บทที่ 3

วัสดุและวิธีการ

3.1 วิธีการแยก และจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* spp.

อุปกรณ์ และสารเคมีในการทดลอง

1. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ที่ปลูกในประเทศไทย ตั้งแต่ พฤษภาคม พ.ศ. 2541 - พฤษภาคม พ.ศ. 2542
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด คือ PCNB-peptone agar, potato dextrose agar (PDA) และ cornmeal agar (CMA) สำหรับแยกเชื้อรา ในการจำแนกชนิดของเชื้อราใช้ corn leaf agar (CLA) และ corn seed agar (CSA) ส่วนอาหาร potato dextrose agar (PDA) และ potato sucrose agar (PSA) ใช้สำหรับศึกษาลักษณะสีของโคโลนี และสารสี (pigment) ที่ซึมสู่อาหาร
3. ตะเกียงแอลกอฮอล์ เข็มเขี่ย สไลด์(slide) และแผ่นปิดสไลด์ (cover slip) น้ำยาสำหรับปิดผนึกสไลด์ (mounting medium) ยาทาเล็บสำหรับทารอบ cover slip และ จานเลี้ยงเชื้อ (petri dish)
4. กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo-microscope) และ แบบ แสงสว่าง (compound microscope) รวมทั้งกล้องถ่ายรูป และอุปกรณ์วาดภาพ (camera lucida)
5. ชุดสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาสารพิษ Aflatoxin T-2 toxin Ochratoxin และ Fumonisin (Veratox™, USA)

วิธีการทดลอง

1. เก็บตัวอย่างข้าวโพดจากโรงงานผลิตอาหารสัตว์ ซึ่งซื้อจากแหล่งรวมข้าวโพด ในภาคกลาง ภาคตะวันออก และภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (จ.นครสวรรค์ จ.ลพบุรี จ.สระแก้ว และ จ.นครราชสีมา) เพื่อตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา โดยเก็บตัวอย่างข้าวโพดจากรถบรรทุกข้าวโพดด้วยวิธีสุ่มตัวอย่าง 100% จำนวนทั้งสิ้น 122 ตัวอย่าง
2. การตรวจหาสารพิษจากเชื้อราโดยการนำตัวอย่างข้าวโพดมาทดสอบด้วยชุดตรวจหาสารพิษสำเร็จรูปจากเชื้อรา (Veratox™) ตามวิธีการของชุดทดสอบ

3. การแยกเชื้อราจากเมล็ดข้าวโพด

3.1 นำตัวอย่างข้าวโพดที่ต้องการแยกเชื้อรา จำนวน 10 กรัม ใส่ลงใน 1% peptone water จำนวน 90 มล. เขย่าและตั้งทิ้งไว้

3.2 เจือจางสารละลายเชื้อรา (ten-fold dilution) โดยใช้ pipette ดูด suspension ที่ความเข้มข้น 10^{-2} และ 10^{-3} ปริมาณ 1 มล. ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อแล้วเกลี่ยลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCNB-peptone agar PDA และ CMA ในจานเลี้ยงเชื้อรา

3.3 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 28 - 30 องศาเซลเซียส (°C) เป็นเวลา 1-7 วัน

3.4 เมื่อโคโลนีของเชื้อราเจริญ ทำการแยกโคโลนีเชื้อราที่เป็น *Fusarium* spp. ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA จนได้เชื้อราที่บริสุทธิ์ (pure culture)

3.5 นำเชื้อราบริสุทธิ์ไปศึกษาการจำแนกชนิดของเชื้อราในขั้นตอนต่อไป

4. การศึกษาและการจำแนกชนิดของเชื้อรา *Fusarium* spp.

4.1 เลือกเชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture) จากตัวอย่างเมล็ดข้าวโพดที่ตรวจพบ fumonisin มากกว่า 4,000 ppb จำนวน 8 สายพันธุ์ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 6

4.2 ศึกษาลักษณะการเจริญของโคโลนีเชื้อรา *Fusarium* spp. และศึกษาการสร้างสารสี (pigment) บนอาหาร PDA และ PSA

4.3 ศึกษาลักษณะและขนาดของ conidia conidiophore และ phialide บนอาหารเลี้ยงเชื้อ CLA CSA PDA และ PSA โดยเพาะเลี้ยงเป็นเวลานาน 10-14 วันที่ อุณหภูมิ 26-28 °C ในสภาพแสงธรรมชาติ ในกรณีที่ไม่พบ macroconidia sporodochia หรือ chlamydospore อาจเพาะเลี้ยงนานขึ้นเพื่อตรวจหาการเจริญของลักษณะสำคัญเหล่านี้

4.4 ศึกษารูปร่างและถ่ายรูปลักษณะต่าง ๆ เช่น macroconidia และ microconidia โดยใช้กล้อง compound microscope ที่ติดอุปกรณ์ถ่ายภาพ และวาดภาพโดยใช้ camera lucida ช่วยในการจำแนกตามวิธีการของ Nelson และคณะ (1983)

5. การเก็บรักษาเชื้อรา *Fusarium* spp.

ทำการเก็บรักษาเชื้อราที่ทำการศึกษาในอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 7-10 °C และ เก็บไว้บนกระดาษกรองที่ฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 7-10 °C

6. สถานที่ที่ทำการทดลอง

6.1 ฝ่ายบริหารสุขภาพสัตว์ บริษัท โกลเด้น โพลทรี ฟาร์ม จำกัด อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี

6.2 ภาควิชาโรคพืช คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพมหานคร

6. ระยะเวลาทดลอง

เริ่มการทดลองเมื่อ พฤษภาคม 2541 สิ้นสุดการทดลอง พฤษภาคม 2543

3.2 การศึกษาความสามารถของเชื้อรา *Fusarium* spp.ในการสร้างสารพิษเมื่อนำไปเลี้ยงบนข้าวโพดอาหารสัตว์

ตัวอย่างและอุปกรณ์ในการทดลอง

1. รา *Fusarium* spp. รหัสตัวอย่าง 4072 4073 4104 4262 4390 4499 4500 และ 4691
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar
3. เมล็ดข้าวโพดปลอดเชื้อ (sterile corn seed)
4. ชุดสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาสารพิษ Fumonisin T-2 toxin, orchatoxin และ aflatoxin (Veratox ™,USA)
5. อุปกรณ์การศึกษาต่าง ๆ คือ ตะเกียง เข็มเขี่ย petri dish stereomicroscope

วิธีการทดลอง

1. เพาะเลี้ยงเชื้อรา *Fusarium* spp. จำนวน 8 สายพันธุ์ (ตารางที่ 6) บน potato dextrose agar จนได้เชื้อราบริสุทธิ์ (pure culture)
2. เตรียมข้าวโพดที่จะนำไปเพาะเลี้ยงเชื้อรา
    2.1 นำข้าวโพดอาหารสัตว์มาแช่น้ำจนเมล็ดพอง
    2.2 ชั่งข้าวโพดน้ำหนัก ประมาณ 200 กรัม ใส่ถุงพลาสติก สวมปากขวดพลาสติกลงบนปากถุงพลาสติกรัดให้แน่นด้วยหนังยาง อุดปากขวดพลาสติกด้วยสำลี นำไปทำการอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 15 นาที
3. วิธีการเลี้ยงเชื้อราในข้าวโพดอาหารสัตว์ปลอดเชื้อ
    3.1 ตัด potato dextrose agar ที่มีเชื้อราอยู่ขนาดประมาณ 1x 1 ซม.
    3.2 วางชิ้น potato dextrose agar ที่ตัดออกมาลงในถุงข้าวโพดด้วยวิธีปลอดเชื้อ
    3.3 ทำการเลี้ยงเชื้อรานาน 14-49 วัน ที่อุณหภูมิ 28-30 °C โดยปรับสภาวะการเพาะเลี้ยง ให้เป็น 2 กรณีดังนี้คือ
        3.3.1 มีอากาศผ่านเข้าออกภาชนะบรรจุได้สะดวก(aerobic condition)
        3.3.2 เอาแผ่นพลาสติกปิดปากภาชนะบรรจุเพื่อให้อากาศผ่านเข้าออกได้น้อยลง (semi-aerobic condition)
    3.4 เมื่อเชื้อราเจริญขึ้นจนเต็มเม็ดข้าวโพด (ประมาณ 30 วัน) ลักษณะเส้นใยเริ่มน้อยลง ให้แบ่งข้าวโพดที่เลี้ยงเชื้อราออกจากถุงพลาสติกด้วยวิธีการปลอดเชื้อ

ประมาณ 50 กรัม ไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 °C 15 นาที ก่อนนำไปตรวจหาสารพิษด้วยชุดตรวจสำเร็จรูป (Veratox™) เพื่อหาปริมาณสารพิษ

4. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างในการวิเคราะห์

4.1 บดตัวอย่างจนมีขนาดประมาณผงกาแฟ

4.2 ชั่งตัวอย่าง 50 กรัมใส่ flask ขนาด 500 ml

4.3 ใส่ 70 % methanol 250 มล.เขย่าแรงๆประมาณ 10 ครั้งทุก15 นาที 3 ครั้ง

4.4 กรองด้วย กระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 ให้ได้สารสกัดประมาณ 15 มล.

5. ขั้นตอนการวิเคราะห์หาสารพิษจากเชื้อรา fumonisin T-2 toxin ochratoxin และ aflatoxin

5.1 ใส่ antibody coat well ใน microwell holder เท่ากับจำนวนตัวอย่าง + จำนวน control

5.2 ใส่ red marked mixing well ใน microwell holder เท่ากับ antibody coat well

5.3 ใส่ control ใน red marked mixing well หลุมที่ A1 A2 A3 A4 ตามลำดับความเข้มข้นจากน้อยไปมาก หลุมละ 100 µl

5.4 ใส่ตัวอย่างในหลุมที่เหลือของ red marked mixing จนครบทุกหลุม ๆละ 100 µl

5.5 นำ conjugate เทลงใน single reagent basin แล้วดูด conjugate solution ลงใน red marked mixing well strips ทุกหลุม ๆละ100 µl

5.6 ผสมให้เข้ากันโดยการดูดขึ้นลง 5 ครั้ง

5.7 ย้ายสารจาก red marked mixing well strips ไปยัง antibody coat well จนครบทุกหลุม หลุมละ100 µl บ่ม 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง(aflatoxin 2 นาที)

5.8 เทสารใน antibody coat well ทิ้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นประมาณ 300 µl ต่อหลุม โดยใช้ miniwasher ทำ 5 ครั้งแล้วเคาะ plate กับกระดาษทิชชูให้แห้ง

5.9 เท substrate solution ใส่ใน single reagent basin แล้วดูด substrate solution ใส่ใน antibody coat well ทุกหลุม ๆละ100 µl บ่ม 10 นาที (aflatoxin 3 นาที)

5.10 เท red stop solution ลงใน single reagent basin แล้วดูด stop solution ใส่ใน antibody coat well ทุกหลุม หลุมละ 100 µl

5.11 นำไปอ่านด้วย microplate reader ที่ 650 nm (ไม่ควรเกิน 20 นาทีหลังจากใส่ red stop) วิธีการใช้โปรแกรมช่วยในการวิเคราะห์อยู่ในภาคผนวก ข

6. สถานที่ทำการทดลอง

ฝ่ายบริหารสุขภาพสัตว์ บ. โกลเด้น โพลทรี ฟาร์ม จ.ก. อำเภอบ้านบึง จังหวัดชลบุรี

7. ระยะเวลาทดลอง

เริ่มการทดลองเมื่อ 12 ตุลาคม 2541 ถึง 6 กันยายน 2543

3.3 การศึกษาผลของสารพิษจากเชื้อราที่เลี้ยงบนข้าวโพดต่อไก่เนื้ออายุ 1-25 วัน

อุปกรณ์และสารเคมี

1. เชื้อราตัวอย่างที่ 4 (รหัส 4262) ซึ่งเก็บไว้บนกระดาษกรอง ที่อุณหภูมิ 4 - 7 ^{o}C
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา potato dextrose agar (PDA)
3. ข้าวโพดเลี้ยงสัตว์บดหยาบ
4. กรงเลี้ยงไก่ชนิด stainless steel ขนาด กว้าง 60 ซม ยาว 60 ซม และ สูง 50 ซม จำนวน 12 กรง
5. ชุดสำเร็จรูปสำหรับตรวจหาสารพิษ aflatoxin T-2 toxin ochratoxin และ fumonisin (Veratox^{TM})
6. ชุดน้ำยาใช้ตรวจหาค่าเคมี ในเลือด (Blood chemistry)
   - 6.1 Serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) หรือ Aspatate aminotransferase (AST)
   - 6.2 Serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) หรือ Alanine aminotransferase (ALT)
   - 6.3 Alkaline phosphatase (ALP),
   - 6.4 Gamma glutamyl transferase (GGT)
7. หัวอาหารไก่ไข่เบอร์ 155 ของบริษัทสตาร์ฟีด
8. อุปกรณ์ในการชันสูตรซาก ได้แก่ กรรไกรผ่าซาก ปากคีบ มีด และเครื่องชั่งละเอียด
9. สารละลายบัฟเฟอร์ ฟอร์มาลีน 10 %
10. อุปกรณ์ในการเตรียมทางจุลพยาธิวิทยา ได้แก่ ขวดพลาสติก มีด เขียง
11. อุปกรณ์ในการตรวจค่าเคมีในเลือด ได้แก่ spectophotometer centrifuge serum tube pipette

วิธีการทดลอง

1. ขั้นตอนการผลิตสารพิษจำนวนมากเพื่อใช้เป็นอาหารไก่ (mycotoxin production)
   1.1 เพาะเลี้ยงเชื้อรา ตัวอย่างที่ 4 (รหัส 4262) ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDAนาน 7 วัน

1.2 เตรียมข้าวโพดที่จะนำไปเลี้ยงเชื้อรา โดยนำข้าวโพดเลี้ยงสัตว์มาคัดเมล็ดแตกและเมล็ดเสียออก แล้วนำไปแช่น้ำไหลนานประมาณ 8 ชั่วโมงจนเมล็ดพอง ชั่งข้าวโพดน้ำหนัก 500 กรัมใส่ลงในถุงพลาสติก สวมปากขวดพลาสติกลงบนปากถุงพลาสติก รัดให้แน่นด้วยหนังยาง อุดปากขวดพลาสติกด้วยสำลี นำไปอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C 30 นาที

1.3 แล้วจึงตัดอาหารเลี้ยงเชื้อรา PDA ที่มีเชื้อราขึ้นขนาด 1x1 ซม. ใส่ลงในถุงข้าวโพดด้วยวิธีปลอดเชื้อ นำถุงข้าวโพดไปบ่มที่อุณหภูมิ 28±3°C นานจนเห็นว่าเชื้อราขึ้นเต็มเม็ดข้าวโพด ประมาณ 30 วัน จึงนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 °C นาน 15 นาที แล้วนำไปตรวจหาสารพิษจากเชื้อรา

2. วิธีการเตรียมอาหารไก่เนื้อ โดยทำการผสมอาหารไก่เนื้อด้วยหัวอาหารไก่ เบอร์ 155 ของบริษัทสตาร์ฟีด ข้าวโพดบดที่อบฆ่าเชื้อเป็นอาหารกลุ่มควบคุม (Control) ข้าวโพดบดที่มีสารพิษเป็นอาหารกลุ่มทดลอง (treatment) ปรับระดับโภชนะให้ได้โปรตีนประมาณ 20% ด้วย Pearson square method (ภาคผนวก จ) นำอาหารกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองไปตรวจหาระดับสารพิษจากเชื้อราด้วยชุดทดสอบ Veratox™

3. วิธีการทดลองในไก่ทดลอง

3.1 ลูกไก่พันธุ์ อาร์เบอร์ เอเคอร์ (Arbor acre) อายุ 1 วัน คละเพศ จำนวน 164 ตัว โดยเริ่มให้มีระยะเวลาพักฟื้น (accumulization time) นาน 12 ชั่วโมง โดยการให้น้ำอย่างเดียวแล้วจึงทำการสุ่มแยกลูกไก่ จำนวน 20 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมก่อนการทดลอง และแยกลูกไก่เป็น 2 กลุ่มการทดลองดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 ลูกไก่จำนวน 66 ตัว แบ่งเป็น 6 ซ้ำ ๆ ละ 11 ตัว เป็นกลุ่มควบคุมทำการเลี้ยงโดยให้กินอาหารที่เตรียมจากข้าวโพดและหัวอาหารไก่ไข่ โดยให้กินเองตามสะดวก (ad libitum) นาน 25 วัน

กลุ่มที่ 2 ลูกไก่จำนวน 66 ตัว แบ่งเป็น 6 ซ้ำ ๆ ละ 11 ตัว เป็นกลุ่มทดลอง ให้กินอาหารที่เตรียมจากข้าวโพดที่มีเชื้อรา *Fusarium moniliforme* ตัวอย่างที่4 และหัวอาหารไก่ไข่ โดยให้กินเองตามสะดวก (ad libitum) นาน 25 วัน

3.2 ชั่งน้ำหนักตัว และ เจาะเลือดลูกไก่อายุ 1 วัน ที่เป็นกลุ่มควบคุมก่อนการทดลอง จำนวน 20 ตัว ทำการผ่าซากเพื่อดูรอยโรคด้วยตาเปล่า และตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

3.3 สุ่มตัวอย่างไก่กลุ่มที่ 1 และ 2 ที่อายุ 5 10 15 วัน ซ้ำละ 3 ตัว และที่อายุ 25 วัน ซ้ำละ 2 ตัว เพื่อชั่งน้ำหนักไก่ เจาะเลือด และ ปั่นแยกซีรั่ม

3.3.1 นำไปตรวจหาค่าเคมีในเลือด ได้แก่ AST ALT ALP และ GGT และนำผลทดสอบที่ได้ทั้งหมดไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยหาค่าเฉลี่ย (Mean) ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard deviation :SD) และทดสอบหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มของค่าเคมีในเลือดต่าง ๆ ด้วยวิธี pair T-test ด้วยโปรแกรมคำนวณทางสถิติ SPSS for window version 9.0

3.3.2 ทำการผ่าซากเพื่อดูรอยโรคด้วยตาเปล่า และชั่งน้ำหนักตัว ตับ ม้าม และ ต่อมเบอร์ซ่า แล้วนำอวัยวะต่าง ๆ แช่ในสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10% นำมาเตรียมเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยา และฝังลงในพาราฟิน โดยวิธีทางฮีสโตเทคนิค ตัดเนื้อเยื่อหนา 4 ไมครอน ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ eosin (H&E)และศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาทำการประเมินรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของตับโดยประเมินจากรอยโรค ดังนี้ คือ fatty degeneration, glycogen degeneration , hepatic cell swelling, hepatic cell death และ bile duct epithelial cell death โดยให้คะแนนรอยโรคแบ่งออกเป็น 4 ระดับ คือ

0 = ไม่พบรอยโรค (0%) 1 = พบรอยโรคน้อย (≤ 30%) 2 = พบรอยโรคปานกลาง 30-70% และ 3 = พบรอยโรครุนแรง (> 70 %) (Schroeder *et al.*,1992) รอยโรคที่ม้าม ต่อมไทมัส และต่อมเบอร์ซ่าให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา โดยประเมินจากการหายไป และลดลงของ lymphoid cell และ follicles โดยให้คะแนนตามความรุนแรงของรอยโรคเช่นเดียวกับตับ

4. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง ชั้น 8 อาคาร 60 ปี คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เขตพญาไท กรุงเทพมหานคร

5. ระยะเวลาการทดลอง

เริ่มทำการทดลอง เมื่อ 13 ธันวาคม 2543 สิ้นสุดการทดลอง 6 มกราคม 2544