

## ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในการป้องกันกำจัดหนู

ดาราดพร รินทะรักษ์

ยุวลักษณ์ ขอบประเสริฐ

กรแก้ว เสือสะอาด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

### รายงานความก้าวหน้า

ผลิตเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในห้องปฏิบัติการ โดยคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนูตาย 100% จาก มุลงูเหี้ยอมเบอร์ S-24 และ S -82 การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการพัฒนาสูตรและ รูปแบบที่เหมาะสมในห้องปฏิบัติการ พร้อมกับศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเก็บรักษาเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ สำหรับนำไปทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ในแปลงทดลอง ขณะเดียวกันได้ติดตามข้อมูลระบาดของหนูในพื้นที่เกษตรกรรมและการสำรวจประชากรหนูด้วย วิธีการต่างๆ และติดต่อแปลงทดลองสำหรับทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัว ในสภาพไร่

### คำนำ

ตั้งแต่ปี 2536 – 2545 กรมวิชาการเกษตร องค์การความช่วยเหลือทางด้านวิชาการของ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (GTZ) และบริษัทไบเออร์ จำกัด ได้ร่วมกันทำการวิจัยโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* และพบว่าปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้เป็นชีววินทรีย์กำจัดหนูที่มี ประสิทธิภาพสูง ทำให้หนูสกุลท้องขาว (*Rattus* sp.) และสกุลหนูพุก (*Bandicota* sp.) ป่วยและ ตาย 100%ในห้องปฏิบัติการ และตาย 71% - 92% ในแปลงที่ทดลองในฟาร์มไก่ นาข้าว และสวน ปาล์มน้ำมัน (ยุวลักษณ์ และคณะ,2539 ; ยุวลักษณ์ และคณะ,2540; ยุวลักษณ์ และคณะ,2542) โดยไม่มีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นในสภาพแวดล้อม นอกจากนี้โปรโตซัวชนิดนี้ไม่สามารถ เจริญเติบโตและพัฒนาต่อไปได้ในสัตว์ชนิดอื่น หรือแม้กระทั่งหนูในสกุล *Mus* sp. (Jaekel et al.,1999)

ปัจจุบัน มีการนำเชื้อโปรโตซัวชนิดดังกล่าว มาผลิตเป็นเชื้อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป โดยปรับปรุงจากเหยื่ออาหารแบบแป้งนุ่ม (เหยื่อไบเออร์) สูตรดั้งเดิมที่ได้รับจาก Dr.Endopol ผู้เชี่ยวชาญด้านหนูของสถาบันสุขภาพสัตว์ของบริษัทไบเออร์ สหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมนี แต่ เหยื่อสำเร็จรูปที่ใช้ในปัจจุบัน ยังมีข้อจำกัด คือ มีอายุการเก็บรักษาสั้นเพียง 1 เดือน จึง ทำการศึกษาวิจัยและปรับปรุงสูตรและรูปแบบของเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูป และศึกษาอายุ

การเก็บรักษาไปพร้อมๆกัน ทั้งนี้ นอกจากการทดสอบประสิทธิภาพในห้องปฏิบัติการแล้ว จะต้องมีการทดสอบประสิทธิภาพในสภาพแปลงทดลองไปด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่ครบถ้วนและสามารถนำไปใช้ได้จริง และสามารถถ่ายทอดแก่เกษตรกรหรือผู้ที่สนใจได้

## วิธีดำเนินการ

### อุปกรณ์

- สัตว์ทดลองสำหรับผลิตเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* และทดสอบเชื้อโปรโตซัว ได้แก่ งูเหลือม (*Python reticulatus*) หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) และหนูทดลองสายพันธุ์วีสตาร์ (*Rattus novogicus*; wistar rat)
- กรงทดลองประเภทต่างๆ ได้แก่ กรงเลี้ยงงู กรงเลี้ยงหนู กรงดักหนูเป็น กรงทดสอบเดี่ยว พร้อมขวดน้ำ
- เยื่อแป้งนุ่ม ประกอบด้วย แป้งสาลี เมล็ดข้าวโพดบด น้ำตาลทราย น้ำมันข้าวโพด อาหารหนูชนิดเม็ด และแป้งทัลคัม (talcum powder)
- อาหารหนูสำเร็จรูป วัสดุเกษตรอื่นๆ สำหรับเป็นอาหารเสริมให้สัตว์ทดลอง และใช้ดักหนู
- สารเคมี เช่น น้ำตาลกลูโคส gelatin , nucleic acid , ethyl alcohol, xanthan gum
- อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ เช่น ขวดพลาสติกขนาดต่างๆ สำหรับการปั่นตกตะกอนโปรโตซัว เครื่องมือผ่าตัด beaker, petri-dish , blood counting chamber, เป็นต้น
- อุปกรณ์อื่นๆที่จำเป็น เช่น กระดาษทิชชูอเนกประสงค์ ถุงมือยางสำหรับแพทย์ ผ้าปิดจมูก สาลี่ ฯลฯ

### วิธีการ

#### ขั้นตอนผลิตเชื้อโปรโตซัวในรูปแบบเจล (ในห้องปฏิบัติการ)

1. ผลิตเชื้อโปรโตซัวรูปแบบเจลที่มีเชื้อ *Sarcocystis singaporensis* ปริมาณ  $2 \times 10^5$  สปอร์โรซีสต์ บรรจุอยู่ในเยื่อแป้งนุ่มดัดแปลง ที่มีส่วนผสมดังนี้  
น้ำมันข้าวโพด : แป้งทัลคัม : เมล็ดข้าวโพดบด : น้ำตาลทราย : แป้งสาลี : อาหารหนูชนิดเม็ด อัตราส่วน = 20 : 5 : 7 : 8 : 50 : 10
2. ทดสอบการมีชีวิตของเชื้อในเยื่อโปรโตซัวรูปแบบเจลด้วยวิธี nucleic acid staining
3. ทดสอบประสิทธิภาพเชื้อที่บรรจุในเยื่อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ด้วยวิธี bio assay กับหนูสกุลท้องขาว จำนวน 30 ตัว สังเกตและบันทึกผลการทดลอง

ขั้นตอนทดสอบประสิทธิภาพเชื้อรูปแบบเจล (ในแปลงทดลอง ) ทำการทดลอง ดังนี้

1. กำหนดพื้นที่และวัดขนาดแปลงทดลอง จำนวน 4 แปลง วางแผนการทดลองแบบ RCB ดังนี้  
 แปลงที่ 1 แปลงเปรียบเทียบ (ไม่มีการวางเชื้อโปรโตซัว)  
 แปลงที่ 2 แปลงเปรียบเทียบ (วางเชื้อพิษราคูมิน)  
 แปลงที่ 3 วางเชื้อโปรโตซัวเบ้งน่มรูปแบบเดิม  
 แปลงที่ 4 วางเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ (รูปแบบเจล)
2. ประเมินประชากรหนุในแต่ละแปลง โดยใช้เชื้อล่อ และสังเกตพร้อมบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนุ ติดต่อกัน 3 คืน ควบคู่กับสำรวจรอยตีนหนุ และดักหนุ เพื่อนำมาคำนวณหาจำนวนประชากรหนุ ในแต่ละแปลงทดลอง
3. เริ่มวางเชื้อโปรโตซัวตามแผนการทดลอง จำนวน 2 ครั้งๆละ 2 คืนติดต่อกัน โดยแต่ละครั้งห่างกัน 15 วัน พร้อมสังเกตและบันทึกปริมาณการกินเหยื่อของหนุ
4. หลังการวางเชื้อโปรโตซัวตามแผนทดลอง 15 วัน ทำการสำรวจประชากรหนุ เช่นเดียวกับข้อ 2 และดักหนุในแปลงทดลองทั้งที่มีชีวิต และซากหนุที่เพิ่งตาย มาผ่าพิสูจน์ในห้องปฏิบัติการ

#### **เวลาและสถานที่**

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

**สถานที่** ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ซึ่งประกอบด้วย

โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนุ และแปลงทดลองในพื้นที่เกษตรกรรม

#### **ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง**

การคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพ

จากการคัดเลือกเชื้อโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีประสิทธิภาพสูงทำให้หนุป่วยและตาย 100% ด้วยวิธี bio assay ได้เชื้อที่มีความรุนแรงทำให้หนุตาย 100% จากมูลงูเหลือมเบอร์ S-24 และ S-82

การทดสอบการมีชีวิตของเชื้อโปรโตซัวที่เป็นส่วนประกอบของเหยื่อ

การตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อ *S. singaporensis* ที่อยู่ใน xanthan gum และถูกเก็บที่อุณหภูมิ  $30 \pm 2$  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 แล้วนำมาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์

แบบใช้แสงฟลูออเรสเซนส์ และคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิต พบว่าสปอร์โรซิสต์ที่แขวนลอยอยู่ในเจลแซนแทนกัม มีชีวิต 100%, 100% , 99% , 96% และ 60% ตามลำดับ

#### การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ในห้องปฏิบัติการ

จากการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรูปแบบใหม่ในการทำให้หนูป่วยและตายด้วยวิธี bio assay พบว่าเชื้อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 30 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 1 เดือน ทำให้หนูทดลองตาย 70% โดยเชื้อที่เก็บไว้ 2 เดือน ทำให้หนูตายลดลง 50% และเชื้อที่เก็บไว้ 4 เดือน ทำให้หนูตาย 60% ซึ่งหนูที่ตายส่วนใหญ่มีอาการตาแฉะ น้ำหนักลด เมื่อผ่าพิสูจน์อวัยวะภายในพบว่าเนื้อเยื่อปอดและหัวใจมีเลือดคั่ง บางตัวมีอาการน้ำท่วมปอด ซึ่งอาการดังกล่าว เกิดจากเชื้อเจริญเติบโต และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วในเนื้อเยื่อปอด และเนื้อเยื่อหัวใจ (วิยะดา และคณะ, 2539) นอกจากนี้ยังพบว่า หนูที่ตายหลังจากได้รับเชื้อ 40 วันขึ้นไป จำนวน 2 ใน 3 มักตรวจพบซิสต์ในกล้ามเนื้อปริมาณสูง โดยเฉพาะบริเวณเนื้อเยื่อบริเวณช่องท้องและกล้ามเนื้อโคนขา

การทดลองนี้ยังไม่เสร็จสิ้น อยู่ระหว่างการศึกษาค้นคว้าผลของอุณหภูมิและทดสอบประสิทธิภาพต่อการเก็บรักษาเชื้อโปรโตซัวรูปแบบใหม่ ที่เก็บไว้นาน 6 เดือน ซึ่งเก็บในสภาพที่แตกต่างกัน 6 กรรมวิธี ในห้องปฏิบัติการ (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) ก่อนนำไปทดสอบประสิทธิภาพเชื้อโปรโตซัว ในสภาพไร่

#### **คำขอบคุณ**

ขอขอบคุณ นายทรงทัฬห แก้วตา เจ้าพนักงานการเกษตรชำนาญงาน และนายโยชิโนทร์ โพธิ์ศรี เจ้าหน้าที่กลุ่มงานวิจัยสัตววิทยาการเกษตร ที่ช่วยดักหนู ดูแลหนูทดลอง เช่น ให้อาหาร เปลี่ยนกรง ทำความสะอาดกรง และซังน้ำหนักรู ตลอดจนระยะเวลาที่ทำการทดลอง และขออุทิศผลงานให้แก่สัตว์ทดลองทุกชีวิต ที่มีส่วนทำให้งานวิจัย สำเร็จลุล่วงด้วยดี

#### **เอกสารอ้างอิง**

ยูลักษณ์ ขอบประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด .2539.

การศึกษาชนิดของโปรโตซัวที่เป็นปรสิต ในหนูพุกใหญ่และหนูพุกเล็ก. รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 254.

ยูลักษณ์ ขอบประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค T. Jaekel กรแก้ว เสือสะอาด ปราสาททอง พรหมเกิด และ ชูวิทย์ สุขปรាកการ. 2542. การใช้โปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ชีวินทรีย์กำจัดหนู ชนิดใหม่ เพื่อควบคุมหนูในประเทศไทย. 43 หน้า.

ยวลักษณะณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนู  
กาฬ และพวงทอง บุญทรง, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยา  
การเกษตร กองกึ่งและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตร  
แห่งประเทศไทย 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.