

การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังของชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดโรคพืช

Trichoderma harzianum DOA-TH50 ในหนูแรท

Acute Oral Toxicity and Acute Dermal Toxicity Study of

Trichoderma harzianum DOA-TH50 in Rats

ทัสดาว เกตุเนตร^{1/} วิชาญ วรธนะไกววัล^{1/} สมเกียรติ กล้าแข็ง^{1/} ศุภกร วงษ์เรืองพิบูล^{1/}

Thasdaw Katenate^{1/} Vichan Watthanakaiwan^{1/} Somkiat Klakhang^{1/}

Suphakorn Wongruenpibool^{1/}

ABSTRACT

Acute oral and dermal toxicity studies were conducted using a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 as the test material, at doses of 5,000 mg/kg body weight for oral administration and 2,000 mg/kg body weight for dermal exposure. Both studies were performed in accordance with OECD Test Guidelines 423 and 402. The results demonstrated that *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 produced no evidence of acute toxicity in rats by either the oral or dermal route during the 14-day observation period. No mortality, clinical signs of toxicity, or alterations in behavior were observed. Gross and histopathological examinations revealed no abnormalities in internal vital organs. Accordingly, *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 was classified under the Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) as Category 5 (Unclassified). These findings indicate that *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 does not exert toxicological effects following acute oral or dermal exposure and may therefore be considered a safe biological control agent.

Keywords: Acute Oral Toxicity, Acute dermal Toxicity, Toxicology, Laboratory animals, *Trichoderma harzianum*

^{1/} กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ถ.พหลโยธิน ลาดยาว จตุจักร กรุงเทพฯ 10900

^{1/} Entomology and Zoology Group, Plant Protection Research and Development Office, Department of Agriculture, Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 19000. Thailand

* Corresponding author: thasdaw.ka@gmail.com

บทคัดย่อ

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท โดยการใช้สารแขวนลอยสปอร์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ปริมาณความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนูสำหรับป้อนทางปาก และที่ปริมาณความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สำหรับแปะผิวหนังตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423 และ OECD Test Guideline 402 พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลัน ในหนูทั้งทางปากและทางผิวหนัง และเมื่อสังเกตติดตามอาการเป็นเวลา 14 วัน ไม่พบอัตราการตาย ไม่แสดงการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมและไม่พบลักษณะที่ผิดปกติของอวัยวะภายใน ดังนั้นเมื่อจัดระดับความเป็นพิษเฉียบพลันตามเกณฑ์จำแนกความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดตามของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 จัดอยู่ใน category 5 (Unclassified) ไม่มีความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท จึงจัดเป็นชีวภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสูง

คำสำคัญ: การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก
การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทาง
ผิวหนัง พิษวิทยา สัตว์ทดลอง
เชื้อราไตรโคเดอร์มา ฮาเซียนัม

บทนำ

กรมวิชาการเกษตร ได้พัฒนาชีวภัณฑ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคและแมลงศัตรูพืช มีความปลอดภัยสูง ต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม เพื่อให้เกษตรกรใช้ทดแทนการใช้สารเคมีทางการเกษตร ชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช (Biological Control Agents; BCA) ประกอบไปด้วยสิ่งมีชีวิตและสารออกฤทธิ์ที่เป็นองค์ประกอบของสิ่งมีชีวิต เช่น จุลินทรีย์กำจัดศัตรูพืช สิ่งมีชีวิตขนาดใหญ่ สารสกัดจากพืช

ธรรมชาติ เป็นต้น (สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช, 2563) ซึ่งชีวภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 เป็นส่วนหนึ่งในชีวภัณฑ์ที่นักวิชาการวิชาการเกษตร นำมาศึกษาวิจัยและพัฒนาจนสามารถนำมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณและผลิตแจกจ่ายไปสู่มือเกษตรกร เพื่อนำไปใช้ขยายผลต่อยอดเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณ และใช้ในการควบคุมศัตรูพืช เพื่อลดหรือทดแทนการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช ดังนั้นการทดสอบความเป็นพิษหรือความปลอดภัยของชีวภัณฑ์ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 มีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อให้ได้ข้อมูลด้านความเป็นพิษต่อระบบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องและมีการประเมินความเสี่ยงก่อนการนำชีวภัณฑ์นั้น ๆ มาใช้ การทดสอบความเป็นพิษนี้โดยปกติแล้วเป็นการทดสอบโดยใช้สัตว์ทดลอง ชนิดและจำนวนสัตว์ทดลองที่นำมาใช้จะถูกพิจารณากระบวนการขั้นตอนที่ถูกต้องทางวิทยาศาสตร์ และหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง โดยคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลอง นอกจากนี้ ยังมีประกาศควบคุมการใช้สารด้วยระเบียบสารเคมีของสหภาพยุโรป REACH บังคับให้สารเคมีทุกชนิด ทั้งที่มีอยู่แล้วและผลิตขึ้นใหม่ ต้องมีข้อมูลทางพิษวิทยา ด้วยเหตุนี้จึงมีวิธีการเลือก (alternative methods) เกิดขึ้นเพื่อใช้ในการทดสอบ การทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธีการเลือก สามารถปฏิบัติตาม OECD Test Guidelines ซึ่งเป็นวิธีที่ผ่านกระบวนการทดสอบความใช้ได้ของวิธีและมีการยอมรับในระดับสากลแล้ว เพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute oral and dermal) คู่มือผลลัพธ์คือ อัตราการตาย (mortality) และอาการความเป็นพิษที่บ่งชี้ชัดเจน (evident toxicity) ในสัตว์ทดลอง เป็นข้อมูลความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดตามของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ Globally Harmonized System of Classification and Labelling of Chemicals (GHS) (United Nations, 2019) อีกทั้งตามพระราชบัญญัติ วัตถุอันตราย พ.ศ. 2535 สารชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชจัดเป็นวัตถุอันตราย ชนิดที่ 2 ซึ่งจะต้องขึ้นทะเบียนและแจ้งการดำเนินการก่อนการประกอบกิจการ ดังนั้นภาคเอกชนที่เข้ามารับการ

ถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชของกรมวิชาการเกษตร ต้องผ่านการขึ้นทะเบียนก่อน จึงสามารถดำเนินการผลิตเพื่อจำหน่ายเชิงการค้าได้ ซึ่งข้อมูลพิษวิทยาในสัตว์ทดลองตามมาตรฐานสากลนั้น อยู่ในข้อมูลเพื่อการขึ้นทะเบียนชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช ด้วยเช่นกัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity) และความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute dermal Toxicity) โดยการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก จะมีการให้สารทดสอบทางปาก (oral administration) กับหนู สามารถให้ครั้งเดียวหรือหลายครั้งก็ได้ภายใน 24 ชั่วโมง และดูผลภายใน 14 วัน โดยสังเกตอาการไม่พึงประสงค์ (adverse effects) ไปจนถึงรุนแรงถึงเสียชีวิต (OECD, 2000) เพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute oral) โดยการปฏิบัติตาม OECD Test Guideline 423 (OECD, 2001) และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง เป็นการทดสอบพิษที่อาจเกิดขึ้นในระยะสั้นจากการสัมผัสกับสารที่เป็นของแข็งหรือของเหลวโดยทางผิวหนัง โดยสังเกตอาการไม่พึงประสงค์ (adverse effects) ไปจนถึงรุนแรงถึงเสียชีวิต ภายในระยะเวลา 14 วัน เพื่อหาค่า LD₅₀ (Acute dermal) โดยการปฏิบัติตาม OECD Test Guideline 402 (OECD, 2017)

1. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก (Acute Oral Toxicity)

ดำเนินการทดสอบตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423: Acute oral toxicity- Acute toxic class method of OECD guidelines for testing of chemicals (2001)

1.1 การเตรียมวัสดุทดสอบ

นำวัสดุทดสอบ *Trichoderma harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่พร้อมใช้ให้เป็นสารแขวนลอยสปอร์ (spore suspension) ปริมาณ 5 ก. ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 12.5 มล. เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อชีวภัณฑ์

ผสมเข้ากันแล้ว จะทำการผสมอีกครั้งด้วยเครื่องผสมสารละลาย (vortex mixer) เพื่อให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบค่าความเป็นกรดต่างด้วยกระดาษสำหรับวัดค่าพีเอช (pH indicator strips) โดยสารแขวนลอยสปอร์ มีค่า pH = 6.0 การเตรียมวัสดุทดสอบต้องดำเนินการพร้อมกับการทดสอบความเป็นพิษในหนูแรทภายในวันเดียวกัน

1.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรททดลองสายพันธุ์ Jcl:SD เพศเมีย 3 ตัว อายุ 8 สัปดาห์ ที่ไม่มีการตั้งท้องและไม่อยู่ในระยะให้นม สุขภาพแข็งแรง จากบริษัท โนมูระ สยามอินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด พร้อมทั้งได้ใบรับรองสุขภาพหนูแรท (Animal Health Certificate) นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้หนูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยมีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง 22±3°C. ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 - 60 % และมีระบบควบคุมแสงสว่างที่เหมาะสมในแต่ละวัน โดยเปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. ปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. หนูแรทได้รับอาหารเม็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และน้ำกรอง Reverse Osmosis อย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง มีการใส่วัสดุรองนอนในกรง และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 - 4 วัน หรือเปลี่ยนเมื่อพบว่ามีความชื้นและภายในกรงทดลอง โดยดำเนินการตามแนวปฏิบัติของ Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition (National research council, 2011) ตามใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ U1-04925-2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

1.3 การป้อนวัสดุทดสอบ

โดยก่อนวันทดสอบนำหนูแรททั้ง 3 ตัว ใส่ลงในกรงพลาสติกทดลองขนาด 23x52x22 ซม. แยกเลี้ยงหนูแรท 1 ตัวต่อกรง และอดอาหารแต่ไม่อดน้ำเป็นระยะเวลา 1 คืน (หนูแรท 1 ตัว/ 1 วัสดุทดสอบ)

เริ่มป้อนวัสดุทดสอบโดยดำเนินการให้สารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 โดยตรงทางปาก กับหนูแรท (gavage feeding) ด้วย feeding tube ให้สารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู ปริมาณสารแขวนลอยสปอร์ที่ใช้ป้อน หนูแรทแต่ละตัวนั้น ขึ้นอยู่กับน้ำหนักตัวของหนู

โดยปริมาณการให้สารแต่ละครั้งมีขนาดไม่เกิน 2 มล./100 ก. น้ำหนักตัวหนู ภายหลังป้อนสารทดสอบ ครบ 4 ชม. ให้อาหารแก่หนูแรทตามปกติ (Figure 1) ปริมาณสารแขวนลอยสปอร์ที่ป้อนทางปากแก่หนูแรท แต่ละตัวเท่ากับ 3.94, 3.90 และ 3.41 มล. ตามลำดับ (Table 1)

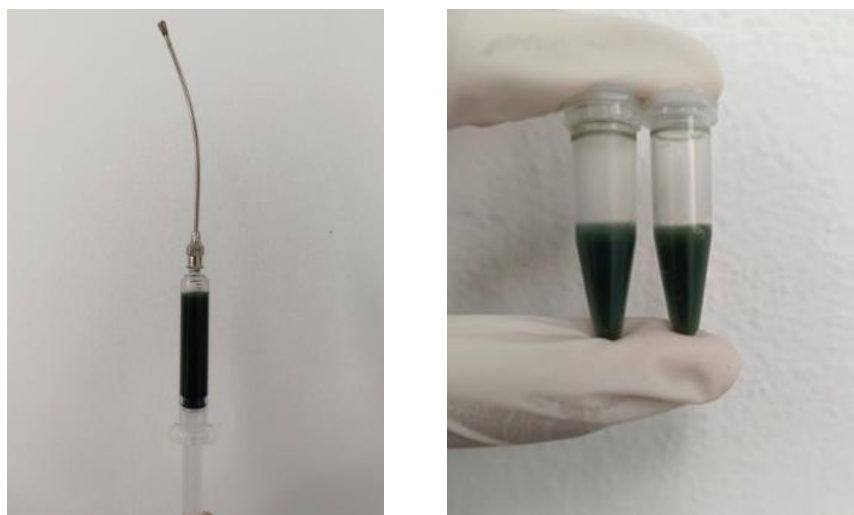


Figure 1 Oral administration of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 at an acute dose of 5,000 mg/kg. body weight to rats.

Table 1 Oral administration of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 to three rats.

No. of animal	Sex	Concentration of substance (mg/kg/day)	Body weight (g.)	Amount of substance (ml.)
1	female	5,000	315.00	3.94
2	female	5,000	312.00	3.90
3	female	5,000	273.10	3.41

1.4 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรมของ หนูแรท ได้แก่ อาการที่ผิดปกติ ความเจ็บปวด อาการสั่น (tremor) อาการชัก (convulsion) อาการท้องเสีย (diarrhea) อาการอ่อนเพลีย (lethargy) อาการ น้ำลายไหล (salivation) และอาการหมดสติ (coma) ที่ระยะเวลา 30 นาที 1 และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดู

อาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จากนั้นสังเกตอาการวันละครั้งทุกวัน ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน บันทึกปริมาณอาหารและ น้ำที่หนูแรทกินทุกวัน และบันทึกน้ำหนักตัวหนูแรท ที่เวลา 1, 7 และ 14 วัน หลังจากได้รับวัสดุทดสอบ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างข้อมูลเพื่อประเมินผล ของวัสดุทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู

ก่อนสิ้นสุดการทดสอบที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับวัสดุทดสอบ ทำการอดอาหารหนูแรทที่ยังไม่ตายเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อชันสูตรซาก ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า (gross examination)

2. การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง (Acute dermal Toxicity)

ดำเนินการทดสอบตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 402: Acute dermal toxicity: fixed dose procedure of the OECD guidelines for testing of chemicals (2017)

2.1 การเตรียมวัสดุทดสอบ

นำวัสดุทดสอบ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่พร้อมใช้ให้เป็นสารแขวนลอยสปอร์ปริมาณ 2 ก. ผสมในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มล. เพื่อให้ได้สารแขวนลอยสปอร์ ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อชีวภัณฑ์ผสมเข้ากันแล้ว จะทำการผสมอีกครั้งด้วยเครื่องผสมสารละลาย เพื่อให้ละลายเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ทำการทดสอบค่าความเป็นกรดต่างด้วยกระดาษสำหรับวัดค่าพีเอช โดยสารแขวนลอยสปอร์มีค่า pH = 6.0 การเตรียมวัสดุทดสอบต้องดำเนินการพร้อมกับการทดสอบความเป็นพิษในหนูแรทภายในวันเดียวกัน

2.2 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรททดลองสายพันธุ์ Jcl:SD เพศเมีย 3 ตัว อายุ 8 สัปดาห์ ที่ไม่มีการตั้งท้องและไม่อยู่ในระยะให้นม สุขภาพแข็งแรง จากบริษัท โนมูระสยาม อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด พร้อมทั้งได้ใบรับรองสุขภาพหนูแรท (Animal Health Certificate) นำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพื่อให้หนูปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อม โดยมีการควบคุมอุณหภูมิอยู่ในช่วง $22 \pm 3^{\circ}\text{C}$. ความชื้นสัมพัทธ์ที่ 50 - 60 % และมีระบบควบคุมแสงสว่างที่เหมาะสมในแต่ละวัน โดยเปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม. ปิดไฟเป็นระยะเวลา 12 ชม.

หนูแรทได้รับอาหารเม็ดที่ผ่านการฆ่าเชื้อจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล และน้ำกรอง Reverse Osmosis อย่างเต็มที่ตลอดการทดลอง มีการใส่วัสดุรองนอนในกรง และมีการเปลี่ยนวัสดุรองนอนทุก 3 - 4 วัน หรือเปลี่ยนเมื่อพบว่ามีความชื้นและภายในกรงทดลอง โดยดำเนินการตามแนวปฏิบัติของ Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition (National research council, 2011) ตามใบอนุญาตใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ เลขที่ U1-04925-2559 สถาบันพัฒนาการดำเนินการต่อสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ (สพสว.) สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

2.3 การแปะวัสดุทดสอบบนผิวหนัง

โดยก่อนทำการทดสอบ 24 ชม. โกลนหนูแรทบริเวณด้านหลังระหว่างขาหน้าและขาหลัง (dorsal/flank area) ความกว้าง 7x5 ซม. หรือ 10 % ของพื้นที่ผิวบนลำตัวหนู โดยไม่ให้เกิดบาดแผลบนผิวหนัง และนำหนูแรททั้ง 3 ตัว ใส่ลงในกรงพลาสติกทดลองขนาด 23x52x22 ซม. แยกเลี้ยงหนูแรท 1 ตัวต่อกรง และอดอาหารแต่ไม่อดน้ำ เป็นระยะเวลา 1 คืน (หนูแรท 1 ตัว/ 1 วัสดุทดสอบ) หลังจากนั้นดำเนินการให้สารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 โดยให้สารเคลือบแผ่นผ้าก๊อช ขนาด 6 ตร.ซม. วางบนผิวหนังหนูแรทตำแหน่งที่โกลน หลังจากนั้นปิดทับแผ่นผ้าก๊อชด้วยพลาสติกปิดแผล และปิดทับด้วยผ้าพันแผลแบบยืดชนิดที่ไม่ก่อให้เกิดการระคายเคืองซ้ำอีกครั้ง โดยใช้สารแขวนลอยสปอร์ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู (ปริมาตรของสารอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5 - 1 มล.) ให้อาหารแก่หนูแรทตามปกติ ภายหลังทดสอบครบ 24 ชม. แกะแผ่นทดสอบออกและล้างทำความสะอาดผิวหนังหนูแรทด้วย 0.9 % Normal Saline (Figure 2) ปริมาณวัสดุทดสอบที่แปะบนผิวหนังแก่หนูแรทแต่ละตัวเท่ากับ 1 มล. (Table 2)

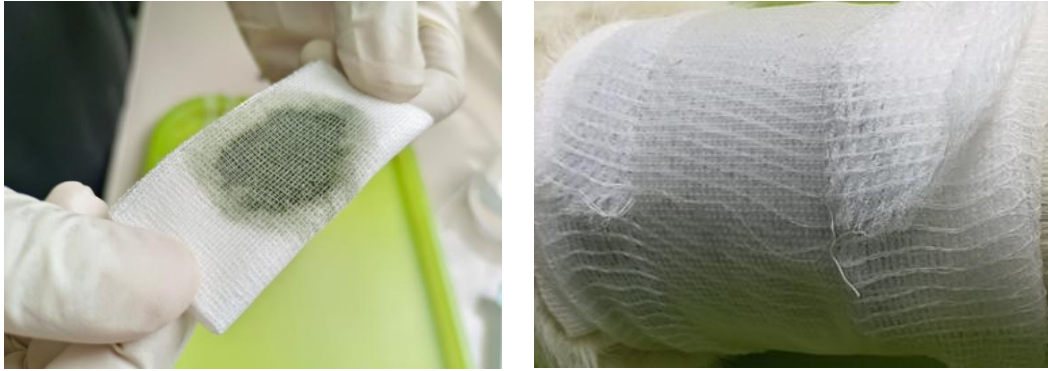


Figure 2 Dermal application of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 at an acute dose of 2,000 mg/kg. body weight using a gauze pad applied to the skin of a rat.

Table 2 Dermal exposure of three rats to a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Concentration of substance (mg/kg/day)	Body weight (g.)	Amount of substance (ml.)
1	female	2,000	225.00	1.0
2	female	2,000	226.70	1.0
3	female	2,000	228.50	1.0

2.4 การสังเกตผลการทดสอบ

สังเกตอาการทางคลินิก พฤติกรรม ได้แก่ อาการที่ผิดปกติ ความเจ็บปวด อาการคัน อาการชก อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหดรัด โดยสังเกตลักษณะการบวมแดง และการเกิดแผลที่ผิวหนังของหนูแรทที่ระยะเวลา 30 นาที 1 และ 4 ชม. หลังจากนั้นประเมินลักษณะผิวหนังของหนูแรทที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. โดยมีหลักเกณฑ์การให้คะแนนอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังตาม Draize et al. (1944) (Table 3) จากนั้นสังเกตอาการวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน บันทึกปริมาณอาหารและน้ำที่หนูแรทกินทุกวัน และบันทึกน้ำหนักตัวหนูแรทที่เวลา 1, 7 และ 14 วัน หลังจากได้รับสารทดสอบ และวิเคราะห์ค่าความแตกต่างข้อมูลเพื่อประเมินผลของสารทดสอบต่ออัตราการเจริญเติบโตของหนู ก่อนสิ้นสุดการทดสอบที่ระยะเวลา 14 วันหลังจากได้รับสารทดสอบ ทำการอดอาหารหนูแรทที่ยังไม่ตายเป็นเวลา 1 คืน ก่อนการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อ

ชั้นสูตรซาก ตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. ผลทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก

การสังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรม (Clinical signs observation and behavior)

อาการของหนูทดลองที่ได้รับการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปาก ในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดูอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. และสังเกตอาการวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว กินอาหารได้ตามปกติ ไม่มีอาการที่ผิดปกติ ไม่แสดงความเจ็บปวด ไม่มีการแสดงอาการคัน อาการชก อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหดรัด

Table 3 Grading of dermal effects.

Erythema and eschar formation	Grade
No erythema	0
Very slight erythema (barely perceptible)	1
Well defined erythema	2
Moderate to severe erythema	3
Severe erythema (beet redness) to slight eschar formation (injuries in depth)	4
Edema formation	Grade
No edema	0
Very slight edema (barely perceptible)	1
Slight edema (edges of area well defined by definite raising)	2
Moderate edema (raised approximately 1 mm)	3
Severe edema (raised more than 1 mm and extending beyond the area of exposure)	4

Source: Draize et al. (1944)

อัตราการตาย (Mortality)

ภายหลังการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เมื่อสังเกตอาการหนูแรก

ในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. แรก ไม่พบ การตายหรืออาการใกล้ตาย และในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จนครบกำหนดระยะเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรกทั้ง 3 ตัว ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Table 4)

Table 4 Mortality, morbidity, clinical observations, and behavior of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Concentration of substance (mg/kg/day)	Mortality and morbidity	Clinical signs observation and behavior
1	5,000	0	No toxic signs
2	5,000	0	No toxic signs
3	5,000	0	No toxic signs

ปริมาณอาหารและน้ำที่กิน และการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัว (Food and water consumption and body weight change)

การกินอาหารและน้ำของหนูแรกทุกตัวที่ได้รับ แบบไม่จำกัด โดยมีการชั่งน้ำหนักอาหารและน้ำทุกวัน พบว่าหนูแรกที่ได้รับการป้อนสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู สามารถกินอาหารและ

น้ำได้เป็นปกติ มีค่าเฉลี่ยการกินอาหารเท่ากับ 16.27, 16.11 และ 13.78 ก. ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยการ กินน้ำเท่ากับ 41.86, 35.53 และ 51.73 มล. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยตลอดระยะเวลาทดสอบ 14 วัน เท่ากับ 24.30, 28.10 และ 25.70 ก./ตัว ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ย 26.03 ก./ตัว) (Table 5) และพบว่าการ เปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้อง กับการเจริญเติบโต (Figure 3)

Table 5 Changes in body weights of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Body weight (g.)					Weight gain (g.)	Mean (g.)
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 14		
1	female	315.00	321.10	328.60	334.90	339.30	24.30	26.03
2	female	312.00	320.40	331.30	336.10	340.10	28.10	
3	female	273.10	276.00	278.80	285.90	298.80	25.70	

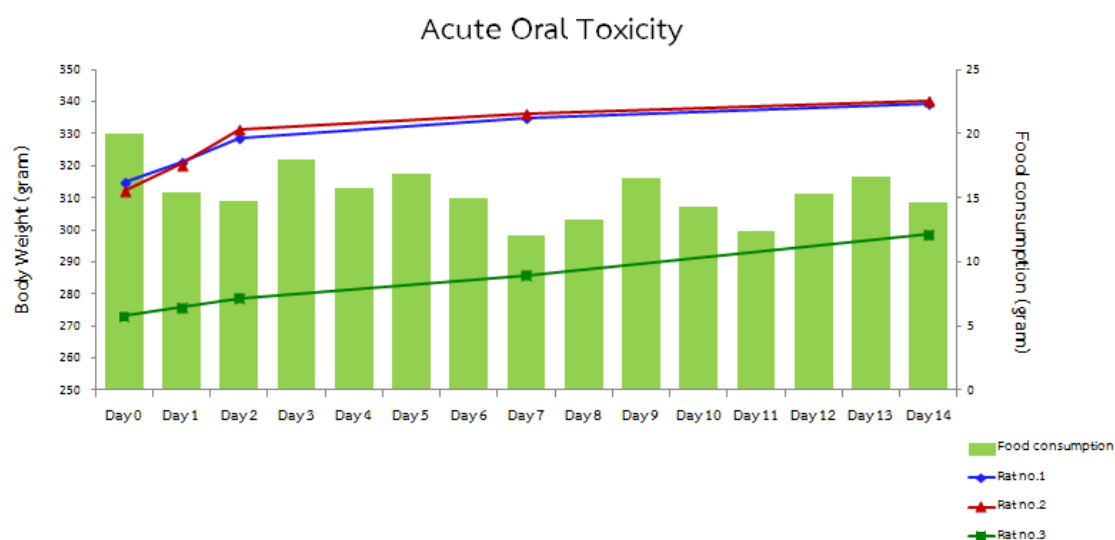


Figure 3 Changes in body weights of rats orally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in relation to food consumption.

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะใน ด้วยตาเปล่า (Gross examination)

ในวันที่ 16 ของการทดสอบความเป็นพิษ
หนูแรททั้ง 3 ตัว จะถูกทำการอดอาหารเป็นเวลา
1 คืน และนำมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการการุณยฆาต
โดยการให้หนูทดลองสูดดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์
(CO₂) ดำเนินการผ่าซากหนูทดลอง ผ่าช่องท้องและ
ช่องอกเพื่อชันสูตรซาก และดูความผิดปกติของ

อวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม กระเพาะ
อาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ไต มดลูกและรังไข่ และ
สมอง ผลการผ่าซากหนูแรทที่ได้รับการป้อนสาร
แขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50
ที่ความเข้มข้น 5,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู พบว่า
อวัยวะภายในของหนูแรททุกตัว ไม่มีความผิดปกติ
ของลักษณะภายนอก ทั้งในด้านของตำแหน่งอวัยวะ
ภายใน ขนาดอวัยวะ และสีของอวัยวะ (Figure 4)

Organs : Acute Oral Toxicity								
Lung	Heart	Liver	Spleen	Gastric	Duodenum	Kidney	Uterus and ovaries	Brain
								
Results = Normal								

Figure 4 Pathogenicity of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in different organs after oral administration.

2. ผลทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง การสังเกตอาการทางคลินิกและพฤติกรรม (Clinical signs observation and behavior)

อาการของหนูทดลองที่ได้รับสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนัง ในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. หลังจากนั้นเฝ้าดูอาการทางคลินิกที่เกิดขึ้นในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. และสังเกตอาการวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว ในช่วง 30 นาทีแรก มีพฤติกรรมไม่คุ้นชินกับผ้าพันแผลที่พันตัวเอาไว้ พยายามกัดและดึงแผ่นผ้าก๊อซออก อยู่ไม่นิ่งแต่ไม่ยอมเดิน ใช้วิธีลากตัวไปรอบกรง อาจเนื่องมาจากการพันผ้าไว้รอบตัว ส่งผลให้หนูแรทไม่สามารถทรงตัวได้ดีเท่าที่ควร หลังจาก 4 ชม. หนูแรทกินอาหารได้ตามปกติ และไม่มีอาการที่ผิดปกติ ไม่แสดงความเจ็บปวด ไม่มีการแสดงอาการคัน อาการช้ำ อาการท้องเสีย อาการอ่อนเพลีย อาการน้ำลายไหล และอาการหมดสติ เมื่อครบ 24 ชม. หลังจากที่ทำผ้าพันแผลและแผ่นผ้าก๊อซออก พบว่า ผิวหนังของหนูแรทไม่มีอาการบวมแดง ไม่มีอาการแพ้ ไม่มีผื่นหรือตุ่มใสขึ้น แต่ในวันที่ 5 พบว่าผิวหนังของ

หนูแรทเริ่มมีสะเก็ดบางๆ บริเวณที่เป็นขอบมีรอยแดงเล็กน้อย ในวันที่ 7 ผิวหนังของหนูแรทเริ่มดีขึ้นสะเก็ดและรอยขอบหนังแห้งหายไป และในวันที่ 14 ผิวหนังได้มีการฟื้นฟูกลับมาในสภาพดีดังเดิม (recover) (Figure 5) และจากการประเมินอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังหนูแรทที่ถูกแปะด้วยสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่พบว่ามีอาการแดงหรืออาการบวม ซึ่งเมื่อคำนวณค่าดัชนีการแดงและการบวมของผิวหนังหนูแรทใน 72 ชม. แรก พบว่ามีค่าคะแนนการแดงและการบวมของผิวหนังเท่ากับ 0 ตามหลักเกณฑ์การให้คะแนนอาการแดงและอาการบวมของผิวหนังของ Draize et al. (1944) (Table 6)

อัตราการตาย (Mortality)

ภายหลังการใช้สารแขวนลอยสปอร์ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู แปะบนผิวหนังหนูแรท เมื่อสังเกตอาการหนูแรทในระยะเวลา 30 นาที 1 ชม. และ 4 ชม. แรก ไม่พบการตายหรืออาการใกล้ตาย และในระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. จนครบกำหนดระยะเวลา 14 วัน พบว่า หนูแรททั้ง 3 ตัว ไม่มีการตายเกิดขึ้น (Table 7)

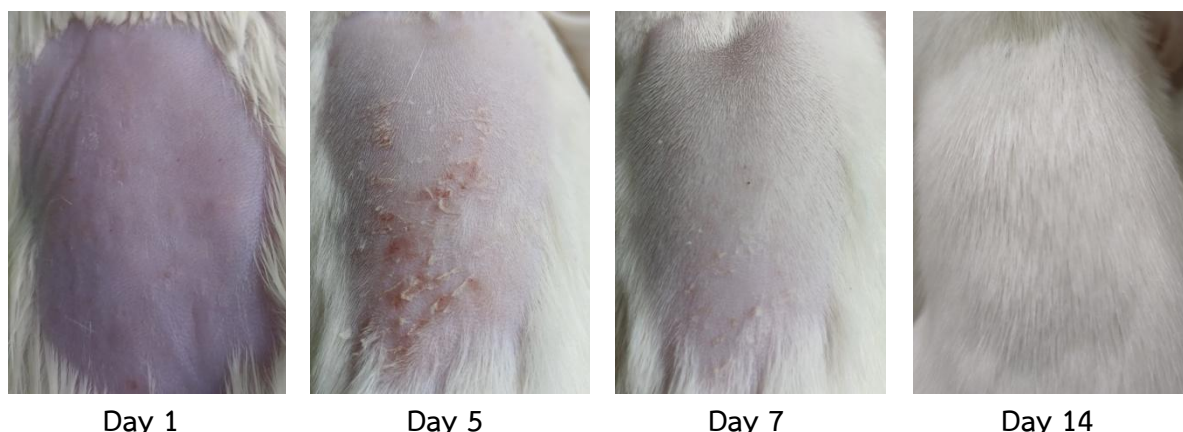


Figure 5 Dermal irritation in rats following administration of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50, with complete recovery observed after 7 days.

Table 6 Grading of erythema, eschar formation, and edema in rats.

No. of animal	Grading of dermal effects						Irritation level
	24 hrs		48 hrs		72 hrs		
	Erythema	Edema	Erythema	Edema	Erythema	Edema	
1	0	0	0	0	0	0	non-irritant
2	0	0	0	0	0	0	non-irritant
3	0	0	0	0	0	0	non-irritant

Table 7 Mortality, morbidity, clinical observations, and behavior of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Concentration of substance (mg/kg/day)	Mortality and morbidity	Clinical signs observation and behavior
1	2,000	0	No toxic signs
2	2,000	0	No toxic signs
3	2,000	0	No toxic signs

ปริมาณอาหารและน้ำที่กิน และการเปลี่ยนแปลง น้ำหนักตัว (Food and water consumption and body weight change)

การกินอาหารและน้ำของหนูแรททุกตัวที่ได้รับแบบไม่จำกัด โดยมีการชั่งน้ำหนักอาหารและน้ำทุกวัน พบว่าหนูแรทที่ได้รับสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู แปะบริเวณผิวหนัง

สามารถกินอาหารและน้ำได้เป็นปกติ มีค่าเฉลี่ยการกินอาหารเท่ากับ 15.55, 16.51 และ 16.65 ก. ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยการกินน้ำเท่ากับ 41.60, 46.40 และ 39.33 มล. ตามลำดับ โดยมีน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยตลอดระยะเวลาทดสอบ 14 วัน เท่ากับ 52.60, 38.40 และ 57.00 ก./ตัว ตามลำดับ (ค่าเฉลี่ย 49.33 ก./ตัว) (Table 8) และพบว่าการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวเฉลี่ยที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการเจริญเติบโต (Figure 6)

Table 8 Changes in body weights of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50.

No. of animal	Sex	Body weight (g.)					Weight gain (g.)	Mean (g.)
		Day 0	Day 1	Day 2	Day 7	Day 14		
1	female	225.00	232.10	235.50	258.40	277.60	52.60	49.33
2	female	226.70	231.10	234.30	247.30	265.10	38.40	
3	female	228.50	237.40	241.10	263.30	285.50	57.00	

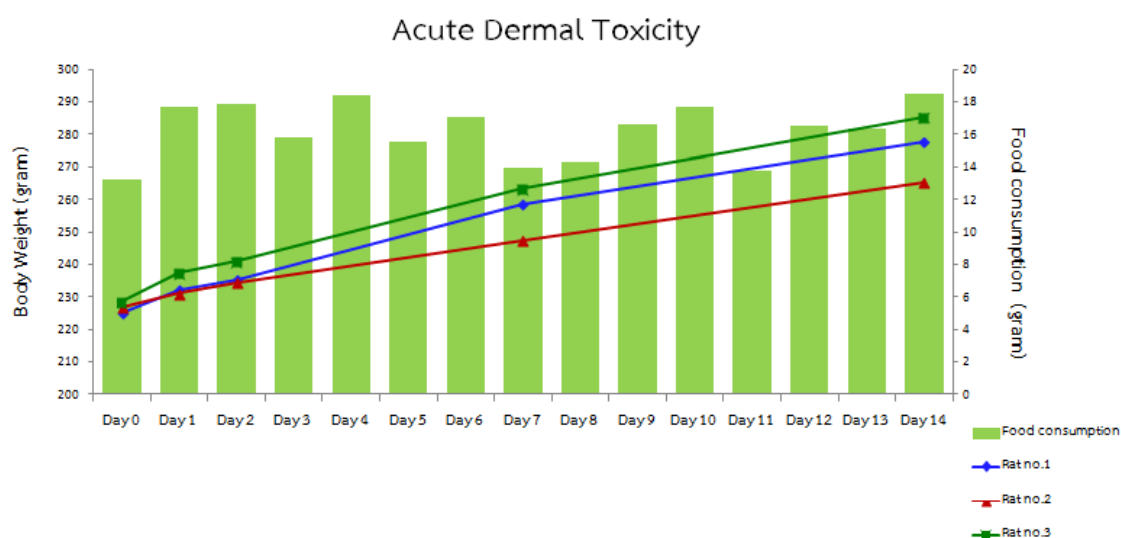


Figure 6 Changes in body weights of rats dermally administered a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in relation to food consumption.

การตรวจสอบลักษณะทางกายภาพของอวัยวะภายในด้วยตาเปล่า (Gross examination)

ในวันที่ 16 ของการทดสอบความเป็นพิษของสารแขวนลอยสปอร์ หนูแรททั้ง 3 ตัว จะถูกทำการอดอาหารเป็นเวลา 1 คืน และนำมาชั่งน้ำหนักก่อนทำการการุณยฆาต โดยการให้หนูแรทสูดดมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ดำเนินการผ่าซากหนูแรทผ่าช่องท้องและช่องอกเพื่อชันสูตรซาก และดูความผิดปกติของอวัยวะภายใน ได้แก่ ปอด หัวใจ ตับ ม้าม

กระเพาะอาหาร ลำไส้เล็กส่วนต้น ไต มดลูกและรังไข่ และสมอง ผลการผ่าซากหนูแรทที่ได้รับการแปะสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 บริเวณผิวหนัง ที่ความเข้มข้น 2,000 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู พบว่า อวัยวะภายในของหนูแรททุกตัวในแต่ละการทดสอบ ไม่มีความผิดปกติของลักษณะภายนอก ทั้งในด้านของตำแหน่งอวัยวะภายใน ขนาดอวัยวะ และสีของอวัยวะ (Figure 7)

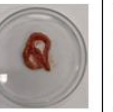
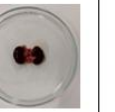
Organs : Acute dermal Toxicity								
Lung	Heart	Liver	Spleen	Gastric	Duodenum	Kidney	Uterus and ovaries	Brain
								
Results = Normal								

Figure 7 Pathogenicity of a spore suspension of *Trichoderma harzianum* DOA-TH50 in different organs after dermal exposure.

จากการทดสอบความเป็นพิษของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ตลอดระยะเวลาการทดสอบความเป็นพิษ หนูแรททั้งหมดในแต่ละการทดสอบ มีการกินอาหารและน้ำอย่างสม่ำเสมอ อาจมีการกินอาหารและน้ำในบางวันที่น้อยกว่าปกติ แต่หลังจากนั้นในวันถัดมาพบว่าหนูแรทมีการกินอาหารและน้ำอยู่ในเกณฑ์ปกติ ส่งผลให้ค่าน้ำหนักตัวที่เพิ่มขึ้นเฉลี่ยสอดคล้องกับการเจริญเติบโต ซึ่งเป็นไปในทิศทางเดียวกับการรายงานของ Colby et al. (2020) ที่รายงานว่า เกณฑ์ปกติในการกินอาหารของหนูแรทโตเต็มวัยอยู่ที่ปริมาณ 5 - 6 ก./100 ก. น้ำหนักตัวหนู/วัน และเกณฑ์ปกติในการกินน้ำของหนูแรทโตเต็มวัยอยู่ที่ปริมาณ 10 - 12 มล./100 ก. น้ำหนักตัวหนู/วัน ซึ่งการที่น้ำหนักตัวของหนูแรทเพิ่มขึ้นเฉลี่ยสอดคล้องกับการเจริญเติบโตนั้น แสดงให้เห็นว่าเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ไม่มีผลต่อการกินอาหารและน้ำ และไม่มีผลเสียต่อการเจริญเติบโตของหนูแรท สอดคล้องกับการรายงานของ Arteaga et al. (2014) ที่ได้รายงานว่า น้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองเป็นตัวชี้วัดอย่างหนึ่งที่ให้ข้อมูลเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารที่ใช้ทดสอบมากขึ้น การสูญเสียน้ำหนักตัวของสัตว์ทดลองอย่างมีนัยสำคัญ อาจเป็นหนึ่งในตัวบ่งชี้ความเสียหายต่อสัตว์มากที่สุด และในกรณีนี้อาจตีความได้ว่าสารที่ใช้ทดสอบมีสัญญาณของความเป็นพิษอย่างชัดเจน

ดังนั้นข้อมูลการทดสอบนี้จึงสามารถนำมาใช้ยืนยันความปลอดภัยของเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตรได้

ประกอบกับมีข้อมูลการจำแนกชนิดทางสัณฐานวิทยาและชีวโมเลกุล กล่าวคือ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 เป็นสายพันธุ์ที่มีความปลอดภัยเมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *T. harzianum* สายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งสอดคล้องกับการรายงานของ Román-Soto et al. (2019) ที่พบว่าเชื้อรา *T. longibrachiatum* เป็นสายพันธุ์ที่ถือเป็นเชื้อโรคอุบัติใหม่ ที่ทำให้เกิดการติดเชื้อในปอดและผิวหนังในผู้ป่วยที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง และนอกจากนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Shahbazfar et al. (2023) ที่รายงานว่ามีการพบผู้ป่วยติดเชื้อรา *Trichoderma* spp. จำนวน 3 ราย โดยพบรอยโรคบนผิวหนัง เนื่องจากการเกิดแผลเน่าเปื่อยแต่ทั้งนี้ผิวหนังของผู้ป่วยสามารถกลับมาฟื้นฟูได้ในภายหลัง ซึ่งสาเหตุของการติดเชื้อมาจากการสัมผัสอาหารที่ปนเปื้อนเชื้อรา โดยทั่วไปแล้ว เชื้อรา *Trichoderma* spp. ถือว่าเป็นเชื้อราที่มีประโยชน์ต่อพืชและไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยง แม้ว่า *Trichoderma* spp. ส่วนใหญ่จะไม่เป็นอันตราย แต่ในบางกรณีอาจมีการแพ้ต่อเชื้อราทำให้เกิดอาการคัน ผื่นแดง หรืออาการทางผิวหนังอื่น ๆ ดังนั้นควรหลีกเลี่ยงการสัมผัสเชื้อราโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งหากมีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่องหรือมีประวัติแพ้เชื้อรา

ดังนั้นจากผลการทดสอบที่ได้ เมื่อจัดระดับความเป็นพิษเทียบเคียงตามเกณฑ์จำแนกความปลอดภัยตามระบบการจัดกลุ่มสารเคมีและการติดฉลากของวัสดุทดสอบตามหลักเกณฑ์ของ GHS พบว่าชีวภัณฑ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 จัดอยู่ใน category ที่ 5 (Unclassified) (United Nations, 2019) ไม่มีความ

เป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท
จึงจัดเป็นชีวภัณฑ์ที่มีความปลอดภัยสูง

สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากในหนูแรท ของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ปริมาณความเข้มข้น 5,000 มล./กก. น้ำหนักตัวหนู และการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางผิวหนังในหนูแรท ของสารแขวนลอยสปอร์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ปริมาณความเข้มข้น 2,000 มล./กก. น้ำหนักตัวหนู ตามแนวปฏิบัติของ OECD Test Guideline 423 และ OECD Test Guideline 402 ในช่วงระยะ 24, 48 และ 72 ชม. แรก และตลอดช่วงระยะเวลา 14 วันของการทดสอบ พบว่า หนูแรททุกตัวไม่แสดงอาการผิดปกติทางคลินิกและพฤติกรรมหรือมีการตาย ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรท

ทั้งนี้ นอกจากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางปากและทางผิวหนังในหนูแรทแล้ว ควรมีการทดสอบความเป็นพิษในด้านอื่น ๆ เพิ่มเติม โดยเฉพาะในด้านการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันทางการสูดดม (Acute inhalation) เพื่อยืนยันถึงความปลอดภัยของชีวภัณฑ์ *T. harzianum* สายพันธุ์ DOA-TH50 ที่ผลิตโดยกรมวิชาการเกษตร และยังสามารถเป็นต้นแบบหรือแนวทางในการทำการทดสอบความเป็นพิษของชีวภัณฑ์กำจัดศัตรูพืชชนิดอื่น ๆ ต่อไปในอนาคต

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณ คุณเกษมสุข อินสุธา คุณสุกฤษฎี ตั้งอิสริยะสกุล คุณนุสรา สุขคะตะ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ที่ได้ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบความเป็นพิษในสัตว์ทดลอง ดูแลและเลี้ยงสัตว์ทดลองตลอดระยะเวลาการเก็บข้อมูล และช่วยเก็บข้อมูลงานวิจัย จนกระทั่งงานวิจัยนี้สำเร็จลงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช. 2563. ชีวภัณฑ์ป้องกันกำจัดศัตรูพืช. เอกสารวิชาการ, สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร. กรุงเทพฯ. 240 หน้า.
- Arteaga, M. E., A. Mancebo, T. Molier, D. Gómez, C. González, A. M. Bada, B. González, N. M. Rojas and G. Rodríguez. 2014. Dermal toxicity, eye and dermal irritation and skin sensitization evaluation of a new formulation of *Bacillus thuringiensis* var *israelensis* SH-14. Regulatory Toxicology and Pharmacology. 68: 147-151.
- Colby, L., M. H. Nowland, L. H. Kennedy and K. Hrapkiewicz. 2020. Clinical laboratory animal medicine: An introduction. Wiley-Blackwell.
- Draize, J. H., G. Woodard and H. O. Calvery. 1944. Methods for the study of irritation and toxicity of substances applied topically to the skin and mucous membranes. The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics. 82(3): 377-390. Cited OECD (1999), Detailed Review Document on Classification Systems for Skin Irritation /Corrosion in OECD Member Countries. OECD Environmental Health and Safety Publications Series on Testing and Assessment No.16.
- National research council. 2011. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals, 8th edition. National Academies Press: Washington DC, USA.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2000. Guidance Document on Acute Oral Toxicity: OECD Environmental Health and Safety Monograph Series on

- Testing and Assessment No. 24. OECD. Paris.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2001. Guideline for Testing of Chemicals Acute Oral Toxicity - Acute Toxic Class Method No. 423. OECD. Paris.
- OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development). 2017. Guideline for Testing of Chemicals Acute Dermal Toxicity: Fixed Dose Procedure No. 402. OECD. Paris.
- Román-Soto, S., E. Álvarez-Rojas and J. García-Rodríguez. 2019. Skin infection due to *Trichoderma longibrachiatum* in a haematological paediatric patient. *Clinical Microbiology and Infection*. 25: 1383-1384.
- Shahbazfar, A. A., M. Heidarieh, S. Shahbazi and H. Askari. 2023. *Trichoderma harzianum* as fungicide and symbiont: is it safe for human and animals?. *Veterinary Research Forum*. 14(11): 607-614.
- United nations Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals (GHS) (2019). The Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals.