ทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในการป้องกันกำจัดหนู

ดาราพร รินทะรักษ์ ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ กรแก้ว เสือสะอาด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S -82 การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการพัฒนาสูตรและรูปแบบที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ พร้อมกับศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ สำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในแปลงทดลอง ขณะเดียวกันได้ติดตามข้อมูลระบาดของหนูในพื้นที่เกษตรกรรรมและการสำรวจประชากรหนูด้วยวิธีการต่างๆ และติดต่อแปลงทดลองสำหรับทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัว ในสภาพไร่

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-06-03-02-52

คำนำ

ตั้งแต่ปี 2536 – 2545 กรมวิชาการเกษตร องค์การความช่วยเหลือทางด้านวิชาการของสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (GTZ) และบริษัทไบเออร์ จำกัด ได้ร่วมกันทำการวิจัยโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* และพบว่าปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นชีวินทรีย์กำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูสกุลท้องขาว (*Rattus* sp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* sp.) ป่วยและตาย 100%ในห้องปฏิบัติการ และตาย 71% - 92% ในแปลงที่ทดลองในฟาร์มไก่ นาข้าว และสวนปาล์มน้ำมัน (ยุวลักษณ์ และคณะ,2539 ; ยุวลักษณ์ และคณะ,2540; ยุวลักษณ์ และคณะ,2542) โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้โปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถเจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ในสัตว์ชนิดอื่น หรือแม้กระทั่งหนูในสกุล *Mus* sp. (Jaekel *et*. al.,1999)

ปัจจุบัน มีการนำเชื้อโปรโตซัวชนิดดังกล่าว มาผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป โดยปรับปรุงจากเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สูตรดั้งเดิมที่ได้รับจาก Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี แต่เหยื่อสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน ยังมีข้อจำกัด คือ มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน จึงทำการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป และศึกษาอายุการเก็บรักษาไปพร้อมๆกัน ทั้งนี้นอกจากการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการแล้ว จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลองไปด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนและสามารถนำไปใช้ได้จริง และสามารถถ่ายทอดแก่เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเหยื่อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม *(Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) และหนูทดลองสายพันธุ์วีสตาร์ *(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
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น เช่น กระดาษทิชชูอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ผ้าปิดจมูก สำลี ฯลฯ

วิธีการ

<u>ขั้นตอนผลิตเหยื่อโปรโตซัวในรูปแบบเจล</u> (ในห้องปฏิบัติการ)

1. ผลิตเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจลที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ $2x10^5$ สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ภายในเหยื่อแป้งนุ่มดัดแปลง ที่มีส่วนผสมดังนี้
   น้ำมันข้าวโพด :แป้งทัลคัม :เมล็ดข้าวโพดบด :น้ำตาลทราย :แป้งสาลี :อาหารหนูชนิดเม็ด
   อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10
2. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อในเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบจลด้วยวิธี nucleic acid staining
3. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อที่บรรจุในเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay กับหนูสกุลท้องขาว จำนวน 30 ตัว สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

<u>ขั้นตอนทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อรูปแบบเจล</u> (ในแปลงทดลอง) ทำการทดลอง ดังนี้

1. กำหนดพื้นที่และวัดขนาดแปลงทดลอง จำนวน 4 แปลง วางแผนการทดลองแบบ RCB ดังนี้
   แปลงที่ 1 แปลงเปรียบเทียบ (ไม่มีการวางเหยื่อโปรโตซัว)
   แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ (วางเหยื่อพิษราคูมิน)
   แปลงที่ 3 วางเหยื่อโปรโตซัวแป้งนุ่มรูปแบบเดิม
   แปลงที่ 4 วางเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ (รูปแบบเจล)
2. ประเมินประชากรหนูในแต่ละแปลง โดยใช้เหยื่อล่อ และสังเกตุพร้อมบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนู ติดต่อกัน 3 คืน ควบคู่กับสำรวจรอยตีนหนู และดักหนู เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนประชากรหนู ในแต่ละแปลงทดลอง
3. เริ่มวางเหยื่อโปรโตซัวตามแผนการทดลอง จำนวน 2 ครั้งๆละ 2 คืนติดต่อกัน โดยแต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน พร้อมสังเกตุและบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนู
4. หลังการวางเหยื่อโปรโตซัวตามแผนทดลอง 15 วัน ทำการสำรวจประชากรหนูเช่นเดียวกับข้อ 2 และดักหนูในแปลงทดลองทั้งที่มีชีวิต และซากหนูที่เพิ่งตาย มาผ่าพิสูจน์ ในห้องปฏิบัติการ

เวลาและสถานที่

ระยะเวลาเริ่มต้น ตุลาคม 2551 **สิ้นสุด** กันยายน 2553 **รวม** 2 ปี

สถานที่ ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู และแปลงทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพ

จากการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้หนูป่วยและตาย 100% ด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S- 82

การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวที่เป็นส่วนประกอบของหยื่อ

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน 2 เดือน 3 เดือน 4 เดือน และ 5 เดือน เมื่อนำมาย้อมด้วยสีซึ่งสามารถตรวจวัดการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ดีที่สุด คือสี Hexidium และ Syto-9 (Belosevic *et* al., 1997) หลังจากย้อมทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงฟลูโอเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าสปอร์โรซีสต์ที่แขวนลอยอยู่ในเจลแซนแทนกัม มีชีวิต 100%, 100 % , 99% , 96% และ 60 % ตามลำดับ

การทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเหยื่อรูปแบบใหม่ในการทำให้หนูป่วยและตายด้วยวิธี bio assay พบว่าเหยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ทำให้หนูทดลองตาย 70 % โดยเหยื่อที่เก็บไว้ 2 เดือน ทำให้หนูตายลดลง 50 % และเหยื่อที่เก็บไว้ 4 เดือน ทำให้หนูตาย 60 % ซึ่งหนูที่ตายส่วนใหญ่มีอาการตาแฉะ น้ำหนักลด เมื่อผ่าพิสูจน์อวัยวะภายใน พบว่าเนื้อเยื่อปอดและหัวใจมีเลือดคั่ง บางตัวมีอาการน้ำท่วมปอด ซึ่งอาการดังกล่าว เกิดจากเชื้อเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อหัวใจ (วิยะดา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า หนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้นไป จำนวน 2 ใน 3 มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา

การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น ควรทำการศึกษาเพิ่มเติม เกี่ยวกับผลของอุณหภูมิและทดสอบประสิทธิภาพต่อการเก็บรักษาเหยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ซึ่งเก็บในสภาพที่ต่างๆ ในห้องปฏิบัติการ (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพเหยื่อโปรโตซัว ในสภาพไร่

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 136 หน้า.

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.