ศึกษาสูตรอาหารและรูปแบบใหม่ของเหยื่อโปรโตซัว

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ทดลองผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อที่ดัดแปลงใหม่ โดยมีส่วนผสมของน้ำมันข้าวโพด : แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี : อาหารหนูชนิดเม็ด อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10 และเติมสาร xanthan gum ลงไปในเหยื่อรูปแบบใหม่ ซึ่งสารนี้มีคุณสมบัติที่สามารถจับกับน้ำซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น จากนั้นทดสอบความชอบของหนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) ต่อเหยื่อรูปแบบใหม่ พบว่าหนูท้องขาวบ้านจำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ชอบกินเหยื่อแป้งนุ่มรูปแบบใหม่ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$)

ทำการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay โดยให้เชื้อแก่หนูด้วย feeding tube ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-82 และเบอร์ S -24 จากนั้นตรวจสอบการมีชีวิตของโปโตซัว *S. singaporensis* โดยการย้อมสี nucleic acid พบว่าเชื้อที่อยู่ในสาร xanthan gum นาน 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน,4 เดือน และ 5 เดือน ยังคงมีชีวิต 100%, 100 %, 99%, 96% และ 60% ตามลำดับ และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น ขณะนี้อยู่ระหว่างทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ ที่เก็บไว้นาน 4 เดือน, 5 เดือน และ 6 เดือน และพัฒนารูปแบบที่สามารถเก็บรักษาได้นานขึ้น

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-02-01-51

คำนำ

ประเทศไทย เป็นประเทศเกษตรกรรมที่สามารถผลิตและส่งออกสินค้าเกษตรหลายชนิด แต่เกษตรกรมักประสบปัญหาเกี่ยวกับศัตรูพืชที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ พืชผลทางเกษตรกรรมหลายชนิดที่มีประวัติถูกหนูทำลาย โดยเฉพาะพืชในกลุ่มธัญพืช เช่น ข้าว ข้าวโพด ถั่วเหลือง ข้าวสาลี ข้าวบาร์เลย์ เป็นต้น ซึ่งหนูจะทำลายและทำให้เกิดความเสียหายแก่พืชเหล่านี้ได้เกือบทุกระยะ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช ความเสียหายของพืชเศรษฐกิจในประเทศไทยที่เกิดจากการทำลายของหนู พบว่าในข้าวความเสียหายเฉลี่ยประมาณ 1.53% ข้าวบาร์เลย์ประมาณ 6.53% ถั่วเหลืองประมาณ 9.1-17.2% อ้อยประมาณ 5.3% ปาล์มน้ำมันประมาณ 36% มะพร้าวประมาณ 8.7% และโกโก้ประมาณ 10% ซึ่งความเสียหายเหล่านี้ ประมาณมูลค่าไม่ต่ำกว่า 1,000 ล้านบาทต่อปี (เสริมศักดิ์, 2536)

หนูที่พบในประเทศไทยมีทั้งหมด ประมาณ 36 ชนิด ประกอบด้วย 3 สกุล (genus) คือสกุลหนูพุก (*Bandicota*) สกุลหนูท้องขาว (*Rattus*) สกุลหนูหริ่ง (*Mus*) โดยพบว่าหนูที่เป็นศัตรูพืชเศรษฐกิจที่สำคัญของประเทศไทย ได้แก่ หนูพุกใหญ่ (*Bandicota indica*) หนูพุกเล็ก (*B.savilei*) หนูนาใหญ่ (*Rattus argentiventer*) หนูนาเล็ก (*R.losea*) หนูท้องขาวบ้าน (*R.rattus*) หนูป่ามาเลย์ (*R.tiomanicus*) หนูนอรเวย์ (*R.norvegicus*) หนูจี๊ด (*R. exulans*) หนูหริ่งหางยาว (*Mus caroli*) และหนูหริ่งหางสั้น (*R.cervicolor*) นอกจากจะทำลายพืชทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคสำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์และสัตว์เลี้ยง เช่น กาฬโรค โดยมีหมัดที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะของโรค และโรคเลปโตสไปโรซิสหรือไข้ฉี่หนูที่เกิดจากแบคทีเรีย *Leptospira interrogans* เป็นต้น

การป้องกันกำจัดหนูโดยการใช้สารกำจัดหนู (rodenticide) ในปัจจุบัน มีการใช้สารกำจัดหนู 2ประเภทหลัก คือสารกำจัดหนูประเภทออกฤทธิ์เร็ว (acute rodenticide หรือ single dose rodenticide) เป็นกลุ่มที่มีความเป็นพิษสูง ทั้งต่อมนุษย์และสัตว์อื่น และมีข้อเสียคือทำให้หนูเข็ดขยาดต่อเหยื่อพิษ (bait shyness) และสารกำจัดหนูประเภทออกฤทธิ์ช้า (chronic rodenticide หรือ multiple dose rodenticide) แต่ถ้าใช้เป็นระยะเวลานานทำให้หนูสามารถสร้างความต้านทานขึ้นมาได้ ดังนั้น วิธีการป้องกันกำจัดหนูโดยชีววิธี เช่น การใช้เชื้อโปรโตซัวกำจัดหนู จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่อาจช่วยลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีดังกล่าวได้

อย่างไรก็ตาม ปัจจัยที่เกี่ยวข้องและควรคำนึงถึงในการใช้ปรสิตชนิดใดๆกำจัดหนู ได้แก่ มีความจำเพาะเจาะจงต่อสัตว์อาศัย สามารถในการลดการสืบพันธุ์หรือขยายพันธุ์ของสัตว์อาศัยได้ และต้องมีระยะติดเชื้อ (infective phase) ที่รุนแรงและสม่ำเสมอ ซึ่งอาจต้องมีการช่วยเหลือจากสัตว์อาศัยตัวกลาง (Anderson and May,1978) ซึ่งใน ปี ค.ศ. 1975 Zaman and Colly ได้ค้นพบ

เชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ในมูลงูเหลือม (*Python reticulatus*) ซึ่งเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้จัดอยู่ใน Phylum Apicomplexa, Class Sporozoasida, Order Eucoccidiorida, Family Sarcocystidae , Genus Sarcocystis โปรโตซัวชนิดนี้มีการสร้างซีสต์ระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโต โดยต้องการสัตว์อาศัย 2 ชนิด ในการเจริญและขยายพันธุ์ ได้แก่ สัตว์อาศัยตัวกลาง (intermediate host) และสัตว์อาศัยสุดท้าย (definitive host) โปรโตซัวชนิดนี้พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ มีความจำเพาะสูงต่อสัตว์อาศัยระหว่างหนูและงูเหลือม (Haefner and Frank, 1984) โดยมีการขยายพันธุ์เป็นแบบมีเพศภายในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม ได้สปอร์โรซีสต์ (sporocysts) เป็นผลผลิตสุดท้ายของการเจริญเติบโต โดยพบว่าระยะสปอร์โรซีสต์ของเชื้อชนิดนี้สามารถทำให้หนูสกุลหนูท้องขาวป่วยและตายในที่สุด โดยสปอร์โรซีสต์จะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก เข้าสู่สัตว์อาศัยที่เป็นพาหะคือหนู ซึ่งโปรโตซัวชนิดนี้จะขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในเซลล์บุผิวหลอดเลือดในอวัยวะสำคัญเช่น หัวใจ ปอด ตับ ไต และเจริญพัฒนาเป็นแบรดิซ้อยต์ (bradyzoites) ฝังในกล้ามเนื้อของหนู (sarcocysts) เพื่อรอให้งูซึ่งเป็นสัตว์อาศัยแบบจำเพาะมากินและเข้าสู่วัฏจักรต่อไป (ภาพที่ 1)

ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูสกุลท้องขาวและสกุลหนูพุกป่วยและตายทั้งหมดในระดับห้องปฏิบัติการ และ 71% - 92% ในแปลงทดลองในฟาร์มไก่ นาข้าว และสวนปาล์มน้ำมัน (ยุวลักษณ์ และคณะ,2539 ; ยุวลักษณ์ และคณะ,2540; ยุวลักษณ์ และคณะ,2542) โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม โดยโปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ในกบ คางคก จิ้งเหลน ตุ๊กแก จิ้งจก และแม้กระทั่งสกุลหนูหริ่ง (Jaekel *et*. al.,1999)

Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ ในสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี ได้มอบเหยื่อแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สำหรับกำจัดหนู ให้แก่กรมวิชาการเกษตร เพื่อนำมาผลิตเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปกำจัดหนู และทดสอบประสิทธิภาพในแปลงทดลอง พบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการทำให้หนูสกุลท้องขาว และสกุลหนูพุก ป่วยและตาย 100% (ยุวลักษณ์ และคณะ,2544) ทั้งนี้ เหยื่อที่ดีควรมีส่วนผสมที่สามารถล่อหรือดึงดูดให้หนูมากินได้ โดยปกติมักใช้เมล็ดธัญพืชต่างๆ เช่น ข้าว ปลายข้าว ข้าวโพด ซึ่งการเลือกเหยื่อมีความสำคัญมาก จะต้องเลือกให้เหมาะสม เหยื่อที่ดีควรมีลักษณะที่หนูชอบกิน ราคาไม่แพง หาได้ง่ายในท้องถิ่น และเก็บได้นานโดยคุณสมบัติ หรือประสิทธิภาพในการกำจัดหนูไม่เปลี่ยนแปลง (Henderson *et*. al., 2002) ซึ่งในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบันได้ปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารบางชนิด โดยใช้วัสดุที่มีในประเทศไทยทดแทนสูตรดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม พบว่าการผลิตเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูป ยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น มีขีดความสามารถน้อยในการแข่งขัน

กับอาหารในธรรมชาติของหนู เหยื่อสำเร็จรูปมีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน เนื่องจากรูปแบบของเหยื่อที่ยังไม่เหมาะสมพอที่จะให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน ปัจจัยที่ทำให้โปรโตซัวตาย คือ น้ำมันพืชที่เป็นส่วนผสมหนึ่งของเหยื่อ ปิดกั้นการใช้ออกซิเจนของสปอร์โรซ้อยต์ (sporozoite) ในสปอร์โรซีสต์ มีผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหนูลดลง (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542) (ภาพที่ 2)

ดังนั้น ในการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเดิมที่ยังคงมีข้อจำกัดดังกล่าว เพื่อให้ได้เหยื่อรูปแบบใหม่ที่หนูชอบกิน ราคาถูก มีอายุในการเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 3 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนู และมีศักยภาพในการแข่งขันกับอาหารในธรรมชาติของหนูได้ จึงควรมีการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรอาหารและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป ให้เหมาะสมยิ่งขึ้นสำหรับการผลิตเป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูและสามารถถ่ายทอดให้แก่ภาคเอกชนและผู้ที่สนใจได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus* rattus) และหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาร์ *(Rattus novegicus*; Wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยวพร้อมขวดน้ำ
- เหยื่อแป้งนุ่ม ประกอบด้วย แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพดบด น้ำตาลทราย น้ำมันข้าวโพด อาหารหนูชนิดเม็ด และแป้งทัลคัม (talcum powder)
- อาหารหนูสำเร็จรูป วัสดุเกษตรอื่นๆสำหรับเป็นอาหารเสริมให้สัตว์ทดลอง และใช้ดักหนู
- สารเคมี เช่น น้ำตาลกลูโคส gelatin ,nucleic acid , ethyl alcohol, xanthan gum
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับการปั่นตกตะกอนโปรโตซัว เครื่องมือผ่าตัด beaker, petri-dish , blood couting chamber, เป็นต้น
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น เช่น กระดาษทิชชูอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ผ้าปิดจมูก สำลี ฯลฯ

วิธีการ

1. <u>คัดเลือกหนูทดลองและคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูง</u>

1.1 คัดเลือกหนูทดลองโดยดักหนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) จากแหล่งเกษตรกรรม

และจากสถานที่ราชการทั้งเพศผู้และเพศเมีย มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ 1 สัปดาห์ และคัดเลือกหนูที่โตเต็มวัย สมบูรณ์ แข็งแรง และมีน้ำหนักตัวระหว่าง 95 -120 กรัม จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) บันทึกน้ำหนักและเพศของหนู แล้วแยกใส่กรงทดลอง ละ 1 ตัว อดอาหารหนูก่อนทำการทดลอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

1.2 คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพทำให้หนูป่วยและตาย 100% โดยการให้หนูติดเชื้อ (infected rat) สายพันธุ์วีสตาร์ ที่มีซีสต์ของ *S. singaporensis* ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง แก่งูเหลือม จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัวที่ได้จากมูลงูเหลือมกับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว (เพศผู้ 5 ตัว, เพศเมีย 5 ตัว) ด้วยวิธี bio assay

2. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวและคุณสมบัติทางกายภาพส่วนประกอบของหยื่อ

2.1 หลังจากได้สปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* จากขั้นตอนที่ 1 แล้ว ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อทันที โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อจากสูตร

$$\% \text{ Death} = \frac{[\text{number of stained sporocyst}]}{[\text{total number - number of ghost}]} \times 100$$

2.2 ทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพ (เช่น การละลาย การแข็งตัว) ของ food additives ชนิดต่างๆ เช่น เจล เจลาติน ผงวุ้นและแซนแทนกัม (Caldic ®) ในห้องปฏิบัติการ เพื่อให้ได้ชนิดและความเข้มข้นที่เหมาะที่สุด ที่สามารถทำให้เชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* แขวนลอยและมีชีวิตอยู่ได้นานอย่างน้อย 3 เดือน

3. ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ

3.1 บรรจุสปอร์โรซีสต์ของเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจล (รูปแบบใหม่) ลงในเหยื่อแป้งนุ่ม แล้วแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือกลุ่มแรกนำไปทดสอบการมีชีวิตของเชื้อ โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid และกลุ่มที่ 2 นำไปทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้หนูป่วยและตาย ด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ในห้องปฏิบัติการ

3.2 สังเกตผลและผ่าพิสูจน์หนูทดลองที่ตาย เพื่อตรวจสอบอวัยวะภายใน บันทึกการทดลอง และถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope)

3.1 เตรียมเหยื่อและทดสอบประสิทธิภาพ เช่นเดียวกับข้อ 1. หลังทิ้งเหยื่อไว้นาน 1 , 2 , 3 4 , 5 และ 6 เดือน พร้อมบันทึกผลการทดลอง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2548 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 5 ปี (การทดลองยังไม่เสร็จสิ้น)

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และดักหนูทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม สถานที่ราชการในกรมวิชาการเกษตร รวมถึงเขตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. <u>คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพ</u>

คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้หนูป่วยและตาย ด้วยวิธี bio assay โดยให้เชื้อแก่หนูด้วย feeding tube ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S- 82

2. <u>ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวที่เป็นส่วนประกอบของหยื่อ</u>

เชื้อโปรโตซัวที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจล แล้วทิ้งไว้นาน 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน 4 เดือน และ 5 เดือน เมื่อนำมาทดสอบการมีชีวิต โดยการย้อมด้วยสี nucleic acid ซึ่งสีย้อมที่ชี้วัดการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium และ Syto-9 (Belosevic *et* al., 1997) หลังจากย้อมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าสปอร์โรซีสต์ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจลยังคงมีชีวิต 100%, 100 % , 99% , 96% และ 60 % ตามลำดับ

3. <u>ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ</u>

จากการทดสอบประสิทธิภาพในการทำให้หนูป่วยและตายด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้านในห้องปฏิบัติการ โดยให้เชื้อปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ สังเกตผลและผ่าพิสูจน์หนูท้องขาวบ้านที่ตาย เพื่อตรวจสอบอวัยวะภายใน พบว่าเชื้อในรูปแบบเจลที่เก็บไว้นาน 1 เดือน 2 เดือน และ 3 เดือน ทำให้หนูตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายในเวลา 17 - 42 วัน ซึ่งหนูที่ตายส่วนใหญ่มีอาการตาแฉะ น้ำหนักลด เมื่อผ่าพิสูจน์อวัยวะภายใน พบว่าเนื้อเยื่อปอดและหัวใจมีเลือดคั่ง บางตัวมีอาการน้ำท่วมปอด ซึ่งอาการดังกล่าว เกิดจากเชื้อเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อหัวใจ (วิยะดา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า หนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้นไป จำนวน 2 ใน 3 มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา (ภาพที่ 3)

จากการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล พบว่าหนูยังชอบกิน และมีอายุในการเก็บรักษาได้นานไม่น้อยกว่า 3 เดือน โดยยังคงมีประสิทธิภาพในการกำจัดหนูได้ 50-70 % จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรจะพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากเจลมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว โครงสร้างเจลเกิดจากโมเลกุลของสายโพลิเมอร์ จับกันด้วยพันธะชนิดต่างๆ ที่สามารถจับกับน้ำหรือสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ ไว้ภายในได้ (McClements, 1999) ซึ่งในธรรมชาติ มีโพลิเมอร์ชีวภาพหลายชนิด ที่มีคุณสมบัติการเกิดเจล เนื่องจากโพลิเมอร์ชีวภาพเหล่านี้ มีขนาดโมเลกุลใหญ่และสามารถละลายน้ำได้ เช่น โพลิเมอร์กลุ่มโพลิแซคคาไรด์ alginate จากเชื้อ *Pseudomonas*, dextran จากเชื้อ *Leuconostoc mesenteroides* และสาร xanthan จากเชื้อ *Xanthomonas compestris* สารแซนแทนกัม (xanthan gum) เป็นสารประกอบโพลีแซคคาไรด์ ที่แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* สร้างขึ้นบริเวณผนังเซลล์ โดยแบคมีเรียชนิดที่นิยมนำมาผลิตสารแซนแทนได้แก่ *X. campestris* และ *X.phaseoli* (บุษราคัม,2548)

อย่างไรก็ตาม พบว่าเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่เก็บรักษาไว้นานมากกว่า 3 เดือน มีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้น เพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อและควบคุมคุณภาพของเหยื่อรูปแบบเจล จึงต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของหนู การเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปัจจัยอื่นๆเกี่ยวกับความแข็งแรงของเชื้อ ซึ่ง Rehg (1996) พบว่าสาร dexamethasone สามารถลดระบบภูมิคุ้มกันของหนูทดลองต่อเชื้อโปรโตซัว *Cryptosporidium pavum* ได้ และ Schmatz (1997) รายงานว่า manitol มีความสำคัญต่อการมีชีวิตและความแข็งแรงของขบวนการขยายพันธุ์ของโปรโตซัว *Eimeria* ในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตในสัตว์อาศัย โดยพบว่าระยะโอโอซีสต์มี manitol สูงถึง 0.3 โมล (Mol.) ซึ่งได้จาก manitol cycle ในขบวนการเมตาบอลึซึมของการขยายพันธุ์โปรโตซัวแบบมีเพศ ซึ่งจะเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของโอโอซีสต์ของโปรโตซัวชนิดนี้ เมื่อถูกปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ผลการทดสอบความชอบต่อเหยื่อรูปแบบใหม่ ของหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 30 ตัว (เพศผู้ 15 ตัว, เพศเมีย 15 ตัว) ในห้องปฏิบัติการ พบว่าหนูท้องขาวบ้านทั้งสองเพศ ชอบกินเหยื่อแป้งนุ่มรูปแบบใหม่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P \leq 0.05$) และเชื้อที่อยู่ในสาร xanthan gum นาน 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน,4 เดือน และ 5 เดือน ยังคงมีชีวิต 100%, 100 %, 99%, 96% และ 60% ตามลำดับ เมื่อทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) จากการผ่าพิสูจน์หนูที่ตาย พบว่าหนูที่ตายส่วนใหญ่ตาแฉะ น้ำหนักลด น้ำท่วมปอด และหนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้น

ไป ประมาณ 70 % มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา

จากการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล พบว่าหนูยังชอบกิน และเหยื่อที่เก็บรักษานาน 3 เดือน ยังคงมีประสิทธิภาพดีในการกำจัดหนูได้ 50 -70 % ดังนั้นเหยื่อดัดแปลงรูปแบบเจล จากผงแซนแทนกัม จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรจะพัฒนาต่อไปได้ เนื่องจากแซนแทนกัมมีลักษณะก้ำกึ่งระหว่างของแข็งและของเหลว จึงสามารถจับกับน้ำไว้ภายในได้ ซึ่งลักษณะดังกล่าว จะช่วยให้สปอร์โรซีสต์มีชีวิตนานขึ้น

อย่างไรก็ตาม พบว่าเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่เก็บรักษาไว้นานกว่า 3 เดือน มีประสิทธิภาพลดลง ดังนั้น เพื่อการปรับปรุงประสิทธิภาพของเชื้อและควบคุมคุณภาพของเหยื่อรูปแบบเจล จึงต้องมีการศึกษาและพัฒนาเพิ่มเติมถึงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของหนู การเพาะเลี้ยงเซลล์ รวมถึงปัจจัยอื่นๆเกี่ยวกับความแข็งแรงของเชื้อ เพื่อให้เหมาะสมยิ่งขึ้นสำหรับการผลิตเป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูในเชิงพาณิชย์ และสามารถถ่ายทอดให้แก่ผู้ที่สนใจได้

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณบุษราคัม อุดมศักดิ์ นักวิชาการโรคพืชชำนาญการพิเศษ กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่อนุเคราะห์แซนแทนกัม สำหรับการทดลองในครั้งนี้ และขอขอบคุณ นายทรงทัพ แก้วตา และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู และดูแลหนูทดลอง ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และท้ายที่สุด ขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และธีระเดช เจริญรักษ์. 2539. ทดสอบความชอบในการกินเหยื่อของหนูนอร์เวย์ .รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 250-251.

บุษราคัม อุดมศักดิ์ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล และสุณีรัตน์ สีมะเดื่อ.2548. คัดเลือกสายพันธุ์แบคทีเรียสกุล *Xanthomonas* ที่มีประสิทธิภาพสูงในการสร้างแซนแทนกัม. รายงานผลการวิจัยปี 2548. สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 254.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงายผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปราการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง,2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

วิยะดา สีหะบุตร ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ และกรแก้ว เสือสะอาด.2539. การก่อพยาธิสภาพของ *Sarcocystis singaporensis* (Zaman and Colley, 1975) ในหนูพุกใหญ่. รายงานผลการวิจัยปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 238.

เสริมศักดิ์ หงส์นาค พวงทอง บุญทรง เกษมทองทวี ชมพูนุท จรรยาเพศ กรแก้ว เสือสะอาด ทรงทัพ แก้วตา และยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ. 2536. การประเมินความเสียหายของข้าวที่เกิดจากหนูศัตรูข้าวในประเทศไทย. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2536. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร.หน้า 10-18.

Anderson,R.M. and May, R.1978. Regulation and stability of host-parasite population Interaction:

Bartoshuk,L.M., Harned,M.A. and Parks,L.H. 1971. Taste of water in the cats: effects on sucrose preference, Science 171 : pp.699-701.

Beaver, P.C., and Maleckar, J.R. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976.*Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. J.I of Parasitology, 67: 241-256.

McClements, D.J. 1999. Food Emulsions: Principles, Practice & Techniques. CRC Press. pp. 275 - 278.

Fayer, R. and Nerad, T. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium Pavum* Oocysts. Appl. And Envi.Microbiol. 62(4) : 1431-1433.

Haefner, U and Frank, W. 1984. Host specificity and host range of the genus Sarcocystis in three snake-rodent life cycles. Zb1.Bak.Hyg., Orig. A 256, 296-299.

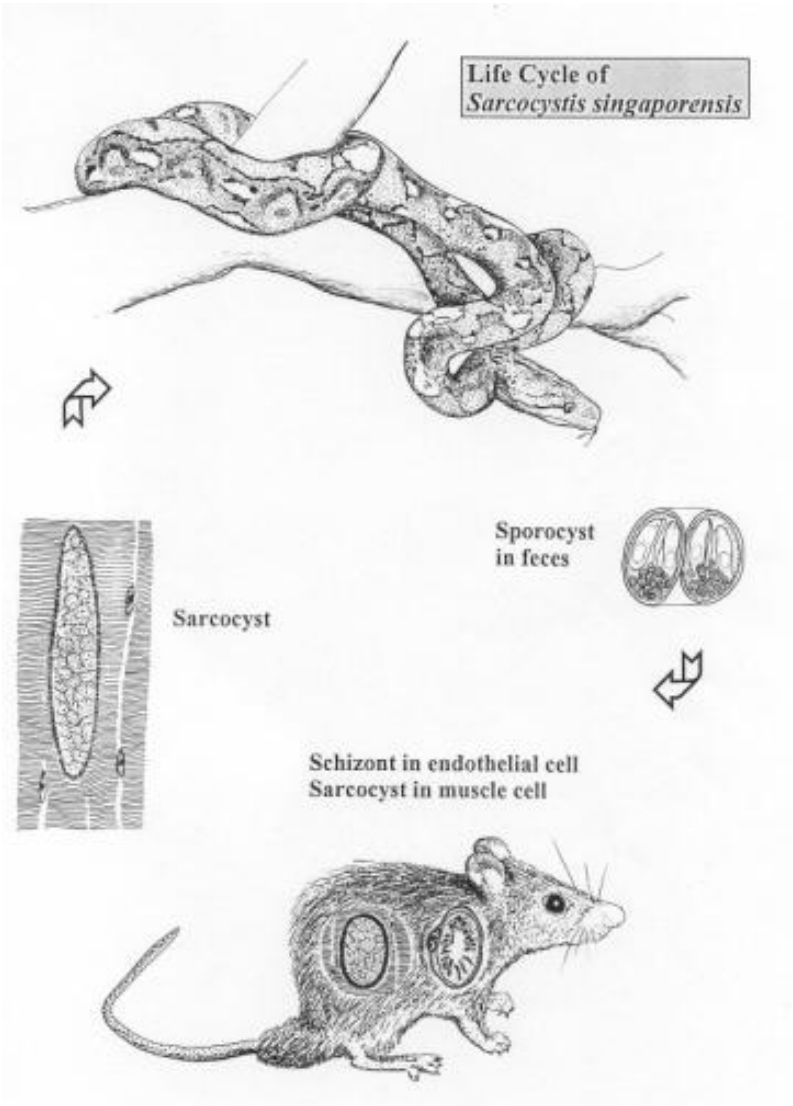
Henderson, R., Ross, J. and Frampton, C. 2002. Development of a long life bait for control of stoats. DOC Sci. Int. Ser. 51 ,Department of conservation. Wellington.: 15 p.

Jaekel, T., Burgstaller, H. and Frank, W. 1996. *Sarcocystis singaporensis* : Studies on host specificity, pathogenicity, and potential use as a biocontrol agent of wild rats. J.Parasitol. 82, 280-287.

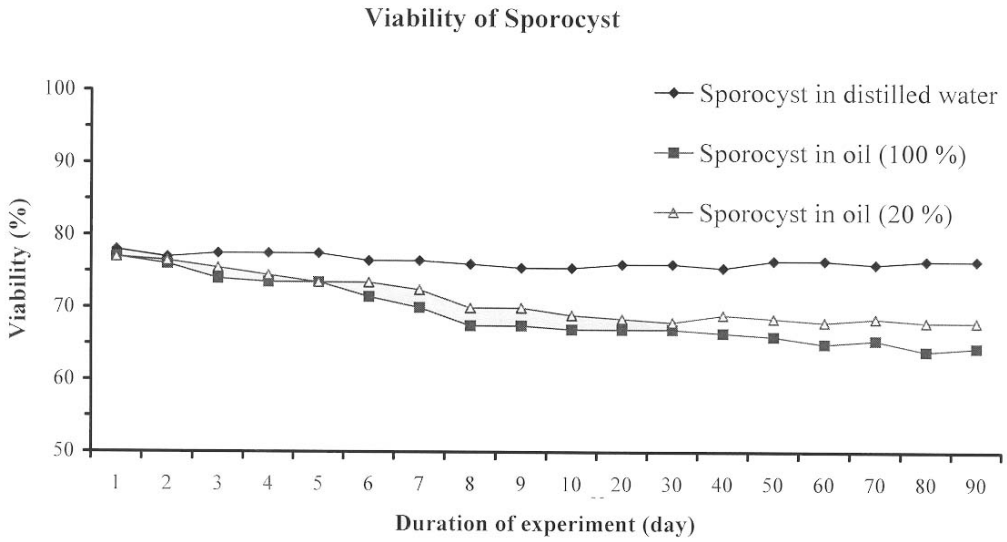
Jaekel,T., Khprasert,Y ., Endepol,S., .Acher-Baumann,C.,Suesa-ard, K., Promkerd,K., Kliemt, D.,Boonsong ,P. and Hongnark,S.1999. Biological Control of rodents using *Sarcocystis singaporensis*. Int., J., Parasitol. 29 : 1321-1330.

Rehg, J.E., 1996. Effect of Di-ethyldithiocarbamate on *Cryptosporidium pavum* infection in Immune - supressed rats. J.Parsitol. 82(1) : 158-162.

Schmatz,D.M. 1997. The Manitol cycle in Eimeria. Parasitology : 114.



ภาพที่ 1 แสดงวงจรชีวิตของเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีวงจรชีวิตและมีการขยายพันธุ์โดยมีสัตว์อาศัยระหว่างหนู และงูเหลือม
(ที่มา : Jaekel, 1996)



ภาพที่ 2 : กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลา และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในสภาพต่างๆ
(ที่มา : ยุวลักษณ์ และคณะ, 2542 และ Jaekel,1996)

ก **ข**

ภาพที่ 3 : หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) ที่ตายหลังจากกินเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่
ก หนูท้องขาวบ้าน ที่ตายภายหลังได้รับเชื้อ 19 วัน มีอาการตาแฉะ และน้ำหนักลด
ข หนูท้องขาวบ้าน ที่ตายภายหลังได้รับเชื้อ 42 วัน พบซีสต์ปริมาณสูงในกล้ามเนื้อโดยเฉพาะ บริเวณหน้าท้องและกล้ามเนื้อบริเวณโคนขา