

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

กุ้งก้ามกราม (Giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* de Man) เป็นกุ้งน้ำจืดที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคภายในประเทศ จะเห็นได้จากข้อมูลของฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง (2545) ว่า ปริมาณผลผลิตกุ้งก้ามกรามมีสัดส่วนถึง 25 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณรวมของผลผลิตสัตว์น้ำจืด และมีมูลค่าถึง 35.4 เปอร์เซ็นต์ของมูลค่าสัตว์น้ำจืดทั้งหมด จากการรวบรวมข้อมูลของกรมประมงพบว่า ในช่วง 30 ปีที่ผ่านมาผลผลิตกุ้งก้ามกรามเกิดปัญหาอยู่ 2 ช่วง คือ ระหว่างปี พ.ศ. 2532 ถึง พ.ศ. 2533 (ฝ่ายสถิติและประมวลผล กองนโยบายและแผนงานประมง, 2532; 2533) และระหว่างปี พ.ศ. 2538 ถึง พ.ศ. 2540 (กลุ่มสถิติและสารสนเทศการประมง, 2538; 2539; กลุ่มวิเคราะห์สถิติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, 2540) ซึ่งมีผลทำให้ปริมาณผลผลิตลดลงอย่างชัดเจน ปัญหาดังกล่าวเกิดจากผลกระทบหลายประการ ได้แก่ ปรากฏการณ์น้ำท่วมซึ่งควบคุมโดยกลไกทางการตลาด และปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการเลี้ยงกุ้งซึ่งมีผลกระทบต่ออัตราการรอด หลังจากปี พ.ศ. 2541 เป็นต้นมา ผลผลิตกุ้งก้ามกรามจึงเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง (กลุ่มวิเคราะห์สถิติการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำจืด, 2541-2542; กลุ่มวิจัยและวิเคราะห์สถิติการประมง, 2543; ฝ่ายสถิติและสารสนเทศการประมง, 2545) ในปัจจุบันกุ้งก้ามกรามมีราคาสูง โดยเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 145 ถึง 280 บาทต่อกิโลกรัม แม้กุ้งก้ามกรามจะเป็นที่นิยมอย่างมากของตลาดในประเทศ แต่การศึกษาเกี่ยวกับกุ้งก้ามกรามยังมีน้อยมากในทุกด้านเมื่อเทียบกับกุ้งทะเลซึ่งเป็นสินค้าส่งออก ไม่ว่าจะเป็นเรื่องการปรับปรุงพันธุ์ โรค และอาหาร ปัญหาสำคัญที่พบในขณะนี้ คือ แม่พันธุ์มีขนาดเล็กซึ่งเกิดจากการเจริญพันธุ์เร็ว นอกจากนั้นยังมีเรื่องโรคที่เป็นปัญหาสำคัญในโรงเพาะฟักทำให้ผลผลิตลูกกุ้งไม่แน่นอน การศึกษาเกี่ยวกับโรคในกุ้งก้ามกรามนั้นมีน้อยมากไม่ว่าจะเป็นในประเทศไทยหรือต่างประเทศ โรคที่พบบ่อยในโรงเพาะฟักกุ้งก้ามกราม คือ โรคเรืองแสง (Luminescent Diseases) หรือที่เกษตรกรรู้จักกันในชื่อโรคดาวเรืองหรือโรคเพชรพลอย เป็นโรคที่เกิดจากแบคทีเรียและมีผลกระทบต่อการผลิตลูกกุ้งในโรงเพาะฟักอย่างรุนแรงหากไม่มีการป้องกัน โรคนี้ยังพบมากในโรงเพาะฟักกุ้งทะเลเช่นกัน (จิราพร เกษรจันทร์ และคณะ, 2530; ดารุณี แซ่หุ้ย และคณะ, 2530; ชลอ ลิมสุวรรณ, 2543) โรคนี้มีสาเหตุจากเชื้อแบคทีเรียแกรมลบชนิด *Vibrio harveyi* (Liu et al., 1996) นอกจากนั้นยังมีรายงานเกี่ยวกับแบคทีเรียสกุล *Vibrio* อีกหลายชนิดที่เป็นสาเหตุการตายของกุ้งทะเล (penaeid shrimps) ได้แก่ *V. parahaemolyticus* (Kourany and Vasquez, 1975; Nolan et al., 1984), *V. vulnificus* (Hoffmann et al., 1988), *V. damsella* (Nash et al., 1992), *V. campbellii* (Xu et al., 1994), *V. cholerae* (Blake et al., 1980; Coelho et al., 1995) และ *V.*

splendidus (Baticados et al., 1990) เป็นต้น เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งที่ประสบปัญหาเกี่ยวกับโรคเรืองแสงมักใช้ยาปฏิชีวนะในการรักษา แต่ผลที่ได้ไม่แน่นอนซึ่งเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การดื้อยาของเชื้อ หรือความล่าช้าในการรักษาเนื่องจากกว่าที่เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งจะรู้ว่าลูกกุ้งเป็นโรคเรืองแสงก็ต่อเมื่อเห็นการเรืองแสงในบ่อเพาะพักในเวลากลางคืนเท่านั้น เมื่อถึงระยะนั้นลูกกุ้งจะมีการติดเชื้อมีอยู่ในระดับที่รุนแรงแล้ว ซึ่งทำให้เกิดความเสียหายตามมาอย่างแน่นอน เนื่องจากการเรืองแสงของแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้จะเกิดขึ้นเมื่อมีความหนาแน่นสูงถึง 10^{10} ถึง 10^{11} เซลล์ต่อมิลลิลิตร (Bluth et al., 1997) ชนิดของแบคทีเรียที่สามารถเรืองแสงได้และมีรายงานทำการศึกษาค้นคว้า ได้แก่ *V. harveyi* (Cao and Meighen, 1993; Czyz et al., 2002), *V. fischeri* (Wegrzyn and Czyz, 2002; Nyholm and McFall-Ngai, 2003), *V. cholerae* serogroup O28 (Shimada et al., 1995), *V. splendidus* (Nealson and Hastings, 1979), *V. logei* (Ziegler and Baldwin, 1981), *Photobacterium phosphoreum* (Haygood, 1993), *P. leiognathi* (Illarionov et al., 1990) และ *Xenorhabdus luminescens* (Frackman et al., 1990; Lee et al., 2004) ทำให้การวินิจฉัยแบคทีเรียที่เป็นสาเหตุของโรคโดยสังเกตจากการเรืองแสงเป็นไปได้ยากขึ้น

ปัญหาเกี่ยวกับความหลากหลายของเชื้อในสกุล *Vibrio* นี้มีรายงานอยู่มาก Vandenberghe et al. (2003) ได้ทำการศึกษาค้นหาความหลากหลายของแบคทีเรียสกุล *Vibrio* โดยแยกเชื้อจากสัตว์ทะเลชนิดต่างๆ ซึ่งจำแนกเชื้อออกมาได้มากกว่า 25 ชนิด โดยเป็น *V. harveyi* 24.71 เปอร์เซ็นต์ และยังพบว่า *V. harveyi* และ *V. alginolyticus* มีลักษณะทางฟีโนไทป์ที่มีความหลากหลายสูง ทำให้การศึกษาโดยใช้วิธีการทางแบคทีเรียวิทยาทำได้ยากมาก ซึ่งจากความหลากหลายทางฟีโนไทป์ของเชื้อแบคทีเรียสกุล *Vibrio* ทำให้ต้องใช้ข้อมูลจากลักษณะอื่นเข้ามาประกอบร่วม เช่น ลักษณะรูปร่าง คุณสมบัติทางชีวเคมี และลักษณะทางกายภาพ เป็นต้น Castro et al. (2002) ได้ทำการแยกความแตกต่างของ halophilic vibrios ที่แยกได้จากหอยกาบ (*Ruditapes philippinarum*) จำนวน 123 ตัวอย่าง โดยใช้การทดสอบถึง 94 ลักษณะ ซึ่งดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา และชีวเคมี ผลจากการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม Simple matching (SSM) and Jaccard (SJ) similarity coefficients, unweighted pair group method with arithmetic averages (UPGMA) และ NTSYST-pc 1.70 พบว่า สามารถจำแนกได้ทั้งหมด 15 กลุ่ม โดยที่ 7 กลุ่มสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น *V. tubiashii*, *V. splendidus* biotype I, *V. harveyi*, *V. splendidus* biotype II, *V. natriegens*, *V. mediterranei* และ *V. alginolyticus* ส่วนอีก 8 กลุ่มไม่สามารถจำแนกชนิดของ *Vibrio* ที่แน่นอนได้ จึงจำแนกเชื้อเป็น *V. tubiashii*-like, *V. harveyi*-like *V. logei*-like และ *Vibrio* sp. นอกจากนั้น Alcaide (2003) ได้ทำการแยกความแตกต่างของเชื้อแบคทีเรียในวงศ์ Vibrionaceae ที่ได้จากปลา Amberjack (*Seriola dumerili*) และตัวอย่างน้ำที่ใช้เลี้ยงจำนวน 148 ตัวอย่าง ต้องใช้การทดสอบถึง 109 ลักษณะ ซึ่งดูจากลักษณะทางสัณฐานวิทยา สรีรวิทยา ชีวเคมี และโภชน

ศาสตร์เข้ามาช่วย นำข้อมูลไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม NTSYST-pc 2.0, SSM และ UPGMA เพื่อสร้าง dendrogram ขึ้นมา พบว่า แบ่งกลุ่มได้ทั้งหมด 11 กลุ่ม โดยที่ 9 กลุ่มสามารถจำแนกเชื้อได้เป็น *V. alginolyticus*, *V. fisheri*, *V. harveyi*, *V. carchariae*, *V. mediterranei*, *V. splendidus*, *V. furnissii*, *V. parahaemolyticus* and *Photobacterium damsela* subsp. *damsela* ส่วนอีก 2 กลุ่มเป็น vibrios แต่ไม่สามารถระบุชนิดได้ ซึ่งใช้เวลาค่อนข้างนานและสิ้นเปลืองค่าใช้จ่ายมาก นอกจากนั้นมีการใช้ชุดตรวจสอบสำเร็จรูปแต่ผลยังไม่แม่นยำหรือได้ผลเป็นที่น่าเชื่อถือนัก (Vandenberghe et al., 2003)

ในปัจจุบันเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรส (Polymerase Chain Reaction : PCR) ได้ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในวงการวิทยาศาสตร์อย่างกว้างขวาง ในทางการแพทย์ก็เช่นกันได้มีการนำเอาเทคนิคนี้มาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน รวมทั้งใช้เพื่อการตรวจวินิจฉัยโรคที่เกิดกับสัตว์น้ำ เทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อเพิ่มปริมาณดีเอ็นเอที่ต้องการศึกษาได้เป็นล้านเท่าหรือมากกว่านั้นภายในระยะเวลาอันสั้น ทำให้การตรวจวินิจฉัยโรคเป็นไปได้อย่างรวดเร็วและได้ผลค่อนข้างถูกต้องแม่นยำ จากการที่พบเชื้อแบคทีเรียหลายชนิดปะปนอยู่ในกุ้งที่เป็นโรคเรืองแสงด้วยนั้น อาจมีผลกระทบต่อการแยกเชื้อเพื่อนำมาตรวจวินิจฉัยในห้องปฏิบัติการ ดังนั้นเทคนิคที่มีความจำเพาะและมีประสิทธิภาพสูงที่มีจึงน่าจะถูกนำมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของลูกกุ้งก้ามกรามในโรงเพาะฟักก่อนออกสู่บ่อดิน ทำให้เกษตรกรผู้เลี้ยงกุ้งได้ลูกพันธุ์ที่มีคุณภาพ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

การหาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *Vibrio harveyi* มาใช้ในการตรวจสอบหาเชื้อในกุ้งก้ามกรามที่เป็นโรคเรืองแสง

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

งานวิจัยนี้จะศึกษาหาไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อ *V. harveyi* และทดลองนำเทคนิคปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสมาใช้ในการตรวจวินิจฉัยโรค

1.4 สถานที่และระยะเวลาการทำวิจัย

ห้องปฏิบัติการโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ และห้องปฏิบัติการกลาง 2 ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

งานวิจัยนี้คาดว่าจะประโยชน์ต่อเกษตรกรผู้เพาะเลี้ยงกุ้งก้ามกราม และอาจทำให้มีวิธีการตรวจวินิจฉัยที่ได้มาตรฐานในการตรวจสอบคุณภาพของลูกกุ้ง ช่วยลดความเสี่ยงของการระบาดของโรค ทำให้ทราบเชื้อก่อโรคของโรคเรืองแสงในกุ้งก้ามกรามว่ามีเพียง *V. harveyi* ชนิด

เดียวหรือไม่ หรือเกิดจากเชื้ออื่นๆ นอกจากนั้นยังเป็นแนวทางในการศึกษาเกี่ยวกับโรคอื่นๆ ที่เกิดกับกุ่มก้ามกรามต่อไปในอนาคต