

การพัฒนาวิธีการเก็บรักษา สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *Sarcocystis singaporensis*
โดยใช้ potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) เพื่อยืดอายุการเก็บรักษา
สำหรับผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนู

Study and 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.

วิชาญ วรธนะไควล์ ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์

ปิยาณี หนูภาพ ทรงทัฬห แก้วดา

กลุ่มกัญและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

การเก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ของปรสิตโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ในการศึกษาครั้งนี้ ทำการเปรียบเทียบกรรมวิธีการเก็บรักษาเชื้อที่แตกต่างกัน 3 กรรมวิธี ได้แก่ การล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation/ Saturate NaCl solution และน้ำประปา เก็บรักษาลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 4-10 °C โดยเปรียบเทียบกับวิธีการล้างแบบปกติด้วยน้ำประปา ทำการทดลองหาศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อกับหนูทดลอง และเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อ ทุก 6 เดือน เป็นระยะเวลา 3 ปี พบว่าศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อกับหนูทดลอง ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อ 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี นั้น มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนูทดลองเท่ากับ 100%, 100%, 37.5% และ 18.75% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อ 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี นั้น อยู่ที่ 93.5%, 74.5%, 68.25% และ 55.25% ตามลำดับ

รหัสการทดลอง 03-05-59-02-01-00-16-59

คำนำ

หนูเป็นสัตว์ศัตรูพืชที่สร้างความเสียหายให้แก่พืชหลายชนิด เช่น ข้าว ข้าวโพด อ้อย ถั่วเหลือง และปาล์มน้ำมัน เป็นต้น ซึ่งนอกจากการทำลายผลิตผลทางการเกษตรแล้ว หนูยังเป็นแหล่งรังโรคที่สำคัญที่ถ่ายทอดสู่มนุษย์ และสัตว์เลี้ยงอีกด้วย เช่น กาฬโรค ซึ่งมีหมัดที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะ, Leptospirosis หรือโรคฉี่หนูที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียที่เรียกรวม Leptospira, โรค Spotted fever มีสาเหตุจาก Rickettsia bacteria โดยมีเห็บที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะ รวมไปถึงโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ ที่มีหนูเป็นพาหะนำโรค เป็นต้น (ยวลักษณ์ และคณะ, 2544)

การป้องกันกำจัดหนูโดยการใช้สารกำจัดหนู (rodenticide) ในปัจจุบันมีการใช้สารเคมีกำจัดหนู 2 ประเภท คือประเภทออกฤทธิ์เร็ว (acute rodenticide) และประเภทออกฤทธิ์ช้า (chronic rodenticide) ซึ่งทั้ง 2 ประเภท สามารถลดจำนวนหนูลงได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งการใช้สารกำจัดหนูออกฤทธิ์เร็วบ่อยครั้ง จะทำให้หนูเซ็ดขยายต่อสารพิษนั้น นอกจากนี้เนื่องจากสารเคมีที่ใช้กำจัดหนูเหล่านี้มีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมและมนุษย์ สารเคมีเหล่านี้ไม่ได้มีอันตรายเฉพาะหนูเท่านั้น แต่ยังรวมถึงสัตว์ชนิดอื่นและมนุษย์ที่ได้รับสารกำจัดหนูทั้งทางตรงและทางอ้อม ทำให้ได้รับอันตรายจากสารเคมีกำจัดหนูอาจร้ายแรงถึงขั้นเสียชีวิต ซึ่งส่งผลให้ระบบลูกโซ่อาหารในธรรมชาติ ส่งผลให้ห่วงโซ่อาหารนั้นเสียสมดุลในที่สุด

Sarcocystis singaporensis Zamen & Colley (1976) เป็นปรสิตโปรโตซัวที่มีความจำเพาะต่อสัตว์อาศัย 2 ชนิด คือ หนูและงูเหลือมพบแพร่ระบาดในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ขยายพันธุ์แบบอาศัยเพศในเซลล์บุผิวลำไส้ของงูเหลือม (*Python reticulatus*) และในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตมีการสร้างสปอร์โรซิสต์ (sporocysts) ซึ่งจะปะปนออกมาพร้อมมูลงูสู่สิ่งแวดล้อมภายนอก และเข้าสู่สัตว์อาศัยตัวกลางโดยการปนเปื้อนไปกับน้ำและอาหารของสัตว์อาศัยตัวกลางเหล่านั้น ซึ่งก็คือสกุลหนูท้องขาว (*Rattus* spp.) และในสกุลหนูพุก (*Bandicota* spp.) ซึ่งปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ขยายพันธุ์แบบไม่มีเพศในสัตว์อาศัยตัวกลางและในระยะสุดท้ายของการเจริญเติบโตจะมีการสร้าง ซาร์โคซิสต์ (sarcocysts) ซึ่งภายในมีแบรดิซอัยต์ (bradyzoites) บรรจุอยู่ ซึ่งฝังตามกล้ามเนื้อลำตัวหนู ในระยะนี้เป็นระยะที่พร้อมเข้าสู่สัตว์อาศัยสุดท้าย เมื่อหนูซึ่งเป็นสัตว์อาศัยตัวกลางถูกงูเหลือมกิน ปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ก็จะเริ่มวงจรชีวิตใหม่อีกครั้ง

กรมวิชาการเกษตรและองค์การความช่วยเหลือทางด้านวิชาการของสหพันธ์สาธารณรัฐเยอรมัน (GTZ) และบริษัทไบเออร์ จำกัด ได้ร่วมกันทำการวิจัยด้านต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับปรสิตโปรโตซัวชนิดนี้ ตั้งแต่ปี 2536 – 2545 จนมีการผลิตปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซิสต์เป็นสารชีววินทรีย์กำจัดหนู (bio-rodenticide) ที่มีการนำไปใช้ในภาคการเกษตรและตามโรงงานบ้านเรือนกันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันการใช้ปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซิสต์ ซึ่งเป็นระยะที่ทำให้หนูติดเชื้อ เพื่อผลิตเป็นเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูนั้น มีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อมเนื่องจากปรสิตโปรโตซัว ชนิดนี้มีความจำเพาะต่อหนูสกุลหนูท้องขาวและหนูพุกเท่านั้น

(ยกุลักษณ์ และคณะ 2539a, ยกุลักษณ์ และคณะ 2539b, ยกุลักษณ์ และคณะ 2540 และ Jakes และคณะ, 1996) การผลิตขยายปรสดีโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลาาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ โดยมากประมาณ 90% มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆพบปะปนอยู่ด้วย (Beaver and Maleckar, 1981, ยกุลักษณ์ และคณะ, 2541) ทำให้ได้เชื้อ โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองที่ไม่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้จากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และเชื้อ โปรโตซัวกำจัดหนูที่มีศักยภาพสูงขาดความสม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง ดังนั้นขั้นตอนการคัดแยกเชื้อจากมูลงูและวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์จึงมีความสำคัญ ทำให้สปอร์โรซีสต์ของเชื้อยังคงมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้ ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาครั้งนี้จึงต้องทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ให้มีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งยังคงความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองและสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลาาน เพื่อการผลิตเชื้อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสูง ในการกำจัดหนูอย่างสม่ำเสมอเป็นจำนวนมาก และเป็นการสนับสนุนลดการใช้สารเคมีเพื่อการเกษตรที่ยั่งยืนต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- สารเคมี; potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$), sucrose, sodium chloride (NaCl) และ สีย้อม nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit)
- สัตว์ทดลอง; หนูท้องขาวและงูเหลือม (มูลงูเหลือม)
- วัสดุและอุปกรณ์; กรงทดลอง, กรงดักหนู, กรงเลี้ยงหนู, ตะแกรงกรอง, เครื่องปั่นเหวี่ยง, หลอดปั่นขนาด 1.5, 15 และ 50 มิลลิลิตร, ตู้เย็น, petridish, เครื่องชั่งสาร, pipette, กรรไกรผ่าตัด, มีดผ่าตัด, ปากคีบ และกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูง (light microscope)

วิธีการ

1. การเตรียมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

ชั่งมูลงู 5 กรัม ละลายน้ำ 30 มิลลิลิตร นำไปกรองผ่านตะแกรงกรองละเอียด ปั่นสารแขวนลอยมูลงูที่ผ่านการกรองแล้วที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เทส่วนใสทิ้ง ทำการปั่นล้าง ประมาณ 2-3 รอบ จนกว่าสารส่วนใสด้านบนตะกอนจะใส

2. การล้างสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

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

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว ทำการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation (Sheather, 1923) โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

ที่ได้ผสมกับ สารละลาย Sheather's sucrose flotation (ซึ่ง sucrose 454 กรัมละลายในน้ำ 355 มิลลิลิตร) จากนั้นปั่นสารแขวนลอยด้วยความเร็วรอบ 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) โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้ผสมกับ สารละลาย Saturate NaCl solution (ซึ่ง NaCl 311 กรัมละลายในน้ำ 1 ลิตร) จากนั้นปั่นสารแขวนลอยด้วยความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

กรรมวิธีที่ 3 และ 4; วิธีการล้างแบบปกติ

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

3. การเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

นับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ให้มีจำนวนสปอร์โรซีสต์อยู่ 2×10^6 ซีสต์ นำส่วนใสของสารแขวนลอยผสมลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ในอัตราส่วน 1 ส่วนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ต่อ 5 ส่วนของ 2% $K_2Cr_2O_7$ (Duszynski, 1997) ลงใน petridish บ่มที่อุณหภูมิห้อง ($23^\circ C - 27^\circ C$) เป็นเวลา 7 วัน เก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$ (ยกเว้นในกรรมวิธีที่ 4 เก็บสารแขวนลอยที่ได้โดยไม่ผสมลงในสารละลาย 2% $K_2Cr_2O_7$)

4. ทดสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์และเปอร์เซ็นต์การตายของหนูกทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี กรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation (Sheather, 1923) ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$

กรรมวิธีที่ 2 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยวิธี Saturate NaCl solution (Bhat and Jithendran, 1995) ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$

กรรมวิธีที่ 3 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา ลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$

ทำการทดลองโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูงมาทำการทดลอง โดยเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation/ Saturate NaCl solution/ น้ำประปา ในหลอดทดลองจำนวน 6 หลอดทดลอง/วิธีการล้าง ซึ่งในแต่ละหลอดทดลองมีสปอร์โรซีสต์อยู่ 2×10^6 ซีสต์ เก็บรักษาลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ $4-10^\circ C$ โดยเปรียบเทียบกับวิธีการ

ล้างด้วยน้ำประปาทดสอบศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ ด้วยวิธี bioassay โดยการให้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ทางปากกับหนูท้องขาว ช้ำละ 4 ตัว นับเปอร์เซ็นต์การตายของหนูทดลองในแต่ละกรรมวิธี และตรวจสอบการมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ โดยการใช้สีย้อม nucleic acid (QIAGEN, Live/Dead backlight viability kit) นับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์ในแต่ละกรรมวิธี และสังเกตการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ชนิดอื่นในสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C ทดสอบทุก 6 เดือน เป็นระยะเวลา 3 ปี วิเคราะห์ข้อมูลในแต่ละกรรมวิธีโดยวิธีทางสถิติที่เหมาะสม และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยในกรรมวิธีต่างๆ

เวลา และสถานที่

ทดลองและเก็บรวบรวมข้อมูลระหว่างเดือนตุลาคม 2558 - กันยายน 2560 ภายในกลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลการทดลองพบว่า การทดลองหาศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อกับหนูทดลองที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อ 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี นั้น มีค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การตายของหนูทดลองเท่ากับ 100%, 100%, 37.5% และ 18.75% ตามลำดับ ในขณะที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อ ที่ระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อ 6 เดือน, 1 ปี, 1 ปี 6 เดือน และ 2 ปี นั้น อยู่ที่ 93.5%, 74.5%, 68.25% และ 55.25% ตามลำดับ

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

จากผลการทดลองหาศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อ *S. singaporensis* กับหนูทดลอง พบว่าศักยภาพความรุนแรงในการก่อโรคของเชื้อนั้นลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเชื้อ ที่มีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

การทดลองของงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยกันปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

- ยวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539a. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูพุกใหญ่. รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 255-256.
- ยวลักษณ์ ขอประเสริฐ วิยะดา สีหะบุตร เสริมศักดิ์ หงส์นาค และกรแก้ว เสือสะอาด. 2539b. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนอร์เวย์. รายงานผลการวิจัย ปี 2539. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 257.
- ยวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด กรแก้ว เสือสะอาด เสริมศักดิ์ หงส์นาค และทรงทัฬห แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.
- ยวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูภาพ และทรงทัฬห แก้วตา. 2541. การศึกษาโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในหนูพุกศัตรูพืช. รายงานผลการวิจัย ปี 2541. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 102-103.
- ยวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูภาพ และพวงทอง บุญทรง, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.
- Bhat, T.K. and K.P. Jithendran. 1995. *Eimeria magna*: the effect of varying inoculum size on the course of infection in Angora rabbit. World Rabbit Science. 3163-165.
- Beaver, P.C., and J.R. Maleckar, 1981. *Sarcocystis singaporensis* Zaman & Colley (1975) 1976. *Sarcocystis villivillosi* sp.p, and *Sarcocystis zamani* sp.n.: Development, morphology and persistence in the laboratory rat, *Rattus norvegicus*. Journal of Parasitology, 67: 241-256.
- Duszynski, O. and P.O. Wilber. 1997. A Guideline for the preparation of species descriptions in the Eimeriidae. Journal of parasitology. 83: 333-336.
- 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.
- Sheather, A.L. 1923. The detection of intestinal protozoa and mange parasites by a flotation technique. Journal of Comparative Pathology, 36: 266-275.

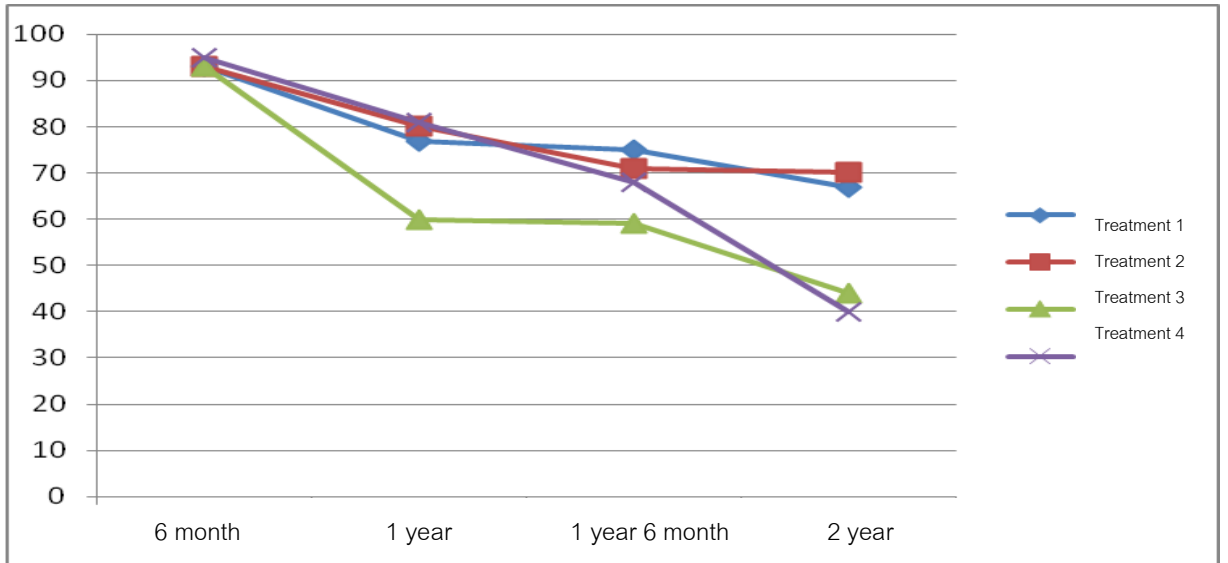


Figure 1 The graph showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments in this study.

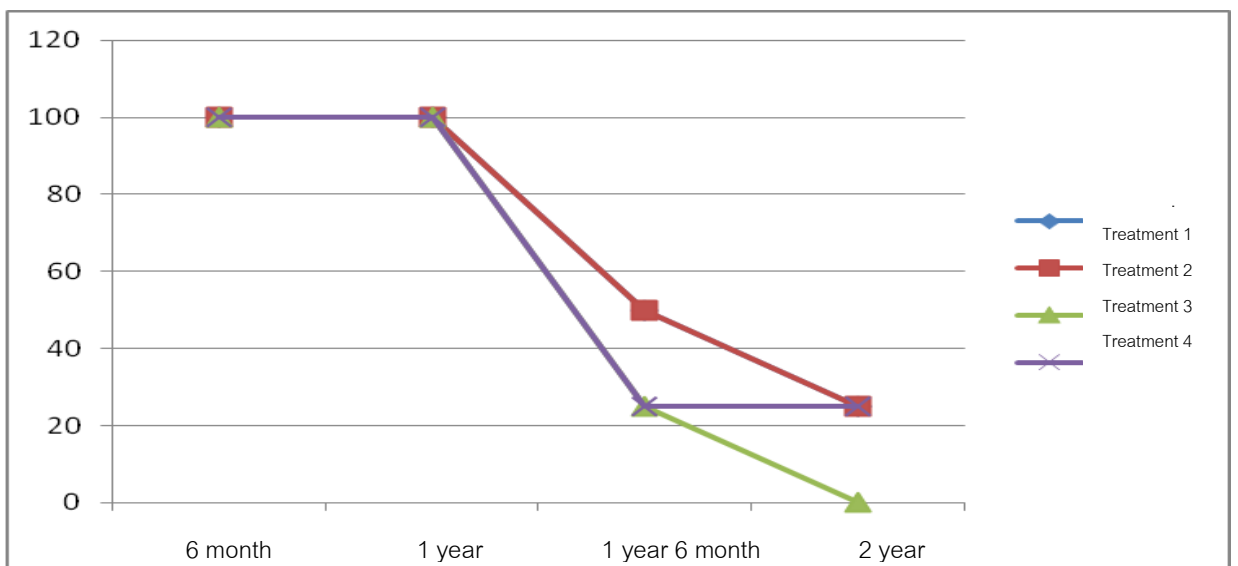


Figure 2 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments in this study.

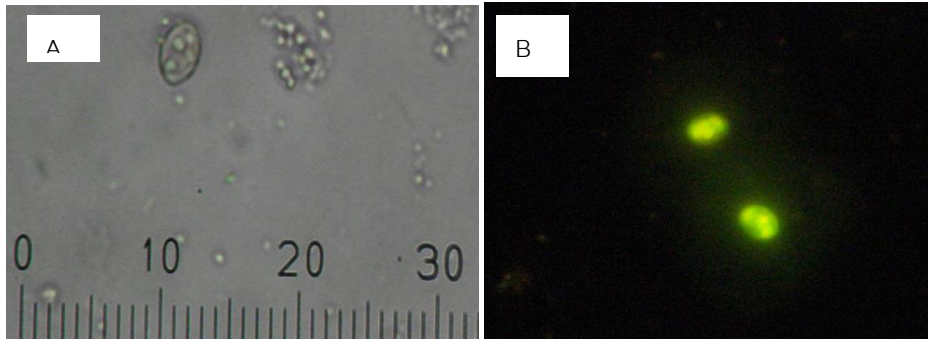


Figure 1 Sporocyst characterized of *S. singaporensis* at magnification 40x and figure (1A). The sporocyst of *S. singaporensis* stain with nucleic stain at magnification 40x was used to differentiate between unstained sporocysts; viable and stained; death (1B).