

โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอย ศัตรูแมลงในระดับการค้า

กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร



คำนำ

จากความพยายามในการลดปัญหาการใช้สารเคมีที่มีพิษของเกษตรกรในการควบคุมแมลงศัตรูพืช จึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีการต่างๆ เพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีดังกล่าว ไล่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* จัดได้ว่าเป็นชีววินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ประโยชน์เพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชเนื่องจากมีลักษณะเด่นหลายประการ งานวิจัยทางด้านนี้ได้ดำเนินต่อเนื่องกันมาตั้งแต่ปี 2535 และในช่วงปี 2538 – 2542 ด้วยความร่วมมือระหว่างนักวิชาการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กับนักวิชาการภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ได้จัดตั้งโครงการ “วิจัยและพัฒนาการผลิตไล่เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า” โดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ให้การสนับสนุนทางด้านงบประมาณในการวิจัย จากการดำเนินงานเป็นระยะเวลา 4 ปี สามารถพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไล่เดือนฝอยสำเร็จ จนสามารถถ่ายทอดให้บริษัทเอกชนนำไปผลิตได้ ซึ่งก่อให้เกิดธุรกิจใหม่ทางการเกษตร ลดการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชจากต่างประเทศ ไม่มีผลกระทบต่อสภาพแวดล้อม ลดปัญหาที่ประเทศต่างๆ นำเงื่อนไขด้านการปนเปื้อนสารพิษเป็นเครื่องกีดกันทางการค้าสำหรับสินค้าเกษตรจากประเทศไทย

การที่คณะผู้วิจัยได้รวบรวมผลงานวิจัยทั้งหมดของโครงการ “วิจัยและพัฒนาการผลิตไล่เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า” และจัดพิมพ์รูปเล่มในครั้งนี้ก็เพื่อที่จะเผยแพร่งานวิจัยทางด้านนี้ให้มากขึ้น และงานวิจัยนี้เป็นตัวอย่างของงานด้านวิจัยและพัฒนาชีววินทรีย์เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประสบความสำเร็จค่อนข้างสมบูรณ์

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยที่ได้เห็นความสำคัญพร้อมทั้งการสนับสนุนงบประมาณ กรมวิชาการเกษตรและมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ อุปกรณ์เครื่องมือในการวิจัยจนทำให้งานวิจัยดำเนินไปอย่างมีประสิทธิภาพ

สุดท้ายใคร่ขอขอบคุณนักวิจัยผู้ช่วยปฏิบัติงานในโครงการฯ คือ น.ส.รุ่งอรุณ ขุนณรงค์ น.ส.พัชรวิพรรณ จงจิตเมตต์ และ น.ส.จุฑาพรรณ ไชวเจริญสุข ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยประสบความสำเร็จลุล่วงไปด้วยดีตามวัตถุประสงค์

คณะผู้วิจัย

กุมภาพันธ์ 2544

โครงการวิจัยและพัฒนการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า

บทคัดย่อ

ความพยายามในการนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทางการเกษตร เพื่อทดแทนการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เกษตรกรได้ใช้กันมากกว่าทศวรรษ จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ซึ่งมีชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* มีศักยภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและในธรรมชาติที่มีสภาพแวดล้อมเหมาะสม และด้วยคุณสมบัติเด่นอีกหลายประการ กรมวิชาการเกษตรจึงได้สนับสนุนการวิจัยและพัฒนการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* อย่างต่อเนื่อง ในระยะแรกการวิจัยประสบความสำเร็จในการผลิตโดยใช้อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) และได้ถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่บริษัทเอกชนหลายแห่งนำไปผลิตจำหน่าย แต่ยังมีข้อจำกัดที่ต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูงเมื่อขยายการผลิตเป็นปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรม เพราะต้องขยายทั้งพื้นที่และแรงงาน

ในเดือนพฤศจิกายน 2538 ได้เริ่มโครงการวิจัยและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในเชิงอุตสาหกรรมด้วยวิธีการด้าน Fermentation Technology โดยได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ผลการวิจัยได้พัฒนาสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสม สามารถผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective Juvenile, IJ) ทั้งในระดับขวดเขย่า (shake flask) และระดับถังหมัก (fermentor) ขนาด 6 ลิตร ได้ผลผลิตสูงระหว่าง 300,000 - 400,000 ตัว/อาหารเหลว 1 มิลลิลิตร นอกจากนั้นยังพัฒนาเครื่องมือและอุปกรณ์ที่มีประสิทธิภาพสูงในการแยกและล้างไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ทำให้ได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่สะอาด มีคุณภาพไม่เปลี่ยนแปลง รวมทั้งพัฒนาวิธีการเก็บรักษาและบรรจุหีบห่อไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ โดยการเก็บในฟองน้ำสังเคราะห์และในรูปผงบรรจุในถุงพลาสติก สามารถเก็บรักษาไส้เดือนฝอยได้นาน 1 ปี ที่อุณหภูมิ 6° ซ. มีอัตราการรอดชีวิตสูงถึง 80% และในช่วง 4 เดือนแรกประสิทธิภาพในการทำลายหนอนไม่เปลี่ยนแปลง นอกจากนั้นวิธีบรรจุหีบห่อยังสะดวกในการขนส่ง และมีต้นทุนการผลิตต่ำ

การวิจัยและพัฒนาเพื่อให้ได้กระบวนการผลิตที่ใช้อาหารเหลวจัดว่าเป็นวิธีการผลิตที่สมบูรณ์แบบและครบวงจรสามารถลดต้นทุนการผลิตลงได้มากกว่า 60% เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยใช้อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว ต่อมาได้มีการถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตให้แก่เอกชนคือ บริษัทยูนิซิดส์ จำกัด ซึ่งได้ทำสัญญาลงนามร่วมกับกรมวิชาการเกษตร และสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ในการลงทุนสร้างโรงงานต้นแบบและดำเนินการผลิตไส้เดือนฝอยในเชิงอุตสาหกรรม ซึ่งมีคณะผู้วิจัยเป็นผู้ดูแลและควบคุมโดยกำหนดแผนการผลิต 8,000 ชอง/เดือน ใน

ขจะขยายการผลิตให้มากขึ้นในโอกาสต่อไป นอกจากนั้นยังดำเนินงานส่งเสริมการตลาด เพื่อให้เกษตรกรนำไ้เดือนฝอยที่ผลิตได้ไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช ทดแทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลงที่เป็นอันตรายทั้งต่อตัวเกษตรกรเองและต่อสภาพแวดล้อม รวมทั้งยังเป็นการลดปริมาณการนำเข้าสารเคมีฆ่าแมลงจากต่างประเทศ ซึ่งจะก่อให้เกิดผลดีต่อเศรษฐกิจของประเทศโดยรวม

Research and Development for Commercial Production of Entomopathogenic Nematodes

Abstract

Chemical pesticides have been the practical method used by farmers for many decades, but their side-effects on non-target organisms, groundwater contamination, residues on food crops and the development of insect resistance to chemicals have forced both the government and industrial sectors to focus on the development of alternative control measures. Alternatives, including entomopathogenic nematode, characterized by their mutualistic relationship with *Xenorhabdus* bacteria have been sought. *Steinernema carpocapsae*, the high potential insect nematode has emerged as an excellent candidate for biological control of insect pests. Attributes making the nematode ideal biological insecticide include its broad host ranges, high virulence, safety for non-target organism and high efficacy for controlling insect pests in favourable habitats.

The research on the use of entomopathogenic nematode for controlling insect pests in Thailand has begun since 1986. The field trials were firstly conducted in Chantaburi province to determine the effectiveness of *Steinernema carpocapsae* against bark-eating caterpillars, *Cossus* sp. (Lepidoptera : Cossidae) and *Microchlora* sp. (Lepidoptera : Pyralidae), the serious insect pests of Longkong (*Lansium domesticum*). Nematode suspension was sprayed at the concentration of 2000 nematodes/ml. along the stems and twigs of longkong tree in the evening, and 80% mortality of bark-eating caterpillars were found after the application for 24 hours. The nematodes used were cultured *In Vivo* by using the cotton bollworm (*Heliothis armigera*). The cost of producing nematode suspension by insect host was rather high about 36 baht for 4×10^6 nematodes.

In 1988, as a result of the first success in the efficacy field trials, the research on production technology of large quantities of the insect nematode *S. carpocapsae* by using artificial media received much attention and was strongly supported by the Department of Agriculture. Mass production by semi-solid artificial medium was successfully developed and later on the technologies have been adopted by a number of commercial companies which could produce nematode at a cost of 30 - 40 baht per 1 sachet of 4 million nematodes. Anyway, there were some limitations in the potential production of large quantities of insect nematode, either

by semi-solid medium or *In Vivo* process which needs more labor and capital in order to get success.

During 1991 – 1993 the further field trials were conducted successfully for controlling striped flea beetle *Phyllotreta sinuata* (Coleoptera : Chrysomellidae), sweet potato weevil *Cylas formicarius* (Coleoptera : Curculionidae) and beet armyworm *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) which are the important pests of chinese radish, sweet potato and marigold respectively. In comparison with chemical insecticides the application of the nematode-based product was limited only for the high value crops because of its high cost.

In November 1995, the project of research and development on the fermentation technology for commercial production of entomopathogenic nematode was established under the support from The Thailand Research Fund (TRF).

The suitable liquid medium and key factors necessary for development and reproduction of *S. carpocapsae* were found. In approximately 2 weeks product yields as high as 300,000 nematodes (Infective Juveniles) per milliliter in shake flasks and yields of 400,000 nematodes per milliliter in fermentors were obtained. The equipments used for settling the nematode and filtration processes to clean and to separate the nematode from the culturing medium were developed. Powder formulation of the insect nematode utilizing attapulgit clay as carrier packed in a sealed polyethylene bag covered with aluminium foil, which is proved to be the recommended storage condition suitable for maintaining the high virulence and high percentage of nematode survival for one year, had been carried out. The liquid production process can reduce more than 60% of capital cost compared to the semi-solid media production processes.

Recently, this production technology was already adopted by the private company, Uniseed Co.,Ltd. which signed contact with Department of Agriculture and The Thailand Research Fund for the support on establishments of a pilot plant producing the nematodes commercially 8,000 sachets (4×10^6 nematodes per sachet) per month which so far are the largest number of nematode production. The increasing capacity of production will be planned in the coming year (year 2000). These efforts have led to a successful introduction of the nematode-based product into the local markets which plays an important role as one of biopesticides to substitute the imported chemical insecticides and to be used as alternatives for insect pest control measures which can save the quality of farmer's lives. Therefore, this technological advancement in the nematode production process will be beneficial to the country's agricultural environment and economic.

ความเป็นมา และความสำคัญของงานวิจัย

ปัจจุบันการเกษตรของประเทศไทยมุ่งเน้นการผลิตเพื่อส่งออกไปจำหน่ายต่างประเทศ และแปรรูปสินค้าเป็นสินค้าอุตสาหกรรมเกษตร ดังนั้นเกษตรกรจึงต้องเพิ่มผลผลิตให้มากขึ้น โดยขยายพื้นที่การปลูกพืชและเพิ่มผลผลิตต่อหน่วยพื้นที่ มีการใช้ปัจจัยการผลิตทุกรูปแบบ ปัจจัยที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ การใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการป้องกันกำจัดศัตรูพืช ได้มีการนำเข้าสารเคมีหรือสารพิษเหล่านี้มากในแต่ละปี และมีแนวโน้มจะเพิ่มปริมาณขึ้นเรื่อยๆ ในช่วงปี 2536 มีการนำเข้าสารเคมีกำจัดศัตรูพืชและสัตว์สูงถึง 18,000 ตัน คิดเป็นมูลค่า 3,500 ล้านบาท (สถิติการนำเข้าสารกำจัดศัตรูพืช พ.ศ. 2536 กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร)

การใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเป็นจำนวนมากก่อให้เกิดปัญหาต่างๆ คือ

ก. อันตรายต่อสุขภาพของตัวเกษตรกรผู้ใช้โดยตรงและมีพิษตกค้างในผลิตผลต่อผู้บริโภค ในขณะที่เกษตรกรขาดความเข้าใจในการใช้สารเคมีที่ถูกต้อง และขาดความระมัดระวังในขณะปฏิบัติงาน จากการสำรวจสถิติมีผู้ป่วยเนื่องจากสาเหตุเหล่านี้ ในปี 2533 สูงถึง 4,851 คน และเสียชีวิต 39 คน (รายงานการเฝ้าระวังโรคประจำปี 2533 กองระบาดวิทยา กระทรวงสาธารณสุข) และผู้ที่ได้รับสารเคมีเหล่านี้มีโอกาสเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งสูง

ข. ก่อให้เกิดมลพิษโดยตรงและทางอ้อม

ค. ก่อให้เกิดความต้านทานต่อสารเคมีของแมลงศัตรูพืช

ง. มีผลกระทบต่อแมลงที่มีประโยชน์ เช่น แมลงศัตรูธรรมชาติ, แมลงผสมเกสร, ทำให้เกิดการเสียสมดุลธรรมชาติ และนิเวศน์เกษตร

นอกจากนี้ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ได้กำหนดนโยบายเคมีเกษตร โดยมีจุดมุ่งหมายที่ชัดเจนในการลดการใช้สารเคมีที่มีอันตราย และในขณะเดียวกันก็สนับสนุนให้เพิ่มทางเลือกอื่น ๆ มาทดแทนในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชเพื่อหลีกเลี่ยงปัญหาต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ตลอดจนเป็นการลดการนำเข้าสารเคมีอันตรายจากต่างประเทศซึ่งมีราคาแพงและพิษสูง และลดปัญหาอุปสรรคในการส่งสินค้าเกษตรกรรมไปขายในตลาดต่างประเทศด้วย

จากความพยายามในการลดปัญหาที่เกิดจากการใช้สารเคมีที่เป็นพิษในการควบคุมแมลงศัตรูพืช จึงได้มีการค้นคว้าหาวิธีต่างๆ เพื่อนำมาทดแทนการใช้สารเคมีดังกล่าว

ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* จัดว่าเป็นชีวินทรีย์ที่มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ประโยชน์สำหรับการควบคุมแมลงศัตรูพืช เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ คือ

- สามารถกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิดในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม
- มีประสิทธิภาพในการทำให้แมลงเป็นโรคตายได้อย่างรวดเร็วในเวลา 24 – 48 ชั่วโมง
- ไม่มีอันตรายต่อคน และสัตว์ทุกชนิด รวมทั้งไม่เป็นศัตรูพืช
- ไม่มีกลิ่นเหม็น ไม่มีพิษตกค้างในพืชผล และไม่ก่อให้เกิดมลพิษ ในสภาพแวดล้อม

– มีความทนทานต่อแรงดันสูง ทำให้สามารถผ่านไส้เดือนฝอยผ่านรูหัวฉีดของเครื่องพ่นสารชนิดต่างๆได้ รวมทั้งสามารถทนต่อสารฆ่าแมลง สารกำจัดโรคพืช และสารกำจัดวัชพืช (วัชร, 2533)

งานวิจัยในการนำไส้เดือนฝอยมาควบคุมแมลงศัตรูพืชในประเทศไทย ได้เริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2525 ที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการ เกษตร และทำงานวิจัยติดต่อกันมาจนถึงปัจจุบัน ตามลำดับ ดังต่อไปนี้

1. เริ่มต้นได้ทำการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย เพื่อขยายปริมาณด้วยหนอนเจาะสมอฝ้าย (*Heliothis armigera*) เพื่อที่จะได้ปริมาณมากเพียงพอในการทดลองประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงชนิดต่างๆ พบว่า สามารถเข้าทำลายแมลงได้มากกว่า 20 ชนิด (วัชร, 2534)

2. หลังจากทดลองในห้องปฏิบัติการได้ผลดีแล้ว จึงได้นำไส้เดือนฝอยไปทดสอบประสิทธิภาพในสภาพธรรมชาติ โดยนำไปควบคุมหนอนกินใ้ผิวเปลือกถั่วลิสง (งา) (*Cossus* sp. และ *Microchlora* sp.) ที่จังหวัดจันทบุรี ในสภาพที่มีความชื้นประมาณ 60 – 80% พบว่าไส้เดือนฝอย อัตรา 2 ล้านตัวในน้ำ 1 ลิตร โดยพ่น 3 – 5 ลิตรต่อต้น สามารถฆ่าหนอนได้ 80% (วัชร และคณะ, 2529)

3. จากความสำเร็จในการทดลอง ได้ศึกษาค้นคว้าพัฒนาวิธีการเลี้ยงไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเทียม (artificial media) โดยทำการเลี้ยงในจานแก้ว (petridish) (วัชร และคณะ, 2535) ใช้อาหารสุนัข ดับไก่ หรือเนื้อไก่สด ผสมกับวุ้น (agar) พบว่าสามารถเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ครบวงจรชีวิต และขยายพันธุ์ได้ดี สำหรับการเลี้ยงได้มีการแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่อาศัยในส่วนของลำไส้ของไส้เดือนฝอย ซึ่งมีความสำคัญต่อการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยเติมลงในอาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงด้วย ดันทุนการผลิต (เฉพาะค่าแรงงาน และค่าอาหารเทียม) สำหรับไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ 1 ล้านตัว ประมาณ 2 – 3 บาท ในขณะที่ต้นทุนการผลิตจากแมลงอาศัยในปริมาณเท่ากันประมาณ 9 บาท

4. หลังจากได้ข้อมูลพื้นฐานการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมในจานแก้วแล้ว ซึ่งไส้เดือนฝอยอาศัยเฉพาะบนผิวหน้าอาหารเท่านั้นในการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ จึงได้พัฒนาวิธีการเลี้ยงไส้เดือนฝอยแบบใหม่ โดยผสมอาหารสุนัขที่ปั่นละเอียดกับฟองน้ำสังเคราะห์ชิ้นเล็กๆ (วัชร และคณะ, 2539) ทำการเลี้ยงในขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. สภาพการเลี้ยงนี้เป็นแบบอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ทั้งนี้เป็นการเพิ่มพื้นที่ผิว และมีการถ่ายเทอากาศได้ทั่วถึง ทำให้ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ดีขึ้น ได้ผลผลิตสูงเฉลี่ย 8 ล้านตัว/ขวด สามารถลดต้นทุนการเลี้ยงไส้เดือนฝอยลงได้กว่า 50%

5. ในขณะเดียวกันได้คิดค้นวิธีการเก็บรักษาและบรรจุหีบห่อ วิธีที่เหมาะสมที่สุด คือ บรรจุไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัวผสมน้ำ 10 มล. ในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ 1.4 กรัม ใส่ในถุงพลาสติก

ขนาด 4 x 6 นิ้ว ปิดผนึกปากถุง เก็บที่อุณหภูมิ 6 – 10°ซ มีชีวิตอยู่ได้นานกว่า 3 เดือนโดยประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลง (วัชร และคณะ, 2534)

6. หลังจากผลิตไส้เดือนฝอยได้เป็นปริมาณมาก จึงได้ขยายการทดสอบในสภาพธรรมชาติมากขึ้น และประสบความสำเร็จในการนำไส้เดือนฝอยไปควบคุมแมลงศัตรูพืชผักต่างๆ และไม้ดอก ได้แก่ ตัวอ่อนด้วงหมัดผัก (*Phyllotreta sinuata*) ซึ่งเป็นศัตรูทำลายผักกาดหัว และพืชผักตระกูลกะหล่ำ (วัชร และคณะ, 2534) ด้วงงวงมันเทศ (*Cylus formicarius*) ซึ่งทำลายหัวมันเทศ (วัชร และคณะ, 2534) หนอนกระทู้หอม (*Spodoptera exigua*) ศัตรูดาวเรือง (วัชร และคณะ, 2537)

7. จากความสำเร็จในด้านการผลิตไส้เดือนฝอยและการทดสอบประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยในการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้มีบริษัทเอกชนที่สนใจ และมาขอรับเทคโนโลยีการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารแบบแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) นำไปผลิต และจำหน่ายแก่เกษตรกร

- บริษัท เฮกซ์เนมาโทดิก จำกัด
- บริษัท แอ็กโกร (ประเทศไทย) จำกัด
- บริษัท แอปพลายเค็ม (ประเทศไทย) จำกัด

โดยจำหน่ายในราคาปัจจุบัน 30 – 40 บาท/ไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัว (1 ซอง)

ปัญหาการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช

หลังจากได้มีการเผยแพร่เทคโนโลยีการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ในการควบคุมแมลง ข้อมูลเกี่ยวกับปัญหาที่เกิดขึ้นพอสรุปได้ดังนี้

1. ปัญหาเกี่ยวกับการผลิตไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมาก ภาคเอกชนที่ได้รับเทคโนโลยีดังกล่าวไปทำการผลิตไส้เดือนฝอยตามวิธีดังกล่าว จำหน่ายให้แก่เกษตรกรและผู้สนใจประสบปัญหาเกี่ยวกับต้นทุนซึ่งค่อนข้างสูง จึงต้องจำหน่ายในราคาค่อนข้างแพง ฉะนั้นสถานการณ์การใช้ไส้เดือนฝอยในปัจจุบันส่วนใหญ่จะนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเฉพาะในพืชที่ให้ผลตอบแทนสูง เช่น ลองกอง ลางสาด ไม้ดอกไม้ประดับ เป็นต้น สำหรับการนำไปกำจัดแมลงศัตรูพืชที่ให้ผลตอบแทนต่ำ เช่น มันเทศ ผักกาดหัว ฯลฯ เกษตรกรจะประสบกับการขาดทุน ถึงแม้ว่าการป้องกันกำจัดได้ผลดีก็ตาม (ตารางที่ 1.) นอกจากนี้การผลิตไส้เดือนฝอยโดยวิธีที่ใช้อยู่ในปัจจุบันนี้ให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ ไม่เพียงพอต่อความต้องการของเกษตรกรที่เพิ่มขึ้น และถ้ามีการขยายกำลังการผลิตให้มากขึ้น ก็จำเป็นต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก และขยายพื้นที่เพิ่มขึ้น ซึ่งมีผลทำให้ต้นทุนยิ่งสูงขึ้น กระบวนการผลิตมีหลายขั้นตอน โอกาสที่จะมีการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ได้ง่ายขึ้น

2 ปัญหาการเก็บรักษาและการขนส่งไส้เดือนฝอย ไส้เดือนฝอยที่จะนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ได้ผลดีนั้นจะต้องมีคุณภาพมาตรฐาน นอกจากวิธีการผลิตแล้ว การเก็บรักษาและการบรรจุภาชนะเพื่อสะดวกในการขนส่งไปยังแหล่งของผู้ใช้ซึ่งอยู่ห่างไกลออกไป ก็มีความสำคัญ ปัจจุบันการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยนั้นจะต้องเก็บไว้ในอุณหภูมิต่ำตลอดเวลา ถึงแม้ว่าในช่วงการขนส่งก็ตาม ทำให้ไม่สะดวกและต้นทุนสูง ช่วงระยะเวลาการเก็บรักษาได้ไม่นานเกิน 3 เดือน

3. ปัจจัยอย่างหนึ่งที่สามารถกำหนดการขยายตลาดของไส้เดือนฝอยคือประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชในสภาพธรรมชาติดังกล่าวมาแล้ว การทดสอบในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอยสามารถทำลายแมลงศัตรูพืชได้อย่างกว้างขวาง ในต่างประเทศมีการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงศัตรูพืชที่อาศัยในดินเป็นส่วนใหญ่และประสบผลสำเร็จเป็นอย่างดี เนื่องจากสภาพแวดล้อมในดินนั้นมีความแปรปรวนน้อย ไส้เดือนฝอยสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้นานหลังจากฉีดพ่นไปแล้ว สำหรับในประเทศไทยนอกจากใช้ในการกำจัดแมลงที่อาศัยในดินแล้ว มีการพยายามนำไส้เดือนฝอยมาควบคุมแมลงศัตรูพืชที่อาศัยและทำลายส่วนต่างๆ ของพืชที่อยู่เหนือระดับดิน เนื่องจากแมลงเหล่านี้มักจะเป็นแมลงที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ปัจจุบันงานทดลองในการควบคุมแมลงนี้ได้ประสบความสำเร็จและผลการทดลองได้ถูกถ่ายทอดให้เกษตรกรนำไปใช้แล้ว แต่อย่างไรก็ตามงานทดลองเหล่านี้ยังครอบคลุมไปถึงแมลงไม่กี่ชนิด เนื่องจากการใช้ไส้เดือนฝอยในสภาพดังกล่าวถูกจำกัดโดยปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น แสงแดด ตลอดจนเทคนิคการพ่นไส้เดือนฝอยซึ่งแตกต่างกันในแต่ละพืช ฉะนั้นถ้าต้องการขยายตลาดให้กว้างขึ้นสำหรับไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในอนาคต มีความจำเป็นต้องขยายงานการทดลองเพิ่มขึ้นด้วย และพัฒนาวิธีการใช้ไส้เดือนฝอยเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพพร้อมกันไปด้วย

ศัตรูพืชที่ ควบคุม	ใช้เดือนฝอย (1 ชอง = 25 บาท)			* สารเคมี เฉลี่ย/ไร่ (บาท)
	อัตราการใช้	จำนวนที่ใช้/ไร่	เป็นเงิน/ไร่ (บาท)	
1. หนอนกินใต้ผิว เปลือกองคอง	2 ชอง/ต้น หรือ 8 ล้านตัว/ต้น พ่น 2 ครั้ง	40 ต้น/ไร่ ใช้ 80 ชอง พ่น 2 ครั้ง ใช้ทั้งหมด 160 ชอง	4,000	3,000
2. ค้างคาวคอกใน ผักกาดหัว	4 ล้านตัว (1 ชอง) ต่อ พท. 20 ตรม. ใช้ 4 ครั้ง	80 ชอง/ไร่ พ่น 4 ครั้ง ใช้ทั้งหมด 320 ชอง	8,000	2,000
3. หนอนกระทู้หอม ในดาวเรือง	40 ล้านตัว ต่อน้ำ 20 ลิตร พ่น 6 ครั้ง	40 ชอง/ไร่ พ่น 6 ครั้ง ใช้ทั้งหมด 240 ชอง	6,000	2,600

* จากการสัมภาษณ์เกษตรกรโดยผู้วิจัย ชนิดของสารเคมีนั้นไม่แน่นอนเปลี่ยนแปลงตาม
สถานการณ์ การควบคุมได้ผลบ้างไม่ได้ผลบ้าง



ด้วยเหตุผลดังกล่าว ในปี พ.ศ. 2538 จึงได้จัดตั้งโครงการวิจัยการพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า โดยมีวัตถุประสงค์หลัก คือ

1. เพื่อที่จะพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ Infective Juvenile (IJ) ของ *S. carpocapsae* โดยใช้วิธี liquid fermentation วิธีการนี้สามารถผลิตได้เป็นปริมาณมากในระดับเชิงการค้าและลดต้นทุนการผลิตได้ต่ำกว่าวิธีการผลิตเดิม (semi-solid media) อย่างน้อย 50% ซึ่งสามารถอยู่ในสภาพที่แข่งขันกับการใช้สารเคมีที่เกษตรกรใช้อยู่ได้ (ตารางที่ 1.)
2. พัฒนาอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้ในการแยกเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้จากอาหารเหลว โดยมีเปอร์เซ็นต์การสูญหายน้อยที่สุดและไม่กระทบกระเทือนต่อประสิทธิภาพ
3. พัฒนาวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้มีชีวิตอยู่ได้นาน ประสิทธิภาพคงที่สะดวกในการขนส่ง ซึ่งจะบรรจุในภาชนะที่เป็นผลิตภัณฑ์มาตรฐานต่อไป
4. เพื่อที่จะนำเทคโนโลยีการผลิตใหม่ทั้งกระบวนการนี้ถ่ายทอดให้แก่ภาคเอกชนผู้สนใจนำไปผลิตเพื่อจำหน่ายให้เกษตรกรใช้แทนสารเคมีอย่างแพร่หลายและกว้างขวางต่อไป

แผนการดำเนินงานวิจัย

1. แผนการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์ที่ 1

เกี่ยวกับกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอย ดังนี้คือ

1.1 การทดลองหาส่วนประกอบของอาหารเหลว (liquid media) ที่เหมาะสมสำหรับการผลิต Infective Juvenile ของไส้เดือนฝอย ส่วนประกอบที่สำคัญของอาหารเหลวมาจากแหล่งต่างๆ ได้แก่

- แหล่งโปรตีนจากพืชหรือสัตว์
- แหล่งคาร์โบไฮเดรตและไขมัน
- แหล่งวิตามินและเกลือแร่
- Emulsifier

ทำการเตรียมอาหารเหลวสูตรต่างๆ ใส่ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. บรรจุขวดละ 30 มล. เมื่ออบนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว ทำการใส่เชื้อแบคทีเรียที่เป็น symbiont ของไส้เดือนฝอยลงไปนำไปเขย่าด้วยเครื่องเขย่า (shaker) ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ลงไปเลี้ยง ทำการตรวจการพัฒนาของไส้เดือนฝอยเป็นวัยต่างๆ และความหนาแน่นทุกๆ 24 ชั่วโมง จนครบ 1 วงจรชีวิต (life cycle) เปรียบเทียบปริมาณของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่เลี้ยงได้จากอาหารแต่ละสูตร

2 การผลิตขยายไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในแมลงอาศัย (host) เพื่อทำเป็น inoculum

- นำหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) วัย 5 – 6 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียมในห้องปฏิบัติการ

- นำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (nematode suspension) ผสมน้ำให้มีอัตราความหนาแน่นประมาณ 200 ตัว/มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานแก้วที่ใส่หนอนกินรังผึ้งประมาณ 10 ตัว

- หนอนจะตายภายใน 48 ชั่วโมง โดยผนังลำตัวหนอนที่ตายมีลักษณะเหนียวนุ่ม มีสีเหลืองครีม ไม่เน่าและ

- นำซากหนอนเหล่านั้นมาล้างให้สะอาด แล้ววางบนจานแก้วซึ่งมีกระดาษกรองปูด้านบน นำไปวางในกล่องพลาสติก เทน้ำสะอาดหล่อจานแก้ว ปิดฝาให้สนิทป้องกันแมลงหวี่

- นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 – 10 วัน

- ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ จะทยอยออกจากซากหนอนมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ (ดูจากความขุ่นของน้ำ)

- เก็บไส้เดือนฝอยจากน้ำที่หล่อไว้ โดยเทเก็บพร้อมกับน้ำวันเว้นวัน จนซากหนอนแห้ง ประมาณ 4–5 ครั้ง จะได้ไส้เดือนฝอยไม่ต่ำกว่า 100,000 ตัว จากแมลงอาศัย 1 ตัว

1.3 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่ใช้เป็น inoculum

ในการศึกษาการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ด้วยอาหารเทียม จำเป็นต้องมีการใส่เชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ซึ่งเป็น symbiotic bacteria ใส่ลงในอาหาร สำหรับเทคนิคในการแยกเชื้อบริสุทธิ์นั้นทำได้ 2 วิธีการ คือ

ก. แยกจากตัวไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เป็นระยะ Infective Juvenile (IJ) โดยนำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ประมาณ 1,000 ตัว มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างน้ำกลั่นที่อบนิ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำมาบดในชุดบด (homogenizer) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียในลำไส้ของไส้เดือนฝอยหลุดออกมา แล้วใช้เข็มเจาะและนำไปจัดบนอาหาร TTC + Tergitol 7 agar นำเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเลือก colony ของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะกลม นูนตรงกลางสีเข้ม รอบๆ สีน้ำเงิน ทำการแยกออกมาเลี้ยงไว้บน Nutrient agar ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำเก็บที่อุณหภูมิ 10 – 12°C ไว้ใช้ต่อไป

ข. แยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* โดยนำหนอนกินรังผึ้งที่ตายใหม่ๆ มาล้างให้สะอาด

(surface sterilized) ด้วยน้ำยา hyamine 0.1% แล้วตัดหาเทียมของหนอน จากนั้นใช้เข็มเจาะแต่น้ำเลือด (haemolymph) ไปป้ายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Tergitol 7 agar + TTC แล้วแยกเชื้อบริสุทธิ์ของ *X. nematophilus* เช่นเดียวกับในข้อ ก.

1.4 จากการทดลองตามข้อ 1.1 ได้สูตรอาหารที่เหมาะสมแล้ว ทำการศึกษาปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลต่อการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอย คือ

- อิทธิพลของแบคทีเรียที่เป็น symbiont ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้รับ
- ผลของปริมาณอาหารและไส้เดือนฝอยเริ่มต้นต่อผลผลิตที่ได้รับ
- ปริมาณ inoculum ของเชื้อ bacteria และของไส้เดือนฝอยที่มีต่อผลผลิต

ไส้เดือนฝอย

- ความเป็นกรด - ด่างของอาหารต่อการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์

ไส้เดือนฝอย

- เปรียบเทียบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงด้วย

อาหารเหลวกับไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (host)

- การเพิ่มระดับปริมาณอาหารต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้
- ฯลฯ

1.5 จากการวิจัยในข้อ 1.1 – 1.4 ได้สูตรอาหารที่เหมาะสม พร้อมกับปัจจัยสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย สามารถนำมาเป็นแนวทางในการศึกษาการผลิตในเชิงพาณิชย์โดยใช้ถังหมัก (Fermentor) กระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยนั้นแตกต่างจากการเลี้ยงขยายจุลินทรีย์อื่นๆ คือ มีการเปลี่ยนแปลงและการกระจายของวัยต่างๆ ในการเจริญเติบโตค่อนข้างมาก ความต้องการ O_2 ในแต่ละวัยแตกต่างกัน

วิธีการดำเนินการ

ก. เตรียมอาหารสูตรที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยได้เหมาะสมที่สุดใส่ลงในถังหมักแบบ stirred tank reactor

ติดตั้ง pH probe และ pO_2 probe ก่อนนำไปอบฆ่าเชื้อ ทำการ calibrate pH probe เสียก่อน หลังจากอบฆ่าเชื้อที่ 121°C นาน 30 นาที ปล่อยให้อาหารเย็นลง แล้ว calibrate pO_2 probe ปรับอุณหภูมิ 28°C ใส่แบคทีเรียที่เป็น inoculum ลงไปเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการใส่ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ลงไปเลี้ยงที่ 25°C จนได้ผลผลิตเป็น II 100% จากงานทดลองนี้มีการศึกษารายละเอียดต่างๆ ดังนี้

- การเจริญเติบโตและพัฒนาเป็นวัยต่างๆของไส้เดือนฝอยตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

- ระยะเวลาในการเลี้ยงที่ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II 100%
- ระดับการละลายของออกซิเจนในอาหาร
- อัตราการไหลเข้าของอากาศ
- การกวนของไบโพลในถังหมัก

ข. การเตรียมไส้เดือนฝอยด้วยกรรมวิธีบริสุทธิ์ (pure line technics) เพื่อใช้เป็น inoculum การเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในถังหมักนั้น จะต้องใช้ไส้เดือนฝอยที่เป็น inoculum เป็นจำนวนมาก และไส้เดือนฝอยนั้นจะต้องบริสุทธิ์ปราศจากเชื้อแบคทีเรียทั้งภายในและภายนอกลำตัว เนื่องจากสภาพการเลี้ยงในถังหมักนั้นมีปัจจัยต่างๆที่เหมาะสม การปนเปื้อนย่อมเกิดขึ้นได้ง่าย

ในการเตรียม inoculum ไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย (host) หนอนกินรังผึ้งนั้น บางครั้งพบว่าในระบบทางเดินอาหารของมัน นอกจากมี symbiotic bacteria แล้ว อาจมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นปะปนอยู่ด้วย ไส้เดือนฝอยที่นำไปใช้นั้นก็ได้รับการทำความสะอาดฆ่าเชื้อเฉพาะที่ผนังลำตัวภายนอกเท่านั้น เมื่อนำไปเลี้ยงในอาหารเหลว อาจเกิดปนเปื้อนจากการที่ไส้เดือนฝอยขับถ่ายออกมา ผลผลิตที่ได้จะต่ำ การผลิตไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์นั้น ดำเนินการโดยนำไข่ไส้เดือนฝอยมาฟักในอาหารเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อได้ตัวอ่อนวัย 1 และ 2 ทำการย้ายไปเลี้ยงในอาหารร่วน ตรวจสอบการพัฒนาดังกล่าวไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 3 ระยะ II ซึ่งใช้เวลา 15 วัน จากนั้นนำไปเลี้ยงขยายด้วยอาหารเหลว เพื่อให้ได้ปริมาณมาก และทดสอบประสิทธิภาพ

ค. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

ทำการแยกเชื้อ symbiotic bacteria (จากลำไส้ของไส้เดือนฝอย) ที่บริสุทธิ์ ตามวิธีการเช่นเดียวกับข้อ (1.3) แล้วนำไปเลี้ยงขยายปริมาณในอาหาร Yeast Salt broth (YS broth) หลังจากนั้นเก็บแบคทีเรีย โดยผสมกับ glycerin 30% ไว้ใน micro tube ด้วยวิธีปลอดเชื้อแล้วนำเก็บไว้ในอุณหภูมิ -70°C เมื่อต้องการเตรียม inoculum จึงนำออกมาเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth ในขวดเขย่าเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปใช้เป็น inoculum ในการผลิตไส้เดือนฝอยในถังหมัก

1.6 การทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเหลว (วิธีการตามรายงานของ Miller 1989)

1.6.1 เตรียมถาดหลุม 7 ถาด แต่ละถาดมี 24 หลุม แต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2 ซม. พร้อมฝาครอบสนิททุกถาด

1.6.2 ใส่กระดาษกรองที่กั้นหลุมๆละ 1 แผ่น

1.6.3 ใช้ไปเปิดดูไส้เดือนฝอย 1 ตัว/น้ำ 30 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของถาดที่เตรียมไว้ หลุมละ 1 ตัว

1.6.4 จากนั้นจับหนอนกินรังผึ้งวัย 5-6 ใส่ในหลุมๆละ 1 ตัว แล้วปิดฝา

1.6.5 ทำการทดลองทั้งหมด 7 ถาด แต่ละถาดคิดเป็น 1 ชั่วโมง นำถาดทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับหนอนที่ตายในแต่ละถาด คัดเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเข้าทำลายแมลง โดยตัดข้อมูลของชั่วโมงหรือถาดที่มีปริมาณหนอนตายสูงสุด และต่ำสุดออก

2. แผนการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์ที่ 2

การศึกษากระบวนการแยกไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II

หลังจากที่เลี้ยงไส้เดือนฝอยได้เป็นปริมาณมากแล้ว จะต้องทำการแยกและล้างให้สะอาดเพื่อเก็บรักษาต่อไป

วิธีการดำเนินการ

- ทำการออกแบบและสร้างอุปกรณ์เครื่องมือที่ใช้แยกล้างไส้เดือนฝอย ที่มีระบบการทำงานไม่ซับซ้อน โดยอาศัยพฤติกรรมและชีววิทยาของไส้เดือนฝอยเป็นหลักและทำการศึกษาทดลอง ดังนี้
- เปรียบเทียบการสูญหายของไส้เดือนฝอย หลังจากการทดลองกับอุปกรณ์ที่สร้างขึ้น
- ผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากอุปกรณ์แต่ละแบบ
- ความรวดเร็วในการแยก เหมาะกับการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

3. แผนการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์ที่ 3

เป็นการศึกษาวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ผลิตได้ให้มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน ประสิทธิภาพไม่ลดลง สะดวกในการขนส่งไปยังแหล่งที่ใช้ไส้เดือนฝอยในการกำจัดแมลงศัตรูพืช ซึ่งส่วนใหญ่ห่างจากกรุงเทพฯ

วิธีการดำเนินการ คือ

3.1 คัดเลือกวัสดุชนิดต่างๆ มาผสมกับไส้เดือนฝอยในรูปผง โดยไม่มีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของไส้เดือนฝอย ส่วนสภาพอื่นๆ ที่จะต้องศึกษา

- ความชื้นและอุณหภูมิที่เหมาะสม
- สภาพการฟื้นตัวของไส้เดือนฝอยหลังจากเก็บไว้นาน

3.2 คั้นหาวัสดุที่จะนำมาใช้เป็นภาชนะบรรจุไส้เดือนฝอย ซึ่งจะต้องมีลักษณะดังนี้

- สามารถรักษาความชื้นภายในภาชนะให้คงที่ตลอดเวลา
- เป็นฉนวนทำให้อุณหภูมิภายในเปลี่ยนแปลงน้อยที่สุด
- มีฝาปิดมิดชิด
- ไม่เป็นพิษต่อไส้เดือนฝอย

4. แผนการดำเนินงานตามวัตถุประสงค์ที่ 4

ผลงานวิจัยที่ได้นี้มีประโยชน์ต่อเกษตรกรโดยตรง ซึ่งสามารถนำไปใช้ในการกำจัดแมลงศัตรูพืชแทนสารเคมี แต่อย่างไรก็ตามการผลิตไส้เดือนฝอยให้มีคุณภาพนั้น เป็นเทคโนโลยีที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน เกษตรกรเองไม่สามารถที่จะดำเนินการผลิตไส้เดือนฝอยใช้เองได้ ดังนั้นผลงานวิจัยนี้ควรจะถ่ายทอดให้หน่วยงานของรัฐบาล เช่น กรมวิชาการเกษตร, กรมส่งเสริมการเกษตร ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับเกษตรกรโดยตรง หรือบริษัทเอกชน นอกเหนือจากบริษัทที่ผลิตอยู่ในปัจจุบันที่มีความสนใจนำไปผลิตไส้เดือนฝอย เพื่อจำหน่ายให้แก่เกษตรกรในราคาถูกกว่าที่เป็นอยู่ในปัจจุบัน ส่วนการถ่ายทอดความรู้เกี่ยวกับการใช้ไส้เดือนฝอยในการกำจัดศัตรูพืชนั้น จะร่วมมือกับหน่วยงานดังกล่าว ดำเนินการดังต่อไปนี้

- ฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการเกี่ยวกับการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดศัตรูพืชแก่เกษตรกร โดยเฉพาะ
- ประชาสัมพันธ์ความรู้ใหม่ๆ ในการใช้ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงเป็นระยะๆ
- ฝึกอบรม สัมมนา ให้แก่นักวิชาการเกษตร นักส่งเสริมการเกษตร และผู้สนใจทั่วไป

5. ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยและพัฒนการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า เป็นงานทดลองค้นคว้าวิจัยในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับครอบคลุมกับสิ่งมีชีวิต 3 ชนิด คือ

5.1 ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae*

ศึกษาหาสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ให้ได้ครบวงจรชีวิต โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเจริญเติบโตในแมลงอาศัย การศึกษาจะเริ่มทำการเลี้ยงในระดับขวดเขย่า (shake flask) จนได้ผลดี มีข้อมูลพื้นฐาน จึงนำไปเลี้ยงต่อในระดับถังหมัก (fermentor) 6 ลิตร พร้อมทั้งศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ เช่น ระดับความเป็นกรดต่างในอาหารเหลว ปริมาณการละลายของอากาศในอาหารเหลว ระดับความเร็วในการกวนอาหาร เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/อาหารเหลว 1 มล.

5.2 symbiotic bacteria

ศึกษา symbiotic bacteria *X. nematophilus* ซึ่งอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เพื่อทราบถึงบทบาทความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว พร้อมทั้งการทำเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ เพื่อใช้ในการผลิตขยาย

5.3 แมลงอาศัย (insect host)

เนื่องจากแมลงเป็นอาหารโดยธรรมชาติของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งมีหลายชนิด ฉะนั้นในการที่จะศึกษาการเจริญเติบโตขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย โดยใช้อาหารเทียมชนิดต่างๆ ว่าเหมาะสมหรือไม่นั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบกับ การเจริญเติบโตในแมลงอาศัย และแมลงอาศัยที่อ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งสามารถเลี้ยงขยายปริมาณได้มากด้วยอาหารเทียม คือ หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* จึงต้องมีการเลี้ยงขยาย และนำมาใช้ในงานทดลองต่างๆ ได้แก่

- ใช้ในการผลิตขยายไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับการเลี้ยงขยายในอาหารเหลว
- ใช้ทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ โดยวิธีการทดลองปล่อยไส้เดือนฝอย 1 ตัว : หนอนกินรังผึ้ง วัย 5 – 6 1 ตัว ในภาชนะที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2 ซม. แล้วตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่ทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย ที่ 48 ชั่วโมง
- ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* จากหนอนกินรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย ซึ่งจะมีแบคทีเรีย *X. nematophilus* กระจายอยู่ในระบบเลือด

6. ระยะเวลาทำการวิจัย

ตั้งแต่วันที่ 1 เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2538 ถึงวันที่ 30 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2542

7. สถานที่ทำการวิจัย ทดลอง หรือเก็บข้อมูล

ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร

8. งบประมาณที่ใช้ในการวิจัย

6,904,280 บาท จาก สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สรุปผลการวิจัย

1) ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า ได้ทำการศึกษาตามหัวข้อต่างๆ คือ

(1.1) ศึกษาอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae*

ศึกษาอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย ได้ทำการศึกษาในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. ใส่อาหารเหลว 30 มล. เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ โดยทำการคัดสรรสูตรอาหาร 9 สูตร ซึ่งมีส่วนประกอบมาจากแหล่งโปรตีนพืช และสัตว์ แหล่งคาร์โบไฮเดรต ไขมัน เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย จากนั้นนำไปใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย ผลการทดลองพบว่าสูตร Tsb ได้รับการคัดเลือกเบื้องต้นเนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่ให้ผลผลิตที่เป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงที่สุดในระยะเวลาที่สั้นกว่า ต่อมาจึงพัฒนาสูตรอาหารนี้โดยปรับสัดส่วนของส่วนประกอบอาหารดังกล่าวให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยมากที่สุด พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ Tsb₂ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II เฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 200,000 ตัว/มล. ในระยะเวลาการเลี้ยง 9 วัน

(1.2) อิทธิพลของแบคทีเรีย *X. nematophilus* (Enterobacteriaceae) ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว

ศึกษาอิทธิพลของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ที่มีต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว โดยทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในอาหารเหลวร่วมกับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพต่างๆ 4 วิธีการ มี 5 ข้อ คือ

1.2.1 เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย *X. nematophilus* ลงไปให้มีการเจริญเติบโตก่อน 24 ชั่วโมง

1.2.2 เลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียในอาหารเหลวพร้อมกัน

1.2.3 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 24 ชั่วโมง ก่อนแล้วกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง

1.2.4 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยไม่มีการใส่แบคทีเรีย

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย ทั้ง 4 วิธี การทำในขวดแก้วขนาด 125 มล. บรรจุอาหาร 30 มล. เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 9 วัน จึงทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ พบว่า วิธีการที่ 1 ให้ผลผลิตสูงสุด 166,140 ตัว/มล. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งได้ผลผลิต 131,213 5,646 และ 5,086 ตัว/มล. ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาถึงระดับปริมาณของแบคทีเรีย ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว โดยใส่แบคทีเรีย 4 ระดับ 3×10^7 , 3×10^8 , 3×10^9 , และ 3×10^{10} เซลล์/มล. พบว่าผลผลิตสุดท้ายของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้จากอาหารเหลวจะเพิ่มขึ้น ตามปริมาณของแบคทีเรียที่ใส่ในอาหารดังนี้ คือ 81,200 99,800 109,000 และ 128,800 ตัว/มล. ตามลำดับ โดยผลผลิตที่ได้สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากผลผลิตที่ได้ต่ำสุด ผลการทดลองเหล่านี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* โดยเฉพาะการผลิตไส้เดือนฝอยเพื่อควบคุมแมลงศัตรูพืชเป็นการค้า

(1.3) ผลของระดับปริมาณอาหารเหลวและไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

ระดับปริมาณอาหารเหลว และ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงเลี้ยงในขวดแก้วมีผลต่อการขยายปริมาณผลผลิตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้ทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลอง แบบ 4×4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ขั้ว ปัจจัย A ระดับปริมาณอาหารเหลวสูตร Tsb₃ มี 4 ระดับ คือ 15 20 25 30 มล. ในขวดแก้วขนาด 125 มล. แล้วใส่แบคทีเรีย 10^9 เซลล์/ขวด ลงในอาหารนำไปแช่ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ inoculum ไส้เดือนฝอย ปัจจัย B มี 4 ระดับ คือ 1,000 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/มล. ลงเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน พบว่าวิธีการที่เหมาะสมที่สุด คือ ใส่ปริมาณอาหาร 15 มล./ขวด และใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุด 266,775 ตัว/มล.

(1.4) ผลของปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว

ผลของระดับปริมาณของแบคทีเรีย *X. nematophilus* และไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตของไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ได้ทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ 4×4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ขั้ว ปัจจัย A คือปริมาณแบคทีเรีย 4 ระดับได้แก่ 10^7 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. ปัจจัย B คือปริมาณไส้เดือนฝอย 4 ระดับ คือ 1,000 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยใส่แบคทีเรียลงเลี้ยงในอาหาร 15 มล. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่าวิธีการที่ใช้ปริมาณ 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. และใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุดเฉลี่ย 308,800 ตัว/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้ระดับปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยในระดับอื่นๆ เลี้ยงร่วมกัน

(1.5) ผลของระดับความเป็นกรดต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ศัตรูแมลง ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

ศึกษาผลของความเป็นกรดต่างในอาหารเหลวต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้ทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 8 วิธีการ 3 ซ้ำ โดยใส่อาหารเหลวสูตร Tsb₃ 15 มล. ในขวดแก้วขนาด 125 มล. หลังอบนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จึงใส่แบคทีเรีย *X. nematophilus* 10¹⁰ เซลล์/15 มล. ลงเลี้ยงในอาหาร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ปรับระดับ pH ในอาหารเป็น 3 4 5 6 7 8 และ 9 รวมทั้ง control (ไม่มีการปรับ pH) หลังการเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง ทำการตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยทุกวัน เป็นเวลา 12 วัน พบว่า

- ในสภาพที่เป็นกรดจัด (pH 3 และ pH 4) นั้น เมื่อใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 88% ตัวที่รอดชีวิตก็ไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตต่อไปได้

- สภาพที่ปรับเป็น pH 5 และการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในระยะต่อมา มีผลต่อการสร้างไข่และการพัฒนาไข่เป็นตัวอ่อน ซึ่งช้ากว่าปกติ 1 วัน และ 6 – 7 วัน ตามลำดับ ปริมาณไข่น้อย ระยะสุตท้ายไม่สามารถพัฒนาถึงวัย 3 ระยะ II ทำให้ไม่ได้ผลผลิต

- สภาพ pH 6 และการเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยง ทำให้การสร้างไข่และการพัฒนาไข่เป็นตัวอ่อนช้ากว่าปกติ 1 วัน และ 3 – 4 วัน ตามลำดับ ปริมาณไข่ปกติ ผลผลิตที่เป็นวัย 3 ระยะ II ได้ต่ำสุดคือ 107,800 ตัว/มล.

- ในสภาพ pH 7, 8, 9 และ control นั้น การพัฒนา การเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ ของไส้เดือนฝอยเป็นปกติ (สร้างไข่ภายใน 72 ชั่วโมง, ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 24 ชั่วโมง) ผลผลิตที่ได้คือ 373,333.3 , 366,666.7 , 346,666.7 และ 413,333.3 ตัว/มล. ตามลำดับ

ฉะนั้น ในการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวนั้น สภาพความเป็นด่างจะเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต และการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ซึ่งเป็นผลให้ได้ผลผลิตสูงตาม

(1.6) เปรียบเทียบการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลว และแมลงอาศัย

ศึกษาการเจริญเติบโตสืบพันธุ์และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ เปรียบเทียบกับที่เลี้ยงจากแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) *G. mellonella* พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ครบหนึ่งวงจรชีวิต ซึ่งอาหารจะหมดพอดีใช้เวลา 7 วัน ใกล้เคียงกับในแมลงอาศัย เริ่มครบวงจรที่ 8 วัน แต่โดยที่อาหารในตัวหนอนยังไม่หมด จึงมีการพัฒนาต่อเป็นวงจรที่ 2 และพบว่าไส้เดือนฝอยเพศผู้ 1 ตัว สามารถผสมกับไส้เดือนฝอยเพศเมียได้สูงถึง 3 ตัว โดยไส้เดือนฝอยเพศเมีย 1 ตัว ที่เลี้ยงในอาหาร

เห็ดสูตร Tsb₃ สามารถออกลูกได้ตั้งแต่ 189 - 2,000 ตัว เฉลี่ย 974.6 ± 574.5 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่เลี้ยงในแมลงอาศัย ซึ่งสามารถออกลูกได้ ตั้งแต่ 300 ถึง 3,050 ตัว เฉลี่ย 1688.9 ± 1009.6 ตัว ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเห็ด Tsb₃ (45.5%) ไม่แตกต่างทางสถิติจากที่เลี้ยงในแมลงอาศัย (51.8%)

(1.7) ผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหารต่างกันต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล.

การเพิ่มขนาดการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล. ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงขยายแบคทีเรียในอาหารเห็ดสูตร Tsb₃ คือที่ 48 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกัน จะให้ผลผลิตสูงสุดในทุกปริมาณอาหาร โดยพบว่าระดับปริมาณอาหารที่ 30, 40, 50 และ 60 มล./ขวด ให้ผลผลิตสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 321,160 319,360 326,720 และ 322,980 ตัว/มล. ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากทุกวิธีการทดลอง (treatment) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 44 – 46%

2) ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในระดับถึงหมัก

(2.1) ปริมาณและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ผลิตในอาหารเห็ดโดยการใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ที่ได้จากกรรมวิธีการเลี้ยงที่บริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (insect host)

การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ผลิตโดยการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงโดยกรรมวิธีที่บริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (host) ได้ทำการทดลอง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเห็ด Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์

กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเห็ด Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย

กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย

ตรวจนับปริมาณและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในทุ่ววิธีการ พร้อมทั้งตรวจหาปริมาณเซลล์ symbiotic bacteria จากไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในทุ่ววิธีการ พบว่าการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากกรรมวิธีที่บริสุทธิ์ (pure line technique) และนำไปเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารแข็งกึ่งเหลวจะให้ผลผลิตและประสิทธิภาพสูง ซึ่งเหมาะสมที่จะนำไปใช้เลี้ยงในถังหมักต่อไป

(2.2) ผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร

จากการทดลองเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในถังหมักโดยศึกษาเปรียบเทียบการใช้ inoculum ที่ 1,000 กับ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ในถังหมักต่างกัน 2 สภาพ พบว่าการใช้ inoculum ที่ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงสูงกว่าการใช้ inoculum ที่ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยการเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. มีการปรับสภาพถังหมักให้มีอัตราการให้อากาศต่ำสุด 4 ลิตร/นาที่ ในการเลี้ยงครบ 1 วงจรชีวิต ใช้เวลา 10 วัน จะได้ผลผลิตสูง 304,100 ตัว/มล.

(2.3) อัตราและวิธีการให้อากาศที่มีผลต่อการเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียและผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร

จากการทดลองเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในถังหมักโดยให้อากาศต่างกัน 7 แบบ พบว่าการให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ ในสภาพการเลี้ยง (batch) แบบที่ 7 ให้ผลผลิตสูงสุด 424,600 ตัว/มล. และประสิทธิภาพของผลผลิต 42.50% โดยมีการปรับปัจจัยต่างๆดังนี้

- เลี้ยงขยายแบคทีเรีย โดยให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 24 ชั่วโมง
 - เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย โดยใช้ความเร็วในการกวน 350 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 25 °ซ แบ่งเป็นช่วงการให้อากาศในปริมาณต่างๆ ตามอายุ การเลี้ยงดังนี้
- | | |
|-----------------|-----------------------------|
| 24-78 ชั่วโมง | ให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ |
| 78-96 ชั่วโมง | ให้อากาศคงที่ 10 ลิตร/นาที่ |
| 96-123 ชั่วโมง | ให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ |
| 123-168 ชั่วโมง | ให้อากาศคงที่ 5 ลิตร/นาที่ |
| 168-288 ชั่วโมง | ให้อากาศคงที่ 2 ลิตร/นาที่ |

จากผลการทดลองที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ผลิตไส้เดือนฝอยในถังหมักระดับใหญ่ขึ้นต่อไป

3) พัฒนาวิธีการแยกล้างไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแยกล้างไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะ II ที่ผลิตด้วยอาหารเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่ประดิษฐ์ขึ้น 2 แบบ และดำเนินการทดลองดังนี้

วิธีการที่ 1 ทำการแยกล้างด้วยชุดกรองเขย่า แบบกรวยขนาดใหญ่

วิธีการที่ 2 ทำการแยกล้างด้วยชุดกรองแบบถาดตั้งเป็นชั้น (แต่ละชั้นจึงด้วยผ้ากรองละเอียด 270 mesh)

โดยการเปรียบเทียบปริมาณไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่หลังจากผ่านกระบวนการแยกล้างทั้ง 2 วิธี รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ได้จาก 2 วิธีนี้ด้วย ผลการทดลองพบว่า การแยกล้างตามวิธีที่ 2 นั้นมีปริมาณไส้เดือนฝอยเหลืออยู่ 88.83% สูงกว่าวิธีที่ 1 ซึ่งมี 64.58% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 2 เฉลี่ย 42.67% สูงกว่าไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 35.67% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

4) ศึกษาอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* ที่เก็บรักษาในฟองน้ำและในรูปผงโดยใช้ดิน Attapulgate

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในฟองน้ำสังเคราะห์และในรูปผงดิน Attapulgate ที่อุณหภูมิ 6°ซ เป็นเวลานาน 1 ปี พบว่าไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาทั้ง 2 วิธีการมีอัตราการรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงไม่แตกต่างกัน หลังจากครบ 12 เดือน การเก็บในฟองน้ำมีอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงลดลงเหลือ 83.6% และ 30.8% ตามลำดับ ส่วนการเก็บในรูปผงลดลงเหลือ 79.5% และ 29.0% ตามลำดับในช่วง 4 เดือนแรกประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงยังอยู่ในระดับ 40% หลังจากนั้นลดลง สำหรับการเปรียบเทียบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธี ในสภาพอุณหภูมิ 6°ซ, 25°ซ และ 30°ซ นั้น ในสภาพอุณหภูมิ 6°ซ อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยในการเก็บรักษาทั้ง 2 วิธีการในช่วง 6 เดือนสูงถึง 86-95% ในระดับอุณหภูมิ 25°ซ ในช่วง 6 อาทิตย์แรกมีอัตราการรอดชีวิตของทั้ง 2 วิธีการเก็บรักษาสูงกว่า 85% ในอุณหภูมิ 30°ซ การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในรูปผงนั้นในช่วง 2 สัปดาห์แรกมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 80% ส่วนการเก็บในรูปฟองน้ำมีอัตราการรอดต่ำกว่า 50%

5) ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ด้วยวิธีการต่างๆ

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ทั้ง 4 วิธีการ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและพัฒนาในห้องปฏิบัติการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กำหนดศักยภาพของการผลิตไส้เดือนฝอยในโรงงานต้นแบบ (pilot plant) ด้วยการใช้อาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (shake flask) เป็นเกณฑ์ ซึ่งผลิตได้ 8,000 ชอง (1 ชองมีไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัว)

ใช้ระยะเวลา 1 เดือน โดยมีต้นทุนเฉลี่ย 6.29 บาท/ซอง สำหรับการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลง
อาศัย (หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*) ซึ่งเป็นอาหารตามธรรมชาติของไส้เดือนฝอย ต้องใช้
เวลาถึง 8 เดือน ในการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ 8,000 ซอง และมีต้นทุนการผลิตเฉลี่ย 41.50 บาท/
ซอง ส่วนการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (อาหารสุนัขผสมฟองน้ำ) ใช้
เวลา 3 เดือน และต้นทุนการผลิตเฉลี่ย 16.88 บาท/ซอง และจากข้อมูลการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอย
ในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 6 ลิตร สามารถผลิตไส้เดือนฝอยได้เฉลี่ย 300,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
ฉะนั้นถ้าขยายระดับการเลี้ยงในถังหมักเป็น 100 ลิตร ต้นทุนการผลิตจะลดลงเหลือ 5.62 บาท/ซอง
โดยใช้เวลา 1 เดือน ในการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง

6) การถ่ายทอดเทคโนโลยีการผลิตไปสู่เอกชนผู้สนใจ (ตามเอกสารแนบท้าย)

ปัจจุบันได้มีบริษัทเอกชนสนใจในเทคโนโลยี และได้มีการลงนามเซ็นสัญญากับ
กรมวิชาการเกษตร และ สกว. (ตามเอกสารแนบท้าย) ในการลงทุนสร้างโรงงานต้นแบบ เพื่อ
ดำเนินการผลิตไส้เดือนฝอยเป็นอุตสาหกรรมด้วยเทคโนโลยีใหม่ ภายใต้การควบคุมของโครงการ
นี้ โดยวางแผนการผลิต ประมาณ 8,000 ซอง/เดือน ในช่วงเริ่มต้น และจะขยายปริมาณการผลิตใน
ช่วงต่อไป นอกจากนี้มีการนำผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ไปส่งเสริมให้เกษตรกร และผู้สนใจ
นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้แพร่หลายยิ่งขึ้น ซึ่งเป็นโอกาสดีในการพัฒนาการขยายตลาดให้
มากขึ้นในอนาคต อันส่งผลดีทั้งในด้านลดการนำเข้าของสารเคมีจากต่างประเทศ และต่อเศรษฐกิจ
ของประเทศโดยรวม

รายละเอียดของโครงการวิจัย

1. ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*
ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเย้า

1.1 ศึกษาอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

Study on Liquid Culture for Mass Production of the Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

บทคัดย่อ

ศึกษาอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย ได้ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัย การปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยทำการคัดค้นสูตรอาหาร 9 สูตร ซึ่งมีส่วน ประกอบมาจากแหล่งโปรตีนพืชและสัตว์ แหล่งคาร์โบไฮเดรต ไขมัน เกลือแร่ และวิตามินต่างๆ ที่ จำเป็นต่อการเจริญเติบโตสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย จากนั้นนำไปใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย ผลการ ทดลองพบว่าสูตรอาหาร สูตร B (Tsb) ได้รับการคัดเลือกเบื้องต้น เนื่องจากเป็นสูตรอาหารที่ให้ผล ผลิตที่เป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J2 สูงที่สุดในระยะเวลาที่สั้นกว่า ต่อมาจึงพัฒนาสูตรอาหารนี้ โดยปรับสัดส่วนของส่วนประกอบอาหารดังกล่าวให้เหมาะสมต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยมากที่สุด พบว่าสูตรอาหารที่เหมาะสมคือ Tsb₃ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J2 เฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 200,000 ตัว/มล. ในระยะเวลาการเลี้ยง 9 วัน การทดลองได้ทำการศึกษาในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. ใส่อาหารเหลว 30 มล. เขย่าด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถเข้าทำลายแมลงได้หลายชนิดโดยเป็นพาหะนำ symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* เข้าไปแพร่ในระบบเลือดของแมลงและทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว (Poinar and Thomas, 1966) ในปัจจุบันมีการศึกษาและนำไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชกว้างขวางขึ้น ประกอบกับปัญหาแมลงศัตรูพืชสร้างความต้านทานต่อสารฆ่าแมลง และปัญหาเรื่องการปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมและผลิตผลการเกษตร ทำให้มีเกษตรกรและผู้สนใจที่จะนำไส้เดือนฝอยไปใช้ทดแทนสารฆ่าแมลงมากขึ้น ฉะนั้นเทคโนโลยีในการผลิตไส้เดือนฝอยจึงต้องมีการพัฒนา เริ่มจากการผลิตไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัย และผลิตได้จากอาหารเทียมในจานแก้ว (วัชร และพิมลพร, 2535) ต่อมาพัฒนาเทคนิคใหม่โดยใช้อาหารเทียมผสมเศษฟองน้ำสังเคราะห์ (วัชร และพิมลพร, 2538) สามารถเพิ่มผลผลิตให้เป็นปริมาณมากขึ้นในเชิงธุรกิจ ตามรายงานของ Friedman (1990) ว่าการผลิตโดยใช้อาหารเหลวในถังหมัก (fermentor) จะเหมาะสมกว่า เพราะจะประหยัดทั้งแรงงานและพื้นที่ ฉะนั้นจึงน่าที่จะได้มีการพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลว โดยเริ่มคิดหาสูตรอาหารเหลว จากแหล่งอาหารโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน เกลือแร่ วิตามินต่างๆ ทั้งจากพืชและสัตว์มาเลี้ยงร่วมกับ symbiotic bacteria *X. nematophilus* ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (วัชร และสุทธิชัย, 2542) แล้วพิจารณาสูตรอาหารที่ไส้เดือนฝอยจะเจริญเติบโตได้ปริมาณมากในระยะเวลาสั้นโดยศึกษาในระดับขวดเขย่าก่อนเพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานก่อนนำไปเลี้ยงในถังหมักต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้บ่มนิ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petridish, test tube
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ peptone 0.1%, Yeast Salt broth, TTC + Tergitol 7 agar
4. ไร้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ II
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%, KH_2PO_4 , NaCl
8. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากกิบ

วิธีการ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอนคือ

1. การคัดเลือกสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงไร้เดือนฝอย *S. carpocapsae*
 - คัดค้นสูตรอาหารที่คิดว่ามีสารอาหารต่างๆที่จำเป็น ได้แก่ แหล่งอาหารโปรตีน คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และวิตามิน – เกลือแร่ และ emulsifier
 - ได้สูตรอาหารที่คาดหวังว่าสามารถนำมาเลี้ยงไร้เดือนฝอยได้จำนวน 9 สูตร (Table 1.) โดยตั้งชื่อเป็นสูตร A, B, C, D, E, F, G, H และ I ส่วนประกอบของสูตรอาหารแต่ละสูตรนั้นขอสงวนสิทธิ์ ไม่เปิดเผย
 - เตรียมอาหารตามส่วนประกอบต่างๆ ดังกล่าว ทั้ง 9 สูตร ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. ปิดจุกสำลีหุ้มกระดาษอลูมิเนียม นำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที
 - เตรียมแบคทีเรีย *X. nematophilus* ใช้เป็น inoculum (วัชรี และพิมลพร, 2538) ซึ่งเป็น symbiotic bacteria และมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไร้เดือนฝอย (Poinar and Thomas, 1966)
 - หลังอาหารในขวดเย็นทำการใส่แบคทีเรียที่เตรียมไว้ลงในขวดอาหารแต่ละสูตรขวดละ 1 มล. โดยวิธีการปลอดเชื้อแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - นำไร้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และน้ำกลั่นที่อบนิ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นครั้งสุดท้ายก่อนนำลงเลี้ยงในขวดอาหารทั้ง 9 สูตร โดยใส่ไร้เดือน

ฝอยประมาณ 500 ตัว/อาหาร 1 มล. แล้วนำไปแช่ต่อ ทำการทดลองสูตรละ 10 ขวด (10 ซ้ำ)

- ทำการสัมนับปริมาณไส้เดือนฝอยทุก 24 ชั่วโมง หลังใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในขวดอาหารทุกสูตร และสังเกตการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย จนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ รุ่นใหม่ (ครบ 1 วงจรชีวิต)
- บันทึกปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ได้ในอาหารแต่ละสูตร
- บันทึกจำนวนวันที่เลี้ยงไส้เดือนฝอยจนได้เป็นระยะ IJ

2. ศึกษาระดับส่วนประกอบต่างๆ ของสูตรอาหารเหลวที่คัดเลือกแล้วในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย

จากการทดสอบสูตรอาหารเหลวชนิดต่างๆ ในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในหัวข้อที่ 1. พบว่าอาหารเหลว Tsb หรือ สูตร B (Table 1.) สามารถเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ปริมาณสูงที่สุดในระยะเวลาสั้นที่สุด 9 วัน ฉะนั้นจึงนำสูตรนี้มาทดสอบต่อเพื่อปรับหาระดับส่วนประกอบต่างๆ ให้เหมาะสมยิ่งขึ้น โดยการศึกษาแบ่งเป็นหัวข้อย่อยตามส่วนประกอบของสูตรอาหารดังนี้

- 2.1 ระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต
- 2.2 ระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามิน - เกลือแร่
- 2.3 ระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งไขมัน
- 2.4 ระดับปริมาณของ emulsifier

2.1 การศึกษาระดับปริมาณของอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน และคาร์โบไฮเดรตที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

- 2.1.1 ใช้ปริมาณ 0.75%
- 2.1.2 ใช้ปริมาณ 1.5%
- 2.1.3 ใช้ปริมาณ 2.25%
- 2.1.4 ใช้ปริมาณ 3%

ดำเนินการทดลอง ดังนี้

- เตรียมผสมอาหารสูตร Tsb โดยปรับอัตราส่วนของปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต เป็น 4 วิธีการดังกล่าวข้างต้น ผสมกับส่วนประกอบอื่นๆ ที่เหลือ
- นำอาหารที่ผสมแล้วใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. ปิดจุกนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที
- หลังจากอาหารเย็นจึงใส่แบคทีเรีย *X. nematophilus* ในอัตรา 3×10^9 เซลล์/ขวด นำไปแช่ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C

- หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงใส่ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ลงเลี้ยงในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และนำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 9 วัน ที่อุณหภูมิ 25°ซ
- ทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ได้จากอาหารในแต่ละวิธีการๆ ละ 5 ซ้ำ (5 ขวด) ได้กล้องจุลทรรศน์
- บันทึกปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ได้ในแต่ละวิธีการ

2.2 ศึกษาปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามิน - แกลีออกซ์ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

2.2.1	ใช้ปริมาณ	0.5%
2.2.2	ใช้ปริมาณ	0.25%
2.2.3	ใช้ปริมาณ	0.125%
2.2.4	ใช้ปริมาณ	0%

ดำเนินการทดลอง ดังนี้

- เตรียมอาหารสูตร Tsb โดยปรับอัตราส่วนอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามิน - แกลีออกซ์ เป็น 4 วิธีการดังกล่าวข้างต้น โดยผสมกับส่วนประกอบอาหารที่เหลือ
- หลังจากนั้นปฏิบัติการเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อ 2.1

2.3 ศึกษาระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งไขมัน ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 5 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

2.3.1	ใช้ปริมาณ	0.2%
2.3.2	ใช้ปริมาณ	0.33%
2.3.3	ใช้ปริมาณ	0.5%
2.3.4	ใช้ปริมาณ	0.66%
2.3.5	ใช้ปริมาณ	0.83%

ดำเนินการทดลอง ดังนี้

- เตรียมอาหารสูตร Tsb โดยปรับอัตราส่วนของอาหารที่เป็นแหล่งไขมัน เป็น 5 วิธีการดังกล่าว โดยผสมกับส่วนประกอบอาหารที่เหลือ
- หลังจากนั้นปฏิบัติการเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อ 2.1

ใช้ปริมาณของ emulsifier ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

2.4.1	ใช้ปริมาณ	6.6%
2.4.2	ใช้ปริมาณ	10%
2.4.3	ใช้ปริมาณ	13.3%
2.4.4	ใช้ปริมาณ	16.7%

ดำเนินการทดลอง ดังนี้

- เตรียมอาหารสูตร Tsb โดยปรับอัตราส่วนของ emulsifier เป็น 4 วิธีการ ดังกล่าวข้างต้น โดยผสมกับส่วนประกอบอาหารที่เหลือ
- หลังจากนั้นปฏิบัติการเช่นเดียวกับวิธีการทดลองในหัวข้อ 2.1

ผลการทดลอง

1. การคัดเลือกสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae*

การคิดค้นส่วนประกอบของสูตรอาหารเหลวทั้ง 9 สูตร ได้พิจารณาจากแหล่งอาหารสำคัญ ที่คิดว่าจำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ซึ่งมาจากแหล่งอาหารต่างๆ ได้แก่

- แหล่งโปรตีนและคาร์โบไฮเดรต จากพืช และสัตว์
- แหล่งวิตามิน - เกลือแร่
- แหล่งไขมันจากพืชและสัตว์
- emulsifier

จากการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวทั้ง 9 สูตร ตาม Table 1. พบว่าสูตรอาหารทั้ง 9 สูตร ที่เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* และให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ สูงกว่า 100,000 ตัว/มล. ขึ้นไปนั้น จะเห็นว่าสูตรอาหาร B F และ G ให้ผลผลิตสูง 181,000, 181,000 และ 155,000 ตัว/มล. ตามลำดับ แต่เมื่อพิจารณาระยะเวลาในการเลี้ยง จะเห็นว่า สูตร B ใช้เวลาสั้นที่สุด 9 วัน ในขณะที่สูตร F และ G ใช้เวลา 16 และ 23 วัน ตามลำดับ ฉะนั้น ในการศึกษารายละเอียดในหัวข้อต่อไป เพื่อปรับปรุงสูตรอาหารให้เหมาะสมยิ่งขึ้นจะคัดเลือกสูตรอาหาร B เป็นหลัก และให้ชื่อสูตรอาหารนี้ว่า Tsb

2. ศึกษาระดับส่วนประกอบต่างๆ ของสูตรอาหารเหลวที่คัดเลือกแล้ว ในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย

2.1 การศึกษาระดับปริมาณของอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว Tsb

จากผลการทดลองตาม Table 2. จะเห็นว่าระดับปริมาณของอาหารที่เป็นแหล่งโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ในอาหารเหลวทั้ง 4 ระดับ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยจะเห็นว่าแนวโน้มการใช้โปรตีน และคาร์โบไฮเดรต ที่ระดับต่ำสุด 0.75% จะให้ผลผลิตสูงสุด 207,600 ตัว/มล.

2.2 ศึกษาระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามิน - เกลือแร่ ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

จากผลการทดลองตาม Table 3. จะเห็นว่า แหล่งของวิตามิน - เกลือแร่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย โดยเทียบดูจากปริมาณของวิตามิน - เกลือแร่ ในอาหาร 0.5% ได้ผลผลิตสูงสุด 209,400 ตัว/มล. ซึ่งให้ผลแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีการอื่นๆ ที่ลดวิตามิน - เกลือแร่ลง และที่ไม่ใส่ ผลผลิตจะได้ต่ำมาก 29,000 ตัว/มล. แสดงให้เห็นว่าวิตามิน - เกลือแร่ มี

ความสำคัญในอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย การจะลดต้นทุนอาหารนั้นต้องหาสารอาหารอื่นที่เป็นแหล่งของวิตามิน - เกลือแร่ เช่นเดียวกันแต่ราคาถูกกว่ามาทดแทน

2.3 ศึกษาระดับปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งไขมัน ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว Tsb

จากผลการทดลองตาม Table 4. จะเห็นว่า แหล่งไขมัน ต่ำสุด คือ 0.2% ในอาหารเหลว Tsb ให้ผลผลิตสูงสุด คือ 134,000 ตัว/มล. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใส่ไขมันในระดับอื่นๆ และมีแนวโน้มว่ายิ่งเพิ่มความเข้มข้นของไขมันลงในอาหาร จะทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยยิ่งลดลง

2.4 ศึกษาระดับปริมาณของ emulsifier ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวสูตร Tsb

จากผลการทดลองตาม Table 5. ระดับการใส่ emulsifier ในอาหารเหลว ที่ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุดในเวลา 9 วัน คือระดับ 6.6% ในอาหารเหลว 30 มล. ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ เฉลี่ย 270,600 ตัว/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใส่ emulsifier 10%, 13.3% และ 16.7% มล. ซึ่งได้ผลผลิตเฉลี่ย 172,000, 127,800 และ 166,000 ตัว/มล. ตามลำดับ แต่การใส่ emulsifier ที่ระดับ 10%, 13.3% และ 16.7% ให้ผลไม่แตกต่างกันทางสถิติ

จากการศึกษาทดสอบส่วนประกอบต่างๆ ของสูตรอาหารเหลว Tsb เลี้ยงไส้เดือนฝอย เพื่อดูระดับความสำคัญและเหมาะสมของสารประกอบแต่ละตัว ทั้งนี้โดยพิจารณาจากผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้สูงเป็นหลัก พบว่า

- | | |
|---|-------|
| - แหล่งอาหารที่เป็นโปรตีน และคาร์โบไฮเดรต | 0.75% |
| - แหล่งอาหารที่เป็นวิตามิน - เกลือแร่ | 0.5% |
| - ไขมัน | 0.2% |
| - emulsifier | 6.6% |

ฉะนั้นสำหรับสูตรอาหารเหลวที่ได้มีการปรับปรุงสัดส่วนของส่วนประกอบอาหารใหม่ จะเป็นสูตรอาหารที่ใช้ในการศึกษาทดลองต่อไป และให้ชื่อสูตรอาหารนี้ว่า Tsb₃

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า การผลิตไลซีนฝอยด้วยอาหารเหลว โดยการเลี้ยงในขวดแก้วนั้น มีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนประกอบและสัดส่วนที่เหมาะสมของสูตรอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ของไลซีนฝอยโดยตรง ถ้าขาดหรือมีไม่พอจะมีผลกระทบต่อ การสร้างไข่ การพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัยต่างๆ ขนาดของวัยต่างๆ เล็กกว่าปกติ ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงลดน้อยลง ฯลฯ ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงไลซีนฝอยมาจากแหล่งอาหารต่างๆ คือ โปรตีนและไขมันจากพืชและสัตว์ วิตามินและเกลือแร่ต่างๆ เช่นเดียวกับงานทดลองของ Pace *et al.* (1986) ซึ่งอาหารเหลวประกอบด้วย ดับวีสตป่นละเอียด, yeast extract โดยสามารถเลี้ยงไลซีนฝอยวัย 3 ระยะ II ได้ประมาณ 190,000 ตัว/มล. ในขวดแก้ว Friedman *et al.* (1989) ได้ทดลองเลี้ยงไลซีนฝอย ใน fermentor โดยใช้สูตรอาหารเหลวประกอบด้วย แป้งถั่วเหลือง yeast extract, แป้งข้าวโพด และ egg yolk ผลผลิตได้ 110,000 ตัว/มล.

สัดส่วนของส่วนประกอบของอาหารและปริมาณอาหาร 30 มล. ที่ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. นั้น จะมีความพอเหมาะกับการเลี้ยงไลซีนฝอยได้ครบ 1 วงจรชีวิตพอดี หลังจากอาหารหมดไลซีนฝอยจะพัฒนาเป็น II ทั้งหมดจะไม่มียัยอื่นปะปน ทำให้ได้ผลผลิตสูง นอกจากนี้ยังเกี่ยวเนื่องกับ aeration เมื่อนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที่ ซึ่งมีส่วนทำให้ไลซีนฝอยที่อยู่ในอาหารเหลวนั้นได้รับ O_2 อย่างทั่วถึงและเพียงพอ ถ้าอาหารมีปริมาณมากหรือน้อยกว่านี้ (ความเร็วในการเขย่าเท่าเดิม) ผลผลิตจะลดลง ในขณะเดียวกันถ้าปริมาณเท่าเดิม ความเร็วในการเขย่าช้าลงหรือเร็วเกินไป ผลผลิตจะลดลง เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Stoll (1953) ซึ่งเลี้ยง *S. glaseri* ในหลอดทดลอง นำไปเขย่าที่ 100 รอบ/นาที่ ให้ผลผลิตสูง ถ้าเร็วหรือช้าไปผลผลิตจะลดลง ส่วน Hansen and Cryan (1966) รายงานว่าจะได้ผลผลิตไลซีนฝอยเพิ่มขึ้นอีก 5 เท่า ถ้าเลี้ยงไลซีนฝอยในอาหารเหลวที่มีปริมาณน้อยที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ทั้งนี้เนื่องจากไลซีนฝอยได้รับ O_2 อย่างทั่วถึง นอกจากนี้อุณหภูมิก็ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการทดลองนี้ อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ ถือว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (Kaya, 1977)

ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ซึ่งเป็น symbiotic bacteria นั้น เป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน ในการเลี้ยงร่วมกับไลซีนฝอยในอาหารเหลว เพราะมันจะสร้างสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของไลซีนฝอย (วัชร และสุทธิชัย, 2542) จะเห็นได้ว่า การผลิตไลซีนฝอยด้วยสูตรอาหาร Tsb₃ นั้นได้ผลผลิตไลซีนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบกับสภาพที่เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (host) เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงและการเจริญเติบโตของไลซีนฝอยนั้นเท่าเทียมกัน

สรุปผลการทดลอง

การทดลองสูตรอาหารเหลว เพื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ให้ได้ปริมาณสูงสุดในระยะเวลาสั้นที่สุดจากสูตรอาหารเหลวทั้ง 9 สูตร แล้วนำมาศึกษาระดับส่วนประกอบต่างๆ ของสูตรอาหารเหลวที่คัดเลือกแล้วให้เหมาะสมยิ่งขึ้น พบว่าอาหารเหลวสูตร Tsb₃ เป็นสูตรอาหารที่เหมาะสมในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* และได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II เฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 200,000 ตัว/มล. โดยเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 125 มล. ใส่อาหาร 30 มล./ขวด เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 9 วัน จึงเก็บผลผลิต

Table 1. Yield and culturing periods of *Steinernema carpocapsae* in the different medium formulae (average from 10 replications).

Recipes	No.of nemas.(IJ)/ml.	Culturing periods (days)
A.	35,722	14
B.	181,000	9
C.	303	8
D.	2,000	12
E.	74,600	10
F.	181,000	16
G.	155,000	23
H.	17,700	17
I.	18,500	21

Table 2. Effect of protein and carbohydrate sources in liquid culture (Tsb) on the production of *Steinernema carpocapsae* in 9 culturing days.

Treatments		Yield of nematodes/ml.
(Levels of protein and carbohydrate sources)		
1.	0.75%	207,600
2.	1.5%	189,800
3.	2.25%	175,200
4.	3%	182,000
CV.	(%)	11.03

Table 3. Effect of vitamin and mineral sources in liquid culture (Tsb) on the production of *Steinernema carpocapsae* in 9 culturing days.

Treatments		Yield of nematodes/ml.
(Levels of vitamin and mineral sources)		
1.	0.5%	209,400 a
2.	0.25%	166,200 b
3.	0.125%	158,400 c
4.	0%	29,000 d
CV.	(%)	10.08

In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.

Table 4. Effect of lipid source in liquid culture (Tsb) on the production of *Steinernema carpocapsae* in 9 culturing days.

Treatments (Levels of lipid source)		Yield of nematodes/ml.
1.	0.2%	134,000 a
2.	0.33%	94,200 b
3.	0.5%	40,600 c
4.	0.66%	15,800 cd
5.	0.83%	460 d
CV.	(%)	46.55

In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.

Table 5. Effect of emulsifier source in liquid culture (Tsb) on the production of *Steinernema carpocapsae* in 9 culturing days.

Treatments (Levels of emulsifier source)		Yield of nematodes/ml.
1.	6.6%	270,600 a
2.	10%	172,000 b
3.	13.3%	127,800 b
4.	16.7%	166,000 b
CV.	(%)	26.21

In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% by DMRT.

1.2 อิทธิพลของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae)
ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser)
ในอาหารเหลว

The Influence of *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) on the
Propagation of the Entomopathogenic Nematode
Steinernema carpocapsae (Weiser) in Liquid Culture

บทคัดย่อ

ศึกษาอิทธิพลของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ที่มีต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในอาหารเหลว ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยทดลองเลี้ยงแบคทีเรีย *X. nematophilus* ในอาหารเหลวร่วมกับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพต่างๆ 4 วิธีการมี 5 ขั้นตอน วิธีการคือ

1. เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย *X. nematophilus* ลงไปให้มีการเจริญเติบโตก่อน 24 ชั่วโมง
2. เลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียในอาหารเหลวพร้อมกัน
3. เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 24 ชั่วโมงก่อน แล้วกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออก จึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง
4. เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยไม่มีการใส่แบคทีเรีย

การเลี้ยงไส้เดือนฝอยทั้ง 4 วิธีการ ทำในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. บรรจุอาหาร 30 มล. แล้วบ่มนิ่งฆ่าเชื้อ เขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 9 วัน จึงทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J₃ ที่ได้ พบว่าวิธีการที่ 1 ให้ผลผลิตสูงสุด 166,140 ตัว/มล. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการที่ 2, 3 และ 4 ซึ่งได้ผลผลิต 131,213 5,646 และ 5,086 ตัว/มล. ตามลำดับ

ส่วนการศึกษาถึงระดับปริมาณของแบคทีเรีย ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว โดยใส่แบคทีเรีย 4 ระดับ 3×10^7 , 3×10^8 , 3×10^9 และ 3×10^{10} เซลล์/อาหาร 30 มล. พบว่าผลผลิตสุดท้ายของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J₃ ที่ได้จากอาหารเหลวจะเพิ่มขึ้นตามปริมาณของแบคทีเรียที่ใส่ในอาหารดังนี้คือ 81,200 99,800 109,000 และ 128,800 ตัว/มล. ตามลำดับ โดยผลผลิตที่ได้สูงสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากผลผลิตที่ได้ต่ำสุด ผลการทดลองเหล่านี้

คำนำ

Xenorhabdus nematophilus เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* แบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน (symbiotic relationship) ในธรรมชาติพบแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอย (Poinar and Thomas, 1965) ซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะโดยที่ไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปล่อยแบคทีเรียออกมาสู่กระแสเลือดของแมลงซึ่งเป็นระบบเปิด แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลงตายภายในเวลา 24 - 48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด

ในประเทศไทยมีการนำไส้เดือนฝอยชนิดนี้ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชที่สำคัญต่างๆ ได้เป็นผลสำเร็จ ได้แก่ หนอนกินได้ผิวเปลือกถองถอง ตัวอ่อนด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ด้วงงวงมันเทศ หนอนกระทุ้งหอมในควาเรือ (วัชร, 2538) ปัจจุบันมีการศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยชนิดนี้ให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเทียม (วัชร และคณะ, 2539) เพื่อใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารฆ่าแมลง ในการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลว (liquid medium) จึงเป็นวิธีหนึ่งที่จะนำไปสู่การผลิตระดับการค้าได้ (Friedman, 1990) เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าแบคทีเรีย *X. nematophilus* เป็นปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอย และสภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวในห้องปฏิบัติการนั้นต่างจากสภาพธรรมชาติ ซึ่งมีแมลงเป็นแหล่งอาศัย ฉะนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาในประการแรกคือ สภาพการเลี้ยงร่วมกันระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองที่จะพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน ให้ได้รับผลประโยชน์สูงสุด และประการที่ 2 ศึกษาถึงระดับของปริมาณแบคทีเรียที่มีผลต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย จากการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการยืนยันให้เห็นความสำคัญของแบคทีเรียชนิดนี้ที่มีต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงในอาหารเหลว ข้อมูลพื้นฐานต่างๆ ที่ได้สามารถนำไปใช้ในการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากในระดับอุตสาหกรรมต่อไป



อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ ตู้บ่มนิ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ flask, petridish, beaker, cylinder, homogenizer
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Yeast Salt broth, Nutrient agar, TTC + Tergitol 7 agar
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ II
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%
8. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ microfilter ขนาด 0.2 ไมครอน สำลี กระดาษอลูมิเนียม

วิธีการ

1. การเตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ สำหรับทดลอง

เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

นำไข่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II จำนวนประมาณ 1,000 ตัว มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างด้วยน้ำกลั่นอบนิ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปบดในชุดบด (homogenizer) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียในลำไส้ของไข่เดือนฝอยหลุดออกมา แล้วใช้เข็มเจียตะ และนำไปฉีดบนอาหาร TTC + Tergitol 7 agar นำเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเลือก colony ของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะกลมมนตรงกลางสีเข้ม รอบๆ สีน้ำเงิน ทำการแยกออกมาเลี้ยงไว้บน Nutrient agar ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 12° ซ เมื่อเวลาจะใช้จึงเจียเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS broth นำไปเขย่าที่ 25 - 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนับปริมาณเซลล์แบคทีเรีย (direct count) ที่ได้พร้อมปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการผังแผนการทดลอง

3 การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J₁ ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนิ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ

การทดลองแบ่งเป็น 2 หัวข้อ คือ

1. ความสำคัญของแบคทีเรีย *X. nematophilus* กับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 วิธีการ (treatment) 5 ซ้ำ (replication) วิธีการมีดังนี้

1.1 เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย

X. nematophilus ลงไปเจริญเติบโตก่อน 24 ชั่วโมง

1.2 เลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียในอาหารเหลวพร้อมกัน

1.3 เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว 24 ชั่วโมงก่อน แล้วกรองเอาเซลล์แบคทีเรียออกก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง

1.4 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยไม่มีการใส่แบคทีเรีย

นำขวดอาหารเหลวที่เตรียมไว้ตามข้อ 1. มาทดลองตามวิธีดังกล่าว แต่ละวิธีการใช้อาหารเหลว 5 ขวด (1 ขวด = 1 หน่วยทดลอง) หยอดแบคทีเรีย 1 มล. ซึ่งมีปริมาณเซลล์ประมาณ 10^9 /อาหารเหลว 1 ขวด (30 มล.) ใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ทุกวิธีการ (30,000 ตัว/ขวด) ส่วนในวิธีการที่ 3 นั้น ทำการกรองแบคทีเรียด้วย microfilter ขนาด 0.2 ไมครอน ในทุกวิธีการหลังจากเตรียมการทดลองแล้ว นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 9 วัน จึงทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J₁ ในอาหารเหลวปริมาณ 1 มล.

2. การศึกษาระดับปริมาณของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว

วางแผนการทดลองแบบ CRD มี 4 วิธีการ (treatment) 5 ซ้ำ (replication) ดังนี้

2.1 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย 3×10^7 เซลล์/อาหาร 30 มล.

2.2 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย 3×10^8 เซลล์/อาหาร 30 มล.

2.3 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย 3×10^9 เซลล์/อาหาร 30 มล.

2.4 เลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่ใส่แบคทีเรีย 3×10^{10} เซลล์/อาหาร 30 มล.

นำอาหารเหลวในขวดเขย่าที่เตรียมตามวิธีข้อ 1. จำนวน 20 ขวด นำมาทดลองตามวิธีการดังกล่าวข้างต้น 4 วิธีการ วิธีการละ 5 ขวด (1 ขวด = 1 หน่วยทดลอง) โดยหยดแบคทีเรียใส่ในอาหารเหลวอัตราต่างๆ ตามแต่ละวิธีด้วยวิธีการปลอดเชื้อ นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใส่ใส่เดือนฝอยลงเลี้ยงในอัตรา 500 ตัว/อาหาร 1 มล. ทุกวิธีการ (15,000 ตัว/ขวด) แล้วเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 9 วัน จึงนำมาตรวจนับผลผลิตใส่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ในทุกวิธีการ

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง กุมภาพันธ์ 2539 – พฤษภาคม 2539

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีย *X. nematophilus* มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวในห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกันกับในสภาพธรรมชาติ ตาม Table 1. จะเห็นว่าวิธีการแรกที่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว 24 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงจะให้ผลผลิตสูงสุดคือ 166,140 ตัว/มล. ไส้เดือนฝอยสามารถเพิ่มปริมาณได้ถึง 166 เท่า และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการที่ 2, 3, 4 ซึ่งให้ผลผลิตน้อยกว่าตามลำดับ ตามวิธีการที่ 1.1 ซึ่งใส่แบคทีเรียลงไปเลี้ยงก่อนนั้น แบคทีเรียจะอาศัยอาหารเหลวในการขยายปริมาณโดยการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมากและขณะเดียวกันมันจะผลิตสารบางชนิด (ปัจจุบันยังไม่ทราบชื่อ) ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (Poinar and Thomas, 1966) และขณะเดียวกันมันสามารถป้องกันการปนเปื้อน (contamination) ของจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ โดยสร้างสาร antibiotic ได้แก่ Xenocoumacins, Xenorhabdins (Akhurst, 1982; Mc Inerney *et al.*, 1991a and 1991b) และ Bacteriocins (Boemare *et al.*, 1992) และการขยายปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียน้อยอย่างรวดเร็ว ทำให้จุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ไม่สามารถแข่งขันได้ เมื่อสภาพต่างๆ ที่เหมาะสมดังกล่าวเกิดขึ้นในอาหารเหลวแล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงซึ่งจะได้รับสารอาหารที่จำเป็นทันทีจึงสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์

วิธีการที่ 1.2 ซึ่งใส่เชื้อแบคทีเรียและใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอาหารเหลวพร้อมกัน ได้ผลผลิตรองลงมาคือ 131,213 ตัว/มล. เพิ่มปริมาณได้ 131 เท่า สภาพที่แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่ต้องอาศัยอยู่ร่วมกันตั้งแต่เริ่มต้นของการเลี้ยงนั้น เนื่องจากปัจจัยต่างๆ ในการเจริญเติบโตในอาหารที่ใช้เลี้ยงมีอยู่อย่างจำกัด อาจมีการแข่งขันในการใช้ปัจจัยต่างๆ ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองนี้แบคทีเรียไม่สามารถที่จะขยายปริมาณหรือแบ่งเซลล์ได้เต็มที่ ฉะนั้นการสร้างสารอาหารที่จำเป็นต่อไส้เดือนฝอยลดน้อยลงกว่าวิธีที่ 1.1 ซึ่งมีผลต่อผลผลิตของไส้เดือนฝอย ในขณะที่เดียวกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่นมีโอกาสมากขึ้น

วิธีการที่ 1.3 ในช่วง 24 ชั่วโมงแรกนั้นจะมีสภาพคล้ายกับวิธีการที่ 1.1 แต่สารที่จำเป็นนี้อาจไม่พอกับความต้องการของไส้เดือนฝอย ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ได้ต่ำมาก 5,646 ตัว/มล. ขยายปริมาณได้ 5.6 เท่า เพราะหลังจาก 24 ชั่วโมงแล้ว แบคทีเรียจะถูกกรองออก ฉะนั้นจึงมีผลกระทบต่อการขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอย ซึ่งแสดงให้เห็นว่าแบคทีเรีนี้นี้จะต้องมีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยตลอดระยะเวลาที่เลี้ยงร่วมกันจึงจะได้ผลผลิตสูงสุด และโอกาสที่จะถูกปนเปื้อนโดยเชื้อจุลินทรีย์อื่นก็มีมากกว่าวิธีที่ 1.1 และ 1.2

ส่วนวิธีการที่ 1.4 นั้น ซึ่งไม่ได้ใส่แบคทีเรียลงไปเลี้ยงร่วมกับไส้เดือนฝอย แต่อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอยก็ยังเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ แต่ผลผลิตน้อย ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับวิธีที่ 1.3 ตามปกติในลำไส้ของไส้เดือนฝอยมีแบคทีเรียชนิดนี้อาศัยอยู่ แต่มีปริมาณน้อย มันจะถูกปล่อยออกมาในอาหารพร้อมกับการขับถ่ายของเสียของไส้เดือนฝอย อย่างไรก็ตามการสร้างสารที่จำเป็นและสาร antibiotic ก็มีน้อยเช่นกัน ฉะนั้นโอกาสที่จะถูกปนเปื้อนก็มีมากขึ้นเช่นเดียวกับวิธีที่ 1.3 สภาพเช่นนี้ไม่เหมาะกับไส้เดือนฝอย

นอกจากสภาพการเลี้ยงมีผลต่อการเจริญเติบโตและขยายปริมาณไส้เดือนฝอยแล้วระดับปริมาณของแบคทีเรียที่ใส่ลงในอาหารที่เลี้ยงร่วมกับไส้เดือนฝอยก็มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยเช่นกัน จาก Table 2. ในสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมที่สุด (วิธีการที่ 2.4) ปริมาณแบคทีเรียสูงสุดที่ 3×10^{10} เซลล์/อาหาร 30 มล. ใช้เป็น inoculum ในอาหารเหลวให้ผลผลิตสูงสุด แสดงให้เห็นว่าเมื่อแบคทีเรียมีจำนวนมากขึ้น การสร้างสารที่จำเป็นต่อการดำรงชีพก็มีมากขึ้นและการปนเปื้อนก็ลดลง ซึ่งเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยมากขึ้น

การทดลองทั้ง 2 หัวข้อนี้ให้ผลสอดคล้องกันแสดงให้เห็นถึงอิทธิพลในทางบวกของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* นอกจากนี้ยังมีปัจจัยที่สำคัญอื่นๆที่มีผลต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย คือ ออกซิเจน อุณหภูมิ องค์ประกอบของอาหารเหลว ความเหมาะสมระหว่างจำนวนประชากรของแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย (Pace *et al.*, 1986; Friedman *et al.*, 1989; Buecher and Popiel, 1989) ซึ่งจะต้องมีการทดสอบหาข้อมูลต่อ เพื่อให้การเพิ่มผลผลิตได้สูงสุด

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาอิทธิพลของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในอาหารเหลว โดยการทดลองปรับสภาพการเลี้ยงร่วมกันระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสอง 4 วิธีการด้วยกัน พบว่าวิธีการที่เลี้ยงแบคทีเรียให้เจริญในอาหารเหลวก่อน 24 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 9 วัน จะได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุดเฉลี่ย 166,140 ตัว/มล. และแตกต่างจากวิธีการอื่นๆอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ปริมาณแบคทีเรียที่ใส่ลงไปเลี้ยงในระดับสูงสุด คือ 3×10^{10} เซลล์/อาหาร 30 มล. จะได้ผลผลิตสูงสุดเฉลี่ย 128,800 ตัว/มล. และแตกต่างจากผลผลิตที่ได้จากการใส่แบคทีเรียระดับต่ำสุด (3×10^7 เซลล์) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการผลิตไส้เดือนฝอย ในระดับการค้า เพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนสารเคมีฆ่าแมลง

Table 1. Effect of bacterial cell *Xenorhabdus nematophilus* on development of *Steinernema carpocapsae* in liquid culture.

Treatments	Yield of nematodes/ml.	
bacteria and nematode in liquid medium	(9 days)	
1. culturing bact. 24 hr. prior nema. inoculation	166,140	a
2. nema. and bact. cultured at the same time	131,213	b
3. 24 hr. cultured bact. was filtered prior inoculation of nema.	5,646	c
4. nema. culturing alone without bact. inoculation	5,086	c
CV. (%)	20.40	

In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Table 2. Effect of bacterial inoculum sizes on liquid culture production of *Steinernema carpocapsae*.

Treatments	Yield of nematodes/ml.	
Inoculum sizes of <i>X. nematophilus</i> (cells/ml.)	(9 days)	
1. 3×10^7	81,200	c
2. 3×10^8	99,800	bc
3. 3×10^9	109,000	ab
4. 3×10^{10}	128,800	a
CV. (%)	14.21	

In a column means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

1.3 ผลของระดับปริมาณอาหารเหลวและไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

Effect of Quantity Levels of Liquid Culture and Nematode

Inoculum Sizes on Yield of *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

บทคัดย่อ

ระดับปริมาณอาหารเหลว และ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงเลี้ยงในขวดแก้วมีผลต่อการขยายปริมาณผลผลิตของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ซ้ำ ปัจจัย A ระดับปริมาณอาหารเหลวสูตร Tsb₃ มี 4 ระดับ คือ 15 20 25 30 มล. ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. ทำการอบนิ่งฆ่าเชื้อ แล้วใส่แบคทีเรีย 10¹⁰ เซลล์/ขวด ลงในอาหารนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ inoculum ไส้เดือนฝอยซึ่งเป็น ปัจจัย B มี 4 ระดับ คือ 1,000 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่าปัจจัยร่วมเหมาะสมที่สุด คือ ใส่ปริมาณอาหาร 15 มล./ขวด และใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุด 266,775 ตัว/มล.

คำนำ

จากผลการทดลองที่ผ่านมา ถึงแม้ว่าได้ค้นพบสูตรอาหารที่เหมาะสมที่ให้ผลผลิตสูงมีคุณภาพดี และการเลี้ยงไส้เดือนฝอยนั้นจำเป็นต้องเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiont ของมัน (วัชรวิทย์และสุทธิชัย, 2542) อย่างไรก็ตามในการทดลองเลี้ยงแต่ละครั้งผลผลิตที่ได้นั้นยังไม่คงที่หรือสม่ำเสมอ แสดงว่าจะต้องมีปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้อง ปริมาณอาหารที่ใส่ลงในขวดเพื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยนั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญ จากการทดลองที่ผ่านมาได้กำหนดปริมาณอาหาร 30 มล./ขวด แก้วขนาด 125 มล. คงที่มาตลอด และความเร็วของเครื่องเขย่า 120 รอบ/นาที ซึ่งเป็นความเร็วสูงสุดที่ปรับได้ อาจกล่าวได้ว่าระดับปริมาณของอาหารในขวดที่ใช้เลี้ยงนั้น มีความเกี่ยวข้องกับการละลาย O_2 หรือปริมาณของ O_2 ที่ไส้เดือนฝอยได้รับ ส่วนปริมาณของไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงไปเลี้ยงนั้นจะต้องมีความพอเหมาะด้วย ถ้าเกิดมีการแข่งขันแย่งปัจจัยต่างๆ กันมาก ย่อมมีผลกระทบต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ ฉะนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาผลของปริมาณอาหารระดับต่างๆ ที่ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. เพื่อเลี้ยงไส้เดือนฝอยและปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum หลายระดับต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, petridish, beaker, cylinder, homogenizer
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Yeast Salt broth, TTC + Tergitol 7 agar
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ IJ
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%
8. วัสดุอื่นๆ เช่น สำลี กระดาษอลูมิเนียม เข็มเย็บ

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD 16 วิธีการ (treatment) 5 ซ้ำ (replication) มี 2 ปัจจัย (factor) ดังนี้

ปัจจัย A ใช้ปริมาณอาหารเหลวสูตร Tsb₃ 4 ระดับ คือ

- ปริมาณอาหาร 15 มล./ขวด
- ปริมาณอาหาร 20 มล./ขวด
- ปริมาณอาหาร 25 มล./ขวด
- ปริมาณอาหาร 30 มล./ขวด

ปัจจัย B ใช้ปริมาณไข่เดือนฝอยที่เป็น inoculum 4 ระดับ คือ

- ไข่เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไข่เดือนฝอย 2,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไข่เดือนฝอย 3,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไข่เดือนฝอย 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล.

1. การเตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ สำหรับทดลอง

เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ในปริมาณต่างๆ ตามปัจจัย A ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2 การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II จำนวนประมาณ 1,000 ตัว มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นอบนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปบดในชุดบด (homogenizer) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียในลำไส้ของไส้เดือนฝอยหลุดออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยตะ และนำไปฉีดบนอาหาร TTC + Tergitol 7 agar นำเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเลือก colony ของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะกลมมนตรงกลางสีเข้ม รอบๆ สีน้ำเงิน ทำการแยกออกมาเลี้ยงไว้บน Nutrient agar ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 12° ซ เมื่อเวลาจะใช้จึงเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS broth นำไปเขย่าที่ 25 - 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้แบคทีเรียเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. (direct count) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ (ปัจจัย B)

4. การปฏิบัติการทดลอง

นำขวดอาหารเหลวที่เตรียมไว้ตามข้อ 1. มาหยดแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ขวดละ 1 มล. โดยวิธีการปลอดเชื้อ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 - 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3. ตามวิธีการต่างๆ ของปัจจัย B และนำไปเขย่าต่อเป็นเวลา 10 วัน แต่ละวิธีการทำการทดลอง 5 ขวด (5 ซ้ำ) หลังจากนั้นจึงทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ในแต่ละวิธีการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างพฤษภาคม 2539 – สิงหาคม 2539

ผลการทดลอง

จาก Table 1. การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในขวดแก้วขนาด 125 มล. โดยที่ใส่ปริมาณอาหารในระดับต่ำสุด 15 มล. จะให้ผลผลิตสูงสุดไม่ว่าจะใช้ inoculum 1,000 2,000 3,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ได้ผลผลิต 266,775, 250,108 และ 267,764 ตัว/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) กับผลผลิตที่ลดลงเมื่อเลี้ยงในระดับปริมาณอาหารที่เพิ่มขึ้น (20 25 และ 30 มล.) ที่มีการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยในปริมาณเดียวกัน (1,000 – 3,000 ตัว/อาหาร 1 มล.) ถ้าเพิ่มเป็น 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ผลผลิตกลับลดลงในทุกระดับปริมาณอาหาร

ที่ปริมาณอาหาร 20 มล. ได้ผลผลิตรองลงมาในช่วงการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 – 3,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และไม่แตกต่างกันทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าที่ระดับปริมาณอาหารต่ำ 15 – 20 มล. นั้น ขนาดของ inoculum ไส้เดือนฝอยไม่มีผลต่อผลผลิตที่ได้

การเพิ่มปริมาณอาหารเป็น 25 – 30 มล. ขนาดของ inoculum ไส้เดือนฝอย เริ่มจะมีผลต่อผลผลิตที่ได้ ซึ่งไม่มีความสม่ำเสมอและแปรปรวน ฉะนั้นสรุปได้ว่าการใช้ปริมาณอาหารระดับต่ำสุด 15 มล. ในขวดแก้ว 125 มล. และใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะเหมาะสมที่สุด

วิจารณ์ผลการทดลอง

การใช้ปริมาณอาหาร 15 มล. ในขวดแก้วขนาด 125 มล. และขนาด inoculum ของไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงไส้เดือนฝอย เนื่องจากในการทดลองนั้นใช้ความเร็วในการเขย่าคงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงด้วยความเร็ว 120 รอบ/นาที ซึ่งเป็นความเร็วสูงสุดที่สามารถจะปรับได้ การเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้อยจะให้ผลผลิตที่ดีกว่า เนื่องจากการละลายของ O_2 ในอาหารจะดีกว่า และมีการกระจายของอากาศไปได้ทั่วถึง ทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญได้ดี มีการสร้างสารอาหารที่จำเป็นต่อการขยายพันธุ์และการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยได้มากกว่า ดังเช่นที่ Mc Daniel and Bailey 1969 , Mc Daniel *et al.*, 1965 ได้รายงานว่าการผลิตเชื้อจุลินทรีย์ในระดับขวดเขย่านั้น การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์จะดีหรือไม่ขึ้นกับปัจจัยแวดล้อมที่เอื้ออำนวยต่อการให้ออกซิเจนเพียงพอเหมาะสมหรือไม่ ซึ่งได้แก่ระดับความเร็วในการเขย่า ระดับปริมาณอาหารในขวดเขย่าเป็นต้น ปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. นั้นเป็นอัตราที่เหมาะสมที่สุด การใช้ในปริมาณที่น้อยกว่าเป็นการลดต้นทุนในการผลิตเนื่องจากในการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum จำเป็นต้อง

ใช้แมลงอาศัย (host) คือ หนอนกินรังผึ้งในการผลิต ผลการทดลองนี้สามารถนำไปเพิ่มประสิทธิภาพในการผลิตไส้เดือนฝอยชนิดนี้ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ด้วยอาหารเหลวในขวดแก้วขนาด 125 มล. ระดับปริมาณอาหารในขวดแก้ว และปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นที่ใส่ลงไปเลี้ยง มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตที่ได้รับจากการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ในขวดแก้วขนาด 125 มล. โดยใส่ระดับปริมาณอาหารต่างๆ คือ 15 20 25 และ 30 มล. แล้วใส่แบคทีเรีย *X. nematophilus* 10¹⁰ เซลล์/ขวด นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ inoculum ไส้เดือนฝอยในระดับปริมาณต่างๆ คือ 1,000 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงต่อเป็นเวลา 10 วัน พบว่าที่ระดับปริมาณอาหาร 15 มล. และใส่ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงให้ผลผลิตสูงสุด 266,775 ตัว/มล.

Table 1. Average yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* per ml. cultured in 125 ml. shake flask for 10 days at different combinations of quantity levels of liquid media and nematode inoculum sizes.

Liquid medium (ml./flask) (A)	Levels of nematode inoculum sizes (nemas./ml.) (B)				A Mean ^{1/}
	1,000	2,000	3,000	4,000	
15	266,775 a(a)	250,108 a(a)	267,764 a(a)	158,333 a(b)	235,745 A
20	215,250 b(a)	207,566 b(a)	216,216 b(a)	153,000 a(b)	198,008 B
25	176,400 c(ab)	196,266 bc(a)	171,850 c(b)	157,599 a(b)	175,529 C
30	131,383 d(b)	175,000 c(a)	162,550 c(a)	118,300 b(b)	146,808 D
B Mean ^{1/}	157,452 A	207,235 A	204,595 A	146,808 B	189,022

CV. = 6.9%

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

In a row, means followed by a common letter in a bracket () are not significantly different at 5% level by DMRT.

^{1/} Means factor A, B, followed by a common capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD (LSD 0.05 A, B = 21789.9 nemas./ml).

1.4 ผลของปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิต
ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในอาหารเหลว

Effect of Bacterial and Nematode Inoculum Sizes on *In Vitro* Liquid Culture

Production of the Entomopathogenic Nematode

Steinernema carpocapsae (Weiser)

บทคัดย่อ

ผลของระดับปริมาณของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* และไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตของไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ซ้ำ ปัจจัย A คือปริมาณแบคทีเรียมี 4 ระดับได้แก่ 10^7 10^8 10^9 และ 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. ปัจจัย B คือปริมาณไส้เดือนฝอยมี 4 ระดับ คือ 1,000 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยใส่แบคทีเรียลงเลี้ยงในอาหาร 15 มล. หลังจากบ่มนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน ทำการทดลองในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25°C พบว่าวิธีการที่ใช้ปริมาณแบคทีเรีย 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. และใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J2 สูงสุดเฉลี่ย 308,800 ตัว/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใช้ระดับปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยในระดับอื่นๆ ที่เลี้ยงร่วมกัน

ไส้เดือนฝอยในวงศ์ Steinernematidae อันได้แก่ *Steinernema carpocapsae* (Weiser) เป็นไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลาย และเจริญเติบโตครบวงจรได้ในตัวแมลง (entomopathogenic nematode) มีศักยภาพสูงในการนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี ฉะนั้นจึงได้มีการศึกษาการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยชนิดนี้เป็นปริมาณมากด้วยอาหารเทียม เพื่อจะนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางทดแทนการใช้สารฆ่าแมลง

ในสภาพธรรมชาติ ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* มีชีวิตอยู่ร่วมกับแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* แบบพึ่งพาอาศัยกันและกัน (symbiotic relationship) โดยที่แบคทีเรียชนิดนี้ จะอาศัยอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอย (Poinar and Thomas, 1965) ซึ่งทำหน้าที่เป็นพาหะเข้าสู่ภายในตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปล่อยแบคทีเรียนี้ออกมาสู่กระแสเลือดของแมลงซึ่งเป็นระบบเปิด แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์ และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็ว แล้วทำให้แมลงตายภายใน 24 - 48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารในตัวแมลงหมด (วัชร และสุทธิชัย, 2542)

ในประเทศไทยมีการพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวได้เป็นผลสำเร็จ (วัชร และพิมลพร, 2535; วัชร และคณะ, 2539) หลังจากนั้นได้เริ่มพัฒนาการผลิตด้วยอาหารเหลว (liquid culture) ซึ่งเป็นวิธีหนึ่งที่จะนำไปสู่การผลิตระดับการค้าได้ (Friedman, 1990) เนื่องจากมีต้นทุนต่ำ ปัจจัยสำคัญอย่างหนึ่งต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอย ดังได้กล่าวแล้ว คือ แบคทีเรีย *X. nematophilus* ฉะนั้นการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวจึงจำเป็นต้องศึกษาปริมาณของแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อปริมาณไส้เดือนฝอยที่นำลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวร่วมกันเพื่อให้ได้ผลผลิตสูงสุด



อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ ตู้บ่มนิ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, petridish, beaker, cylinder, homogenizer
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Yeast Salt broth, TTC + Tergitol 7 agar
4. ไร้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ II
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%
8. วัสดุอื่นๆ เช่น สำลี กระดาษอลูมิเนียม เข็มเขี่ย

วิธีการ

วางแผนการทดลอง แบบ 4 x 4 factorial in CRD 16 วิธีการ (treatment) 5 ซ้ำ (replication) มี 2 ปัจจัย (factor) ดังนี้

ปัจจัย A ใช้ปริมาณแบคทีเรีย 4 ระดับ คือ

- แบคทีเรีย 10^7 เซลล์/อาหาร 15 มล.
- แบคทีเรีย 10^8 เซลล์/อาหาร 15 มล.
- แบคทีเรีย 10^9 เซลล์/อาหาร 15 มล.
- แบคทีเรีย 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล.

ปัจจัย B ใช้ปริมาณไร้เดือนฝอย 4 ระดับ คือ

- ไร้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไร้เดือนฝอย 2,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไร้เดือนฝอย 3,000 ตัว/อาหาร 1 มล.
- ไร้เดือนฝอย 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล.

1. การเตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ที่ใช้ในการทดลอง

เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ใส่ขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 15 มล. ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ประมาณ 1,000 ตัว มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นอบนึ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำมาบดในชุดบด (homogenizer) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียในลำไส้ของไส้เดือนฝอยหลุดออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยตะ และนำไปฉีดบนอาหาร TTC + Tergitol 7 agar นำเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเลือก colony ของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะกลมมนตรงกลางสีเข้ม รอบๆ สีน้ำเงิน ทำการแยกออกมาเลี้ยงไว้บน Nutrient agar ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ นำเก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 12°ซ เมื่อเวลาจะใช้จึงเขี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS broth นำไปเขย่าที่อุณหภูมิ 25 - 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ได้ และปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการดังแผนการทดลอง (ปัจจัย A)

3. การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ (ปัจจัย B)

4. การปฏิบัติการทดลอง

นำขวดอาหารเหลวที่เตรียมไว้ตามข้อ 1. มาหยดแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ตามวิธีต่างๆ ของปัจจัย A โดยวิธีการปลอดเชื้อ และนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ในข้อ 3. ตามวิธีการต่างๆ ของปัจจัย B และนำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 25°ซ ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 วัน แต่ละวิธีการทำการทดลอง 5 ขวด (5 ซ้ำ) หลังจากนั้นจึงทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ได้ในแต่ละวิธีการ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างตุลาคม 2539 - มกราคม 2541

ผลการทดลอง

ในการผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ในอาหารเหลว จะเห็นได้ว่าปริมาณ (inoculum size) ของไส้เดือนฝอย และเชื้อแบคทีเรียที่ใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกันมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้รับ จาก Table 1. และ Figure 1. ปริมาณไส้เดือนฝอยในระดับต่ำสุด คือ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เลี้ยงร่วมกับปริมาณแบคทีเรียสูงสุด 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. ในอาหารเหลวจะได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยสูงสุด คือ 308,800 ตัว/มล. ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเลี้ยงร่วมกันของระดับปริมาณอื่นๆ ระหว่างไส้เดือนฝอย และแบคทีเรีย

เมื่อการใช้ปริมาณไส้เดือนฝอยในอัตราต่ำสุด 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ผลผลิตที่ได้มีแนวโน้มสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณแบคทีเรียที่เลี้ยงร่วมกัน (Figure 1.) จะเห็นได้จากการเลี้ยงร่วมกันกับระดับปริมาณแบคทีเรียที่น้อยกว่า 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. คือ 10^9 10^8 10^7 เซลล์/อาหาร 15 มล. นั้น ผลผลิตที่ได้จะลดน้อยลงตามลำดับ คือได้ 308,800, 221,330, 200,060 และ 181,120 ตัว/มล. และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละระดับ ยกเว้นผลผลิตที่ระดับ 10^7 และ 10^8 นั้นไม่แตกต่างกัน

สำหรับด้านการใช้ปริมาณแบคทีเรียระดับสูงสุด (Table 2. Figure 1.) คือ 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. เลี้ยงร่วมกับระดับไส้เดือนฝอยที่สูงกว่า 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. คือ 2,000 3,000 และ 4,000 ตัว/อาหาร 1 มล. นั้น ผลผลิตที่ได้ในแต่ละระดับลดลงและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของผลผลิตระหว่าง 3 ระดับนี้

วิจารณ์ผลการทดลอง

เทคโนโลยีการขยายปริมาณไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวนั้น ปัจจุบันได้มีการดำเนินการเพื่อประโยชน์ในเชิงพาณิชย์ จึงได้มีการศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตไส้เดือนฝอยโดยวิธีนี้อย่างกว้างขวาง ปัจจัยสำคัญนั้นได้แก่ ส่วนประกอบของอาหารเหลว ออกซิเจน อุณหภูมิ ชีวิตวิทยาของแบคทีเรีย ประชากรของแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย shear sensitivity และ inoculum size (Pace *et al.*, 1986 ; Friedman *et al.*, 1989 ; Buecher and Popiel, 1989 ; Popiel *et al.*, 1989 ; Ehlers *et al.*, 1992 ; Stoessel and Ehlers, 1992 ; Wang, 1993 ; Strauch *et al.*, 1994 ; Surrey and Davies, 1996) งานทดลองนี้เป็นการยืนยันถึงความสำคัญของแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum นั้นมีผลต่อการผลิตไส้เดือนฝอย ปริมาณของแบคทีเรียในระดับสูงสุด 10^{10} เซลล์/อาหาร 15 มล. เลี้ยงร่วมกับปริมาณไส้เดือนฝอยที่ระดับน้อยที่สุด 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะให้ผลผลิตสูงสุดและมีแนวโน้มที่เห็นได้ชัด คือยิ่งเพิ่มปริมาณแบคทีเรียให้สูงขึ้นผลผลิตที่ได้ก็ยิ่งสูงขึ้น แต่ถ้าใส่

ปริมาณไส้เดือนฝอยสูงกว่า 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. มีผลทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง อาจกล่าวได้ว่า แบคทีเรียที่มีอยู่ในจำนวนที่สูงกว่านั้นสามารถสร้างสารอาหารที่จำเป็นปริมาณมากกว่าในระยะเวลาดสั้นกว่า และปรับสภาพที่เหมาะสมอื่นๆ แก่การเจริญเติบโตขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยได้ดีกว่า ดังนั้นการเลี้ยงในสภาพนี้จะได้ผลผลิตสูงกว่า

นอกจากนี้ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงในแต่ละขวดแก้วนั้นมีปริมาณจำกัด คือ 15 มล. ซึ่งพอเพียงกับปริมาณของไส้เดือนฝอยในระดับหนึ่งที่สามารถใช้ประโยชน์จากอาหารได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุดกล่าวคือ เมื่อไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตขยายพันธุ์ครบ 1 วงจรชีวิต อาหารจะหมดพอดี ไส้เดือนฝอยวัย 2 จะพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ II ทั้งหมด ผลผลิตที่ได้จึงสูง แต่ถ้าใส่ไส้เดือนฝอยในปริมาณน้อย เมื่อพัฒนาครบ 1 วงจรชีวิต อาหารยังคงมีเหลือบ้าง ไส้เดือนฝอยวัย 2 บางส่วนจะเจริญเป็นวัย 3 ระยะ II และพัฒนาต่อเป็นวัย 4 และตัวเต็มวัย เมื่อเก็บผลผลิตจึงได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II น้อยกว่าเพราะมีบางส่วนเจริญเป็นวัยอื่นที่ไม่ต้องการ และถ้าใส่ไส้เดือนฝอยมากเกินไปจะทำให้เกิดการแข่งขันกันมากขึ้น อาหารไม่พอเพียงทำให้ผลผลิตที่ได้ลดลง เช่นเดียวกันกับการทดลองการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้หนอน *Galleria mellonella* วัย 5 พบว่าใช้ไส้เดือนฝอยในอัตรา 200 ตัว/หนอน 1 ตัว จะให้ผลผลิตสูงสุด (สุทธิชัย, 2541) การทดลองของ Han (1996) โดยทำการผลิตไส้เดือนฝอยชนิดนี้ในอาหารเหลว 100 กรัม บรรจุในขวดแก้วขนาด 500 มล. ใส่แบคทีเรีย 1 กรัม ลงไปเลี้ยงในอาหารเหลวก่อน 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยในอัตราต่างๆ ลงไป พบว่าปริมาณไส้เดือนฝอยในอัตรา 8,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะได้ผลผลิตสูงสุด ส่วนการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis bacteriophora* นั้นจะใช้อัตราที่สูงกว่าถึง 56,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จึงจะได้ผลผลิตสูงสุด

ถึงแม้ว่าผลการทดลองนี้แสดงถึงความสำคัญของ inoculum size ของแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอยต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ก็ตาม การศึกษาเพื่อความเข้าใจถึงกลไกความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งมีชีวิตทั้งสองที่เลี้ยงร่วมกันในอาหารเหลวให้เด่นชัดขึ้นก็เป็นสิ่งจำเป็นเพื่อผลประโยชน์ในการเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตให้ดียิ่งขึ้น

สรุปผลการทดลอง

การใช้อาหารเหลวในการเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพื่อขยายปริมาณให้ได้ผลผลิตสูงนั้นปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II และแบคทีเรียที่ใช้เป็น inoculum มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตที่ได้รับ จากการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ใส่อาหาร 15 มล.นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25° ซ ใส่ inoculum แบคทีเรีย 10¹⁰ เซลล์/อาหาร 15 มล. และเลี้ยงร่วมกับการใส่ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด เฉลี่ย 308,800 ตัว/มล. โดยใช้ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน และมีแนวโน้มจะได้ผลผลิตสูงขึ้นเมื่อใส่แบคทีเรียปริมาณมากขึ้น และตรงกันข้ามถ้าเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย ผลผลิตมีแนวโน้มลดลง

Table 1. Average yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* per ml. cultured in liquid medium for 10 days at different combinations of bacterial and nematode inoculum sizes.

Bacterial inoculum sizes (cells/15 ml.) (A)	Nematode inoculum sizes (nemas./ml.)				(A) Mean
	1,000	2,000	3,000	4,000	
10^7	181,120 c	190,460 b	193,000 a	116,800 c	170,345
10^8	200,060 c	210,280 ab	204,640 a	163,800 b	194,695
10^9	221,330 b	215,820 a	207,840 a	188,300 a	208,322
10^{10}	308,800 a	224,520 a	203,960 a	200,840 a	234,530
B Mean	227,827	210,270	202,360	167,435	201,973

CV = 7.9%

Table 2. Average yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* per ml. cultured in liquid medium for 10 days at different combinations of nematode and bacterial inoculum sizes.

Nematode inoculum sizes (nemas./ml.) (B)	Bacterial inoculum sizes (cells/15 ml.)				(B) Mean
	10^7	10^8	10^9	10^{10}	
1,000	181,120 a	200,060 a	221,330 a	308,800 a	227,827
2,000	190,460 a	210,280 a	215,820 a	224,520 b	210,270
3,000	193,000 a	204,640 a	207,840 ab	203,960 b	202,360
4,000	116,800 b	163,800 b	188,300 b	200,840 b	167,435
A Mean	170,345	194,695	208,322	234,530	201,973

CV = 7.9%

In the table 1 – 2 , means followed by a common letter in the same column are not significantly different at the 5% level by DMRT.

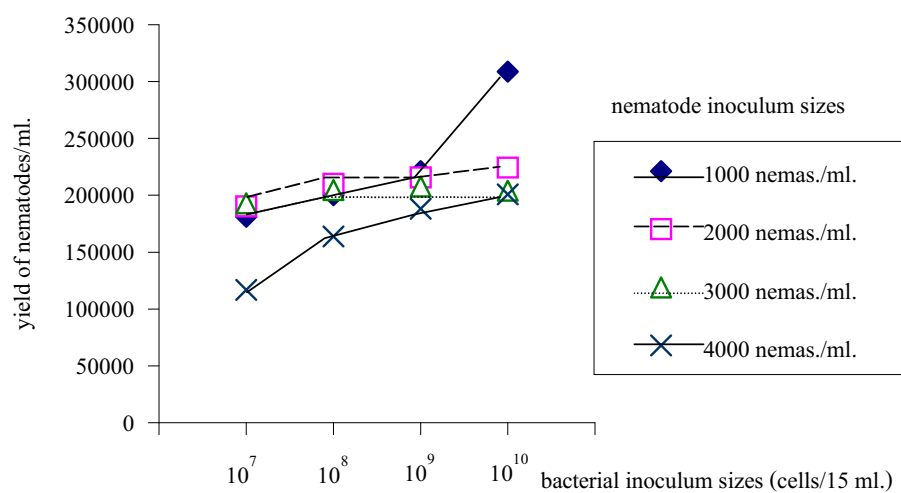


Figure 1. Effect of the interaction between the bacterial and nematode inoculum sizes on the yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* cultured in liquid medium for 10 days.

1.5 ผลของระดับความเป็นกรดต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย

Steinernema carpocapsae (Weiser) ศัตรูแมลง ที่เลี้ยงในอาหารเหลว

Effect of pH Levels on the Development of the Entomopathogenic

Nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

Cultured in Liquid Medium

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของความเป็นกรดต่างในอาหารเหลวต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 8 วิธีการ 3 ซ้ำ โดยใช้อาหารเหลวสูตร Tsb₃ 15 มล. ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 125 มล. เมื่ออบนิ่งฆ่าเชื้อแล้ว จึงใส่ symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* 10¹⁰ เซลล์/ 15 มล. ลงเลี้ยงในอาหาร นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที่ ที่อุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ทำการปรับระดับ pH ของอาหารเป็น 3 4 5 6 7 8 และ 9 รวมทั้ง control (ไม่มีการปรับ pH) หลังการเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรีย จึงทำการตรวจดูการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยทุก 24 ชั่วโมงเป็นเวลา 12 วัน ติดต่อกันพบว่า

ในสภาพที่เป็นกรดจัด (pH 3 และ 4) นั้น เมื่อใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง 24 ชั่วโมง มีเปอร์เซ็นต์การตายสูงถึง 88% ส่วนตัวที่รอดชีวิตก็ไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตต่อไปได้

ในสภาพที่ปรับ pH 5 และการเปลี่ยนแปลงระดับ pH ในระยะต่อมา มีผลต่อการสร้างไข่และการพัฒนาไข่เป็นตัวอ่อน ซึ่งช้ากว่าปกติ 1 วัน และ 6 – 7 วัน ตามลำดับ ปริมาณไข่น้อย เฉลี่ย 15 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว เนื่องจากมีการพัฒนาช้า เมื่อเลี้ยงครบ 12 วัน จึงทำให้ไม่ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II

ในสภาพ pH 6 และการเปลี่ยนแปลงในช่วงการเลี้ยง การสร้างไข่และการพัฒนาไข่เป็นตัวอ่อนช้ากว่าปกติ 1 วัน และ 3 – 4 วัน ตามลำดับ แต่มีปริมาณไข่น้อย (955 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว) ผลผลิตที่เป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ได้ต่ำสุดคือ 107,800 ตัว/มล. ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับผลผลิตในสภาพ pH อื่นๆ

ในสภาพ pH 7 8 9 และ control นั้น การพัฒนาการเจริญเติบโต และการสืบพันธุ์ ของไส้เดือนฝอยเป็นปกติ (สร้างไข่ภายใน 72 ชั่วโมง ไข่จะฟักเป็นตัวอ่อนภายใน 24 ชั่วโมง) ผลผลิตที่

๒, 366,666, 346,666 และ 413,333 ตัว/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

นอกจากนี้ยังพบว่า ปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเลี้ยงในอาหารเหลว คือ เปอร์เซ็นต์การพัฒนามีวัย 4 ของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ใส่ลงไปเลี้ยงช่วงเริ่มต้น (inoculum) ซึ่งจะมีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r = 0.886$, $P < 0.01$) กับสภาพ pH ของอาหาร ในช่วง 24 ชั่วโมง หลังการเลี้ยง

คำนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* เป็นไส้เดือนฝอยที่มีศักยภาพสูง ในการนำมาควบคุมแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด (Kaya, 1982, 1991) ปัจจุบันได้มีการศึกษาและพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเทียม Bedding (1981, 1984); วัชร และคณะ (2535, 2539) ได้รายงานวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในขวดแก้ว โดยผสมอาหารกับชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ วิธีการนี้สามารถเพิ่มผลผลิตได้สูงและลดต้นทุนได้ระดับหนึ่ง เมื่อเปรียบเทียบกับการผลิตโดยใช้แมลงอาศัย แต่ต้องการให้ได้ปริมาณมากขึ้น เพื่อขยายตลาดในเชิงธุรกิจนั้น Friedman (1990) ได้รายงานว่าการผลิตโดยวิธี liquid fermentation นั้นจะเหมาะสมกว่า คือ ประหยัดทั้งแรงงาน เวลา และพื้นที่ ซึ่งมีผลทำให้ต้นทุนลดลง แต่การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในระดับถึงหมัก (fermentor) จำเป็นต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ในถึงหมัก ให้มีความพอเหมาะกับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่เกี่ยวข้องกัน ซึ่งจะมีผลต่อผลผลิตทั้งปริมาณและคุณภาพ การศึกษาถึงปัจจัยที่สำคัญต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในระดับขวดเขย่า จึงมีความสำคัญในการที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตระดับถึงหมักต่อไป ปัจจัยต่างๆ ที่มีความสำคัญต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว ได้แก่ symbiotic bacteria (วัชร และสุทธิชัย, 2542 ก) inoculum sizes ของไส้เดือนฝอยและแบคทีเรีย (Han, 1996, วัชร และสุทธิชัย, 2542 ข) การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาถึงความสำคัญของสภาพความเป็นกรดและด่างของอาหารเหลว ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญอันหนึ่งที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย



อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องเขย่า เครื่องวัด pH กล้องจุลทรรศน์
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Yeast Salt broth, อาหารเหลวสูตร Tsb₃
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ II
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%, 2 N HCl, 1 N NaOH
8. วัสดุอื่นๆ เช่น สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคีบ

วิธีการ

วางแผนการทดลอง แบบ CRD 8 วิธีการ (treatment) 3 ซ้ำ (replication) ดังนี้

- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 3 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 4 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 5 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 6 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 7 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 8 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ปรับระดับ pH 9 หลังจากเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงไข่เดือนฝอยในอาหารที่ไม่มีการปรับระดับ pH (control)

ขั้นตอนการทดลองมีดังนี้

1. การเตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ สำหรับทดลอง

เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 30 มล. ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

นำไข่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II จำนวนประมาณ 1,000 ตัว มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างด้วยน้ำกลั่นอบนิ่งฆ่าเชื้อ ก่อนนำไปบดในชุดบด (homogenizer) เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียในลำไส้ของไข่เดือนฝอยหลุดออกมา แล้วใช้เข็มเขี่ยตะ และนำไปฉีดบนอาหาร

๕ Tergitol 7 agar นำเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 48 ชั่วโมง จึงเลือก colony ของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะกลมมนตรงกลางสีเข้ม รอบๆสีน้ำเงิน ทำการแยกออกมาเลี้ยงไว้บน Nutrient agar ให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ เก็บที่อุณหภูมิไม่เกิน 12° ซ เมื่อเวลาจะใช้จึงเชี่ยเชื้อบริสุทธิ์ลงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS broth นำไปเขย่าที่ 25 - 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะได้แบคทีเรียเข้มข้น 10^{10} เซลล์/มล. (direct count) เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3. การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J2 ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการคือประมาณ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เท่ากัน

4. การปฏิบัติการทดลอง

นำขวดอาหารเหลวที่เตรียมไว้ตามข้อ 1. มาหยดแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 2. ในอัตรา 10^{10} เซลล์/อาหาร 1 ขวด นำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28° ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำมาปรับสภาพ pH ในอาหารเหลวด้วย 2N HCl หรือ 1N NaOH ให้ได้ pH ตามกรรมวิธีต่างๆ หลังจากนั้นทำการใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ร่วมกับแบคทีเรีย และนำไปเขย่าต่อที่อุณหภูมิ 25° ซ ความเร็ว 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 12 วัน แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 36 ขวด (1 ซ้ำ = 12 ขวด)

5. การบันทึกข้อมูล

- บันทึกระดับ pH ของอาหารในทุกวิธีการหลังจากเลี้ยงไส้เดือนฝอยทุก 24 ชั่วโมง
- บันทึกปริมาณและการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยวัยต่างๆ ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา

12 วัน

๗ การทดลอง

จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า pH เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย การผลิตหรือการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหล่านั้นจำเป็นต้องเลี้ยง symbiotic bacteria *X. nematophilus* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะใส่ไส้เดือนฝอยไปเลี้ยงร่วมกัน จึงจะทำให้ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตขยายพันธุ์ได้ดี (วัชร และ สุทธิชัย 2542 ก.) บทบาทที่สำคัญของเชื้อแบคทีเรีย ก็มันจะสร้างสภาพที่เหมาะสมให้แก่ไส้เดือนฝอยโดยทำการย่อยอาหาร สร้างสารอาหารหลายชนิดที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย (Dutky *et al.*, 1967) และปรับสภาพ pH ของอาหารให้อยู่ในระดับที่เหมาะสม รวมทั้งสร้างสาร antibiotic เพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์อื่นๆ (Akhurst, 1980) การทดลองนี้หลังจากเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อสร้างสภาพต่างๆ ที่เหมาะสม ระดับ pH ของอาหารมีค่าอยู่ระหว่าง 8.4 – 8.7 หลังจากนั้นจึงทำการปรับ pH ให้อยู่ในระดับตั้งแต่ 3 – 9 ตามกรรมวิธีการทดลองดังกล่าวข้างต้นแล้วใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกันนั้น การปรับ pH ในช่วงเริ่มต้นและการเปลี่ยนแปลงในระยะเวลาต่อมา มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยดังนี้

ในสภาพอาหารที่ปรับเป็น pH 3 และ 4 ซึ่งเป็นกรดจัดนั้น หลังการเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ 24 ชั่วโมง พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ สูงถึง 88% และเมื่อเลี้ยงผ่านไป 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตรอดไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตต่อไปได้ ส่วนการปรับสภาพ pH เป็น 5 6 7 8 9 และที่ไม่ได้ปรับ (control) นั้น ไม่มีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ และเมื่อทำการตรวจนับการเจริญเติบโตทุก 24 ชั่วโมง ในวิธีการอื่นๆ พบว่า

ในช่วงการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมง (Figure 1.1.)

ในสภาพอาหารที่ได้ปรับ pH เป็น 5 6 7 และ 8 นั้น ระดับ pH หลัง 24 ชั่วโมง จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 5.4 6.6 8.5 และ 8.7 ตามลำดับ สำหรับใน control (ไม่มีการปรับ) ซึ่งสภาพ pH สูง 8.6 และในสภาพอาหารที่มีการปรับ pH เป็น 9 นั้น หลัง 24 ชั่วโมง ระดับ pH จะมีการเปลี่ยนแปลงในช่วงนี้น้อยมาก และจากการทดลองนี้พบว่า ระดับ pH ที่วัดได้ในช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ 24 ชั่วโมงจะมีความสัมพันธ์ทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r = 0.886$, $P < 0.01$) (Figure 2.) กับเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ใส่ลงไปเลี้ยงแล้วเจริญเป็นตัวอ่อนวัย 4 (J_4) Strauch (1997) ได้รายงานว่า มีสารเคมีชนิดหนึ่ง (ยังไม่ทราบสูตรโครงสร้าง) ซึ่ง symbiotic bacteria สร้างขึ้นในช่วงปลายของการเลี้ยงขยายแบคทีเรีย ซึ่งจะกระตุ้นให้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ พัฒนาเป็น J_4 เมื่อสภาพอาหารเหมาะสม และเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็น J_4 จะมีความสำคัญต่อผลผลิตสุดท้ายของไส้เดือนฝอยที่ได้รับ

ช่วงที่ 48 ชั่วโมง (Figure 1.1.)

สภาพ pH ในอาหารของทุกวิธีการทดลองหลังการเลี้ยงไส้เดือนฝอยได้ 48 ชั่วโมง เพิ่มขึ้นในอัตราที่ต่างกัน โดยเฉพาะสภาพอาหารที่ยังเป็นกรดเมื่อ 24 ชั่วโมงแรก คือ pH 5.6 และ 6.7 จะเพิ่มในอัตราที่สูงเป็น 6.6 และ 7.4 ตามลำดับ ส่วนสภาพที่เป็นด่างอยู่แล้วเมื่อ 24 ชั่วโมงแรก การเปลี่ยนแปลงระดับ pH จะน้อยมาก ในช่วงนี้พบไส้เดือนฝอยเริ่มพัฒนาเป็นเพศเมีย (Yong female,YF) และตัวผู้ (Yong male,YM) ที่ยังไม่พร้อมผสมพันธุ์ ในทุกระดับ pH ที่ทดลอง (pH 5 – 9) แสดงว่า pH ไม่มีผลต่อการพัฒนาของ J_4

ในช่วงระยะการเลี้ยงที่ 72 ชั่วโมง (Figure 1.1.)

ในวิธีการที่ได้ปรับสภาพ pH เป็น 5 และ 6 นั้น เมื่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอยผ่านไป 72 ชั่วโมง ระดับ pH สูงขึ้นเป็น 7.9 และ 8.2 ตามลำดับ ส่วนวิธีการอื่นการเปลี่ยนแปลงของ pH หลังการเลี้ยง 72 ชั่วโมง จะน้อยมาก และที่ทุกระดับ pH ที่ทดลองพบตัวเต็มวัยเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ตั้งแต่ 86 – 100% แสดงว่าการเปลี่ยนแปลง pH ไม่มีผลต่อการพัฒนาของไส้เดือนฝอย อย่างไรก็ตามพบความผิดปกติของเพศเมีย ในอาหารที่ได้มีการปรับสภาพ pH เป็น 5 และ 6 ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยง พบว่ายังไม่มีการฝังไข่ในมดลูก (uterus) ดังเช่น เพศเมียที่เจริญในอาหารที่มี pH ตั้งแต่ 8.6 – 8.8 (pH ที่ปรับก่อนเลี้ยงไส้เดือนฝอย ตั้งแต่ 7 – 9) ซึ่งมีไข่ที่ผสมแล้วเต็มมดลูก เฉลี่ยประมาณ 955 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว ($n = 5$) แสดงว่าการปรับสภาพอาหารเป็น pH 5 และ 6 ในการทดลองนั้น สภาพที่เป็นกรดอาจไปทำลายสารอาหารบางชนิดที่แบคทีเรียสร้างขึ้น ซึ่งมีผลต่อการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ทำให้การสร้างไข่ช้ากว่าปกติ

ในช่วงระยะการเลี้ยงที่ 96 ชั่วโมง (Figure 1.1.)

ระดับ pH ในอาหารที่เลี้ยงได้ 96 ชั่วโมง ทุกวิธีการทดลอง อยู่ในระดับใกล้เคียงกับที่ 72 ชั่วโมง ในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 5 และ 6 ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงพบว่าเพศเมียมีไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว (fertilized eggs) ในมดลูก แต่พบว่าวิธีการที่สภาพ pH 5 มีจำนวนน้อยมาก เฉลี่ย 15 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว ($n = 5$) ส่วนในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 6 นั้น เพศเมียมีไข่เต็มมดลูกเช่นปกติ แสดงให้เห็นว่าการขาดสารอาหารที่สภาพ pH 5 จะรุนแรงกว่าในสภาพอาหาร pH 6 ส่วนในสภาพอาหารที่ระดับ pH สูงกว่า 6 นั้น จะพบตัวอ่อนวัย 1 (J_1) ทั้งหมด ซึ่งเป็นไส้เดือนฝอยรุ่นใหม่แล้ว

ในช่วงระยะการเลี้ยงที่ 120 – 168 ชั่วโมง (Figure 1.2.)

ในช่วงนี้สภาพระดับ pH ในอาหารของทุกวิธีการทดลองมีการเพิ่มและลดลงไม่แน่นอน ในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 5 ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงนั้นไข่ยังไม่มีการพัฒนา ซึ่งตรงข้ามกับในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 6 จะพบตัวอ่อน J_1 และ J_2 ในช่วงเวลา 168 ชั่วโมง ฉะนั้นการฟักตัวของไข่จะช้ากว่าปกติ 3 – 4 วัน เมื่อเทียบกับวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 7 – 9 นั้น พบว่ามีการพัฒนาเป็น J_2 และ J_3 แล้ว

เลี้ยงที่ 192 – 288 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงสุดท้าย (Figure 1.2, 1.3, และ

Table 1.)

การเปลี่ยนแปลงของระดับ pH ในอาหารของทุกวิธีการทดลอง ไม่แน่นอนมีการเพิ่มและลดในบางช่วง ในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 5 ก่อนเลี้ยงไส้เดือนฝอยนั้น พบตัวอ่อนระยะ J_1 ที่ช่วงเวลาการเลี้ยง 240 ชั่วโมง (การฟักไข่เป็นตัวอ่อนช้ากว่าปกติ 6 – 7 วัน) พัฒนาเป็นตัวอ่อน J_2 และ J_3 ที่ช่วงเวลาการเลี้ยง 264 และ 288 ชั่วโมง ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบเพศเมียที่มีไข่ที่ยังไม่ฟักเป็นตัวอยู่ประมาณ 66.6% ฉะนั้นในระยะเวลาการเลี้ยง 12 วัน จึงยังไม่สามารถเก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J_3 ได้ ส่วนวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 6 พบว่าไส้เดือนฝอยสามารถพัฒนาต่อไปและเริ่มเปลี่ยนเป็นระยะ J_2 ในช่วงการเลี้ยงที่ 240 ชั่วโมง (10 วัน) และในช่วงสุดท้าย (12 วัน) นับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J_3 ได้เพียง 60 % ของประชากรทั้งหมด ซึ่งบางส่วนพัฒนาช้า เกิดเป็นผลผลิตได้ 107,800 ตัว/มล. นับเป็นผลผลิตต่ำสุดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากผลผลิตที่ได้ ในวิธีการที่ปรับสภาพอาหารเป็น pH 7 8 9 และ control (ไม่มีการปรับ) มีปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J_3 ประมาณ 80 – 90% ของประชากรทั้งหมดที่คิดเป็นผลผลิตได้เป็น 373,333.3 366,666.7 346,666.7 และ 413,333.3 ตัว/ มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ



หลังจากเลี้ยงแบคทีเรีย ในอาหารเหลว Tsb₃ 24 ชั่วโมง แล้ว ปรับสภาพ pH ของอาหารให้อยู่ในระดับต่างๆ คือ pH 3 4 5 6 7 8 9 และ control (pH 8.6 ไม่ปรับสภาพ pH) พบว่า pH ระดับต่างๆ มีผลต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ดังนี้

- สภาพที่ปรับเป็นกรดจัด pH 3 และ 4 นั้น หลังจากการเลี้ยงไส้เดือนฝอย pH ไม่มีการเปลี่ยนแปลงจากเดิมมากนัก ระดับ pH นี้มีผลต่อการตายของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงเป็นเปอร์เซ็นต์สูงถึง 88% ใน 24 ชั่วโมงแรก ส่วนที่รอดชีวิตก็ไม่สามารถพัฒนาเจริญเติบโตต่อไปได้

- สภาพที่ถูกปรับเป็น pH 5 ซึ่งสภาพเป็นกรด และการเปลี่ยนแปลง pH ในระยะต่อมา มีผลต่อการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย คือเพศเมียจะสร้างไข่ช้ากว่าปกติ 1 วัน จะพบไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว ในมดลูก (uterus) ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง และมีจำนวนน้อยมาก เพศเมีย 1 ตัว มีไข่เฉลี่ย 15 ฟอง (n = 5) ไข่เหล่านี้ใช้เวลา 6 – 7 วัน จึงจะพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 1 (J₁) ซึ่งมีประมาณ 33.3% ของประชากรทั้งหมด นอกจากนี้พบเพศเมียที่มีไข่ ซึ่งยังไม่พัฒนาด้วยถึง 66.6% หลังจากเลี้ยงครบ 12 วัน (288 ชั่วโมง) มีการพัฒนาถึงระยะ J₃ เท่านั้น ฉะนั้นจึงไม่ได้ผลผลิตที่เป็น II

- สภาพอาหารที่ถูกปรับเป็น pH 6 เพศเมียมีไข่ซึ่งได้รับการผสมแล้ว ในช่วงเวลา 96 ชั่วโมง (เช่นเดียวกันกับ pH 5) มีจำนวนมากขึ้น uterus เฉลี่ย 955 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว (n = 5) การฟักไข่ออกเป็นตัวอ่อนวัย 1 (J₁) ใช้เวลานานกว่าปกติ 3 - 4 วัน ในช่วงสุดท้าย 12 วัน สามารถพัฒนาเป็น II ได้ ซึ่งมีประมาณ 60% ของตัวอย่างที่สุ่มตรวจ ผลผลิตที่ได้ต่ำสุด คือ 107,800 ตัว/มล. และมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญจากผลผลิตของระดับ pH อื่นๆ (7 – 9)

- สภาพที่ถูกปรับเป็น pH 7 8 และ 9 นั้น การเปลี่ยนแปลงสภาพ pH ในแต่ละช่วงนั้นไม่มีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกันกับการเลี้ยงในสภาพที่ไม่ได้ปรับ pH (control) เพศเมียจะสร้างไข่ภายใน 72 วัน และไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 1 (J₁) ภายใน 24 ชั่วโมง ส่วนผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงใน pH แต่ละระดับ 7 8 และ 9 นั้นใกล้เคียงกัน คือ 373,333.3 , 366,666.7 และ 346,666.7 ตัว/มล. ตามลำดับ และไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับผลผลิตที่ได้จาก control ซึ่งมีผลผลิตสูงสุด 413,333.3 ตัว/มล.

ปัจจัยอีกอย่างหนึ่งที่มีผลต่อปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเหลว คือ เปอร์เซ็นต์พัฒนาเป็นวัย 4 (J₄) ของตัวอ่อนระยะ Infective Juvenile (IJ) ที่ใส่ลงไปเลี้ยงช่วงเริ่มต้น (inoculum) ซึ่งมีความสัมพันธ์โดยตรงกับสภาพ pH ในช่วง 24 ชั่วโมง หลังการเลี้ยง

Table 1. Frequent mating of the male nematodes *Steinernema carpocapsae* in liquid culture by observing the 1° juvenile in female body.

Sex ratio male:female	Female*	Replication							Total No.Female
		1	2	3	4	5	6	7	
0:1	WE	1	-	1	1	1	1	-	5
	WoE	-	1	-	-	-	-	1	2
	WJ	-	-	-	-	-	-	-	-
1:2	WE	1	2	1	-	-	1	1	6
	WoE	1	-	-	2	-	-	1	4
	WJ	-	-	1	-	2	1	-	4
1:3	WE	2	2	1	-	3	-	-	8
	WoE	1	-	2	2	-	1	2	8
	WJ	-	1	-	1	-	2	1	5
1:4	WE	-	-	-	1	1	1	2	5
	WoE	2	3	2	-	2	1	1	1
	WJ	2	1	2	3	1	2	1	12

* = Female nematode after 5 days released in liquid culture with male nematode.

WE = with eggs in body

WoE = without egg in body

WJ = with 1° juvenile in body

Table 2. Reproductive number of the juveniles produced by female nematodes *Steinernema carpocapsae* in liquid culture and insect host.

Culture method	No. female observed	No. juvenile per female		T – test
		Max.	Aver.	
Liquid culture	13	2000	189	974.6 ± 574.5
Insect host	9	3050	300	1688.9 ± 1009.6

T=2.1164*
P=.05

Table 3. The pathogenicity assessment* of nematode *Steinernema carpocapsae* (II) cultured in liquid medium and insect host.

Liquid culture			Insect host		Chi – square (χ^2)
No. treated	No. dead	%dead	No. treated	No. dead	
216	99	45.5	216	112	51.8
					1.33 ^{ns} (P=.2481)

* = The method utilizes a culture cell well with confines one infective *Steinernema carpocapsae* with one insect host and results infection within 48 hours (Miller, R.W. 1989).

**1.7 ผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหาร
ต่างกันต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล.**

**Effect of Bacteria Culturing Periods in Different Quantities of Liquid Culture
in 500 ml. Shake Flask on the Yield of the Entomopathogenic Nematode
Steinernema carpocapsae (Weiser)**

บทคัดย่อ

ศึกษาผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหารเหลวต่างกันต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD มี 2 ปัจจัย 5 ซ้ำ ปัจจัย A คือ ปริมาณอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ต่างกัน 4 ระดับ คือ 30, 40, 50 และ 60 มล./ขวด ปัจจัย B คือ ระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียเป็นเวลา 30, 36, 42 และ 48 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน ความเร็วในการเขย่า 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25° ซ โดยใช้ปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น (inoculum) ประมาณ 10⁷ เซลล์/อาหาร 1 มล. และไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. พบว่าระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงแบคทีเรียก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยง ซึ่งให้ผลผลิตสูงในทุกระดับปริมาณอาหาร คือที่ 30, 40, 50 และ 60 มล./ขวด โดยมีผลผลิต 321,160 319,360, 326,720 และ 322,980 ตัว/มล. ตามลำดับ และไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากทุกวิธีการทดลอง (treatment) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 44 – 46%

การเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ด้วยอาหารเหลวที่ผ่านมานั้น เนื่องจากมีข้อจำกัดเกี่ยวกับความเร็วในการเขย่า ซึ่งปรับได้สูงสุดในอัตรา 120 รอบ/นาที ซึ่งมีผลต่อระดับปริมาณอากาศหรือออกซิเจนที่แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยได้รับในช่วงการเลี้ยง การทดลองจึงมุ่งเน้นในการปรับระดับปริมาณอาหารให้น้อยที่สุด และใช้ขวดแก้วที่มีขนาดเล็กในการเลี้ยง ทั้งนี้เพื่อให้การเลี้ยง symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* ได้ปริมาณสูงสุดในช่วงระยะเวลาสั้น เนื่องจากมันมีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย (วัชรและสุทธิชัย, 2542; Poinar and Thomas, 1965, 1966) และปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้รับ จากการทดลองที่ผ่านมามะเห็นได้ว่าการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในขวดแก้ว 125 มล. ปริมาณอาหารเหลว 15 มล. แบคทีเรียเริ่มต้น (inoculum) 10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงในอาหารเหลวก่อนเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 9 - 10 วัน ได้ผลผลิตสูงไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/มล. หรือ 4.5 ล้านตัว/อาหาร 1 ขวด อย่างไรก็ตามการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวให้ได้ปริมาณมากตามความต้องการ โดยวิธีดังกล่าวนี้มีข้อเสียเปรียบคือ เปลืองทั้งแรงงานและเวลาสำหรับการบรรจุอาหารในขวดแก้วจำนวนมาก การใส่เชื้อแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงบ่อยครั้ง ซึ่งโอกาสที่จะปนเปื้อนมีมาก นอกจากนี้ยังมีการใช้พื้นที่ในการเลี้ยงเขย่าและการปฏิบัติงานมากเช่นกัน

ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อที่จะลดปัญหาดังกล่าวข้างต้นให้น้อยลง โดยการเพิ่มทั้งปริมาณอาหารเหลวและขนาดของขวดแก้วที่ใช้เลี้ยง และทำการเลี้ยงในสภาพที่มีความเร็วในการเขย่าสูงสุดด้วยอัตราเท่าเดิมคือ 120 รอบ/นาที ทั้งนี้ให้ได้อัตราผลผลิตไส้เดือนฝอยต่ออาหารเหลว 1 มล. ไม่ต่ำกว่าการทดลองที่ผ่านมามาเช่นกัน ซึ่งจะมีผลให้ได้ปริมาณไส้เดือนฝอยในการผลิตแต่ละครั้งได้มากขึ้น ทำให้ต้นทุนการผลิตต่ำลง ข้อมูลที่ได้สามารถนำไปใช้ในการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในถังหมักต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องปั่นอาหาร เครื่องกวนสาร ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ -70°C
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker, cylinder, flask, slide, plate, pastuer pipette, vial
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ peptone 0.1%, อาหารเหลวสูตร Tsb₃, Yeast Salt broth, NBTA
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ II
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น counter, autopipette พร้อม tip, magnetic bar, ถาดนับไข่เดือนฝอย จุกสำลี เข็มเขี่ย กระดาษอลูมิเนียม ถาดหลุมทดสอบประสิทธิภาพ ปากคีบ

วิธีการ

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 factorial in CRD 16 วิธีการ (treatment) 5 ซ้ำ (replication)

2 ปัจจัย (factor) ดังนี้

ปัจจัย A ปริมาณอาหารเหลว 4 ระดับ คือ

- 30 มล./ขวด
- 40 มล./ขวด
- 50 มล./ขวด
- 60 มล./ขวด

ปัจจัย B การเลี้ยงขยายแบคทีเรียในอาหารเหลว 4 ระยะเวลา ก่อนใส่ไข่เดือน

ฝอยลงเลี้ยง คือ

- 30 ชั่วโมง
- 36 ชั่วโมง
- 42 ชั่วโมง
- 48 ชั่วโมง

1. เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ สำหรับทดลอง

เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ใส่ในขวดแก้วขนาด 500 มล. ที่ระดับปริมาณอาหารตามปัจจัย A นำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จากน้ำเลือด (haemolymph) ของหนอนกินรังผึ้ง

- นำหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัยสุด้ายก่อนเข้าดักแด้ที่แข็งแรง 2-3 ตัว มาทำการ infect ด้วยไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ในจานแก้ว (petridish) ที่มีกระดาษกรองรองอยู่ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ นาน 48 ชั่วโมง
- นำหนอนที่ตายแล้วด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้ว ทำการตัดขาเทียมของหนอนจะมีน้ำเลือดหยดออกมา ใช้เข็มเย็บตะแล้วนำไปจิดบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเชื้อเจริญ เลือกล colony ที่บริสุทธิ์ แล้วทำการย้ายเชื้อหลายๆ ครั้งจนได้เชื้อที่บริสุทธิ์
- เชื้อเชื้อที่บริสุทธิ์ ลงเลี้ยงขยายในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth 150 มล. ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. เขย่าที่ความเร็ว 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28 °ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- ทำการตรวจการปนเปื้อนโดยคุณลักษณะแบคทีเรียด้วยการย้อมแกรม เซลล์ของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* จะมีลักษณะเป็นท่อนรูปทรงกระบอก แกรมลบ (สีแดง)
- เมื่อได้แบคทีเรียที่บริสุทธิ์แล้วจึงเติม glycerin ที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 45 มล. ลงไปผสมกับแบคทีเรียที่เลี้ยงได้ 1 ขวด เขย่าให้เข้ากันแล้วบรรจุลงใน micro tube ที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว หลอดละ 1 มล. นำเข้าเก็บในตู้ควบคุมอุณหภูมิ -70 °ซ เพื่อใช้เป็น inoculum

2.2 เมื่อต้องการใช้แบคทีเรียในปริมาณมากสำหรับใช้เป็น inoculum ในการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย ให้นำแบคทีเรียจากข้อ 2.1 มาเลี้ยงขยายปริมาณใน YS broth โดยใช้แบคทีเรีย 1 หลอด/YS broth 1 ขวด เขย่าที่ความเร็วและอุณหภูมิดังเช่นในข้อ 2.1 นาน 24 ชั่วโมง จะได้ปริมาณแบคทีเรียประมาณ 2.6×10^8 เซลล์/มล. นับโดยวิธี drop plate (Supanwong and Pichai 1995)

3. การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ แล้วปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ คือเมื่อใส่ไส้เดือนฝอย 1 มล. ลงไปเลี้ยงในอาหารทุกระดับ จะมีไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ประมาณ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เท่ากัน

4. การเลี้ยงขยายแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย

ทำการใส่แบคทีเรียที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.2 (1 มล. มีประมาณ 2.6×10^8 เซลล์) ลงในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ที่เตรียมไว้ตามปัจจัย A ในระดับต่างๆ ฉะนั้นระดับปริมาณแบคทีเรียเริ่มต้น

(inoculum) ในอาหารระดับต่างๆ จะมีประมาณ 1.42×10^7 เซลล์/มล. หลังจากนั้นนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที โดยใช้ระยะเวลาในการเลี้ยงขยายตามปัจจัย B คือ 30 36 42 และ 48 ชั่วโมง แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ตามข้อ 3. ลงไปเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลา 10 วัน ที่อุณหภูมิ 25°C

5. เก็บผลผลิต

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้มาแยกล้างด้วยการตั้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนก่อน แล้วจึงนำไปผ่านการล้างกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 270 mesh ทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ด้วยเครื่องนับอัตโนมัติ หลังจากนั้นเก็บผลผลิตที่ได้ในฟองน้ำบรรจุในถุงพลาสติก แล้วนำเก็บที่อุณหภูมิ 6°C เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

6. การตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียทุกๆ 6 ชั่วโมง หลังการเลี้ยง 24 ชั่วโมงแรกในแต่ละวิธีการ

หลังการใส่ inoculum แบคทีเรียลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ตามวิธีการต่างๆ หลังจากเลี้ยงครบ 24 ชั่วโมงแรกแล้ว ทำการนำตัวอย่างอาหาร 1 มล. มาทุกๆ 6 ชั่วโมงในแต่ละวิธีการ เพื่อตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่ได้ด้วยวิธีการ drop plate (Supanwong and Pichai 1995)

7. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989) ดังนี้

- 7.1 เตรียมถาดหลุม 7 ถาด แต่ละถาดมี 24 หลุม แต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2 ซม. พร้อมฝาครอบสนิททุกถาด
- 7.2 ใส่กระดาษกรองที่กั้นหลุมๆละ 1 แผ่น
- 7.3 ใช้ไปเปิดดูไส้เดือนฝอย 1 ตัว/น้ำ 30 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของถาดที่เตรียมไว้ หลุมละ 1 ตัว
- 7.4 จากนั้นจับหนอนกินรังผึ้ง วัย 5 - 6 ใส่ในหลุมๆละ 1 ตัว แล้วปิดฝา
- 7.5 ทำการทดลองทั้งหมด 7 ถาด แต่ละถาดคิดเป็น 1 ซ้ำ นำถาดทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับหนอนที่ตายในแต่ละถาด คัดเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเข้าทำลายแมลง โดยตัดข้อมูลของซ้ำหรือถาดที่มีปริมาณหนอนตายสูงสุดและต่ำสุดออก

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างพฤษภาคม 2541 - สิงหาคม 2541

■ การทดลอง

จาก Table 1. พบว่าระยะเวลาในการเลี้ยงขยายแบคทีเรียของทุกระดับปริมาณอาหาร 30, 40, 50 และ 60 มล. ในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าที่ 120 รอบ/นาที เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้ผลผลิตใส้เดือนฝอยสูงสุด คือ 321,160 319,360 326,720 และ 322,980 ตัว/มล. ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่สูงกว่าผลผลิตที่ได้จากวิธีการเลี้ยงแบคทีเรียในช่วงระยะเวลาที่สั้นกว่าคือ 30, 36, 42 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของผลผลิตใส้เดือนฝอยที่ได้ไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้ง 16 วิธีการ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 44 – 46% (Table 3.) แสดงว่าระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียที่แตกต่างกันนั้น ไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของใส้เดือนฝอย

ใน Table 2. และ Figure 1. แสดงให้เห็นถึงการเจริญและการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียในการเลี้ยงที่มีระดับปริมาณอาหารที่ต่างกัน มีความคล้ายคลึงกันที่ 48 ชั่วโมงได้ปริมาณสูงถึง 10^{12} เซลล์/อาหาร 1 มล. ช่วงนี้ถือว่าเป็นระยะสิ้นสุดของช่วงการแบ่งเซลล์ (log phase) หลังจากนั้นปริมาณเซลล์แบคทีเรียคงที่ ซึ่งเป็นการเข้าสู่ระยะ stationary phase จะเห็นได้ว่ามีความแตกต่างจากการทดลองในการเลี้ยงในขวดแก้วขนาด 125 มล. ระดับปริมาณอาหารเหลว 15 มล. ความเร็วเขย่า 120 รอบ/นาที จะได้ปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง (1.29×10^{12} เซลล์/มล.) ช่วง log phase จะสั้นกว่า ทั้งนี้เนื่องจากความเร็วในการเขย่านั้นเท่ากัน การเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณน้อยกว่า แบคทีเรียมีโอกาสได้รับอากาศหรือออกซิเจนได้มากกว่า ทำให้การเจริญและเพิ่มปริมาณได้เร็วกว่า อย่างไรก็ตามสิ่งที่เหมือนกันคือการใส้ใส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในช่วงปลาย log phase (ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง) และให้ผลผลิตสูงในระดับเดียวกันประมาณ 300,000 ตัว/มล. ส่วนการใส้ใส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 30, 36 และ 42 ชั่วโมงนั้น จะได้ผลผลิตน้อยกว่า ดังนั้นช่วงระยะเวลาการใส้ใส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียนั้นมีความสำคัญต่อผลผลิตใส้เดือนฝอย จึงสามารถอธิบายได้ว่า ในช่วง log phase นั้น แบคทีเรียมีการสร้างสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการสืบพันธุ์ของใส้เดือนฝอย (Ehlers *et al.* 1990) ในกรณีที่แบคทีเรียสามารถสร้างสารอาหารได้ครบทุกชนิดและมีปริมาณสูงพอเพียงต่อความต้องการของใส้เดือนฝอยนั้น จำเป็นจะต้องให้แบคทีเรียดำเนินกิจกรรมของมันพร้อมกับการแบ่งเซลล์จนได้ปริมาณสูงสุดถึงช่วงปลาย log phase เสียก่อน การใส้ใส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงก่อนที่จะถึงช่วงปลาย log phase ของแบคทีเรียนั้นใส้เดือนฝอยอาจได้รับสารอาหารไม่พอเพียงและครบถ้วน เนื่องจากการใส้ใส้เดือนฝอยจะไปรบกวนกิจกรรมของแบคทีเรียในช่วงนี้ จึงมีผลต่อการขยายพันธุ์ การสร้างไข่จะน้อยลง ผลผลิตที่ได้ก็จะน้อยลงเช่นกัน

การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในขวดแก้วขนาด 500 มล. ที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°C ใช้แบคทีเรียเริ่มต้น (inoculum) ประมาณ 10^7 เซลล์/อาหาร 1 ขวด และไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. พบว่าระยะเวลา 48 ชั่วโมง เป็นช่วงที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงขยายแบคทีเรียในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกัน จะให้ผลผลิตสูงในทุกระดับปริมาณอาหาร คือ ที่ 30, 40, 50 และ 60 มล./ขวด ให้ผลผลิตคือ 321,160 319,360 326,720 และ 322,980 ตัว/มล. ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากทุกวิธีการทดลอง (treatment) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าอยู่ระหว่าง 44 – 46%

Table 1. Average yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* per ml. cultured in 500 ml. shake flask for 10 days at different combinations of quantity of liquid medium and bacteria culturing period.

Quantities of liquid medium (ml./flask) (A)	Bacteria culturing periods (hr.) (B)				A Mean
	30	36	42	48	
30	280,480 a(b)	264,620 a(c)	262,200 b(c)	321,160 a(a)	282,115 A
40	242,420 b(b)	246,280 b(b)	224,540 c(c)	319,360 a(a)	258,150 B
50	225,060 c(b)	229,900 c(b)	209,540 d(c)	326,720 a(a)	247,805 B
60	230,920 bc(d)	268,720 a(c)	305,160 a(b)	322,980 a(a)	281,945 A
B Mean	244,720 B	252,380 B	250,360 B	322,555 B	267,503.8

CV. = 3.7%

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

In a row, means followed by a common letter in a bracket () are not significantly different at 5% level by DMRT.

1/ Means factor A, B, followed by a common capital letter are not significantly different at the 5% level by LSD (LSD 0.05 A, B = 12,639.3 nemas./ml.).

Table 3. Average pathogenicity assessment* of nematodes cultured in 500 ml. flask at different combinations of quantity of liquid media and bacteria culturing period.

Quantities of liquid medium (ml.) (A)	Bacteria culturing periods (hr.) (B)				A Mean
	30	36	42	48	
30	44.164 a(a)	45.000 a(a)	44.166 a(a)	44.168 a(a)	44.375
40	44.168 a(a)	46.668 a(a)	44.166 a(a)	44.166 a(a)	44.792
50	44.168 a(a)	46.666 a(a)	45.000 a(a)	44.168 a(a)	45.001
60	44.168 a(a)	46.666 a(a)	45.000 a(a)	45.000 a(a)	45.209
B Mean	44.167	46.250	44.583	44.375	44.844

CV. = 12.80%

* = The method utilizes a culture cell well with confines one infective *Steinernema carpocapsae* with one insect host and results infection within 48 hours (Miller, R.W. 1989.).

In a column, means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

Figure 1. Comparative growth curves of symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* cultured in 125 and 500 ml. shake flasks.

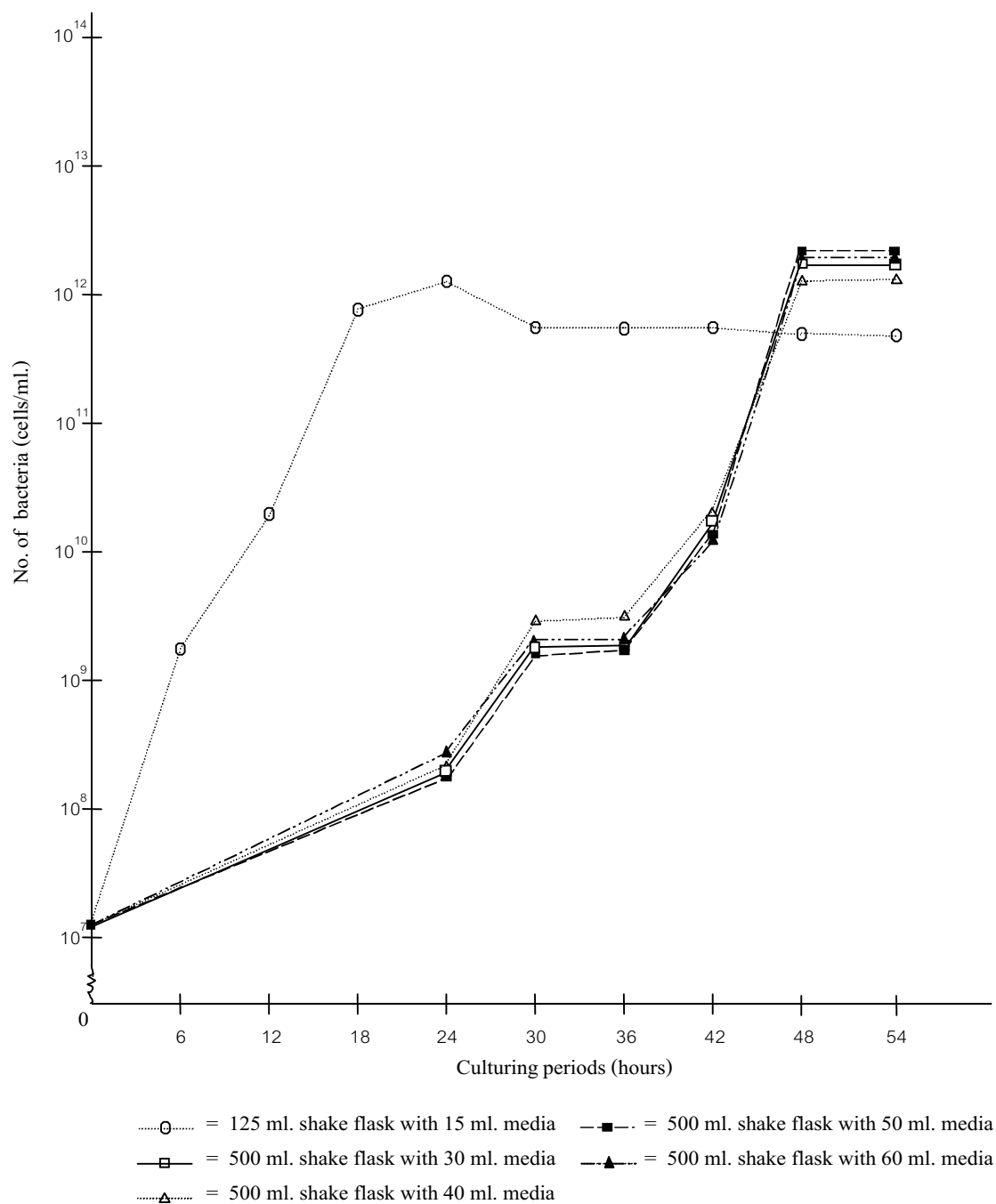


Table 4. Density of symbiotic bacterial *Xenorhabdus nematophilus* counted at 6 hour intervals during culturing periods of 54 hours in 125 ml. shake flask (15 ml. media) and 500 ml. shake flasks (30, 40, 50 and 60 ml. media).

Bacteria culturing periods (hr.)	Bacterial cell density (cells/ml.)				
	In 125 ml. shake flask** (15 ml. media)	In 500 ml. shake flask** (with media)			
		30 ml.	40 ml.	50 ml.	60 ml.
0	1.17×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7
6	2.23×10^9	-	-	-	-
12	3.12×10^{10}	-	-	-	-
18	8.94×10^{11}	-	-	-	-
24	1.29×10^{12}	3.01×10^8	3.25×10^8	2.98×10^8	4.21×10^8
30	7.62×10^{11}	2.77×10^9	4.40×10^9	2.0×10^9	3.11×10^9
36	7.60×10^{11}	2.86×10^9	5.0×10^9	2.36×10^9	3.14×10^9
42	7.61×10^{11}	2.23×10^{10}	3.10×10^{10}	1.65×10^{10}	1.75×10^{10}
48	6.98×10^{11}	2.73×10^{12}	1.18×10^{12}	3.21×10^{12}	2.81×10^{12}
54	6.90×10^{11}	2.71×10^{12}	1.20×10^{12}	3.20×10^{12}	2.85×10^{12}

(-) = not recorded

* airflow rate = 8 l / min.

2. ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ใน ระดับงูหมัก

2.1 ปริมาณและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่ผลิตในอาหารเหลวโดยใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ที่ได้จากกรรมวิธีการเลี้ยงบริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (insect host)

Yield and Potential of the Entomopathogenic Nematode

***Steinernema carpocapsae* (Weiser) Cultured in Liquid Medium by Using Nematode Inoculum Reared from Pure Line Technique and Insect Hosts**

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบการเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตโดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงโดยกรรมวิธีบริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (host) ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์

กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย

กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย

ตรวจนับปริมาณและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในทุกวิธีการ พร้อมทั้งตรวจหาปริมาณเซลล์ symbiotic bacteria จากไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในทุกวิธีการ พบว่าการใช้ inoculum ที่บริสุทธิ์นั้นไม่ว่าในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ และอาหารแข็งกึ่งเหลว สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงถึง 283.6 และ 302.2 เท่าตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่จะสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรเดียวกันแต่ใช้ inoculum ที่ได้จากแมลงอาศัย โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงในอาหารเหลว คือเพิ่มปริมาณได้ 243.8 เท่า และจากการนำลงเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลว เพิ่มปริมาณได้เพียง 183.3 เท่า ($P < 0.05$)

สำหรับประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของผลผลิตไส้เดือนฝอย พบว่าการเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลว โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 55% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเลี้ยงโดยวิธีการอื่น อยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่าง 38 - 43% และไม่แตกต่างกันทางสถิติ

ส่วนปริมาณเซลล์แบคทีเรียแยกจากไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงโดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ มีปริมาณสูงกว่าการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัย โดยที่การใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์เลี้ยงด้วยอาหารเหลว ได้สูงสุด 760,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว แตกต่างทางสถิติจากที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว ซึ่งได้ 270,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว ส่วนที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัย ไม่ว่าจะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวหรืออาหารแข็งกึ่งเหลว ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือได้ 74,000 และ 44,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว ตามลำดับ

การเลี้ยงไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณสูงและมีคุณภาพนั้นจะต้องเลี้ยงในสภาพ monoxenic culture ซึ่งมีเฉพาะแบคทีเรียที่เป็น symbiont เท่านั้น ถ้าเกิดการปนเปื้อน (contamination) ของจุลินทรีย์อื่นผลผลิตจะลดลงหรือไม่ได้ผลผลิตเลย การทดลองที่ผ่านมาไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum นั้นเตรียมโดยการเลี้ยงขยายด้วยแมลงอาศัย (host) หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) เท่านั้น ซึ่งก็มีความเสี่ยงจากการปนเปื้อน ตามปกติไส้เดือนฝอยดำรงชีวิตได้โดยกินเนื้อเยื่อของแมลงเป็นอาหารถึงแม้ว่า symbiotic bacteria ของมันสามารถสร้างสาร antibiotic (Akhurst, 1982) ยับยั้งการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ก็ตาม แต่ก็ไม่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ (aseptic condition) อย่างสมบูรณ์ ในระบบทางเดินอาหารของไส้เดือนฝอยนอกจากมี symbiotic bacteria แล้ว ยังมีจุลินทรีย์อื่นๆ ที่ปะปนมากับอาหารอยู่ด้วย ไส้เดือนฝอยที่นำไปใช้นั้นได้รับการทำความสะอาดและฆ่าเชื้อเฉพาะนอกลำตัวเท่านั้น เมื่อเลี้ยงในอาหารก็จะมี การปนเปื้อนจากการที่ไส้เดือนฝอยขับถ่ายออกมา ฉะนั้นการเลี้ยงขยายในถังหมักจึงมีความจำเป็นจะต้องใช้ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์เพราะสภาพในถังหมักนั้นเหมาะสมกว่าสภาพในขวดเขย่า โอกาสที่จะเกิดการปนเปื้อนได้ง่ายกว่า นอกจากนี้การเลี้ยงในถังหมักจะต้องใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมาก การเลี้ยงขยายโดยใช้แมลงอาศัยนั้นไม่พอเพียงกับความต้องการ ค่าใช้จ่ายสูง เปลืองแรงงาน เสี่ยงต่อการล้มเหลวในการผลิต เนื่องจากเกิดโรคระบาดแมลงตาย ฉะนั้นจุดประสงค์ของการทดลองนี้ เพื่อศึกษาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ (pure line) ให้ได้เป็นจำนวนมากและมีประสิทธิภาพสูง เพื่อจะนำไปใช้ในการศึกษาการเลี้ยงในถังหมักต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องปั่นอาหาร เครื่องเขย่า เครื่องกวนสาร vortex mixer centrifuge
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker, cylinder, flask, petridish, test tube, vial
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ peptone 0.1%, อาหารเหลวสูตร Tsb₃, NBTA, Yeast Salt broth,
4. ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ IJ
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1% , formalin 0.1% , alcohol 75% , Ringer's solution, Steriled egg's solution (ดูภาคผนวก)
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น counter, autopipette + tip, magnetic bar, parafilm จุกยาง เข็มเขี่ย ผ้ากรองขนาด 270 mesh จุกสำลี ชุดล้างกรอง ปากคีบ ถาดหลุมทดสอบประสิทธิภาพ ถาดนับไส้เดือนฝอย กระดาษอลูมิเนียม

วิธีการ : วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี (treatment) 5 ซ้ำ (replication)

- กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์
- กรรมวิธีที่ 2 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์
- กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย
- กรรมวิธีที่ 4 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากแมลงอาศัย

1. กรรมวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ (pure line)

ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.1 การแยกไข่ที่ได้รับการผสมแล้วออกจากลำตัวไส้เดือนฝอยเพศเมีย

- นำหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* มาทำการ infect ด้วยไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ในจานแก้ว (petridish) ที่มีกระดาษกรองรองอยู่ นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25⁰ซ เป็นเวลา 3-5 วัน

- นำหนอนที่ตายเนื่องจากไส้เดือนฝอยมาล้างด้วย alcohol 75% จากนั้นนำมาผ่าในน้ำยา Ringer's solution ทำการคัดเฉพาะไส้เดือนฝอยเพศเมียที่มีไข่ที่ได้รับการผสมแล้ว

- นำไส้เดือนฝอยเพศเมียที่ได้คัดเลือกแล้วใส่ในหลอดทดลอง (test tube) เขย่าด้วยเครื่อง vortex mixer เพื่อให้ลำตัวแตกไข่จะหลุดออกมา เสร็จแล้วนำไปเทผ่านผ้ากรองละเอียด ขนาด 270 mesh นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 1 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้เทรวมกัน แล้วเติม Ringer's solution ลงไป นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งหนึ่ง ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง จะได้ไข่ไส้เดือนฝอยเพื่อนำไปใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.2 การเตรียมไข่ที่บริสุทธิ์ปลอดเชื้อ โดยทำในตู้ปลอดเชื้อ

นำไข่ที่แยกได้จากข้อ 1.1 ใส่ลงใน micro tube ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อแล้ว เติมน้ำยา Steriled egg's solution ผสมเขย่าเป็นเวลา 4 นาที แล้วนำไปปั่นตกตะกอนที่ 2,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง แล้วเติม YS broth ลงไปแทน เขย่าให้เข้ากัน นำไปปั่นตกตะกอนอีกครั้งที่ 2,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ดูดของเหลวส่วนบนทิ้ง แล้วเติม YS broth ลงไปใหม่ เขย่าให้เข้ากันด้วยมือเพื่อเตรียมไข่ลงเพาะฟักในขั้นตอนต่อไป

1.3 การเพาะฟักไข่เพื่อให้ได้ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยวัย 1 (J₁)

หยด YS broth ลงในภาชนะที่อบฆ่าเชื้อแล้วหุ้มละ 1 มล. แล้วหยดไข่ไส้เดือนฝอย จากข้อ 1.2 ลงไปหุ้มละ 1-2 หยด ปิดฝาและปิดทับด้วย parafilm นำเก็บที่ 25⁰ซ เป็นเวลา 2-3 วัน เมื่อไข่พัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 1 (J₁) ตรวจสอบการปนเปื้อน คัดเฉพาะหุ้มที่มีไส้เดือนฝอยวัย 1 (J₁) ที่ปราศจากการปนเปื้อนเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

1.4 การย้ายตัวอ่อนวัย 1 (J₁) ลงเลี้ยงในอาหารวุ้น เพื่อให้ได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II

- เตรียมอาหารวุ้น

- หยดแบคทีเรียที่เลี้ยงขยายใน YS broth แล้ว 24 ชั่วโมง ลงในอาหารวุ้น เก็บที่อุณหภูมิ 25⁰ซ นาน 24 ชั่วโมง

- คูดใส่เดือนฝอยวัย 1 (J_1) ที่คัดความบริสุทธิ์แล้วจากข้อ 1.3 ใส่ลงในอาหารร่วน นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°C นาน 15 วัน จะได้ใส่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ใช้เป็น inoculum ในการเลี้ยง ขยายปริมาณในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) ต่อไป

2. การเตรียมใส่เดือนฝอยจากแมลงอาศัยโดยใช้หนอนกิ้งรังผึ้ง

- 2.1 เตรียมหนอนกิ้งรังผึ้ง (วัย 5 - 6) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเทียม ในห้องปฏิบัติการ
- 2.2 นำใส่เดือนฝอย *S. carpocapsae* (nematode suspension) ผสมน้ำให้มีอัตราความหนาแน่นประมาณ 200 ตัว/มล. หยดลงบนกระดาษกรองในจานแก้วที่ใส่หนอนกิ้งรังผึ้งประมาณ 10 ตัว
- 2.3 หนอนจะตายภายใน 48 ชั่วโมง โดยผนังลำตัวหนอนที่ตายมีลักษณะเหนียวนุ่ม ไม่เน่าและ มีสีเหลืองครีม
- 2.4 นำซากหนอนเหล่านั้นมาล้างให้สะอาด แล้ววางบนจานแก้วซึ่งมีกระดาษกรองปูด้านบน นำไปวางในกล่องพลาสติก เทน้ำสะอาดหล่อจานแก้ว ปิดฝาให้สนิทป้องกันแมลงหวี่
- 2.5 นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 7 - 10 วัน
- 2.6 ใส่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II จะทยอยออกจากซากหนอนมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ (ดูจากความขุ่นของน้ำ)
- 2.7 ทำการเก็บใส่เดือนฝอยที่ได้จากน้ำที่หล่อไว้ โดยเทเก็บพร้อมน้ำวันเว้นวันจนซากหนอนแห้ง ประมาณ 4 - 5 ครั้ง เฉลี่ยได้ใส่เดือนฝอยประมาณไม่ต่ำกว่า 100,000 ตัวจากแมลงอาศัย 1 ตัว

3. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์ที่ใช้เป็น inoculum

นำใส่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้จากแมลงอาศัย (หนอนกิ้งรังผึ้ง) และกรรมวิธีบริสุทธิ์ (pure line technique) มา เพื่อทำการแยกแบคทีเรีย *X. nematophilus* ด้วยวิธีที่ได้กล่าวมาแล้วให้ได้เชื้อบริสุทธิ์ของแต่ละชุด แล้วนำเชื้อแบคทีเรียมาเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลว YS broth เพื่อนำไปใช้ในการทดลอง ในแต่ละวิธีการต่อไป

4. การเตรียมกรรมวิธีการทดลอง

- 4.1 เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb_3 ใส่ขวดแก้วขนาด 125 มล. ขวดละ 15 มล. จำนวน 10 ขวด นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที จากนั้นนำไปทดลองเลี้ยงใส่เดือนฝอยในกรรมวิธีที่ 1 ซึ่งใช้ inoculum แบคทีเรีย และใส่เดือนฝอยที่ได้จากกรรมวิธีบริสุทธิ์ และในกรรมวิธีที่ 3 ซึ่งใช้ inoculum แบคทีเรียและใส่เดือนฝอยที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย โดยในแต่ละกรรมวิธีหยดแบคทีเรีย 1 มล. ประมาณ 2.6×10^8 เซลล์/มล. (drop plate) นำไปเขย่าที่

120 รอบ/นาที่ ที่ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงเป็นเวลา 10 วัน จึงทำการ
ตรวจนับปริมาณผลผลิตที่ได้

4.2 เตรียมอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi - solid media) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

อาหารสุนัข	22%
น้ำมันหมู	5%
น้ำ	66%
ฟองน้ำสังเคราะห์	7%

บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน ถุงละ 45 กรัม ปิดจุก นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที จากนั้นนำไปทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยตามกรรมวิธีที่ 2 ซึ่งใช้ inoculum แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่ได้จากกรรมวิธีบริสุทธิ์ และในกรรมวิธีที่ 4 ซึ่งใช้ inoculum แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่ผลิตด้วยแมลงอาศัย โดยในแต่ละวิธีการ หยอดแบคทีเรียถุงละ 4 มล. (ประมาณ 2.6×10^8 เซลล์/มล.) เขย่าให้ทั่วนำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงถุงละ 45,000 ตัว ตามแต่ละวิธีการ หลังจากตั้งเพาะเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 12 วัน จึงตรวจนับปริมาณผลผลิตที่ได้

5. การตรวจนับปริมาณแบคทีเรียของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละกรรมวิธี

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ผลิตได้ในแต่ละวิธีการๆ ละประมาณ 500,000 ตัว มาล้างด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นอบนิ่งฆ่าเชื้อ จากนั้นจึงนำไปบดในชุดบด (homogenizer) และเติมน้ำกลั่นอบนิ่งฆ่าเชื้อให้ครบ 1 มล. แล้วจึงนำไปนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการ drop plate (Supanwong and Pichai, 1995)

6. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989) ดังนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 1.6 เรื่องเปรียบเทียบการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและแมลงอาศัย (ข้อ 3.)

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างมกราคม 2542 – เมษายน 2542

ผลการทดลอง

จาก Table 1. ผลผลิตระหว่างการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวสูตร Tsb₃ และในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ไม่สามารถเปรียบเทียบได้โดยตรง เนื่องจากค่าเฉลี่ย/หน่วยไม่เหมือนกัน อย่างไรก็ตามจากการทดลองที่ผ่านมาได้พิสูจน์แล้วว่า การเลี้ยงขยายปริมาณด้วยอาหารทั้งสองสูตรนี้พร้อมกับปรับปัจจัยที่จำเป็นให้เหมาะสมให้ผลผลิตสูงสุด ต่างกันเพียงต้นทุนในการเลี้ยงเท่านั้น ฉะนั้นในงานทดลองนี้จะนำเอาการเพิ่มจำนวน (เท่า) ของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากปริมาณ inoculum ที่ใส่ลงเลี้ยงของแต่ละวิธีการมาเปรียบเทียบกัน จะเห็นได้ว่าการใช้ inoculum ที่บริสุทธิ์นั้นไม่ว่าในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ และอาหารแข็งกึ่งเหลว สามารถเพิ่มปริมาณได้สูงถึง 283.6 และ 302.2 เท่าตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างกัน แต่จะสูงกว่าการเลี้ยงในสูตรเดียวกันแต่ใช้ inoculum ที่ได้จากแมลงอาศัย โดยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการเลี้ยงในอาหารเหลวคือเพิ่มปริมาณได้ 243.8 เท่า และจากการนำลงเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลว เพิ่มปริมาณได้เพียง 183.3 เท่า ($P < 0.05$)

ส่วนปริมาณแบคทีเรียในตัวไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วย inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ในอาหารเหลวจะสูงกว่า คือ 760,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลว คือ 270,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว และจะสูงกว่าที่เลี้ยงได้ด้วย inoculum จากแมลงอาศัยในอาหารทั้งสองสูตร คือจากที่เลี้ยงได้ในอาหารเหลวมีปริมาณแบคทีเรีย 74,000 เซลล์/ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว และที่เลี้ยงได้ในอาหารแข็งกึ่งเหลวมีปริมาณ 44,000 เซลล์ / ไส้เดือนฝอย 500,000 ตัว ($P < 0.05$)

ดังนั้นในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ จะมีแบคทีเรียมากกว่าในอาหารแข็งกึ่งเหลว ทั้งในการเลี้ยงด้วย inoculum ที่ได้จากไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ และจากแมลงอาศัย

สำหรับประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ด้วย inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 55% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเลี้ยงด้วยวิธีการอื่นๆ คือ การเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งกึ่งเหลว โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัยมีประสิทธิภาพ 43.3% เท่ากัน และการเลี้ยงในอาหารเหลวซึ่งใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพเท่ากับ 38.3% ($P < 0.05$)

ทดลอง

จากงานทดลองแสดงให้เห็นว่า การใช้ inoculum ทั้งไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ (pure line) นั้น ทำให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูง หรืออาจกล่าวได้ว่าสภาพการเลี้ยงดังกล่าวอยู่ในสภาพที่เรียกว่า monoxenic culture และเป็นการยืนยันผลการทดลองนี้อีกครั้ง โดยเปรียบเทียบการผลิตไส้เดือนฝอยที่ผ่านมาซึ่งส่วนใหญ่ใช้ inoculum จากแมลงอาศัย การผลิตขยายด้วยอาหารเหลว จะได้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 3,000,000 – 4,500,000 ตัว/ขวด หรือ 200,000 – 300,000 ตัว/มล. และการผลิตขยายด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) จะได้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 5,000,000 – 10,000,000 ตัว/ถุง ผลผลิตที่ได้ในการผลิตแต่ละครั้งไม่สม่ำเสมอ มีความแปรปรวนสูง ถึงแม้ว่ามีการปรับปัจจัยอื่นๆ ให้เหมาะสมแล้วก็ตาม ฉะนั้นการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์นั้น สามารถเพิ่มผลผลิตให้สูงขึ้นอีกได้ เช่นการทดลองนี้

การเลี้ยงในสภาพ monoxenic culture นั้นจะมีแบคทีเรียที่เป็น symbiont ของไส้เดือนฝอยอยู่ในอาหารที่เลี้ยงชนิดเดียว ไม่มีการแข่งขันจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นๆ ทำให้มันเจริญขยายปริมาณได้รวดเร็ว สามารถสร้างอาหารที่จำเป็นแก่ไส้เดือนฝอยได้เป็นปริมาณมาก เป็นผลทำให้ไส้เดือนฝอยได้อาหารเต็มที่ ขยายพันธุ์ได้มาก ผลผลิตที่ได้ก็สูงตาม จะเห็นได้จาก Table 1. การเลี้ยงในอาหารเหลวและอาหารแข็งกึ่งเหลวที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ จะพบปริมาณแบคทีเรียในตัวไส้เดือนฝอยมากกว่าการเลี้ยงที่ใช้ inoculum จากแมลงอาศัย นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลวด้วย inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงสุด อาจเนื่องจากส่วนประกอบของอาหารและสภาพการเลี้ยงใกล้เคียงกับสภาพธรรมชาติมากที่สุด

ฉะนั้นการผลิตไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum ในการทดลองเลี้ยงด้วยด้งหมักหรือวิธีต่างๆ ควรใช้วิธีการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลวโดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์จะเหมาะสมที่สุด

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองจะเห็นว่า ผลผลิตเฉลี่ยที่เลี้ยงได้จากอาหารเหลวสูตร Tsb₃ โดยการใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่ได้จากกรรมวิธีที่บริสุทธิ์ (pure line technique) ลงเลี้ยงให้ผลผลิตเฉลี่ย 4,254,000 ตัว/ขวด ซึ่งสูงกว่าการใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ลงเลี้ยงขยาย ซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 3,658,400 ตัว/ขวด ส่วนผลผลิตเฉลี่ยที่เลี้ยงได้จากอาหารแข็งกึ่งเหลว พบว่าการใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ลงเลี้ยงให้ผลผลิตเฉลี่ย 13,600,000 ตัว/ถุง ซึ่งสูงกว่าการใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัยลงเลี้ยงซึ่งให้ผลผลิตเฉลี่ย 8,250,000 ตัว/ถุง

สำหรับประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของผลผลิตใส่เดือนฝอย พบว่าการเลี้ยงในอาหารแข็งกึ่งเหลวโดยใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์มีประสิทธิภาพสูงสุดคือ 55% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการเลี้ยงวิธีการอื่น ซึ่งอยู่ในระดับใกล้เคียงไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 38 - 43% ($P < 0.05$)

ส่วนปริมาณเซลล์แบคทีเรียจากใส่เดือนฝอยที่เลี้ยงโดยใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์มีปริมาณสูงกว่าการใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยจากแมลงอาศัย โดยที่การใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยบริสุทธิ์ลงเลี้ยงด้วยอาหารเหลวได้สูงสุด 760,000 เซลล์/ใส่เดือนฝอย 500,000 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลวซึ่งได้ 270,000 เซลล์/ใส่เดือนฝอย 500,000 ตัว และส่วนที่ใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยจากแมลงอาศัย ไม่ว่าจะเลี้ยงด้วยอาหารเหลวหรืออาหารแข็งกึ่งเหลว ได้ปริมาณเซลล์แบคทีเรียไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือได้ 74,000 และ 44,000 เซลล์/ใส่เดือนฝอย 500,000 ตัว ตามลำดับ ($P < 0.05$)

จะเห็นว่ากรรมวิธีที่ 2 คือการเลี้ยงขยายใส่เดือนฝอยในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) โดยใช้ inoculum ใส่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ นอกจากจะให้ผลผลิตสูงสุดแล้ว ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงก็สูงด้วย ดังนั้นวิธีการนี้จึงเหมาะสมที่สุดในการเลี้ยงขยายปริมาณใส่เดือนฝอยเพื่อนำไปเลี้ยงขยายในถังหมัก

Table 1. Comparison of the yield, number of symbiotic bacterial cells and percent infectivity of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* cultured *In Vitro* by using inoculum of nematode and symbiotic bacteria produced by pure line technique to those produced from insect host (*Galleria mellonella*).

Treatment		Yield	Multiple increasing	Average number	% nematode
Inoculum	Media		of yield	of bacteria*	infectivity**
Nematode and bacteria from pure line	liquid (Tsb ₃)	4,254,000/flask	283.6 a	760,000 a	38.3 b
	semi-solid (dog food)	13,600,000/sac	302.2 a	270,000 b	55.0 a
Nematode and bacteria from insect host	liquid (Tsb ₃)	3,658,400/flask	243.8 b	74,000 c	43.3 b
	semi-solid (dog food)	8,250,000/sac	183.3 c	44,000 c	43.3 b
CV. (%)			7.4	23	13.1

Means followed by a common letter are not significantly different at the 5% level by DMRT.

* cells / 500,000 nematodes

** The method utilizes a culture cell well with confines one infective *Steinernema carpocapsae* with one insect host and results infection within 48 hours (Miller, R.W. 1989).

2.2 ผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย

Steinernema carpocapsae (Weiser) ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร

Effect of Nematode Inoculum Sizes on Yield of *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

Cultured in 6 Liter Fermentor

บทคัดย่อ

ผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร ทำการทดลองในห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยใช้ชุดถังหมักแบบไบโพดกวน 2 ชุด แต่ละชุดมีตัวเครื่องควบคุม (control unit) สำหรับการปรับตั้งปัจจัยต่างๆ ในการเลี้ยง

จากการศึกษาผลผลิตและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในถังหมักของการทดลองที่ 1. (สภาพที่ 1.) โดยปรับอัตราการไหลเข้าของอากาศอยู่ในช่วงต่ำสุด – สูงสุด ระหว่าง 0.1 – 10 ลิตร/นาที่ พบว่า การใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะได้ผลผลิต 157,000 ตัว/มล. มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 48% ซึ่งสูงกว่าการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยได้ผลผลิต 104,000 ตัว/มล. มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 38% และสำหรับการเลี้ยงครบ 1 วงจรชีวิตของการใช้ inoculum 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. นั้น จะใช้เวลา 12 วัน ซึ่งนานกว่าการเลี้ยงที่ใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยที่ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ถึง 4 วัน เช่นเดียวกันกับการทดลองครั้งที่ 2 (สภาพที่ 2.) ในสภาพที่ปรับอัตราการให้อากาศในถังหมักในช่วงต่ำสุด – สูงสุด ระหว่าง 4 – 10 ลิตร/นาที่ พบว่า การใช้ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิต 304,100 ตัว/มล. มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 45% ซึ่งสูงกว่าการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยมีผลผลิต 240,200 ตัว/มล. และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 43% สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยครบ 1 วงจรชีวิต ในสภาพที่มีการใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะใช้เวลา 10 วัน ซึ่งนานกว่าระยะเวลาการเลี้ยงที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. 1 วัน จะเห็นได้ว่าการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในถังหมักนั้น ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะให้ผลผลิตสูงกว่าการเลี้ยงที่ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และการปรับอัตราการให้อากาศในถังหมักที่เหมาะสมคือ ปรับให้อยู่ในช่วง ต่ำสุด – สูงสุด ระหว่าง 4 – 10 ลิตร/นาที่ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงจะให้ผลผลิตสูงสุด 304,100 ตัว/มล. ระยะเวลาการเลี้ยง 10 วัน

จากการศึกษาการผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว ในระดับขวดเขย่านั้นจะเห็นได้ว่า มีปัจจัยหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง แต่อย่างไรก็ตามข้อมูลบางส่วนสามารถนำมาเป็นแนวทางในการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในถังหมักได้โดยตรง ปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยนั้นเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญและมีผลต่อผลผลิตที่ได้โดยตรง จากการทดลองในระดับขวดพบว่าอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. นั้นเหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตามก็มีความจำเป็นที่จะต้องนำมาทดสอบในถังหมักอีกครั้ง ซึ่งมีสภาพที่แตกต่างกัน สภาพการเลี้ยงในถังหมักมีข้อได้เปรียบในแง่ที่ว่าเราสามารถควบคุมปัจจัยหลายอย่างได้ตามความต้องการ และปรับสภาพการเลี้ยงได้เหมาะสมและดีกว่า ฉะนั้นการเลี้ยงในสภาพนี้การเพิ่มปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยเป็น 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. อาจได้ผลผลิตมากขึ้น ฉะนั้นงานทดลองนี้มีจุดประสงค์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณ inoculum ไส้เดือนฝอยทั้งสองอัตราดังกล่าว ในการให้ผลผลิตจากการเลี้ยงในถังหมัก เพื่อนำผลการทดลองนี้เป็นแนวทางในการทดลองเพิ่มผลผลิตไส้เดือนฝอยต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องปั่นอาหาร เครื่องกวนสาร ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ -70°C ชุดทดลองถึงหมักขนาด 6 ลิตร พร้อมตัว control unit, vortex mixer, centrifuge
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker, cylinder, flask, petridish, test tube, vial
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ peptone 0.1%, อาหารเหลวสูตร Tsb₃, Yeast Salt broth, NBTA
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ IJ
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%, Ringer's solution Sterilized egg's solution (ดูภาคผนวก)
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น counter, autopipette พร้อม tip, magnetic bar, parafilm, จุกยาง ผ้ากรองขนาด 270 mesh ถาดนับไข่เดือนฝอย จุกสำลี เข็มเจีย กระดาษอลูมิเนียม ถาดหลุมทดสอบประสิทธิภาพ ปากคีบ ชุดล้างกรอง

วิธีการ

ศึกษาการเลี้ยงไข่เดือนฝอยในถังหมักขนาด 6 ลิตร โดยใช้ inoculum ไข่เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum มีขั้นตอนดังต่อไปนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 1.7 เรื่องผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหารต่างกันต่อผลผลิตไข่เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล. (ข้อ 2.)

2. กรรมวิธีการผลิตไข่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ (pure line)

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 2.1 เรื่องปริมาณและประสิทธิภาพของไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตในอาหารเหลวโดยการใช้ไข่เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ที่ได้จากกรรมวิธีการเลี้ยงบริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (insect host) (ข้อ 1.)

3. การเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับทดลองในถังหมัก ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.1 เตรียมอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

อาหารสุนัข	22%
น้ำมันหมู	5%
น้ำ	66%
ฟองน้ำสังเคราะห์	7%

บรรจุในถุงพลาสติกทนร้อน ถุงละ 45 กรัม ปิดจุก นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 20 นาที

3.2 หยดแบคทีเรียที่เลี้ยงขยายจาก YS broth มีจำนวนแบคทีเรียประมาณ 2.6×10^8 เซลล์/มล. (drop plate) ลงไปถุงละ 4 มล. เก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 24 ชั่วโมง จึงใส่ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์จากข้อ 2.4 ลงไปเลี้ยงขยายถุงละ 45,000 ตัว ที่อุณหภูมิ 25°ซ นาน 12 วัน จะได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ในปริมาณมาก เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับทดลองเลี้ยงขยายในถังหมัก

4. เตรียมการทดลองในถังหมัก โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

- เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ 3 ลิตร ใส่ลงในถังหมักขนาด 6 ลิตร
- ติดตั้งใบพัดกวนแบบ Turbine 2 ชุด แล้วปิดฝาถังหมัก
- ทำการปรับตั้ง (calibrate) pH – electrode
- ติดตั้ง pO₂ - electrode (partial dissolved Oxygen)
- ประกอบชุดท่อระบายอากาศ ขวดสำหรับดูดตัวอย่างมาตรวจ ท่อให้อากาศในถังหมัก
- ตรวจสอบการรั่วไหลเพื่อป้องกันการปนเปื้อน
- นำถังหมักทั้งชุดเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นาน 30 นาที จากนั้นรอให้อุณหภูมิลดลงถึง 35 – 40°ซ
- นำไปติดตั้งกับตัวเครื่องควบคุม (control unit) ทำการต่อเชื่อมสายสัญญาณ, ท่อหรือสายต่างๆ เข้าด้วยกันระหว่างถังหมักกับตัวเครื่องควบคุม
- เปิดสวิตซ์ให้เครื่องทำงาน
- ทำการปรับตั้ง (calibrate) pO₂ – electrode

5. การปรับตั้งเพื่อควบคุมปัจจัยต่างๆ สำหรับการเลี้ยงในถังหมัก

5.1 เลี้ยงขยายแบคทีเรียในช่วง 24 ชั่วโมงแรก

การทดลองครั้งที่ 1 (สภาพที่ 1) ทำการเลี้ยงภายใต้ปัจจัยดังนี้

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 20% คงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง โดยมีอัตราการไหลของอากาศ (airflow rate) เป็นตัวควบคุมให้คงที่โดยอัตโนมัติ โดยปรับให้อยู่ระหว่างอัตรา 0.1 - 10 ลิตร/นาที่

- ตั้งระดับความเร็วในการกวนคงที่ในอัตรา 300 รอบ/นาที่
- ตั้งอุณหภูมิคงที่ 28°C

การทดลองครั้งที่ 2 (สภาพที่ 2) ทำการเลี้ยงภายใต้ปัจจัยดังนี้

- ตั้งระดับ pO_2 ให้อยู่ที่ระดับ 40% คงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

- ตั้งอัตราการไหลของอากาศเข้าในถังหมักควบคุม pO_2 ให้อยู่ระหว่าง 4 - 10 ลิตร/นาที่

- ตั้งความเร็วในการกวนคงที่ 300 รอบ/นาที่
- อุณหภูมิคงที่ 28°C

5.2 การปรับปัจจัยในถังหมักหลังจากใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงขยายร่วมกับแบคทีเรีย

การทดลองครั้งที่ 1 (สภาพที่ 1) ทำการเลี้ยงภายใต้ปัจจัยดังนี้

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 20% ซึ่งควบคุมโดยอัตราการให้อากาศ 1 - 10 ลิตร/นาที่ แบบอัตโนมัติ

- เพิ่มความเร็วในการกวนเป็น 350 รอบ/นาที่
- ปรับอุณหภูมิเป็น 25°C

การทดลองครั้งที่ 2 (สภาพที่ 2) ทำการเลี้ยงภายใต้ปัจจัยดังนี้

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 40% อัตราการไหลของอากาศเข้าในถังหมักระหว่าง 4 - 10 ลิตร/นาที่

6. เก็บผลผลิต

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้ในถังหมัก ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 9-11 วัน มาแยกล้างด้วยการตั้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนก่อน แล้วจึงนำไปผ่านการล้างกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 270 mesh ทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ด้วยเครื่องนับอัตโนมัติ หลังจากนั้นเก็บผลผลิตที่ได้ในฟองน้ำบรรจุในถุงพลาสติก แล้วนำเก็บที่อุณหภูมิ 6°C เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

7. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989) ดังนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 1.6 เรื่องเปรียบเทียบการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและแมลงอาศัย (ข้อ 3.)

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างเมษายน 2542 – กรกฎาคม 2542

ผลการทดลอง

จาก Table 1. หลังจากการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียเริ่มต้น (inoculum) 10^7 เซลล์/มล. เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการเพิ่มจำนวนเป็น 10^{14} เซลล์/มล. ทั้งในการทดลองครั้งที่ 1 และ 2 ถึงแม้ว่าสภาพการเลี้ยงโดยอัตราการให้อากาศต่ำสุดแตกต่างกันก็ตาม ส่วนค่า pH ที่วัดได้ในช่วงนี้มีความแตกต่างกัน โดยการเลี้ยงในสภาพที่ให้อากาศในอัตราสูงกว่าจะมีค่าสูงกว่า

จาก Table 2. หลังจากใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงทำการตรวจการพัฒนาทุกๆ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงดังนี้

- ที่อายุการเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาพการเลี้ยงครั้งแรกนั้นเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของไส้เดือนฝอยเป็นวัย 4 (J_4) ของ inoculum อัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. น้อยกว่าที่อัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ประมาณ 5% ส่วนในการทดลองครั้งที่สองนั้น การพัฒนาของไส้เดือนฝอยเป็นวัย 4 (J_4) นั้นมีค่าใกล้เคียงกัน (ประมาณ 70%)

- ที่อายุการเลี้ยง 72 ชั่วโมง ในสภาพแรกเหลือไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ซึ่งยังไม่พัฒนา ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. 6 และ 3% ตามลำดับ ซึ่งเหลือในปริมาณน้อยกว่าการเลี้ยงในสภาพที่ 2 คือ ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เหลือ 28% และที่ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เหลือ 12%

- ที่อายุการเลี้ยงที่ 96 ชั่วโมง ในสภาพการเลี้ยงทั้ง 2 สภาพ สำหรับทุกๆ อัตรา inoculum จะพบตัวอ่อนวัย 1 (J_1) และวัย 2 (J_2) อยู่ระหว่าง 95-99%

- ที่อายุการเลี้ยงที่ 144 ชั่วโมง จะพบไส้เดือนฝอยวัย 3 ตั้งแต่ 97-100% ในทุกๆ inoculum ของทั้งสองสภาพการเลี้ยง

หลังจากนี้การพัฒนาเป็น Infective Juvenile ใช้ระยะเวลาต่างกัน ในสภาพที่ 1 ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. การพัฒนาใช้เวลา 2 วัน ส่วน inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ใช้เวลา 6 วัน ในสภาพที่ 2 ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. การพัฒนาใช้เวลา 3 วัน และที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ใช้เวลา 4 วัน

จาก Table 3. ผลผลิตเฉลี่ย/อาหาร 1 มล. ทั้งสองสภาพการเลี้ยงนั้น ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ได้สูงกว่าที่ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้นั้นก็เช่นกัน ที่ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. จะต่ำกว่าที่ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล.

วิจารณ์ผลการทดลอง

จาก Table 1., 2. และ 3. ปริมาณของแบคทีเรียที่นับได้ที่อายุการเลี้ยง 24 ชั่วโมงนั้น มีค่าใกล้เคียงกันในทุกวิธีการ ซึ่งไม่มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ต่างกัน ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าช่วงนี้การเจริญของแบคทีเรียอยู่ในระยะ stationary phase แล้ว จากสภาพการเลี้ยงอัตราการให้อากาศ (airflow rate) ที่ต่างกันระหว่างสภาพการเลี้ยงครั้งแรกและครั้งที่สองนั้น อาจมีผลต่อการเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียในระยะ log phase (ยังไม่ได้มีการศึกษา growth curve ในงานทดลองนี้) ซึ่งอาจมีความสัมพันธ์กับการสร้างสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยในระยะเวลาต่อมา และการเพิ่ม pH นั้นอาจเนื่องมาจากอัตราการให้อากาศที่สูงและปริมาณสารอาหารที่ถูกสร้างขึ้น (จำเป็นต้องศึกษาต่อไป) ซึ่งเห็นได้จากการทดลองนี้ในสภาพการให้อากาศอัตรา 4 ลิตร/นาที่ จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าสภาพการให้อากาศอัตรา 0.1 ลิตร/นาที่ ทั้งการใช้ inoculum ในอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. หลังจากใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงนั้น สภาพในถังหมักที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ของแต่ละสภาพการทดลองนั้นเหมือนกัน ยกเว้นในสภาพที่การเลี้ยงครั้งที่สองนั้น มีการให้ออกซิเจนบริสุทธิ์ผสมกับอากาศลงไปด้วย ทำให้ pH ในการเลี้ยงต่ำกว่า แต่อย่างไรก็ตามในการทดลองที่ผ่านมานั้น pH ระดับนี้ไม่มีผลต่อการพัฒนาของไส้เดือนฝอย ผลผลิตของไส้เดือนฝอยที่ต่างกันระหว่างการใช้ inoculum ที่ต่างกันนั้น อาจกล่าวได้ว่าในปริมาณอาหารที่จำกัด (3 ลิตร) ในสภาพการเลี้ยงที่มีประชากรไส้เดือนฝอยมากกว่าถึง 5 เท่าตัว (ใช้ inoculum 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล.) ย่อมมีการใช้ปัจจัยในการเลี้ยงมากกว่า นอกจากอาหารแล้วยังมีการแข่งขันด้านอื่นๆด้วย เช่น อากาศ พื้นที่ ฯลฯ ถึงแม้ว่าจะใช้ inoculum ที่ต่างกัน เพอร์เซ็นต์ในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยนั้นใกล้เคียงกัน (เปรียบเทียบในแต่ละสภาพการเลี้ยง) เป็นช่วงที่ไส้เดือนฝอยมีขนาดใหญ่และมีประชากรหนาแน่นมาก (5,000 ตัว/อาหาร 1 มล.) สารอาหารที่จำเป็นที่สร้างโดยแบคทีเรียและปัจจัยอื่นๆ ในถังหมักจะถูกใช้มากขึ้นและจะหมดเร็วขึ้น นอกจากนี้สภาพในถังหมักอาจไม่เหมาะสมเนื่องจากของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมาสะสมกันมากขึ้น ปัจจัยต่างๆ เหล่านี้จะมีผลต่อการสร้างไข่ของเพศเมียเมื่อสภาพต่างๆ ไม่สมบูรณ์ ปริมาณไข่ก็จะลดลง นำไปสู่ผลผลิตทั้งหมดที่ได้จะน้อยลง จะเห็นได้จากในสภาพการเลี้ยงทั้งสองสภาพนั้นผลผลิตเฉลี่ย/เพศเมีย 1 ตัว ของการใช้ inoculum ในอัตรา 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ต่ำกว่าการใช้ inoculum ในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. (Table 1.) ส่วนระยะเวลาการเลี้ยงครบ 1 วงจรชีวิตจนได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II 100% ที่มีความแตกต่างกัน (Table 2.) มีความเกี่ยวข้องกับระยะเวลาในการพัฒนาจากวัยที่ 3 (J_3) เปลี่ยนเป็น II ในระยะเวลานี้ถ้าอาหารเหลือน้อยไม่พอเพียงกับความต้องการ และสภาพอื่นๆ ในถังหมักไม่เหมาะสม (ของเสียมาก) ไส้เดือนฝอยวัย 3 จะเร่งพัฒนาเป็น II เร็วขึ้น ทำให้อายุการเลี้ยงทั้งวงจรชีวิตสั้นลง จะเห็นได้จากการเลี้ยงทั้ง 2 สภาพ (Table 3.) โดยใช้ inoculum 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ระยะเวลา

การเลี้ยงประมาณ 8 และ 9 วัน ซึ่งจะสั้นกว่าการเลี้ยงใน inoculum 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. การพัฒนาเป็น II เร็วเกินไป เนื่องจากสภาพไม่เหมาะสม อาหารไม่พอเพียง ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่แข็งแรง ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนลดลง นอกจากนี้มีการสะสมไขมันในลำตัวน้อยเกินไป อาจมีผลต่อการเก็บรักษาทำให้อายุในการเก็บรักษาสั้นลง ซึ่งจะมีการศึกษาเพื่อเป็นการยืนยันต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในถังหมักโดยศึกษาเปรียบเทียบการใช้ inoculum ที่ 1,000 กับ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ในถังหมักต่างกัน 2 สภาพ พบว่าการใช้ inoculum ที่ 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ให้ผลผลิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงสูงกว่าการใช้ inoculum ที่ 5,000 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยการเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ใช้ inoculum ไส้เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. มีการปรับสภาพถังหมักให้มีอัตราการให้อากาศต่ำสุด 4 ลิตร/นาที่ ในการเลี้ยงครบ 1 วงจรชีวิต ใช้เวลา 10 วัน จะได้ผลผลิตสูง 304,100 ตัว/มล.

Table 1. The number of bacterial cells *Xenorhabdus nematophilus* counted at the culturing period of 24 hours prior to nematode feeding in the two different conditions of fermentation cultures.

Bacteria culturing period (hr.)	1 st condition *				2 nd condition **			
	nematode inoculum				nematode inoculum			
	5000 nemas./ml.		1000 nemas./ml.		5000 nemas./ml.		1000 nemas./ml.	
	Bateria	pH	Bateria	pH	Bateria	pH	Bateria	pH
	(cells/ml.)		(cells/ml.)		(cells/ml.)		(cells/ml.)	
0	1.28×10^7	6.99	1.31×10^7	7.01	3.08×10^7	7.10	3.14×10^7	7.11
24	2.33×10^{14}	7.60	2.45×10^{14}	7.58	2.11×10^{14}	8.30	2.34×10^{14}	8.34

* minimum airflow rate 0.1 l/min.

** minimum airflow rate 4 l/min.

Table 2. Comparative development of the entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* culturing in the two different conditions of fermentation process.

nematode culturing periods (day)	stage	1 st condition *				2 nd condition **			
		nematode inoculum				nematode inoculum			
		5000 nemas./ml.		1000 nemas./ml.		5000 nemas./ml.		1000 nemas./ml.	
		% nematode development	pH	% nematode development	pH	% nematode development	pH	% nematode development	pH
1	IJ	11.58	8.02	6.79	8.01	31.16	7.98	29.29	8.87
	J ₄	88.42		93.21		68.84		70.71	
2	IJ	6.20		5.07		30.19		25.46	
	J ₄	1.46	8.25	4.12	8.24	3.05	7.88	5.13	8.66
	M	35.77		42.45		17.45		25.64	
	F	56.57		48.11		49.31		43.59	
3	IJ	5.80		3.00		28.16		11.96	
	M	37.56	8.13	30.08	8.15	20.68	7.44	28.26	8.78
	F	56.64		66.92		51.17		59.78	
4	J ₁₋₂	94.84		97.98		97.82		98.79	
	M	2.02	7.98	0.76	8.09	0.27	7.54	0.40	8.55
	F	3.14		1.26		1.90		0.81	
5	J ₁₋₂	10.65	7.54	28.10	7.61	1.44	7.44	7.64	8.68
	J ₃	89.35		71.90		98.56		92.36	
6	J ₁₋₂	2.71	7.53	6.97	7.65	0.07	7.48	-	8.12
	J ₃	97.29		93.03		99.93		100.00	
7	J ₁₋₂	-	8.34	4.47	8.31	-	8.10	-	8.20
	J ₃	15.06		95.52		20.09		76.70	8.42
	IJ	84.94		-		79.95		23.30	
8	J ₃	-	8.34	70.73	8.35	7.90	8.10	21.29	8.61
	IJ	100.00		29.27		92.10		78.71	
9	J ₃	-	-	52.84	8.35	-	8.10	11.50	8.52
	IJ	-		47.16		100.00		88.50	
10	J ₃	-	-	19.78	8.41	-	-	-	-
	IJ	-		80.22		-	-	100.00	-
11	J ₃	-	-	5.00	8.40	-	-	-	-
	IJ	-		95.00		-	-	-	-
12	IJ	-	-	100.00	8.40	-	-	-	-

* minimum airflow rate 0.1 l/min.

** minimum airflow rate 4 l/min.

Table 3. Yields and pathogenicity of the nematodes *Steinernema carpocapsae* cultured in the two different conditions of fermentation process.

Items	1 st condition*		2 nd condition**	
	nematode inoculum		nematode inoculum	
	5000 nemas./ml.	1000 nemas./ml.	5000 nemas./ml.	1000 nemas./ml.
Yields (nemas/ml.)	104,000	157,000	240,200	304,100
Yields/1 female	36.723	234.61	93.49	508.68
Period 1 generation(days)	8	12	9	10
% nematode development in 24 hr.	88.42	93.21	68.84	70.71
% pathogenicity	38.00	48.33	43.33	45.00

* minimum airflow rate 0.1 l/min.

** minimum airflow rate 4 l/min.

2.3 อัตราและวิธีการให้อากาศที่มีผลต่อการเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียและผลผลิต ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร

Effect of Airflow Rate and Method of Air Supply on the Development of Symbiotic Bacteria and Yield of *Steinernema carpocapsae* (Weiser) in 6 Liter Fermentor

บทคัดย่อ

ศึกษาอัตราและวิธีการให้อากาศที่มีผลต่อการเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียและผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ผลิตในถังหมักขนาด 6 ลิตร บรรจุน้ำอาหารเหลว 3 ลิตร ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยกำหนดการปรับอัตราและวิธีการให้อากาศในช่วงการเลี้ยงขยายแบคทีเรีย 24 ชั่วโมง ในถังหมักที่ต่างกัน 7 สภาพด้วยกัน โดยให้อากาศ (airflow rate) ในอัตราเฉลี่ย 0.48, 0.50, 2.85, 3.25, 4.69, 6.27 และ 8.0 ลิตร/นาที่ และสำหรับแต่ละอัตราเฉลี่ยนั้นได้กำหนดวิธีการให้อากาศในอัตราต่ำสุด คือ 0, 0.5, 0, 1.0, 4.0, 5.0 และ 8.0 ลิตร/นาที่ ตามลำดับ ส่วนปัจจัยอื่นๆ เช่น ความเร็วของใบพัดกวน (300 รอบ/นาที่) และอุณหภูมิการเลี้ยง (28°C) นั้น ตั้งคงที่ตลอดเวลาการเลี้ยง หลังจากนั้นทำการใส่ไส้เดือนฝอยในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย แล้วปรับความเร็วใบพัดกวนเป็น 350 รอบ/นาที่ และอุณหภูมิเป็น 25 °C คงที่ตลอด

จากผลการทดลอง ทุกสภาพการทดลอง แบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ใกล้เคียงกันภายใน 15 ชั่วโมงแรก (10^{12} เซลล์/อาหาร 1 มล.) ส่วนที่ 18 ชั่วโมง การให้อากาศในอัตราเฉลี่ย 4.69, 6.27 และ 8.0 ลิตร/นาที่ นั้นจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรีย 7.14×10^{14} , 1.01×10^{14} และ 1.01×10^{14} เซลล์/มล. ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าการให้อากาศอัตราเฉลี่ยที่ต่ำกว่า ความแตกต่างนี้ไม่มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ของแต่ละวิธีการ ($r = 0.3985$, $P > 0.05$) และภายใน 21 ชั่วโมง ปริมาณเซลล์แบคทีเรียของทุกวิธีการนั้นใกล้เคียงกัน อัตราการให้อากาศเฉลี่ยในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรียนี้มีความสัมพันธ์กับผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($r = 0.8998$, $P < 0.01$) อัตราเฉลี่ย 4.69, 6.27 และ 8 ลิตร/นาที่ จะให้ผลผลิตสูง คือ 321,000, 334,600 และ 424,600 ตัว/มล. ตามลำดับ

นอกจากนี้การกำหนดอัตราการให้อากาศต่ำสุดของแต่ละอัตราเฉลี่ย คือ 4, 5 และ 8 ลิตร/นาที่ นั้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับผลผลิตที่ได้เช่นกัน ฉะนั้นการผลิตไส้เดือนฝอยในถังหมักให้ได้ผลผลิตสูงจำเป็นต้องกำหนดการให้อากาศขั้นต่ำสุดในอัตราที่สูงและคงที่ในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรีย

คำนำ

จากการทดลองที่ผ่านมา ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบการใช้ inoculum ไล้เดือนฝอยในอัตรา 5,000 และอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. พบว่าการใช้ inoculum อัตรา 1,000 ตัว/มล. นั้นให้ผลผลิตสูงกว่า นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการให้อาการและวิธีการให้อาการที่สม่ำเสมอมีผลต่อการขยายปริมาณของเชื้อแบคทีเรียและผลผลิตไล้เดือนฝอยที่ได้ ดังนั้นจุดประสงค์ของงานทดลองนี้ก็เพื่อที่จะศึกษาเกี่ยวกับอิทธิพลของปัจจัยเหล่านี้ให้มีความชัดเจนยิ่งขึ้น โดยเปรียบเทียบอัตราและวิธีการให้อาการรูปแบบต่างๆ ในการนำไปสู่การผลิตไล้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณสูงสุดต่อไป

อุปกรณ์

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องชั่งไฟฟ้า เครื่องปั่นอาหาร เครื่องกวนสาร ตู้ควบคุมอุณหภูมิ ตู้ควบคุมอุณหภูมิต่ำ -70°C ชุดทดลองถึงหมักขนาด 6 ลิตร พร้อมตัว control unit, vortex mixer, centrifuge
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker, cylinder, flask, petridish, test tube, vial
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ peptone 0.1%, อาหารเหลวสูตร Tsb₃, Yeast Salt broth, NBTA
4. ไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะ IJ
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%, Ringer's solution Sterilized egg's solution (ดูภาคผนวก)
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น counter, autopipette พร้อม tip, magnetic bar, parafilm, จุกยาง ผ้ากรองขนาด 270 mesh ถาดนับไข่เดือนฝอย จุกสำลี เข็มเขี่ย กระดาษอลูมิเนียม ถาดหลุมทดสอบประสิทธิภาพ ปากคีบ ชุดล้างกรอง

วิธีการ

ศึกษาการเลี้ยงไข่เดือนฝอยในถังหมักขนาด 6 ลิตร โดยใช้ inoculum ไข่เดือนฝอย 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การเตรียมแบคทีเรียบริสุทธิ์เพื่อใช้เป็น inoculum

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 1.7 เรื่องผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหารต่างกันต่อผลผลิตไข่เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล. (ข้อ 2.)

2. กรรมวิธีการผลิตไข่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ (pure line)

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 2.1 เรื่องปริมาณและประสิทธิภาพของไข่เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตในอาหารเหลวโดยการใช้ไข่เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ที่ได้จากกรรมวิธีการเลี้ยงบริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (insect host) (ข้อ 1.)

3. การเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ในอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับทดลองในถังหมัก ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 2.2 เรื่องผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร (ข้อ 3.)

4. เตรียมการทดลองในถังหมัก โดยทำตามขั้นตอนดังนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 2.2 เรื่องผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็น inoculum ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในถังหมักขนาด 6 ลิตร (ข้อ 4.)

5. การปรับตั้งเพื่อควบคุมปัจจัยต่างๆ สำหรับการเลี้ยงในถังหมัก (Figure 1.)

5.1 ปรับสภาพภายในถังหมักเพื่อเลี้ยงขยายแบคทีเรียในช่วง 24 ชั่วโมงแรก

ในทุกสภาพการทดลองตั้งความเร็วของใบพัดกวนคงที่ 300 รอบ/นาที และอุณหภูมิคงที่ 28⁰ซ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง ส่วนปัจจัยอื่นปรับตามสภาพการเลี้ยงดังนี้

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 1

- ตั้งระดับ pO₂ (partial dissolved Oxygen) ที่ 20% ทำการปรับเพื่อรักษาระดับ pO₂ ที่ตั้งไว้ด้วยระบบการให้อากาศแบบอัตโนมัติ อยู่ระหว่างอัตราต่ำสุดและสูงสุดคือ 0 – 2 ลิตร/นาที

(อัตราการให้อากาศเฉลี่ยหลังจากเลี้ยงแบคทีเรียครบ 24 ชั่วโมง = 0.48 ลิตร/นาที)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 2

- ปรับการให้อากาศในถังหมักในอัตรา 0.50 ลิตร/นาที คงที่ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรีย (อัตราเฉลี่ย 0.50 ลิตร/นาที)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 3

- ปรับอัตราการให้อากาศแตกต่างกันในแต่ละช่วงของการเลี้ยงดังนี้
0 – 6 ชั่วโมง ปรับให้อากาศในอัตราตั้งแต่ 0 – 10 ลิตร/นาที ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพการเกิดฟอง ถ้าฟองมากปรับลดลง ฟองลดลงปรับอัตราเพิ่มขึ้น
6 – 11 ชั่วโมง ปรับการให้อากาศที่ 0 ลิตร/นาที เนื่องจากฟองมาก
11 – 18 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 10 ลิตร/นาที
18 – 24 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 2 ลิตร/นาที
(เฉลี่ยอัตราการให้อากาศเฉลี่ย 2.85 ลิตร/นาที)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 4

- ปรับอัตราการให้อากาศที่แตกต่างกันคือ
0 – 6 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 10 ลิตร/นาที่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับสภาพฟองที่เกิดขึ้นดังกล่าวมาแล้ว
6 – 12 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 10 ลิตร/นาที่
12 – 24 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 1 ลิตร/นาที่
(เฉลี่ยอัตราการให้อากาศ 3.52 ลิตร/นาที่)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 5

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 40% และให้อากาศในอัตราต่างๆ ตามระยะเวลาการเลี้ยงดังนี้
0 – 21 ชั่วโมง ปรับอากาศในอัตราต่ำสุดที่ 4 ลิตร/นาที่
และให้อัตราสูงสุดไม่เกิน 5 ลิตร/นาที่
21 – 23 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 2 ลิตร/นาที่
23 – 24 ชั่วโมง ให้อากาศในอัตรา 3 ลิตร/นาที่
(เฉลี่ยอัตราการให้อากาศ 4.69 ลิตร/นาที่)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 6

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 40% ปรับค่า pO_2 ให้คงที่โดยการให้อากาศระบบอัตโนมัติ
ในอัตราต่ำสุด 5 ลิตร/นาที่
และอัตราสูงสุดไม่เกิน 10 ลิตร/นาที่
(อัตราการให้อากาศเฉลี่ย 6.27 ลิตร/นาที่)

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 7

- ปรับการให้อากาศเข้าถึงหมักในอัตรา 8 ลิตร/นาที่ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง

5.2 ปรับสภาพภายในถังหมักหลังจากใส่ไข่เค็มฟลอยลงเลี้ยงขยายร่วมกับแบคทีเรียครบ 1 วงจรชีวิต (life cycle) หรือตั้งแต่ชั่วโมงที่ 24 – 48 ชั่วโมง ของการเลี้ยง

ในทุกสภาพการเลี้ยงตั้งความเร็วรอบของใบพัดกวนคงที่ ที่ 350 รอบ/นาที่ และอุณหภูมิ 25°C ตลอดระยะเวลาการเลี้ยงขยาย

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 1

- ตั้งระดับ pO_2 ที่ 20% ปรับค่า pO_2 ให้คงที่ด้วยระบบการให้อากาศแบบอัตโนมัติ โดยให้อากาศในอัตราอยู่ระหว่างค่าต่ำสุดและสูงสุด 0 – 10 ลิตร/นาที่

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 2

- ปรับอัตราการให้อากาศเข้าถึงหมัก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้

24 – 48	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	0.5 ลิตร/นาที่
48 – 96	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	0.1 ลิตร/นาที่
96 – 120	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	1.0 ลิตร/นาที่
120 – 240	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	0.5 ลิตร/นาที่
240 – 288	ชั่วโมง	ไม่ให้อากาศ	

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 3

- ปรับอัตราการให้อากาศเข้าถังหมัก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้

24 – 108	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	3 ลิตร/นาที่
108 – 168	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	2 ลิตร/นาที่
168 – 264	ชั่วโมง	ไม่ให้อากาศ	

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 4

- ปรับอัตราการให้อากาศเข้าถังหมัก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้

24 – 168	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	2 ลิตร/นาที่
168 – 264	ชั่วโมง	ไม่ให้อากาศ	

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 5

- ปรับอัตราการให้อากาศเข้าถังหมัก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้

24 – 30	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	3 ลิตร/นาที่
30 – 168	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	2 ลิตร/นาที่
168 – 264	ชั่วโมง	ไม่ให้อากาศ	

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 6

- 24 – 192 ชั่วโมง ตั้งระดับ pO_2 ที่ 20 % ตั้งระบบให้อากาศแบบอัตโนมัติ เพื่อปรับค่า pO_2 ให้คงที่ โดยให้ในอัตราระหว่าง 5–10 ลิตร/นาที่
- 192 – 264 ชั่วโมง ให้อากาศคงที่ในอัตรา 1 ลิตร/นาที่

การทดลองสภาพ (batch) ที่ 7

- ปรับอัตราการให้อากาศเข้าถังหมัก ในช่วงระยะเวลาการเลี้ยงแตกต่างกันดังนี้

24 – 78	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	8 ลิตร/นาที่
78 – 96	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	10 ลิตร/นาที่
96 – 120	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	8 ลิตร/นาที่
120 – 168	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	5 ลิตร/นาที่
168 – 192	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	2 ลิตร/นาที่
192 – 288	ชั่วโมง	ให้อากาศคงที่ในอัตรา	1 ลิตร/นาที่

6. เก็บผลผลิต

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่เลี้ยงได้ในถังหมัก ระยะเวลาการเลี้ยงประมาณ 9 -11 วัน มาแยกล้างด้วยการตั้งให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนก่อน แล้วจึงนำไปผ่านการล้างกรองด้วย ตะแกรงกรองขนาด 270 mesh ทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ด้วยเครื่องนับอัตโนมัติ หลังจากนั้นเก็บผลผลิตที่ได้ในฟองน้ำบรรจุในถุงพลาสติก แล้วนำเก็บที่อุณหภูมิ 6⁰ซ เพื่อทดสอบประสิทธิภาพต่อไป

7. การตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรียในแต่ละสภาพการทดลอง

หลังการใส่ inoculum แบคทีเรียลงเลี้ยงในอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ตามวิธีการต่างๆ ทุก 3 ชั่วโมง ทำการดูดตัวอย่างอาหารในแต่ละสภาพการทดลอง 15 มล. เพื่อตรวจนับปริมาณเซลล์แบคทีเรีย ด้วยวิธีการ drop plate (Supanwong and Pichai 1995)

8. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989) ดังนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 1.6 เรื่องเปรียบเทียบการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลวและแมลงอาศัย (ข้อ 3.)

เวลาและสถานที่

ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและ สัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ระหว่างกรกฎาคม 2542 - พฤศจิกายน 2542

จากการศึกษาลักษณะการเพิ่มปริมาณของแบคทีเรีย (Growth curve) ในการเลี้ยงในถังหมัก (Table 1.) โดยปรับอัตราการให้อากาศ (airflow rate) และวิธีการให้อากาศที่ต่างกัน 7 วิธีการนั้นพบว่าแบคทีเรียสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ได้ใกล้เคียงกันในระยะเวลาการเลี้ยง 15 ชั่วโมง โดยเพิ่มจากปริมาณเซลล์เริ่มต้น (inoculum) 10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล. เป็น 10^{12} เซลล์/อาหาร 1 มล. แต่เมื่อเลี้ยงขยายต่อไปจนครบ 18 ชั่วโมง พบว่าการให้อากาศในอัตราเฉลี่ย 4.69, 6.27 และ 8.00 ลิตร/นาที่ แบคทีเรียสามารถแบ่งเซลล์ได้ปริมาณสูงสุด (10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล.) และเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้เร็วกว่าการทดลองวิธีการอื่นๆ ประมาณ 3 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามความแตกต่างของแบคทีเรียในช่วง 18 ชั่วโมงนี้ ไม่มีความสัมพันธ์กับปริมาณผลผลิตที่ได้ของวิธีการเลี้ยงต่างๆ ($r = 0.3985$, $P > 0.05$) (Figure 2.)

อัตราการให้อากาศเฉลี่ย ในช่วงการเลี้ยงขยายแบคทีเรีย 24 ชั่วโมงแรก (Table 2., Figure 3.) มีความสัมพันธ์กับผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยที่ได้ อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r = 0.8998$, $P < 0.01$) จะเห็นได้ว่าอัตราการให้อากาศเฉลี่ยตลอดระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียตั้งแต่ 4.69 ลิตร/นาที่ ขึ้นไป ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่า 321,000 ตัว/มล. ซึ่งเป็นปริมาณที่ใกล้เคียงกับการเลี้ยงในขวดเขย่า นอกจากนี้วิธีการให้อากาศโดยกำหนดอัตราการให้อากาศต่ำสุด (minimum airflow rate) ของการเลี้ยงแต่ละครั้งนั้นมีความสัมพันธ์ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($r = 0.9885$, $P < 0.01$) ฉะนั้นนอกจากจะให้อากาศในอัตราเฉลี่ย 4.69 ลิตร/นาที่ จะต้องให้อัตราต่ำสุด 4 ลิตร/นาที่ ด้วยจึงจะได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูง ดังกล่าวมาแล้ว

การกำหนดอัตราต่ำสุดนั้น เป็นวิธีการให้อากาศเข้าไปในถังหมักติดต่อกันตลอดเวลาเพื่อไม่ให้ลดลงถึงระดับ 0 ลิตร/นาที่ ในช่วงใดช่วงหนึ่งของการเลี้ยง จาก Table 2. การทดลองใน batch ที่ 1 - 4 ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยค่อนข้างต่ำซึ่งอยู่ระหว่าง 112,800 ตัว/มล. ถึง 157,000 ตัว/มล. (อัตราการให้อากาศเฉลี่ย 0.48 – 3.52 ลิตร/นาที่) อัตราการให้อากาศสำหรับ batch ที่ 1-3 นั้น บางช่วงเวลาของการเลี้ยงจะลดต่ำถึงระดับ 0 ลิตร/นาที่ เป็นการให้อากาศไม่คงที่ เนื่องจากหยุดชะงัก ช่วงใดช่วงหนึ่งจะได้ผลผลิตน้อยกว่าการเลี้ยงใน batch ที่ 2 และ 4 ซึ่งให้อากาศต่ำสุด 0.5 และ 1.0 ลิตร/นาที่ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีการหยุดชะงัก หรือ airflow rate ลดต่ำถึงระดับ 0 ลิตร/นาที่ ช่วงใดช่วงหนึ่งของการเลี้ยง

วิจารณ์ผลการทดลอง

Table 4. และ Figure 5. เปรียบเทียบการเจริญของแบคทีเรียในสภาพต่างกัน โดยใช้จำนวนแบคทีเรีย เริ่มต้น (inoculum) เท่ากัน (10^7 เซลล์/มล.) พบว่าอากาศมีบทบาทสำคัญยิ่งในการเพิ่มจำนวนเซลล์และกระตุ้นกระบวนการสร้างสารที่จำเป็นบางอย่างสำหรับไส้เดือนฝอย

ลักษณะการเพิ่มจำนวนของแบคทีเรียในขวดเขย่าขนาด 125 มล. มีปริมาณอาหาร 15 มล. เปรียบเทียบกับขวดเขย่าขนาด 500 มล. ที่มีปริมาณอาหาร 30, 40, 50 และ 60 มล. (จากรายงานหัวข้อที่ 1.3 ผลของระดับปริมาณอาหารเหลวและไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว และหัวข้อที่ 1.7 ผลของระยะเวลาการเลี้ยงขยายแบคทีเรียในระดับปริมาณอาหารต่างกันต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในขวดเขย่าขนาด 500 มล.) มีอัตราการให้อากาศที่ด้วยความเร็วในการเขย่าเท่ากัน คือ 120 รอบ/นาที พบว่าในขวดเขย่าขนาด 125 มล. มีปริมาณอาหารน้อย ระดับปริมาณอาหารต่ำ การละลายของอากาศได้มากกว่าและแบคทีเรียได้รับ O_2 มากกว่า ทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ 24 ชั่วโมง ได้ปริมาณเซลล์สูงสุด 1.29×10^{12} เซลล์/มล. ผลผลิต 312,000 ตัว/มล. เนื่องจากมีปริมาณมากกว่า การละลายของอากาศในอาหารที่เตรียมในขวดเขย่าขนาด 500 มล. ได้น้อยกว่า จึงพบว่าแบคทีเรียในขวดเขย่าขนาด 500 มล. ที่มีระดับปริมาณอาหารต่างๆ (30 – 60 มล.) เพิ่มปริมาณเซลล์อย่างช้าๆ เข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ 48 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามมีความสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์สูงสุดได้ใกล้เคียงกับการเลี้ยงในขวดเขย่า 125 มล. (Figure 5.)

สำหรับการเจริญของแบคทีเรียในถังหมัก ความต้องการของอากาศต่ำสุดเฉลี่ย 0.48 ลิตร/นาที ก็สามารถแบ่งเซลล์ได้เป็นปริมาณสูงเท่ากับอัตราการให้อากาศเฉลี่ยที่สูงกว่าตั้งแต่ระดับ 0.5 - 8.0 ลิตร/นาที และได้ปริมาณสูงสุด (1.14×10^{14} เซลล์/มล.) มากกว่าการเลี้ยงในขวดเขย่าในระยะเวลาการเลี้ยงเท่ากัน แสดงว่าอัตราการให้อากาศนั้นมีผลต่อการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้นั้นไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียอย่างเดียว แต่การให้อากาศในอัตราที่สูงมากเกินไปจากปริมาณที่แบคทีเรียต้องการใช้ในการแบ่งเซลล์ได้สูงสุด และการให้อากาศที่สม่ำเสมอเช่นเดียวกันกับการเลี้ยงในขวดเขย่า (ความเร็วในการเขย่าคงที่) จะมีผลต่อกิจกรรมในการสร้างสารอาหารที่สำคัญ ซึ่งอาจมีหลายชนิดที่จำเป็นต่อไส้เดือนฝอยในการเจริญเติบโต การให้อากาศที่สูงก็จะให้ผลผลิตที่สูงตามผลการทดลองที่กล่าวมาแล้ว ส่วนปริมาณการเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียอาจเกี่ยวข้องกับชนิดและปริมาณของสารที่จำเป็นที่ถูกสร้างขึ้น ช่วงที่แบคทีเรียเพิ่มปริมาณเซลล์ได้สูงสุดจะมีปริมาณสารอาหารสูงที่สุด ตรงกับระยะเริ่มต้นของ stationary phase เป็นระยะที่เหมาะสม สำหรับไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงขยายปริมาณในทุกสภาพการผลิตขยายด้วยอาหารเทียมเพื่อให้ได้ผลผลิตสูง

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในถังหมักโดยให้อากาศต่างกัน 7 แบบ พบว่าการให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ ในสภาพการเลี้ยง (batch) แบบที่ 7 ให้ผลผลิตสูงสุด 424,600 ตัว/มล. และประสิทธิภาพของผลผลิต 42.50% โดยมีการปรับเปลี่ยนต่างๆดังนี้

- เลี้ยงขยายแบบคทีเรีย โดยให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่ ความเร็วรอบในการกวน 300 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 28 °ซ นาน 24 ชั่วโมง
- เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย โดยใช้ความเร็วในการกวน 350 รอบ/นาที่ อุณหภูมิ 25 °ซ แบ่งเป็นช่วงการให้อากาศในปริมาณต่างๆ ตามอายุการเลี้ยงดังนี้
 - 24-78 ชั่วโมง ให้อากาศคงที่ 8 ลิตร/นาที่
 - 78-96 ชั่วโมง ให้อากาศคงที่ 10 ลิตร/นาที่
 - 96-123 ชั่วโมง ให้อากาศ คงที่ 8 ลิตร/นาที่
 - 123-168 ชั่วโมง ให้อากาศคงที่ 5 ลิตร/นาที่
 - 168-288 ชั่วโมง ให้อากาศคงที่ 2 ลิตร/นาที่

จากผลการทดลองที่ได้จึงสามารถนำไปใช้ผลิตไส้เดือนฝอยในถังหมักระดับใหญ่ขึ้นต่อไป

Table 1. Number of symbiotic bacterial cells observed at 3 hour intervals during 24 hours culturing period before nematode feeding in fermentation cultures in different condition.

Culturing periods (hr.)	Batch of fermentation process						
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	7 th
0	2.23×10^7	1.35×10^7	6.63×10^7	1.18×10^7	2.23×10^7	5.43×10^7	1.02×10^7
3	8.15×10^7	1.21×10^8	2.02×10^8	1.0×10^8	-	2.23×10^8	9.97×10^7
6	1.02×10^9	1.62×10^9	3.44×10^9	1.22×10^9	-	3.26×10^9	1.28×10^9
9	1.19×10^9	2.19×10^9	3.51×10^9	1.31×10^9	-	3.30×10^9	1.72×10^9
12	2.31×10^{10}	3.95×10^{10}	5.11×10^{10}	2.45×10^{10}	-	3.84×10^{10}	3.74×10^{10}
15	2.34×10^{12}	1.0×10^{12}	1.23×10^{12}	1.14×10^{12}	-	2.26×10^{12}	1.12×10^{12}
18	9.74×10^{13}	1.10×10^{13}	1.21×10^{13}	9.74×10^{13}	7.14×10^{14}	1.01×10^{14}	1.01×10^{14}
21	1.31×10^{14}	1.01×10^{14}	2.43×10^{14}	2.18×10^{14}	7.10×10^{14}	1.48×10^{14}	1.11×10^{14}
24	1.38×10^{14}	1.11×10^{14}	2.44×10^{14}	2.15×10^{14}	7.12×10^{14}	1.44×10^{14}	1.14×10^{14}

(-) = not recorded

Table 2. The density of symbiotic bacterial cells, pH, yield and pathogenicity of nematode *Steinernema carpocapsae* cultured in the vessels with different conditions.

Batch	Bacterial inoculum (cells/ml.)	Bacterial cell density before nematode feeding (cells/ml.)	pH	Average airflow rate (l / min.)	Infectivity (%)	Yields (nemas./ml.)
1 st	2.23×10^7	1.38×10^{14}	7.85	0.48	42.5	137,000
2 nd	1.345×10^7	1.11×10^{14}	8.48	0.05	46.67	145,200
3 rd	6.63×10^7	2.44×10^{14}	8.48	2.85	42.15	112,800
4 th	1.18×10^7	2.15×10^{14}	8.5	3.52	44.17	157,400
5 th	2.23×10^7	7.12×10^{14}	8.51	4.69	42.5	321,000
6 th	5.43×10^7	1.44×10^{14}	8.12	6.27	45.5	334,600
7 th	1.02×10^7	1.14×10^{14}	8.2	8	42.5	424,600

* stirred rate = 300 rpm

temperature = 28 °C

nematode inoculum = 1,000 nema/ml.

Table 3. Air supply during 24 hours culture of the symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* before nematode feeding in the fermentation process.

Batch	Air supply		
	min. - max. (l/min.)	Average airflow rate (l/min.)	Yields (nemas./ml.)
1 st	0.0 - 2.0	0.48	137,000
2 nd	0.5 - 0.5	0.5	145,200
3 rd	0.0 - 10.0	2.85	112,800
4 th	1.0 - 10.0	3.52	157,400
5 th	4.0 - 5.0	4.69	321,000
6 th	5.0 - 10.0	6.27	334,600
7 th	8.0 - 8.0	8	424,600

Table 4. Comparison of density of symbiotic bacterial *Xenorhabdus nematophilus* counted at 6 hour intervals during culturing period of 54 hours in 6 liter bioreactor (3 liter media), 125 ml. shake flask (15 ml. media) and 500 ml. shake flasks (30, 40, 50 and 60 ml. media).

Bacteria culturing periods (hr.)	Bacterial cell density (cells/ml.)					
	In 6 liter bioreactor* (3 liter media)	In 125 ml. shake flask** (15 ml. media)	In 500 ml. shake flask** (with media)			
			30 ml.	40 ml.	50 ml.	60 ml.
0	1.02×10^7	1.17×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7	1.42×10^7
6	1.28×10^9	2.23×10^9	-	-	-	-
12	3.74×10^{10}	3.12×10^{10}	-	-	-	-
18	1.01×10^{14}	8.94×10^{11}	-	-	-	-
24	1.14×10^{14}	1.29×10^{12}	3.01×10^8	3.25×10^8	2.98×10^8	4.21×10^8
30	7.25×10^{13}	7.62×10^{11}	2.77×10^9	4.40×10^9	2.0×10^9	3.11×10^9
36	7.00×10^{13}	7.60×10^{11}	2.86×10^9	5.0×10^9	2.36×10^9	3.14×10^9
42	7.10×10^{13}	7.61×10^{11}	2.23×10^{10}	3.10×10^{10}	1.65×10^{10}	1.75×10^{10}
48	6.69×10^{13}	6.98×10^{11}	2.73×10^{12}	1.18×10^{12}	3.21×10^{12}	2.81×10^{12}
54	6.98×10^{13}	6.90×10^{11}	2.71×10^{12}	1.20×10^{12}	3.20×10^{12}	2.85×10^{12}

(-) = not recorded

* airflow rate = 8 l / min.

** shake speed = 120 rpm.

Figure 2. Correlation between the bacterial cell density observed at the 18th culturing hour and the yield of nematode in the fermentation cultures.

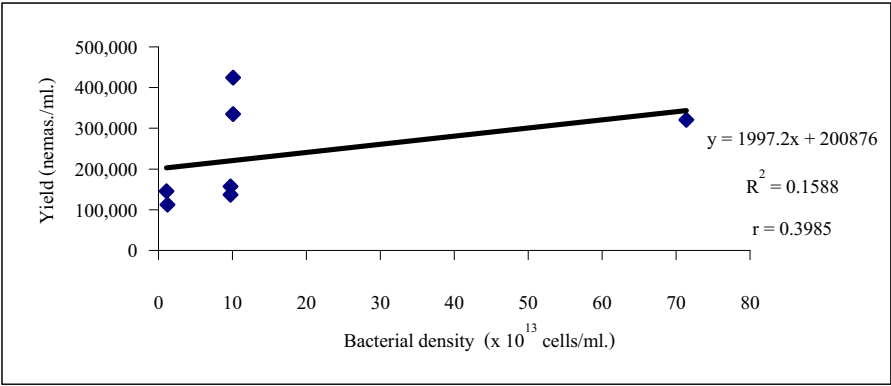


Figure 3. Correlation between the average airflow rate during 24 hours bacterial culturing (before nematode inoculation) and yield of nematode gained in 6 liter fermentor.

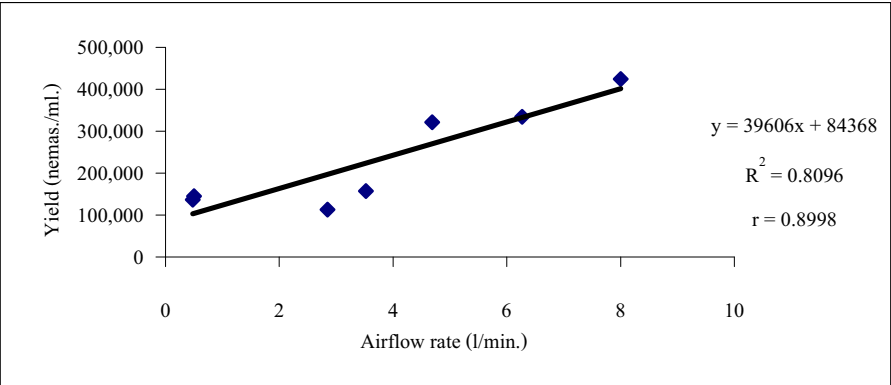


Figure 4. Correlation between the average minimum airflow rate (l/min.) supplied during bacterial culturing and the yield of nematode in fermentation process.

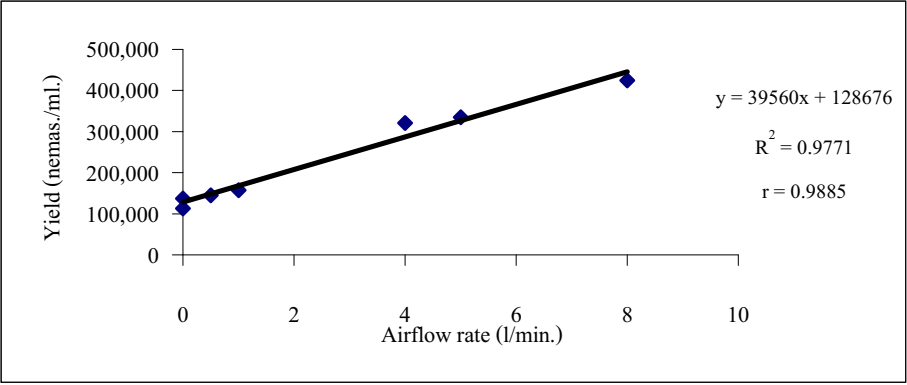
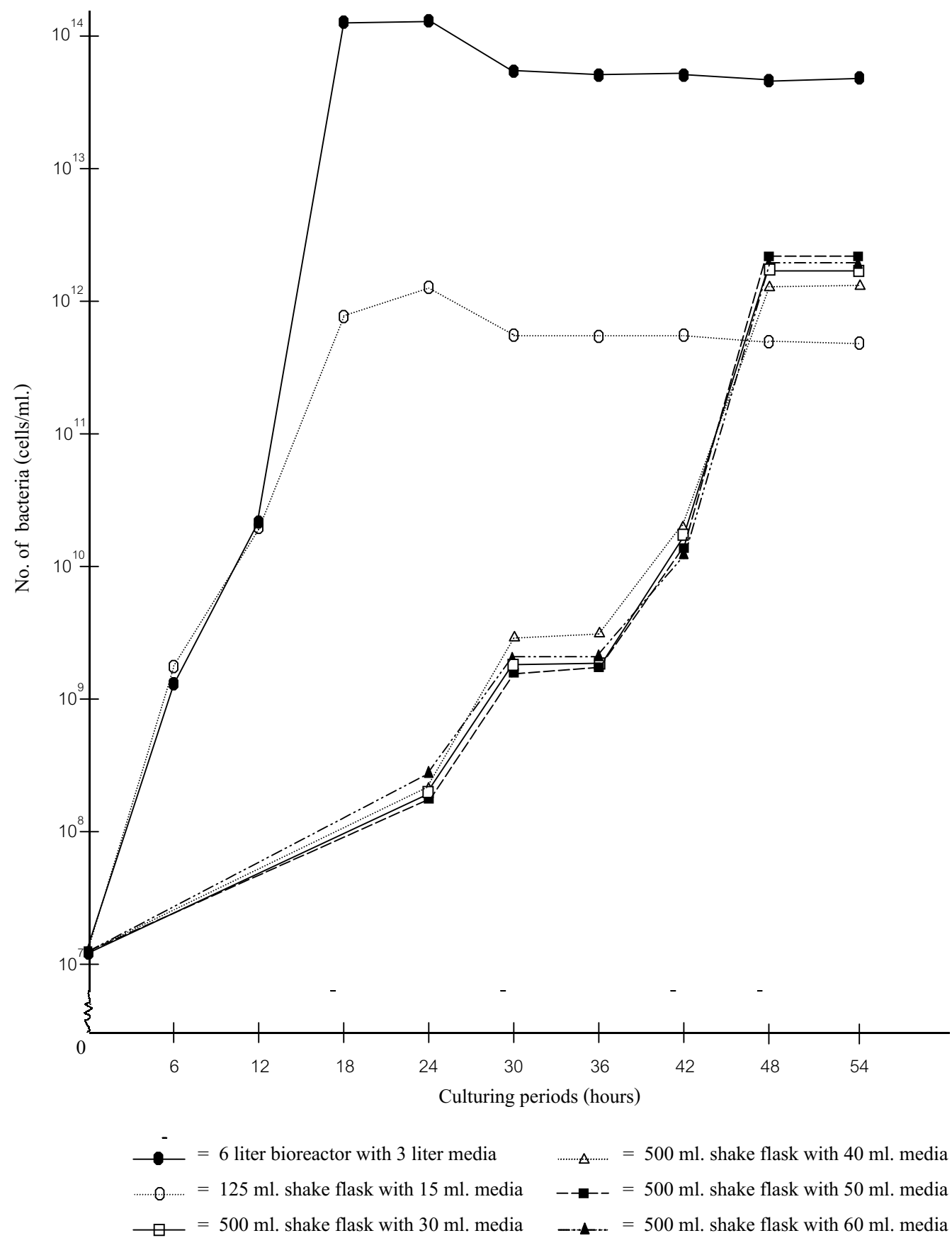


Figure 5. Comparative growth curves of symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophilus* cultured in 6 liter bioreactor, 125 and 500 ml. shake flasks.



3. พัฒนารูปแบบการแยกไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser)
ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว

Harvesting and Cleaning of the Entomopathogenic Nematode

Steinernema carpocapsae (Weiser) Reared by *In Vitro* Liquid Culture

บทคัดย่อ

ศึกษาเปรียบเทียบวิธีการแยกไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะ II ที่ผลิตด้วยอาหารเหลว โดยใช้อุปกรณ์ที่ประดิษฐ์ขึ้น 2 แบบ (ตามรูปที่ 1 และ 2) และดำเนินการทดลองดังนี้

วิธีการที่ 1 ทำการแยกไส้เดือนฝอยด้วยชุดกรองเขย่า แบบกรวยขนาดใหญ่

วิธีการที่ 2 ทำการแยกไส้เดือนฝอยด้วยชุดกรองแบบถาดตั้งเป็นชั้น (แต่ละชั้นจึงด้วยผ้ากรองละเอียด ขนาด 270 mesh)

โดยการเปรียบเทียบปริมาณไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่หลังจากผ่านกระบวนการแยกไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธี รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ได้จาก 2 วิธีนี้ด้วย ผลการทดลองพบว่า การแยกไส้เดือนฝอยตามวิธีการที่ 2 นั้นมีปริมาณไส้เดือนฝอยเหลืออยู่ 88.83% สูงกว่าวิธีการที่ 1 ซึ่งมี 64.58% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 2 เฉลี่ย 42.67% สูงกว่าไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 35.67% และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำนำ

หลังจากการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารจนครบ 1 วงจรชีวิต ได้ผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II มากกว่า 90% แล้ว ขั้นตอนต่อไปก็จะเป็นกระบวนการแยกล้างกรองไส้เดือนฝอยออกจากของเหลวซึ่งเป็นของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมา เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่จะทำให้ได้ผลิตไส้เดือนฝอยที่สะอาด ปราศจากสิ่งเจือปน สามารถเก็บรักษาได้นาน วิธีการแยกล้างที่เหมาะสมนั้นจะต้องมีการสูญหายของไส้เดือนฝอยน้อยที่สุด และไม่กระทบกระเทือนต่อประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย นอกจากนี้แบบวิธีการแยกล้างกรองไส้เดือนฝอยนั้นแตกต่างกันตามสภาพการเลี้ยง ดังนั้นจึงจำเป็นต้องศึกษาค้นประดิษฐ์เครื่องมือหรืออุปกรณ์แยกล้างกรองที่เหมาะสมสำหรับงานการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวแบบการค้าขึ้น

การทดลองนี้เป็นการเปรียบเทียบอุปกรณ์แยกล้างกรองที่ประดิษฐ์ขึ้น 2 แบบ คือ ชุดกรวยกรองขนาดใหญ่ และชุดกรวยแบบถาดตั้งเป็นชั้น เพื่อที่จะคัดเลือกแบบที่เหมาะสมที่สุดกับการแยกล้างกรองไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในสภาพอาหารเหลว ข้อมูลที่ได้สามารถที่จะนำไปใช้ในการปรับปรุงแก้ไขอุปกรณ์ให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น และจะเป็นต้นแบบของเทคโนโลยีการแยกล้างกรองไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวในอนาคตต่อไป



อุปกรณ์

1. ชุดแยกล้างกรองแบบกรวยกรองขนาดใหญ่ (รูปที่ 1) โดยด้านบนของเครื่องมีช่องกลม 3 ช่อง สำหรับวางตะแกรงกรองที่มีความละเอียดต่างๆ กัน ในขณะที่เครื่องทำงาน ส่วนบนนี้จะถูกเขย่าเพื่อให้การกรองเร็วขึ้น ส่วนด้านล่างมีถังรองรับส่วนที่ผ่านตะแกรงกรอง และสามารถนำมากรองซ้ำได้หลายๆ ครั้ง
2. ชุดแยกล้างกรองแบบถาดตั้งเป็นชั้น (รูปที่ 2) มีลักษณะเป็นถาดสแตนเลสสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 11.5 x 15.5 นิ้ว วางตั้งเป็นชั้นๆ แต่ละถาดจะมีผ้ากรองขนาด 270 mesh จึงครอบอยู่ด้านบน และมีท่อระบายน้ำออกทางด้านข้าง
3. ไข่เดือนฝอยที่เลี้ยงในอาหารเหลวครบ 1 วงจรชีวิต พัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ IJ ตั้งแต่ 90% ขึ้นไป พร้อมทั้งจะทำการเก็บผลผลิต
4. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ self-refilling syringe ตะแกรงกรองขนาด 60, 200, 270, 325, 500 mesh, บีกเกอร์พลาสติกขนาด 3 ลิตร, ถังน้ำพลาสติก, ผ้ากรองละเอียด, ตะแกรงรองผ้ากรองละเอียด, ขันพลาสติก, stirrer
5. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, petridish, beaker, cylinder
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ formalin 0.1%
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถาดหลุมทดสอบประสิทธิภาพ ถาดนับไข่เดือนฝอย กระบอกฉีดน้ำ ปากคีบ counter, autopipette

วิธีการ

1. ทดลองด้วยชุดแยกล้างกรองแบบกรวยกรองเขย่า (รูปที่ 1)

หลังจากเลี้ยงไข่เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวในขวดเขย่าได้ครบ 1 วงจรชีวิต ได้ปริมาณไข่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ มากกว่า 90% และของเหลวซึ่งส่วนใหญ่เป็นสิ่งขับถ่ายของไข่เดือนฝอย นำมาเทลงในบีกเกอร์ขนาด 3 ลิตร แล้วกวนให้ไข่เดือนฝอยกระจายสม่ำเสมอ ทำการสุ่มตัวอย่างของเหลวแล้วนับหาค่าเฉลี่ยจำนวนไข่เดือนฝอยในปริมาตร 1 มล. จากนั้นคำนวณหาปริมาณไข่เดือนฝอยทั้งหมดก่อนนำไปผ่านกระบวนการแยกล้างกรองต่อไป เติม formalin 0.1% ในของเหลวประมาณ $\frac{1}{2}$ ส่วนโดยปริมาตรของของเหลวทั้งหมดเพื่อลดความเหนียวหนืดลง แล้วนำของเหลวผ่านกระบวนการแยกล้างดังนี้

1.1 ทำการกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 60 mesh โดยค่อยๆ เทของเหลวที่เจือจางลงบนตะแกรงขณะที่เครื่องทำการเขย่า เมื่อเหลือตะกอนบนตะแกรงใช้น้ำฉีดล้างเบาๆ แล้วจึงนำตะกอนทิ้งไป

1.2 นำของเหลวที่ผ่านตะแกรงกรองตามหัวข้อ 1.1 มาทำการกรองด้วยตะแกรงกรองขนาด 200, 270, 325, 500 mesh ตามลำดับ แต่ละขั้นตอนของการกรองนั้นดำเนินการเช่นเดียวกับหัวข้อ 1.1 สำหรับการกรองขั้นสุดท้ายด้วยตะแกรงกรองขนาด 500 mesh ต้องทำการกรองซ้ำอีก 1 ครั้ง ก่อนที่จะนำตะกอนที่กรองได้ทิ้งไป

1.3 นำของเหลวที่ผ่านตะแกรงกรองขั้นสุดท้ายแล้วมาวางไว้นิ่งๆ ประมาณ 20 นาที เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน แล้วเทน้ำส่วนบนทิ้งไป เหลือตะกอนซึ่งเป็นไส้เดือนฝอย

1.4 ทำการนับจำนวนไส้เดือนฝอยทั้งหมดที่เหลืออยู่ (ตามวิธีการข้อ 1.) เพื่อนำไปผลิตเปอร์เซ็นต์การสูญหายของไส้เดือนฝอยหลังจากผ่านกระบวนการนี้แล้ว

1.5 ทำการเก็บไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่ในฟองน้ำโดยบรรจุลงในถุงพลาสติก นำไปเก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิ 48 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงตามหัวข้อที่ 3. ต่อไป

2. ทดลองด้วยชุดแยกล้างกรองแบบลาดตั้งเป็นชั้น

นำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ซึ่งพร้อมที่จะล้างกรองมาเทผ่านตะแกรงกรองขนาด 60 mesh ฉีดน้ำล้างตะกอนที่ค้างบนตะแกรงกรองเพื่อให้ไส้เดือนฝอยที่ค้างติดอยู่ผ่านลงข้างล่างแล้วนำตะกอนไปทิ้ง ทำการนับปริมาณไส้เดือนฝอยในของเหลวที่ผ่านตะแกรงกรองเช่นเดียวกับวิธีการตามข้อ 1. เพื่อทราบปริมาณไส้เดือนฝอยทั้งหมดที่มีอยู่ก่อนผ่านกระบวนการที่ 2 นี้ เติม formalin 0.1% ลงในของเหลวประมาณ $\frac{1}{2}$ ส่วนของของเหลวที่มีอยู่โดยปริมาตร แล้วนำของเหลวที่เจือจางผ่านกระบวนการแยกล้างตามขั้นตอนดังนี้

2.1 นำของเหลวมาวางไว้นิ่งๆ นานประมาณ 20 นาที เพื่อให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอน ค่อยๆ เทน้ำส่วนบนทิ้ง ทำซ้ำ 2 ครั้ง

2.2 นำตะกอนไส้เดือนฝอยที่ได้จากข้อ 2.1 มาเทลงบนผ้ากรองละเอียดขนาด 270 mesh ซึ่งขึงบนถาดล้างกรองเป็นเวลานาน 30 นาที ในช่วงนี้ไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ผ่านผ้ากรองลงไปยังข้างล่างของถาดซึ่งมีน้ำรองรับอยู่ ส่วนตะกอนที่หลงเหลืออยู่นั้นจะค้างติดบนผ้ากรอง

2.3 ใช้น้ำซึ่งมีไส้เดือนฝอยปนอยู่ออกมาจากถาด ทำการนับปริมาณไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่ทั้งหมดเพื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การสูญหาย

2.4 ทำการเก็บไส้เดือนฝอยในฟองน้ำแล้วบรรจุในถุงพลาสติก เก็บในห้องควบคุมอุณหภูมิ $7-10^{\circ}\text{C}$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปทดสอบประสิทธิภาพตามหัวข้อที่ 3. ต่อไป

3. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989) ดังนี้

- 3.1 เตรียมถาดหลุม 7 ถาด แต่ละถาดมี 24 หลุม แต่ละหลุมมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2 ซม. พร้อมฝาครอบสนิททุกถาด
- 3.2 ใส่กระดาษกรองที่กั้นหลุมๆละ 1 แผ่น
- 3.3 ใช้ไปเปตูดไส้เดือนฝอย 1 ตัว/น้ำ 30 ไมโครลิตร หยดลงในแต่ละหลุมของถาดที่เตรียมไว้ หลุมละ 1 ตัว
- 3.4 จากนั้นจับหนอนกินรังผึ้ง วัย 5 - 6 ใส่ในหลุมๆละ 1 ตัว แล้วปิดฝา
- 3.5 ทำการทดลองทั้งหมด 7 ถาด แต่ละถาดคิดเป็น 1 ซ้ำ นำถาดทั้งหมดเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงทำการตรวจนับหนอนที่ตายในแต่ละถาด คัดเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการเข้าทำลายแมลง โดยตัดข้อมูลของซ้ำหรือถาดที่มีปริมาณหนอนตายสูงสุดและต่ำสุดออก

การบันทึกข้อมูล

- ตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ก่อนและหลังกระบวนการแยกเลี้ยงกรองทั้ง 2 วิธีการ
- ตรวจนับปริมาณหนอนตายด้วยไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่ได้หลังจากผ่านการแยกเลี้ยงกรองทั้ง 2 วิธีการ

ผลการทดลอง

จาก Table 1. และ 2. จะเห็นได้ว่ากระบวนการแยกล้างกรองโดยชุดกรดกรองตั้งเป็นชั้น (วิธีการที่ 2) มีไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ในปริมาณที่สูงถึง 88.83% และมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 42.67% ส่วนวิธีการที่ 1 การใช้ชุดกรวยกรองเขี่ยนั้นปริมาณไส้เดือนฝอยเหลืออยู่เพียง 64.58% และมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 35.67% ข้อมูลทั้งสองวิธีการนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (χ^2 -test ; $p < 0.01$)

วิจารณ์ผลการทดลอง

การแยกล้างกรองโดยใช้ชุดกรวยกรองเขี่ยนั้นมีการสูญเสียผลผลิตไส้เดือนฝอยมากถึง 34.42% เนื่องจากการล้างกรองหลายขั้นตอนโดยผ่านตะแกรงกรองหลายขนาด ตั้งแต่การกรองที่หยาบจนถึงการกรองละเอียด การสูญเสียของไส้เดือนฝอยเกิดขึ้นทุกขั้นตอนหลักเลียงไม่ได้ เพราะเทคนิคในการกรองนั้นจะต้องเก็บส่วนที่ผ่านตะแกรงกรองไว้และทำการเทกรองกลับไปที่เดิมซ้ำหลายๆ ครั้ง นอกจากนี้ยังทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้บอบช้ำ การเก็บไส้เดือนฝอยที่ได้ในถังรองรับซึ่งมีน้ำมากและทิ้งไว้นานเพื่อรอการกรองแต่ละขั้นตอน ไส้เดือนฝอยตกตะกอนทับถมกันนาน อากาศไม่พอเพียงซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ไส้เดือนฝอยอ่อนแอ ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงต่ำ ส่วนการแยกล้างกรองโดยวิธีที่ 2 นั้น มีการใช้ตะแกรงกรองเพียงครั้งเดียวเพื่อทำการกรองเศษอาหารที่จับเป็นก้อนออกไปก่อน หลังจากเทใส่ผ้ากรองแล้วไส้เดือนฝอยจะเคลื่อนที่ลงในน้ำเอง ซึ่งเป็นพฤติกรรมธรรมชาติของไส้เดือนฝอย วิธีการนี้จึงไม่กระทบกระเทือนต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยและเกิดการสูญเสียน้อยกว่า ประหยัดน้ำ ประหยัดเวลา และพื้นที่ใช้สอย ฉะนั้นอุปกรณ์ของวิธีการที่ 2 นี้สามารถนำไปใช้แยกล้างกรองไส้เดือนฝอยต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบปริมาณไส้เดือนฝอยที่เหลืออยู่หลังจากผ่านกระบวนการแยกล้างทั้ง 2 วิธี รวมทั้งทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยนั้น ผลการทดลองพบว่าการแยกล้างตามวิธีที่ 2 คือทำการแยกล้างด้วยชุดกรองแบบถาดตั้งเป็นชั้น (แต่ละชั้นจึงด้วยผ้ากรองละเอียด ขนาด 270 mesh) มีปริมาณไส้เดือนฝอยเหลืออยู่ 88.83% สูงกว่าวิธีที่ 1 คือทำการแยกล้างด้วยชุดกรองเขี่ยแบบกรวยขนาดใหญ่ซึ่งมีปริมาณไส้เดือนฝอยเหลืออยู่เพียง 64.58% โดยแตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 2 เฉลี่ย 42.67% สูงกว่าไส้เดือนฝอยที่ได้จากวิธีการที่ 1 มีค่าเฉลี่ย 35.67% และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ

Table 1. The comparison of nematode numbers gained before and after harvesting by shaking funnel and standing tray sieving methods.

Funnel sieve (shaking)		Tray sieve (standing)		Chi-square
No. of nema ($\times 10^6$)	% of nema left	No. of nema ($\times 10^6$)	% of nema left	(χ^2)
before the process	after the process	before the process	after the process	df = 1
126.8	64.58	160.5	88.83	25.0 **

Table 2. The pathogenicity assessment* on *Galleria mellonella* of the nematode *Steinernema carpocapsae* (IJ) collected by the shake funnel sieve and standing tray seive.

Funnel sieve (shaking)		Tray sieve (standing)		Chi-square
No. treated	% dead	No. treated	% dead	(χ^2)
(<i>G. mellonella</i>)		(<i>G. mellonella</i>)		df = 1
600	35.67	600	42.67	5.90 **

* = The method utilizes a culture cell well with confines one infective *Steinernema carpocapsae* with one insect host and results infection within 48 hours (Miller, R.W. 1989).

** = highly significant different ($P < .01$)

4. ศึกษาอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย
ศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เก็บรักษาในฟองน้ำและในรูปผงโดย
ใช้ดิน Attapulgit

Study on Survival and Infectivity Rates of the Entomopathogenic Nematode
Steinernema carpocapsae (Weiser) Stored in Synthetic Sponge
and in Attapulgit Powder

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพการทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย
ระหว่างการเก็บรักษาในฟองน้ำสังเคราะห์และในรูปผงโดยใช้ดิน Attapulgit ที่อุณหภูมิ 6°ซ เป็น
เวลานาน 12 เดือน และศึกษาผลของระดับอุณหภูมิ 6°ซ, 25°ซ และ 30°ซ ที่มีผลต่อการเก็บรักษา
ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีดังกล่าว ได้ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการในกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทาง
ชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา ทำการเตรียมไส้เดือนฝอยอัตรา 4 ล้านตัวในน้ำ 10 มล. หยดใส่
ฟองน้ำชิ้นเล็กๆ น้ำหนักรวม 1.4 กรัมบรรจุในถุงพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้ว ปิดผนึกปากถุง ในรูปผง
นั้นผสมไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัวกับดิน Attapulgit 10 กรัม ความชื้น 40% ใส่ถุงพลาสติกเช่นกัน ปิด
ผนึกปากถุงพบว่า

ที่ 6°ซ หลังจากเก็บครบ 12 เดือนไส้เดือนฝอยที่เก็บในฟองน้ำและในรูปผงนั้น การรอด
ชีวิตและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน โดยในช่วง 4 เดือนแรกนั้น
ประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงอยู่ในระดับ 40% หลังจากนั้นจะเริ่มลดลง

สำหรับการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยที่เก็บในฟองน้ำและในรูปผง
ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆนั้น พบว่าการเก็บที่อุณหภูมิ 6°ซ หลังจากการเก็บรักษา 6 เดือนแล้ว ไส้เดือน
ฝอยยังมีชีวิตรอดเป็นเปอร์เซ็นต์สูง (86-95%) ของทั้ง 2 วิธีการ แต่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25°ซ
อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีการใกล้เคียงกันในช่วง 6 สัปดาห์แรก คืออัตราการรอด
อยู่ระหว่าง 85-87% หลังจากนั้นเริ่มลดลง และในสัปดาห์ที่ 12 อัตราการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 47-
51% ส่วนที่สภาพอุณหภูมิ 30°ซ การเก็บในฟองน้ำอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยในช่วง 2
สัปดาห์แรก เหลือเพียง 46% หลังจากนั้นลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 6 ไส้เดือนฝอยตายหมด
แต่การเก็บในดิน Attapulgit ในช่วง 2 สัปดาห์แรกอัตราการรอดชีวิตสูงประมาณ 80% พอถึงสัปดาห์ที่
12 ลดลงเหลือ 12%

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์เล็กๆ ซึ่งบรรจุไว้ในถุงพลาสติก และปิดปากถุงเก็บไว้ที่อุณหภูมิตู้เย็น (อุณหภูมิ 6 °C) เป็นวิธีการที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน ซึ่งมีทั้งข้อดีและข้อเสีย ข้อดีคือ ฟองน้ำมีรูพรุน การถ่ายเทอากาศดี น้ำหนักเบา ซ่อนทับกันได้ไม่แน่น ไส้เดือนฝอยที่อาศัยในรูพรุนมีโอกาสได้รับออกซิเจนกันอย่างทั่วถึง ซึ่งการเก็บในฟองน้ำนั้นไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดอยู่ได้และยังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง ส่วนข้อเสียเปรียบอยู่ที่วิธีการใช้ซึ่งจะต้องนำชั้นฟองน้ำที่มีไส้เดือนฝอยอาศัยอยู่ มาบีบในน้ำหลายๆ ครั้งเพื่อให้ไส้เดือนฝอยหลุดออกมาอยู่ในน้ำ แล้วนำไปฉีดพ่น ซึ่งอาจไม่สะดวกและไม่คุ้นเคยสำหรับเกษตรกรที่เคยชินกับการใช้สารเคมี ฉะนั้นในการทดลองนี้จึงได้มีการหาวัสดุที่เหมาะสมมาใช้เก็บรักษาไส้เดือนฝอยแทนฟองน้ำ โดยวัสดุที่ใช้เก็บรักษาในรูปผงนั้นควรมีลักษณะเบา โปร่ง เมื่อมีความชื้น ไม่เกาะแน่น อุณหภูมิชื้นได้ดี ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ละลายน้ำได้ดี เมื่อเกษตรกรนำไปใช้สามารถนำไปผสมน้ำฉีดพ่นโดยใช้เครื่องพ่นสารเคมีทั่วๆ ไปได้ และมีประสิทธิภาพดีเหมือนกับการเก็บในฟองน้ำ

จากการดำเนินงานที่ผ่านมาได้มีการนำวัสดุต่างๆ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นดินชนิดต่างๆ คือ ดินเหนียว (clay), ดินขาว (white clay), Pumice, Diatomaceous earth, Perlite และ Attapulgate นำมาใช้โดยตรงและนำมาผสมกันเป็นสูตรต่างๆ ประมาณ 20 สูตร ในการทดลองเก็บรักษาในรูปผง (powder) โดยเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บในฟองน้ำ จากผลการทดลองในเบื้องต้นซึ่งเป็นการดำเนินการในช่วงระยะเวลาสั้นๆ 3 เดือน จึงได้ทำการคัดเลือก ดิน Attapulgate ซึ่งให้ผลการทดลองดีที่สุด ฉะนั้นวัตถุประสงค์ของงานทดลองนี้ก็เพื่อเปรียบเทียบอัตราการรอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพในการทำลายแมลงระหว่างการเก็บในฟองน้ำและการเก็บในรูปผง โดยใช้ดิน Attapulgate ในช่วงระยะเวลานาน 1 ปีที่อุณหภูมิ 6 °C นอกจากนี้ยังศึกษาถึงผลของอุณหภูมิระดับต่างๆ ต่ออัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยด้วย 2 วิธีการดังกล่าว

อุปกรณ์

อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์, เครื่องชั่งละเอียด, ตู้อบแห้ง, counter, pH meter, auto pipette, tip, stirrer, magnetic bar, Moisture Analyzer
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ
3. ฟองน้ำสังเคราะห์ (ตัดเป็นชิ้นขนาดลูกเต๋า)
4. น้ำผสม formalin 0.1%
5. ไข่เห็ดฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
6. ดิน Attapulgate
7. อื่นๆ ได้แก่ บีกเกอร์พลาสติกขนาด 3000 มล., ถังพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้ว และ 8 x 12 นิ้ว, กระจกนิตยพลาสติกขนาด 10 มล., เครื่องปิดผนึกถังพลาสติก

วิธีการ

1. การเตรียมไข่เห็ดฝอยสำหรับการทดลอง

นำไข่เห็ดฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะ IJ ที่ผลิตจากอาหารเหลว Tsb₃ หลังจากแยกล้างสะอาดแล้ว นำมาใส่ในน้ำผสมฟอร์มาลิน 0.1% เพื่อทำความสะอาดอีกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ 15 นาที เมื่อไข่เห็ดฝอยตกตะกอน เทน้ำส่วนบนทิ้งเติมน้ำกลั่นที่อบฆ่าเชื้อแล้วลงไปแทน นำไปนับอัตราความหนาแน่นของไข่เห็ดฝอยโดยวิธี dilution counting แล้วนำไปทดลอง

2. การทดลองการเก็บรักษาไข่เห็ดฝอยในฟองน้ำสังเคราะห์

นำฟองน้ำสังเคราะห์ตัดขนาด 1 ลบ.ซม. ไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที จากนั้นนำมาใส่ถังขนาด 4 x 6 นิ้ว ถังละประมาณ 22 ก้อน (หนัก 1.4 กรัม) หยดไข่เห็ดฝอยในอัตรา 4 ล้านตัวในน้ำ 10 มล.ลงในถัง ปิดปากถังให้สนิท แล้วนำไปทดลอง

3. การทดลองการเก็บรักษาไข่เห็ดฝอยในรูปผง

- นำดิน Attapulgate ที่ใช้ในการทดลองมาบดให้ละเอียดแล้วนำไปใส่ถาดที่สะอาด อบที่อุณหภูมิ 60-80°ซ จนกระทั่งมีความชื้นน้อยที่สุดใกล้เคียง 0%

- ตักดิน Attapulgate ใส่ถังขนาด 8 x 12 นิ้ว ถังละ 60 กรัม

- ใส่ไข่เห็ดฝอยในอัตรา 40 ล้านตัวในน้ำ 40 มล.ลงในถัง เขย่าให้เข้ากัน

- แบ่งส่วนผสมใส่ถังพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้ว ถังละ 10 กรัม นำไปปิดปากถังให้สนิท จากนั้นนำไปทดลอง

4. สำหรับการทดลองเปรียบเทียบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในฟองน้ำสังเคราะห์ และในรูปผง (powder) โดยใช้ Attapulgate ที่อุณหภูมิ 6 °ซ

ในแต่ละวิธีการนั้นทำการทดลอง 3 ซ้ำ (3 ถัง) โดยมีการตรวจนับทุกๆเดือนเป็นเวลา 12 เดือน ปริมาณทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองแต่ละวิธี 36 ถัง นำไปเก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (6 °ซ)

5. สำหรับการทดลองเปรียบเทียบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในฟองน้ำสังเคราะห์ และในรูปผง (powder) โดยใช้ Attapulgate ที่อุณหภูมิ 6 °ซ, 25 °ซ และ 30 °ซ

ในแต่ละระดับอุณหภูมินั้น แต่ละวิธีการทดลองมี 3 ซ้ำ (3 ถัง) เช่นกัน ในระดับอุณหภูมิ 6 °ซ นั้นทำการตรวจนับทุกๆ 1 เดือนเป็นเวลา 6 เดือน ปริมาณทั้งหมดที่ใช้ในการทดลองแต่ละวิธีการ 18 ถัง ในระดับอุณหภูมิ 25 °ซ ทำการตรวจนับทุกๆ 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 3 เดือน ฉะนั้นแต่ละวิธีการจะต้องเตรียมทั้งหมด 18 ถัง ส่วนในระดับอุณหภูมิที่ 30 °ซ ทำการตรวจนับทุกๆ สัปดาห์เป็นเวลา 6 สัปดาห์ แต่ละวิธีการจะต้องใช้ 18 ถัง เช่นกัน

6. วิธีการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอด

วิธีการเก็บในดิน Attapulgate

นำไส้เดือนฝอย 3 ถัง ตักปากถังออก ตักแบ่งดิน 5 กรัมจากแต่ละถัง (ซ้ำ) นำไปวัดความชื้นด้วยเครื่อง Moisture analyzer ส่วนที่เหลือนำไปละลายในน้ำกลั่น 500 มล. คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน นำไปวัด pH และตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตและตาย โดยสุ่มนับ 3 ครั้ง ด้วยวิธี dilution counting และหาค่าเฉลี่ย (แต่ละซ้ำ)

วิธีการเก็บในฟองน้ำสังเคราะห์

เทฟองน้ำในแต่ละถังลงในน้ำ 500 มล. ทำการบีบฟองน้ำให้ไส้เดือนฝอยออกมาอยู่ในน้ำทั้งหมด นำไปวัด pH และตรวจนับตัวที่มีชีวิต และที่ตายโดยวิธี diluting counting แต่ละถังสุ่มนับ 3 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ย (แต่ละซ้ำ)

7. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (วิธีของ Miller 1989)
ดังนี้

มีวิธีการเช่นเดียวกับวิธีการในหัวข้อการวิจัยที่ 3. เรื่องพัฒนาวิธีการแยกเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลว (ข้อ 3.)

■ การทดลอง

ตารางที่ 1. การรอดชีวิตและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในฟองน้ำและในรูปผงโดยใช้ดิน Attapulgit 100% ที่อุณหภูมิ 6 °ซ เป็นเวลา 1 ปี นั้นลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน แต่อย่างไรก็ตามในช่วง 4 เดือนแรกนั้น ประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงเปลี่ยนแปลงน้อยมาก มีค่าใกล้เคียง 40% ซึ่งถือว่าเป็นระดับขั้นต่ำสุดที่ใช้สำหรับวัดคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้แต่ละครั้ง ตั้งแต่เดือนที่ 5 เป็นต้นไป เปอร์เซ็นต์ของ infectivity นั้นลดลงต่ำกว่า 40% แสดงว่าประสิทธิภาพการทำลายแมลงต่ำกว่ามาตรฐานที่ตั้งไว้ ฉะนั้นในระดับอุณหภูมิ 6 °ซ การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีการนั้นไม่ควรนานเกิน 4 เดือน ก่อนที่จะนำไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บไส้เดือนฝอยในรูปผงโดยใช้ Attapulgit แทนการเก็บในฟองน้ำได้

สำหรับการเปรียบเทียบอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยที่เก็บในรูปฟองน้ำ และในรูปผงที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ นั้น

จากตารางที่ 2. การเก็บในอุณหภูมิ 6 °ซ เปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีการนั้น ในช่วงการตรวจนับทุกๆ เดือน เป็นระยะเวลา 6 เดือน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (χ^2 - test) อัตราการรอดชีวิตหลังจากเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน ยังอยู่ในอัตราที่สูง (86-95%) การเปลี่ยนแปลง pH ของทั้ง 2 วิธีการเป็นไปในทางเดียวกันอยู่ในช่วง 7.0-7.6 ความชื้นของวิธีการเก็บในรูปผงอยู่ระหว่าง 35-36.2% ซึ่งลดลงประมาณ 1.2% ผลการทดลองนี้เป็นการยืนยันถึงการเก็บในดิน Attapulgit ได้ดีเท่าเทียมกับการเก็บในฟองน้ำ

การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 25 °ซ (ตารางที่ 3.) มีผลต่ออัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีการใกล้เคียงกัน ในช่วง 6 สัปดาห์แรกมีการรอดชีวิตสูงระหว่าง 85-87% หลังจากนั้นจะลดลงในอัตราที่สูงในสัปดาห์ที่ 12 ไส้เดือนฝอยรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 47-51% ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH ของทั้ง 2 วิธีการอยู่ในช่วง 7.3-7.8 ซึ่งสูงกว่าการเก็บในอุณหภูมิ 6 °ซ ความชื้นในรูปผงนั้นลดลงประมาณ 8% ในเวลา 12 สัปดาห์ ฉะนั้นการเก็บไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธีการนี้ที่ระดับอุณหภูมิ 25 °ซ ไม่ควรนานเกิน 6 สัปดาห์ และก่อนที่จะนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชจะต้องทดสอบประสิทธิภาพเสียก่อน

จากตารางที่ 4. ในสภาพอุณหภูมิ 30 °ซ จะเห็นความแตกต่างชัดเจนทางสถิติ (χ^2 -test) การเก็บรักษาในฟองน้ำอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยในช่วง 2 สัปดาห์ แรกเหลือเพียง 46% หลังจากนั้นจะลดลงอย่างรวดเร็วในสัปดาห์ที่ 6 ไส้เดือนฝอยตายหมด ส่วนการเก็บใน Attapulgit ในช่วง 2 สัปดาห์แรก อัตราการรอดชีวิตสูง ประมาณ 80% ในสัปดาห์ที่ 12 ลดเหลือ 12% pH ในการเก็บรักษาด้วยฟองน้ำอยู่ช่วง 7.4-8.3 ซึ่งสูงกว่าในการเก็บในรูปผงซึ่งอยู่ในช่วง 7.4-7.8 ส่วนความชื้นในรูปผงนั้นลดลงประมาณ 7% ในช่วง 6 สัปดาห์ซึ่งเร็วกว่าในการเก็บที่ 25 °ซ ฉะนั้นใน

๑๕ นี้การเก็บไส้เดือนฝอยในรูปผงโดยใช้ Attapulgate จะเหมาะสมกว่า และควรเก็บไม่เกิน 2 สัปดาห์เช่นกัน และก่อนนำไปใช้ในสภาพธรรมชาติจะต้องทดสอบประสิทธิภาพเสียก่อน

ในสภาพที่มีอุณหภูมิสูง 25-30๑๕ ไส้เดือนฝอยจะมีการเคลื่อนไหวตลอดเวลา ขบวนการ metabolism สูง ไขมันหรืออาหารที่สะสมไว้ในตัวจะถูกนำไปใช้หมดอย่างรวดเร็ว ของเสียจะถูกขับถ่ายออกมามาก จึงเป็นสาเหตุทำให้อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยต่ำ ยิ่งในสภาพอุณหภูมิสูง (30๑๕) นั้น pH ที่วัดได้จะสูงขึ้นตามระยะเวลาการเก็บ แสดงว่ามีของเสียถูกขับถ่ายออกมามาก การเก็บใน Attapulgate เหมาะสมกว่าเนื่องจากดินชนิดนี้สามารถดูดซับของเสียที่ไส้เดือนฝอยขับถ่ายออกมา และรักษาระดับ pH ไม่ให้สูงขึ้นอย่างรวดเร็ว จึงเป็นอันตรายต่อไส้เดือนฝอยน้อยลงไม่เหมือนกับการเก็บในฟองน้ำ ของเสียนั้นจะละลายอยู่ในน้ำซึ่งไส้เดือนฝอยอาศัยอยู่ ทำให้เกิดเป็นพิษส่งผลให้มีอัตราการตายของไส้เดือนฝอยสูง

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในฟองน้ำสังเคราะห์และในรูปผงดิน Attapulgate ที่อุณหภูมิ 6๑๕ เป็นเวลานาน 1 ปี พบว่าไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาทั้ง 2 วิธีการมีอัตราการรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงไม่แตกต่างกัน หลังจากครบ 12 เดือน การเก็บในฟองน้ำ มีอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงลดลงเหลือ 83.6% และ 30.8% ตามลำดับ ส่วนการเก็บในรูปผงลดลงเหลือ 79.5% และ 29.0% ตามลำดับในช่วง 4 เดือนแรกประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงยังอยู่ในระดับ 40% หลังจากนั้นลดลง สำหรับการเปรียบเทียบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยทั้ง 2 วิธี ในสภาพอุณหภูมิ 6๑๕, 25๑๕ และ 30๑๕ นั้น ในสภาพอุณหภูมิ 6๑๕ อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยในการเก็บรักษาทั้ง 2 วิธีการในช่วง 6 เดือนสูงถึง 86-95% ในระดับอุณหภูมิ 25๑๕ ในช่วง 6 อาทิตย์แรกมีอัตราการรอดชีวิตของทั้ง 2 วิธีการเก็บรักษาสูงกว่า 85% ในอุณหภูมิ 30๑๕ การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในรูปผงนั้นในช่วง 2 สัปดาห์แรกมีอัตราการรอดชีวิตประมาณ 80% ส่วนการเก็บในรูปฟองน้ำมีอัตราการรอดต่ำกว่า 50%

Table 1. Comparison survival and infectivity of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* stored in crumbed synthetic sponge and Attapulgate powder at 6 °C.

Periods of Nematode storage (month)	Formulations			
	Synthetic sponge		Attapulgate 100%	
	%Survival	%Infectivity	%Survival	%Infectivity
1	96.68	40.80	95.54	40.10
2	96.49	40.30	94.71	40.80
3	93.11	40.50	92.10	39.20
4	91.53	39.50	90.74	39.80
5	88.34	34.30	89.80	33.00
6	86.34	34.00	91.58	32.50
7	86.40	33.30	89.05	32.50
8	84.95	33.30	88.76	31.80
9	85.28	32.50	83.12	30.80
10	82.16	31.70	84.95	31.70
11	82.16	30.80	80.06	30.00
12	83.55	30.80	79.50	29.00

Table 2. Survival, pH and percent of humidity of *S. carpocapsae* stored in sponge and Attapulgit 100% at 6°C.

Storage period (month)	Sponge			Attapulgit 100%			Chi-square (χ^2) (survival)
	% survival	pH	% humidity	% survival	pH	% humidity	
1	97.26	7.16	-	90.00	7.26	36.19	1.109(P=0.2923)
2	96.00	7.23	-	87.10	7.28	35.62	1.560(P=0.2116)
3	94.87	7.29	-	86.67	7.74	36.12	1.591(P=0.2072)
4	94.59	7.23	-	86.36	7.40	36.10	1.466(P=0.2260)
5	94.59	7.04	-	86.84	7.31	35.78	1.128(P=0.2883)
6	94.67	7.33	-	86.84	7.54	35.51	1.174(P=0.2785)

Table 3. Survival, pH and percent of humidity of *S. carpocapsae* stored in sponge and Attapulgit 100% at 25°C.

Storage period (week)	Sponge			Attapulgit 100%			Chi-square (χ^2) (survival)
	% survival	pH	% humidity	% survival	pH	% humidity	
2	94.44	7.37	-	91.67	7.31	38.07	0.019(P=0.8901)
4	87.10	7.56	-	87.10	7.36	36.64	0.108(P=0.7428)
6	86.89	7.48	-	85.71	7.44	35.51	0.034(P=0.8540)
8	63.08	7.80	-	69.23	7.41	33.00	0.098(P=0.7547)
10	62.86	7.80	-	65.00	7.52	32.67	0.008(P=0.9301)
12	50.75	7.81	-	47.37	7.52	30.73	0.000(P=1.0000)

Table 4. Survival, pH and percent of humidity of *S. carpocapsae* stored in sponge and Attapulgit 100% at 30°C.

Storage period (week)	Sponge			Attapulgit 100%			Chi-square (χ^2) (survival)
	% survival	pH	% humidity	% survival	pH	% humidity	
1	46.48	7.44	-	80.00	7.39	38.07	7.101* (P<0.05)
2	45.83	7.50	-	79.17	7.42	36.36	6.769* (P<0.05)
3	36.84	8.05	-	65.00	7.57	34.52	4.044* (P<0.05)
4	33.82	8.17	-	52.63	7.65	33.61	1.504(P=0.2201)
5	1.56	8.26	-	40.00	7.79	32.77	19.687* (P<0.05)
6	0.00	8.30	-	11.76	7.82	31.16	3.608(P=0.0575)

N = total numbers of nematode counted

* = significantly different

5. ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ด้วยวิธีการต่างๆ

Production Cost of the Entomopathogenic Nematode

Steinernema carpocapsae (Weiser) Cultured by Different Methods

บทคัดย่อ

ทำการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ทั้ง 4 วิธีการ โดยใช้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาและพัฒนาในห้องปฏิบัติการกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กำหนดศักยภาพของการผลิตไส้เดือนฝอยในโรงงานต้นแบบ (pilot plant) ด้วยการใช้อาหารเหลวในระดับขวดเขย่า (shake flask) เป็นเกณฑ์ ซึ่งผลิตได้ 8,000 ชอง (1 ชองมีไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัว) ใช้ระยะเวลา 1 เดือน โดยมีต้นทุนเฉลี่ย 6.29 บาท/ชอง สำหรับการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*) ซึ่งเป็นอาหารตามธรรมชาติของไส้เดือนฝอย ต้องใช้เวลาถึง 8 เดือน ในการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ 8,000 ชอง และมีต้นทุนการผลิตเฉลี่ย 41.50 บาท/ชอง ส่วนการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (อาหารสุนัขผสมฟองน้ำ) ใช้เวลา 3 เดือน และต้นทุนการผลิตเฉลี่ย 16.88 บาท/ชอง และจากข้อมูลการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวในถังหมักขนาด 6 ลิตร สามารถผลิตไส้เดือนฝอยได้เฉลี่ย 300,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ฉะนั้นถ้าขยายระดับการเลี้ยงในถังหมักเป็น 100 ลิตร ต้นทุนการผลิตจะลดลงเหลือ 5.62 บาท/ชอง โดยใช้เวลา 1 เดือน ในการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ชอง

ก่อนที่จะดำเนินการวิจัยโครงการพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในเชิงธุรกิจ แรกเริ่มได้ศึกษาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ต่อมาพัฒนาวิธีการเลี้ยงเป็นการให้อาหารเทียม (*In Vitro* culture) แบบแข็งกึ่งเหลว (Semi-solid medium) และได้มีภาคเอกชนรับเทคโนโลยีนี้ไปทำการผลิตเชิงพาณิชย์ แต่ต้องประสบกับต้นทุนการผลิตค่อนข้างสูง ราคาจำหน่ายสูงเกินไปทำให้เกษตรกรไม่สามารถที่จะซื้อไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ วัตถุประสงค์หลักของโครงการวิจัยนี้เพื่อที่จะลดต้นทุนการผลิตให้ต่ำกว่าต้นทุนของวิธีการดังกล่าวมาแล้วประมาณ 50% ซึ่งเกษตรกรสามารถที่จะนำไปใช้แทนสารเคมีที่ใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในปัจจุบัน หลังจากโครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาเทคโนโลยีการผลิตด้วยอาหารเหลว (liquid culture) สิ้นสุดลงแล้ว จำเป็นต้องมีการประเมินเปรียบเทียบต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยวิธีการต่างๆ เพื่อแสดงให้เห็นว่าผลงานวิจัยนี้ได้บรรลุถึงเป้าหมายที่ได้วางไว้

๕.๒ ในการเปรียบเทียบต้นทุนการผลิต

การคำนวณต้นทุนในการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยวิธีการต่างๆ นั้นได้กำหนดเกณฑ์ไว้ดังนี้

- ก. กำหนดปริมาณการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ของทุกวิธีการไว้ที่ 8,000 ชอง (1 ชอง = 4 ล้านตัว) ซึ่งเป็นปริมาณสูงสุดที่ผลิตได้ตามศักยภาพของโรงงานต้นแบบ (pilot plant) ในระยะเวลา 1 เดือน โดยใช้วิธีการเลี้ยงด้วยอาหารเหลวในขวดเขย่า (shake flask)
- ข. ต้นทุนการผลิตนั้นประกอบด้วย
 - ต้นทุนอาหารที่ใช้เลี้ยง
 - ต้นทุนการเลี้ยงแมลง (สำหรับวิธีการผลิตด้วยแมลงอาศัย)
 - ต้นทุนวัสดุที่ใช้บรรจุไส้เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์
 - ต้นทุนที่เป็นแรงงาน อัตราค่าจ้างแรงงานนั้นใช้ข้อมูลของอัตราจ้างของโรงงานต้นแบบ ส่วนปริมาณงานที่ทำได้นั้นจะเป็นข้อมูลจากห้องปฏิบัติการและโรงงานต้นแบบ
- ค. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ ประกอบด้วย ค่าสาธารณูปโภค ค่าเสื่อมราคาของอุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ซึ่งคิดเป็น 60% ของต้นทุนรวมในข้อ ข.

5.1 ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัยโดยใช้หนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* วัย 5 – 6

ก. ความสามารถในการผลิตไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัย

การผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง ต้องจะมีไส้เดือนฝอย	=	32,000	ล้านตัว
หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ผลิตไส้เดือนฝอยได้เฉลี่ย	=	100,000	ตัว
ในการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง ต้องใช้หนอนทั้งหมด	=	320,000	ตัว
ตามสภาพห้องปฏิบัติการของกองกัญและสัตววิทยา			
สามารถผลิตหนอนกินรังผึ้งได้เฉลี่ย	=	40,000	ตัว/เดือน

ข. ต้นทุนอาหาร(หนอน) และวัสดุบรรจุไส้เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์

ต้นทุนหนอนกินรังผึ้ง 320,000 ตัว	=	320,000 x 0.36	=	115,200	บาท (ภาคผนวก)
ต้นทุนวัสดุบรรจุไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง	=	8,000 x 0.4	=	3,200	บาท
รวม			=	118,400	บาท

ค. ต้นทุนแรงงาน

แรงงานวุฒิ ปวส. 1 คน อัตราจ้าง (รวมค่าล่วงเวลา)		6,140	บาท/เดือน
คนงานผู้ช่วย 1 คน อัตราจ้าง		5,000	บาท/เดือน
รวม	=	11,140	บาท/เดือน
ความสามารถในการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง ใช้เวลา 8 เดือน			
ดังนั้นต้นทุนแรงงาน	=	89,120	บาท

ง. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

คิด 60% ของต้นทุนอาหาร + แรงงาน (ข + ค)	=	$\frac{207,520 \times 60}{100}$	
	=	124,512	บาท
รวมต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง (ข + ค + ง)	=	332,032	บาท
ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากแมลงอาศัย เฉลี่ยของละ	=	41.50	บาท

5.2 ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (อาหารสุนัข + ฟองน้ำสังเคราะห์)

ก. ความสามารถในการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว

การผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง มีไส้เดือนฝอย	=	32,000	ล้านตัว
อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว 1 ถุง ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยถุงละ	=	5	ล้านตัว
ฉะนั้นต้องเตรียมอาหารจำนวน	=	6,400	ถุง

ข. ต้นทุนอาหารและวัสดุบรรจุไส้เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์

ต้นทุนอาหารสุนัข + ฟองน้ำสังเคราะห์ 6,400 ถุง เป็นเงิน	=	12,224	บาท
ต้นทุนวัสดุสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์ 8,000 ซอง	=	3,200	บาท
รวม	=	15,424	บาท

ค. ต้นทุนแรงงาน

นักวิชาการวุฒิปริญญาตรี 1 คน อัตราจ้าง	=	8,000	บาท/เดือน
คนงาน 3 คน อัตราจ้าง 5,000 บาท/เดือน	=	15,000	บาท/เดือน
รวมต้นทุนแรงงาน	=	23,000	บาท/เดือน
ผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว 8,000 ซอง ต้องใช้เวลา 3 เดือน			
ดังนั้นต้นทุนแรงงาน	=	69,000	บาท/เดือน

ง. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

คิด 60% ของต้นทุนอาหาร + แรงงาน (ข + ค)	=	$\frac{84,424 \times 60}{100}$	
	=	50,654.40	บาท
รวมต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง (ข + ค + ง)	=	135,078.40	บาท
ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวเฉลี่ยซองละ		16.88	บาท

5.3 ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือ (Tsb₃) ระดับขวดเขย่า

ก. ความสามารถในการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือในระดับขวดเขย่า

การผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ชอง จะมีไส้เดือนฝอย	=	32,000	ล้านตัว
อาหารเหลือ Tsb ₃ 1 ขวด (อาหาร 60 มล.) จะได้ผลผลิตเฉลี่ย	=	18	ล้านตัว
ตามสภาพห้องปฏิบัติการของกองกัญและสัตววิทยาสามารถเตรียมอาหารเหลือได้เดือนละ 1,778 ขวด (ปริมาณ 106,680 มล.) ซึ่งได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย	=	32,004	ล้านตัว

ข. ต้นทุนอาหารเหลือ(Tsb₃) และวัสดุบรรจุไส้เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์

ต้นทุนอาหารเหลือ 1,778 ขวด (ปริมาณ 106,680 มล.)	=	5,291.33	บาท
ต้นทุนวัสดุสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์ 8,000 ชอง	=	3,200	บาท
รวมต้นทุนอาหารและวัสดุบรรจุผลิตภัณฑ์	=	8,491.33	บาท

ค. ต้นทุนแรงงาน

นักวิชาการวุฒิปริญญาตรี 1 คน อัตราจ้าง	=	8,000	บาท/เดือน
คนงาน 3 คน อัตราจ้าง 5,000 บาท/เดือน	=	15,000	บาท/เดือน
รวมต้นทุนแรงงาน	=	23,000	บาท/เดือน

ง. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

คิด 60% ของต้นทุนอาหาร + แรงงาน (ข + ค)	=	$\frac{31,491.33 \times 60}{100}$	
	=	18,894.80	บาท
รวมต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ชอง (ข + ค + ง)	=	50,386.13	บาท
ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือเฉลี่ยของละ		6.29	บาท

5.4 ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือ (Tsb₃) ระดับถังหมัก (fermentor) ขนาด 100 ลิตร

ก. ความสามารถในการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือ ในระดับถังหมัก

จากข้อมูลการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในถังหมักขนาด 6 ลิตร ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 300,000 ตัว/มล. ฉะนั้นถ้าใช้ถังหมักขนาด 100 ลิตร โดยเตรียมอาหารได้ครั้งละไม่ต่ำกว่า 53,400 มล.

ซึ่งจะได้ผลผลิตเฉลี่ย 16,020 ล้านตัว ใน 1 เดือน สามารถผลิตไส้เดือนฝอยในถังหมักได้ 2 ครั้ง (cycle)

สามารถผลิตไส้เดือนฝอยได้ไม่ต่ำกว่า 32,000 ล้านตัวหรือเท่ากับ 8,000 ซอง

ข. ต้นทุนอาหาร Tsb₃ และวัสดุบรรจุไส้เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์

ต้นทุนอาหารเหลือใส่ในถังหมักขนาด 100 ลิตร 2 ชุด ใช้อาหารเหลือ 106,800 มิลลิลิตร

= 4,912.80 บาท

ต้นทุนวัสดุสำหรับบรรจุผลิตภัณฑ์ 8,000 ซอง

= 3,200 บาท

รวม

= 8,112.80 บาท

ค. ต้นทุนแรงงาน

นักวิชาการวุฒิปริญญาตรี 1 คน อัตราจ้าง

= 10,000 บาท/เดือน

คนงาน 2 คน อัตราจ้าง 5,000 บาท/เดือน

= 10,000 บาท/เดือน

รวมต้นทุนแรงงาน

= 20,000 บาท/เดือน

ง. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

คิด 60% ของต้นทุนอาหาร + แรงงาน (ข + ค)

= $\frac{28,112.80 \times 60}{100}$

= 16,867.68 บาท

รวมต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย 8,000 ซอง (ข + ค + ง)

= 44,980.48 บาท

ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลือในถังหมักเฉลี่ยซองละ

5.62 บาท

ผลการเปรียบเทียบและวิจารณ์

ใน Table1. จะเห็นได้ว่า การผลิตไส้เดือนฝอยด้วยแมลงอาศัยนั้นมีต้นทุนสูงสุด คือ 41.50 บาท/ชอง รองลงมาเป็นการผลิตโดยใช้อาหารแข็งกึ่งเหลว 16.88 บาท/ชอง ส่วนการผลิตด้วยอาหารเหลวในขวดเขย่าและในถังหมักมีต้นทุน 6.29 และ 5.62 บาท/ชอง ตามลำดับ เดิมการใช้หนอนกิ้งมั่งในการผลิตของไส้เดือนฝอย เนื่องจากว่าหนอนชนิดนี้เลี้ยงง่าย ขยายพันธุ์ได้รวดเร็ว และมีความอ่อนแอต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย แต่อย่างไรก็ตามอาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงหนอนชนิดนี้ในห้องปฏิบัติการประกอบด้วยสารอาหารต่างๆ ที่มีราคาแพง ต้นทุนอาหารจึงสูง ส่วนการขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากตามความต้องการนั้น จำเป็นต้องใช้แรงงานเป็นจำนวนมาก ในการดูแลทำความสะอาด เปลี่ยนอาหาร, จับคู่ผสมพันธุ์, เก็บไข่นำมาฟัก ฯลฯ อุปสรรคอื่นๆ ในการเลี้ยงแมลงชนิดนี้ บางครั้งเกิดโรคระบาดทำให้หนอนอ่อนแอและตาย นอกจากนี้การขยายปริมาณของไส้เดือนฝอยในตัวแมลงนั้นช้ามาก หลังจากแมลงตายแล้ว ต้องรอให้ไส้เดือนฝอยขยายพันธุ์ในตัวแมลงจนอาหารหมด ไส้เดือนฝอยจึงจะออกมาจากตัวหนอน แล้วทำการเก็บไว้เป็นผลผลิตต่อไป จึงทำให้ต้นทุนการผลิตสูงไม่เหมาะกับการผลิตเป็นการค้า ส่วนการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลวต้นทุนอาหารนั้นจะลดลงต่ำกว่าที่เลี้ยงจากแมลงอาศัยมากกว่า 80% แต่ต้นทุนแรงงานลดลงได้เพียง 22% ซึ่งถ้าเทียบกับแรงงานที่ใช้ในการผลิตไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลวแล้วยังค่อนข้างสูง ทั้งนี้เนื่องจากจุดอ่อนของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลวต้องใช้เวลาและแรงงานในการเตรียมอาหารผสมเศษฟองน้ำสังเคราะห์ แล้วบรรจุใส่ลงเป็นถุงๆ เพื่อการเข้าบ่มนิ่งฆ่าเชื้อ และหลังจากเลี้ยงไส้เดือนฝอยครบวงจรจนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II แล้ว กระบวนการแยกล้างไส้เดือนฝอยให้สะอาดจากอาหารที่เลี้ยงนั้นค่อนข้างยุ่งยากต้องใช้เวลา 2-3 วัน ในการล้างแต่ละชุด จึงทำให้ต้นทุนแรงงานยังค่อนข้างสูงกว่าวิธีการผลิตด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่าและในถังหมัก ซึ่งนอกจากผลผลิตที่ได้ในแต่ละครั้งจะเป็นปริมาณมากกว่าแล้ว กระบวนการเตรียมอาหารเหลวและการแยกล้างไส้เดือนฝอยจากอาหารเหลวนั้นทำได้ง่ายและสะดวกรวดเร็วกว่า ต้นทุนแรงงานจึงต่ำกว่าวิธีการอื่นๆ ฉะนั้นถ้าขยายการผลิตในระดับถังหมักที่มีขนาดใหญ่ขึ้นไปอีก ต้นทุนการผลิตก็จะต่ำกว่าเดิม ดังนั้นจะเห็นได้ว่าโครงการนี้สามารถผลิตไส้เดือนฝอยที่มีต้นทุนต่ำกว่าวิธีการผลิตเดิม

■ . The comparison of nematode production cost between *In Vivo* and *In Vitro* culture.

Item	Production cost of the entomopathogenic nematode (baht/sachet)			
	<i>In Vivo</i>	<i>In Vitro</i>		
	<i>G. mellonella</i> (insect host)	Semi-solid medium	Liquid medium (shake flask)	Liquid medium (fermentor)
Material	14.8	1.93	1.06	1.01
Labor	11.14	8.63	2.87	2.5
Operating*	15.56	3.33	2.36	2.11
Total	41.50	16.88	6.29	5.62

*The cost of equipment, electricity and water were included

notes : 1) production cost = bath/sachet

2) 1 sachet of nematode = 4×10^6 nematodes

สรุปผลการเปรียบเทียบ

ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* 4 ล้านตัว (1 ชอง) ด้วยวิธีการต่างๆ

ผลิตจากแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง)	= 41.50	บาท/ชอง
ผลิตจากอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว	= 16.88	บาท/ชอง
ผลิตจากอาหารเหลวระดับขวดเขย่า (shake flask)	= 6.29	บาท/ชอง
ผลิตจากอาหารระดับถังหมัก (fermentor) 100 ลิตร	= 5.62	บาท/ชอง

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิทย์ สมสุข. 2533. ผลของสารกำจัดศัตรูพืชต่อไส้เดือนฝอย *Neoaplectana carpocapsae*. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. 12 : 237 – 241.
- วัชรวิทย์ สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 182 - 197.
- วัชรวิทย์ สมสุข. 2538. การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. หน้า 207 - 221. ในเชื้อจุลินทรีย์ควบคุมศัตรูพืช. จัดพิมพ์โดย สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และกรมวิชาการเกษตร.
- วัชรวิทย์ สมสุข. 2540. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L). วารสารกัญและสัตววิทยา ปีที่ 19 (2) : 107–109.
- วัชรวิทย์ สมสุข และพิมลพร นันทะ. 2535. การผลิตไส้เดือนฝอยปราบแมลงศัตรูพืชด้วยอาหารเทียม. วารสารวิชาการเกษตร 1 (10) : 1 – 4.
- วัชรวิทย์ สมสุข และพิมลพร นันทะ. 2538. เทคนิคใหม่ในการผลิตขยายไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมาก. หน้า 123-131. ในรายงานผลการค้นคว้าและวิจัยปี 2538. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัชรวิทย์ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2541. เปรียบเทียบการเจริญเติบโต สืบพันธุ์ และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว และแมลงอาศัย. วารสารกัญและสัตววิทยา ปีที่ 20 (2) : 75 – 88.
- วัชรวิทย์ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2542. อิทธิพลของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในอาหารเหลว. วารสารวิชาการเกษตร 17 (1) : 66 - 72.
- วัชรวิทย์ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2542. ผลของปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในอาหารเหลว. วารสารกัญและสัตววิทยา 21 (2) : 76 - 83.
- วัชรวิทย์ สมสุข ประยูร จันทน์นาม และพิมลพร นันทะ. 2539. พัฒนาการผลิตขยายไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมากด้วยอาหารเทียม. หน้า 256 - 264. ในรายงานการประชุมสัมมนาทางวิชาการแมลง และสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 10 กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัชรวิทย์ สมสุข พิมลพร นันทะ และเอนก บุตรรักษ์. 2537. การควบคุมหนอนกระทู้หอม *Spodoptera exigua* ในดาวเรืองด้วยไส้เดือนฝอย. หน้า 55 - 62. ในการประชุมสัมมนาทางวิชาการ แมลงและสัตว์ศัตรูพืช ครั้งที่ 9 กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัชรวิทย์ สมสุข วินัย รัชตปกรณ์ชัย และพิมลพร นันทะ. 2534. การใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ควบคุมด้วงหมัดผักในผักกาดหัว. วารสารกัญและสัตววิทยา 4 (13) : 183 – 188.

- วัชรีย์ สมสุข สุรน สุวรรณบุตร และพิมลพร นันทะ. 2534. ศึกษาการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema* (= *Neoaplectana*) *carpocapsae* (Weiser) ในการควบคุมด้วงงวงมันเทศในสภาพธรรมชาติ. หน้า 10. ในรายงานผลงานประจำปี 2534 กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา.
- วัชรีย์ สมสุข อัจฉรา ตันติโชค และอุทัย เกตุนุติ. 2529. ไส้เดือนฝอย *Neoaplectana carpocapsae* ควบคุมหนอนกินใต้ผิวเปลือกไม้สกุลกลางสาต. วารสารกัญและสัตววิทยา 3 (8) : 115 – 119.
- สุทธิชัย สมสุข. 2541. ศึกษาการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) โดยใช้แมลงอาศัย (insect host) *Galleria mellonella* และสภาพการเก็บรักษา. รายงานผลการวิจัย คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ประจำปี 2541. 10 หน้า.
- Akhurst,R.J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus* spp. ; bacteria symbiotically associated with insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernematidae. J. Gen. Microbiol. 128 : 3061 - 3065.
- Akhurst,R.J. and N.E.Boemare. 1990. Biology and taxonomy of *Xenorhabdus*, pp. 75 - 90. In : R.Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press Raton, FL, USA.
- Barbercheck,M.E. and H.K.Kaya. 1991. Competitive interactions between entomopathogenic nematodes and *Beauveria bassiana* (Deuteromycotina : Hyphomycetes) in soilborne larvae of *Spodoptera exigua* (Lepidoptera : Noctuidae) Environmental Entomology 20 : 707 - 712.
- Bedding,R.A. 1981. Low cost *In Vitro* mass production of *Neoaplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109 – 114.
- Bedding,R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect parasitic nematodes *Neoaplectana* spp. and *Heterorhabditis* spp. Ann. Appl : Biol. 104 : 117 – 120.
- Boemare,N.E., M.H.Boyer-Giglio, J.O.Thaler, R.J.Akhurst and M.Brehekin. 1992. Lysogeny and bacteriocigeny in *Xenorhabdus* spp. Bacteria associated with entomopathogenic nematodes. Appl. Environ. Microbiol. 58 : 3032 - 3037.
- Buecher,E.J. and I.Popiel. 1989. Liquid culture of the entomogenous nematodes *Steinernema feltiae* with its bacterial symbiont. J. Nematol. 21 : 500 - 504.
- Dutky,S.R., W.E.Robbins and V.V.Thomson. 1967. The demonstration of sterds as requirements for growth, development and reproduction of DD-136 nematode. Nematological 13 - 140.
- Ehlers,R.U., Stefan Stoessel and Urs Wyss. 1990. The influence of phase variants of *Xenorhabdus* spp. And *Escherichia coli* (Enterobacteriaceae) on the propagation of entomopathogenic nematodes of the genera *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Revue Ne'matol. 13 (4) : 417 – 424.

- Ehlers,R.U., K.H.Osterfeld, K.Krasomil-Osterfeld and S.Linau. 1992. *In Vitro* production of *Heterorhabditis megidis* (strain HSH) in laboratory scale bioreactors. *Nematologica* 38 : 409.
- Fodor,A., G.Vecseri and T.Farkas. 1990. *Caenorhabditis elegans* as a model for the study of entomopathogenic nematodes. In : Entomopathogenic nematodes in biological control, pp. 249 - 270. Eds R.Haugler and H.K.Kaya. CRC Press Raton, Fl, USA.
- Friedman,M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153 – 172. In : Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. R.Gaugler and H.K.Kaya. (eds) CRC Press Raton, Fl, USA.
- Friedman,M.J., S.L.Langston and S.Pollitt 1989. Mass Production in liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent, Wo 89/04602, 12 pp.
- Georgis,R. 1990. Formulation and application technology. Standardization and quality control. In : Entomopathogenic Nematodes for Biological Control (R.Gaugler and H.K.Kaya,eds.) pp. 173 - 191. CRC Press Raton, Fl, USA.
- Han,R.C. 1996. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in liquid culture. *Nematologica* 42 : 546 - 553.
- Hansen,E.L. and W.S.Cryan. 1966. Continuous axenic culture of free-living nematodes. *Nematologica* 12 : 138 - 142.
- Kaya,H.K. 1977. Development of the DD-136 strain of *Neoplectana carpocapsae* at constant temperatures. *J. Nematol.* 9 (4) : 346 - 349.
- Kaya,H.K. and B.J.Grieve. 1982. The Nematode *Neoplectana carpocapsae* and the Beet Armyworm *Spodoptera exigua* : Infectivity of Prepupae and pupae in Soil. *J. Invertebr. Pathol.* 39 : 413 - 414.
- Kaya,H.K. and A.H.Hare. 1981. Susceptibility of various species of Lepidoptergus pupae to the entomogenous nematode *Neoplectana carpocapsae*. *J. Nematology* 13 (3) : 291 - 294.
- Mc Daniel,L.E. and E.G.Bailey. 1969. Effect of shaking speed and type of closure on shake flask cultures *Applied Microbiology* 17 (2) : 286 - 290.
- Mc Daniel,L.E., E.G.Bailey and A.Zimmerli. 1965. Effect of oxygen supply rates on growth of *Escherichia coli*. *Applied Microbiology* 13 (1) : 109 - 119.
- Mc Inerney,B.V., R.P.Gregson, M.J.Lacey, R.J.Akhurst, G.R.Lyons, S.H.Rhodes, D.R.J.Smith, L.M.Engelhardt And A.H.White. 1991a. Biologically active metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part I : Dithiopyrrolone derivatives with antibiobic activity. *J. Nat. Product* 54 : 774 - 784.
- Mc Inerney,B.V., W.C.Taylor, M.J.Lacey, R.J.Akhurst and R.P.Gregson. 1991b. Biologically active Metabolites from *Xenorhabdus* spp. Part II : Benzopyran-T-one derivatives with gastroprotective activity. *J. Nat.Produc.* 54 : 785 - 795.

- Miller,R.W. 1989. Novel pathogenicity assessment techniques for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. J. Nematol. 21 : 574.
- Pace,W.G., W.Grote, D.E.Pitt and J.M.Pitt. 1986. Liquid culture of nematodes. International Patent Application, Wo 86/01074, 14 pp.
- Poinar,G.O.Jr. 1979. Nematodes for Biological Control of Insect. CRC Press Raton, Fl, USA. p. 277.
- Poinar,G.O.Jr. and G.M.Thomas. 1965. A new bacterium *Achromobacter nematophilus* NOV. (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) associated with a nematode International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy Vol. 15 : 4, 249 - 252.
- Poinar,G.O.Jr and G.M.Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas. (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp., Steinernematidae). Parasitology 56 : 385 - 390.
- Popiel,I., D.L.Grove and M.J.Friedman. 1989. Infective juvenile formation in the insect parasitic nematode *Steinernema feltiae*. Parasitology 88, 77 - 81.
- Stoessel,S. and R.-U.Ehler. 1992. Influence of different *Xenorhabdus luminescens* clones on the propagation of *Heterorhabditis* sp. in monoxenic liquid culture. Nematologica 37: 394.
- Stoll,N. 1953. Axenic cultivation of parasitic nematode. *Neoplectana glaseri* in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39 : 422.
- Strauch,O., S.Stoessel. and R.-U.Eglers. 1994. Culture conditions define automictic or amphimictic Reproduction in entomopathogenic rhabditid nematodes of the genus *Heterorhabditis*. Fundamental and Applied Nematology. 17 : 575 - 582.
- Supanwong,K. and K.Pichai. 1995. Cost effective and convenient version of the drop plate method. J. Sci.Soc. Thailand 21 : 47 - 50.
- Surrey,M.R. and R.J.Davies. 1996. Pilot scale liquid culture and harvesting of an entomopathogenic Nematode, *Heterorhabditis bacteriophora*. J. Invertebr. Pathol. 67 : 92 - 99.
- Wang,J.X. 1993. Population dynamics of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora* in *In Vitro* culture. Ph.D.thesis.Australian National University, Canberra. 203 pp.

ภาคผนวก

NBTA

- Nutrient Agar (NA)	1	l.
- Bromothymol Blue (BTB)	0.025	g.
- Triphenyltetrazolium Chloride	0.04	g.

Ringer's solution 10 litre

- NaCl	10	g.
- KCl	4.2	g.
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	3.7	g.
- NaHCO_3	2	g.
- Distilled water	10	l.

Steriled egg's solution

- 4M NaOH	1.25	ml.
- Sodium Hypochlorite 12%	1	ml.
- Distilled water	7.75	ml.

Tergitol 7 Agar + TTC (Triphenyltetra Zolium Chloride)

- Group 1 ingredients	Tergital 7 agar	33	g.
	Distilled water	1000	ml.
- Group 2 ingredients	TTC	0.1	g.
	Distilled water	100	ml.

Yeast Salts หรือ YS broth (Akhurst 1980)

- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5	g.
- K_2HPO_4	0.5	g.
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	g.
- Yeast Extract	5.0	g.
- NaCl	5.0	g.
- Water	1	l.

ต้นทุนการเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (Wax moth)

สูตรอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้งประกอบด้วย

ปลายข้าวบด	2	kg.	กิโลกรัม	= 13	บาท	=> 26	บาท
แป้งข้าวโพด	1.5	kg.	500 g.	= 35	บาท	=> 105	บาท
นมผง	1	kg.	กิโลกรัม	= 95	บาท	=> 95	บาท
น้ำ	1,500	มล.	ค่าน้ำ	= 10	บาท	=> 10	บาท
กลีเซอริน	1,000	มล.	มล. ละ	= 0.50	บาท	=> 500	บาท
น้ำผึ้ง	720	มล.	มล. ละ	= 0.16	บาท	=> 115.2	บาท
รังผึ้ง	1.4	kg.	1 แผ่น	= 14	บาท	=> 14	บาท
ถั่วเขียว	1.8	kg.	กิโลกรัม	= 35	บาท	=> 63	บาท
รวมต้นทุนอาหารเลี้ยงหนอน				=	928.20		บาท

วิธีการคำนวณต้นทุนอาหารเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง ดังนี้คือ

- ต้นทุนอาหารเลี้ยงหนอน
 - * เตรียมอาหาร 1 ครั้ง (1 สูตร) 928.20 บาท
 - ใน 1 เดือน เตรียมอาหาร 3 ครั้ง เป็นเงิน 2,784.60 บาท
- ต้นทุนแรงงาน
 - ลูกจ้างวุฒิ ปวส. 1 คน อัตราจ้าง 6,140 บาท/เดือน
- ต้นทุนรวม
 - ต้นทุนอาหาร + ต้นทุนแรงงาน เป็นเงิน 8,924.60 บาท/เดือน
- อื่นๆ (ไฟฟ้า น้ำ สารเคมี ฯลฯ) คิด 60% ของต้นทุนรวม
 - เป็นเงิน 5,520.36 บาท/เดือน
- ต้นทุนสุทธิ ต้นทุนรวม + อื่นๆ เป็นเงินทั้งสิ้น 14,444.96 บาท/เดือน
 - ในระยะเวลา 1 เดือน สามารถผลิตหนอนได้ 40,000 ตัว
 - ต้นทุนการผลิตหนอน 1 ตัว 0.36 บาท

*เตรียมอาหาร 1 ครั้งสามารถเลี้ยงหนอนได้ $\approx$ 13,000 ตัว (หนอน 1 ตัว ผลิตไข่ได้เดือนฝอยได้ 100,000 ตัว)

ต้นทุนอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว (อาหารสุนัข + ฟองน้ำ)

สูตรอาหารประกอบด้วย

อาหารสุนัขสำเร็จรูป	990	กรัม	ราคา	26.30	บาท
ผักเคี้ยวอ่อนใหม่	110	กรัม	ราคา	14.30	บาท
น้ำมันหมู	220	กรัม	ราคา	6.51	บาท
เศษฟองน้ำสังเคราะห์	400	กรัม	ราคา	71.20	บาท
อื่นๆ (สารเคมี)			ราคา	36	บาท

ภาชนะบรรจุอาหารเทียม

ถุงร้อนสำหรับบรรจุอาหารเทียม ราคาถุงละ	0.52	บาท
คอกวดอันละ	0.10	บาท
ต้นทุนภาชนะสำหรับบรรจุอาหารเทียม ชุดละ	0.62	บาท
ในการเตรียมอาหาร 1 ครั้ง (1 สูตร) สามารถบรรจุลงในถุงทนร้อนได้	120	ถุง
ต้นทุนการเตรียมอาหารเทียม 120 ถุง	154.31	บาท
ต้นทุนอาหารเทียม 1 ถุง	1.29	บาท
ต้นทุนอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวถุงละ	1.91	บาท

ต้นทุนอาหารเหลว (Tsb₃)

ในการเตรียมอาหารเหลว 1 ครั้ง (1 สูตร)	3,000	มิลลิลิตร
ต้นทุนในการเตรียมอาหารเหลวแต่ละครั้ง	138.25	บาท
(สูตรอาหารขอสงวนสิทธิ์ไม่บอกส่วนประกอบ)		
ต้นทุนอาหารเหลวมีลิลิตรละ	0.0496	บาท

ต้นทุนวัสดุสำหรับบรรจุใส่เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์

ถุงพลาสติกขนาด 4 x 6 นิ้วราคาถุงละ	0.3	บาท
ฟองน้ำสังเคราะห์ตัดเป็นชิ้นลูกเต๋าจำนวน 23 ชิ้น/ถุง	0.1	บาท
ต้นทุนวัสดุบรรจุใส่เดือนฝอยเป็นผลิตภัณฑ์ชุดละ	0.4	บาท