

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 โขวเจริญสุข 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

ข จะขยายการผลิตให้มากขึ้นในโอกาสต่อไป 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 กองกีฏและสัตววิทยา 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% แล้วตัดขาเทียมของหนอน จากนั้นใช้เข็มหยดย้ำน้ำเลือด (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 ตรวจสอบการพัฒนากันทั้งไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 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 ในถาดหลุมที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 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 โดยทำการคัดค้นสูตรอาหาร 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* ในอาหารเหลรร่วมกับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในสภาพต่างๆ 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 (หนอนกิ้งมึ้ง) *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

เหหลวงสูตร 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 ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเหหลวง 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. พบว่าระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับเลี้ยงขยายแบคทีเรียในอาหารเหหลวงสูตร 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* ที่ผลิตในอาหารเหหลวงโดยใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (inoculum) ที่ได้จากกรรมวิธีการเลี้ยงที่บริสุทธิ์ (pure line technique) และที่ได้จากแมลงอาศัย (insect host)

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

กรรมวิธีที่ 1 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหหลวง Tsb₃ โดยใช้ inoculum ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์

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

กรรมวิธีที่ 3 เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหหลวง 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*
ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเยาะ

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 ตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อ 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 นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 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% และน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อแล้วเป็นครั้งสุดท้ายก่อนนำลงเลี้ยงในขวดอาหารทั้ง 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 II ที่ได้จากอาหารในแต่ละวิธีการๆ ละ 5 ซ้ำ (5 ขวด) ได้กล้องจุลทรรศน์
- บันทึกปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ในแต่ละวิธีการ

2.2 ศึกษาปริมาณอาหารที่เป็นแหล่งของวิตามิน - แกลีอแร่ 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 - แกลีอแร่ 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 การผลิตไล้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลว โดยการเลี้ยงในขวดแก้วนั้น มีปัจจัยหลายอย่างเข้ามาเกี่ยวข้อง ส่วนประกอบและสัดส่วนที่เหมาะสมของสูตรอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโต การสืบพันธุ์ของไล้เดือนฝอยโดยตรง ถ้าขาดหรือมีไม่พอจะมีผลกระทบต่อ การสร้างไข่ การพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัยต่างๆ ขนาดของวัยต่างๆ เล็กกว่าปกติ ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงลดน้อยลง ฯลฯ ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงไล้เดือนฝอยมาจากแหล่งอาหารต่างๆ คือ โปรตีนและไขมันจากพืชและสัตว์ วิตามินและเกลือแร่ต่างๆ เช่นเดียวกับงานทดลองของ Pace *et al.* (1986) ซึ่งอาหารเหลวประกอบด้วย ดับวีสตป่นละเอียด, yeast extract โดยสามารถเลี้ยงไล้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ได้ประมาณ 190,000 ตัว/มล. ในขวดแก้ว Friedman *et al.* (1989) ได้ทดลองเลี้ยงไล้เดือนฝอย ใน fermentor โดยใช้สูตรอาหารเหลวประกอบด้วย แป้งถั่วเหลือง yeast extract, แป้งข้าวโพด และ egg yolk ผลผลิตได้ 110,000 ตัว/มล.

สัดส่วนของส่วนประกอบของอาหารและปริมาณอาหาร 30 มล. ที่ใส่ในขวดแก้วขนาด 125 มล. นั้น จะมีความพอเหมาะกับการเลี้ยงไล้เดือนฝอยได้ครบ 1 วงจรชีวิตพอดี หลังจากอาหารหมดไล้เดือนฝอยจะพัฒนาเป็น II ทั้งหมดจะไม่มียัยอื่นปะปน ทำให้ได้ผลผลิตสูง นอกจากนี้ยังเกี่ยวเนื่องกับ aeration เมื่อนำไปเขย่าที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที่ ซึ่งมีส่วนทำให้ไล้เดือนฝอยที่อยู่ในอาหารเหลวนั้นได้รับ 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) รายงานว่าจะได้ผลผลิตไล้เดือนฝอยเพิ่มขึ้นอีก 5 เท่า ถ้าเลี้ยงไล้เดือนฝอยในอาหารเหลวที่มีปริมาณน้อยที่แผ่กระจายเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ ทั้งนี้เนื่องจากไล้เดือนฝอยได้รับ O_2 อย่างทั่วถึง นอกจากนี้อุณหภูมิก็ยังเป็นปัจจัยที่สำคัญสำหรับการทดลองนี้ อุณหภูมิ $25^{\circ}C$ ถือว่าเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสม (Kaya, 1977)

ส่วนแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* ซึ่งเป็น symbiotic bacteria นั้น เป็นปัจจัยสำคัญเช่นกัน ในการเลี้ยงร่วมกับไล้เดือนฝอยในอาหารเหลว เพราะมันจะสร้างสภาพที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและการพัฒนาของไล้เดือนฝอย (วัชร และสุทธิชัย, 2542) จะเห็นได้ว่า การผลิตไล้เดือนฝอยด้วยสูตรอาหาร Tsb₃ นั้นได้ผลผลิตไล้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II สูงสุด แต่อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเปรียบเทียบกับสภาพที่เลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (host) เพื่อเป็นการยืนยันถึงประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงและการเจริญเติบโตของไล้เดือนฝอยนั้นเท่าเทียมกัน

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 หนอนกระทุ้งหอมในดาวเรือง (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 เครื่องซังไฟฟ้า 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) ที่ได้พร้อมปรับระดับความเข้มข้นของแบคทีเรียให้ได้ตามปริมาณที่ต้องการวางแผนการทดลอง

3 การเตรียมไส้เดือนฝอยเพื่อใช้เป็น inoculum

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ J₂ ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% และล้างตามด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ 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 J₂ 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 ซึ่งใส่แบคทีเรียลงไปเลี้ยงก่อนหน้านี้ 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. ไร้เดือนฝอย *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 ใช้ปริมาณไร้เดือนฝอยที่เป็น inoculum 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 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 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 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. หลังจากบ่มจนเข้าเชื้อแล้ว 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.

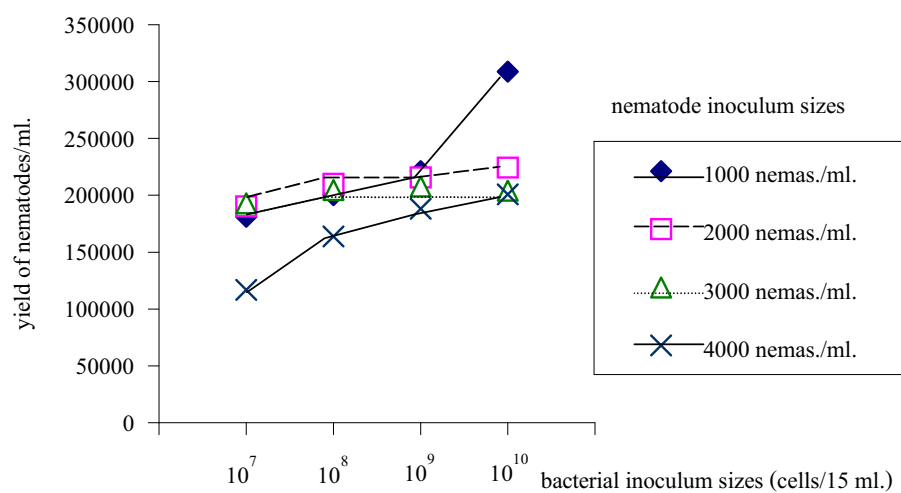


Figure 1. Effect of the interaction between the bacterial and nematode inoculum sizes on the yield of nematodes *Steinernema carpocapsae* cultured in liquid medium for 10 days.