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 วรรธนะไกวัล ปราสาททอง พรหมเกิด ดาราพร รินทะรักษ์
ปิยาณี หนูกาฬ ทรงทัพ แก้วตา
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา 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 และเปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อ 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 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อ 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 หรือโรคฉี่หนูที่มีสาเหตุจากแบคทีเรียกลุ่ม *Leptospira*, โรค Spotted fever มีสาเหตุจาก *Rickettsia* bacteria โดยมีไรที่อาศัยอยู่บนตัวหนูเป็นพาหะ รวมไปถึงโรคที่เกี่ยวกับระบบทางเดินอาหารต่างๆ ที่มีหนูเป็นพาหะนำโรค เป็นต้น (ยุวลักษณ์ และคณะ, 2544)

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

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

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

(ยุวลักษณ์ และคณะ 2539a, ยุวลักษณ์ และคณะ 2539b, ยุวลักษณ์ และคณะ 2540 และ Jakel และคณะ, 1996) การผลิตขยายปรสิตโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ ในงูเหลือมติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน ทำให้เชื้อโปรโตซัวที่ได้อ่อนแอลง นอกจากนี้ยังพบว่าหนูติดเชื้อโปรโตซัวจากธรรมชาติ โดยมากประมาณ 90% มีโปรโตซัวชนิดอื่นๆพบปะปนอยู่ด้วย (Beaver and Maleckar, 1981, ยุวลักษณ์ และคณะ, 2541) ทำให้ได้เชื้อ โปรโตซัว *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองที่ไม่เท่ากัน จึงจำเป็นต้องมีการดักหนูติดเชื้อโปรโตซัวชนิดนี้จากธรรมชาติมาให้งูเหลือมกินเป็นอาหาร เพื่อเพิ่มศักยภาพของสปอร์โรซีสต์ในการทำให้เกิดโรคที่รุนแรงต่อหนู ซึ่งทำให้กระบวนการผลิตสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์และเหยื่อ โปรโตซัวกำจัดหนูที่มีศักยภาพสูงขาดความสม่ำเสมอ ไม่ต่อเนื่อง ดังนั้นขั้นตอนการคัดแยกเชื้อจากมูลงูและวิธีการเก็บรักษาสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์จึงมีความสำคัญ ทำให้สปอร์โรซีสต์ของเชื้อยังคงมีชีวิตและมีประสิทธิภาพในการทำให้หนูติดเชื้อป่วยและตายได้ ด้วยเหตุนี้เองการศึกษาครั้งนี้จึงต้องทราบเทคนิคและวิธีการเก็บรักษาโปรโตซัว *S. singaporensis* ระยะสปอร์โรซีสต์ให้มีความบริสุทธิ์สูง อีกทั้งยังคงความรุนแรงในการก่อโรคกับหนูทดลองและสามารถมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลานาน เพื่อการผลิตเหยื่อโปรโตซัวกำจัดหนูสำเร็จรูปที่มีประสิทธิภาพสูง 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) 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) โดยผสมสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้ผสมกับ สารละลาย Saturate NaCl solution (ซึ่ง NaCl 311 กรัมละลายในน้ำ 1 ลิตร) จากนั้นปั่นสารแขวนลอยที่ความเร็วรอบ 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

กรรมวิธีที่ 3 และ 4; วิธีการล้างแบบปกติ

นำสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่ผ่านการปั่นล้างแล้ว เก็บส่วนใสด้านบนของสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่ได้

3. การเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์

นับจำนวนสปอร์โรซีสต์ที่ได้ ให้มีจำนวนสปอร์โรซีสต์อยู่ $2x10^6$ 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°C – 27°C) เป็นเวลา 7 วัน เก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ที่อุณหภูมิ 4-10°C (ยกเว้นในกรรมวิธีที่ 4 เก็บสารแขวนลอยที่ได้โดยไม่ผสมลงในสารละลาย 2% $K_2Cr_2O_7$)

4. ทดสอบเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของสปอร์โรซีสต์และเปอร์เซ็นต์การตายของหนูทดลอง

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 °C

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

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

กรรมวิธีที่ 4 เก็บรักษาสปอร์โรซีสต์ที่ผ่านการล้างด้วยน้ำประปา ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

ทำการทดลองโดยใช้สารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ของ *S. singaporensis* ที่มีความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนูสูงมาทำการทดลอง โดยเก็บสารแขวนลอยสปอร์โรซีสต์ ที่ได้จากการล้างด้วยวิธี Sheather's sucrose flotation/ Saturate NaCl solution/ น้ำประปา ในหลอดทดลองจำนวน 6 หลอดทดลอง/วิธีการล้าง ซึ่งในแต่ละหลอดทดลองมีสปอร์โรซีสต์อยู่ $2x10^6$ ซีสต์ เก็บรักษาลงในสารละลาย 2% potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) ที่อุณหภูมิ 4-10 °C โดยเปรียบเทียบกับวิธีการ

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

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 ในขณะที่ค่าเฉลี่ยเปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อ 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 เช่นเดียวกับเปอร์เซนต์การมีชีวิตของเชื้อ ทีมีค่าเฉลี่ยของเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตลดลงตามระยะเวลาการเก็บรักษาที่เพิ่มขึ้น

การทดลองของงานวิจัยนี้ยังไม่สิ้นสุด ยังต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไป

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร ที่เกี่ยวข้องทุกท่าน ที่ช่วยกันปฏิบัติงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

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 และ ทรงทัพ แก้วตา. 2540. ผลของโปรโตซัว *Sarcocystis singaporensis* ต่อหนูนาใหญ่. รายงายผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพมหานคร หน้า 10-16.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ ปราสาททอง พรหมเกิด เสริมศักดิ์ หงส์นาค ปิยาณี หนูกาฬ และ ทรงทัพ แก้วตา. 2541. การศึกษาโปรโตซัวที่เป็นปรสิตในหนูพุกศัตรูพืช. รายงายผลการวิจัย ปี 2541. กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร หน้า 102-103.

ยุวลักษณ์ ขอประเสริฐ เสริมศักดิ์ หงส์นาค กรแก้ว เสือสะอาด เกรียงศักดิ์ หามะฤทธิ์ ปิยาณี หนูกาฬ และพวงทอง บุญทรง, 2544. หนูและการป้องกันกำจัด. กลุ่มงานสัตววิทยาการเกษตร กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทย 136 หน้า.

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. 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.

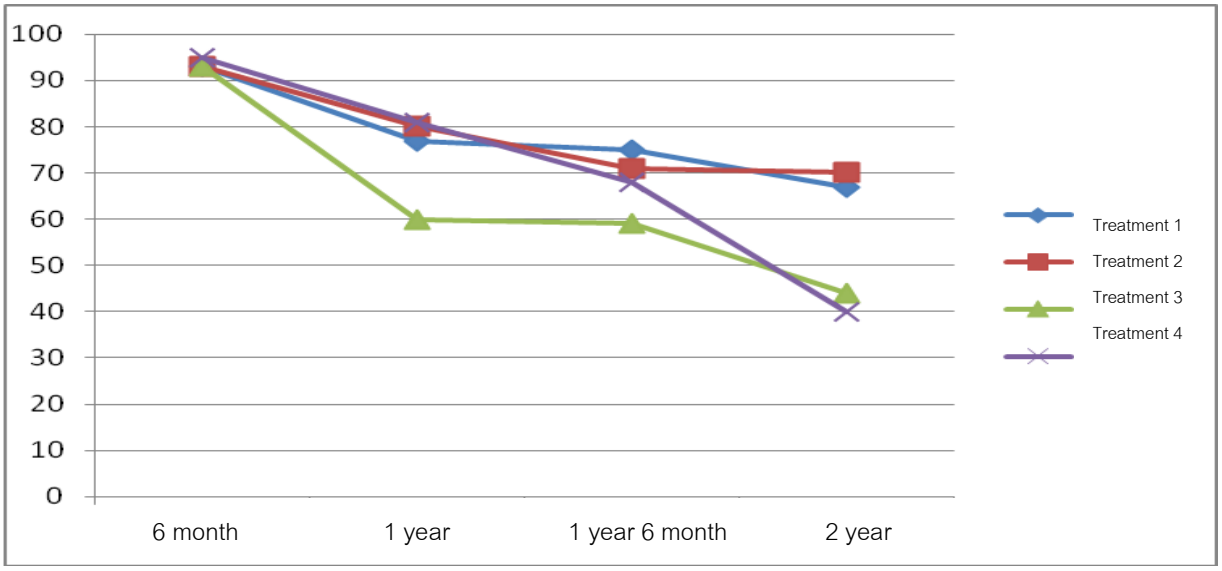

Figure 1 The graph showing the percentage of viable sporocysts of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments in this study.

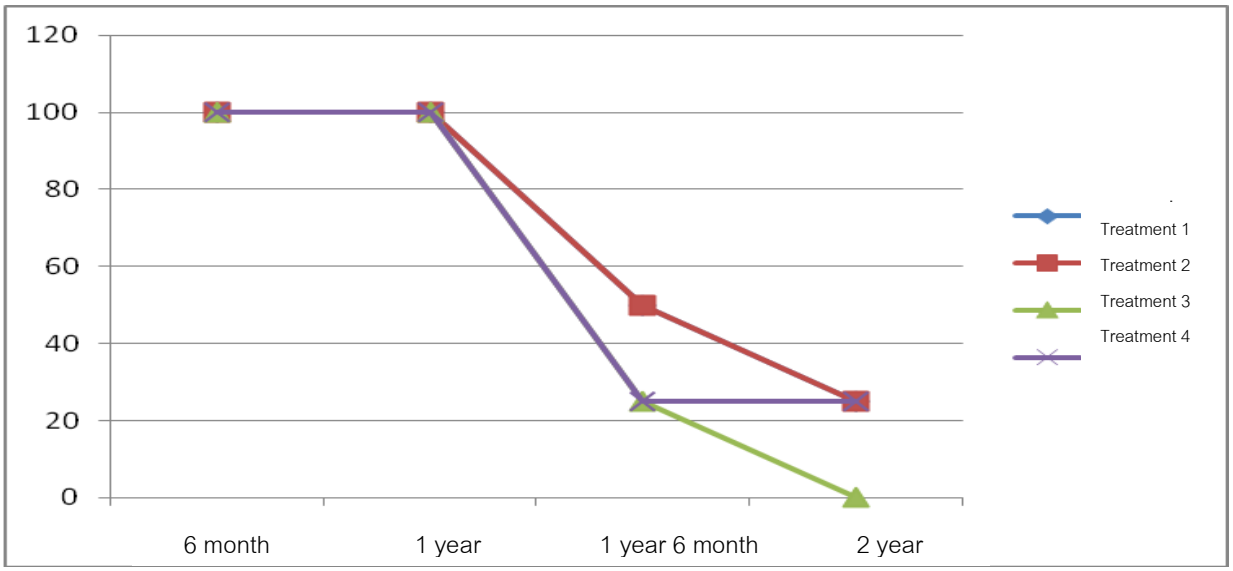

Figure 2 The graph showing the mortality rates of rats from sporocyst suspension of *S. singaporensis* maintained in 4 treatments in this study.

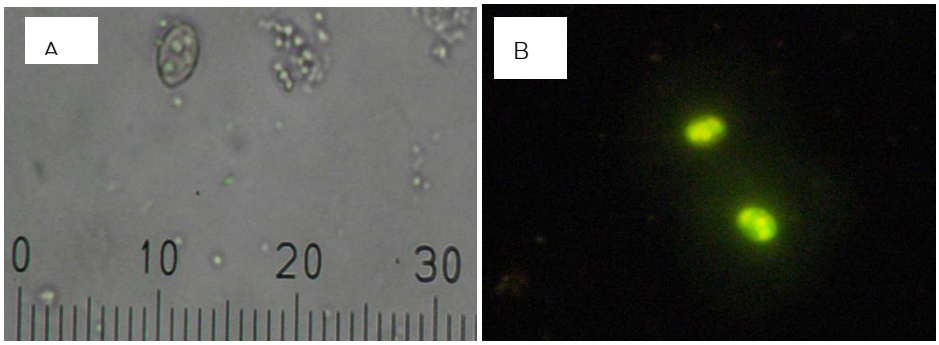

Figure 1 Sporocyst characterized of *S. singaporensis* at magnification 40x and figure (1A). The sporocyst of *S. singaporensis* stain with nucleic stain at magnification 40x was used to differentiate between unstained sporocysts; viable and stained; death (1B).