



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

การพัฒนาไส้เดือนฝอย

Heterorhabditis sp. สายพันธุ์ไทย

เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

โดย

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ สมคิด ติสกาพร

กรกฎาคม พ.ศ. 2545

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ
การพัฒนาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย
เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช

คณะผู้วิจัย

1. ดร. บุณยฤทธิ์ ตั้งจิตสุมิต หอพักโครงการ
2. ดร. สมคิด ติสทาพร นักวิจัยที่ปรึกษา

หน่วยงานสังกัด กรมวิชาการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

วันที่	2 ส.ย. 2546
เลขทะเบียน	REL 00004
	PPF
เลขเรียกค้น	42
	6845

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)
ชั้น 14 อาคาร เอส เอ็ม ทาวเวอร์
เลขที่ 979/17-21 ถนนพหลโยธิน แขวงสามเสนใน
เขตปทุมธานี กรุงเทพฯ 10400
โทร 298-0455 โทรสาร 298-0476

Home page : <http://www.trf.or.th>
E-mail : trf-info@trf.or.th



สัญญาเลขที่ \ PDF/48/2542

โครงการ การพัฒนาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช
คณะผู้วิจัย นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด (หัวหน้าโครงการ) และ สมคิด ดิษฐาพร (นักวิจัยที่ปรึกษา)
หน่วยงาน กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900

บทคัดย่อ

การศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยภายในตัวหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ณ อุณหภูมิห้อง ($26 \pm 2^{\circ}\text{C}$) เริ่มจากตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective juvenile, IJ หรือ J3) เข้าสู่ตัวหนอน มีการเจริญเติบโตจาก J3 ลอกคราบเป็น J4 และพัฒนาเป็นตัวเมียชนิด hermaphroditic female (1^{st} generation) ให้ลูกเป็น J1 J2 และ J3 ตามลำดับ ใช้เวลา 6 วัน และ J3 จากแม่รุ่นที่ 1 นี้ เจริญเติบโตเป็น J4 พัฒนาเป็นตัวเมียชนิด amphimictic female (2^{nd} generation) ผสมพันธุ์กับตัวผู้ ให้ลูกเป็น J1 J2 และ J3 ตามลำดับ ใช้เวลาต่ออีก 4 วัน จากนั้น J3 ปรับสภาพเป็น IJ รวมเวลาการขยายพันธุ์ภายในตัวหนอน 2 ชั่วโมง เท่ากับ 10 วัน หลังจากนั้น IJ พะยอยเคลื่อนที่ออกจากซากของหนอนทดสอบ นับจำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 213,300 ตัวต่อหนอน 1 ตัว จากการศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยภายในตัวหนอนกินรังผึ้ง อยู่ระหว่าง $25-30^{\circ}\text{C}$ สามารถให้ลูกได้ปริมาณสูง และจากการแยกแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย (symbiotic bacteria) จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลาย 48 ชม. บนอาหาร NBTA สามารถแยกได้ symbiotic bacteria ที่มีการดูลี BTB และมีรูปร่างลักษณะของโคโลนีจัดอยู่ในสกุล *Photorhabdus* sp. จากการศึกษาความสามารถของไส้เดือนฝอยในการเคลื่อนที่เข้าสู่ช่องเปิดตามธรรมชาติของตัวหนอนและความรุนแรงในการทำให้หนอนเกิดโรคและตายในอัตราไส้เดือนฝอย 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สามารถทำให้หนอนตายได้ 33 67 80 และ 93 % ตามลำดับในเวลา 48 ชม. หลังใส่ไส้เดือนฝอย และมีความทนทานต่ออุณหภูมิในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งเมื่อวางที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C สามารถฆ่าหนอนได้สูงที่สุด 88 และ 98 % ที่เวลา 48 ชม. นอกจากนี้ ไส้เดือนฝอยมีศักยภาพในการฆ่าแมลงทั้งระยะตัวหนอนและตัวเต็มวัย ทดสอบกับแมลงรวม 15 ชนิด คือ หนอนบึ้งชมพู หนอนเยื่อไผ่ หนอนกินรังผึ้ง หนอนเจาะผลมะเขือ หนอนเจาะฝักถั่ว หนอนเจาะยอดกะหล่ำ หนอนกระทู้หอม หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนต้นรัก หนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง หนอนนก แมลงกะซอน และแมลงสาบ มีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 67 80 100 88 71 89 89 88 100 67 55 50 และ 30 % ที่เวลา 48 ชม. หลังใส่ไส้เดือนฝอย และทดสอบกับแมลงขนาดเล็ก ได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล และเพลี้ยจักจั่นสีเขียว สามารถฆ่าได้ 19 และ 11 % ตามลำดับ เมื่อตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายที่เวลาเดียวกันหลังใส่ไส้เดือนฝอย จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบโปรตีนจากสัตว์ 60 % ผสมไขมันจากสัตว์ (น้ำมันหมู) 20 % และน้ำ 20 % ให้ผลผลิตเท่ากับ 349 293 205 และ 182 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ของสูตรโปรตีนจากโตมู ไช้ไก่ เนื้อปลา และอาหารสุนัขสำเร็จรูป (รสตับ) ตามลำดับ และการใช้สูตรอาหารโปรตีนจากพืช (นมถั่วเหลือง 90 %) ผสมน้ำมันหมู 10 % ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 191 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยง 15 วันเท่ากัน

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง สายพันธุ์ไทย *Heterorhabditis* sp. ชีววิทยา การเกิดโรค การเพาะเลี้ยง

PROJECT NO. PDF/48/2542

TITLE Development of a Thai Strain of *Heterorhabditis* sp. for Insect Pest Control

AUTHORS Nuchanart Tangchitsomkid (Researcher) and Somkid Disthaporn (Mentor)

ADDRESS Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture,
Chatuchak, Bangkok 10900 THAILAND

ABSTRACT

The life cycle sequence of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain within the larva of wax moth (*Galleria mellonella*) at room temperature ($26 \pm 2^\circ\text{C}$) started from the infective juveniles (IJ or J3) entering the host insect. They were then molted into J4 and developed further to be the hermaphroditic females. The first generation hermaphroditic female produced J1, J2 and J3 successively within six days and the J3 molted into J4 which later developed to be the second generation amphimictic female. The amphimictic female mated with the male and produced J1, J2 and J3 successively within another four days. The J3s were later developed to be the IJs. Two generations of the nematode were reproduced within the host insect larva for totally ten days. Afterwards, the IJs were gradually moved out of the host insect cadaver and their average number per one insect was 213,300. The optimum temperature for high growth and reproductive rates of the nematode within the wax moth larva was between $25\text{--}30^\circ\text{C}$. A symbiotic bacterium was isolated on the NBTA medium from the haemolymph of the 48 hours infected larva. It was identified as *Photobacterium* sp. on the basis of its absorption to bromthymol blue and its colony characterization. The nematode entered the host insect larva's body through its natural openings and 4, 6, 8, and 10 nematodes per larva killed the insect at the rates of 33, 67, 80, and 93%, respectively, at 48 hours after inoculation. It killed the insect up to 88% and 98% at 25°C , and 30°C , respectively. It could potentially kill both larva and adult of the insect pest. It killed 15 tested insect pests including *Trabala vishnou*, *Omphisa fuscidentalis*, *Galleria mellonella*, *Leucinodes orbonalis*, *Maruca testulalis*, *Hellula undalis*, *Spodoptera exigua*, *Heliothis armigera*, *Danaus genutia*, *Cossus* sp., *Tenebrio molitor*, *Gryllotalpa africana* and *Periplaneta americana* at the rates of 67, 80, 100, 88, 71, 88, 88, 87, 100, 67, 55, 50, and 30%, respectively. It also killed small insects such as *Nilaparvata lugens* and *Nephotettix virescens* at the rates of 19, and 11%, respectively at 48 hours after inoculation. The nematode was multiplied in semi-solid monoxenic culture media containing 60% animal protein, 20% lard, and 20% water. The yields of 349, 293, 205 and 182 million nematodes per one litre of medium were obtained from the media containing protein, pigs kidney, chicken egg, tuna fish meat, and canned dog's food (kidney flavor), respectively. The medium containing plant protein (90% soybean milk) and 10% lard, yielded 191 million nematodes per one litre of the medium within 15 days.

key words : entomopathogenic nematode, Thai strain, *Heterorhabditis* sp., biology, pathogenicity, mass rearing.

หน้าสรุปโครงการ

ชื่อโครงการ	การพัฒนาไส้เดือนฝอย <i>Heterorhabditis</i> sp. สายพันธุ์ไทยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืช
คณะผู้วิจัย	นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด (หัวหน้าโครงการ) และ สมคิด ดิสถาพร (นักวิจัยที่ปรึกษา)
หน่วยงาน	กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
สาขาวิชาที่ทำการวิจัย	เกษตรศาสตร์และชีววิทยา
งบประมาณ	400,000 บาท
ระยะเวลาดำเนินงาน	2 ปี (เริ่ม 1 กรกฎาคม 2543 สิ้นสุด 30 มิถุนายน 2545)

ความสำคัญและปัญหา

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (entomopathogenic nematode) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ Steinemematidae และ Heterorhabditidae จัดเป็น bio-pesticide อีกพวกหนึ่งที่มีความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากไส้เดือนฝอยมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงตายภายในเวลารวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียม และได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในหลายประเทศแถบยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น จีน และออสเตรเลีย

ในประเทศไทย ได้มีการสำรวจและค้นพบไส้เดือนฝอย heterorhabditid (*Heterorhabditis* spp.) เป็นครั้งแรกในปี 2540 ซึ่งแยกได้จากดินในเขตพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด จัดเป็นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย อีกสกุลหนึ่งและเป็น indigenous strain ที่น่าสนใจน่าพัฒนาใช้ประโยชน์ ซึ่งต้องทำการศึกษาวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์ใหม่ ตั้งแต่องานวิจัยพื้นฐานทางด้านชีววิทยา การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณ และศักยภาพของสายพันธุ์ในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญ ข้อมูลของงานวิจัยที่ได้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ต่อการพัฒนางานวิจัย ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ที่พบในประเทศ ตลอดจนความก้าวหน้าของงานทางด้านการนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติขึ้นมาใช้ประโยชน์ ทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาเลือกใช้จุลินทรีย์กับแมลงศัตรูเป้าหมายอย่างเหมาะสม ตลอดจนข้อมูลของงานวิจัยขั้นพื้นฐานที่ได้จะส่งผลถึงงานวิจัยขั้นประยุกต์และพัฒนาสายพันธุ์ไทยให้เป็น bio-pesticide อีกชนิดหนึ่งต่อไป

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาชีววิทยา ศักยภาพในการฆ่าแมลงศัตรูสำคัญ และการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย เพื่อการนำไปใช้เป็น bio-pesticide

วิธีดำเนินงาน

การศึกษาวิจัย ชีววิทยา จีโนมของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในตัวแมลงอาศัย โดยบันทึกระยะ การเจริญเติบโตทุก 24 ชม. ศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยภายในตัวแมลง และทำการแยก symbiotic bacteria จากน้ำเลือดของแมลงที่ถูกไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเข้าทำลายและแบ่งแยกแบคทีเรีย โดยศึกษารูปร่างลักษณะของโคโลนีและการดูสี BTB จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

การศึกษาศักยภาพ ทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการฆ่าแมลงในอัตราไส้เดือนฝอย ตั้งแต่ 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอน 1 ตัว ภายในเวลา 48 ชม. ทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิระดับต่างๆ ในการฆ่าแมลง และทดสอบศักยภาพในการฆ่าแมลงศัตรูสำคัญในอันดับ Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Homoptera และ Blattodea โดยตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงหลังใส่ไส้เดือนฝอยเป็นเวลา 24 และ 48 ชม. ในระดับห้องปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงในอาหารเทียม ศึกษาสูตรอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลวที่เหมาะสมในการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย

ผลงานวิจัยที่ได้รับ

1. ได้องค์ความรู้ใหม่ทางด้านชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ซึ่งประกอบด้วยผลงานวิจัยเรื่อง การเจริญเติบโตของระยะตัวอ่อนและลักษณะการขยายพันธุ์ของตัวเต็มวัยภายในตัวแมลงครบวงจรชีวิต ตั้งแต่เริ่มเข้าทำลายจนถึงออกจากตัวแมลงรวม 10-11 วัน ที่อุณหภูมิ 25-30 °ซ ซึ่งเป็นสภาพที่เหมาะสมต่อการเข้าทำลายและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย และสามารถแยกได้ symbiotic bacteria ที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยบนอาหารสังเคราะห์ (NBTA medium) เป็นแบคทีเรียในสกุล *Photorhabdus* sp.

2. ได้องค์ความรู้ทางด้านศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ซึ่งมีความสามารถในการค้นหาช่องเปิดตามธรรมชาติของแมลงและมีความรุนแรงในการฆ่าแมลงตายสูงสุด 93 % ในอัตราไส้เดือนฝอย 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว ภายในเวลา 48 ชม. มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญได้หลายชนิดโดยเฉพาะในกลุ่มหนอนผีเสื้อตาย 67-100 % ในเวลา 48 ชม. และสามารถเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวราคาถูก มีส่วนผสมของสูตรอาหารที่ประกอบด้วยแหล่งอาหารโปรตีน 60% ไขมันสัตว์ 20 % และน้ำ 20 % ใช้เวลาเพาะเลี้ยง 15 วัน ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเท่ากับ 182-349 ล้านตัวต่ออาหาร 1 ลิตร

3. ผลงานวิจัยที่ได้รับ สามารถส่งตีพิมพ์ในวารสารระดับนานาชาติจำนวน 2 เรื่อง คือ

3.1 Tangchitsomkid, N. and S. Disthaporn. 2002. Life cycle of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp., isolated from Thailand. **Journal of ISSAAS**

3.2 Tangchitsomkid, N. and S. Disthaporn. 2002. Mass rearing in semi-solid culture of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. Thai isolate. **Kasetsart Journal**

4. ความรู้พื้นฐานทางด้านชีววิทยาของไส้เดือนฝอย เป็นข้อมูลที่มีความสำคัญต่อการพิจารณาตัดสินใจนำไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ไปพัฒนาขยายผลสู่ภาคเกษตรและอุตสาหกรรม ซึ่งจากผลงานวิจัยดังกล่าว ได้นำไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไปขยายผลต่อเนื่องในโครงการ “การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร” โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากฝ่ายเกษตร สกว. ในปี 2544-2547

5. ผลงานวิจัยของโครงการฯ เกิดประโยชน์ต่อการพัฒนางานไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงของประเทศไทยทั้งในแง่ของความรู้ทางวิชาการและการนำไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อภาคการเกษตร ซึ่งในอนาคตมีแนวโน้มสูงในการนำไปขยายผลต่อในภาคอุตสาหกรรม ให้สามารถผลิตจำหน่ายเป็นการค้าในอนาคต

EXECUTIVE SUMMARY

TITLE	Development of a Thai Strain of <i>Heterorhabditis</i> sp. for Insect Pest Control
AUTHORS	Nuchanart Tangchitsomkid (Researcher) and Somkid Disthaporn (Mentor)
ADDRESS	Plant Pathology & Microbiology Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok, 10900, THAILAND
STUDY FIELD	Agriculture and Biology
BUDGET	400,000 baht
DURATION	2 years (July 1, 2000 – June 30, 2002)

PROBLEM STATEMENT AND IMPORTANCE

Entomopathogenic nematodes including those in the families Steinernematidae and Heterorhabditidae are bio-pesticides which have been proved to be potential control agents of many insect pests. They are interested in many countries of the world because they cause relatively rapid death of the insect hosts and they have wide host range of more than 200 species, but do not adversely affect mammals or plants. Besides, they are environmentally safe as registered by the United States Environmental Protection Agency (EPA), and they can be cultured on a large scale in artificial media. A number of commercial enterprises worldwide are now producing entomopathogenic nematodes in many European countries, the United States, Canada, Japan, China and Australia.

Heterorhabditid (*Heterorhabditis* sp.) was first found in Thailand from a survey in 1997. It was isolated from the soil collected at Roi Et Province, northeastern Thailand. It is another indigenous strain of entomopathogenic nematode which should be developed for practical use in the country. Research on the development of this new entomopathogenic nematode strain needs to start from its biological characterization, mass production, and insect pests control potential. The information to be obtained from this research will provide the new knowledge or guideline for further research and development of the other newly found indigenous entomopathogenic nematode strains. This information will also reveal the progressiveness of utilization of naturally existing microorganisms to replace or reduce the use of chemicals for insect pests control. It will also offer more options of microorganisms to be chosen to properly control the targetted pests. Furthermore, the information can be applied in developing any Thai strains of entomopathogenic nematode to become effective bio-pesticides in the future.

OBJECTIVES

To study on biological characters of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain and to mass produce the nematode in semi-solid culture media for use as a bio-pesticide.

METHODOLOGY

Biological Characterization : Study on the life cycle of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain within its host insect was conducted and its growth development was recorded at 24-hour intervals. The effect of temperature on the nematode's growth was also studied, a symbiotic bacterium was isolated from the haemolymph of the infected insect and identified on the basis of its colony characterization and its absorption of BTB from the culture medium.

Insect Pest Control Potential : Studies on the ability and aggressiveness of the *Heterorhabditis* sp. -Thai strain in killing the pest insects within 48 hours were conducted by using 4, 6, 8, and 10 nematodes per one insect larva. The tests also included its tolerance to different levels of the temperature in killing the insects and its potential to control the destructive pests in the order Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Homoptera and Blattodea. Mortality percentages of the insects were examined in the laboratory at 24 and 48 hours after inoculation with the nematode.

Mass Rearing in Artificial Media : Different semi-solid medium formulae were tested for the high-yielding of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain.

OUTPUTS

1. New knowledge on biological characteristics of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain including growth development of the larval stages and reproduction of the adult stages to complete its life cycle within the host insect. It took 10-11 days at 25-30°C for the nematode to enter the host insect and come out as infective juveniles which are ready to attack the host insect again. A symbiotic bacterium identified as *Photorhabdus* sp. was isolated.

2. The new knowledge on insect pest control potential of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain was obtained. The nematode was able to seek for the natural openings of the insect and its aggressiveness in killing the insect was up to 93% within 48 hours when using 10 nematodes per one insect. It could potentially control many important insect pest species, especially those in the order Lepidoptera which could be killed at a range of 67-100 % within 48 hours. This nematode could be mass-reared in the cheap semi-solid culture media containing 60% protein, 20% animal fat, and 20 % water. The nematode yields of 182-349 million nematodes per one litre of medium was obtained within 15 days.

3. The research results are to be published in the following international journals as follows :

3.1 Tangchitsomkid, N. and S. Disthaporn. 2002. Life cycle of entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp., isolated from Thailand. **Journal of ISSAAS**

3.2 Tangchitsomkid, N. and S. Disthaporn. 2002. Mass rearing in semi-solid culture of an entomopathogenic nematode, *Heterorhabditis* sp. Thai isolate. **Kasetsart Journal**

4. The basic knowledge on biological characteristics of *Heterorhabditis* sp. -Thai strain was crucial for the consideration to develop and extend its outcome to the practical agricultural and industrial level. From the research results, this nematode has been further studied in the project entitled "Development of Simple

Entomopathogenic Nematodes Production Process for Transferring to the Farmers". This project has been funded by the Thailand Research Fund during 2001-2004.

5. The results from this research project are useful to the development of indigenous strains of the entomopathogenic nematode in Thailand both in academic and applied aspects. Some potential strains are being understudy to be applied in agricultural practices and will be further developed for the industrial and commercial scales.

สารบัญ

	หน้า
บทนำ	1
วัตถุประสงค์ของโครงการ	2
การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง	3
อุปกรณ์และวิธีการ	15
ผลงานทดลองและวิจารณ์	21
สรุปผลการวิจัย	41
เอกสารอ้างอิง	43
Outputs ที่ได้จากโครงการ	54
ภาคผนวก	55

Manuscripts :

1. Life Cycle of Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis* sp., Isolated from Thailand
2. Mass Rearing in Semi-solid Culture of an Entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis* sp. Thai Isolate

บทนำ

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง (entomopathogenic nematode) ประกอบด้วย 2 วงศ์ คือ Steinernematidae และ Heterorhabditidae จัดเป็น bio-pesticide อีกพวกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชอย่างกว้างขวางทั่วโลก เนื่องจากไส้เดือนฝอยมีคุณสมบัติในการฆ่าแมลงตายภายในเวลารวดเร็ว กำจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียม และได้รับการรับรองจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ถึงความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่น รวมถึงสภาพแวดล้อม ในปัจจุบันได้มีการผลิตเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในหลายประเทศแถบยุโรป สหรัฐอเมริกา แคนาดา ญี่ปุ่น จีน และออสเตรเลีย

ในประเทศไทย เกษตรกรทุกภาคปลูกพืชผัก พืชไร่ และพืชสวน ยังคงประสบปัญหาแมลงศัตรูพืช โดยเฉพาะกลุ่มผลัดผักปลอดสารพิษ-ผักอนามัยและผลไม้ปลอดจากสารพิษเพื่อการส่งออก บางครั้งก็ไม่อาจควบคุมได้ด้วยสารธรรมชาติหรือวิธีการเขตกรรม ถ้าพื้นที่นั้นมีการระบาดของแมลง รวมทั้งพวกกลุ่มเกษตรกรที่ประสบปัญหา แมลงดื้อสารเคมี ปัญหาต่างๆ เหล่านี้ทำให้ผลผลิตเสียหายหรือต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น ดังนั้นเกษตรกรจึงให้ความสนใจการใช้จุลินทรีย์กำจัดแมลงศัตรูพืช อันได้แก่ แบคทีเรียบีที (*Bacillus thuringiensis*) และไวรัสเอ็นพีวี (nuclear polyhedrosis virus) รวมทั้งไส้เดือนฝอยซึ่งเป็นจุลินทรีย์อีกทางเลือกหนึ่งของการเลือกใช้ควบคุมแมลง ศัตรูพืชที่มีความหลากหลายในสวนผัก-ผลไม้ของเขตร้อนชื้น ที่ได้ศึกษาวิจัยและพัฒนา นำไส้เดือนฝอยมาใช้ในประเทศตั้งแต่ปี 2534 โดยกองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้นำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์จากต่างประเทศ มาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมประสบผลสำเร็จถึงระดับการค้า มีผลิตภัณฑ์จำหน่ายในรูปของฟองน้ำบรรจุของๆ ละ 4 ล้านตัว นำไปใช้ควบคุมหนอนเจาะเปลือกลองกอง หนอนด้วงหมัดกระโดดในผักกาดหัว หนอนกระทู้หอมดาวเรือง เป็นต้น ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงจึงเป็น bio-pesticide ที่น่าสนใจในการศึกษา โดยเฉพาะสายพันธุ์ไทยที่แยกได้จากดินในพื้นที่ต่างๆ ของประเทศ นำมาวิจัยและพัฒนาให้สามารถนำกลับไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชในสภาพแวดล้อมเดิมได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ปี พ.ศ. 2540 ได้มีการสำรวจและค้นพบไส้เดือนฝอย heterorhabditid (*Heterorhabditis* spp.) เป็นครั้งแรกในประเทศไทย ซึ่งแยกได้จากดินในเขตพื้นที่จังหวัดร้อยเอ็ด จัดเป็นไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (Thai strain) อีกสกุลหนึ่งที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลง จึงควรทำการศึกษาวิจัยและพัฒนาสายพันธุ์ที่พบในบ้านเราซึ่งเป็น indigenous strain ที่น่าสนใจนำขึ้นมาใช้ประโยชน์ในอนาคต โดยการศึกษามุ่งเน้นงานวิจัยพื้นฐานทางด้านชีววิทยา การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณ และศักยภาพของสายพันธุ์ในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ข้อมูลของงานวิจัยที่ได้จากโครงการนี้จะก่อให้เกิดองค์ความรู้ใหม่ต่อการพัฒนางานวิจัย ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ของประเทศไทย และความก้าวหน้าของงานทางด้าน การนำจุลินทรีย์ที่มีอยู่ในธรรมชาติขึ้นมาใช้ประโยชน์ ทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีกำจัดแมลงศัตรูพืช และเพิ่มทางเลือกในการพิจารณาใช้จุลินทรีย์ที่มี

ประโยชน์กับแมลงศัตรูเป้าหมายอย่างเหมาะสม ตลอดจนข้อมูลของงานวิจัยขั้นพื้นฐานที่ได้จะส่งผลถึงงานวิจัยขั้นประยุกต์และพัฒนาสายพันธุ์ไทย ในการเป็น bio-pesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบผลสำเร็จในอนาคตต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. เพื่อศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย โดยศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยในแมลงอาศัย ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอยในแมลงอาศัย และการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ symbiotic bacteria ที่อยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย
2. เพื่อศึกษาคักยภาพของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในการกำจัดแมลง โดยทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการฆ่าแมลง ทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิระดับต่างๆ ในการเข้าทำลายแมลง และทดสอบ pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ
3. เพื่อศึกษาการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในอาหารเทียม สภาพ monoxenic culture

การตรวจเอกสารที่เกี่ยวข้อง

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง (entomopathogenic nematodes) จัดเป็น จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์และเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงอีกชนิดหนึ่ง ค้นพบครั้งแรกโดย Steiner ในประเทศ เยอรมันนี เมื่อปี ค.ศ. 1923 เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กและเป็น obligate parasite ภายในตัวแมลง ในปัจจุบัน ได้รับการยอมรับในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญทางเศรษฐกิจในหลายประเทศ เนื่องจากมีศักยภาพ ในการฆ่าแมลงตายภายในเวลาอันรวดเร็ว ก่อจัดแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด ได้รับการรับรองถึงความปลอดภัย ต่อพืช สัตว์เลือดอุ่น และสภาพแวดล้อมจาก The United States Environmental Protection Agency (EPA) ตลอดจนสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมหลายชนิด (Gaugler and Kaya, 1990)

ไส้เดือนฝอยจัดอยู่ใน order Rhabditida และพบว่ามีเพียง 2 วงศ์ (family) เท่านั้น ที่มี ศักยภาพในการทำให้เกิดโรคในแมลง คือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae มีการศึกษา วิจัยเป็นเวลากว่า 75 ปี โดยได้ศึกษาไส้เดือนฝอยทั้งในด้านการจัดจำแนกชนิด พฤติกรรม ความอยู่รอด ศักยภาพ ในการเป็น biological control agent และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่ดัดนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม นำไป ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญหลายชนิด เพื่อทดแทนหรือลดการใช้สารเคมีในหลายประเทศทั่วโลก

ไส้เดือนฝอย steinernematid มีการกระจายตัวในภูมิภาคต่างๆ ของโลก จากรายงานการ กระจายตัวในยุโรปตอนเหนือเท่ากับ 37-49 % และพบในทุกประเทศที่มีการสำรวจในทวีปยุโรป ได้แก่ 36.8 % ในสาธารณรัฐเช็กโกสโลวาเกีย (Mracek, 1980) 25 % ในสวีเดน (Burman *et al.*, 1986) 5.8 % ในฟินแลนด์ (Vanninen *et al.*, 1989) 10.4 % ในสาธารณรัฐไอร์แลนด์ (Griffin *et al.*, 1991) 18.3 % ในนอร์เวย์ (Haukeland, 1993) และ 26.5 % ในสวิตเซอร์แลนด์ (Steiner, 1994) ในทวีปอเมริกามีการศึกษาการ กระจายตัว และรายงานใน 5 ประเทศของอเมริกาเหนือ-กลางคือ แคนาดา สหรัฐอเมริกา เม็กซิโก คิวบา และ เปอร์โตริโก และใน 3 ประเทศของอเมริกาใต้ คือ บราซิล อุรุกวัย และอาร์เจนตินา นอกจากนั้นยังมีรายงานใน ประเทศออสเตรเลียและนิวซีแลนด์ ส่วนในทวีปเอเชียมีการสำรวจและศึกษาการแพร่กระจายของไส้เดือนฝอย มี รายงานใน 6 ประเทศ คือ จีน (Shen, 1992) อินเดีย (Poinar *et al.*, 1992) ศรีลังกา (Amarasinghe *et al.*, 1994) ญี่ปุ่น (Yoshida *et al.*, 1998) เกาหลี (Stock *et al.*, 1997) และโอมาน (Elawad *et al.*, 1997) ใน ทวีปแอฟริกา Waturu *et al.* (1997) ได้รายงานการสำรวจและค้นพบในประเทศเคนยา ส่วนไส้เดือนฝอย heterorhabditid พบครั้งแรกในปี ค.ศ. 1976 โดย Poinar และตั้งชื่อสกุลเป็น *Heterorhabditis* มีการศึกษากัน มากในทวีปยุโรปและอเมริกา จากรายงานการสำรวจของ Griffin *et al.* (1991) พบว่า heterorhabditid มีการ กระจายตัวตามชายฝั่งหรือพื้นที่ที่เป็นดินทรายเป็นส่วนใหญ่

Poinar (1986) ได้จัดลำดับชั้นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคในแมลง ดังนี้ :-

Phylum Nematoda

Class Secernentea

Order Rhabditida

Sub-order Rhabditina

Superfamily Rhabditoidea

Family Steinernematidae

Family Heterorhabditidae

การจัดจำแนกชนิดโดยศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดเป็นงานพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแบ่งแยกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย (Siddiqi, 1986) หลักของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง คือ การวัดขนาดสัดส่วนต่างๆ และพิจารณารูปร่างลักษณะที่สำคัญของตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียใน 1st และ 2nd generation โดยใช้ light microscopoe (LM) และ scanning electron microscope (SEM) ความแตกต่างของขนาดสัดส่วนและรูปร่างลักษณะของไส้เดือนฝอยสามารถจัดจำแนกชนิดได้ (Nguyen and Smart, 1996) นอกจากนั้น ในปัจจุบันวิทยาการทางด้านอนุชีววิทยา (molecular biology) ได้พัฒนาอย่างรวดเร็ว และเข้ามามีบทบาทในงานการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยในระดับยีนหรือดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นสารพันธุกรรมที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปตามสภาวะแวดล้อมภายนอก จึงนิยมใช้ในตรวจสอบและแบ่งแยกชนิดและสายพันธุ์ที่มีความหลากหลายในระบบนิเวศ และการใช้ยีนของดีเอ็นเอเป็นตัวตรวจสอบความเหมือนกันหรือแตกต่างกันของการจัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยให้ความถูกต้องมากที่สุด หากเป็นชนิดเดียวกันจะมีดีเอ็นเอเหมือนกันหรือคล้ายคลึงกัน ตลอดจนการใช้เทคนิค molecular biology ยังเป็นวิธีการตรวจสอบที่รวดเร็วมากที่สุด เทคนิคที่นำมาใช้จัดจำแนกชนิดไส้เดือนฝอย ได้แก่ DNA sequence analysis (Curran *et al.*, 1985), restriction fragment length differences (RFLD) (Curran, 1991), restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Reid and Hominick, 1992) และ random amplified polymorphic DNA (RAPD) (Hashmi *et al.*, 1996) เป็นต้น ในปัจจุบันเทคนิคที่นิยมใช้ในการจัดจำแนกและตรวจสอบชนิดของไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลง ได้แก่ เทคนิค PCR-RFLP เนื่องจากให้ผลแม่นยำและได้รับการยอมรับ

Tangchitsomkid (2000) ได้รวบรวมชนิดของไส้เดือนฝอยที่ค้นพบทั่วโลก แบ่งแยกได้เป็น family Steinernematidae ประกอบด้วย 2 สกุล (genera) คือ สกุล *Steinernema* spp. ในปัจจุบันจัดจำแนกออกเป็นชนิด (species) ได้ 25 ชนิด คือ *S. kraussei* (Steiner, 1923) syn. *Aplectana kraussei* Steiner, 1923; *S. glaseri* (Steiner, 1929); *S. feltiae* (Filipjev, 1934); *S. affinie* (Bovien, 1937); *S. carpocapsae* (Weiser, 1955); *S. arenarium (anomalae)* (Kozodoi, 1984); *S. intermedium* (Poinar,

1985); *S. rarum* (De Doucet, 1986); *S. kushidai* (Mamiya, 1988); *S. ritteri* (Doucet & Doucet, 1990); *S. scapterisci* (Nguyen & Smart, 1990); *S. caudatum* (Xu et al., 1991); *S. neocurtillae* (Nguyen & Smart, 1992 b); *S. longicaudum* (Shen, 1992); *S. cubanum* (Mracek et al., 1994); *S. puertoricense* (Roman & Figueroa, 1994); *S. riobrave* (Cabanillas et al., 1994); *S. bicornutum* (Tallosi et al., 1995); *S. oregonense* (Liu & Berry, 1996 a); *S. monticolum* (Stock et al., 1997); *S. kari* (Waturu et al., 1997); *S. abbasi* (Elawad et al., 1997); *S. ceratophorum* (Jian et al., 1997); *S. siamkayai* (Stock et al., 1998) และ *S. tami* (Luc et al., 2000) ในสกุล *Neosteinemema* sp. 1 ชนิด คือ *N. longicurvicauda* (Nguyen & Smart, 1994)

family Heterorhabditidae พบ 1 สกุล คือ *Heterorhabditis* spp. จำแนกได้ 8 ชนิด คือ *H. bacteriophora* (Poinar, 1976), *H. zealandica* (Wouts, 1979), *H. megidis* (Poinar et al., 1987), *H. indica* (Poinar et al., 1992), *H. argentinensis* (Stock, 1993), *H. hawaiiensis* (Gardner et al., 1994), *H. brevicaudis* (Liu, 1994) และ *H. marelata* (Liu and Berry, 1996 b)

ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล คือ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในดิน ดำรงชีวิตเป็นอิสระโดยไม่กินอาหาร เป็นระยะที่เรียกว่า free living หรือตัวอ่อนระยะที่ 3 (third-stage juvenile) หรือตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile) เป็นตัวอ่อนระยะเดียวที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีที่สุด โดยลำตัวมีผนังใสที่เรียกว่า cuticle ปกคลุมป้องกันอุณหภูมิและความชื้น มีการสะสมอาหารสำรองพวกไขมัน (lipid reserve) จึงสามารถอยู่ในดินได้นานโดยไม่กินอาหารเพื่อรอคอยแมลงเหยื่อ (Poinar, 1990) เมื่อพบแมลงไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ช่องว่างในตัวแมลง (haemocoel) ได้หลายทาง ขึ้นกับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย ซึ่งสัมพันธ์กับชนิด แมลง และสภาพแวดล้อม เช่น ไส้เดือนฝอย *S. scapterisci* เข้าทำลายแมลงกะซอน โดยผ่านรูหายใจทางผิวหนัง (spiracle) และเคลื่อนที่เข้าสู่ท่อ trachea ดันตัวจนท่อ trachea ฉีกขาด เพื่อเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวที่มีน้ำเลือด (haemolymph) (Nguyen and Smart, 1991) นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายของ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* สามารถเข้าสู่แมลงได้ทางช่องเปิดตามธรรมชาติอื่นๆ เช่น ปากและช่องขับถ่าย และเจาะทะลุผ่านท่อทางเดินอาหาร ของแมลง (foregut หรือ midgut หรือ hindgut) เข้าสู่ haemocoel ของแมลง (Poinar, 1979) แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยพวก *Heterorhabditis* มี labial tooth อยู่บริเวณส่วนหัวของไส้เดือนฝอยระยะ infective juvenile มีลักษณะคล้ายฟันที่แข็ง ช่วยในการเจาะทะลุผนังลำตัวของแมลง ซึ่งเป็นโครงสร้างพิเศษที่พบเฉพาะในสกุลนี้เท่า

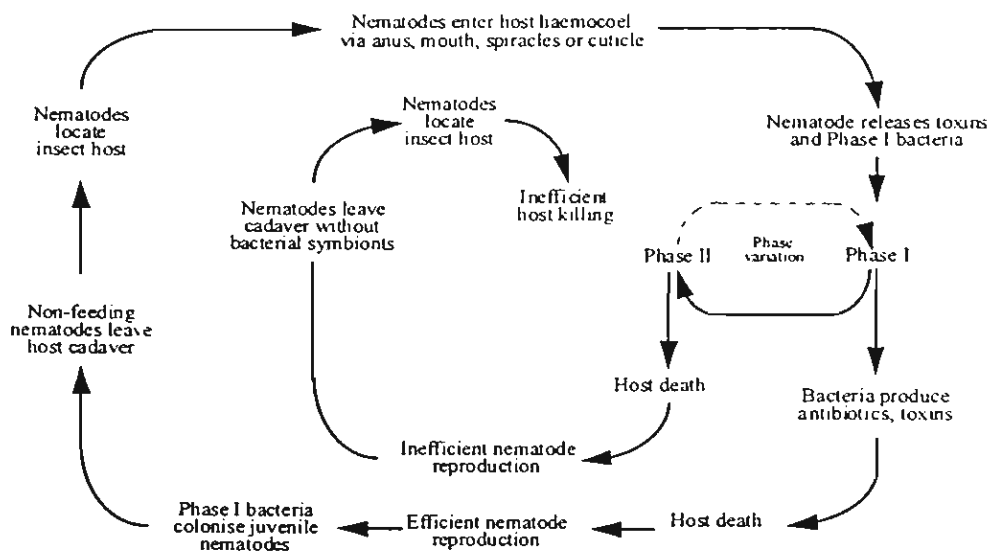


นั้น (Wouts, 1979) จากรายงานของ Bedding and Molyneux (1982) แสดงให้เห็นว่า ไล์เดือนฝอย *H. bacteriophora* strain D1 มี tooth ช่วยเจาะเข้าสู่หนอนแมลงวัน (sheep blowfly) ทางผิวหนังบริเวณ intersegment

ในเรื่องของอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายของไล์เดือนฝอยที่แตกต่างกันโดยพบว่า ไล์เดือนฝอย *S. carpocapsae* มีความสามารถในการเข้าสู่แมลงเหยื่อได้ดีที่อุณหภูมิ 24°C และ *S. scapterisci* ดีที่อุณหภูมิ 32°C (Grewal et al., 1993)

เมื่อไล์เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลงจะปลดปล่อย symbiotic bacteria สู่กระแสเลือดของแมลง แบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วและสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดอาการของโรคเลือดเป็นพิษ (septicemia) และตายภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. (Poinar and Thomas, 1966) ในปี 1982 Burman ได้รายงาน การสร้างสารพิษจากไล์เดือนฝอย *Neaplectana* (*Steinernema*) *carpocapsae* ที่เรียกว่า NGE (nematode growth extract) ที่ผลิตจากการเลี้ยงไล์เดือนฝอยในสภาพ axenic culture สารพิษที่ได้เมื่อนำไป inject กับแมลงทดสอบ พบว่าแมลงเกิดอาการ heart beat อ่อนแอและตายภายในเวลา 24 ชม.

โดยสรุปการเกิดโรคในแมลงของไล์เดือนฝอยร่วมกับ symbiotic bacteria แสดงได้ดังไดอะแกรม ต่อไปนี้ :-

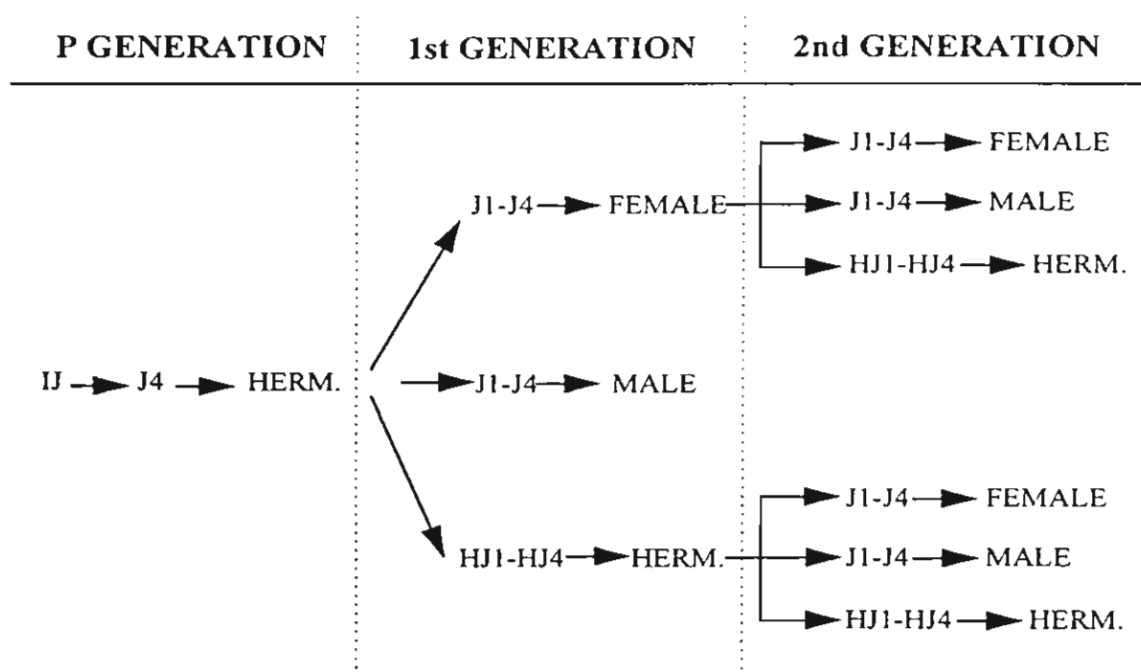


Connor Thomas (<http://www.microbiology.adelaide.edu.au/>)

ไล์เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบ 4 ครั้ง ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน (juvenile stage) 4 ระยะคือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (J1) พักออกจากไข่ภายในตัวแม่ มีการลอกคราบเป็นตัวอ่อนระยะที่ 2 (J2) ตัวอ่อนระยะที่ 3 (J3) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ตามลำดับ ก่อน

เป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ตัวอ่อนทั้ง 4 ระยะ และตัวเต็มวัยจะเจริญเติบโตภายในแมลงอาศัยเท่านั้น มีเพียงระยะเดียว ที่อยู่นอกตัวแมลงคือ ตัวอ่อนระยะ infective juvenile (IJ) เท่านั้น ซึ่งก็คือตัวอ่อนในระยะ J2 และ J3 ที่มีการปรับ สภาพตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก และเคลื่อนที่ออกจากซากแมลง ดำรงชีพอยู่ในดินโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานานเพื่อรอแมลงเหยื่อตัวใหม่ (Nguyen and Smart, 1992 a)

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีความแตกต่างกันอย่างเด่นชัดของการขยายพันธุ์ โดยพบว่า *Steinernema* มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic เท่านั้น คือการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ส่วน *Heterorhabditis* พบว่าใน generation ที่ 1 จะมีการขยายพันธุ์แบบ hermaphroditic โดยตัวเมียสามารถสร้างไข่และสเปิร์มภายในตัวให้ลูกได้เอง และใน generation ที่ 2 เป็นแบบ amphimictic (Poinar, 1990) จากการศึกษาวงจรชีวิตและการขยายพันธุ์ของ *H. bacteriophora* HP88 strain Glazer et al. (1994) ได้สรุปเป็น diagram การพัฒนาของไส้เดือนฝอยในแต่ละ generation ดังนี้ :-



Proposed developmental pathway for *Heterorhabditis bacteriophora* HP88 strain.

(HERM. = Hermaphrodite)

Nguyen and Smart (1998) ได้ศึกษารูปร่างลักษณะและการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* spp. 3 ชนิดคือ *H. bacteriophora* *H. hawaiiensis* และ *H. megidis* ตั้งแต่ตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (IJ) ถึงระยะ hermaphrodite อัตราการเจริญเติบโตของทั้ง 3 ชนิด มีความแตกต่างกันในช่วงของวันที่ 2 และ 3 หลังจากเข้าทำลายแมลง โดยพบว่า *H. hawaiiensis* มีการเจริญเติบโตได้รวดเร็วจากระยะ IJ เป็น J4

ในวันที่ 2 หลังการเข้าทำลาย และในวันที่ 3 มีการเจริญเติบโตเป็น young hermaphroditic female ส่วน *H. megidis* ยังไม่มีการเจริญเติบโตหลังเข้าทำลายเป็นเวลา 2 วัน แต่ในวันที่ 3 IJ เจริญเป็น J4 และมีบางส่วนเจริญเป็น young hermaphroditic female สำหรับ *H. bacteriophora* เจริญเติบโตช้ากว่า พบเฉพาะ J4 ในวันที่ 3 หลังเข้าทำลายและยังไม่พบ young hermaphroditic female

ความสัมพันธ์ของการอยู่ร่วมกันของสิ่งมีชีวิต 2 ชนิด ระหว่างไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode ใน family Steinernematidae และ Heterorhabditidae กับแบคทีเรียใน family Enterobacteriaceae เป็นการอยู่ร่วมกันแบบที่เรียกว่า symbiotic association (Poinar and Thomas, 1966) พบอยู่บริเวณลำไส้ส่วนหน้าของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย โดยแบคทีเรียไม่สามารถมีชีวิตรอดในดินหรือในน้ำด้วยตัวเองได้ (Poinar, 1979) และไม่ทำให้เกิดโรคเมื่ออยู่ในระบบย่อยอาหารของแมลง (Poinar and Thomas, 1967) จนกว่าไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จึงสามารถออกมาอยู่ในน้ำเลือดของแมลงได้ ดังนั้น การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียจากซากแมลงหนึ่งสู่แมลงตัวใหม่ต้องอาศัยไส้เดือนฝอยเป็นตัวนำและปกป้องแบคทีเรียต่อสภาพแวดล้อม เซลล์ของแบคทีเรียเมื่ออยู่ในน้ำเลือดของแมลงจึงจะสามารถทวีจำนวนได้ และเซลล์ของแบคทีเรียเป็นแหล่งอาหารสำคัญต่อกระบวนการขยายพันธุ์ (reproduction) ของไส้เดือนฝอยภายในตัวแมลง (Akhurst and Boemare, 1990)

แบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยจัดอยู่ในสกุล *Xenorhabdus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) เป็นพวก facultative anaerobic แกรมลบ จากหนังสือ Bergey's Manual of Systematic Bacteriology (Volume 1) มีการจัดจำแนกโดยใช้คุณสมบัติทางชีวเคมีไว้ 2 ชนิด (species) ได้แก่ *X. luminescens* และ *X. nematophilus* (Krieg and Holt, 1984)

Akhurst (1980) พบว่า *Xenorhabdus* spp. มี 2 รูปแบบ (form) คือ primary form และ secondary form การแยกความแตกต่างระหว่าง form ของ *X. nematophilus* อาศัยลักษณะโคโลนี (colony) ในปี ค.ศ. 1988 Boemare and Akhurst ได้ทำการศึกษาคุณสมบัติทางกายภาพและชีวเคมีของ *Xenorhabdus* spp. ทั้ง 2 form ที่แยกจาก Steinernematidae และ Heterorhabditidae 21 สายพันธุ์ (strain) พบว่า *Xenorhabdus* ทั้ง 2 form ของทุกสายพันธุ์มีความแตกต่างกัน

ในการแยกความแตกต่างของทั้ง 2 form ทำได้โดยดูความสามารถของโคโลนีในการดูดสี neutral red จากอาหาร MacConkey agar และการดูดสี bromthymol blue จากอาหาร NBTA นอกจากนี้ ยังแยกความแตกต่างด้วยการทดสอบ antibiotic activity และ lecithinase (Akhurst, 1980)

ในปี ค.ศ. 1988 Akhurst and Boemare ได้ทำการศึกษาการจัดหมวดหมู่ *Xenorhabdus* จากเชื้อทั้ง 2 form จำนวน 21 สายพันธุ์ โดยทำการทดสอบคุณสมบัติ 240 ลักษณะ และได้เสนอจัดแบคทีเรีย *X. nematophilus* เป็น 4 species คือ *X. nematophilus*, *X. beddingii*, *X. bovienii* และ *X. poinarii* ในปี ค.ศ. 1993 Boemare et al. ได้ตรวจสอบความสัมพันธ์ของแบคทีเรียด้วยวิธี DNA hybridization และเปลี่ยนจาก *X. luminescens* เป็นสกุลใหม่คือ *Photorhabdus* โดยใช้ความแตกต่างของยีนหรือดีเอ็นเอเป็นตัวแบ่งแยก

Xenorhabdus spp. ที่แยกจากธรรมชาติมีลักษณะเป็น primary form โดยมีลักษณะโคโลนี หนูนโด้ง ทึบแสง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสี (dye) เชื้อสามารถดูดซับสีทำให้โคโลนีมีสี แต่ถ้าเลี้ยง *Xenorhabdus* spp. ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน เชื้อเปลี่ยนเป็น secondary form โคโลนีมีลักษณะแบนและเชื้อไม่สามารถดูดซับสีที่ผสมลงในอาหารได้ ไม่พบความแตกต่างในการทำให้เกิดโรคของเชื้อทั้ง 2 form แต่พบว่ามีผลต่อความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับไส้เดือนฝอย โดยไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์กับแบคทีเรีย primary form ได้ดีกว่า secondary form ไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์เฉพาะเจาะจงกับแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่ง แต่แบคทีเรียชนิดอื่นๆ มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยได้หลายชนิด แบคทีเรียแต่ละชนิดยังสามารถจัดแบ่งได้อีกหลายกลุ่ม นอกจากการจัดจำแนกแบคทีเรีย (classical taxonomy) โดยใช้วิธีการที่ถือปฏิบัติกันมา ได้มีการนำวิธีการอื่นๆ มาช่วยในการจัดจำแนก เช่น การศึกษาดีเอ็นเอ วิธีการทางเซรุ่มวิทยา การใช้ gas-liquid chromatography ของ fatty acid methyl esters (FAMES) (Aguillera et al., 1993) เป็นต้น การจำแนกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* spp. มีความสำคัญมาก เนื่องจากแบคทีเรียเป็นจุลินทรีย์ที่มีความผันแปรสูงอีกทั้งยังเกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย ประกอบกับมีความซับซ้อนของความสัมพันธ์ของสิ่งมีชีวิตทั้ง 3 ชนิด คือ แมลง ไส้เดือนฝอย และแบคทีเรีย

ไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดมีความเฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรีย ได้แก่ *S. carpocapsae* มีความสัมพันธ์กับแบคทีเรียชนิด *X. nematophilus* ไส้เดือนฝอย *S. feltiae*, *S. affinis*, *S. kraussei*, *S. intermedia* มีความสัมพันธ์กับ *X. bovienii* เป็นต้น ความเฉพาะเจาะจงของการอยู่ร่วมกันของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย ขึ้นกับสารอาหารที่จำเป็นสำหรับไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นและการเก็บรักษาเซลล์ของแบคทีเรียบริเวณลำไส้ของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลาย (Akhurst and Boemare, 1990)

ความต้องการสารอาหารของไส้เดือนฝอยที่แบคทีเรียสร้างขึ้นนี้พบว่า ไม่เฉพาะเจาะจงกับชนิดของแบคทีเรียมากนัก โดยไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่มี *X. nematophilus* อยู่ร่วม ยังสามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มีแบคทีเรียชนิดอื่นได้ แต่การขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยจะลดลง อย่างไรก็ตาม *Steinernema* spp.

ไม่สามารถขยายพันธุ์ในอาหารที่มี *X. luminescens* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* spp. (Akhurst and Boemare, 1990)

แมลงที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยพบว่า ไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆ เข้าทำลายซ้ำเติม เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเลือดของแมลง สร้างสาร antimicrobial ซึ่งจะยับยั้งรา ยีสต์ และแบคทีเรียอื่นๆ Paul et al. (1981) พบว่า antimicrobials เป็นสารประกอบทางเคมี (chemical compound) ใน *X. nematophilus* strain R เป็น 4 indole derivatives และ *X. luminescens* strain Hb เป็น 2 trans-stilbene derivatives

ความสามารถในการทำให้เกิดโรคกับแมลงของ *Xenorhabdus* spp. มีประสิทธิภาพสูงมาก เมื่ออยู่ในน้ำเลือดภายในช่องว่างลำตัวแมลง โดยพบว่า หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) มีจำนวนของเซลล์แบคทีเรียเพียง 50 เซลล์ ก็สามารถทำให้เกิดโรคในหนอนชนิดนี้ได้ (Akhurst, 1982)

ได้มีการคัดเลือกชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอย นำมาผลิตเป็นการค้า ได้แก่ 6 ชนิด ในสกุล *Steinernema* spp. คือ *S. carpocapsae*, *S. glaseri*, *S. feltiae*, *S. riobrave*, *S. scapterisci* และ *S. kushidai* และ 2 ชนิด ในสกุล *Heterorhabditis* spp. คือ *H. bacteriophora* และ *H. megidis* (Ehlers, 1995)

การนำไส้เดือนฝอยมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช มีการศึกษาวิจัยถึงวิธีการใช้ที่เหมาะสมและมีประสิทธิภาพสูงสุด เนื่องจากไส้เดือนฝอยเป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กไม่ทนทานต่อสภาพอุณหภูมิสูง แสงอุลตราไวโอเลต สภาพความแห้ง ซึ่งมีผลทำให้อัตราการรอดของไส้เดือนฝอยต่ำลง ดังนั้น วิธีการใช้จึงมีปัจจัยหลายประการเป็นตัวกำหนด ปัจจัยที่สำคัญคือ ปัจจัยทางด้านพฤติกรรมของไส้เดือนฝอยเป็นแบบ cruiser หรือ ambusher โดยพฤติกรรมแบบ cruiser เป็นไส้เดือนฝอยพวกที่มีการเคลื่อนที่เข้าหาแมลงเหยื่อ ได้แก่ *S. glaseri* และ *H. bacteriophora* ส่วนพฤติกรรมแบบ ambusher เป็นพวกไม่ค่อยเคลื่อนที่ แต่จะหยุดอยู่กับที่ (sit and wait) และมีการยิดลำตัวขึ้นโบกส่วนหัวหรือลำตัวไปมา (nictating) เพื่อรอจังหวะในการกระโดดเข้าเกาะตัวแมลงที่วิ่งไปมา จะพบไส้เดือนฝอยพวกนี้อยู่บริเวณผิวดิน ได้แก่ *S. carpocapsae* และ *S. scapterisci* (Campbell and Gaugler, 1993) ลักษณะพฤติกรรมที่แตกต่างทำให้ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิด มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงแตกต่างกัน เช่น การควบคุมแมลงกะซอนในสนามกอล์ฟ ควรเลือกใช้ *S. scapterisci* เนื่องจากแมลงกะซอนเคลื่อนที่อย่างรวดเร็วบนผิวดิน และใช้ *S. glaseri* ควบคุม white grub ที่กัดกินรากพืชใต้ดิน (Klein, 1990) นอกจากนั้น ปัจจัยทางด้านความแข็งแรงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตเป็นการค้ามีความอยู่รอดและมีประสิทธิภาพสูง ซึ่งขึ้นกับรูปแบบการผลิต การเก็บรักษา และการขนส่งที่มีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอย

จำนวนเซลล์ของแบคทีเรียและปริมาณไขมันสะสมในตัวไส้เดือนฝอย ตลอดจนปัจจัยทางด้านสิ่งแวดล้อม ได้แก่ โครงสร้างดิน อุณหภูมิดิน และความชื้นในดิน (Kaya, 1990) การนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบผลสำเร็จนั้น จึงต้องมีการศึกษาถึงปัจจัยต่างๆ ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ความรู้ทางวิชาการจึงเป็นข้อมูลที่สำคัญในการพิจารณาเลือกใช้ไส้เดือนฝอยชนิดใดไปควบคุมแมลงศัตรูพืชให้มีประสิทธิภาพสูงสุด

ไส้เดือนฝอย *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีศักยภาพในการเป็น bio-pesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม ตั้งแต่ปี 1931 โดย Glaser ได้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* และ *S. carpocapsae* เป็นผลสำเร็จในอาหารชนิดวุ้นที่ประกอบด้วย 1% ไคโรแทย์ และ 1% วุ้น เป็นอาหารที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนหรือที่เรียกว่า axenic culture ต่อมาในปี 1953 Stoll พัฒนาการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีน้ำตาลเป็นองค์ประกอบ โดยเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีการเขย่า 100 ครั้งต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงยังเป็นงานวิจัยในห้องทดลอง ผลผลิตที่ได้ต่ำต้นทุนสูง จึงได้มีการค้นคว้าและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านเทคนิคและสูตรอาหารเพื่อให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดและต้นทุนการผลิตต่ำ (Friedman, 1990)

ในปี 1964 Dutky *et al.* พบว่า การนำ symbiotic bacteria ที่แยกได้จากตัวของไส้เดือนฝอย ใส่เพิ่มลงในอาหารเทียมที่ใช้เพาะเลี้ยงหรือที่เรียกว่า monoxenic culture ทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

ในปี 1981 Bedding ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบของ 70% ไคหมู 10% ไขมันสัตว์ และ 20% น้ำ ของการเลี้ยง *Steinernema* sp. และ 60% ไคหมู 20% ไขมันสัตว์ และ 20% น้ำ ของการเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเฉลี่ย 40 ล้านตัวต่อ flask ขนาด 500 มล. ต่ออาหาร 70 กรัม ต้นทุนการผลิตเท่ากับ \$ 0.50/flask (ประมาณ 20 บาท) เทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมา Bedding (1984) ได้ ศึกษาเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในถุง polypropylene ขนาด 1.0x0.5 เมตร ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 2,000 ล้านตัวต่อถุง

มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใน 2 สกุล ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งมีความแตกต่างกันของสารอาหารที่ไส้เดือนฝอยต้องการ จากรายงานของ Dunphy and Webster (1989) ได้ศึกษาแหล่งอาหารต่างๆ เพื่อการขยายปริมาณ *S. carpocapsae* DD 136 strain และ *H. heliothidis* พบว่าสารอาหารชนิดต่างๆ มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน

โดย culture ที่มี stearic acid จากน้ำมันดอกทานตะวัน (0.1% V/V) เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และน้ำมันตับปลา (0.5% V/V) เพิ่มผลผลิต *H. heliothidis*

ในปัจจุบันการผลิตไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode สามารถผลิตในอาหารเหลวได้สูงถึง 190,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระดับ shake flask และ 90,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในถังหมัก (fermenter) (Friedman, 1990) มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ เช่น บริษัท MicroBio ผลิตไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และไส้เดือนฝอย *H. megidis* ควบคุมด้วงงวงงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง Japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ, 2541 ก)

รูปแบบผลิตภัณฑ์ (formulation) ไส้เดือนฝอย และการนำไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่ มีหลายรูปแบบ ได้แก่ การผสมไส้เดือนฝอยในดินเหนียว ฟองน้ำ เวอร์มิคูไลต์ บรรจุเป็นแคปซูลในสารแอลจินเนต (alginate capsule) และในรูปเจลโพลีอะครีลาไมด์ (gel-forming polyacrylamides) เป็นต้น ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยมีจำหน่ายในหลายประเทศ เช่น บริษัท Mellinger's ในสหรัฐอเมริกา ผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในชื่อผลิตภัณฑ์ scanmark ราคา \$ 13.95 บรรจุไส้เดือนฝอย 7 ล้านตัว สามารถสั่งซื้อได้ง่ายโดยผ่านทาง internet และชำระเงินด้วยบัตรเครดิต

วิธีการนำไปใช้ง่ายและสะดวก โดยละลาย formulated product ในน้ำตามคำแนะนำของแต่ละผลิตภัณฑ์ ซึ่งขึ้นอยู่กับจำนวนไส้เดือนฝอยและชนิดของแมลงเป้าหมาย ด้วยวิธีฉีดพ่นด้วยเครื่องพ่นสารชนิดสะพายหลัง หรือใช้วิธีการหว่านในแปลงปลูกที่มีแมลงศัตรูระบาด ควรใช้ในช่วงเช้าหรือเย็น เพื่อหลีกเลี่ยงแสงอุลตราไวโอเลตและความร้อนจากแสงแดดในเวลากลางวัน

สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ได้นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* All strain เป็นสายพันธุ์จากอเมริกาที่ผลิตเป็นการค้าทั่วโลก นำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมและนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชสำคัญ หลายชนิดประสบผลสำเร็จในสภาพไร่กับหนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง หนอนกระทู้หอม ทำลายดอกดาวเรือง และด้วงหมัดผักทำลายผักกาดหัว เป็นต้น ในปัจจุบันเกษตรกรให้ความสนใจการนำจุลินทรีย์ไปใช้ควบคุมแมลง โดยเฉพาะแมลงดื้อสารเคมี และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เป็นจุลินทรีย์อีกชนิดหนึ่งซึ่งประสบผลสำเร็จในการผลิตเป็นการค้าและเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายในประเทศไทย (วัชรวิ, 2534)

นอกจากนั้น ยังมีจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ที่มีศักยภาพในการเป็น biological control agent และได้รับความสนใจทั้งจากภาครัฐและภาคเอกชน มีการศึกษาวิจัยนำจุลินทรีย์มาใช้ควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรที่ประสบผลสำเร็จและนำไปใช้ประโยชน์ในประเทศไทยคือ การใช้แบคทีเรีย *Bacillus thuringiensis* (Bt) กำจัดหนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูสำคัญของพืชหลายชนิด (อัจฉรา, 2534) การใช้ไวรัส nuclear polyhedrosis virus (NPV) ควบคุมหนอนกระทู้หอมในแปลงผัก (อุทัย, 2534) การใช้แบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ควบคุมโรคกาบใบแห้งของข้าว (พากเพียร และคณะ, 2543) การใช้รา *Trichoderma harzianum* ควบคุมรา *Phytophthora parasitica* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของพริกไทย และทุเรียน เป็นต้น ทำให้จุลินทรีย์ต่างๆ เหล่านี้ได้รับความสนใจและยอมรับจากเกษตรกรในการนำไปใช้ทดแทนสารเคมีบางส่วน โดยเฉพาะเลือกใช้กับแมลงศัตรูพืชที่ดื้อสารเคมี เช่น หนอนหน้างเหนียว (*Spodoptera exigua*) ที่ทำความเสียหายกับพืชผักและไม้ดอกหลายชนิด

การค้นหายูนิทรีย์ที่มีประโยชน์ที่มีอยู่ตามธรรมชาติ เพื่อนำขึ้นมาพัฒนาและนำกลับไปใช้ควบคุมศัตรูพืช ได้เพิ่มความสำคัญและมีการศึกษาปัจจัยที่เกี่ยวข้องในหลายๆ ด้าน โดยเฉพาะงานวิจัยขั้นพื้นฐาน ดำเนินงานโดยนักวิจัยในแต่ละสาขาเพื่อค้นหาจุดสำคัญของการนำจุลินทรีย์มาใช้ให้มีประสิทธิภาพสูงสุด จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีข้อจำกัดในการนำไปใช้แตกต่างกันไป เช่น ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้ในดินร่วนปนทราย ที่อุณหภูมิสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส (Kaya, 1977) เป็นต้น ข้อจำกัดดังกล่าวจึงต้องมีการค้นคว้าวิจัยข้อมูลพื้นฐานทั้งด้านชีววิทยา นิเวศวิทยา และพฤติกรรมการดำรงชีวิต ซึ่งข้อมูลทางวิชาการเหล่านี้มีความสำคัญยิ่งต่อการพัฒนาจุลินทรีย์ที่พบตามธรรมชาติให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง การพยายามค้นหายูนิทรีย์สายพันธุ์ใหม่ในเขตต่างๆ ซึ่งมีความแตกต่างของสภาพแวดล้อม อุณหภูมิ ความชื้น ความเข้มของแสงอุลตราไวโอเลต แมลงอาศัย ชนิด และคุณสมบัติของดิน เพื่อนำจุลินทรีย์สายพันธุ์พื้นเมืองมาใช้ควบคุมศัตรูพืชในท้องถิ่นที่มีสภาพแวดล้อมเดิม จึงเป็นงานวิจัยที่ได้รับความสนใจจากนักวิจัยทั่วโลก รวมทั้งประเทศไทยได้เริ่มมีการสำรวจเก็บรวบรวม ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family Steinernematidae จำนวน 8 ไอโซเลท โดยกำหนดรหัสตามจังหวัดที่พบคือ จังหวัดกาญจนบุรี (KB) พิจิตร (PC) อุดรธานี (AY) กาฬสินธุ์ (KS) มหาสารคาม (MK) ขอนแก่น (KK) หนองคาย (NK) และสระแก้ว (SK) และ family Heterorhabditidae จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด (RE) นำมาเก็บรวบรวมเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืชและจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, 2543)

Tangchitsomkid (2000) ได้ศึกษารูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphological characteristics) และใช้เทคนิค PCR-RFLP เพื่อการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในเขตจังหวัดกาญจนบุรี (*Steinernema* sp. KB code) พบว่า เป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่และเป็นสายพันธุ์ไทย ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *S. thailandense* n. sp. ผลงานวิจัยดังกล่าวตีพิมพ์เผยแพร่ในประเทศไทยเมื่อปี พ.ศ. 2541

(นุชนารถ, 2541 ข) และส่งตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Nematology ชื่อเรื่อง *Steinernema thailandense* n. sp. (Rhabditida : Steinernematidae) in Thailand : Taxonomy and Biology (Tangchitsomkid et al., 2001)

จากการศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *S. thailandense* n. sp. และความสามารถในการเป็น biological control agent ในระดับห้องปฏิบัติการ พบว่ามีวงจรชีวิต 4 วัน ที่อุณหภูมิ 30 °ซ ระดับของอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโต อัตราการเปลี่ยนเป็นเพศผู้หรือเพศเมีย และความสามารถในการเข้าทำลายแมลงทดสอบ โดยพบว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมอยู่ในช่วงระหว่าง 25 ถึง 35 °ซ เป็นช่วงที่ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตได้ดี มีอัตราส่วนของเพศผู้ : เพศเมีย เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณรุ่นลูกได้สูง และไส้เดือนฝอยมีศักยภาพในการฆ่าแมลงตาย ได้เร็วที่สุด (ไม่เกิน 12-18 ชม.) ที่ช่วงอุณหภูมิดังกล่าว การทดสอบความรุนแรงในการทำให้เกิดโรคในหนอนกิ้งมั่ง พบว่าไส้เดือนฝอยอัตรา 10 ตัวต่อแมลง 1 ตัว สามารถทำให้หนอนกิ้งมั่งตาย 53 % ในเวลา 24 ชม. และจัดเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ที่ร้อนที่มีศักยภาพในการฆ่าหนอนกิ้งมั่งตาย 100 % ในเวลา 22 ชม. ที่อุณหภูมิ 30 และ 35 °ซ และคงศักยภาพในการเข้าทำลายแมลงได้สูงที่อุณหภูมิ 38 °ซ เมื่อนำไส้เดือนฝอยมาเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมชนิดวัน พบว่ามีการเจริญเติบโตได้ดีในอาหารที่มีถั่วเหลืองเป็นองค์ประกอบ โดยให้ผลผลิตเฉลี่ยเท่ากับ 6.4×10^5 ต่ออาหาร 20 กรัม ในเวลา 10 วัน การศึกษาศักยภาพในการกำจัดแมลงสำคัญ 12 ชนิด ได้แก่ หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera litura*) หนอนกระทู้ผัก (*S. exigua*) หนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หนอนเจาะดอกมะลิ (*Henedecasis duplifacialia*) หนอนกิ้งมั่ง (*G. mellonella*) หนอนในถุงเห็ด (unidentified) ตัวเต็มวัยของด้วงหมัดกระโดด (*Phyllotreta sinuata*) หนอนด้วงกินรากสตรอเบอรี่ (unidentified) เพลี้ยอ่อน (*Myzus persicae*) และปลวก (*Coptotermes* sp.) พบว่า *S. thailandense* n. sp. มีศักยภาพในการฆ่าแมลง โดยมีเปอร์เซ็นต์การตายเท่ากับ 56 60 89 92 100 100 100 33 20 44 และ 42 % ในเวลา 24 ชม. ตามลำดับ และในแมลงสาป (*Periplaneta americana*) เท่ากับ 57 % ในเวลา 48 ชม. (Tangchitsomkid, 2000)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ตัวอ่อนระยะเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย เพาะเลี้ยงจาก หนอนกินรังผึ้ง (Wax moth, *Galleria mellonella* L.)
2. หนอนทดสอบ (*G. mellonella*) วัยสุดท้ายก่อนเข้าดักแด้ น้ำหนักประมาณ 2.0-2.3 กรัม เพาะเลี้ยงได้จากอาหารเทียมดัดแปลง
3. สารอาหารที่ใช้เลี้ยงหนอนทดสอบ ได้แก่ แป้งข้าวเจ้า นมถั่วเหลือง น้ำผึ้ง ฟอรัมาลิน กลีเซอริน ไข่ผง และวิตามิน
4. กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo และ Compound microscope พร้อมกล้องถ่ายภาพ
5. เครื่องมือวิทยาศาสตร์สำหรับห้องปฏิบัติการ ได้แก่ เครื่องหมุนเหวี่ยงความเร็วรอบสูง ตู้ควบคุมอุณหภูมิ เครื่องชั่ง เครื่องวัด pH เครื่องทำน้ำกลั่น เครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบ/นาทีก เป็นต้น
6. เครื่องมือและอุปกรณ์สำหรับห้องปฏิบัติการปลอดเชื้อ ได้แก่ ตู้เชื้อเชื้อ หม้อนึ่งความดัน และตู้อบฆ่าเชื้อ เป็นต้น
7. สารเคมีสำหรับแยกเชื้อ symbiotic bacteria ให้บริสุทธิ์ ได้แก่ nutrient agar, nutrient broth, bromthymol blue, 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride เป็นต้น
8. วัสดุอุปกรณ์อื่นๆ ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ เครื่องแก้ว กระบอกพลาสติก กรวยแก้ว ขวดพลาสติกชนิด culture flask จานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 ซม. และกระดาษกรอง (Whatman #2) เป็นต้น
9. แมลงทดสอบชนิดและวัยต่างๆ ใน order Lepidoptera, Coleoptera, Orthoptera, Homoptera และ Blattodea
10. อาหารเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย ได้แก่ แหล่งอาหารโปรตีนจากสัตว์และพืช ไขมันสัตว์
11. ฟองน้ำสังเคราะห์ขนาดลูกเต๋า

วิธีการ

1. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย

1.1 การศึกษาวงจรชีวิต

ใช้หลอดทดสอบชนิด microtube (1.5 มล.) เจาะรูที่ฝา นำกระดาษกรอง Whatman # 2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงในหลอดทดสอบ และนำไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ระยะเข้าทำลาย จำนวน 100 ± 10 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 25 ไมโครลิตร หยดลงบนกระดาษกรองในหลอดทดสอบ จากนั้นนำหนอนกินรังผึ้ง น้ำหนัก 2.0-2.3 กรัม ใส่ 1 ตัวต่อ 1 หลอดทดสอบ ปฏิบัติจำนวน 60 หลอดทดสอบ (ซ้ำ) และเก็บที่อุณหภูมิห้อง 26 ± 2 °C นำหนอนมาผ่าทุก 24 ชม. จำนวน 5 ซ้ำ บันทึกผลช่วงเวลาการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ตั้งแต่เริ่มเข้าสู่ตัวหนอน และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นระยะต่างๆ ช่วงการผสมพันธุ์ของเพศผู้และเพศเมีย การวางไข่และลอกคราบ เป็นตัวอ่อนระยะต่างๆ จนครบ 1 วงจรชีวิต และทำการวัดขนาดความยาวลำตัวของไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ ($n=10$) โดยใช้ stage micrometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งตรวจนับผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะ IJ ที่ได้จากการขยายปริมาณในหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว เป็นเวลา 11 วัน โดยตรวจนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ 3 ซ้ำ (ตัว) ซ้ำละ 3 ครั้ง และคำนวณค่าเฉลี่ย

1.2 การศึกษาผลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิต

นำไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ระยะเข้าทำลาย จำนวน 300 ± 50 ตัว ที่อยู่ในน้ำกลั่น 500 ไมโครลิตร ใส่ลงใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ จากนั้นใส่หนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวต่อ dish นำไปวางที่อุณหภูมิ 15 20 25 30 และ 35 °C นำหนอนที่ถูกเข้าทำลายมาผ่าจำนวน 3 ตัว (ซ้ำ) ของแต่ละระดับอุณหภูมิ ที่เวลา 24 48 72 96 120 144 168 192 216 และ 240 ชม. บันทึกการเจริญเติบโต การขยายพันธุ์ในแต่ละระยะของไส้เดือนฝอยที่อุณหภูมิต่างๆ ของแต่ละช่วงเวลา

1.3 การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์และคุณลักษณะของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกับ *Heterorhabditis* sp.

สายพันธุ์ไทย

ปลูกเชื้อไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ระยะเข้าทำลายในหนอนกินรังผึ้งเป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำหนอนที่ถูกเข้าทำลายมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 75% และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดส่วนหัวของหนอนและใช้ลูบแต่น้ำเลือด นำมา streak บนอาหาร NBTA (37 g standard-I-nutrient agar, 25 mg bromthymol blue, 1,000 ml distilled water, 4 ml sterile filtrate 1 % 2,3,5

triphenyl-tetrazolium chloride solution) ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ ที่ไว้ 48 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°C บันทึกรูปร่างลักษณะของโคโลนีและการดูดสี bromthymol blue ของแบคทีเรียบนอาหาร NBTA และแยกโคโลนีเดี่ยวเก็บในหลอดอาหาร nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) เป็น stock culture เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4-10 °C

2. การศึกษาศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในการกำจัดแมลงศัตรูสำคัญ

2.1 ทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการฆ่าแมลง

วางแผนการทดลองแบบ CRD 5 กรรมวิธี 3 ซ้ำ โดยกรรมวิธีคือ อัตราไส้เดือนฝอย 0 4 6 8 และ 10 ตัวต่อหนอนทดสอบ 1 ตัว

ทดสอบความสามารถและความรุนแรงในการเกิดโรคกับแมลงทดสอบ ระยะตัวหนอนวัยก่อนเข้าดักแด้ (*Galleria mellonella*) โดยทำการทดลองในหลอดทดสอบชนิด microtube ขนาด 1.5 มล. เจาะรูที่ฝานำกระดาษกรอง Whatman # 2 ขนาด 1 x 1.5 ซม. ใส่ลงในหลอด ใส่ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. ระยะ IJ ในอัตราตั้งแต่ 0 4 6 8 10 ตัวต่อน้ำ 25 ไมโครลิตร นำหนอนทดสอบใส่ 1 ตัวต่อหลอด ปฏิบัติ 5 หลอดทดสอบต่ออัตราไส้เดือนฝอย เก็บที่อุณหภูมิ 25°C ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของแมลงที่ 12 24 36 และ 48 ชม. ปฏิบัติงานทดลอง 3 ซ้ำ (ครั้ง) วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.2 ทดสอบความทนทานต่ออุณหภูมิในการเข้าทำลาย (heat tolerance)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 6 กรรมวิธี 5 ซ้ำ โดยกรรมวิธีคือ อุณหภูมิระดับ 15 20 25 30 35 และ 40°C

ทดสอบความทนทานของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. ระยะ IJ ในการเข้าทำลายแมลงทดสอบ ระยะตัวหนอน (*G. mellonella*) ที่อุณหภูมิ 6 ระดับ โดยทำการทดลองใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 ซม. ที่บรรจุดินอบฆ่าเชื้อที่ใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 1,000 ตัว และวางหนอนทดสอบจำนวน 3 ตัวต่อ dish นำไปวางที่อุณหภูมิต่างๆ ตามกรรมวิธีจำนวน 5 ซ้ำ (dish) ต่ออุณหภูมิ ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนทดสอบที่เวลา 48 ชม. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี DMRT

2.3 ทดสอบ Pathogenicity กับแมลงศัตรูสำคัญ

ทดสอบศักยภาพของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ในการกำจัดแมลงรวม 15 ชนิด แบ่งเป็น order Lepidoptera ได้แก่ หนอนบุ้งชมพู (*Trabala vishnou*) หนอนเยื่อไผ่ (*Omphisca fuscidentalis*) หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) หนอนเจาะผลมะเขือ (*Leucinodes orbonalis*) หนอนเจาะผักกาด (*Maruca testulalis*) หนอนเจาะยอดกะหล่ำ (*Hellula undalis*) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) หนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) หนอนตำบัก (*Danaus genutia*) และหนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง (*Cossus* sp.) แมลงใน order Coleoptera ได้แก่ หนอนนก (*Tenebrio molitor*) แมลงใน order Orthoptera ได้แก่ แมลงกะซอน (*Gryllotalpa africana*) แมลงใน order Homoptera ได้แก่ เพลี้ยกระโดดสีน้ำตาล (*Nilaparvata lugens*) เพลี้ยจักจั่นสีเขียว (*Nephotettix virescens*) และ order Blattodea ได้แก่ แมลงสาบ (*Periplaneta americana*)

โดยทำการทดสอบใน Petri dish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5 และ 9 ซม. ตามขนาดของแมลงทดสอบ วางด้วยกระดาษกรอง Whatman # 2 ใส่ไส้เดือนฝอยจำนวน 1,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 และ 1.0 มล. ตาม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของ Petri dish 5 และ 9 ซม. ตามลำดับ นำแมลงแต่ละชนิดใส่ 3-10 ตัวต่อ Petri dish (ขึ้นกับขนาดของแมลง) เก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง ทำการตรวจนับการตายของแมลงแต่ละชนิดที่เวลา 24 และ 48 ชม. นำไปวิเคราะห์ผลเปอร์เซ็นต์การตาย (% mortality) ของแมลงโดยใช้ Abbott's formula (1925)

3. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทยในอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic

การเตรียมไส้เดือนฝอย

ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ระยะ IJ เตรียมได้จากการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินรังผึ้งเป็นเวลา 11-14 วัน ได้ไส้เดือนฝอย IJ รุ่นใหม่ นำมาล้างด้วย 0.1 % hyamine เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บไว้ในขวดพลาสติกชนิด culture flask ที่อุณหภูมิ 25 ± 2 °ซ เพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยง

การเตรียม symbiotic bacteria

แยกเชื้อจากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้งที่ถูกไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย เข้าทำลาย โดยใช้เทคนิคของ Akhurst (1980) streak บนอาหาร NBTA (37 g standard-I-nutrient agar, 25 mg bromthymol blue, 1,000 ml distilled water, 4 ml sterile filtrate 1 % 2,3,5 triphenyl-tetrazolium chloride solution) ทำการแยกโคโลนีเดี่ยวเก็บเป็น stock culture ในหลอดอาหาร nutrient agar (8 g nutrient broth, 15 g agar, 1,000 ml distilled water) นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4-10 °ซ

เมื่อเริ่มปฏิบัติงาน ทำการเชื้อแบคทีเรียจาก stock culture 1 ลูบ ที่เก็บรักษาไว้ไม่เกิน 30 วัน ลงในขวด Erlenmeyer flask ขนาด 125 มล. ที่มีอาหารชนิด nutrient broth (8 g Bacto nutrient broth, 1,000 ml distilled water) ปริมาตร 15 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า 120 รอบต่อนาที ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. เพื่อเพิ่มปริมาณเซลล์แบคทีเรียก่อนนำไปใช้เพาะเลี้ยงร่วมกับไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมสภาพ monoxenic culture

การเตรียมอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว

ผสมอาหาร 5 สูตร ตามอัตราส่วนกำหนด และคำนวณต้นทุนอาหารต่อลิตรดังนี้ :-

สูตรอาหาร	ส่วนผสมอาหาร	ราคาอาหาร/ลิตร (บาท)
BDM (control)*	ไคหมู 60% น้ำมันหมู 20% น้ำกลั่น 20%	60
MM 1**	นมถั่วเหลือง 90% น้ำมันหมู 10%	26
MM 2	ไข่ไก่ 60% น้ำมันหมู 20% น้ำกลั่น 30%	40
MM 3	เนื้อปลาทุ 60% น้ำมันหมู 20% น้ำกลั่น 30%	35
MM 4	อาหารสุนัขสำเร็จรูป (รสตับ) 60% น้ำมันหมู 20% น้ำกลั่น 30%	40

*BDM = Bedding medium [สูตรอาหารของ Bedding (1981)]

**MM 1, MM 2, MM 3 และ MM 4 = Modified medium 1, 2, 3, 4 [สูตรอาหารดัดแปลง]

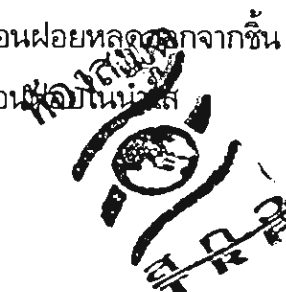
นำอาหารแต่ละสูตรคลุกกับฟองน้ำ (ขนาดลูกเต๋า) บรรจุลงในขวด flask ขนาด 250 มล. ในอัตราอาหาร 30 กรัม ต่อฟองน้ำ น้ำหนัก 2 กรัมต่อ flask นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที

การเพาะเลี้ยง

นำแบคทีเรียที่เลี้ยงเพิ่มปริมาณเซลล์จากอาหาร nutrient broth จำนวน 10⁷ เซลล์ โดยใช้วิธี ตรวจนับเซลล์ด้วย counting chamber จากนั้นนำไปหยดลงบนอาหารสูตรต่างๆ และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26±2 °ซ เป็นเวลา 24 ชม. เพื่อให้แบคทีเรียเจริญบนอาหาร หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอย IJ ที่เตรียมไว้จำนวน 20,000±2,000 ตัวต่อขวดที่บรรจุอาหารสูตรต่างๆ ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26±2 °ซ ไส้เดือนฝอย เจริญเติบโตและขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณเป็นเวลา 15 วัน

การแยกล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหาร

ปฏิบัติโดยขยำฟองน้ำของแต่ละสูตรอาหารในน้ำสะอาด 3 ครั้ง ให้ไส้เดือนฝอยหลุดออกจากชั้น ฟองน้ำ ตั้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้งและเติมน้ำสะอาด ทำซ้ำให้ได้ไส้เดือนฝอยในน้ำใส



การทดสอบศักยภาพในการกำจัดแมลง (quality control, QC)

เตรียมจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ที่มีกระดาษกรอง Whatman # 2 วางไว้ทำการใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ที่เพาะเลี้ยงจากอาหารแข็งกึ่งเหลว 5 สูตร เปรียบเทียบกับ IJ ที่เพาะเลี้ยงจากหนอน (host) อย่างละ 200 ตัวต่อจาน จากนั้นวางหนอนกินรังผึ้งจำนวน 10 ตัวในแต่ละจาน เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 26 ± 2 °ซ เป็นเวลา 48 ชม.

การบันทึกผล

- 1) จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย โดยตรงนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด LM จำนวน 5 ซ้ำต่อสูตรอาหาร คำนวณค่าเฉลี่ยผลผลิตต่อขวดเพาะเลี้ยง และเปรียบเทียบผลผลิตต่ออาหาร 1 ลิตร ของแต่ละสูตรอาหาร
- 2) ศักยภาพของไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงจากอาหารสูตรต่างๆ และไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากแมลงอาศัย โดยนับจำนวนหนอนทดสอบตายและคำนวณเปอร์เซ็นต์การตายของหนอนในแต่ละสูตรอาหาร

ผลงานทดลองและวิจารณ์

1. การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย

1.1 การศึกษาวงจรชีวิต

วงจรชีวิตในแมลงอาศัย (host) เริ่มจากตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (infective-stage juvenile, IJ) ซึ่งเป็นระยะที่มีความทนทานและอยู่ภายนอกตัวแมลงโดยไม่กินอาหารได้เป็นเวลานาน จนกว่าจะเข้าไปภายในตัวแมลง ซึ่งเป็นแหล่งอาหาร จึงสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. มีการเจริญเติบโต เปลี่ยนแปลงรูปร่างด้วยการลอกคราบ 4 ครั้ง ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน (juvenile stage) 4 ระยะ คือ ตัวอ่อนระยะที่ 1 (first-stage juvenile, J1) ตัวอ่อนระยะที่ 2 (second-stage juvenile, J2) ตัวอ่อนระยะที่สาม (third-stage juvenile, J3) หรือระยะเข้าทำลาย (IJ) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (fourth-stage juvenile, J4) และเจริญเป็นตัวเต็มวัย (adult stage) ประกอบด้วยเพศเมีย (female) และเพศผู้ (male) ผลการศึกษาวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ภายในหนอนทอดสอบ (*G. mellonella*) เป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิห้อง (26 ± 2 °C) เริ่มจากตัวอ่อนระยะ IJ ถึงระยะ IJ ที่ได้จากแม่ตัวที่ 2 (2nd generation) เคลื่อนที่ออกจากซากหนอนทอดสอบ เมื่อทำการใส่ไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. ระยะ IJ ขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 541 ไมครอน และความกว้างลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 22 ไมครอน (Figure 1D) จำนวน 100 ± 10 ตัวต่อหนอนทอดสอบ 1 ตัว ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนตัวเข้าสู่ตัวหนอนได้ทางช่องเปิดธรรมชาติ ได้แก่ ปาก รูทวาร หรือรูหายใจทางผิวหนัง และจากการผ่าหนอนทอดสอบจำนวน 5 ตัว (ตัว) ทุกๆ 24 ชม. พบการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวอ่อนระยะ ต่างๆ ที่มีรูปร่างและลักษณะทางสัณฐานวิทยาแตกต่างกัน จนถึงตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมีย มีลักษณะการขยายพันธุ์ภายในตัวแมลง 2 แบบ คือ ใน 1st generation เป็นแบบ hermaphroditic และ 2nd generation เป็นแบบ amphimictic จนได้ไส้เดือนฝอยรุ่นใหม่เคลื่อนที่ออกจากซากของแมลงจนครบวงจรชีวิต ผลการศึกษาการพัฒนาของไส้เดือนฝอยภายในตัวหนอนทอดสอบในแต่ละช่วงเวลา ผลการตรวจ ดังนี้ :-

ที่เวลา 24 ชม. ไส้เดือนฝอยเคลื่อนตัวเข้าสู่ตัวแมลงทางช่องเปิดธรรมชาติ ได้แก่ ปาก รูทวาร หรือรูหายใจทางผิวหนัง พบไส้เดือนฝอยระยะ IJ ภายในตัวแมลง จำนวนเฉลี่ยเท่ากับ 37 ตัวต่อหนอนทอดสอบ (หรือเท่ากับ 37 %) หนอนทอดสอบแสดงอาการอ่อนแอและเคลื่อนที่ช้าลง-หยุดนิ่ง

ที่เวลา 48 ชม. พบตัวอ่อนไส้เดือนฝอย 2 ระยะในตัวหนอนทอดสอบ คือ ระยะ IJ และ J4 จำนวน เฉลี่ยเท่ากับ 25 และ 21 ตัวต่อหนอนทอดสอบ ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ไส้เดือนฝอย IJ ยังเคลื่อนที่เข้าสู่หนอนเพิ่มขึ้นอีกในช่วงเวลา 48 ชม. เพิ่มเท่ากับ 9 ตัว รวมการเข้าสู่ตัวหนอนของ IJ เท่ากับ 46 ตัวต่อหนอน 1 ตัว (หรือเท่ากับ 46 %) ไส้เดือนฝอย IJ ที่เข้าสู่ตัวหนอนช่วง 24 ชม. แรก เริ่มทยอยลอกคราบและเจริญเติบโต

โตเป็นระยะ J4 ซึ่งมีขนาดลำตัวใหญ่ขึ้น ความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 1,279 ไมครอน และความกว้างเฉลี่ยเท่ากับ 70 ไมครอน (Figure 1E)

ที่เวลา 72 ชม. ในช่วงเวลาตั้งแต่ 48 ถึง 72 ชม. ไล่เดือนฝอยภายในตัวหนอนมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว จากระยะ J4 มีการพัฒนาเป็นเพศเมียแบ่งออกเป็น 2 ระยะ โดยพิจารณาแบ่งแยกจากการปรากฏตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์เพศเมียบริเวณกลางลำตัวแต่ยังไม่สร้างรังไข่ เรียกว่า young female และระยะที่ปรากฏรังไข่ 2 ข้าง เริ่มมีการผลิตไข่ภายในรังไข่เป็นระยะที่เรียกว่า adult female มีความยาวและความกว้างลำตัวขยายใหญ่ขึ้นเฉลี่ยเท่ากับ $1,776 \times 160$ ไมครอน (Figure 2A)

ที่เวลา 96 ชม. เป็นช่วงเวลาที่มีการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ (reproductive system) ซึ่งพบว่า ไล่เดือนฝอยที่เจริญเป็นตัวเต็มวัยมีการขยายพันธุ์แบบ hermaphrodite คือ เป็นตัวเมียเต็มวัยที่สามารถสร้างไข่ (ovary) ในท่อรังไข่ (oviduct) และผลิตน้ำเชื้อตัวผู้ (sperm) ในถุงเก็บเชื้อ (spermatozoa) ไข่ที่สร้างขึ้นได้รับการผสมเพื่อพัฒนาเป็นตัวอ่อนภายในตัวแม่

ที่เวลา 120 ชม. ในช่วงเวลาจาก 96-120 ชม. ไข่มีการผสม แบ่งเซลล์ และฟักเป็นตัวอ่อนระยะ J1 ภายในตัวแม่ ตัวแม่อุ้มท้องที่มีตัวอ่อนเบียดแน่นตลอดลำตัว ตัวแม่เริ่มเคลื่อนไหวช้าและตายในที่สุด และตัวแม่บางตัวพบว่ามี J1 เคลื่อนที่ออกจากตัวแม่ที่ตายแล้วโดยดันผนังลำตัวให้แตกออกทั้งทางส่วนหัวและหาง J1 มีขนาด ความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 335.4 ไมครอน ความกว้างเท่ากับ 15.7 ไมครอน (Figure 1A) พบ J1 เริ่มมีการเจริญเติบโตลอกคราบเป็นระยะ J2 มีขนาดความยาวลำตัวเฉลี่ยเท่ากับ 507 ไมครอน ความกว้างเท่ากับ 21.6 ไมครอน (Figure 1B) ไล่เดือนฝอย J1 และ J2 จัดเป็นรุ่นลูกในชั่วที่ 1 (first generation) ที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบ hermaphrodite

ที่เวลา 144 ชม. พบซากตัวเมียที่ตายแล้ว มีไล่เดือนฝอยระยะ J1 ในซากตัวแม่เคลื่อนที่ออกมา และปรากฏระยะ J2 และ J3 (Figure 2B-C) จำนวนมากภายในตัวหนอน

ที่เวลา 168 ชม. ในช่วงเวลาจาก 144-168 ชม. ไล่เดือนฝอยเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วจาก J4 เป็นตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Figure 3A-B) มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic โดยการ mating ของเพศผู้และเพศเมียเกิดขึ้นภายในตัวแมลง J4 ที่เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ หลังจากผสมพันธุ์กับตัวเมียแล้ว ตัวผู้จะตายอย่างรวดเร็ว อยู่ในช่วงประมาณไม่เกิน 12-18 ชม. จึงไม่พบหรือพบน้อยมากเมื่อผ่าหนอนที่เวลา 168 ชม. ตัวเมียที่ได้รับการผสมพันธุ์ มีลูก J1 อยู่ในลำตัวจำนวนมาก ตัวเมียยังไม่ตาย โดยพบการเคลื่อนไหวและลำตัวดำ

ที่เวลา 192 ชม. พบตัวเมียอุ้มท้องมี J1 อยู่ภายในลำตัว (Figure 3B) ซากตัวแม่ที่ตายแล้ว หลังจากถูกดันจากลูกอ่อน พบตัวอ่อน J1 และ J2 จัดเป็นรุ่นลูกในชั่วที่ 2 (2nd generation) ที่ได้จากการขยายพันธุ์แบบ amphimictic

ที่เวลา 216 ชม. และ 240 ชม. เนื้อเยื่อและน้ำเลือดของตัวหนอนเริ่มลดลง ผนังลำตัวของหนอนเริ่มแตก ประชากรไล่เดือนฝอยระยะ J3 อยู่ภายในหนอนจำนวนมาก เริ่มปรับสภาพเป็นระยะ J4 หรือระยะ

ที่เรียกว่า free living ที่สะสมอาหารสำรอง (food reserve) ในรูปของไขมัน (lipid) ที่บริเวณ hypodermal gland และส่วนลำไส้ เมื่อนำตัวหนอนทดสอบไปวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำ ไล่เดือนฝอยระยะ IJ ซึ่งเป็นตัวอ่อนระยะเดียวกันนั้นที่เคลื่อนที่ออกมาจากซากหนอน เป็นระยะที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม มีการสะสมอาหารสำรอง (food reserve) เป็นพวก fatty acid สะสมบริเวณลำไส้ ซึ่งสามารถสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบลำตัวของระยะ IJ มีสีดำ (Figure 4A) ดังนั้น ไล่เดือนฝอยสามารถอยู่รอดได้โดยไม่กินอาหารเป็นเวลานานจนกว่าจะพบแมลงอาศัย และเข้าไปเจริญเติบโต-ขยายพันธุ์ในตัวแมลงต่อไป

จากการนับจำนวนผลผลิตไล่เดือนฝอยระยะ IJ ที่ได้จากหนอน 1 ตัว ผลการตรวจนับจำนวนพบว่า หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สามารถผลิตไล่เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย เฉลี่ยเท่ากับ 213,300 ตัว ใน เวลา 11 วัน หลังการปลูกเชื้อ

ไล่เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. ระยะ IJ เมื่ออยู่ในน้ำ มีพฤติกรรมการรวมกลุ่มโดยพันปลายหางติดกัน มีลักษณะคล้ายดอกไม้ (Figure 4B) ซึ่งเป็นลักษณะทางชีววิทยาของไล่เดือนฝอยในสกุลนี้ที่มีความแตกต่างจากในสกุล *Steinernema* sp.

การศึกษาวงจรชีวิตของไล่เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย ภายในตัวแมลง (*G. mellonella*) ให้ข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาของสายพันธุ์ไทยและเป็นองค์ความรู้ใหม่ที่สำคัญต่อการพัฒนาไล่เดือนฝอยสายพันธุ์พื้นเมืองนี้ไปใช้ประโยชน์ในอนาคต จากผลการศึกษาทำให้ได้ข้อมูลความสามารถในการเข้าสู่ตัวหนอนทดสอบ การลอกคราบของไล่เดือนฝอยเพื่อการเจริญเติบโต พฤติกรรมการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้-เพศเมีย การขยายพันธุ์และให้ลูกรุ่นใหม่ ที่เกิดขึ้นในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งไล่เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* sp. มีความแตกต่างจากสกุล *Steinernema* sp. ของวิธีการขยายพันธุ์ โดย *Heterorhabditis* sp. มีการขยายพันธุ์แบบ hermaphrodite ใน 1 st generation และแบบ amphimictic ใน 2nd generation ส่วน *Steinernema* sp. ทั้งสอง generation เป็นแบบ amphimictic นอกจากนั้น ยังพบว่าระยะเวลาของวงจรชีวิตมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ไล่เดือนฝอย จากรายงานการศึกษาวงจรชีวิตของไล่เดือนฝอย *S. carpocapsae* พบว่า ครบ 1 วงจรชีวิตในแมลง larch sawfly (*Cephalcia lariciphila*) ใช้เวลา 11 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °ซ (Georgis, 1981) และ *S. arenarium* มีวงจรชีวิตเร็วที่สุดในหนอน *G. mellonella* เท่ากับ 5 วันครึ่ง ที่อุณหภูมิ 23 °ซ (Poinar and Kozodoi, 1988) ส่วนไล่เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย *S. thailandensis* n. sp. มีวงจรชีวิต 4 วัน (นุชนารถ และคณะ, 2543) ใกล้เคียงกับ *S. abbasi* ซึ่งเป็นไล่เดือนฝอยที่แยกได้จากประเทศโอมาน มีวงจรชีวิตเท่ากับ 4 วันครึ่ง ที่อุณหภูมิ 30 °ซ (Elawad et al., 1999) อย่างไรก็ตาม วงจรชีวิตของไล่เดือนฝอยจะช้าหรือเร็วขึ้นขึ้นกับชนิดของแมลงอาศัย ซึ่งเป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ภายในตัวแมลงอาศัยของไล่เดือนฝอย จากรายงานของ Nguyen and Smart (1992) พบว่า *S. scapterisci* เฉพาะเจาะจงกับแมลงกะซอน (mole cricket, *Scapteriscus borelli*) ซึ่งเป็นแมลงในกลุ่ม Orthoptera (Gryllotalpidae) มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดี และวงจรชีวิตอยู่ระหว่าง 6-7 วัน ที่อุณหภูมิ 24 °ซ แต่ถ้าเจริญเติบโตและ

ขยายพันธุ์ในแมลงกลุ่มหนอนผีเสื้อ (Lepidoptera) พบว่า วงจรชีวิตใช้เวลา 10-11 วัน และการขยายพันธุ์ภายในตัวแมลงไม่ดี ตัวเมียให้ลูกได้น้อย

ดังนั้น การศึกษาชีววิทยาของไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคในแมลง ยังมีความหลากหลายของชนิดและสายพันธุ์ รวมทั้งแมลงอาศัยที่เฉพาะเจาะจง ซึ่ง Poinar (1979) รายงานว่า ไส้เดือนฝอยเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด แต่ความรุนแรงในการเข้าทำลาย การเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ ยังคงขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยเป็นสำคัญ

การศึกษาวงจรชีวิตของ *Heterorhbaditis* sp. สายพันธุ์ไทยชนิดใหม่นี้ ได้ทำการทดสอบในหนอน *G. mellonella* เพียงชนิดเดียว ซึ่งเป็นแมลงที่นักวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั่วโลกยอมรับและนำมาใช้เป็นแมลงทดสอบเบื้องต้น เนื่องจากเป็นแมลงในกลุ่มของหนอนผีเสื้อที่เป็นศัตรูพืชสำคัญทางการเกษตร และยังสามารถเพาะเลี้ยงหนอนชนิดนี้ได้จากอาหารเทียม อย่างไรก็ตาม การนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น หนอนกระทู้หอม หนอนใยผัก หนอนเจาะสมอฝ้าย หนอนดั่งต่างๆ ปลวก แมลงกะซอน และแมลงสาบ ฯลฯ ควรทำการศึกษาวงจรชีวิตในแต่ละแมลงศัตรูพืช เพื่อได้ข้อมูลทางชีววิทยาที่จะเป็นประโยชน์ในการนำไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยไปใช้ให้ประสบผลสำเร็จกับแมลงเป้าหมายนั้นๆ

นอกจากนั้น การขยายพันธุ์ของตัวเมียแบ่งเป็น 2 ลักษณะ ในช่วงเวลาต่างกัน โดยการขยายพันธุ์แบบ hermaphrodite เกิดตั้งแต่ช่วงเวลา 72-120 ชม. และแบบ amphimictic เกิดที่ช่วงเวลา 144-192 ชม. ซึ่งในช่วงของการวางไข่และ/หรือผสมพันธุ์นั้น เป็นช่วงที่ตัวเมียหรือตัวผู้มีขนาดใหญ่ เคลื่อนไหวช้า และมีพฤติกรรมการจับคู่เพื่อผสมพันธุ์ในช่วง amphimictic องค์ความรู้เหล่านี้สำคัญต่อกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในอาหารเหลวระดับถังหมัก (fermenter) ที่ต้องมีการกวนอาหารด้วยใบพัดเพื่อให้ออกซิเจนหมุนเวียนภายในถังหมัก ใบพัดจะมีผลกระทบต่อกระบวนการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ส่งผลถึงผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ ดังนั้น ในช่วงเวลาของการจับคู่ผสมพันธุ์ จึงควรปรับจังหวะการกวนของใบพัดให้เหมาะสม ผลการศึกษานี้จะเป็นข้อมูลที่เป็นประโยชน์ต่อกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยในเชิงการค้าต่อไป

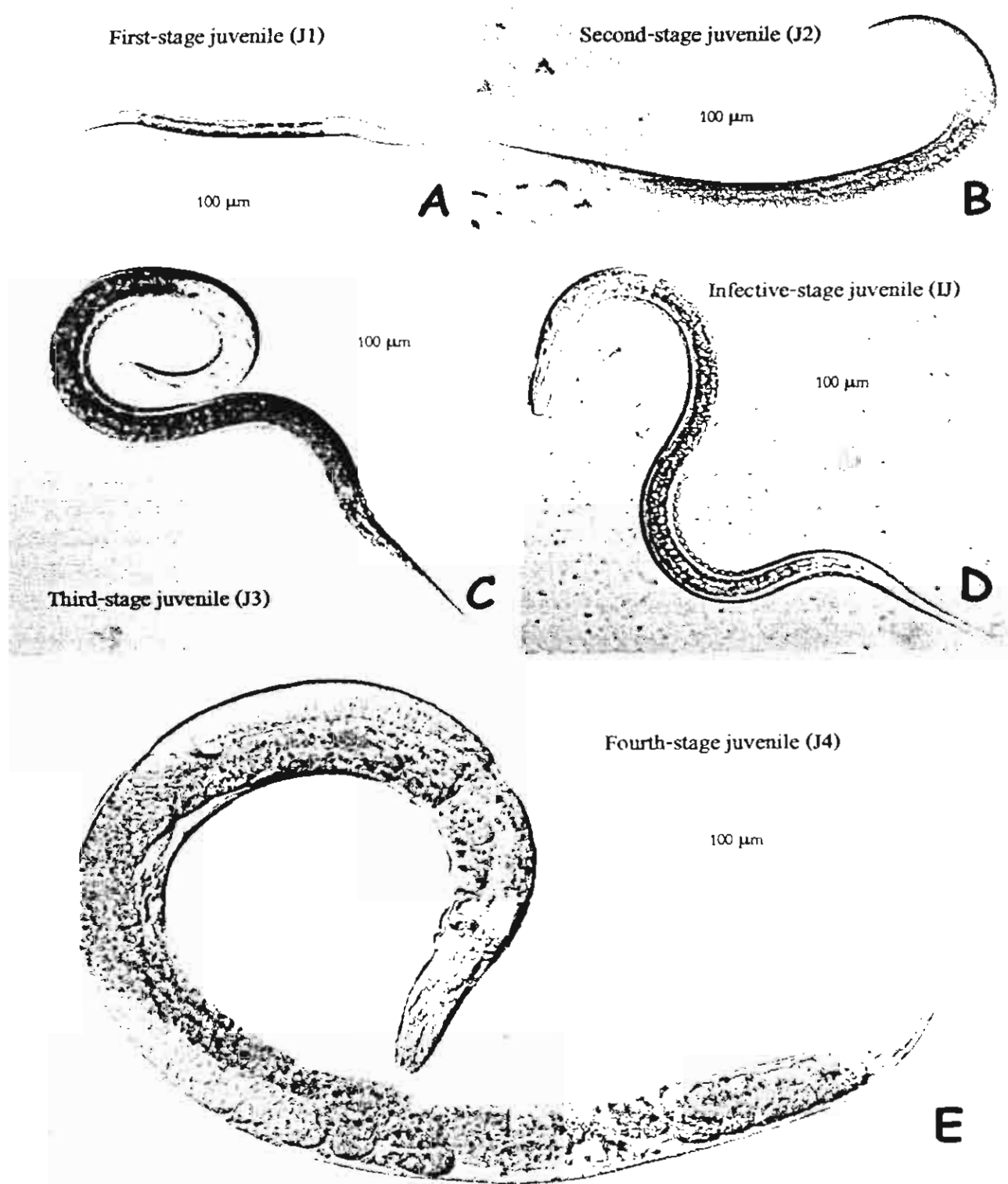


Figure 1 Growth stages of *Heterorhabditis* sp. Thai strain.

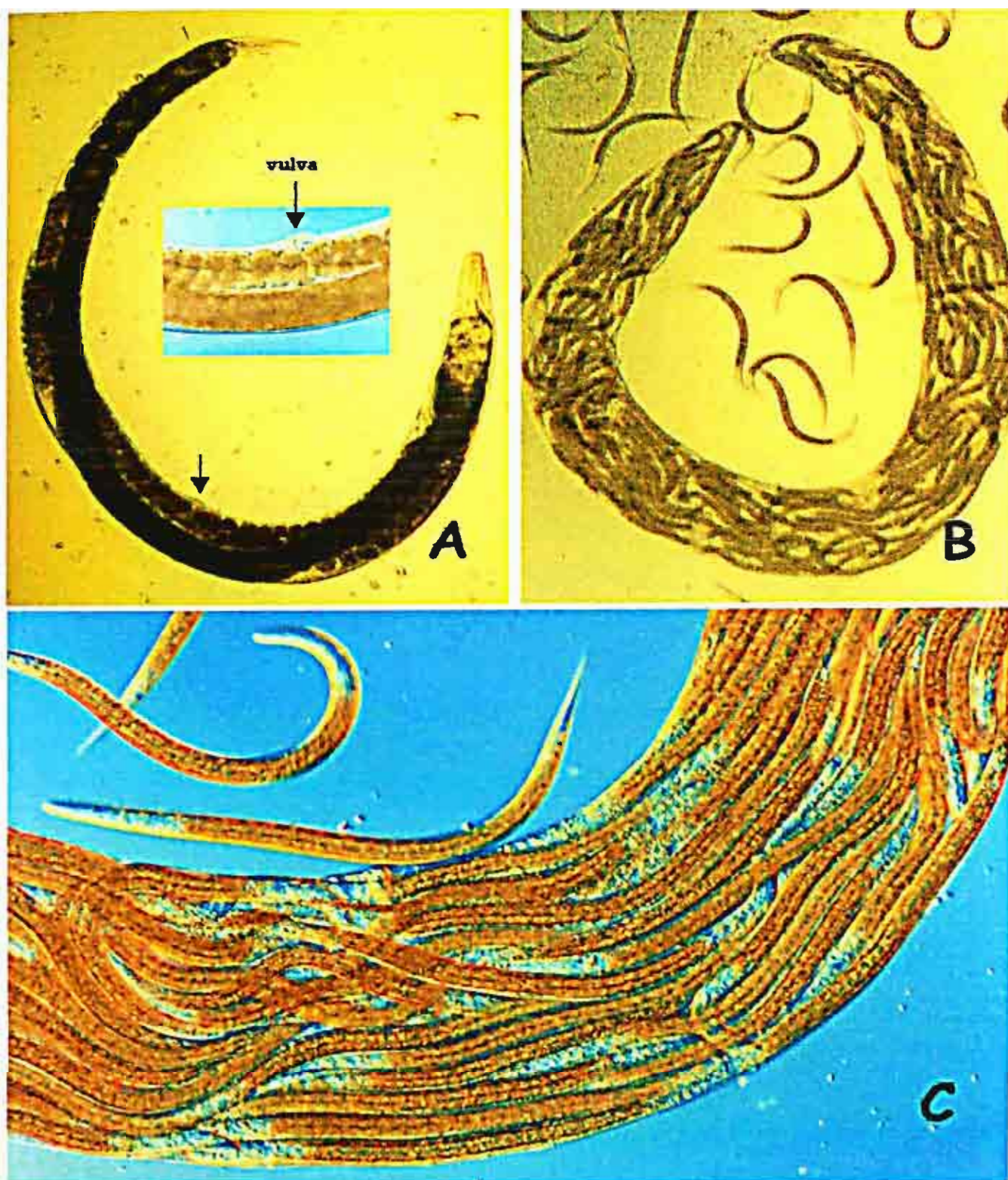


Figure 2 Hermaphroditic female of *Heterorhabditis* sp. Thai strain, A) entire body and vulva; B) and C) first and second-stage juveniles in hermaphroditic female body.

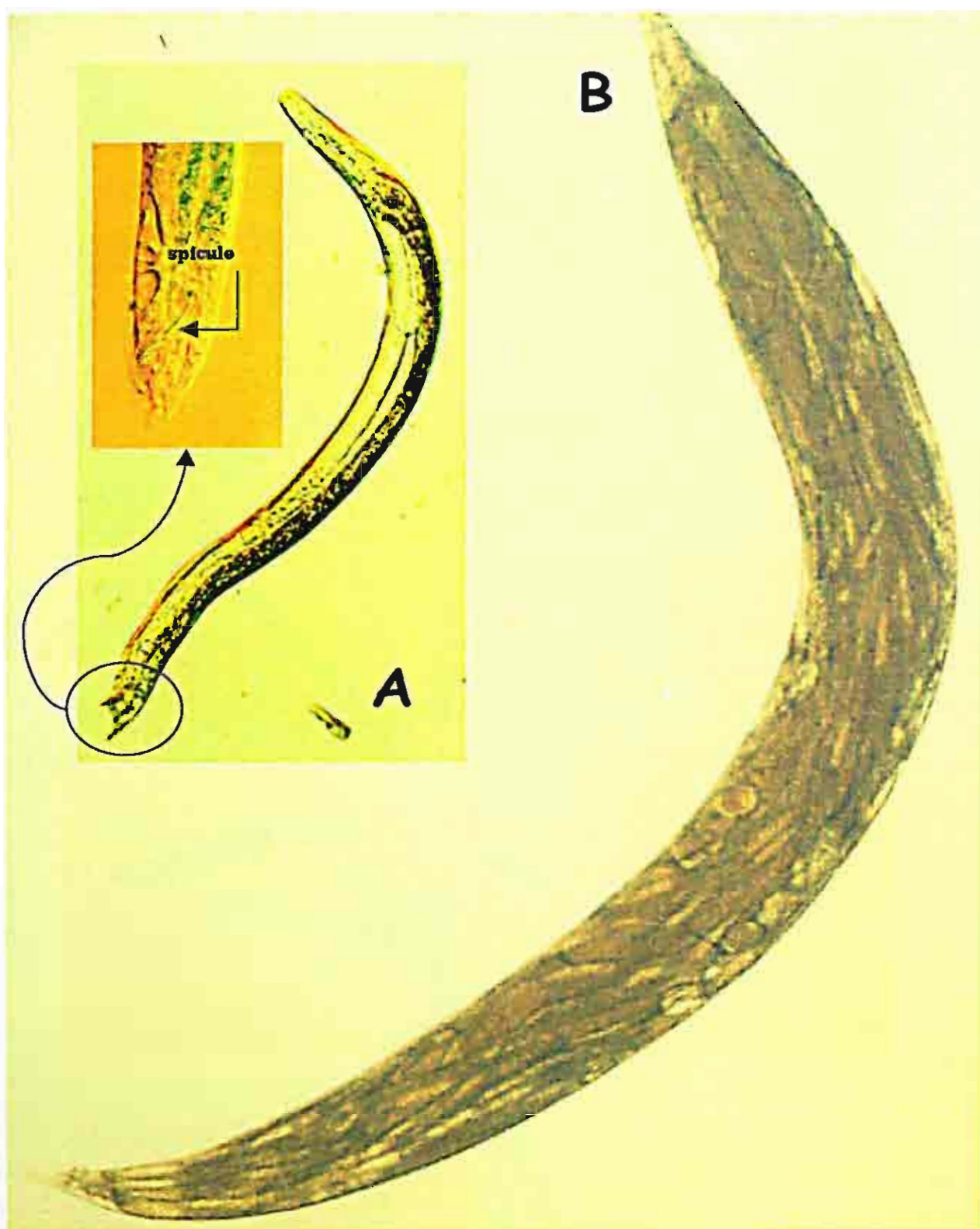


Figure 3 Adult stages of *Heterorhabditis* sp. Thai strain, A) entire body and spicule of male; B) juvenile stage in amphiditic female body.

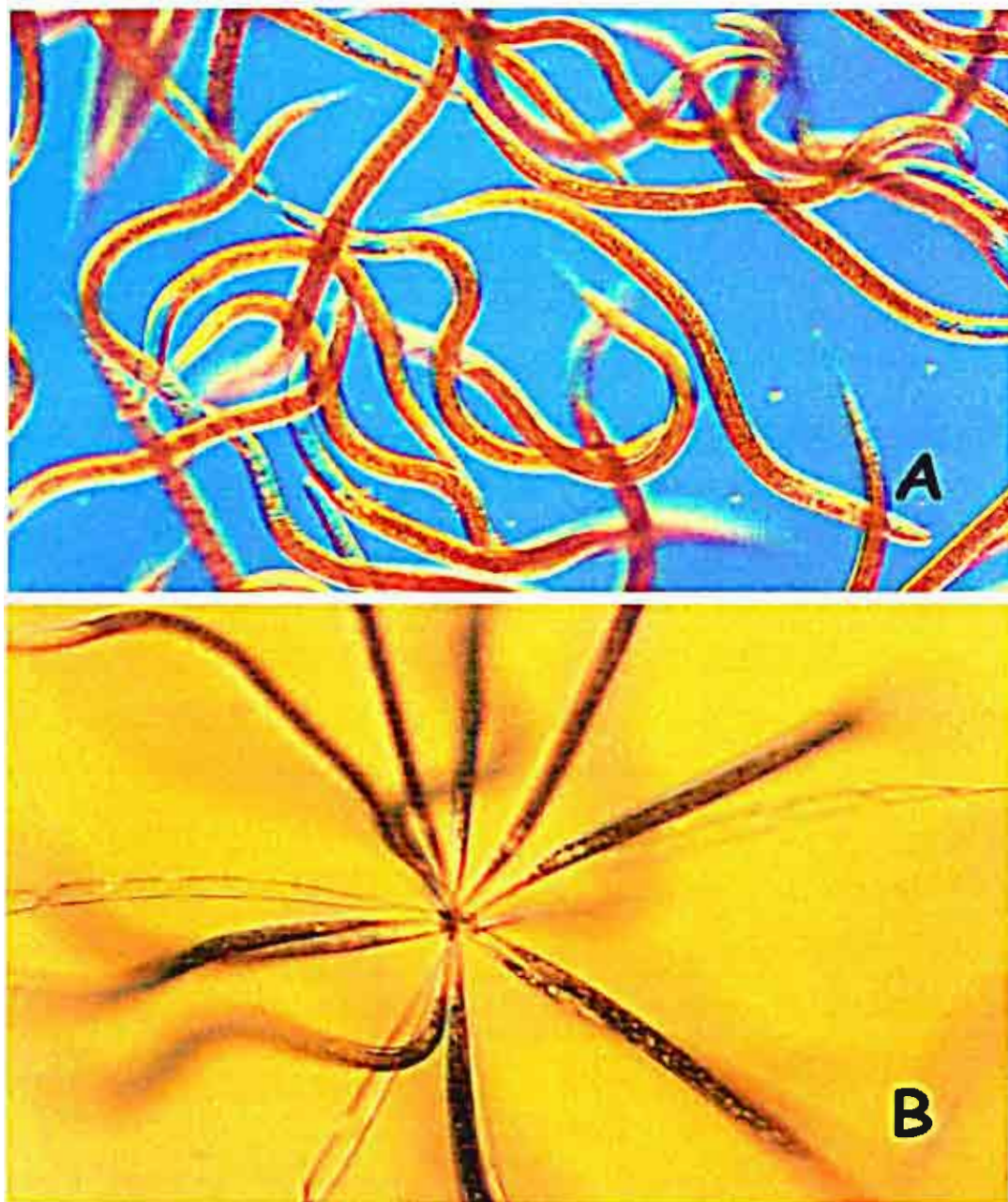


Figure 4 Infective-stage juveniles (IJs) of *Heterorhabditis* sp. Thai strain, A) second generation of IJs moved out from insect cadavers after inoculated 11 days; B) to combine of IJs like a flower.

1.2 อิทธิพลของอุณหภูมิต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย

ผลจากการศึกษาพบว่า ระดับของอุณหภูมิมิมีผลต่อวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย ทั้งในด้านการเจริญเติบโตและจำนวนวันของการครบวงจรชีวิตเร็วหรือช้า โดยพบว่าอุณหภูมิต่ำ (15°C) ไส้เดือนฝอยไม่เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ ที่อุณหภูมิปานกลาง (20°C) มีการพัฒนาได้จนถึงตัวเมียชนิด hermaphroditic เท่านั้น ที่อุณหภูมิสูง (35°C) ไส้เดือนฝอยพัฒนาได้เพียง J4 และไม่สามารถเจริญเป็นตัวเต็มวัยได้ ดังนั้น อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเปลี่ยนแปลงรูปร่างและขยายพันธุ์ อยู่ระหว่าง $25-30^{\circ}\text{C}$ มีวงจรชีวิตสั้นที่สุดคือ 5-6 วัน ในการขยายพันธุ์แบบ hermaphroditic และ 9-10 วัน ในการขยายพันธุ์แบบ amphimictic ภายในตัวแมลงทดสอบ รายละเอียดในแต่ละระดับอุณหภูมิ อธิบายได้ดังนี้ :-

ที่อุณหภูมิ 15°C ไส้เดือนฝอยระยะ IJ เข้าสู่หนอนทดสอบได้เพียงเฉลี่ย 2 % และหลังจากนั้นไม่พบการเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย เมื่อผ่าหนอนตรวจทุก 24 ชม. เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยคงสภาพความชีวิตเป็นระยะ IJ ภายในตัวหนอนทดสอบหยุดเพียงเท่านั้น

ที่อุณหภูมิ 20°C ไส้เดือนฝอย IJ เข้าสู่ตัวหนอนเฉลี่ย 15 % มีการเจริญเติบโตและพัฒนาช้าใช้เวลา 2 วัน จึงลอกคราบจาก IJ เป็น J4 จากนั้น J4 เปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัยเพศเมียชนิด hermaphroditic ใช้เวลาเพิ่มอีก 1-2 วัน หลังจากนั้นตัวเมียให้ลูกรุ่นที่ 1 เมื่อเวลาผ่านไป 7 วัน และลูกรุ่นที่หนึ่งทยอยเจริญเติบโตอย่างช้าๆ จาก J1 เป็น J2 J3 และ J4 จนถึง 10 วัน ที่ทำการตรวจ ยังไม่พบตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมียชนิด amphimictic

ที่อุณหภูมิ 25°C ไส้เดือนฝอยระยะ IJ เข้าสู่หนอนทดสอบคิดเป็น 38 % IJ ทยอยลอกคราบเป็น J4 ในระหว่างช่วงวันที่ 2 และ 3 ปรากฏตัวเต็มวัยเพศเมียชนิด hermaphroditic ให้เห็นในวันที่ 3 และ 4 ในวันที่ 5 ได้ลูกตัวที่ 1 และพัฒนาจาก J1 เป็น J2 J3 และ J4 ในระหว่างวันที่ 6 7 และ 8 พบทุกระยะของไส้เดือนฝอย ได้แก่ ตัวอ่อน 4 ระยะ และตัวเต็มวัยเพศผู้-เพศเมียชนิด amphimictic เป็นช่วงที่มีการสืบพันธุ์ให้ลูกตัวที่ 2 ในช่วงวันที่ 9 และ 10 หลังจาก inoculate หนอนทดสอบเริ่มแห้ง ไส้เดือนฝอยที่พบเป็นระยะ IJ จำนวนมากอยู่ภายในตัวหนอน และเริ่มเคลื่อนที่ออกจากซากหนอนเมื่อนำไปวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำ

ที่อุณหภูมิ 30°C ไส้เดือนฝอยระยะ IJ เข้าสู่หนอนทดสอบคิดเป็น 22 % แต่การเจริญเติบโตและพัฒนาของไส้เดือนฝอยเร็วกว่าที่อุณหภูมิ 25°C โดยพบว่าในวันที่ 3 พบลูกตัวที่ 1 ที่เกิดจากตัวเมียชนิด hermaphroditic ได้แก่ J1 J2 และ J3 ในช่วงวันที่ 4 และ 5 ทยอยเจริญเติบโต และในวันที่ 6 พบตัวเมียและตัวผู้ การขยายพันธุ์แบบ amphimictic เริ่มขึ้น ตั้งแต่วันที่ 6 พบลูกตัวที่ 2 ในวันที่ 8 ในวันที่ 9 และ 10 ไส้เดือนฝอย IJ เคลื่อนตัวออกจากซากหนอนเมื่อนำไปวางบนกระดาษกรองชุ่มน้ำ

ที่อุณหภูมิ 35°C ไส้เดือนฝอย IJ มีความสามารถเข้าสู่หนอนทดสอบเฉลี่ย 5 % และสามารถพัฒนาเป็น J4 ได้ในวันที่ 2 แต่เมื่อผ่าหนอนในวันที่ 3-5 ไส้เดือนฝอย J4 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นตัวเต็มวัย และในวันที่ 6 เป็นต้นไป ไม่พบไส้เดือนฝอยภายในตัวหนอน แสดงว่า J4 ไม่มีการพัฒนาและตายภายในตัวหนอนทดสอบ

จากการศึกษาผลของระดับอุณหภูมิต่ออัตราการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. สายพันธุ์ไทย แสดงให้เห็นว่า อุณหภูมิเป็นปัจจัยสำคัญและมีผลกระทบสูงต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย รวมถึงความสามารถในการเข้าสู่ตัวแมลง โดยที่อุณหภูมิต่ำ 15°C ไส้เดือนฝอยมีความสามารถเข้าสู่ตัวแมลงได้เพียง 2 % และไม่มีการเจริญเติบโต-ขยายพันธุ์ แต่คงความมีชีวิตภายในตัวหนอนนั้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ การทดสอบที่อุณหภูมิสูง 35°C ไส้เดือนฝอยเข้าสู่ตัวแมลงได้ใกล้เคียง (5%) IU พัฒนาได้เพียงระยะ J4 เท่านั้น และตายในเวลาต่อมา แสดงให้เห็นว่าอุณหภูมิมีผลต่อความทนทานและความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย เมื่อนำมาพิจารณาเปรียบเทียบระหว่างสายพันธุ์ไทยด้วยกัน คือ *Steinernema thailandense* n. sp. ที่แยกได้จากจังหวัดกาญจนบุรี (Tangchitsomkid, 2000) จัดเป็นสายพันธุ์ที่ทนร้อน (heat tolerance) ซึ่งมีความทนทานต่ออุณหภูมิได้สูงมากกว่า 35°C และยังคงศักยภาพในการฆ่าแมลงได้ที่อุณหภูมิสูงถึง 38 °C (นุชนารถ และคณะ, 2543) จึงมีความแตกต่างจากสกุล *Heterorhabditis* sp. ที่แยกได้จากจังหวัดร้อยเอ็ด และทำการทดลองในครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า สกุลของไส้เดือนฝอย ถึงแม้จะเก็บได้จากพื้นที่ในประเทศไทยและเป็นสายพันธุ์ไทยเช่นกัน แต่ชีววิทยาของไส้เดือนฝอยมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจน ดังนั้น การศึกษาข้อมูลทางชีววิทยาในแต่ละสกุล ชนิด และสายพันธุ์ จึงมีความสำคัญยิ่งต่องานวิจัยและพัฒนาสกุลใดสกุลหนึ่งให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างแท้จริง