1. ชุดโครงการวิจัย : แผนงานวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ประโยชน์ของชีวภัณฑ์สู่เชิงพาณิชย์

2. โครงการวิจัย : วิจัยพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตขยายและการใช้ชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจ

3. ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย) : การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *Sarcocystis singaporensis* โดยใช้ potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาสำหรับผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ) : Development of storage method for sporocysts suspension of *Sarcocystis singaporensis* by using Potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) to stretch shelf life for producing of bio-rodenticide bait.

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : วิชาญ วรรธนะไกวัล กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผู้ร่วมงาน : ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์ ปิยาณี หนูกาฬ และทรงทัพ แก้วตา กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ : การพัฒนาวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *Sarcocystis singaporensis* โดยใช้ potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาสำหรับผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2558 ถึงเดือนกันยายน 2561 ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองหาร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ และร้อยละการตายของหนูทดลอง จากการเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ได้แก่ 1.การล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation 2.วิธี Saturate NaCl solution 3.ล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ 4.ล้างและเก็บสารแขวนลอยด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ โดยเก็บที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทดสอบทุก 6 เดือน เป็นระยะเวลา 3 ปี พบว่าที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี สปอร์โรซีสต์สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ เท่ากับร้อยละ 100, 100, 37.5 และ 18.75 ตามลำดับ แต่ที่ระยะเวลาการเก็บรักษามากกว่า 2 ปี ขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ในทุกกรรมวิธี ในขณะที่ร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน และ 3 ปี เท่ากับ 93.04, 74.63, 68.53, 55.60, 33.67 และ 17.18 ตามลำดับ ซึ่ง

แสดงให้เห็นว่าค่าร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ และร้อยละการตายของหนูทดลอง นั้นลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น

Abstract : The development of storage method for sporocysts suspension of *Sarcocystis singaporensis* by using potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) to stretch shelf life for producing of bio-rodenticide bait was conducted during October 2015 to September 2018. This study was conducted for a life percentage of sporocysts and percentage of death in rats were kept in 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), experimental designed in CRD have three replications four treatments; 1. Sheather's sucrose flotation 2. Saturate NaCl solution 3. Wash the sporocysts suspension with drinking water 4. Wash and kept the sporocysts suspension with drinking water, tested every six months at three years after treatments. The experiment found at 6 months, 1 year, 1 year 6 months and 2 years, the sporocysts are remain effective were caused death of rats at 100%, 100%, 37.5% and 18.75% respectively. But the storage duration over 2 years were not caused death of rats all treatments. While the percentage of the viability of sporocysts at 6 months, 1 year, 1 year 6 months, 2 years, 2 years 6 months and 3 years are 93.04%, 74.63%, 68.53%, 55.60%, 33.67% and 17.18% respectively. The results indicated that the effective of efficiency pathogenesis in rats and the percentage of the viability of the sporocysts are decreasing with increasing duration times.

6. คำนำ : หนูเป็นสัตว์ศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งนอกจากการทำลายผลิตผลทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงอีกด้วย เช่น กาฬโรค ซึ่งมีหมัดที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะ, Leptospirosis หรือโรคฉี่หนูที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียกลุ่ม *Leptospira*, โรค Spotted fever มีสาเหตุจากแบคทีเรียกลุ่ม *Rickettsia* โดยมีไรที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะ รวมไปถึงโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ ที่มีหนูเป็นพาหะนำโรค เป็นต้น (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2544)

การป้องกันกำจัดหนูโดยการใช้สารกำจัดหนู (rodenticide) ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดหนู 2 ประเภท คือประเภทออกฤทธิ์เร็ว (acute rodenticide) และประเภทออกฤทธิ์ช้า (chronic rodenticide) สารกำจัดหนูทั้ง 2 ประเภท นั้นสามารถลดจำนวนหนูลงได้อย่างรวดเร็ว แต่การใช้สาร

กำจัดหนูออกฤทธิ์เร็วบ่อยครั้ง จะทำให้หนูเข็ดขยาดต่อสารพิษ อีกทั้งการใช้สารเคมีกำจัดหนูเหล่านี้มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อม รวมถึงสัตว์ชนิดอื่นและมนุษย์ที่ได้รับสารกำจัดหนูทั้งทางตรงและทางอ้อม ทำให้ได้รับอันตรายจากสารเคมีกำจัดหนูอาจร้ายแรงถึงขั้นเสียชีวิต ซึ่งส่งผลต่อระบบห่วงโซ่อาหารตามธรรมชาติ ส่งผลให้ห่วงโซ่อาหารนั้นเสียสมดุลในที่สุด

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่ต้องการสัตว์อาศัย 2 ชนิด ได้แก่ สัตว์อาศัยตัวกลาง (intermediate host) คือ หนูสกุลท้องขาว (*Rattus*) และสกุลหนูพุก (*Bandicota*) เท่านั้น (ยุวลักษณ์ และคณะ 2539a, ยุวลักษณ์ และคณะ 2539b, ยุวลักษณ์ และคณะ 2540, Jakel *et al*., 1996) ในขณะที่สัตว์อาศัยสุดท้าย (final host) คือ งูเหลือม (*Python reticulatus*) ซึ่งวงจรชีวิตของปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ มีความจำเพาะเจาะจงต่อ สัตว์อาศัยมาก (Beaver and Maleckar, 1981; Jaekel *et al*., 1996) พบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ (Zamen, 1976; Lai, 1977; Kan, 1979; O'Donoghue *et al*., 1987) ซึ่งถูกค้นพบโดยศาสตราจารย์ Zamen เป็นครั้งแรกในประเทศสิงคโปร์ ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม และในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตมีการสร้างสปอร์โรซีสต์ (sporocysts) ซึ่งจะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และเข้าสู่หนูซึ่งเป็นสัตว์อาศัยตัวกลางโดยการปนเปื้อนไปกับน้ำและอาหาร ซึ่งปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในสัตว์อาศัยตัวกลางและในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะมีการสร้างซาร์โคซีสต์ (sarcocysts) ซึ่งภายในมีแบรดิซ้อยต์ (bradyzoites) บรรจุอยู่ ซึ่งฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู ในระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมเข้าสู่สัตว์อาศัยสุดท้าย (Gardiner *et al*., 1985) เมื่อหนูซึ่งเป็นสัตว์อาศัยตัวกลางถูกงูเหลือมกินเป็นอาหาร ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ก็จะเริ่มวงจรชีวิตใหม่อีกครั้ง

กรมวิชาการเกษตรและองค์การความช่วยเหลือทางด้านวิชาการของสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (GTZ) และบริษัทไบเออร์ จำกัด ได้ร่วมกันทำการวิจัยด้านต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ตั้งแต่ปี 2536 – 2545 จนมีการผลิตปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์เป็นสารชีวินทรีย์กำจัดหนู (bio-rodenticide) ที่มีการนำไปใช้ในภาคการเกษตรและตามโรงงาน บ้านเรือนกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบัน

การผลิตขยายปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง และการปนเปื้อนจากค็อคซิเดียโปรโตซัวชนิดอื่นส่งผลให้ไม่สามารถทำให้หนูติดเชื้อ ป่วยและตายได้ จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้จากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มี

ศักยภาพสูงขาดความสม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง อีกทั้งยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ โดยมากประมาณร้อยละ 90 มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆพบปะปนอยู่ด้วย (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2541) ทำให้ได้เชื้อปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองที่ไม่เท่ากัน ดังนั้นขั้นตอนการคัดแยกเชื้อจากมูลงูและวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์จึงมีความสำคัญเพื่อให้สปอร์โรซีสต์ของเชื้อยังคงมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้

อย่างไรก็ดีจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาดและในสารละลายเกลือ PBS 1% ที่อุณหภูมิ 4-10 °C และสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ – 176 °C นั้น ร้อยละการชีวิตและประสิทธิภาพการก่อโรคกับหนูทดลองของสปอร์โรซีสต์ลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่นานขึ้น อีกทั้งพบว่าถ้าสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์เก็บรักษามากกว่า 2 ปี ขึ้นไป นั้นไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ในทุกสภาวะของการทดลองที่ผ่านมา (วิชาญ และคณะ, 2557) ในขณะที่สารละลาย potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) นั้นเป็นสารละลายที่นิยมนำมาใช้ในการเก็บรักษาโอโอซีสต์ของค็อคซิเดียโปรโตซัว โดยพบว่าการเก็บรักษาโอโอซีสต์ของค็อคซิเดียโปรโตซัวในสารละลาย 2% potassium dichromate นั้นมีค่า sporulation สูงและมีค่าร้อยละการถูกทำลายต่ำ เมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายชนิดอื่นๆ (Duszynski and Gardner, 1990) อีกทั้งยังพบว่า โอโอซีสต์ของค็อคซิเดียโปรโตซัวนั้นสามารถมีชีวิตอยู่ได้นาน 3-4 ปี (Duszynski and Wilber, 1997)

ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาครั้งนี้ จึงต้องการทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาโปรโตซัวระยะสปอร์โรซีสต์ให้มีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งยังคงความรุนแรงในการ ก่อโรคกับหนูทดลองและสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน เพื่อที่สปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* สามารถคงประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองได้ ทำให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกำจัดหนูอย่างสม่ำเสมอได้เป็นจำนวนมาก และเป็นการสนับสนุนลดการใช้สารเคมีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืนต่อไป

7. วิธีดำเนินการ :

- อุปกรณ์

1. มูลงูเหลือม
2. หนูทดลอง ได้แก่ หนูท้องขาวบ้าน (*Rattus rattus*) จากธรรมชาติและหนูทดลอง Sprague Dawley Rat
3. เครื่องปั่น (centrifuge) Hettich รุ่น universal 16A และตู้เย็น (4-10°C)
4. ตะแกรงกรองละเอียด (ขนาดความละเอียด 6-8 ไมครอน)

5. Blood counting chamber
6. หลอดปั่นขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร
7. สารเคมีได้แก่ ชุดสีย้อม nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit), NaCl (sodium chloride), น้ำตาลซูโครส (sucrose) และ potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$)
8. น้ำดื่มบริสุทธิ์
9. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงกำลังขยายสูง (light microscope)
10. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัด
11. Auto pipette และ Tips
12. กรงเลี้ยงเดี่ยวสำหรับหนูทดลองขนาด 23x52x22 เซนติเมตร และกรงดักหนู
13. จานแก้วเพาะเชื้อ (petridish)
14. ที่ให้อาหารโดยตรงจากปากสู่กระเพาะ (feeding tube)

- วิธีการ

การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

คัดเลือกสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ไอโซเลทที่มีศักยภาพสามารถทำให้ หนูทดลองป่วยและตายได้ (dose $2x10^6$ sporocysts) จากนั้นนำไปป้อนโดยตรงทางปากในหนูทดลอง Sprague Dawley Rat (dose 500 sporocysts) เลี้ยงหนูทดลองเป็นระยะเวลา 2 เดือน นำหนูทดลองไปผ่าซากเพื่อตรวจหาซาร์โคซีสต์ในกล้ามเนื้อ และนำไปให้เป็นอาหารงูเหลือมเพื่อเพิ่มปริมาณเชื้อ หลังจากนั้นเก็บมูลงูเหลือมที่ได้ ชั่งมูลงู 5 กรัม ละลายน้ำ 30 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตะแกรงกรองละเอียด ปั่นสารแขวนลอยมูลงูที่ผ่านการกรองแล้วที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการปั่นล้าง ประมาณ 2-3 รอบ จนกว่าสารแขวนลอยด้านบนตะกอนจะใส

การล้างสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

กรรมวิธีที่ 1; วิธี Sheather's sucrose flotation (Sheather, 1923)

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว ทำการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation (Sheather, 1923) โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้ผสมกับ สารละลาย Sheather's sucrose flotation (ชั่ง sucrose 454 กรัมละลายในน้ำ 355 มิลลิลิตร) จากนั้นปั่นสารแขวนลอยที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

กรรมวิธีที่ 2; วิธี Saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995)

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว ทำการล้างด้วยวิธี Saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่

ได้ผสมกับ สารละลาย Saturate NaCl solution (ชั่ง NaCl 311 กรัมละลายในน้ำ 1 ลิตร) จากนั้นปั่นสารแขวนลอยที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

กรรมวิธีที่ 3 และ 4; วิธีการล้างแบบปกติ

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

การเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

นับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ให้มีจำนวนสปอร์โรซีสต์อยู่ $2x10^6$ ซีสต์ นำส่วนใสของสารแขวนลอยผสมลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ในอัตราส่วน 1 ส่วนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ต่อ 5 ส่วนของ 2% potassium dichromate (Duszynski and Wilber, 1997) ลงใน petridish บ่มที่อุณหภูมิห้อง (23°C – 27°C) เป็นเวลา 7 วัน เก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่อุณหภูมิ 4-10°C (ยกเว้นในกรรมวิธีที่ 4 เก็บสารแขวนลอยที่ได้โดยไม่ผสมลงในสารละลาย 2% potassium dichromate)

ทดสอบร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์และร้อยละการตายของหนูทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation (Sheather, 1923) ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

กรรมวิธีที่ 2 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ที่อุณหภูมิ 4-10°C

กรรมวิธีที่ 3 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

ทำการทดลองโดยเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ที่ได้จากการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation/ Saturate NaCl solution/ น้ำดื่มบริสุทธิ์ ในหลอดทดลองจำนวน 6 หลอดทดลอง/วิธีการล้าง ซึ่งในแต่ละหลอดทดลองมีสปอร์โรซีสต์อยู่ $2x10^6$ ซีสต์ เก็บรักษาลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ที่อุณหภูมิ 4-10 °C โดยเปรียบเทียบกับวิธีการล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ ทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ ด้วยวิธี bioassay โดยการให้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ทางปากกับหนูท้องขาว ซ้ำละ 4 ตัว นับร้อยละการตายของหนูทดลองใน

แต่ละกรรมวิธี และตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit) นับร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในแต่ละกรรมวิธี เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทดสอบทุก 6 เดือน เป็นระยะเวลา 3 ปี วิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในกรรมวิธีต่างๆ

- เวลาและสถานที่

ดำเนินการทดลองระหว่างเดือนตุลาคม 2559 ถึงเดือนกันยายน 2561 ณ ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร โรงเรือนเลี้ยงงูเหลือม โรงเลี้ยงหนู ของกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร

8. **ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง** :

การทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ตามกรรมวิธีต่างๆ ในการทดลองครั้งนี้ ทั้ง 4 กรรมวิธี ได้แก่ เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate (กรรมวิธีที่ 1) เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Saturate NaCl solution ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate (กรรมวิธีที่ 2) เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate (กรรมวิธีที่ 3) และล้างและเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ (กรรมวิธีที่ 4) ซึ่งทั้ง 4 กรรมวิธีนั้น เก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่อุณหภูมิ 4-10 °C แล้วนำมาทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ และนับร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในแต่ละกรรมวิธี ทดสอบทุก 6 เดือน เป็นระยะเวลา 3 ปี ให้ผลการทดลองดังนี้

ผลการทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้น พบว่าศักยภาพการก่อโรคของเชื้อนั้นลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธี ในระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และ 1 ปี สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ทั้งหมด ในทุกกรรมวิธี (100%) แต่เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน ถึง 2 ปี พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการตายของหนูทดลองนั้นลดลง อยู่ที่ 37.5 และ 18.75 ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บรักษาที่ระยะเวลา 2 ปี ขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองที่ติดเชื้อป่วยและตายได้ในทุกกรรมวิธี (100%) (figure 2)

ผลการทดสอบการนับร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้น พบว่าร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ลดลง ตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มมากขึ้นในทุกกรรมวิธีเช่นเดียวกัน โดยที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของทุกกรรมวิธีอยู่ที่ 93.04 ซึ่งวิธีการเก็บรักษาทั้ง 4 กรรมวิธี นั้นให้ค่าเฉลี่ยร้อยละไม่แตกต่างกัน

ทางสถิติ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ปี มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของทุกกรรมวิธีอยู่ที่ 74.63 พบว่าในกรรมวิธีที่ 3 มีค่าเฉลี่ยร้อยละต่ำสุด ส่วนกรรมวิธีที่ 1, 2 และ 4 มีค่าเฉลี่ยร้อยละที่ไม่ต่างกันทางสถิติ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของทุกกรรมวิธีที่ 68.53 และ 55.60 ตามลำดับ โดยวิธีการเก็บรักษาในกรรมวิธีที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ยร้อยละสูงสุด ขณะที่กรรมวิธีที่ 3 และ 4 นั้นให้ค่าเฉลี่ยร้อยละที่ไม่ต่างกันทางสถิติ ในเดียวกันที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 2 ปี 6 เดือน มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของทุกกรรมวิธีอยู่ที่ 33.67 ซึ่งพบว่ากรรมวิธีที่ 2 มีค่าเฉลี่ยร้อยละสูงสุด ส่วนกรรมวิธีที่ 3 และ 4 มีค่าเฉลี่ยร้อยละต่ำสุด ขณะที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 3 ปี มีค่าเฉลี่ยร้อยละการมีชีวิตของทุกกรรมวิธีอยู่ที่ 17.18 ซึ่งกรรมวิธีที่ 1 และกรรมวิธีที่ 3 มีค่าเฉลี่ยร้อยละสูงสุดและต่ำสุด ตามลำดับ (table 1 และ figure 3)

จากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่าร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้นไม่มีความสัมพันธ์กับศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคในหนูทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยที่ผ่านมาดังนี้

Baver and Maleckar, 1981 รายงานว่า ความแข็งแรงและความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคโดยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* นั้นขึ้นกับการเก็บรักษา โดยปกติแล้วสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* สามารถเก็บรักษาในน้ำกลั่นที่อุณหภูมิ 4-10°C ได้นาน 2 ปีและยังสามารถทำให้หนูที่ได้รับสปอร์โรซีสต์เข้าไปเป็นโรคได้

Haefner and Frank, 1984 รายงานว่า จำนวนสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ที่เก็บรักษาไม่เกิน 4 อาทิตย์ จำนวนสปอร์โรซีสต์เพียง 200-300 สปอร์โรซีสต์ และ 350-500 สปอร์โรซีสต์ สามารถทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้ตามลำดับ แต่ถ้าเก็บรักษานาน 4-6 เดือนไปใช้ พบว่าความแข็งแรงและความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูจะลดลง ทำให้ต้องใช้สปอร์โรซีสต์มากขึ้นจึงจะทำให้หนูนอร์เวและหนูพุกใหญ่ติดเชื้อได้

Elsheikha *et al*., 2004 ได้ทำการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ตั้งแต่ปี 1996-2002 ที่อุณหภูมิ 4 °C และนำมาทดสอบการมีชีวิตโดยการย้อมด้วย Propidium Iodide (PI) พบว่า แม้ว่าสามารถเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* ให้ยังคงมีชีวิตได้ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลานาน 7 ปี แต่ไม่สามารถทำให้เกิดซีสต์ในหนูทดลองที่สัตว์อาศัยตัวกลางได้ ซึ่งเป็นการแสดงให้เห็นว่าการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในโปรโตซัวสกุลนี้ไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง แต่ระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์ เป็นปัจจัยสำคัญในการสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลาง ซึ่งเมื่อระยะเวลาและอายุของสปอร์โรซีสต์มากขึ้นส่งผลให้การสร้างซีสต์ในสัตว์อาศัยตัวกลาง ลดลงตามอายุของสปอร์โรซีสต์ที่มากขึ้น

วิชาญ และคณะ, 2557 ทำการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในกรรมวิธีที่แตกต่างกัน 4 กรรมวิธี ได้แก่ เก็บรักษาในน้ำดื่มสะอาด เก็บรักษาในสารละลายเกลือ PBS (phosphate buffered saline) 1% และเก็บรักษาโดยวิธีการปั่นล้างน้ำตาล (sugar flotation) ที่อุณหภูมิ 4°C ในขณะที่การเก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว (N_2) นั้นมีอุณหภูมิการเก็บรักษาที่ -196°C ซึ่งในทุกกรรมวิธีนั้นพบว่าเมื่อทำการเก็บรักษาระยะเวลานานสองปีขึ้นไป ไม่สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้และร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นในทุกกรรมวิธี

ถึงแม้ว่าผลการทดลองครั้งนี้จะสอดคล้องกับผลงานวิจัยทั้ง 4 เรื่องดังกล่าว ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประสิทธิภาพในการก่อโรคกับหนูทดลองของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัวสกุล *Sarcocystis* และ *S. singaporensis* นั้นจะค่อยๆลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น และร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* นั้นไม่ได้สัมพันธ์กับการสร้างซีสต์ในหนูทดลองที่เป็นสัตว์อาศัยตัวกลาง ซึ่งขัดแย้งกับงานวิจัยของ Fayer and Nerod, 1996 ที่พบว่า ในน้ำที่ผ่านการเป็นน้ำแข็งแล้ว โอโอซีสต์ของโปรโตซัว *Cryptosporidium pavum* สามารถมีชีวิตและยังทำให้เกิดโรคในสัตว์อาศัยได้ อีกทั้งโอโอซีสต์จะมีชีวิตและมีศักยภาพการก่อโรคที่ยาวนานขึ้น ถ้าอยู่ในสภาพอุณหภูมิต่ำมาก ซึ่งสาเหตุที่ทำให้ผลการทดลองที่ได้มานั้นไม่สอดคล้องกัน อาจเป็นไปได้ว่า โปรโตซัวที่ทำการทดลองของ Fayer and Nerod, 1996 นั้นเป็น *C. pavum* ซึ่งไม่ใช่โปรโตซัวในสกุล *Sarcocystis* ดังนั้นจึงอาจมีความแตกต่างกันในหลายด้าน ทั้งในด้านสารพันธุกรรม สรีรวิทยา รวมถึงสารประกอบต่างๆภายในสปอร์โรซีสต์ ถึงแม้ว่าจะเป็นโปรโตซัวในไฟลัม Apicomplexa เหมือนกันก็ตาม (Hikosaka *et al*., 2010) ดังนั้นจากผลการทดลองที่ได้ในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า วิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ทั้ง 4 กรรมวิธี ผลร้อยละการมีชีวิตและศักยภาพในการก่อโรคในหนูทดลองของเชื้อ จะลดลงตามอายุการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น เพียงแต่ร้อยละการมีชีวิตของเชื้อนั้น สามารถมีชีวิตอยู่ได้ถึง 3 ปี ในขณะที่ศักยภาพการก่อโรคของเชื้อในหนูทดลองนั้น สามารถก่อโรคทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ ในเชื้อที่มีอายุการเก็บรักษาสูงสุดได้เพียง 2 ปี เท่านั้น ซึ่งแสดงให้เห็นว่าร้อยละการชีวิตกับศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อนั้น ไม่ได้มีความสัมพันธ์กันแต่อย่างใด

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ :

การทดลองเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ในสารละลาย 2% potassium dichromate ตามกรรมวิธีต่างๆในการทดลองครั้งนี้ ทั้ง 4 กรรมวิธี ได้แก่ เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation (กรรมวิธีที่ 1) เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Saturate NaCl solution (กรรมวิธีที่ 2) เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ (กรรมวิธีที่ 3) และล้างและเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ด้วยน้ำดื่มบริสุทธิ์ (กรรมวิธีที่ 4) ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน และ 1 ปี สปอร์โรซีสต์ของเชื้อ

สามารถทำให้หนูทดลองป่วยและตายได้ทั้งหมด ในทุกกรรมวิธี (100%) แต่เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1 ปี 6 เดือน ถึง 2 ปี พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละการตายของหนูทดลองนั้นลดลง อยู่ที่ 37.5 และ 18.75 ตามลำดับ และการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 2 ปี ขึ้นไปนั้น ไม่สามารถทำให้หนูทดลองที่ติดเชื้อป่วยและตายได้ในทุกกรรมวิธี ในขณะที่ร้อยละการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน, 2 ปี, 2 ปี 6 เดือน และ 3 ปี เท่ากับ 93.04, 74.63, 68.53, 55.60, 33.67 และ 17.18 ตามลำดับ จากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การล้างสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation และวิธี Saturate NaCl solution ซึ่งเก็บในสารละลาย 2% potassium dichromate นั้น ให้ผลเช่นเดียวกับกรรมวิธีควบคุม (กรรมวิธีที่ 4) ดังนั้นในการปฏิบัติงานจริงเพื่อผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู ของกรมวิชาการเกษตร นั้น สามารถใช้วิธีการล้างสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ในน้ำดื่มบริสุทธิ์ (กรรมวิธีที่ 4) เป็นวิธีหลักในการเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ซึ่งเป็นวิธีปกติที่ใช้กันอยู่ เพื่อความสะดวกของเจ้าหน้าที่ในการปฏิบัติงาน เพื่อให้สามารถผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูที่มีประสิทธิภาพสูงได้เพียงพอกับความต้องการของเกษตรกรและประชาชนทั่วไป ในการป้องกันและกำจัดหนูศัตรูพืชด้วยชีววิธีอย่างยั่งยืนต่อไป

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ : นำไปประยุกต์ใช้ในการเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ *S. singaporensis* ในการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

11. คำขอบคุณ : ขอขอบคุณ คุณทัศวรรณ พุ่มกาหลง ที่ให้ความช่วยเหลือในการผ่าซากชันสูตรเพื่อดูพยาธิสภาพหลังการตาย และตรวจหาเชื้อ *S. singaporensis* ในหนูทดลอง

ขอขอบคุณ คุณบรรจง บุญครอบ คุณวิชา สีแจ่ม คุณธนากรณ์ ภักดีสุข คุณเจริญศักดิ์ กันต่าย และคุณกุลธิดา เจนสิริโสภณ ที่ให้ความช่วยเหลือในการดักหนูและเลี้ยงหนูทดลอง

ขอขอบคุณ เจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตรที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่มีส่วนร่วมให้งานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

12. เอกสารอ้างอิง :

วิชาญ วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์ และ สมเกียรติ กล้าแข็ง. 2557. การผลิตและการเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของค็อคซิเดียนโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* เพื่อใช้เป็นหัวเชื้อในการผลิตสารชีวินทรีย์กำจัดหนู. รายงานผลการวิจัยปี 2557 เล่มที่ 1 สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร หน้า 656-671.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง. 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย, กรุงเทพฯ.

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

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

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539b. 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.

Bhat, T.K. and K.P. Jithendran. 1995. *Eimeria magna*: the effect of varying inoculums size on the course of infection in Angora rabbit. World Rabbit Science. 163-165.

Beaver, P.C. and J.R. Maleckar. 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* N, and *Sarcocystis zamani* N.: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. Journal of Parasitology. 67: 241-526.

Duszynski, D.W. and P.G. Wilber. 1997. A Guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. Journal of Parasitology. 83: 333-336.

Duszynski, O. and S.L. Gardner. 1990. Fixing coccidian oocyst is not an adequate solution to the problem of preserving protozoan type material. Journal of parasitology. 77: 52-57.

Elsheikha, H.M., A.J. Murphy and L.S. Mansfiled. 2004. Viability of *Sarcocystis neurona* sporocyst after long-term storage. Veterinary Parasitology. 123: 257-264.

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

Gardiner, C.H., R. Fayer and J.P. Dubey. 1985. An Atlas of Protozoan Parasites in Animal Tissues. Agriculture Handbook number 651. United States Department of Agriculture.

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

Hikosaka, K., N. Tsuji, Y. Watanabe, H. Kishine, T. Horii, I. Igarashi, K. Kita, K. Tanabe, N. Arisue, N.M. Palacpac, S. Kawazu and H. Sawai. 2010. Divergence of the mitochondrial genome structure in the apicomplexan parasites, *Babesia* and *Theileria*. Molecular Biology. 27: 1107–1116.

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.

Kan, S.P., 1979. Ultrastructure of the cyst wall of *Sarcocystis* spp. from some rodents in Malaysia. International Journal for Parasitology. 9: 475-480.

Lai, P.F., 1977. *Sarcocystis* in Malaysian field rats. The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health. 8: 417-419.

O' Donoghue, P.Z., CH.S. Watts and B.R. Dixon. 1987. Ultrastructure of *Sarcocystis* spp. (Protozoa: Apicomplexa) in rodents from North Sulawesi and West Java, Indonesia. Journal of Wildlife Disease. 23: 255-282.

Sheather, A.L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. Journal of Comparative Pathology, 36: 266-275.

Zaman, V. 1976. Host range of *Sarcocystis orientalis*. The Southeast Asian Journal of tropical Medicine and Public Health. 7: 112.

13. **ภาคผนวก** :

Table 1 The average percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* at different interval after maintained in the 4 treatments.

Treatments	% Viability of sporocysts after treatment					
	6 months	1 year	1 year 6 months	2 years	2 year 6 months	3 years
Sucrose + $K_2Cr_2O_7$	92.15 a	76.57 a	74.95 a	67.05 a	36.78 b	24.58 a
NaCl+ $K_2Cr_2O_7$	92.77 a	80.51 a	71.59 a	69.98 a	50.59 a	17.24 b
Drinking water+ $K_2Cr_2O_7$	92.68 a	60.22 b	59.94 b	44.68 b	25.15 c	12.78 c
Control	94.55 a	81.2 a	67.66 ab	40.68 b	22.15 c	14.12 bc
Means	93.04	74.63	68.53	55.6	33.67	17.18
CV (%)	3.1	9	6.5	5.9	9.3	12.6

[1/] Means of 3 replications; in column, means followed by a common letter are not significantly different at 5% level by DMRT (Duncan's multiple new rang test).

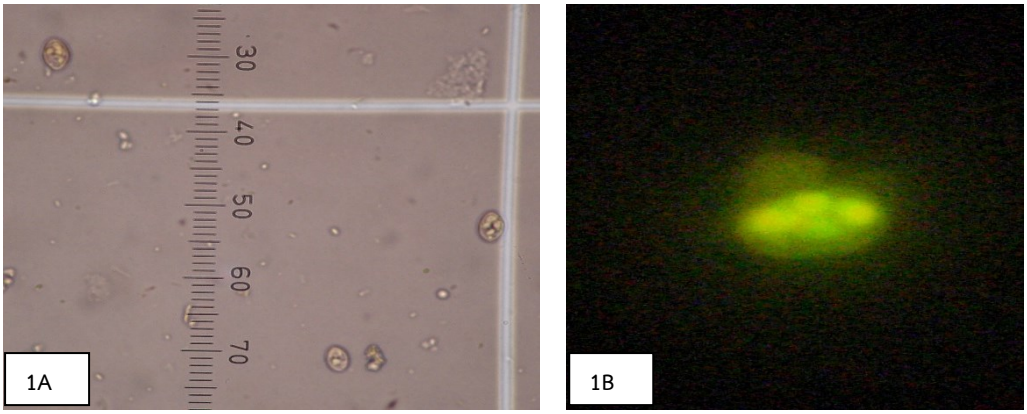

Figure 1 Sporocysts characterized of *S. singaporensis* at magnification 40X. (1A), oval shape and each sporocysts containing 4 sporozoites. (1B), the sporocyst stained with nucleic stain was used to differentiate between viable sporocysts (unstained) and death sporocysts (stained).

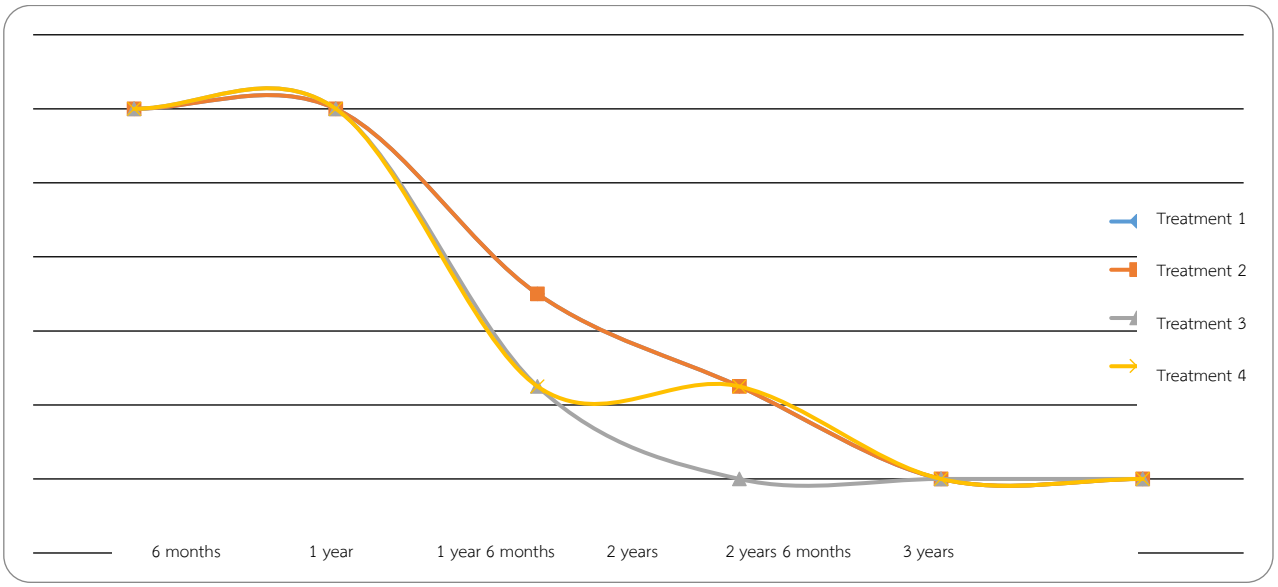

Figure 2 The graph showing percent mortality of rats from sporocysts suspension of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments at different interval.

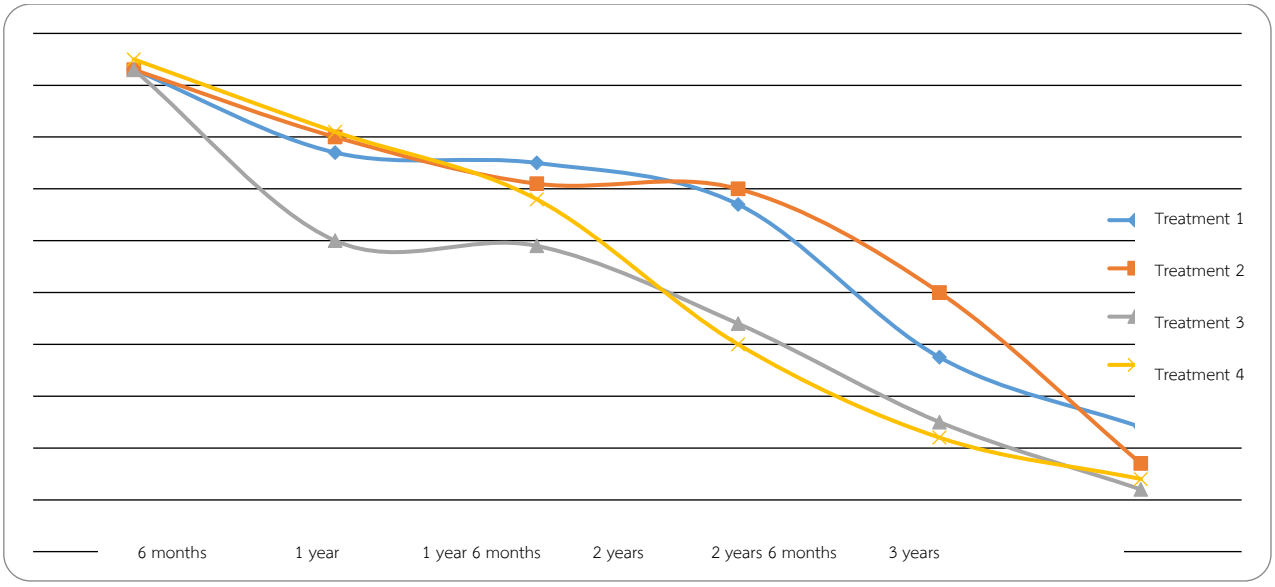

Figure 3 The graph showing percent viability of sporocysts of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments at different interval.