

เชื้อแบคทีเรียที่สัมพันธ์กับอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนจากระบบเลี้ยง Bacteria Associated with White Band Syndrome from Cultured Coral (*Platygyra daedalea*)

ภัทรจิต รัชชาชล¹ ปภาศิริ บาร์เนต^{1*} นรินทรรัตน์ คงจันทร์ตรี¹ และ อัญชลี จันทรวง²

Pattarajit Raksachon¹, Praparsiri Barnette^{1*}, Narinratana Kongjandtre¹ and Anchalee Chankong²

¹ภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

²ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก

¹Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University.

² Marine and Coastal Resources Research and Development Center the Eastern Gulf of Thailand

Received : 12 July 2017

Accepted : 6 September 2017

Published online : 28 September 2017

บทคัดย่อ

การอนุบาลและเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วัยอ่อนในโรงเรือน พบว่าบริเวณเนื้อเยื่อมีอาการแถบขาว White Band Syndrome (WBS) จึงจำแนกอาการแถบขาว ตามลักษณะการของหลอดลอกของเนื้อเยื่อ ได้เป็น 4 กลุ่มคือโคโลนีที่ไม่แสดงอาการแถบขาว (0), แสดงอาการแถบขาวเล็กน้อย 10 - 20% (+1), ปานกลาง >20 - 60% (+2) และรุนแรง > 60% (+3) เนื้อเยื่อปะการังถูกตรวจสอบการติดเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม โดยพบปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่ไม่แสดงอาการ (0) มีค่าเฉลี่ย \pm SE ที่ 5.49 ± 1.1 , (+1), (+2) และ (+3) มีค่า $2.45 \times 10^2 \pm 1.48$, $4.89 \times 10^3 \pm 1.2$ และ $6.16 \times 10^3 \pm 1.26$ CFU/ml. ตามลำดับ และปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่ไม่แสดงอาการ (0) มีค่าเฉลี่ย \pm SE ที่ $2.63 \times 10^2 \pm 1.48$, (+1), (+2) และ (+3) มีค่า $1.62 \times 10^3 \pm 1.1$, $6.91 \times 10^3 \pm 1.51$ และ $8.13 \times 10^4 \pm 1.55$ CFU/ml. ตามลำดับ สำหรับปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในเนื้อเยื่อปะการัง WBS พบการสะสมของปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมมากกว่าแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงที่ไม่แสดงอาการ (0) มีค่าเฉลี่ย \pm SE ที่ $6.46 \times 10^4 \pm 1.62$, (+1), (+2) และ (+3) มีค่า $2.14 \times 10^5 \pm 1.12$, $4.68 \times 10^5 \pm 1.38$ และ $3.39 \times 10^6 \pm 1.09$ CFU/ml. ตามลำดับ และปริมาณการสะสมของแบคทีเรียรวมในเนื้อเยื่อปะการังที่ไม่แสดงอาการ (0) มีค่าเฉลี่ย \pm SE ที่ $1.28 \times 10^5 \pm 3.31$, (+1), (+2) และ (+3) มีค่า $5.62 \times 10^5 \pm 3.98$, $1.02 \times 10^6 \pm 2.57$ และ $6.03 \times 10^6 \pm 4.89$ CFU/ml. ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในเนื้อเยื่อปะการัง มีค่า $r = 0.879$ ($n = 4$) และ $r = 0.892$ ($n = 4$) ตามลำดับ เมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียพบว่าส่วนใหญ่เป็นกลุ่ม *Vibrio* spp. โดยเชื้อวิบริโอชนิดเด่นคือ *V. parahaemolyticus* รองลงมาเป็นชนิด *V. alginolyticus* จากผลการศึกษานี้ชี้ให้เห็นว่าอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนเกิดขึ้น อาจเกิดจากการสะสมปริมาณเชื้อแบคทีเรียของน้ำในถังเลี้ยง ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญทำให้ปะการังเกิดสภาวะเครียด ส่งผลให้เนื้อเยื่อปะการังติดเชื้อแบคทีเรีย จนปรากฏอาการแถบขาวและมีอาการรุนแรงมากขึ้นตามปริมาณเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งควรมีการทดลองเพื่อยืนยันสาเหตุของโรคจากเชื้อแบคทีเรียต่อไป โดยทั่วไปแนวทางการเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในระบบเลี้ยง ควรรักษาระดับคุณภาพน้ำในถังเลี้ยงให้อยู่ในเกณฑ์ที่เหมาะสม เพื่อลดปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรีย

คำสำคัญ : แบคทีเรีย แบคทีเรียวิบริโอ ปะการังสมองร่องยาว โรคปะการัง อาการแถบขาวในปะการัง

*Corresponding author. E-mail : praparsi@buu.ac.th

Abstract

Cultured immature corals (*Platygyra daedalea*) affected by White Band Syndrome (WBS), were classified based on white plague area on coral surface into four categories; (0), WBS absent; (+1), WBS present over 10 - 20% of coral surface; (+2), >20 - 60% and > 60%, (+3). Coral tissue was examined for bacterial infection by directed enumeration of total bacteria and total *Vibrio* spp. Density of total *Vibrio* spp. in culture tank water (means \pm SE) amounted 5.49 ± 1.1 for category (0), $2.45 \times 10^2 \pm 1.48$, (+1), $4.89 \times 10^3 \pm 1.2$, (+2), and $6.16 \times 10^3 \pm 1.26$, (+3), CFU/ml. Total bacteria in culture tank water was higher with than total *Vibrio* spp. (means \pm SE) at $2.63 \times 10^2 \pm 1.48$ for category (0), $1.62 \times 10^3 \pm 1.1$, (+1), $6.91 \times 10^3 \pm 1.51$, (+2), and $8.13 \times 10^4 \pm 1.55$, (+3), CFU/ml. Furthermore, processed coral tissue scrapings from WBS had higher densities of total *Vibrio* spp. and total bacterial than water in those culture tanks with means \pm SE for the former $6.46 \times 10^4 \pm 1.62$ category (0), $2.14 \times 10^5 \pm 1.12$, (+1), $4.68 \times 10^5 \pm 1.38$, (+2), and $3.39 \times 10^6 \pm 1.09$, (+3), CFU/ml., infections. Total bacteria of processed coral tissue scrapings had higher densities with means \pm SE $1.28 \times 10^5 \pm 3.31$ for category (0), $5.62 \times 10^5 \pm 3.98$, (+1), $1.02 \times 10^6 \pm 2.57$, (+2), and $6.03 \times 10^6 \pm 4.89$, (+3), CFU/ml. infections. WBS of coral tissue was significantly correlated with total bacteria ($n = 4$, $r = 0.879$), and total *Vibrio* spp. ($n = 4$, $r = 0.892$), respectively. Thus, total bacteria and *Vibrio* spp. virulence was positively and significantly correlated with WBS. Dominant bacteria were *V. parahaemolyticus* and *V. alginolyticus*. Overall, 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.

Keywords: bacteria, coral disease, *Platygyra daedalea*, *Vibrio* spp., White Band Syndrome

บทนำ

ระบบนิเวศแนวปะการังในปัจจุบันมีความเสื่อมโทรมลงไปมาก เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิของน้ำ ซึ่งส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงสรีระและโครงสร้างปะการัง ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมจึงเป็นปัญหาหลักที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของปะการัง ได้แก่ การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิ น้ำ การเพิ่มขึ้นของสารอาหาร ปริมาณตะกอนที่ละลายในน้ำที่เกิดจากการพัฒนาชายฝั่ง จึงส่งผลให้ปะการังเกิดความเครียด และมีการเกิดโรคขึ้นในที่สุด (Roseberg & Kushmaro, 2011) ทำให้มีการระบาดของเชื้อแบคทีเรียซึ่งสามารถส่งผลเสียต่อสุขภาพปะการัง จนทำให้เกิดการฟอกขาว จากการสำรวจการเกิดโรคในแนวปะการังทางภาคใต้ของประเทศไทย พบมีการเกิดโรคทั้งหมด 20 โรค โดย 68% ของโรคที่พบทั้งหมด พบบริเวณทะเลอันดามัน และ 80% พบบริเวณอ่าวไทย และจากการสำรวจจมีโรคในแนวปะการังที่พบมาก จำนวน 4 โรค คือ White Syndrome (WS), Pink-line syndrome (PLS), Black band disease (BBD) และ Aspergilliosis (ASP) (Kenkel, 2007) ในสภาวะปะการังเครียดถือเป็นช่วงเวลาที่ปะการังมีภาวะอ่อนแอ ทำให้เชื้อแบคทีเรียสามารถเข้าทำลายเนื้อเยื่อได้ มีรายงานว่าเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดเป็นสาเหตุก่อโรคในปะการังที่สัมพันธ์กับอาการแถบขาว เช่น แบคทีเรีย *Vibrio coralliilyticus* และ *V. shiloi* ก่อโรค Bacterial bleaching ในปะการังชนิด *Oculina patagonica* (Rosenberg & Zilber, 2008) และแบคทีเรีย *V. carchariae*

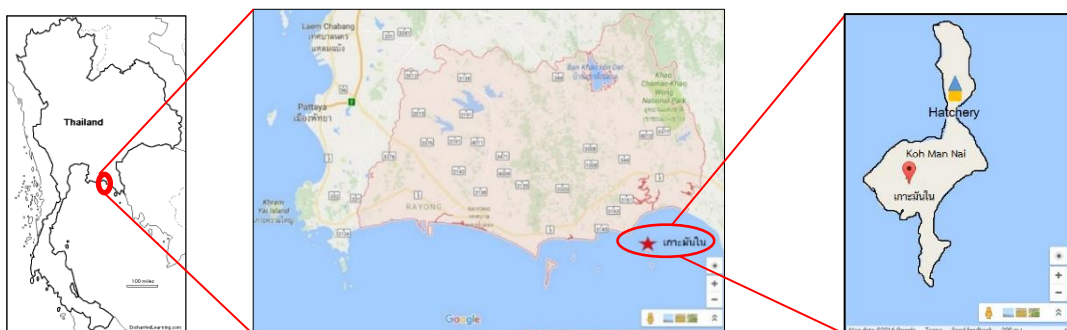
ก่อโรค White band II หรือ โรคแถบขาว โดยพบการระบาดในปะการังก้อน และปะการังเขากวางกลุ่ม *Acropora* spp. (Raymundo *et al.*, 2008)

ในปัจจุบันศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงปะการังบนเกาะมันใน โดยนำเซลล์สืบพันธุ์ของปะการังที่รวบรวมจากธรรมชาติมาทำการปฏิสนธิ และอนุบาลในโรงเรือนเพื่อนำไปฟื้นฟูระบบนิเวศแนวปะการังในธรรมชาติ (Omori & Iwao, 2014) โดยเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) เป็นชนิดหลัก และมีปะการังชนิดอื่นร่วมด้วย ในระหว่างการเลี้ยงพบอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาวได้ทุกขนาด ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียที่อาจก่อโรคแถบขาวได้ จากรายงานของ Wilson *et al.* (2012) ระบุว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* spp. สามารถก่อโรค White syndrome ได้ในปะการัง *Acropora hyacinthus* ดังนั้นการศึกษาดังนี้ มีวัตถุประสงค์เพื่อ ตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว จำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม *Vibrio* ที่อาจทำให้เกิดอาการแถบขาว และตรวจสอบความสัมพันธ์ของอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน กับระดับการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ทั้งนี้เพื่อหาแนวทางป้องกัน และการจัดการอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาว ในระบบเลี้ยงต่อไป

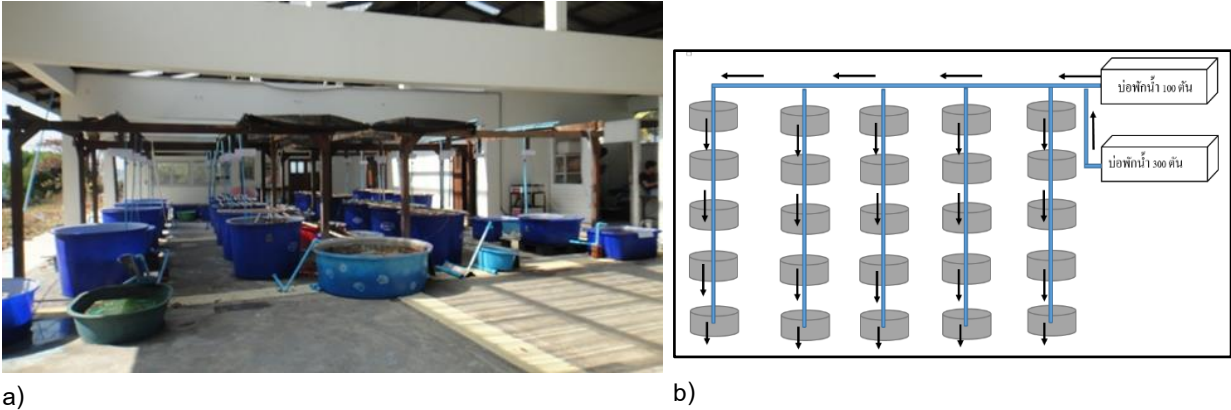
วิธีดำเนินการวิจัย

1. พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาว (*Platygyra daedalea*) วัยอ่อน และน้ำในระบบเลี้ยงจากโรงเพาะเลี้ยงเกาะมันใน ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก ตำบลปากน้ำกระแสด อำเภอกาญจนบุรี จังหวัดระยอง (ภาพที่ 1) ในโรงเพาะเลี้ยงมีวิธีการนำน้ำทะเลมาใช้ในระบบเลี้ยง โดยสูบน้ำจากทะเลมาพักไว้ในบ่อพักน้ำแบบวันต่อวันและไม่มีการฆ่าเชื้อโรค หลังจากนั้นจึงปล่อยน้ำผ่านท่อพีวีซีเข้าไปยังถังเลี้ยงขนาด 500 ลิตร โดยระบบน้ำล้น น้ำจะถูกส่งผ่านแต่ละถังจากถังหนึ่งไปยังอีกถัง ซึ่งถูกควบคุมกลไกโดยระบบน้ำล้นของระดับน้ำในถังเลี้ยงซึ่งเป็นถังไฟเบอร์ แต่ละถังจะมีการแขวนแผ่นกระเบื้องดินเผาที่มีโคโลนีของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนยึดเกาะอยู่หลายขนาด ในการศึกษาครั้งนี้จะเลือกเก็บโคโลนีที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 1 เซนติเมตร สภาพโรงเลี้ยงปะการัง (ภาพที่ 2a) และไดอะแกรมแสดงทิศทางการไหลของน้ำในโรงเพาะเลี้ยงปะการัง (ภาพที่ 2b)



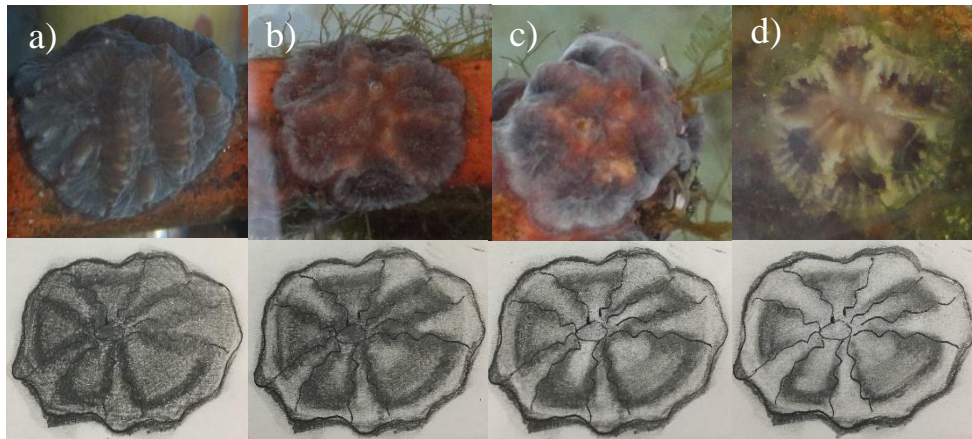
ภาพที่ 1 แผนที่แสดงสถานที่เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาว โรงเลี้ยงปะการังบนเกาะมันใน จังหวัดระยอง



ภาพที่ 2 a) สภาพโรงเลี้ยงปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน และ b) ไดอะแกรมแสดงระบบถังเลี้ยงปะการังสมอร่องยาว ด้วยกลไกโดยระบบน้ำดันของระดับน้ำในถังเลี้ยง

2. การสังเกตลักษณะและประเมินอาการแถบขาวของปะการังสมอร่องยาววัยอ่อน

ความผิดปกติของอาการแถบขาวของโคโลนีปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนเมื่อเริ่มสังเกตได้ เนื้อเยื่อสีขาวจะปรากฏบริเวณขอบโคโลนี และแถบขาวจะลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี จะสังเกตได้ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ โดยการประเมินระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวใช้การประเมินด้วยสายตา แบ่งออกได้เป็น 4 ระดับ แสดงดังภาพที่ 3a – 3d



ภาพที่ 3 อาการแถบขาวที่ประเมินด้วยสายตา จากปริมาณความขาวต่อพื้นที่โคโลนีปะการัง จำแนกออกได้ 4 ระดับ

- a) ระดับ (0) จัดเป็น ปะการังที่ไม่ปรากฏอาการแถบขาว 0%
- b) ระดับ (+1) อาการแถบขาวปรากฏเฉพาะบริเวณขอบรอบโคโลนี ความขาวประมาณ 10-20%
- c) ระดับ (+2) อาการแถบขาวลุกลามจากขอบโคโลนี และกระจายเข้าสู่ศูนย์กลาง ความขาวประมาณ >20-60% และ
- d) ระดับ (+3) อาการแถบขาวลุกลามไปทั่วทั้งโคโลนี ความขาวมากกว่า 60%

3. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำในถังเลี้ยงเพื่อศึกษาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และจำแนกชนิดแบคทีเรีย มีรายละเอียดดังนี้ สุ่มเก็บตัวอย่างโคโลนีปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่ติดบนกระเบื้องในบ่อเลี้ยง จากปะการังที่แสดงอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ เก็บตัวอย่างจำนวน 3 โคโลนี ต่อความรุนแรงของอาการแถบขาวทางกายภาพของปะการัง บันทึกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนแต่ละโคโลนีโดยใช้ไม้บรรทัด (วัดจากด้านที่ยาวที่สุดของโคโลนีมีหน่วยเป็นเซนติเมตร) ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างน้ำบริเวณผิวน้ำในถังเลี้ยงปะการังที่มีปริมาตรน้ำ 300 ลิตร มีการให้อากาศหมุนเวียนทั่วถัง จากถังเลี้ยงปะการังที่แสดงอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ ระดับละ 3 ขั้ว ด้วยหลอด conical ปริมาตร 50 มิลลิลิตร เพื่อนำไปหาปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวม และจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ

4. การนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน และน้ำจากถังเลี้ยงปะการัง

เตรียมตัวอย่างเพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียออกจากปะการัง ดัดแปลงจาก (Charlotte *et al.*, 2011; Wilson *et al.*, 2012) โดยนำโคโลนีของปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาวในแต่ละระดับความรุนแรง ล้างด้วยน้ำเกลือ 0.85% ที่ปราศจากเชื้อ ขูดเมือกและเนื้อเยื่อของปะการังแต่ละโคโลนีด้วยใบมีดที่ปราศจากเชื้อ ลงในหลอด eppendorf ขนาด 1 มิลลิลิตร (หนึ่งหลอดสำหรับ 1 โคโลนี) จากนั้นเจือจางเมือกและเนื้อเยื่อปะการังแต่ละโคโลนีทั้ง 4 ระดับความรุนแรง แบบ 10-fold serial dilution ที่ ระดับความเจือจาง 10, 100 และ 1,000 เท่า ด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ผสมให้เข้ากัน จากนั้นก็ทำการกระจายตัวอย่าง (Spread plate method) ที่เจือจางแล้วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Trypticase soy agar (TSA) + NaCl 2% และ Thiosulfate Citrate Bile Salt Sucrose Agar (TCBS) + NaCl 2% ทันที และนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA และ TCBS เพื่อหาปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมจากปะการัง และเจือจางน้ำจากระบบเลี้ยงปะการัง เพื่อนับปริมาณเชื้อแบคทีเรียโดยนำน้ำจากถังเลี้ยงปะการัง มาทำการเจือจางด้วยน้ำเกลือที่ปราศจากเชื้อ ให้ได้ระดับความเข้มข้น 2 เท่าและ 10 เท่า ผสมให้เข้ากัน และหาปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการัง โดยกระจายตัวอย่างที่เจือจางแล้วลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA + NaCl 2% และ TCBS + NaCl 2% ทันที จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 - 48 ชั่วโมง นับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียที่เจริญบนอาหาร TSA และ TCBS

5. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย

แบคทีเรียในกลุ่มวิบริโอ จะถูกนำมาจำแนกชนิด โดยสุ่มโคโลนีที่มีลักษณะรูปร่าง และสีเหมือนกัน คือโคโลนีสีเขียว และโคโลนีสีเหลือง อย่างละ 3 โคโลนี เพื่อนำมาทดสอบด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดี Immono assay ด้วยวิธี Dot blotting ที่จำเพาะต่อชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอ ซึ่งการเตรียมแบคทีเรียเพื่อจำแนกชนิดทำได้โดยนำแบคทีเรียที่ได้จากปะการังที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรง ที่เจริญบนอาหาร TCBS ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Tryptic Soy Broth (TSB) โดยเจือจางให้มีปริมาณเชื้อเริ่มต้นเท่ากับ $10^8 - 10^9$ CFU/ml และต้มแบคทีเรียด้วยความร้อน 60 องศาเซลเซียส 30 นาที และเมื่อโคโลนีใดเป็นโคโลนีที่ให้ผลลบ จึงจำแนกต่อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ร่วมกับชุดทดสอบ API 20E

5.1. การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอโดยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนด้วยวิธี

Immunodot blotting

นำแบคทีเรียที่ได้จากปะการังทั้ง 4 ระดับ ที่เจริญบนอาหาร TCBS และในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSB หยดลงบนกระดาษ Nitrocellulose ปริมาตร 1 ไมโครลิตรต่อ 1 จุด โดยใช้แบคทีเรียที่ถูกจำเพาะกับโมโนโคลนอลแอนติบอดีชนิด Mouse antibody แสดงใน ตารางที่ 1 เป็น positive control ที่ให้แห้ง และแช่ใน 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 และบ่มด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่างๆ (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 มิลลิตร เป็นเวลา 5 นาที สังเกตการเปลี่ยนสีเทาเข้มบริเวณหยดแบคทีเรีย โดยแบคทีเรียที่จำเพาะกับ positive control จะเปลี่ยนเป็นสีเทาให้อ่านผลเป็นบวก ส่วนหยดแบคทีเรียที่ไม่เปลี่ยนสีให้ถือว่าผลเป็นลบ (Sithigorngul *et al.*, 2006)

ตารางที่ 1 โมโนโคลนอลแอนติบอดีที่นำมาใช้จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอด้วยวิธี Immunodot blotting

| ลำดับ | รหัสโมโนโคลนแอนติบอดี | 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))

5.2 การจำแนกแบคทีเรียโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี ของชุดทดสอบ API 20 E

แบคทีเรียที่ไม่สามารถจำแนกชนิดได้ด้วยความจำเพาะของแอนติบอดี ในข้อ 5.1 จะถูกนำมาจำแนกด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมีเบื้องต้น ร่วมกับชุดทดสอบ API 20 E

5.2.1 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)

5.2.2 ชุดทดสอบ API 20 E (ซื้อจากบริษัท Biomerieux, ตัวแทนในประเทศไทย) ใช้จำแนกชนิดแบคทีเรียในกลุ่ม Enterobacteriaceae และแบคทีเรียแกรมลบอื่นๆ สำหรับตรวจสอบปฏิกิริยาของเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย และความสามารถในการใช้น้ำตาลชนิดต่างๆ 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) เติมหงอกหลอดเฉพาะในส่วนหลอดกระเปาะปิด (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>)

6. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

วิเคราะห์เชื้อปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวมจากปะการังวัยอ่อน และตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยง ที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ โดยใช้หน่วยในการคำนวณปริมาณแบคทีเรียเป็น log CFU/ml ในการวิเคราะห์ทางสถิติ วิเคราะห์ความแปรปรวนของแต่ละชุดการทดลอง โดยใช้ Analysis of Variance (one way ANOVA) เพื่อทดสอบความแตกต่างของปริมาณการปนเปื้อนเชื้อแบคทีเรียในปะการังวัยอ่อน และตัวอย่างน้ำจากถังเลี้ยง ที่มีอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับ และใช้ LSD เพื่อตรวจสอบความแตกต่างที่เกิดขึ้นในแต่ละระดับความรุนแรง โดยใช้ค่าการตัดสินใจที่ระดับความมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p < 0.05$) และวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (Pearson's correlation coefficient) ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับปริมาณแบคทีเรียรวม แบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน แล้วแปลงเป็นหน่วย log CFU/ml ในการแสดงผล

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว *P. daedalea* วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน ที่มีอาการแถบขาวจากความรุนแรงทั้ง 4 ระดับ พบว่าค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในทุกระดับความรุนแรง ซึ่งพบว่าปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากน้ำในถังเลี้ยงที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 4.91 ± 0.19 log CFU/ml ในขณะที่น้ำในถังเลี้ยง

ระดับความรุนแรง (+2) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม มีค่าเฉลี่ย $3.84 \pm 0.18 \log \text{CFU/ml}$ สูงกว่า ระดับความรุนแรง (+1) มีค่าเฉลี่ย $3.21 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$ และทุกระดับความรุนแรง มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมสูงกว่า ระดับ (0) ที่มีค่าต่ำที่สุด มีค่าเฉลี่ย $2.42 \pm 0.17 \log \text{CFU/ml}$ แสดงดังตารางที่ 2

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาว พบว่า ปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในบางระดับความรุนแรง โดยพบว่า ที่ระดับความรุนแรง (+2) และที่ระดับความรุนแรง (+3) ปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมไม่มีความแตกต่างกันแต่สูงกว่าอาการ (+1) และ (0) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณการสะสมของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวม สูงที่สุด ซึ่งมีค่าเฉลี่ย $3.79 \pm 0.10 \log \text{CFU/ml}$ ในขณะที่ระดับความรุนแรง (+2) มีค่าเฉลี่ย คือ $3.69 \pm 0.08 \log \text{CFU/ml}$ และที่ระดับความรุนแรง (+1) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมต่ำกว่า มีค่าเฉลี่ย $2.39 \pm 0.17 \log \text{CFU/ml}$ และพบว่าอาการ แถบขาวที่شدควบคุมที่ระดับ (0) มีค่าเฉลี่ยของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมต่ำที่สุด มีค่าเฉลี่ย $0.74 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$ แสดงดัง ตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม ในหน่วย $\log \text{CFU/ml}$ และ CFU/ml จากน้ำในถังเลี้ยงปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว

| น้ำในถังเลี้ยง | | | | |
|---------------------|----------------------|-----------------------------|----------------------|-----------------------------|
| ระดับ ความรุนแรง | แบคทีเรียรวม | | แบคทีเรียวิบริโอรวม | |
| | $\log \text{CFU/ml}$ | CFU/ml | $\log \text{CFU/ml}$ | CFU/ml |
| 0 | 2.42 ± 0.17^d | $2.63 \times 10^2 \pm 1.48$ | 0.74 ± 0.04^c | $5.49 \times 10 \pm 1.1$ |
| +1 | 3.21 ± 0.04^c | $1.62 \times 10^3 \pm 1.1$ | 2.39 ± 0.17^b | $2.45 \times 10^2 \pm 1.48$ |
| +2 | 3.84 ± 0.18^b | $6.91 \times 10^3 \pm 1.51$ | 3.69 ± 0.08^a | $4.89 \times 10^3 \pm 1.2$ |
| +3 | 4.91 ± 0.19^a | $8.13 \times 10^4 \pm 1.55$ | 3.79 ± 0.10^a | $6.16 \times 10^3 \pm 1.26$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c, d ที่แตกต่างภายในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ความแตกต่างกัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

การปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมจากปะการังสมองร่องยาว *P. daedalea* วัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

ปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่นำมาศึกษาในครั้งนี้ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 1.00 ± 0.15 เซนติเมตร ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียรวมจากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมสูงที่สุดมีค่าเฉลี่ย $6.78 \pm 0.69 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งสูงกว่าระดับความรุนแรง (+1) และ (+2) อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่ระดับความรุนแรง (+1) และระดับความรุนแรง (+2) มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ มีค่าเฉลี่ย $5.75 \pm 0.60 \log \text{CFU/ml}$ และ $6.01 \pm 0.41 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ ส่วนอาการแถบขาว ที่ระดับ (0) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวมต่ำที่สุด มีค่าเฉลี่ย $5.11 \pm 0.52 \log \text{CFU/ml}$ แสดงดังตารางที่ 3

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติของปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจากอาการแถบขาวในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนทั้ง 4 ระดับความรุนแรง พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมมีค่าแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยที่ระดับความรุนแรง (+3) มีปริมาณของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมสูงที่สุด มีค่าเฉลี่ย $6.53 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$ ซึ่งสูงกว่าระดับความรุนแรง (+1) และ (+2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งทั้งสองระดับนี้มีค่าเฉลี่ยของปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย $5.33 \pm 0.05 \log \text{CFU/ml}$ และ $5.67 \pm 0.14 \log \text{CFU/ml}$ ตามลำดับ ส่วนอาการแถบขาวที่ระดับ (0) มีปริมาณเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมต่ำที่สุด มีค่าเฉลี่ย $4.81 \pm 0.21 \log \text{CFU/ml}$ แสดงดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐานของปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวมในหน่วย $\log \text{CFU/ml}$ และ CFU/ml จากเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนในแต่ละระดับที่มีอาการแถบขาว

| ระดับ ความรุนแรง | ปะการังสมองร่องยาว | | | |
|---------------------|----------------------|-----------------------------|---------------------|-----------------------------|
| | แบคทีเรียรวม | | แบคทีเรียวิบริโอรวม | |
| | $\log \text{CFU/ml}$ | CFU/ml | CFU/ml | $\log \text{CFU/ml}$ |
| 0 | 5.11 ± 0.52^c | $1.28 \times 10^5 \pm 3.31$ | 4.81 ± 0.21^c | $6.46 \times 10^4 \pm 1.62$ |
| +1 | 5.75 ± 0.60^b | $5.62 \times 10^5 \pm 3.98$ | 5.33 ± 0.05^b | $2.14 \times 10^5 \pm 1.12$ |
| +2 | 6.01 ± 0.41^b | $1.02 \times 10^6 \pm 2.57$ | 5.67 ± 0.14^b | $4.68 \times 10^5 \pm 1.38$ |
| +3 | 6.78 ± 0.69^a | $6.03 \times 10^6 \pm 4.89$ | 6.53 ± 0.04^a | $3.39 \times 10^6 \pm 1.09$ |

หมายเหตุ : ตัวอักษร a, b, c ที่แตกต่างกันภายในคอลัมน์เดียวกัน หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

จากการวิเคราะห์ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวที่ (0), (+1), (+2) และ (+3) กับปริมาณเชื้อแบคทีเรียในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนพบว่า ข้อมูลมีความสัมพันธ์กันกับปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.01$) มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.879 และ 0.892 ตามลำดับ กล่าวคือเมื่อระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวเพิ่มสูงขึ้นปริมาณเชื้อแบคทีเรียรวม และเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมจะเพิ่มสูงขึ้นด้วย ผลแสดงใน ตารางที่ 4

ตารางที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความรุนแรงของอาการแถบขาวกับ ปริมาณแบคทีเรียรวม และแบคทีเรียวิบริโอรวม ในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อน (Pearson's correlation coefficient) (r)

| ระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว | ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน (r) | |
|-------------------------------|--|---|
| | ปริมาณแบคทีเรียรวมในปะการังสมองร่องยาว | ปริมาณแบคทีเรียวิบริโอรวมในปะการังสมองร่องยาว |
| 0, +1, +2, +3 | 0.879** | 0.892** |

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

ชนิดเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

การศึกษาการจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน และใช้คุณสมบัติทางชีวเคมี ของชุดทดสอบ API 20 E ในปะการังสมองร่องยาววัยอ่อนที่มีอาการแถบขาว

ผลการศึกษาเมื่อจำแนกชนิดเชื้อแบคทีเรียด้วยเทคนิคความจำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจนวิบริโอ พบโคโลนีเชื้อแบคทีเรียจากปะการังสมองร่องยาว ส่วนใหญ่เป็น *Vibrio* spp. (ด้วยแอนติบอดี VAL57) ในทุกระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว สามารถจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรียวิบริโอรวมได้ทั้งหมด 4 ชนิด (ตารางที่ 5) พบว่า เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดที่พบมากที่สุดในทุกะดับของอาการแถบขาว พบการสะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPV 767) ในปะการังทั้ง 4 ระดับ คือ (0), (+1), (+2) และ (+3) โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ต่อจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่นำมาทดสอบ ซึ่งมีค่าดังนี้ 16%, 8.5%, 25% และ 25% ตามลำดับ และพบการสะสมของเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPV54-1) ในปะการังระดับ (0) และ (+1) มีค่า 20% และ 8.5% เชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* (ด้วยแอนติบอดี VPC 701) สามารถพบได้เพียงในระดับ (+1) มีค่า 12% และเชื้อแบคทีเรียชนิด *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) เมื่อทดสอบต่อด้วยคุณสมบัติทางชีวเคมี ของชุดทดสอบ API 20 E พบเป็นเชื้อแบคทีเรียชนิด *Providencia rettgi* ในระดับ (0) เชื้อแบคทีเรียชนิด *Pasteurella pneumotropica*, *Ochrobactrum anthropic* ในระดับ (+2) และเชื้อพบแบคทีเรียชนิด *Aeromonas hydrophila* ในระดับ (+3)

ตารางที่ 5 การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย vibrio โดยรวม จากปะการังสมองร่องยาวอาการแถบขาว ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะ

| ระดับ ความรุนแรง | จำนวน โคโลนี | Vibrio spp. | V. alginolyticus | | | | V. parahaemolyticus | | | V. mimicus | V. harveyi |
|---------------------|-----------------|-------------|------------------|------------|-----------|-----------|---------------------|-----------|---------|-------------|------------|
| | | (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% | |

วิจารณ์ผล

อาการผิดปกติในปะการังมีความสัมพันธ์กับสิ่งแวดล้อม และเชื้อก่อโรค ซึ่งเป็นปัจจัยที่ส่งผลต่อสุขภาพของปะการังให้อยู่ในสภาวะเครียด และง่ายต่อการเกิดโรค (Roseberg & Kushmaro., 2011 และ Muller *et al.*, 2012 และ Sudek *et al.*, 2012) โดยสภาพแวดล้อมในน้ำทะเลเสื่อมโทรม ประกอบกับอุณหภูมิสูงขึ้น และปริมาณสารอินทรีย์ที่มีมากจนเกินไป ส่งผลให้แบคทีเรียในกลุ่ม *Vibrio* spp. สามารถเข้าลงเกาะเนื้อเยื่อปะการัง แล้วทำการเพิ่มจำนวนโดยการสร้าง และปล่อย inflammatory enzyme และ harmful exotoxins จนทำให้เนื้อเยื่อปะการังเกิดความเสียหาย ทำให้ปรากฏอาการแถบขาว (Indo-Pacific white syndrome) ซึ่งความหนาแน่นของประชากรปะการัง ก็มีผลทำให้อาการแถบขาวในปะการังรุนแรงมากขึ้น (Arotsker & Kushmaro, 2016) อีกทั้งมีการศึกษาแบคทีเรียในน้ำทะเลจากตู้เลี้ยงปะการังชนิด *Acropora* sp. และ *Hydnophora* sp. ที่ประเทศเยอรมนี พบเป็นแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* (Hörmansdorfer *et al.*, 2000) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเนื้อเยื่อปะการังสมองร่องยาวและน้ำในถังเลี้ยง มีการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียรวมส่วนใหญ่ถูกจำแนกเป็นกลุ่ม *Vibrio* spp. ด้วยอาหาร TCBS และพบว่าปริมาณแบคทีเรีย vibrio โดยรวมมีค่าใกล้เคียงกับปริมาณแบคทีเรียรวมทั้งหมด เมื่อพิจารณาปริมาณแบคทีเรียกับอาการแถบขาว พบว่ามีความสัมพันธ์กัน คือปริมาณแบคทีเรีย vibrio โดยรวมทั้งจากเนื้อเยื่อปะการังที่มีอาการแถบขาว และน้ำในถังเลี้ยงจะมีปริมาณมากขึ้นตามระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการศึกษาข้อมูลได้ชี้ว่าปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำในถังเลี้ยงของ ระดับ (0) ยังไม่ปรากฏอาการแถบขาว มีปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำเฉลี่ยที่ $0.74 \pm 0.04 \log \text{CFU/ml}$ เมื่อเพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ส่งผลให้อาการแถบขาวปรากฏ สังเกตได้บริเวณขอบโคโลนีของเนื้อเยื่อปะการัง ที่ระดับความรุนแรง (+1) พบปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำเฉลี่ยที่ $2.39 \pm 0.17 \log \text{CFU/ml}$ และเมื่อลักษณะอาการแถบขาว ลูกกลม ในระดับความรุนแรง (+2) พบปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำเฉลี่ยที่ $3.69 \pm 0.08 \log \text{CFU/ml}$ และที่ระดับความรุนแรงสูงสุด (+3) อาการแถบขาวได้ลูกกลมไปทั่วทั้งโคโลนี พบปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำเฉลี่ยที่ $3.79 \pm 0.06 \log \text{CFU/ml}$

เมื่อพิจารณาการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำในเนื้อเยื่อปะการังพบว่า ปริมาณแบคทีเรีย vibrio ใต้น้ำในเนื้อเยื่อปะการังเฉลี่ยที่ $4.81 \pm 0.21 \log \text{CFU/ml}$ ในระดับ (0) แบคทีเรียสามารถเพิ่มขึ้นเชิงปริมาณ 5 เท่า บนเนื้อเยื่อปะการัง ที่ระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว (+1) และ (+2) และปริมาณเพิ่มขึ้น 50 เท่า ที่ความรุนแรงสูงสุดระดับ (+3) ทั้งนี้การเพิ่มขึ้นของปริมาณแบคทีเรียในปะการัง กับอาการแถบขาวทั้ง 4 ระดับความรุนแรง มีความสัมพันธ์เชิงบวก

ให้ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เพียร์สัน เท่ากับ 0.879 (แบคทีเรียรวม) และ 0.892 (แบคทีเรีย vibrio รวม) จากผลการศึกษาพบว่า เชื้อแบคทีเรียจากน้ำในถังเลี้ยงที่เพิ่มขึ้นประมาณ 3 เท่า ทำให้ปะการังเกิดอาการแถบขาวระดับ (+1) นั้น บ่งชี้เป็นจุดวิกฤตที่มีการสะสมของเชื้อแบคทีเรียในปริมาณที่สามารถก่ออาการแถบขาวลูกกลมมากขึ้นในเนื้อเยื่อปะการัง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากปัญหาการเลี้ยงแบบระบบน้ำล้นจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง ผลการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้สามารถให้ข้อแนะนำว่าต้องมีการลดปริมาณแบคทีเรียในน้ำลง โดยควรทำการเปลี่ยนถ่ายน้ำอย่างสม่ำเสมอในถังเลี้ยง และสังเกตการฟื้นตัวของเนื้อเยื่อปะการังจากอาการแถบขาว และไม่ใช่วิธีระบบน้ำล้นในการอนุบาลปะการังวัยอ่อนเพื่อลดการติดเชื้อของแบคทีเรีย

อาการแถบขาว (White syndrome) ในปะการัง ได้มีรายงานที่เกิดขึ้นบริเวณบริเวณ 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.) ในปริมาณที่มากที่สุดในปะการังอาการแถบขาวทุกระดับ ความรุนแรง และพบว่าเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดเด่น ที่พบได้ในทุกระดับความรุนแรง และสามารถพบเชื้อแบคทีเรียชนิด *V. alginolyticus* ได้ในปะการังสมอร่องยาวที่เริ่มปรากฏอาการแถบขาว (ระดับความรุนแรงที่ 0 และ (+1) อย่างไรก็ตาม มีรายงานการระบาดของเชื้อแบคทีเรียก่อโรคชนิด *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 จากผลการศึกษาครั้งนี้ ยังพบแบคทีเรียแกรมลบอีก 4 ชนิด คือ *Aeromonas*, *Providencia*, *Pasteurella* และ *Ochrobactrum* ที่ปนเปื้อนในเนื้อเยื่อปะการัง ซึ่งแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ถูกรายงานว่าสามารถก่อโรคได้ทั้งในคนและสัตว์ (National Research Council of Thailand, 2014) อย่างไรก็ตามแบคทีเรีย *V. harveyi* แม้ตรวจไม่พบในระบบเลี้ยงของการศึกษาครั้งนี้ แต่มีรายงานการก่อโรค white syndrome (WS) ในปะการังชนิด *Pocillopora damicornis* บริเวณมหาสมุทรอินเดีย (Luna et al., 2010) และยังเป็นสาเหตุของการก่อโรคในกุ้งกุลาดำ (Sithigorngul et al., 2006)

สรุปผลการวิจัย

จากการศึกษาอาการแถบขาวในปะการังสมอร่องยาววัยอ่อนในโรงเรือน สามารถแบ่งความรุนแรง จากเปอร์เซ็นต์แถบขาวบนโคโลนีปะการัง ออกเป็น 4 ระดับ ได้แก่ โคโลนีที่ไม่แสดงอาการ (0), แสดงอาการแถบขาวเล็กน้อย (+1), ปานกลาง (+2) และรุนแรง (+3) จากการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียในระบบเลี้ยงปะการังสมอร่องยาว พบว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio รวมจากน้ำในถังเลี้ยงปะการังจากระดับ (0) ถึง (+3) เพิ่มขึ้น 1,000 เท่า ส่วนปริมาณแบคทีเรีย vibrio รวมในเนื้อเยื่อปะการังจากระดับ (0) ถึง (+3) เพิ่มขึ้น 50 เท่า และระดับความรุนแรงของอาการแถบขาว มีความสัมพันธ์กับปริมาณการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียรวม และแบคทีเรีย vibrio รวมในเนื้อเยื่อปะการัง จึงบ่งชี้ว่าปริมาณเชื้อแบคทีเรีย vibrio รวมจากน้ำในถังเลี้ยงเป็นปัจจัยสำคัญทำให้ปะการังเกิดสภาวะเครียด ส่งผลให้ปะการังเกิดอาการแถบขาว พบว่าเชื้อแบคทีเรียอยู่ในกลุ่ม *Vibrio* spp. โดย *V. parahaemolyticus* เป็นชนิดเด่น รองลงมาคือ *V. alginolyticus*

ดังนั้นการเลี้ยงปะการังสมองร่องยาวแบบระบบน้ำล้นจากถังหนึ่งไปสู่อีกถังหนึ่ง เป็นสถานะที่ทำให้เกิดการสะสมของปริมาณเชื้อแบคทีเรีย และเกิดการแพร่กระจายของเชื้อระหว่างโคโลนีปะการังในแต่ละถังเลี้ยงได้อย่างรวดเร็ว

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากศูนย์วิจัย และพัฒนาทรัพยากรทางทะเลและชายฝั่งอ่าวไทยฝั่งตะวันออก จังหวัดระยอง และศาสตราจารย์ ดร.ไพศาล สิทธิกรกุล และ รองศาสตราจารย์ ดร. ศิวาพร ลงยันต์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ โมโนโคลนอลแอนติบอดีจำเพาะต่อแบคทีเรีย กลุ่ม *Vibrio* spp.

เอกสารอ้างอิง

- 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.
- Cervino, J.M., Hayes, L.R., Polson, S.W., Polson, P.S., Goreau, T.J., Martinez, R.J., Smith G.W. (2004). Relationship of *Vibrio* Species Infection and Elevated Temperatures to Yellow Blotch/Band Disease in Caribbean Corals. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(11), 6855-6864.
- 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.
- 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.
- Kenkel, C. (2007). *Coral Disease on the Reefs of Southern Thailand*. Phuket Marine Biological Centre, Ministry of Natural Resources and Environment. Retrieved June 8, 2015, from http://www.pmbc.go.th/webpmbc/nipon/disease_greenfins.pdf
- Lesser, M.P., Bythell, J.C., Gates, R.D., Johnstone, R.W., Guldberg, O.H., (2007). Are infectious disease really killing coral? Alternative interpretations of the experimental and ecological data. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 346, 36-44.
- 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.
- Muller, E.M., Van Woesik, R. (2012). Caribbean coral disease: primary transmission or secondary infection?. *Global Change Biology*, 12019, 1-7.
- 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; P. A. Living Ltd. (in Thai)

- 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 September 4, 2017, from <http://www.amsl.or.jp/etc/english.pdf>
- 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*, 17-24.
- Raymundo, A.J., Couch, C.S., Work, T.M., Weil, E., Woodley, CM., 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.
- Rosenberg, E. & Zilber, R.I. (2008). From bacterial bleaching to the hologenome theory of evolution. Dept. Mol. Microbiol and Biotechnol, Tel Aviv University, Ramat Aviv, Israel 69978.
- Roseberg, E. & Kushmaro, A. (2011). Microbial Disease of Coral: Pathology and Ecology. In Z, Dubensky & N, Stambler (Eds.), *Coral reefs: An Ecology in Transition*. (pp. 451-464). Springer Dordrecht Heidelberg London New York.
- Sithigorngul, W., Rengpipat, S., Tansiristtikul, 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.
- 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.
- Ushijima, B., Videau, P., Burger, H.A., Shore-Maggio, A., Runyon, M.C., Sudek, M., Aeby, S.G., & Callahan M.S. (2014). *Vibrio coralliilyticus* strain OCN008 Is an Etiological Agent of Acute *Montipora* White Syndrome. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(7), 2102-2109.
- 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. *FEMS Microbio Ecol*, 80, 509-520.
- Yaashikaa, P.R., Saravanan, A., Kumar, P,S. (2016). Isolation and identification of *Vibrio choleare* and *Vibrio parahaemolyticus* from prawn (*Penaeus monodon*) seafood: Preservation strategies. *Microbial Pathogenesis*, 99, 5-13.