

Development for Commercial Production of Entomopathogenic Nematode in Fermenter

Abstract

Research on development for commercial production of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* in fermenter during 2001-2005 encompassed the study on the large-scale liquid culture of the nematode for producing high yields (concentration) of infective juvenile in a 130 liter stirred tank reactor, and the effort to develop water soluble powder formulation and containers suitable for storing of the nematode with long shelf-life at 7 °C and 25-30 °C. For the liquid fermentation processes, the experiment was started for developing the advanced technique for producing pure-line nematode inoculum to meet quality and quantity needs for scale-up production in a 130 liter stirred tank bioreactor. Healthy fertilized eggs were directly isolated and selected from living females, and released to hatch and develop to the infective juvenile (IJ) on the nutrient lipid agar under aseptic condition. The harvested IJ were then mass cultured by utilizing semi-solid media for producing high concentration of IJ for inoculation in the fermenter. Approximately 1×10^7 bacterial cells/ml of medium were inoculated in the fermenter containing 70 liter liquid culture (Tsb₃) and grown for 24 hours at 28 °C prior to inoculation with the nematode concentration at 1000 IJs/ml of medium.

After bacterial inoculation into the culture, different air flow and agitation rates are introduced to be tested in culturing symbiotic bacterium. At the time of nematode culture, the partial dissolved oxygen (pO₂) is maintained in the same levels in each fermentation batch and airflow rates are varied according to O₂ requirements of different nematode population densities in each growth stage.

The result showed the higher average air flow and stirring rates (2.7, 2.3 vvm and 195, 197.5 rpm) accelerated the growth rate of the bacterium reaching the stationary phase (10^{14} cells/ml) at 18th culture hour, earlier than in other treatments. These conditions are most suitable for reproduction of the nematodes giving highest yields at 313,000 and 302,000 IJs/ml, respectively.

Addition of various concentration rates (0.1, 0.3, 0.5 and 1%) of antifoam (Glycerin Alkoxylate) tested in the culture time of symbiotic bacterium resulted in reducing yields and efficiency of the produced nematodes.

The study on formulation development, including the selection of formulation types, ingredients, packaging sizes and storage condition, was also undertaken. The result showed the most suitable formulation 100 grams comprises Attapugite powder 30 grams, Zeolite powder 15 grams, antimicrobial substance (Benzoic acid) 0.1 grams, *Steinernema carpocapsae* 50 millions, water 40 ml . The mixture of the formulation is sealed tightly in a contrast cylinder container (vol. $\approx 311 \text{ cm}^3$) with a opaque spiral cap. The shelf life (90% survival) of the nematodes can be prolonged for 6 months at temperature 5-7°C and 4 weeks at 25-30°C with constant efficacy (90%).

โครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม”

บทคัดย่อ

โครงการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม มีแผนการตลาดดำเนินการเป็น 2 ส่วน ส่วนที่ 1 เป็นการทดลองเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณ ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในถังหมัก ขนาด 130 ลิตร ส่วนที่ 2 เป็นการพัฒนาลูตรสำเร็จแบบผง และภาชนะบรรจุเพื่อเก็บรักษาผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์

ในส่วนการทดลองเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในถังหมักนั้น ประกอบด้วยการพัฒนาการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ให้เพียงพอ เพื่อใช้เป็น inoculum สำหรับกระบวนการผลิตใน ถังหมัก ขนาด 130 ลิตร ซึ่งในการทดลองแต่ละครั้ง (batch) ต้องใช้ปริมาณ 70 ล้านตัว เริ่มตั้งแต่การคัดไข่ที่สมบูรณ์จากไส้เดือนฝอยเพศเมีย นำมาเพาะฟักด้วยวิธีการปลอดเชื้อจนได้ไส้เดือนฝอยวัย 1 แล้วนำมาเลี้ยงต่อจนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (II) แล้วเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ให้ได้มากเพียงพอ นอกจากนั้นยังพบว่าการใช้ดินเชื้อไส้เดือนฝอยเลี้ยงติดต่อกัน 3 ชั่วโมง ผลผลิตที่ได้ทั้งปริมาณ และคุณภาพของไส้เดือนฝอยจะลดลง ในกระบวนการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวในถังหมัก ขนาด 130 ลิตร พบว่า อัตราการให้อากาศและการกวนในระดับที่แตกต่างกันในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria (*Xenorhabdus nematophila*) 24 ชั่วโมงแรกก่อนใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ลงไปเลี้ยงร่วมกัน มีผลต่อการขยายพันธุ์หรือปริมาณของไส้เดือนฝอย โดยที่การให้อากาศและการกวนในอัตราที่สูงที่ 2.7 และ 2.3 vvm และ 195.0 และ 197.5 รอบ/นาที ตามลำดับ ทำให้แบคทีเรียเจริญขยายปริมาณเซลล์สูงสุดที่ 10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล. เข้าสู่ stationary phase ภายใน 18 ชั่วโมง หลังจากใส่แบคทีเรียเริ่มต้น (10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล.) ลงเลี้ยง และในการเลี้ยงสภาพนี้ไส้เดือนฝอยให้ผลผลิตสูงที่ระดับ 313,000 และ 302,000 ตัว/อาหาร 1 มล. หรือไส้เดือนฝอยสามารถขยายพันธุ์ได้สูงถึง 313 และ 302 เท่าจากปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงไปเลี้ยงช่วงเริ่มต้น ส่วนการให้อากาศและปรับการกวนในอัตราต่ำกว่า คือ 1.8 1.6 และ 1.8 vvm และ 180 174.6 และ 178.8 รอบ/นาที ตามลำดับ ทำให้แบคทีเรียเจริญแบ่งเซลล์ได้สูงสุดที่ระดับ 10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล. และเข้าสู่ระยะ stationary phase ได้ช้ากว่า คือ ที่ 21 ชั่วโมงของการเลี้ยง และไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในสภาพนี้ให้ผลผลิตที่ระดับต่ำกว่าเช่นกัน คือ อยู่ระหว่าง 131,000-161,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ส่วนคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในทุกสภาพการทดลอง (batch) อยู่ในช่วง 40-60% ซึ่งเป็นระดับมาตรฐาน นอกจากนี้การใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria ให้ผลผลิตต่ำเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 13,000-37,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และคุณภาพของไส้เดือนฝอยอยู่ระหว่าง 38.54-40.63% พบว่า ในขณะที่ใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ในช่วงเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ให้ผลผลิตสูงกว่าเฉลี่ยอยู่ระหว่าง 286,000-

297,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีการไม่ใส่น้ำมันดับฟอง ซึ่งให้ผลผลิต 317,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่มีคุณภาพอยู่ระหว่าง 41.67-44.79% ในขณะที่ไม่ใส่น้ำมันดับฟองมีคุณภาพ 50%

ในส่วนของการพัฒนาสูตรสำเร็จ เพื่อเก็บรักษาผลผลิตไส้เดือนฝอย พร้อมภาชนะบรรจุพบว่า สูตรสำเร็จที่เหมาะสมคือ Attapulgit + Zeolite (อัตรา 2:1 โดยน้ำหนัก) 59% Benzoic acid 1% น้ำ 40% ไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว ในกระป๋องพลาสติกมีฝาปิดทึบ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. (ปริมาตร $\approx$ 311 ลบ. ซม.) สามารถเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7°C ได้เป็นเวลา 6 เดือน มีอัตราการอยู่รอดได้ 90% โดยยังคงมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลง แต่ถ้าเก็บที่ 25°C และ 30°C สามารถเก็บได้นาน 4 สัปดาห์