and salinity on zooxanthellae. The growth responses of axenic culture were observed at 3 levels of temperatures; 25 (control), 27 and 33 $^{\circ}$C. At each temperature level, 5 levels of salinities; 10, 15, 25, 28 (control) and 33 psu were assigned. Sampling cells were enumerated every 2 days for 14 days from which the specific growth rates were determined. The decreasing specific growth rates of zooxanthellae were observed at high temperatures and low salinity levels. At the highest temperature, 33 $^{\circ}$C, at all levels of salinity, a decrease in growth rate of zooxanthellae was found. While at 25 and 27 $^{\circ}$C, a decrease in growth of zooxanthellae was observed only at the lowest salinities; 10 and 15 psu. These results suggest that both temperature and salinity may have a singular and combined affect on the growth rate of zooxanthallae.

**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 | 4 |
| ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ | 4 |
| วิธีดำเนินการศึกษา | 5 |
| ผลการศึกษาและวิจารณ์ผล | 7 |
| สรุป | 12 |
| เอกสารอ้างอิง | 12 |
| ภาคผนวก | 14 |

# สารบัญรูป

รูปที่ 1 การดำรงชีพแบบพึ่งพาของ zooxanthellae ในเนื้อเยื่อปะการัง 2
รูปที่ 2 zooxanthellae ที่อยู่ภายในไข่ของปะการัง(Hirose et al.,2000) 3
รูปที่ 3 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร 4
รูปที่ 4 ปะการัง *Pocillopora damicornis* ใช้ในการแยก zooxanthellae 5
รูปที่ 5 gymnodinoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง 8
รูปที่ 6 coccoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง 8
รูปที่ 7 อัตราการเติบโตของ zooxanthellae ภายใต้ 5 ระดับความเค็ม ได้แก่ 10, 15, 25, 28 และ 33 psu ทีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก.) 27 องศาเซลเซียส (ข.) และ 33 องศาเซลเซียส (ค.) 10
รูปที่ 8 เซลล์ zooxanthellae ซึ่งเพาะเลี้ยงที่ 25องศาเซลเซียส (ก.) และ 33 องศาเซลเซียส (ข.) 11

**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**

zooxanthellae เป็นไดโนแฟลกเจลเลต สกุล *Symbiodinium* มีสีน้ำตาลอมเหลืองอาศัยอยู่แบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด โดย zooxanthellae ที่อาศัยร่วมกับสัตว์ทะเลดังกล่าวจะพบเป็นเซลล์กลม(coccoid cell) มีขนาดตั้งแต่ 6-15 ไมโครเมตรโดยจะพบ zooxanthellae clade C เป็นส่วนมาก ในบางกรณีอาจพบ clade A, B, D, F และ G ด้วย ทั้งนี้ clade C จะพบกระจายเป็นวงกว้างในเขตร้อน clade D สามารถปรับตัวต่อการเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมได้ดีที่สุด สำหรับ clade B จะพบเฉพาะในเขตอบอุ่น ซึ่งมีแสงต่ำ และอุณหภูมิน้ำทะเลต่ำ (Stambler, 2011)

ความสัมพันธ์ระหว่างปะการังกับ zooxanthellae เป็นแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกันได้ประโยชน์ด้วยกันทั้งคู่ โดย zooxanthellae จะนำคาร์บอนไดออกไซด์และธาตุอาหารที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของปะการังมาใช้ในการสังเคราะห์แสงได้ผลผลิตเป็นออกซิเจนและสารอาหารกลับคืนให้ปะการัง (Trench, 1979) คิดเป็น90 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานและสารอาหารทั้งหมดที่ปะการังได้รับ (Muscatine and Porter, 1977)

เมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลจะสูงขึ้นกว่าปกติเพียง 1-2 องศาเซลเซียส ความเค็มลดต่ำลง เป็นต้น zooxanthellae จะไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ก็จะออกจากปะการัง ทำให้ปะการังมีสีขาว เรียกปรากฏการณ์นี้ว่า ปะการังฟอกขาว(coral bleaching) ปะการังที่ปราศจาก zooxanthellae จะอ่อนแอเพราะไม่ได้รับสารอาหารที่เพียงพอ และอาจตายหากมีการเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นเวลานาน (Podesta and Glynn, 1997) แม้ว่าการสูญเสีย zooxanthellae อาจจะเกิดได้จากหลายสาเหตุ เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มสูงขึ้น, ความเข้มแสงเพิ่มมากขึ้น, ความเค็มเปลี่ยนจากเดิม หรือ ติดเชื้อแบคทีเรีย (Fagoonee *et al.*, 1999) แต่การเพิ่มขึ้นของอุณหภูมิน้ำทะเลเป็นปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบต่อ zooxanthellae เช่น เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มขึ้นจากปกติ 27 องศาเซลเซียส เป็น 32 องศาเซลเซียส zooxanthellae จะมีสีจางลงและมีจำนวนต่อพื้นที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ และหากเพิ่มอุณหภูมิเป็น 34 องศาเซลเซียส ปะการังจะตายภายใน 8 ชั่วโมง (Hoegh-Guldberg and Smith, 1989) การที่ปะการังมีสีซีดจางลงเนื่องจาก zooxanthellae ถูกขับออกมาภายนอกปะการังหรือตัวสาหร่ายเองสูญเสียรงควัตถุไปในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยรุนแรงปะการังจะมีสีขาวอย่างสมบูรณ์(completely bleaching)

อย่างไรก็ตามพบว่าปะการังมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นแตกต่าง แม้ในโคโลนีเดียวกันก็อาจพบบางส่วนไม่ฟอกขาว แสดงให้เห็นว่าอาจมี zooxanthellae หลายสายพันธุ์ทั้งที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงได้และที่ทนไม่ได้อาศัยอยู่ร่วมกันในปะการังหรืออาจมีบางส่วนที่สามารถปรับตัวให้ทนต่อ การเปลี่ยนแปลง

นอกจากอุณหภูมิแล้ว ความเค็มก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อ zooxanthellae เช่นเดียวกัน โดยความเค็มที่ต่ำลง จะทำให้ความทนทานของ zooxanthellae ลดลง (Sakami, 2000) เนื่องจากอัตราการ

สังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่อความเค็มเปลี่ยนแปลงจากเดิมทั้งเพิ่มขึ้นและลดลงแม้ในช่วงแคบ แต่ความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงได้ง่ายกว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้น (Pages et al., 1999) ผลจากการศึกษาความเค็มที่ต่ำลงต่ออัตราการออกของ zooxanthellae จากดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* พบว่า zooxanthellae จะออกจากดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* เพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีความเค็มต่ำเป็นระยะเวลานานมากขึ้น (Engebretson and Martin, 1994) สำหรับการเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกได้จากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงในความเค็มต่ำ (15-20 psu) เมื่ออุณหภูมิเป็นปกติ (28-32 องศาเซลเซียส) แต่ถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นเป็น 36 องศาเซลเซียส อัตราการเติบโตของ zooxanthellae จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า อาจมีหลายปัจจัยที่มีผลต่อการเติบโตของ zooxanthellae

ในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งสมมติฐานว่าการที่ปะการังมีการฟอกขาวเพียงบางส่วนของก้อนปะการังอาจเป็นเพราะมี zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนและไม่ทนการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มอาศัยอยู่ในปะการัง ดอกไม้ทะเล และหอยสองฝาบางชนิด ดังนั้นการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae สายพันธุ์ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มได้ อาจจะสามารถนำมาใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวที่เกิดขึ้น

**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 ทากเปลือย หอยมือเสือ ปะการัง เป็นต้น (Venn et al., 2008) โดยจะมีลักษณะกลม ไม่เคลื่อนที่(coccoid form)เมื่ออาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดต่างๆ และมีลักษณะเช่นเดียวกับ dinoflagellate โดยทั่วไปคือ เป็น gymnodiniod form มีการสร้าง flagella เพื่อใช้ในการเคลื่อนที่เมื่ออยู่ในมวลน้ำ

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

Zooxanthellae ที่อาศัยแบบพึ่งพาในเนื้อเยื่อของปะการังมีบทบาทสำคัญในการดึงแคลเซียมคาร์บอเนตในมวลน้ำเพื่อให้ปะการังใช้ในการสร้างโครงร่างแข็ง ดังสมการที่แสดงต่อไปนี้

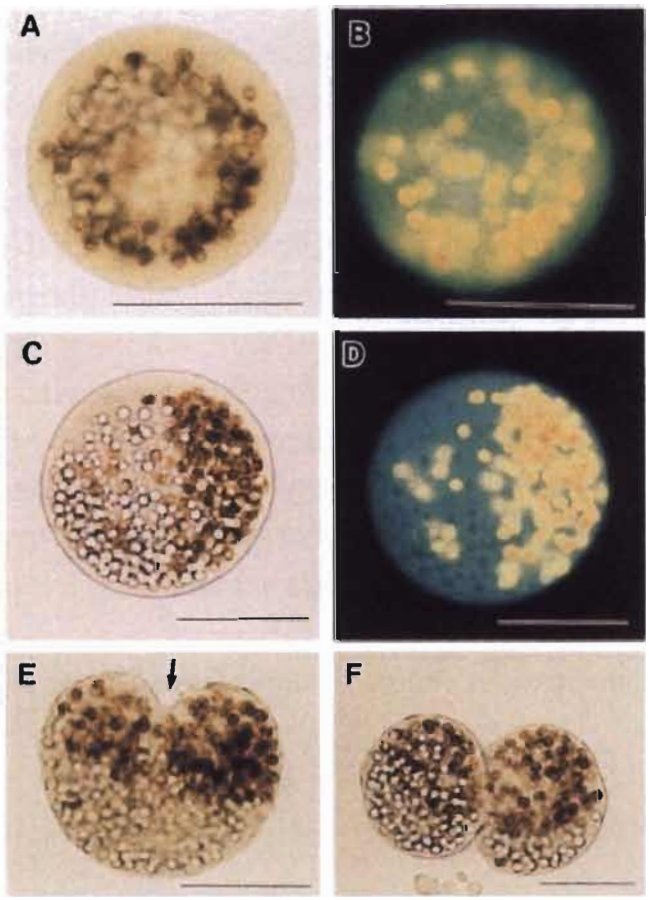
$$Ca^{2+} + 2HCO^{-} \longrightarrow Ca(HCO_3)_2 \qquad \text{(สมการที่ 1-1)}$$

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

$$Ca(HCO_3)_2 \longrightarrow CaCO_3 + H_2CO_3 \qquad \text{(สมการที่ 1-2)}$$

จากนั้น carbon acid originate จะสลายตัวเป็นคาร์บอนไดออกไซด์และน้ำในที่สุดดังสมการ1-3

$$H_2CO_3 \longrightarrow CO_2 + H_2O \qquad \text{(สมการที่ 1-3)}$$




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)

นอกจากการดึงแคลเซียมเพื่อสร้างโครงร่างแข็งแล้ว zooxanthellae ยังเป็นแหล่งสร้างอาหารที่สำคัญให้กับกลุ่มดอกไม้ ทะเลและปะการังสูงถึง95 เปอร์เซ็นต์ของแหล่งอาหารทั้งหมดโดยผ่านกระบวนการสังเคราะห์แสง (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

**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 ที่อาศัยแบบพึ่งพาภายในตัวปะการัง (endosymbiosis) ไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวจึงออกจากเนื้อเยื่อปะการังทำให้ปะการังมีสีขาวกลายเป็นสีขาวส่งผลให้ปะการังขาดแคลนอาหารและตายลงในที่สุด ซึ่งปรากฏการณ์นี้ไม่ได้พบเฉพาะแต่ในปะการังเท่านั้น ยังพบในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ ที่มี zooxanthellae อาศัยอยู่ในเนื้อเยื่อ ไม่ว่าจะเป็นฟองน้ำ ทากเปลือย หรือในดอกไม้ทะเลเองก็พบการฟอกขาวด้วยเช่นกัน การศึกษาของ Rowan ในปี 1997 พบว่า การฟอกขาวที่เกิดขึ้นในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังนั้นมีความแตกต่างกันระหว่างชนิดของ zooxanthellae ที่สามารถแบ่งได้เป็นหลาย clade ด้วยกัน ส่งผลให้ความสามารถในการทนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมนั้นมีความแตกต่างกันในแต่ละเจ้าบ้าน (Host) ทำให้อัตราการฟอกขาวในปะการังสูงกว่าในสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังอื่นๆ (Louis et al., 2002)

**วัตถุประสงค์ของโครงการ**

เพื่อคัดเลือก zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม

**ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ**

ได้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อน เพื่อใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวและการฟื้นฟูปะการัง

**ขอบเขตการวิจัย**

ทำการศึกษาและเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ zooxanthellae ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มที่แยกได้จากปะการังและหอยสองฝาบางชนิดหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น สำหรับปีงบประมาณ 2556 ทำการศึกษาเฉพาะผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเติบโตของซูแซนเทลลีที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ Pocillopora damicornis

**วิธีดำเนินการวิจัย**

**พื้นที่ศึกษา**

ทำการศึกษาในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รูปที่ 3 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร

1. **การเก็บตัวอย่าง**

**ปีงบประมาณ 2556**

ทำการเก็บตัวอย่างปะการังและหอยสองฝาหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นอย่างทั้งสิ้น 5 ครั้ง ในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี นำตัวอย่างสัตว์ทะเลดังกล่าวไปยังห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

2. **การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae**

ทำการแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากปะการัง *Pocillopora damicornis* และดอกไม้ทะเลที่เก็บได้ โดยวิธี capillary technique ที่ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

รูปที่ 4 ปะการัง *Pocillopora damicornis* ใช้ในการแยก zooxanthellae

I26794664

**2.1 การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ต่างๆ**

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

**2.2 การทำน้ำทะเลกรองสำหรับเลี้ยง zooxanthellae**

น้ำทะเลที่นำมากรองเพื่อใช้ในการเลี้ยง zooxanthellae เป็นน้ำทะเลธรรมชาติบริเวณใกล้เคียงที่ทำการเก็บตัวอย่างปะการัง นำมากรองผ่านผ้ากรองขนาด 150 ไมโครเมตรเพื่อกรองเอาขยะออก จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรอง Millipore ขนาดรูพรุน 0.45 ไมโครเมตร

**2.3 การแยก zooxanthellae จากปะการังและดอกไม้ทะเล**

สำหรับการแยก zooxanthellae ในระยะแรกนั้น ได้ทำการทดลองแยกโดยการสั่นสะเทือนด้วยเครื่อง sonicator โดย มีขั้นตอนดังนี้

2.3.1 ทำการเก็บตัวอย่างปะการังดอกกะหล่ำ, *Pocillopora damicornis* แบบสุ่มที่ระดับความลึก 3-6 เมตร บริเวณเกาะแสมสาร จังหวัดชลบุรี นำตัวอย่างกลับห้องปฏิบัติการทันที หักปะการังเป็นชิ้นขนาดประมาณ 5 เซนติเมตร ใส่ในบีกเกอร์ที่มีน้ำทะเลกรองแล้วนำบีกเกอร์ไปใส่ในเครื่อง sonicator ทำการ sonicate เป็นเวลา 5 – 10 นาที zooxanthellae จะหลุดออกจากเนื้อเยื่อปะการังมาอยู่ในมวลน้ำ จะสังเกตุเห็นน้ำทำเลกรองมีสีน้ำตาลซึ่งเป็นสีของ zooxanthellae

2.3.2 นำน้ำที่ได้จาก 2.3.1 กรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 200 ไมโครเมตร เพื่อกรองเอาเมือกที่มาจากปะการังออก และกรองอีกครั้งด้วยผ้ากรองขนาด 20 ไมโครเมตรเพื่อเอาแพลงก์ตอนอื่นที่ปนเปื้อนออกให้มากที่สุด

2.3.3 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

**2.4 การทดลองผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis***

1 ความเค็มที่ใช้ในการทดลองมี 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 25, 28 และ 33 PSU เนื่องจากความเค็มของน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยตลอดทั้งปีมีค่าอยู่ระหว่าง 23-33 PSU (สมยศ, 2541) และความเค็มต่ำที่มีรายงานทำให้เกิดปะการังฟอกขาวในช่วงการเกิดอุทกภัยปี 2554 มีค่าเท่ากับ 11.08 PSU (ธรรมศักดิ์และคณะ, 2554)

2 สำหรับอุณหภูมิในการทดลองใช้ 3 ระดับ ได้แก่ 25, 27 และ 33 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิของน้ำทะเลบริเวณอ่าวไทยตลอดทั้งปีมีค่าอยู่ระหว่าง 26.5-31.4 องศาเซลเซียส (สมยศ, 2541) และอุณหภูมิที่ทำให้เกิดปะการังฟอกขาวบริเวณ จังหวัดชลบุรี ในปี 2553 มีค่าเท่ากับ 32.7 องศาเซลเซียส

3 การศึกษาผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อ zooxanthellae

นำ zooxanthellae ที่แยกได้ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 ml ที่บรรจุอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนสูตร Daigo' IMK (Nihon Pharmaceutical Co., Ltd) 100 ml. ซึ่งมีความเค็มแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 25, 28 และ 33 PSU โดยในแต่ละระดับความเค็มมีจำนวนทั้งสิ้น 12 ขวด ด้วยความหนาแน่นเริ่มต้นเท่ากับ 1,000 cell/ml. แล้วจึงนำขวดเลี้ยงในแต่ละระดับความเค็มไปบ่มที่อุณหภูมิแตกต่างกัน 4 ระดับ ได้แก่ 25, 27 และ 33 องศาเซลเซียส อุณหภูมิละ 3 ขวด

ทำการสุ่มนับเซลล์ในแต่ละขวดทุก 2 วันเป็นเวลา 14 วัน แล้วนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาสัมประสิทธิ์การเจริญเติบโต

**2.5 การวิเคราะห์ข้อมูล**

หาอัตราการเจริญเติบโต (Growth rate) คำนวณสัมประสิทธิ์การเติบโตจำเพาะจาก

$$N = N_o e^{K_e t} \qquad \text{(Guillard, 1973)}$$

$N$ แทน ความหนาแน่นของเซลล์ (เซลล์ต่อมิลลิลิตร)

$K_e$ แทน ค่าคงที่การเติบโตจำเพาะ, t แทน เวลา (วัน)

$N = N_o$ ที่ $t = 0$ และเปลี่ยนสมการโดยการเติม log ฐาน 10 จะได้

$$\log N = \log N_o + K_e t \log(e)$$
$$= \log N_o + (0.4343) K_e t$$

ทำการหาเวลาที่จำนวนเซลล์ zooxanthellae เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

$$T = \ln 2 / K_e \quad \text{วัน}$$

**2.6 วิเคราะห์ผล**

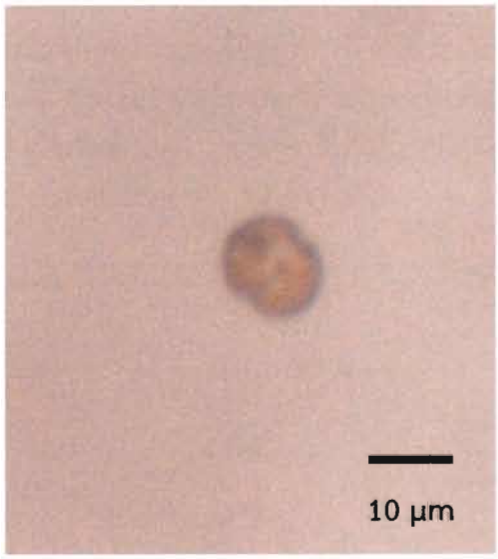
วิเคราะห์ความแตกต่างของอัตราการเติบโตที่ได้ด้วย two-way ANOVA

## ผลการดำเนินการ

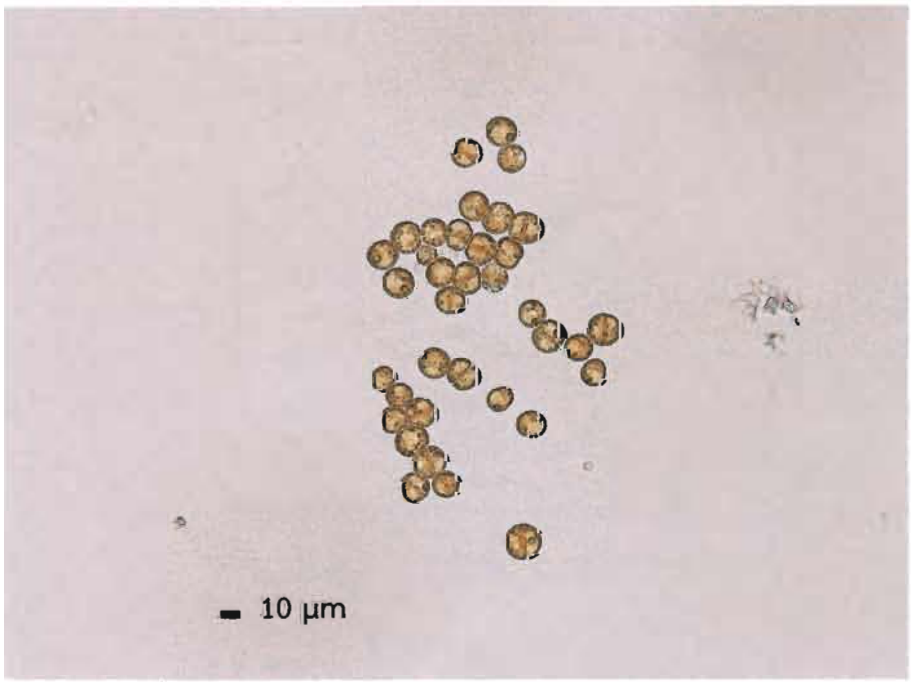
ทำการเก็บตัวอย่างปะการัง ดอกไม้ทะเล และหอยสองฝาไปแล้วทั้งสิ้น 5 ครั้ง

**1. อัตราการเติบโตของ zooxanthellae ที่แยกได้จากปะการัง**

ในปี 2556 ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง และพบว่า zooxanthellae ที่แยกได้เติบโตได้ดีใน Daiko Medium (รูปที่ 5 และ 6)




รูปที่ 5 gymnodinoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง

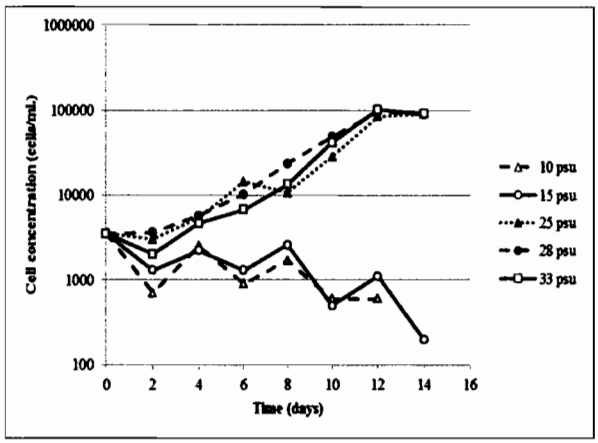



รูปที่ 6 coccoid cell ของ zooxanthellae ที่ได้จากปะการัง

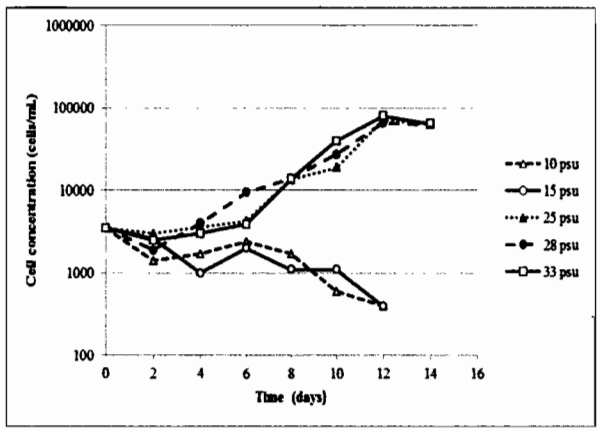
**การเติบโตของ zooxanthellae**

ที่อุณหภูมิ 25 และ 27 องศาเซลเซียส อัตราการเติบโตของ zooxanthellae ที่เลี้ยงในระดับความเค็มต่ำ (10 และ 15 psu) จะค่อยๆลดลงในระหว่างการทดลองและเซลล์ส่วนใหญ่ตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่เซลล์ zooxanthellae ที่เลี้ยงในความเค็มสูง, 25, 28 และ 33 psu มีอัตราการเติบโตเพิ่มขึ้นตามปกติ (รูปที่ 7 ก. และ ข.) อัตราการเติบโตจำเพาะของ zooxanthellae ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพิ่มขึ้นตามระดับความเค็มที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างชัดเจน ในขณะที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ค่าอัตราการเติบโตจำเพาะไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละระดับความเค็ม (ตารางที่ 1) ชี้ให้เห็นว่า ที่อุณหภูมิต่ำ zooxanthellae ยังสามารถเติบโตได้ดีถ้าความเค็มสูงเพียงพอ ในขณะที่ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ในทุกระดับความเค็ม ความหนาแน่นของ zooxanthellae จะลดลงในช่วงแรก และค่อยๆ

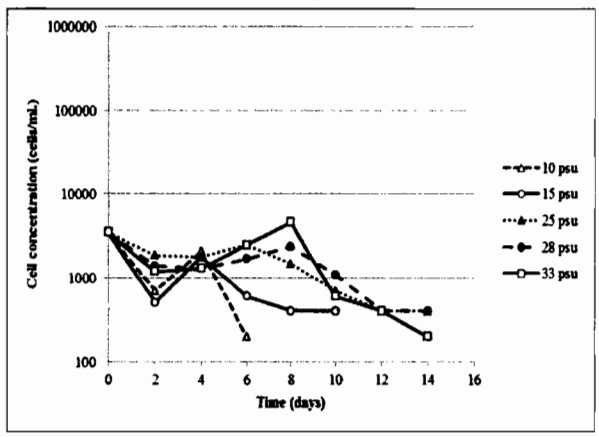
เพิ่มขึ้นในวันที่ 2 หลังจากนั้นก็ลดลงอย่างรวดเร็ว (รูปที่ 7ค.) ในระดับความเค็มต่ำ (10 และ 15 psu) เซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 6 และ 8 ตามลำดับ ในขณะที่ระดับความเค็มสูง (25, 28 และ 33 psu) เซลล์ส่วนใหญ่จะตายในวันที่ 14 ซึ่งเป็นวันสิ้นสุดการทดลอง ชี้ให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูง 33 องศาเซลเซียส เป็นปัจจัยสำคัญต่อการตายของ zooxanthellae มากกว่าความเค็ม




(ก.)




(ข.)




(ค.)

รูปที่ 7 อัตราการเติบโตของ zooxanthellae ภายใต้ 5 ระดับความเค็ม ได้แก่ 10, 15, 25, 28 และ 33 psu ทีอุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส (ก.) 27 องศาเซลเซียส (ข.) และ 33 องศาเซลเซียส (ค.)

**ตารางที่ 1** อัตราการเติบโตจำเพาะของ zooxanthellae ซึ่งบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 และ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้ระดับความเค็ม 25, 28 และ 33 psu

| | 25 °C | 27 °C |
|---|---|---|
| 25 psu | 0.23 | 0.18 |
| 28 psu | 0.31 | 0.17 |
| 33 psu | 0.44 | 0.19 |

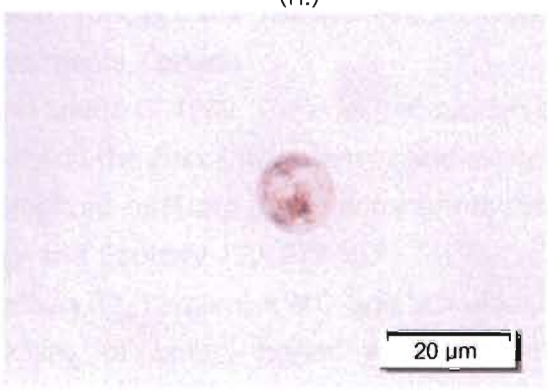
อัตราการเติบโตจำเพาะของ zooxanthellae มีค่าสูงที่อุณหภูมิ 25 และ 27 องศาเซลเซียส ภายใต้ระดับความเค็ม 25, 28 และ 33 psu (ตารางที่ 1) เนื่องจากช่วงอุณหภูมิและความเค็มดังกล่าวใกล้เคียงกับช่วงของอุณหภูมิและความเค็มบริเวณที่เก็บปะการังดอกกะหล่ำ, *Pocillopora damicornis* ซึ่งมีค่าระหว่าง 26-30 องศาเซลเซียส และ 30-33 psu ตามลำดับ

ในการศึกษาครั้งนี้ ที่ระดับความเค็มต่ำ (10 และ 15 psu) เซลล์ส่วนใหญ่ตายเมื่อใกล้สิ้นสุดการทดลอง (รูปที่ 7) เนื่องจากความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae (Ferrier-Pages *et al.*, 1999) อย่างไรก็ตาม พบว่าที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส zooxanthellae ไม่เติบโต แม้ว่าจะอยู่ภายใต้ระดับความเค็มปกติ ทั้งนี้เนื่องจาก ความหนาแน่นเซลล์และประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิสูง (Rodolfo-metalpa *et al.*, 2006; Warner *et al.*, 1996) สอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆที่ศึกษาความผันผวนในรอบปีของความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ในเนื้อเยื่อปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* บริเวณอ่าว Kaneohe ประเทศสหรัฐอเมริกา (Stimson, 1997), zooxanthellae ในปะการังเขากวาง *Acropora millepora* ที่ Great Barrier reef ประเทศออสเตรเลีย (Pilley *et al.*, 2005) และ zooxanthellae จากปะการัง *Coeloseris mayeri, Goniastrea retiformis, Porites lutea* และ *G. asperaa* บริเวณจังหวัดภูเก็ต (Brown *et al.*, 1999) ซึ่งพบว่าในฤดูร้อน zooxanthellae จะมีความหนาแน่นน้อยกว่าในฤดูหนาวหรือฤดูฝน ทั้งนี้เนื่องจากฤดูร้อนมีอุณหภูมิน้ำทะเลที่สูงกว่า สอดคล้องกับการศึกษาของ Berkelmans and Oppen (2006) ซึ่งศึกษาบทบาทของ zooxanthellae ในการทนทานต่ออุณหภูมิ พบว่าในปะการัง *Acropora millepora* บริเวณชายฝั่งออสเตรเลีย จะฟอกขาวและตายกว่า 40 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส แม้ว่าจะมี zooxanthellae clade D ซึ่งถือว่าเป็น clade ที่ทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาวะแวดล้อมมากที่สุดก็ตาม ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นจะไปส่งผลต่อการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae โดยที่อุณหภูมิ 32 และ 34 องศาเซลเซียสจะส่งผลอย่างชัดเจนต่อการสังเคราะห์แสง (วัดโดย Pulse-amplitude modulation fluorometry ในช่วง 30-36 องศาเซลเซียส) ของ zooxanthellae ในปะการัง *Agaricia agaricites* และ *Aguricia lamarki* (Warner *et al.*, 1996) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Hoegh-Guldberg and Smith (1989) ที่พบว่าจำนวน zooxanthellae ต่อพื้นที่ในปะการัง *Stylophora pistillata* และ*Seriatopora hystrix* ที่เก็บจากบริเวณขอบของ Lizard Island lagoon เริ่มลดลงที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส และลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

**2. ลักษณะของเซลล์**

เซลล์ของ zooxanthellae ซึ่งเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ, 25 และ 27 องศาเซลเซียส จะมีลักษณะกลม, เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมครอน มีสีน้ำตาลเหลืองและพบรงควัตถุสีเขียวภายในเซลล์จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (รูปที่ 7 ก.) ในขณะที่ zooxanthellae ซึ่งเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ในทุกระดับความเค็ม และที่อุณหภูมิ 25 และ 27 องศาเซลเซียส ที่ระดับความเค็มต่ำ (10 และ 15 psu) พบเซลล์มีรูปร่างและขนาดใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ แต่มีสีจางลงและสูญเสีย cytoplasmic organelles อย่างชัดเจน (ภาพที่ 2ข.) เนื่องจากอุณหภูมิสูงจะส่งผลต่อ chlorophyll ภายในเซลล์ ทำให้เซลล์มีสีจางลง และส่งผลให้ประสิทธิภาพการสังเคราะห์แสงลดลง (Warner *et al.*, 1996) สอดคล้องกับการศึกษาของ Hoegh-Guldberg and Smith (1989) ที่พบว่า เมื่ออุณหภูมิน้ำทะเลเพิ่มขึ้น จากปกติ 27 องศาเซลเซียส เป็น 32 องศาเซลเซียส zooxanthellae จากปะการัง *Stylophora pistillata* และ *Seriatopora hystrix* ที่เก็บจากบริเวณขอบของ Lizard Island lagoon จะมีสีจางลง เช่นเดียวกันกับการศึกษาของ Rodolfo-metalpa *et al.*, (2006) ที่พบว่าปริมาณ Chlorophyll ใน zooxanthellae จากปะการัง *Cladocora caespitosa* และ *Oculina patagoniga* ที่เก็บจากอ่าว Fiascherio ประเทศอิตาลี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส

(ก.)




รูปที่ 8 เซลล์ zooxanthellae ซึ่งเพาะเลี้ยงที่ 25องศาเซลเซียส (ก.) และ 33 องศาเซลเซียส (ข.)

**สรุปผลการทดลอง**

เซลล์ของ zooxanthellae ซึ่งอยู่ภายใต้ภาวะอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำจะมีสีจางลง, อัตราการเติบโตจำเพาะลดลงและเซลล์ส่วนใหญ่จะตายภายใน 14 วันของการทดลอง ชี้ให้เห็นว่า อุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำส่งผลต่อการเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae ทั้งนี้อุณหภูมิและความเค็มที่เหมาะสมต่อการเติบโตของ zooxanthellae ได้แก่ 25-27 องศาเซลเซียส และ 25-33 psu ตามลำดับ สำหรับการศึกษาสายพันธุ์ทนร้อนจะเริ่มทำการทดลองในปีงบประมาณ 2557


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 measure ments, 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* toelevated 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.

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 |