

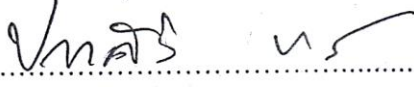
ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรีย กับอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาว
(*Platygyra daedalea*) วัยอ่อนในระบบเลี้ยง

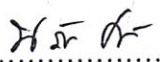
ภัทรจิต รักษาชล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวาริชศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
มกราคม 2561
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา


คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ภัทรจิต รักษาชล ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

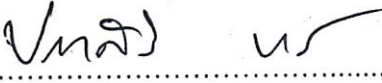
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

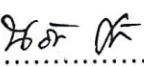

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

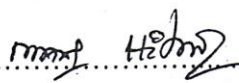

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

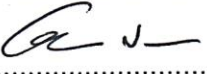

..... ประธาน
(ดร.นลินี ทองแถม)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)


..... กรรมการ
(ดร.นรินทร์รัตน์ คงจันทร์ตรี)


..... กรรมการ
(ดร. กาญจนา หิรมเพ็ง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวาริชศาสตร์ ของมหาวิทยาลัยบูรพา


..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัฐ ศรีสุข)

วันที่ 19 เดือน ๕ ปี ๒๕๖1 พ.ศ. 2561

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยคำแนะนำและความอนุเคราะห์อย่างยิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก และ ดร. นรินทรรัตน์ คงจันทร์ตรี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำแนวทางที่ถูกต้อง ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความละเอียดถี่ถ้วน และเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมาผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง จึงขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ขอขอบพระคุณ ดร. นลินี ทองแถม ประธานสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์ นักวิชาการประมงชำนาญการพิเศษ ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งทะเลอันดามัน ที่กรุณาให้ความรู้ ตรวจสอบแก้ไขและวิจารณ์ผลงานทำให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ Prof. Dr. Frederick William. Henry Beamish อาจารย์พิเศษ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่กรุณาให้ความรู้ ให้คำปรึกษา ให้กำลังใจ และตรวจทานบทความนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณศูนย์วิจัย และพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งตะวันออก ตำบล ปากน้ำกระแจะ อำเภอ แกลง จังหวัด ระยอง ที่ให้ความอนุเคราะห์ตัวอย่างปะการังสมอง ร่องยาว และเงินสนับสนุนในการวิเคราะห์ตัวอย่าง ตลอดจนบุคลากรทุกท่านที่มีส่วนช่วยในการเก็บตัวอย่างปะการังในครั้งนี้

ขอขอบคุณภาควิชาวิทยาศาสตร์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาพร้อมด้วยคุณสุกานดา ทับเมฆา พี่ ๆ และน้อง ๆ จากห้องปฏิบัติการโรค และภูมิคุ้มกันสัตว์น้ำ ที่คอยช่วยเหลือและให้กำลังใจเสมอมา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อจรัส รักษาชล คุณแม่อินสชา รักษาชล ที่ให้การสนับสนุนทุนทรัพย์ในด้านการศึกษา ตลอดจนกำลังใจเสมอมา ซึ่งคุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูตเวทิตาแด่บุพการี บุรพจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านทั้งในอดีตและปัจจุบัน ที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

ภัทรจิต รักษาชล

56910026: สาขาวิชา: วาริชศาสตร์; วท.ม. (วาริชศาสตร์)

คำสำคัญ: แบคทีเรีย/ แบคทีเรียวิบริโอ/ ปะการังสมองร่องยาว/ โรคปะการัง/

อาการแถบขาวในปะการัง

ภัทรจิต รักษาชล: ชนิดและปริมาณของเชื้อแบคทีเรียกับอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วิทยานิพนธ์ในระบบเลี้ยง (BACTERIA SPECIES AND DENSITY FROM CULTURED BRAIN CORAL (*Platygyra daedalea*) WITH WHITE BAND SYNDROME) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ปภาศิริ บาร์เนท, Ph.D., นรินทรรัตน์ คงจันทร์ตรี, Ph.D. 80 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

การอนุบาลและเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วิทยานิพนธ์ในโรงเรียนพบว่าบริเวณเนื้อเยื่อมีอาการแถบขาว White Band Syndrome (WBS) จึงจำแนกอาการแถบขาวตามลักษณะการของหลุดลอกของเนื้อเยื่อปะการัง ได้เป็น 4 กลุ่ม คือโคโลนีที่ไม่แสดงอาการแถบขาว (0), แสดงอาการแถบขาวเล็กน้อย 10 - 20% (+1), ปานกลาง >20 - 60% (+2) และรุนแรง > 60% (+3) โดยตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวม ทั้งจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังและเนื้อเยื่อปะการังทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ พบว่าปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวมทั้งจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่มีอาการแถบขาว และเนื้อเยื่อปะการังจะมีปริมาณแบคทีเรียมากขึ้นตามระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำพบปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่ (0) มีค่าเฉลี่ย \pm SE ที่ 5.49 ± 1.1 CFU/ml โดยปริมาณเพิ่มขึ้น 3 เท่า ส่งผลให้เกิดอาการแถบขาวเล็กน้อยที่เนื้อเยื่อปะการัง (+1) และความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในเนื้อเยื่อปะการังเพิ่มขึ้นตามระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว เมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยเชื้อวิบริโอชนิดเด่นคือ *V. parahaemolyticus* รองลงมาเป็นชนิด *V. alginolyticus* และหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำเป็นเวลา 1 เดือน จึงสุ่มตัวอย่างพบว่าปริมาณแบคทีเรียลดลง 2 เท่า แต่อาการแถบขาวในปะการังยังไม่ฟื้นตัว เนื่องจากยังคงมีแบคทีเรียสะสมในเนื้อเยื่อปะการัง ดังนั้นปัจจัยสำคัญในการเลี้ยงปะการังคือการจัดการระบบสิ่งแวดล้อมภายในถังเลี้ยงโดยทำความสะอาดถังเลี้ยงและเปลี่ยนถ่ายน้ำในทุก ๆ วันเพื่อลดการสะสมของเชื้อแบคทีเรียที่อาจเป็นสาเหตุของอาการแถบขาวในปะการัง ซึ่งควรมีการทดลองเพื่อยืนยันสาเหตุของโรคจากเชื้อแบคทีเรียต่อไป

56910026: MAJOR: AQUATIC SCIENCE; M.Sc. (AQUATIC SCIENCE)

KEYWORDS: BACTERIA/ CORAL DISEASE/ *Platygyra daedalea*/ *Vibrio* spp./

WHITE BAND SYNDROME

PATTARAJIT RAKSACHON: BACTERIA SPECIES AND DENSITY FROM CULTURED *Platygyra daedalea* WITH WHITE BAND SYNDROME. ADVISORY COMMITTEE: PRAPARSIRI BARNETTE, Ph.D., NARINRATANA KONGJANDTRE, Ph.D. 80 P. 2018.

Cultured immature coral (*Platygyra daedalea*) affected by White Band Syndrome (WBS) were classified based on area of coral surface infected by bacteria into four categories; (0), WBS absent; (+1), WBS present over 10 - 20% of coral surface; (+2), >20 - 60% and > 60%, (+3). Coral tissue and culture tank water was examined for bacterial infection by directed enumeration of total bacterial and total *Vibrio* spp. before and after cleanliness culture tanks. Thus, virulence of total bacteria and of total *Vibrio* spp. was positively and significantly ($p < 0.05$) correlated with WBS. For culture tank water before cleanliness of bacteria density *Vibrio* spp. was 5.49 ± 1.10 (mean \pm SE) for category (0), more there 3 time to category (+1), coral tissue appear WBS. Thus, virulence of total bacteria and of total *Vibrio* spp. was positively and significantly correlated with WBS. Dominant bacteria were *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. After changing the water for one month, samples were found to contain less bacteria (by 2 times). However, symptoms of white coral band did not recovered due to bacterial accumulation in the tissues of the coral. Results implied that bacteria accumulation in culture tank water may impose a stress to healthy coral and so, further study should be conducted to confirm bacterial etiology. Generally, basic principles of cleanliness should be applied routinely to all aspects of coral culture.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ณ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
สมมติฐานของการวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	3
ขอบเขตของการวิจัย.....	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ชีววิทยาของปะการัง.....	5
ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแนวปะการัง.....	7
การเกิดโรคในปะการัง.....	11
อาการ และโรคของปะการังที่เกิดจากแบคทีเรีย.....	11
โรคปะการังที่เกิดในประเทศไทย.....	20
การเพาะเลี้ยงปะการัง.....	21
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	26
3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	28
วัสดุอุปกรณ์.....	28
วิธีการทดลอง.....	29
พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง.....	30

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
ตอนที่ 1 (เก็บตัวอย่างเมื่อได้รับแจ้งให้ตรวจสอบการติดเชื้อของอาการแถบขาว)...	32
การสังเกตลักษณะและประเมินอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อน.....	32
การเก็บตัวอย่าง.....	33
การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงปะการัง.....	33
การจำแนกชนิดแบคทีเรีย.....	34
ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยงและเปลี่ยนถ่ายน้ำ).....	36
การเปลี่ยนถ่ายน้ำ.....	36
การสังเกตลักษณะและประเมินอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อน.....	37
การเก็บตัวอย่าง.....	37
การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงปะการัง.....	37
ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย จากบ่อพักน้ำ).....	37
การเก็บตัวอย่าง.....	37
การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในบ่อพักน้ำ.....	37
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	38
4 ผลการวิจัย.....	39
ตอนที่ 1 (เก็บตัวอย่างเมื่อได้รับแจ้งให้ตรวจสอบการติดเชื้อของอาการแถบขาว)...	40
การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม จากน้ำในถังเลี้ยง ปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว.....	40
ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยง และเปลี่ยนถ่ายน้ำ).....	46
การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม จากน้ำในถังเลี้ยง ปะการัง และปะการังสมองร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว.....	46
ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากบ่อพักน้ำ).....	52

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	54
สิ่งแวดล้อมกับการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย.....	54
การก่อโรคแถบขาวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.....	55
โรคในสัตว์น้ำเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย.....	57
สรุปผลการทดลอง.....	58
ข้อเสนอแนะ.....	59
บรรณานุกรม.....	60
ภาคผนวก.....	69
ภาคผนวก ก.....	70
ภาคผนวก ข.....	74
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	80

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1	โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปะการัง..... 18
3-1	โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไวรัสด้วยวิธี Immunodot blotting..... 33
4-1	ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน ระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)..... 38
4-2	ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml) จากปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)..... 40
4-3	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน (Pearson's correlation coefficient) (r) (ก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ)..... 41
4-4	การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไวรัสรวม จากปะการังสมอร่องยาว (<i>P. daedalea</i>) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะ..... 43
4-5	ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)..... 44
4-6	ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml.) จากปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)..... 46
4-7	ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน (Pearson's correlation coefficient (r) (หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ)..... 47
4-8	ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml.) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (ก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ)..... 48

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
4-9	
ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และ แบคทีเรียวิบริโอรวม (log CFU/ml.) จากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละ ระดับที่มีอาการแถบขาว (ก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ).....	49
4-10	
ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และ แบคทีเรียวิบริโอรวม (log CFU/ml) จากบ่อพักน้ำ.....	50

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างทั่วไปของปะการังประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อและโครงร่างหินปูน.....	5
2-2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสุขภาพของปะการัง	10
2-3 ลักษณะการเกิดโรค Black Band Disease.....	12
2-4 ลักษณะการเกิดโรค Yellow Band Disease.....	13
2-5 ลักษณะเนื้อเยื่อและโครงร่างของปะการังที่เป็นโรค White plague (a – c).....	13
2-6 ลักษณะการหลุดลอกของเนื้อเยื่อและโครงร่างของปะการัง ที่เกิดจากการกัดกินของสัตว์ (a - c).....	14
2-7 ลักษณะการเกิดโรค White pox disease.....	15
2-8 ลักษณะการเกิดโรค White band disease.....	16
2-9 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของปะการังจาก โรคแถบขาวเปลี่ยนแปลงเป็นโรคแถบดำ.....	16
2-10 ลักษณะการเกิดโรค Bacterial bleaching.....	17
2-11 วิธีการจัดวางชิ้นส่วนปะการังเพื่อทำการขยายพันธุ์.....	21
2-12 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ.....	23
3-1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาว โรงเลี้ยงปะการังบนเกาะมันในนอกชายฝั่งจังหวัดระยอง.....	28
3-2 สภาพโรงเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน (a) และไดอะแกรมแสดงระบบถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาวด้วยกลไกโดยระบบน้ำคั้นของระดับน้ำในถังเลี้ยง (b).....	29
3-3 อาการแถบขาวที่ประเมินด้วยสายตา จากปริมาณความขาวต่อพื้นที่โคโลนีปะการังจำแนกออกได้ 4 ระดับ.....	30
4-1 อาการแถบขาวที่ปรากฏบริเวณขอบสันโคโลนีปะการังสมองร่องยาว.....	37

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

แนวปะการังจัดเป็นระบบนิเวศทางทะเลที่มีความหลากหลายทางชีวภาพสูง โดยเป็นที่อยู่อาศัย ที่หลบภัย แหล่งอาหาร และเป็นแหล่งวางไข่ให้กับสัตว์น้ำ แล้วยังเป็นแหล่งท่องเที่ยวให้กับมนุษย์ ระบบนิเวศแนวปะการังมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา ซึ่งมีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้อง คือ ภัยธรรมชาติ เช่น พายุ การระบาดของดาวมงกุฎหนาม การเกิดปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว ภัยจากกิจกรรมมนุษย์ เช่น การพัฒนาชายฝั่ง การทิ้งของเสียลงสู่ทะเล ส่งผลกระทบทำให้ปะการังเกิดสภาวะเครียด ความต้านทานโรคลดลง ทำให้เชื้อโรคต่าง ๆ สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อปะการังได้ ทำให้แสดงอาการผิดปกติและอาจตายในที่สุด จากการสำรวจการเกิดโรคในแนวปะการังทางภาคใต้ของประเทศไทย มีรายงานการเกิดโรคที่พบในปะการังทั้งหมด 20 โรค โดย 68% ของโรคที่พบทั้งหมด พบบริเวณทะเลอันดามัน และ 80% พบบริเวณอ่าวไทย และจากการสำรวจมีโรคในแนวปะการังที่พบมาก จำนวน 4 โรค คือ White Syndrome (WS), Pink-line syndrome (PLS), Black band disease (BBD) และ Aspergillosis (ASP) (Kenkel, 2007)

แบคทีเรียหลายชนิดที่เป็นสาเหตุของการก่อโรคในปะการัง เช่น แบคทีเรีย *Aurantimonas corallicida* ซึ่งเป็นสาเหตุของการเกิดโรค White plague II ในปะการังชนิด *Diploria labyrinthiformis* แบคทีเรีย *Serratia marcescens* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค White pox ในปะการัง *Acropora palmata* แบคทีเรีย *Vibrio coralliilyticus* และ *Vibrio shiloi* เป็นสาเหตุของการเกิดโรค Bacterial bleaching ในปะการังชนิด *Oculina patagonica* และแบคทีเรีย *Vibrio carahariae* ก่อโรค White band II หรือ โรคแถบขาว เป็นโรคที่ระบาดอยู่ในกลุ่มปะการังก้อน (Massive species) และกลุ่มปะการังเขากวาง (*Acropora* spp.) (Raymundo et al., 2008) ทั้งใน Indo-Pacific และ Caribbean ลักษณะของโรคแถบขาว มีการเจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อแล้วแพร่กระจายอย่างสม่ำเสมอตามความยาวของขอบแผลตามแต่ละชนิดของปะการัง (Ritchie & Smith; 1998) มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเป็นสาเหตุก่อโรคในปะการังที่สัมพันธ์กับอาการแถบขาว เช่น แบคทีเรีย *V. coralliilyticus* และ *V. shiloi* ก่อโรค Bacterial bleaching ในปะการังชนิด *O. patagonica* (Rosenberg & Zilber, 2008)

ในปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงปะการังบนเกาะมันใน โดยนำเซลล์สืบพันธุ์ของปะการัง

ที่รวบรวมจากธรรมชาติมาทำการปฏิสนธิ และอนุบาลในโรงเรือนเพื่อนำไปฟื้นฟูระบบนิเวศแนวปะการังในธรรมชาติ โดยเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) เป็นชนิดหลัก และมีปะการังชนิดอื่นร่วมด้วย ในระบบเลี้ยงมีการนำน้ำทะเลจากแหล่งน้ำธรรมชาติสูบเข้ามาในบ่อพักน้ำ แล้วนำน้ำทะเลจากบ่อพักน้ำที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคเข้าสู่โรงเพาะเลี้ยง โดยระบบน้ำที่ใช้เลี้ยงปะการัง เป็นแบบน้ำหมุนเวียนจากถังหนึ่งสู่อีกถัง แล้วจึงปล่อยน้ำทิ้งออกไป ในระหว่างการเลี้ยงพบอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาวได้ทุกขนาดที่เกาะบนกระเบื้อง มีอายุประมาณ 10 เดือน ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ที่มีจากแหล่งน้ำทะเลธรรมชาติรวมทั้งการเพิ่มในเชิงปริมาณในน้ำที่ใช้เลี้ยงปะการัง ที่อาจก่อโรคแถบขาวได้

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้น จะเห็นได้ว่าปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากระบบเลี้ยงปะการังอาจส่งผลให้ปะการังเกิดความเครียด และง่ายต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย จึงทำให้เกิดลักษณะผิดปกติบริเวณเนื้อเยื่อปะการัง จากรายงานของ Wilson et al. (2012) ระบุว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. สามารถก่อโรค White syndrome ได้ในปะการัง *Acropora hyacinthus* ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงได้มีการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียโดยเฉพาะแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. จากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง จากเนื้อเยื่อปะการังทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ และน้ำจากบ่อพักน้ำ เพื่อหาแนวทางป้องกันการเกิดอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาว

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. วิเคราะห์ปริมาณแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรีย *Vibrio* ที่สัมพันธ์กับอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงปะการัง
2. จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่อาจทำให้เกิดอาการแถบขาวในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน
3. เปรียบเทียบปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย *Vibrio* จากน้ำในถังเลี้ยง และปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวทั้งก่อนและหลังการทำความสะอาดถังเลี้ยงปะการัง

สมมติฐานของการวิจัย

1. ถ้าระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงสูงขึ้น ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมก็จะเพิ่มสูงขึ้นด้วย
2. ถ้าเชื้อแบคทีเรียกลุ่มไวรัสก่อให้เกิดอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน จะพบเชื้อไวรัสกลุ่มที่ก่อให้เกิดโรค ในปะการังที่มีอาการแถบขาว
3. ถ้าเปลี่ยนถ่ายน้ำและทำความสะอาดถังเลี้ยงปะการัง ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมจะลดลง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. เพื่อเผื่อระวังการเกิดการระบาดของเชื้อแบคทีเรียที่ส่งผลให้เกิดอาการแถบขาวในเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาว
2. ทราบชนิดของเชื้อไวรัสที่ก่อให้เกิดอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และอาจนำไปสู่การผลิตยาปฏิชีวนะเพื่อยับยั้งการระบาดของเชื้อแบคทีเรียในโรงเพาะเลี้ยง
3. การจัดการระบบโรงเพาะเลี้ยงที่ดี โดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำและทำความสะอาดถังเลี้ยง จะช่วยลดปริมาณแบคทีเรียในถังเลี้ยงได้

ขอบเขตการวิจัย

1. ค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2. เก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อพักน้ำ น้ำในถังเลี้ยง และปะการังในโรงเพาะเลี้ยง
 - 2.1 เก็บน้ำก่อนและเปลี่ยนหลังถ่ายน้ำจากบ่อเลี้ยงปะการังที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ และเก็บตัวอย่างน้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน หลังจากมีการเปลี่ยนถ่ายน้ำไปแล้ว 1 เดือน เพื่อตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม
 - 2.2 จำแนกลักษณะ และอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละถังเลี้ยงจากระบบโรงเพาะเลี้ยง และวิเคราะห์ชนิดของแบคทีเรียจากปะการัง ที่มีอาการแถบขาวแตกต่างกัน 4 ระดับ เก็บปะการังที่มีอาการแถบขาวแต่ละระดับจากถังเลี้ยง จำนวน 3 โคโลนี่ คือ (0) ปะการังที่ไม่ปรากฏอาการแถบขาว, (+1) อาการแถบขาวปรากฏเฉพาะบริเวณขอบรอบโคโลนี่ (+2) อาการแถบขาวลุกลามจากขอบโคโลนี่ และกระจายเข้าสู่ศูนย์กลาง และ (+3) อาการแถบขาวลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี่ ก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ

3. วิเคราะห์แบคทีเรียภายใต้ห้องปฏิบัติการ

3.1 ตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย vibrio รวม โดยวิธี Dilution plate count บนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + NaCl 2% และ อาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS + NaCl 2%

3.2 จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดี ต่อแอนติเจนโดยใช้เทคนิค Immono assay ด้วยวิธี Dot blotting และทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นร่วมกับชุดทดสอบ API 20E

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของปะการัง

ปะการังแข็ง (Hard coral) เป็นสัตว์ทะเลที่ไม่มีกระดูกสันหลัง จัดอยู่ในกลุ่มเดียวกับกัลปังหา ดอกไม้ทะเล และแมงกะพรุน โดยมีการจัดลำดับอนุกรมวิธานดังนี้ (Veron, 1986)

อาณาจักร (Kingdom) Animalia

ไฟลัม (Phylum) Cnidaria

ชั้น (Class) Anthozoa

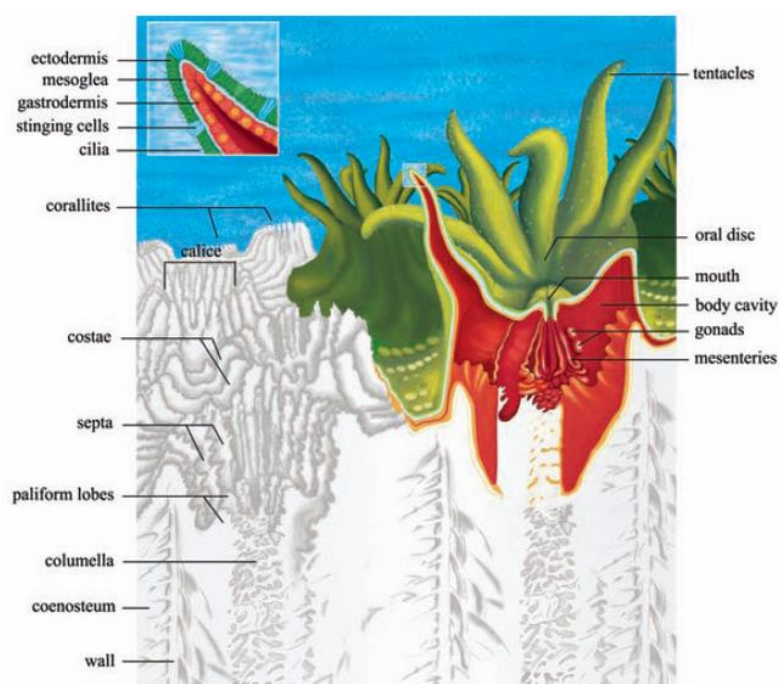
อันดับ (Order) Scleractinia

สมาชิกในวงศ์ (Family) Faviidae มีหลายสกุล เช่น ปะการังวงแหวน *Favia* spp. ปะการังรังผึ้ง *Goniastrea* spp., ปะการังสมอง *Platygyra* spp. และชนิดที่นำมาศึกษาครั้งนี้คือ ปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) ซึ่งมีลักษณะเป็นก้อนตัน มีร่องหยักโค้งไปมาคล้ายสมอง ผงังคั่นร่องเป็นสันเหลี่ยม (Veron, 2000)

2.1.1 ลักษณะทางกายภาพของปะการัง

ปะการังแข็งมีส่วนประกอบอยู่ 2 ส่วน คือ โครงสร้างหินปูน และเนื้อเยื่อของปะการัง ส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อ มีลักษณะเป็นถุงอ่อนนิ่มขนาดเล็กฝังอยู่ในช่องเล็ก ๆ ในโครงร่างหินปูน ที่ประกอบขึ้นมาเป็นที่อยู่ของปะการัง เรียก โพลิป (polyp) ประกอบด้วยปากที่เป็นช่องเปิดเข้าไปยังช่องว่างภายในลำตัว และมีหนวดเรียงเป็นวงโดยรอบ ซึ่งแต่ละโพลิปจะฝังตัวอยู่ในช่องหินปูน ที่มีรูปร่างคล้ายถ้วยเล็ก ๆ ผงังของช่องอาจยกตัวสูงขึ้นมาเป็นทรงกระบอก บนผนังภายในช่องมีแผ่นซีทินปูน เรียก เซปต้า (septa) เรียงแถวเป็นรัศมีเข้าหาจุดศูนย์กลางของช่อง โดยบริเวณจุดศูนย์กลางมักจะมีกลุ่มหนามหินปูนอยู่เป็นกระจุก จะอยู่ตำแหน่งปากของโพลิป โครงร่างหินปูนที่พัฒนาขึ้นมาเป็นที่อยู่ของโพลิป เรียก คอรอลไลต์ (corallite) ซึ่งปะการังแต่ละชนิดมีลักษณะคอรอลไลต์ที่แตกต่างกันไป ดังภาพที่ 2-1 ปะการังแต่ละก้อนมีโพลิปอยู่เป็นจำนวนมาก ซึ่งจะมีเนื้อเยื่อเชื่อมถึงกันหมด เมื่ออาหารถูกจับโดยรยางค์คล้ายหนวดจะส่งมาย่อยที่ช่องกระเพาะอาหาร ภายในช่องกระเพาะอาหารมีผนังเนื้อเยื่อบาง ๆ เรียก มีเซนเทอรี (mesenteries) เชื่อมติดกันด้วยเนื้อเยื่อ ทำให้ระบบย่อยอาหาร และระบบประสาทของโพลิปทั้งหมดเชื่อมต่อกัน ด้านล่างสุดของโพลิปเป็นส่วนฐานที่ยึดเกาะกับพื้นผิว

ปะการังส่วนมากอาศัยอยู่ร่วมกับสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวในกลุ่ม dinoflagellates เรียกว่า zooxanthellae ซึ่งจะมีอยู่มากในเนื้อเยื่อของผิวปะการังชั้นนอก (epidermis) โดยต่างฝ่ายต่างได้รับประโยชน์ซึ่งกันและกัน (symbiosis) กล่าวคือ zooxanthellae จะได้ที่ป้องกันตัวและอาหารที่เป็นของเสียจากปะการัง เช่น ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ไนโตรเจน และฟอสเฟต ในการสังเคราะห์แสงเพื่อสร้างอาหาร และเพิ่มจำนวนเซลล์ ส่วนปะการังจะได้สีส้มและก๊าซออกซิเจนจากการสังเคราะห์แสงที่สาหร่าย zooxanthellae สร้างขึ้นมา (Veron, 1995) ประโยชน์จากสีส้มของ zooxanthellae คือช่วยป้องกันเนื้อเยื่อของปะการังไม่ให้ถูกแผดเผาจากรังสีของดวงอาทิตย์ เมื่อใดที่สภาพแวดล้อมไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของ zooxanthellae จะส่งผลให้ zooxanthellae อ่อนแอลง จนเกิดการสูญเสียรงควัตถุหรือไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ และเป็นสาเหตุที่ทำให้ปะการังไม่สามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ (สุชนา ชวนิชย์, 2556) โพลิปที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่มเรียกว่า โคลนินี (colony) ยกเว้นปะการังก้อนซึ่งเป็นชนิดที่อยู่เดี่ยว ๆ (solitary) เช่น ปะการังดอกเห็ด (mushroom coral) และปะการังสมอง (brain coral) (สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล ภูเก็ต, 2538; Veron, 2000)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างทั่วไปของปะการังประกอบด้วยส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อและโครงร่างหินปูน
(ที่มา: Veron, 2000)

2.2 ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อแนวปะการัง

แนวปะการังจัดเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำนานาชนิดเนื่องจาก แนวปะการังส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นซอกโพรง ทำให้ง่ายต่อการเข้าอยู่อาศัยของสัตว์น้ำโดยเป็นทั้งแหล่งหลบภัย แหล่งผสมพันธุ์วางไข่ แหล่งอนุบาลสัตว์น้ำวัยอ่อน และเป็นแหล่งอาหาร อีกทั้งทำหน้าที่ดึงดูดนักท่องเที่ยวจากทั่วทุกมุมโลก ให้เข้ามาท่องเที่ยวเพื่อชมความงามใต้ท้องทะเล และยังช่วยลดความรุนแรงของคลื่นที่จะเข้ากระทบกับชายฝั่ง

2.2.1 ปัจจัยควบคุมการพัฒนาแนวปะการัง

แนวปะการังเป็นสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่งที่มีขนาดเล็ก จำเป็นต้องอาศัยปัจจัยหลายประการในการพัฒนาการเจริญเติบโตของแนวปะการัง ได้แก่

- การเปลี่ยนแปลงของเปลือกโลก (Plate Tectonics) เป็นการเปลี่ยนแปลงโดยการยกตัวหรือจมตัวของเปลือกโลก ซึ่งเป็นสาเหตุให้ปะการังมีการสัมผัสกับน้ำทะเลที่ระดับแตกต่างกัน ส่งผลต่อการกระจายตัวของแนวปะการังในแต่ละมหาสมุทร (นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ, มปป.)

- ระดับน้ำทะเล (Sea Level) มีความสัมพันธ์กับอุณหภูมิและการเจริญเติบโตของแนวปะการัง โดยแนวปะการังจะสามารถปรับสภาพตามแสงที่สามารถส่งลงไปตามความลึก โดยที่ความลึกของน้ำไม่เกินกว่า 50 เมตร จึงจะเหมาะสมของการเจริญเติบโตของปะการัง (กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช, 2556)

- อุณหภูมิ (Temperature) อุณหภูมิที่ปะการังสามารถเจริญเติบโตได้ คือ 18-36 องศาเซลเซียส แต่อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแนวปะการัง คือ 25-27 องศาเซลเซียส (จามรี แยมยิม, 2552 อ้างถึงใน สวลักษณ์ สารมณีสพันธุ์, มปป.) ซึ่งส่วนมากปะการังจะมีอยู่อย่างหนาแน่นในบริเวณที่มีอุณหภูมิของน้ำทะเลค่อนข้างสูง ซึ่งอุณหภูมิของน้ำทะเลบริเวณเส้นศูนย์สูตรจะมีความเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการกระจายตัวของปะการังมากกว่าอุณหภูมิของน้ำทะเลบริเวณอื่น ซึ่งหากมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิจะมีผลต่อการพัฒนาแนวปะการัง (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556)

- ความเค็ม (Salinity) ความเค็มที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตปะการังอยู่ในช่วงจำกัดคือ 30-36 ส่วนในพัน (ppt) น้ำทะเลที่มีความเค็มที่อยู่ในช่วงนี้ จะส่งผลให้มีการพัฒนาได้ดีกว่าบริเวณน้ำทะเลที่มีความเค็มต่ำ เช่นบริเวณปากแม่น้ำ จะมีการพัฒนาของแนวปะการังน้อยกว่าบริเวณอื่นเนื่องจากได้รับอิทธิพลการไหลของน้ำจืดจากแผ่นดิน

- พลังงานคลื่น (Wave energy) การแตกกระจายของคลื่นจะก่อให้เกิดการเคลื่อนที่ของระบบสารอาหารและของเสีย ซึ่งปริมาณสารอาหารก่อให้เกิดความสัมพันธ์แบบพึ่งพกันระหว่างสัตว์หน้าดิน (Benthic) และกลุ่มสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่กับแนวปะการัง โดยสัตว์เหล่านี้จะได้รับสารอาหารจากการแตกกระจายของคลื่น และตัวปะการังจะได้รับประโยชน์จากการเจริญเติบโตของสัตว์หน้าดิน (Benthic) ซึ่งปรากฏการณ์นี้จะเกิดขึ้นอย่างชัดเจนบริเวณแนวปะการังชายฝั่ง โดยปะการังจะมีความสามารถรับพลังงานของคลื่นได้ในระดับหนึ่ง หากพลังงานคลื่นมีความรุนแรงมากเกินไป จะมีผลต่อการลงเกาะของตัวอ่อนปะการัง ซึ่งเป็นผลให้แนวปะการังบริเวณนี้มีการเจริญเติบโตไม่สมบูรณ์

- แสง (Light) สาหร่ายจะใช้แสงในกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยการอยู่แบบพึ่งพา (Symbiotic) ระหว่างปะการังและสาหร่าย โดยปะการังจะได้รับประโยชน์จากสารอาหารในการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย ซึ่งจะมีผลต่อกระบวนการผลิตแคลเซียมคาร์บอเนตของปะการังด้วย โดยปริมาณแสงจะลดลงตามระดับความลึกของน้ำทะเล

- สารอาหาร (Nutrients) สารอาหารเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ควบคุมการพัฒนาแนวปะการัง ซึ่งปริมาณและรูปแบบของสารอาหารจะเปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลา และบริเวณของมหาสมุทรนั้น ๆ โดยปริมาณสารอาหารที่เหมาะสมจะมีผลทำให้ปะการังเจริญเติบโตได้ดี แต่หากมีปริมาณของสารอาหารที่มากเกินไป ทำให้โครงร่างแข็งเปราะและแตกง่าย

- ปริมาณตะกอน (Sediment) ปริมาณของตะกอนที่ทับถมบนโคโลนีมากเกินไป มีผลทำให้ปะการังตายได้ โดยเฉพาะตัวอ่อนของปะการัง ส่วนปะการังที่มีขนาดใหญ่หากเกิดการทับถมของตะกอนจะส่งผลให้เกิดความเครียด และมักจะใช้เวลานานในการปรับตัว โดยสาเหตุที่ปริมาณตะกอนก่อให้เกิดความเครียด มีดังนี้

- ปริมาณตะกอนส่งผลต่อกระบวนการหายใจของปะการัง
- เกิดการหลุดลอกของเนื้อเยื่อปะการัง
- บังแสงเงาซึ่งจะมีผลต่อการสังเคราะห์แสงของสาหร่าย zooxanthellae
- ขัดขวางการเจริญเติบโตของตัวอ่อนปะการัง

2.2.2 ปัจจัยที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในแนวปะการัง

ระบบนิเวศในธรรมชาติเกิดการเปลี่ยนแปลงอยู่ตลอดเวลา การที่แนวปะการังมีพัฒนาการเจริญเติบโตเป็นผลจากการเปลี่ยนแปลง ซึ่งเมื่อมีการเจริญเติบโตก็มีการเสื่อมไปในเวลาพร้อมกัน ปัจจัยที่ทำให้เกิดผลกระทบอย่างชัดเจน แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

2.2.3 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากมนุษย์

- การพัฒนาชายฝั่ง เช่น การก่อสร้างที่มีการเปิดหน้าดิน ขุดลอกพื้นที่ชายฝั่ง เพื่อกิจการต่าง ๆ เช่น ทำถนน ก่อสร้างอาคาร ฯลฯ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาเรื่องตะกอนที่ชะลงสู่ทะเล ในช่วงฤดูฝน
- การปล่อยน้ำเสียลงทะเล เป็นปัญหาที่เกิดขึ้นในพื้นที่ชุมชนขนาดใหญ่ โดยส่งผลกระทบต่อแนวปะการังตรงจุดนั้นเกิดการเสื่อมโทรมลง
- การขุดแร่ในทะเล การขุดแร่ในทะเลนั้นไม่ได้ขุดลงบนแนวปะการังโดยตรง แต่เป็นการขุดบนพื้นทะเลนอกแนวปะการังออกไปจึงอาจเกิดปัญหา เมื่อการขุดแร่อยู่ใกล้แนวปะการัง เนื่องจากเกิดการฟุ้งกระจายของตะกอนที่เกิดจากการขุดพื้นที่ของทะเล และล้างแยกแร่ในเรือขุด ซึ่งมีการปล่อยน้ำล้างแร่ลงทะเลโดยตรง ตะกอนที่ฟุ้งกระจายในมวลน้ำอาจแพร่กระจายไปปกคลุมบนแนวปะการังที่อยู่ใกล้เคียง เมื่อมีอัตราการตกตะกอนสูงปริมาณตะกอนที่ทับถมปะการัง จึงมีผลโดยตรงต่อการหายใจซึ่งเป็นผลให้ปะการังตายในที่สุด
- การระเบิดปลาในแนวปะการัง เป็นการทำลายปะการังอย่างรุนแรง เพราะแรงระเบิดนอกจากจะเป็นการฆ่าปลา ยังทำให้ปะการังแตกหักเสียหาย และยากต่อการฟื้นตัว
- การใช้อยาเบื่อปลาในแนวปะการัง เพื่อจับสัตว์น้ำ เช่น ปลาสวยงามและกุ้งมังกรที่หลบซ่อนอยู่ตามซอกโพรงปะการัง โดยปริมาณของสารเคมี มีผลต่อปะการัง แต่ยังไม่มีการศึกษากันอย่างจริงจังว่าจะเกิดผลกระทบกับปะการังอย่างไร
- การลักลอบเก็บปะการัง เพื่อมาประดับตู้ปลา เนื่องจากปะการังเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีสีสันสวยงาม จึงนิยมใช้ประดับตู้ปลา
- การลักลอบรื้อปะการัง กรณีนี้เป็นการรื้อปะการังที่อยู่ติดหาดออกไป โดยเฉพาะตามหาดที่อยู่หน้าสถานที่พักตากอากาศเพื่อให้เป็นพื้นที่ทรายสำหรับนักท่องเที่ยวได้ลงเล่นน้ำ หรือเพื่อให้เรือขนาดเล็กสามารถวิ่งเข้าเทียบชายหาดได้ในช่วงน้ำลง กิจกรรมเหล่านี้เป็นสิ่งที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในแนวปะการังเป็นอย่างมาก เพราะปะการังที่ถูกรื้อออกจากที่เดิมมักจะตายไปในที่สุด ในกรณีที่รื้อปะการังแล้วนำไปทับถมเพื่อสร้างเป็นแนวเขื่อนกันคลื่น ยิ่งก่อให้เกิดผลกระทบมากขึ้นเพราะเป็นการกั้นการไหลเวียนของกระแสน้ำที่ไหลเลียบฝั่ง อาจทำให้ลักษณะชายฝั่งเปลี่ยนแปลงไป กล่าวคือเกิดการกัดเซาะของชายฝั่งด้านหนึ่ง และเกิดการทับถมของตะกอนทรายในแนวปะการัง หรือเกิดทรายทับถมหน้าหาดยื่นลงสู่ทะเลในอีกด้านหนึ่งของตัวเขื่อน เป็นการเปลี่ยนแปลงสภาพระบบนิเวศเดิมอย่างสิ้นเชิง
- การท่องเที่ยวในแนวปะการัง ก่อให้เกิดผลกระทบต่อทรัพยากรทางทะเล

โดยการท่องเที่ยวดำน้ำซึ่งมีผลกระทบต่อแนวปะการังโดยตรง กล่าวคือ การดำน้ำตื้นมีโอกาสสูงที่จะยื่นเหยียบย่ำปะการัง การดำน้ำลึกก็มีผลกระทบจากการขาดความระมัดระวังของนักดำน้ำ เช่น ตีนกบกระแทกปะการังแตกหัก โดยเฉพาะในแหล่งที่มีปะการังบอบบาง และนักท่องเที่ยวดำน้ำหนาแน่น

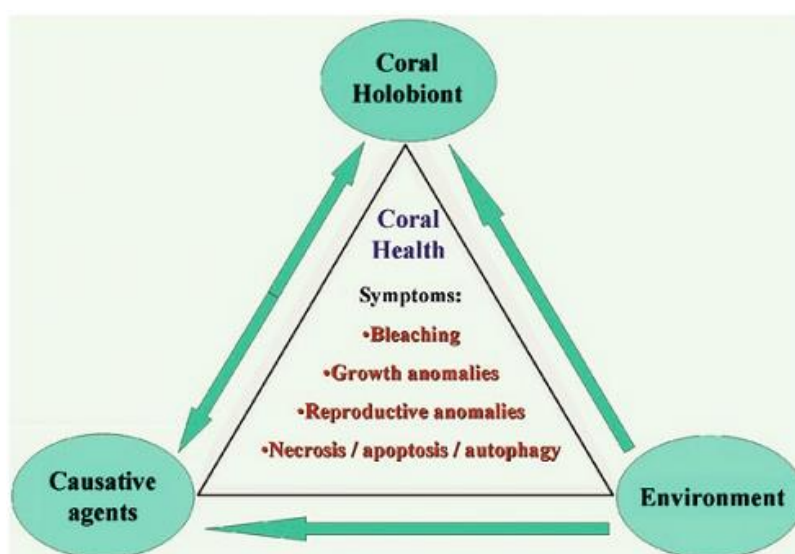
- การรั่วไหลของน้ำมันลงทะเล มักเกิดจากอุบัติเหตุเรืออับปางก่อให้เกิดน้ำมันรั่วไหลลงสู่ทะเล

2.2.4 การเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากธรรมชาติ

- การเกิดพายุ ทำให้ปะการังเกิดการแตกหักเสียหายเป็นจำนวนมาก
- ปรากฏการณ์น้ำเปลี่ยนสี
- การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิน้ำทะเลอย่างรวดเร็ว โดยการเพิ่มอุณหภูมิของน้ำทะเลประมาณ 2 - 5 องศาเซลเซียส จากปรากฏการณ์ El Nino เช่น ในปี 1982 - 1983 ก็เป็นสาเหตุที่ทำให้ Zooxanthellae ในเนื้อเยื่อปะการังหายไป
- การระบาดของดาวมงกุฎหนาม ปัจจุบันพบว่ามีการระบาดของดาวมงกุฎหนามหลายแห่งในเขตน่านน้ำอินโด - แปซิฟิก สำหรับในน่านน้ำไทย มีรายงานการระบาดบริเวณเกาะต่าง ๆ ทางฝั่งอันดามันทำให้ในช่วงปี พ.ศ. 2527 - 2529 แนวปะการังหลายแห่งได้รับความเสียหายเป็นจำนวนมาก (นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ, มปป.)

2.3 การเกิดโรคในปะการัง

โรค หมายถึงการทำให้เกิดความเสียหายของเนื้อเยื่อหรือโครงสร้างทางสรีระ โดยทำให้เกิดอาการที่มองเห็นได้ (Stedman, 2005) โดยปัจจัยส่งผลต่อสุขภาพของปะการังได้แก่ สิ่งแวดล้อมที่เป็นตัวกระตุ้นเชื้อก่อโรค และความหนาแน่นของปะการัง ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ซึ่งกันและกัน (ภาพที่ 2-2) มีผลต่อสุขภาพปะการังให้เกิดการฟอกขาว การเจริญเติบโตลดลง เกิดความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ และเกิดการตายของเนื้อเยื่อปะการัง (Rosenberg et al., 2008)



ภาพที่ 2-2 ปัจจัยที่ส่งผลต่อสุขภาพของปะการัง (ที่มา: Rosenberg et al., 2008)

2.3.1 ปัจจัยที่ทำให้ปะการังในธรรมชาติเกิดความเครียดและเป็นโรค

2.3.1.1 อุณหภูมิ

การพัฒนาของโรคในปะการัง เกิดจากความเครียดที่เกิดจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งเป็นตัวเร่งให้เกิดโรคปะการัง อุณหภูมิ และคุณภาพน้ำที่เปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วส่งผลให้เกิดความเครียด โดยในสภาวะแวดล้อมที่มีอุณหภูมิสูง หรือต่ำจากระดับอุณหภูมิของน้ำทะเลปกติ จนเกินไป ติดต่อกันหลายวัน เป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิดความเครียด เมื่อภูมิคุ้มกันโรคในตัวปะการังลดต่ำลงจึงเป็นสาเหตุให้ปะการังอ่อนแอ และไม่สามารถกำจัดเชื้อโรคได้ เชื้อโรคจึงสามารถเข้าบุกรุกตัวปะการังได้ในที่สุด (Neulinger et al., 2008)

2.3.1.2 คุณภาพน้ำ

ความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำเป็นอีกสิ่งหนึ่งที่ทำให้เกิดความเครียดในปะการัง ซึ่งสัมพันธ์กับช่วงเวลาที่ฝนตกหนัก มลพิษจากกิจกรรมของมนุษย์ และฝนที่ตกลงมาสู่พื้นดินนำตะกอน ปริมาณสารอาหาร ไหลลงไปตามแหล่งน้ำแล้วลงสู่ทะเล ซึ่งจะลดการส่องผ่านของแสง โดยพบว่าสัมพันธ์กับปริมาณความขุ่น และความรุนแรงการเกิดโรคปะการัง (Bruno et al., 2003) ดังนั้นความเสื่อมโทรมของคุณภาพน้ำจัดเป็นความสัมพันธ์ระหว่างความเครียด และความไวต่อการเกิดโรคในปะการัง (Raymundo et al., 2008)

2.3.1.3 ตะกอนที่ละลายในน้ำ

การพัดพาตะกอนจากแผ่นดินลงสู่ทะเลในปริมาณที่มาก และเป็นระยะเวลาานาน มีผลทำให้ปะการังไม่สามารถกำจัดตะกอนที่ปกคลุมโคโลนีออกไปได้ ปะการังจึงเกิดภาวะขาดออกซิเจน และตายในที่สุด (Haapkyla et al., 2011)

2.3.1.4 การก่อโรคที่เกิดจากหอยฝาเดียว

หอยฝาเดียวที่กินเนื้อเยื่อปะการังเป็นอาหาร corallivorous snail (*Coralliophila abbreviata*) จัดเป็นพาหะของเชื้อก่อโรคแบคทีเรีย *V. shiloi* ในปะการัง *Oculina patagonica* บริเวณ Florida Key โดยหอยสามารถส่งผ่านเชื้อก่อโรคคล้ายกับลักษณะการฟอกขาวของปะการัง โดยพบการระบาดของหอย *Drupella cornus* บริเวณ ทะเลแดง มีความสัมพันธ์กับการระบาดของโรค white syndrome โดยหอยสามารถส่งผ่านเชื้อโรค *V. shiloi* ไปทำให้เกิดรอยโรคและมีการติดเชื้อตามมา (Rotjan and Lewis, 2008)

2.4 อาการและโรคของปะการังที่เกิดจากแบคทีเรีย

2.4.1 Black Band Disease (BBD)

โรคแถบดำ black band disease (BBD) พบครั้งแรกที่แนวปะการัง Belize และมีการกระจายไปทั่วโลก (Richardson, 2004) ลักษณะของโรค สังเกตจากแถบดำจะมีการแบ่งข้างที่ชัดเจน ระหว่างเนื้อเยื่อที่มีสุขภาพดี และส่วนที่เป็นโรค โดยแถบสีดำจะเคลื่อนผ่านผิวเนื้อเยื่อปะการังเมื่อรอยโรคผ่านไปแล้ว จะมีลักษณะโครงสร้างเปลือยเปล่า (ภาพที่ 2-3) ในปะการัง *Diploria strigosa* ระยะเวลาการเกิดโรคจะเริ่มจากมีขนาดเป็นมิลลิเมตร ไปจนถึง 3 มิลลิเมตร ต่อวัน ขนาดของแถบสีดำอาจมีความกว้าง 5-30 มิลลิเมตร (Antonius, 1981) สาเหตุหลักของการติดเชื้อเกิดจากการอยู่กันอย่างหนาแน่นของปะการัง (Frias-Lopez et al., 2004) โดยโรคจะส่งผลกับทั้งปะการังแข็งและปะการังอ่อน

โรคแถบดำ เกิดจากกลุ่มจุลินทรีย์จำพวก ไซยาโนแบคทีเรีย (cyanobacteria) มีการเจริญเติบโตโดยใช้ออกซิเจนจากกระบวนการสังเคราะห์แสงของปะการัง รอยโรคมีลักษณะเฉพาะ คือความหนาของชั้นเซลล์แบคทีเรียสะสม น้อยกว่า 1 มิลลิเมตร แล้วจะเคลื่อนตัวในแนวนอน ส่วนของฐานปะการังจะตายเนื่องจากสภาวะขาดออกซิเจน เพราะมีซัลไฟด์เป็นจำนวนมาก และมีความเป็นพิษ โดยเกิดจากใต้แถบสีดำ ที่สร้างขึ้นมาจากแบคทีเรีย (Carlton and Richardson, 1995)

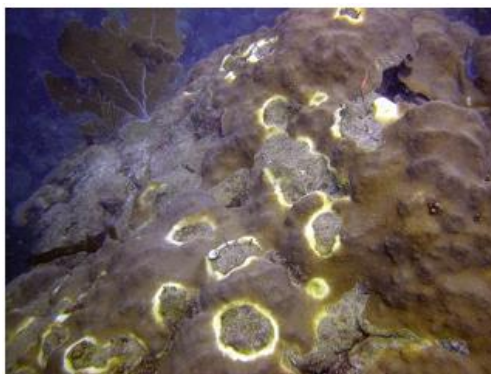


ภาพที่ 2-3 ลักษณะการเกิดโรค Black Band Disease (ที่มา: Weil and Rogers, 2011)

2.4.2 Yellow Band Disease (YB)

Yellow band (YB) โรคแถบเหลือง ปรากฏครั้งแรกที่ Florida Keys ในปี 1997 (Santavy and Peters, 1997) ลักษณะเป็นรอยเปื้อนสีเหลือง (ภาพที่ 2-4) ใน *Montastraea faveolata* โดยลักษณะของการเกิดโรคคือ จะเกิดจากศูนย์กลางของโรคแถบเหลือง และจะเป็นวงเหลืองทั่วทั้งโคโลนี อัตราการตายของเนื้อเยื่อจะเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ รอยโรคเป็นวงกว้างขึ้นขนาดประมาณ 0.7 เซนติเมตรต่อเดือน (Bruckner and Bruckner, 2006)

สาเหตุของเชื้อแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรคแถบเหลือง เกิดจากแบคทีเรียหลายชนิด และพบแบคทีเรีย *Vibrio* อยู่ในเมือกของปะการังที่เป็นโรค (Weil et al., 2006) ซึ่งเชื้อแบคทีเรียไม่เพียงแต่ทำลายเนื้อเยื่อปะการัง แต่ยังรวมถึง endosymbiotic ซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียสาหร่าย zooxanthellae ถึง 41-97 % จึงทำให้ไม่พบร่องรอยของ zooxanthellae ในเมือกของปะการัง (Cervino et al., 2004)



ภาพที่ 2-4 ลักษณะการเกิดโรค Yellow Band Disease (ที่มา: Weil and Rogers, 2011)

2.4.3 White Syndrome (WS)

การปรากฏลักษณะอาการขาวในปะการัง ระหว่างโรค white plague และ white band อาการของโรคที่แตกต่างกัน สังเกตได้จากลักษณะของเนื้อเยื่อ โครงร่างของปะการัง และรูปแบบการเกิดรอยโรคจะจำเพาะกับชนิดปะการัง เช่น white plague จะมีบริเวณฟอกขาวของเนื้อเยื่อปะการัง ซึ่งมีความจำเพาะกับปะการังสกุล *Acropora* ส่วน white band แบนที่เรียวยาวจะอยู่กันอย่างหนาแน่นบริเวณรอยโรค (Ainsworth et al., 2007) และจำเพาะกับปะการังแข็ง (Antonius, 1982)

2.4.3.1 White plague disease

จากการสำรวจการเกิดโรค White plague บริเวณทางตอนเหนือของ Florida Keys พบว่าโรคจะส่งผลกับปะการัง 6 สายพันธุ์ และกลุ่มปะการังเคลือบ (encrusting coral) (Dustan, 1977) ซึ่งจะขยายตัวไปตามพื้นผิวปะการัง การติดเชื้อของปะการังจะเริ่มจากขอบฐานของโคโลนี และลุกลามไปถึงโครงร่างจุดกึ่งกลางของปะการัง (ภาพที่ 2-5) โดยอัตราการขยายตัวของโรคระหว่างเนื้อเยื่อที่มีสุขภาพดี และที่มีการติดเชื้อ โดยในหนึ่งวันจะมีการขยายตัวไม่กี่มิลลิเมตร และจะขยายตัวไปจนทั่วทั้งโคโลนี

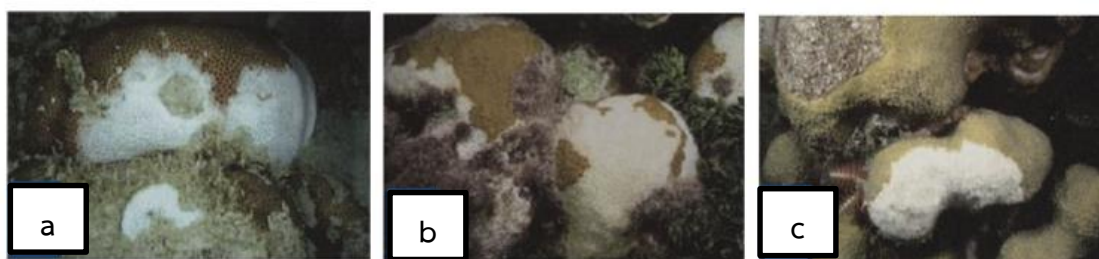


ภาพที่ 2-5 ลักษณะเนื้อเยื่อและโครงร่างของปะการังที่เป็นโรค White plague (a – c)

(ที่มา: Bythell et al., 2003)

ความแตกต่างในการกำหนดชนิดของ white plague แบ่งออกเป็น 3 ลักษณะ ซึ่งจะสังเกตได้จากลักษณะการเกิดรอยโรค โดย white plague type I มีการลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี แตกต่างกับ white plague type II เริ่มจากฐานของโคโลนี และ white plague type III มีการระบาดของโรคอย่างรุนแรง และรวดเร็วโดยมีการลุกลามเป็น เซนติเมตรต่อวัน (Richardson et al., 2001) จากรายงานของ Dustan (1977) กล่าวว่า โรคที่เกิดขึ้นมีการถ่ายทอดระหว่างโคโลนีที่ติดกัน พบการระบาดเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว คือ มากกว่า 2 เซนติเมตรใน 1 วัน โดย white plague type II มีอัตราการลุกลามอย่างรวดเร็ว โดยความชุกชุมของโรคเกิดมากใน elliptical star coral, *Dichacaenia stokesii* ที่เกิดขึ้นในทางเหนือของ Florida Keys ส่งผลกับโคโลนีที่มีขนาดเล็ก (ปกติมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร หรือน้อยกว่า)

White plague มีความผิดปกติในรูปแบบของขอบเนื้อเยื่อ แต่ลักษณะของอาการจะแตกต่างกัน เช่นพบการกระจาย เป็นหย่อม ๆ ของโครงสร้างที่เปลี่ยนแปล่า (ภาพที่ 6a – 6c) ซึ่งโรคนี้ไม่เกิดการติดต่อ แต่เกิดจากการกัดกินของสัตว์นักล่า เช่น corallivorous snails (*Coralliophila* sp.) และ fireworms (*Hermodice* sp.) บริเวณเนื้อเยื่อจากโครงร่างของปะการัง ซึ่งเป็นสาเหตุให้เกิดการติดเชื้อโรคในปะการังได้ (Bythell et al., 1993)



ภาพที่ 2-6 ลักษณะการหลุดลอกของเนื้อเยื่อและโครงร่างของปะการัง ที่เกิดจากการกัดกินของสัตว์นักล่า (a – c) (ที่มา: Bythell et al., 2003)

ลักษณะของโรคแถบขาวมีการเจริญมาจากเนื้อเยื่อที่มีการติดเชื้อ แล้วแพร่กระจายออกอย่างสม่ำเสมอตามความยาวของขอบแผล จึงทำให้เป็นขอบโค้งตามชนิดของปะการัง อาการของโรคแถบขาวมีการระบาดอยู่ในกลุ่ม ปะการังก้อน (massive species) ทั้ง Indo-Pacific และ Caribbean โดยโรคแถบขาวจะพบอยู่ในกลุ่ม *Acropora* species และ massive species โดย (White band disease: WBD) ซึ่งมีความสัมพันธ์กับเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio carchariae*

2.4.3.2 White Pox Disease (WPD)

White pox disease (WPD) มีการรายงานการระบาดครั้งแรกในปี 1990 ที่แนวปะการัง Off key ทางตะวันออกของ Florida Keys ซึ่งสาเหตุเกิดจากความเครียด ทำให้ปะการังเกิดการอ่อนแอ ส่งผลให้แบคทีเรีย *Serratia marcescens* เกิดการกระจายไปทั่วทั้งบริเวณ ลักษณะของโรคเป็นจุดสีขาว และปื้นสีขาว กระจายทั่วโคโลนีของปะการัง (ภาพที่ 2-7) พบในปะการังเขากวาง *Acropora palmata* จากรายงานเกิดจากเชื้อแบคทีเรีย *Serratia marcescens* ที่มีความจำเพาะกับปะการังในกลุ่ม *Acropora* ที่เกิด WPD ในแนวปะการัง Florida Keys จากการสำรวจพบปะการังมีรอยโรค 8 – 40% ของโคโลนี และตรวจพบเชื้อแบคทีเรีย *S. marcescens* ในเมือกและเนื้อเยื่อปะการัง *A. palmata* (Jessica et al., 2015)



ภาพที่ 2-7 ลักษณะการเกิดโรค White pox disease (ที่มา: Weil & Rogers, 2011)

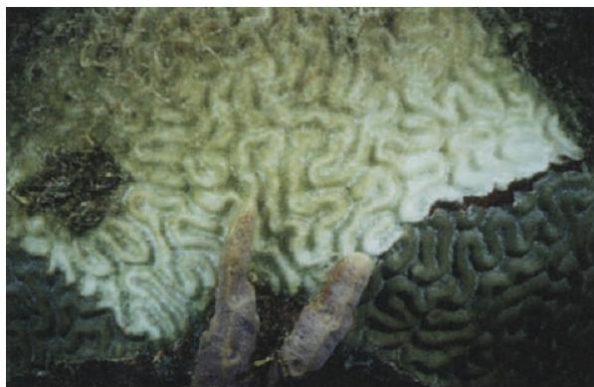
2.4.3.3 White Band Disease (WBD)

White band disease (WBD) เกิดครั้งแรกในปี 1970 ที่ Greater Caribbean (Gladfelter et al., 1977) ระบาดครั้งแรกในปะการังเขากวาง *Acropora cervicornis* และ *A. palmata* โดย WBD เริ่มจากฐานของปะการังแล้วเจริญไปทั่วทั้งโคโลนี (ภาพที่ 2-8) เนื้อเยื่อจะถูกทำลาย และมีการตายอย่างรวดเร็ว ทำให้เกิดการตายภายใน สัปดาห์ วัน หรือ ชั่วโมงคั้น ในการศึกษาช่วงต้น Antonius (1982) กล่าวว่าโรคแถบขาวอาจเกิดจากสภาวะเครียดของเนื้อเยื่อ หรือเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า 'shut-down reaction' ที่เป็นผลมาจากสิ่งแวดล้อมจึงทำให้เกิดสภาวะเครียดของปะการัง ทำให้เชื้อก่อโรคสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อปะการังได้ง่าย



ภาพที่ 2-8 ลักษณะการเกิดโรค White band disease (ที่มา: Weil and Rogers, 2011)

จากการศึกษาเนื้อเยื่อของปะการังเกิดโรค WBD บริเวณ ทะเลแคริบเบียน และอินโดแปซิฟิก พบว่าแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุให้เกิดโรค WBD ไม่ใช่ตัวก่อให้เกิดโรคที่แท้จริง แต่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของฤดูที่อาจมีผลทำให้เกิดโรค WBD เปลี่ยนไปเป็นโรคแถบดำ back band diseases (BBD) (ภาพที่ 2-9) และอาจมีการพัฒนามาจากกลุ่มเดียวกับโรค WBD (Weil et al., 2002)



ภาพที่ 2-9 การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของปะการังจาก โรคแถบขาวเปลี่ยนแปลงเป็นโรคแถบดำ (ที่มา: Bythell et al., 2003)

2.4.4 Bacterial bleaching

Bacterial bleaching เริ่มเกิดขึ้นเมื่อ ปี 1993 โดยเกิดขึ้นในฤดูร้อนทางตะวันออกเฉียง
ของทะเลเมดิเตอร์เรเนียน ในปะการัง *Oculina patagonica* (Fine and Loya, 1995)
พบลักษณะเนื้อเยื่อเกิดการหลุดลอก และเกิดการฟอกขาวไปทั่วทั้งโคโลนี (ภาพที่ 2-10) และ
จากรายงานการระบาดพบว่าเกิดการติดเชื้อจากแบคทีเรีย *Vibrio shiloi* ซึ่งเป็นสาเหตุของการ
bleaching และการติดเชื้อมักเกิดขึ้นเมื่ออุณหภูมิของน้ำทะเลสูงกว่า 25 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็น
ปัจจัยให้เกิดความรุนแรงของเชื้อ *V. shiloi* มากยิ่งขึ้น (Rosenberg and Zilber, 2008)



ภาพที่ 2-10 ลักษณะการเกิดโรค Bacterial bleaching (ที่มา: <http://www.artificialreefs.org/Corals/diseasesfiles/Common%20Identified%20Coral%20Diseases.htm>)

2.4.5 โรคขาวอื่นๆ ที่เกิดจากแบคทีเรีย

Patchy necrosis การตายของเนื้อเยื่อเป็นหย่อม ๆ (Rodriguez-Martinez et al., 2001) พบแผลโค้งมนทั่วทั้งโคโลนี และรอยแผลมีการขยายขนาดได้ในเวลาอันรวดเร็ว มากกว่า 10.5 ตารางเซนติเมตรต่อวัน (Patterson et al., 2002) และจะเชื่อมต่อกันไปเรื่อยๆ และตายไปทั่วทั้งโคโลนี พบในกลุ่ม ปะการังก้อน (ภาพที่ 2-6) แบคทีเรียหลายชนิดสามารถก่ออาการขาวและโรคปะการังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรียแสดงดังตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 โรคติดเชื้อแบคทีเรียในปะการัง (ที่มา: Raymundo, 2008)

ชื่อโรค	เชื้อก่อโรค	อาการ	ชนิดของปะการัง
White band	<i>Vibrio charcharia</i>	แถบขาวเริ่มจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ แล้วแพร่กระจายตามความยาวของขอบแผล	<i>Acropora</i> species และ massive species
White band II	<i>Vibrio carchariae</i>	เริ่มจากเนื้อเยื่อที่ติดเชื้อ แล้วแพร่กระจายตามความยาวของขอบแผล	<i>Acropora cervicornis</i>
White plague II	<i>Aurantimonas coralicida</i>	พบปื้นขาวเป็นหย่อม ๆ และมีการกระจายของปื้นขาว	<i>Diploria labyrinthiformis</i>
White pox	<i>Serratia marcescens</i>	จุดและปื้นสีขาว กระจายทั่วโคโลนีของปะการัง	<i>Acropora palmata</i>
Black band	Cyanobacteria	แถบสีดำมีการพาดผ่านตัวปะการัง ระหว่างส่วนที่ถูกทำลายเนื้อเยื่อ และส่วนที่ยังปกติ	<i>Diploria strigosa</i>
Bacterial bleaching	<i>Vibrio coralliilyticus</i> และ <i>V. shiloi</i>	เนื้อเยื่อหลุดลอก และเกิดการฟอกขาวไปทั่วทั้งโคโลนี	<i>Oculina patagonica</i>
Yellow band	เกิดจากแบคทีเรียร่วมหลายสายพันธุ์	วงแหวนสีเหลืองกระจายอยู่ทั่วโคโลนี	<i>Montastraea faveolata</i>

2.5 โรคปะการังที่เกิดในประเทศไทย

ลัดดาวัลย์ แสงสว่าง (2554) ศึกษาโรคปะการังที่เกิดขึ้นในประเทศไทย บริเวณเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี โดยศึกษาปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สัมพันธ์กับการเกิดโรคปะการัง ในช่วง 2 ฤดู คือ ฤดูแล้ง และฤดูฝน เก็บข้อมูลโรคที่เกิดในปะการังโดยวิธี Line intercept และ Belt Transect พบปะการังชนิดเด่น คือ *Porites lutea* และ *Pavona decussata* มีรายงานการเกิดโรค 5 ลักษณะ คือ ปื้นชมพู (pink patch), จุดชมพู (pink spot), วงปื้นขาว (white patch), จุดขาว (white spot) และสิ่งมีชีวิตเจาะไช (borer) โดยปะการัง *Porites lutea* มีการเกิดโรคมากที่สุด และพบโรคจุดขาวมากที่สุด ซึ่งจะพบการเกิดโรคได้มากในบริเวณใกล้แหล่งปล่อยน้ำเสียจากชุมชน

Sirusa and Pongsa (2014) สำรวจโรคปะการัง บริเวณแนวปะการังน้ำตื้นของเกาะสมุย จังหวัดสุราษฎร์ธานี และอีก 4 เกาะ บริเวณใกล้เคียงกัน รายงานพบโรคในปะการัง 6 โรค ได้แก่ White Plague (WP), Pink Line Syndrome (PLS), *Porites* White Patch Syndrome (WPS), *Porites* Trematodiasis (PTR), White Syndrome (WS) และ Pacific Yellow Band Disease (YBD) จากการศึกษาพบว่าปะการังชนิด *Porites lutea* เป็นปะการังชนิดเด่นในบริเวณที่มีการศึกษา และมีการติดเชื้อ Pink Line Syndrome (PLS) สูงที่สุด ซึ่งบริเวณแนวปะการังน้ำตื้นของเกาะสมุยมีการติดเชื้อสูงที่สุดจาก 4 บริเวณที่มีการศึกษา

Roder et al. (2014) ศึกษาการเกิดโรคในปะการัง บริเวณเกาะเต่า จังหวัดชุมพร ประเทศไทย โดยศึกษารูปแบบของการเคลื่อนที่ การรวมกลุ่มของแบคทีเรีย ในปะการังที่มีสุขภาพดี และปะการังที่เป็นโรค ในปะการัง 2 ชนิดคือ *Pavona duerdeni* และ *Porites lutea* บริเวณแนวปะการังเกาะเต่า โดยศึกษาลำดับเบสตำแหน่ง 16S rRNA ของแบคทีเรียที่พบในปะการัง จากการศึกษาพบกลุ่มเชื้อก่อโรคชนิดเด่น คือกลุ่มเชื้อในวงศ์ Alteromonadaceae, Rhodobacteraceae, Vibrionaceae

Kenkel (2007) สำรวจการเกิดโรคในแนวปะการังทางภาคใต้ของประเทศไทย พบมีการเกิดโรคทั้งหมด 20 โรค จากทะเลอันดามัน และอ่าวไทย โดยทางทะเลอันดามัน พบมีอัตราการเกิดโรค 68% ของโรคทั้งหมด และทางฝั่งอ่าวไทยมีอัตราการเกิดโรค 80% จากโรคทั้งหมด ซึ่งสาเหตุเกิดขึ้นจากการพัฒนาชายฝั่ง และการท่องเที่ยว บริเวณชายฝั่งทางตะวันตกของภูเก็ต เกาะพีพี เกาะหลีเป๊ะ และเกาะเต่า จากการสำรวจมี 4 โรค ที่พบมาก คือ White Syndrome (WS), Pink-line syndrome (PLS), Black band disease (BBD) และ Aspergilliosis (ASP) โดยมีปัจจัยต่าง ๆ เข้ามาเกี่ยวข้องต่อการเกิดโรคปะการัง เช่นการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ น้ำ การเพิ่มขึ้น

ของสารอาหาร และตะกอนที่ละลายในน้ำที่เกิดจากการพัฒนาชายฝั่ง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ส่งผลให้ปะการังเกิดความเครียด และมีการเกิดโรคขึ้นในที่สุด

2.6. การเพาะเลี้ยงปะการัง

การเพาะเลี้ยงปะการังซึ่งสามารถเลี้ยงได้ทั้งในระบบปิด และระบบเปิด ในการเลี้ยงควรคำนึงถึงปัจจัยทางสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ในระบบเลี้ยงเพื่อให้ปะการังดำรงชีวิตได้ ระบบการเลี้ยงปะการังซึ่งมี 2 ระบบดังนี้

2.6.1 การเลี้ยงปะการังแข็ง แบบระบบปิด

การเลี้ยงปะการังแข็ง แบบระบบปิด หรือในตู้กระจก ต้องการดูแลเป็นอย่างมาก เนื่องจากปะการังมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงค่อนข้างสูง และสามารถตายได้ในช่วงระยะเวลาข้ามคืน ถ้าหากได้รับการดูแลอย่างไม่ถูกวิธี ข้อคำนึงถึงปัจจัยการเลี้ยงปะการังซึ่งมีดังนี้

- ความเพียงพอของแสงในระบบเลี้ยง ตามธรรมชาติปะการังแข็ง ดำรงชีวิตอยู่ในทะเลไม่ลึกมาก จึงมีความต้องการแสงที่ค่อนข้างสูง ดังนั้นในระบบเลี้ยงจึงควรมีพลังงานจากแสงที่เพียงพอ โดยพลังงานแสงเบื้องต้นควรใช้หลอด Metal halide 250 W
- สารอาหารของปะการังแข็ง คือแร่ธาตุในน้ำ ที่มีแพลงตอนพืช และแพลงตอนสัตว์ ในปริมาณที่เหมาะสม เพราะปริมาณแพลงตอนที่มากเกินไปในระยะสั้น ส่งผลให้น้ำในระบบเลี้ยงมีคุณภาพน้ำต่ำลง
- การจัดวางปะการัง ในระบบเลี้ยง ควรวางไว้จุดที่ไม่ต่ำจากผิวน้ำจนเกินไป เพื่อให้ได้รับแสงอย่างทั่วถึง การจัดวางแบบถาวร ควรใช้กาว (Epoxy) ติดปะการังกับหินและไม่ควรเคลื่อนย้ายบ่อย ๆ เนื่องจากจะทำให้ปะการังเครียดและตายได้ นอกจากนี้ไม่ควรเลี้ยงปะการังแข็งร่วมกับปะการังอ่อน
- คุณภาพของน้ำทะเล ค่าอุณหภูมิน้ำเป็นสิ่งสำคัญที่สุดเนื่องจากปะการังแข็งมีความไวต่อการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ อุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเลี้ยงอยู่ระหว่าง 25-30 องศาเซลเซียส ซึ่งการทำให้อุณหภูมิคงที่ทั้งวันเป็นสิ่งจำเป็น กล่าวคืออุณหภูมิที่เปลี่ยนแปลงแม้เพียง 1 องศาเซลเซียส สามารถก่อความเครียดในตัวปะการัง จนเกิดการฟอกขาวได้ ความเค็มที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงปะการังอยู่ที่ 30-36 ส่วนในพัน (ppt) ในการเลี้ยงควรตรวจสอบความเค็มอย่างสม่ำเสมอ และให้ค่าความเค็มคงที่ ส่วนค่าคุณภาพของน้ำทะเลอื่น ๆ เช่น ไนโตรเจน, ไนเตรท, ฟอสเฟต และแอมโมเนีย ควรมีการตรวจสอบคุณภาพน้ำอย่างสม่ำเสมอ เพื่อให้ปะการังแข็งดำรงชีวิตในระบบเลี้ยงแบบปิด ให้มีสุขภาพดี และควรควบคุมระดับแคลเซียม

อัลคาไลนิตี้ เพราะเป็นส่วนประกอบหลักในการเจริญเติบโตของโครงร่าง จึงควรเติมแคลเซียมให้เพียงพอต่อความต้องการของปะการัง

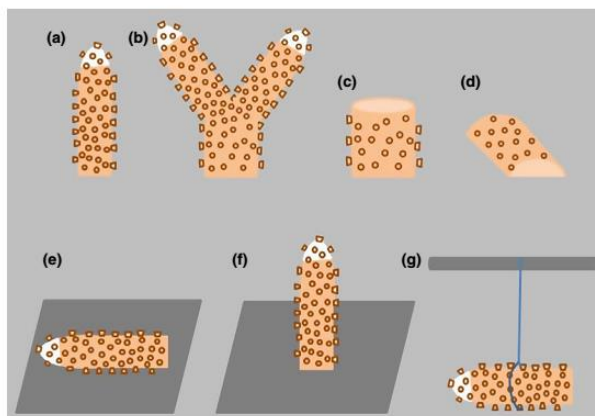
2.6.2 การเลี้ยงปะการังแข็งในระบบเปิด

2.6.2.1 การขยายพันธุ์ย้ายปลูกรังปะการังแข็ง

2.6.2.1.2 การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศเป็นการขยายพันธุ์ภายในเวลาที่รวดเร็ว และจะมีลักษณะทางพันธุกรรมที่เหมือนเดิม โดยจะมีการขยายขนาดโคโลนีให้ใหญ่ขึ้น และแยกออกไปอีกโคโลนีหนึ่ง

การย้ายปลูกรังปะการังกิ่ง หรือการนำชิ้นส่วนปะการังมาทำการย้ายปลูกรัง ต้องเป็นปะการังที่มีสุขภาพดี และไม่มีโรค หรือฟอกขาว (ทงศ์ศักดิ์ จันทร์เมธาภูล, 2545) และไม่ควรเป็นชิ้นส่วนที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากจะมีโอกาสตายสูง โดยกระแสน้ำที่แรง และการตกตะกอน จะปกคลุมชิ้นส่วนของปะการังทำให้ชิ้นส่วนขนาดเล็กมีโอกาสรอดได้น้อย และชิ้นส่วนขนาดใหญ่ของปะการังจะมีโอกาสรอดได้มากเนื่องจากสามารถทนกับกระแสน้ำได้ดีกว่า และสามารถเปลี่ยนแปลงโครงสร้างให้เหมาะสมกับปริมาณการตกของตะกอน วิธีย้ายปลูกรังชิ้นส่วนของปะการัง จึงเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพสำหรับการย้ายปลูกรัง (Nagelkerken et al., 2000) หลังจากทำการอนุบาลในโรงเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลาหนึ่ง สามารถย้ายปลูกรังไปยังทะเลได้โดย Leal et al. (2014) แบ่งการขยายพันธุ์ของปะการังด้วยวิธีการการนำชิ้นส่วนของปะการังมาทำการย้ายปลูกรังได้เป็น 7 วิธี (ภาพที่ 2-11)



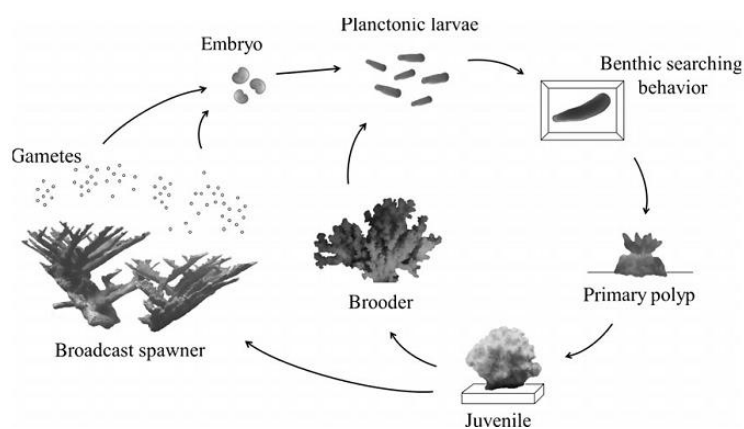
ภาพที่ 2-11 วิธีการจัดวางชิ้นส่วนปะการังเพื่อทำการขยายพันธุ์ (a) ขยายพันธุ์โดยนำชิ้นส่วนปลายกิ่งเดียวของปะการังมาทำการย้ายปลูก, (b) นำชิ้นส่วนกิ่งที่มีการแยกออกเป็น 2 แฉกมาขยายพันธุ์ (dichotomous), (c) นำชิ้นส่วนกลางของกิ่งปะการังมาขยายพันธุ์, (d) นำชิ้นส่วนปะการังที่มีรูปร่างแบนมาขยายพันธุ์, (e) ทำการวางชิ้นส่วนปะการังในแนวอนมาขยายพันธุ์, (f) ทำการขยายพันธุ์โดยวางชิ้นส่วนปะการังในแนวตั้งตรง, (g) ทำการขยายพันธุ์โดยแขวนชิ้นส่วนปะการัง ส่วนใหญ่ชิ้นส่วนปะการังที่เพาะเลี้ยงในทะเลมักจะยึดติดอยู่กับฐานที่มั่นคง เช่น หินคอนกรีต, พลาสติก, เชือก เพื่อป้องกันกระแสน้ำ และกระแสน้ำซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะช่วยให้ปะการังที่เลี้ยงรอดได้ (ที่มา: Leal et al., 2014)

2.6.2.1.3 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ

การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศเป็นเรื่องที่ค่อนข้างใหม่ในการเพาะเลี้ยงปะการังแข็ง (scleractinian) การสืบพันธุ์ของปะการังมีทั้งแบบแยกเพศ และส่วนใหญ่เป็นปะการังกะเทย คือมีทั้ง 2 เพศอยู่ในโคลนีเดียวกัน (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556) ข้อดีของการสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ เพื่อเพิ่มจำนวนประชากรของสายพันธุ์ปะการัง และให้เกิดความหลากหลายทางพันธุกรรมในการสืบพันธุ์ของปะการัง (Baird et al., 2009) การปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ (ภาพที่ 1-12) มักสัมพันธ์กับการโคจรของดวงจันทร์ หรือทางจันทรคติ ปะการังแข็งส่วนมากมักปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ หลังจากพระจันทร์เต็มดวง (ขึ้น 15 ค่ำ) ซึ่งจะอยู่ในช่วงน้ำตาย เป็นช่วงที่มีการเคลื่อนตัวของกระแสน้ำที่ไม่แรงมาก ดังนั้นโอกาสที่ไข่จะได้รับการผสมกับสเปิร์มจึงมีมาก (ทองศักดิ์ จันทรเมธากุล, 2545)

- Spawner เป็นปะการังที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาผสมภายนอก โดยจะเกิดการปฏิสนธิเป็นตัวอ่อนภายในมวลน้ำ (external fertilization) โดยปะการังส่วนใหญ่จะปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกมาครั้งเดียวในรอบปี และครั้งละมาก ๆ เช่นกลุ่มปะการังเขากวาง (*Acropora* spp.)

- Brooder เป็นปะการังที่มีการปฏิสนธิภายในโคโลนี (internal fertilization) โดยจะปล่อยตัวอ่อน (planula) ออกมา ซึ่งหลังการปฏิสนธิจะมีปริมาณการปล่อยตัวอ่อนครั้งละไม่มาก แต่จะปล่อยเป็นประจำ ได้ทุกเดือน และตลอดปี ซึ่งตัวอ่อนแต่ละชนิดจะใช้ระยะเวลาล่องลอยในมวลน้ำแตกต่างกันไป และจะลงเกาะในพื้นที่ที่เหมาะสม เช่น บริเวณที่พื้นที่แข็ง (กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง, 2556) ซึ่งทางศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งตะวันออก เกาะมันใน จังหวัดระยอง ได้ใช้ถุงเก็บเซลล์สืบพันธุ์ครอบบนก้อนปะการังในช่วงเย็นก่อนพระอาทิตย์ตก และกลับไปเก็บรวบรวมถุงเก็บเซลล์สืบพันธุ์ เพื่อนำมาผสมเทียม โดยให้ลงเกาะบนแผ่นกระเบื้องดินเผา และเลี้ยงให้เจริญเติบโตในโรงเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 2-12 การสืบพันธุ์แบบอาศัยเพศ (ที่มา: Leal et al., 2014)

2.6.2.2 ปัจจัยที่ควบคุมการเจริญเติบโตของปะการังในระบบปิด

- แสง ปะการังส่วนใหญ่ต้องการแสงที่เหมาะสมเพื่อการเจริญเติบโต โดยแสงมีส่วนในการเปลี่ยนแปลงสภาพทางสรีระ โครงสร้าง รูปร่าง สี อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของปะการัง ก็ขึ้นอยู่กับปรับตัวให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของแสงที่แตกต่างกัน แสง ประกอบด้วย เชิงปริมาณ (รังสี), คุณภาพ (คลื่นแสง) และชนิดของแหล่งกำเนิดแสง ปริมาณแสงจะถูกวัดเป็นควอนตัมรังสี แหล่งกำเนิดแสงที่ใช้สำหรับการเพาะเลี้ยงปะการัง คือ

หลอดไฟ LED (Light-emitting diode) มีประสิทธิภาพในการเปล่งแสง เป็นพลังงาน (Wijgerde et al., 2014)

- สารอาหารที่สำคัญของปะการัง ส่วนใหญ่เป็นธาตุอาหารจำพวกไนโตรเจน คาร์บอน และฟอสฟอรัส โดยเฉพาะธาตุฟอสฟอรัส และไนโตรเจน มีความจำเป็นสำหรับการผลิตพลังงานของปะการัง (Ferrier et al., 2003) โดย symbionts มีความต้องการสารอาหารอินทรีย์จำพวกไนโตรเจน ซึ่งปะการังไม่สามารถใช้งานได้จึงถูกขับออกมา โดย symbionts จะนำยูเรีย และแอมโมเนียที่ปล่อยออกมาจากปะการัง นำกลับมาใช้ใหม่ จนเข้าสู่กระบวนการสังเคราะห์แสง จึงเกิดเป็นพลังงานให้กับปะการัง และการได้รับอาหารก็อาจจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสีในปะการัง (Borneman, 2002)

- การไหลของน้ำ และการเคลื่อนไหวของน้ำเป็นตัวกำหนดรูปร่างของปะการัง และรูปแบบการเจริญเติบโต การไหลของน้ำยังเป็นการเพิ่มอัตราการหายใจ เพิ่มอัตราการเติบโต และกำจัดขยะบริเวณพื้นผิวปะการัง (Kaandorp and Kubler, 2001)

- ปัจจัยทางกายภาพ และทางเคมีของน้ำเป็นสิ่งสำคัญที่ทำให้ปะการัง มีการเจริญเติบโตที่ดี พารามิเตอร์ที่สำคัญ ได้แก่ ความเค็ม อุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง และออกซิเจนในขณะที่ยังต้องประกอบกับเคมีอื่น ๆ เช่น แคลเซียม และแมกนีเซียม ก็มีความสำคัญสำหรับการเพาะเลี้ยง โดยน้ำทะเลธรรมชาติจะมีธาตุอาหารที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงปะการัง ส่วนน้ำทะเลเทียมจะมีสารอาหารในปริมาณน้อย แต่มีข้อดีในส่วนของควบคุมโรค (Sheridan et al., 2013)

2.6.3 ระบบน้ำในการเลี้ยงปะการัง

ระบบน้ำสำหรับการเลี้ยงปะการังในระบบปิดแบ่งออกได้เป็น 2 วิธี คือ การใช้น้ำแบบหมุนเวียนในระบบเลี้ยง (recirculating aquaculture systems : RAS) และการสูบน้ำทะเลสดเข้าสู่ระบบเลี้ยง (flow-through aquaculture systems : FTAS) (Martins et al., 2010) ซึ่งน้ำเป็นแหล่งสำคัญสำหรับการปนเปื้อนของเชื้อก่อโรค ที่มาจากสภาวะแวดล้อมทางธรรมชาติ การใช้น้ำทะเลโดยไม่ต้องผ่านระบบกรอง หรือฆ่าเชื้อด้วย UV เป็นสาเหตุให้เกิดการเพิ่มขึ้นของความรุนแรงในการติดเชื้อ และการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย ในระบบโรงเพาะเลี้ยงปะการัง (Kimes et al., 2012)

2.7 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.7.1 โรคในปะการังที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

เป็นเวลากว่า 40 ปี ที่มีการค้นพบการเกิดโรคในปะการัง ส่งผลให้ประชากรปะการังลดลงอย่างต่อเนื่อง และเกิดการแพร่ระบาดของเชื้อก่อโรค ทั่วโลก Muller and Woesik (2012) ได้ทำการศึกษาระบาดของโรคปะการัง บริเวณทะเลแคริบเบียน โดยตั้งสมมุติฐานถึงโรคที่เกิดในปะการัง คือเป็นโรคที่ติดต่อ และเชื้อมีการระบาดจากตัวเจ้าบ้าน โดยใช้การระบาดเชิงพื้นที่ จัดกลุ่มจาก 1 เมตร ถึง 10 กิโลเมตร ที่ทำให้เกิดโรค yellow-band disease, dark-spot syndrome และ white-plague disease พบว่าการเกิดโรคในปะการังสามารถเกิดได้จาก (1) สิ่งแวดล้อม (2) ความเครียดที่มีผลทำให้ปะการังเกิดการอ่อนแอ จนทำให้เกิดการติดเชื้อ หรือสภาวะแวดล้อมเป็นปัจจัยให้เกิดการเพิ่มความรุนแรงของเชื้อก่อโรค

นอกจากนี้การติดเชื้อของปะการังยังมีอีกหลายสาเหตุ เช่นการถูกทำลายโดยสัตว์ ไม่มีกระดูกสันหลัง จำพวกหอย *Coralliophila abbreviate* และ *C. caribaea* โดยมีการศึกษาการส่งผ่านโรค White Band Disease (WBD) ในระบบน้ำไหลผ่าน ที่มีปะการังเขากวาง (*Acropora cervicornis*) และ หอย *C. abbreviate*, *C. caribaea* พบว่าหอย *C. abbreviate* และ *C. caribaea* เป็นตัวการทำให้เนื้อเยื่อปะการังได้รับความเสียหาย และนำไปสู่การติดเชื้อโรค (WBD) ในระบบน้ำที่มีการไหลผ่าน จึงทำให้เกิดการแพร่กระจายของเชื้ออย่างรวดเร็ว (Gignoux et al., 2012)

2.7.2 การจำแนกเชื้อด้วยคุณสมบัติของโคโลนี และทางชีวโมเลกุล

การจำแนกเชื้อในปะการัง สามารถศึกษาได้จากความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย และเมือกในปะการัง ด้วยคุณสมบัติของโคโลนี โดยนำเนื้อเยื่อและเมือกมาทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูปริมาณแบคทีเรีย และวิเคราะห์ด้วยการศึกษาลำดับเบสบนสายดีเอ็นเอ Charlotte et al. (2011) ได้ทำการศึกษาค่าความสัมพันธ์ของแบคทีเรียในปะการัง *Acropora millepora* และความสามารถของเมือกปะการัง ในการเข้ายับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยนำเนื้อเยื่อ และเมือกมาทดลองบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อดูปริมาณแบคทีเรียรวม และ *Vibrio* spp. วิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวโมเลกุล ด้วยเทคนิค gel electrophoresis และตรวจสอบวิเคราะห์ดีเอ็นเอของแบคทีเรียที่ยีน 16S rRNA ผลการศึกษาพบว่าในปะการังที่มีสุขภาพดีจะพบแบคทีเรียในกลุ่ม Gammaproteobacteria อยู่ในเมือกของปะการังทำหน้าที่ยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย

Wilson et al. (2012) ศึกษาการเกิด white syndrome ในปะการัง *Acropora* (AWS) โดยเก็บตัวอย่างทั้งปะการังที่มีสุขภาพดี และปะการังที่เป็นโรค บริเวณ American Samoa

และศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรีย และ AWS โดยเลี้ยงเชื้อจากเนื้อเยื่อและเมือกของปะการัง และทดสอบด้วยวิธีการสกัด DNA และใช้วิธีทาง PCR ในการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA พบว่า AWS มีความสัมพันธ์กับเชื้อ *Vibrio* spp.

Sunagawa et al. (2009) ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียในปะการัง *Montastraea faveolata* ที่สุขภาพดี และที่เป็นโรค โดยใช้วิธีทางชีวโมเลกุล ในการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA (16S rDNA) โดยแยกเชื้อจากปะการังที่เป็นโรค ได้รับความเครียด หรือได้รับความเสียหายจากการกินของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง พบว่าเป็นการแสดงออกของโรค White Plague Disease type II (WPD-II) และมีการสะสมของเชื้อจำพวก Alteromonadaceae และ Vibrionaceae

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

3.1.1 อุปกรณ์ และเครื่องแก้ว

จานเพาะเชื้อ

ชุดผ่าตัด ไบโอมิด

ปากคีบ

ตะเกียงแอลกอฮอล์

กระบอกลดแรงดัน

แท่งแก้วเกลี่ยเชื้อ

หลอดทดลอง

ปิเปตเตอร์

ขวดรูปชมพู่

Eppendorf tube

เข็มฉีดยา

กระดาษไนโตรเจนเซลลูโลส

เครื่องมือโครเวฟ บริษัท imaflex

Single Autopipette, tip ขนาดต่างๆ

เครื่องเขย่า (The Belly Dancer, Life science Incorporated)

เครื่องชั่งจุดทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อด้วยความร้อน รุ่น SX-700

เครื่อง Incubator

ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar Flow Clean Bench)

3.1.2 อาหารเลี้ยงเชื้อ

Tryptic Soy Agar, TSA (Difco laboratories)

Thiosulfate citrate bile salt sucrose agar, TCBS (Difco laboratories)

Tryptic soy broth, TSB (Difco laboratories)

MacConkey agar (Difco laboratories)

Oxidation and fermentation, OF test (Difco laboratories)

Triple Sugar Iron, TSI agar (Oxoid)

Motility test (Difco laboratories)

Tryptone Bacto™ (Difco laboratories)

3.1.3 สารเคมี

Sodium chloride

Phosphate buffer saline (PBS)

Goat-anti mouse IgG horseradish antibody peroxidase conjugate
(GAM-HRP) (Jackson)

Diaminobenzidine (DAB) (sigma)

Hydrogen peroxide

1% cobalt chloride

API 20E (Biomérieux, France)

95% เอทานอล

70% เอทานอล

3.2 วิธีการทดลอง

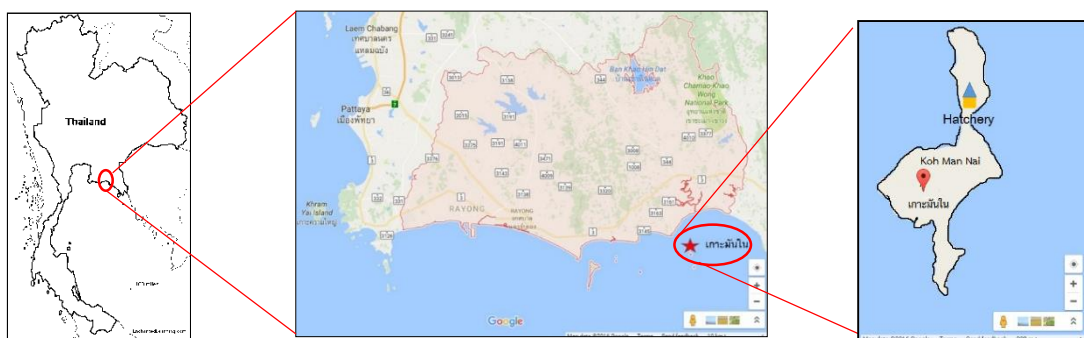
สอบถามข้อมูลประวัติเบื้องต้นการเลี้ยงปะการังสมอร่องยาวกับเจ้าหน้าที่ทางศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ซึ่งได้สังเกตเห็นความสำคัญในการช่วยฟื้นฟูแนวปะการังให้กลับมามีสภาพสมบูรณ์เร็วขึ้น เนื่องจากแนวปะการังในปัจจุบันเกิดการเสื่อมโทรม จากปรากฏการณ์ปะการังฟอกขาว และปัจจัยอื่น ๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง จึงได้ทำการศึกษา ทดลองทำการผสมเทียม และอนุบาลตัวอ่อนของปะการัง จนลงเกาะบนวัสดุที่จัดเตรียมในระบบโรงเพาะเลี้ยง และประสบความสำเร็จกับปะการังสมอร่องยาว *Platygyra daedalea* ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

- สำรวจการพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ปะการังชนิดต่าง ๆ บริเวณแนวปะการังเกาะมันใน และผูกท่อนลอยบนโคโลนีปะการังที่ต้องการ
- เมื่อปะการังที่อยู่ในระยะพร้อมปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ จึงใช้ถุงเก็บเซลล์สืบพันธุ์ครอบเก็บบนก้อนปะการัง ในช่วงเย็นก่อนพระอาทิตย์ตกของวันที่ 1-2 เมษายน พ.ศ. 2556 (แรม 1-2 ค่ำ) และกลับไปเก็บรวบรวมถุงเก็บเซลล์สืบพันธุ์ ในช่วงประมาณ 21.00 น.

- นำเซลล์สืบพันธุ์ของปะการังแต่ละชนิดมาผสมเทียมในโรงเพาะเลี้ยง และติดตามการพัฒนาของตัวอ่อนปะการัง จนตัวอ่อนพัฒนาถึงระยะ planula ที่ใกล้ระยะลงเกาะ
- ย้ายตัวอ่อนระยะ planula มาใส่ถังอนุบาลที่จัดวางแผ่นกระเบื้องดินเผาสำหรับให้ตัวอ่อนลงเกาะ
- อนุบาลตัวอ่อนปะการังที่เกาะบนแผ่นกระเบื้องดินเผาในระบบโรงเพาะเลี้ยง โดยใช้น้ำทะเลที่ไม่ผ่านการกรอง ส่งผ่านน้ำด้วยระบบน้ำล้นจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง พร้อมทั้งให้อากาศตลอดเวลา และควบคุมอุณหภูมิจากการลดหรือเพิ่มปริมาณแสงแดด (รณวัน บุญประกอบ, อัญชลี จันทรัง และสำเริง ใหญ่กล้า, มปป.)

3.4 พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วัยอ่อน และน้ำในระบบเลี้ยงจากโรงเพาะเลี้ยงเกาะมันใน ครั้งที่ 1 วันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2557 และครั้งที่ 2 วันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2557 ณ ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ตำบลปากน้ำกระแจะ อำเภอแกลง จังหวัดระยอง (ภาพที่ 3-1)



ภาพที่ 3-1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาว โรงเลี้ยงปะการังบนเกาะมันใน นอกชายฝั่งจังหวัดระยอง

ในโรงเพาะเลี้ยงมีวิธีการนำน้ำทะเลมาใช้ในระบบเลี้ยง โดยสูบน้ำจากทะเลมาพักไว้ในบ่อพักน้ำแบบวันต่อวันและไม่มีการฆ่าเชื้อโรค หลังจากนั้นจึงปล่อยน้ำผ่านท่อพีวีซีเข้าไปยังถังเลี้ยงขนาด 500 ลิตร โดยระบบน้ำล้น น้ำจะถูกส่งผ่านแต่ละถัง จากถังหนึ่งไปยังอีกถัง ซึ่งถูกควบคุมกลไกโดยระบบน้ำล้นของระดับน้ำในถังเลี้ยง ซึ่งเป็นถังไฟเบอร์ แต่ละถังจะมี

การแขวนแผ่นกระเบื้องดินเผาที่มีโคลนของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนยึดเกาะอยู่หลายขนาดในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกเก็บโคลนที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 1 เซนติเมตร

3.4.1 ระบบการเลี้ยงปะการังสมองร่องยาวในโรงเพาะเลี้ยงศูนย์วิจัยและพัฒนา

ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง

3.4.1.1 การเลี้ยงปะการังสมองร่องยาวในโรงเพาะเลี้ยงศูนย์วิจัยและพัฒนา

ทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง มีรูปแบบการเลี้ยงแบบระบบถังเลี้ยงคือให้ปะการังเกาะบนแผ่นกระเบื้องดินเผา

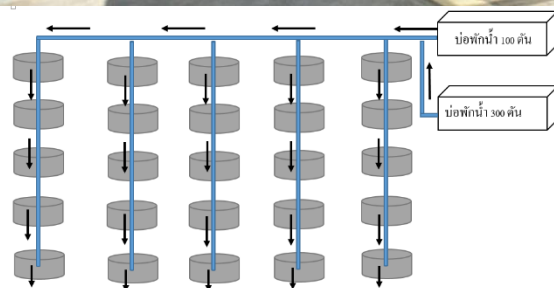
3.4.1.2 ปัจจัยสภาพแวดล้อม วัดค่าพารามิเตอร์ คือ อุณหภูมิ, ออกซิเจนที่ละลายในน้ำ, ปริมาณความเข้มแสง และ pH

3.4.1.3 ระบบน้ำหมุนเวียน ในโรงเพาะเลี้ยง โดยมีการจัดวางบ่อเลี้ยง ดังภาพที่

3-2a, b



a)



b)

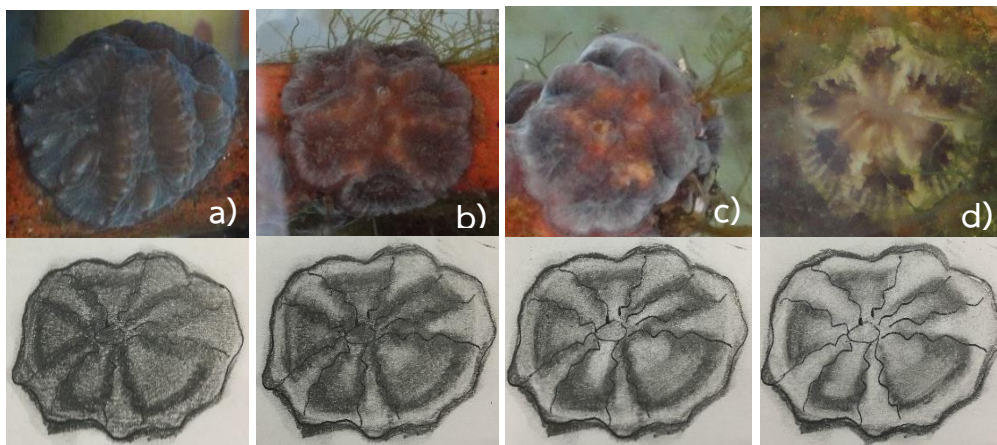
ภาพที่ 3-2 a) สภาพโรงเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และ b) ไดอะแกรมแสดงระบบถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาวด้วยกลไกโดยระบบน้ำดันของระดับน้ำในถังเลี้ยง

ตอนที่ 1 (เก็บตัวอย่างเมื่อได้รับแจ้งให้ตรวจสอบการติดเชื้อของอาการ แถบขาว)

3.5 การสังเกตลักษณะ และประเมินอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อน

ความผิดปกติของอาการแถบขาวของโคโลนีปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนเมื่อเริ่มสังเกตได้ เนื้อเยื่อสีขาวจะปรากฏบริเวณขอบโคโลนี และแถบขาวจะลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี จะสังเกตได้ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ (ภาพที่ a – d) โดยการประเมินระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว ใช้การประเมินด้วยสายตา แบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ ดังนี้

- ระดับ 0 ไม่แสดงอาการแถบขาว 0% = (0)
- ระดับ 1 อาการแถบขาวเริ่มลุกลามบริเวณขอบเนื้อเยื่อ
รอบโคโลนีประมาณ 10 - 20% = (+1)
- ระดับที่ 2 อาการแถบขาวลุกลามไปรอบขอบโคโลนี
และกระจายเข้าสู่ศูนย์กลางโคโลนี ประมาณ >20-60% = (+2)
- ระดับที่ 3 อาการแถบขาวลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี >60% = (+3)



ภาพที่ 3-3 อาการแถบขาวที่ประเมินด้วยสายตา จากปริมาณความขาวต่อพื้นที่โคโลนีปะการัง
จำแนกออกได้ 4 ระดับ a) ระดับ (0) จัดเป็น ปะการังที่ไม่ปรากฏอาการแถบขาว 0%
b) ระดับ (+1) อาการแถบขาวปรากฏเฉพาะบริเวณขอบรอบโคโลนี ความขาว
ประมาณ 10-20% c) ระดับ (+2) อาการแถบขาวลุกลามจากขอบโคโลนี และกระจาย
เข้าสู่ศูนย์กลาง ความขาวประมาณ >20-60% และ d) ระดับ (+3) อาการแถบขาว
ลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี ความขาว >60%

3.6 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงเพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และจำแนกชนิดแบคทีเรีย มีรายละเอียดดังนี้

3.6.1 เก็บตัวอย่างโคโลนีปะการัง

สุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน เมื่อวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2557 ที่ติดบนกระเบื้องในบ่อเลี้ยง จากปะการังที่แสดงอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ เก็บตัวอย่างจำนวน 3 โคโลนี ต่อระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวทางกายภาพของปะการัง บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนแต่ละโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด (วัดจากด้านที่ยาวที่สุดของโคโลนีมีหน่วยเป็นเซนติเมตร)

3.6.2 เก็บตัวอย่างน้ำในถังเลี้ยงปะการัง

จำแนกบ่อเลี้ยงปะการังที่ปรากฏอาการแถบขาวออกเป็น 4 ระดับ สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณผิวน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่มีปริมาตรน้ำ 300 ลิตร มีการให้อากาศหมุนเวียนทั่วถัง จากถังเลี้ยงปะการังที่แสดงอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ ระดับละ 3 ซ้ำ ด้วยหลอด conical ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวม และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไวรัส

3.7 การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อน และน้ำจากถังเลี้ยงปะการัง

3.7.1 เตรียมตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากปะการัง

ดัดแปลงจาก (Charlotte et al., 2011; Wilson et al., 2012)

นำโคโลนีของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวในแต่ละระดับความรุนแรง ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ขูดเมือกและเนื้อเยื่อของปะการังแต่ละโคโลนีด้วยใบมีดที่ปราศจากเชื้อ ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร (หนึ่งหลอดสำหรับ 1 โคโลนี) จากนั้นเจือจางเมือกและเนื้อเยื่อปะการังแต่ละโคโลนีทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แบบ 10-fold serial dilution ที่ระดับความเจือจาง 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นก็ทำการกระจายตัวอย่าง (Spread plate method) ที่เจือจางแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSA) + NaCl 2% และ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) + NaCl 2% ทันที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA และ TCBS เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมจากปะการัง

3.7.2 เตรียมตัวอย่างนำจากถังเลี้ยงปะการัง

เตรียมตัวอย่างนำจากถังเลี้ยงปะการัง และเจือจาง เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยนำน้ำจากถังเลี้ยงปะการัง มาทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ระดับความเข้มข้น 2 เท่าและ 10 เท่า ผสมให้เข้ากัน และหาปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง โดยกระจายตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + NaCl 2% และ TCBS + NaCl 2% ทันที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA และ TCBS

3.8 การจำแนกชนิดแบคทีเรีย

จำแนกชนิดแบคทีเรียออกเป็น 2 กลุ่ม ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + NaCl 2% และ TCBS + NaCl 2% โดยแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จะทดสอบด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับชุดทดสอบ API 20E ตามข้อ 3.8.2 และแบคทีเรียในกลุ่มไวรัสจะถูกนำมาจำแนกชนิด โดยสุ่มโคโลนีบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TCBS ที่มีลักษณะรูปร่างและสีเหมือนกัน คือโคโลนีสีเขียวและโคโลนีสีเหลือง อย่างละ 3 โคโลนี เพื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดีโดยใช้เทคนิค Immuno assay ด้วยวิธี Dot blotting ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อแบคทีเรียไวรัส ตามข้อ 3.8.1 ซึ่งการเตรียมแบคทีเรียเพื่อการจำแนกชนิดทำได้โดยนำแบคทีเรียที่ได้จากปะการังที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรง ที่เจริญบนอาหาร TCBS ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ (TSB) โดยเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $10^8 - 10^9$ CFU/ml ต้มแบคทีเรียด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส 30 นาที

3.8.1 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียไวรัสโดยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนโดยใช้เทคนิค Immuno assay ด้วยวิธี Dot blotting

นำแบคทีเรียที่ได้จากปะการังทั้ง 4 ระดับ ในข้อ 3.8 หยดลงบนกระดาษ Nitrocellulose ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อ 1 จุด โดยใช้แบคทีเรียที่จำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Mouse antibody แสดงใน ตารางที่ 3-1 เป็น positive control ทิ้งให้แห้งและแช่ใน Blocking solution (นมผงปราศจากไขมัน ปริมาณ 5% ใน Phosphate buffered saline (PBS) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PBS – TW 20 (0.05% Tween 20 in PBS) เป็นเวลา 5 นาที 3 ครั้ง และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียไวรัสชนิดต่าง ๆ (เจือจาง 1:200) บ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PBS – TW 20 นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง และนำไปบ่มต่อใน Goat Anti Mouse (GAM-HRP; Jackson Immuno Research Laboratories, INC) (เจือจาง 1:1000) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

ที่อุณหภูมิห้อง ล้างด้วย PBS – TW 20 นาน 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง นำไปทำปฏิกิริยาในสารละลายผสม Diaminobenzidine Tetrahydrochloride (DAB) 3 มิลลิกรัม CoCl₂ 10 ไมโครลิตร และ H₂O₂ 10 ไมโครลิตร ใน PBS 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีเทาเข้มบริเวณหยดแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่จำเพาะกับ positive control จะเปลี่ยนเป็นสีเทาให้อ่านผลเป็นบวก ส่วนหยดแบคทีเรียที่ไม่เปลี่ยนสีให้ถือว่าผลเป็นลบ (Sithigorngul et al., 2006)

ตารางที่ 3-1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอด้วยวิธี

Immunodot blotting

ลำดับ	รหัสโมโนโคลนอลแอนติบอดี	ความจำเพาะต่อชนิดแบคทีเรีย	สถาบัน	แหล่งที่มาของเชื้อแบคทีเรีย
1	VAL 57	<i>Vibrio</i> spp.	SWU	Shrimp pond
2	VAL 83-1	<i>V. alginolyticus</i> 14800	DMSC	Sea food
3	VAL 165/2-1	<i>V. alginolyticus</i> 14800, <i>V. alginolyticus</i> BY2, <i>V. alginolyticus</i> Y16	SWU	Shrimp pond
4	VPV 54-1	<i>V. parahaemolyticus</i> (VPV)	Unknown	Unknown
5	VPV 767	<i>V. parahaemolyticus</i> (VPV) O5:k33	VMARC	Aquatic animal
6	VPC 701	<i>V. parahaemolyticus</i> (VPC) O10:KUT	DMSC	Stool
7	VPB 853	<i>V. parahaemolyticus</i> (VPB) O5:k33	DABU	<i>Penaeus monodon</i>
8	VH 26-11E	<i>V. harveyi</i> 1526	Centex	<i>Penaeus monodon</i>
9	VM 10	<i>V. mimicus</i>	DMST	Rectal swab

หมายเหตุ Centex = หน่วยวิจัยเพื่อความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพกุ้ง คณะวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยมหิดล

DABU = ภาควิชาวาริชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

DMSC = ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์ มหาวิทยาลัย

DMST = กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข

SWU = ภาควิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

VMARC = ทีมสัตว์แพทย์จากศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Unknown = ไม่ทราบแหล่งที่มา

ที่มา : Pengsuk et al. (2010)

3.8.2 การจำแนกแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี ของชุดทดสอบ

API 20 E

แบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยความจำเพาะของโมโนโคลนอลแอนติบอดี ในข้อ 3.8 จะถูกนำมาจำแนกด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ร่วมกับชุดทดสอบ API 20 E

3.8.2.1 คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้นที่ทำการทดสอบมีดังนี้ Motility test, Oxidase test, Oxidation – Fermentation Test, Methyl red and Voges – Proskauer test (MR – VP), Triple Sugar Iron Ager Test (TSI test), Indole test และ Mac Conkey Agar test ดัดแปลงจาก Yaashikaa et al. (2016)

3.8.2.2 ชุดทดสอบ API 20 E (ซื้อจากบริษัท Biomerieux, ตัวแทนในประเทศไทย) ใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบอื่น ๆ สำหรับตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย และความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีวิธีดังนี้ 1) เติมน้ำกลั่นในกล่องพลาสติกบ่มเชื้อ (incubation box) 2) เชื้อเชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์แล้วลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 5 มิลลิลิตร นำไปวัดค่าความขุ่นให้ได้เท่ากับ 0.5 McFarland 3) ใช้ pipette ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดสารละลายแบคทีเรีย (bacterial suspension) ลงในกระเปาะ (micro tubes) เติมหุ่นหลอดเฉพาะในส่วนหลอดกระเปาะปิด (tube) หลอดที่ขีดเส้นใต้ให้เติม mineral oil ปิดทับในส่วน cupule หลอดที่ตัวอักษรอยู่ในกล่องให้เติมแบคทีเรียทั้งในส่วนที่เป็นหลอดปิดและส่วน cupule จากนั้น บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง และตรวจผลของ API 20 E และอ่านผลจาก APILAS Plus Software (<https://apiweb.biomerieux.com>)

ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยงและเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

3.9 การเปลี่ยนถ่ายน้ำ

ย้ายพวงแขวนปะการังไปยังเลี้ยงใหม่ที่ผ่านการทำความสะอาด และมีการเติมน้ำทะเลใหม่ที่ 100% ของปริมาตรน้ำในถังเลี้ยง และให้อากาศกระจายทั่วถังถึง ในวันที่ 30 มกราคม พ.ศ. 2557 จากนั้นทำการสังเกตอาการ และเก็บตัวอย่างปะการังครั้งที่ 2 ในวันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2557

3.10 การสังเกตลักษณะและประเมินอาการแถบขาวของปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อน

สังเกตลักษณะและประเมินอาการแถบขาวปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ตามข้อ 3.5 หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ 1 เดือน

3.11 การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยง ตามขั้นตอนข้อ 3.6 เพื่อนำไปหาปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวม โดยเก็บตัวอย่างในวันที่ 8 มีนาคม พ.ศ. 2557

3.12 การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงปะการัง

เตรียมตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ตามข้อ 3.7.1 และน้ำในถังเลี้ยงปะการัง ตามข้อ 3.7.2

ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย จากบ่อพักน้ำ)

3.13 การเก็บตัวอย่าง

สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำจากบ่อพักน้ำที่เป็นแหล่งของน้ำที่ใช้ในระบบเลี้ยงปะการัง ได้แก่ ปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน ตัวอย่างละ 3 ซ้ำ ด้วยหลอด conical ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม

3.14 การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในบ่อพักน้ำ

เตรียมตัวอย่างน้ำจากบ่อพักน้ำ ได้แก่ น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน ตามข้อ 3.7.2

3.15 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

3.15.1 ตอนที่ 1 (ก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในระบบเลี้ยง)

วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวมจากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยงปะการังที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรง โดยใช้หน่วยในการรายงานปริมาณแบคทีเรียเป็น log CFU/ml. ในการวิเคราะห์ทางสถิติ และหาค่าเฉลี่ยของปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยง ที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ โดยใช้ Analysis of Variance (one way ANOVA) โดยใช้ค่าการตัดสินใจที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) และเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม จากน้ำในถังเลี้ยง และปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวมในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน แล้วแปลงเป็นหน่วย CFU/ml. ในการแสดงผล

3.15.2 ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยงและเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวมจากปะการังวัยอ่อน และตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยง ที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ ตามข้อ 3.15.1 และเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทั้งก่อนและหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ โดยใช้ Univariate Analysis of Variance โดยใช้ค่าการตัดสินใจที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

3.15.3 ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรีย จากบ่อพักน้ำ)

วิเคราะห์ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม แบคทีเรียไวรัสรวมจากบ่อพักน้ำ ได้แก่ น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน โดยใช้หน่วยในการรายงานปริมาณแบคทีเรียเป็น log CFU/ml. ในการวิเคราะห์ทางสถิติ และหาค่าเฉลี่ยของปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากบ่อพักน้ำ โดยใช้ Analysis of Variance (one way ANOVA) โดยใช้ค่าการตัดสินใจที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การศึกษาอาการแถบขาวปรากฏบริเวณขอบสันโคโลนีปะการังสมองร่องยาว (ภาพที่ 4-1) จากโรงเพาะเลี้ยงบนเกาะมันใน ของศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งตะวันออก ตำบลปากน้ำกระแจะ อำเภอแกลง จังหวัดระยอง ถูกนำมาวินิจฉัยการเกิดลักษณะผิดปกติ โดยคาดว่าแบคทีเรียน่าจะเป็นสาเหตุของอาการแถบขาวที่ปรากฏในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในโรงเพาะเลี้ยง จึงทำการตรวจสอบปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวม และจำแนกชนิดเชื้อวิบริโอที่ปนเปื้อนจากเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวน้ำในบ่อเลี้ยงปะการัง และน้ำจากบ่อพักน้ำ และตรวจสอบความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ และจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมที่อาจส่งผลต่อการเกิดอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน



ภาพที่ 4-1 อาการแถบขาวที่ปรากฏบริเวณขอบสันโคโลนีปะการังสมองร่องยาว

ตอนที่ 1 (เก็บตัวอย่างเมื่อได้รับแจ้งให้ตรวจสอบการติดเชื้อของอาการ แถบขาว)

4.1 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม จากน้ำในถัง เลี้ยงปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) ว่ายอ่อนที่มีอาการแถบขาว

4.1.1 น้ำในถังเลี้ยงปะการัง

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำ
ในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แสดงดัง
ตารางที่ 4-1 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-1 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย
วิบริโอรวม (log CFU/ml) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละ
ระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

น้ำในถังเลี้ยงปะการัง		
ระดับความ รุนแรง	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรียวิบริโอรวม log CFU/ml
0	2.42 ± 0.17 ^d	0.74 ± 0.04 ^c
+1	3.21 ± 0.04 ^c	2.39 ± 0.17 ^b
+2	3.84 ± 0.18 ^b	3.69 ± 0.08 ^a
+3	4.91 ± 0.19 ^a	3.79 ± 0.10 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่าง
มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง
สมองร่องยาววัยอ่อน ที่มีอาการแถบขาวจากความรุนแรงทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณ
เชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกระดับความรุนแรง
ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณ
การสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.91 ± 0.19 log CFU/ml ในขณะที่

น้ำในถังเลี้ยงระดับความรุนแรง (+2) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีค่าเฉลี่ย $3.84 \pm 0.18 \log$ CFU/ml. สูงกว่า ระดับความรุนแรง (+1) มีค่าเฉลี่ย $3.21 \pm 0.04 \log$ CFU/ml. และทุกระดับความรุนแรง มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงกว่าระดับ (0) ซึ่งมีค่าเฉลี่ย $2.42 \pm 0.17 \log$ CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาว พบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่าที่ระดับความรุนแรง (+2) และที่ระดับความรุนแรง (+3) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งมีค่า คือ 3.69 ± 0.08 และ $3.79 \pm 0.10 \log$ CFU/ml ตามลำดับ และที่ระดับความรุนแรง (+1) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมรองลงมาคือ มีค่าเฉลี่ย $2.39 \pm 0.17 \log$ CFU/ml และพบว่าอาการแถบขาวที่ชุดควบคุมที่ระดับ (0) มีค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียรวมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย $0.74 \pm 0.04 \log$ CFU/ml

4.1.2 ปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรีย vibrio รวม จากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1 ± 0.15 เซนติเมตร ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แสดงดังตารางที่ 4-2 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-2 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย vibrio รวม (log CFU/ml) จากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

ระดับความรุนแรง	ปะการังสมองร่องยาว	
	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรีย vibrio รวม log CFU/ml
0	5.11 ± 0.52^c	4.81 ± 0.21^c
+1	5.75 ± 0.60^b	5.33 ± 0.05^b
+2	6.01 ± 0.41^b	5.67 ± 0.14^b
+3	6.78 ± 0.69^a	6.53 ± 0.04^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากอาการแถบขาว ในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย 6.78 ± 0.69 log CFU/ml. ระดับความรุนแรง (+1) และระดับความรุนแรง (+2) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมลดลงมา แต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย 5.75 ± 0.60 log CFU/ml และ 6.01 ± 0.41 log CFU/ml ตามลำดับ ส่วนอาการแถบขาว ที่ระดับ (0) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเฉลี่ย 5.11 ± 0.52 log CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio รวมจากอาการแถบขาว ในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio รวม

มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียไวรัสโรรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเฉลี่ย $6.53 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$. ที่ระดับความรุนแรง (+1) และ (+2) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียไวรัสโรรวมรองลงมา โดยมีค่าเฉลี่ย $5.33 \pm 0.05 \log \text{CFU/ml}$ และ $5.67 \pm 0.14 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ ส่วนอาการแถบขาวที่ระดับ (0) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียไวรัสโรรวมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเฉลี่ย $4.81 \pm 0.21 \log \text{CFU/ml}$

4.1.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสโรรวมในปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วิทยอ่อน

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวที่ (0), (+1), (+2) และ (+3) กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในปะการังสมองร่องยาว วิทยอ่อนพบว่า ระดับความรุนแรงของอาการมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียไวรัสโรรวมอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.01$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.879 และ 0.892 ตามลำดับ กล่าวคือเมื่อระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวเพิ่มสูงขึ้น ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียไวรัสโรรวมจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงดังตารางที่ 4-3

ตารางที่ 4-3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสโรรวมในปะการังสมองร่องยาววิทยอ่อน (Pearson's correlation coefficient) (r) (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 1)

ระดับความรุนแรง ของอาการแถบขาว	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r)	
	ปริมาณแบคทีเรียรวม ในปะการังสมองร่องยาว	ปริมาณแบคทีเรียไวรัสโรรวม ในปะการังสมองร่องยาว
0, +1, +2, +3	0.879**	0.892**

** Correlation is significant at the 0.01 level (2-tailed).

4.1.4 ชนิดเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

การศึกษากำหนดชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดี และใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ร่วมกับชุดทดสอบ API 20 E ในปะการังสมองร่องยาว วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว แสดงดังตารางที่ 4-4 มีรายละเอียดดังนี้

ผลการศึกษาเมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดี ต่อแอนติเจนวิบริโอ พบโคโลนีเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว ส่วนใหญ่เป็น *Vibrio* spp. (ด้วยแอนติบอดี VAL57) ในทุกระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว สามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมได้ทั้งหมด 4 ชนิด (ตารางที่ 4-4) พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิด

V. parahaemolyticus เป็นชนิดที่พบมากที่สุด ในทุกระดับของอาการแถบขาว พบการสะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPV) ในปะการังทั้ง 4 ระดับ คือ (0), (+1), (+2) และ (+3) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ซึ่งมีค่า 16%, 8.5%, 25% และ 25% ตามลำดับ และพบการสะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิด

V. parahaemolyticus (ด้วยแอนติบอดี VPV 54-1) ในปะการังระดับ (0) และ (+1) มีค่า 20% และ 8.5% เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPC 701) สามารถพบได้เพียงในระดับ (+1) มีค่า 12% และ เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPB 853) สามารถพบได้ในระดับ (0) และ (+3) มีค่า 8% และ 12.5% ตามลำดับ ในขณะที่แบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VAL 165/2-1) พบมากในระดับ (0) และ (+1) มีค่า 24% และ 6.4% ตามลำดับ และพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VAL 83-1) ได้เพียงในปะการังระดับ 0 ที่ 20% และไม่พบเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. mimicus* (ด้วยแอนติบอดี VM 10) และ *V. harveyi* (ด้วยแอนติบอดี VH 26-11E) ส่วนโคโลนีที่ให้ผลลบต่อการจำแนกชนิดด้วยแอนติบอดีนั้น ในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวจากระดับความรุนแรงที่ (0), (+1), (+2) และ (+3) เมื่อทดสอบต่อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีของชุดทดสอบ API 20 E พบเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด *Providencia rettgi* ในระดับ (0) เชื้อแบคทีเรียชนิด *Pasteurella pneumotropica*, *Ochrobactrum anthropic* ในระดับ (+2) และพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *Aeromonas hydrophila* ในระดับ (+3)

ตารางที่ 4-4 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวม จากปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วัลย์อ่อนที่มีอาการแถบขาว ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะ

ระดับ ความรุนแรง	จำนวน โคโลนี	<i>Vibrio</i> spp.	<i>V. alginolyticus</i>				<i>V. parahaemolyticus</i>			<i>V. mimicus</i>	<i>V. harveyi</i>
		(VAL 57)	(VAL 165/2-1)	(VAL 83-1)	(VPV54-1)	(VPV 767)	(VPC 701)	(VPB 853)	(VM 10)	(VH 26-11E)	
0	25	100%	24%	20%	20%	16%	12%	8%	0%	0%	
+1	47	74.5%	6.4%	0%	8.5%	8.5%	0%	0%	0%	0%	
+2	12	100%	0%	0%	0%	25%	0%	0%	0%	0%	
+3	8	87.5%	0%	0%	0%	25%	0%	12.5%	0%	0%	

ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยง และเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

4.2 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม จากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง และปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว และเปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยง

4.2.1 น้ำจากถังเลี้ยงปะการัง

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แสดงดังตารางที่ 4-5 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-5 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม (log CFU/ml) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)

ระดับความรุนแรง	น้ำในถังเลี้ยงปะการัง	
	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรียวิบริโอรวม log CFU/ml
0	0.62 ± 0.23 ^d	0.26 ± 0.14 ^c
+1	2.21 ± 0.07 ^c	0.80 ± 0.02 ^{bc}
+2	3.10 ± 0.57 ^b	1.59 ± 0.54 ^b
+3	4.35 ± 0.33 ^a	2.54 ± 0.00 ^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ที่มีอาการแถบขาวจากความรุนแรงทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกระดับความรุนแรง ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.35 ± 0.33 log CFU/ml ในขณะที่

น้ำในถังเลี้ยงระดับความรุนแรง (+2) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีค่าเฉลี่ย 3.10 ± 0.57 log CFU/ml. สูงกว่าระดับความรุนแรง (+1) มีค่าเฉลี่ย 2.21 ± 0.07 log CFU/ml และทุกระดับความรุนแรง มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงกว่า ระดับ (0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 0.62 ± 0.23 log CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาว ที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย 2.54 ± 0.00 log CFU/ml ในขณะที่ระดับความรุนแรง (+2) มีค่ารองลงมา มีค่าเฉลี่ย คือ 1.59 ± 0.54 log CFU/ml อาการแถบขาวที่ชุดควบคุมที่ระดับ (0) มีค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียรวมต่ำที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเฉลี่ย 0.26 ± 0.14 log CFU/ml แต่พบว่าที่ระดับ (+1) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมไม่มีความแตกต่างจากระดับ (0) และ (+2)

4.2.2 ปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียไวรัสรวมจากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ที่มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1 ± 0.15 เซนติเมตร ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แสดงไว้ในตารางที่ 4-6 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-6 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียไวรัสรวม (log CFU/ml.) จากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)

ระดับความรุนแรง	ปะการังสมองร่องยาว	
	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรียไวรัสรวม log CFU/ml
0	2.23 ± 0.08^d	1.83 ± 0.29^d
+1	3.39 ± 0.08^c	2.91 ± 0.19^c
+2	4.81 ± 0.03^b	4.29 ± 0.14^b
+3	5.29 ± 0.10^a	4.89 ± 0.11^a

หมายเหตุ ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมสูงที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 5.29 ± 0.10 log CFU/ml ในขณะที่ระดับความรุนแรง (+2) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีค่าเฉลี่ย 4.81 ± 0.03 log CFU/ml สูงกว่า ระดับความรุนแรง (+1) มีค่าเฉลี่ย 3.39 ± 0.08 log CFU/ml และสูงกว่าระดับ (0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเฉลี่ย 2.23 ± 0.08 log CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียไวรัสรวมจากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียไวรัสรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งพบว่าที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ย 4.89 ± 0.11 log CFU/ml

ในขณะที่ระดับความรุนแรง (+2) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีค่าเฉลี่ย $4.29 \pm 0.14 \log \text{CFU/ml}$ สูงกว่า ระดับความรุนแรง (+1) มีค่าเฉลี่ย $2.91 \pm 0.19 \log \text{CFU/ml}$ และทุกระดับความรุนแรง มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงกว่า ระดับ (0) มีค่าเฉลี่ย $1.83 \pm 0.29 \log \text{CFU/ml}$ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

4.2.3 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) วัยอ่อน

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวที่ (0), (+1), (+2) และ (+3) กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน พบว่าระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวมีความสัมพันธ์กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมที่ระดับนัยสำคัญ 0.01 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สันในทางบวก เท่ากับ 0.901 และ 0.974 กล่าวคือเมื่อระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวเพิ่มขึ้น ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย แสดงดังตารางที่ 4-7

ตารางที่ 4-7 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน (Pearson's correlation coefficient (r) หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยง และการเปลี่ยนถ่ายน้ำ (เก็บตัวอย่างครั้งที่ 2)

ระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r)	
	ปริมาณแบคทีเรียรวมในปะการังสมองร่องยาว	ปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาว
0, +1, +2, +3	0.901**	0.974**

** Correlation coefficient is significant at the 0.01 level (2-tailed).

4.3.1 เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย วิบริโอรวม จากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง ทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวม
 จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว ทั้ง 4 ระดับ ทั้งก่อนและหลัง
 เปลี่ยนถ่ายน้ำ แสดงดังตารางที่ 4-8 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-8 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย
 วิบริโอรวม (log CFU/ml.) จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในแต่ละ
 ระดับที่มีอาการแถบขาว (ก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

เปลี่ยนถ่ายน้ำ ในถังเลี้ยงปะการัง	น้ำในถังเลี้ยงปะการัง	
	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรียวิบริโอรวม log CFU/ml
ก่อน	3.60 ± 0.36 ^a	2.66 ± 0.11 ^a
หลัง	2.57 ± 0.36 ^b	1.30 ± 0.11 ^b

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงความแตกต่างอย่างมี
 นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากอาการแถบขาว
 ในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย
 รวมทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงปะการัง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
 ($p < 0.05$) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยง มีค่าเฉลี่ย
 5.91 ± 0.11 log CFU/ml ในขณะที่หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีค่าเฉลี่ย คือ 3.93 ± 0.11
 log CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากอาการแถบขาวใน
 ปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย
 วิบริโอรวมทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงปะการัง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง
 สถิติ ($p < 0.05$) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ

ในถังเลี้ยง มีค่าเฉลี่ย $5.58 \pm 0.12 \log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีค่าเฉลี่ย $3.48 \pm 0.12 \log \text{CFU/ml}$

4.3.2 เปรียบเทียบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย ไวรัสโดยรวมจากปะการังสมองร่องยาว (*P. daedalea*) ว่ายอ่อนที่มีอาการแถบขาวทั้งก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียไวรัสโดยรวม
จากปะการังสมองร่องยาวว่ายอ่อนที่มีอาการแถบขาว ทั้ง 4 ระดับ ทั้งก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ
แสดงดังตารางที่ 4-9 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-9 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย
ไวรัสโดยรวม ($\log \text{CFU/ml}$) จากปะการังสมองร่องยาวว่ายอ่อนในแต่ละระดับ
ที่มีอาการแถบขาว (ก่อน และหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

เปลี่ยนถ่ายน้ำ ในถังเลี้ยงปะการัง	ปะการังสมองร่องยาว	
	แบคทีเรียรวม	แบคทีเรียไวรัสโดยรวม
	$\log \text{CFU/ml}$	$\log \text{CFU/ml}$
ก่อน	5.91 ± 0.11^a	5.58 ± 0.12^a
หลัง	3.93 ± 0.11^b	3.48 ± 0.12^b

หมายเหตุ ตัวอักษร a และ b ที่แตกต่างกันในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึงความแตกต่าง
อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง
สมองร่องยาว ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งก่อนและ
หลังเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงปะการัง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)
มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยง มีค่าเฉลี่ย
 $3.60 \pm 0.36 \log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีค่าเฉลี่ย คือ $2.57 \pm 0.36 \log$
 CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาว ทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมทั้งหมดก่อนและหลังเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงปะการัง มีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในถังเลี้ยงมีค่าเฉลี่ย 2.66 ± 0.12 log CFU/ml ในขณะที่หลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำ มีค่าเฉลี่ย 1.30 ± 0.12 log CFU/ml

ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากบ่อพักน้ำ)

4.3 การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียรวม จากน้ำบ่อพักน้ำ

การวิเคราะห์ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวม และปริมาณแบคทีเรียรวมจากน้ำบ่อพัก ได้แก่ น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำ ขนาด 300 ตัน แสดงดังตารางที่ 4-10 มีรายละเอียดดังนี้

ตารางที่ 4-10 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียรวม (log CFU/ml) จากบ่อพักน้ำ

น้ำจากระบบเลี้ยง	แบคทีเรียรวม log CFU/ml	แบคทีเรียรวม log CFU/ml
น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน	0.83 ± 0.08	0.12 ± 0.06
น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน	0.54 ± 0.18	0.32 ± 0.09
น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน	0.49 ± 0.27	0.23 ± 0.27

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำบ่อพักน้ำ พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยที่น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุด มีค่าเฉลี่ย 0.83 ± 0.08 log CFU/ml. น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน มีค่าเฉลี่ย 0.54 ± 0.18 log CFU/ml ส่วนน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน มีค่าเฉลี่ยของปริมาณแบคทีเรียรวม 0.49 ± 0.27 log CFU/ml

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำบ่อพักน้ำพบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมมีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) โดยที่น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมสูงที่สุด มีค่าเฉลี่ย $0.32 \pm 0.09 \log \text{CFU/ml}$. น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตันมีค่าเฉลี่ย $0.23 \pm 0.27 \log \text{CFU/ml}$ ส่วนน้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน มีค่าเฉลี่ย ของปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวม $0.12 \pm 0.06 \log \text{CFU/ml}$

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

5.1 สิ่งแวดล้อมกับการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรีย

อาการผิดปกติในปะการังมีความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม และเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปะการังให้อยู่ในสภาวะเครียด และง่ายต่อการเกิดโรค (Roseberg and Kushmaro, 2011; Muller et al., 2012; Sudek et al., 2012) โดยสภาพแวดล้อมในน้ำทะเลเสื่อมโทรม ประกอบกับอุณหภูมิสูงขึ้น และปริมาณสารอินทรีย์ที่มีมากจนเกินไป ส่งผลให้แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. สามารถเข้าไปในเนื้อเยื่อปะการัง แล้วทำการเพิ่มจำนวนโดยการสร้าง และปล่อย inflammatory enzyme และ harmful exotoxins จนทำให้เนื้อเยื่อปะการังเกิดความเสียหาย ทำให้ปรากฏอาการแถบขาว (Indo-Pacific white syndrome) ซึ่งความหนาแน่นของประชากรปะการัง ก็มีผลทำให้อาการแถบขาวในปะการังรุนแรงมากขึ้น (Arotsker and Kushmaro, 2016) อีกทั้งมีการศึกษาแบคทีเรียในน้ำทะเลจากตู้เลี้ยงปะการังสกุล *Acropora* sp. และ *Hydnophora* sp. ที่ประเทศเยอรมนี พบเป็นแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* (Hörmansdorfer et al., 2000) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาวและน้ำในถังเลี้ยง มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียรวมส่วนใหญ่ถูกจำแนกเป็นกลุ่ม *Vibrio* spp. ด้วยอาหาร TCBS และพบว่าปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมด เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกับอาการแถบขาว พบว่ามีความสัมพันธ์กัน คือปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมทั้งจากเนื้อเยื่อปะการังที่มีอาการแถบขาว และน้ำในถังเลี้ยงจะมีปริมาณมากขึ้นตามระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาข้อมูลได้ชี้ว่าปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงของ ระดับ (0) ยังไม่ปรากฏอาการแถบขาว มีปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในน้ำจากถังเลี้ยงเฉลี่ยที่ $0.74 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$. เมื่อปริมาณแบคทีเรียวิบริโอเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ส่งผลให้อาการแถบขาวปรากฏ สังเกตได้บริเวณขอบโคโลนีของเนื้อเยื่อปะการัง ที่ระดับความรุนแรง (+1) พบปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในน้ำจากถังเลี้ยงเฉลี่ยที่ $2.39 \pm 0.17 \log \text{CFU/ml}$. และเมื่อลักษณะอาการแถบขาวลุกลามในระดับความรุนแรง (+2) พบปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในน้ำจากถังเลี้ยงเฉลี่ยที่ $3.69 \pm 0.08 \log \text{CFU/ml}$ และที่ระดับความรุนแรงสูงที่สุด (+3)

อาการแถบขาวได้ลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี พบปริมาณแบคทีเรีย vibrio โดยรวมในน้ำจากถังเลี้ยงเฉลี่ยที่ $3.79 \pm 0.10 \log \text{ CFU/ml}$.

เมื่อพิจารณาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยรวมในเนื้อเยื่อปะการังพบว่า ปริมาณแบคทีเรีย vibrio โดยรวมในเนื้อเยื่อปะการังเฉลี่ยที่ $4.81 \pm 0.21 \log \text{ CFU/ml}$. ในระดับ (0) แบคทีเรียสามารถเพิ่มขึ้น 5 เท่า บนเนื้อเยื่อปะการัง ที่ระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว (+1) และ (+2) และปริมาณเพิ่มขึ้น 50 เท่า ที่ความรุนแรงสูงที่สุดระดับ (+3) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียในปะการัง กับอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรงมีความสัมพันธ์เชิงบวก ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.879 (แบคทีเรียรวม) และ 0.892 (แบคทีเรีย vibrio โดยรวม) จากผลการศึกษาพบว่าเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในถังเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ทำให้ปะการังเกิดอาการแถบขาวระดับ (+1) นั้นบ่งชี้เป็นจุดวิกฤต ที่มีการสะสมของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณที่สามารถก่ออาการแถบขาวลุกลามมากขึ้นในเนื้อเยื่อปะการัง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาการเลี้ยงแบบระบบน้ำล้นจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถให้ข้อเสนอแนะว่าต้องมีการลดปริมาณแบคทีเรียในน้ำลง โดยควรทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอในถังเลี้ยง และสังเกตการฟื้นตัวของเนื้อเยื่อปะการังจากอาการแถบขาว และไม่ใช้วิธีระบบน้ำล้นในการอนุบาลปะการังวัยอ่อนเพื่อลดการติดเชื้อของแบคทีเรีย

5.2 การก่อโรคแถบขาวที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

อาการแถบขาว (White syndrome) ในปะการัง ได้มีรายงานที่เกิดขึ้นบริเวณ American Samoa โดยมีสาเหตุมาจากแบคทีเรีย จำพวก vibrio (*Vibrio* spp.) ที่แยกได้จากเนื้อเยื่อและเมือกปะการังชนิด *Acropora hyacinthus* ที่เก็บจากธรรมชาติทั้งที่มีและไม่มีอาการแถบขาว โดยจำแนกด้วยเทคนิค PCR ในการหาลำดับเบสของยีน 16S rRNA และพบแบคทีเรียชนิดเด่นคือ *V. owensii* (Wilson et al., 2012) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อแบคทีเรียจากเนื้อเยื่อปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน เป็นกลุ่มเชื้อแบคทีเรียในสกุล *Vibrio* (*Vibrio* spp.) ในปริมาณที่มากที่สุด ในปะการังอาการแถบขาวทุกระดับความรุนแรง และพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดเด่น ที่พบได้ในทุกระดับความรุนแรง และสามารถพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* ได้ในปะการังสมอร่องยาวที่เริ่มปรากฏอาการแถบขาวระดับความรุนแรงที่ (0) และ (+1) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการระบาดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรค

ชนิด *V. coralliiticus* ในปะการังหลายชนิด เช่น ในปะการังชนิด *Montastrea* spp. ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Yellow Blotch/Band บริเวณทะเลแคริบเบียน (Cervino et al., 2004), และพบการก่อโรค *Montipora* white syndrome บริเวณ Kānēohe Bay, Hawai'i (Ushijima et al., 2014) โดยแบคทีเรียจะก่อโรครุนแรง และสามารถกระจายเชื้อไปยังปะการังใกล้เคียง จนทำให้ปะการังเกิดการตายภายในเวลาอันรวดเร็วได้ จากผลการศึกษารั้งนี้ ยังพบแบคทีเรียแกรมลบอีก 4 สกุล คือ *Aeromonas*, *Providencia*, *Pasteurella* และ *Ochrobactrum* ที่ปนเปื้อนในเนื้อเยื่อปะการัง ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 4 สกุล มีรายงานว่าสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ (National Research Council of Thailand, 2014) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *V. harveyi* แม้ตรวจไม่พบในระบบเลี้ยงของการศึกษารั้งนี้ แต่มีรายงานการก่อโรค White Syndrome (WS) ในปะการังชนิด *Pocillopora damicornis* บริเวณมหาสมุทรอินเดีย (Luna et al., 2010) และยังเป็นสาเหตุของการก่อโรคในกึ่งกุหลาดำ (Sithigorngul et al., 2006)

จากการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมในเนื้อเยื่อปะการังหลังการทำความสะอาดถังเลี้ยง และเปลี่ยนถ่ายน้ำพบว่า ปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในเนื้อเยื่อปะการังเฉลี่ยที่ $1.83 \pm 0.29 \log \text{CFU/ml}$. ในระดับ (0) เฉลี่ยที่ $4.81 \pm 0.21 \log \text{CFU/ml}$. แบคทีเรียมีการลดจำนวนลง 1,000 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในระดับ (0) และการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวมในเนื้อเยื่อปะการังหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำพบว่า ปริมาณแบคทีเรียรวมในเนื้อเยื่อปะการังเฉลี่ยที่ $2.23 \pm 0.08 \log \text{CFU/ml}$. ในระดับ (0) แบคทีเรียมีการลดจำนวนลง 700 เท่า เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำในระดับ (0) เฉลี่ยที่ $5.11 \pm 0.52 \log \text{CFU/ml}$. ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียในปะการัง กับอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรงหลังการเปลี่ยนถ่ายน้ำมีความสัมพันธ์เชิงบวก ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.901 (แบคทีเรียรวม) และ 0.974 (แบคทีเรียวิบริโอรวม) ซึ่งผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าการจัดการระบบสิ่งแวดล้อมในถังเลี้ยงโดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำ และทำความสะอาดถังส่งผลให้ลดการติดเชื้อแบคทีเรีย และการเกิดโรคในปะการังได้

เมื่อพิจารณาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากบ่อพักน้ำ ได้แก่ น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน และน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน พบว่าการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในบ่อพักน้ำ 100 ตัน มีปริมาณแบคทีเรีย

วิบริโอรวมเฉลี่ยที่ $0.32 \pm 0.09 \log \text{CFU/ml}$. ซึ่งมีค่าสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน และจากน้ำปลายน้บ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน มีการเพิ่มขึ้น 1 เท่า ทั้งนี้ปริมาณแบคทีเรียของน้ำจากบ่อพักน้ำประกอบกับการสะสมของเชื้อแบคทีเรียในถังเลี้ยงปะการังสามารถส่งผลให้ปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนเกิดลักษณะอาการแถบขาวปรากฏขึ้นบริเวณเนื้อเยื่อปะการัง

5.3 โรคในสัตว์น้ำที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย

โรคที่มักเกิดในปลาทะเล คือโรค Vibriosis เกิดจากเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* มักพบระบาดในปลาทะเลเป็นส่วนใหญ่ และจะระบาดในบ่อเลี้ยงปลาที่มีปริมาณสารอินทรีย์สูง ความรุนแรงของเชื้อก่อโรคจึงมีความแตกต่างกัน โดยมีทั้งชนิดที่ทำให้เกิดโรคได้ด้วยตนเอง (Primary Pathogen) และพวกที่เข้าทำอันตรายปลาที่อ่อนแอ (Secondary Pathogen) ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงก็เป็นสาเหตุให้ปลาเกิดความเครียด อ่อนแอ และติดเชื้อแบคทีเรียได้ง่าย ลักษณะอาการที่พบคือ ปลาจะมีแผลตกลือดตามตัว ปาก และอาจลึกลงไปถึงชั้นกล้ามเนื้อ กรณีที่แผลเกิดบริเวณผิวหนังชั้นนอก จะทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นเป็นสีดำ เกิดเป็นแผลตื้น ตกเลือดและขยายกว้างออกไปโดยมีขอบเป็นสีขาว (นิลกุล ยูอาสะ, 2543)

การเกิดโรคคลอแลมเนเรียเป็นโรคที่มีการติดต่อทางสิ่งแวดล้อม โดยเกิดจากภาวะเครียดของปลา ที่อาจเกิดจากการขนย้ายปลา ความหนาแน่นของสถานที่เลี้ยงปลา และสิ่งแวดล้อมของน้ำ เช่น อุณหภูมิของน้ำ ออกซิเจนที่ละลายในน้ำต่ำ แอมโมเนียสูง ไนโตรที่สูง ซึ่งปัจจัยเหล่านี้ อาจทำให้ปลาเกิดสภาวะเครียด เกิดการอ่อนแอ จึงทำให้เชื้อก่อโรคเข้าสู่ตัวปลาได้ และอาจมีการติดต่อกันโดยผ่านสิ่งแวดล้อม (มลฤดี สนนธิ, 2547) โรคคลอแลมเนเรียเป็นโรคที่พบได้ในปลาน้ำจืดทุกชนิด และอัตราการเจริญของเชื้อสัมพันธ์กับอุณหภูมิของน้ำ เมื่อสภาวะแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเชื้อ และเป็นสภาวะเดียวกันที่ทำให้ปลาเกิดความเครียด เชื้อ *Flavobacterium columnaris* จะเข้าทำอันตรายปลาจากภายนอก โดยเริ่มเกิดจุดสีขาวบริเวณหัว เหงือก ครีบ และลำตัวซึ่งมักจะมีขอบสีแดง เมื่อเวลาผ่านไปก็จะเกิดการหลุดลอกของผิวหนังบริเวณใกล้เคียง ปลาจึงขับเมือกออกมาเพื่อยับยั้งการลุกลามของเชื้อแบคทีเรีย ลักษณะที่รุนแรงของโรคมักปรากฏแผลบริเวณเหงือกและครีบซึ่งจะมีลักษณะก่อร่อง ส่วนแผลบริเวณลำตัวที่มีอาการจะถูกทำลายและหลุดลอกไป ลักษณะอาการดังกล่าวส่งผลให้ปลาเกิดอาการเซื่องซึม ไม่กินอาหาร นอนก้นบ่อ และเชื้ออาจมีการแพร่ไปสู่ระบบเลือด ซึ่งทำให้เกิดการตายได้ในที่สุด

โรค Seawater Columnaris ส่วนใหญ่จะเกิดในปลาน้ำจืด แต่มีรายงานการเกิดโรคชนิดนี้ในลูกปลากะพงจากโรงเพาะเลี้ยงในปลาทะเลที่ประเทศญี่ปุ่น โดยสิ่งแวดล้อมเป็นตัวส่งเสริมให้เกิดโรค เช่น เมื่อมีการขนย้ายปลาจากสถานที่หนึ่งไปยังอีกสถานที่หนึ่ง เมื่ออุณหภูมิของน้ำเกิดการเปลี่ยนแปลงจากปกติ ทำให้ปลาเกิดสภาวะเครียด ตัวปลาเกิดความอ่อนแอเชื้อก่อโรคจึงเข้าทำลาย ส่งผลให้ปลาป่วยและตายได้ภายในระยะเวลา 1 - 2 วัน หลังจากมีอาการปรากฏลักษณะการเกิดโรคบริเวณภายนอก โดยบริเวณปาก ครีบต่าง ๆ จึงเปื่อยกร่อน และหลุดลอก (นิลบล ยูอาสา, 2543)

5.4 สรุปผลการทดลอง

ตอนที่ 1 (เก็บตัวอย่างเมื่อได้รับแจ้งให้ตรวจสอบการติดเชื้อของอาการแถบขาว)

1. ปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยรวมจากน้ำในถังเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญทำให้ปะการังเกิดสภาวะเครียด ส่งผลให้ปะการังเกิดอาการแถบขาว พบว่าเชื้อแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม *Vibrio* spp.
2. ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบในเนื้อเยื่อปะการังอยู่ในกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยมี *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดเด่น รองลงมาคือ *V. alginolyticus*
3. การเลี้ยงปะการังสมอร่องยาวแบบระบบน้ำล้นจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง เป็นสภาวะที่ทำให้เกิดการสะสมของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และเกิดการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างโคโลนีปะการังในแต่ละถังเลี้ยงได้อย่างรวดเร็ว

ตอนที่ 2 (หลังการทำความสะอาดถังเลี้ยง และเปลี่ยนถ่ายน้ำ)

1. ปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน หลังการเปลี่ยนถังเลี้ยงใหม่ที่ทำนุทำความสะอาดถังเลี้ยง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยรวมในเนื้อเยื่อปะการังลดลง 1,000 เท่า เมื่อเทียบกับปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยรวมในเนื้อเยื่อก่อนการเปลี่ยนถ่ายน้ำ
2. ปัจจัยของคุณภาพน้ำภายในถังเลี้ยงมีส่วนสำคัญอย่างมากต่อการเกิดสภาวะเครียด ง่ายต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย และก่อให้เกิดอาการแถบขาวในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน

ตอนที่ 3 (ตรวจสอบปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากบ่อพักน้ำ)

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียจากบ่อพักน้ำ ได้แก่ น้ำปลายท่อจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 100 ตัน น้ำจากบ่อพักน้ำขนาด 300 ตัน ประกอบกับปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียจากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง ทำให้เชื้อแบคทีเรียในถังเลี้ยงเพิ่มระดับความรุนแรงขึ้น สามารถกระตุ้นให้ปะการังเกิดสภาวะเครียดและตายได้ในที่สุด

5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการทดสอบชนิดของแบคทีเรีย *Vibrio* spp. ที่พบในเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาว และเพื่อเป็นการยืนยันผลการติดเชื้อ และระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวที่ปรากฏบนโคโลนีของปะการัง

2. ควรสำรวจการปรากฏของอาการแถบขาวของปะการังชนิดต่าง ๆ ในธรรมชาติรอบเกาะมันใน รวมทั้งชนิดของแบคทีเรียในน้ำทะเล และในเนื้อเยื่อปะการังเพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของอาการแถบขาวในลักษณะเดียวกันกับปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในโรงเพาะเลี้ยง

บรรณานุกรม

- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2556). การสืบพันธุ์ของปะการัง. เข้าถึงได้จาก http://marinegiscenter.dmcr.go.th/km/coral_doc4/#.VkQ8VrfhDIU
- กรมทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่ง. (2556). การสืบพันธุ์ของปะการัง. เข้าถึงได้จาก http://marinegiscenter.dmcr.go.th/km/coral_doc7/#.VkRohLfhDIU
- กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และพันธุ์พืช. (2556). ปะการังสายใยแห่งชีวิต. เข้าถึงได้จาก http://www.dnp.go.th/parkreserve/Np/Html/Research/Coralreef/Coralreef_7.html.
- จามรี แยมยิ้ม. (2552). การทดแทนประชากรและอัตราการรอดภายหลังลงเกาะของปะการังวัยอ่อนบนแนวปะการังน้ำตื้น บริเวณเกาะมันใน จังหวัดระยอง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาดไทย, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- ทงศักดิ์ จันทร์เมธากุล. (2545). ฤดูกาลการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ของปะการังแข็งบริเวณเกาะภูเก็ต. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.
- มลฤดี สนนธิ. (2547). การติดเชื้อ *Flavobacterium columnare* ของปลาตุ๊กตักุ้งที่ได้รับเชื้อจากปลาตุ๊กตอเมริกัน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวาริชศาสตร์, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยบูรพา.
- นิพนธ์ พงศ์สุวรรณ. (ม.ป.ป). สถานภาพแนวปะการังและการจัดการทรัพยากรแนวปะการังในประเทศไทย. เข้าถึงได้จาก <http://www.pmbc.go.th/web/webpmbc/nipon/10.pdf>.
- นิลุบล ยูอาสาสะ. (2543). โรคปลาที่เกิดจากเชื้อแบคทีเรีย. เอกสารประกอบการสอน วิชา118341 โรคและปรสิตสัตว์น้ำ. ขอนแก่น: ภาควิชาประมง, คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- รณวัน บุญประกอบ, อัญชลี จันทร์คง และสำเร็จ ไหมงกล้า. (มปป.). การเพาะเลี้ยงปะการังแบบอาศัยเพศในปะการังกลุ่ม *Faviidae* Coral Culture by Sexual Reproduction : Order *Faviidae*. เข้าถึงได้จาก: <http://www.dmcr.go.th/download/seminar/poster/EC06.pdf>.

- ลัดดาวัลย์ แสงสว่าง. (2554). *การแพร่กระจาย และปริมาณของโรคปะการังบริเวณเกาะล้าน จังหวัดชลบุรี*. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีววิทยา, คณะวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยรามคำแหง.
- สถาบันวิจัยชีววิทยาและประมงทะเล ภูเก็ต. (2538). *โครงการอุทยานใต้ทะเลจุฬารักษ์ 36: คู่มือสัตว์และพืชในแนวปะการัง หมู่เกาะสุรินทร์และสิมิลัน*. ภูเก็ต: สถาบันวิจัยจุฬารักษ์ และ กองเรือภาค 3 กองเรือยุทธการ กองทัพเรือ.
- สุชนา ชวนิชย์. (2556). *ปะการังกับภาวะโลกร้อน*. เข้าถึงได้จาก http://www.rspg.or.th/tis_museum/semi_articles/semi_articles_19/semi_article_19.htm, 20 พฤศจิกายน 2555.
- Ainsworth, T.D., Kvennefors, E.C., Blackall, L.L., Fine, M., & Hoegh-Guldberg, O. (2007). Disease and cell death in white syndrome of acroporid coral on the Great Barrier Reef. *Marine Biology*, 151, 19-29.
- Antonius, A. (1982). The "band" disease in coral reefs. In *Proceedings of the 4th International Coral Reef Symposium* (pp. 7-14). Philippines: Marine Sciences Center, University of the Philippines, Quezon City.
- Araujo, G.H., Gorch-Lira, K., Medeiros, D.S., & Sass, C.F.C. (2015). Physicochemical and bacteriological seawater quality and sustainability of Cabo Branco (Brazil) coral reef. *Pan-American Journal of Aquatic Sciences*, 10(2), 94-104.
- Arotsker, L., & Kushmaro, A. (2016). Vibriosis. In C. M. Woodley, C. A. Downs, A. W. Bruckner, J. W. Porter & S. B. Galloway (Eds.), *Diseases of Coral* (pp. 206 – 220). United States of America: John Wiley & Sons.
- Baird, A., Guest, J., & Willis, B. (2009). Systematic and biogeographical patterns in the reproductive biology of scleractinian corals. *Annual Review of Ecology and Systematics*, 40, 551–571.
- Borneman, E. (2002). *Bacterial infections: a response to recent 'reef notes' columns, reefkeeping*. Reefkeeping an online magazine for the marine aquarist. Retrieved, from <http://reefkeeping.com/issues/2002-05/eb/feature>.

- Bruckner, A.W., & Bruckner, R.J. (2006). Consequences of Yellow Band Disease (YBD) on *Montastraea annularis* (species complex) populations on remote reefs off Mona Island. *Disease of aquatic organisms*, 69, 67–73.
- Bruno, J.F., Peters, L.E., Harvell, C.D., & Hettinger, A. (2003). Nutrient enrichment can increase the severity of coral diseases. *Ecology Letters*, 6, 1056 – 1061.
- Bythell, J.C., Gladfelter, E.H., & Bythell, M. (1993). Chronic and catastrophic natural mortality of three common Caribbean reef corals. *Coral Reefs*, 12, 143-152.
- Bythell, J., Pantos, O., & Richardson, L. (2003). White Plague, White Band and Other "White" Diseases. In R. Eugene & Y, Loya (Eds.), *Coral Health and Disease* (pp. 351-365). Israel: Springer.
- Carlton, R.G., & Richardson, L.L. (1995). Oxygen and sulfide dynamics in a horizontally migrating cyanobacterial mat: Black band disease of corals. *FEMS Microbiology Ecology*, 18, 155–162.
- Cervino, J.M., Hayes, R.L., Goreau, T.J., & Smith, G.W. (2004). Zooxanthellae regulation in yellow bloch/band and other coral diseases contrasted with temperature related bleaching: in situ destruction vs expulsion. *Symbiosis*, 37, 63–85.
- Charlotte, E., Kvennefors, E., Eugenia, S., Caroline, K., Genyess, V., George, R., & Andrew, C.B. (2011). Regulation of Bacterial Communities Through Antimicrobial Activity by the Coral Holobiont. *Microbiology Ecology*, 63(3), 605-618.
- Dustan, P. (1977). Vitality of reef coral populations off Key Largo, Florida: recruitment and mortality. *Environmental Geology*, 2(1), 51-58.
- Ferrier-Pagès, C., Witting, J., Tambuttè, E., & Sebens, K.P. (2003). Effect of natural zooplankton feeding on the tissue and skeletal growth of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *Coral Reefs*, 22, 229–240.
- Fine, M., Loya, Y. (1995). The coral *Oculina patagonica*: a new immigrant to the Mediterranean coast of Israel. *Israel Journal of Zoology*, 41, 81.

- Frias-Lopez, J., Klaus, J.S., Bonheyo, G.T., & Fouke, B.W. (2004). Bacterial community associated with black band disease in corals. *Applied and environmental microbiology*, 70(10), 5955–5962.
- Gignoux-Wolfsohn, S.A., Marks, C.J., & Vollmer, S.V. (2012). White Band Disease transmission in the threatened coral, *Acropora cervicornis*. *Scientific reports*, 2(804), 1-3.
- Gladfelter, W.B., Gladfelter, E.H., Monahan, R.K., Ogden, J.C., & Dill, R.F. (1977). Environmental studies of Buck Island Reef National Monument. *US National Park Service Report*.
- Haapkyla, J., Unsworth, R.K., Flavell, M., Bourne, D.G., Schaffelke, B., & Willis, B.L. (2011). Seasonal rainfall and runoff promote coral disease on an inshore reef. *PLoS One*, 6(3), 63-73.
- Hörmansdorfer, S., Wentges, H., Neugebauer-Büchler, H., & Bauer, B. (2000). Isolation of *Vibrio alginolyticus* from seawater aquaria. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 203, 169-175.
- Jessica, J.L., Kathryn, S.P., Dustin, K.W., Brett, B., Ashton, G., James, P.W., Molly, H.B.A., Hunter, K.G.N., & Erin, K.L. (2015). Systematic analysis of white pox disease in *Acropora palmate* of the Florida Keys and the role of *Serratia marcescens*. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 4451–4457.
- Kaandorp, J., & Kubler, J. (2001). *The Algorithmic Beauty of Seaweeds, Sponges, and Corals*. Springer, Berlin, Heidelberg, Germany.
- Kenkel, C. (2007). *Coral Disease on the Reefs of Southern Thailand*. Phuket Marine Biological Centre, Ministry of Natural Resources and Environment. Retrieved from http://www.pmbc.go.th/webpmbc/nipon/disease_greenfins.pdf.
- Kimes, N.E., Grim, C.J., Johnson, W.R., Hasan, N.A., Tall, B.D., Kothary, M.H., Kiss, H., Munk, A.C., Tapia, R., Green, L., Detter, C., Bruce, D.C., Brettin, T.S., Colwell, R.R., & Morris, P.J. (2012). Temperature regulation of virulence factors in the pathogen *Vibrio coralliilyticus*. *International Society for Microbial Ecology*, 6, 835-846.

- Leal, M.C., Ferrier, P.C., Petersen, D., & Osinga, R. (2014). Coral aquaculture: applying scientific knowledge to ex situ production. *Aquaculture and Fisheries*, 8(2), 136-153.
- Luna, G.M., Bongiorni, L., Gill, C., Biavasco, F., & Danovavaro, R. (2010). *Vibrio harveyi* as a causative agent of the White Syndrome in tropical stony corals. *Environment Microbiol Report*, 2(1), 120-127.
- Martin, C.I.M., Edinga, E.H., Verdegema, M.C.J., Heinsbroeka, L.T.N., Schneiderc, O., Blanchetond, J.P., Roque d' Orbcasteld, E., & Verretha, J.A.J. (2012). New Developments in Recirculating Aquaculture Systems in Europe: A Perspective on Environmental Sustainability. *Aqua cultural Engineering*, 43(3), 83-93.
- Muller, E.M., & Van Woesik, R. (2012). Caribbean coral disease: primary transmission or secondary infection?. *Global Change Biology*, 18(12), 3529-3535.
- Nagelkerkena, I., Veldea, van der G., Gorissena, M.W., Meijera, G.J., Hof, van't, T., & Hartoga, den C. (2000). Importance of Mangroves, Seagrass Beds and the Shallow Coral Reef as a Nursery for Important Coral Reef Fishes, Using a Visual Census Technique. *Estuar coastal and shelf science*, 51, 31-44.
- National Research Council of Thailand. (2014). Organisms that are classified as Type research. In *Biosafety Guidelines for Work Related to Modern Biotechnology or Genetic Engineering Time 8* (pp. 113-154). Pathumthani: Technical Biosafety Committee for Genetic Engineering and Biotechnology National Science and Technology Development Agency Center Bangkok.
- Neulinger, S.C., Järnegren, J., Ludvigsen, M., Lochte, K., & Dullo, W.C. (2008). Phenotype-Specific Bacterial Communities in the Cold-Water Coral *Lophelia pertusa* (Scleractinia) and Their Implications for the Coral's Nutrition, Health, and Distribution. *Applied and environmental microbiology*, 74(23), 7272-7285.
- Omori, M., & Iwao, K. (2014). *Methods of farming sexually propagated corals and outplanting for coral reef rehabilitation; with list of references for coral reef rehabilitation through active restoration measure*. Retrieved from <http://www.amsl.or.jp/etc/english.pdf>.

- Patterson, K.L., Porter, J.W., Ritchie, K.B., Polson, S.W., Mueller, E., Peters, E.C., Santavy, D.L., & Smith, G.W. (2002). The etiology of white pox, a lethal disease of the Caribbean elkhorn coral, *Acropora palmata*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(13), 8725-8730.
- Pengsuk, C., Longyant, S., Rukpratanporn, S., Chaivisuthangkura, P., Sridulykul, P., & Sithigorngul, P. (2010). Development of monoclonal antibodies for simple detection and differentiation of *Vibrio mimicus* from *V. cholerae* and *Vibrio* spp. by dot blotting. *Aquaculture*, 300, 17-24.
- Raymundo, A.J., Couch, C.S., Work, T.M., Weil, E., Woodley, C.M., Jordan-Dahlgren, E., Bruckner, A.W., Willis, B.L., Harvell, C.D., Sato, Y., & Aeby, G.S. (2008). *A Coral Disease Handbook: Guidelines for Assessment, Monitoring and Management*. Coral Reef Targeted Research and Capacity Building for Management Program, Melbourne, Australia.
- Richardson, L.L. (2004). Black band disease. In E. Rosenberg, & Y. Loya. (Eds), *Coral health and disease* (pp. 325–336). Berlin: Springer.
- Richardson, L.L., Smith, G.W., Ritchie, K.B., & Carlton, R.G. (2001). Integrating microbiological, microsensor, molecular, and physiologic techniques in the study of coral disease pathogenesis. *Hydrobiologia*, 460, 71-89.
- Ritchie, K.B., & Smith, G.W. (1998). Type II white-band disease. *Revisa de Biologia Tropical*, 46(5), 199-203.
- Roder, C., Arif, C., Bayer, T., Aranda, M., Daniels, C., Shibl, A., Chavanich, S., & Voolstra, C.R. (2014). Bacterial profiling of White Plague Disease in a comparative coral species framework. *International Society for Microbial Ecology*, 8, 31–39.
- Rodrigues, L.J., & Grottoli, A.G. (2007). Energy reserves and metabolism as indicators of coral recovery from bleaching. *American Society of Limnology and Oceanography*, 52(5), 1874–1882.

- Rodríguez-Martínez, R.E., Banaszak, A.T., & Jordán-Dahlgren, E. (2001). Necrotic patches affect *Acropora palmata* (Scleractinia: acroporidae) in the Mexican Caribbean. *Disease of aquatic organisms*, 47, 229-234.
- Rosenberg, E., Kushmaro, A., Winter, E.K., Banin, E., & Yossi, L. (2008). The role of microorganisms in coral bleaching. *International Society for Microbial Ecology All rights reserved*, 3(2), 1-8.
- Rosenberg, E., & Zilber-Rosenberg, I. (2008). From bacterial bleaching to the hologenome theory of evolution. *Proceedings of the 11th International Coral Reef Symposium*, 9, 269-273.
- Rotjan, R.D., & Lewis, S.M. (2008). Impact of coral predators on tropical reefs. *Marine Ecology Progress Series*, 367, 73–91.
- Santavy, D.L., & Peters, E.C. (1997). Microbial pests: coral diseases in the Western Atlantic. *Proceedings 8th International Coral Reef Symposium*, 1, 607-612.
- Sheridan, C., Kramarsky-Winter, E., Sweet, M., Kushmaro, A., & Leal, M.C. (2013). Diseases in coral aquaculture: causes, implications and preventions. *Aquaculture*, 396(399), 124–135.
- Sithigorngul, W., Rengpipat, S., Tansiristikul, A., Rukprataporn, S., Longuyant, S., Chaivisuthangkura, P., & Sithigorngul, P. (2006). Development of monoclonal antibodies for simple identification of *Vibrio alginolyticus*. *Letters in Applied Microbiology*, 43, 436-442.
- Sirusa, K., & Pongsa, A. (2014). *Coral disease prevalence in Samui Island and the adjacent islands, southern part of the Gulf of Thailand*. Master' s thesis, Faculty of Science and Industrial Technology, Prince of Songkla University, Surattani campus, Surattani province.
- Stedman, T.L. (2005). *Stedmans' medical dictionary* (27th ed.). Philadelphia: Lippencott Williams & Wilkins.
- Sudek, M., Work, T.M., Aeby, G.S., & Davy, S.K. (2012). Histological observations in the Hawaiian reef coral, *Porites compressa*, affected by Porites bleaching with tissue loss. *Journal of Invertebrate Pathology*, 111, 121-125.

- Sunagawa, S., Desantis, T.Z., Piceno, Y.M., Brodie, E.L., DeSalvo, M.K., Voolstra, C.R., Weil, E., Andersen, L.G., & Medina, M. (2009). Bacterial diversity and White Plague Disease-associated community changes in the Caribbean coral *Montastraea faveolata*. *International Society for Microbial Ecology*, 3, 512-521.
- Veron, J.E.N. (1986). *Corals of Australia and the Indo-Pacific*. The Australia Institute of Marine Science.
- Veron, J.E.N. (1995). *Corals in space and time*. New York: Cornell University Press.
- Veron, J.E.N. (2000). *Coral of the world*. Queensland, Australia: Australian Institute of Marine Science.
- Weil, E., & Rogers, C.S. (2011). Coral Reef Diseases in the Atlantic-Caribbean. In Z. Dubensky & N. Stambler (Eds.), *Coral reefs: An Ecology in Transition* (pp. 465-491). New York: Springer Dordrecht Heidelberg London.
- Weil, E., Smith, W. & Gil-Agudelo, D.L. (2006). Status and progress in coral reef disease research. *Disease Of Aquatic Organisms*, 69, 1-7.
- Weil, E., Urreiztieta, I., & Garzón-Ferreira, J. (2000). Geographic variability in the incidence of coral and octocoral diseases in the wider Caribbean. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*, 2, 23-27.
- Weil, E. (2002). Geographic variability in the incidence of coral and octocoral diseases in the wider Caribbean. *Proceedings 9th International Coral Reef Symposium*, 2, 1231-1237.
- Wijgerdeet, T., Melis, A.V., Silva, C.I.F., Leal, M.C., Vogels, L., & Mutter, C. (2014). Red light represses the photophysiology of the scleractinian coral *Stylophora pistillata*. *PLoS One*, 9(3), 1-10.
- Wilson, B., Aeby, G.S., Work, T.M., & Bourne, D.G. (2012). Bacterial communities associated with healthy and *Acropora* white syndrome-affected corals from American Samoa. *Federation of European Microbiological Societies*, 80, 509-520.

Yaashikaa, P.R., Saravanan, A., & Kumar, P.S. (2016). Isolation and identification of *Vibrio cholerae* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis*, 99, 5-13.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. Trypticase soy agar, TSA (Difco laboratories) with 2% Sodium chloride

Tryptic soy agar powder	40	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

2. Thiosulfate Citrate Bile Salt surose (TCBS) agar

Thiosulfate-Citrate-Bile-Sucrose powder	89	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

3. Tryptic soy broth, TSB (Difco laboratories) with 2% Sodium chloride

Tryptic soy borth powder	30	กรัม
Sodium chloride	20	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

4. Peptone water with 2% Sodium chloride

Peptone	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างเป็น 8.5 นำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

5. MacConkey agar (Difco laboratories)

MacConkey powder	50	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

6. Triple Sugar Iron, TSI agar (Oxoid)

Triple Sugar Iron powder	65	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

7. Motility test (Difco laboratories)

Motility agar powder	22	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

8. Oxidation and fermentation, OF test (Difco laboratories)

Oxidation and fermentation agar powder	9.4	กรัม
D-glucose	10	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และต้มจนผงอุ่นละลาย แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

9. Indole test

Tryptone Bacto™ (Difco laboratories) powder	10	กรัม
Sodium chloride	5	กรัม
Di-potassium phosphate	2.5	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร และเติม Di-potassium phosphate ปรับ pH ที่ 7.3 แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

10. Methyl red and Voges – Proskauer test (MR – VP)

Methyl red and Voges – Proskauer powder	17	กรัม
น้ำกลั่น	1,000	มิลลิลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่นปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร แล้วนำไปฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที

ภาคผนวก ข
การทดสอบทางชีวเคมี

การทดสอบทางชีวเคมี

1. การนับจำนวนแบคทีเรียมีชีวิต colony forming unit (CFU)

นับจำนวนแบคทีเรียมีชีวิต colony forming unit (CFU) โดยวิธี Dilution plate count บนอาหารรูน

Dilution plate count

การนับจำนวนจุลินทรีย์ที่มีชีวิตวิธีใช้เทคนิคการทำให้เชื้อ หรือตัวอย่างเจือจางลง (dilution) ด้วยน้ำหรือน้ำเกลือ 0.85% (normal saline) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ การเจือจางควรให้มีโคโลนีของเชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อระหว่าง 25 - 275 (CFU) โดยปกติจะเจือจางให้เพิ่มขึ้นร้อยละ 10 เท่าเป็นลำดับ

ทำการเจือจางเชื้อที่จะตรวจนับ

1.1 นำน้ำจากถังเลี้ยงปะการัง และตัวอย่างของปะการังที่มีอาการการเกิดโรคแถบขาวทั้ง 3 ระดับ มาทำการวัดขนาดความยาว จากนั้นล้างตัวอย่างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นจำนวน 3 ครั้ง

1.2 ชูตเมือกและเนื้อเยื่อ มาเจือจางกับน้ำทะเลที่ปราศจากเชื้อ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

1.3 นำมาเกลี่ยในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA+NaCl และ TCBS+NaCl ทันที เพื่อเพื่อดูปริมาณแบคทีเรียรวม และปริมาณ *Vibrio* sp. นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง (E. Charlotte, 2011) โดยตรวจสอบการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย และ Subculture จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ จนเป็นโคโลนีเดียว

2. ทดสอบด้วยวิธี Gram stain

การย้อมสี เป็นวิธีการแบ่งแบคทีเรียออกเป็น 2 ประเภท คือ gram positive และแกรม negative มีวิธีการดังนี้

2.1 สเมียร์ เชื้อบนสไลด์

2.2 ปลอ่ยให้แห้งแล้ว fix ผ่านเปลวไฟ 3 ครั้ง แล้วปลอ่ยให้เย็น

2.3 หยดสี crystal violet stain ให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที

2.4 ล้างสีออกด้วย Lugel iodine แล้วหยดให้ท่วม ทิ้งไว้ 1 นาที

2.5 เท Lugel iodine ออก แล้วล้างทันทีด้วย acetone alcohol ชั่วครู่ (ล้างเกล็ดสีน้ำเงินจะจางลงไป)

2.6 ล้างน้ำทันที

2.7 หยดสี safanine ท่วม นาน 1 นาที

2.8 ล้างสีด้วยน้ำก็อก

2.9 ซับสไลด์ให้สะอาดแล้วหยด permount แล้วปิดด้วย cover slip

2.10 ปล่อยให้แห้งแล้วส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ 1000 เท่า

ติดสีน้ำเงิน gram positive bacteria ติดสีแดง gram negative

3. API 20 E ใช้แยกชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และแกรมลบอื่น ๆ

สำหรับตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่แบคทีเรียผลิต และความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่าง ๆ ซึ่งมีวิธีดังนี้

3.1 เติมน้ำกลั่นในกล่องพลาสติกอบเชื้อ (incubation box)

3.2 เชื้อแบคทีเรียที่แยกบริสุทธิ์แล้วลงในหลอดทดลองที่มีน้ำเกลือ 0.85% ที่ฆ่าเชื้อแล้วจำนวน 5 ml. ให้ได้ความชุ่มชื้นที่เหมาะสม

3.3 ใช้ pipette เล็กดูดสารละลายแบคทีเรีย (bacterial suspension) ลงในกระเปาะ (microtubes)

- เติมหุ่นหลอดเฉพาะในส่วนหลอดกระเปาะปิด (tube)

- หลอดที่ขีดเส้นใต้ให้เติม mineral oil ปิดทับในส่วน cupule

- หลอดที่ตัวอักษรอยู่ในกล่องให้เติมแบคทีเรียทั้งในส่วนที่เป็นหลอดปิดและส่วน

cupule

3.4 บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

3.5 ตรวจสอบผลของ API 20 E

4. จำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้วิธีการ Dot Blotting โดยนำ antibody ชนิดต่าง ๆ มาจับกับแอนติเจน (เชื้อแบคทีเรีย) ซึ่งมีวิธีการดังนี้

4.1 นำกระดาษไนโตรเซลลูโลสมาขีดเส้นตาราง ช่องละ 0.5 x 0.5 cm

4.2 นำโคโลนีบริสุทธิ์มา 1 โคโลนี ใส่ใน Eppendorf tube ที่มี 1% Twin 80 ปริมาตร 50 µl เพื่อสกัดเซลล์ จากนั้นหยดตัวอย่างละ 1 µl ลงตรงกลางช่อง ปล่อยให้แห้ง

4.3 นำเมมเบรนมาแช่ใน 5% blotto เพื่อให้โปรตีนจากนมมาจับกับส่วนที่เหลือของกระดาษไนโตรเซลลูโลส เป็นเวลา 30 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.4 ล้างด้วย PBS Twin 20 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีโดยบ่มบนเครื่องเขย่า

4.5 นำไปบ่มใน goat-anti mouse IgG-HRP antibody (GAM-HRP) เจือจาง 1:200 ใน 5% blotto เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง

4.6 ล้างด้วยล้างด้วย PBS Twin 20 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาทีโดยบ่มบนเครื่องเขย่า

4.7 แช่ในสารละลาย (substrate) (0.03% diaminobenzidine (DAB), 0.006% H₂O₂ และ 0.05% CoCl₂ ใน PBS) เป็นเวลา 5 นาที สังเกตจุดสีดำที่เกิดขึ้นจากปฏิกิริยาของแอนติบอดีจับกับแอนติเจน ล้างเมมเบรนหลายๆครั้งด้วยน้ำประปา

4.8 ตรวจผล Dot Blotting

5. การเคลื่อนไหวของแบคทีเรีย Motility test

การเคลื่อนไหวของแบคทีเรีย Brownian movement เกิดจากการสั่น หรือการเคลื่อนไหวไป มาของอนุภาคเล็ก ๆ มีวิธีการดังนี้

5.1 ใช้เข็ม needle เขี่ยเชื้อ แล้ว stab ลงไปตรงกลางของ motility test medium ให้ลึกประมาณถึงก้นหลอด แล้วค่อย ๆ ดึงเข็มออกมาตรง ๆ

5.2 บ่มเชื้อที่ 37 °C นาน 24 - 48 ชั่วโมง

5.3 สังเกตการณ์เจริญของแบคทีเรีย

6. Oxidase test ทดสอบว่าแบคทีเรียมี enzyme oxidase test หรือไม่ โดยใช้วิธี indirect paper procedure ดังนี้

6.1 หยด oxidase reagent บนกระดาษกรองให้ชื้น ประมาณ 1-2 หยด

6.2 ใช้ loop เขี่ยเชื้อป้ายลงบนน้ำยาบนกระดาษกรอง

6.3 สังเกตการเปลี่ยนสีของเชื้อที่ป้าย

7. Oxidation – Fermentation Test เป็นวิธีการทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการย่อยคาร์โบไฮเดรต ชนิดที่ใช้ออกซิเจน (Oxidation) และชนิด ไม่ใช้ออกซิเจน Fermentation แบคทีเรียทั่วไปสามารถย่อยคาร์โบไฮเดรตได้ 2 วิธี คือ Fermentation หรือ Oxidation

- Fermentation เป็นขบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในสภาพที่มี ออกซิเจน มักเป็นคุณสมบัติของ Facultative anaerobe bacteria คือ แบคทีเรียสามารถเจริญ แบ่งตัวได้ทั้งสภาพมี/ไม่มีออกซิเจน

- Oxidation ขบวนการย่อยคาร์โบไฮเดรตในสภาพที่มีออกซิเจน มักเป็นคุณสมบัติของ Obligate aerobe bacteria ซึ่งมีวิธีการทดสอบดังนี้

- 7.1 เชื้อเชื้อลงใน glucose medium 2 หลอด
- 7.2 หยดparaffin ใส 1 หลอด ประมาณ 2 ml
- 7.3 บ่มเชื้อแบบ open และ cover ด้วย paraffin ที่ อุณหภูมิ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง
- 7.4 สังเกตการเปลี่ยนสีของอาหารและการดูการเกิดก๊าซ

8. MR-VP

- MR ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียในการสร้างกรดจาก glucose fermentation

- VP ทดสอบความสามารถของแบคทีเรียที่สร้างกิจกรรมจาก glucose

- 8.1 เชื้อเชื้อลงใน MR-VP broth 2 หลอด
- 8.2 ทำ control MR-VP broth ไม่เชื้อเชื้อลงไป
- 8.3 นำทั้ง 3 หลอดบ่มเชื้อ 37 °C นาน 48 ชั่วโมง
- 8.4 เติม methyl red indicator 5 หยด สังเกตการเปลี่ยนสีของ indicator

ที่ผิวหน้าของอาหาร

ถ้าเป็นสีส้ม แสดงว่าปฏิกิริยาของแบคทีเรียในการ ferment เกิดซ้ำจึงเกิดกรด ดังนั้นจึงต้องบ่มเชื้อต่อ 48 ชั่วโมง แล้วจึงทดลองใหม่

- 8.5 เติม 5% α -naphthol solution 0.6 ml
- 8.6 เติม 40% potassium hydroxide 0.2 ml
- 8.7 เขย่าให้ผสมกัน แล้วปล่อยให้วางอย่างน้อย 10 นาที

9. Triple Sugar Iron Ager Test (TSI test) ศึกษาความสามารถของแบคทีเรียว่ามี enzyme ที่จะไปย่อยสลาย sulfur-containing amine acid หรือไม่ พร้อมทั้งศึกษาลักษณะของ media เมื่อทำการ ferment น้ำตาลแต่ละชนิด มีวิธีการดังนี้

9.1 ใช้ needle ตะเข็ว stab ลงไปถึงก้นหลอด, loop-streak เกลี่ยเข็วที่ผิวของอาหาร

9.2 บ่มเข็ว 37 °C นาน 18-24 ชั่วโมง

9.3 สังเกตการณัเปลี่ยนแปลงของอาหาร การเกิดก๊ากซ

10. Indole test เพื่อทดสอบการสร้าง indole จากแบคทีเรีย โดยมีวิธีการดังนี้

10.1 บ่มเข็วแต่ละชนิดลงใน trypticase broth

10.2 ทำ control ไมไสเข็ว

10.3 บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

10.4 ทดสอบโดยการเติม Kovacs reagent ลงไป 1 ml แล้ว เขย่าเบาๆ ให้ผสมกัน ตั้งไว้สักครู่ แบบตะแคงแล้วสังเกตสีในชั้น Kovac alcohol

11. MacConkey Agar test เป็นการจำแนกกลุ่มแบคทีเรียโดยใช้พลังงานจาก lactose fermentation

11.1 เขี่ยเข็วแบคทีเรียที่เป็นโคโลนีเดี่ยวมาลงในอาหารเลี้ยงเข็ว MacConkey

11.2 บ่ม 37 °C นาน 48 ชั่วโมง

11.3 สังเกตการณัเปลี่ยนแปลงของอาหาร