ศึกษาระยะเวลา การเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

คัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay ก่อนนำมาผลิตเหยื่อรูปแบบใหม่ที่ ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 มาผลิตเหยื่อรูปแบบใหม่โดยเติมสาร แซนแทนกัม (xanthan gum) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น จากการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน, 2 เดือน และ 4 เดือน พบว่าเชื้อยังคงมีชีวิต 100 %, 100 % และ 96 % ตามลำดับ จากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่นาน 6 เดือน โดยเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-05-02-02-52

คำนำ

ปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีวินทรีย์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดหนู โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่น และถึงแม้ว่าในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปแล้ว โดยปรับปรุงจากเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สูตรดั้งเดิมที่ได้รับจาก Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ ในสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี คุณสมบัติของเหยื่อที่ดีควรมีลักษณะที่หนูชอบกิน ราคาไม่แพง หาได้ง่ายในท้องถิ่น และเก็บได้นานโดยประสิทธิภาพในการกำจัดหนูไม่เปลี่ยนแปลง (Henderson *et*. al., 2002) เหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน เป็นการปรับปรุงองค์ประกอบของอาหารบางชนิด โดยใช้วัสดุที่มีในประเทศไทยทดแทนสูตรดั้งเดิม อย่างไรก็ตาม เหยื่อโปรโตซัวสำเร็จรูปที่ผลิตในปัจจุบันยังมีข้อจำกัดอยู่หลายประการ เช่น มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน เนื่องจากรูปแบบของเหยื่อยังไม่เหมาะสมพอที่จะให้เชื้อมีชีวิตอยู่ได้นาน ยุวลักษณ์ และคณะ (2542) พบว่าปัจจัยที่ทำให้เชื้อโปรโตซัวตาย คือน้ำมันพืชซึ่งใช้เป็นส่วนผสมของเหยื่อ โดยปิดกั้นการใช้ออกซิเจนของสปอร์โรซ้อยต์ (sporozoite) ที่อยู่ในสปอร์โรซีสต์ เป็นผลทำให้ประสิทธิภาพในการกำจัดหนูลดลง

Beaver and Maleckar (1981) พบว่าในมูลงูเหลือม นอกจากจะพบสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* แล้ว ยังพบสปอร์โรซีสต์ *S. vilivillosi* และ *S. zamani* ซึ่งสปอร์โรซีสต์เหล่านี้สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C ได้ประมาณ 2 ปี โดยยังคงประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูที่ติดเชื้อป่วยและตายได้

Belosevic *et* al. (1997) ใช้สีย้อมในกลุ่ม nucleic acid เพื่อตรวจวัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ของปรสิต *Crytosporidium parvum* ในหลอดทดลอง และสรุปว่าสีย้อมที่ตรวจวัดการมีชีวิตของโอโอซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium and Syto-9

ในปี 2549 ได้ทดสอบความชอบของหนูท้องขาวบ้านในห้องปฏิบัติการ พบว่าอาหารที่หนูท้องขาวบ้านชอบกินมากที่สุด 3 อันดับแรก คือ ปลาซาร์ดีน ข้าวกล้อง และอาหารหนูชนิดเม็ด คิดเป็น 100.00%, 72.40% และ 70.25% ตามลำดับ ทำการทดลองนำเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่แขวนลอยอยู่ในรูปแบบเจลมาผลิตเหยื่อโปรโตซัว ทิ้งไว้ 1 เดือน แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี pathogenecity test กับหนูท้องขาวบ้าน 10 ตัว พบว่าสามารถทำให้หนูป่วยและตาย 100% ในการปรับปรุงเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเดิมที่ยังคงมีข้อจำกัดดังกล่าว ควรมีการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรอาหารและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป และศึกษาอายุการเก็บรักษาไปพร้อมๆกัน เพื่อให้ได้วิธีการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบที่เหมาะสมที่สุด

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus* rattus) และหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาร์ *(Rattus novegicus*; Wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยว พร้อมขวดน้ำ
- 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

วิธีการ

<u>ขั้นตอนที่1</u>. ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อแป้งนุ่มดัดแปลง ที่มีส่วนผสมดังนี้

น้ำมันข้าวโพด : แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี :อาหารหนูชนิดเม็ด

อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10

<u>ขั้นตอนที่2</u> ศึกษาระยะเวลาการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ทำการทดลอง ดังนี้

2.1 นำเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล จำนวน 600 ซอง ไปเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (treatment) กรรมวิธีละ 100 ซอง เป็นเวลานาน 5 เดือน ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เก็บที่อุณหภูมิ -3 ± 1 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 2 เก็บที่อุณหภูมิ -3 ± 1 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 3 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 4 เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 5 เก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส

กรรมวิธีที่ 6 เก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส (เก็บให้พ้นแสงแดด)

กรรมวิธีที่ 7 เชื้อโปรโตซัวแขวนลอยในน้ำเกลือ PBS 1% เก็บที่อุณหภูมิ 5 ± 1 องศาเซลเซียส

2.2 หลังทำการทดลองในข้อ 1. เป็นระยะเวลา 1 เดือน, 2 เดือน, 3 เดือน, 4 เดือน, 5 เดือน และ 6 เดือน สุ่มเลือกเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ทั้ง 6 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซอง เปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 7 โดยนำมาทดสอบประสิทธิภาพด้วยวิธี bio assay กับหนูท้องขาวบ้าน จำนวน 10 ตัว/กรรมวิธี (ตามวิธีมาตรฐานของ ASTM) สังเกตและผ่าพิสูจน์หนูทดลอง เพื่อตรวจสอบซีสต์ในกล้ามเนื้อและอวัยวะภายใน บันทึกการทดลอง และถ่ายภาพใต้กล้องจุลทรรศน์ (light microscope)

2.3 ในแต่ละเดือน ทำการสุ่มเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจล ทั้ง 6 กรรมวิธีๆ ละ 10 ซอง ละลายในน้ำกลั่น เพื่อตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว ด้วยการย้อมสี nucleic acid ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของเชื้อจากสูตร

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

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเพศ น้ำหนักหนูทดลอง ทั้งก่อนและหลังการทดลอง
2. บันทึกวันที่เริ่ม สิ้นสุด และระยะเวลาที่หนูทดลองตาย
3. บันทึกข้อมูลอุณหภูมิ ความชื้นสัมพัทธ์ของทั้ง 6 กรรมวิธี ตลอดระยะเวลาทดลอง
4. บันทึกเปอร์เซ็นต์การตายของสปอร์โรซีสต์หลังจากย้อมด้วยสี nucleic acid
5. บันทึกชนิดและปริมาณซีสต์ในกล้ามเนื้อหนูทดลอง พร้อมถ่ายภาพ
6. บันทึกข้อมูลอื่นๆ ที่สังเกตได้ ตลอดการทดลอง

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 2 ปี (การทดลองยังไม่เสร็จสิ้น)

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และดักหนูทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม สถานที่ราชการในกรมวิชาการเกษตร รวมถึงเขตมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ บางเขน

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ได้เหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ที่มีการเติมสาร แซนแทนกัม (xanthan gum)และมีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ / เม็ด โดยการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 โดยแซนแทนกัม (xanthan gum) มีคุณสมบัติที่เหมาะสมทำให้สปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวมีชีวิตนานขึ้น

สามารถจับกับน้ำและสารอื่นที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำไว้ภายในได้ นอกจากนี้สารแซนแทนกัม ยังสามารถละลายน้ำได้ที่อุณหภูมิปกติ

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน, 2 เดือน และ 4 เดือน พบว่าเชื้อยังคงมีชีวิต 100 %, 100 % และ 96 % ตามลำดับ และจากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิดังกล่าว ทำให้หนูทดลองตาย 70 % , 50 % และ 60 % ภายใน 27 วัน โดยเฉลี่ย (17-42 วัน; n=30) การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ นาน 6 เดือน โดยเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม)

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ นายทรงทัพ แก้วตา เจ้าพนักงานการเกษตรชำนาญงาน และนายโยฆินทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู ดูแลหนูทดลอง เช่น ให้อาหาร เปลี่ยนกรง ทำความสะอาดกรง และชั่งน้ำหนักหนู ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง และขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

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

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 36 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:

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.

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.