ศึกษาวิธีการรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

Study on methods to store the sporocysts of *Sarcocystis singaporensis* using as stock for production of controlling rats bioagent

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์
สมเกียรติ กล้าแข็ง
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ได้สารแขวนลอยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูงและแบ่งเพื่อการวิจัยการเก็บรักษา ซึ่งทำการแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย โดยทำการตรวจสอบทุกระยะ 6 เดือน คือ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี, 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ตามลำดับ การทดลองย่อยที่ 1 โดยเก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาด และในสารละลายเกลือ PBS 1% ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C โดยที่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดนาน 6 เดือน – 1 ปี สามารถทำให้หนูท้องขาวชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด(100%) ในขณะที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดนาน 2 ปี พบหนูท้องขาวป่วยและตายประมาณ 50% ส่วนสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% นาน 6 เดือน ป่วยและตายทั้งหมด และที่เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 1 ปี และ 2 ปี พบหนูท้องขาวป่วยและตาย คิดเป็น 75% และ 50% ตามลำดับ ขณะที่เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณภูมิ 4-10 °C ระยะเวลา 6 เดือน ถึง 1 ปี ใกล้เคียงกันขณะที่ระยะเวลา 2 ปี เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% เริ่มสูงกว่าอย่างชัดเจน

สำหรับการทดลองย่อยที่ 2 ทำการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* โดยวิธี Sugar flotation ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม nucleic acid พบเปอร์เซนต์การรอดชีวิตจนถึงระยะเวลา 2 ปี ประมาณ 77% ในส่วนของการทดลองย่อยที่ 3 ทำการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว ภายในระยะเวลา 1 ปี สามารถทำให้หนูท้องขาว ชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด (100%) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาเป็น 2 ปี ไม่สามารถทำให้หนูทดลองตายได้เลย

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-04-01-01-54

คำนำ

การผลิตขยายโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง และไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อป่วยตายได้ จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสปอร์โรซีสต์และเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่มีศักยภาพสูงไม่สม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง และไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ ส่วนมาก(90%)มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆพบปะปนอยู่ด้วย ทำให้ได้เชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงที่ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตาม พบว่า สปอร์โรซีสต์ใน สารแขวนลอยบางหลอดที่ใสสะอาดและเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 - 7 เดือน และนำมาใช้ผลิตเหยื่อ โปรโตซัวกำจัดหนูนั้น ยังคงมีศักยภาพสูงในการทำให้หนูป่วยตายได้ถึง 100% จึงเห็นได้ว่าการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่มีศักยภาพสูงในน้ำเปล่าหรือสารละลาย PBS 1% สามารถรักษาการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้จึงต้องการทราบเทคนิค/วิธีการเก็บรักษาโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคต่อหนูสูง ให้สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน และนำกลับมาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู เพื่อทดแทนการนำเชื้อโปรโตซัวที่มีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ จากธรรมชาติ

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. กรงเลี้ยงงูเหลือมและงูเหลือม กรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูท้องขาว อาหารหนูและน้ำ
2. Sporocysts suspension of *S. singaporensis*
3. Microtube 50 ml., pipette 20-100 µl., 100-1000 µl. + tips, nucleic acid stains(live/dead bacLight Bacterial Viability Kit), ether, sugar, formalin 37%, etc
4. Feeding tube 2 sets , light microscope +fluorescent light set, electronic stove, etc
5. น้ำดื่มสะอาด น้ำเกลือ PBS ไนโตรเจนเหลวและถังแช่แข็ง
6. กระดาษทิชชูแบบอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

1. การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis*

ปฏิบัติตามกระบวนการในรายงานโครงการวิจัยโรงงานต้นแบบการผลิตขยายสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว , *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนูในเชิงพาณิชย์ของยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ (2553)

2. การเก็บรักษาการรักษาสปอร์โรซีสต์ของค๊อคซิเดียนโปรโตซัว *S.singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู

<u>การทดลองย่อยที่ 1</u> การเปรียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

วางแผนการทดลองแบบ 2x5 Factorial in CRD มี 5 ซ้ำ (5 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอด แต่ละหลอดมีสปอร์โรซีสต์แขวนลอยอยู่ $1x10^6$ ซีสต์ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 คือ สารละลายในการเก็บรักษามี 2 ระดับ คือ น้ำดื่มสะอาดและสารละลายเกลือ PBS

ปัจจัยที่ 2 คือ ระยะเวลาในการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์มี 7 ระดับ คือ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี , 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ตามลำดับ

ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตซัวทั้งสองปัจจัยโดยการใช้สีย้อม nucleic acid และศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อโปรโตซัวโดยวิธี bioassay กับหนูท้องขาวที่ 6 เดือน , 1 ปี , 2 ปี , 2 ปี 6 เดือน , 3 ปี , 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ตามลำดับ

การบันทึกข้อมูล

1. เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว
2. เปอร์เซ็นต์การตายของหนู

<u>การทดลองย่อยที่ 2</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

วางแผนการทดลอง แบบ CRD มี 3 ซ้ำ (3 เชื้อ) ซ้ำละ 3 หลอดๆ ละ 1 ul 7 กรรมวิธี คือ

1. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 6 เดือน
2. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 1 ปี
3. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 2 ปี
4. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ4-10°Cนาน 2 ปี 6 เดือน
5. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 3 ปี
6. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ4-10°Cนาน 3 ปี 6 เดือน
7. ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ ที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C นาน 4 ปี

เตรียมสารละลาย

สารละลาย A : Sheather's solution : PBS +1% tween 80 (1:4)

สารละลาย B : Sheather's solution : PBS +1% tween 80 (1:2)

ทำการเตรียมตัวอย่างโดยการปั่นล้างมูลงูเหลือมจนได้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ใส่สารละลาย B 15 มิลลิลิตร ลงไปในหลอดปั่นขนาด 50 มิลลิลิตร หลังจากนั้นใส่สารละลาย A 10 มิลลิลิตร และใส่สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ไว้ด้านบนสุดปริมาตร 10 มิลลิลิตร ทำการปั่นตกตะกอนที่ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ถ่ายรินส่วนชั้นของสปอร์โรซีสต์ที่อยู่เหนือตะกอน ลงในหลอดปั่นหลอดใหม่ขนาดเดียวกัน 2 หลอด ในปริมาตรที่เท่ากัน ปั่นตกตะกอนอีกครั้ง หลังจากนั้นดูดสารละลายที่อยู่เหนือตะกอนออกช้าๆ ให้แต่ละหลอดเหลือสารละลายประมาณ 12.5 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารแขวนลอยทั้งสองผสมลงในหลอดเดียวกันและนับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้

เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่เก็บเกี่ยวได้ ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม nucleic acid ทุก 6 เดือน 1 ปี , 2 ปี , 2 ปี 6 เดือน , 3 ปี , 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัว

<u>การทดลองย่อยที่ 3</u> การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

ทำการทดลองโดยสลายผนังเซลล์ของสปอร์โรซีสต์จำนวน 200,000 ซีสต์ ตามวิธีการของ Jaekel (2007) เพื่อแยกแต่ละเซลล์โปรโตซัว (sporozoits) ออกมา แล้วนำไปแช่แข็งในไนโตรเจนเหลวที่ -10° C ถึง – 20° C เป็นเวลา 6 เดือน, 1 ปี , 2 ปี , 2 ปี 6 เดือน , 3 ปี , 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี จากนั้นนำเซลล์โปรโตซัวออกมาทดสอบการสร้างซีสต์ในกล้ามเนื้อลำตัวหนูท้องขาว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 ซ้ำ (4 เชื้อ) ซ้ำละ 1 ตัว 7 กรรมวิธี (ระยะเวลาการเก็บรักษา) คือ

กรรมวิธีที่ 1. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 6 เดือน
กรรมวิธีที่ 2. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 1 ปี
กรรมวิธีที่ 3. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี
กรรมวิธีที่ 4. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 2 ปี 6 เดือน
กรรมวิธีที่ 5. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี
กรรมวิธีที่ 6. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 3 ปี 6 เดือน
กรรมวิธีที่ 7. เซลล์โปรโตซัวที่เก็บในไนโตรเจนเหลว นาน 4 ปี

ดำเนินการดังนี้

1. เตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ลงในหลอดปั่น 15 ml
2. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที
3. เติมสารละลาย NaOCL 8% 5 ml (น้ำกลั่น 4.6 ml และ NaOCL 0.4 ml)
4. เขย่าสารละลายทันทีเป็นเวลา 5 นาที
5. แช่น้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
6. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที จำนวน 4 ครั้ง ; ล้างด้วยน้ำกลั่น
7. ละลายตะกอนเซลล์ใน RPMI medium
8. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที; ด้วย RPMI medium
9. เติมสารละลาย Pepsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที
10. ทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
11. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที; ด้วย RPMI medium
12. เติมสารละลาย trypsin ลงไปในตะกอนเซลล์ แล้วเขย่าทันที
13. ทำการย่อยที่ 37°c เป็นเวลา 2.5 ชั่วโมง
14. ทำการเช็คลักษณะสปอร์โรซอยด์โดยกล้องจุลทรรศน์

15. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที; ด้วย RPMI medium
16. นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที; ด้วย FBS(Fetal Bovine Serum)
17. นับจำนวนสปอร์โรซอยด์ใน Hemocytometerโดยกล้องจุลทรรศน์
18. นำ สปอร์โรซอยด์แช่น้ำแข็ง
19. สำหรับการเก็บ Freezing ผสม RPMI 840 ml , DMSO(10%) 120 ul และ FBS (20%)240 ul
20. ทำการเก็บเซลล์ที่ได้ลงใน Cryotubes หลังจากนั้นเก็บลงใน Liquid nitrogen

การบันทึกข้อมูล

เปอร์เซนต์การตายของหนู

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2555 - กันยายน 2556 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

<u>การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis*</u>

ได้สารแขวนลอยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูงโดยทำการแบ่งเพื่อการวิจัยการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของเชื้อปรสิตโปรโตซัว โดยทำการแบ่งเป็น 3 การทดลองย่อย ทำการตรวจสอบทุกระยะ 6 เดือน คือ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี, 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ตามลำดับ ดังนี้

การทดลองย่อยที่ 1 การเปรียบการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS

เป็นการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูท้องขาวและเปอร์เซนต์การมีชีวิตรอดของเชื้อโดยเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ระหว่างในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณภูมิ 4-10 °C พบว่าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดนาน 6 เดือน – 1 ปี สามารถทำให้หนูท้องขาวชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด (100%) ในขณะที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดนาน 2 ปี พบหนูท้องขาวป่วยและตายประมาณ 50% ส่วนสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% นาน 6 เดือน ป่วยและตายทั้งหมด และที่เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 1 ปี และ 2 ปี พบหนูท้องขาวป่วยและตาย คิดเป็น 75% และ 50% ตามลำดับ ขณะที่เปอร์เซนต์การรอดชีวิตของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ระยะเวลา 6 เดือน ถึง 1 ปี ใกล้เคียงกันขณะที่ระยะเวลา 2 ปี เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% เริ่มสูงกว่าอย่างชัดเจน

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าเมื่อเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของเชื้อมากกว่า 1 ปี ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทั้งในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนู

ท้องขาวเริ่มลดลง สาเหตุเนื่องมาจากแม้ว่าได้ทำการปั่นล้างแยกสปอร์โรซีสต์จากมูลงูเหลือมแต่ยังคงมีจุลินทรีย์ต่างๆปนเปื้อนอยู่เป็นจำนวนมากซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูท้องขาวลดลงเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานานขึ้น ขณะที่เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ไม่แตกต่างกันในช่วง 1 ปีแรกแต่เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้นเป็น 2 ปี เปอร์เซ็นต์ การรอดชีวิตในสารละลายเกลือ PBS 1% เริ่มมีมากกว่า อันเนื่องมาจากแรงดันออสโมซีสในสารละลายเกลือ PBS ใกล้เคียงกับสภาพแวดล้อมตามธรรมชาติซึ่งมีแร่ธาตุต่างๆปะปนอยู่ซึ่งช่วยรักษาสภาพของสปอร์โรซีสต์ไม่ให้แตกสลายได้แต่ในน้ำดื่มสะอาดไม่มีแร่ธาตุต่างๆปะปนอยู่หรือมีอยู่น้อยมาก ส่งผลให้เซลล์ของสปอร์โรซีสต์เกิดการแตกสลายได้เนื่องจากภายในเซลล์มีความเข้มข้นมากกว่าในสิ่งแวดล้อมที่อยู่ซึ่งก็คือน้ำดื่มสะอาด ส่งผลให้เซลล์เกิดการเสียน้ำออกภายนอกเซลล์ เซลล์จึงแตกสลายในที่สุด จากการทดลองย่อยที่ 1 แสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูท้องขาวไม่มีความสัมพันธ์กับเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของสปอร์โรซีสต์

การทดลองย่อยที่ 2 การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวโดยวิธี Sugar flotation

ทำการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* โดยวิธี Sugar flotation ตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ คือ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี, 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อปรสิตโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม nucleic acid พบเปอร์เซนต์การรอดชีวิตประมาณ 96%, 80% และ 77% ตามลำดับ แม้ว่าการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์วิธีนี้จะสามารถทำให้สปอร์โรซีสต์มีสิ่งปนเปื้นน้อยมากก็ตาม แต่เมื่อระยะเวลานานขึ้น เปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตเริ่มลดลง แต่สปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการทำให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี Sugar flotation ยังคงให้เปอร์เซนต์การรอดชีวิตที่นับว่าสูงมากเมื่อเทียบกับการคัดแยกเชื้อด้วยวิธีการปั่นล้างแบบปกติ

การทดลองย่อยที่ 3 การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในไนโตรเจนเหลว

เป็นการศึกษาประสิทธิภาพการก่อโรคในหนูท้องขาวโดยทำการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ในไนโตรเจนเหลว ตามระยะเวลาที่กำหนดไว้คือ 6 เดือน, 1 ปี, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน, 3 ปี, 3 ปี 6 เดือน และ 4 ปี ซึ่งภายในระยะเวลา 1 ปี สามารถทำให้หนูท้องขาวชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด (100%) แต่เมื่อเพิ่มระยะเวลาการเก็บรักษาเป็น 2 ปี สารแขวนลอยดังกล่าวไม่สามารถทำให้หนูทดลอง ป่วยและตายได้ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสปอร์โรซีสต์ของเชื้อที่มีประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูท้องขาวสูง เมื่อเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำประมาณ -176 °C เชื้อยังคงสามารถคงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูท้องขาวไว้ได้ในระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี

การทดลองงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไปอีก

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

-

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ที่ช่วยสอนเทคนิคการย้อมสีโปรโตซัวและคำแนะนำต่างๆ ในงานวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูกาฬ และทรงทัพ แก้วตา. 2539. ทดสอบความชอบในการกินเหยื่อของหนูพุกใหญ่ .รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 248-249.

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

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 25-40

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

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนอร์เวย์. รายงายผลการวิจัย ปี 2539. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 257.

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 ปราสาททอง พรหมเกิด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูกาฬ และทรงทัพ แก้วตา.2541. การศึกษาโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในหนูพุกศัตรูพืช. รายงายผลการวิจัย ปี 2541. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 102-103.

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 กรแก้วเสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง,2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

วัชรี สมสุข และ สาทิพ มาลี, 2551. การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* สูตรผงกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช รายงานประจำปีกรมวิชาการเกษตร 2551, 33 หน้า.

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

Brehm ,H. and W. Frank. 1980. Der Entwicklungskreislauf von *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley 1976, in End- and Zwischenwirt. Zeitschr.fuer Parasittenkunde, 62 ;15-30.

Brooks, W.M.,1988. Entomogenous protozoa. In Ignoffo,C (ed) Handbook of Natural Pesticides,Microbiall Insecticides. Part A, Entomogenous Protozoa and Fungi, Vol.5 CRC Press, Boca, Raton, Florida, pp 1-149.

Fayer, R. and T. Nerad. 1996. Effect of low Temperatures on Viability of *Cryptosporidium Pavum* Oocysts. Applied and Environmental Microbiology. 62: 1431-1433.

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

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

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

Jakel, T. 2005. Biological control of rodents using *Sarcocystis singaporensis*. A technical manual.