

การผลิตและการรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *S. singaporensis*

เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีววินทรีย์กำจัดหนู

Study on Methods to Store the Sporocysts of *S. singaporensis* using as stock
for production of controlling rats bioagent

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ดาราพร รินทะรักษ์ ปราสาททอง พรหมเกิด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis* ได้สารแขวนลอยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูง จำนวน 3500 ล้านสปอร์โรซีสต์ และแบ่งเพื่อการวิจัยการเก็บรักษา โดยเก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดจำนวน 5 ล้านสปอร์โรซีสต์ และในสารละลายเกลือ PBS 1% จำนวน 5 สปอร์โรซีสต์ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C ตามระยะเวลาที่กำหนดไว้ คือ 1, 6 และ 12 เดือน ส่วน สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและนาน 1, 6 และ 12 เดือน สามารถทำให้หนูท้องขาวชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด(100%) ส่วนสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% นาน 1 และ 6 เดือน ป่วยและตายทั้งหมด และที่เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 12 เดือน พบหนูท้องขาวป่วยและตายเพียง 3 ตัวจาก 4 ตัว คิดเป็น 75%

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-04-01-01-54

คำนำ

การผลิตขยายโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง และไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อมรตายได้ จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสปอร์โรซีสต์และเชื้อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่มีศักยภาพสูงไม่สม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง และไม่เพียงพอต่อความต้องการของตลาด นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ ส่วนมาก(90%)มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆปนเปื้อนอยู่ด้วย ทำให้ได้เชื้อโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ที่มีความรุนแรงที่ไม่เท่ากัน อย่างไรก็ตาม พบว่า สปอร์โรซีสต์ในสารแขวนลอยบางหลอดที่ใสสะอาดและเก็บรักษาในตู้เย็นนาน 6 - 7 เดือน และนำมาใช้ผลิตเชื้อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น ยังคงมีศักยภาพสูงในการทำให้หนูป่วยตายได้ถึง 100% จึงเห็นได้ว่าการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่มีศักยภาพสูงในน้ำเปลา่า หรือสารละลาย PBS 1% สามารถรักษามีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ได้ระยะเวลาหนึ่ง ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการทราบเทคนิค/วิธีการเก็บรักษาโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคต่อหนูสูง ให้สามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นเวลานาน ๆ และนำกลับมาใช้เป็นหัวเชื้อบริสุทธิ์ในการผลิตสารชีววินทรีย์กำจัดหนู 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 ถังมือสำหรับแพทย์ ชุดเครื่องมือผ่าตัด

วิธีการ

1. การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis*

ปฏิบัติตามกระบวนการในรายงานโครงการวิจัยโรงงานต้นแบบการผลิตขยายสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว, *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีววินทรีย์ที่กำหนดในเชิงพาณิชย์ของยูวาลักษณ์ ขอประเสริฐ(2553)

2. การเก็บรักษาการรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *S. singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิต

สารชีววินทรีย์ที่กำหนด

การทดลองขั้นตอนที่ 1

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ชั้น ๆ ละ 3 หลอด (~50 μ l) แต่ละหลอดจะมีสปอร์-โรซีสต์แขวนลอยอยู่ 1×10^6 ซีสต์ ดังนี้

ปัจจัย A คือ เก็บสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวในสารละลายที่เป็นน้ำต้มสะอาด และในสารละลายเกลือ(PBS) 0.1 % ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C

ปัจจัย B คือ ระยะเวลาที่เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์เป็นเวลา 6 เดือน 1, 2, 3, 4, 5 ปี

ทุกทริทเมนต์ของทั้งสองปัจจัย ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของโปรโตซัวโดยใช้สีย้อม nucleic acid และประสิทธิภาพของเชื้อโปรโตซัวโดยวิธี bioassay กับหนูท้องขาวทุก ๆ ตามระยะเวลาที่กำหนด

การทดลองสำหรับปีพ.ศ. 2554 นี้ ทำการศึกษาที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร ในระหว่างเดือนตุลาคม 2553 – กันยายน 2554 โดยเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่ได้จากการผลิตสารแขวนลอยโปรโตซัวจากข้อ 1 ในตู้เย็นตามที่กล่าวไว้ข้างต้น และทำการทดสอบเฉพาะประสิทธิภาพกับหนูท้องขาวจำนวน 4 ตัว อัตรา 200,000 สปอร์โรซีสต์ / หนู 1 ตัว โดยให้โดยตรงทางปาก ตามระยะเวลาเก็บรักษา 1, 6 และ 12 เดือน

ส่วนการตรวจสอบการมีชีวิตโดยการย้อมสีนิวคลีอิกแอซิก ไม่สามารถทำการทดสอบได้ เนื่องจากสีย้อมเสื่อมคุณภาพ

การบันทึกข้อมูล โดยทำการบันทึกอัตราการตายของหนูท้องขาว (*Rattus rattus*) ได้รับเชื้อโปรโตซัวที่เก็บรักษาน้ำต้มสะอาดและน้ำเกลือ PBS 1% ในตู้เย็นนาน 1, 6, 12 เดือน

เวลา สถานที่

เก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2553-กันยายน 2554 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยา การเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัว *S. singaporensis*

ได้สารแขวนลอยโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูง จำนวน 3500 ล้านสปอร์โรซีสต์ และแบ่งเพื่อการวิจัยการเก็บรักษา โดยเก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดจำนวน 5 ล้านสปอร์โรซีสต์ และในสารละลายเกลือ PBS 1% จำนวน 5 สปอร์โรซีสต์ ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-10 °C ตมระยะเวลาที่กำหนดไว้ข้างต้น

การเก็บรักษาการรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *S. singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการ

ผลิต

สารชีวอินทรีย์กำจัดหนู

สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและ นาน 1, 6 และ 12 เดือน สามารถทำให้หนูท้องขาวชุดละ 4 ตัว ป่วยและตายทั้งหมด(100%) ส่วนสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% นาน 1 และ 6 เดือน ป่วยและตายทั้งหมด และที่เก็บรักษาในตู้เย็นนาน 12 เดือน พบหนูท้องขาวป่วยและตายเพียง 3 ตัวจาก 4 ตัว คิดเป็น 75% ทั้งนี้จากการตรวจนับสปอร์โรซีสต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่า สารแขวนลอย *S. singaporensis* ที่เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS 1% มีปริมาณของจุลินทรีย์ต่าง ๆ มากกว่าหลอดที่เก็บรักษาเชื้อโปรโตซัวในน้ำดื่มสะอาด ซึ่ง Maddox, et.al (2000) กล่าวว่า สามารถเก็บสารแขวนลอยของสปอร์บริสุทธิ์ของโปรโตซัวกลุ่ม Microsporidia ที่ใช้เป็นจุลินทรีย์กำจัดต๊กแตนหรือด้วง ที่อุณหภูมิ 5 °C ได้เป็นเวลานานกว่าสารแขวนลอยของสปอร์ที่มีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่น ๆ

การทดลองงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไปอีก

เอกสารอ้างอิง

ยิวลักษณ์ ขอประเสริฐ คาราวพร รินทะรักษ์ และปราสาททอง พรหมเกิด 2553, โรงงานต้นแบบการผลิต
ขยาย

สปอร์โรซิสต์ของปรสิตโปรโตซัว , *Sarcocystis singaporensis* เป็นสารชีววินทรีย์กำจัดหนูในเชิง
พาณิชย์ รายงานผลการวิจัยปี 2553 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

Maddox,J.V.,W.M. Brooks and L.F.Solter,2000. Bioassays of Microsporidia. In Bioassays of
Entomophogenic Microbes and Nematodes(eds A.Navon and K.R.S. Ascher) pp.
197-223.