รายงานผลการดำเนินงาน
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2557

โครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริ สมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

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

กิตติกรรมประกาศ

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

บทคัดย่อ

อุณหภูมิที่เพิ่มขึ้นและความเค็มที่ลดลงเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดปรากฏการณ์ฟอกขาวในปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลัง เพื่อให้ทราบผลของปัจจัยดังกล่าว จึงได้ทำการศึกษาความทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็มใน zooxanthellae ที่แยกจาก ปะการังดอกกะหล่ำ (*Pocillopora damicornis*), ปะการังดอกเห็ด (*Fungia* sp.) และ ดอกไม้ทะเล (*Epiactis* sp.) โดยทำการแยกเลี้ยงเซลล์ zooxanthellae แบบปลอดเชื้อที่ 33 องศาเซลเซียส โดยประกอบด้วย 5 ระดับความเค็ม ได้แก่ 10, 15, 25, 28 (ควบคุม) และ 33 psu ทำการสุ่มนับเซลล์ทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน พบว่า ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังทั้ง 2 ชนิด ลดลงอย่างรวดเร็วและเซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลอง สำหรับเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล ที่ระดับความเค็มต่ำ (10, 15 และ 25 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วและเซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลอง แต่ที่ระดับความเค็มสูง (28 และ 33 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะค่อยๆลดลง และเซลล์ส่วนใหญ่ตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 14) จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า zooxanthellae ที่ทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็มมากที่สุด คือ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล

คำสำคัญ: อุณหภูมิ, ความเค็ม, zooxanthellae, *Pocillopora damicornis*, *Fungia* sp., *Epiactis* sp.

Abstract

The elevated water temperature and decreased water salinity cause bleaching in coral and other marine invertebrates. To clarify the effect of temperature and salinity on zooxanthellae, this study was conducted in the zooxanthellae isolated from cauliflower coral (*Pocillopora damicornis*), mushroom coral (*Fungia* sp.) and sea anemone (*Epiactis* sp.). The experiments were performed in axenic culture at 33 °C with 5 salinity levels of 10, 15, 25, 28 (control) and 33 psu. Sampling cells were enumerated every 2 days for 14 days. The cell densities of zooxanthellae isolated from both coral species were rapidly decreased and most cells died on day 8. At low salinity levels (10, 15 and 25 psu) cell densities of zooxanthellae isolated from sea anemone were rapidly decreased and most cells died on day 8. At high salinity levels (28 and 33 psu) cell densities were gradually decreased and most cells died at the end of experiments (day 14). These results reveal that the most temperature and salinity tolerance clone is zooxanthellae isolated from sea anemone.

Keywords: temperature, salinity, zooxanthellae, *Pocillopora damicornis*, *Fungia* sp., *Epiactis* sp.

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 10

อภิปรายผลการศึกษา 13

สรุป 14

เอกสารอ้างอิง 14

ภาคผนวก 17

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 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกเห็ด *Fungia* sp. ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 10

รูปที่ 9 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 11

รูปที่ 10 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส 11

รูปที่ 11 (ก.) เซลล์ zooxanthellae ที่อุณหภูมิปกติ 27 องศาเซลเซียส (ข.) เซลล์ที่แยกจากปะการังดอกเห็ด *Fungia* sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (ค.) เซลล์ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ Pocillopora damicornis ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (ง.) เซลล์ ที่แยกจากดอกไม้ทะเล Epiactis sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (จ.) เซลล์ที่แยกจากดอกไม้ทะเล Epiactis sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (33 psu) 12

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* มีสีน้ำตาลอมเหลืองอาศัยในเนื้อเยื่อปะการังและสัตว์ทะเลไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด 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 เป็นแบบพึ่งพาซึ่งกันและกัน ได้ประโยชน์ด้วยกันทั้งคู่ โดย zooxanthellae จะนำคาร์บอนไดออกไซด์และธาตุอาหารที่เกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของปะการังมาใช้ในการสังเคราะห์แสง ได้ผลผลิตเป็นออกซิเจนและสารอาหารกลับคืนให้ปะการัง (Trench, 1979) คิดเป็น90 เปอร์เซ็นต์ของพลังงานและสารอาหารทั้งหมดที่ปะการังได้รับ (Muscatine and Porter, 1977)

เมื่อปัจจัยสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไป เช่น อุณหภูมิน้ำทะเลจะสูงขึ้นกว่าปกติเพียง 1-2 องศาเซลเซียส ความเค็มลดต่ำลง เป็นต้น zooxanthellae จะไม่สามารถทนต่อการเปลี่ยนแปลงนี้ได้ ทำให้ปะการังสูญเสีย zooxanthellae เป็นสาเหตุทำให้ปะการังมีสีขาว 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 ถูกขับออกมาภายนอกปะการังหรือตัวสาหร่ายเองสูญเสียรงควัตถุไปในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงของปัจจัยรุนแรง ปะการังจะมีสีขาวอย่างสมบูรณ์(completely bleaching)

อย่างไรก็ตามพบว่าปะการังมีการตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิที่สูงขึ้นแตกต่าง แม้ในโคโลนีเดียวกันก็อาจพบบางส่วนไม่ฟอกขาว แสดงให้เห็นว่าอาจมี zooxanthellae หลายสายพันธุ์ทั้งที่

ทนต่อการเปลี่ยนแปลงได้และที่ทนไม่ได้อาศัยอยู่ร่วมกันในปะการังหรืออาจมีบางส่วนที่สามารถปรับตัวให้ทนต่อ การเปลี่ยนแปลง

นอกจากนี้ความเค็มก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลต่อ zooxanthellae เช่นเดียวกัน โดยความเค็มต่ำจะทำให้ความทนทานของ zooxanthellae ลดลง (Sakami, 2000) เนื่องจากอัตราการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่อความเค็มเปลี่ยนแปลงจากเดิมโดยความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงได้ง่ายกว่าความเค็มที่เพิ่มขึ้น (Pages et al., 1999) ผลจากการศึกษาความเค็มที่ต่ำลงต่ออัตราการสูญเสีย zooxanthellae ของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* พบว่า zooxanthellae จะออกจากดอกไม้ทะเล *A. elegantissima* เพิ่มขึ้นเมื่อสัมผัสกับน้ำทะเลที่มีความเค็มต่ำเป็นระยะเวลานาน (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

จากการสำรวจการเกิดปะการังฟอกขาวในพื้นที่ศึกษาพบว่าปะการังมีการฟอกขาวเพียงบางส่วนของก้อนปะการังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้จึงตั้งสมมติฐานว่าอาจเป็นเพราะมี zooxanthellae ทั้งสายพันธุ์ที่ทนและไม่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มอาศัยอยู่ร่วมกันในปะการัง ดังนั้นในการศึกษาวิจัยจึงทำการคัดเลือกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae จากปะการัง และดอกไม้ทะเล ทำการทดลองคัดเลือกสายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Zooxanthellae เป็นแพลงก์ตอนพืช จัดอยู่ในอนุกรมวิธานลำดับต่อไปนี้

Division Dinoflagellata

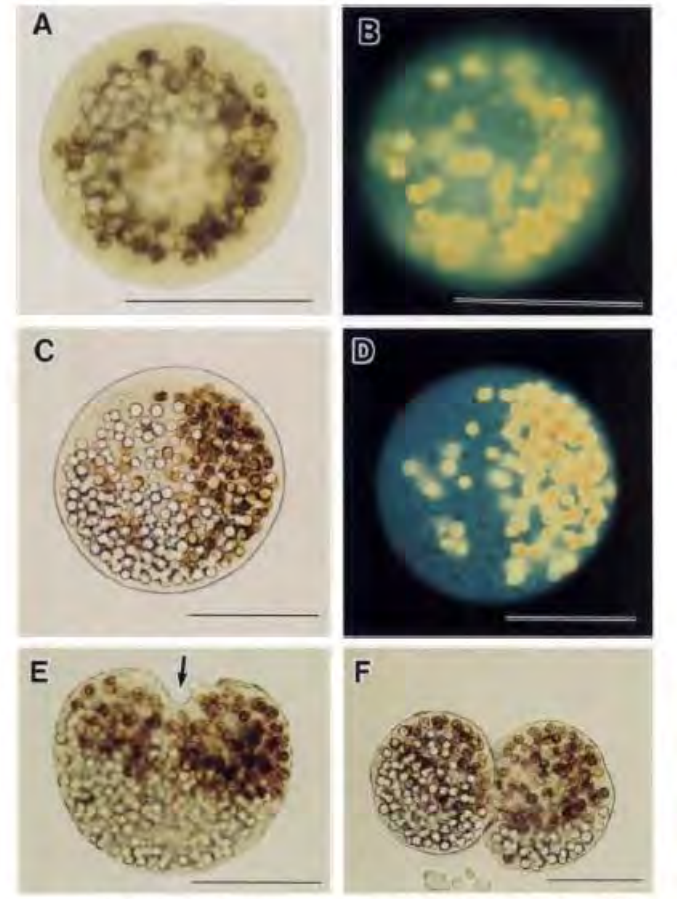
Class Dinophyceae

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

เพื่อคัดเลือก zooxanthellae สายพันธุ์ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็ม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ zooxanthellae สายพันธุ์ทนร้อน เพื่อใช้ในการบรรเทาปัญหาปะการังฟอกขาวและการฟื้นฟูปะการัง

ขอบเขตการวิจัย

ทำการศึกษาและเพื่อคัดเลือกสายพันธุ์ zooxanthellae ที่ทนต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและความเค็มที่แยกได้จากปะการัง หอยสองฝาบางชนิดหรือสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังชนิดอื่น สำหรับปีงบประมาณ 2556 ทำการศึกษาเฉพาะผลของอุณหภูมิและความเค็มต่อการเติบโตของซูแซนเทลลีที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*

วิธีดำเนิการวิจัย

พื้นที่ศึกษา

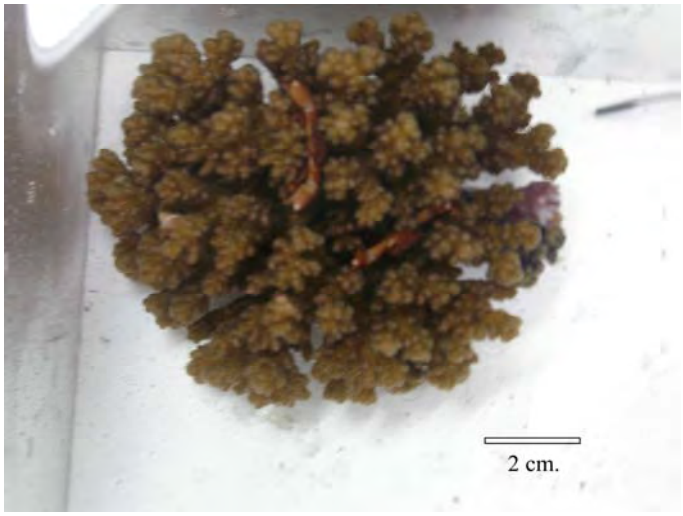
ทำการศึกษาในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี

รูปที่ 4 สถานีเก็บตัวอย่างบริเวณเกาะปลาหมึกซึ่งอยู่บริเวณทิศใต้ของเกาะแสมสาร

1. การเก็บตัวอย่าง

ปีงบประมาณ 2557

เก็บตัวอย่างปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis*(รูปที่ 5), ปะการังดอกเห็ด *Fungia fungites* (รูปที่ 6) และดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. (รูปที่ 7), แบบสุ่มโดยวิธีการดำน้ำที่ระดับความลึก 3-6 เมตร ในแนวปะการังบริเวณเกาะแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี เป็นประจำเดือนเว้นเดือนตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน 2556 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

2. การแยกและเพาะเลี้ยง zooxanthellae

ทำการแยกและเลี้ยง zooxanthellae จากตัวอย่างที่เก็บได้โดยวิธี capillary technique ที่ห้องปฏิบัติการแพลงก์ตอนพืช ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

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

2.3.1 นำน้ำทะเลกรองใส่ในกระบอกฉีดน้ำสำหรับรีดผ้าปรับหัวฉีดให้น้ำออกเพียงรูเดียว ทำการฉีดลงบนตัวอย่างด้วยความรวดเร็ว โดยมีบีคเกอร์รองรับน้ำที่ฉีดผ่านปะการัง zooxanthellae จะหลุดออกจากปะการังพร้อมเนื้อเยื่อและเมือก จะสังเกตุเห็นน้ำทะเลในบีคเกอร์มีสีน้ำตาลซึ่งเป็นสีของ zooxanthellae

2.3.2 นำน้ำที่ได้จาก 2.3.1 กรองผ่านผ้ากรองขนาดตา 125 20 และ 15 ไมโครเมตร ตามลำดับ เพื่อกรองเอาเมือกที่มาจากปะการังออกและแพลงก์ตอนอื่นที่ปนเปื้อนออกให้มากที่สุด

2.3.3 ทำการเหวี่ยงตะกอนน้ำส่วนที่ผ่านการกรองในข้อ 2.3.2 จะได้ zooxanthellae ตกตะกอนที่ก้นหลอด นำ zooxanthellae ทีได้มาทำการแยกด้วยเทคนิค 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

ปรับตัว zooxanthellae ก่อนเริ่มทำการทดลอง โดยนำหัวเชื้อซึ่งทำการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการทดลอง ประกอบด้วยความเค็มต่างกัน 5 ระดับคือ 10, 15, 25, 28 (ควบคุม) และ 33 psu โดยนำเซลล์ zooxanthellae ใส่ในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่มีอาหารเลี้ยงแพลงก์ตอนพืช Daigo' IMK (Nihon Pharmaceutical CO., Ltd) บรรจุอยู่ 150 มิลลิลิตร โดยให้มีความหนาแน่นเซลล์เริ่มต้นที่ 4,500 เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำชุดการทดลองต่างระดับความเค็ม (3 ซ้ำ) ไปเลี้ยงที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ทำการสุ่มนับเซลล์ในแต่ละขวดทุก 2 วัน เป็นเวลา 14 วัน สังเกตลักษณะของเซลล์ทั้งรูปร่าง ขนาด สี และองค์ประกอบภายในเซลล์ ในทุกกลุ่มทดลอง ตลอดการทดลอง

2.5 การวิเคราะห์การเติบโต

หาอัตราการเติบโต (Growth rate) คำนวณสัมประสิทธิ์การเติบโตจำเพาะจาก

$N = N_o e^{K_e t}$ (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

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

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

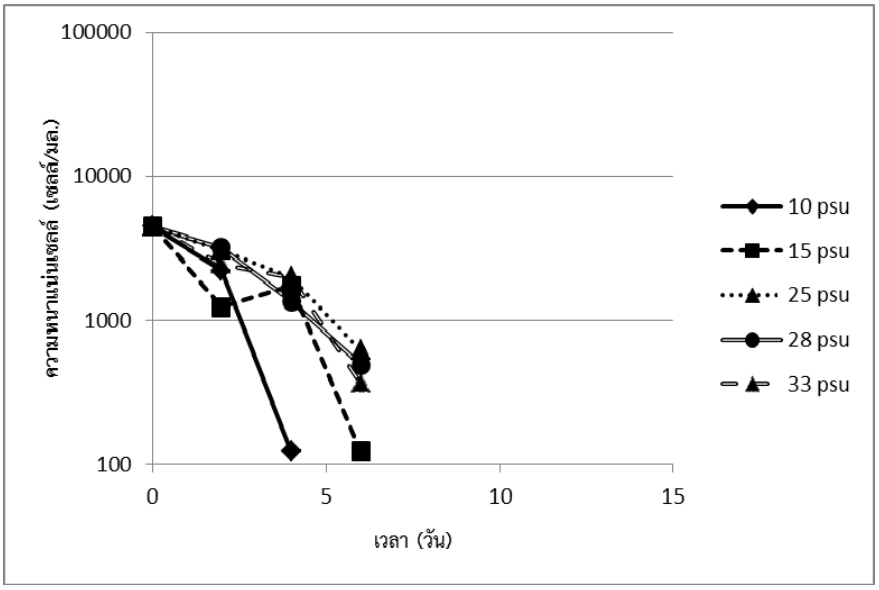
ทำการหาเวลาที่จำนวนเซลล์ zooxanthellae เพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า

$T = \ln 2 / K_e$ วัน

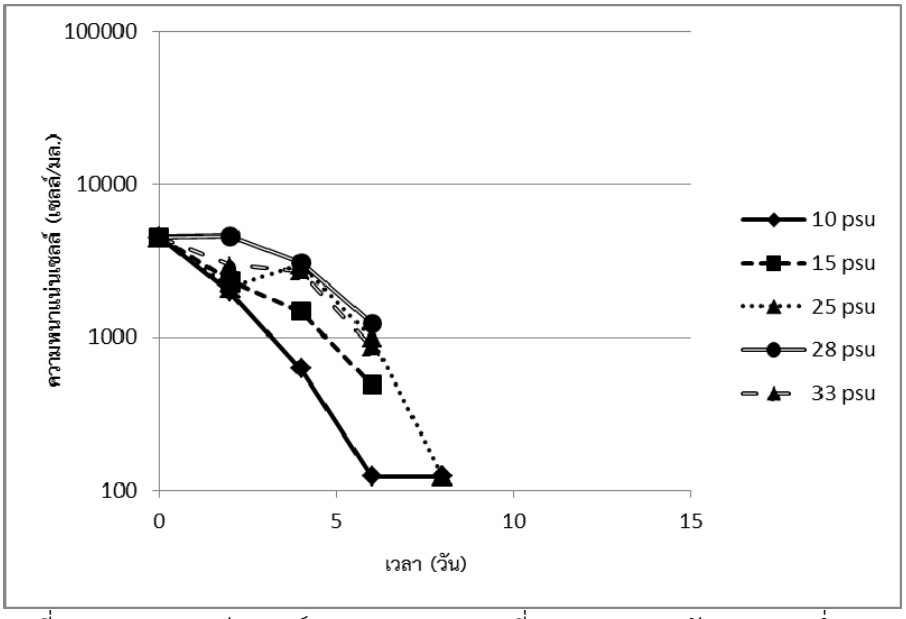
ผลการศึกษา

1.การเติบโตของ zooxanthellae

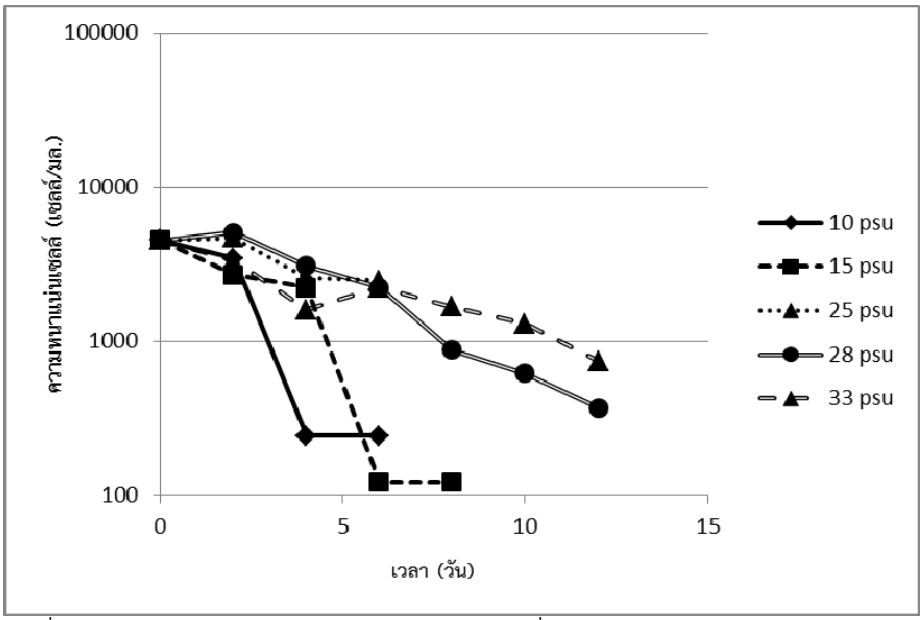
ที่อุณหภูมิสูง (33 องศาเซลเซียส) ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังทั้ง 2 ชนิด ลดลงอย่างรวดเร็วและเซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลอง (รูปที่ 8 และ 9) สำหรับเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล ที่ระดับความเค็มต่ำ (10, 15 และ 25 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วและเซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลอง แต่ที่ระดับความเค็มสูง (28 และ 33 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะค่อยๆลดลง (รูปที่ 3) และเซลล์ส่วนใหญ่ตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 14) ชี้ให้เห็นว่า zooxanthellae ที่ทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็มมากที่สุด คือ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล (*Aiptasia* sp.)



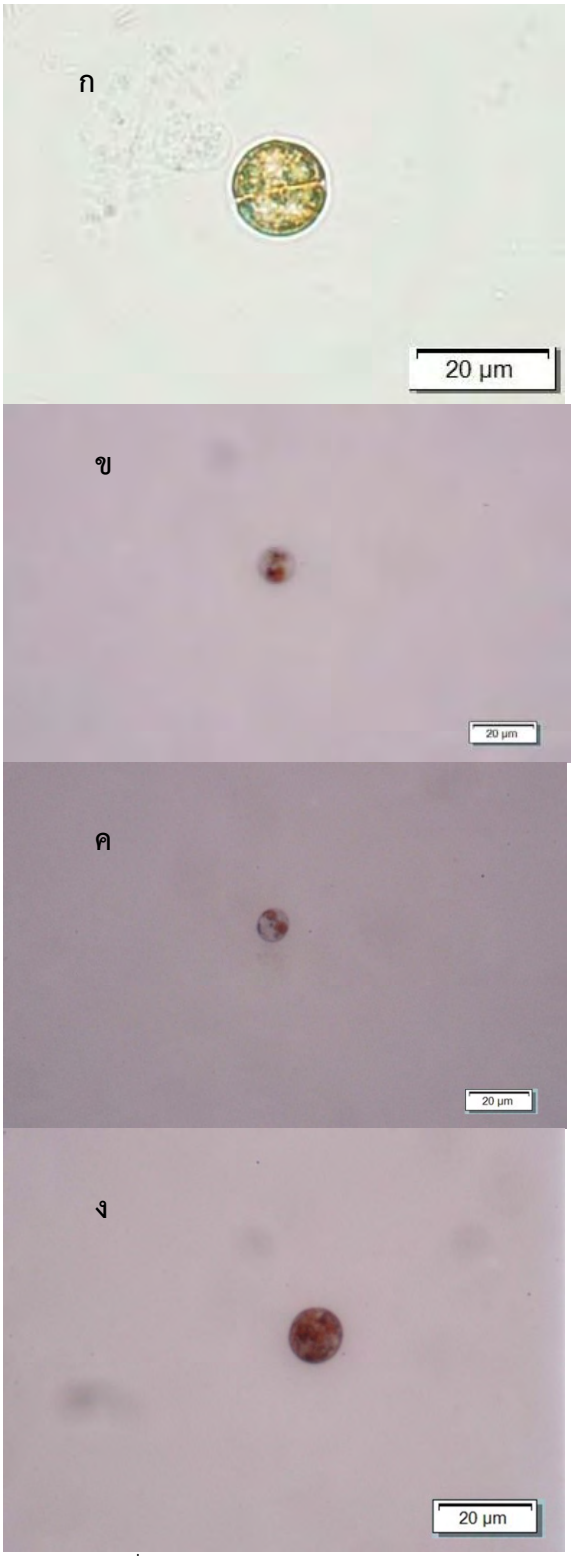
รูปที่ 8 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกเห็ด *Fungia* sp. ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส



รูปที่ 9 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส



รูปที่ 10 ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ในแต่ละระดับความเค็ม (10, 15, 25, 28 และ 33 psu) ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส



รูปที่ 11 (ก.) เซลล์ zooxanthellae ที่อุณหภูมิปกติ 27 องศาเซลเซียส (ข.) เซลล์ที่แยกจากปะการังดอกเห็ด *Fungia* sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (ค.) เซลล์ที่แยกจากปะการังดอกกะหล่ำ *Pocillopora damicornis* ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (ง.) เซลล์ ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (15 psu) (จ.) เซลล์ที่แยกจากดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp. ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส (33 psu)

2.ลักษณะของเซลล์

เซลล์ของ zooxanthellae ซึ่งเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิปกติ (27 องศาเซลเซียส) มีลักษณะกลม เส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 10 ไมโครเมตร มีสีน้ำตาลอมเหลืองและพบรงควัตถุสีเขียวภายในเซลล์จำนวนมาก ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์ปกติที่พบได้ทั่วไปในธรรมชาติ (รูปที่ 11ก.) ในขณะที่เซลล์ ซึ่งเพาะเลี้ยง ที่ 33 องศาเซลเซียส ในทุกระดับความเค็ม มีรูปร่างกลมและมีขนาดใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ แต่มีสีจางลงและสูญเสีย cytoplasmic organelles อย่างชัดเจน (รูปที่ 4.ข-ง.) เมื่อเปรียบเทียบลักษณะเซลล์ zooxanthellae ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส ในแต่ละระดับความเค็มพบว่า แม้ zooxanthellae ที่อยู่ภายใต้อุณหภูมิสูงจะเปลี่ยนไปจากเซลล์ปกติโดยมีสีซีดลงและสูญเสีย cytoplasmic organelles แต่ที่ความเค็มต่ำจะมีสีซีดและสูญเสีย cytoplasmic organelles มากกว่า zooxanthellae ที่อยู่ภายใต้ความเค็มสูง (รูปที่ 4 ง.-จ.)

อภิปรายผลการศึกษา

ที่อุณหภูมิ 33 องศาเซลเซียส zooxanthellae ไม่เติบโต ลักษณะเซลล์เปลี่ยนแปลงไปจากปกติ แม้ว่าจะอยู่ภายใต้ความเค็มปกติ ทั้งนี้เนื่องจากความหนาแน่นเซลล์และประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae จะลดลงเมื่ออยู่ภายใต้อุณหภูมิสูง (Rodolfo-metalpa *et al*., 2006; Warner *et al*., 1996) เมื่ออยู่ที่อุณหภูมิสูง เซลล์จะตายโดยมีขนาดเล็กลงและ cytoplasmic organelles รวมเข้าด้วยกัน (Strychar and Sammarco, 2009) ส่งผลให้การเผลาผลาญออกซิเจนของ zooxanthellae ไม่ปกติ และอัตราการหลุดออกจากผู้ให้อาศัยจะเพิ่มมากขึ้นด้วย (Hoegh-Guldberg and Smith, 1989) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาอื่นๆ เช่น zooxanthellae ที่แยกจากปะการัง *Agaricia lamarki* และ *Agaricia agaricites* ไวต่ออุณหภูมิที่เพิ่มสูงขึ้น (Warner *et al*., 1996) โดยจะส่งผลต่อความหนาแน่นของ zooxanthellae ที่แยกออกมาจาก tentacle ของดอกไม้ทะเล *Anthopleura elegantissima* อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอุณหภูมิที่สูงขึ้นนี้มีผลมากกว่าปัจจัยสิ่งแวดล้อมอื่นที่เปลี่ยนแปลงไป เช่น แสง เป็นต้น (Saunders and Muller-Parker, 1997) การศึกษาของ Hoegh-Guldberg and Smith (1989) พบว่า 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) รงควัตถุที่ใช้ในการสังเคราะห์แสงใน zooxanthellae จากปะการัง *Cladocora caespitosa* และ *Oculina patagoniga* ที่เก็บจากอ่าว Fiascherio ประเทศอิตาลี ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส สำหรับ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเลจะทนทานกว่า zooxanthellae ที่แยกจากปะการัง โดยที่ความเค็มสูง (28 และ 33 psu) สามารถยืดระยะเวลาการตายออกไปได้เมื่อเทียบกับ zooxanthellae ที่แยกจากปะการัง แต่ที่ความเค็มต่ำ (10, 15 และ 25 psu) ไม่สามารถยืดระยะเวลาการตายออกไปได้ ทั้งนี้เนื่องจาก ความเค็มที่เปลี่ยนแปลงไปโดยเฉพาะความเค็มที่ลดลงจะส่งผลต่ออัตราการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae (Ferrier-Pages *et al*., 1999)

สรุปผลการศึกษา

ภายใต้สภาวะอุณหภูมิสูง 33 องศาเซลเซียส เซลล์ zooxanthellae ที่แยกจากปะการังทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ ปะการังดอกกะหล่ำ (*Pocillopora damicornis*) และปะการังดอกเห็ด (*Fungia* sp.) ความหนาแน่นเซลล์ zooxanthellae ลดลงอย่างรวดเร็ว เซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลอง สำหรับ zooxanthellae ที่แยกจากดอกไม้ทะเล ที่ระดับความเค็มต่ำ (10, 15 และ 25 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะลดลงอย่างรวดเร็วและเซลล์ส่วนใหญ่ตายในวันที่ 8 ของการทดลองแต่ที่ระดับความเค็มสูง (28และ33 psu) ความหนาแน่นเซลล์จะค่อยๆลดลงและเซลล์ส่วนใหญ่ตายเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (วันที่ 14) แสดง ให้เห็นว่าอุณหภูมิสูงและความเค็มต่ำส่งผลต่อการเติบโตและประสิทธิภาพในการสังเคราะห์แสงของ zooxanthellae และ zooxanthellae ที่ทนทานต่ออุณหภูมิและความเค็มได้มากที่สุดในการทดลองครั้งนี้ คือ zooxanthellae ที่แยกมาจากดอกไม้ทะเล *Epiactis* sp.

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