



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม”

Development for Commercial Production of Entomopathogenic Nematode
in Fermenter

โดย

รศ. ดร. สุทธิชัย สมสุข
ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
(ศูนย์รังสิต)

และ วัชรวิ สมสุข
กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร

ตุลาคม 2548

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม” Development for Commercial Production of Entomopathogenic Nematode in Fermenter

คณะผู้วิจัย

สังกัด

รศ.ดร. สุทธิชัย สมสุข

ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร
คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี
มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ศูนย์รังสิต)

วัชรีย์ สมสุข

กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา
สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
กรมวิชาการเกษตร

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

สารบัญ

หน้า

คำนำ	1
Executive Summary	3
Abstract	5
บทคัดย่อ	7
วัตถุประสงค์ของโครงการ	9
รายละเอียดของโครงการวิจัย	
1. ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย (<i>Steinernema carpocapsae</i>)	
ระยะ Infective Juvenile (IJ) ด้วยอาหารเหลวในถังหมักระดับ 130 ลิตร	
1.1 พัฒนาการผลิตต้นเชื้อ (inoculum) ไส้เดือนฝอย (<i>Steinernema carpocapsae</i>)	10
ที่บริสุทธิ์ สำหรับการ เพาะเลี้ยงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม	
1.2 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย <i>Steinernema carpocapsae</i> (Weiser)	31
ด้วยอาหารเหลวในถังหมักขนาด 130 ลิตร	
1.3 ผลของการใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย	77
<i>Steinernema carpocapsae</i> ในอาหารเหลว	
1.4 ต้นทุนการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ (stock pureline)	87
1.5 ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลว Tsb ₃	88
ในถังหมักขนาด 130 ลิตร (อาหาร 70 ลิตร)	
2. การพัฒนาสูตรสำเร็จแบบผง และภาชนะบรรจุในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง	89
<i>Steinernema carpocapsae</i> ที่ผลิตได้เชิงพาณิชย์	
2.1 ศึกษาสูตรดินผงและภาชนะในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย	92
<i>Steinernema carpocapsae</i> ในเชิงพาณิชย์	
2.2 อัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอย <i>Steinernema carpocapsae</i>	115
ที่เก็บในรูปดินผงบรรจุในภาชนะที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ	
2.3 ศึกษาอัตราที่เหมาะสมของ Benzoic acid ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย	138
<i>Steinernema carpocapsae</i> ในสูตรดินผง	
2.4 ผลของการบรรจุสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอย <i>Steinernema carpocapsae</i>	157

ในภาชนะที่มีปริมาณและขนาดแตกต่างกันต่ออัตราการอยู่รอดและ
ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย

2.5 เปรียบเทียบอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย 170

Steinernema carpocapsae ที่เก็บรักษาในสูตรดินผงและฟองน้ำ
ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

2.6 ต้นทุนการบรรจุไส้เดือนฝอยสูตรผงเป็นผลิตภัณฑ์ 187

ภาคผนวก I สูตรอาหาร สูตรน้ำยาเคมี 188

- อาหารเลี้ยงเชื้อ
- อาหารเทียมกึ่งแข็งกึ่งเหลว (เพาะเลี้ยงต้นเชื้อไส้เดือนฝอย)
- น้ำยาเคมี

ภาคผนวก II ราคาวัสดุอาหาร และสารเคมี 190

- ต้นทุนวัสดุอาหารเลี้ยงไส้เดือนฝอย
- ต้นทุนสารเคมี
- ต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ภาคผนวก III 192

- ต้นทุนวัสดุทำสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยสูตรผงบรรจุกระป๋อง
- ภาพผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสูตรผง

ภาคผนวก IV 194

- ต้นทุนการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*)

ภาคผนวก V

- สำเนาสัญญาถ่ายทอดเทคโนโลยี
- สำเนาคำขอรับสิทธิบัตร เรื่อง “สูตรอาหารเหลว และวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง”

คำนำ

โครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม” เป็นโครงการต่อเนื่องจาก “โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า” ซึ่งได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) ตั้งแต่เดือนพฤศจิกายน พ.ศ. 2538 - 2542 โดยความร่วมมือระหว่างนักวิชาการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร กับภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โครงการดังกล่าวได้ประสบผลสำเร็จในการคิดค้นสูตรอาหารเหลวที่เหมาะสมสำหรับการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ทั้งในระดับขวดเขย่า (shake-flask) และในถังหมัก 6 ลิตร โดยได้ผลผลิตไส้เดือนฝอย (ระยะเข้าทำลายแมลง) ในอัตราไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/อาหาร 1 มล. รวมทั้งคิดประดิษฐ์ชุดอุปกรณ์การแยกล้างไส้เดือนฝอยเพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยที่สะอาดมีคุณภาพ พร้อมบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์จำหน่ายตามวัตถุประสงค์

ในการที่จะผลิตไส้เดือนฝอยนี้จำเป็นต้องใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชทาง การเกษตรทดแทน หรือลดปริมาณการใช้สารเคมีของเกษตรกร เทคโนโลยีดังกล่าวถือเป็นความสำเร็จระดับหนึ่ง ซึ่งสามารถถ่ายทอดภาคเอกชนทำธุรกิจขนาดย่อม (SME) แต่เทคโนโลยีดังกล่าวยังคงต้องมีการพัฒนาต่อในระดับอุตสาหกรรม โดยมีภาคเอกชนขนาดใหญ่ที่สนใจมารองรับ และเพื่อให้ได้ต้นทุนการผลิตลดลงอีก พร้อมทั้งการทำสูตรสำเร็จ (formulation) เก็บไส้เดือนฝอยบรรจุเป็นผลิตภัณฑ์มาตรฐานในภาชนะที่สามารถเก็บรักษาได้ช่วงระยะหนึ่งก่อนการขนส่งไปจำหน่าย โดยที่ประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชไม่เปลี่ยนแปลง เกษตรกรสามารถนำไปใช้ได้สะดวกเช่นเดียวกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช คณะผู้วิจัยจึงได้ตั้งโครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม” โดยได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.) อีกครั้ง ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2544 – เดือนตุลาคม 2548

โครงการวิจัยดังกล่าวได้เสร็จสิ้นลงแล้ว และได้ยื่นจดสิทธิบัตรเรื่อง “สูตรอาหารเหลวและวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง” กับกรมทรัพย์สินทางปัญญา พร้อมถ่ายทอดเทคโนโลยีสู่ภาคเอกชนบริษัท ทีเอฟไอ. กรีนไบโอเทค จำกัด คณะผู้วิจัยจึงได้รวบรวมผลงานวิจัยทั้งหมดของโครงการ และจัดพิมพ์เป็นรูปเล่ม เพื่อจะเผยแพร่ผลงานวิจัยด้านการพัฒนาชีววินทรีย์ ให้เป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสนับสนุนการทำเกษตรอินทรีย์ และการผลิตสินค้าเกษตรการส่งออกที่มีการแข่งขันและกีดกันสินค้าปนเปื้อนสารเคมี จากประเทศในยุโรป อเมริกา และญี่ปุ่น

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย ที่ได้เห็นความสำคัญ พร้อมการสนับสนุนงบประมาณ กรมวิชาการเกษตร และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่ให้การสนับสนุนทางด้านสถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือในการทำงานวิจัย ให้ดำเนินไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ใคร่ขอขอบคุณนักวิจัย ผู้ช่วยปฏิบัติงานในโครงการฯ คือ นางสาวอชริย์ หงษ์
ประสิทธิ์ นางพัชรีวรรณ มณีสาคร และนางสาวศัลภา รักกลิ่น ที่มีส่วนช่วยให้งานวิจัยประสบ
ความสำเร็จ และช่วยจัดพิมพ์เอกสารเล่มนี้ให้เสร็จสมบูรณ์

คณะผู้วิจัย

4 ธันวาคม 2550

Executive Summary

Between 1986 and 1990, the research group of entomopathogenic nematode, Department of Agriculture, had developed *in vivo* mass production of *Steinernema carpocapsae*. The strategy was to rear nematodes in the insect host, the greater wax moth (*Galleria mellonella*). Yields per larva ranged from $1\text{--}3.5 \times 10^5$ infective juveniles (IJs). *In vivo* production depends on the availability of relatively inexpensive supply of hosts and are far too high for large scale commercial production. The first attempt at mass production of the entomopathogenic nematode on artificial media was the development of monoxenic semi-solid culture technique, that achieved much higher and more consistence and gave yields as high as 8×10^5 IJs per one kilogram of media. This technique has been choiced by three of commercial operators to produce nematode-based products for a local market, the cost of the product available was about 30-40 Bath per sachet containing 4 millions of IJs carried on moist sponges.

During 1996 – 2000, the research and development project on commercial production of *S. carpocapsae* by liquid fermentation technology and yield harvesting process techniques were established under the cooperation between the Department of Agriculture and Thammasat University financially supported by the Thailand Research Fund (TRF). The research focused on the development of small-scale liquid culture in shake flasks and 6 liter bioreactors. Areas of investigation included nematode and symbiotic bacterium inoculum, interaction between nematode and it's symbiont, growth media, process development such as shear sensitivity, optimum aeration, population dynamics, timing and storage, harvesting equipment for separating nematode from culture. In 2000, the developed liquid production technique in shake-flask, yields per 1 ml medium ranges from 200,000-300,000 IJs, can reduce more than 60% of capital cost compared with the semi-solid culture and has been adopted by the commercial operator, Uniseeds Co., Ltd. signing the contract with the Thailand Research Fund for an investment in establishing a pilot plant commercially producing the nematode 8,000 sachets (4×10^6 IJs per sachet) per month.

A major breakthrough in a commercialization of the nematode was the development of the scaled-up monoxenic liquid culture of *S. carpocapsae* in 130 liter bioreactor in order to produce sufficient yields for the demand of local market at a competitive cost compared with chemical insecticides. Additionally, the nematode formulations provide a long shelf life for storage and transportation and make application rapid and simple.

At present, *Steinernema carpocapsae* can be successfully produced with yields as high as 250,000-300,000 IJs/ml (media). In order to maintain the nematode quality by producing reliable and consistent nematodes and minimize variation in nematode pathogenicity among *in vitro* production batches, the stock of nematode used as inoculum for the fermentation process was produced by pure line techniques. In stead of the sponge based formulation made by applying nematode to small pieces of moist sponge providing 2-month and 2-4-week shelf-life when stored at 7 °C and 25-30 °C, respectively, the water soluble powder formulation with an appropriate package was so developed that kept the nematode shelf-life of 6 months and 4 weeks at 7 °C and 25-30 °C, respectively, and can maintain viability and pathogenicity of the nematodes after they are harvested from the fermenter until the product is applied by the end-user. To ensure the stability, the standard quality control procedures of Miller (1989) was used to measure at every stage of production process. The advanced technology in the nematode production process and formulation were adopted by a private company, TFI. GREEN BIOTECH Co., Ltd. which signed the technology transfer contract with TRF and DOA in June 2007. Also the patents for the production technology, the nematode formulation and the technique for separating the nematode from culture residue have already been registered at the Department of Intellectual Property, Thailand since 2002.

Now, the nematode-based product is introduced to successfully control of various economically-important insect pests such as Longkong bark-eating caterpillars (*Cossus* sp. and *Microchlora* sp.), chinese radish striped flea beetle, (*Phyllotreta sinuata*), sweet potato weevil (*Cylas formicarius*), marigold beet armyworm (*Spodoptera exigua*), strawberry root beetle (*Mimela schneideri*), Turf grass carpet beetle (*Ataenius nigricans*) and mushroom tineid moth (*Dasytes* sp.).

Making the nematode production a local business will create new opportunities and potential for the nematode-based product used as a biopesticide to substitute imported synthetic pesticides. Because of the less environmental impact and selectives of nematodes, they will be ideal components in intergrated pest management programmes.

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 ในขณะที่ใส่น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ 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

โครงการ “พัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม”

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ได้วิธีการผลิตไส้เดือนฝอย (*Steinernema carpocapsae*) ในระยะ Infective Juvenile ด้วยอาหารเหลวในถังหมักระดับ 130 ลิตร และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการผลิตไส้เดือนฝอยในระดับอุตสาหกรรม
2. เพื่อให้ได้รูปแบบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในภาชนะที่มีมาตรฐาน มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูง สะดวกต่อการขนส่ง และการนำไปใช้โดยที่ประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงไม่เปลี่ยนแปลง

1.1 พัฒนาการผลิตต้นเชื้อ (inoculum) ไร้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่บริสุทธิ์ สำหรับการเพาะเลี้ยงในถังหมักระดับอุตสาหกรรม

Technique Development for Producing Pure-Line Inoculum of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* for Commercial Scale-Production

บทคัดย่อ

การพัฒนาวิธีการเพาะเลี้ยงไร้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ (pure line inoculum) เพื่อที่จะนำไปใช้ในการผลิตขยายปริมาณไร้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในถังหมักระดับอุตสาหกรรม ดำเนินการในห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง กันยายน 2545 – สิงหาคม 2546

ศึกษาผลของอัตราและวิธีการให้ไร้เดือนฝอยวัย Infective Juvenile (IJ) เข้าทำลายแมลง (infection) ต่อการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย ปริมาณการสร้างไข่ และการขยายพันธุ์ในตัวแมลง โดยใช้ไร้เดือนฝอยอัตรา 100 200 400 600 และ 800 ตัวต่อหนอน 1 ตัว เข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) วัย 5-2 วิธีการ คือ วิธีการแรก ทำการหยดปล่อยไร้เดือนฝอยลงบนกระดาษกรอง แล้ววางหนอนลงไป ไร้เดือนฝอยค้นหาเหยื่อเอง แล้วเข้าสู่ภายในลำตัวหนอนทางช่องเปิดธรรมชาติ (penetration) วิธีการที่สอง ใช้เข็มฉีดยา (injection) ไร้เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวหนอนโดยตรง พบว่า หลังจากหนอนตาย อัตราไร้เดือนฝอย 100 ตัวต่อหนอน 1 ตัว ของทั้ง 2 วิธีการเข้าทำลาย มีไร้เดือนฝอยเพศเมียสร้างไข่ได้เป็นปริมาณสูงสุด เฉลี่ย 838.9 และ 838.7 ฟอง/ตัวเมีย 1 ตัว ตามลำดับ และสามารถขยายพันธุ์ในตัวหนอนได้ผลผลิตเป็นไร้เดือนฝอยระยะ II สูงสุดเฉลี่ย คือ 127,640 และ 112,400 ตัว/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ ส่วนอัตราการเป็นเพศผู้:เพศเมีย อยู่ระหว่าง 1 : 1.1 – 1 : 1.5 ทั้ง 2 วิธีการทุกระดับความหนาแน่น

การเพาะฟักไข่ไร้เดือนฝอยด้วยการใช้ถาดหลุม แต่ละหลุม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2 ซม.) บรรจุอาหารเหลว Ys broth 1 มล.ต่อหลุม พบว่า การใส่ไข่ลงเพาะฟักอัตรา 920 ฟอง/หลุม สามารถฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้สูงสุด 73.9% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการใส่อัตรา 690 460 และ 230 ฟอง/หลุม

การทดลองการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไร้เดือนฝอยวัย 1 ให้ได้ต้นเชื้อบริสุทธิ์วัย II ในปริมาณมากด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว ซึ่งมีอาหารสุนัขเป็นส่วนประกอบหลัก โดยคลุกอาหาร 16 กรัมกับแผ่นฟองน้ำ (ขนาด 3 x 5 ซม.) วางบนตระแกรงในกล่องแอสตันเลส (ขนาด 14x18x5 ซม.) พร้อมฝาปิดสนิท เลี้ยงครบ 15 วัน พบว่า การใส่ไร้เดือนฝอยวัย 1 อัตรา 8,000 ตัว/กล่อง พัฒนา

ให้ผลผลิตเป็นไต้เดือนฝอยระยะ II เพิ่มขึ้น 850 เท่า (6.8 ล้านตัว/กิโลกรัม) สูงสุด แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับการใช้ในอัตรา 16,000 24,000 และ 32,000 ตัว/กิโลกรัม

การทดลองการเปรียบเทียบอัตราการขยายพันธุ์ (ปริมาณ) ของต้นเชื้อบริสุทธิ์วัย II ที่ได้จากการเลี้ยงขยายด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลวกับอัตราการขยายพันธุ์ของต้นเชื้อที่ได้จากการเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย โดยใช้อาหารเหลวสูตร Tsb₃ พบว่า การเลี้ยงต้นเชื้อบริสุทธิ์ในระดับขวดเขย่า และถึงหมักขนาด 6 ลิตร ได้ผลผลิตระยะ II 349,200 และ 336,860 IJs/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ สูงกว่าการใช้ต้นเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัยซึ่งให้ผลผลิต 326,600 และ 229,223 IJs/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ โดยเฉพาะในถังหมัก มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณของต้นเชื้อบริสุทธิ์วัย II (ที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว) ด้วยอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ในถังหมัก 6 ลิตร ติดต่อกัน 4 ครั้ง (รุ่น) โดยใช้ผลผลิตวัย II ที่ได้จากการเลี้ยงขยายแต่ละครั้ง (รุ่น) ใช้เป็นต้นเชื้อของการเพาะเลี้ยงครั้งต่อไป พบว่าผลผลิตที่เป็นไต้เดือนฝอยวัย II ที่ได้จากการเลี้ยงรุ่นที่ 1 2 และ 3 มีปริมาณใกล้เคียงกัน คือ 290,000 283,200 และ 284,100 IJs/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ได้จากการเลี้ยงรุ่นที่ 4 คือ 180,200 IJs/อาหาร 1 มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับคุณภาพของผลผลิตไต้เดือนฝอยที่ได้ในชั่วรุ่นที่ 1-3 อยู่ในระดับ 43-60% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากผลผลิตในรุ่นที่ 4 ซึ่งได้เพียง 30.8%

คำนำ

ในการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยนั้นจำเป็นต้องมีต้นเชื้อ (inoculum) ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลาย (Infective Juvenile หรือ IJ) และต้นเชื้อ symbiotic bacteria ซึ่งจะต้องเลี้ยงร่วมกัน ตามปกติต้นเชื้อไส้เดือนฝอยนั้นผลิตจากแมลงอาศัยซึ่งมีข้อเสียคือ อาจมีจุลินทรีย์อื่นๆปะปนหรือติดมาด้วย ซึ่งก่อให้เกิดการปนเปื้อนในระบบการผลิตได้ วัชรและสุทธิชัย 2544. ได้ทดลองโดยการนำต้นเชื้อบริสุทธ์มาเพาะเลี้ยงในโครงการการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในระดับการค้า พบว่า การเพาะเลี้ยงต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธ์ด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว ได้ปริมาณผลผลิตเป็นวัย IJ และประสิทธิภาพในการทำลายแมลงสูงกว่าการเพาะเลี้ยงด้วยต้นเชื้อที่ผลิตมาจากแมลงอาศัย

วัชร และสุทธิชัย 2544. ได้ศึกษาวิธีการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ต้นเชื้อบริสุทธ์ ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ เข้าทำลายหนอนกิ้งกักรังผึ้ง หลังจากแมลงตายแล้วจะไม่ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตขยายพันธุ์ต่อไปตลอดอายุขัยในเหยื่อของมันดังเช่นวิธีการผลิตต้นเชื้อจากแมลงอาศัย แต่จะทำการผ่าตัวหนอนที่ตายในช่วงที่ไส้เดือนฝอยเพศเมียได้รับการผสมพันธุ์และสร้างไข่เต็มท้อง ทำการแยกเอาเฉพาะเพศเมียเหล่านี้ออกมา แล้วทำการแยกไข่ที่ได้รับการผสมออกจากตัวแม่พันธุ์ นำไข่ที่ได้ไปฟักในอาหารเหลวภายใต้สภาพปลอดเชื้อ จนได้ตัวอ่อนวัย 1 (ช่วงนี้เป็นการตัดตอนการปนเปื้อนจากการที่ตัวอ่อนอาศัยอาหารในตัวแมลงที่ตาย เพื่อการเจริญเติบโตต่อไป) จึงนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้นในสภาพปลอดเชื้อเช่นกัน จนพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่บริสุทธ์ ขั้นตอนสุดท้ายนำวัย IJ ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารแข็งกึ่งเหลวหรือในอาหารเหลว ให้ได้ปริมาณมากพอในการนำไปใช้เป็นต้นเชื้อ จะเห็นได้ว่า การผลิตต้นเชื้อที่บริสุทธ์นั้นประกอบด้วยหลายขั้นตอน แต่ละขั้นตอนมีเทคนิคเฉพาะและใช้อุปกรณ์เครื่องมือค่อนข้างซับซ้อน นอกจากนี้มีหลายปัจจัยที่มีผลกระทบในการผลิต ฉะนั้นจุดประสงค์ของการทดลองนี้ ก็เพื่อที่จะพัฒนากระบวนการผลิตในแต่ละขั้นตอนให้มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น พร้อมทั้งปรับปรุงปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการผลิตและอุปกรณ์ในการผลิตให้มีความเหมาะสมในการที่จะผลิตไส้เดือนฝอยต้นเชื้อให้มีมาตรฐานทั้งปริมาณและคุณภาพ ต้นทุนต่ำ ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญในการนำไปสู่ความสำเร็จของการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับอุตสาหกรรม

วิธีดำเนินการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ ตู้บ่มไข่เชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องซังไฟฟ้า centrifuge vortex mixer
2. อุปกรณ์เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ beaker, cylinder, flask, test tube, pasture pipette, petridish
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth (ภาคผนวก)
4. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
5. ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (II)
6. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila*
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ Ringer's solution, Steriled egg's solution (ภาคผนวก)
8. อุปกรณ์อื่นๆ เช่น ถาดนับไส้เดือนฝอย ฝ้ายกรองขนาด 48 ไมครอน เข็มเขี่ย จุกสำลี จุกยาง กระดาษอลูมิเนียม petridish, paraffin film, counter, multi-well plate, auto pipette+tip

งานวิจัยนี้ประกอบด้วย 5 การทดลองตามขั้นตอนต่างๆ ของกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอย ดันเชื้อที่บริสุทธิ์ตามที่กล่าวมาแล้ว ดังนี้

1. ศึกษาผลของอัตราความเข้มข้นและวิธีการให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายแมลง (infection) ต่อการ พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย (sex ratio) ปริมาณไข่ที่ตัวเมียสร้างและการขยายพันธุ์ใน ตัวแมลง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย (2×5) 10 วิธีการๆ ละ 10 ซ้ำ (1 ซ้ำ=หนอน 1 ตัว)

ปัจจัย A อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอยที่ใช้ 5 ระดับ คือ

- ใช้อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 100 ตัว/หนอน 1 ตัว
- ใช้อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 200 ตัว/หนอน 1 ตัว
- ใช้อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 400 ตัว/หนอน 1 ตัว
- ใช้อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 600 ตัว/หนอน 1 ตัว
- ใช้อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 800 ตัว/หนอน 1 ตัว

ปัจจัย B วิธีการที่ให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายแมลง 2 (infection) วิธีการ คือ

วิธีการที่ 1.1 หยดไส้เดือนฝอยลงบนกระดาษกรองแล้วปล่อยหนอนกินรังผึ้งลงบนกระดาษกรองเพื่อให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายหนอนทางช่องเปิดตามธรรมชาติ ปาก ทวาร รูหายใจข้างลำตัว (penetration method)

วิธีการที่ 1.2 ฉีดไส้เดือนฝอยเข้าในช่องว่างภายในลำตัว (haemocoel) หนอนกิน
รังผึ้งโดยตรง (injection method)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1- ถาดหลุมที่ใช้ในการทดลอง (multi-well plate) มี 20 หลุม แต่ละหลุมมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 ซม. สูง 2.0 ซม. (ปริมาตร 4.0 ลบ.ซม.) และรองพื้นด้วยกระดาษกรอง

2- เตรียม nematode suspension (ปัจจัย A) ให้มีความหนาแน่น 5,000 10,000 20,000 30,000 และ 40,000 ตัวต่อน้ำ 1 มล. สำหรับการทดลองตามวิธีการที่ 1.1 (ปัจจัย B) โดยหยดแต่ละอัตราความเข้มข้นปริมาณ 0.02 มล. ลงบนกระดาษกรองในแต่ละหลุม แล้วปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 5 ลงไป 1 ตัว/หลุม (หลุมละ 1 ชั่ว) ปิดฝาถาดหลุมแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 4 วัน 10 ชั่วแรก สำหรับการศึกษการพัฒนาเป็นเพศผู้และเพศเมีย (sex ratio) และอีก 10 ชั่ว สำหรับการศึกษการขยายพันธุ์ (ปริมาณ) ของไส้เดือนฝอยในตัวแมลง

3- เตรียม nematode suspension (ปัจจัย A) ให้มีความเข้มข้น 10,000 20,000 40,000 60,000 และ 80,000 ตัว/น้ำ 1 มล. สำหรับการทดลองตามวิธีการที่ 1.2 (ปัจจัย B) โดยการฉีดไส้เดือนฝอยโดยใช้เข็มฉีดยา เข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวหนอนโดยตรง ในอัตรา 0.01 มล./หนอน 1 ตัว แล้วปล่อยลงในหลุม ปิดฝาถาดหลุมแล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 3 วัน 10 ชั่ว สำหรับการศึกษการพัฒนาเป็นเพศผู้และเพศเมีย และอีก 10 ชั่ว สำหรับการศึกษการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย

4- การศึกษาอัตราเพศผู้และเพศเมียในตัวหนอนที่ตายตามวิธีการปล่อยให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายแมลงทางช่องเปิดธรรมชาติ (ตามวิธีการที่ 1.1) และการฉีดเข้าไป (ตามวิธีการที่ 1.2) โดยการนำหนอนที่ตายด้วยไส้เดือนฝอยด้วยวิธีการทั้ง 2 มาล้างทำความสะอาดผิวลำตัวภายนอก ด้วยการจุ่มลงในแอลกอฮอล์ 75% แล้วนำมาวางบนฝา petridish ใช้เข็มเย็บผนังลำตัวให้แตกออก ทำการนับจำนวนเพศผู้และเพศเมียในหนอนแต่ละตัว

5- การศึกษาปริมาณไข่ที่สร้างโดยเพศเมียในตัวหนอนแต่ละตัว (ชั่ว) ของทั้ง 2 วิธีการ คัดเลือกเฉพาะเพศเมียที่มีไข่ ทั้งหมดจากหนอนแต่ละตัว ใส่ลงในหลอดทดลอง เติมน้ำยา Ringer's solution 5 มล. นำไปวางบนเครื่องปั่น (vortex) ลำตัวไส้เดือนฝอยเพศเมียแตกออก ไข่จะหลุดออกมาทั้งหมด เติม Ringer's solution ให้ได้ปริมาตร 10 มล. เท่ากันทุกชั่ว จากนั้นนำไปนับจำนวนไข่ทั้งหมดที่ได้แต่ละชั่ว

6- การศึกษการขยายพันธุ์หรือปริมาณของไส้เดือนฝอยในตัวหนอนแต่ละตัวของทั้ง 2 วิธีการ (ปัจจัย B) นำหนอนที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย (จากข้อ 2 และ 3) มาวางบนผ้ากรองที่ปูบนจาน petridish ซึ่งวางคว่ำลงในกล่องพลาสติกซึ่งมีน้ำหล่อไว้สูงประมาณ $\frac{3}{4}$ ของความสูงจานแก้ว กล่องละ 1 ตัว (ชั่ว) ปิดฝากล่อง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 วัน จนกระทั่งไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ II แล้วออกจากซากหนอนทั้งหมด จึงทำการตรวจนับจำนวน

ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากหนอนแต่ละตัว แล้วนำมาทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บได้

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอยเพศผู้ และเพศเมียที่ตรวจนับได้จากหนอน 1 ตัว ในแต่ละวิธีการ
- บันทึกจำนวนไข่ที่ได้จากไส้เดือนฝอยเพศเมีย 1 ตัว ในแต่ละวิธีการ
- บันทึกปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IV ที่ได้จากหนอน 1 ตัว ในแต่ละวิธีการ
- บันทึกคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ในแต่ละวิธีการ โดยดูจากประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller (1989) ใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกิ้งรังผึ้ง (*G. mellonella*) วัย 5 จำนวน 1 ตัว ในถาดหลุม (24 หลุม/ถาด) ที่ 48 ชั่วโมง

2. ศึกษาปริมาณไข่ที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอยที่นำลงเพาะฟักด้วยอาหารเทียมในถาดหลุม กับเปอร์เซ็นต์การพัฒนเป็นตัวอ่อนวัย 1

แต่ละหลุมของถาดหลุมที่ใช้ในการเพาะฟักมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 1.6 ซม. สูง 2.0 ซม. (ปริมาตร 4.0 ซม.³)

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ ซ้ำละ 10 หลุม 4 วิธีการ ดังนี้

- 2.1 เพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยจำนวน 230 ฟอง/หลุม
- 2.2 เพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยจำนวน 460 ฟอง/หลุม
- 2.3 เพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยจำนวน 690 ฟอง/หลุม
- 2.4 เพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยจำนวน 920 ฟอง/หลุม

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- นำหนอนกิ้งรังผึ้ง วัย 5 นิดไส้เดือนฝอยอัตรา 100 200 400 และ 600 ตัว/หนอน 1 ตัว เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ 1 วิธีปฏิบัติการทดลองข้อที่ 3- เมื่อนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C ครบ 3 วัน ทำการผ่าหนอนกิ้งรังผึ้งที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย เขี่ยคัดเลือกเอาเฉพาะไส้เดือนฝอยเพศเมียที่มีไข่สมบูรณ์แล้วนำมาล้างให้สะอาดด้วยสารละลาย Ringer's solution

- นำไส้เดือนฝอยเพศเมียที่ล้างสะอาดแล้วในแต่ละวิธีการ ใส่ลงในหลอดทดลอง แล้วทำการสั่นบนเครื่อง vortex ให้ลำตัวไส้เดือนฝอยเพศเมียแตก เพื่อให้ไข่หลุดออกมา

- นำมากรองด้วยผ้ากรองที่มีความละเอียดขนาด 48 ไมครอน เพื่อแยกชิ้นส่วนที่เป็นเนื้อเยื่อแมลงออกจากนั้นนำส่วนที่ผ่านผ้ากรองใส่ลงใน micro tube แล้วปั่นตกตะกอนด้วยเครื่อง centrifuge ความเร็ว 2,000 รอบ/นาที นาน 2 นาที ดูดน้ำส่วนบนทิ้งแล้วล้างด้วยสารละลาย Ringer's solution จนได้ไข่ที่สะอาด

- ขั้นตอนต่อไปดำเนินการในตู้เชื้อ โดยล้างด้วยสารละลาย Steriled egg's solution 2 ครั้ง จากนั้นนับจำนวนไข่แล้วนำลงเพาะเลี้ยงในถาดหลุมตามแต่ละวิธีการ ซึ่งแต่ละหลุมมี Ys broth 1 มล. ทำซ้ำละ 10 หลุม ปิดฝาแล้วปิดทับด้วย paraffin film นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนไข่เดือนฝอยวัย 1 ที่ฟักออกจากไข่ ในแต่ละวิธีการหลังการเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน

3. ศึกษาอัตราการขยายพันธุ์ของต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย 1 (inoculum) ที่ใส่ลงเลี้ยงในปริมาณต่างกันในกลุ่มเลี้ยงที่มีขนาดเท่ากับอาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลวในปริมาณที่เท่ากัน

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 วิธีการ 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 กลุ่ม) ดังนี้

4.1 ไส้เดือนฝอยวัย 1 จำนวน 8,000 ตัว/อาหาร 16 กรัม/กลุ่ม

4.2 ไส้เดือนฝอยวัย 1 จำนวน 16,000 ตัว/อาหาร 16 กรัม/กลุ่ม

4.3 ไส้เดือนฝอยวัย 1 จำนวน 24,000 ตัว/อาหาร 16 กรัม/กลุ่ม

4.4 ไส้เดือนฝอยวัย 1 จำนวน 32,000 ตัว/อาหาร 16 กรัม/กลุ่ม

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- ทำการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย 1 ดังเช่นในการทดลองที่ 2

- เตรียมอาหารเหลว Ys broth ประมาณ 150 มล. ใส่ในขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. อบนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave) นำแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus nematophila* ซึ่งแยกจากน้ำเลือดแมลงที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย ใส่ลงในอาหารเหลวแล้วนำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจะขยายปริมาณแบคทีเรียได้ประมาณ 10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล.

- เตรียมอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวตามสูตรของวัชรวิ (2538) นำมาคลุกกับแผ่นฟองน้ำ โดยใช้อาหารดังกล่าว 16 กรัมต่อฟองน้ำ 1 แผ่น (ขนาด 3 x 5 ซม.) วางฟองน้ำบนตะแกรงในกลุ่มสแตนเลส ขนาด 14 x 18 x 5 ซม. พร้อมปิดฝาให้สนิท นำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว

- เมื่ออาหารเย็นลง ทำการหยด symbiotic bacteria ลงในอาหารเทียมกลุ่มละ 2 มล. นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 2 วัน

- นำต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย 1 ที่เตรียมไว้ลงเลี้ยงในอาหารเทียมบนแผ่นฟองน้ำ ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ในอัตราต่างๆตามแผนการทดลอง ไส้เดือนฝอยวัย 1 ที่ใส่ลงเลี้ยงจะ

พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยซึ่งจะผสมพันธุ์วางไข่ ไข่ฟักออกเป็นตัวอ่อนวัย 1 แล้วพัฒนาเป็นวัย II ใช้เวลา 9 วัน ในช่วงนี้ทำการเติมน้ำกลั่นที่อบนิ่งมาเชื้อแล้วลงในกล่อง 10 มล. นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°C

- จากนั้น 2 วัน ทำการเก็บไข่เดือนฝอยวัย II ซึ่งจะเคลื่อนย้ายลงมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ข้างล่างตะแกรง โดยการเทน้ำที่มีไข่เดือนฝอยเก็บในขวดแก้ว แล้วเติมน้ำอีก 10 มล. ลงในกล่องอาหารเทียมอีกครั้ง

- ทำการเทไข่เดือนฝอยวัย II จากกล่องอาหารวันเว้นวันจนไม่พบไข่เดือนฝอยที่เคลื่อนย้ายลงมาอยู่ในน้ำอีกต่อไป (ประมาณ 3 ครั้ง)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนผลผลิตไข่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ในทุกวิธีการ

4. เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตและคุณภาพของไข่เดือนฝอยที่เลี้ยงขยายพันธุ์ได้จากการใช้ต้นเชื้อบริสุทธิ์ และต้นเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัย

วางแผนการทดลองแบบ CRD 4 กรรมวิธี 5 ซ้ำ ดังนี้

- 5.1 เพาะเลี้ยงไข่เดือนฝอยในระดับขวดเขย่า โดยใช้ต้นเชื้อไข่เดือนฝอยบริสุทธิ์
- 5.2 เพาะเลี้ยงไข่เดือนฝอยในระดับขวดเขย่า โดยใช้ต้นเชื้อไข่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัย
- 5.3 เพาะเลี้ยงไข่เดือนฝอยในระดับถังหมัก ขนาด 6 ลิตร โดยใช้ต้นเชื้อไข่เดือนฝอยบริสุทธิ์
- 5.4 เพาะเลี้ยงไข่เดือนฝอยในระดับถังหมัก ขนาด 6 ลิตร โดยใช้ต้นเชื้อไข่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัย

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- ทำการผลิตต้นเชื้อไข่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ ตามการทดลองที่ 1-3 ดังกล่าวข้างต้น จนได้ไข่เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ เพื่อการทดลอง

- ทำการผลิตต้นเชื้อไข่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัย โดยใช้หนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* ตามวิธีการของ วังรี (2544)

- เตรียมต้นเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus nematophila* จากลำไส้ของต้นเชื้อไข่เดือนฝอย ที่บริสุทธิ์และต้นเชื้อไข่เดือนฝอยที่ได้จากแมลงอาศัย

- อาหารเหลวสูตร Tsb₃ (วังรี และสุทธิชัย, 2544) ซึ่งประกอบด้วย

Tryptic soy broth	0.75%
Yeast cell	0.50%
Egg	6.67%
Corn oil	0.20%

Distilled water 100%

- เตรียมอาหารเหลว Tsb₃ ใส่ในขวด flask ขนาด 125 มล. ขวดละ 15 มล. ปิดจุก นำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121°C เป็นเวลานาน 21 นาที

- เตรียมอาหารเหลว Tsb₃ ใส่ในถังหมัก ขนาด 6 ลิตร ของ B. Braun รุ่น Biostat B แบบ stirred - tank ประกอบด้วยชุด control unit ควบคุมปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ อัตราการไหลเข้าของอากาศ ความเร็วในการกวนอาหารของใบพัด ระดับปริมาณออกซิเจนที่ละลายในอาหาร ตามวิธีการของวัชร และสุทธิชัย (2544)

- เลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียร่วมอาศัย ที่เตรียมไว้ ทั้งในการทดลองในขวดเขย่าและในถังหมักขนาด 6 ลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน แล้วทำการใส่ไส้เดือนฝอยต้นเชื้อลงไปเลี้ยงร่วมกันตามแผนการทดลอง 4 วิธีการ ดังกล่าวข้างต้น ปรับอุณหภูมิและปัจจัยต่างๆ ในการเลี้ยงเช่นเดียวกับการทดลองของ วัชร และสุทธิชัย (2544) เป็นเวลาประมาณ 12 วัน จนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ II 100% จึงทำการเก็บผลผลิตและนับผลผลิตที่ได้ในทุกวิธีการ

- ทำการทดสอบคุณภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ในทุกวิธีการ โดยดูจากประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller (1989) ใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกิ้งกิ้ง (G. mellonella) วัย 5 จำนวน 1 ตัว/หลุม (24 หลุม/ถาด) ที่ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบจำนวนหนอนกิ้งกิ้งที่ตายในทุกวิธีการ ทำ 5 ซ้ำ (5 ถาด)/วิธีการ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอย ที่เพาะเลี้ยงได้ในทุกวิธีการ
- บันทึกคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละวิธีการ (ไส้เดือนฝอย 1 ตัว : หนอน 1 ตัว ที่ 48 ชม.)

5. เปรียบเทียบปริมาณผลผลิตและคุณภาพในของไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงโดยใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ในอาหารเหลวติดต่อกัน 4 รุ่น (generation) ($F_1 - F_4$)

วางแผนการทดลองแบบ RCB มี 4 วิธีการ คือ การเพาะเลี้ยงด้วยต้นเชื้อรุ่นลูกช่วงที่ 1, 2, 3, และ 4 แต่ละวิธีการมี 10 ซ้ำๆ ละ 1 ขวด

วิธีปฏิบัติการทดลอง

- เตรียมอาหารเหลว Tsb₃ ใส่ในขวด flask ขนาด 125 มล. ขวดละ 15 มล. เข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว นานเป็นเวลา 21 นาที ทิ้งอาหารให้เย็นลง

- เตรียมแบคทีเรียร่วมอาศัย โดยการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว Ys broth ดังเช่นวิธีการของการทดลองที่ 3

- เตรียมต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ (inoculum) ตามวิธีการของการทดลองที่ 4 จนได้ไส้เดือนฝอยวัย II ครั้งแรก ถือว่า เป็น F_1 ซึ่งเตรียมจากการนำไข่ที่แยกจากแม่พันธุ์โดยตรงมาฟักและเลี้ยงจนได้ II ครั้งแรก

- การเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์หรือปริมาณไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์รุ่นที่ 1 (F_1) ตามขั้นตอนดังนี้

- ทำการใส่แบคทีเรียร่วมอาศัยที่เตรียมไว้ลงในอาหารเหลว Tsb₃ ขวดละ 1 มล. ซึ่งมีแบคทีเรีย 10^7 เซลล์ นำไปเขย่าต่อที่ความเร็ว 120 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วใส่ไส้เดือนฝอยต้นเชื้อบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้ (F_1) ในอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ลงเลี้ยงร่วมกัน ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 12 วัน จนได้ไส้เดือนฝอยวัย II ทั้งหมด ถือว่าเป็น F_2

- นำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้จากครั้งแรก (F_2) มาเป็นต้นเชื้อของการเลี้ยงครั้งที่ 2 ฉะนั้น II ที่เลี้ยงขยายพันธุ์ได้จะเป็น F_3

- นำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้จากครั้งที่ 2 (F_3) มาเป็นต้นเชื้อของการเลี้ยงขยายปริมาณครั้งที่ 3 ฉะนั้น II ที่เลี้ยงขยายพันธุ์ได้จะเป็น F_4

- ทำการนับไส้เดือนฝอยวัย II หรือผลผลิตที่เลี้ยงได้แต่ละรุ่นและนำไปทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอย

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ได้ในแต่ละวิธีการ

- บันทึกคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ในแต่ละวิธีการ โดยดูจากประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller (1989) ใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) วัย 5 จำนวน 1 ตัว/หลุม (24 หลุม/ถาด) ที่ 48 ชั่วโมง

ผลการทดลอง

การผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่บริสุทธิ์ ประกอบด้วย กระบวนการที่สำคัญหลายขั้นตอนด้วยกัน ได้แก่ การแยกไข่จากไส้เดือนฝอยเพศเมีย การเพาะฟัก ไข่ไส้เดือนฝอยด้วยวิธีการปลอดเชื้อ การย้ายตัวอ่อนไส้เดือนฝอยวัย 1 ลงเลี้ยงในอาหารเทียม การเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ไว้เป็นต้นเชื้อ ในแต่ละขั้นตอนดังกล่าว ได้มีการศึกษาพัฒนา เทคนิคที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ไส้เดือนฝอยต้นเชื้อบริสุทธิ์ที่มีปริมาณและคุณภาพสูง โดยมี รายละเอียดผลการศึกษาดังนี้

1. ผลของปริมาณไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายแมลงต่อจำนวนไส้เดือนฝอยเพศผู้ เพศเมีย ปริมาณการสร้างไข่ และปริมาณผลผลิตไส้เดือนฝอย (Table 1 และ 2)

การหยดปล่อยให้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะทำลาย (Infective Juvenile หรือ IJ) เข้าสู่ภายใน ลำตัวหนอนทางช่องเปิดธรรมชาติ (penetration method) โดยใช้อัตราความหนาแน่น 100 200 400 600 และ 800 IJs/หนอน 1 ตัว หลังจากหนอนตายทำการตรวจนับ พบไส้เดือนฝอยสามารถเข้าสู่ ภายในตัวหนอนได้ 100 80.3 67.4 67.1 และ 78.9% ตามลำดับ ส่วนวิธีการฉีดไส้เดือนฝอยเข้าสู่ ช่องว่างภายในลำตัวหนอนโดยตรง (injection method) พบว่า ไส้เดือนฝอยสามารถเข้าทำลายได้ ตามปริมาณไส้เดือนฝอยเริ่มต้นที่ฉีดเข้าไป สำหรับอัตราส่วนเพศผู้เพศเมีย (sex ratio) ของไส้เดือน ฝอยที่เข้าทำลายตัวหนอนได้นั้น มีค่าใกล้เคียงกันทั้ง 2 วิธีการ ในทุกระดับความหนาแน่นที่ใช้ โดย อยู่ระหว่าง 1 : 1.1 – 1 : 1.5 ส่วนปริมาณไข่ที่สร้างโดยไส้เดือนฝอยเพศเมีย 1 ตัว พบว่า วิธีการที่ ให้ไส้เดือนฝอยเข้าทำลายหนอนทางช่องเปิดธรรมชาติที่อัตรา 100 IJs/หนอน 1 ตัว พบ เพศเมีย 1 ตัว สร้างไข่ได้ปริมาณสูงสุดเฉลี่ย 838.9 ฟอง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับอัตราไส้เดือน ฝอย 200 400 600 และ 800 IJs/หนอน 1 ตัว ซึ่งมีปริมาณไข่เฉลี่ย 630.7 491.3 254.5 และ 214.1 ฟอง/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ เช่นเดียวกับวิธีการฉีดไส้เดือนฝอยเข้าไปโดยตรง ที่ระดับอัตรา ไส้เดือนฝอย 100 IJs/หนอน 1 ตัว พบ เพศเมีย 1 ตัว สร้างไข่ได้ปริมาณสูงสุดเฉลี่ย 838.7 ฟอง ซึ่ง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ระดับอัตราไส้เดือนฝอย 200 400 600 และ 800 IJs/หนอน 1 ตัว ซึ่งมีปริมาณไข่เฉลี่ย 590.1 339.2 241.4 และ 184.4 ฟอง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบจำนวน ไข่ที่ผลิตได้จากเพศเมียของทั้ง 2 วิธีการ ในทุกระดับความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายตัว หนอน ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ หลังจากหนอนตาย ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายพัฒนา เจริญเติบโต จนอาหารในตัวแมลงหมด จะได้ผลผลิตเป็นวัย IJ ทั้งหมด ผลผลิตเฉลี่ย (IJs)/หนอน 1 ตัว ที่ได้จาก 2 วิธีการเข้าทำลายตัวหนอนของไส้เดือนฝอยที่ต่างกันดังกล่าวมาแล้ว ไม่มีความ แตกต่างทางสถิติที่ทุกระดับอัตราของไส้เดือนฝอยที่ใช้ โดยที่ระดับความหนาแน่น 100 IJs/หนอน 1 ตัว ให้ผลผลิตเฉลี่ยสูงสุด คือ 127,640 และ 112,400 IJs/หนอน 1 ตัว แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก ผลผลิตของระดับความหนาแน่นที่สูงกว่าทั้งหมด ซึ่งผลผลิตที่ได้ลดลงเมื่ออัตราไส้เดือนฝอยที่เข้า

ทำลายตัวหนอนสูงขึ้นตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยจากวิธี penetration และ injection ในทุกระดับความหนาแน่นไม่แตกต่างกันทางสถิติทั้งวิธีการเดียวกันและระหว่างทั้ง 2 วิธีการ คือ อยู่ในช่วง 50.0 – 56.7%

2. ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไข่ที่เพาะฟัก ในถาดหลุมกับเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นไส้เดือนฝอยวัย 1 พบว่า วิธีการเพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยอัตรา 920 ฟอง/หลุมในอาหาร Ys broth สามารถฟักเป็นวัย 1 สูงสุด 680 ตัว คิดเป็น 73.9% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากวิธีการเพาะฟักไข่ในอัตรา 690 460 และ 230 ฟอง/หลุม ซึ่งสามารถฟักเป็นวัย 1 ได้จำนวน 461 268 และ 68 ตัว คิดเป็น 66.8 58.3 และ 29.6% ตามลำดับ ซึ่งแต่ละระดับแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกันด้วย (Table 3)

3. ศึกษาอัตราการขยายพันธุ์ของดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย 1 ที่นำลงเลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพปลอดเชื้อ พบว่าวิธีการใส่ไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย 1 อัตรา 8,000 IJs/กล่อง สามารถให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ เพิ่มขึ้น 850 เท่า (7,470,000 IJs/กล่อง) สูงสุด และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการใส่อัตรา 16,000 24,000 และ 32,000 IJs/กล่อง ซึ่งได้ผลผลิตไส้เดือนฝอย เพิ่มขึ้น 467 เท่า (7,470,000 IJs/กล่อง) 253 เท่า (6,080,000 IJs/กล่อง) และ 176.6 เท่า (5,650,000 IJs/กล่อง) ตามลำดับ (Table 4)

4. เปรียบเทียบผลผลิตและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยวัย IJ ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดินเชื้อไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์และดินเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัย ในอาหารเหลว Tsb₃ ทั้งในระดับขวดเขย่าขนาด 125 มล. และในถังหมักขนาด 6 ลิตร พบว่าในระดับขวดเขย่า ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ใช้ดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ให้ผลผลิต 349,200 IJs/อาหาร 1 มล. หรือประมาณ 349.2 เท่าของปริมาณดินเชื้อที่ใส่ลงไป ซึ่งสูงกว่าผลผลิตที่ใช้ดินเชื้อจากแมลงอาศัย 326,600 IJs/อาหาร 1 มล. แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนการเพาะเลี้ยงในระดับถังหมัก 6 ลิตร ดินเชื้อบริสุทธิ์ให้ผลผลิต 336,860 IJs/อาหาร 1 มล. (337 เท่าของปริมาณดินเชื้อ) สูงกว่าการเพาะเลี้ยงดินเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งให้ผลผลิต 229,223 IJs/อาหาร 1 มล. (229.2 เท่าของปริมาณดินเชื้อ) ส่วนคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ได้ทุกวิธีการอยู่ในระดับ 42.5 - 47.6% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (Table 5)

5. เปรียบเทียบปริมาณและประสิทธิภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการเพาะเลี้ยงดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์เลี้ยงติดต่อกัน 4 รุ่น (F₁- F₄) รุ่นที่ 1 (F₁) รุ่นที่ 2 (F₂) และรุ่นที่ 3 (F₃) ให้ผลผลิตใกล้เคียงกัน คือ 299,000 283,200 และ 284,100 IJs/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ และเมื่อเลี้ยงต่อถึงรุ่นที่ 4 (F₄) ผลผลิตลดลงซึ่งได้เพียง 180,200 IJs/อาหาร 1 มล. แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรุ่นที่ 1 2 และ 3 (Table 6) เช่นเดียวกันกับคุณภาพของไส้เดือนฝอย ในรุ่นที่ 1 2 และ 3 อยู่ในระดับ 46 - 60% ได้มาตรฐาน ตามวิธีการของ Miller (1989) แต่เมื่อเลี้ยงต่อถึงรุ่นที่ 4 คุณภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยจะลดลงต่ำกว่ามาตรฐาน คือ 30.8% ฉะนั้นการนำดินเชื้อ

ไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์ ไปเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเทียม จึงไม่ควรนำไปเพาะเลี้ยงติดต่อกันกว่า 3 ชั่วโมง

วิจารณ์ผลการทดลอง

การพัฒนาวิธีการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ *Stienernema carpocasae* เพื่อการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณในระดับอุตสาหกรรมนั้น มุ่งเน้นในการที่จะคิดค้นเทคนิคที่เหมาะสม มีประสิทธิภาพในการที่จะให้ได้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอยดังกล่าว มีคุณภาพและปริมาณสูง ตามที่ได้ทดลองเพื่อเปรียบเทียบวิธีการให้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะทำลาย (Infective juvenile (IJ)) เข้าทำลายหนอนกินรังผึ้งวัย 5 โดยวิธีการแรกนั้นได้ทำการหยดเพื่อปล่อยให้ไส้เดือนฝอยเข้าสู่ภายในลำตัวแมลง (penetration) ทางช่องเปิดธรรมชาติของแมลง ได้แก่ ปาก รูหายใจ (spiracle) และช่องทวาร (anus) ฉะนั้นไส้เดือนฝอยจะต้องค้นหาตัวแมลงให้พบเสียก่อน Gaugler *et al.* (1980) ได้สังเกตว่าระดับ CO₂ สามารถที่จะดึงดูดไส้เดือนฝอย *S. carpocasae* มารวมกลุ่มกันได้ การที่ไส้เดือนฝอยค้นหาแมลงและเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องหายใจ อาจเนื่องมาจากความเข้มข้นของ CO₂ ตรงบริเวณช่องรูหายใจมีส่วนในการดึงดูดไส้เดือนฝอย Schmidt and All (1978, 1979) รายงานว่าส่วนประกอบของสิ่งขับถ่ายของแมลง ซึ่งมี uric acid, xanthine, allantoin, ammonia และ arginic acid สามารถที่จะดึงดูดไส้เดือนฝอยวัย IJ มารวมกลุ่มกันได้เช่นเดียวกัน นอกจากนี้ระดับอุณหภูมิมีส่วนช่วยให้ไส้เดือนฝอยค้นหาแมลงได้ด้วย (Byers and Poiner, 1982) เมื่อพบแมลงไส้เดือนฝอยวัย IJ ก็จะเข้าทางช่องเปิดธรรมชาติของแมลง ในแมลงบางชนิดตรงส่วนภายในช่อง spiracle มีอวัยวะคล้ายแผ่นตระแกรงสำหรับกรองสิ่งแปลกปลอมที่ติดไปกับอากาศที่หายใจเข้าไป ซึ่งทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถเข้าทำลายช่องเปิดนี้ได้ Georgis (1987) พบว่าผนังของ proventriculus ที่มีลักษณะแข็ง ซึ่งใช้บดอาหารให้ละเอียดก่อนที่จะถูกส่งผ่านไปย่อยที่กระเพาะส่วนกลาง โครงสร้างนี้จะเป็นอุปสรรคต่อไส้เดือนฝอยที่เข้าทำลายทางช่องปาก อย่างเช่น แมลงสาบ ส่วนวิธีการที่สอง ซึ่งใช้เข็มฉีดฉีดไส้เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง (Haemocoel) โดยตรง วิธีการนี้ทำให้แมลงตายเร็วกว่าวิธีการแรก 1 วัน (จากการสังเกต) เนื่องจากไส้เดือนฝอยไม่ต้องเสียเวลาในการเคลื่อนย้ายเข้าสู่ภายในตัวแมลงดังเช่นในวิธีการแรก แต่มีข้อเสียเปรียบคือ ต้องมีความชำนาญในการฉีด ส่วนปริมาณของไส้เดือนฝอยที่สามารถเข้าทำลายแมลงได้ ในวิธีการแรกนั้น จะเห็นได้ว่า การใช้ไส้เดือนฝอย 100 IJs/หนอน 1 ตัว ไส้เดือนฝอยทุกตัวสามารถเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงได้ แต่ถ้าใช้อัตราสูงกว่านี้ไส้เดือนฝอยสามารถเข้าทำลายแมลงประมาณ 67-80% เท่านั้น ส่วนที่เหลือก็จะตายในเวลาต่อมา เนื่องจากขาดความชื้น หลังจากแมลงตาย ไส้เดือนฝอยวัย IJ ก็จะพัฒนาต่อไปเป็นตัวเต็มวัยเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งจะผสมพันธุ์กัน ตัวเมียสร้างไข่ จะเห็นได้ว่า การให้ไส้เดือนฝอยในอัตรา

100 IJs/หนอน 1 ตัว เข้าทำลายแมลงทั้ง 2 วิธีการ เพศเมีย 1 ตัว สร้างไข่ได้เป็นปริมาณสูงสุดเฉลี่ยประมาณ 839 ฟอง เนื่องจากอาหารในตัวหนอนมีจำกัด ถ้าไส้เดือนฝอยมีปริมาณที่มากเกินไป มีการแย่งแย่งอาหารกัน การได้รับอาหารไม่พอเพียงทำให้การสร้างไข่ลดลง ในการทดลองนี้ อัตราส่วนระหว่างเพศผู้และเพศเมีย ของวิธีการทดลองทั้งหมดอยู่ระหว่าง 1:1.1 – 1:1.5 ซึ่งไม่มีผลต่อการสร้างไข่ของเพศเมีย เนื่องจากเพศผู้ 1 ตัว สามารถผสมกับเพศเมียได้หลายตัว (วัชร และสุทธิชัย, 2544) และเมื่อปล่อยให้ไส้เดือนฝอยพัฒนาต่อไปจนอาหารในตัวแมลงหมด ไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่วัย II ทั้งหมด ออกจากตัวหนอน จากการนับผลผลิตในช่วงนี้ จะเห็นได้ว่า การใช้ไส้เดือนฝอยอัตรา 100 IJs/หนอน 1 ตัว ให้ผลผลิตสูงสุดทั้ง 2 วิธีการ สืบเนื่องจากการที่เพศเมียสร้างไข่ได้เป็นปริมาณสูงสุดตามที่กล่าวมาแล้ว ช่วงสำคัญที่จะได้ดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ คือ การแยกไข่ออกจากเพศเมีย ก่อนที่จะฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ในตัวแมลงที่ตาย ถ้าฟักเป็นตัวอ่อนแล้วมันจะเริ่มกินเนื้อเยื่อแมลงเป็นอาหาร ซึ่งจะเกิดการปนเปื้อนในระบบทางเดินอาหารของมัน ไข่ที่แยกออกมาต้องนำมาเพาะฟักด้วยอาหารเหลวในสภาพปลอดเชื้อ ภาชนะที่ใช้คือถาดหลุม แต่ละหลุมมีปริมาตร 4.0 ซม.³ ตามปกติแล้วมีการใช้ถาดหลุมสำหรับการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยเท่านั้น ถ้าสามารถนำมาใช้ในการเพาะฟักได้ก็จะมีประโยชน์มากขึ้น จากผลการทดลอง การใส่ไข่อัตรา 920 ฟอง/1 หลุม มีเปอร์เซ็นต์การฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 สูงสุด คือ 74% เมื่อได้ไส้เดือนฝอยวัย 1 แล้ว จำเป็นต้องนำไปเพาะเลี้ยงให้ได้ไส้เดือนฝอยวัย II บริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณมากที่สุด โดยใช้อาหารแข็งกึ่งเหลวในสภาพปลอดเชื้อเช่นกัน และได้คัดเลือกถาดแสดงเลขที่มีขนาด 14 x 18 x 5 ซม. ที่มีขายอยู่ในท้องตลาด ราคาไม่แพง มาปรับใช้เพาะเลี้ยงขยายปริมาณดังกล่าว ปรากฏว่าใช้ไส้เดือนฝอยวัย 1 อัตรา 16,000 ตัว/ถาด จะได้ผลผลิตเป็น II สูงสุด แสดงว่า ปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงมีความเหมาะสมต่อปริมาณไส้เดือนฝอยที่ใช้เป็นต้นเชื้อ เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (วัชร และสุทธิชัย, 2544) หลังจากได้ดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ที่เป็นวัย II แล้ว จึงได้นำมาเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบศักยภาพในการให้ผลผลิต ก่อนที่จะนำไปใช้ในการผลิตเพื่อเป็นการค้าต่อไป โดยทำการเพาะเลี้ยงระดับขวดเขย่า (ขนาด 125 มล.) และถึงหมัก 6 ลิตร ด้วยอาหารเหลวเปรียบเทียบกับเพาะเลี้ยงต้นเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัย จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า ดินเชื้อบริสุทธิ์ให้ผลผลิตสูงกว่าดินเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัย ดังเช่น ผลการทดลองของ วัชร และสุทธิชัย 2544. ซึ่งแสดงว่าดินเชื้อที่ผลิตได้สามารถนำไปใช้ผลิตในระดับอุตสาหกรรมได้ เพื่อเป็นการประหยัดในการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณแต่ละครั้งไม่จำเป็นต้องใช้ดินเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ที่ผลิตขึ้นใหม่ทุกครั้ง จึงได้ทำการทดลองเพาะเลี้ยงขยายปริมาณดินเชื้อไส้เดือนฝอยวัย II บริสุทธิ์ ที่ผลิตได้ติดต่อกันหลายรุ่น (generation) โดยใช้ผลผลิตที่ได้แต่ละรุ่นเป็นต้นเชื้อของการเพาะเลี้ยงในรุ่น (ครั้ง) ต่อไป ปรากฏว่าสามารถเพาะเลี้ยงติดต่อกันได้ 3 รุ่น ซึ่งได้ผลผลิตสูงสุดใกล้เคียงกัน และมีประสิทธิภาพสูงกว่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ (40%) ส่วนรุ่นที่ 4 ที่เลี้ยงได้มีปริมาณน้อยกว่า 3 รุ่นแรก ส่วนประสิทธิภาพหรือคุณภาพต่ำกว่ามาตรฐาน ทั้งนี้เนื่องจากการเลี้ยงติดต่อกัน โดยใช้ไส้เดือน

ฝอยกลุ่มเดียวกัน จะมีการผสมพันธุ์กันในกลุ่มเดียวกัน (Inbreed) หลายรุ่นจะมีผลต่อการขยายพันธุ์ และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า inoculum ที่ผลิตได้แต่ละครั้งสามารถนำไปเพาะเลี้ยงขยายปริมาณติดต่อกันได้ไม่เกิน 3 รุ่น

สรุปผลการทดลอง

การพัฒนากระบวนการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ให้มีประสิทธิภาพเหมาะสมตามขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. การให้ไส้เดือนฝอยอัตราต่างๆเข้าทำลายหนอนกิ้งมิ่งวัย 5 โดยวิธีการหยดปล่อยให้ไส้เดือนฝอยเข้าสู่ตัวแมลงเองทางช่องเปิดธรรมชาติ (penetration) และการฉีดไส้เดือนฝอยเข้าช่องว่างภายในลำตัวแมลงโดยตรง (injection) พบว่า หลังจากหนอนตาย การใช้อัตราไส้เดือนฝอย 100 IJs/หนอน 1 ตัว ของทั้ง 2 วิธีการ มีไส้เดือนฝอยเพศเมียสร้างไข่ได้เป็นปริมาณสูงสุด 838.9 และ 838.7 ฟอง/เพศเมีย 1 ตัว ตามลำดับ และสามารถขยายพันธุ์ในตัวหนอนได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยระยะ II สูงสุดเช่นกัน คือ 127,640 และ 112,400 IJs/หนอน 1 ตัว ตามลำดับ ส่วนอัตราเพศผู้: เพศเมีย อยู่ระหว่าง 1:1.1 – 1:1.5 ทั้ง 2 วิธีการที่ทุกระดับความหนาแน่น

2. การเพาะฟักไข่ไส้เดือนฝอยด้วยการใช้ถาดหลุม แต่ละหลุม (เส้นผ่าศูนย์กลาง 1.5 ซม. สูง 2.0 ซม.) บรรจุอาหาร Ys broth 1 มล. ต่อหลุม การใส่ไข่ลงเพาะฟัก 920 ฟอง/หลุม สามารถฟักเป็นตัวอ่อนวัย 1 ได้สูงสุด 73.9%

3. การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 1 เพื่อให้ได้ต้นเชื้อบริสุทธิ์วัย II ซึ่งนำไปใช้ในการผลิตไส้เดือนฝอยเชิงการค้าต่อไป โดยทำการเลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว ซึ่งมีอาหารสุนัขเป็นส่วนประกอบ โดยคลุกอาหาร 16 กรัม กับแผ่นฟองน้ำ วางในกล่องแสดนเลสพร้อมฝาปิดสนิท ในสภาพปลอดเชื้อ ครอบ 15 วัน การใส่ไส้เดือนฝอยวัย 1 อัตรา 8,000 ตัว/กล่อง ให้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย II เพิ่มขึ้น 850 เท่า (6.8 ล้านตัว/กล่อง) สูงสุด

4. การทดลองเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์วัย II เปรียบเทียบกับต้นเชื้อที่ได้จากแมลงอาศัย ในระดับขวดเขย่า (125 มล.) และถังหมัก 6 ลิตร โดยใช้อาหาร Tsb₃ พบว่า การเพาะเลี้ยงด้วยต้นเชื้อบริสุทธิ์ ทั้ง 2 ระดับการเลี้ยง ได้ผลผลิต 349,200 และ 336,860 IJs/อาหาร 1 มล. สูงกว่าต้นเชื้อจากแมลงอาศัย

5. การเพาะเลี้ยงขยายปริมาณต้นเชื้อไส้เดือนฝอยที่บริสุทธิ์วัย II ที่เตรียมได้แต่ละครั้ง ด้วยอาหารเหลวในถังหมัก 6 ลิตร ติดต่อกัน 4 ครั้ง (รุ่น) โดยใช้ผลผลิตที่เลี้ยงได้แต่ละรุ่น เป็นต้นเชื้อของการเลี้ยงในครั้ง (รุ่น) ถัดไป ปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงติดต่อกัน 3 ครั้งแรก จะได้ผลผลิตสูงสุดใกล้เคียงกัน 284,100 – 290,000 IJs/อาหาร 1 มล. และสูงกว่าผลผลิตที่เพาะเลี้ยงได้จากรุ่นที่ 4

(180,200 IJs/อาหาร 1 มล.) เช่นเดียวกับประสิทธิภาพหรือคุณภาพของผลผลิตที่ได้ในชั่วรุ่นที่ 1-3 อยู่ในระดับ 43-60% สูงกว่าของรุ่นที่ 4 (30.8%) ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐาน

Table 1 Comparison of sex ratios of *Steinernema carpocapsae* adult stage developing in a dead insect host (*Galleria mellonella*) infected with different injective juvenile (IJ) concentrations per larva by penetration and infection methods.

Concentrations of IJs/larva	Average number of male and female/larva							
	Penetration method				Injection method			
	Male	Female	M : F	Total	Male	Female	M : F	Total
100	44.2	57.0	1:1.3	101.2	40.7	60.5	1:1.5	101.2
200	68.1	92.4	1:1.4	160.5	91.7	108.8	1:1.2	200.5
400	116.8	152.7	1:1.1	269.5	185.1	229.4	1:1.2	414.5
600	182.1	220.3	1:1.2	402.4	279.5	337.1	1:1.2	616.6
800	282.6	348.8	1:1.2	631.4	361.1	456.3	1:1.3	817.4

Table 2 The numbers of eggs per female, yield and efficacy of infective juvenile (IJ) of *Steinernema carpocapsae* propagated in a *G. mellonella* larva infected with different concentrations of infective juvenile (IJ) per larva by penetration and injection methods.

IJ concentrations per larva	Aver. no. of eggs/female			Aver. no. of yield			Efficacy of IJ (%)**		
	Penetration	Injection	Different	Penetration	Injection	Different	Penetration	Injection	Different
100	838.9 a*	838.7 a*	0.2 ns	127,640 a*	112,400 a*	15,240 ns	53.3 a*	54.2 a*	-0.8 ns
200	630.7 b	590.1 b	40.6 ns	76,120 b	65,600 b	10,520 ns	52.5 a	56.7 a	-4.2 ns
400	491.3 b	339.2 c	152.1 ns	56,960 bc	50,400 b	6,560 ns	50.0 a	53.3 a	-3.3 ns
600	254.5 c	241.4 c	13.2 ns	42,360 bc	34,800 b	7,560 ns	51.7 a	53.3 a	-1.7 ns
800	214.1 c	184.4 c	29.8 ns	28,520 c	26,400 b	2,120 ns	50.0 a	50.0 a	0.0 ns
CV (%)	42.7			53.8			16.7		

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

ns = not significantly

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

Table 3 Numbers of the first stage juvenile (J_1) of *S. carpocapsae* emerging in a culture cell well containing 1 ml Ys broth and added with different number of nematode's eggs.

No. eggs/well	No. emerging J_1 /well	% emergence
230	68 d*	29.6
460	268 c	58.3
690	461 b	66.8
920	680 a	73.9
CV(%)	25.8	

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

Table 4 Yield and multiple increasing of different numbers of the first stage juvenile (J_1) of *S. carpocapsae* cultured with 16 g semi-solid media spread over a sheet of sponge in a closed stainless box for 12 days.

Treatments No. J_1 /16 g media	Yield of nema. (IJ) per 16g media	Multiple increasing yield (%)
8,000	6,800,000 b*	850 a*
16,000	7,470,000 a	466.8 b
24,000	6,080,000 c	253.3 c
32,000	5,650,000 c	176.6 d
CV(%)	7.2	6.3

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

Table 5 Comparison of yield of nematode cultured with liquid medium in shake flask and 6 litre stirred-tank fermenter by using inocula of *S. carpocapsae* produced by pure line techniques and using insect host (*G. mellonella*).

Treatments		Yield (IJ/ml.)	Efficacy of IJ(%)**
Culturing in	Inoculum		
Shake flask	Pure line	349,200 a*	43.3
	Insect host	326,600 a	42.5
Fermenter	Pure line	336,860 a	43.8
	Insect host	229,223 b	47.6
CV(%)		13.5	18.5

Table 6 The quantity and efficacy of each generation of nematode *In Vitro* cultured continuously by using a pure line nematode inoculum.

Generations of nematode inoculum	Quantities of production (IJs/1 ml medium)	Efficacy of IJ (%)**
1 st	290,000 a*	55.8
2 nd	283,200 a	43.3
3 rd	284,100 a	60.0
4 th	180,200 c	30.8
CV(%)	10	16.1

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

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

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิ สมสุข และพิมลพร นันทะ. 2538. เทคนิคใหม่ในการผลิตขยายไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมาก. รายงานผลการค้นคว้าและวิจัย กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 123 – 134.
- วัชรวิ สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ใน: เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 209-244.
- วัชรวิ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2542. ผลของปริมาณแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในอาหารเหลว. วารสารกัญและสัตววิทยา. 21(2):76-83.
- วัชรวิ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2544. ผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า. ใน: รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรมวิชาการเกษตร. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 172 น.
- Byers, J. A. and Poinar, G. O. , Jr. 1982. Location of insect hosts by the nematode, *neoplectana capocapsae*, in response to temperature. Behaviour. 79 : 1-10.
- Chongchitmate, P. 2005. Bionomic of Entomopathogenic Nematode, *Steinernema siamkayai* Stock, Somsook and Reid (n.sp.) and Its Efficacy Against *Helicoverpa armigera* Hübner (Lepidoptera: Noctuidae). M.S. Thesis, Kasetsart University.
- Gaugler, R. , LeBeck, L. , Nakagaki, B. and Boush, G. M. 1980. Orientation of the entomogenous nematode, *neoplectana capocapsae*, to carbon dioxide. Environ. Entomol. 9 : 649-652.
- Miller, R.W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. Journal of Nematology. 21:574. (abstr.)
- Schmidt, J. and All, J.N. 1978. Chemical attraction of *Neoplectana capocapsae*, (Nematoda : Stienernematidae) to insect larvae. Environ. Entomol. 7 : 605-607.
- Schmidt, J. and All, J.N. 1979. Attraction of *Neoplectana capocapsae*, (Nematoda : Stienernematidae) to common excretory products of insects. Environ. Entomol. 8 : 55-61.

1.2 การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ด้วยอาหารเหลวในถังหมัก ขนาด 130 ลิตร

Mass Production of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* (Weiser) *In Vitro* Liquid Culture in 130 Litre Fermenter

บทคัดย่อ

กระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* ในระดับอุตสาหกรรม ด้วยการเพาะเลี้ยงขยายพันธุ์ให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเหลว โดยใช้เทคโนโลยีการหมัก มี 2 ขั้นตอน ขั้นตอนแรกเป็นการเลี้ยง symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophila* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในขั้นตอนต่อไปจึงทำการใส่ไส้เดือนฝอย infective juvenile (IJ) ลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียดังกล่าว ทั้ง 2 ขั้นตอนนี้จำเป็นต้องปรับปัจจัยหรือสภาพการเลี้ยงให้เหมาะสม ผลผลิตสุดท้ายที่ได้ก็คือ ไส้เดือนฝอยวัย IJ เพิ่มขึ้น

ในงานทดลองนี้ ทำการศึกษาผลของการปรับปัจจัยที่สำคัญคือ อัตราการให้อากาศและการกวน ที่ระดับต่างๆ ในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria ต่อการขยายพันธุ์ปริมาณของไส้เดือนฝอยหลังจากใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียดังกล่าว ทำการเพาะเลี้ยงในถังหมักแบบ stirred tank bioreactor ขนาด 130 ลิตร บรรจุอาหารเหลวสูตร Tsb₃ 70 ลิตร ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง ตุลาคม 2547 – กันยายน 2549 ทำการทดลองใน 5 สภาพการเลี้ยง (batch) ที่มีความแตกต่างกันในการให้อากาศและการปรับความเร็วในการกวนช่วงการเลี้ยงแบคทีเรีย ดังนี้ ใน batch ที่ 1 2 3 4 และ 5 มีการปรับอัตราการให้อากาศเฉลี่ย (ช่วง 24 ชั่วโมง) 127.5 109.2 127.1 172.5 และ 162.5 ลิตร/นาที่ (หรือ 1.8 1.6 1.8 2.5 และ 2.3 vvm) ตามลำดับ และปรับอัตราการกวนเฉลี่ย 180 174.6 178.8 195.0 และ 197.5 รอบ/นาที่ ตามลำดับ ส่วนในช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยนั้นมีการปรับสภาพใกล้เคียงกันในทุกๆ batch โดยในช่วงชั่วโมงการเลี้ยงที่ 0-24 24-48 48-72 72-96 96-120 และ 120-312 รักษาระดับ pO₂ ด้วยการปรับปัจจัยต่างๆ ให้อยู่ได้ทีละระดับ 90-100 70-90 10-50 10-30 30-50 และ 50-100% ตามลำดับ

ผลการทดลอง พบว่า การปรับปัจจัยใน batch ที่ 1 2 และ 3 โดยการให้อากาศเฉลี่ยในอัตรา 127.5 109.2 และ 127.1 ลิตร/นาที่ หรือ 1.8 1.6 และ 1.8 vvm ตามลำดับ และปรับการกวนที่ 180 174.6 และ 178.8 รอบ/นาที่ ตามลำดับ ทำให้แบคทีเรียในทุก batch เจริญเพิ่มปริมาณจากปริมาณเริ่มต้นที่ใส่ลงเลี้ยง (inoculum) 10⁷ เซลล์/อาหาร 1 มล. เป็น 10¹⁴ เซลล์/อาหาร 1 มล. ที่ 21 ชั่วโมงของการเลี้ยงซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของ stationary phase และไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงเลี้ยงในสภาพนี้สามารถขยายพันธุ์จากปริมาณเริ่มต้น (inoculum) 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. เพิ่มขึ้นเป็น 161,000 131,000 และ

131,500 ตัว/อาหาร 1 มล. หรือสามารถเพิ่มได้ 161 131 และ 131.5 เท่า ตามลำดับ และทั้ง 3 batch ใช้เวลาในการเลี้ยง 13 วัน ส่วนใน batch ที่ 4 และ 5 ให้อากาศในอัตราเฉลี่ยที่สูงกว่า คือ 172.5 และ 162.5 ลิตร/นาที่ หรือ 2.8 และ 2.3 vvm ตามลำดับ และปรับความเร็วในการกวนเฉลี่ยที่สูงกว่า คือ 195.0 และ 197.5 รอบ/นาที่ ตามลำดับ แบคทีเรียสามารถเจริญแบ่งเซลล์จากปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ลดลงเฉลี่ย 10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล. ได้ปริมาณสูงสุด 10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล. ที่ 18 ชั่วโมงของการเลี้ยง (เร็วกว่าใน batch ที่ 1 2 และ 3) และเริ่มเข้าสู่ระยะ stationary phase ในสภาพนี้ไส้เดือนฝอยสามารถขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณได้เป็น 313,000 302,000 ตัว/อาหาร 1 มล. หรือ 313 และ 302 เท่าของปริมาณเริ่มต้น (inoculum) ตามลำดับ และใช้เวลาในการเลี้ยง 12 วันซึ่งสั้นกว่า แสดงว่า การให้อากาศและการปรับการกวนในอัตราที่สูงมีผลต่อการขยายพันธุ์เพิ่มปริมาณของไส้เดือนฝอยได้ในอัตราที่สูงและระยะเวลาการเก็บผลผลิตที่สั้นกว่า ส่วนคุณภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้จากการทดลองทุก batch อยู่ในระดับมาตรฐานตามวิธีการของ Miller (1989)

คำนำ

จากโครงการพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* ในระดับการค้า วัชร และสุทธิชัย (2544) ได้ดำเนินการทดลองเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยชนิดนี้ด้วยอาหารเหลว ในระดับ shake-flask ขนาด 250 มล. (อาหาร 15 มล.) และขนาด 500 มล. (อาหาร 40 มล.) โดยได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ข้อมูลเกี่ยวกับปัจจัยในการเลี้ยงปริมาณไส้เดือนฝอยนี้ได้นำมาใช้ในการพัฒนาการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอยในระดับถังหมัก 6 ลิตร (อาหาร 3 ลิตร) ผลการทดลองสามารถผลิตไส้เดือนฝอยได้ในระดับไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/มล. เช่นกัน วัตถุประสงค์ของการทดลองในขั้นต่อไปนี้ ก็เพื่อที่จะศึกษาขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอยในถังหมักขนาดใหญ่ขึ้น ซึ่งมีขนาดบรรจุของถังหมัก 130 ลิตร ถือว่าเป็นการวิจัยการผลิตไส้เดือนฝอยในเชิงการค้า โดยการใช้ข้อมูลหรือผลการค้นคว้าทดลองในระดับ shake-flask และถังหมัก 6 ลิตร มาปรับใช้เพื่อให้ได้รับผลสำเร็จในโครงการเช่นเดียวกัน และสามารถถ่ายทอดเทคโนโลยีให้แก่ภาคเอกชนผลิตจำหน่ายให้แก่เกษตรกร และผู้สนใจนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชแทนการใช้สารเคมีฆ่าแมลง

วิธีดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์

- อาหารเลี้ยงเชื้อ symbiotic bacteria (*Xenorhabdus nematophila*)
- อาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอยสูตร Tsb₃ (วัชรวิ และสุทธิชัย, 2544)
- แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus nematophila*
- ไส้เดือนฝอย *Steinernerma carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile = IJ)
- หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
- สารเคมีต่างๆ ได้แก่ hyamine 0.1%, formalin 0.1%, alcohol 75%, Ringer's solution
- ชุดถังหมักแบบ autoclavable stirred tank bioreactor ขนาด 6 ลิตร ของบริษัท B. Braun Biotech International รุ่น Biostat[®] B พร้อมอุปกรณ์ประกอบ ได้แก่ ถังหมักแก้ว หน่วยควบคุม (control unit) ระบบควบคุมอุณหภูมิ (cooling system) ระบบการให้อากาศ (air pump), gas mixing unit, manual sampler, ระบบควบคุม pH, ระบบการกวนซึ่งประกอบด้วยใบพัด 3 ชุด ได้แก่ 6 blade disc impellers, up-pumping impeller และใบพัดกำจัดฟอง ซึ่งทำด้วยแผ่น silicone
- ชุดถังหมัก 130 ลิตร (รูปที่ 1) แบบ In-situ sterilizable stirred tank bioreactor ซึ่งสร้างและประกอบโดยคณะวิศวกร จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น

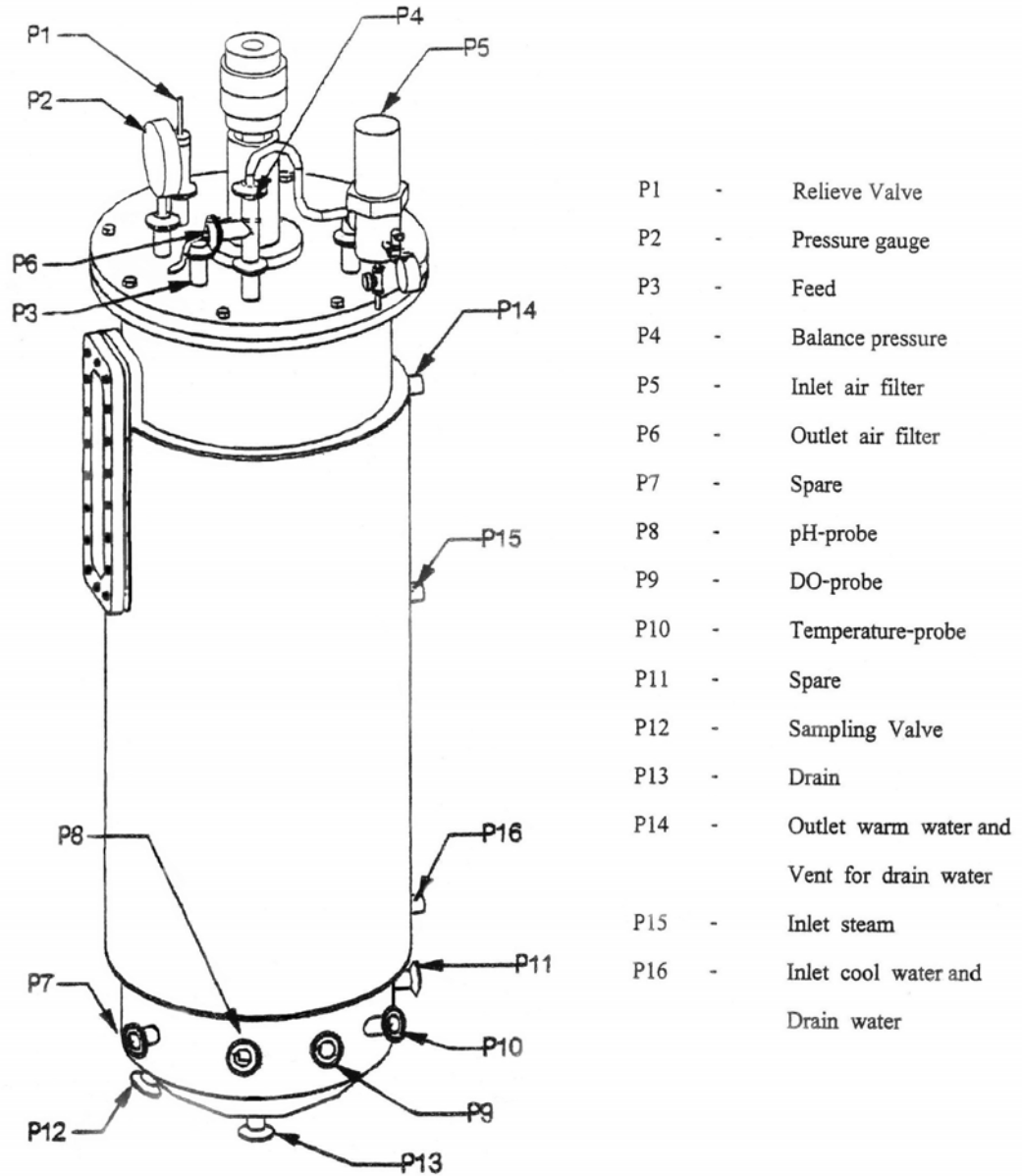
ตัวถัง ทำด้วย stainless steel ขัดผิวมัน ผนังมี 2 ชั้น (double jacket) สำหรับ In-situ sterilization และควบคุมอุณหภูมิ ขอบด้านล่างมี port สำหรับติดตั้งหัววัด (sensor) pO₂ pH และอุณหภูมิ และก๊อกสำหรับเก็บตัวอย่างอาหาร มีช่องกระจก ทำจากวัสดุกระจกนิรภัยหนา 10 มม. ติดตั้งอยู่ช่วงกลางของถังหมัก เพื่อการสังเกตสภาพการทำงานภายในถังหมัก

ฝาถัง (รูปที่ 1, 4) มีอุปกรณ์ต่างๆ ติดตั้งบนฝาถัง ได้แก่

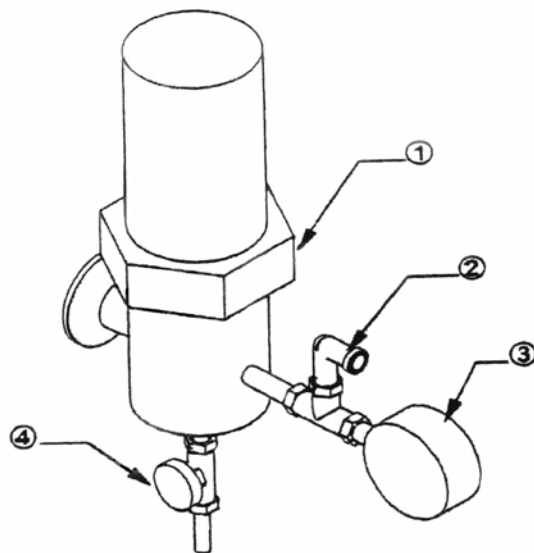
- ชุดวัดความดัน (pressure gauge) และอุณหภูมิภายในถัง
- ชุดอุปกรณ์กรองอากาศที่มาจาก air pump (รูปที่ 2, 3)
- ท่อสำหรับต่อสายยางสำหรับ inoculation เชื้อแบคทีเรีย และไส้เดือนฝอย และการควบคุมความดันในถัง

อุปกรณ์การกวน (รูปที่ 5) ประกอบด้วย

- ใบพัดกวนทำจาก stainless steel มี 2 แบบ คือ ใบพัดกวนมาตรฐาน (6- blade disc impeller) และใบพัดกวนแบบ Up-Pumping impeller
- ใบพัดกำจัดฟองเป็นใบพัดทำด้วยซิลิโคน
- แกนกวนต่อกับมอเตอร์ ขนาด 3 แรงม้า

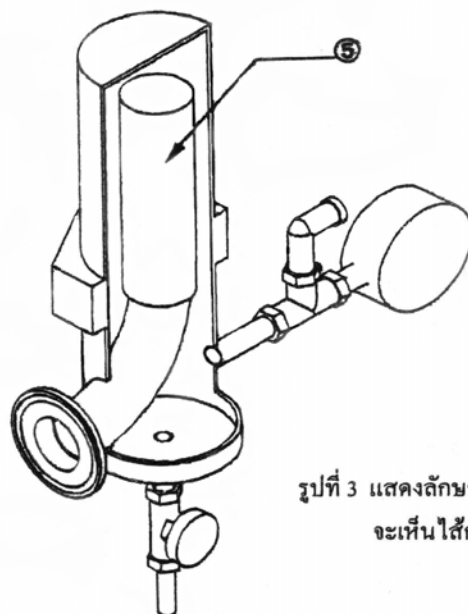


รูปที่ 1 แสดงลักษณะภายนอกของถังหมัก (Fermenter) ขนาด 130 ลิตร

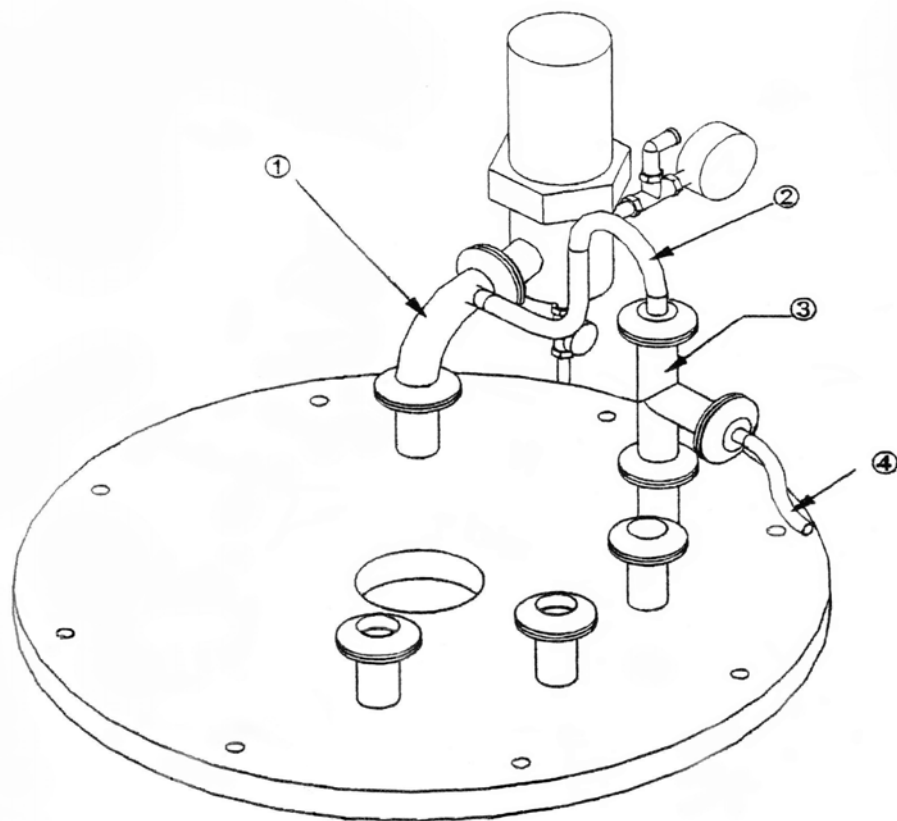


รูปที่ 2 แสดงลักษณะของตัวกรองอากาศขาเข้า

- | | | |
|---|---|---|
| 1 | - | เปลือกของไส้กรอง (Filter Casing) |
| 2 | - | ข้อต่อสายยางลมเข้าถึงหมัก
ขนาด ϕ 8 มม. (Quick connect
for air inlet) |
| 3 | - | Pressure gauge 0-2 bar |
| 4 | - | Drain valve (Condensate) |
| 5 | - | ไส้กรองอากาศ (Air filter) |

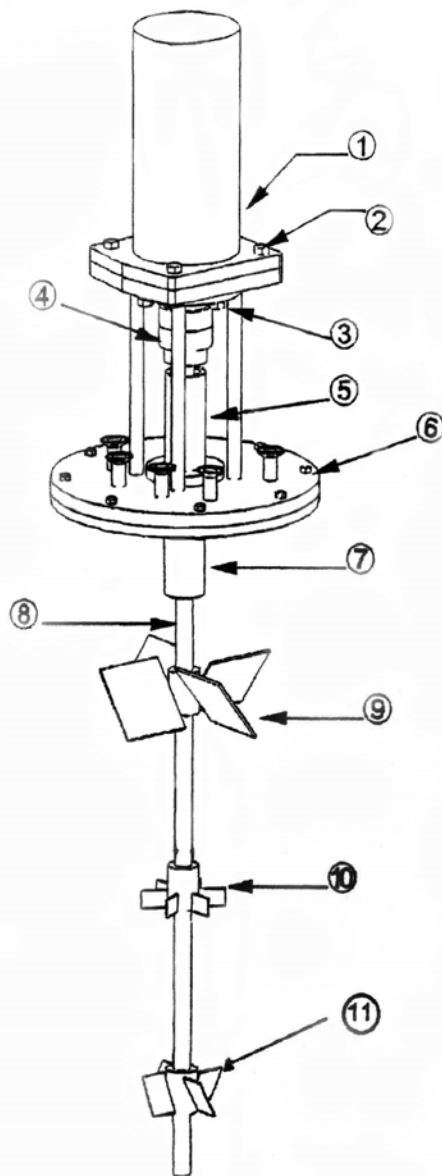


รูปที่ 3 แสดงลักษณะภายในของตัวกรองอากาศ
จะเห็นไส้กรองอากาศซึ่งอยู่ภายใน



รูปที่ 4 แสดงลักษณะการต่อระหว่างตัวรักษาความดัน
ภายในถังกับตัวกรองอากาศเข้าและขาออก

- 1 - ข้องอ 90 สำหรับต่อกับด้านความดันของของเหลวส่วนล่างในถัง
- 2 - สายยางซิลิโคนขนาด 1/2 นิ้ว สำหรับต่อเพื่อปรับความดัน ปกติอยู่ในสภาพปิด จะเปิดตอนทำการ
ฆ่าเชื้อเท่านั้น
- 3 - ข้อต่อสามทาง สำหรับต่อกับด้านความดันของไอน้ำส่วนบนเหนือระดับของเหลวในถัง
- 4 - สายยางซิลิโคนขนาด 3/8 นิ้ว สำหรับต่อกับไส้กรองอากาศขาออก ปกติอยู่ในสภาพเปิด จะปิดตอน
ทำการฆ่าเชื้อเท่านั้น



- 1 - มอเตอร์มรเกียร์ทดรอบในตัวยาวขนาด 3 แรงม้า
ใช้กับไฟฟ้า 380 โวลต์ 3 เฟส (3 เส้น)
- 2 - Bolt สแตนเลส เกรด 304 size M x 65 mm
จำนวน 4 ตัว สำหรับยึดมอเตอร์ กับ
แท่นรองมอเตอร์
- 3 - Nut สแตนเลส เกรด 304 size M จำนวน 8 ตัว
- 4 - Coupling (ขอย) สำหรับส่งกำลังจากมอเตอร์สู่เพลา
- 5 - Housing สแตนเลส เกรด 316
สำหรับรับลูกปืน (bearing) ของหน้าแปลนด้านบน
- 6 - Bolt and Nut สแตนเลส เกรด 316
size M8 x 60 mm จำนวน 8 ชุด
- 7 - Housing สแตนเลส เกรด 316
สำหรับรับลูกปืน (bearing) ของหน้าแปลนด้านล่าง
- 8 - เฟลสแตนเลส เกรด 316
ขนาด 30 มม. ยาว 142 ซม.
- 9 - ไบพัตคววนซิลิโคน สำหรับปิดฟอง
ที่เกิดที่ผิวน้ำหมัก
- 10 - ไบพัตคววนแบบ มาตรฐาน
(6-blade disc impeller)
- 11 - ไบพัตคววนแบบ up-pumping impeller

รูปที่ 5 แสดงลักษณะของชุดส่งกำลังในการกวน

อุปกรณ์ให้อากาศ

- air pump, airflow meter, ชุดกรองอากาศ (air filter) (รูปที่ 2 และ 3)
- ซึ่งมีแผ่นกรองอากาศ ขนาดช่อง 0.2 micron

อุปกรณ์ประกอบ ได้แก่

- ชุดเครื่องทำน้ำเย็น (chiller) สำหรับควบคุมอุณหภูมิในถังหมัก
- ชุดเครื่องผลิตไอน้ำ (steam generator) สำหรับอบนึ่งฆ่าเชื้อภายในถังหมัก

วิธีปฏิบัติการการทดลอง

1. การเตรียมต้นเชื้อไส้เดือนฝอย (inoculum) ที่บริสุทธิ์

วิธีการตามขั้นตอนของวัชร และสุทธิชัย (2544) ซึ่งมีขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

- 1.1 การแยกไข่ไส้เดือนฝอยตัวเต็มวัยเพศเมีย (ซึ่งเลี้ยงได้จากแมลงอาศัย) มาเพาะฟักด้วยวิธีการปลอดเชื้อให้ได้ไส้เดือนฝอยวัย 1
- 1.2 การย้ายไส้เดือนฝอยวัย 1 ลงเลี้ยงในอาหารวุ้นด้วยวิธีการปลอดเชื้อ จนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ (IJ) ที่บริสุทธิ์
- 1.3 การเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่บริสุทธิ์ให้ได้ปริมาณมากด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว (70×10^6 ล้านตัว/การเลี้ยงในถังหมัก 1 batch) เพื่อใช้เป็น inoculum

2. การเตรียมต้นเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัย (symbiotic bacteria) ที่บริสุทธิ์ เพื่อใช้เป็น inoculum

- 2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila* ให้ได้เชื้อบริสุทธิ์
นำหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ที่ตายด้วยไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไม่เกิน 24 ชม. มาล้างให้สะอาดด้วย alcohol 75% ตัดขาเทียมหนอน (ทำในตู้ปลอดเชื้อ) ใช้เข็มเย็บสัมผัสกับน้ำเลือดที่ไหลออกมาแล้วทำการ streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA บ่มจานเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน คัดเลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่บริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะกลมมนสีน้ำเงิน ทำการแยกเลี้ยงในอาหารเหลว Ys broth ปริมาตร 150 มล. ซึ่งบรรจุในขวด (flask) ขนาด 500 มล. นำไปเขย่าที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 1-2 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง
- 2.2 การเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียร่วมอาศัยในถังหมัก 6 ลิตร เพื่อใช้เป็นต้นเชื้อในถังหมัก 130 ลิตร โดยมีขั้นตอนดังนี้
 - 2.2.1 ประกอบอุปกรณ์ถังหมัก 6 ลิตร ตามขั้นตอนการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในถังหมัก 6 ลิตร ของวัชร และสุทธิชัย (2544)
 - 2.2.2 เตรียมอาหาร Ys broth จำนวน 4,457 มล. ใส่ในถังหมัก 6 ลิตร ติดตั้งอุปกรณ์ประกอบเรียบร้อยแล้ว จึงนำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°C เป็นเวลา 30 นาที

2.2.3 หลังจากอาหารในถังหมักมีอุณหภูมิลดลงแล้ว จึงนำถังหมักต่อเข้ากับชุด control unit

2.2.4 ทำการใส่แบคทีเรียต้นเชื้อบริสุทธิ์ที่เตรียมไว้แล้วในข้อ 2.1 ลงในถังหมัก 6 ลิตร ปรับอุณหภูมิ 28°C ความเร็วรอบของใบพัดกวน 150 รอบ/นาที ให้อากาศอัตรา 10 ลิตร/นาที เลี้ยงขยายแบคทีเรียต่อเป็นเวลา 24 ชม. จะได้เซลล์แบคทีเรียเพิ่มในปริมาณ 10^7 เซลล์/มล. จึงพร้อมนำไปเป็นต้นเชื้อสำหรับเลี้ยงในถังหมัก 130 ลิตร ในขั้นตอนต่อไป

3. การติดตั้งอุปกรณ์ประกอบชุดถังหมักขนาด 130 ลิตร

3.1 เพื่อป้องกันการปนเปื้อน ทำการอบนึ่งฆ่าเชื้ออุปกรณ์ประกอบของถังหมักต่างๆ ก่อนที่จะนำไปติดตั้งกับถังหมัก ได้แก่ O-ring ข้อต่อต่างๆ แคมล็อก แผ่นซีลิโคนรองฝาถังหมัก ใบพัด 3 ชุด ชุด air sparker ชุดกรองอากาศ สายซีลิโคนสำหรับถ่ายผ่านอาหารและ inoculum ต่างๆ ลงถัง

3.2 ติดตั้งใบพัดกวน 3 ชุดที่ 3 ระดับ กับแกนกวนของถังหมัก 130 ลิตร ดังนี้

- ชุดใบพัดแบบ up-pumping ซึ่งมีใบพัดขนาด 6.3x11.2 ซม. (กว้างxยาว) ทำการติดตั้งที่ระดับล่างสุด โดยให้ขอบล่างสุดของแกนกลางใบพัดอยู่ต่ำลงจากปลายสุดของแกนกวน 3 ซม.
- ชุดใบพัดกวนมาตรฐาน (6 blade-disc impeller) ซึ่งใบพัดมีขนาด 3.1x4.7 ซม. (กว้างxยาว) โดยให้ขอบล่างของแกนใบพัดห่างจากขอบบนของแกนใบพัด up-pumping 15 ซม.
- ชุดใบพัดกำจัดฟอง (ใบพัดซีลิโคน) ซึ่งมีใบพัดขนาด 10x13 ซม. ติดตั้งให้ห่างจากใบพัดมาตรฐาน 25 ซม.

3.3 ทำการปรับมาตรฐาน (calibration) หัววัดต่างๆ ได้แก่ pH, pO₂ ก่อนใส่เข้าที่ port ของแต่ละหัววัดที่ขอบด้านล่างของถังหมัก

3.4 เติมน้ำกลั่น จำนวน 56 ลิตร ลงในถังหมัก

3.5 ยกฝาถัง พร้อมมอเตอร์แกนกวนที่ติดตั้งใบพัดกวนแล้ว (ตามข้อ 3.2) ขึ้นปิดฝากับถังหมัก โดยมีแผ่นยางซีลิโคนวางรองกันกระแทกระหว่างฝากับตัวถังหมัก

3.6 ประกอบอุปกรณ์ต่างๆ เข้ากับ port บนฝาถังหมัก ซึ่งมีมาตรวัดความดัน ชุดกรองอากาศ ท่อระบายอากาศ ท่อซีลิโคนสำหรับถ่ายผ่าน inoculum แบคทีเรีย และใส่เดือนฝอยลงถังหมัก

3.7 ทำการอบฆ่าเชื้อที่ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที

4. การเตรียมอาหารสูตร Tsb₃ (เข้มข้น) จำนวน 10.6 ลิตร ซึ่งประกอบด้วย

Tryptic soy broth	525	กรัม
Yeast cell	350	กรัม
Corn oil	1.7	ลิตร
Egg	4.7	ลิตร
Distilled water	3.35	ลิตร

ใส่ในหม้อสแตนเลส ซึ่งที่ฝ่ามีท่อสำหรับถ่ายอาหารผ่าน peristaltic pump ลงในถังหมัก 130 ลิตร โดยนำอาหารที่เตรียมดังกล่าวไปอบนิ่งฆ่าเชื้อก่อนที่ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 30 นาที เมื่ออาหารเย็นจึงนำไปถ่ายลงในถังหมัก 130 ลิตรเพื่อใช้ในขั้นตอนต่อไป

5. การทดลองเลี้ยงแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยร่วมกันในถังหมัก 130 ลิตร โดยปรับอัตราการให้อากาศและอัตราความเร็วในการกวนที่แตกต่างกัน

5.1 ช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria ใน 24 ชั่วโมงแรก เพื่อให้ได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย II สูงสุด หลังจากนำอาหารที่เตรียมไว้ (ตามข้อ 4) ถ่ายลงในถังหมักที่ได้จัดเตรียมไว้ตามขั้นตอนที่ 3 กวนให้เข้ากัน แล้วจึงนำต้นเชื้อแบคทีเรีย (inoculum) ซึ่งเตรียมได้ในขั้นตอนที่ 2 ใส่ลงเลี้ยงในถังหมักเป็นเวลา 24 ชม. ทำการทดลอง 5 สภาพ (batch) แต่ละ batch ปรับอัตราการให้อากาศและอัตราการกวนที่แตกต่างกันตามข้อที่ 5.3

5.2 ช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยหลังจากเลี้ยงขยายเชื้อแบคทีเรีย 24 ชม. แล้ว (ตามข้อ 5.1) นำต้นเชื้อไส้เดือนฝอย (inoculum) ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 มาล้างให้สะอาดด้วย hyamine 0.1% 4 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นอบนึ่งอีก 4 ครั้ง หลังจากนั้นนำไส้เดือนฝอยดังกล่าวใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียในแต่ละ batch (1-5) โดยใช้ไส้เดือนฝอยอัตรา 1,000 ตัว/อาหาร 1 มล. แล้วปรับอัตราการให้อากาศและความเร็วในการกวนตามสภาพการเลี้ยงในแต่ละ batch โดยให้ค่า pO_2 อยู่ในช่วงที่กำหนดไว้ในแต่ละระยะการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ดังเช่นในข้อ 5.4

5.3 การปรับสภาพการเลี้ยงในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรีย (24 ชม. แรก)

5.3.1 ในทุก batch ปรับระดับอุณหภูมิที่ 28°ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมตลอดช่วงการเลี้ยง

5.3.2 อัตราการให้อากาศแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม

- กลุ่มแรก (batch ที่ 1-3) ให้อากาศในอัตราระหว่างค่าต่ำสุด 50 ลิตร/นาที่ถึงค่าสูงสุด 150 ลิตร/นาที่ หรือ 0.7 – 2.1 vvm ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้

ใน batch ที่ 1 (Table 1, Figure 1) แบ่งช่วงเวลากการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวนที่อัตราแตกต่างกันดังนี้

ช่วงที่ 1 (3 ชม. แรก) ปรับอัตราการให้อากาศ 50 ลิตร/นาที่ (0.7 vvm)

ช่วงที่ 2 และ 3 (ชั่วโมงที่ 4-5 และ 6-7) ค่อยๆปรับอัตราการให้อากาศสูงขึ้นที่ 80 100 ลิตร/นาที่ (1.1 1.4 vvm) ตามลำดับ

ช่วงที่ 4 (ชั่วโมงที่ 8-24 นาน 16 ชม. ติดต่อกัน) ปรับอัตราการให้อากาศสูงสุดที่ระดับ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) เป็นช่วงสุดท้าย

ค่าเฉลี่ยตลอดช่วง 24 ชั่วโมง ใน batch ที่ 1 อัตราการให้อากาศ = 127.5 ลิตร/นาที่ หรือ 1.8 vvm อัตราการกวน = 180 รอบ/นาที่

ใน batch ที่ 2 (Table 2, Figure 2) แบ่งช่วงเวลาการให้อากาศและความเร็วรอบในการกววนที่อัตราแตกต่างกันดังนี้

ช่วงที่ 1 (3 ชม. แรก) ปรับอัตราการให้อากาศ 50 ลิตร/นาที่ (0.7 vvm) และอัตราการกววน 150 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 2 (ชั่วโมงที่ 4-7) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 80 ลิตร/นาที่ (1.1 vvm) และอัตราการกววนที่ 170 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 3 (ชั่วโมงที่ 8-15) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 100 ลิตร/นาที่ (1.4 vvm) และอัตราการกววนที่ 180 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 4 (ชั่วโมงที่ 16-24 นาน 9 ชม. ติดต่อกัน) อัตราการให้อากาศสูงสุดที่ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) และอัตราการกววนสูงสุดที่ 180 รอบ/นาที่ เช่นกัน

ค่าเฉลี่ยตลอดช่วง 24 ชั่วโมง ใน batch ที่ 2 อัตราการให้อากาศ = 109.2 ลิตร/นาที่ หรือ 1.6 vvm อัตราการกววน = 174.6 รอบ/นาที่

ใน batch ที่ 3 (Table 3, Figure 3) แบ่งช่วงเวลาการให้อากาศและความเร็วรอบในการกววนที่อัตราแตกต่างกันดังนี้

ช่วงที่ 1 (3 ชม. แรก) ปรับอัตราการให้อากาศ 50 ลิตร/นาที่ (0.7 vvm) และอัตราการกววนที่ 170 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 2 (ชั่วโมงที่ 4-8) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 100 ลิตร/นาที่ (1.4 vvm) และอัตรากววน 180 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 3 (ชั่วโมงที่ 9-24) เพิ่มอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) และอัตราการกววนที่ 180 รอบ/นาที่

ค่าเฉลี่ยตลอดช่วง 24 ชั่วโมง ใน batch ที่ 3 อัตราการให้อากาศ = 127.1 ลิตร/นาที่ หรือ 1.8 vvm อัตราการกววน = 178.8 รอบ/นาที่

- **กลุ่มที่ 2** (batch ที่ 4-5) ให้อากาศในอัตราอยู่ระหว่างค่าต่ำสุดที่ 50 ลิตร/นาที่ ถึง สูงสุด 200 ลิตร/นาที่ (0.7-2.9 vvm) ในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันดังนี้

ใน batch ที่ 4 (Table 4, Figure 4) แบ่งช่วงเวลาการให้อากาศและความเร็วรอบในการกววนที่อัตราแตกต่างกันดังนี้

ช่วงที่ 1 (ในชม. แรก) ปรับอัตราการให้อากาศ 50 ลิตร/นาที่ (0.7 vvm) และอัตราการกววนที่ 180 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 2 (ชั่วโมงที่ 2-4) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 80 ลิตร/นาที่ (1.1 vvm) และอัตราการกววนที่ 180 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 3 4 และ 5 (ชั่วโมงที่ 5 6 และ 7) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 120 150 และ 180 ลิตร/นาที่ (1.7 2.1 และ 2.6 vvm) ตามลำดับ และอัตราการกวนในระดับ 180 180 และ 200 รอบ/นาที่ ตามลำดับ

ช่วงที่ 6 (ชั่วโมงที่ 8-24 นาน 17 ชม. ติดต่อกัน) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 200 ลิตร/นาที่ (2.9 vvm) และอัตราการกวนคงที่ 200 รอบ/นาที่

ค่าเฉลี่ยตลอดช่วง 24 ชั่วโมง ใน batch ที่ 4 อัตราการให้อากาศ = 172.5 ลิตร/นาที่ หรือ 2.5 vvm อัตราการกวน = 195.0 รอบ/นาที่

ใน batch ที่ 5 (Table 5, Figure 5) แบ่งช่วงเวลาการให้อากาศและความเร็วรอบในการกวนที่อัตราแตกต่างกันดังนี้

ช่วงที่ 1 (4 ชม. แรก) ปรับอัตราการให้อากาศ 50 ลิตร/นาที่ (0.7 vvm) และอัตราการกวนคงที่ 190 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 2 (ชั่วโมงที่ 5-7) เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 100 ลิตร/นาที่ (1.4 vvm) ที่ 5-6 ชม. อัตราการกวนยังคงที่ 190 รอบ/นาที่ ที่ 7 ชม. เพิ่มอัตราการกวนเป็น 200 รอบ/นาที่

ช่วงที่ 3 (ชั่วโมงที่ 8-24) เพิ่มอัตราการให้อากาศสูงสุดเป็น 200 ลิตร/นาที่ (2.9 vvm) และอัตราการกวนคงที่ 200 รอบ/นาที่

ค่าเฉลี่ยตลอดช่วง 24 ชั่วโมง ใน batch ที่ 5 อัตราการให้อากาศ = 162.5 ลิตร/นาที่ หรือ 2.3 vvm อัตราการกวน = 197.5 รอบ/นาที่

5.4 การปรับสภาพการเลี้ยงไส้เดือนฝอยหลังจากใส่ลงไปเลี้ยงร่วมกับ symbiotic bacteria

เนื่องจากงานทดลองนี้ต้องการศึกษาผลของการให้อากาศและการกวนในอัตราที่ต่างกันในช่วงเลี้ยง symbiotic bacteria เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง) ต่อการขยายพันธุ์หรือปริมาณของไส้เดือนฝอยจนได้ผลผลิตสุดท้ายเป็นตัวอ่อนวัย 3 ระยะทำลายแมลง (II) จึงต้องปรับปัจจัยต่างๆ ในช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในแต่ละ batch (1-5) ให้มีสภาพใกล้เคียงกัน โดยการปรับอัตราให้อากาศและการกวนเพื่อรักษาระดับ pO_2 ให้อยู่ในช่วงที่กำหนด ซึ่งแตกต่างกันในแต่ละระยะการเจริญเติบโตหรือการพัฒนาของไส้เดือนฝอย ดังแสดงไว้ในตารางข้างล่างนี้

การปรับปัจจัยต่างๆในถังหมักในช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยหลังการเลี้ยง symbiotic bacteria
24 ชม. แล้ว

ช่วงระยะเวลา (ชั่วโมง) วัน		วัยของไส้เดือนฝอย	ระดับ pO_2 (%)	หมายเหตุ
24	1	IJ-J ₄	90-100	
48	2	J ₄ , YM, YF	70-90	
60	2.5	IJ, YM, YF, M, F(ไข่)	30-50	ช่วงตัวผู้และตัวเมียจับคู่ผสมพันธุ์ กันในช่วงนี้ไส้เดือนฝอยมีความ ต้องการอากาศสูงมาก การปรับ อัตราการให้อากาศและการกวน สูงเกินไปเพื่อรักษาระดับ pO_2 สูง ตามกำหนดจะมีผลต่อการจับคู่ ผสมพันธุ์ จึงต้องให้ O_2 บริสุทธิ์ผสมกับอากาศ
72	3	IJ, M, F(ไข่)	10-30	
96	4	J ₁ , J ₂ , M, F(ไข่)	10-30	
120	5	J ₁ , J ₂ , M, F	30-50	
144	6	J ₁ , J ₂ , J ₃	50-100	
168-312	7-13	J ₂ , J ₃ , IJ	50-100	

หมายเหตุ การปรับเพิ่มระดับ pO_2 นั้นจะต้องปรับอัตราการให้อากาศ (airflow rate) ก่อนจึงจะ
ปรับอัตราการกวน เพื่อไม่ให้เกิด shear force ซึ่งมีผลต่อการจับคู่ผสมพันธุ์

IJ = infective juvenile หรือตัวอ่อนวัย 3 ระยะทำลายแมลง (inoculum)

J₁, J₂, J₃ = ตัวอ่อนวัย 1 2 และ 3 ตามลำดับ

YM, YF = ตัวผู้ และตัวเมียที่ยังไม่เจริญพันธุ์เต็มที่

M, F(ไข่) = ตัวผู้เจริญพันธุ์แล้ว และตัวเมียมีไข่

6. การบันทึกข้อมูล

- บันทึกระดับ pO_2 pH อัตราการให้อากาศ อัตราการกวน ทุกๆ ชั่วโมง
- ตรวจสอบปริมาณไส้เดือนฝอยวัยต่างๆ ทุก 24 ชั่วโมง
- ทดสอบคุณภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอยหลังการเก็บทุก batch ตามวิธีการของ Miller, 1989.

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การทดลองขั้นตอนการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ด้วยอาหารเหลวในถังหมัก ขนาด 130 ลิตร นี้ มี 2 ขั้นตอน คือ ช่วงการเลี้ยงขยายปริมาณเซลล์ของ symbiotic bacteria เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกับ bacteria ได้มีการทดลองในการปรับปัจจัยต่างๆ หลายรูปแบบ เพื่อสร้างสภาพการเลี้ยงให้เหมาะสมของสิ่งมีชีวิตทั้งสอง ซึ่งการทดลองเลี้ยงแต่ละครั้ง (batch) (รวมทั้งหมดไม่น้อยกว่า 25 batches) ให้ผลผลิตที่แตกต่างกัน และบางครั้งไม่มีผลผลิต ฉะนั้น ในรายงานการวิจัยนี้ ขอนำเสนอเฉพาะสภาพการเลี้ยงที่ให้ผลผลิตสูงสุดและสามารถเลี้ยงที่ให้ผลผลิตที่ต่ำกว่า ซึ่งเกิดจากการปรับระดับปัจจัยที่แตกต่างกัน เพื่อที่จะได้เปรียบเทียบกันรวมทั้งหมด 5 batches ดังต่อไปนี้

1. ช่วงระยะเวลาการเลี้ยง symbiotic bacteria

อัตราการให้อากาศและความเร็วในการกวนมีผลต่อการเจริญเติบโตของ symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophila* ใน Table 6, Figure 6 แสดงการเพิ่มจำนวนของเซลล์แบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหารเหลวในถังหมักขนาด 130 ลิตร เป็นเวลา 24 ชม. โดยให้อากาศอัตราเฉลี่ย (average airflow rate) ที่แตกต่างในการทดลอง 5 batches ดังนี้ 127.5 109.2 127.1 172.5 และ 162.5 ลิตร/นาที่ หรือ 1.8 1.6 1.8 2.5 และ 2.3 vvm ตามลำดับ และอัตราความเร็วในการกวนเฉลี่ย 180 174.6 178.8 195.0 และ 197.5 รอบ/นาที่ ตามลำดับ ส่วนระดับ pO_2 ของทุก batch อยู่ระหว่าง 90-100% จากการตรวจนับเซลล์ของ bacteria ทุกๆ 3 ชั่วโมง พบว่า การให้อัตราอากาศเฉลี่ยที่ต่ำอยู่ในช่วงระหว่าง 1.6-1.8 vvm และอัตราการกวนเฉลี่ยระหว่าง 109.2-127.1 รอบ/นาที่ ทำให้แบคทีเรียเพิ่มปริมาณเซลล์จากจำนวนเริ่มต้น (inoculum) ที่ 10^7 เซลล์/อาหาร 1 มล. เป็น 10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล. ที่ 21 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระยะเริ่มต้นของแบคทีเรียเข้าสู่ stationary phase ส่วนการให้อากาศในอัตราที่สูงขึ้นที่ระดับ 2.5 และ 2.3 vvm และอัตราการกวน 195.0 197.5 รอบ/นาที่ ตามลำดับนั้น ทำให้แบคทีเรียเพิ่มปริมาณเป็น 10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล. ที่ 18 ชั่วโมง เข้าสู่ระยะ stationary phase เร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับ 3 batch ดังกล่าวข้างต้น เช่นเดียวกับการทดลองของ วังริ และสุทธิชัย (2544) ในการเลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียชนิดเดียวกันในอาหารเหลวสูตรเดียวกัน แต่ทำการทดลองในถังหมัก 6 ลิตร (อาหารเหลว 3 ลิตร) อัตราการกวนคงที่ 300 รอบ/นาที่ พบว่า อัตราการให้อากาศเฉลี่ยระหว่าง 0.5-3.5 ลิตร/นาที่ หรือ 0.2-1.1 vvm แบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase (10^{14} เซลล์/อาหาร 1 มล.) ที่ 21 ชั่วโมง ช้ากว่าการให้อากาศ ในอัตราที่สูงระหว่าง 4.7-8 ลิตร/นาที่ หรือ 1.6-2.7 vvm ซึ่งทำให้แบคทีเรียเข้าสู่ระยะ stationary phase ที่ 18 ชั่วโมง ในช่วงต่างๆ ของระยะการเจริญของแบคทีเรียชนิดนี้ มีการสร้าง exoenzyme ต่างๆ ขึ้นมา ดังเช่น Thaler *et al.* (1998) พบว่า แบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. สามารถสังเคราะห์ lecithinase ซึ่งย่อยสารพวก phospholipid ให้สารไขมันที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย *Steinernema* และเอนไซม์ชนิดนี้จะถูกสร้างในช่วงที่เข้าสู่ระยะ stationary phase และ

primary cell ของมันเท่านั้นที่จะสร้างเอ็นไซม์นี้ได้ Volgyi *et al.* (2000) และ Dunphy *et al.* (1997) พบว่า *Xenorhodus nematophila* สร้าง lipases ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับความสามารถในการทำให้เกิดโรค แก่แมลง แบคทีเรียนี้ยังมีการสร้าง proteases ซึ่งส่วนใหญ่จะถูกสร้างโดย primary cell ของมัน ปริมาณ และรูปแบบต่างๆ ของเอ็นไซม์นี้จะแตกต่างกันในแต่ละ strain ของแบคทีเรียชนิดนี้ด้วย (Bowen *et al.*, 2000) หน้าที่ของเอ็นไซม์จะเกี่ยวข้องกับการย่อยโปรตีนในตัวแมลงและให้สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยและของตัวมันเอง นอกจากนี้แบคทีเรียชนิดนี้สามารถสร้าง crystal protein ภายในเซลล์ของมันในช่วงต้น stationary phase ซึ่งเชื่อว่าเป็นแหล่งที่สะสมสารอาหารที่สำคัญภายในเซลล์ (Couche and Gregson, 1987; Bowen and Ensign, 2001) และสิ่งที่สำคัญอีกอย่างหนึ่งก็คือ *Xenorhabdus* นี้สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (antibiotic) ซึ่งสามารถป้องกันการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์อื่นๆ ได้ในอาหารที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอย หรือในตัวแมลงที่ตาย (Paul *et al.*, 1981; Akhurst, 1982; Richardson *et al.*, 1988) เพื่อไม่ให้มีผลกระทบต่อการพัฒนาของไส้เดือนฝอยที่กำลังเติบโตขยายพันธุ์

จากผลของ 2 การทดลอง เป็นไปในทิศทางเดียวกัน ซึ่งอาจแบ่งเป็นออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมีอัตราการให้อาหารและการกวนต่ำกว่า และมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ต่ำ เข้าสู่ stationary phase ที่ 21 ชั่วโมง ช้ากว่าการทดลองกลุ่มที่สอง ซึ่งมีอัตราการให้อาหารและการกวนที่สูงกว่า อัตราการเพิ่มของเซลล์แบคทีเรียและเข้าสู่ stationary phase อยู่ที่ 18 ชั่วโมง จากวิธีการทดลองหลังจากเลี้ยง symbiotic bacteria เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแล้วจึงทำการใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกัน จะเห็นได้ว่า ในการทดลองกลุ่มแรก bacteria เข้าสู่ stationary phase ก่อนทำการใส่ไส้เดือนฝอยลงไป 3 ชั่วโมง ส่วนในกลุ่มที่ 2 เข้าสู่ระยะเดียวกันก่อน 6 ชั่วโมง เนื่องจาก bacteria และไส้เดือนฝอยนั้นมีความสัมพันธ์แบบ symbiotic การเลี้ยงขยายปริมาณ bacteria ก่อนนั้นเพื่อที่จะให้ bacteria สร้างสภาพที่เหมาะสมในอาหารเหลว สำหรับการพัฒนาของไส้เดือนฝอย เมื่อเปรียบเทียบกันระหว่าง 2 กลุ่มการทดลอง จะเห็นได้ว่าในสภาพการเลี้ยงกลุ่มที่ 2 มีสภาพที่เหมาะสมกว่าเนื่องจาก

1. อัตราการให้อาหารและการกวนที่เหมาะสมทำให้ bacteria ผลิตสารต่างๆ เช่น exoenzyme metabolite ต่างๆ ดังกล่าวได้ในความเข้มข้นที่สูง (ในงานทดลองนี้ไม่ได้วิเคราะห์) เช่นเดียวกับการทดลองในการเลี้ยง bacteria ชนิดอื่นๆ Potumarthi *et al.* (2007) พบว่า ในการเลี้ยง *Bacillus licheniformis* NCIM-2042 ด้วยอาหารเหลวในถังหมักแบบไบปัดกวน ขนาด 5 ลิตร การให้อาหารในอัตรา 3 vvm และความเร็วในการกวน 200 รอบ/นาที จะผลิต alkaline protease ได้ปริมาณสูงสุดที่ 72 ชั่วโมง ส่วนการเลี้ยงแบคทีเรีย *Paenibacillus* sp. ด้วยอาหารเหลวในถังหมัก 5 ลิตร แบบไบปัดกวน การให้อาหารอัตรา 3 vvm และการกวนอัตรา 200 รอบ/นาที นั้นสามารถผลิตเอ็นไซม์ chitinase ได้ปริมาณสูงสุด (Koa *et al.*, 2007)

2. แบคทีเรียเข้าสู่ stationary phase 6 ชั่วโมง ก่อนที่จะใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยง ทำให้ bacteria สามารถผลิตหรือสังเคราะห์สารต่างๆ และมีกิจกรรมต่างๆ ได้ในระยะเวลาที่นานขึ้นทำให้มี

การสะสมสารอาหารและสารอื่นๆ ที่มีความจำเป็นต่อไส้เดือนฝอยปริมาณมากขึ้นด้วย จาก Table 7 สภาพการทดลองที่ 2 ซึ่งมีสภาพที่เหมาะสมกว่า อัตราการให้อากาศเฉลี่ยที่ 2.5 vvm (172.5 ลิตร/นาที่) อัตราการกวนที่ระดับ 195.4 รอบ/นาที่ และอัตราการให้อากาศ 2.3 vvm (162.5 ลิตร/นาที่) อัตราการกวน 197.5 รอบ/นาที่ ในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรีย symbiont *Xenorhabdus nematophila* เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกัน) ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่า 300,000 ตัว/อาหารเหลว 1 มล. (หรือขยายพันธุ์ได้สูงกว่า 300 เท่า) ส่วนในการทดลองกลุ่มที่ 1 โดยอัตราให้อากาศที่ 1.8 1.6 และ 1.8 vvm และอัตราการกวนที่ 180 173.3 และ 193.7 รอบ/นาที่ ตามลำดับ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 161,100 131,100 และ 131,500 ตัว/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ เช่นเดียวกันกับการทดลองที่ระดับถังหมัก 6 ลิตร (วัชร และสุทธิชัย, 2544) การให้อากาศอัตราเฉลี่ย 4.7-8 ลิตร หรือ 1.6-2.7 vvm ความเร็วในการกวนเฉลี่ย 300 รอบ/นาที่ ให้ผลผลิตไม่ต่ำกว่า 300,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มที่มีสภาพที่เหมาะสม (กลุ่มที่ 2) ส่วนการให้อากาศระหว่าง 0.48-3.25 vvm อัตราการกวน 300 รอบ/นาที่ ให้ผลผลิตที่ต่ำกว่าอยู่ในระดับ 112,800-137,000 ตัว/อาหาร 1 มล. แสดงให้เห็นว่า สภาพการเลี้ยง bacteria ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงร่วมกันมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ได้ โดยเฉพาะในสภาพการทดลองกลุ่มที่ 2 ซึ่งมีสภาพที่เหมาะสมกว่า เนื่องจาก bacteria สามารถสร้างอาหารและสาร metabolite ชนิดต่างๆ ได้มากกว่าทั้งปริมาณและชนิดทำให้ไส้เดือนฝอยสามารถเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดี

ส่วนระดับ pH ในช่วงการเลี้ยง bacteria ในแต่ละ batch นั้นมีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 7-8 (Figure 17) ซึ่งเป็นช่วงที่เหมาะสม (สุทธิชัย และวัชร, 2543) โดยในช่วงต้นของการเลี้ยง bacteria (lag phase) pH จะอยู่ในระดับระหว่าง 7-7.5 หลังจากนั้น pH จะค่อยๆ สูงขึ้นในช่วง log phase และในช่วง stationary phase pH จะอยู่ระหว่าง 7.5-8

2. ช่วงการเลี้ยงขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอย

ในขั้นตอนนี้เป็นการใส่ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลาย (I₃) ลงไปเลี้ยงร่วมกับ symbiotic bacteria (หลังจากเลี้ยงมาแล้ว 24 ชั่วโมง) ในอัตรา 1,000 ตัว/อาหารเหลว 1 มล. ในทุกสภาพการเลี้ยง (batch) แล้วทำการปรับสภาพปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อัตราการให้อากาศ ความเร็วในการกวน เพื่อรักษาค่า pO₂ ให้อยู่ในช่วงที่กำหนดในแต่ละระยะการพัฒนาของไส้เดือนฝอย ระดับอุณหภูมิตลอดระยะเวลาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยคงที่ 25°C และความดันภายในถังที่ 0.3 bar ตลอดเวลา

ในช่วงการเลี้ยงที่ 24 ชั่วโมงแรก (1 วัน) ในการที่จะรักษาระดับ pO₂ ให้มีค่าอยู่ระหว่าง 90-100% ทำการปรับสภาพการเลี้ยงในทุก batch โดยให้อากาศในอัตรา 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) และความเร็วการกวน 180 รอบ/นาที่ ไส้เดือนฝอยวัย I₃ ที่ใส่ลงไป ใน batch ที่ 1 2 3 4 และ 5 มีการพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัย 4 (I₄) 71.5 73.4 83.9 73.2 และ 84.6% ตามลำดับ Strauch and Ehler (1998) พบว่า ไส้เดือนฝอยวัย I₃ ตามปกติเป็นระยะที่อยู่อิสระในธรรมชาติ ปากปิดไม่กินอาหาร เมื่อใส่ลงเลี้ยงในอาหารเหลว มีสารเคมีชนิดหนึ่งเรียกว่า food signal ซึ่งผลิตโดย symbiotic bacteria ในระยะ

log phase มากระตุ้นให้ไส้เดือนฝอยวัยนี้ฟื้นตัวเริ่มกินอาหาร และพัฒนาต่อไปเป็นตัวอ่อนวัย 4 (J₄) ซึ่งเรียกระยะนี้ว่า recovery period

ในช่วงการเลี้ยงที่ 24-48 ชั่วโมง (2 วัน) (Figure 12-16) ทุก batch ให้อากาศอัตรา 150 ลิตร/นาที่ และความเร็วในการกวน 180 รอบ/นาที่ ไส้เดือนฝอยเริ่มพัฒนาเป็นตัววัยเพศผู้ (YM) และเพศเมีย (YF) ที่ยังไม่เป็นวัยเจริญพันธุ์ ความต้องการ O₂ เริ่มมีมากขึ้นระดับ PO₂ ลดลงมาอยู่ในช่วงที่กำหนดระหว่าง 70-90% โดยไม่ต้องมีการปรับ

ในช่วงการเลี้ยงที่ 48-72 ชั่วโมง (3 วัน) (Figure 7-11) ในทุก batch ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ (M) และเพศเมีย (F) ที่พร้อมผสมพันธุ์แล้ว โดยใน batch ที่ 1 2 3 4 และ 5 มีเปอร์เซ็นต์ตัวเต็มวัย (ทั้งตัวผู้และตัวเมีย) 91.9 91.1 96.4 95.6 96.8 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างผลผลิตของไส้เดือนฝอยกับเปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (M, F) ปรากฏว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ($r = 0.583$) (Figure 18) แสดงว่า เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยไม่มีผลต่อความแตกต่างผลผลิตของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงขยายได้ในแต่ละ batch นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การพัฒนาของตัวเต็มวัยเพศเมียใน batch ที่ 1-5 เท่ากับ 63.3 63.4 50.0 และ 63.0 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความสัมพันธ์กันทางสถิติ ($r = 0.309$) (Figure 19) จึงไม่ส่งผลกระทบต่อความแตกต่างของปริมาณของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในแต่ละ batch เช่นกัน ในช่วงนี้เป็นระยะที่ตัวผู้และตัวเมียจับคู่ผสมพันธุ์กัน ตัวเมียเริ่มสร้างไข่และตัวเมียบางตัวมีไข่เป็นปริมาณมาก ซึ่งเป็นระยะที่ไส้เดือนฝอยมีความต้องการ O₂ ในปริมาณที่มาก จึงจำเป็นต้องเพิ่มอัตราการให้อากาศในแต่ละ batch ใน 4 ช่วงเวลาดังกล่าว ซึ่งแต่ละช่วงห่างกัน 6 ชั่วโมง ดังนี้

- batch ที่ 1 ให้อากาศในอัตรา 180 200 225 และ 225 ลิตร/นาที่
หรือ 2.6 2.9 3.2 และ 3.7 vvm ตามลำดับ
- batch ที่ 2 ให้อากาศในอัตรา 220 225 250 และ 250 ลิตร/นาที่
หรือ 3.1 3.2 3.6 และ 3.6 vvm ตามลำดับ
- batch ที่ 3 ให้อากาศในอัตรา 200 200 200 และ 200 ลิตร/นาที่
หรือให้ 2.9 vvm คงที่ตลอด
- batch ที่ 4 ให้อากาศในอัตรา 210 230 266 และ 300 ลิตร/นาที่
หรือ 3 3.3 3.8 4.2 vvm ตามลำดับ
- batch ที่ 5 ให้อากาศในอัตรา 180 180 180 และ 180 ลิตร/นาที่
หรือ 2.6 vvm เท่ากันตลอด

ส่วนอัตราการกวนนั้นใน batch ที่ 1-4 ยังคงรักษาระดับความเร็ว 180 รอบ/นาที่ และใน batch ที่ 5 นั้น เพิ่มอัตราการกวนเป็น 190 รอบ/นาที่ เนื่องจากช่วงนี้เป็นช่วงที่ไส้เดือนฝอย พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ เพศเมีย หากมีการปรับอัตราความเร็วในการกวนสูงเกินไป จะมีผลกระทบต่อ การจับคู่ผสมพันธุ์กันของไส้เดือนฝอย ซึ่งจะมีผลต่อการได้ผลผลิตต่ำ (Pace *et al.*, 1986 ; Friedman *et*

al.,1989) ในช่วงนี้แม้จะมีการให้อากาศในอัตราที่สูง แต่จะเห็นว่าระดับ pO_2 ยังคงลดลงเรื่อยๆ แสดงว่า ระดับการให้อากาศดังกล่าวยังไม่เพียงพอ ฉะนั้นจึงต้องมีการเริ่มให้ O_2 บริสุทธิ์ ในช่วงระหว่าง ชั่วโมงที่ 60-66 เพื่อรักษาระดับ pO_2 ไม่ให้ลดลงถึง 0% และให้อยู่ระหว่าง 10-50% หลังการเติม O_2 บริสุทธิ์ตามที่กำหนดไว้

ในช่วงการเลี้ยงที่ 72-96 ชั่วโมง (4 วัน) ของการเลี้ยง (Figure 12-16) ในช่วงเวลานี้ถือว่าเป็นช่วงวิกฤติของการเลี้ยงขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอย เนื่องจากตัวเมียทุกตัวสร้างไข่และมีไข่เต็มท้องและตัวเมียบางตัวก็เริ่มปล่อยไข่ที่ได้รับการผสมแล้วออกสู่ภายนอก และไข่บางส่วนก็ฟักออกเป็นตัวอ่อนวัย 1, 2 เช่นเดียวกันกับช่วงที่ผ่านมา ไส้เดือนฝอยมีความต้องการ O_2 สูงมาก เพื่อที่จะไม่ให้ระดับ pO_2 ลดลงถึง 0% และจะต้องรักษาระดับ pO_2 อยู่ระหว่าง 10-30% ตามที่กำหนด ดังนั้นจึงให้อากาศและ O_2 บริสุทธิ์ผสมกัน ในอัตราเท่ากับช่วงปลายของการเลี้ยงที่ 48-72 ชั่วโมง ในทุก batch และเพิ่มอัตราการกวนในบางช่วงเวลาดังนี้

<u>batch ที่ 1</u>	ชั่วโมงที่ 72-90 อัตราการกวน 180 รอบ/นาที ชั่วโมงที่ 90-96 เพิ่มอัตราการกวนเป็น 220 รอบ/นาที
<u>batch ที่ 2</u>	ชั่วโมงที่ 72-78 อัตราการกวน 190 รอบ/นาที ชั่วโมงที่ 78-84 เพิ่มอัตราการกวนที่ 230 รอบ/นาที ชั่วโมงที่ 84-96 เพิ่มอัตราการกวนที่ระดับ 260 รอบ/นาที
<u>batch ที่ 3</u>	ชั่วโมงที่ 72-78 เพิ่มอัตราการกวนเป็น 215 รอบ/นาที ชั่วโมงที่ 78-96 เพิ่มอัตราการกวนอยู่ในระดับ 260 รอบ/นาที
<u>batch ที่ 4</u>	ในทุกๆ 6 ชั่วโมงของช่วงนี้ เพิ่มอัตราการกวนในระดับ 190 225 255 และ 260 รอบ/นาที ตามลำดับ
<u>batch ที่ 5</u>	ในทุกๆ 6 ชั่วโมงเพิ่มเป็น 200 225 240 และ 250 รอบ/นาที ตามลำดับ

การเพิ่มอัตราการกวนระยะนี้เพื่อให้การละลายของ O_2 ในอาหารมากขึ้น และการที่ค่อยๆ เพิ่มอัตราความเร็วขึ้นเพื่อที่จะไม่ให้เกิดการผสมพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ซึ่งเกิดขึ้นในช่วงต้นของการเลี้ยง จากการนับปริมาณตัวอ่อนทั้งหมด ($J_1 + J_2$) ในแต่ละ batch พบว่า มีความแตกต่างกัน โดย batch 1 2 3 4 และ 5 มีตัวอ่อน 15,655 17,833 16,633 43,500 และ 34,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ ถึงแม้ว่ายังมีไข่จำนวนหนึ่งที่ยังไม่ฟักออกเป็นตัวอ่อน อาจกล่าวได้ว่า batch ที่ 4 และที่ 5 มีแนวโน้มให้ผลผลิตมากกว่า

ในช่วงการเลี้ยงที่ 96-120 ชั่วโมง (5 วัน) ในช่วงนี้ส่วนใหญ่จะพบว่าตัวอ่อน 1 และ 2 ($J_1 + J_2$) ในทุก batch อยู่ระหว่าง 98.5-99.1% มีตัวเมียพร้อมไข่ และตัวผู้ในปริมาณที่น้อยมากในทุก batch ระหว่าง 0.4-0.8% และ 0.1-0.4% ตามลำดับ ซึ่งส่วนใหญ่ได้ตายไปเนื่องจากหมดอายุขัย ฉะนั้นความต้องการอากาศของไส้เดือนฝอยในช่วงนี้น้อยกว่าการเลี้ยงในช่วงที่ผ่านมาจึงหยุดการให้ O_2 บริสุทธิ์ และมีการปรับอัตราการให้อากาศและการกวนดังนี้ เพื่อรักษาระดับ pO_2 ให้อยู่ในช่วง 30-50%

<u>batch ที่ 1</u>	ชั่วโมงที่ 96-102	เพิ่มอัตราการให้อากาศเป็น 270 ลิตร/นาที่ (3.9 vvm) คงที่ เพิ่มอัตราการกวน 230 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 102-120	อัตราการให้อากาศคงที่ 270 ลิตร/นาที่ เพิ่มอัตราการกวนเป็น 260-270 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 2</u>	ชั่วโมงที่ 96-108	อัตราการให้อากาศ 250 ลิตร/นาที่ (3.7 vvm) อัตราการกวน 260 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 108-120	อัตราการให้อากาศคงที่ 250 ลิตร/นาที่ อัตราการกวนลดลงที่ 210 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 3</u>	ชั่วโมงที่ 96-108	อัตราการให้อากาศ 200 ลิตร/นาที่ (2.8 vvm) อัตราการกวน 260 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 108-120	อัตราการให้อากาศคงที่ 200 ลิตร/นาที่ อัตราการกวนลดลงที่ระดับ 240 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 4</u>	ชั่วโมงที่ 96-102	อัตราการให้อากาศ 300 ลิตร/นาที่ (4.3 vvm) อัตราการกวน 260 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 102-120	อัตราการให้อากาศคงที่ 300 ลิตร/นาที่ อัตราการกวนลดลงที่ระดับ 230 รอบ/นาที่

batch ที่ 5 แตกต่างจาก batch อื่นๆ คือ ลดอัตราการให้อากาศอยู่ในระดับที่ต่ำ คือ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) แต่มีการเพิ่มอัตราการกวนสูงกว่า batch อื่นๆ โดยปรับความเร็วในการกวนคงที่ 275 รอบ/นาที่

ในช่วงการเลี้ยงที่ 120-144 ชั่วโมง (6 วัน) จะเห็นได้ว่า จากการสุ่มนับไม่พบตัวเต็มวัยทั้งตัวเมียและตัวผู้ แสดงว่า หลังจากที่ตัวเมียวางไข่ครั้งสุดท้ายแล้วตาย เช่นเดียวกับเพศผู้ ซึ่งตายไปเพาะหมดอายุขัย ในทุก batch มีตัวอ่อนวัย 1 (J_1) อยู่ระหว่าง 9.0-13.3% ตัวอ่อนวัย 2 (J_2) อยู่ระหว่าง 71.1-77.7% และเริ่มพบตัวอ่อนวัย 3 (J_3) ในช่วงนี้เพียง 10.6-13.7% อัตราการให้อากาศและการกวน เพื่อที่จะรักษาระดับ pO_2 ให้อยู่ที่ 50-100% ในทุก batch

batch ที่ 1 ลดอัตราการให้อากาศจากช่วงที่ผ่านมาทุก 6 ชั่วโมง เหลือ 260 240 230 และ 200 ลิตร/นาที่ (3.7 3.4 3.3 และ 2.9 vvm) ตามลำดับ และในขณะเดียวกันลดอัตราการกวนทุก 6 ชั่วโมง เป็น 260 230 190 และ 180 รอบ/นาที่ ตามลำดับ

batch ที่ 2 ลดอัตราการให้อากาศทุกๆ 6 ชั่วโมง เหลือ 200 190 150 และ 150 ตามลำดับ (2.8 2.7 2.1 และ 2.1 vvm) เช่นกัน อัตราการกวนลดลงเป็น 200 180 150 และ 140 รอบ/นาที่ ตามลำดับ

batch ที่ 3 ชั่วโมงที่ 120-138 รักษาอัตราการให้อากาศ 200 ลิตร/นาที่ (2.9 vvm)
อัตราการกวนอยู่ในระดับ 200 รอบ/นาที่

ชั่วโมงที่ 138-144 อัตราการให้อากาศ 180 ลิตร/นาที่ (2.6 vvm)

อัตราการกวนอยู่ในระดับคงที่ 200 รอบ/นาที

batch ที่ 4 ลดระดับอัตราการให้อากาศทุกๆ 6 ชั่วโมง เหลือ 280 270 260 และ 225 ลิตร/นาที (4.0 3.9 3.7 และ 3.2 vvm)

ชั่วโมงที่ 120-126 อัตราการกวน 260 รอบ/นาที

ชั่วโมงที่ 126-144 ลดอัตราการกวนลงมาอยู่ที่ระดับ 230 รอบ/นาที

batch ที่ 5 อัตราการให้อากาศ 150 ลิตร/นาที (2.1 vvm) คงที่ตลอด (ต่ำกว่าการให้อากาศใน batch อื่นๆ) ส่วนอัตราการกวนอยู่ในระดับ 275 รอบ/นาที คงที่ตลอดทดแทนการให้อากาศในอัตราที่ต่ำ

ในช่วงการเลี้ยงที่ 144-321 ชั่วโมง (7-13 วัน) เป็นช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวอ่อนวัยต่างๆ แต่ไม่พบตัวอ่อนวัย 1 (J_1) แสดงว่า ในทุก batch นั้นไข่ฟักออกเป็นตัวอ่อนหมดแล้ว จึงสามารถเปรียบเทียบประชากรของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในแต่ละ batch ช่วงนี้จึงเป็นการพัฒนาของตัวอ่อนวัย 2 (J_2) เป็นวัย 3 (J_3) และเข้าสู่วัย 3 ระยะทำลาย (infective juvenile หรือ IJ) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของการเลี้ยงขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอย และจะทำการเก็บล้าง (harvesting) ต่อไป การที่ไส้เดือนฝอย J_3 ไม่พัฒนาต่อไปเป็น J_4 แต่เปลี่ยนเข้าสู่วัย IJ ซึ่งเป็นระยะที่สามารถอยู่อิสระในธรรมชาติ โดยไม่กินอาหารและปากปิด เนื่องจากว่า สภาพการเลี้ยงไม่เหมาะสมเกิดขึ้นในถังหมักเพราะสารอาหารต่างๆถูกใช้หมดไป มีการสะสมสิ่งขับถ่ายหรือของเสียมากขึ้น เช่นเดียวกันกับการเลี้ยงขยายพันธุ์ในแมลงอาศัย (insect host) เมื่ออาหารในตัวแมลงหมดตัวอ่อนทุกวัยจะพัฒนาแล้วเปลี่ยนเข้าสู่วัย IJ แล้วออกจากตัวแมลงไปสู่สภาพธรรมชาติ เพื่อหาเหยื่อต่อไป จะเห็นได้ว่าใน batch ที่ 1 2 และ 3 ตัวอ่อนวัยต่างๆ จะพัฒนาเข้าสู่วัย IJ ทั้งหมด (100%) เมื่อเลี้ยงครบ 321 ชั่วโมง (13 วัน) ส่วนใน batch ที่ 4 และ 5 ได้วัย IJ 100% ที่ 288 ชั่วโมง (12 วัน) ใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงสั้นกว่า 1 วัน ทั้งนี้เนื่องจากว่าปริมาณของตัวอ่อนวัยต่างๆ มากกว่า (Figure 7-11) อาหารที่ใช้เลี้ยงซึ่งมีปริมาณจำกัดจึงหมดเร็วขึ้น การที่จะเลี้ยงขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอยให้ได้ครบ 1 วงจรชีวิต และได้ผลผลิตเป็น IJ ทั้งหมดในระยะเวลาที่เหมาะสมนั้นปริมาณ inoculum ของไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงไปเลี้ยงจะต้องมีความสัมพันธ์กับปริมาณอาหาร (วัชรีและสุทธิชัย, 2544 , Han, 1996) ระยะเวลาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อต้นทุนการผลิต ซึ่งใช้เวลานานกว่าการผลิต microbial insecticide อื่นๆ เช่น *Bacillus thuringiensis* (Gaugler and Han, 2001) การพัฒนาของตัวอ่อนไส้เดือนฝอยเป็นวัยต่างๆ ในช่วงนี้ มีความต้องการออกสายน้อยกว่าในช่วงการพัฒนาของตัวเต็มวัย การลดอัตราการให้อากาศและการกวนต่ำเกินไปอาจทำให้ไส้เดือนฝอยตกตะกอนสู่ก้นถัง ฉะนั้นการปรับอัตราการให้อากาศและการกวนที่เหมาะสมในแต่ละ batch ให้มีค่า pO_2 อยู่ระหว่าง 50-100% ในช่วงการเลี้ยงที่ 144-312 ชั่วโมง มีดังนี้

batch ที่ 1 ชั่วโมงที่ 144-192 อัตราการให้อากาศคงที่ 200 ลิตร/นาที (2.9 vvm)

อัตราการกวน 180 รอบ/นาที

	ชั่วโมงที่ 192-312 ลดอัตราการให้อากาศอยู่ในระดับ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) อัตราการกววนอยู่ในระดับ 160 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 2</u>	อัตราการให้อากาศคงที่ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) อัตราการกววน 140 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 3</u>	ชั่วโมงที่ 144-168 อัตราการให้อากาศอยู่ระหว่าง 150-180 ลิตร/นาที่ หรือ (2.1-2.6 vvm) อัตราการกววน 190-200 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 168-192 อัตราการให้อากาศลดลงจาก 180 ลิตร/นาที่ (2.6 vvm) มาอยู่ในระดับ 100 ลิตร/นาที่ (1.4 vvm) อัตราการกววน 180 ลิตร/นาที่
	ชั่วโมงที่ 192-312 อัตราการให้อากาศคงที่ 100 ลิตร/นาที่ (1.4 vvm) อัตราการกววนคงที่ 180 รอบ/นาที่
<u>batch ที่ 4</u>	ชั่วโมงที่ 144-192 อัตราการกววนให้อากาศ 200 ลิตร/นาที่ (2.9 vvm) อัตราการกววน 200 รอบ/นาที่ (pO_2 50-75%)
	ชั่วโมงที่ 192-216 ลดอัตราการให้อากาศมาอยู่ที่ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) อัตราการกววน 180 รอบ/นาที่ (pO_2 80-100%)
	ชั่วโมงที่ 216-288 อัตราการให้อากาศ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) อัตราการกววน 150 รอบ/นาที่ (pO_2 80-100%)
<u>batch ที่ 5</u>	ต่างกับ batch อื่นๆ คือ
	ชั่วโมงที่ 144-168 อัตราการให้อากาศ 150 ลิตร/นาที่ (2.1 vvm) อัตราการกววนสูง 250 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 168-240 อัตราการให้อากาศยังคงที่ 150 ลิตร/นาที่ อัตราการกววนลดลงที่ 200 รอบ/นาที่
	ชั่วโมงที่ 240-288 ลดอัตราการให้อากาศคงที่ 130 ลิตร/นาที่ (1.8 vvm) อัตราการกววนลดลงที่ 180 รอบ/นาที่

ในช่วงนี้จะเห็นได้ว่า เปอร์เซ็นต์การพัฒนามีแนวโน้มสูงขึ้น ระดับ pO_2 ก็สูงขึ้นตาม ถึงแม้ว่าอัตราการให้อากาศและการกววนในแต่ละ batch สม่่าเสมอเท่ากันตลอด แต่ในบางช่วงจะลดลงก็ตาม แสดงว่าระยะ II นี้มีความต้องการอากาศน้อย

การเปรียบเทียบผลผลิตหรือปริมาณของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในแต่ละ batch ช่วงการเลี้ยงที่ 144-168 (7 วันของการเลี้ยงไส้เดือนฝอย) ระยะนี้ตรวจพบไส้เดือนฝอยเจริญเป็น ตัวอ่อนวัย 2 3 และเริ่มมีวัย ระยะเข้าทำลายแมลง (II) ส่วนตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย ไม่พบเนื่องจากตายเพราะหมดอายุขัย ช่วงนี้จึงไม่มีประชากรใหม่ของไส้เดือนฝอยเพิ่มขึ้นอีก แต่อย่างไรก็ตามจาก Figure 7-11 ปริมาณไส้เดือน

ฝอยวัยต่างๆ ที่ทำการสุ่มตรวจนับได้มีการเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั้งนี้เนื่องจากอาหารเหลวได้ถูกใช้ไปและมีการระเหยไปบางส่วนปริมาณค่อยๆ ลดลง เหลือประมาณ 40 ลิตร ในช่วงการเก็บผลผลิต จึงทำให้ความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยต่ออาหาร 1 มล. ที่นับได้เพิ่มขึ้น จากการเปรียบเทียบปริมาณไส้เดือนฝอยทุกวัยรวมกันในช่วง 144-168 ชั่วโมง พบว่า batch ที่ 1 2 และ 3 มีปริมาณเฉลี่ย 134,500 113,333 และ 109,500 ตัว/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ ต่ำกว่าใน batch ที่ 4 และ 5 ซึ่งมีปริมาณเฉลี่ย 298,710 และ 270,500 ตัว/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ ส่วนผลผลิตสุดท้ายที่เก็บได้ใน batch ที่ 1-5 มีปริมาณไส้เดือนฝอยวัย IJ 161,000 130,500 131,500 313,500 และ 302,500 ตัว/อาหาร 1 มล. ตามลำดับ ผลของการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า สภาพการเลี้ยงใน batch ที่ 4-5 มีความเหมาะสมต่อการขยายพันธุ์และเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยมากกว่าใน batch ที่ 1-3 ทั้งนี้เนื่องจากช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกัน ใน batch ที่ 4-5 มีสภาพที่เหมาะสมกว่าตามที่กล่าวมาแล้ว จึงมีผลให้ตัวเมียสร้างไข่ได้ในปริมาณที่มากกว่า ซึ่งจะเห็นได้ในชั่วโมงที่ 72-96 96-120 และ 120-144 ปริมาณของตัวอ่อน J_1 ที่ฟักออกจากไข่ ใน batch ที่ 4-5 นั้น สูงกว่าใน batch ที่ 1-3 อย่างเห็นได้ชัด

มีงานทดลองการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในถังหมักแบบ stirred tank bioreactor ของ Friedman *et al.* (1989) โดยใช้อาหารเหลวซึ่งประกอบด้วย แป้งถั่วเหลือง yeast extract น้ำมันข้าวโพด และไข่แดง ได้ผลผลิตเป็นไส้เดือนฝอยวัย IJ ประมาณ 1.1×10^5 ตัว/อาหาร 1 มล. พบว่าอัตราการกวนมีผลต่อการจับคู่ผสมพันธุ์ของตัวผู้และตัวเมีย และช่วงระยะตัวเต็มวัยมีความต้องการ O_2 สูง เช่นเดียวกับงานทดลองนี้ นอกจากนี้ Friedman (1990) ได้พัฒนา “variable agitation regime” ขึ้นมา โดยในช่วง log phase ของการเลี้ยง symbiotic bacteria จะต้องปรับความเร็วในการกวนให้สูงขึ้น เพื่อให้มี O_2 เพียงพอกับความต้องการของแบคทีเรีย ส่วนในช่วง lag phase ซึ่งคล้ายกับช่วงการผสมพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ทำการลดความเร็วรอบในการกวนให้ต่ำลง ซึ่งเป็นวิธีการที่ใกล้เคียงกับสภาพการทดลองนี้ ส่วนงานทดลองของ Pace *et al.* (1986) ได้ผลผลิต 90×10^4 ตัว/อาหาร 1 มล. โดยใช้ใบพัดแบบ paddle impeller ที่มีแรงเฉือน (shear force) ในการกวนต่ำ และปรับให้ช่องอากาศออกของ air sparger หันสู่กันถึงหมัก เพื่อไม่ให้มีผลต่อการผสมพันธุ์ของไส้เดือนฝอย Nerves *et al.* (2001) ได้หลีกเลี่ยงการมีผลกระทบของใบพัดกวนต่อการผสมพันธุ์ของไส้เดือนฝอย โดยใช้ถังหมักแบบ external-loop airlift bioreactor ในการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้ผลผลิต 6×10^4 ตัว/อาหาร 1 มล. เพิ่มขึ้น 120 เท่า จากปริมาณ inoculum เริ่มต้น ถังหมักแบบนี้มีแนวโน้มจะนำมาผลิตไส้เดือนฝอยได้ดี นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่มีผลกระทบต่อการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในถังหมัก ได้แก่ การเกิดฟอง ซึ่งเกิดจากการกวน และการให้อากาศในอัตราที่สูงฟองที่ล้นอาจเข้าไปสู่แผ่นกรองอากาศทำให้การระบายอากาศออกจากถังช้าลงทำให้ความดันในถังหมักสูงขึ้น การเติมสาร antifoam อาจเป็นพิษต่อแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยและรบกวนอัตราของ Oxygen transfer ฉะนั้นการเลือกสาร antifoam ที่เหมาะสมก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญ สำหรับในงานทดลองนี้ไม่ใช้สาร antifoam แต่ทำการ

ป้องกันฟองขึ้นโดยการปรับอัตราการกวนและการให้อากาศไม่ให้ฟองเกิดขึ้นมากโดยเฉพาะในช่วงเริ่มต้นของการเลี้ยง bacteria การให้อากาศในอัตราต่ำเกินไปเพื่อที่จะลดการเกิดฟอง อาจมีผลต่อการสะสม CO₂ ในถังหมักมากขึ้นและมีผลต่อไส้เดือนฝอย (Strauch and Ehler, 2000) อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญของ bacteria และไส้เดือนฝอยนั้นแตกต่างกัน ในงานทดลองนี้ปรับอุณหภูมิ 28°C สำหรับการเลี้ยงแบคทีเรีย และ 25°C สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนฝอย อุณหภูมิมีผลต่อการพัฒนาของวัย IJ ที่ใส่ลงไปเลี้ยงเริ่มต้น (inoculum) หรือ เปอร์เซ็นต์ recovery (Ehler, *et al.*, 2000) ปริมาณ inoculum ของ bacteria และไส้เดือนฝอยที่ใส่ลงเลี้ยงก็มีผลต่อผลผลิตที่ได้ (วัชรวิ และสุทธิชัย 2542 ; Han 1996) จากการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากผลการทดลองในการผลิตขยายปริมาณไส้เดือนฝอยชนิดต่างๆ ในอาหารเหลว Gaugler and Han 2001 พบว่า ไส้เดือนฝอยชนิดที่มีขนาดเล็ก (ความยาวลำตัว) กว่าที่มีแนวโน้มให้ผลผลิตมากกว่าไส้เดือนฝอยชนิดที่มีขนาดใหญ่กว่า ส่วนการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในระดับอุตสาหกรรมนั้นมีบริษัท Biosys ประเทศสหรัฐอเมริกา ประสบความสำเร็จในการผลิตในระดับถึงหมัก ขนาด 80,000 ลิตร โดยได้ผลผลิต 150,000 IJs/อาหารเหลว 1 มล. (Georgis, 2001) ส่วนคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในทุก batch ของงานทดลองนี้ อยู่ในช่วง 40-60% ซึ่งเป็นระดับมาตรฐานทั่วไป (Miller, 1989) (Table 7) จากผลการทดลองนี้ แสดงให้เห็นว่า เราสามารถที่จะนำเทคโนโลยีการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ไปใช้ในการผลิตระดับอุตสาหกรรมได้

สรุปผลการทดลอง

อัตราการให้อาหารและการกวนในระดับที่แตกต่างกันในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria (*Xenorhabdus nematophila*) 24 ชั่วโมงแรกก่อนใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ลงไปเลี้ยงร่วมกัน มีผลต่อการขยายพันธุ์หรือปริมาณของไส้เดือนฝอย โดยที่การให้อาหารและการกวนในอัตราที่สูงที่ 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 ส่วนการให้อาหารและปรับการกวนในอัตราต่ำกว่า 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 คือที่ชั่วโมงที่ 21 ของการเลี้ยง และไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในสภาพนี้ให้ผลผลิตที่ระดับต่ำกว่าเช่นกัน คือ อยู่ระหว่าง 131,000-161,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ส่วนคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในทุกสภาพการทดลอง (batch) อยู่ในช่วง 40-60% ซึ่งอยู่ในระดับมาตรฐาน จากผลการทดลองนี้จะนำเทคโนโลยีไปใช้ในการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ระดับอุตสาหกรรมต่อไป

Table 1 Air flow (l/min) and agitation (rpm) rates set in culturing symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in 70 liters of medium for 24 hours prior to *Steinernema carpocapsae* inoculation in the 1st batch of a 130 liter fermenter.

Culture period (h)	Air flow rate (l/min)			Stirring rate (rpm)		
	Max.	Min.	x	Max.	Min.	x
0-3	50	50	50	180	180	180
4-5	80	80	80	180	180	180
6-7	100	100	100	180	180	180
8-24	150	150	150	180	180	180
Average (24 h)	127.5			180		

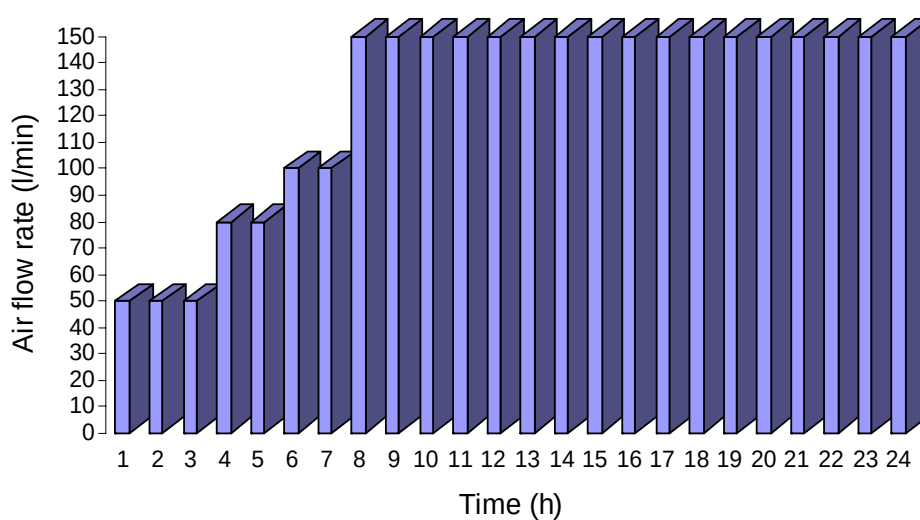


Figure 1 Air flow rates adjusted for culturing symbiotic bacterium in 70 liters of medium for 24 hours in the 1st fermentation batch.

Table 2 Air flow (l/min) and agitation (rpm) rates set in culturing symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in 70 liters of medium for 24 hours prior to *Steinernema carpocapsae* inoculation in the 2nd batch of a 130 liter fermenter.

Culture period (h)	Air flow rate (l/min)			Stirring rate (rpm)		
	Max.	Min.	x	Max.	Min.	x
0-3	50	50	50	150	150	150
4-7	80	80	80	170	170	170
8-15	100	100	100	180	180	180
16-24	150	150	150	180	180	180
Average (24 h)	109.2			174.6		

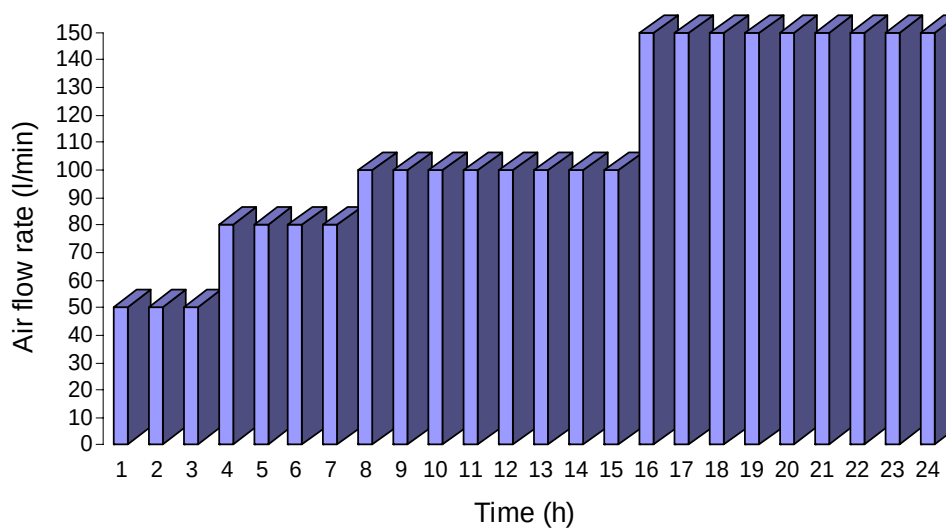


Figure 2 Air flow rates adjusted for culturing symbiotic bacterium in 70 liters of medium for 24 hours in the 2nd fermentation batch.

Table 3 Air flow (l/min) and agitation (rpm) rates set in culturing symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in 70 liters of medium for 24 hours prior to *Steinernema carpocapsae* inoculation in the 3rd batch of a 130 liter fermenter.

Culture period (h)	Air flow rate (l/min)			Stirring rate (rpm)		
	Max.	Min.	x	Max.	Min.	x
0-3	50	50	50	170	170	170
4-8	100	100	100	180	180	180
9-24	150	150	150	180	180	180
Average (24 h)	127.1			178.8		

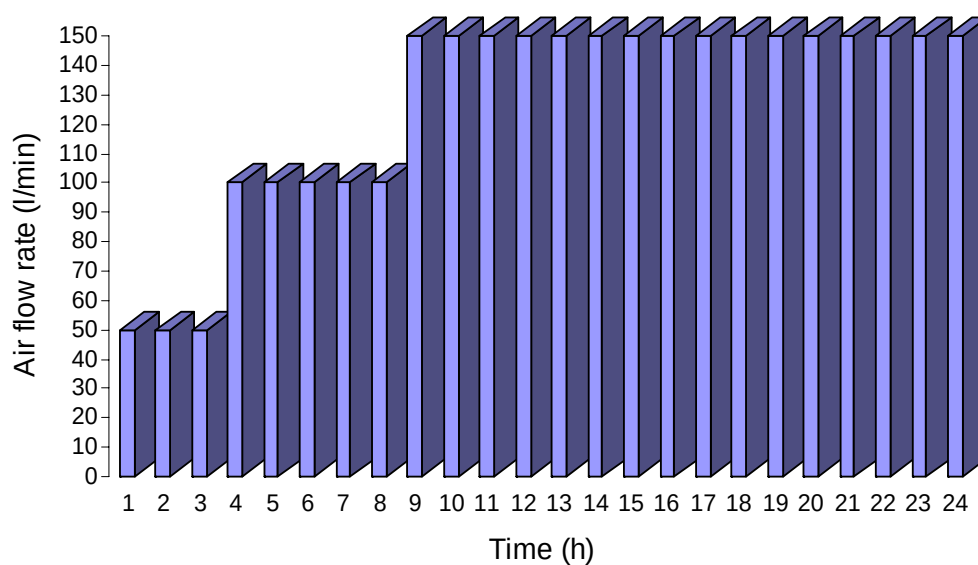


Figure 3 Air flow rates adjusted for culturing symbiotic bacterium in 70 liters of medium for 24 hours in the 3rd fermentation batch.

Table 4 Air flow (l/min) and agitation (rpm) rates set in culturing symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in 70 liters of medium for 24 hours prior to *Steinernema carpocapsae* inoculation in the 4th batch of a 130 liter fermenter.

Culture period (h)	Air flow rate (l/min)			Stirring rate (rpm)		
	Max.	Min.	x	Max.	Min.	x
0-1	50	50	72.5	180	180	180
2-4	80	80	80	180	180	180
5	120	120	120	180	180	180
6	150	150	150	180	180	180
7	180	180	180	200	180	190
8-24	200	200	200	200	200	200
Average (24 h)	172.5			195.0		

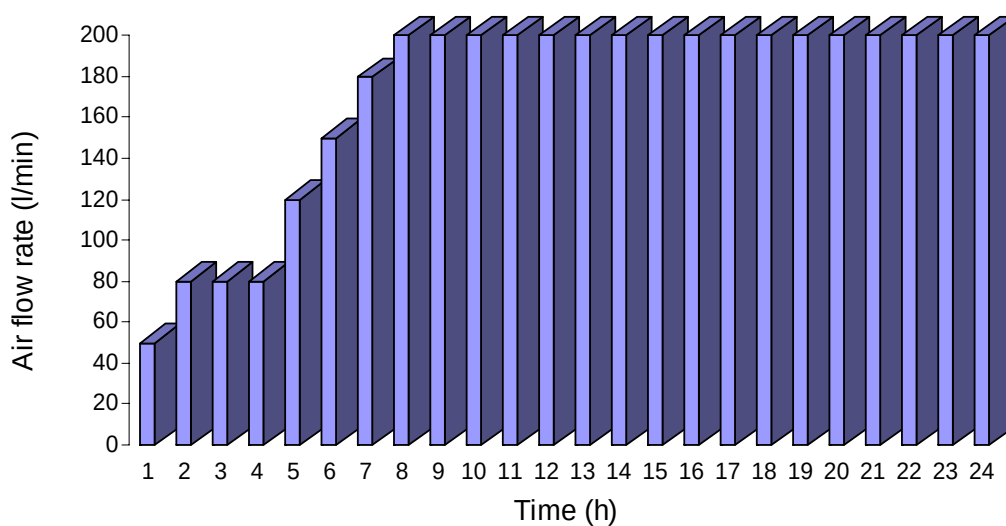


Figure 4 Air flow rates adjusted for culturing symbiotic bacterium in 70 liters of medium for 24 hours in the 4th fermentation batch.

Table 5 Air flow (l/min) and agitation (rpm) rates set in culturing symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* in 70 liters of medium for 24 hours prior to *Steinernema carpocapsae* inoculation in the 5th batch of a 130 liter fermenter.

Culture period (h)	Air flow rate (l/min)			Stirring rate (rpm)		
	Max.	Min.	x	Max.	Min.	x
0-4	50	50	72.5	190	190	190
5-7	100	100	100	200	190	193
8-24	200	200	200	200	200	200
Average (24 h)	162.5			197.5		

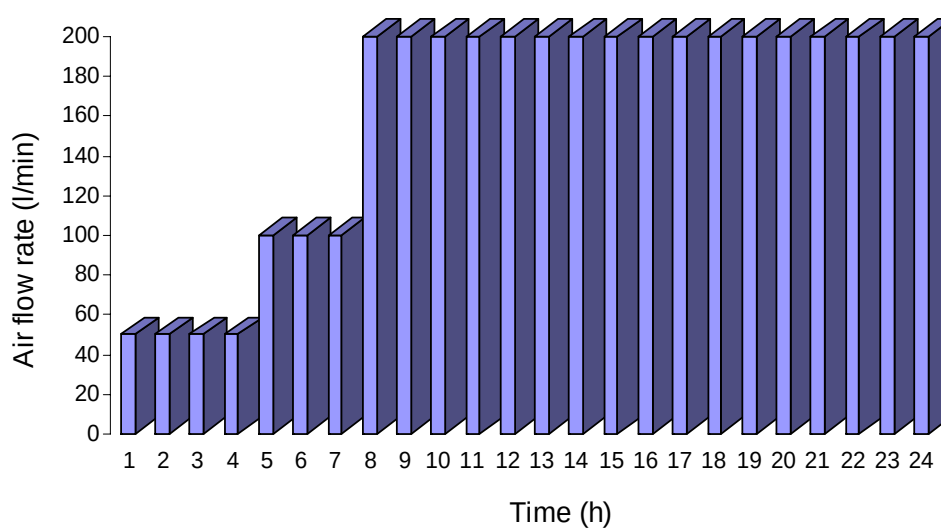


Figure 5 Air flow rates adjusted for culturing symbiotic bacterium in 70 liters of medium for 24 hours in the 5th fermentation batch.

Table 6 The numbers of symbiotic bacterium *Xenorhabdus nematophila* observed at 3 hour intervals during 24 hour culture period under 5 different conditions adjusted before nematode inoculation in 130 liter bioreactor containing 70 liter liquid medium.

Bacterium culture period (h)	Bacterial cell density (cell/ml.)				
	1 st batch	2 nd batch	3 rd batch	4 th batch	5 th batch
0	3.2×10^7	2.8×10^7	3.5×10^7	1.5×10^7	3.2×10^7
3	8.3×10^8	3.4×10^8	4.2×10^8	2.8×10^8	1.5×10^8
6	5.2×10^9	6.5×10^9	1.8×10^9	4.8×10^9	3.5×10^9
9	6.4×10^{10}	2.1×10^{10}	3.2×10^{10}	1.8×10^{10}	2.0×10^{10}
12	6.4×10^{11}	4.8×10^{11}	1.5×10^{11}	2.4×10^{11}	1.5×10^{11}
15	1.5×10^{12}	9.3×10^{12}	4.8×10^{12}	4.1×10^{12}	6.7×10^{12}
18	1.7×10^{13}	2.0×10^{13}	1.5×10^{13}	1.9×10^{14}	1.6×10^{14}
21	1.4×10^{14}	2.1×10^{14}	3.8×10^{14}	2.5×10^{14}	7.6×10^{14}
24	2.3×10^{14}	2.8×10^{14}	2.5×10^{14}	2.0×10^{14}	2.0×10^{14}

Table 7 The quantity and quality production yields and ration of inoculum density to final yields of *Steinernema carpocapsae* infective juveniles (IJ) produced in 70 liters of liquid medium under different process factors set in 5 fermentation batches of a 130 liter fermenter.

Batch No.	Average		Yield (IJ/ml)	Ratio of inoculum to yield	QC. (%)*
	Air flow rate (l/min)	Stirring rate (rpm)			
1 st	127.5	180	161,000	161	45.17
2 nd	109.2	174.6	131,000	131	40.63
3 rd	127.1	178.8	131,500	131.5	41.67
4 th	172.5	195.0	313,000	313	45.17
5 th	162.5	197.5	302,000	302	60.00

* Quality control : the method utilizes a cell well which confine one infective *S. carpocapsae* with one insect host and results infection within 48 hours (Miller, R.W. 1989)

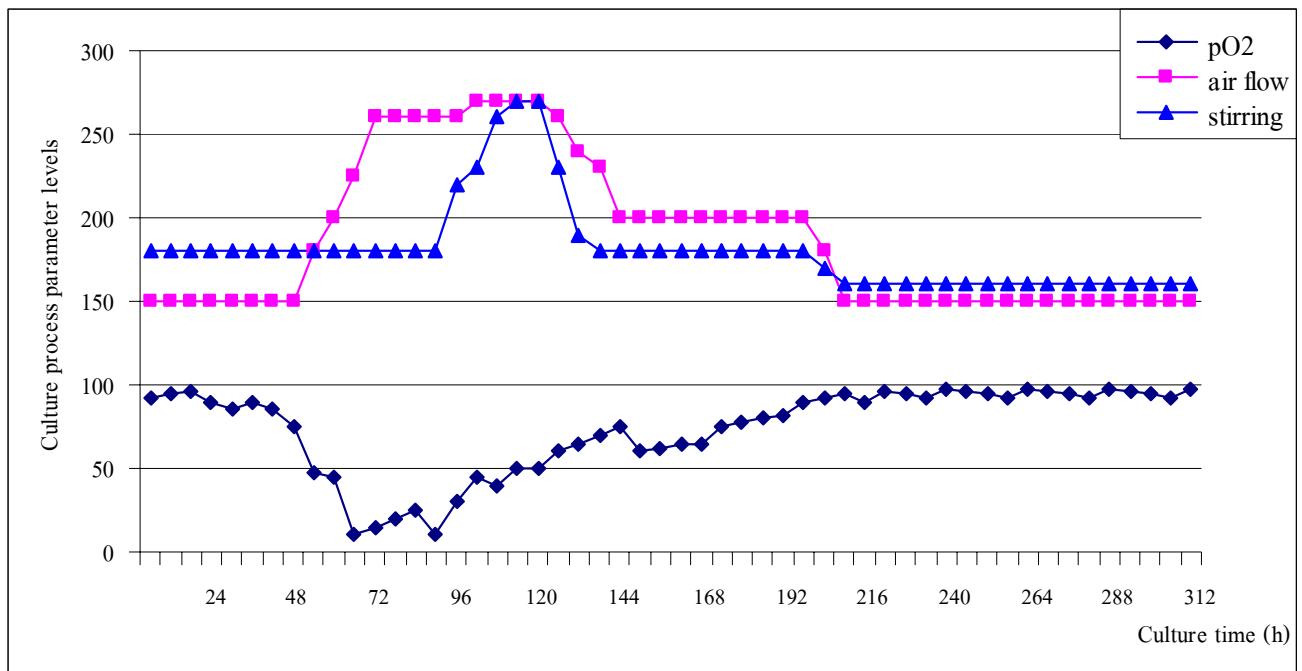


Figure 12 Culture process parameters including pO₂ (%) air flow rate (l/min) and stirring rate (rpm) set in developing liquid fermentation for the entomopathogenic nematode *S. carpocasae* in the 1st production batch of a 130 liter fermenter.

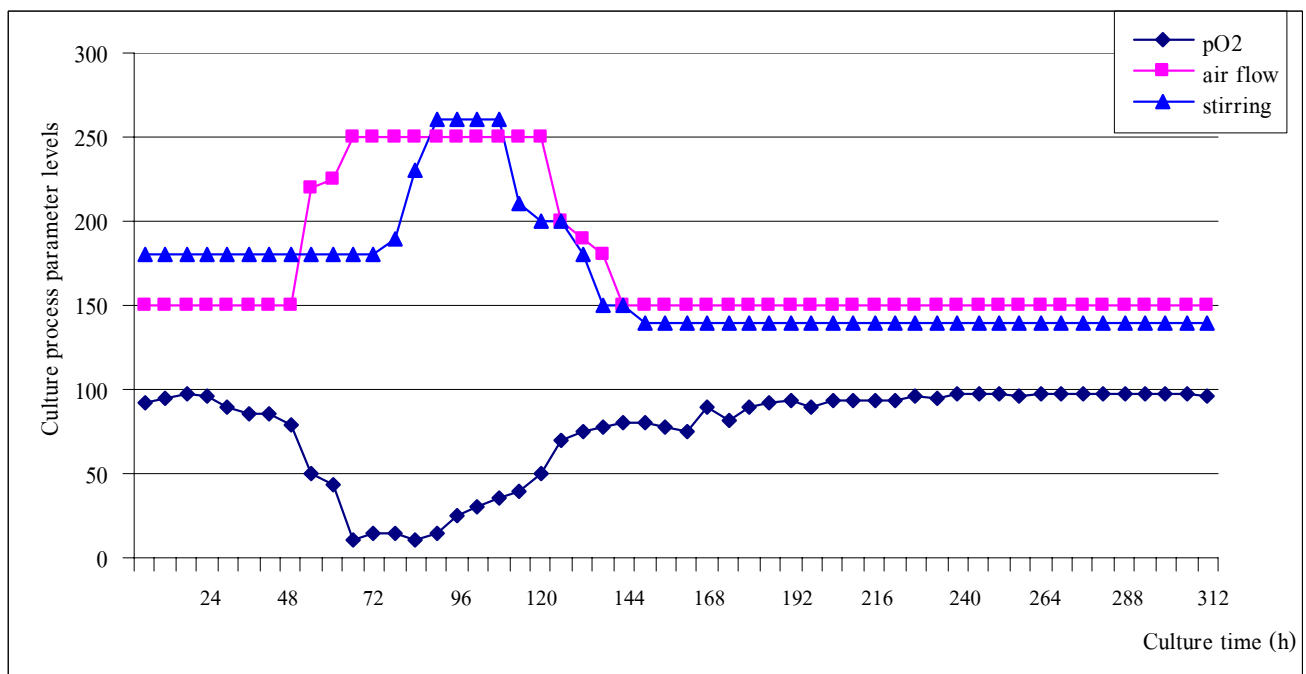


Figure 13 Culture process parameters including pO₂ (%) air flow rate (l/min) and stirring rate (rpm) set in developing liquid fermentation for the entomopathogenic nematode *S. carpocasae* in the 2nd production batch of a 130 liter fermenter.

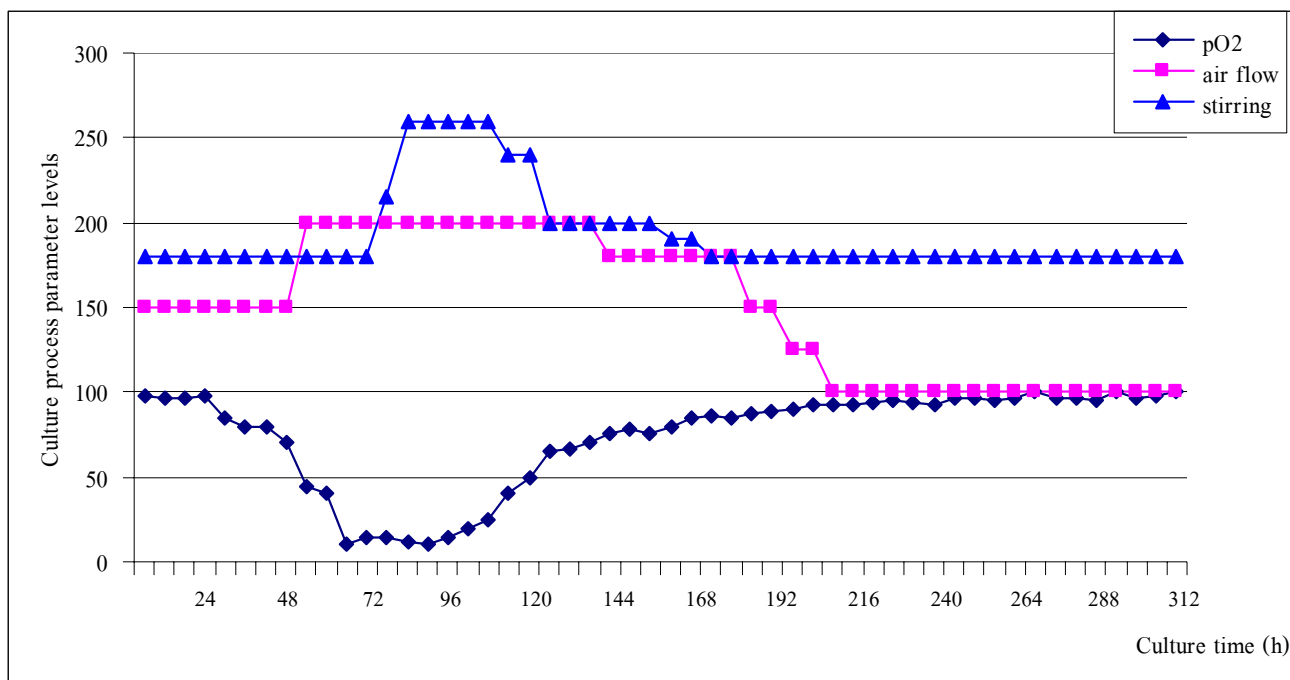


Figure 14 Culture process parameters including pO_2 (%) air flow rate (l/min) and stirring rate (rpm) set in developing liquid fermentation for the entomopathogenic nematode *S. carpocaseae* in the 3rd production batch of a 130 liter fermenter.

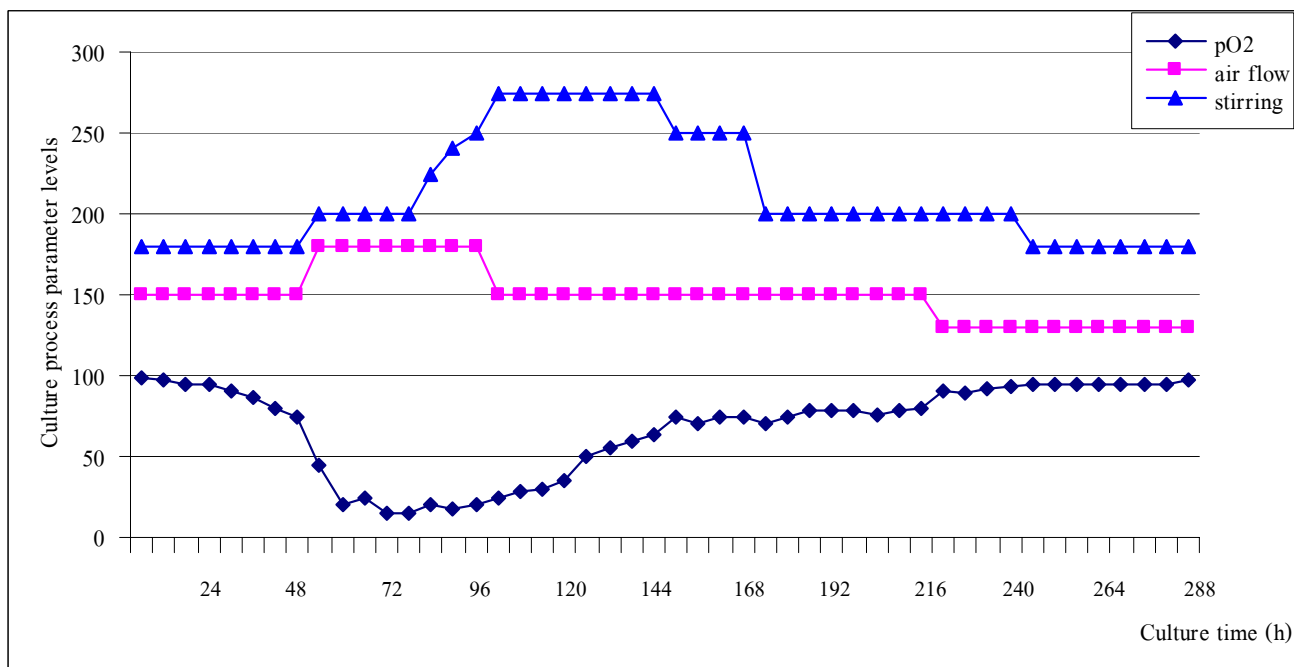


Figure 15 Culture process parameters including pO_2 (%) air flow rate (l/min) and stirring rate (rpm) set in developing liquid fermentation for the entomopathogenic nematode *S. carpocaseae* in the 4th production batch of a 130 liter fermenter.

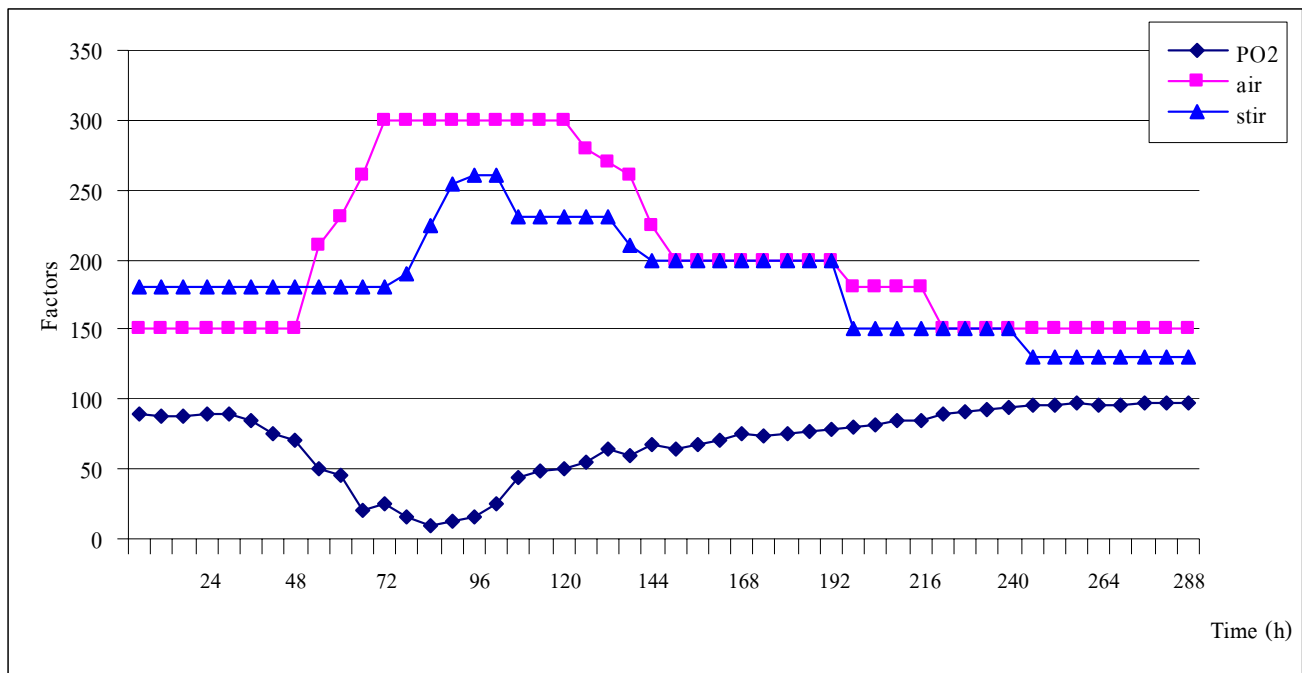


Figure 16 Culture process parameters including pO_2 (%) air flow rate (l/min) and stirring rate (rpm) set in developing liquid fermentation for the entomopathogenic nematode *S. carpocaseae* in the 5th production batch of a 130 liter fermenter.

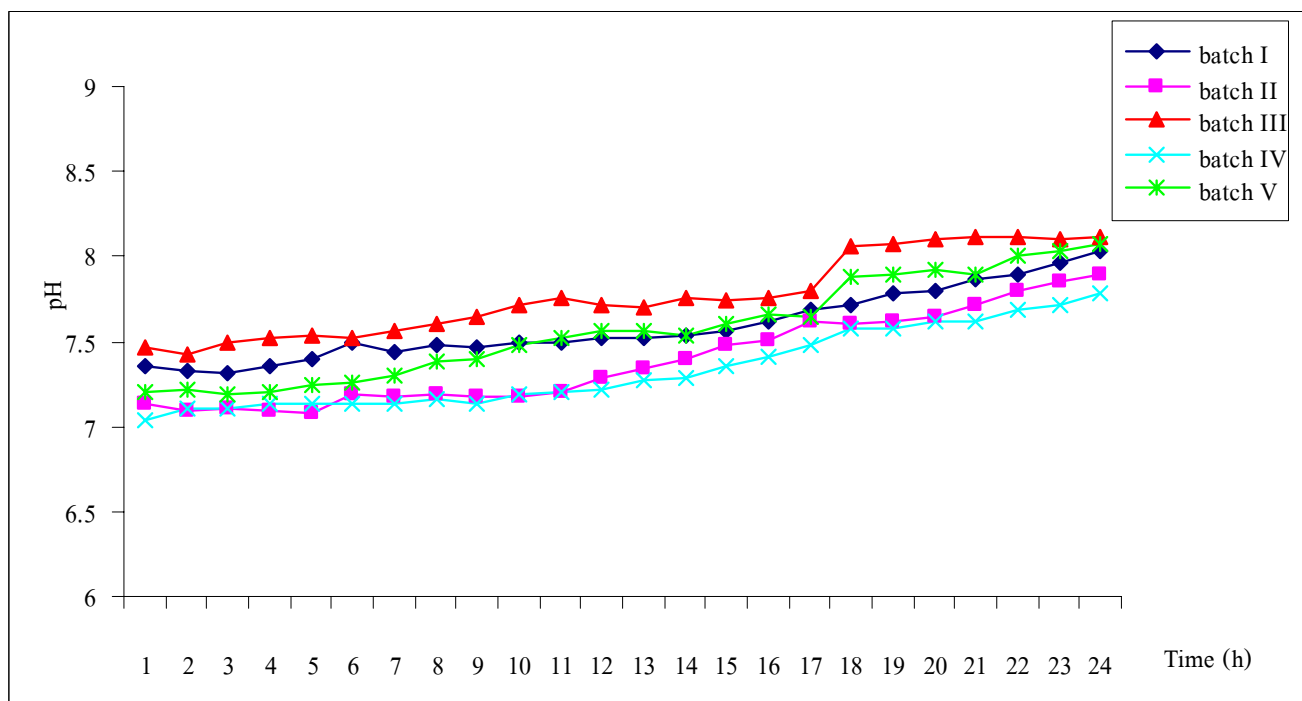


Figure 17 pH level in the liquid medium culturing symbiotic bacteria *Xenorhabdus nematophila* for 5 batches.

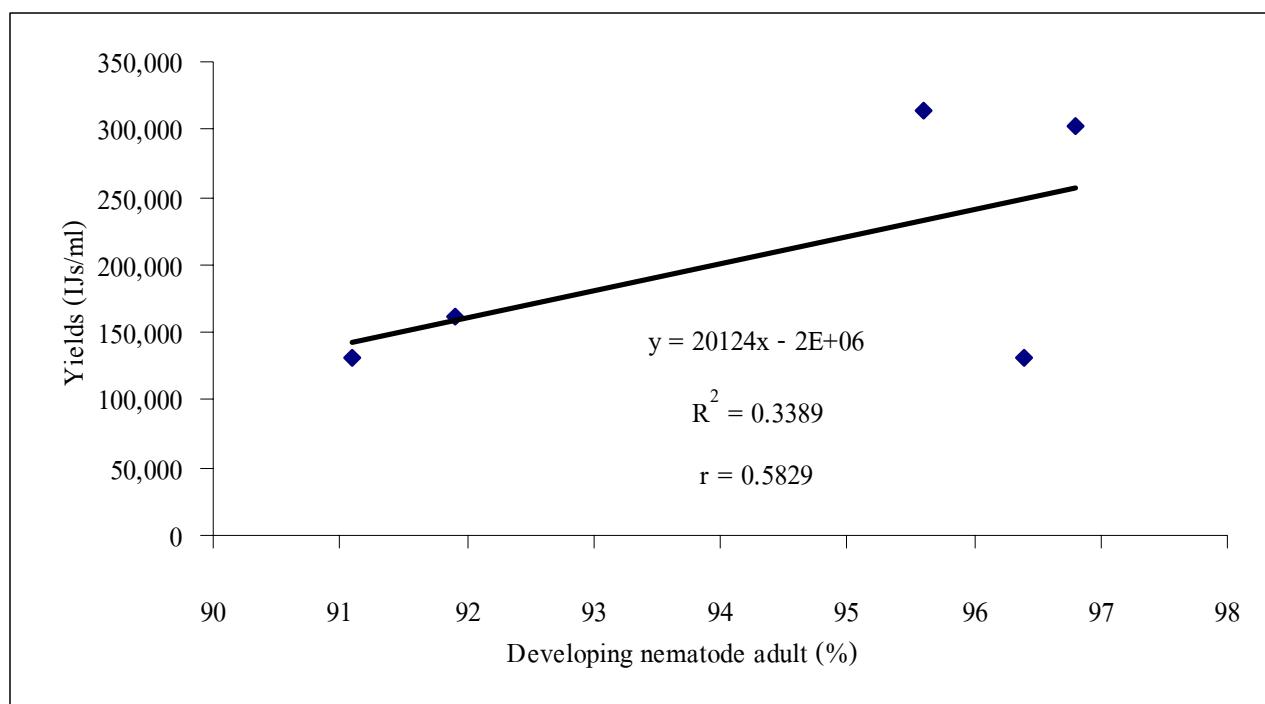


Figure 18 Correlation between percentage of nematode adult stage developing from infective juveniles (IJ) inoculum at the 4th culture day and production yields of the harvested IJ during liquid culture in the production batches 1-5.

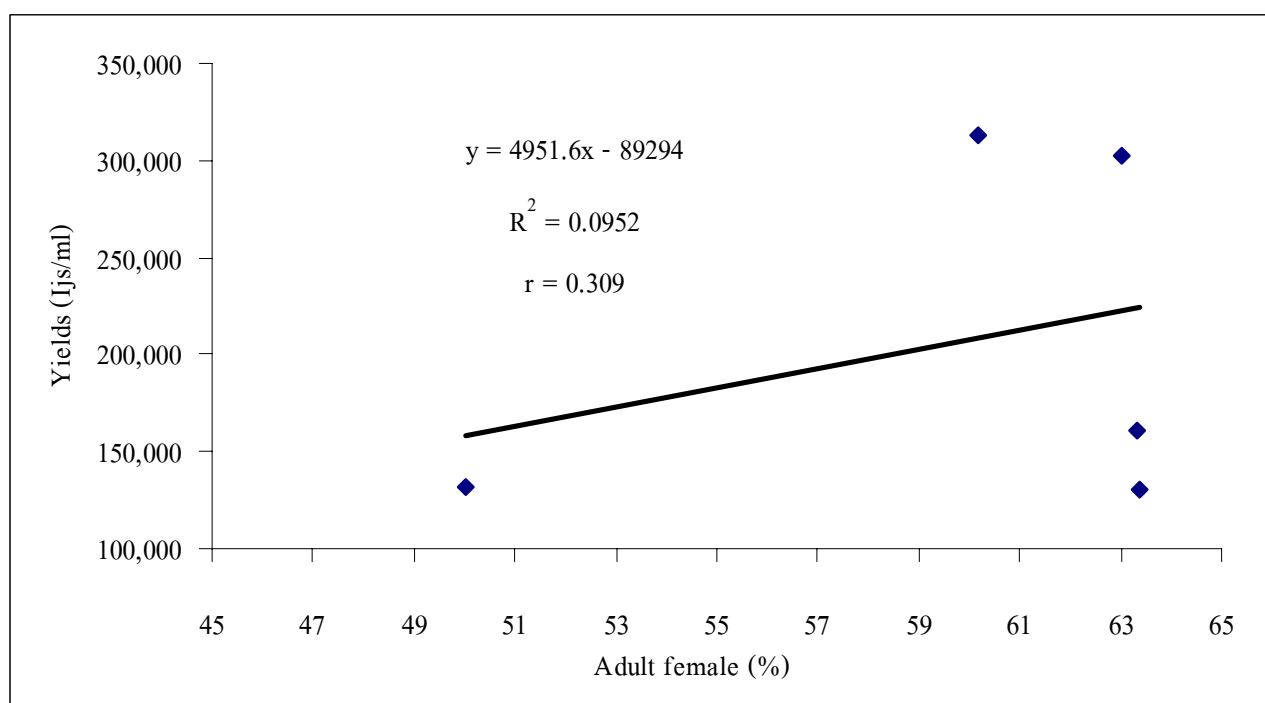


Figure 19 Correlation between percentage of adult females developing from infective juveniles (IJ) inoculum at the 4th culture day and production yields of the harvested IJ during liquid culture in the fermentation batches 1-5.

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2542. ผลของปริมาณแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกันต่อการเพิ่มผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocaseae* ในอาหารเหลว. วารสารกีฏและสัตววิทยา 21 (2) : 76 – 83.
- สุทธิชัย สมสุข และ วัชรวิ สมสุข. 2543. ผลของระดับความเป็นกรดต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงในอาหารเหลว. วารสารกีฏและสัตววิทยา 22 (3) : 228 – 240.
- วัชรวิ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2544. ผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า ใน : รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรมวิชาการเกษตร. สำนักกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 172 น.
- Akhurst, R.J. 1982. Antibiotic activity of *Xenorhabdus spp.*, bacteria symbiotically associated with Insect pathogenic nematodes of the families Heterorhabditidae and Steinernema. Journal of General Microbiology 128 : 3061 – 3065.
- Bowen, D. , Blackkurn, M. , Racheleau, T. Grutzmacher, C. and ffench-Constant, R.H. 2000. Secreted proteases from *Photorhabdus luminescens* separation of the extracellular proteases from the insecticidal to toxic complex. Insect Biochemistry and Molecular Biology 30 : 69 – 74.
- Bowen, D.J. and Ensign. 2001. Isolation and Characterization of protein inclusions produced by the entomopathogenic bacterium *Photorhabdus luminescens*. Applied and Environmental Microbiology 67 : 4834 – 4841.
- Couche, G.A. and Gregson, R.P. 1987. Protein inclusions produced by the entomopathogenic Bacteria *Xenorhabdus nematophilus* subsp. *nematophilus*. Journal of Bacteriology 169 : 5279 – 5288.
- Dunphy, G.B. , Miyamoto, C. and Meighen, E. 1997. A homoserine lactone autoinducer Regulates Virulence of an insect-pathogenic bacterium, *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) Journal of Bacteriology 179 : 5288 – 5291.
- Ehler, R.U. , Niemann, I. , Hollmer, S. , Strauch, O. , Iende, D. , Shanmugasundram, M. , Mehta, U.K. , Easwaramoorthy, S.K. and Burnell, A. 2000. Mass production potential of the bacto-helminthic biocontrol complex *Heterorhabditis indica* *Photorhabdus luminescens*. Biocontrol Science and Technology 10 : 607 – 616.

- Friedman, M.J. 1990. Comercial production and development. *In* : Gaugler, R. and Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematode in Biological control. CRC Press, Boca Raton, Florida, PP. 153-172.
- Friedman, M.J. , Langston, S.L. , and Pollitt, S. 1989. Mass Production in Liquid culture of insect-killing nematodes. International Patent No. WO 89/04602. 24 pp.
- Gaugler, R. and Han, R. 2001. Production Technology. *In* : Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing New York. pp. 289-310.
- Georgis, R. 2001. The Biosys Experiment : an Insider's Perspective *In* : Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing New York. pp. 357 – 372.
- Han, R.C. 1996. The effects of inoculum size on yield of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabdus bacteriophora* in liquid culture. *Nematologica* 42 : 546 – 553.
- Kao, Po-Min , Chen, Chih-I , Huang, Shu-Chen , Chang, Yung-Chi , Tsai, Po-Jen and Liu , Yung-Chuan. 2007. Effect of shear stress and mass transfer on chitinase production by *Paenibacillus* sp. CHE-N1. *Biochemical Engineering Journal* 34 (2) : 172 – 178.
- Miller, R.W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. *Journal of Nematology*. 21 : 574 (abstr.)
- Nerves, J.M. , Teixeira, J.A. , Simones, N. and Mota, M. 2001. Effect of airflow rate on yields of *Steinernema carpocapsae* Az 20 in liquid culture in an external-loop airlift bioreactor. *Biotechnology and Bioengineering* 72 : 369 – 373.
- Pace, G.W. , Grote, W. , Pitt, D.E. and Pitt, J.M. 1986. Liquid culture of nematodes. International Patent No. WO 86/01074. 16 pp.
- Potumarthi, R. , Subhakar Ch. And Annapurna Jetty. 2007. Alkaline protease production by submerged Fermentation in stirred tank reactor using *Bacillus licheniformis* NCIM-204 : Effect of aeration and agitation regimes. *Biochemical Engineering Journal* 34 (2) : 185 - 192.
- Paul, V.J. , Frautschy, S. , Fenical, W. And Nealson, K.H. 1981. Antibiotic in microbiocrobial ecology : isolation and structure assignment of several new antibacterial compounds for the insect symbiotic bacteria *Xenorhabdus* spp. *Journal of Chemical Ecology* 7 : 589 – 597.
- Richardson, W.H. , Schmiolt, T.M. , Nealson, K.H. 1988. Identification of an anthraquinone pigment and a hydroxystilbene antibiotic from *Xenorhabdus luminescens*. *Applied and Environmental Microbiology* 54 (6) : 1602 – 1605.

- Strauch, O. and Ehlers, R.-U. 1998. Food signal production of *Photorhabdus luminescens* inducing the recovery of entomopathogenic nematodes *Heterorhabditis* spp. In liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 50 : 369 – 374.
- Strauch, O. and Ehlers, R.-U. 2000. Influence of the aeration rate on the yields of the biocontrol nematode *Heterorhabditis megidis* in monoxenic liquid culture. *Applied Microbiology and Biotechnology* 54 : 9 -13.
- Thaler, J.O. , Duvic, B. , Givaudan, A. and Boemare, N. 1998. Isolation and entomotoxic Properties of *Xenorhabdus nematophilus* Fl lecithinase. *Applied and Environmental Microbiology* 64 : 2367 – 2373.
- Volgyi, A. , Fodor, A. and Forst, S. 2000. Inactivation of a novel gene produces a phenotypic variant cell and affects the symbiotic behaviour of *Xenorhabdus nematophilus*. *Applied and Environmental Microbiology* 66 : 1622 -1628.

1.3 ผลของการใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย

Steinernema carpocapsae ในอาหารเหลว

Effect of Different Anti-Foaming Oil Concentrations Added in Liquid Culture on Production Yield of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*

บทคัดย่อ

ศึกษาการใช้น้ำมันดับฟองอัตราที่เหมาะสมในการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว สูตร Tsb₃ ทำการทดลองที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย (5x2) 5 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 อัตราการใส่น้ำมันดับฟอง 5 อัตรา คือ control (ไม่ใส่น้ำมันดับฟอง) 0.1 0.3 0.5 และ 1% ปัจจัยที่ 2 ช่วงเวลาที่ใส่น้ำมันดับฟอง 2 ช่วง คือ ใส่ช่วงเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัย และ ใส่ช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย หลังการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในแต่ละวิธีการเป็นเวลา 14 วัน จึงตรวจนับผลผลิต และประสิทธิภาพของผลผลิตไส้เดือนฝอย พบว่าในช่วงเลี้ยง symbiotic bacteria วิธีการไม่ใส่น้ำมันดับฟอง (0%) ได้ผลผลิตสูงสุด (317,000 ตัว/มล.) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการใส่น้ำมันดับฟองทุกอัตรา การใส่น้ำมันดับฟองอัตราต่ำสุด 0.1% ให้ผลผลิต 184,000 ตัว/มล. ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากวิธีการใส่น้ำมันดับฟองในอัตราที่สูงกว่าทุกอัตรา (0.3 0.5 และ 1.0%) ซึ่งให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 37,000-13,000 ตัว/มล. ในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย วิธีการไม่ใส่น้ำมันดับฟอง (0%) มีแนวโน้มให้ผลผลิตสูงสุด 317,000 ตัว/มล. แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการที่ใส่น้ำมันดับฟองทุกอัตรา (0.1 0.3 0.5 และ 1.0%) ซึ่งให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 297,000-286,000 ตัว/มล. การใส่น้ำมันดับฟองทุกอัตราความเข้มข้นในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria ให้ผลผลิตน้อยกว่าการใส่น้ำมันดับฟองในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากวิธีการที่ใส่น้ำมันดับฟองแต่ละอัตราทั้ง 4 อัตรา ในช่วงเลี้ยง symbiotic bacteria ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 38.50-40.63% และในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 41.67-44.79% นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ทุกวิธีการที่ใส่น้ำมันดับฟองนี้จะให้ไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพต่ำกว่าที่ไม่ใส่น้ำมันดับฟอง (50%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำนำ

จากการทดลองที่ผ่านมา จะเห็นได้ว่าอัตราการให้อากาศ (Airflow rate) นั้นเป็นปัจจัยที่สำคัญในการเลี้ยงขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอย (*Steinernema carpocapsae*) โดยเฉพาะในช่วงเลี้ยง symbiotic bacteria ซึ่งต้องการอัตราการให้อากาศในปริมาณอากาศที่สูง จึงจะทำให้ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณที่สูง (วัชร และสุทธิชัย, 2544) อย่างไรก็ตาม ในช่วงต้นของการเลี้ยง bacteria นั้นมักจะมีปัญหาเรื่องเกิดฟอง เนื่องจากส่วนประกอบของอาหารเหล่านั้นยังไม่ได้ถูกย่อยสลายโดย symbiotic bacteria เพื่อเปลี่ยนเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย เมื่อให้อากาศในอัตราที่สูงทำให้เกิดฟองขึ้น หลังจากเลี้ยง bacteria 24 ชั่วโมงแล้วใส่ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (II) ลงไปเลี้ยงร่วมกับ bacteria ไส้เดือนฝอยจะพัฒนาเป็นวัย 4 และตัวเต็มวัย ทั้งเพศผู้และเพศเมียจะผสมพันธุ์กัน เพศเมียวางไข่ ไข่ฟักเป็นเพศอ่อนวัย 1 ซึ่งเจริญเติบโตเป็นวัย 2 3 และเป็นวัยระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งครบวงจรในการเลี้ยงในอาหารเหลว โดยเฉพาะในช่วงที่มีการพัฒนาจากไข่เป็น เพศอ่อนวัย 1 และ 2 นั้น ในถังหมักจะเกิดฟองขึ้นมาก ซึ่งอาจเนื่องจากตัวอ่อนไส้เดือนฝอยขับถ่ายสารบางอย่างประกอบกับการให้อากาศในอัตราที่สูง ทำให้เกิดฟองขึ้นออกมา ก่อให้เกิดความสูญเสียผลผลิตไส้เดือนฝอย ฉะนั้นในช่วง 2 เวลาตามที่กล่าวมาแล้ว ถ้ามีการเติมสารดับฟอง (antifoam) ลงไปก็จะเป็นการลดการเกิดฟองทำให้สามารถเติมอากาศในถังหมักได้ในอัตราที่สูง จากความพยายามที่ผ่านมาได้มีการนำสาร antifoam ต่างๆ มาทดสอบเบื้องต้น แต่ก็ไม่ประสบผลสำเร็จ เนื่องจากมีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอย (รายงานไม่ได้ตีพิมพ์) อย่างไรก็ตาม ในการทดลองนี้ได้้นำสาร antifoam ที่ผลิตโดยบริษัท คาร์โอ (ประเทศไทย) จำกัด มาใช้ทดลองเพื่อหาข้อมูลเบื้องต้นถึงผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยและ symbiotic bacteria ทำการทดลองในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มล. โดยใส่สารกำจัดฟองในช่วงเริ่มต้นเลี้ยง bacteria และช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย เพื่อป้องกันการเกิดฟองในช่วงที่เจริญเป็นตัวอ่อนวัย 1 และวัย 2 ตามสภาพในการเลี้ยงในถังหมัก

วิธีดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อสูตร Tsb₃, NBTA, Ys broth, Egg, Corn oil
2. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol 75%, hyamine 0.1%, peptone 0.1%, clorox 0.1%
3. เครื่องแก้ว ได้แก่ ขวดแก้ว (flask ขนาด 500 มล.)
4. ไข่เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
5. แบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophila*
6. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
7. อื่นๆ ได้แก่ สำลี, ปากคืบ, กระดาษอลูมิเนียม
8. น้ำมันดับฟอง (Glycerin Alkoxylate, pH $\approx$ 3-4) ของบริษัท Kao Industrial (Thailand) จำกัด
9. เครื่องเขย่า

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย (5x2) 5 ซ้ำ ได้แก่

ปัจจัยที่ 1 อัตราการใส่น้ำมันดับฟอง 5 อัตรา ได้แก่ 0 (control 0.1 0.3 0.5 และ 1%

ต่ออาหาร 40 มล.

ปัจจัยที่ 2 ช่วงเวลาที่เหมาะสมสำหรับการใส่น้ำมันดับฟอง

- ใส่น้ำมันดับฟองช่วงเริ่มเลี้ยงแบคทีเรีย
- ใส่น้ำมันดับฟองช่วงไข่เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. เตรียมดินเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยเพื่อใช้ในการทดลอง

- แยกเชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์ โดยเริ่มจากการปลูกเชื้อไข่เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่น 200ตัว/มล. ลงบนกระดาษกรอง แล้วปล่อยหนอนกินรังผึ้งลงบนจานทดลอง นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25°C เป็นเวลา 24 ชม.

- นำหนอนที่ตายไปแยกแบคทีเรียในตู้ปลอดเชื้อ โดยการตัดขาเทียมของหนอนที่ตาย แล้วใช้ loop แตะน้ำเลือดของหนอน streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA แล้วบ่มเชื้อในลักษณะคว่ำจาน ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชม. คัดเลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวบริสุทธิ์ ซึ่งมีลักษณะกลมมนขอบไม่เรียบ

- นำโคโลนีแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ลงเลี้ยงในขวดอาหารเหลว Ys broth ปริมาตร 150 มล. นำไปเขย่าที่ 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชม. ตรวจสอบบริสุทธิ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีการย้อมสีแกรม ก่อนนำไปใช้ในการทดลองเลี้ยงร่วมกับไข่เดือนฝอยต่อไป

2. เตรียมสารละลายน้ำมันดับฟอง (บ.คาร์โอ) ให้มีความเข้มข้น 10% ดังนี้

- นำน้ำมันดับฟอง 10 มล. ผสมน้ำกลั่น 90 มล. จะได้น้ำมันดับฟองที่มีความเข้มข้น 10%
- จากนั้นนำน้ำมันดับฟองเข้มข้น 10% มาใช้ในการทดลอง โดยใช้ในอัตรา 0.1 0.3 0.5

และ 1% (ต่ออาหาร Tsb₃ 40 มล.) ตามแผนการทดลองในปัจจัยที่ 1

3. เตรียมอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ซึ่งประกอบด้วย

Tryptic soy broth	0.75 %
Yeast cell	0.5 %
Egg	6.67 %
Oil	0.20 %
Distilled water	

- เตรียมอาหารตามสูตรบรรจุลงในขวดขนาด 500 มล. ปริมาตรอาหารเหลว 40 มล./ขวด นำไปอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น

4. สำหรับในวิธีการที่ใส่น้ำมันดับฟอง ช่วงเลี้ยงแบคทีเรียนั้น ให้หยคน้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ลงในขวดอาหารที่เย็นแล้วพร้อมแบคทีเรียที่เตรียมไว้ในข้อ 1. จากนั้นนำไปเขย่าที่ ความเร็ว 120 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชม. ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันในอัตรา 1000 ตัว/อาหาร 1 มล. แล้วเขย่าเลี้ยงต่อเป็นเวลาประมาณ 14 วัน เมื่อตรวจพบไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะ II จึงเก็บผลผลิต

5. สำหรับในวิธีการใส่น้ำมันดับฟองช่วงไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย และเริ่มสร้างไข่ นั้นปฏิบัติเช่นเดียวกับในข้อ 4. เพียงแต่การหยคน้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ให้หยดในช่วงหลังจากเลี้ยงไส้เดือนฝอยแล้ว 3 วัน (ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย เพศเมียเริ่มสร้างไข่)

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนผลผลิตที่ได้ในแต่ละวิธีการ ทำการตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยวิธี dilution อาหาร 1/1000 เท่า นับ 3 ครั้ง/ขวด (ครั้งละ 1 มล.) เพื่อหาค่าเฉลี่ย

- บันทึกคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ได้ในแต่ละวิธีการ โดยทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยกับหนอนกิ้งมิ่งในอัตราส่วน ไส้เดือนฝอย 1 ตัว : หนอนกิ้งมิ่ง 1 ตัว ตรวจผลหนอนตาย ที่ 48 ชม.

ผลและวิจารณ์การทดลอง

จากการศึกษาผลกระทบของการใส่น้ำมันดิบฟองต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย ในการเลี้ยงขยาย ปริมาณด้วยอาหารเหลวสูตร Tsb₃ ในระดับขวดเขย่าขนาด 500 มล. (บรรจุอาหาร 40 มล.) โดยการใส่น้ำมันดิบฟอง 4 อัตรา คือ 0.1 0.3 0.5 และ 1% และไม่ใส่น้ำมันดิบฟองเป็นวิธีการเปรียบเทียบ (control) ลงในอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงในช่วงเริ่มต้นการเลี้ยง symbiotic bacteria และในช่วงเวลาที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยแล้ว หลังจากเลี้ยงในขวดเขย่าเป็นเวลา 14 วัน ทำการตรวจนับปริมาณของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ที่ผลิตขยายได้ในแต่ละวิธีการ พบว่าในช่วงการเลี้ยง bacteria วิธีการที่ไม่ใส่น้ำมันดิบฟองนั้นให้ผลผลิตสูงสุด 317,000 ตัว/อาหาร 1 มล. และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีการที่ใส่น้ำมันดิบฟองทุกอัตรา และการใส่น้ำมันดิบฟองในอัตราต่ำสุด (0.1%) ให้ผลผลิต 184,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับวิธีการที่ใส่น้ำมันดิบฟองในอัตราที่สูงกว่าทุกอัตรา (0.3 0.5 และ 1.0%) โดยให้ผลผลิตระหว่าง 37,000-13,000 ตัวต่ออาหาร 1 มล. แสดงให้เห็นว่าน้ำมันดิบฟองนั้นมีผลกระทบต่อผลผลิตที่เป็นปริมาณของไส้เดือนฝอยอย่างชัดเจน และยังใช้ความเข้มข้นสูงก็ยังมีผลกระทบมากขึ้น วัชร และสุทธิชัย, 2544 ได้ศึกษาการผลิตไส้เดือนฝอยชนิดนี้ในถังหมัก 6 ลิตร ด้วยอาหารเหลวสูตร Tsb₃ เช่นกัน พบว่า ปริมาณของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้นั้น มีความสัมพันธ์กับอัตราการให้อากาศในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria ถ้าให้อากาศในอัตรา 8 ลิตร/นาที่ ตลอดระยะเวลาการเลี้ยง 24 ชั่วโมง จะให้ผลผลิตสูงสุด แสดงว่า O₂ มีความจำเป็นมากต่อการสร้างสารอาหารที่สำคัญ และจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ฉะนั้นการใส่น้ำมันดิบฟองในการทดลองนี้เกิดผลต่อแบคทีเรียได้หลายประการ เนื่องจาก pH ของน้ำมันดิบฟองต่ำ (pH 3-4) เป็นผลทำให้ pH ของอาหารเหลว เปลี่ยนแปลงจากสภาพ pH ปกติที่เหมาะสมต่อแบคทีเรีย อยู่ระหว่าง 7-8 (สุทธิชัย และ วัชร, 2543) สาร antifoam ทำให้ระบบ O₂ transfer ผิดปกติ (Gaugler and Han, 2001) และอาจเป็นพิษโดยตรงต่อเซลล์แบคทีเรีย จากสาเหตุเหล่านี้ทำให้การเจริญเพิ่มปริมาณของแบคทีเรียเข้าสู่ระยะต่างๆ ช้าหรือผิดปกติขาดประสิทธิภาพในการสร้างสาร antibiotic สารอาหารต่างๆ และสภาพอื่นๆ ที่เหมาะสมต่อการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ส่งผลต่อไส้เดือนฝอยทำให้มีการสร้างไข่ลดลง ปริมาณผลผลิตที่ได้ลดลง ยังมีความเข้มข้นสูงยังมีผลต่อ bacteria สูงด้วยเช่นเดียวกัน นอกจากนี้พบว่าสารจำพวก silicone ซึ่งเป็นที่นิยมใช้กันในวงการอุตสาหกรรมสำหรับการควบคุมการเกิดฟอง สามารถทำให้ผลผลิตของไส้เดือนฝอยพวก *Heterorhabditis* ลดลงได้ (Grewal, 2001) ในการทดลองในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (Table 1) วิธีการไม่ใส่น้ำมันดิบฟองให้ผลผลิตสูงสุด 317,000 ตัวต่ออาหาร 1 มล. แต่ก็ไม่ได้แตกต่างกับวิธีการที่ใส่น้ำมันดิบฟองทุกอัตรา (0.1 0.3 0.5 และ 1.0%) ซึ่งให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 286,000-297,000 ตัว/อาหาร 1 มล. แสดงว่าสาร antifoam ไม่มีผลกระทบต่อตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอย ซึ่งสามารถที่จะผสมพันธุ์ต่อไปได้อย่างปกติ โดยเพศผู้และเพศเมีย

ผสมพันธุ์กัน เพศเมียวางไข่ ไข่ฟักเป็นเพศอ่อนวัย 1 เจริญเป็นวัย 2 3 และเข้าสู่วัย 3 ระยะ II เมื่ออาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงหมดปริมาณของไส้เดือนฝอยที่ได้ไม่แตกต่างจากการไม่ใช้สารกำจัดฟอง ไส้เดือนฝอยวัยต่างๆ สามารถทนทานต่อน้ำมันดับฟองได้ดีทำให้อัตราการอยู่รอดสูง Rovesti and Dese, 1900; Isibashi, 1993 พบว่าไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II ชนิดนี้สามารถทนทานต่อสารกำจัดศัตรูพืชบางชนิดได้นาน 2-6 ชั่วโมง ส่วนวัยอื่นๆ นั้นยังไม่มีผู้ใดได้ศึกษา ผลผลิตสุดท้ายของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้นั้นคือวัย 3 ระยะ II ซึ่งเมื่อนำมาทดสอบคุณภาพกับหนอนกินรังผึ้งตามวิธีการของ Miller R.W. (1989) จะเห็นได้ว่า คุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้จากวิธีการใส่น้ำมันดับฟองทั้ง 4 อัตรา ในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรีย (38.5-40.63%) และช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยระยะที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย (41.67-44.78%) นั้นไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ประสิทธิภาพต่ำกว่าที่ผลิตได้จากวิธีการไม่ใส่น้ำมันดับฟอง (50.0%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) แสดงว่าในช่วงที่ไส้เดือนฝอยมีการพัฒนา ตั้งแต่ระยะไข่ ตัวอ่อนวัย 1 2 และวัย 3 ระยะ II นั้น ได้รับผลกระทบโดยตรงจากน้ำมันดับฟองที่ใส่ลงไป ทำให้วัยต่างๆ ของไส้เดือนฝอยมีความอ่อนแอลงเป็นผลทำให้คุณภาพลดลง ขณะที่อัตราการอยู่รอดหรือปริมาณของไส้เดือนฝอยไม่ได้รับผลกระทบตามที่กล่าวมาแล้ว จะเห็นได้ชัดในวิธีการที่ใส่สารดับฟองในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย อย่างไรก็ตามมีการพบว่าสารกำจัดศัตรูพืชบางชนิดสามารถที่จะทำให้คุณภาพของไส้เดือนฝอย (infectivity) และอัตราการอยู่รอดลดลง (Zimmerman and Cranshow, 1990; Patel and Wright, 1996; Grewal *et al.*, 1998) สารลดการตึงผิว (Surfactants) ต่างๆ เป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยโดยตรง (Grewal, 2001) จากเหตุผลทั้งหมดที่กล่าวมา Table 1 และ 2 จะเห็นได้ว่า การใส่น้ำมันดับฟองในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria นั้นจะมีผลกระทบทั้งปริมาณผลผลิตที่ได้ และคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ ส่วนการใส่น้ำมันดับฟองในช่วงการเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัย มีผลกระทบต่อคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ ส่วนผลผลิตที่ได้นั้นสูงกว่าวิธีการที่ใส่น้ำมันดับฟองในช่วงเลี้ยงแบคทีเรียอย่างมีนัยสำคัญ

Table 1 Production yields of nematodes cultured in liquid medium added with different anti-foaming oil concentrations in the culture time of symbiotic bacterium and nematode developing to adult stage.

Treatments	Yield (nema./ml.)		Mean	Diff.
Anti-foaming	Culturing time			
oil (%)	Symbiotic bacteria	Adult nematode		
0 (control)	317,000 a*	317,000 a*	317,000	ns
0.1	184,000 b	297,000 a	241,000	**
0.3	37,000 c	288,000 a	163,000	**
0.5	31,000 c	292,000 a	161,000	**
1.0	13,000 c	286,000 a	149,000	**
Mean	116,000	296,000	206,000	

CV = 10.8%

* = In a column, means followed by a same letters are not significantly different at 5% level by DMRT.

** = In a row means between columns significantly different at 1% level.

ns = not significantly

Table 2 Effectiveness against greater wax moth (*Galleria mellonella*) of the entomopathogenic nematodes *Steinernema carpocapsae* produced by liquid culture in shake flask added with different concentrations of anti-foaming oil in the culture time of symbiotic bacterium and nematode developing to adult stage.

Treatments	Quality of nema* (%)		Mean	Diff.
Anti-foaming	culturing time			
oil (%)	Symbiotic bacteria	Adult nematode		
0 (control)	50.00 a**	50.00 a**	50.00	ns
0.1	40.63 b	44.79 b	42.70	ns
0.3	40.63 b	43.75 b	42.18	ns
0.5	39.58 b	42.71 b	41.15	ns
1.0	38.54 b	41.67 b	40.10	ns
Mean	41.87	44.58	43.23	

CV = 4.9%

ns = not significantly

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

** = In a column, means followed by a same letter are not significantly different at 5% level by DMRT.

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองผลของการใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่างๆ ในช่วงการเลี้ยง symbiotic bacteria และในช่วงไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยของการผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ด้วยอาหารเหลวในระดับขวดเขย่า 500 มล. (อาหารเหลว 40 มล.) พบว่า การใช้น้ำมันดับฟองในช่วงการเลี้ยงแบคทีเรียวิธีการที่ไม่ใช้น้ำมันดับฟองให้ผลผลิตสูงสุด 317,000 ตัว/อาหาร 1 มล. รองลงมาได้แก่ ใช้น้ำมันดับฟองอัตราต่ำสุดคือ 0.1% ให้ผลผลิต 184,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ส่วนอีก 3 อัตราคือ 0.3 0.5 และ 1.0% ให้ผลผลิตต่ำอยู่ระหว่าง 13,000-37,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ส่วนคุณภาพของไส้เดือนฝอยของวิธีใช้น้ำมันดับฟองทั้ง 4 อัตรา อยู่ระหว่าง 38.54-40.63% ในขณะที่ไม่ใช้น้ำมันดับฟองมีคุณภาพ 50% ส่วนในช่วงที่ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยวิธีการที่ใช้น้ำมันดับฟองทั้ง 4 อัตรา ให้ผลผลิตอยู่ระหว่าง 286,000-297,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ซึ่งใกล้เคียงกับวิธีการไม่ใช้น้ำมันดับฟอง ซึ่งให้ผลผลิต 317,000 ตัว/อาหาร 1 มล. ส่วนทุกอัตราให้ไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 41.67-44.79% ในขณะที่ไม่ใช้น้ำมันดับฟองมีคุณภาพ 50%

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิทย์ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2542. อิทธิพลของแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* (Enterobacteriaceae) ต่อการเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในอาหารเหลว. วารสารวิชาการเกษตร. 17 (1): 66-72
- วัชรวิทย์ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2544. ผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า. ใน: รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรมวิชาการเกษตร. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 172 น.
- สุทธิชัย สมสุข และวัชรวิทย์ สมสุข. 2543. ผลของระดับความเป็นกรดต่างต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เลี้ยงในอาหารเหลว. วารสารกีฏและสัตววิทยา. 22(3):228-234
- Grewal, P. S. 2001. Formulation and application technology. In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing New York, pp. 265-287.
- Grewal, P. S., Webber, T. and Batterley, D.A. 1998. Compatibility of *Steinernema feltiae* with chemicals used in mushroom production. Mushroom News. 46:6-10.
- Gaugler, R. and Han, R. 2001. Production technology. In: Gaugler, R. (ed.) Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing New York, pp. 289-310.
- Ishibashi, N. 1993. Integrated control of insect pests by *Steinernema carpocapsae*. In: Bedding, R., Akhurst, R. and Kaya, H.K (eds.) Nematodes and Biological Control of Insects. CSIRO, East Melbourne, Australia, pp. 105-113.
- Miller, R.W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. Journal of Nematologica. 21:574. (abstr.)
- Patel, M.N. and Wright, D.J. 1996. The influence of neuroactive pesticides on the behaviour of entomopathogenic nematode, *Steinernema* spp. (Rhabditida) = Steinernematidae) International Journal of Parasitology. 27:61-70.
- Rovesti, L. and Deseö, K.V.1990. Compatibility of chemical pesticides with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema carpocapsae* (Weiser) and *S. feltiae* Filipjev (Nematoda: Steinernematidae). Journal of Nematologica. 36:237-245.
- Zimmerman, R.J. and Cranshaw, W.S. 1990. Compatibility of three entomogenous nematodes. (Rhabditida) in aqueous solutions of pesticides used in turfgrass maintenance. Journal of Economic Entomology. 83:97-100.

1.4 ต้นทุนการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ (Stock pureline)

การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในถังหมักขนาด 130 ลิตร (อาหาร 70 ลิตร) ต้องใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์

จำนวน 70 ถังตัว/รอบการเลี้ยง

ศักยภาพในการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์/เดือน = 1,857 ถังตัว

1. วัสดุ และสารเคมีที่ใช้ ได้แก่

หนอนกินรังผึ้ง	200 ตัว	=	290 บาท
อาหารเทียมชนิดแข็งกึ่งเหลว			
- อาหารสุนัข	2,079 กรัม	=	103.95 บาท
- น้ำมันหมู	462 กรัม	=	18.48 บาท
- ฟองน้ำ	756 กรัม	=	1,945.44 บาท
สารเคมี และอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่			
- Ringes's solution	5 ลิตร	=	30.3 บาท
- Sterilized egg's solution	20 มล.	=	4.78 บาท
- อาหาร NBTA	4 plate	=	7.74 บาท
- Ys broth	300 มล.	=	5.71 บาท
- Hyamine	4 กรัม	=	81.12 บาท
รวม		=	2,487.52 บาท

2. ต้นทุนแรงงาน

เป็นแรงงานแฝง = -

3. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

คิด 60% ของต้นทุนอาหาร + วัสดุ + แรงงาน = $\frac{2487.52 \times 60}{100}$

1,492.51 บาท/เดือน

∴ ต้นทุนการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยใน 1 เดือน (1,857 ถังตัว) = 1+2+3 = **3,980 บาท/เดือน**

ต้นทุนการผลิตต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์ 70 ถังตัว = **150 บาท**

**การพัฒนาสูตรสำเร็จแบบผง และภาชนะบรรจุในการเก็บรักษา
ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตได้เชิงพาณิชย์**

**Developing Powder Formulation and Container for Commercial Product of
Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema carpocapsae***

คำนำ

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่า ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* เป็นไส้เดือนฝอยชนิดหนึ่งที่มีศักยภาพในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด ปัจจุบัน วัชร และสุทธิชัย (2544) ได้พัฒนาสูตรอาหารเหลวและวิธีการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงดังกล่าวได้เป็นผลสำเร็จ และสามารถผลิตได้ในระดับเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ยังได้ประดิษฐ์อุปกรณ์ใช้ในการแยกล้างไส้เดือนฝอยที่เพาะเลี้ยงได้ออกจากอาหารเหลวและสิ่งขับถ่ายที่ปะปนอยู่จนได้ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลาย (Infective Juveniles = IJ) ที่สะอาด ปราศจากสิ่งเจือปน มีประสิทธิภาพสูง ฉะนั้นขั้นตอนสุดท้ายของกระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยในเชิงการค้า ก็คือ การพัฒนาสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและการเก็บในภาชนะที่เหมาะสม เพื่อที่จะนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชได้ประสบความสำเร็จต่อไป

วัชร (2544) ได้ทำการเก็บไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์เล็กๆ ที่มีความชื้นสูงบรรจุในถุงพลาสติกปิดปากถุงสนิทกันความชื้นระเหยออก ไส้เดือนฝอยจะอาศัยอยู่ในรูพรุนของฟองน้ำ มันจะไม่ทับซ้อนกันแน่นจนขาดอากาศหายใจ ฟองน้ำเก็บความชื้นได้ดี แต่มีข้อเสียเปรียบในการใช้ฟองน้ำ ก็คือ มี shelf life สั้น (ระยะเวลาที่ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดไม่ต่ำกว่า 90% โดยมีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงไม่เปลี่ยนแปลง) ที่อุณหภูมิ 25-30°C ประมาณ 2 สัปดาห์และที่อุณหภูมิ 7-10°C ประมาณ 1 เดือน นอกจากนี้วิธีการใช้ค่อนข้างยุ่งยากจะต้องบีบคั้นฟองน้ำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ออกมาอยู่ในน้ำแล้วกรองเอาเฉพาะน้ำและไส้เดือนฝอยไปใช้ โดยใส่ในเครื่องพ่นสาร

ต่อมาจึงมีแนวคิดหาวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ในรูปสูตรสำเร็จและบรรจุในภาชนะเป็นผลิตภัณฑ์ เพื่อนำไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยทำให้ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดได้นาน มีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา ในธรรมชาติไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงส่วนใหญ่อาศัยอยู่ในดิน ในช่วงสภาพธรรมชาติแห้งแล้งในดินมีความชื้นต่ำ ไส้เดือนฝอยสูญเสียน้ำบางส่วนออกจากร่างกายเป็นผลทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมลดลง การเคลื่อนไหวช้าลง อาหารที่เก็บสำรองไว้ใช้เป็นแหล่งพลังงานก็ถูกเผาผลาญหมดไปอย่างช้าๆ ความต้องการออกซิเจนก็ลดลงด้วย ไส้เดือนฝอยจึงสามารถมีชีวิตรอดได้นานขึ้น

ถึงแม้ว่าในช่วงนั้นมีอุณหภูมิสูงก็ตาม ตรงกันข้ามถ้ามีความชื้นสูงไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวยากตลอดเวลาต้องใช้พลังงานมาก อาหารสำรองจะถูกใช้หมดไปเร็วขึ้น อายุการเก็บก็จะสั้นลง อย่างไรก็ตาม อุณหภูมิต่ำทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวยาก อัตราการเผาผลาญอาหารลดลงได้บางส่วนเช่นกัน ฉะนั้นจึงมีความพยายามที่จะหาวิธีการต่างๆ ที่จะทำให้กระบวนการเมตาบอลิซึมลดลงโดยตรง หรือทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ช้าลง หรือหยุดการเคลื่อนไหว ทั้งนี้เพื่อลดอัตราการใช้พลังงานที่สะสมในรูปไขมัน Yukuwa, and Pitt (U.S.Pat.No.4,765,275) ได้นำเอาผงถ่านซึ่งมีคุณสมบัติเป็นวัสดุดูดซับความชื้นผสมกับไส้เดือนฝอย เพื่อที่จะทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนที่ช้าลง วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ราคาสูง ไม่สะดวกในการใช้ มี shelf life ที่อุณหภูมิ 25°C ประมาณ 1-2 เดือน Nelson and Mannion (U.S.Pat.No.4,615,883) ใช้แอลจินเนท เจล (alginate gel) หุ้มตัวไส้เดือนฝอยคล้ายแคปซูลให้หยุดการเคลื่อนไหว มี shelf life ที่อุณหภูมิ 4°C ประมาณ 6-9 เดือน เมื่อบรรจุในภาชนะที่ปิดมิดชิด ข้อเสียคือ ราคาแพง วิธีการนี้เหมาะสำหรับการเก็บเนื้อเยื่อหรือเซลล์ของสิ่งมีชีวิตต่างๆ เช่นเดียวกันได้มีการเก็บไส้เดือนฝอยในแอลจินเนท เจล ซึ่งแผ่เป็นแผ่นบางบนแผ่นตะแกรง (Georgis, 1990) เมื่อนำไปใช้ต้องนำไปละลายในน้ำที่มีโซเดียมซิเตรท ใช้เวลานานในการแยกไส้เดือนฝอย จึงไม่สะดวกและมีวัสดุเหลือใช้มาก นอกจากนี้ยังมีการเก็บไส้เดือนฝอยในเจลเหลว ซึ่งละลายน้ำได้ดี ใช้ง่าย แต่ไส้เดือนฝอยมี shelf life สั้นกว่าการใช้แอลจินเนท เจล (Georgis, 1990) Capinera and Hibbard (1987) ได้ผสมไส้เดือนฝอยกับแป้งถั่วอัลฟาฟา โดยปั้นเป็นก้อนเล็ก (pellet) แล้วทำให้แห้ง Bedding (Inter Pat. WO 88/08668) ได้เก็บไส้เดือนฝอยในสาร anhydrous polyacrylamide ทำให้ไส้เดือนฝอยสูญเสียน้ำบางส่วน ข้อเสียของวิธีการนี้คือ shelf life สั้น Bedding ได้ใช้แผ่นดินเหนียวหนา 2 นิ้ว 2 แผ่น ประกบชั้นของไส้เดือนฝอยคล้ายแซนวิช พบว่าไส้เดือนฝอยได้รับออกซิเจนไม่พอเพียง เนื่องจากแผ่นดินเหนียวหนา Grewal (1998) ได้คิดค้นสูตรสำเร็จแบบผง ซึ่งสามารถเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis megidis* ได้นาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 22°C โดยมีชีวิตรอด 100% Silver (U.S.Pat.No.5,965,149) ได้คิดค้นสูตรสำเร็จแบบเม็ดมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 10-20 มม. โดยมีไส้เดือนฝอยอยู่ตรงกลางถูกหุ้มด้วยชั้นเปลือกนอก ซึ่งประกอบด้วยส่วนผสมซิลิกา ดินเหนียว เซลลูโลส ลิกลิน และแป้ง ข้อดีคือ shelf life ที่อุณหภูมิ 22-25°C มีระยะนาน 2.0-3.5 เดือน และที่ 2-10°C ได้นานถึง 6-8 เดือน ใช้ง่าย สะดวก ละลายน้ำได้ดี ข้อเสียคือ วิธีการทำเป็นเม็ดค่อนข้างซับซ้อน สูญเสียไส้เดือนฝอยในกระบวนการปั้นเม็ด สำหรับวิธีการเก็บไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำตามที่กล่าวมาแล้วซึ่งมีความชื้นสูง ไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวยากตลอดเวลา การเก็บในอุณหภูมิห้องมีเปอร์เซ็นต์การตายสูงและการนำไปใช้ค่อนข้างยุ่งยาก (Grewal, 2002)

จะเห็นได้ว่าการคิดค้นสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยในรูปแบบต่างๆ เพื่อที่จะเก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้มี shelf life ยาว ทั้งในระดับอุณหภูมิสูงกว่า 22°C และอุณหภูมิต่ำ (2-10°C) บางวิธีการ

สามารถเก็บไผ่เดือนฝอยได้นานและมีประสิทธิภาพดีแต่ใช้วัสดุที่แพงและอุปกรณ์ที่ยุ่งยากซับซ้อน ทำให้ต้นทุนการผลิตสูง สูตรสำเร็จบางรูปแบบไม่สะดวกในการนำไปใช้

ฉะนั้นงานวิจัยจึงมุ่งเน้นในการคิดสูตรสำเร็จไผ่เดือนฝอยศัตรูแมลงในรูปแบบผง ซึ่งง่ายและสะดวกในการนำไปใช้เช่นเดียวกันกับสารเคมี โดยการนำไปละลายน้ำและฉีดพ่นบนต้นพืชหรือลงในดินได้ทันที ไผ่เดือนฝอยสามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้นานและมีประสิทธิภาพคงเดิมเช่นเดียวกับสูตรสำเร็จอื่นๆ ตามที่กล่าวมาแล้ว ลดขั้นตอนกระบวนการผลิตและใช้อุปกรณ์เครื่องมือที่ไม่ยุ่งยากซับซ้อน เพื่อให้เหมาะสมสำหรับการผลิตในเชิงพาณิชย์ นอกจากนี้ยังคิดค้นรูปแบบของภาชนะที่นำมาบรรจุสูตรสำเร็จผงดิน โดยไม่มีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของคนและประสิทธิภาพของไผ่เดือนฝอยเช่นกัน เหมาะแก่การขนส่งไปยังแหล่งผู้ใช้

2.1 ศึกษาสูตรดินผงและภาชนะบรรจุในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

Steinernema carpocapsae ในเชิงพาณิชย์

Study on Powder Formulations and Container for Commercial Product of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae*

บทคัดย่อ

ศึกษาสูตรดินผงและการบรรจุในภาชนะที่เหมาะสม เพื่อเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ ทำการทดลองที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (4x6) 24 วิธีการ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระป๋อง ปัจจัยแรก คือ ดินผสม 4 สูตรคือ **ดินสูตร A** ประกอบด้วย ดินผสม Attapugite และ Zeolite (อัตรา 2:1) 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Napthalenesulfonic acid) 1.25% ความชื้น 40% **ดินสูตร B** ประกอบด้วย ดินผสมสูตร A 57.4% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% สารอุ้มความชื้น (Moist 24®) 0.01% และ Ethylene glycol 1.25% ความชื้น 40% **ดินสูตร C** ประกอบด้วย ดิน Agsorb® 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% ความชื้น 40% **ดินสูตร D** ประกอบด้วย ดินสูตร C 57.5% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% สารอุ้มความชื้น 0.01% Ethylene glycol 1.25% ความชื้น 40% ปัจจัยที่สอง คือ วิธีการบรรจุในภาชนะ (กระป๋อง) 4 วิธีการคือ วิธีการที่ 1 บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดแบบเกลียวปิดสนิท วิธีการที่ 2 บรรจุส่วนผสมในถุงพลาสติกใส ขนาด 4x6 นิ้ว ปิดปากถุงให้สนิทแล้วเก็บในภาชนะตามแบบวิธีการที่ 1 วิธีการที่ 3 เก็บในภาชนะปิดด้วยฝาที่มีรูเจาะ 3 รู เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. และปิดทับด้วยแผ่นพลาสติกใสได้ฝา วิธีการที่ 4 เช่นเดียวกับวิธีการที่ 3 แต่ใช้กระดาษ Tyvex® แทนพลาสติก ปิดทับได้ฝา บรรจุส่วนผสมแต่ละสูตร 100 กรัม (มีไส้เดือนฝอย 40 ล้านตัว) ลงในภาชนะ (กระป๋อง) พลาสติกทึบสีขาวที่มีลักษณะทรงกระบอกสูง 11 ซม. เส้นผ่านศูนย์กลาง 6 ซม. (ปริมาตร 311 ลบ.ซม.) นำไปเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 7°C ตรวจสอบอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยทุกๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่า การบรรจุในภาชนะตามวิธีการทั้ง 4 วิธีการนั้นไส้เดือนฝอยเก็บในดินสูตร A และ B มีอัตราการอยู่รอดสูงกว่าการเก็บในดินสูตร C และ D อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเก็บในดินสูตร A และ B แล้วบรรจุในภาชนะตามวิธีการที่ 1 (ภาชนะที่มีฝาปิดทึบ) มีอัตราการอยู่รอดสูงสุด (85.5-86.4%) รองลงมาได้แก่ การบรรจุในภาชนะที่มีฝาเจาะรูปิดทับด้วยพลาสติก (วิธีการที่ 3) และกระดาษ Tyvex® (วิธีการที่ 4) ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 74.8-76.0% และ 75.9-76.4% ตามลำดับ ส่วนวิธีการบรรจุในถุงพลาสติกแล้วเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 2 มีอัตราการอยู่รอด

ต่ำสุด (68.4-69.5%) ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินทั้ง 4 สูตร บรรจุในภาชนะตามวิธีการที่ 1 (กระป๋องมีฝาปิดทึบ) ไม่แตกต่างทางสถิติมีค่า 93.0-95.7% และเช่นเดียวกันบรรจุในภาชนะตามวิธีการที่ 2 (ใส่ในถุงพลาสติกปิดปากถุงสนิทแล้วเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดทึบ) มีค่าอยู่ระหว่าง 84.3-86.7% ส่วนการบรรจุในภาชนะที่ปิดด้วยฝาที่มีรูเจาะ ปิดทับด้วยพลาสติกใสตามวิธีการที่ 3 และปิดทับด้วยกระดาษ Tyvex® (วิธีการที่ 4) การเก็บในดินสูตร A มีประสิทธิภาพ 95.3 และ 92.0% ในดินสูตร B มีค่า 95.7 และ 90.0% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการเก็บในดินสูตร C ซึ่งมีประสิทธิภาพ 85.0 และ 80.5% ในดินสูตร D มีประสิทธิภาพ 87.0 และ 76.7% ตามลำดับ ฉะนั้นการเก็บไส้เดือนฝอยในดินสูตร A ที่มี Attapugite และ Zeolite เป็นส่วนประกอบ และบรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดทึบเป็นเวลา 6 เดือน ที่ 7°C จะได้ผลดีที่สุด

คำนำ

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์เล็กๆ ที่มีความชื้นสูง บรรจุในถุงพลาสติกปิดปากถุงสนิท ตามวิธีการที่ใช้อยู่ปัจจุบัน ซึ่งมีข้อดีและข้อเสียหลายประการ วุทธิ และสุทธิชัย (2544) ได้ทำการทดลองเบื้องต้นในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในดินผง (powder formulation) โดยผสมไส้เดือนฝอยกับดิน Attapulgate บรรจุในถุงพลาสติก ถุงละ 10 กรัม ซึ่งมีไส้เดือนฝอย (4 ล้านตัว) ความชื้น 40% หลังจากเก็บรักษาตลอดระยะเวลา 12 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 7°C พบว่า อัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยของทั้ง 2 วิธีการ ไม่แตกต่างกัน แต่เมื่อเก็บในสภาพอุณหภูมิสูงที่ 25 และ 30°C การเก็บในดินผงนั้นให้ผลการทดลองที่ดีกว่า อย่างไรก็ตามการพัฒนาวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยจำเป็นต้องดำเนินการต่อไป เพื่อที่จะคิดค้นสูตรดินผง และรูปแบบของภาชนะที่นำมาใช้ในการบรรจุ ตลอดจนวิธีการบรรจุ ทั้งนี้เพื่อสามารถเก็บไส้เดือนฝอยให้มีชีวิตอยู่ได้นาน พร้อมทั้งมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายแมลงรวมทั้งเหมาะกับการขนส่งจากแหล่งผลิตไปยังผู้ใช้ซึ่งอยู่ห่างไกลออกไป และสะดวกต่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในสภาพธรรมชาติ

วิธีดำเนินการ

วัสดุอุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด counter, pH meter, auto pipette, tip, stirrer, magnetic bar, moisture analyzer กระบอกฉีด (Refilling syringe) เครื่องผสมดิน ตะแกรงร่อนดินผงขนาด 100 mesh

2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวงขนาดต่างๆ petridish

3. ไข่เห็บฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)

4. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5

5. สารเคมีที่มีคุณสมบัติในการอุ้มน้ำ Moist 24TM (ผลิตภัณฑ์ของบริษัทเคมีโก้ จำกัด)

และ Ethylene glycol

6. สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Naphthalenesulfonic acid)

7. กระป๋องพลาสติกทึบสีขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. ปริมาตรบรรจุ 311 ลบ.ซม.

8. กระดาษ Tyvek[®] (ผลิตภัณฑ์ของบริษัท คูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด)

9. อื่นๆ ได้แก่ ถังพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว กระบอกฉีดยาพลาสติกขนาด 10 มล. เข็มเย็บเชื้อ

10. ดิน Agsorb[®] (ผลิตภัณฑ์ของบริษัทภูมิสมบูรณ์ จำกัด)

11. ดิน Attapugite และ Zeolite

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (4x6) 24 วิธีการ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระป๋อง ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ดินผสม 4 สูตร ได้แก่

- ดินสูตร A ประกอบด้วย ดินผสม Attapugite และ Zeolite (อัตรา 2:1) 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Naphthalenesulfonic acid) 1.25% ความชื้น 4%
- ดินสูตร B ประกอบด้วย ดินผสมสูตร A 57.4% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% สารอุ้มน้ำ (Moist 24) 0.01% และ Ethylene glycol 1.25% ความชื้น 40%
- ดินสูตร C ประกอบด้วย ดิน Agsorb[®] 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% ความชื้น 40%
- ดินสูตร D ประกอบด้วย ดินสูตร C 57.4% สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% สารอุ้มน้ำ Moist 24[®] 0.01% Ethylene glycol 1.25% ความชื้น 40%

ปัจจัยที่ 2 การบรรจุในภาชนะ 4 วิธีการ ได้แก่

- วิธีการที่ 1 บรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดแบบเกลียวปิดสนิท
- วิธีการที่ 2 บรรจุส่วนผสมในถุงพลาสติกใส ขนาด 4x6 นิ้ว ปิดปากถุงสนิท แล้วเก็บในภาชนะตามแบบวิธีการที่ 1
- วิธีการที่ 3 เก็บในภาชนะปิดด้วยฝาที่มีรูเจาะ 3 รู (เส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.) และปิดทับด้วยแผ่นพลาสติกใสได้ฝา
- วิธีการที่ 4 เช่นเดียวกับวิธีการที่ 3 แต่ใช้กระดาษ Tyvek® แทนพลาสติก ปิดทับได้ฝา

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. บดดิน Attapulgite และ Zeolite ให้เป็นผงละเอียดคล้ายแป้งนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100-120°ซ แล้วนำผสมกันในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก จะได้ดินผสม
2. ดินผสมยี่ห้อ Agsorb® เป็นดินสำเร็จรูปจากบริษัทผู้จำหน่าย นำมาอบให้แห้งเช่นเดียวกันกับข้อ 1
3. เตรียมไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลาย (II) อัตรา 40 ล้านตัวในน้ำกลั่น 40 มิลลิลิตร (สำหรับผสมกับสูตรดิน 1 ครั้ง)
4. ในการเตรียมส่วนผสมทั้งหมด 100 กรัม สำหรับการทดลอง 1 กระป๋อง (1 ซ้า) ให้มีไส้เดือนฝอย 40 ล้านตัว สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% ความชื้น 40% ดำเนินการโดยนำดินผสม 58.75 กรัม ใส่ในถุงพลาสติกที่เตรียมไว้ นำสารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25 กรัม คลุกเคล้าให้ทั่ว ใส่ไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ (40 ล้านตัว) ลงไปผสม แล้วปรับความชื้นครั้งสุดท้ายของส่วนผสมให้อยู่ในระดับ 40% เช่นเดียวกันกับการเตรียมส่วนผสมดินที่มีสารเคมีอื่นๆ เช่น Ethylene glycol ตามแผนการทดลอง
5. นำส่วนผสมทั้งหมด 100 กรัม บรรจุใส่ในกระป๋องพลาสติกปิดฝาที่หมุนเกลียวให้แน่นตามวิธีการที่ 1 ในวิธีการที่ 2 นำส่วนผสมใส่ในถุงพลาสติกใสขนาด 4x6 นิ้ว ปิดผนึกปากถุงให้สนิท แล้วนำไปใส่ในกระป๋องพลาสติกปิดฝาที่บให้แน่น ในวิธีการที่ 3 หลังจากใส่ส่วนผสมแล้ว ก่อนปิดฝาที่มีรูเจาะ 3 รู (แต่ละรูมีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้าง 0.5 ซม.) นำเอาแผ่นพลาสติกใส ซึ่งมีเส้นผ่านศูนย์กลางเท่ากับฝา มาปิดทับด้านในของฝา แล้วปิดกระป๋องบรรจุให้แน่น ในวิธีการที่ 4 เช่นเดียวกันกับวิธีการที่ 3 แต่ใช้กระดาษ Tyvek® ของบริษัท คูปองท์ (ประเทศไทย) จำกัด แทนพลาสติก
6. นำกระป๋องที่บรรจุส่วนผสมไปเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ 7°ซ (ตู้เย็น) ตามวิธีการในแผนการทดลอง
7. ทำการตรวจนับไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตและตายในแต่ละวิธีการทดลองทุกๆ 1 เดือน หลังจากเก็บเป็นเวลา 6 เดือน โดยการนับ 3 ครั้ง ต่อ 1 ซ้า (1 กระป๋อง) เพื่อหาค่าเฉลี่ย ดำเนินการดังนี้

- เทส่วนผสมทั้งหมดออกจากกระป๋องใส่ในถุงพลาสติก คลุกผสมให้ทั่ว
- สุ่มตักส่วนผสมครั้งละ 5 กรัม นำไปวัดความชื้นด้วยเครื่อง Moisture Analyzer จำนวน 5 ครั้ง
- ทำการสุ่มตักส่วนผสม 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. กวนให้ทั่วนำไปวัด pH หลังจากนั้นแบ่งส่วนหนึ่งเจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:100 เพื่อนำไปนับปริมาณไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตรอดและที่ตายภายใต้กล้องสเตอริโอไมโครสโคป

8. นำไส้เดือนฝอยที่เหลือในแต่ละวิธีการไปทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงกับหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) วัย 5 โดยใช้อัตราไส้เดือนฝอย 200 ตัว/หนอน 1 ตัว ทำการทดสอบในจานพลาสติกที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. มีฝาปิด 1 จาน (1 ซ้ำ) มีหนอน 10 ตัว แต่ละวิธีการมี 3 จาน (3 ซ้ำ) หลังจากครบ 24 ชั่วโมง นำมาตรวจนับปริมาณหนอนที่ตาย และคำนวณหาค่าเฉลี่ยแต่ละซ้ำในแต่ละวิธีการ

การบันทึกข้อมูล

หลังการเก็บไส้เดือนฝอยในดินสูตรต่างๆ ทุกเดือนเป็นเวลา 6 เดือน บันทึก

- ปริมาณไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่และที่ตายในแต่ละวิธีการ
- pH ความชื้นในดินสูตรต่างๆ แต่ละวิธีการ
- ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายแมลงในแต่ละวิธีการ

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรม IRRISTAT

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การทดลองเก็บไส้เดือนฝอยในรูปผงดินสูตรต่างๆ ที่อุณหภูมิ 7°C เป็นระดับอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* (Grewal *et al.*, 1994) และการปรับความชื้นของสูตรดินอยู่ที่ระดับ 40% ก็ถือว่าเป็นระดับที่เหมาะสมเช่นกัน (จากผลการทดลองที่ไม่ได้ตีพิมพ์) ทั้ง 2 ปัจจัยนี้สามารถทำให้อายุการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยได้นานขึ้นเนื่องจากในสภาพดังกล่าวนี้ ไส้เดือนฝอยมีการเคลื่อนไหวช้า กระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นอย่างช้า ไชมันที่สะสมไว้ในตัวซึ่งมีประมาณ 60% ของน้ำหนักแห้งของไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ Infective Juvenile (Selvan *et al.*, 1993) จะถูกเผาผลาญเพื่อเปลี่ยนเป็นพลังงานไปใช้ในการดำรงชีวิตของมันในช่วงการเก็บ ซึ่งกระบวนการนี้จะนำไปอย่างช้าเช่นกันทำให้มีอาหารสำรองเหลือเก็บไว้ใช้ได้ยาวนาน ทำให้ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานขึ้น นอกจากนี้การเผาผลาญจำเป็นต้องใช้ O₂ เนื่องจากไส้เดือนฝอยชนิดนี้เป็น aerobic organism ปริมาณ O₂ ที่ลดลง ในขณะการเก็บรักษาทำให้อัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพในการทำลายแมลงลดลงเช่นกัน (Evans and Perry, 1976; Wharton, 1986) ฉะนั้นในช่วงการเก็บรักษา O₂ ที่เพียงพอจึงเป็นปัจจัยที่สำคัญต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอยเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลานาน จากการเกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมของเสียในรูปของก๊าซ (CO₂ และ NH₃) ของเหลวและของแข็งจะถูกปล่อยออก ส่วนที่เป็นก๊าซระเหยสะสมอยู่ในช่องว่างในภาชนะที่เก็บทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมถ้าไม่สามารถระบายออกได้ ส่วนของเสียที่เป็นของเหลวก็จะถูกดูดซึมอยู่ในดินที่เป็นส่วนประกอบของสูตรที่ใช้เก็บรักษา การลดระดับความเป็นพิษมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติแต่ละสูตร ซึ่งมีความแตกต่างกัน

จากการเก็บในภาชนะ ตามวิธีการที่ 1 บรรจุดินผสมในกระป๋อง ที่มีฝาปิดแบบมิดชิดเป็นเวลา 6 เดือน ในระดับอุณหภูมิ 7°C ไส้เดือนฝอยที่เก็บในทุกสูตรดินมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 80.4-86.4% (Table 1) และมีประสิทธิภาพในการทำลายแมลง 93.0-95.7% (เฉลี่ย 94.7%) (Table 5) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยในสภาพนี้ ได้แก่ ปริมาณ O₂ ที่มีอยู่ในปริมาณจำกัดและค่อยๆ ถูกใช้หมดไป การสะสมก๊าซที่เป็นของเสียในส่วนที่เป็นช่องว่างในภาชนะ และสิ่งขับถ่ายของไส้เดือนฝอยที่จะถูกดูดซับโดยดินและจะสะสมมากขึ้น คุณสมบัติของดินที่สามารถลดความเป็นพิษจากสิ่งขับถ่าย เมื่อเปรียบเทียบกับวิธีการอื่นๆ อีก 3 วิธีการ (Table 2 3 4 และ Table 6 7 8) การเก็บในวิธีการนี้มีอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพสูงสุด แสดงว่าปัจจัยต่างๆ ของการเก็บโดยวิธีการนี้มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยในระดับที่ต่ำ นอกจากนี้จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยได้รับผลกระทบน้อยกว่าอัตราการรอดชีวิต อาจกล่าวได้ว่าไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตรอดยังมีประสิทธิภาพสูง ทั้งนี้อาจเนื่องจากการเก็บในภาชนะแบบนี้มีการสูญเสียความชื้น (Fig. 1.1) เป็นปริมาณที่น้อยอยู่ระหว่าง 0-2% ใน Table 1 แสดงให้เห็นถึงการเก็บรักษาในสูตรดินที่ต่างกัน ในภาชนะแบบเดียวกันก็มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ตลอดระยะเวลา 6

เดือนของการเก็บรักษา อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตร A และ B ลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน โดยใน 4 เดือนแรกลดลงอยู่ระหว่าง 92.8%-93.4% (การลดลงในช่วงแรก) หลังจากนั้นในช่วงเดือนที่ 5 และ 6 (ช่วงที่ 2) ลดลงในอัตราที่สูงมาอยู่ในระดับ 85.5%-89.4% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 4 เดือนแรก อาจเนื่องมาจากเมื่อเก็บนานขึ้น O_2 ไม่พอเพียง เช่นเดียวกันกับการทดลองของ Qiu and Bedding (1999) และมีสิ่งขยับถ่ายของไส้เดือนฝอยสะสมในดินมากขึ้น ซึ่งเป็นพิษต่อตัวมันเองด้วย การเปลี่ยนแปลง pH ของดินที่ใช้เก็บทั้ง 2 สูตร อยู่ระหว่าง 7-7.6 (Fig. 2.1) ซึ่งไม่มีผลต่อไส้เดือนฝอย (สุทธิชัย และวัชรวิ, 2543) ส่วนการเติมสาร Ethylene glycol ในดินสูตร B นั้นไม่มีผลต่อไส้เดือนฝอยในการเก็บ ส่วนในดินสูตร C และ D มีอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยลดลงใกล้เคียงกัน โดยในช่วง 4 เดือนแรก (ช่วงที่ 1) มีระดับการรอดชีวิตอยู่ระหว่าง 90.6%-94.2% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับการเก็บในดินสูตร A และ B แสดงว่าในช่วงนี้สภาพในสูตรดินทุกสูตรไม่แตกต่างกัน ในเดือนที่ 5-6 อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยลดลงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 4 เดือนแรกมาอยู่ในระดับ 80.6-82.7% แสดงว่าการลดลงในอัตราที่สูงเกิดจากการที่มี O_2 ไม่พอเพียงและความเป็นพิษของสิ่งขยับถ่ายของไส้เดือนฝอยเองที่สะสมในดินมากขึ้น เช่นเดียวกันกับในสูตร A และ B เมื่อเปรียบเทียบกับเก็บในดินสูตร A และ B ในช่วงเดียวกันอัตราการรอดชีวิตในดินสูตร C และ D ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอาจบ่งถึงคุณสมบัติของดินที่ใช้เก็บต่างกัน ดินที่เป็นส่วนประกอบของสูตร A และ B คือ Attapugite และ Zeolite นั้นเป็นดินที่เกิดจากหินภูเขาไฟ มีความพรุนหรือช่องว่างเป็นปริมาณมาก การถ่ายเทอากาศดี และสามารถดูดซับสารเคมีได้ดี ส่วนดินผสมสูตร C และ D นั้น ไม่มีข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของดินที่เป็นส่วนประกอบ (ความลับทางธุรกิจ) จากผลการทดลองแสดงว่าดินสูตร A และ B สามารถดูดซับสิ่งขยับถ่ายได้ดีและลดความเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยดีกว่า ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH นั้นยังอยู่ในช่วงเดียวกันกับในดินสูตร A และ B (Fig. 2.1) ใน Table 5 แสดงถึงสภาพของการเก็บในสูตรดินทั้ง 4 สูตรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการทำลายแมลง ซึ่งแตกต่างจากอัตราการรอดชีวิต จะเห็นว่าการเก็บในภาชนะที่มีฝาไม่เจาะรูตามวิธีการที่ 1 นี้ หลังจากเก็บไว้ 1 เดือน ในสูตรดินทุกสูตรไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตอยู่มีประสิทธิภาพ 100% จากเดือนที่ 2 ถึงเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงในดินสูตร A และ B อยู่ระหว่าง 95.7-99.3% ส่วนในดินสูตร C และ D มีแนวโน้มลดลงในอัตราที่สูงกว่า ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 93.0-96.0% อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ นอกจากนี้การลดลงของประสิทธิภาพจากเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 ในดินสูตรเดียวกันก็ไม่มีความแตกต่างทางสถิติเช่นกัน แสดงว่าการเก็บวิธีการนี้ ไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตรอดหลังจากเก็บ 6 เดือน ยังมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายแมลง ในขณะที่ความแตกต่างของคุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบของดินสูตรผสมทั้ง 4 สูตร ไม่มีผลกระทบทำให้ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยแตกต่างกัน การเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิดมีการสูญเสียความชื้นน้อย (Fig. 1.1) ซึ่งอาจเป็นปัจจัยที่ทำให้ไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินทุกสูตรมีประสิทธิภาพสูง

การเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 2 (Table 2) โดยการบรรจุส่วนผสมดินลงในถุงพลาสติก ปิดผนึกเก็บในภาชนะที่ปิดสนิท ไม่มีการเจาะ เช่นเดียวกับวิธีการที่ 1 ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในวิธีการนี้มีลักษณะเช่นเดียวกับการเก็บในวิธีการที่ 1 อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บครบ 6 เดือน ที่ 7°C ในดินทุกสูตรไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด 59.2-69.5% (เฉลี่ย 64.4%) (Table 2) และมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 84.3-86.4% (เฉลี่ย 85.5%) (Table 6) ซึ่งต่ำกว่าการเก็บตามวิธีการแรก (Table 1) ทั้งที่สภาพการเก็บเหมือนกันและมีการสูญเสียความชื้นในช่วง 0-2% (Fig. 1.1) สาเหตุที่ทำให้อัตราการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพลดต่ำมากอาจเนื่องมาจากปริมาณของถุงพลาสติกที่ใช้บรรจุน้อยกว่ากระป๋องที่ใช้บรรจุ แต่ส่วนผสมพร้อมไส้เดือนฝอยมีปริมาณเท่ากัน ทำให้ไส้เดือนฝอยอยู่ในสภาพที่หนาแน่น การถ่ายเทอากาศไม่ดี ช่องว่างภายในถุงพลาสติกมีน้อยลง ในช่วงเริ่มต้นจะเก็บปริมาณอากาศหรือ O_2 ได้น้อย และเก็บสะสมของเสียที่เป็นก๊าซได้ในปริมาณค่อนข้างจำกัดเช่นกัน การดูดซับสิ่งขับถ่ายและการลดความเป็นพิษของดินสูตรต่างๆ ที่ใช้เก็บนั้นก็ทำได้ระดับหนึ่ง ฉะนั้นเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานาน 6 เดือน สภาพที่ไม่เหมาะสมเกิดขึ้นโดยที่ O_2 ไม่พอเพียง ประกอบกับความเข้มข้นของก๊าซที่เป็นของเสียในช่องว่างและสิ่งขับถ่ายในดินเพิ่มในปริมาณสูงมาก จึงมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพมากกว่าวิธีการอื่นๆ ส่วน pH (Fig. 2.1) มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ในช่วง 7-7.5 ซึ่งยังอยู่ในสภาพที่ไม่มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอย (สุทธิชัย และวัชรวิ, 2543) ใน Table 2 ดิน 4 สูตรที่ใช้ในการเก็บรักษานั้นมีผลต่ออัตราการอยู่รอดที่แตกต่างกัน จะเห็นได้จากการลดลงของอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยนั้นแตกต่างจากการเก็บรักษาในภาชนะวิธีการที่ 1 (Table 1) การเปลี่ยนแปลงของอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินสูตร A และ B ใกล้เคียงกัน ส่วนดินสูตร C และ D ก็ใกล้เคียงเช่นกัน โดยในดินสูตร A และ B อัตราการอยู่รอดลดลงมาอยู่ในระดับ 88.2-91.7% (เฉลี่ย 90.0%) ในช่วง 3 เดือนแรก (ช่วงที่ 1) และอยู่ระหว่าง 81.2-82.0% (เฉลี่ย 81.6%) ในเดือนที่ 4 (ช่วงที่ 2) และลดลงมาอยู่ในระดับที่ต่ำมากระหว่าง 68.4-69.9% (เฉลี่ย 69.2%) ในเดือนที่ 5 และ 6 (ช่วงที่ 3) ซึ่งทั้ง 3 ช่วงนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนในดินสูตร C และ D (Table 2) อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ในระดับ 89.9-91.7% (เฉลี่ย 90.8%) ในช่วง 2 เดือนแรก (ลดช่วงที่ 1) ซึ่งใกล้เคียงกับ 2 เดือนแรกในดินสูตร A และ B แสดงว่าในช่วงเริ่มต้นนั้นสภาพในดินเหมือนกัน หลังจากนั้นอัตราการอยู่รอดลดลงสูงกว่าในดินสูตร A และ B โดยลงมาอยู่ในระดับ 81.6-83.3% (เฉลี่ย 82.5%) ในเดือนที่ 3 (ช่วงที่ 2) ลดลงในอัตราสูงลงมาอยู่ระหว่าง 73.2-74.5% (เฉลี่ย 73.9%) ในเดือนที่ 4 (ช่วงที่ 3) และลดลงมาอยู่ในระดับต่ำสุดระหว่าง 59.2-67.3% (เฉลี่ย 63.3%) ในเดือนที่ 5 และ 6 (ช่วงที่ 4) การลดลงในแต่ละช่วงจะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญและทั้ง 3 ช่วงหลังนี้จะต่ำกว่าการเก็บในดินสูตร A และ B อย่างมีนัยสำคัญ อาจกล่าวได้ว่าการลดของอัตราการอยู่รอดทั้งในดินสูตร A, B และ C, D นั้น เกิดจากสภาพไม่เหมาะสมดังกล่าวมาแล้วคือ O_2 ไม่พอเพียง อีกทั้งสภาพในถุงพลาสติกและในดินที่เก็บ และการเก็บในดินสูตร A และ B นั้นมีความเหมาะสมกว่าใน

ดินสูตร C และ D เช่นเดียวกับการเก็บในภาชนะวิธีการที่ 1 เนื่องจากดินซึ่งเป็นส่วนประกอบของดินสูตร A และ B นั้นมีคุณสมบัติที่ดีกว่าดังกล่าวแล้ว ใน Table 6 แสดงถึงสภาพการเก็บในดินทั้ง 4 สูตรที่มีผลต่อประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยในการเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 2 นี้ จะเห็นได้ว่าในระยะเวลา 5 เดือนแรก ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินทุกสูตรมีค่าอยู่ระหว่าง 89.0-97.7% (เฉลี่ย 94.2%) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกันทั้ง 4 สูตร เมื่อเปรียบเทียบกับระยะเวลาการเก็บที่เท่ากันและในสูตรเดียวกันเปอร์เซ็นต์ที่ลดลงแต่ละเดือนก็ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพลดลงในอัตราที่สูงสุดมาอยู่ในระดับ 84.3-86.7% (เฉลี่ย 85.5%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก 2 เดือนแรก แสดงให้เห็นว่าสภาพการเก็บรักษาโดยวิธีการนี้มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพมากกว่าการเก็บตามวิธีการที่ 1 ถึงแม้ว่ามีความชื้นไม่แตกต่างกัน ความแตกต่างของสูตรทั้ง 4 สูตร ไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย แต่มีผลกระทบต่ออัตราการรอดชีวิต เช่นเดียวกันกับวิธีการที่ 1

การเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 3 คือ เก็บในภาชนะกระป๋องที่มีฝาเจาะรูและปิดทับด้านใต้ ฝาด้วยแผ่นพลาสติกใส ทั้งนี้เพื่อให้มีการถ่ายเทอากาศ เพื่อระบายก๊าซที่เป็นของเสียออกข้างนอก และได้รับอากาศ (O_2) เพิ่มจากภายนอก ในขณะเดียวกันต้องการเก็บความชื้นไม่ให้สูญเสียไปมากนัก จากผลการทดลอง เมื่อเก็บเป็นระยะเวลา 6 เดือน ใน Fig.1.3 จะเห็นได้ว่าดินทุกสูตรสูญเสียความชื้นประมาณ 4% (สูงกว่าวิธีการที่ 1 และ 2) ซึ่งถือว่าเป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอย อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ระหว่าง 71.6-76.0% (เฉลี่ย 73.6%) (Table 3) และประสิทธิภาพในการทำลายแมลงอยู่ระหว่าง 85.0-95.5% (Table 7) เฉลี่ย 90.8% ซึ่งมีค่าต่ำกว่าการเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 1 แต่สูงกว่าวิธีการที่ 2 ฉะนั้นปัจจัยที่มีผลต่อการลดลงของอัตราการรอดชีวิตและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยจากการเก็บโดยวิธีนี้คือ ความชื้นที่สูญเสียไป และความเป็นพิษของสิ่งขับถ่ายที่ดูดซับไว้ในสูตรดินที่ใช้เก็บ แต่มีข้อได้เปรียบคืออากาศสามารถซึมผ่านเข้าออกได้ตามรูเจาะที่ฝาปิด เนื่องจากการปิดทับของแผ่นพลาสติกไม่แน่นสนิท ทำให้มีการถ่ายเทก๊าซที่เป็นของเสียออกสู่ภายนอกได้ ขณะเดียวกันก็ได้รับ O_2 พอเพียงทำให้อัตราการมีชีวิตและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงไม่มากนัก และมีค่าสูงกว่าวิธีการที่ 2 ส่วน pH นั้นมีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 7-7.6 ตามที่กล่าวมาแล้วซึ่งจะไม่มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอย (Fig. 2.3) ใน Table 3 แสดงสภาพของดิน 4 สูตร ที่ใช้เก็บมีผลต่ออัตราการรอดของไส้เดือนฝอยที่ต่างกัน ตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 เดือน ของวิธีการที่ 3 ดินสูตร A และ B มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอยู่ในระดับ 86.8-91.9% (เฉลี่ย 89.4%) ในช่วง 4 เดือนแรก (ช่วงแรกของการลดลง) เมื่อเก็บนานขึ้นอัตราการรอดชีวิตจะลงมาอยู่ในระดับ 74.8-78.1% (เฉลี่ย 76.5%) ในช่วงเดือนที่ 5 และ 6 (ช่วงที่ 2 ของการลดลง) โดยลดลงแตกต่างจาก 4 เดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญ ปัจจัยที่ทำให้การมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยลดลงมากในช่วงนี้ ได้แก่ การสูญเสียความชื้นตามที่กล่าวมาแล้ว แตกต่างจากการเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 1 และ 2 ซึ่งเกิดจากการขาด O_2 นอกจากนี้ยังมี

อีกปัจจัยหนึ่งคือ การสะสมสิ่งขับถ่ายในดินที่เก็บมากขึ้น เมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น (ส่วนที่เป็นก๊าซเสียนี้มีการระบายออกได้บ้าง) การลดความเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยมากขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของดินที่ใช้เก็บ เช่นเดียวกันกับวิธีการอื่นๆ ที่กล่าวมาแล้ว ส่วนการเก็บในดินสูตร C และ D (Table 3) มีอัตราการรอดชีวิตลดลงอยู่ระหว่าง 88.7-91.4% (เฉลี่ย 90.1%) ในช่วง 2 เดือนแรก (การลดลงช่วงที่ 1) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับในดินสูตร A และ B หลังจากนั้นอัตราการรอดชีวิตลดลงในอัตราที่ค่อนข้างสูง ลงมาอยู่ระหว่าง 83.1-83.6% (เฉลี่ย 83.3%) ในช่วงเดือนที่ 3 (ช่วงที่ 2 ของการลดลง) ต่อมาลดลงอยู่ในระดับ 75.2-79.2% (เฉลี่ย 77.2%) ในเดือน 4 และ 5 (ช่วงที่ 3 ของการลดลง) และลดลงอยู่ระหว่าง 71.6-71.9% (เฉลี่ย 71.8%) ในเดือนที่ 6 (ช่วงที่ 4) ซึ่งแต่ละช่วงแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ปัจจัยที่ทำให้อัตราการรอดชีวิตลดลงใน 3 ช่วงหลัง (จากเดือนที่ 3-6) มีแนวโน้มต่ำกว่าการเก็บในสูตร A และ B โดยเฉพาะในเดือนที่ 4 แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าสภาพการเก็บในดินสูตร C และ D มีความเหมาะสมน้อยกว่า เนื่องมาจากการสูญเสียความชื้น (4%) ทำให้คุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบของดินสูตร C และ D เปลี่ยนแปลงไป จากการสังเกตอนุภาคดินจะมีการอัดทับกันแน่นขึ้น การระบายอากาศไม่ดีพอ ความสามารถในการดูดซับและการลดความเป็นพิษในดินสูตร C และ D ไม่ดีเท่าดินในดินสูตร A และ B จาก Table 7 แสดงสภาพการเก็บในดินทั้ง 4 สูตรที่มีต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 3 นี้ จะเห็นได้ว่าประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินสูตร A และ B หลังจากการเก็บตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 มีค่าใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 95.3-100% (เฉลี่ย 97.7%) ซึ่งสูงเท่ากับการเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 1 (Table 5) แสดงว่าไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตจากการเก็บโดยวิธีที่ 3 นี้ มีประสิทธิภาพในการทำลายสูง ถึงแม้ว่าการเก็บในดินสูตร A และ B จะบรรจุภาชนะตามวิธีการที่ 3 นี้ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดในเดือนที่ 4 และ 5 (Table 3) ลดลงในอัตราที่สูง (74.8-78.1%) เนื่องจากการสูญเสียความชื้นประมาณ 4% ก็ตาม แต่การสูญเสียความชื้นมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยน้อยมาก ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสูญเสียความชื้น (Fig. 1.3) ในระดับดังกล่าวไม่ทำให้คุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบของดินสูตร A และ B เปลี่ยนแปลง เนื้อดินยังมีความพรุนสูงไม่อัดแน่น การถ่ายเทอากาศได้ดี ซึ่งเป็นปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ถ้าเปรียบเทียบการเก็บในดินสูตรเดียวกันแต่บรรจุในภาชนะตามวิธีการที่ 2 โดยเก็บในถุงพลาสติกปิดผนึกสูญเสียความชื้นน้อย แต่ระบายอากาศไม่ดีมีความแออัด ทำให้ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บตามวิธีการที่ 2 ต่ำ (Table 6) ส่วนการเก็บในดินสูตร C และ D (Table 7) ในช่วง 4 เดือนแรกเท่านั้น ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพในระดับสูง 95.3-100% (เฉลี่ย 97.7%) ใกล้เคียงกับดินสูตร A และ B ช่วงนี้การสูญเสียความชื้นน้อย คุณสมบัติของสูตรดินไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น มีการสูญเสียความชื้นมากขึ้น (สูงสุดประมาณ 4%) คุณสมบัติของดินเปลี่ยน เนื้อดินอัดกันแน่นขึ้น การถ่ายเทอากาศไม่ดี จึงทำให้ในช่วงเดือนที่ 5 และ 6 ประสิทธิภาพลดลงในอัตราที่สูงอยู่ในระดับ 85.0-89.0% (เฉลี่ย 87.0%) ซึ่ง

แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับการเก็บใน 4 เดือนแรก และต่ำกว่าการเก็บในดินสูตร A และ B ซึ่งมีคุณสมบัติไม่เปลี่ยนแปลงดังกล่าวมาแล้ว

การเก็บในภาชนะตามวิธีการที่ 4 คือการเก็บในกระป๋องที่มีฝาเจาะรู เช่นเดียวกันกับวิธีการที่ 3 แต่ใช้กระดาษ Tyvek[®] แทนพลาสติก (จากคำบอกกล่าวของผู้จำหน่ายว่ามีคุณสมบัติในการถ่ายเทอากาศได้ดีและสามารถป้องกันการสูญเสียความชื้นได้ดี) ทั้งนี้เพื่อต้องการระบายก๊าซที่เป็นของเสียสู่ภายนอกได้มากขึ้นปลอดภัยต่อไส้เดือนฝอย ในขณะที่เดียวกันได้รับ O₂ เพิ่มจากผลการทดลอง เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 6 เดือน มีการสูญเสียความชื้นสูงถึง 8.2% (Fig. 1.4) แสดงว่ากระดาษชนิดนี้ไม่สามารถเก็บความชื้นได้ ส่วนอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินทุกสูตร (Table 4) อยู่ระหว่าง 31.4-76.4% (เฉลี่ย 58.7%) และประสิทธิภาพของมัน (Table 8) อยู่ในระดับ 76.7-92.0% (เฉลี่ย 84.8%) ปัจจัยที่มีผลกระทบต่อการเก็บวิธีการนี้คือ การสูญเสียความชื้น (8.2%) ซึ่งทำให้คุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบดินสูตรต่างๆ เปลี่ยนไปจึงมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย ส่วนการเปลี่ยนแปลง pH (Fig. 2.4) อยู่ในระดับ 7-7.4 ซึ่งไม่มีผลกระทบตอไส้เดือนฝอยตามที่กล่าวมาแล้ว จาก Table 4 แสดงสภาพการเก็บในดินทั้ง 4 สูตร ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย การเปลี่ยนแปลงอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินสูตร A และ B ใกล้เคียงกัน โดยในระยะเวลา 4 เดือนแรกของการเก็บ (ลดลงช่วงที่ 1) อัตราการรอดชีวิตลดลงอยู่ในระดับ 85.2-89.4% (เฉลี่ย 87.3%) ในเดือนที่ 5 และ 6 ลดลงในอัตราที่สูงลงมาอยู่ระหว่าง 75.9-77.6% (เฉลี่ย 76.8%) ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับการเก็บในดินสูตรเดียวกันกับการบรรจุภาชนะตามวิธีการที่ 3 แสดงว่า สภาพการเก็บในวิธีการนี้ไม่แตกต่างจากวิธีการที่ 3 ถึงแม้จะมีการสูญเสียความชื้นมากกว่า 4% ก็ตาม ซึ่งหมายถึงสภาพของคุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบของดินสูตร A และ B ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อสูญเสียความชื้นเพิ่มขึ้นก็ตาม ซึ่งถือว่ามีคุณสมบัติที่ดีจากการสังเกตเนื้อดินไม่ยุบตัวลงและอัดกันแน่น ไส้เดือนฝอยยังกระจายอยู่สม่ำเสมอในดินที่เก็บ แสดงว่าอากาศยังแทรกซึมได้ทั่วถึง ส่วนในดินสูตร C นั้นอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยลดลงใน 3 เดือนแรก (ลดลงช่วงแรก) อยู่ระหว่าง 83.6-88.4% (เฉลี่ย 86.0%) และในช่วงเดือนที่ 4 และ 5 (ลดลงช่วงที่ 2) ลดลงอยู่ระหว่าง 71.7-77.4% (เฉลี่ย 74.6%) อัตราการอยู่รอดทั้ง 2 ช่วงมีแนวโน้มต่ำกว่าการเก็บในสูตรดิน A และ B แต่ไม่แตกต่างทางสถิติ แสดงว่าเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงสภาพในการเก็บรักษาที่เริ่มมีผลต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอย โดยเฉพาะการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของดิน อย่างไรก็ตามในเดือนที่ 6 (ลดลงในช่วงที่ 3) มีการลดลงในอัตราที่สูงลงมาอยู่ในระดับต่ำมากคือ 51.1% ซึ่งต่ำกว่าดินสูตร A และ B อย่างมีนัยสำคัญ ช่วงนี้มีการสูญเสียความชื้นมาก สภาพของดินเปลี่ยนไป จึงมีผลกระทบต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยสูงซึ่งจะกล่าวต่อไป ส่วนการเก็บในดินสูตร D ในช่วง 2 เดือนแรก (ช่วงที่ 1) อัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ระหว่าง 81.3-85.9% (เฉลี่ย 83.6%) ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับดินสูตร A, B และ C แต่มีแนวโน้มต่ำกว่า แสดงว่าสภาพการเก็บในสูตรนี้เริ่มไม่เหมาะสม ในเดือนที่ 3, 4 (ช่วงที่ 2) ลดลงมา

อยู่ระหว่าง 62.5-63.6% ในเดือนที่ 5 (ช่วงที่ 3) อยู่ในระดับ 45.4% และในเดือนที่ 6 (ช่วงที่ 4) อยู่ที่ 31.4% ซึ่งทั้ง 3 ช่วงหลังนี้ต่ำกว่าการเก็บในดินสูตร A, B และ C อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าการสูญเสียความชื้นมากทำให้คุณสมบัติของดินสูตร D ไม่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย จากการเปรียบเทียบการเก็บในดินสูตร C และ D ด้วยกันระหว่างการบรรจุตามวิธีการที่ 3 และวิธีการที่ 4 นี้ จะเห็นว่าอัตราการรอดของไส้เดือนฝอยในวิธีการที่ 4 จะลดลงต่ำกว่ามาก แสดงว่าการสูญเสียความชื้นเพิ่มขึ้น 4% นั้น ทำให้สภาพเปลี่ยนแปลงมาก โดยเฉพาะคุณสมบัติของดินสูตร C และ D (ต่างกับสูตร A และ B) จากการสังเกตเมื่อความชื้นในดินระเหยออกเนื้อดินจะยุบลงและแออัดกันแน่น ซึ่งทำให้มีช่องว่างน้อยลง อากาศไม่สามารถซึมผ่านเข้าไปได้อย่างทั่วถึง ไส้เดือนฝอยที่กระจายอยู่ในระดับที่ลึกลงไปจากผิวดินที่ใช้เก็บได้รับอากาศไม่พอเพียง จึงเคลื่อนย้ายขึ้นมาด้านบนผิวดิน เพื่อรับ O_2 ในขณะเดียวกันมันจะรวมตัวกันใช้ลำตัวพันกันเป็นก้อนกลม ซึ่งเป็นพฤติกรรมในการป้องกันการสูญเสียความชื้นที่เคลือบผิวลำตัวมัน ทำให้ไส้เดือนฝอยที่อยู่ด้านในสุดได้รับ O_2 ไม่พอเพียงก็จะตายไป ด้วยเหตุนี้อัตราการรอดของไส้เดือนฝอยในดินสูตร C และ D จึงต่ำ

จาก Table 8 แสดงสภาพการเก็บรักษาในภาชนะตามวิธีการที่ 4 ของดิน 4 สูตร พบว่าประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในดินสูตร A และ B นั้น ตั้งแต่เดือนแรกจนถึงเดือนที่ 6 ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพสูงอยู่ระหว่าง 90.0-99.3% (เฉลี่ย 94.7%) ซึ่งสูงในระดับเดียวกันกับการบรรจุตามวิธีการที่ 1 แต่การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยกลับลดลงในอัตราที่สูงกว่าอยู่ระหว่าง 75.9-88.8% (เฉลี่ย 84.5%) ซึ่งเกิดจากการสูญเสียความชื้นของดินที่ใช้เก็บ แต่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยน้อยมาก เนื่องจากการสูญเสียความชื้นในช่วงนี้ไม่ทำให้คุณสมบัติของดินที่เป็นส่วนประกอบของดินสูตร A และ B เปลี่ยนไป ส่วนในดินสูตร C และ D ในช่วง 5 เดือนแรก ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพอยู่ในระดับสูงเช่นกัน 90.0-93.3% (เฉลี่ย 91.65%) แต่ในช่วงนี้อัตราการรอดชีวิตจะลดลงต่ำมาก คือ ในดินสูตร C อยู่ระหว่าง 71.7-88.4% ในดินสูตร D อยู่ระหว่าง 45.4-85.9% เป็นผลเนื่องจากการสูญเสียความชื้น แต่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพน้อยมาก อาจเนื่องมาจากสภาพดินเปลี่ยนแปลงไปเล็กน้อย ในเดือนที่ 6 อัตราการรอดของไส้เดือนฝอยต่ำมากในดินสูตร C และ D มีค่า 51.1 และ 31.4% ในช่วงนี้ประสิทธิภาพก็มีการลดลงมาอยู่ในระดับ 80.7 และ 76.7 ตามลำดับ มีการสูญเสียความชื้นเพิ่มสูงขึ้นจนถึงระดับ 8% ทำให้คุณสมบัติของดินในสูตร C และ D เปลี่ยนไปจึงมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในระดับที่สูง

สรุปผลการทดลอง

จากการเปรียบเทียบการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ในสูตรดิน 4 สูตร และบรรจุในภาชนะที่ใช้เก็บ 4 วิธีการ พบว่า การเก็บไส้เดือนฝอย 40 ล้านตัวในสูตรดินผง (A) ซึ่งประกอบด้วยดิน Attapulgite และ Zeolite (อัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักแห้ง) 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Naphthalenesulfonic acid) 1.25% ความชื้น 40% และสูตรดิน B ประกอบด้วยดิน Attapulgite และ Zeolite (อัตราส่วน 1:2 โดยน้ำหนัก) สารยับยั้งจุลินทรีย์ 1.25% Ethylene glycol 1.25% สารอุ้มความชื้น (Moist 24[®]) 0.01% เก็บในภาชนะพลาสติกทรงกระบอกที่มีปริมาตร 311 ลบ.ซม. (สูง 11 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม.) มีฝาเกลียวปิดสนิท (ตามวิธีการที่ 1) เก็บที่อุณหภูมิ 5-7°C เป็นเวลา 6 เดือน มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 85.5-86.4% (เฉลี่ย 85.9%) และประสิทธิภาพในการทำลายหนอนกินรังผึ้ง 95.7% (เมื่อใช้อัตราไส้เดือนฝอย 200 ตัว ต่อหนอน 1 ตัว) ซึ่งเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด ส่วนอันดับรองลงมาได้แก่ การเก็บไส้เดือนฝอยในสูตรดิน A + B ดังกล่าวแต่บรรจุในภาชนะที่ปิดด้วยผ้าที่มีรูเจาะ 3 รู ปิดทับด้านในของผ้าด้วยแผ่นพลาสติกใส (วิธีการที่ 3) และปิดทับด้วยกระดาษ Tyvek[®] (วิธีการที่ 4) ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 74.6-74.8% (เฉลี่ย 74.7%) และมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 91.0-95.7% (เฉลี่ย 93.4%) ส่วนการเก็บโดยบรรจุส่วนผสมลงในถุงพลาสติกก่อนแล้วจึงเก็บในภาชนะที่มีฝาเกลียวปิดแน่นสนิท (วิธีการที่ 2) ไส้เดือนฝอยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำสุดอยู่ระหว่าง 68.4-69.5% (เฉลี่ย 68.95%) และมีประสิทธิภาพต่ำสุดเช่นกัน 85.3-86.7% (เฉลี่ย 86 %) ส่วนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในสูตรดินอีก 2 สูตร คือ ดินสูตร C ซึ่งประกอบด้วยดิน Agsorb[®] 58.75% (แทน Attapulgite และ Zeolite ในสูตร A) สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Naphthalenesulfonic acid) 1.25% ความชื้น 40% และดินสูตร D ซึ่งประกอบด้วยดิน Agsorb[®] 57.4% (แทน Attapulgite และ Zeolite ในสูตร B) สารอุ้มความชื้น (Moist 24[®]) 0.01% Ethylene glycol 1.25% และความชื้น 40% ไส้เดือนฝอยมีอัตราการรอดชีวิตอยู่ในระดับต่ำกว่าการเก็บในดินสูตร A และ B เมื่อเปรียบเทียบวิธีการในการเก็บในภาชนะที่เหมือนกัน โดยการเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด (วิธีการที่ 1) มีอัตราการรอดชีวิตระหว่าง 80.4-80.6% (เฉลี่ย 80.5%) เก็บในถุงพลาสติก และบรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด (วิธีการที่ 2) มีอัตราการรอดชีวิต 52.9-63.4% (เฉลี่ย 58.2%) เก็บในภาชนะที่มีฝาเจาะรูปิดทับด้านในด้วยแผ่นพลาสติกใส มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 71.6-71.9% (เฉลี่ย 71.75%) ส่วนวิธีการที่ปิดทับกระดาษ Tyvek[®] มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 31.4-51.1% (เฉลี่ย 41.3%) ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยนั้น เมื่อเก็บในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด (วิธีการที่ 1) และเก็บในถุงพลาสติกก่อนและบรรจุในภาชนะที่มีฝาปิดมิดชิด (วิธีการที่ 2) มีการทำลายอยู่ระหว่าง 93.0-94.3 (เฉลี่ย 93.7%) และระหว่าง 84.3-86.7% (85.5%) ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากการเก็บในดินสูตร A และ B เนื่องจากการสูญเสียความชื้นน้อย (1-2%) ในช่วงการเก็บ (6 เดือน) แต่เมื่อเก็บตามวิธีการที่ 3 (ภาชนะมีฝาเจาะรูปิดทับ

ด้วยแผ่นพลาสติกใส) และวิธีการที่ 4 (ปิดทับด้วยกระดาษ Tyvex[®]) มีการสูญเสียความชื้นในช่วงการเก็บ 4-8% ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ซึ่งเก็บในดินสูตร C และ D นี้จะอยู่ระหว่าง 87.0-85.0 (เฉลี่ย 86%) และ 76.7-80.7 (เฉลี่ย 78.7%) ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าการเก็บในดินสูตร A + B อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบวิธีการเก็บเดียวกัน

Table 1 Survival percentage of nematode kept in four different powder formulations in plastic containers with opaque screw lids, for a period of 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	93.4 a (a)	93.8 a (a)	94.2 a (a)	93.3 a (a)	93.7
2 nd	93.2 a (a)	92.5 a (a)	92.5 a (a)	92.7 a (a)	92.7
3 rd	94.4 a (a)	93.7 a (a)	92.1 a (a)	90.8 a (a)	92.8
4 th	93.5 a (a)	92.8 a (a)	91.4 a (a)	90.6 a (a)	92.1
5 th	89.4 b (a)	87.9 b (a)	82.7 b (b)	82.1 b (b)	85.5
6 th	86.4 b (a)	85.5 b (a)	80.4 b (b)	80.6 b (b)	83.2
Average (I)	91.7	91.0	88.9	88.4	90.0

CV = 2.5%

Table 2 Survival percentage of nematode stored in four different powder formulations in sealed plastic bags contained in plastic cans with opaque screw lids, for 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	90.4 a (a)	91.7 a (a)	91.7 a (a)	91.6 a (a)	91.4
2 nd	88.0 a (a)	88.1 a (a)	89.9 a (a)	89.8 a (a)	89.0
3 rd	89.3 a (a)	88.2 a (a)	83.3 b (b)	81.6 b (b)	85.6
4 th	82.0 b (a)	81.2 b (a)	74.5 c (b)	73.2 c (b)	77.7
5 th	69.9 c (a)	69.9 c (a)	59.9 d (b)	67.3 d (b)	66.8
6 th	69.5 c (a)	68.4 c (a)	59.2 d (c)	63.4 d (b)	65.1
Average (I)	81.5	81.3	76.4	77.8	79.3

CV = 3.2%

In a column, means followed by the same letters 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.

Table 3 Survival percentage of nematode kept in four different powder formulations contained in plastic cans with 3 holes-perforated opaque screw lids (each hole having 0.5 cm. diameter) entirely covered with plastic sheet underneath, for 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	90.2 a (a)	91.9 a (a)	90.2 a (a)	91.4 a (a)	90.9
2 nd	87.3 a (a)	90.1 a (a)	88.7 a (a)	88.9 a (a)	88.8
3 rd	86.7 a (ab)	88.4 a (a)	83.6 b (b)	83.1 b (b)	85.5
4 th	86.8 a (a)	86.8 a (a)	79.2 c (b)	78.6 c (b)	82.9
5 th	76.0 b (ab)	78.1 b (a)	75.8 c (ab)	75.2 c (b)	76.3
6 th	76.0 b (a)	74.8 b (ab)	71.9 d (b)	71.6 d (b)	73.6
Average (I)	83.8	85.0	81.6	81.5	83.0

CV = 2.8%

Table 4 Survival percentage of nematode maintained in four different powder formulations contained in plastic cans with 3 holes-perforated opaque screw lids (each hole having 0.5 cm. diameter) entirely covered with Tyvex[®] pad underneath, for 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	88.8 a (a)	89.4 a (a)	88.4 a (a)	85.9 a (a)	88.1
2 nd	89.3 a (a)	90.2 a (a)	82.3 a (a)	81.3 a (a)	85.8
3 rd	89.7 a (a)	88.9 a (a)	83.6 a (a)	63.6 b (b)	81.5
4 th	85.2 a (a)	85.7 a (a)	77.4 b (a)	62.5 b (b)	76.2
5 th	77.6 b (a)	76.9 b (a)	71.7 b (a)	45.4 c (b)	67.9
6 th	76.4 b (a)	75.9 b (a)	51.1 c (b)	31.4 d (c)	58.7
Average (I)	84.5	84.5	75.8	61.7	76.4

CV = 7.2%

In a column, means followed by the same letters 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.

Table 5 Infectivity percentage of nematode maintained in four different powder formulations containers with opaque screw lids, for a period of 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0
2 nd	96.0 a (a)	97.3 a (a)	96.0 a (a)	94.0 a (a)	95.8
3 rd	98.0 a (a)	99.3 a (a)	96.0 a (a)	96.0 a (a)	97.3
4 th	98.0 a (a)	98.0 a (a)	94.7 a (a)	95.3 a (a)	96.5
5 th	96.7 a (a)	98.0 a (a)	93.3 a (a)	93.3 a (a)	95.3
6 th	95.7 a (a)	95.7 a (a)	94.3 a (a)	93.0 a (a)	94.7
Average (I)	97.4	98.1	95.7	95.3	96.6

CV = 4.0%

Table 6 Infectivity percentage of nematode maintained in four different powder formulations in a sealed plastic bags contained in plastic cans with opaque screw lids, for 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	96.7 a (a)	97.7 a (a)	96.7 a (a)	95.7 a (a)	96.7
2 nd	96.0 a (a)	95.7 a (a)	95.3 a (a)	94.7 a (a)	95.4
3 rd	95.0 ab (a)	92.7 ab (a)	94.7 ab (a)	93.3 ab (a)	93.9
4 th	93.3 ab (a)	92.0 ab (a)	94.7 ab (a)	92.7 ab (a)	93.2
5 th	92.0 ab (a)	91.0 ab (a)	94.7 ab (a)	89.0 ab (a)	91.7
6 th	86.7 b (a)	85.3 b (a)	86.7 b (a)	84.3 b (a)	85.8
Average (I)	93.3	92.4	93.8	91.6	92.8

CV = 5.7%

In a column, means followed by the same letters 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.

Table 7 Infectivity percentage of nematode maintained in four different powder formulations contained in plastic cans with 3 holes-perforated opaque screw lids (each hole having 0.5 cm. diameter) entirely covered with plastic sheet underneath, 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	99.8
2 nd	97.7 a (a)	95.7 a (a)	95.7 a (a)	96.7 a (a)	96.5
3 rd	98.7 a (a)	96.7 a (a)	95.3 a (a)	95.3 a (a)	96.5
4 th	98.7 a (a)	98.7 a (a)	95.3 a (a)	95.3 a (a)	97.0
5 th	96.7 a (a)	97.0 a (a)	89.0 b (a)	88.3 b (a)	92.9
6 th	95.3 a (a)	95.7 a (a)	85.0 b (b)	87.0 b (b)	90.8
Average (I)	97.9	97.4	93.4	93.6	95.6

CV = 3.2%

Table 8 Infectivity percentage of nematode maintained in four different powder formulations contained in plastic cans with 3 holes-perforated opaque screw lids (each hole having 0.5 cm. diameter) entirely covered with Tyvex[®] pad underneath, 6 months at 7°C.

Month (II)	Formulations (I)				
	A	B	C	D	Average(II)
1 st	99.3 a (a)	97.3 a (a)	93.3 a (a)	99.3 a (a)	97.3
2 nd	96.7 ab (a)	95.3 a (a)	92.7 a (a)	96.0 ab (a)	95.2
3 rd	96.7 ab (a)	96.3 a (a)	90.0 a (a)	93.0 ab (a)	94.0
4 th	94.7 ab (a)	93.3 a (a)	91.0 a (a)	90.0 b (a)	92.3
5 th	94.7 ab (a)	91.0 a (a)	90.0 a (a)	89.3 b (a)	91.3
6 th	92.0 b (a)	90.0 a (a)	80.7 b (b)	76.7 c (b)	84.8
Average (I)	95.7	93.9	89.6	90.7	92.5

CV = 4.3%

In a column, means followed by the same letters 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.

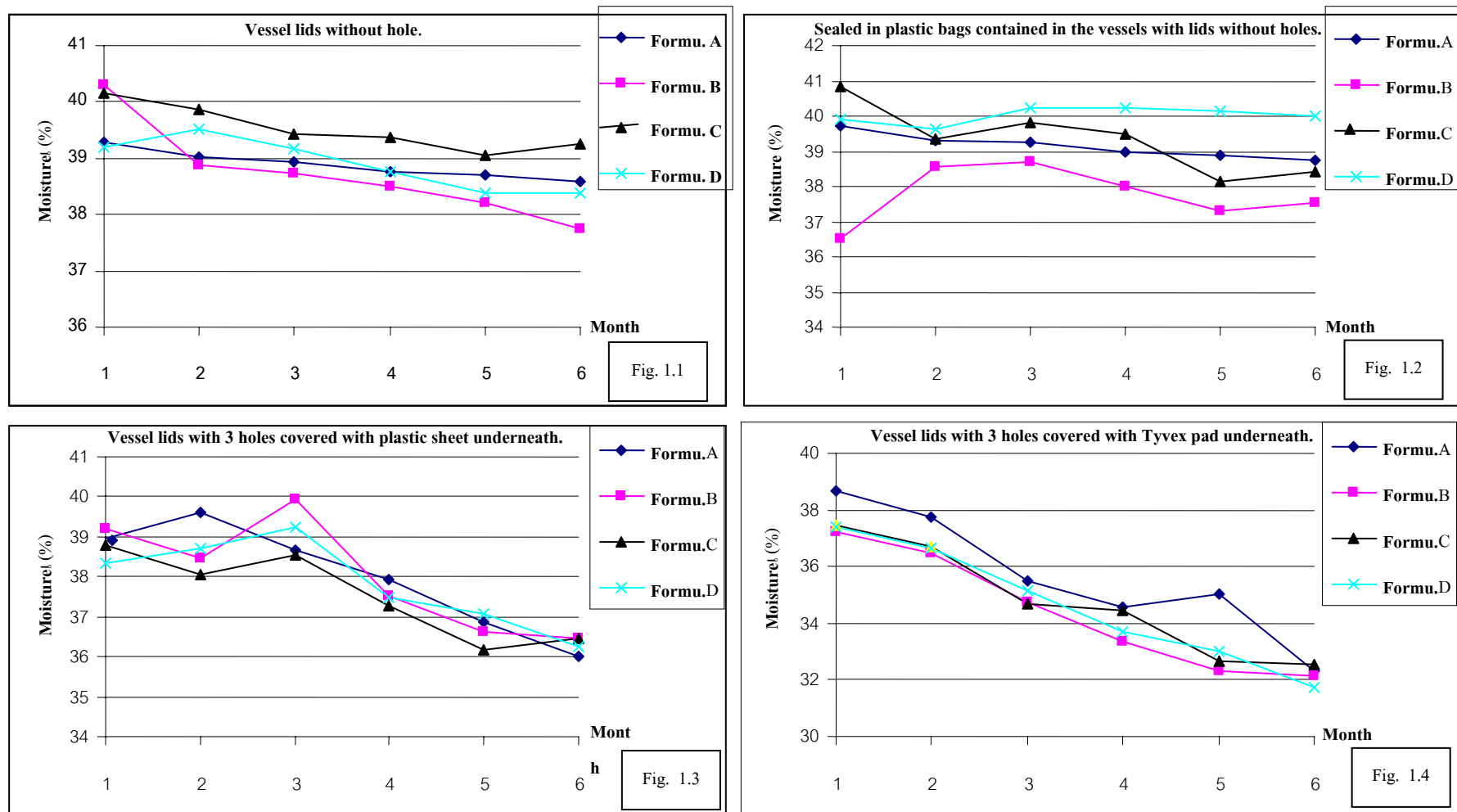


Figure 1 Change of moisture content of various soil powder formulations keeping nematodes in different containing method.

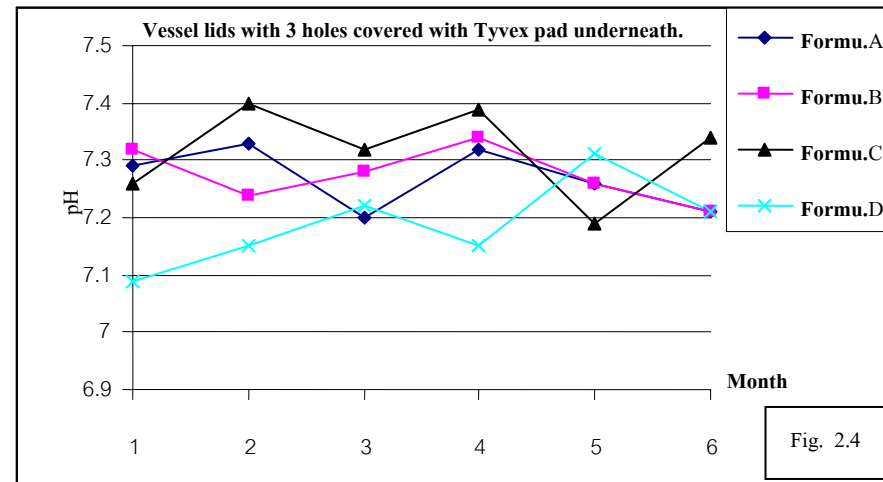
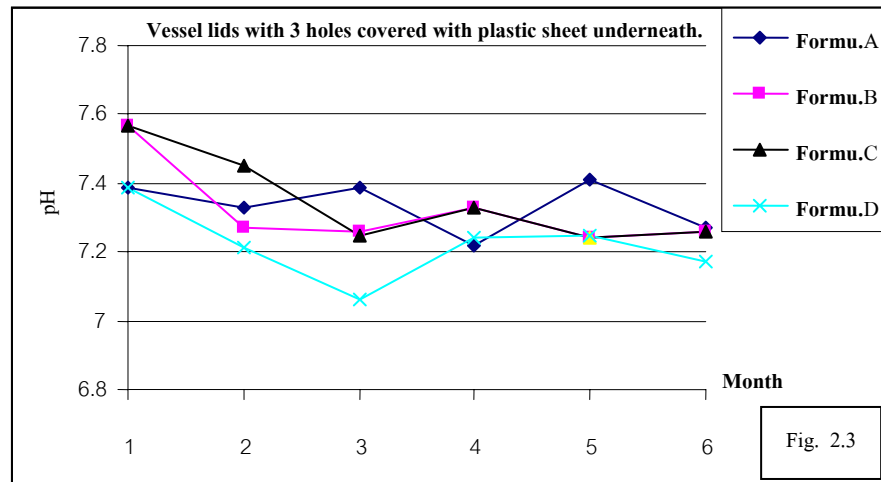
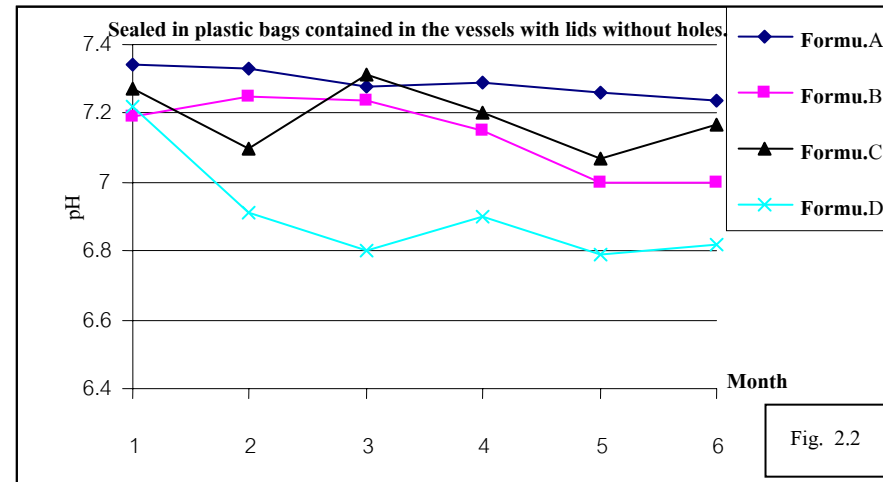
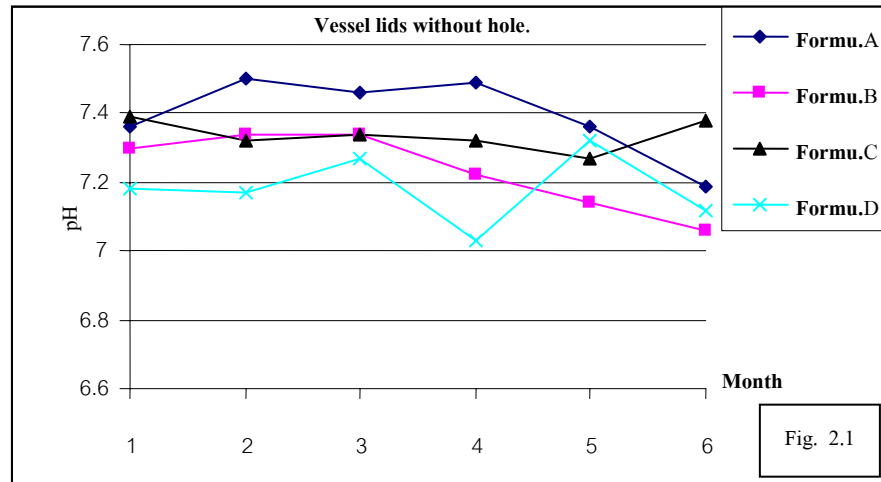


Figure 2 pH changing of soil powder formulations keeping nematodes in different containing method.

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิ สมสุข. 2544. "ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ใน: เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 209-244.
- วัชรวิ สมสุข และ สุทธิชัย สมสุข. 2544. ผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า. ใน: รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์. กรมวิชาการเกษตร. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์. 172 น.
- สุทธิชัย สมสุข และวัชรวิ สมสุข. 2543. ผลของระดับความเป็นกรดต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ที่เลี้ยงในอาหารเหลว. วารสารกัญและสัตววิทยา 22(3):228-240.
- Bedding, R.A. 1988. Storage of entomopathogenic Nematodes. Int. Pat. WO 88/08668. 25 pp.
- Capinera, J.L. and Hibbard, B.E. 1987. Bait formulations of chemical and microbial insecticides for suppression of crop feeding grasshoppers. Journal of Agricultural Entomology 4:337-344.
- Evans, A.A.F. and Perry, R.N. 1976. Survival strategies in nematodes. In: Croll, N.A. (ed.) The Organization of Nematodes. Academic Press, London, pp. 383-401.
- Georgis, R. 1990. Formulation and application technology. In: Gaugler R. and Kaya, H.K. (eds.) Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc., Boca Raton, Florida. pp. 173-191.
- Grewal, P.S, Selvan S. and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. Journal of Thermal Biology 19:245-253.
- Grewal, P.S. 1998. Formulations of entomopathogenic nematodes for storage and application. Japanese Journal of Nematology 28:68-74.
- Grewal, P.S. 2002. Enhanced ambient storage stability of an entomopathogenic nematode through anhydrobiosis. Pest Management Science. 56:401-406.
- Nelson, C.E. and Mannion, C. 1986. Hydrogel encapsulated nematodes U.S. Pat. No.4,615,883. 11 pp.

- Qui, L. and Bedding, R.A. 1999. Low temperature induced cryoprotectant synthesis by the infective juveniles of *Steinernema carpocapsae*: its biological significance and the mechanisms involved. *Cryo Letters*. 20:393-404.
- Selvan, S., Gaugler, R. and Lewis, E.E. 1993. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. *Journal of Parasitology* 79:167-172.
- Silver, Scott C. 1999. Granular formulation of biological entities with improved storage stability. U.S. Pat. No. 5,965,149. 30 pp.
- Wharton, D.A. 1986. *A Functional Biology of Nematodes*. Croom Helm, London, 192 p.
- Yukawa, T. and Pitt, J.M. 1988. Nematode storage and transport. U.S. Pat. No. 4,765,275. 12 pp.

2.2 อัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่เก็บในรูปผงดินบรรจุในภาชนะที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

Study on Optimum Density of Entomopathogenic Nematodes, *Steinernema carpocapsae* Stored in Powder Formulation in a Sealed Container at Different Temperatures.

บทคัดย่อ

ศึกษาอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่เก็บในรูปผงดินและบรรจุในกระป๋องที่มีปริมาตร ≈ 311 ลบ.ซม. (ทรงกระบอกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม.) ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (3×6) 18 วิธีการ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระป๋อง โดยทำการทดสอบ ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือ 7 25 และ 30°C ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยในผงดิน 3 ระดับ คือ 40 60 และ 80 ล้านตัว/กระป๋อง

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาการเก็บรักษานาน 6 ระดับ คือ ที่ 7°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 25 และ 30°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์

หลังการบรรจุไส้เดือนฝอยรูปผงดินในภาชนะและเก็บที่อุณหภูมิตามแผนการทดลองในระยะเวลาที่กำหนด จึงนำมาตรวจนับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในแต่ละวิธีการ พบว่า ที่ 7°C ในช่วงเดือนแรก อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในการบรรจุทุกระดับความหนาแน่น อยู่ที่ 96.7-98.0% ในช่วงเดือนที่ 2 และ 3 ที่บรรจุ 80 ล้านตัว ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอดต่ำสุดที่ 92.5 และ 89.9% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่บรรจุ 40 ล้านตัว (96.7 และ 94.3%) และ 60 ล้านตัว (95 และ 93.3%) ในช่วงเดือนที่ 4 5 และ 6 อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ขึ้นกับอัตราความหนาแน่นในการบรรจุ โดยที่บรรจุ 40 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดสูงสุดระหว่าง 90.0-92.8% รองลงมาคือที่บรรจุ 60 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 80.3-90.2% และที่บรรจุ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดต่ำสุด ระหว่าง 75.7-84.6% โดยแต่ละอัตราการบรรจุมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งกันและกันทั้ง 3 อัตรา ส่วนอัตราความหนาแน่นในการบรรจุมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในการเข้าทำลายแมลง โดยทดสอบกับหนอนกิ้งมั่ง (*Galleria mellonella*) พบว่า ที่ 7°C ในช่วง 3 เดือนแรก ที่บรรจุทั้ง

3 ระดับความหนาแน่น ไล้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 94.4-100% ในช่วงเดือนที่ 4-5 ที่บรรจุ 60 และ 80 ล้านตัว ไล้เดือนฝอย มีประสิทธิภาพลดลงมาอยู่ใกล้เคียงกันระหว่าง 85.9-91.1% ซึ่งต่ำกว่าที่บรรจุ 40 ล้านตัว (91.1-94.4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงเดือนที่ 6 ที่บรรจุ 40 ล้านตัว ไล้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพสูงสุด (91.1%) รองลงมาได้แก่ ที่บรรจุ 60 ล้านตัว (87.8%) และ 80 ล้านตัว (82.2%) โดยที่ทั้ง 3 อัตราการบรรจุมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติซึ่งกันและกัน

ที่ 25°ซ อุณหภูมิสูงขึ้น อายุการเก็บรักษาไล้เดือนฝอยที่อัตราการบรรจุทั้ง 3 ระดับสั้นลง พบว่าในช่วง 3 สัปดาห์แรก อัตราการอยู่รอดของไล้เดือนฝอยที่บรรจุ 80 ล้านตัว ลดต่ำลงอยู่ระหว่าง 80.9-93.6% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกันระหว่าง 85.7-97.8% ส่วนในช่วง 3 สัปดาห์หลัง (สัปดาห์ที่ 4-6) อัตราการอยู่รอดของไล้เดือนฝอยที่บรรจุทั้ง 3 ระดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยที่บรรจุ 40 60 และ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอด ระดับ 65.7-83.2 60.4-80.3 และ 59.1-70.7% ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอย ในช่วง 2 สัปดาห์แรก ที่บรรจุทั้ง 3 ระดับ ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 95.6-98.9% พอถึงช่วงสัปดาห์ที่ 3-6 ประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอยที่บรรจุ 80 ล้านตัว ลดลงต่ำสุดอยู่ระหว่าง 74.4-91.1% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่บรรจุ 40 ล้านตัว ซึ่งประสิทธิภาพสูงสุดอยู่ระหว่าง 77.8-95.6% รองลงมาคือที่บรรจุ 60 ล้านตัว ประสิทธิภาพไล้เดือนฝอยอยู่ระหว่าง 75.8-94.4% ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติกับที่บรรจุ 40 และ 80 ล้านตัว (ยกเว้นสัปดาห์ที่ 3)

ที่ 30°ซ เช่นเดียวกับการเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ อายุการเก็บสั้นลง ในช่วง 2 สัปดาห์แรก อัตราการอยู่รอดของไล้เดือนฝอยที่บรรจุ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดต่ำสุด อยู่ระหว่าง 84.0-94.4% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 94.0-98.3% ในช่วงสัปดาห์ที่ 3-6 การบรรจุที่ 40 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 71.8-94.5% ที่บรรจุ 60 และ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 60.3-81.6% และ 51.1-75.0% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกันทั้ง 3 อัตราการบรรจุ ส่วนประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอย ในช่วงสัปดาห์ที่ 1-2 ที่การบรรจุทั้ง 3 อัตรา ไม่แตกต่างกันทางสถิติ มีประสิทธิภาพ 95.6-97.8 95.6 และ 92.2-95.6% ตามลำดับ ในช่วงสัปดาห์ที่ 3-6 ที่บรรจุ 80 ล้านตัว ประสิทธิภาพลดลงมาอยู่ที่ระดับต่ำสุดระหว่าง 67.8-87.8% ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ กับที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 74.4-92.2% และ 74.5-92.2% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละสัปดาห์

คำนำ

จากการศึกษาสูตรดินผงและภาชนะบรรจุในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocasae* พบว่า การเก็บไส้เดือนฝอย 40 ล้านตัวในสูตรดินผงประกอบด้วย ดินผสม (Attapulgate และ Zeolite อัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก) 58.75% สารยับยั้งจุลินทรีย์ (1-Naphthalenesulfonic acid) 1.25% ความชื้น 40% โดยบรรจุ 100 กรัม ในภาชนะพลาสติกทึบ มีปริมาตร 311 ลบ.ซม. (สูง 11 ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม.) มีฝาปิดแบบเกลียวปิดสนิท เก็บที่อุณหภูมิ 7°C เป็นเวลา 6 เดือน ไส้เดือนฝอยมีอัตราการรอดชีวิต 85.5-86.4% และมีประสิทธิภาพในการทำลายโดยทดสอบกับหนอนกินรังผึ้ง 95.7% ซึ่งเป็นวิธีที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตาม การผลิตไส้เดือนฝอยในเชิงการค้า จำเป็นต้องมีข้อมูลที่เหมาะสมที่สุด ในการที่จะลดต้นทุนทุกขั้นตอนในกระบวนการผลิต ฉะนั้นในการทดลองต่อไปจำเป็นต้องหาปริมาณที่เหมาะสมในการบรรจุในภาชนะที่มีขนาดหรือปริมาตรมาตรฐานจำหน่ายในท้องตลาด พร้อมทั้งเปรียบเทียบการเก็บในอุณหภูมิ ที่สูงขึ้นในระดับอุณหภูมิห้องและในสภาพธรรมชาติ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่นำไส้เดือนฝอยไปใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชต่อไป

วิธีดำเนินการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องนับ (counter) เครื่องวัด pH (pH meter) ปิเปตแบบอัตโนมัติ (auto pipette) ชุดกวนแบบแท่งแม่เหล็ก (stirrer magnetic bar) เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer)
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระบอกตวงขนาดต่างๆ จาน petridish
3. ไข่เห็บฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
4. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
5. ดินผง Attapulgate และ Zeolite
6. สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ (Benzoic acid)
7. กระป๋องพลาสติกทึบสีขาว ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. ปริมาตรบรรจุ 311 ลบ.ซม.
8. อื่นๆ ได้แก่ ถังพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว กระบอกฉีดยาพลาสติก ขนาด 10 มล. เข็มฉีดยา

วิธีการทดลอง

ทำการทดลอง ที่อุณหภูมิ 3 ระดับ คือที่ 7 25 และ 30°C โดยวางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (6x3) 3 ซ้ำ ๆ ละ 1 กระป๋อง ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 อัตราความหนาแน่นของไข่เห็บฝอยในผงดิน 3 ระดับ คือ 40 60 และ 80 ล้านตัว/กระป๋อง

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษา 6 ระดับ คือ ที่ 7°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 25 และ 30°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. บดดิน Attapulgate และ Zeolite ให้เป็นผงละเอียดนำไปอบแห้งที่ 100-120°C และนำมาผสมกันในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนักจะได้ดินผสมที่นำไปใช้เก็บไข่เห็บฝอย
2. เตรียมไข่เห็บฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective Juvenile) ในปริมาณ 40, 60 และ 80 ล้านตัวในน้ำ 40 มิลลิลิตร สำหรับผสมดิน
3. ทำการเตรียมสูตรผสม 100 กรัม โดยใช้ดินผสม 58.75 กรัม (Attapulgate+Zeolite อัตรา 2:1) ผสมสารกันบูด (Benzoic acid) 1.25 กรัม คนให้เข้ากันให้ทั่ว

4. ผสมไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ในข้อ 2 กับส่วนผสมในข้อ 3 พร้อมกับปรับความชื้นให้ได้ 40% บรรจุส่วนผสมลงในภาชนะกระป๋องพลาสติกทึบฝาไม่เจาะรูในอัตรา 100 กรัม/กระป๋องนำไปเก็บรักษาที่ระดับอุณหภูมิ 7 25 และ 30°C

5. ตรวจสอบไส้เดือนฝอยในแต่ละวิธีการ 3 ครั้ง ต่อ 1 ชั่วโมง (กระป๋อง) โดยที่ อุณหภูมิ 7°C ตรวจสอบทุกๆ เดือน (เป็นเวลา 6 เดือน) ที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C ตรวจสอบทุกๆ สัปดาห์ (เป็นเวลา 6 สัปดาห์) ซึ่งมีการปฏิบัติดังนี้

- ทำการสุ่มส่วนผสมในแต่ละชั่วโมง 5 กรัม นำไปวัดความชื้นด้วยเครื่อง Moisture Analyzer โดยตรง

- สุ่มส่วนผสม 10 กรัม นำมาละลายในน้ำกลั่น 500 มล. นำไปวัด pH หลังจากนั้นนำมาเจือจางด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งในอัตรา 1:100 เพื่อนำไปนับปริมาณไส้เดือนฝอยที่ยังมีชีวิตอยู่และที่ตาย

- นำไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตไปทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยกับหนอนกิ้งกือ (G. mellonella) วัย 5 โดยใช้อัตราไส้เดือนฝอย 200 ตัว/หนอนกิ้งกือ 10 ตัว ทำการทดสอบในจาน petridish ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. ครบ 48 ชั่วโมง ตรวจสอบอัตราหนอนที่ตาย

การบันทึกข้อมูล

- ที่อุณหภูมิ 7 °C บันทึกเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน ส่วนที่อุณหภูมิ 25 และ 30°C บันทึกทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

- บันทึกเปอร์เซ็นต์ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง เปอร์เซ็นต์คุณภาพ และเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอย ในทุกวิธีการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรม IRRISTAT

ผลและวิจารณ์การทดลอง

ที่ 7^๐ซ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในสูตรดินผงบที่บรรจุ อัตรา 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากัน พบว่า ในเดือนแรก (Table 1) อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย คือ 98.0 96.5 และ 96.7% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่า ที่บรรจุ 60 และ 80 ล้านตัว มีแนวโน้มลดลงในอัตราที่สูงกว่าที่บรรจุ 40 ล้านตัว แต่ยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ในเดือนที่ 2 และ 3 อัตราความหนาแน่นที่สูงเริ่มมีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย โดยจะเห็นว่า ที่บรรจุ 80 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ที่ระดับ 92.5 และ 89.9% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากที่บรรจุ 40 ล้านตัว (96.7 และ 94.3%) และที่ 60 ล้านตัว (95.0 และ 93.3%) ในช่วงนี้การเก็บที่บรรจุ 60 ล้านตัว เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยเริ่มลดลงในอัตราที่สูงกว่าที่บรรจุ 40 ล้านตัว แต่ยังไม่มีความแตกต่างทางสถิติสภาพในภาชนะที่ไม่เหมาะสมเนื่องจากมีความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยสูง จะเห็นผลชัดเจนขึ้นเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น อย่างเช่น ในเดือนที่ 4 5 และ 6 อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยขึ้นกับอัตราความหนาแน่นในการบรรจุไส้เดือนฝอย โดยที่บรรจุ 40 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงสุดระหว่าง 90.0-92.8% รองลงมาที่บรรจุ 60 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดระหว่าง 80.3-90.2% ที่บรรจุสูงสุด 80 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดระหว่าง 75.7-84.6% ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกันในแต่ละเดือน และระหว่างอัตราการบรรจุ

หากดูการเปลี่ยนแปลงอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ในช่วงการเก็บ 6 เดือนที่ 7^๐ซ ของแต่ละอัตราการบรรจุ พบว่า

ที่บรรจุ 40 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดลดลงตามลำดับ โดยแบ่งเป็น 3 ช่วง คือ
ช่วงที่ 1 หลังการเก็บ 2 เดือนแรก ลดลงอยู่ระหว่าง 96.7-98.0%
ช่วงที่ 2 หลังการเก็บ 3-5 เดือน ลดลงอยู่ระหว่าง 92.8-94.3%
ช่วงที่ 3 หลังการเก็บ 6 เดือน ลดลงอยู่ระหว่าง 90.0%
การลดลงทั้ง 3 ช่วงนี้ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ที่บรรจุ 60 ล้านตัว มีอัตราการลดลง 4 ช่วง ในช่วง 2 เดือนแรก อัตราการอยู่รอดลดลงอยู่ในระดับที่ใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 95.0-96.5% หลังจากนั้น อัตราการอยู่รอดลดลงทุกๆ เดือน จาก 93.3% ในเดือนที่ 3 เหลือ 80.3% ในเดือนที่ 6 ซึ่งแต่ละเดือนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกัน และแตกต่างจาก 2 เดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติด้วย

ที่บรรจุ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดลดลง ตามลำดับทุกเดือน รวม 5 ช่วง คือ ตั้งแต่เดือนแรก มีอัตราการอยู่รอด 96.7% และลดลงทุกเดือนจนเหลือ 75.7% ในเดือนที่ 6 ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละเดือน

จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนระหว่างความหนาแน่นกับปริมาตรภาชนะที่ใช้เก็บไส้เดือนฝอยของการบรรจุที่อัตราความหนาแน่น 40 60 และ 80 ล้านตัว ต่างกัน ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.8 5.2 และ 3.9 ล้านตัว/ 1 ลบ.ซม. ตามลำดับ ดังนั้น เมื่อเก็บเป็นเวลานานขึ้น ไส้เดือนฝอยที่ถูกบรรจุในอัตราความหนาแน่นสูง ย่อมมีโอกาสได้รับผลกระทบจากการขาด O_2 ได้มากกว่า ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอย Lindergrén *et al.* (1986) พบว่า เมื่อเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. feltiae* ในสภาพดินร่วนปนทราย เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ อัตราการรอดชีวิตลดลง เมื่อความเข้มข้นของ O_2 ลดลงจาก 20% เหลือ 1% หลังจากเก็บนานกว่า 2 สัปดาห์ อัตราการรอดชีวิตจะลดลงอย่างรวดเร็ว แม้มีความเข้มข้นออกซิเจน 20% ก็ตาม นอกจากนี้การสะสมของ CO_2 และสิ่งขับถ่ายของไส้เดือนฝอย การระบายอากาศของสูตรดิน ซึ่งก็มีผลต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยดังกล่าวมาแล้ว จาก Fig. 1 แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นในช่วงระยะเวลาการเก็บ เมื่อครบ 6 เดือน จะเห็นได้ว่า ความชื้นของทุกอัตราความหนาแน่นในการเก็บ 40 60 และ 80 ล้านตัว ลดลงอยู่ในระดับ 34.3-36.0% โดยสูญเสียความชื้นประมาณ 4.0-5.7% ผลกระทบที่เกิดขึ้นจะได้กล่าวต่อไป

ไส้เดือนฝอยมีไขมันประมาณ 60% ของน้ำหนักแห้งลำตัว (Selvan *et al.*, 1993) ในช่วงการเก็บในสูตรดิน ฉะนั้นการใช้ไขมันขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ ได้แก่ อุณหภูมิ ปริมาณ O_2 และกิจกรรมของไส้เดือนฝอย (Grewal and Georgis, 1998) ฉะนั้นการเก็บที่ 7°C เป็นระดับอุณหภูมิต่ำ การเคลื่อนไหวของไส้เดือนฝอยช้าลง อัตราการหายใจช้า ไขมันหรืออาหารสำรองถูกใช้หมดไปอย่างช้าๆ สภาพนี้จึงทำให้ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดได้นานขึ้น Molyneux (1985) พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. carpocasiae* สามารถมีชีวิตรอดได้ถึง 60% หลังการเก็บนาน 36 สัปดาห์ ที่ 10°C จาก Fig. 1 (A) แสดงการเปลี่ยนแปลงความชื้นแต่ละเดือนช่วงการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่นการบรรจุ 40 60 และ 80 ล้านตัว ที่ 7°C เมื่อเก็บครบ 6 เดือน ความชื้นของทุกอัตราการบรรจุลดลงอยู่ในระดับ 34.3-36.0% สูญเสียความชื้นประมาณ 4.0-5.7% การเปลี่ยนแปลงความชื้นในช่วงการเก็บมีความสัมพันธ์กับการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Fig. 2 A) แสดงว่าที่สูญเสียมีผลต่อการเก็บด้วย ถึงแม้เก็บในอุณหภูมิที่เหมาะสมก็ตาม

หากเปรียบเทียบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย ที่เก็บรักษาในสูตรดินผงที่บรรจุอัตรา 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากัน ที่ 7°C พบว่าในเดือนแรก (Table 2) ไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่รอด ที่อัตราการบรรจุทั้ง 3 ระดับ มีประสิทธิภาพสูงถึง 100% แสดงว่าการเก็บในช่วงต้นๆดังกล่าวมีผลเฉพาะต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยเท่านั้น (เปรียบเทียบจาก Table 1) ในเดือนที่ 2 การเก็บที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ไส้เดือนฝอยยังคงมีประสิทธิภาพ 100% ในภาชนะที่บรรจุ 80 ล้านตัว ประสิทธิภาพเริ่มลดลงมาที่ 98.9% แต่ทั้ง 3 อัตรายังไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในเดือนที่ 3 สภาพการเก็บเริ่มมีผลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย โดยที่บรรจุ 40 ล้านตัว ประสิทธิภาพลดลงอยู่ที่ 96.3% ที่บรรจุ 60 ล้านตัว ประสิทธิภาพลดลงอยู่ใน

ระดับเดียวกับที่บรรจุ 80 ล้านตัว คือ 94.4% แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มี ความแตกต่างกันทางสถิติ ระหว่างการบรรจุทั้ง 3 ระดับ พอถึงเดือนที่ 4-5 ผลกระทบจากการบรรจุอัตราต่างๆ กันจะเห็น ชัดเจนขึ้น โดยประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่บรรจุ 60 ล้านตัว เท่ากับ 91.1 87.8% และที่ บรรจุ 80 ล้านตัว เท่ากับ 90.0 85.9% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากที่บรรจุ 40 ล้านตัว คือ 94.4, 91.1% ตามลำดับ ในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่บรรจุอัตรา ความหนาแน่นทั้ง 3 ระดับ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือที่บรรจุ 40 ล้านตัวมี ประสิทธิภาพสูงสุด (91.1%) รองลงมา ที่บรรจุ 60 ล้านตัว (87.8%) และที่บรรจุ 80 ล้านตัว (82.2%) ตามลำดับ

เมื่อเปรียบเทียบอัตราการลดลงของประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่ บรรจุที่อัตราต่างๆ ที่ 7°C เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าที่บรรจุ 40 ล้านตัว มีการลดลงของ ประสิทธิภาพ 2 ช่วงคือ

ช่วงที่ 1 หลังการเก็บ 3-4 เดือน ลดลงอยู่ในระดับ 94.4-96.3%

ช่วงที่ 2 หลังการเก็บ 5-6 เดือน ลดลงอยู่ในระดับ 91.1%

ทั้ง 2 ช่วงนี้ ประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ รองลงมาที่บรรจุ 60 ล้านตัว มีการลดลงของประสิทธิภาพ 3 ช่วง คือ

ช่วงที่ 1 หลังการเก็บ 3 เดือน ลดลงอยู่ในระดับ 94.4%

ช่วงที่ 2 หลังการเก็บ 4 เดือน ลดลงอยู่ในระดับ 91.1%

ช่วงที่ 3 หลังการเก็บ 5-6 เดือน ลดลงอยู่ในระดับ 87.8%

ทั้ง 3 ช่วงนี้ ประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนที่บรรจุ 80 ล้านตัว มีการลดลงของประสิทธิภาพ 4 ช่วง คือ หลังการเก็บเดือนที่ 3 ลดลงทุกๆ เดือน จนถึงเดือนที่ 6 อยู่ในระดับ 94.4 90.0 85.9 และ 82.2% ตามลำดับ การเปลี่ยนแปลง ความชื้นก็มีผลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่การบรรจุทุกอัตรา (Fig. 5, 6, 7 (B))

จะเห็นได้ว่า ปริมาณความหนาแน่นไส้เดือนฝอยที่บรรจุในภาชนะ สภาพต่างๆ ในภาชนะ มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอด และยังผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยเช่นกัน แต่ รุนแรงน้อยกว่า จะเห็นได้จาก การลดลงของประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยนั้นเป็นไปในอัตราที่ช้ากว่า (Table 1, 2) ทั้งนี้เพราะไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตนั้นยังคงอยู่ในสภาพอุณหภูมิที่เหมาะสมที่ 7°C

ที่ 25°C เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในสุตรดินผงที่ บรรจุอัตรา 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากัน พบว่าใน 3 สัปดาห์แรก (Table 3) ที่อัตราการบรรจุสูงสุด 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดต่ำสุดอยู่ระหว่าง 80.9-93.8% แตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งทั้ง 2 อัตราบรรจุนี้ไม่มีความแตกต่าง กันทางสถิติ คือมีอัตราการอยู่รอดที่ 87.5-97.8% และ 85.7-97.1% ตามลำดับ เมื่อเก็บนานขึ้น ช่วง 4-6 สัปดาห์ ผลกระทบจากอัตราความหนาแน่นในการบรรจุจะเห็นชัดขึ้น โดยที่บรรจุ 40

ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงสุด (65.7-83.2%) รองลงมาที่บรรจุ 60 ล้านตัว (60.4-80.3%) ที่บรรจุ 80 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดต่ำสุด (59.1-70.7%) โดยเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่บรรจุทั้ง 3 อัตรา แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับในแต่ละสัปดาห์ หากดูการเปลี่ยนแปลงการลดลงของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ที่บรรจุทั้ง 3 อัตรา เป็นไปในแบบเดียวกัน โดยลดลงทุกสัปดาห์ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-6 แต่ที่บรรจุ 40 ล้านตัวการลดลงของเปอร์เซ็นต์อยู่รอดจะเปลี่ยนแปลงลดน้อยที่สุด

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่บรรจุ 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากันที่ 25°C (Table 4) ในสัปดาห์แรก พบว่าที่บรรจุ 80 ล้านตัว ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยเริ่มลดลง (96.7%) ในอัตราที่สูงกว่าที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว (98.9%) แต่ยังไม่แตกต่างกันทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 2 ที่บรรจุ 60 ล้านตัว ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยเริ่มลดลงในอัตราที่สูงเช่นเดียวกับที่บรรจุ 80 ล้านตัว แต่ก็ยังไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างการบรรจุทั้ง 3 อัตรา โดยมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 95.6-97.8% จะเห็นว่าในช่วง 1-2 สัปดาห์ของการเก็บนั้น สภาพความไม่เหมาะสมในภาชนะมีผลกระทบต่ออยู่รอดมากกว่าด้านประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย (เปรียบเทียบระหว่าง Table 3 และ 4) เมื่อถึงสัปดาห์ที่ 3-6 จะเห็นความแตกต่างชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะที่บรรจุ 80 ล้านตัว ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงต่ำสุดอยู่ที่ 74.4-91.1% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 77.8-95.6% และ 75.8-94.4% ตามลำดับ

การเปลี่ยนแปลงของประสิทธิภาพไส้เดือนฝอยที่ลดลง ในการเก็บบรรจุทั้ง 3 อัตรานั้น คล้ายคลึงกัน (Table 4) คือประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยเริ่มลดลงตั้งแต่สัปดาห์แรกจนถึงสัปดาห์ที่ 6 และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างแต่ละสัปดาห์ โดยที่บรรจุอัตราความหนาแน่นสูงก็จะลดลงในอัตราสูง นอกจากนี้อุณหภูมิที่เก็บรักษาซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดแล้วยังมีผลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ที่อุณหภูมิ 25°C เป็นอุณหภูมิที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งมีถิ่นกำเนิดในเขตที่มีอุณหภูมิต่ำ (Grewal *et al.*, 1994) และในช่วงการเก็บ ไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวตลอดเวลา มีการเผาผลาญพลังงานในอัตราที่สูง ใช้ออกซิเจนในอัตราที่สูง ฉะนั้นปริมาณออกซิเจนในภาชนะที่บรรจุลดลงจึงส่งผลต่อการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยซึ่งลดลงเร็วกว่าเมื่อเทียบกับที่เก็บในอุณหภูมิต่ำที่ 7°C นอกจากนี้ที่ 25°C การสะสมของเสียในภาชนะบรรจุมีมากกว่าด้วย การอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยได้รับผลกระทบมากยิ่งขึ้น

ด้านการเปลี่ยนแปลงความชื้นในดินผสมที่เก็บไส้เดือนฝอยทั้ง 3 อัตราความหนาแน่น หลังจากการเก็บนาน 6 สัปดาห์ ที่ 25°C (Fig. 1(B)) อยู่ระหว่าง 34.9-35.7% สูญเสียความชื้นประมาณ 4.4-5.0% มีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการอยู่รอด (Fig. 2 3 4 (B)) และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย (Fig. 5 6 7 (B)) ทั้ง 3 ระดับอัตราความหนาแน่นที่บรรจุ อย่างมี

นัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าความชื้นมีอิทธิพลต่อการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับที่ระดับ 7°ซ

ที่ 30°ซ เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ที่เก็บรักษาในสูตรดินผงที่บรรจุอัตรา 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากัน พบว่า (Table 5) ที่บรรจุ 40 ล้านตัวมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงกว่าที่บรรจุทุกอัตรา ตลอดระยะเวลาการเก็บ 1-6 สัปดาห์ อยู่ระหว่าง 71.8-98.3% รองลงมา คือที่บรรจุ 60 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดระหว่าง 60.3-97.3% โดยในช่วง 2 สัปดาห์แรก ที่บรรจุ 60 ล้านตัว มีอัตราการอยู่รอดสูงระหว่าง 94.0-97.3% ไม่แตกต่างกันทางสถิติกับที่บรรจุ 40 ล้านตัว แต่จะเริ่มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงสัปดาห์ที่ 3-6 ส่วนที่บรรจุ 80 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงทุกๆ สัปดาห์ เริ่มจากสัปดาห์แรกเมื่ออัตราการอยู่รอดอยู่ที่ 94.4% ถึงสัปดาห์ที่ 6 การอยู่รอดลดลงอยู่ที่ 51.1% การลดลงทุกสัปดาห์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกัน รวมทั้งเมื่อเทียบกับที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว แสดงให้เห็นว่า สภาพที่ไม่เหมาะสมในการบรรจุไส้เดือนฝอยหนาแน่นมาก มีผลกระทบต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย หากการเปลี่ยนแปลงการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่บรรจุทั้ง 3 อัตรา ในช่วง 6 สัปดาห์ ที่ 30°ซ ที่บรรจุ 40 ล้านตัว มีการลดลงของอัตราการอยู่รอดแบ่งเป็น 4 ช่วง

ช่วงที่ 1 หลังการเก็บ 1-2 สัปดาห์ ลดลงอยู่ที่ระดับ 96.1-98.3%

ช่วงที่ 2 หลังการเก็บ 3-4 สัปดาห์ ลดลงอยู่ที่ระดับ 92.7-94.5%

ช่วงที่ 3 หลังการเก็บ 5 สัปดาห์ ลดลงอยู่ที่ระดับ 82.5%

ช่วงที่ 4 หลังการเก็บ 6 สัปดาห์ ลดลงอยู่ที่ระดับ 71.8%

ซึ่งการลดลงทั้ง 4 ช่วงนั้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกันกับการบรรจุที่ 60 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงทุกสัปดาห์และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกัน โดยตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยอยู่ที่ 97.3% ลดลงทุกสัปดาห์จนถึงสัปดาห์ที่ 6 อัตราการอยู่รอดเหลือ 60.3% เช่นเดียวกับที่บรรจุ 80 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดลดลงทุกสัปดาห์ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่สัปดาห์แรก อัตราการอยู่รอดที่ 94.4% ลดลงตามลำดับจนถึงสัปดาห์ที่ 6 เหลืออยู่ 51.0%

เมื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย ที่บรรจุ 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตรเท่ากันที่ 30°ซ ในช่วง 2 สัปดาห์แรก (Table 6) ที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ที่ 95.6-97.8% และ 95.6% ตามลำดับ มีแนวโน้มสูงกว่าที่บรรจุ 80 ล้านตัว (แม้จะยังไม่แตกต่างกันทางสถิติ) ซึ่งมีประสิทธิภาพอยู่ที่ 92.2-95.6% แสดงให้เห็นว่าอัตราการบรรจุที่หนาแน่นมาก เริ่มมีผลกระทบต่อการอยู่รอดก่อนที่จะมีผลต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย (เปรียบเทียบกับ Table 5) ในช่วงสัปดาห์ที่ 3-6 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ที่บรรจุ 80 ล้านตัว ลดลงต่ำสุดอยู่ระหว่าง 67.8-87.8% แตกต่าง

อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ซึ่งมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 74.4-92.2% และ 74.4-92.2% ตามลำดับ ถ้าเปรียบเทียบกับอัตราการอยู่รอดของการบรรจุที่ 40 และ 60 ล้านตัว ในช่วงระยะเวลาเดียวกันนั้นมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 5) แสดงว่าอัตราการลดลงของประสิทธิภาพและการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยไม่มีความสัมพันธ์กัน หากดูการลดลงของประสิทธิภาพไส้เดือนฝอย ที่บรรจุในอัตราต่างๆ เก็บที่ 30°C (Table 6) พบว่า ที่บรรจุ 80 ล้านตัว ประสิทธิภาพลดลงตามลำดับทุกสัปดาห์ ตั้งแต่ 1-6 สัปดาห์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกันตั้งแต่สัปดาห์ที่ 2-6 ส่วนที่บรรจุ 40 และ 60 ล้านตัว ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เริ่มลดลงและเห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในช่วงสัปดาห์ที่ 4 5 และ 6

หากจะพิจารณาถึงความสัมพันธ์ระหว่างความชื้นกับอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ที่บรรจุในสูตรดินผสมอัตราความหนาแน่น 3 ระดับที่ 30°C พบว่าหลังการเก็บครบ 6 สัปดาห์ ที่บรรจุทั้ง 3 ระดับ 40 60 และ 80 ล้านตัว ความชื้นลดลงอยู่ระหว่าง 34.4-34.8% สูญเสียความชื้นไประหว่าง 5.2-5.5% เช่นเดียวกับที่เก็บในอุณหภูมิ 7 และ 25°C จาก Fig. 2 3 และ 4 (C) ความชื้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่บรรจุทั้ง 3 อัตราอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) และจาก Fig. 5 6 และ 7 (C) เช่นกัน ความชื้นมีความสัมพันธ์โดยตรงกับประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($P \leq 0.01$) ที่บรรจุทั้ง 3 อัตรา ฉะนั้นอาจกล่าวโดยรวมว่า ความชื้นมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

สรุปผลการทดลอง

การศึกษ้อัตราความหนาแน่นที่เหมาะสม ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในสูตรดินผสมที่ อุณหภูมิ 3 ระดับ 7, 25 และ 30°C พบว่าอัตราความหนาแน่นที่เหมาะสมในการเก็บไส้เดือนฝอย ในสูตรดินผสมในภาชนะขนาด 311 ลบ.ซม. และยังคงมีอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพสูงสุด ในแต่ละอุณหภูมิที่เก็บรักษา คือ **ที่บรรจุ 40 ล้านตัว/กระป๋อง** โดยพบว่า

1. ที่ 7°C ระยะเวลาการเก็บ **6 เดือน** ไส้เดือนฝอยยังคงมีอัตราการอยู่รอดไม่ต่ำกว่า 90% และยังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) ซึ่งเป็นหนอนทดสอบ (200 ตัว/หนอน 1 ตัว ที่ 48 ชั่วโมง) ไม่ต่ำกว่า 90% จึงถือได้ว่าที่ 7°C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อ การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

2. ที่ 25 และ 30°C ระยะเวลาการเก็บ **6 สัปดาห์** ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด 65.7 และ 71.8% ตามลำดับ มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 77.8 และ 74.4% ตามลำดับ สูงสุด เมื่อเทียบกับที่บรรจุ 60 และ 80 ล้านตัว/กระป๋อง

3. ที่ 25 และ 30°C ระยะเวลาเก็บเพียง **3-4 สัปดาห์** ที่อัตราการอยู่รอดได้ไม่ต่ำกว่า 80% โดยประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่ต่ำกว่า 90% หากเพิ่มความหนาแน่นในการบรรจุเป็น 60 และ 80 ล้านตัว/กระป๋อง อัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของ ไส้เดือนฝอยจะลดลงในทุกระดับอุณหภูมิที่เก็บ

นอกจากนี้ยังพบว่าการเปลี่ยนแปลงความชื้นในสูตรดินที่เก็บไส้เดือนฝอยมีความสัมพันธ์ โดยตรงกับอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย โดยความชื้นเริ่มต้นที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในการทดลองนี้ คือ 40% เมื่อการเก็บนานขึ้น ความชื้นเริ่มลดลง มีผลกระทบต่อการอยู่รอดและประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง

Table 1 Survival percentage of infective juveniles (IJs) of *Steinernema carpocapsae* kept at three different densities in powder formulation, each stored in a sealed container at 7°C during 1-6 months.

Month	No. of nematode contained in a vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	98.0 a (a)	96.5 a (a)	96.7 a (a)
2 nd	96.7 a (a)	95.0 ab (a)	92.5 b (b)
3 rd	94.3 b (a)	93.3 b (a)	89.9 c (b)
4 th	92.8 b (a)	90.2 c (b)	84.6 d (c)
5 th	92.9 b (a)	85.2 d (b)	81.5 e (c)
6 th	90.0 c (a)	80.3 e (b)	75.7 f (c)
CV =	1.4%		

Table 2 Efficacy against wax moth (*Galleria mellonella*) of *Steinernema carpocapsae* infective juveniles(IJs) (1 larva/200 IJs, and died within 48 hours after infection) after different containing density rates (40x10⁶, 60x10⁶ and 80x10⁶ IJs/containers) stored in a sealed container at 7°C from 1-6 months.

Month	No. of nematode contained in vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)
2 nd	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)
3 rd	96.3 b (a)	94.4 b (a)	94.4 b (a)
4 th	94.4 b (a)	91.1 c (b)	90.0 c (b)
5 th	91.1 c (a)	87.8 d (b)	85.9 d (b)
6 th	91.1 c (a)	87.8 d (b)	82.2 e (c)
CV =	1.8%		

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.

Table 3 Survival percentage of infective juveniles (IJs) of *Steinernema carpocapsae* kept at three different densities in powder formulation, each stored in a sealed container at 25°C during 1-6 weeks.

Week	No. of nematode contained in vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	97.8 a (a)	97.1 a (a)	93.6 a (b)
2 nd	93.9 b (a)	92.6 b (a)	86.9 b (b)
3 rd	87.5 c (a)	85.7 c (a)	80.9 c (b)
4 th	83.2 d (a)	80.3 d (b)	70.7 d (c)
5 th	75.8 e (a)	72.2 e (b)	66.4 e (c)
6 th	65.7 f (a)	60.4 f (b)	59.1 f (b)
CV =	1.7%		

Table 4 Efficacy against wax moth (*Galleria mellonella*) of *Steinernema carpocapsae* infective juveniles(IJs) (1 larva/200 IJs, and died within 48 hours after infection) after different containing density rates (40x10⁶, 60x10⁶ and 80x10⁶ IJs/containers) stored in a sealed container at 25°C from 1-6 weeks.

Week	No. of nematode contained in vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	98.9 a (a)	98.9 a (a)	96.7 a (a)
2 nd	97.8 a (a)	95.6 b (a)	95.6 a (a)
3 rd	95.6 b (a)	94.4 b (a)	91.1 b (b)
4 th	91.1 c (a)	88.9 c (ab)	87.8 c (b)
5 th	85.6 d (a)	83.3 d (ab)	81.1 d (b)
6 th	77.8 e (a)	75.8 c (ab)	74.4 e (b)
CV =	2.0%		

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.

Table 5 Survival percentage of infective juveniles (IJs) of *Steinernema carpocapsae* kept at three different densities in powder formulation, each stored in a sealed container at 30°C during 1-6 weeks.

Week	No. of nematode contained in vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	98.3 a (a)	97.3 a (a)	94.4 a (b)
2 nd	96.1 a (a)	94.0 b (a)	84.0 b (b)
3 rd	94.5 b (a)	81.6 c (b)	75.0 c (c)
4 th	92.7 b (a)	69.7 d (b)	64.5 d (c)
5 th	82.5 c (a)	64.5 e (b)	54.3 e (c)
6 th	71.8 d (a)	60.3 f (b)	51.1 f (c)
CV =	1.9%		

Table 6 Efficacy against wax moth (*Galleria mellonella*) of *Steinernema carpocapsae* infective juveniles(IJs) (1 larva/200 IJs, and died within 48 hours after infection) after different containing density rates (40x10⁶, 60x10⁶ and 80x10⁶ IJs/containers) stored in a sealed container at 30°C from 1-6 weeks.

Week	No. of nematode contained in vessel (million/can)		
	40x10 ⁶	60x10 ⁶	80x10 ⁶
1 st	97.8 a (a)	95.6 a (a)	95.6 a (a)
2 nd	95.6 a (a)	95.6 a (a)	92.2 a (a)
3 rd	92.2 a (a)	92.2 a (a)	87.8 b (b)
4 th	86.7 b (a)	85.6 b (a)	81.1 c (b)
5 th	78.9 c (a)	78.9 c (a)	72.2 d (b)
6 th	74.4 d (a)	74.5 d (a)	67.8 e (b)
CV =	2.4%		

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.

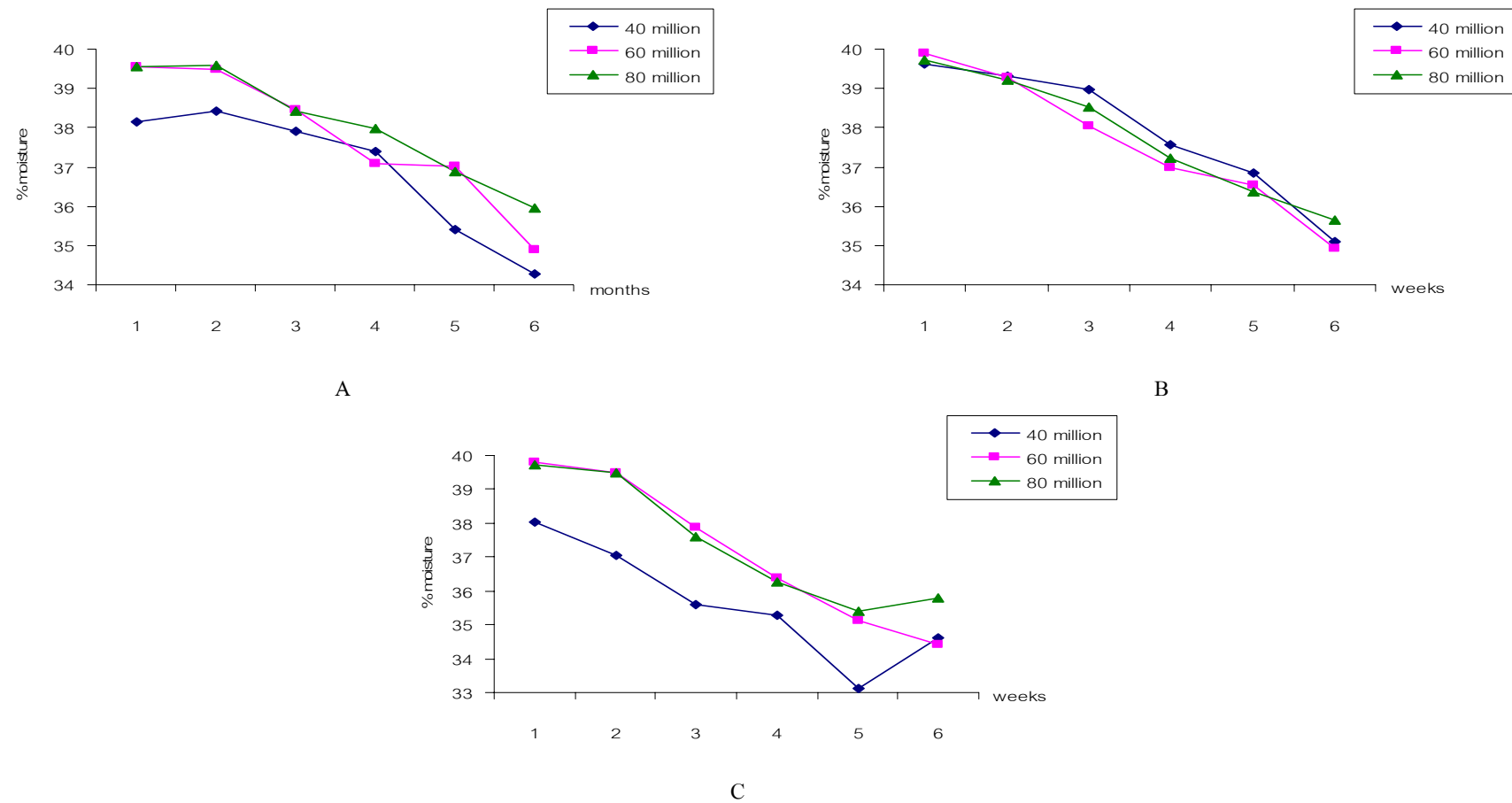


Figure 1 Variation of moisture contents measured in powder formulations containing each 40×10^6 , 60×10^6 and 80×10^6 infective juveniles of *Steinernema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.

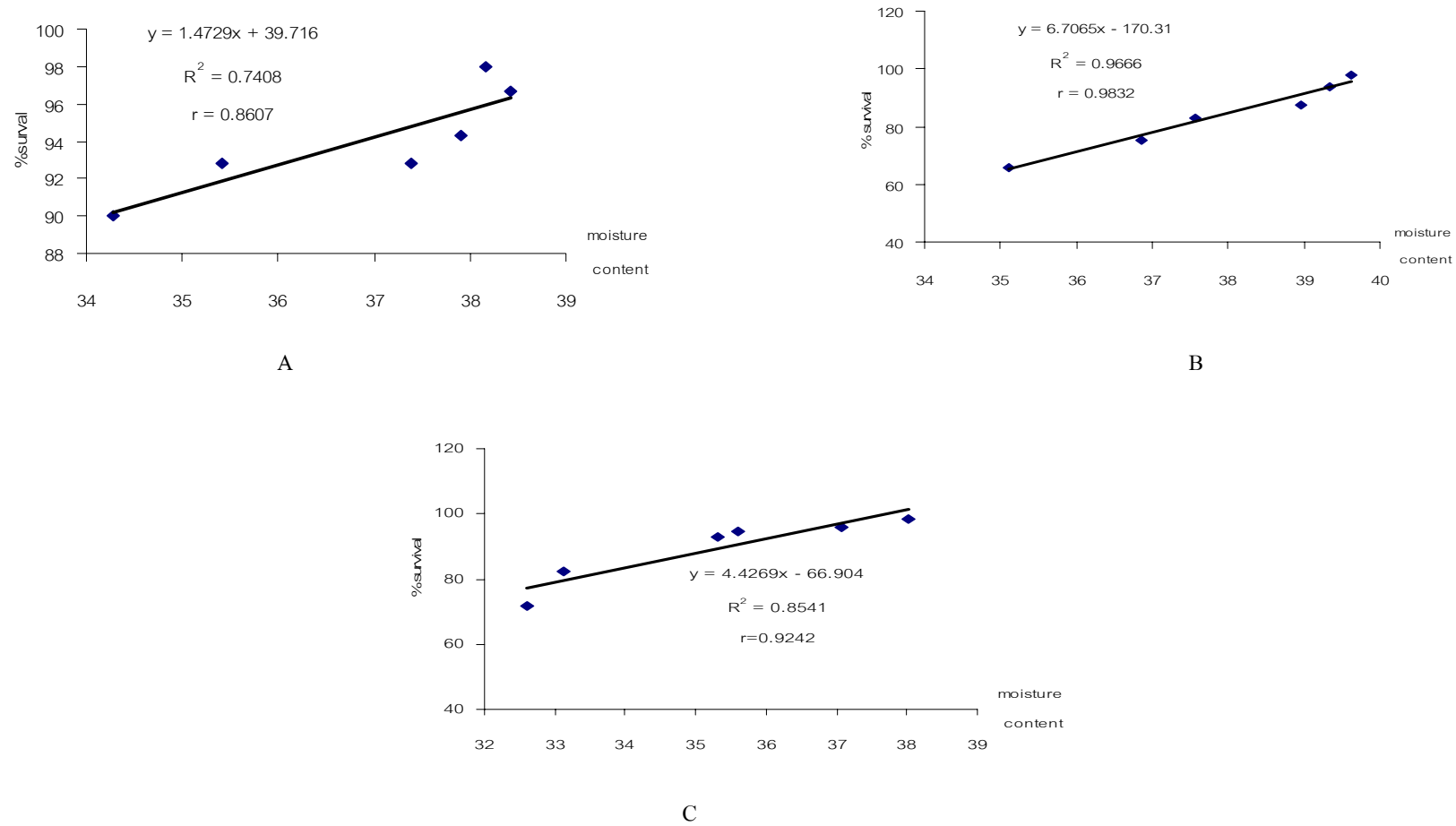


Figure 2 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on survival percentage of 40×10^6 infective juvenile of *Steinernema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.

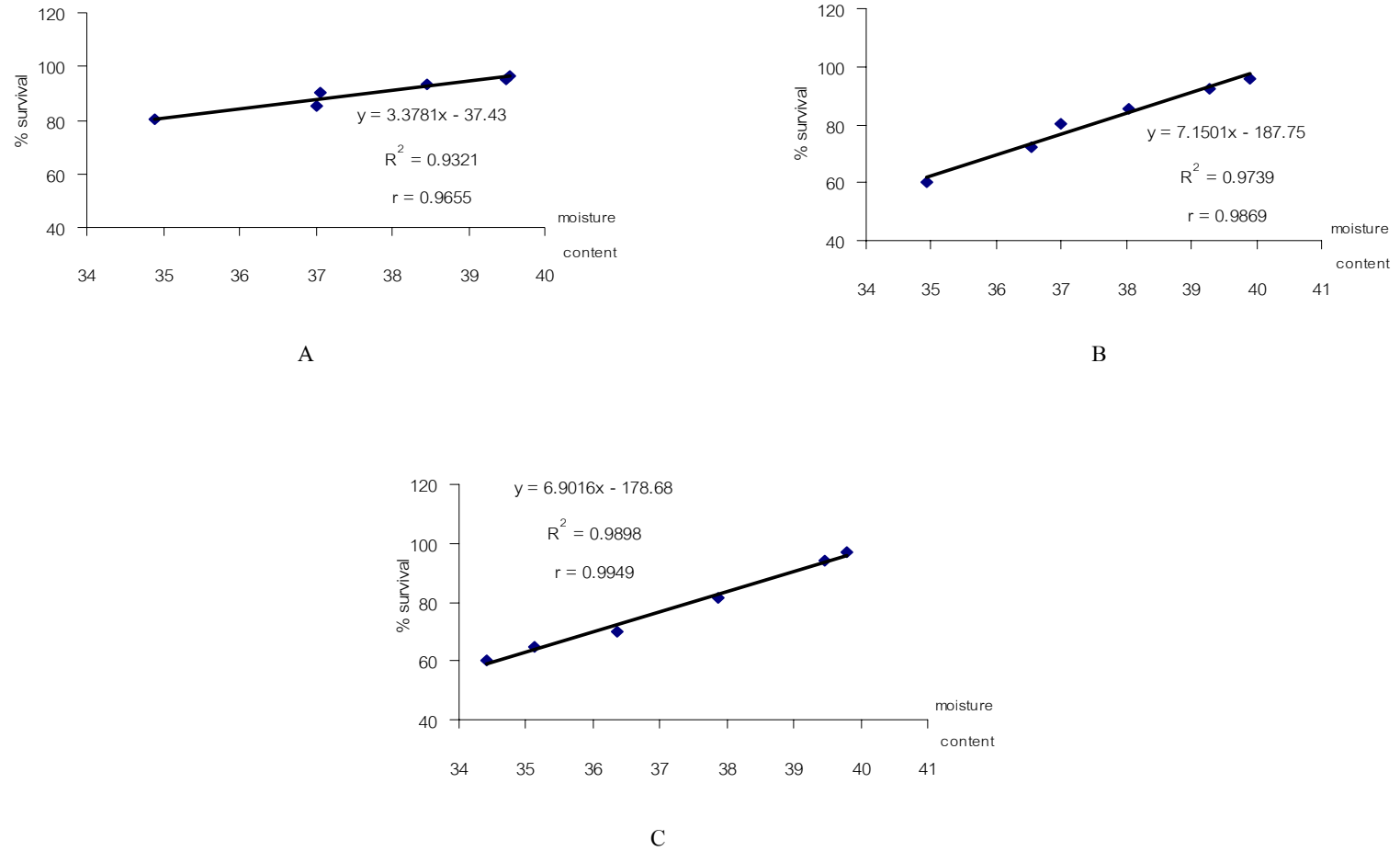


Figure 3 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on survival percentage of 60×10^6 infective juveniles *Steinerema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.

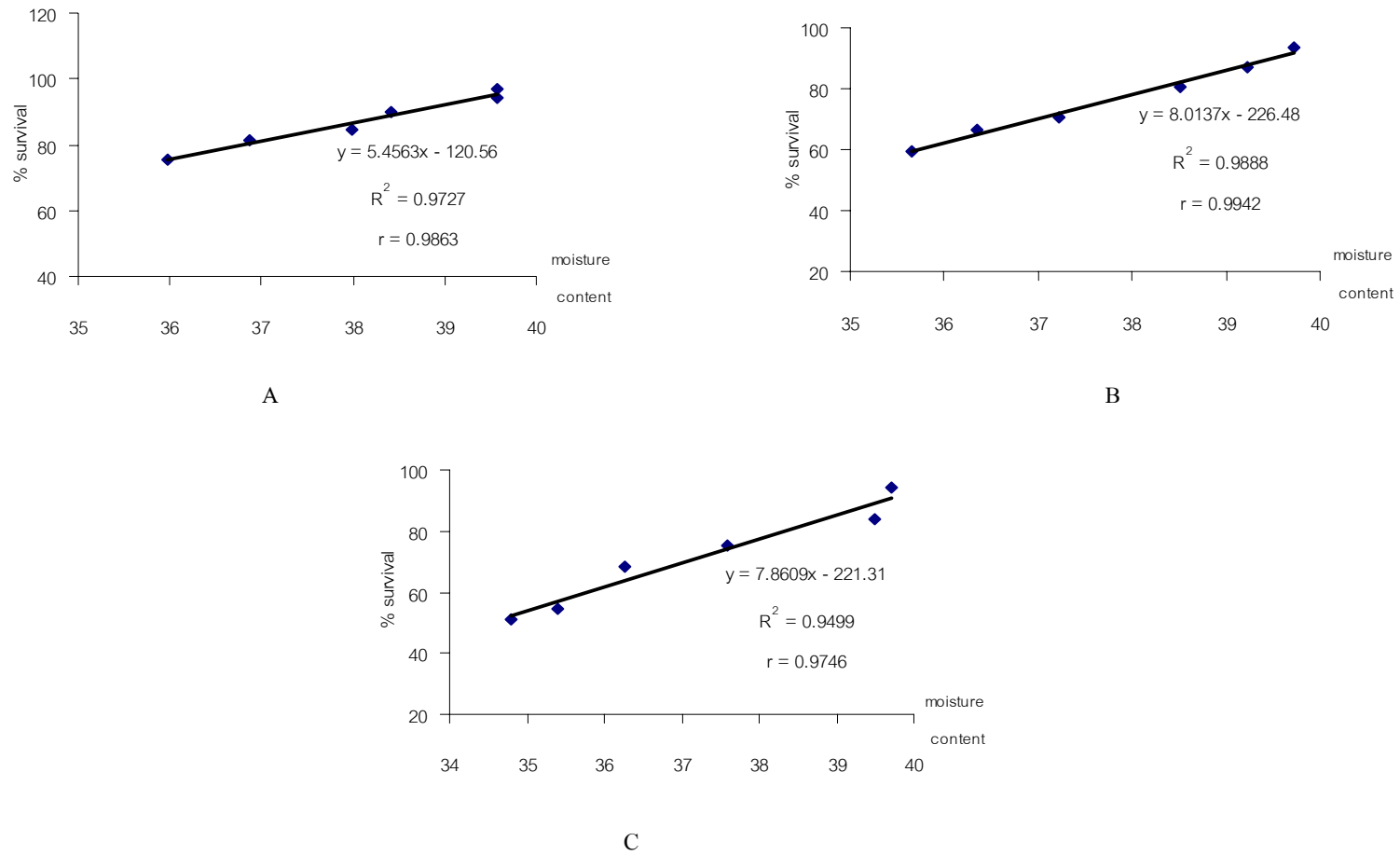
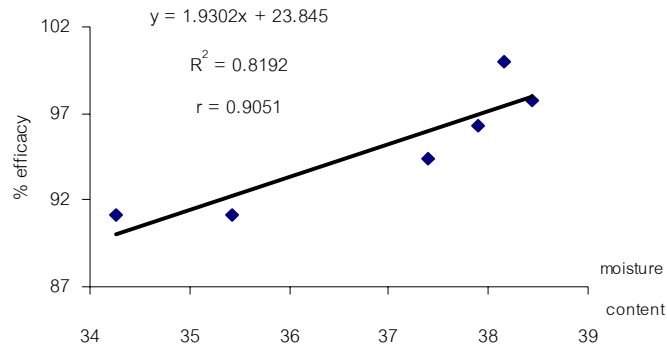
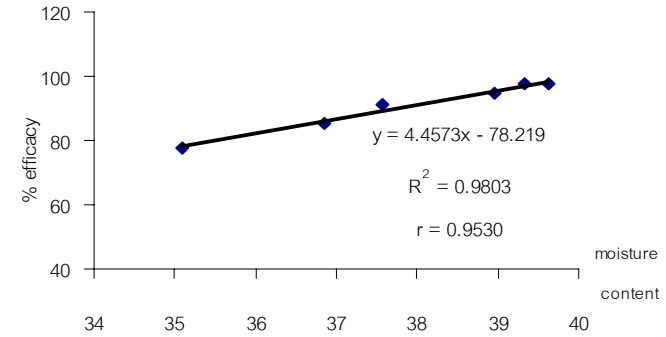


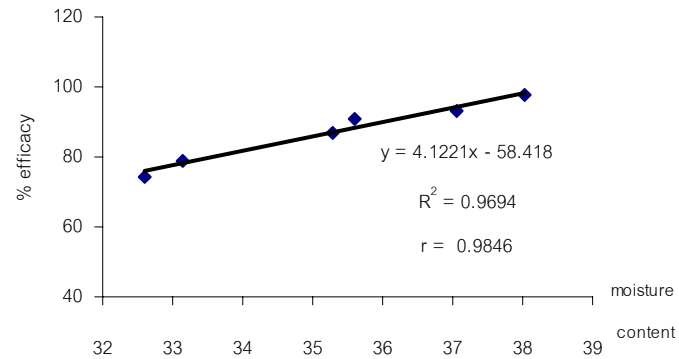
Figure 4 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on survival percentage of 80×10^6 infective juveniles *Steinerema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.



A

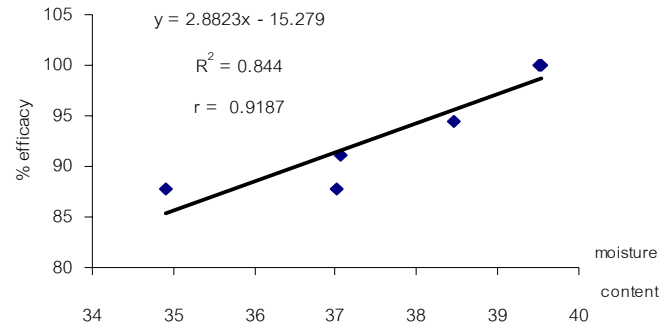


B

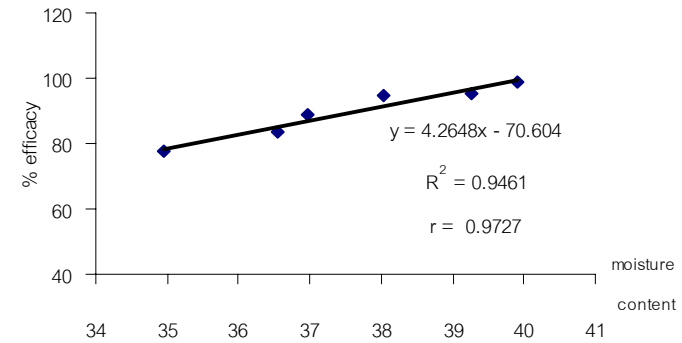


C

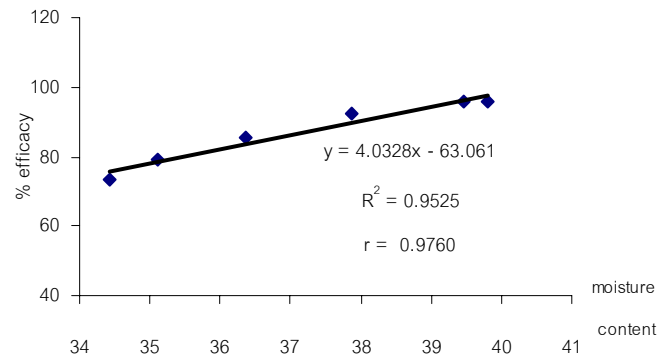
Figure 5 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on the efficacy of 40×10^6 infective juveniles *Steinernema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.



A



B



C

Figure 6 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on the efficacy of 60×10^6 infective juveniles *Steinernema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.

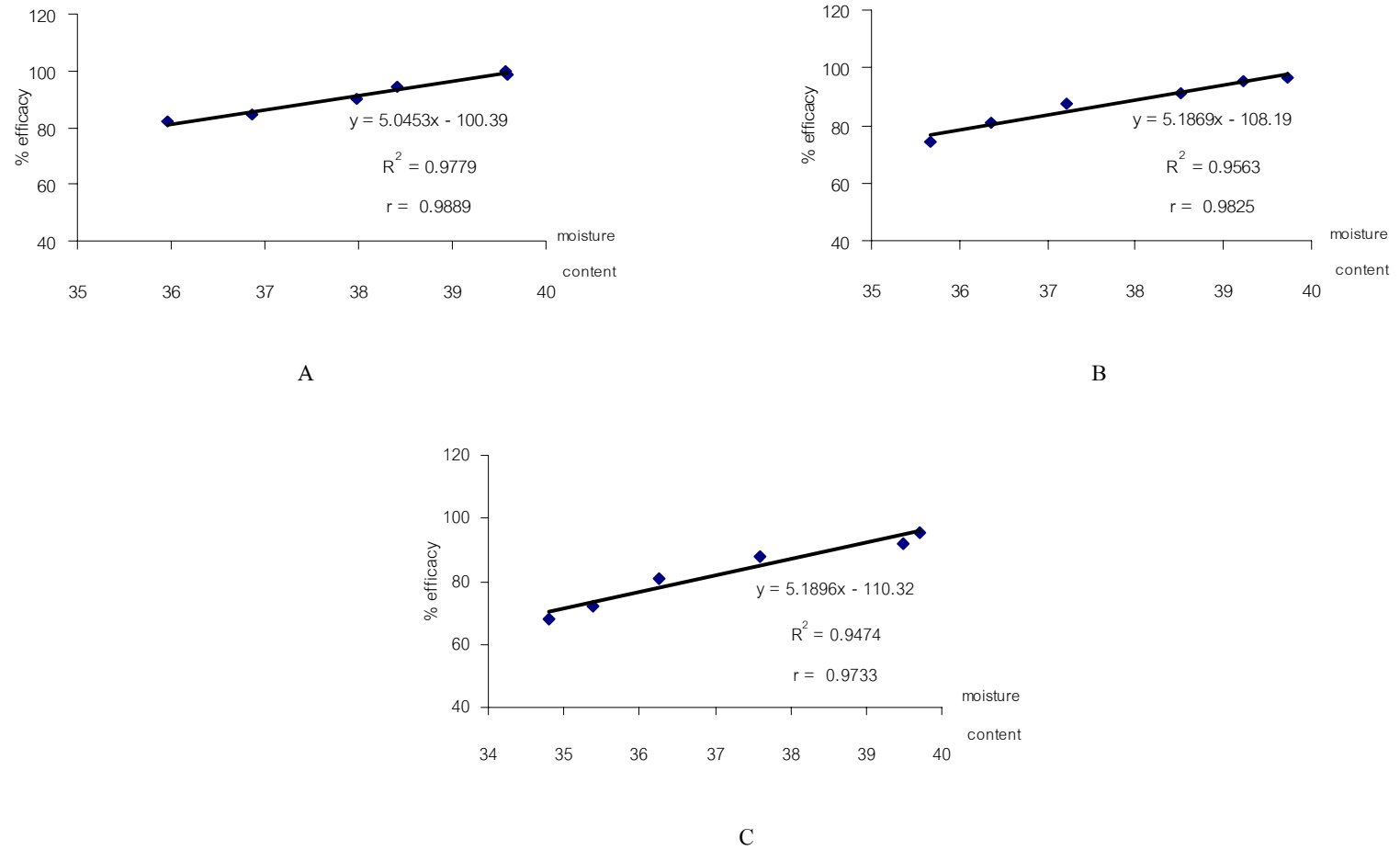


Figure 7 Effect of variation of moisture content measured in powder formulations on the efficacy of 80×10^6 infective juveniles *Steinerema carpocapsae* while stored in a sealed container at 7°C (A) for 6 months, at 25°C (B) and 30°C (C) for 6 weeks.

เอกสารอ้างอิง

- Grewal, P. S. and Georgis, R. 1998. Webber, Entomopathogenic Nematodes *In*: Hall, F. R. and Menn, J. (eds) Methods in Biotechnology Biopesticides: Use and Deliver. Humana Press, Totowa, New Jersey, pp. 271-299.
- Lindergren, J.E., Rij, R.E., Ross, S.R. and Fouse., D.C. 1986. Respiration rate of *Steinernema feltiae* infective juveniles at several constant temperatures. Journal of Nematology. 18:221-224.
- Molyneux, A.S. 1985. Survival of infective juveniles of *Heterorhabditis* spp. and *Steinernema* (= *Neoplectana*: Rhabditida) at various temperature and their subsequent infectivity of insects, Rev. Journal of Nematology. 8:165-170.
- Selvan, S., Gaugler, R. and Lewis, E.E. 1993. Biochemical energy reserves of entomopathogenic nematodes. Journal of Parasitology 79:167-172.

2.3 ศึกษาอัตราที่เหมาะสมของ Benzoic acid ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย

Steinernema carpocapsae ในสูตรดินผง

Study on the Optimum Concentration of Benzoic Acid in Powder Formulation

Maintaining Entomopathogenic Nematode, *Steinernema carpocapsae*

บทคัดย่อ

ศึกษาอัตราที่เหมาะสมของ Benzoic acid หรือสารกันบูด เพื่อยับยั้งจุลินทรีย์ ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่ผลิตได้ในสูตรดินผงบรรจุในกระป๋อง ทำการทดลองที่ห้องปฏิบัติการ กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ระหว่าง มกราคม 2547-ตุลาคม 2548 มี 3 การทดลองย่อยคือ ทำการทดลองที่ 7 25 และ 30 °ซ วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (6x4) 24 วิธีการ 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระป๋อง ปัจจัยที่ 1 อัตราการใส่สารกันบูด 4 ระดับ คือ 1.5 1 0.5 และไม่ได้ (control) ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บ 6 ระดับ ที่ 7°ซ คือ 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน และที่ 25°ซ และ 30°ซ เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ ผลการทดลองพบว่า ที่ 7°ซ การบรรจุไส้เดือนฝอยสูตรดินผงในกระป๋องซึ่งผสมสารกันบูดยับยั้งจุลินทรีย์ที่อัตรา 0.5 1 และ 1.5% เก็บนานเป็นเวลา 6 เดือน ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด 87.6 88.9 และ 88.5% ตามลำดับ ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ control ที่ไม่ได้ใส่สารกันบูด ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยต่ำสุด 85.2% แต่การเก็บนาน 3 เดือน ที่อุณหภูมิ 7°ซ พบว่าทุกวิธีการไม่ว่าจะใส่สารกันบูดหรือไม่ใส่ อัตราการอยู่รอดไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แสดงว่าที่อุณหภูมิ 7°ซ นั้นสามารถยับยั้งหรือชะลอการเจริญของจุลินทรีย์ได้ช่วงระยะหนึ่ง และยังพบว่า วิธีการใส่สารกันบูดที่อัตราสูงสุด 1.5% ในช่วง 2 เดือนแรกเก็บมีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย โดยอัตราการอยู่รอดจะลดลงต่ำกว่าวิธีการใส่สารกันบูด 1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่รอดหลังการเก็บรักษานานเป็นเวลา 6 เดือน ที่อัตราการใส่สารกันบูดทั้ง 3 อัตรา และไม่ได้ ยังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงสูง 98.9 100 97.8 และ 97.8% ตามลำดับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

ที่ 25°ซ ที่อุณหภูมิสูงขึ้น อายุการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยจะสั้นลง หลังการเก็บรักษานาน 6 สัปดาห์ วิธีการใส่สารกันบูดที่อัตรา 0.5 1 และ 1.5% มีอัตราการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยไม่แตกต่างกันทางสถิติ คือ 86.5 87.9 และ 86.2% ตามลำดับ แต่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการไม่ได้ใส่สารกันบูด (control) ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดต่ำสุด 68.1% แต่ในช่วงสัปดาห์แรกของการเก็บรักษา อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในทุกวิธีการเก็บรักษายังอยู่ในระดับสูง 90% ขึ้นไป รวมทั้ง

วิธีการไม่ใส่สารกันบูด แสดงว่าอุณหภูมิสูงขึ้นที่ 25°C สามารถเก็บไส้เดือนฝอยได้นาน 1 สัปดาห์ โดยไม่ต้องใส่สารกันบูด แต่พอ 2 สัปดาห์ขึ้นไป วิธีการไม่ใส่สารกันบูดเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอย จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการใส่สารกันบูดทุกอัตรา ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตหลังการเก็บที่ 25°C นาน 6 สัปดาห์ ที่อัตราการใส่สารกันบูด 0.5 1 และ 1.5% มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง 92.2 93.3 และ 94.4% ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่จะแตกต่างกับวิธีการไม่ใส่สารกันบูด ซึ่งมีประสิทธิภาพเพียง 89.1%

ที่ 30°C อุณหภูมิสูงมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยมาก เมื่อเก็บนาน 6 สัปดาห์ พบว่าทุกวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1.5 1 และ 0.5% รวมทั้งไม่ใส่สารกันบูด (control) มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอย แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในแต่ละวิธีการ โดยที่วิธีการใส่สารกันบูดอัตราสูงสุด 1.5% มีการอยู่รอดสูงสุด คือ 63.5% และรองลงไป คือ 58.2 56.5 และ 36.5% ตามลำดับ แต่ในช่วง 2-4 สัปดาห์ ของการเก็บที่อัตราใส่สารกันบูดสูงสุด 1.5% นั้น มีผลกระทบต่ไส้เดือนฝอย จากเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดจะต่ำกว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1 และ 0.5% ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในวิธีการใส่สารกันบูด 1.5% มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงสูงสุด 85.6% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากวิธีการใส่สารกันบูด 1 0.5 และ ไม่ใส่สารกันบูด ซึ่งมีประสิทธิภาพรองลงมา คือ 80 76.7 และ 71.1% ตามลำดับ

คำนำ

สารยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ มีความสำคัญมากในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย โดยเฉพาะ การเก็บในสูตรดินผง เนื่องจากกระบวนการทั้งหมดนั้น ตั้งแต่การเตรียมสูตรดินผง ภาชนะบรรจุ และการเตรียมไส้เดือนฝอย การบรรจุนั้นไม่ได้ดำเนินการภายใต้สภาพปลอดเชื้อ (Sterilization) ซึ่ง อาจเกิดการปนเปื้อนขึ้นได้ นอกจากนี้การเก็บไส้เดือนฝอยในสภาพที่มีความชื้นและอุณหภูมิที่ พอเหมาะเป็นระยะเวลานาน ก็เป็นการเพิ่มความเสี่ยงในการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ต่างๆมากขึ้น จากการทดลองที่ผ่านมา (การทดลองที่ 1 และ 2) ได้ใช้สาร 1-Naphthalenesulfonic acid (ราคา ประมาณ 13 บาท/กรัม) ในการเก็บรักษา มีประสิทธิภาพในการป้องกันการปนเปื้อนได้ดี และไม่มี ผลกระทบต่อชีวิตของไส้เดือนฝอย ข้อเสียคือมีราคาแพง ซึ่งทำให้ต้นทุนการผลิตเพิ่มขึ้น สาร Benzoic acid เป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย จนมีชื่อเรียกกันทั่วไปว่า “สารกันบูด” ซึ่งมี ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีในอุตสาหกรรมอาหาร มีราคาถูก (ประมาณ 20 สตางค์/ กรัม) อย่างไรก็ตาม ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* นั้นมีความทนทานต่อสารเคมีหลาย ชนิด และไม่ทนทานต่อสารเคมีบางชนิด (Kaya, 1985; Kaya and Burlando, 1989) ฉะนั้นก่อนที่จะ นำมาใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยชนิดนี้ จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบถึงผลกระทบของสารเคมีนี้ ต่อการมีชีวิตและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ตลอดจนการทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสม สำหรับการเก็บรักษาต่อไป

วิธีดำเนินการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องนับ (counter) เครื่องวัด pH (pH meter) ปิเปตแบบอัตโนมัติ (auto pipette) ชุดกวนแบบแท่งแม่เหล็ก (stirrer magnetic bar) เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer)
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ ปีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระจกตวงขนาดต่างๆ เข็มเขี่ย จานพลาสติก
3. ไล้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
4. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
5. ดินชนิด Attapulgate, Zeolite และสารกันบูด (Benzoic acid)
6. กระจ่อกพลาสติกทึบสีขาวขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. ปริมาตรการบรรจุ 311 ลบ.ซม.
7. อุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ ปีกเกอร์พลาสติกขนาด 3,000 มม. ถังพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว และ 4x6 นิ้ว กระจกนิตยาพลาสติกขนาด 10 มม. ถาดนับไล้เดือนฝอย

วิธีการทดลอง

แบบ factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (6x4) 3 ซ้ำ (ซ้ำละ 1 กระจ่อก) โดยทำการทดลองที่อุณหภูมิ 3 ระดับ 7 25 และ 30°ซ ดังนั้น

ปัจจัยที่ 1: อัตราการใส่สารกันบูด 4 ระดับ ในสูตรดินผสมที่เก็บรักษา ได้แก่ 0% (control), 0.5, 1.0 และ 1.5%

ปัจจัยที่ 2: ระยะเวลาการเก็บรักษา 6 ระดับ ที่ 7°ซ เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่ 25 และ 30°ซ เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์

วิธีการปฏิบัติการทดลอง

1. บดดิน Attapulgate และ Zeolite ให้เป็นผงละเอียดคล้ายแป้ง นำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100-120°ซ แล้วนำมาผสมกันในอัตราส่วน 2 : 1 โดยน้ำหนัก จะได้ดินผสมตามต้องการ
2. เตรียมไล้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) อัตรา 40 ล้านตัว ในน้ำ 40 มิลลิลิตร (สำหรับผสมกับดิน 1 ครั้ง)
3. เตรียมส่วนผสมต่างๆ จำนวน 100 กรัม/กระจ่อกโดยใส่สารกันบูดในอัตราต่างๆ ตามกรรมวิธีในปัจจัยที่ 1 คือ
 - สารกันบูด 0.5 กรัม + ดินผสม 59.5 กรัม + ไล้เดือนฝอย 40 ล้านตัว
 - สารกันบูด 1 กรัม + ดินผสม 59 กรัม + ไล้เดือนฝอย 40 ล้านตัว

- สารกันบูด 1.5 กรัม + ดินผสม 58.5 กรัม + ไข่เดือนฝอย 40 ล้านตัว

แต่ละวิธีการทำการปรับความชื้นอยู่ในระดับ 40%

นำส่วนผสมดังกล่าวในแต่ละวิธีการ ใส่ในถุงพลาสติก ผสมคลุกเคล้าให้ทั่วทั้งถุง แล้วนำส่วนผสมที่เข้ากันดีแล้ว ใส่ในกระป๋องพลาสติกทรงกระบอกกลม ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. มีปริมาตรบรรจุ 311 ลบ.ซม. ปิดฝาเกลียวให้แน่น วิธีการละ 3 ซ้ำ (3 กระป๋อง)

4. นำกระป๋องที่บรรจุส่วนผสมตามกรรมวิธีต่างๆ ดังกล่าวแล้ว ไปเก็บที่อุณหภูมิ 7 °C และ 30 °C ตามแผนการทดลองในปัจจัยที่ 2

5. ทำการตรวจนับไข่เดือนฝอยในแต่ละวิธีการ 3 ครั้งต่อ 1 ซ้ำ (กระป๋อง) โดยที่อุณหภูมิ 7 °C ตรวจนับเมื่อเก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 25 °C และ 30 °C เมื่อเก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ โดยปฏิบัติดังนี้

- เทส่วนผสมทั้งหมดออกจากกระป๋องใส่ในถุงพลาสติก คลุกผสมกันให้ทั่ว
- สุ่มตักส่วนผสมครั้งละ 5 กรัม นำไปวัดความชื้นด้วยเครื่อง moisture analyzer โดยตรง
- ทำการสุ่มตักจากส่วนผสม 10 กรัม ละลายในน้ำกลั่น 500 มล. กวนให้เข้ากัน นำไปวัด pH หลังจากนั้นแบ่งมาส่วนหนึ่ง เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตรา 1:100 เพื่อนำไปนับปริมาณของไข่เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่และที่ตาย

6. นำไข่เดือนฝอยไปทดสอบประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงกับหนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella*) วัย 5 โดยใช้อัตราไข่เดือนฝอย 200 ตัว/หนอน 10 ตัว ทำการทดสอบในงานพลาสติก ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม. มีฝาปิด ครอบคลุม 24 ซม. ตรวจนับปริมาณหนอนที่ตาย

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกปริมาณไข่เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่และที่ตาย
- บันทึกระดับ pH และความชื้น ในดินผสมของแต่ละวิธีการที่ทดลอง
- บันทึกเปอร์เซ็นต์ตายของหนอนเนื่องจากไข่เดือนฝอยในแต่ละวิธีการที่ทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรม IRRISTAT

ผลและวิจารณ์การทดลอง

ที่ 7^๑๕ (Table 1) ในช่วงเดือนที่ 1, 2 และ 3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงใส่สารกันบูด 1% มีแนวโน้มสูงสุด (94.3, 92.6 และ 90.6%) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับที่ใส่สารกันบูด 0.5% (93.3, 91.4 และ 90.4%) และไม่ใส่สารกันบูด (92.6, 91.3 และ 89.9%) ทั้งนี้เนื่องจากอุณหภูมิต่ำสามารถหยุดยั้งการปนเปื้อนได้ในช่วงระยะต้นของการเก็บ ซึ่งทำให้วิธีการไม่ใส่สารกันบูดยังมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูง ส่วนที่ใส่สารกันบูด 1.5% (อัตราสูงสุด) มีการอยู่รอดต่ำสุด (91.6, 90.5 และ 89.9%) โดยใน 2 เดือนแรกจะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับที่ใส่สารกันบูด 1% อาจเป็นไปได้ว่า ความเข้มข้นสูงของสารกันบูดมีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ในเดือนที่ 4 วิธีการที่ไม่ใส่สารกันบูดลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากเดือนที่ 2 มาอยู่ในระดับต่ำ 88.5% แสดงว่าอาจเริ่มมีการปนเปื้อนขึ้น ถึงแม้ว่าเก็บในอุณหภูมิต่ำก็ตาม เช่นเดียวกับที่ใส่สารกันบูดอัตราต่ำสุด (0.5%) ฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์อาจลดลง จึงมีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงมาอยู่ในระดับ 89.3% ใกล้เคียงกับที่ใส่สารกันบูดที่ 1.5% (89.9%) ซึ่งมีการลดลงของการอยู่รอดต่ำ เนื่องจากยังมีฤทธิ์การควบคุมการปนเปื้อนสูง ส่วนที่ใส่สารกันบูดในอัตรา 1% ยังคงมีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงสุด (91.1%) ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการอื่นๆ แสดงว่าฤทธิ์การควบคุมการปนเปื้อนยังสูงอยู่ เมื่อเก็บถึงระยะเดือนที่ 5 และ 6 วิธีการไม่ใส่สารกันบูด มีอัตราการรอดชีวิตลดลงมาอยู่ในระดับที่ต่ำสุด (86.8, 85.2%) และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการใส่สารกันบูดทั้ง 3 วิธีการ ฉะนั้นอุณหภูมิต่ำสามารถยับยั้งการปนเปื้อนได้ในระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น การปนเปื้อนมีมากขึ้นตามลำดับเมื่อเก็บนานขึ้น เนื่องจากไม่มีสารกันบูดแม้ว่าวิธีการใส่สารกันบูดทุกวิธีการจะไม่แตกต่างกันทางสถิติ แต่ที่ใส่สารกันบูดต่ำสุด 0.5% อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยมีแนวโน้มลดลงอยู่ในระดับต่ำ (89.3 และ 87.6%) เนื่องจากมีการปนเปื้อนมากขึ้น ส่วนที่อัตรา 1% นั้นอัตราการอยู่รอดลดลงในอัตราที่สูง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเก็บในช่วง 4 เดือนแรก มาอยู่ในระดับ 89.3% ในเดือนที่ 5 และ 88.9% ในเดือนที่ 6 มีค่าใกล้เคียงกับที่ใส่สารกันบูดอัตราสูงสุด (1.5%) ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 88.9 และ 88.4% ตามลำดับ ฉะนั้นถ้ามีการยืดเวลาการเก็บออกไป วิธีการใส่สารกันบูดอัตราสูงนั้นอาจมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงกว่าในวิธีการอื่นๆ เนื่องจากฤทธิ์ในการควบคุมการปนเปื้อนยังคงอยู่ได้ยาวนานกว่า ส่วนที่ใช้อัตรานั้นมันจะค่อยๆ เจือจางหายไปตามระยะเวลาการเก็บที่นานขึ้น

ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่อยู่รอดในแต่ละวิธีการ ทั้งที่ไม่ใส่สารกันบูด และใส่สารกันบูดทุกอัตรา พบว่า (Table 2) หลังการเก็บ 3 เดือน ไส้เดือนฝอยยังคงมีประสิทธิภาพอยู่ในระดับ 100% เท่ากัน ถึงแม้ว่าช่วงนี้สภาพการเก็บรักษามีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในทุกวิธีการทดลองลดลงก็ตาม (Table 1) แต่ไม่มีผลกระทบต่อ

ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตอยู่ ในเดือนที่ 4-5 ถึงแม้ว่าทั้ง 4 วิธีการ มีประสิทธิภาพไม่แตกต่างกันทางสถิติก็ตาม ที่ใส่สารกันบูด 1% มีแนวโน้มมีประสิทธิภาพสูงสุด (100%) ส่วนที่ใส่อัตรา 0.5% ฤทธิ์ในการควบคุมการปนเปื้อนน้อยลง ทำให้ประสิทธิภาพเริ่มลดลงอยู่ในระดับ 98.9% เช่นเดียวกับวิธีการไม่ใส่สารกันบูด มีประสิทธิภาพ 98.9 และ 97.8% (เนื่องจากเริ่มมีการปนเปื้อนเกิดขึ้น) ซึ่งมีค่าเท่ากับที่ใส่สารกันบูดในอัตราสูงสุด 1.5% การใส่สารกันบูดในอัตราสูงมีแนวโน้มส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในเดือนที่ 4, 5 และ 6 แต่ยังไม่แตกต่างทางสถิติกับที่อัตราอื่น ในเดือนที่ 6 ทุกวิธีการมีประสิทธิผลลดลง แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับในช่วง 5 เดือนแรก โดยที่ใส่สารกันบูด 1.0% แนวโน้มมีประสิทธิภาพสูงสุดเช่นเดิม (98.9%) รองลงมาได้แก่ 3 วิธีการที่เหลือยังมีประสิทธิภาพลดลงมากเท่ากันที่ 97.8% เช่นเดียวกันกับอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ถ้ายืดเวลาการเก็บรักษาต่อไปอีก ที่ใส่สารกันบูดอัตราสูงจะส่งผลในการควบคุมการปนเปื้อนได้ดีกว่า

การเปลี่ยนแปลงความชื้นในสูตรดินผงที่ใส่สารกันบูดอัตราต่างๆ พบว่าแต่ละเดือนในช่วงระยะเวลาการเก็บ 6 เดือน ที่ 7^๐ซ (Fig 10) เปอร์เซ็นต์ความชื้นของทุกวิธีการอยู่ระหว่าง 39.2 – 39.3% ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกัน และสูญเสียความชื้นประมาณ 0.7 – 0.8% ถือว่าต่ำมาก คงไม่มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย คุณสมบัติดินไม่เปลี่ยนแปลง มีการระบายอากาศที่ดี จึงไม่มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพ

การเปลี่ยนแปลง pH ในช่วงการเก็บนาน 6 เดือน ของทุกวิธีการ อยู่ระหว่าง 7.4 – 7.5 (Fig 7) ซึ่งไม่มีผลต่อไส้เดือนฝอย การใส่สารกันบูดในอัตราที่แตกต่างกันไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของ pH ในแต่ละวิธีการ

ที่ 25^๐ซ (Table 3) อุณหภูมิสูงทำให้อายุการเก็บรักษาลดลง จึงทำการตรวจผลการทดลองในช่วงระยะเวลา 6 สัปดาห์ ในสัปดาห์แรก เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในวิธีการที่ไม่ใส่สารกันบูด ลดลงมาอยู่ที่ระดับ 90.9% ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับวิธีการใส่สารกันบูดที่อัตรา 1% (90.9%) และ 1.5% (90.3%) ส่วนที่ใส่สารกันบูด 0.5% มีอัตราการอยู่รอด 93.6% สูงกว่าทั้ง 3 วิธีการดังกล่าวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่าในช่วงเริ่มต้นนั้นการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ในวิธีการไม่ใส่สารกันบูดยังมีน้อย เนื่องจากมีการอบดินให้แห้งในอุณหภูมิสูงก่อนนำมาทดลอง ซึ่งเป็นการทำลายจุลินทรีย์ได้ระดับหนึ่ง ส่วนวิธีการที่ใส่สารกันบูดในอัตราที่สูง (1 และ 1.5%) และที่อุณหภูมิสูงมีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยโดยตรง หลังจากสัปดาห์แรกถึงสัปดาห์ที่ 6 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยของวิธีการไม่ใส่สารกันบูด (0%) ลดลงในอัตราที่สูงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในทุกๆ สัปดาห์ จนถึงสัปดาห์ที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดลดต่ำมากอยู่ที่ (68.1%) แสดงว่าเมื่อเก็บนานกว่า 1 สัปดาห์ ในอุณหภูมิที่สูงและไม่ใส่สารกันบูดจะมีผลต่อการมีชีวิตอยู่รอดของไส้เดือนฝอยเป็นอย่างมาก เนื่องจากในอุณหภูมิสูงทำให้จุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในช่วงการเตรียมการทดลองนั้นเจริญขยายพันธุ์อย่างรวดเร็ว ทำให้ไส้เดือนฝอยไม่สามารถดำรงชีวิต

อยู่ได้ ต่างกับวิธีการที่ใส่สารกันบูดทุกอัตรา ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ในทุกช่วงเวลาการเก็บรักษา ในสัปดาห์ที่ 2 สภาพการเก็บในวิธีการที่ใส่สารกันบูดเช่นเดียวกันกับในสัปดาห์แรก โดยการใช้สารกันบูด 0.5% ยังมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด (29.4%) สูงกว่าที่ระดับการใส่สารกันบูดที่เข้มข้นกว่า คือ 1% (90.1%) และ 1.5% (89%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าที่ใส่สารกันบูดอัตราเข้มข้นจะเห็นผลดีต่อเมื่อเก็บนานขึ้น โดยจะเห็นว่าในสัปดาห์ที่ 3 วิธีการใส่สารกันบูดอัตรา 0.5% การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลงมาอยู่ในระดับ 89.1% ใกล้เคียงและไม่แตกต่างทางสถิติกับที่อัตรา 1% และ 1.5% ซึ่งมีอัตราการอยู่รอด 89 และ 88.8% ตามลำดับ แสดงว่าความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารกันบูดอัตรา 0.5 % เริ่มน้อยลง และในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 อัตราการอยู่รอดชีวิตของวิธีการที่ใส่สารกันบูดอัตรา 1% (89.5, 88.9%) มีแนวโน้มสูงกว่าที่อัตรา 0.5% (89, 87.4%) แต่ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกัน อาจกล่าวได้ว่าฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของวิธีการใส่สารกันบูดในอัตราที่ต่ำเสื่อมสลายเร็วกว่า ส่วนการใช้อัตราที่สูงถึง 1.5% ในช่วงเดียวกัน มีอัตราการอยู่รอดที่ระดับ 87.4 และ 86.4% ตามลำดับ ต่ำกว่าที่อัตรา 1% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นสูงอัตรา 1.5% ยังมีผลกระทบต่อเนื่องต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยนานกว่าที่อัตราต่ำกว่า (1%) โดยที่สัปดาห์สุดท้าย (ที่ 6) อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่ใส่สารกันบูด อัตราสูงสุด (1.5%) ลดลงในอัตราที่ต่ำลงมาอยู่ที่ระดับ 86.2% ใกล้เคียงกับที่อัตรา 1% (87.9%) ส่วนที่เก็บในอัตรา 0.5% (86.5%) มีแนวโน้มลดต่ำลงอย่างไรก็ตามทุกวิธีการยังไม่มี ความแตกต่างทางสถิติ อาจกล่าวได้ว่า การใส่สารกันบูดในความเข้มข้นต่ำ ฤทธิ์ในการควบคุมการปนเปื้อนจะสั้นกว่าการใช้ในอัตราที่สูงกว่า คาดว่าถ้าเก็บนานกว่า 6 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดจะเป็นไปในทางสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราความเข้มข้นของสารกันบูดที่ใช้ หรือถ้าเก็บในอุณหภูมิทดลองที่สูงกว่านี้

ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่อยู่รอดในแต่ละวิธีการ ทั้งที่ใส่สารกันบูดและไม่ใส่ ที่ 25°C พบว่า (Table 4) ในช่วง 1-2 สัปดาห์แรกของการเก็บทุกวิธีการ ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยไม่แตกต่างทางสถิติ โดยที่ใส่สารกันบูด 0.5 และ 1% ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพ 100% มีแนวโน้มสูงกว่าวิธีการไม่ใส่สารกันบูด ซึ่งมีประสิทธิภาพ 98.9% แสดงว่าเริ่มมีการปนเปื้อนในวิธีการไม่ใส่สารกันบูด แต่ผลกระทบยังมีน้อยอยู่ ส่วนที่ใส่สารกันบูดอัตรา 1.5% มีประสิทธิภาพ 100% ในสัปดาห์แรก และลดลงอยู่ในระดับ 98.9% ในสัปดาห์ที่ 2 ซึ่งอาจเนื่องมาจากมีความเข้มข้นสูง ซึ่งมีผลกระทบต่อชีวิตของไส้เดือนฝอย (ต่างกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยได้รับผลกระทบตั้งแต่สัปดาห์แรกของการเก็บ) ในสัปดาห์ที่ 3-4 ที่ไม่ใส่สารกันบูด ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงในอัตราที่สูงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากช่วง 2 สัปดาห์แรกของการเก็บ ลงมาอยู่ในระดับ 95.6 และ 94.4% ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่าวิธีการใส่สารกันบูดทุกอัตราอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน จะเห็นว่าเมื่อเก็บนานขึ้นในอุณหภูมิสูง การไม่ใส่สารกันบูด ผลกระทบที่เกิดจากการปนเปื้อนนั่นเพิ่มมากขึ้น ส่วนวิธีการใส่สารกันบูดทุก

อัตราไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกัน แต่ที่อัตรา 1% มีแนวโน้มมีประสิทธิภาพสูงสุด (100 และ 98.9%) และมีแนวโน้มในการยับยั้งจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด ส่วนที่ 0.5% (98.9 และ 97.8%) ซึ่งมีความเข้มข้นน้อยกว่า ฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์นั้นอาจเจือจางลง ทำให้การปนเปื้อนเพิ่มขึ้น วิธีการใส่สารกันบูด 1.5 % มีประสิทธิภาพลดลงอยู่ในระดับ 97.8 และ 97.8% ซึ่งต่ำกว่าที่ระดับ 1% เช่นกัน แสดงว่าความเข้มข้นสูงและมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย

การเปลี่ยนแปลงความชื้นในสูตรดินผงทุกวิธีที่ใส่สารกันบูดและไม่ใส่ในช่วงระยะเวลาการเก็บ 6 เดือนที่ 25°C พบว่า (Fig 11) ในเดือนที่ 6 ทุกวิธีการมีความชื้นอยู่ระหว่าง 39.2 – 39.3% โดยสูญเสียความชื้นในช่วงการเก็บประมาณ 0.69 – 0.97% (เช่นเดียวกับที่ 7°C) ซึ่งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ส่วน pH ของทุกวิธีการมีการเปลี่ยนแปลงไม่แตกต่างกันในช่วงการเก็บ (Fig 8) โดยในช่วงสัปดาห์สุดท้ายมีอัตราการเพิ่มสูงสุดอยู่ในระดับ 7.6 – 7.8 อาจเกิดจากการเพิ่มสะสมของเสียที่ไส้เดือนฝอยถ่ายออกมา

ที่ 30°C (Table 5) เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในสูตรดินผงที่ไม่ใส่สารกันบูดมีอัตราการลดลงสูงมาก จากสัปดาห์แรกซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 87.7% ลดลงทุกๆ สัปดาห์ แต่ละสัปดาห์มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ถึงสัปดาห์ที่ 6 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับต่ำที่ 36.5% แสดงว่า อุณหภูมิสูงนอกจากทำให้การปนเปื้อนรุนแรงมากกว่าในระดับอุณหภูมิต่ำที่ 7°C และ 25°C แล้ว ยังมีส่วนต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยโดยตรงด้วย ส่วนวิธีการใส่สารกันบูดทุกอัตรา มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงกว่าวิธีการไม่ใส่สารกันบูดในทุกช่วงระยะเวลาการเก็บรักษา ฉะนั้นการใส่สารกันบูดมีผลต่อการยับยั้งจุลินทรีย์ได้อย่างมีประสิทธิภาพเมื่อเก็บในระดับอุณหภูมิสูง ส่วนการใส่สารกันบูดในอัตราต่ำ (0.5%) ในสัปดาห์แรก และที่ 2 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่ระดับ 90.8 และ 89.8% ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่อัตรา 1% (89.5, 89.2%) และที่อัตรา 1.5% (88.5 และ 86.7%) โดยเฉพาะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับอัตรา 1.5% แสดงว่าการใส่สารกันบูดในอัตราที่สูงมีผลต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในระดับอุณหภูมิอื่น ในช่วงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 วิธีการใส่สารกันบูดอัตรา 1% มีการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย 88.7 และ 87% ตามลำดับ มีแนวโน้มสูงกว่าที่อัตรา 0.5% (88.1, 86.3%) แต่ไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่างกัน จึงอาจแสดงว่าการใส่สารกันบูดอัตราต่ำ ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลงเร็วกว่า ส่วนการใช้ในอัตราสูงสุด 1.5% ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 83.9 และ 80.6% ตามลำดับซึ่งยังมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยต่ำกว่าที่อัตรา 0.5 และ 1% อย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าความเข้มข้นที่สูงยังมีผลกระทบต่อการใช้ชีวิตของไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับการทดลองที่ระดับอุณหภูมิอื่น ในสัปดาห์ที่ 5 การทดลองมีผลตรงกันข้าม วิธีการใส่สารกันบูดในอัตราสูงสุด 1.5% มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด (73.8%) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับวิธีการใช้ ในอัตราที่ต่ำกว่า คือ 0.5% (70.8 %) และ 1% (71.1%) แสดงว่าการใช้อัตราต่ำเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานความเข้มข้นค่อยๆ เจือจางลง ทำให้ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง จึงมีผล

ต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอย จะเห็นชัดเจนขึ้นในสัปดาห์ที่ 6 โดยเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับอัตราการใช้สารกันบูด โดยที่อัตรา 1.5 1 และ 0.5% มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 63.5, 58.2 และ 56.3% ตามลำดับ และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกัน เนื่องจากการเก็บในอุณหภูมิสูงนั้นสารกันบูดเสื่อมประสิทธิภาพเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับที่เก็บที่ 7°C และ 25°C จะเห็นว่าที่ระดับ 30°C สารกันบูดเสื่อมประสิทธิภาพเร็วที่สุด และมีผลต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยโดยตรงด้วย

ส่วนประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย (Table 6) ที่เก็บในทุกวิธีการที่ 30°C ในสัปดาห์แรก ไม่แตกต่างทางสถิติ อย่างไรก็ตามวิธีการไม่ใส่สารกันบูด และใส่สารกันบูดที่อัตราสูง 1.5% มีประสิทธิภาพ 96.7 และ 98.9% ตามลำดับ มีแนวโน้มต่ำกว่าวิธีการที่ใส่สารกันบูดที่อัตรา 0.5 และ 1% ซึ่งมีประสิทธิภาพ 100% แสดงว่าการปนเปื้อนเริ่มมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในวิธีการไม่ใส่สารกันบูดในสัปดาห์แรกแต่ยังไม่มากนัก ส่วนการใส่สารกันบูดที่ระดับความเข้มข้นสูง (1.5%) นั้นอาจมีผลต่อความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยโดยตรง ในสัปดาห์ที่ 2 วิธีการไม่ใส่สารกันบูด ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงมาอยู่ที่ระดับ 92.2% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสัปดาห์แรก และวิธีการใส่สารกันบูดทุกอัตราอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าที่อุณหภูมิสูง (30°C) การปนเปื้อนเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วจนมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ถ้าไม่ใส่สารกันบูด ส่วนวิธีการใส่สารกันบูดทุกวิธีการไม่แตกต่างทางสถิติ แต่อย่างไรก็ตามในวิธีการใส่สารกันบูด 0.5% ประสิทธิภาพลดลงมาในอัตราที่สูงมาอยู่ในระดับ 96.7% มีแนวโน้มต่ำกว่าวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1% (98.9%) จะเห็นว่าที่อุณหภูมิสูงการใช้สารกันบูดอัตราต่ำ (0.5%) ประสิทธิภาพในการยับยั้งจุลินทรีย์จะลดลงเร็ว จึงมีผลต่อไส้เดือนฝอยมากกว่าวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1.5% ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพ 97.8% ต่ำกว่าที่ระดับ 1% เช่นกัน แสดงว่าสารกันบูดความเข้มข้นสูงมีผลต่อเนื่อง ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 วิธีการใส่สารกันบูด 1 และ 1.5% ประสิทธิภาพอยู่ในระดับ 96.7 และ 94.4% เท่ากัน แสดงว่าความเข้มข้นของสารกันบูดที่อัตรา 1% เจือจางลง ความสามารถในการยับยั้งจุลินทรีย์ลดลง จึงมีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยมากกว่าในวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1.5% ส่วนวิธีการที่ไม่ใส่สารกันบูด (90 และ 84.5%) และใส่สารกันบูด 0.5% (93.3 และ 87.8%) ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (ยกเว้นในเดือนที่ 3 ของอัตรา 0.5%) เนื่องจากการปนเปื้อนเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่อง ในสัปดาห์ที่ 5 ที่ใส่สารกันบูดอัตรา 1% ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงอย่างต่อเนื่อง เพราะฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์เจือจางลงตาม ทำให้ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยลดลงอยู่ในระดับ 87.8% เริ่มต่ำกว่าในวิธีการที่มีสารกันบูด 1.5% (91.1%) อย่างไรก็ตามยังสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากวิธีการที่ใส่สารกันบูด 0.5% (81.1%) ซึ่งลดลงอย่างต่อเนื่องเช่นกัน ส่วนไม่ใส่สารกันบูดมีประสิทธิภาพต่ำสุด (77.8%) เมื่อระยะเวลาการเก็บนานขึ้นอีก 1 สัปดาห์ คือสัปดาห์ที่ 6 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในวิธีการที่ใส่สารกันบูด 1.5% (85.5%) สูงกว่าในวิธีการใส่สารกันบูด 1% (80%) วิธีการที่ใส่

สารกันบูด 0.5% (76.7%) และไม่ได้ใส่สารกันบูด (71.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เหตุผลเช่นเดียวกับที่กล่าวมาแล้วในสัปดาห์ที่ 5 ฉะนั้นจะเห็นได้ว่าการเก็บรักษาโดยใช้สารกันบูดเพื่อยับยั้งการปนเปื้อนของจุลินทรีย์นั้น การใช้สารกันบูดในอัตราที่สูง (1.5%) อาจมีผลต่อไส้เดือนฝอยในช่วงแรกของการเก็บ แต่จะให้ผลดีกว่าเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้นที่อุณหภูมิสูง (เช่นเดียวกับอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย)

การเปลี่ยนแปลงความชื้นของสูตรดินผงที่ใช้เก็บรักษาของทุกวิธีการ (Fig 12) ตลอดอายุการเก็บ (6 เดือน) มีค่าใกล้เคียงกัน ในเดือนสุดท้ายมีค่าอยู่ระหว่าง 39.2 – 39.3 สูญเสียความชื้นประมาณ 0.75 – 0.8% ซึ่งไม่มีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ส่วน pH ของทุกวิธีการมีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกัน (Fig 9) เช่นเดียวกับที่ระดับอุณหภูมิ 25°C ในเดือนสุดท้ายอัตราการเพิ่มของ pH สูงสุดอยู่ระหว่าง 7.6 – 7.8 เหตุผลเช่นเดียวกันกับที่ระดับ 25°C

สรุปผลการทดลอง

การทดลองหาอัตราที่เหมาะสมของสาร Benzoic acid หรือสารกันบูด เพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่ผลิตได้และเก็บในรูปผงดิน โดยไม่มีผลกระทบต่อการอยู่รอด และประสิทธิภาพในการทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยซึ่งสรุปได้ว่า

ที่ 7°ซ ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* พบว่าการเก็บนาน 6 เดือน ที่ใช้สารกันบูดอัตรา 1% มีแนวโน้มเหมาะสมที่สุด มีอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพเท่ากับ 88.9% และ 100% ตามลำดับ ที่ใช้สารกันบูดอัตราสูง 1.5% มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอยโดยในช่วง 2 เดือนแรก อัตราการอยู่รอดต่ำกว่าที่ใช้สารกันบูด 1% ที่ไม่ใส่สารกันบูดสามารถเก็บไส้เดือนฝอยได้นาน 3 เดือน โดยมีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยไม่ต่ำกว่า 90%

ที่ 25°ซ อุณหภูมิสูงทำให้อายุการเก็บสั้นลง เมื่อเก็บนาน 6 สัปดาห์ วิธีการที่ใส่สารกันบูด 1% พบแนวโน้มไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอดได้สูงสุด 87.9% และมีประสิทธิภาพ 93.3% ที่ไม่ใส่สารกันบูด สามารถเก็บรักษาไส้เดือนฝอยได้นาน 1 สัปดาห์ โดยมีอัตราการรอดชีวิต 90.9% แต่ในช่วง 2 สัปดาห์แรกที่ใส่สารกันบูดอัตราสูง 1 และ 1.5% นั้น อาจมีผลต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย โดยจะมีอัตราการอยู่รอดต่ำกว่าที่ใช้สารกันบูด 0.5% (ซึ่งมีอัตราการอยู่รอดสูง 92.4%) ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยนั้นเมื่อเก็บครบ 6 สัปดาห์ ที่อัตราใส่สารกันบูด 1.5% ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยมีแนวโน้มสูงสุด 94.4%

ที่ 30°ซ อุณหภูมิยิ่งสูงยิ่งมีผลต่อไส้เดือนฝอยมากขึ้น เมื่อเก็บครบ 6 สัปดาห์ วิธีการที่ใส่สารกันบูดอัตราสูง 1.5% ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพสูงสุด 63.5 และ 85.6% ตามลำดับ แต่ที่อุณหภูมิ 30°ซ นี้ ถ้าเก็บช่วงไม่เกิน 4 สัปดาห์ อัตราการใช้สารกันบูดเพียง 0.5 และ 1% จะมีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยสูงกว่าที่ใช้สารกันบูด 1.5% โดยในสัปดาห์ที่ 4 การใช้สารกันบูด 1% ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพสูงสุดคือ 87% และ 94.4% ตามลำดับ แสดงว่าที่อุณหภูมิสูงการใช้สารกันบูดในอัตราสูงจะมีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในการเก็บช่วงแรก

Table 1 Survival percentage of the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 weeks at 7°C.

% Benzoic acid	% Survival of the entomopathogenic nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 months)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	92.6 ab (a)	91.3 ab (a)	89.9 a (b)	88.5 b (bc)	86.8 b (c)	85.2 b (c)
0.5	93.2 ab (a)	91.4 ab(ab)	90.4 a (b)	89.3 b (bc)	89.3 a (bc)	87.6 a (c)
1.0	94.3 a (a)	92.6 a (ab)	90.6 a (b)	91.1 a (b)	89.3 a (c)	88.9 a (c)
1.5	91.6 b (a)	90.5 b (ab)	89.9 a (b)	89.0 b (bc)	88.9 a (bc)	88.4 a (c)
CV = 1.2 %						

Table 2 Mortality percentage of *G. mellonella* larvae caused by the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 months at 7°C.

% Benzoic acid	% Larval mortality of <i>G. mellonella</i> caused by nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 months)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)	97.8 a (a)	97.8 a (a)
0.5	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)	98.9 a (a)	97.8 a (a)
1.0	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)
1.5	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)	97.8 a (a)	97.8 a (a)
CV = 1.6 %						

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

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

Table 3 Survival percentage of the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 weeks at 25°C.

% Benzoic acid	% Survival of the entomopathogenic nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 weeks)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	90.9 b (a)	85.8 c (b)	83.3 b (c)	76.2 c (d)	72.6 c (e)	68.1 b (f)
0.5	93.6 a (a)	92.4 a (a)	89.1 a (b)	89.0 ab(bc)	87.4 ab(bc)	86.5 a (c)
1.0	90.9 b (a)	90.1 b (a)	89.0 a (ab)	89.5 a (ab)	88.9 a (ab)	87.9 a (b)
1.5	90.3 b (a)	89.0 b (ab)	88.8 a (b)	87.4 b (bc)	86.4 b (c)	86.2 a (c)
CV = 1.2 %						

Table 4 Mortality percentage of *G. mellonella* larvae caused by the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 weeks at 25°C.

% Benzoic acid	% Larval mortality of <i>G. Mellonella</i> caused by nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 weeks)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	98.9 a (a)	98.9 a (a)	95.6 b (b)	94.4 b (b)	91.1 c (c)	89.1 b (c)
0.5	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)	97.8 a (a)	93.3 bc (b)	92.2 a (b)
1.0	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)	98.9 a (a)	94.4 ab (b)	93.3 a (b)
1.5	100.0 a (a)	98.9 a (a)	97.8 ab(ab)	97.8 a (ab)	96.7 a (bc)	94.4 a (c)
CV = 1.8 %						

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

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

Table 5 Survival percentage of the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 weeks at 30°C.

% Benzoic acid	% Survival of the entomopathogenic nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 weeks)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	87.7 c (a)	84.2 c (b)	73.4 c (c)	69.0 c (d)	55.9 c (e)	36.5 d (f)
0.5	90.8 a (a)	89.8 a (ab)	88.1 a (bc)	86.3 a (c)	70.8 b (d)	56.5 c (e)
1.0	89.5 ab (a)	89.2 a (ab)	88.7 a (ab)	87.0 a (b)	71.1 b (c)	58.2 b (d)
1.5	88.5 bc (a)	86.6 b (a)	83.9 b (b)	80.6 b (c)	73.8 a (d)	63.5 a (e)
CV = 1.2 %						

Table 6 Mortality percentage of *G. mellonella* larvae caused by the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for 6 weeks at 30°C

% Benzoic acid	% Survival of the entomopathogenic nematode <i>S. carpocapsae</i> (during 6 weeks)					
	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th
0	96.7 a (a)	92.2 b (b)	90.0 b (b)	84.5 b (c)	77.8 b (d)	71.1 c (e)
0.5	100.0 a (a)	96.7 a (a)	93.3 ab (b)	87.8 b (c)	81.1 b (d)	76.7 b (e)
1.0	100.0 a (a)	98.9 a (a)	96.7 a (bc)	94.4 a (c)	87.8 a (d)	80.0 b (e)
1.5	98.9 a (a)	97.8 a (ab)	96.7 a (ab)	94.4 a (c)	91.1 a (c)	85.6 a (d)
CV = 2.2 %						

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

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

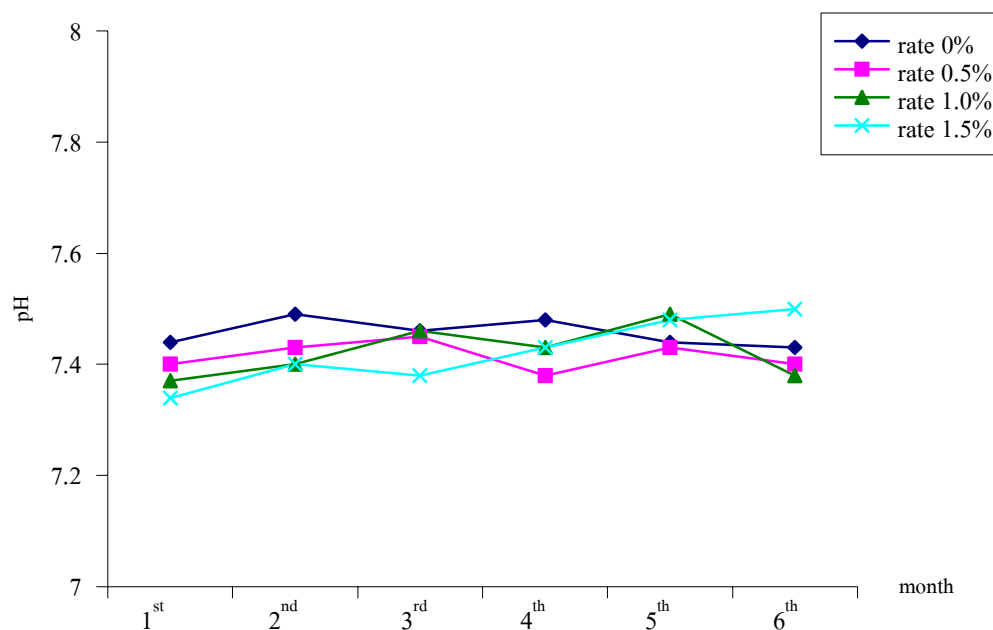


Figure 1 pH level of powder formulation mixed with 4 different Benzoic acid concentrations for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 months at 7°C.

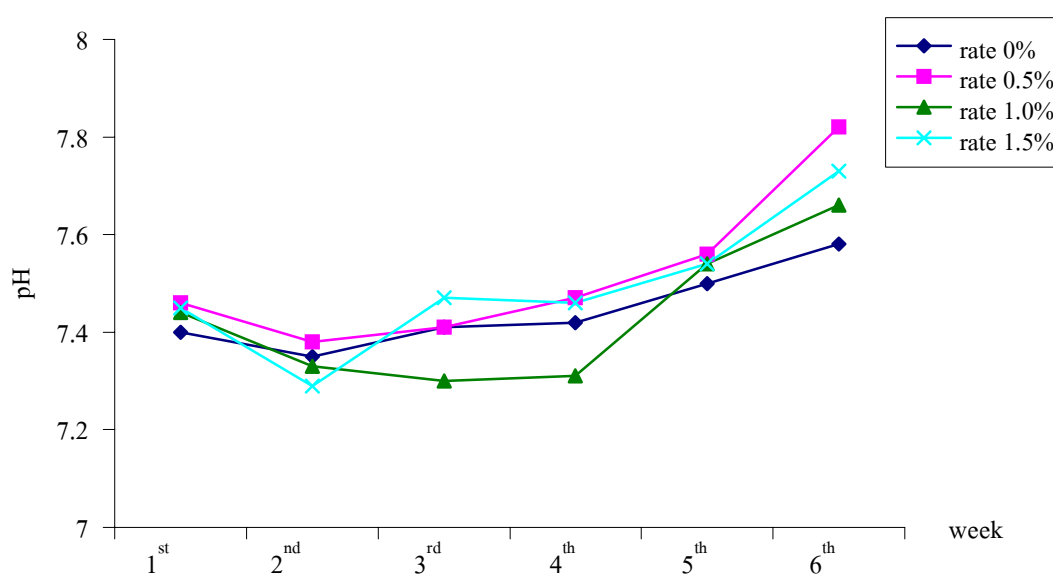


Figure 2 pH level of powder formulation mixed with 4 different Benzoic acid concentrations for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 weeks at 25°C.

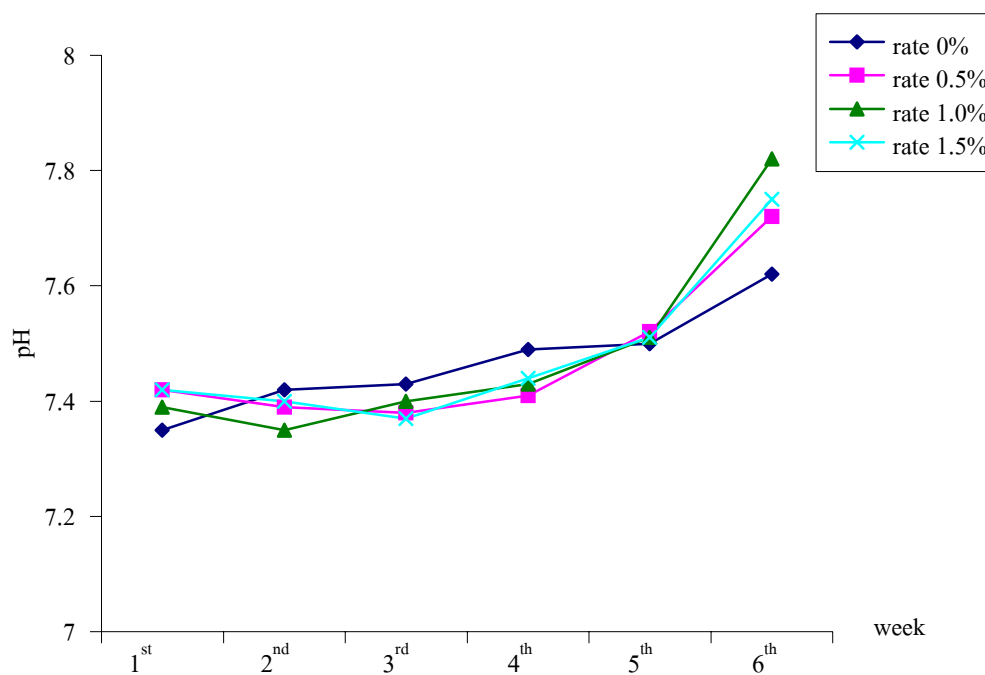


Figure 3 pH level of powder formulation mixed with 4 different Benzoic acid concentrations for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 weeks at 30°C.

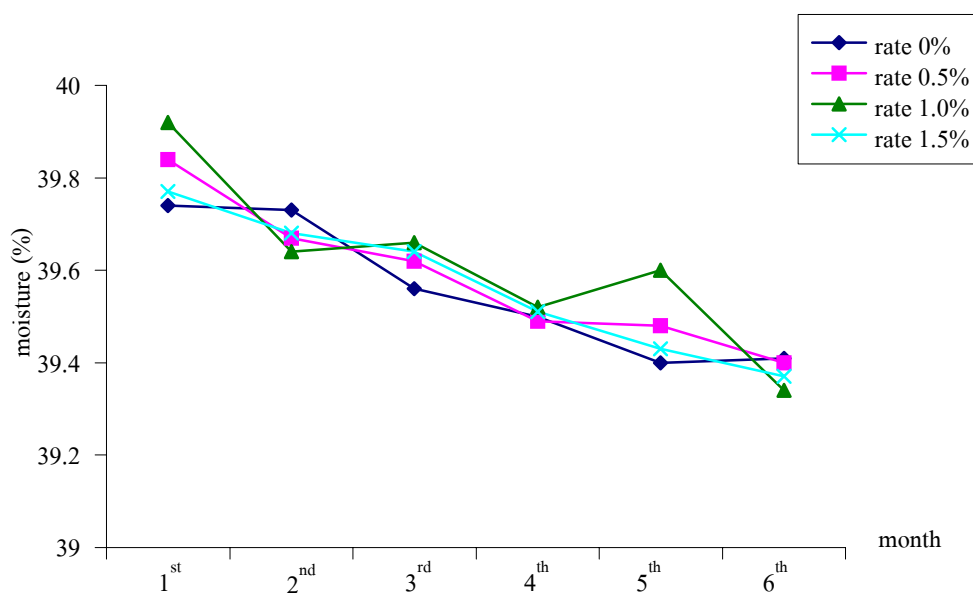


Figure 4 Moisture percentage in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 months at 7°C.

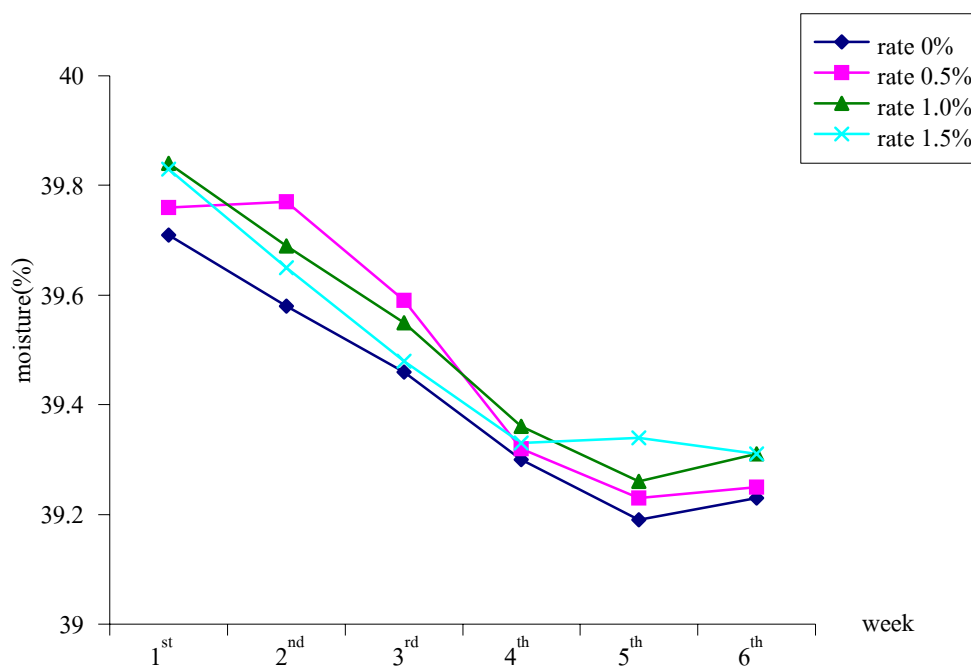


Figure 5 Moisture percentage in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 weeks at 25°C.

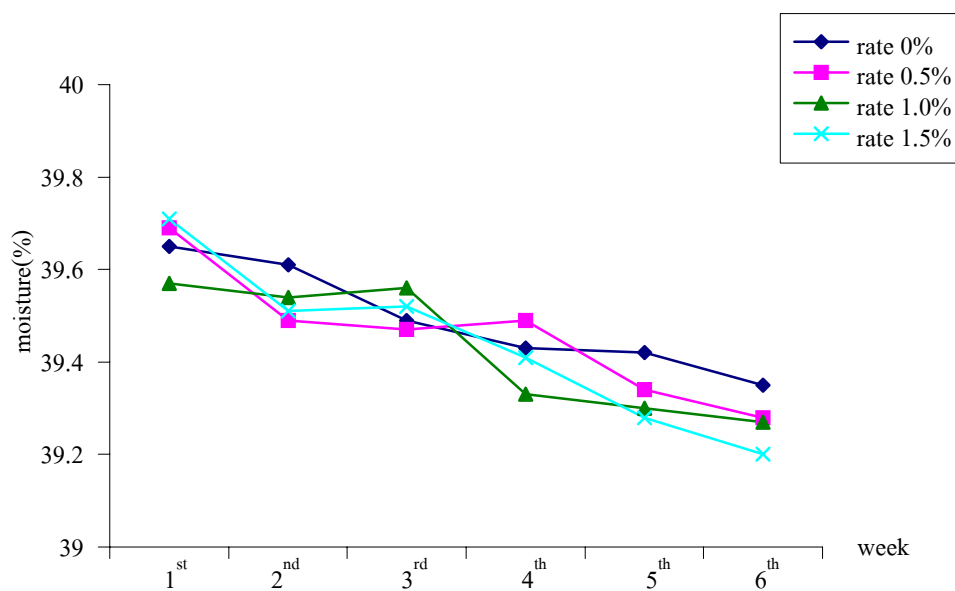


Figure 6 Moisture percentage in powder formulation mixed with 4 different rates of Benzoic acid for maintaining the entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* for 6 weeks at 30°C.

เอกสารอ้างอิง

- Kaya, H.K. 1985. Entomopathogenic nematodes for insect control in IPM Systems. *In*: Hoy M.A. and Herzog, D.C. (eds.) Biological Control in Agricultural IPM Systems. Orlando FL., Academic Press. pp. 283-302.
- Kaya, H.K. and Burlando, T.M. 1989. Development of *Steinernema feltiae* (Rhabditida: Steinernematidae) in diseased insect hosts. *Journal of Invertebrate Pathology*. 53:164-168.

2.4 ผลของการบรรจุสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ในภาชนะที่มีปริมาณ และขนาดแตกต่างกันต่ออัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย

Effect of Powder Formulation for Storing Entomopathogenic Nematodes

Steinernema carpocapsae in the Different Quantity and Size of Vessel

on Their Survival and Efficacy

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยสูตรสำเร็จแบบผงซึ่งประกอบด้วย ดินผสม Attapulgit 2 ส่วน และ Zeolite 1 ส่วน (โดยน้ำหนัก) 59%, Benzoic acid 1.0%, น้ำ 40% ผสมไส้เดือนฝอย ใน ปริมาณต่างกัน โดยบรรจุในภาชนะทรงกระบอก (กระป๋องพลาสติก) ขนาดต่างๆ กัน ทำการทดลอง ที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย (3x6) 18 วิธีการ 3 ซ้ำ ปัจจัยที่ 1 ปริมาณการเก็บ รักษา 3 ระดับ คือ สูตรสำเร็จแบบผง 100 กรัม (50 ล้านตัว) 200 กรัม (100 ล้านตัว) และ 400 กรัม (200 ล้านตัว) ซึ่งบรรจุในกระป๋องที่มีปริมาตร 311 780 และ 1,256 ลบ.ซม. ตามลำดับ ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษานาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 7°C ตรวจสอบอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยทุกเดือน รวมทั้งปัจจัยความชื้นและระดับ pH ที่เปลี่ยนแปลงใน สูตรสำเร็จ พบว่าตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 เดือน การเปลี่ยนแปลง pH ในสูตรสำเร็จของทุกระดับ ปริมาณการบรรจุอยู่ระหว่าง 7.3-7.8 และมีการสูญเสียความชื้น 2.4-3.5% ในช่วงเดือนแรกของการ เก็บรักษา อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยทั้ง 3 ปริมาณการบรรจุลดลงมาอยู่ที่ระดับใกล้เคียงกัน ระหว่าง 97.6-96.7% พอเริ่มเดือนที่ 2-6 อัตราการอยู่รอดในแต่ละปริมาณการบรรจุแตกต่างกัน ที่ อัตราการบรรจุ 50 ล้านตัว การลดลงตั้งแต่เดือนที่ 2-4 อยู่ระหว่าง 91.3-95.9 ไม่แตกต่างทางสถิติกับ เดือนแรก ในเดือนที่ 5-6 ลดลงมาอยู่ในระดับเดียวกัน คือ 89.2% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติกับเดือนแรก ที่อัตราการบรรจุ 100 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดในเดือนที่ 2 ไม่แตกต่างทางสถิติ กับเดือนแรก หลังจากนั้นเดือนที่ 3-6 มีอัตราการอยู่รอดอยู่ระหว่าง 85.1-90.9% ซึ่งแตกต่างจาก เดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่อัตราการบรรจุ 200 ล้านตัว อัตราการอยู่รอดในเดือนที่ 2-3 อยู่ระหว่าง 90.6-94.9% หลังจากนั้นในเดือนที่ 4 5 และ 6 ลดลงอยู่ระหว่าง 87-87.8% ซึ่งแตกต่าง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 2 เดือนแรก อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บครบ 6 เดือน เปอร์เซ็นต์การอยู่ รอดที่อัตราการบรรจุทั้ง 3 อัตรา ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เช่นเดียวกับประสิทธิภาพของ ไส้เดือนฝอยในวิธีการบรรจุที่อัตรา 50 100 และ 200 ล้านตัว ตลอดระยะเวลาการเก็บเป็นเวลา 6

เดือน ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาในการเก็บที่เท่ากัน แต่พบว่า ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่บรรจุอัตรา 50 ล้านตัว มีแนวโน้มอยู่ในระดับสูงสุด และการลดลงของประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บตั้งแต่เดือนที่ 1-6 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ซึ่งอยู่ระหว่าง 93.3-100% ที่บรรจุอัตรา 100 และ 200 ล้านตัว ใน 3 เดือนแรก ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพ 100% และลดลงมาอยู่ในระดับ 96.7 และ 90.0% ในเดือนที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับ 3 เดือนแรก แต่พอถึงเดือนที่ 6 ลดลงมาอยู่ที่ระดับ 86.7% แตกต่างจาก 3 เดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

คำนำ

จากผลการทดลองที่ผ่านมาในการเปรียบเทียบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในรูปผงละลายน้ำได้ โดยบรรจุในปริมาณ 40 60 และ 80 ล้านตัว ในภาชนะกระป๋องพลาสติกทรงกระบอกทึบขาว เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. (ปริมาตร 311 ลบ.ซม.) เก็บที่อุณหภูมิ 7 25 และ 30°C ดินผงที่บรรจุไส้เดือนฝอยปริมาณ 40 ล้านตัวต่อกระป๋อง มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยสูงสุดในทุกระดับอุณหภูมิ แต่เมื่อเพิ่มปริมาณการบรรจุไส้เดือนฝอยมากขึ้น (60 และ 80 ล้านตัว) ในภาชนะเท่าเดิม เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยนั้นต่ำกว่าการบรรจุปริมาณ 40 ล้านตัว ดังนั้นในการทดลองนี้จึงทำการเพิ่มปริมาตรของภาชนะบรรจุให้เหมาะสมกับการบรรจุไส้เดือนฝอยในปริมาณที่มากขึ้น เพื่อให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอด และประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยให้คงเหมือนเดิม ทั้งนี้เป็นการลดต้นทุนและสะดวกสำหรับการบรรจุภัณฑ์ ในการขนส่งกรณีใช้ในพื้นที่กว้างขวาง

วิธีดำเนินการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องนับ (counter) เครื่องวัด pH (pH meter) ปิเปตแบบอัตโนมัติ (auto pipette) ชุดกวนแบบแท่งแม่เหล็ก (stirrer magnetic bar) เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer)
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระจกตวงขนาดต่างๆ
3. ไล้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
4. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
5. ดินผง Attapulgit และ Zeolite
6. Benzoic acid 1.0%
7. กระจีองพลาสติกทึบทรงกระบอกสีขาวมี 3 ขนาด คือ
 - 311 ลบ.ซม.
 - 780 ลบ.ซม.
 - 1,256 ลบ.ซม.
8. อื่นๆ ได้แก่ ถังพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว เข็มเย็บ กระจีองนํ้ายาพลาสติกขนาด 10 มล. petridish ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.

วิธีการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD 2 ปัจจัย (3x6) 18 วิธีการ 3 ซ้ำ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ปริมาณในการบรรจุไล้เดือนฝอย 3 ระดับ คือ

- บรรจุไล้เดือนฝอย 50 ล้านตัว/กระจีอง 311 ลบ.ซม. (อัตราส่วน 1 ล้านตัว/6.2 ลบ.ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. และ สูง 11 ซม.)
- บรรจุไล้เดือนฝอย 100 ล้านตัว/กระจีอง 780 ลบ.ซม. (อัตราส่วน 1 ล้านตัว/7.8 ลบ.ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. และ สูง 10 ซม.)
- บรรจุไล้เดือนฝอย 200 ล้านตัว/กระจีอง 1,256 ลบ.ซม. (อัตราส่วน 1 ล้านตัว/6.3 ลบ.ซม. เส้นผ่าศูนย์กลาง 10 ซม. และ สูง 16 ซม.)

ปัจจัยที่ 2 ระยะเวลาในการเก็บรักษา คือเก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน แต่ละวิธีการมี 3 ซ้ำ ซ้ำละ 1 กระจีอง

วิธีปฏิบัติการทดลอง

1. นำดิน Attapulgit และ Zeolite ที่จะทำการทดลองอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100-120°ซ

2. นำดินทั้ง 2 ชนิดที่อบแล้วมาผสมให้เข้ากันในอัตราส่วน Attapulgite และ Zeolite 2:1
3. เตรียมไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ II อัตรา 50 100 และ 200 ล้านตัว ในน้ำ 40 80 และ 160 มล. ตามลำดับ
4. ทำการผสมตามสูตรดังนี้ ในส่วนผสม 100 กรัม ซึ่งมีดินผสมแห้ง 59 กรัม Benzoic acid 1 กรัม ไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว ปรับความชื้นให้อยู่ในระดับ 40% จะได้ส่วนผสม 100 กรัม มีไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว เช่นเดียวกันในการเตรียมให้มีไส้เดือนฝอย 100 ล้านตัวในส่วนผสม 200 กรัม และ ไส้เดือนฝอย 200 ล้านตัวในส่วนผสม 400 กรัม
5. บรรจุส่วนผสมดินที่มีไส้เดือนฝอยทั้ง 3 อัตรา ลงในภาชนะกระป๋องพลาสติก 3 ขนาด ดังกล่าวข้างต้น โดยมีไส้เดือนฝอยอัตรา 50 ล้านตัวในส่วนผสม 100 กรัม/กระป๋อง ไส้เดือนฝอยอัตรา 100 ล้านตัวในส่วนผสม 200 กรัม/กระป๋อง และไส้เดือนฝอยอัตรา 200 ล้านตัวในส่วนผสม 400 กรัม/กระป๋อง นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 7°C แต่ละวิธีการ มี 3 ซ้ำๆ ละ 1 กระป๋อง
6. ตรวจสอบไส้เดือนฝอยในแต่ละวิธีการทดลอง ทุกเดือนจนครบ 6 เดือน โดยปฏิบัติดังนี้
 - นำส่วนผสมในแต่ละกระป๋องของวิธีการต่างๆ จำนวน 5 กรัม ไปวัดความชื้น ด้วยเครื่อง Moisture Analyzer
 - นำดินผงอีก 10 กรัม มาละลายน้ำกลั่น 500 มล. นำไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง
 - จากนั้นนำมาเจือจางในอัตราส่วน 1 มล. ต่อน้ำกลั่น 99 มล. แล้วนับจำนวนไส้เดือนฝอย ตัวเป็น ตัวตาย ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แต่ละกระป๋อง (ซ้ำ) ตรวจสอบ 3 ครั้ง (เพื่อหาค่าเฉลี่ย/ซ้ำ)
7. ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยกับหนอนกิ้งกิ้ง โดยใช้ไส้เดือนฝอย 200 ตัว/หนอน 10 ตัว ทำการทดสอบบนกระดาดกรองใน petridish ตรวจสอบการตายของหนอนที่ 48 ชั่วโมง

การบันทึกข้อมูล

- ตรวจสอบเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยหลังการเก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน
- บันทึกเปอร์เซ็นต์ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยในแต่ละวิธีการ ตามแผนการทดลอง

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรม IRRISTAT

ผลและวิจารณ์การทดลอง

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยสูตรดินผง ซึ่งประกอบด้วยดินผสม Attapulgit 2 ส่วน Zeolite 1 ส่วน (โดยน้ำหนัก) 59%, Benzoic acid 1.0% และน้ำ 40% ผสมไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว ในปริมาณต่างกัน และบรรจุในภาชนะ (กระป๋องพลาสติก) ขนาดต่างกัน 3 ระดับ คือการบรรจุสูตรผสม 100 กรัม (มีไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว) ในกระป๋องพลาสติกทรงกระบอกปริมาตร 311 ลบ.ซม. บรรจุ 200 กรัม (มีไส้เดือนฝอย 100 ล้านตัว) ในกระป๋องพลาสติกปริมาตร 780 ลบ.ซม. บรรจุ 400 กรัม (มีไส้เดือนฝอย 200 ล้านตัว) ในกระป๋องพลาสติกปริมาตร 1,256 ลบ.ซม. เก็บที่อุณหภูมิ 7°C และตรวจอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย รวมทั้งสภาพความชื้นและระดับ pH ทุกๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน จาก Fig. 1 pH ของสูตรดินที่ใช้เก็บในทุกวิธีการบรรจุ มีการเปลี่ยนแปลงที่ใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 7.3-7.8 และขณะเดียวกัน ก็มีการสูญเสียความชื้น (Fig. 2) ของสูตรดินในทุกวิธีการบรรจุ อยู่ระหว่าง 2.4-3.6% ซึ่งการเปลี่ยนแปลงปัจจัยทั้ง 2 นี้ ไม่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยในทุกวิธีการ จาก Table 1 จะเห็นได้ว่า ในช่วงการเก็บรักษาตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 วิธีการบรรจุในอัตรา 50 ล้านตัว มีแนวโน้มเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบระหว่างช่วงระยะเวลาการเก็บเดียวกันกับการบรรจุที่อัตรา 200 และ 100 ล้านตัว ซึ่งมีอัตราการรอดชีวิตรองลงมาตามลำดับ แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ (Table 1) เมื่อพิจารณาอัตราการลดลงของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในแต่ละอัตราการบรรจุทั้ง 3 ระดับ จะเห็นได้ว่าในช่วง 1 เดือนแรกของการเก็บรักษา เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของทั้ง 3 อัตราการบรรจุลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่าง 96.7-97.7% แสดงว่าสภาพในภาชนะที่ใช้เก็บยังไม่แตกต่างกัน อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้น ก็ตั้งแต่เดือนที่ 2-6 อัตราการลดลงมีแนวโน้มต่างกันทั้ง 3 อัตราการบรรจุ ที่อัตรา 50 ล้านตัว การลดลงของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในเดือนที่ 2 (95.9%) เดือนที่ 3 (91.3%) และเดือนที่ 4 (91.7%) ยังไม่แตกต่างทางสถิติกับเดือนแรก แสดงว่าอัตราการลดลงของเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในช่วงนี้เป็นไปอย่างช้าๆ การเปลี่ยนแปลงของสภาพการเก็บมีผลกระทบไม่มากนัก เมื่อเก็บนานขึ้นในเดือนที่ 5 และ 6 อัตราการลดลงค่อนข้างสูงอยู่ในระดับ 89.2 และ 90.1% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดใน 2 เดือนแรก ในช่วงนี้ออกซิเจนมีปริมาณน้อยลงไม่เพียงพอ และในขณะเดียวกันมีการสะสมของเสียมากขึ้น อาหารที่เก็บไว้ในรูปไขมันเริ่มมีน้อยลง ซึ่งมีผลต่อไส้เดือนฝอยมากขึ้น ส่วนการบรรจุที่อัตรา 200 ล้านตัว มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในเดือนที่ 2 (94.9%) และในเดือนที่ 3 (90.6%) ไม่แตกต่างทางสถิติกับเดือนแรก หลังจากนั้นในเดือนที่ 4 5 และ 6 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 87.0-87.8% แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ 2 เดือนแรก แสดงว่าผลกระทบของสภาพการเก็บนั้นมีผลมากกว่าอัตราการบรรจุที่น้อยกว่า (50 ล้านตัว) ส่วนที่การบรรจุ 100 ล้านตัว เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเดือนที่ 2 (94.9%) เท่านั้นที่ไม่แตกต่างทางสถิติกับเดือนแรก

หลังจากนั้นในเดือนที่ 3 4 5 และ 6 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดระหว่าง 85.1-90.9% ซึ่งลดลงจนแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเดือนแรก แสดงว่าผลกระทบที่เกิดขึ้นมีมากกว่าในอัตราการบรรจุทั้ง 2 ที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามเมื่อเก็บรักษาเป็นระยะเวลา 6 เดือน อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยของการบรรจุทั้ง 3 อัตราไม่แตกต่างทางสถิติตามที่กล่าวมาแล้ว

ในเรื่องประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย เช่นเดียวกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ในช่วง 6 เดือน การบรรจุที่อัตรา 50 ล้านตัว มีแนวโน้มว่าอยู่ในระดับสูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติกับอัตราการบรรจุ 200 และ 100 ล้านตัว เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระยะเวลาการเก็บที่เท่ากัน (เดือนเดียวกัน) การเปลี่ยนแปลงประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาในแต่ละวิธีการบรรจุตลอดระยะเวลา 6 เดือน มีดังนี้ ที่อัตราบรรจุ 50 ล้านตัว เปอร์เซ็นต์การเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่เก็บตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 6 ไม่แตกต่างทางสถิติ โดยในเดือนที่ 1 และ 2 มีประสิทธิภาพ 100% ในเดือนที่ 3 และ 4 ลดลงอยู่ในระดับเดียวกัน คือ 96.7% ในเดือนที่ 5 และ 6 ลดลงอยู่ในระดับเดียวกัน คือ 93.3% แสดงว่าสภาพที่ไม่เหมาะสมที่เกิดขึ้นในระยะเวลานี้มีผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตน้อยกว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด ส่วนที่บรรจุ 100 ล้านตัว เช่นเดียวกับอัตราบรรจุ 200 ล้านตัว ไส้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพ 100% ใน 3 เดือนแรก และลดลงมาอยู่ในระดับ 96.7% และ 90.0% ในเดือนที่ 4 และ 5 ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากประสิทธิภาพใน 3 เดือนแรก ในเดือนสุดท้ายลดลงมาอยู่ในระดับต่ำสุด (86.7%) ซึ่งแตกต่างจาก 3 เดือนแรกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จะเห็นได้ว่าสภาพที่ไม่เหมาะสมในการเก็บนั้นมีผลกระทบต่อประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยซ้ำๆ ที่เกิดขึ้นกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด เช่นเดียวกับที่อัตราการบรรจุ 50 ล้านตัว จะเห็นได้ว่านอกจากปัจจัยต่างๆ ตามที่กล่าวมาแล้วในโครงการวิจัย 1 และ 2 ที่มีผลต่ออัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บรักษาแล้ว ยังมีปัจจัยที่จะต้องคำนึงถึง ได้แก่ ปริมาณของไส้เดือนฝอยที่บรรจุ และขนาดหรือปริมาตรของภาชนะบรรจุ ซึ่งมีผลต่อการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยด้วย โดยปัจจุบันยังไม่มีรายงานการทดลองเกี่ยวกับด้านนี้ ในงานทดลองนี้ได้มีการเพิ่มปริมาณการบรรจุจาก 50 ล้านตัว เป็น 100 และ 200 ล้านตัว และบรรจุในภาชนะรูปทรงกระบอกที่มีขนาดใหญ่ขึ้น โดยการเพิ่มขนาดภาชนะบรรจุในอัตราส่วนต่อไส้เดือนฝอย 1 ล้านตัว ใกล้เคียงกับขนาดภาชนะบรรจุ 50 ล้านตัว (ตามวิธีการทดลอง) อย่างไรก็ตามการบรรจุอัตรา 50 ล้านตัว ในภาชนะที่มีปริมาตร 311 ลบ.ซม. มีแนวโน้มของอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพในการทำลายแมลงสูงสุด แต่ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกันก็ตาม ดังนั้นปัจจัยที่ควรศึกษาเพิ่มได้แก่ การเพิ่มขนาดของภาชนะรูปทรงกระบอกที่ใช้บรรจุในส่วนของความยาว เส้นผ่าศูนย์กลาง หรือเพิ่มในด้านความสูง เพื่อให้มีปริมาตรพอเหมาะกับไส้เดือนฝอยมากขึ้น ในงานทดลองนี้ จะเห็นได้ว่า อัตราส่วนของเส้นผ่าศูนย์กลางและส่วนสูงของภาชนะบรรจุที่ 50 100 และ 200 ล้านตัว คือ 1:1.8 1:1. และ 1:1.6 ตามลำดับ นอกจากนี้การเพิ่มสัดส่วนของปริมาณดินผงให้สูงขึ้นผสมกับไส้เดือนฝอย ในกรณี ที่บรรจุ 100 และ 200 ล้านตัว จากการเปรียบเทียบการเก็บรักษาโดยการใส่วัสดุหรือวิธีการที่

แตกต่างจากการทดลองนี้ในเชิงพาณิชย์ Gaugler (2002) พบว่าที่ระดับ 2-10°C การเก็บไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในผงดิน vermiculite และในฟองน้ำมี shelf life (ระยะเวลาการเก็บที่นานที่สุด) ไส้เดือนฝอยมีอัตราการรอดชีวิตไม่ต่ำกว่า 90% และมีประสิทธิภาพไม่เปลี่ยนแปลงจากเดิม) 5-6 และ 2-3 เดือน ตามลำดับ Nelson and Mannion (U.S.Pat.No.4,615,883) ได้เก็บไส้เดือนฝอยในแอลจิเนต เจล (alginate gel) ที่ 4°C ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* มี shelf life 6-9 เดือน Silver (U.S.Pat.No.5,965,149) ได้คิดค้นสูตรสำเร็จแบบเม็ด การเก็บโดยวิธีนี้ที่ 22-25°C และที่ 2-10°C ไส้เดือนฝอยมี shelf life 2-3.5 และ 6-8 เดือน ตามลำดับ อย่างไรก็ตามสำหรับการเก็บ 2 วิธีการหลังนี้เป็นวิธีการที่ค่อนข้างยุ่งยากซับซ้อน ทำให้มีต้นทุนสูง ไม่เหมาะในเชิงพาณิชย์ ฉะนั้นจากการทดลองนี้ สูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* แบบผง ประกอบด้วย ดินผสม Attapulgit และ Zeolite (2:1 โดยน้ำหนัก) 59% Benzoic acid 1.0% น้ำ 40% ผสมกับไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว บรรจุในภาชนะรูปทรงกระบอกที่มีปริมาตร 311 ลบ.ซม. มีฝาปิดมิดชิด เก็บที่ 7°C จะมี shelf life ไม่ต่ำกว่า 6 เดือน สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในเชิงพาณิชย์ต่อไป

สรุปผลการทดลอง

จากการเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สูตรสำเร็จแบบผง ประกอบด้วย ดินผสมระหว่าง Attapugite (2 ส่วน) กับ Zeolite (1 ส่วน) โดยน้ำหนัก 59% Benzoic acid 1.0% น้ำ 40% ผสมไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว โดยบรรจุสูตรสำเร็จ 100 กรัม (มีไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว) 200 กรัม (100 ล้านตัว) และ 400 กรัม (200 ล้านตัว) ในภาชนะที่เป็นกระป๋องพลาสติก (รูปทรงกระบอก) ซึ่งมีปริมาตร 311 780 และ 1,250 ลบ.ซม. ตามลำดับ เก็บที่อุณหภูมิ 7°C ตรวจสอบนับทุกๆ เดือน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าการเก็บที่อัตรา 50 ล้านตัว ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด 90.1% และมีประสิทธิภาพ 93.3% ซึ่งมีแนวโน้มสูงสุด ในขณะเดียวกัน การเก็บที่อัตรา 100 และ 200 ล้านตัว ในภาชนะที่มีขนาดดังกล่าว มีอัตราการอยู่รอด 85.1 และ 87.2% ตามลำดับ และมีประสิทธิภาพเท่ากันที่ 86.7% จากผลการทดลองนี้ การเก็บที่อัตรา 50 ล้านตัว ในภาชนะดังกล่าวที่ระดับ 7°C ไส้เดือนฝอยมี shelf life 6 เดือน สามารถนำไปใช้ในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในเชิงพาณิชย์ได้

Table 1 Survival percentage of *Steinernema carpocapsae* in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

Month (II)	Quantities of nematode contained in vessels (million/can) (I)		
	50	100	200
1 st	97.7 a (a)	97.4 a (a)	96.7 a (a)
2 nd	95.9 a (a)	94.9 ab (a)	94.9 a (a)
3 rd	91.3 ab (a)	90.9 bc (a)	90.6 ab (a)
4 th	91.7 ab (a)	88.5 c (a)	87.0 b (a)
5 th	89.2 b (a)	85.1 c (a)	87.8 b (a)
6 th	90.1 b (a)	85.1 c (a)	87.2 b (a)
CV = 4.0%			

Table 2 Comparative efficacy of *Steinernema carpocapsae* (200 nema/larva 48 hrs.) after maintenance in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

Month (II)	Quantities of nematode contained in vessels (million/can) (I)		
	50	100	200
1 st	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)
2 nd	100.0 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)
3 rd	96.7 a (a)	100.0 a (a)	100.0 a (a)
4 th	96.7 a (a)	96.7 ab (a)	96.7 a (a)
5 th	93.3 a (a)	90.0 ab (a)	90.0 ab (a)
6 th	93.3 a (a)	86.7 b (a)	86.7 ab (a)
CV = 6.8%			

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 the 5% level by DMRT.

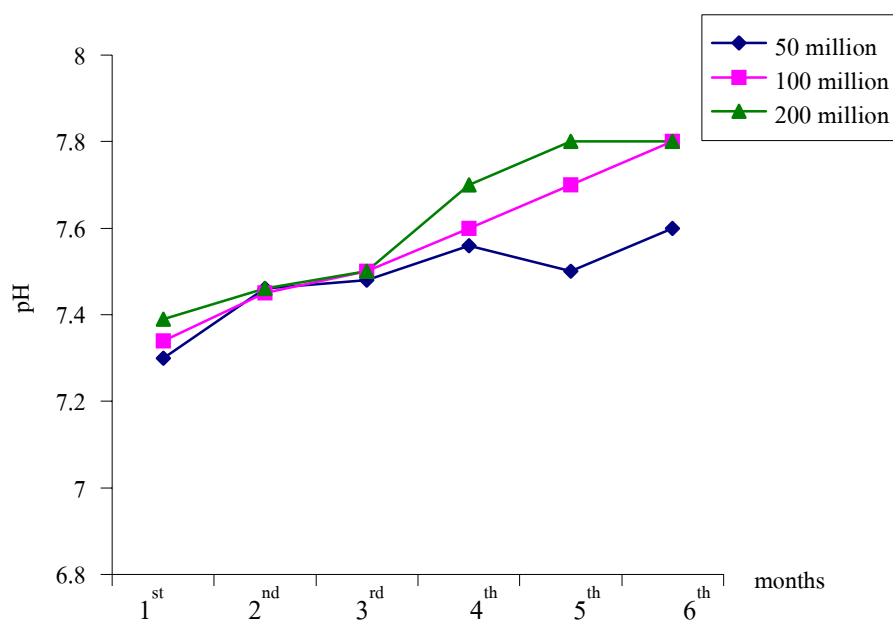


Figure 1 pH change of *Steinerema carpocapsae* in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

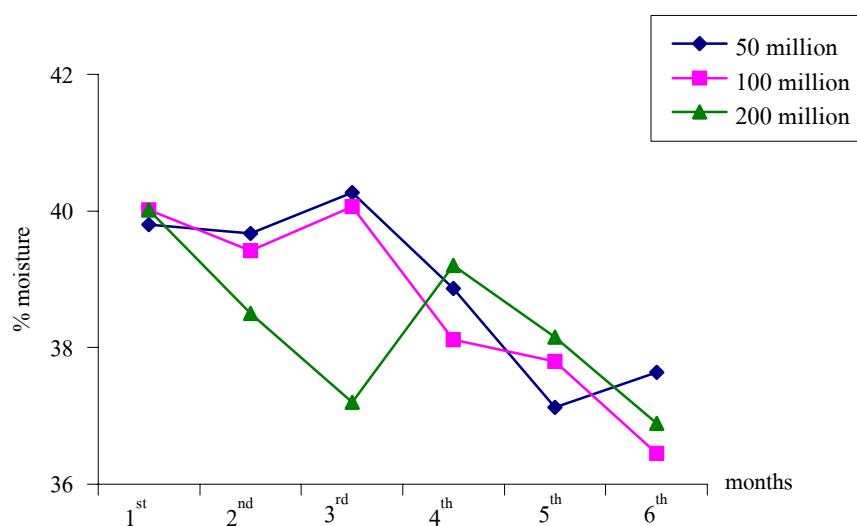


Figure 2 Moisture percentage of *Steinerema carpocapsae* in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

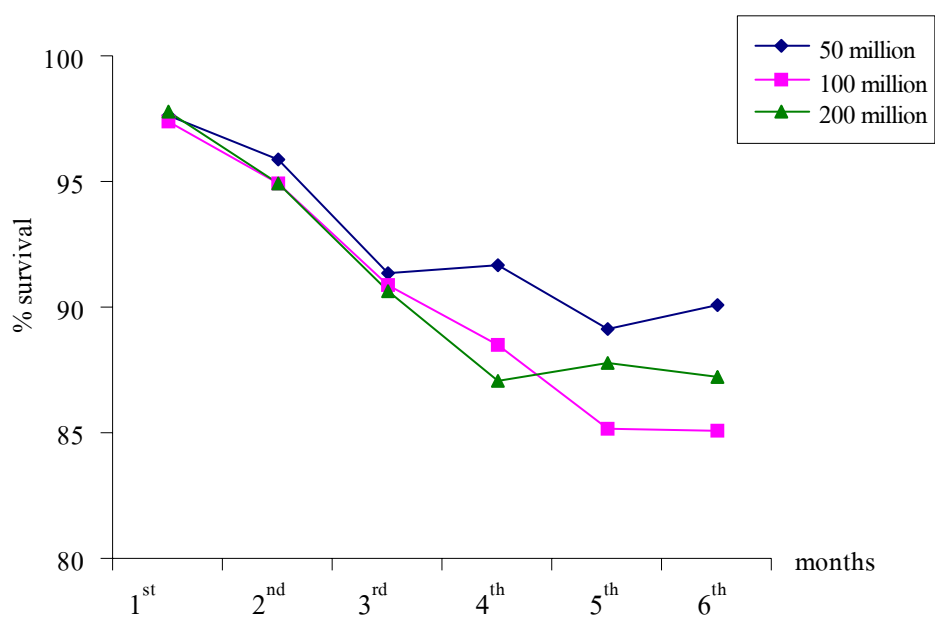


Figure 3 Survival percentage of *Steinernema carpocapsae* in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

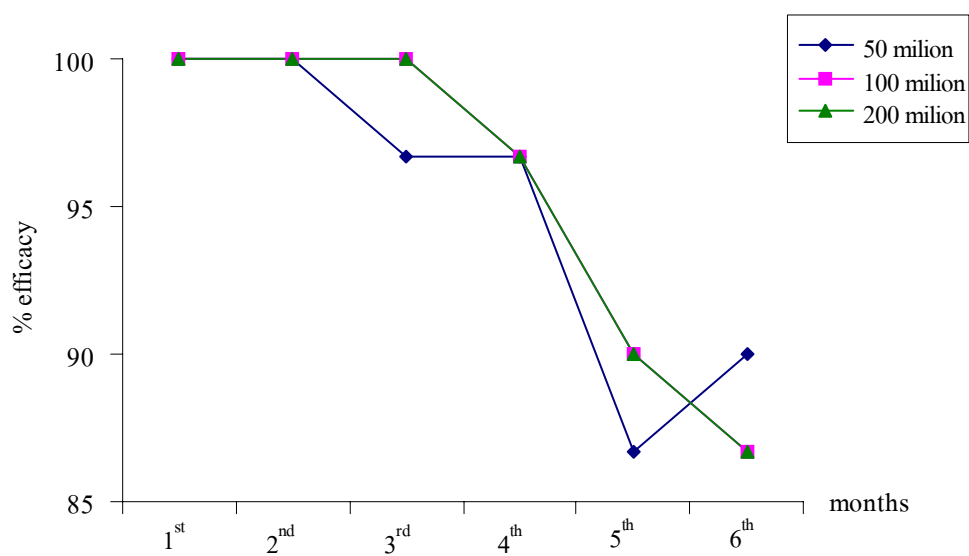


Figure 4 Efficacy of *Steinernema carpocapsae* (200 nema/larva 48 hrs.) after maintenance in powder formulation contained in different quantities and sizes of vessels at 7°C for 6 months.

เอกสารอ้างอิง

Gaugler, R. 2002. Entomopathogenic Nematology. CABI Publishing, Wallingford. 388 pp.

Nelson, C.E. and Mannion, C. 1986. Hydrogel encapsulated nematodes U.S. Pat. No.4,615,883.
11 pp.

Silver, Scott C. 1999. Granular formulation of biological entities with improved storage stability.
U.S. Pat. No. 5,965,149. 30 pp.

2.5 เปรียบเทียบอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ที่เก็บรักษาในสูตรดินผง และฟองน้ำ ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ

Comparative Survival and Efficacy of Entomopathogenic Nematode *Steinernema carpocapsae* Maintained in Powder Formulation and in Sponge at Different Temperatures.

บทคัดย่อ

การเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เก็บในสูตรสำเร็จแบบดินผง (powder formula) และในฟองน้ำ ที่ระดับอุณหภูมิต่างๆ ดำเนินการที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ตั้งแต่เดือนกันยายน 2548 – มีนาคม 2549 มี 3 การทดลองย่อย ตามระดับอุณหภูมิคือ 7, 25 และ 30°C แต่ละการทดลองวางแผนแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (2x6) 12 วิธีการ 5 ซ้ำๆ ละ 3 ถุง (พลาสติก) ปัจจัยแรก ได้แก่ รูปแบบการเก็บ คือ ในสูตรดินผง และการเก็บในฟองน้ำ ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ เวลาการเก็บ 6 ระยะ โดยที่อุณหภูมิ 7°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน ที่อุณหภูมิ 25°C เก็บนาน 2 4 6 8 และ 12 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ 30°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์ แต่ละระยะทำการตรวจอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย พบว่า ที่ 7°C อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในช่วง 3 เดือนแรกที่เก็บในสูตรดินผงอยู่ระหว่าง 94.3-98.6% และเก็บในฟองน้ำอยู่ระหว่าง 92.7-96.7% ไม่แตกต่างกันทางสถิติระหว่าง 2 วิธีการ เมื่อเปรียบเทียบในช่วงระยะเวลาการเก็บแต่ละเดือน ในเดือนที่ 4 การเก็บในสูตรดินผงมีอัตราการอยู่รอด 92.8% สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในฟองน้ำ (89.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยืงนานขึ้นในเดือนที่ 5 และ 6 อัตราการอยู่รอดที่เก็บในสูตรดินผง (92.9 และ 90.0%) สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในฟองน้ำ (88.2 และ 84.4%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การเก็บทั้ง 2 วิธีการตั้งแต่เดือนที่ 3-6 พบการลดลงของอัตราการอยู่รอดแตกต่างจากเดือนที่ 1 และ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บที่ 7°C ลดลงตั้งแต่เดือนที่ 1-5 ในสูตรดินผงอยู่ระหว่าง 91.1-100% และในฟองน้ำอยู่ระหว่าง 88.9-100% ไม่แตกต่างทางสถิติระหว่างกัน เมื่อเปรียบเทียบในช่วงระยะเวลาการเก็บในเดือนเดียวกัน ในเดือนที่ 6 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผง (91.1%) สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในฟองน้ำ (86.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 25°C อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย ในช่วง 2 สัปดาห์แรก ที่เก็บในสูตรดินผง (98.3%) และเก็บในฟองน้ำ (95.5%) ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่หลังการเก็บในสัปดาห์ที่ 4 และ 6 ในสูตรดินผง อัตราการอยู่รอด (95.3 และ

83.7%) สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในสูตรฟองน้ำ (90.3 และ 79.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเก็บนานขึ้นถึงสัปดาห์ที่ 8-12 การเก็บทั้ง 2 วิธีการ การลดลงของอัตราการอยู่รอดในสูตรดินผง (53.5-76.7%) และในฟองน้ำ (50.5-73.2%) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ 25°C ใน 2 สัปดาห์แรก การเก็บในสูตรดินผง (98.9%) และในฟองน้ำ (97.8%) มีค่าใกล้เคียงกัน หลังจากนั้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4-12 การเก็บในสูตรดินผง (56.7-98.9%) มีประสิทธิภาพสูงกว่าแตกต่างจากที่เก็บในฟองน้ำ (48.9-86.7%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ 30°C อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-5 ในสูตรดินผง (82.5-98.3%) สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในฟองน้ำ (73.3-83.1%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบอัตราที่ลดลงระหว่างกันในช่วงระยะเวลาการเก็บเท่ากัน ในสัปดาห์ที่ 6 ลดลงมาอยู่ใกล้เคียงกันระหว่าง 70.3-71.8% ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงตลอดระยะเวลาการเก็บตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1-6 มีค่าอยู่ระหว่าง 97.8-74.4% สูงกว่าแตกต่างจากการเก็บในฟองน้ำ ซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 85.6-36.7% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกๆ สัปดาห์ของการเก็บ

คำนำ

หลังจากได้ค้นพบสูตรดินผสมแบบผง วิธีการบรรจุภาชนะ อัตราการบรรจุไส้เดือนฝอย และปัจจัยต่างๆ ที่เหมาะสมในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้มีอัตราการอยู่รอด และมีประสิทธิภาพ สูงตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 เดือน ที่ระดับอุณหภูมิ 7°C จากผลการทดลองที่ได้นี้สามารถนำไปใช้ ทดแทนวิธีการใช้ฟองน้ำในการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในเชิงพาณิชย์ (วัชร, 2544) โดยการ หยดไส้เดือนฝอยพร้อมน้ำลงในชั้นฟองน้ำเล็กที่ถูกบรรจุในถุงพลาสติก ปิดผนึกถุงแล้วนำไปเก็บ รักษาที่ 7°C การเก็บวิธีนี้มีข้อเสียหลายประการ ได้แก่ ไส้เดือนฝอยมี shelf life สั้นประมาณ 1 เดือน วิธีการนำไปใช้ในสภาพธรรมชาติค่อนข้างยุ่งยาก โดยจะต้องขยำฟองน้ำให้ได้ไส้เดือนฝอยออกมา อยู่ในน้ำ กรองเอาเศษฟองน้ำออก แล้วจึงนำไส้เดือนฝอยไปใช้พ่น ส่วนไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตร ดินสำเร็จแบบผง สามารถนำไปละลายน้ำแล้วทำการพ่นได้ทันที แต่ก่อนที่จะนำไส้เดือนฝอยสูตร สำเร็จแบบผงไปส่งเสริมให้ผู้ผู้ใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืชในธรรมชาติ จำเป็นต้องมีการ ทดสอบสภาพการเก็บเปรียบเทียบกับวิธีการเก็บในฟองน้ำให้ชัดเจน ที่ระดับอุณหภูมิ 7 25 และ 30°C ทั้งนี้เพื่อเป็นการยืนยันว่าไส้เดือนฝอยสูตรสำเร็จแบบผง สามารถนำไปทดแทนการใช้ฟองน้ำได้

วิธีดำเนินการ

วัสดุ อุปกรณ์

1. อุปกรณ์เครื่องมือ ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ เครื่องชั่งละเอียด เครื่องนับ (counter) เครื่องวัด pH (pH meter) ปิเปตแบบอัตโนมัติ (auto pipette) เครื่องวัดความชื้น (moisture analyzer)
2. อุปกรณ์เครื่องแก้ว ได้แก่ บีกเกอร์ขนาดต่างๆ กระจกตวงขนาดต่างๆ จานพลาสติก (petridish)
3. ดิน Attapulgate และ Zeolite
4. ไข่เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ)
5. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* วัย 5
6. อื่นๆ ได้แก่ ฟองน้ำสังเคราะห์ ถูพลาสติกขนาด 8x12 นิ้ว และ 4x6 นิ้ว กระจกนิตยา พลาสติกขนาด 10 มล. เครื่องปิดผนึกถุงพลาสติก

วิธีการทดลอง

ประกอบด้วย 3 การทดลองย่อย โดยทำการทดลองที่ระดับอุณหภูมิ 7 25 และ 30°C แต่ละการทดลองมีการวางแผนแบบ Factorial in CRD มี 2 ปัจจัย (2x6) 12 วิธีการ 5 ซ้ำ ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 วิธีการเก็บรักษา 2 แบบ คือ การเก็บในสุตรดินผง และการเก็บในฟองน้ำ

ปัจจัยที่ 2 เวลาการเก็บ 6 ระยะ คือ การทดลองที่ 7°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 เดือน การทดลองที่ 25°C เก็บนาน 2 4 6 8 และ 12 สัปดาห์ การทดลองที่ 30°C เก็บนาน 1 2 3 4 5 และ 6 สัปดาห์

แต่ละการทดลอง ทำ 5 ซ้ำๆ ละ 1 ถู (พลาสติก)

วิธีปฏิบัติการทดลอง

การเก็บรักษาไข่เดือนฝอยในฟองน้ำสังเคราะห์

- นำชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ที่มีขนาด 1 ลบ.ซม. ไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นนำไปใส่ถุงพลาสติกใสที่มีขนาด 4x6 นิ้ว ถูละ 22 ชิ้น
- เตรียมไข่เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ให้มีความเข้มข้น 4 ล้านตัวในน้ำกลั่น 10 มล.
- ทำการหยดไข่เดือนฝอยที่เตรียมไว้ตามข้อ 1.2 ลงในฟองน้ำที่เตรียมไว้ในถุงพลาสติก ในปริมาณ 4 ล้านตัว/1 ถู/น้ำ 10 มล.
- ปิดปากถุงให้สนิท แล้วนำไปวางที่อุณหภูมิ 7 25 และ 30°C

การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในสูตรดินผสมแบบผง

- บดดิน Attapulgit และ Zeolite ให้เป็นผงละเอียด อบให้แห้งที่อุณหภูมิ 100-120°C ผสมกันในอัตราส่วน 2:1 โดยน้ำหนัก จะได้ดินผสมแบบผง

- เตรียมไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) ในปริมาณ 40 ล้านตัว ในน้ำ 20 มล.

- นำดินผสม (จากข้อ 2.1) 59 กรัม ผสมกับสารกันบูด Benzoic acid 1 กรัม คนให้เข้ากันให้ทั่ว แล้วผสมกับไส้เดือนฝอยที่เตรียมไว้ตามข้อ 2.2 พร้อมกับปรับความชื้นของส่วนผสมทั้งหมด ให้ได้ 40% จะได้สูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยแบบผงที่มีส่วนผสมระหว่างดินผสม (มีความชื้น 40%) 100 กรัม ต่อไส้เดือนฝอย 40 ล้านตัว

- แบ่งส่วนผสม 10 กรัม ซึ่งมีไส้เดือนฝอย 4 ล้านตัว ใส่ลงในถุงพลาสติกขนาด 4x6 นิ้ว 1 ถุง ปิดผนึกถุงให้สนิท แล้วนำไปเก็บที่ระดับอุณหภูมิ 7 25 และ 30°C ตามแผนการทดลองต่อไป

การตรวจผล

- ที่อุณหภูมิ 7°C ตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตรอดและทดสอบประสิทธิภาพทุกเดือน เป็นเวลา 6 เดือน

- ที่อุณหภูมิ 25°C ตรวจเช่นเดียวกัน แต่ตรวจทุก 2 สัปดาห์ เป็นเวลา 12 สัปดาห์

- ที่อุณหภูมิ 30°C ตรวจเช่นเดียวกัน แต่ตรวจทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 6 สัปดาห์

สำหรับวิธีการที่เก็บในฟองน้ำ ทำการเปิดถุงพลาสติก เทขึ้นฟองน้ำซึ่งมีไส้เดือนฝอยอาศัยอยู่ลงในน้ำกลั่น ขยำฟองน้ำหลายๆ ครั้ง จนได้ไส้เดือนฝอยออกมาอยู่ในน้ำ แยกฟองน้ำออกแล้วเติมน้ำให้ครบ 500 มล. จึงพร้อมนำไปตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยที่มีชีวิตและตาย

สำหรับวิธีการที่เก็บในสูตรดินผง เปิดถุงพลาสติก คลุกดินผสมให้ทั่ว ตักส่วนผสม 5 กรัม ใส่ในภาชนะเติมน้ำให้ครบ 500 มล. ซึ่งพร้อมจะนำไปตรวจวัด pH และตรวจนับปริมาณไส้เดือนฝอยอีก 5 กรัม นำไปวัดความชื้นด้วยเครื่อง moisture analyzer

ทำการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในทุกวิธีการโดยทดสอบกับหนอนกิ้งรังฝ้าย 5 ใช้ไส้เดือนฝอย 200 ตัว ต่อหนอน 10 ตัว ในจานพลาสติกที่มีฝาปิด (เส้นผ่าศูนย์กลาง 9 ซม.) นำเก็บที่อุณหภูมิห้อง ครบ 48 ชั่วโมง ทำการตรวจนับจำนวนหนอนที่ตายในแต่ละวิธีการ

การบันทึกข้อมูล

- บันทึกเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในทุกวิธีการ ตามแผนการทดลอง

- บันทึกเปอร์เซ็นต์ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่ทำให้หนอนกิ้งรังฝ้ายตายในทุกวิธีการ ตามแผนการทดลอง

- บันทึกความชื้น และระดับความเป็นกรด-ด่างในดินผสมที่เก็บไส้เดือนฝอยที่เก็บในรูปแบบผง

การวิเคราะห์ข้อมูล

- ใช้โปรแกรม IRRISTAT

ผลการทดลอง

ที่ 7^๐ซ ในช่วงการเก็บรักษา 3 เดือนแรก เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยทั้งในดินผง และฟองน้ำไม่แตกต่างกันทางสถิติ (Table 1) แต่อย่างไรก็ตามการเก็บในดินผง (94.3-98.6%) มีแนวโน้มสูงกว่าการเก็บในรูปฟองน้ำ (92.7-96.7%) เนื่องจากในช่วงเดือนแรกนั้น การเก็บในฟองน้ำ มีอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยลดลง (3.3%) สูงกว่าการเก็บในดินผง ซึ่งมีอัตราการลดลงเพียง 1.4% หลังจากนั้น (เดือนที่ 2 และ 3) มีการลดลงในอัตราที่ใกล้เคียงกัน ในเดือนที่ 4 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินผง (92.8%) สูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ (89.5%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยิ่งเก็บนานขึ้นในเดือนที่ 5 และ 6 ความแตกต่างระหว่างการเก็บทั้ง 2 รูปแบบ ยิ่งมากขึ้นจนมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ และเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในช่วง 3 เดือนหลังนี้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากการเก็บใน 2 เดือนแรก จะเห็นได้ว่า ในเดือนที่ 6 การเก็บในดินผง มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยยังอยู่ในระดับที่สูงถึง 90.1% ส่วนเก็บในฟองน้ำอยู่ในระดับ 84.8% สำหรับประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยหลังการเก็บในดินผง และฟองน้ำช่วง 5 เดือนแรก (Table 4) ไม่แตกต่างทางสถิติ แต่การเก็บในดินผงจะมีแนวโน้มสูงกว่า พอถึงเดือนที่ 6 การเก็บทั้ง 2 รูปแบบ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยที่การเก็บในดินผงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอน 91.1% ส่วนที่เก็บในฟองน้ำมีประสิทธิภาพ 86.9%

ที่ 25^๐ซ ช่วงการเก็บรักษา 2 สัปดาห์แรก เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บทั้ง 2 รูปแบบ (Table 2) ไม่แตกต่างกันทางสถิติ พอถึงสัปดาห์ที่ 4-6 อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในดินผง (83.7-95.3%) สูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ (79.5-90.3%) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละสัปดาห์) อย่างไรก็ตามการเก็บในช่วงระยะเวลานานขึ้นตั้งแต่ 8-12 สัปดาห์ อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในดินผง (53.5-76.7%) มีแนวโน้มสูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ (50.5-73.2%) ถึงแม้จะไม่แตกต่างทางสถิติ การเก็บในสูตรดินผง อัตราการลดลงระหว่างสัปดาห์ที่ 2 และ 4 ไม่แตกต่างทางสถิติ หลังจากนั้นทุกๆ 2 สัปดาห์ อัตราการอยู่รอดแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกัน เช่นเดียวกับการเก็บในฟองน้ำ ซึ่งการลดลงเริ่มตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 เกิดขึ้นก่อนการเก็บในดินผง หลังจากสัปดาห์ที่ 6 การเก็บทั้ง 2 วิธีการ มีอัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน จนถึงสัปดาห์ที่ 12 การเก็บในสูตรดินผงและฟองน้ำ อัตราการอยู่รอดเหลือที่ระดับ 53.5% และ 50.5% ตามลำดับ ส่วนประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิตจากการเก็บรักษาในสูตรดินผงและฟองน้ำ ในช่วง 2 สัปดาห์ ที่ 25^๐ซ นี้ (Table 5) อยู่ในระดับ 98.9 และ 97.8% ตามลำดับ ไม่แตกต่างกันทางสถิติ เมื่อเก็บรักษานานขึ้นตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4-12 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงจะสูงกว่าการเก็บในฟองน้ำอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยในดินผงเริ่มลดลงในอัตราสูงอยู่ที่ระดับ 92.2% ในสัปดาห์ที่ 6 และแตกต่างจาก 2 สัปดาห์แรกอย่างมีนัยสำคัญ แต่ในสัปดาห์ที่ 8-12 ประสิทธิภาพลดลงทุกๆ 2 สัปดาห์ และแตกต่าง

ระหว่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนการเก็บในฟองน้ำนอกจากการลดลงของประสิทธิภาพในอัตราที่สูงกว่าแล้ว การลดลงยังเริ่มก่อนที่สัปดาห์ที่ 4 ซึ่งมีประสิทธิภาพ 86.7% แตกต่างจากสัปดาห์แรกอย่างมีนัยสำคัญ หลังจากนั้น ประสิทธิภาพลดลงทุก 2 สัปดาห์ และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกัน ตั้งแต่ 6-12 สัปดาห์

ที่ 30°C ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษา 5 สัปดาห์ ไล้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอดในสูตรดินผงอยู่ระหว่าง 82.5-98.3% ซึ่งสูงกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติกับการเก็บในฟองน้ำซึ่งมีค่าอยู่ระหว่าง 73.3-83.1% (Table 3) เมื่อเปรียบเทียบการเก็บในระยะเวลาเดียวกัน พอถึงสัปดาห์ที่ 6 อัตราการรอดชีวิตของทั้ง 2 วิธีการลดลงมาอยู่ในระดับใกล้เคียงกันระหว่าง 70.3-71.8% การลดลงของอัตราการรอดชีวิตของไล้เดือนฝอยที่เก็บในดินผง ในช่วงสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ลดลงในอัตราต่ำลงมาที่ระดับใกล้เคียงกันคือ 98.3 และ 97.6% ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 3 และ 4 ลดลงมาอยู่ที่ระดับ 92.7-94.5% เมื่อเก็บนานขึ้นการอยู่รอดยังลดลงในอัตราที่สูงลงมาอยู่ที่ระดับ 82.5% ในสัปดาห์ที่ 5 และ 71.8% ในสัปดาห์ที่ 6 การลดลงในแต่ละช่วงมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการเก็บในฟองน้ำอัตราการอยู่รอดลดลงในอัตราที่สูง ซึ่งต่างจากการเก็บในสูตรดินผง ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 ลดลงอยู่ในระดับใกล้เคียงกัน 83.1 และ 81.1% ตามลำดับ ในสัปดาห์ที่ 3 ลดลงมาอยู่ที่ระดับ 78.2% ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับเดือนแรก ในสัปดาห์ที่ 4 และ 5 ลดลงในอัตราต่ำมาอยู่ที่ระดับใกล้เคียงกัน คืออยู่ระหว่าง 73.3-75.0% ส่วนในสัปดาห์ที่ 6 อยู่ในระดับ 70.3% การลดลงตั้งแต่สัปดาห์ที่ 4 จะแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก 3 เดือนแรก ส่วนประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอยที่เก็บในดินผงที่ 30°C นั้นสูงกว่าที่เก็บในฟองน้ำอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ (Table 6) ตลอดระยะเวลาการเก็บ 6 สัปดาห์ จะเห็นได้จากในสัปดาห์แรกการเก็บในดินผงลดลงอยู่ในระดับ 97.8% ส่วนในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 ประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอยลดลงมาอยู่มาในระดับใกล้เคียงกัน คือ 93.3 และ 91.1% ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากสัปดาห์แรก เมื่อเก็บเป็นระยะเวลานานขึ้นถึงสัปดาห์ที่ 4 5 และ 6 ประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอยลดลงในอัตราค่อนข้างสูงกว่าในช่วง 3 สัปดาห์แรก และแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ไล้เดือนฝอยที่เก็บเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ มีประสิทธิภาพเหลือ 77.4% จะเห็นได้ว่า การเก็บในสูตรดินผงบ้นนั้นมีการเปลี่ยนแปลงใกล้เคียงกับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไล้เดือนฝอย ส่วนวิธีการเก็บในฟองน้ำ ในสัปดาห์แรกประสิทธิภาพลดลงในอัตราที่สูงมาก โดยลดลงมาอยู่ในระดับ 85.6% เช่นเดียวกับในสัปดาห์ที่ 2 และ 3 อัตราการลดลงก็ยังสูงอยู่ ประสิทธิภาพของไล้เดือนฝอยที่เก็บในสัปดาห์ที่ 3 อยู่ในระดับ 56.7% จะเห็นได้ว่าช่วงสัปดาห์ที่ 3 และ 4 นั้น ถือเป็นช่วงที่มีอัตราการลดลงน้อยมากจนไม่แตกต่างทางสถิติ ส่วนช่วงระหว่างสัปดาห์ที่ 4 5 และ 6 ประสิทธิภาพลดลงในอัตราที่ช้ากว่า 3 เดือนแรก และแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยในเดือนที่ 6 ไล้เดือนฝอยมีประสิทธิภาพต่ำสุดเพียง 36.7%

วิจารณ์ผลการทดลอง

ที่ 7[°]ซ อุณหภูมิต่ำ สามารถยืดอายุ (shelf life) การเก็บรักษาไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้นานขึ้น โดยที่เก็บในดินผงมีอัตราการอยู่รอดและมีประสิทธิภาพสูงกว่า 90% ตลอดระยะเวลาเก็บ 6 เดือน อุณหภูมิระดับนี้เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไส้เดือนฝอยชนิดนี้ เนื่องจากมันมีถิ่นกำเนิดในเขตที่มีอุณหภูมิต่ำ (Grewal *et al.*, 1994) นอกจากนี้อุณหภูมิต่ำยังทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวช้า หรือน้อยลง กระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นช้า การเผาผลาญไขมันที่เก็บสะสมเพื่อไปใช้เป็นพลังงานในการดำรงชีวิตก็ดำเนินไปอย่างช้าๆ เช่นกัน ทำให้มีไขมันเหลือเก็บไว้ใช้ได้ยาวนาน สามารถยืดอายุการเก็บได้ นอกจากนี้ไส้เดือนฝอยในดินผงนั้นจะอาศัยอยู่ระหว่างอนุภาคดิน ความชื้นรอบตัวมันจะถูกดูดซับโดยดินทำให้การเคลื่อนไหวช้าลง ส่วนการเก็บในฟองน้ำถึงแม้เก็บในอุณหภูมิที่ 7[°]ซ ก็ตาม ไส้เดือนฝอยอาศัยในรูพรุนของฟองน้ำซึ่งมีความชื้นสูงเกือบ 100% ทำให้ไส้เดือนฝอยเคลื่อนไหวได้ดีมากกว่าการอาศัยในดิน พลังงานที่เก็บสะสมไว้จะถูกใช้หมดเร็วขึ้น เห็นได้จากอัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในฟองน้ำสูงใกล้เคียงกับการเก็บในสูตรดินในช่วงการเก็บ 3 เดือนแรก และประสิทธิภาพเท่าเทียมกันในช่วง 5 เดือนแรกเท่านั้น แต่หลังจากนั้นโดยเฉพาะในเดือนที่ 4 5 และ 6 อัตราการรอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในฟองน้ำลดลงในอัตราที่สูงกว่าการเก็บในสูตรดินผง เนื่องจากมีอัตราเมตาบอลิซึม อัตราการหายใจใช้ O₂ ในปริมาณมากจึงไม่เพียงพอของเสียขับถ่ายออกมาละลายอยู่ในน้ำ เมื่อมีมากขึ้นก็จะเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยเอง แต่การเก็บในดินผงนั้น ดินสามารถดูดซับของเสียที่ไส้เดือนฝอยขับถ่ายออกมา จึงลดการเป็นพิษ นอกจากนี้การเก็บในสูตรดินผงนั้นยังมีปัจจัยอื่นได้แก่ pH และความชื้นที่ได้ทำการวัดในช่วงการเก็บตลอดระยะเวลา 6 เดือน จาก Fig. 1 การเปลี่ยนแปลง pH อยู่ในช่วง 6.9-7.0 ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อไส้เดือนฝอย ส่วนการเปลี่ยนแปลงความชื้น (Fig. 2) ในช่วงการเก็บ 3 เดือนแรกอยู่ระหว่าง 37.1-38.2% (สูญเสียความชื้น 1.8-2.9%) และในเดือนที่ 4 และ 5 มีความชื้น 35.4 และ 34.3% หรือสูญเสียความชื้น 4.6 และ 5.7% ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าการสูญเสียความชื้นในช่วงเดือนที่ 4-5 นั้นค่อนข้างสูงอาจมีผลกระทบต่ออัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยบ้าง แต่ไม่มากนักเนื่องจากการเก็บที่ในอุณหภูมิต่ำ

ที่ 25 และ 30[°]ซ อุณหภูมิสูงระดับนี้ไม่เหมาะสมต่อไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* เนื่องจากมันมีแหล่งกำเนิดในเขตที่มีอุณหภูมิต่ำ (Grewal *et al.*, 1994) ณ ที่อุณหภูมิสูงกระบวนการเมตาบอลิซึมมีสูง ไขมันที่สะสมไว้หมดไปอย่างรวดเร็วเพราะถูกนำไปใช้เป็นพลังงานมากขึ้น ในขณะที่เดียวกันมีการใช้ O₂ ซึ่งมีอยู่จำกัดจึงไม่เพียงพอ CO₂ และของเสียถูกปล่อยออกมาแทน ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อการดำรงชีพของไส้เดือนฝอยในช่วงการเก็บเป็นอย่างมาก และสภาพเหล่านี้จะเกิดขึ้นกับไส้เดือนฝอยที่เก็บในฟองน้ำในระดับที่สูงกว่าการเก็บในสูตรดินผง ความแตกต่างของคุณสมบัติของวัสดุที่ใช้เก็บตามที่กล่าวมาแล้ว ดินผงสามารถดูดซับของเสียที่ขับถ่ายออกมาลด

อันตรายจากความเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอย ส่วนฟองน้ำซึ่งมีความชื้นสูง ไม่สามารถดูดซับได้ดังเช่น
 สูตรดินผง ของเสียดจึงผสมปะปนอยู่ในน้ำ ยิ่งมีความเข้มข้นมากยิ่งเป็นพิษต่อไส้เดือนฝอยมาก
 นอกจากนี้อุณหภูมิของน้ำที่ถูกดูดซับในชั้นฟองน้ำจะเปลี่ยนแปลงตามอุณหภูมิภายนอกอย่างรวดเร็ว
 ซึ่งแตกต่างกับดินผงที่สามารถปกป้องไส้เดือนฝอยจากผลกระทบต่ออุณหภูมิสูงภายนอกอุ้งบรรจุได้
 ทำให้อุณหภูมิไม่เปลี่ยนแปลงเร็วเกินไป จากปัจจัยดังกล่าวทั้งหมดนี้ทำให้อัตราการอยู่รอดและ
 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินผงสูงกว่าการเก็บในฟองน้ำในช่วงระยะเวลา 6 เดือน
 อย่างไรก็ตามการเก็บในดินผง (Fig. 1) มีการเปลี่ยนแปลง pH ในช่วงการเก็บ 12 สัปดาห์ มีค่าอยู่
 ระหว่าง 7.3-7.1 ที่ระดับ 25°C และ 6 สัปดาห์ มีค่า 6.9-7.1 ที่ 30°C ซึ่งไม่มีผลกระทบต่อการ
 ดำรงชีวิตของไส้เดือนฝอย ส่วนการเปลี่ยนแปลงความชื้นในช่วงการเก็บ 6 สัปดาห์ พบว่า การเก็บที่
 ระดับอุณหภูมิ 25°C มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 35.3-38.6% (สูญเสียความชื้นอยู่ระหว่าง 1.4-
 4.7%) ส่วนการเก็บที่ 30°C (Fig. 2) ช่วง 6 สัปดาห์ มีการเปลี่ยนแปลงอยู่ระหว่าง 32.6-38.0%
 (สูญเสียความชื้น 2.0-7.4%) การสูญเสียความชื้นนี้เป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลกระทบต่้อัตราการอยู่รอด
 ประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ซึ่งในการเก็บที่ 30°C มีค่าต่ำกว่าที่ 25°C เนื่องจากการสูญเสีย
 ความชื้นมากกว่า ส่วนสภาพการเก็บหลังจากสัปดาห์ที่ 6 โดยได้ทดลองที่ระดับอุณหภูมิ 25°C เก็บ
 ข้อมูลจนครบ 12 สัปดาห์ จะเห็นได้ว่าการเก็บในสูตรดินผง มีการสูญเสียความชื้น (Fig. 2) ในช่วง
 สัปดาห์ที่ 8-12 อยู่ระหว่าง 5.8-8.2% ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญทำให้อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอย
 ลดลงในอัตราที่สูงใกล้เคียงกับการเก็บในฟองน้ำ ส่วนประสิทธิภาพได้รับผลกระทบน้อยกว่ายังมีค่า
 สูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ

จากการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า การเก็บรักษาไส้เดือนฝอยในสูตรดินผงสามารถนำมา
 ทดแทนการเก็บในฟองน้ำ ซึ่งจะทำให้สะดวกต่อการนำไปใช้ การขนส่ง และยังอาจลดต้นทุน
 ผลิตรักษาลงได้

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดลองเปรียบเทียบอัตราการอยู่รอด และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ที่เก็บรักษาในสูตรดินผง และในฟองน้ำ สามารถสรุปได้ว่าการเก็บในสูตรดินผง ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอดและประสิทธิภาพสูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ ที่ทุกระดับอุณหภูมิ 7 °C และ 30 °C เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงเวลาเดียวกัน โดยที่อุณหภูมิ 7 °C เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมที่สุดในการเก็บไส้เดือนฝอย ดังนี้คือ

ที่ 7 °C ในช่วง 3 เดือนแรก อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงและในฟองน้ำ มีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 92.7-98.6% แต่หลังจากนั้น (4-6 เดือน) การเก็บในสูตรดินผง ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด (90.1-92.8%) สูงกว่าการเก็บในฟองน้ำ (84.8-89.5%) ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในช่วง 5 เดือนแรก การเก็บในสูตรดินผงและฟองน้ำ มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงใกล้เคียงกันอยู่ระหว่าง 88.9-100% แต่พอถึงเดือนที่ 6 จะเห็นความแตกต่างว่า ไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงมีประสิทธิภาพสูง (91.0%) กว่าที่เก็บในฟองน้ำ (86.7%)

ที่ 25 °C ในช่วง 2 สัปดาห์แรก อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงและในฟองน้ำมีค่าใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 95.5-98.3% หลังจากนั้น 4-6 สัปดาห์ เริ่มเห็นความแตกต่าง โดยที่เก็บในดินผง ไส้เดือนฝอยมีอัตราการอยู่รอด (83.7-95.3%) สูงกว่าที่เก็บในฟองน้ำ (79.5-90.3%) แต่พอสัปดาห์ที่ 8-12 อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยในการเก็บทั้ง 2 วิธีการไม่แตกต่างกัน (50.5-76.7%) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงสัปดาห์ ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ในช่วง 2 สัปดาห์แรก การเก็บในสูตรดินผงและฟองน้ำ ประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 97.8-98.9% หลังจากนั้น (สัปดาห์ที่ 4-12) ไส้เดือนฝอยที่เก็บในดินผงจะมีประสิทธิภาพสูง (56.7-98.9%) กว่าที่เก็บในฟองน้ำ (48.9-86.7%) เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงสัปดาห์

ที่ 30 °C การเก็บรักษาในช่วง 1-5 สัปดาห์ อัตราการอยู่รอดของไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงสูง (82.5-98.3%) กว่าที่เก็บในฟองน้ำ (73.3-83.1%) แต่พอถึงสัปดาห์ที่ 6 ไส้เดือนฝอยที่เก็บในทั้ง 2 วิธี อัตราการอยู่รอดใกล้เคียงกัน อยู่ระหว่าง 70.3-71.8% ส่วนประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ตลอดช่วงเวลากการเก็บ 1-6 สัปดาห์ ไส้เดือนฝอยที่เก็บในสูตรดินผงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง อยู่ระหว่าง 74.4-97.8% ซึ่งสูงกว่าที่เก็บในฟองน้ำ ซึ่งมีประสิทธิภาพอยู่ระหว่าง 36.7-85.6% เมื่อเปรียบเทียบในแต่ละช่วงสัปดาห์ของทั้ง 2 วิธีการ

ฉะนั้นการเก็บไส้เดือนฝอยให้มีอายุยืนนาน (shelf life) โดยมีอัตราการอยู่รอดไม่ต่ำกว่า 90% และประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่เปลี่ยนแปลงนั้น

ที่ 7 °C shelf life ของไส้เดือนฝอยเก็บในสูตรดินผงได้ 6 เดือน เก็บในฟองน้ำได้ 4 เดือน

ที่ 25°C shelf life ของไส้เดือนฝอยเก็บในสุตรดินผงได้ 4 สัปดาห์ หรือ 1 เดือน เก็บใน
ฟองน้ำได้ 2 สัปดาห์

ที่ 30°C shelf life ของไส้เดือนฝอยเก็บในสุตรดินผงได้ 4 สัปดาห์ หรือ 1 เดือน เก็บใน
ฟองน้ำได้ต่ำกว่า 1 สัปดาห์

Table 1 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 6 months at 7°C.

Month	% Survival of entomopathogenic nematode in different formulations		Diff.
	Powder formula	Sponge	
1 st	98.6 a	96.7 a	1.9 ns
2 nd	96.7 ab	94.4 ab	2.3 ns
3 rd	94.3 bc	92.7 bc	1.7 ns
4 th	92.8 cd	89.5 cd	3.3 *
5 th	92.9 cd	88.2 d	4.6 **
6 th	90.0 d	84.8 e	5.2 **

CV = 2.0%

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

* In a row, means between columns significantly different at 5% level.

** In a row, means between columns significantly different at 1% level. ns = not significantly

Table 2 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 12 weeks at 25°C.

Week	% Survival of entomopathogenic nematode in different formulations		Diff.
	Powder formula	Sponge	
2 nd	98.3 a	95.5 a	2.8 ns
4 th	95.3 a	90.3 b	5.0 *
6 th	83.7 b	79.5 c	4.2 *
8 th	76.7 c	73.2 d	3.5 ns
10 th	69.2 d	66.1 d	3.1 ns
12 th	53.5 e	50.5 f	3.0 ns

CV = 2.9%

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

* In a row, means between columns significantly different at 5% level. ns = not significantly

Table 3 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 6 weeks at 30°C.

Week	% Survival of entomopathogenic nematode in different formulations		Diff.
	Powder formula	Sponge	
1 st	98.3 a	83.1 a	15.3 **
2 nd	97.6 a	81.1 ab	16.5 **
3 rd	94.5 b	78.2 b	16.2 **
4 th	92.2 b	75.0 c	17.7 **
5 th	82.5 c	73.3 c	9.2 **
6 th	71.8 d	70.3 d	1.4 ns

CV = 2.1%

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

** In a row, means between columns significantly different at 1% level. ns = not significantly

Table 4 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 6 months at 7°C.

Month	% Mortality of <i>G. mellonella</i> by <i>S. carpocapsae</i>		Diff.
	Powder formula	Sponge	
1 st	100.0 a	100.0 a	0.0 ns
2 nd	97.8 a	95.6 b	2.2 ns
3 rd	94.4 b	94.4 b	0.0 ns
4 th	93.3 b	91.1 c	2.2 ns
5 th	91.1 b	88.9 cd	2.2 ns
6 th	91.1 b	86.7 d	4.4 **

CV = 1.9%

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

** In a row, means between columns significantly different at 1% level. ns = not significantly

Table 5 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 12 weeks at 25°C.

Week	% Mortality of <i>G. mellonella</i> by <i>S. carpocapsae</i>		Diff.
	Powder formula	Sponge	
2 nd	98.9 a	97.8 a	1.1 ns
4 th	98.9 a	86.7 b	12.2 **
6 th	92.2 b	78.9 c	13.3 **
8 th	83.3 c	74.4 d	8.9 **
10 th	66.7 d	54.4 e	12.2 **
12 th	56.7 e	48.9 f	7.8 **

CV = 2.9%

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

** In a row, means between columns significantly different at 1% level. ns = not significantly

Table 6 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formulation and in moist sponge during 6 weeks at 30°C.

Week	% Mortality of <i>G. mellonella</i> by <i>S. carpocapsae</i>		Diff.
	Powder formula	Sponge	
1 st	97.8 a	85.6 a	12.2 **
2 nd	93.3 b	71.1 b	22.2 **
3 rd	91.1 b	56.7 c	34.4 **
4 th	86.7 c	53.3 c	33.3 **
5 th	78.9 d	42.2 d	36.7 **
6 th	74.4 e	36.7 e	37.8 **

CV = 3.6%

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

** In a row, means between columns significantly different at 1% level.

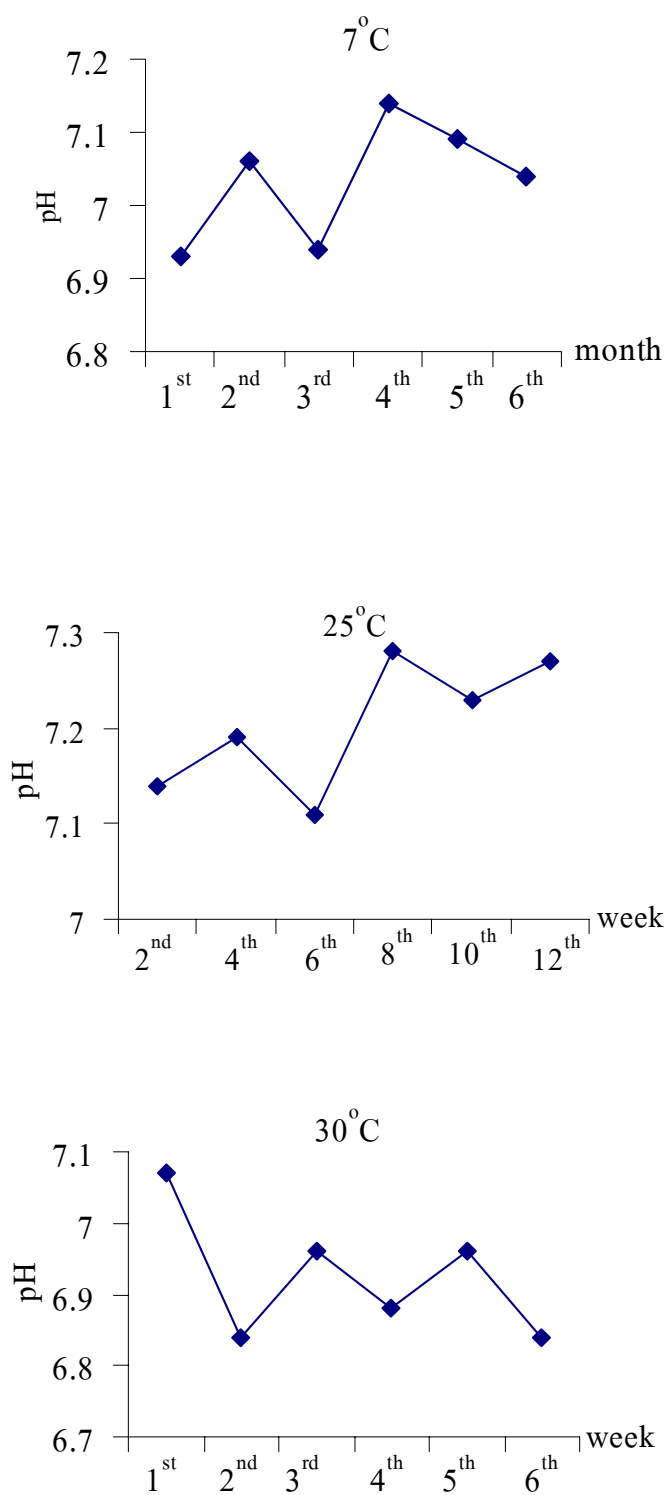


Figure 1 pH level in the powder formulation maintaining entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* at 7, 25 and 30°C.

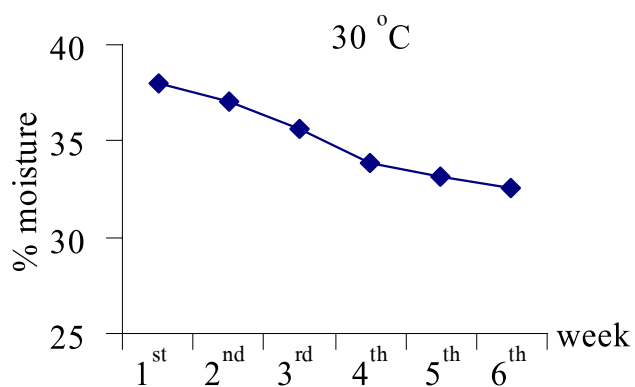
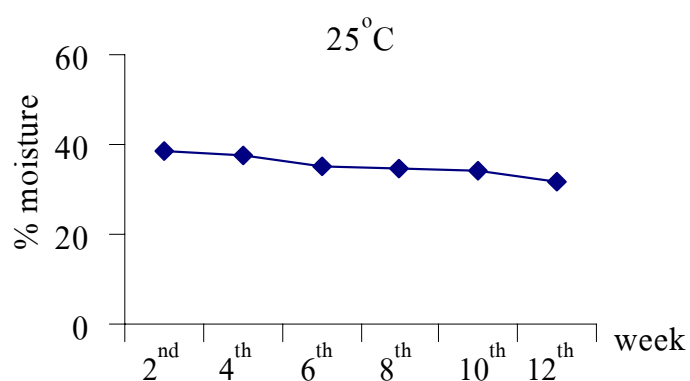
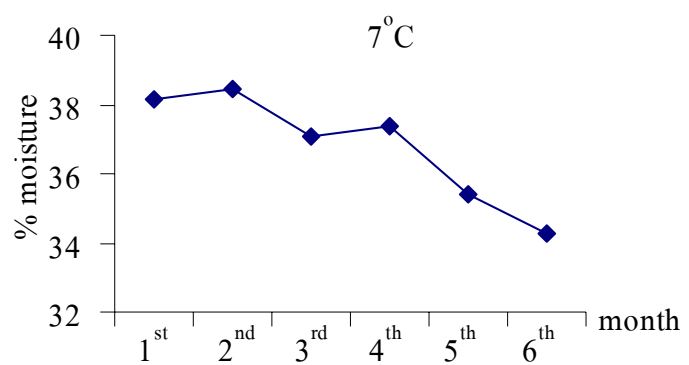


Figure 2 Comparative moisture percentage in the powder formulation maintaining entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* at 7, 25 and 30°C.

เอกสารอ้างอิง

- วัชรวิ สมสุข. 2544. "ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง. ใน: เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร. หน้า 209-244.
- Grewal, P.S., Selvan, S. and Gaugler, R. 1994. Thermal adaptation of entomopathogenic nematodes: Niche breadth for infection, establishment, and reproduction. *Journal of Thermal Biology* 19:245-253.

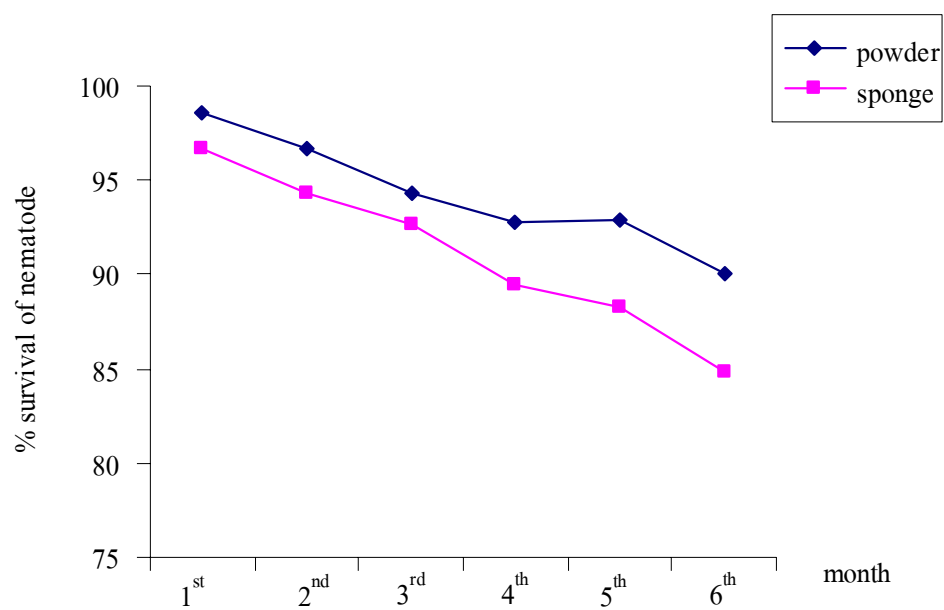


Fig.1 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 6 months at 7°C

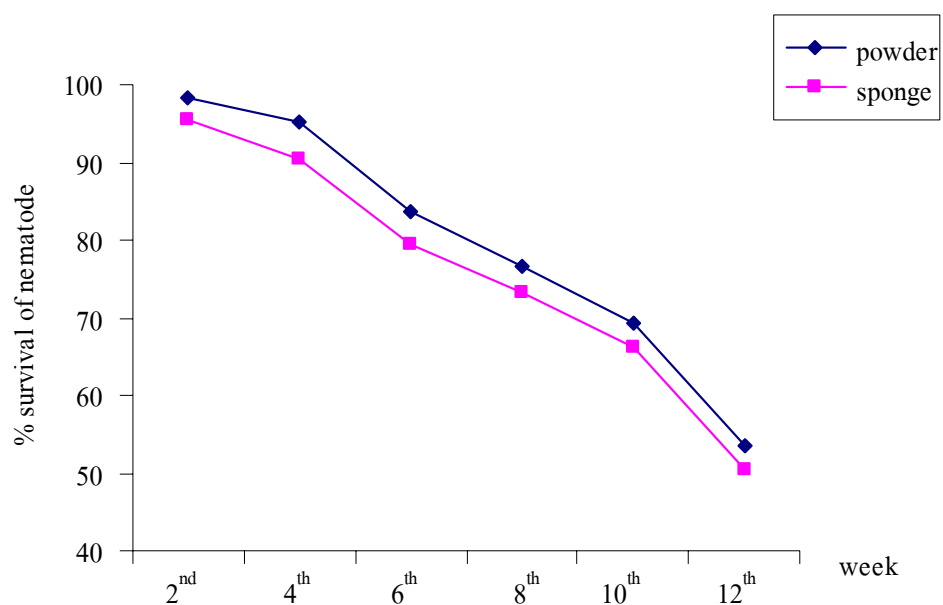


Fig. 2 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 12 weeks at 25°C

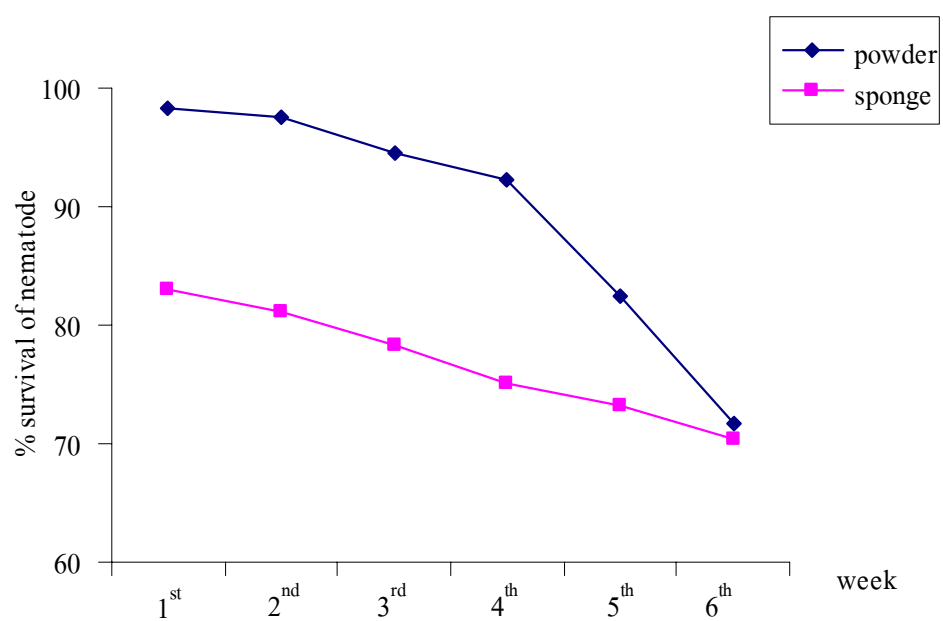


Fig. 3 Comparative survival percentage of entomopathogenic nematode *S. carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 6 weeks at 30°C

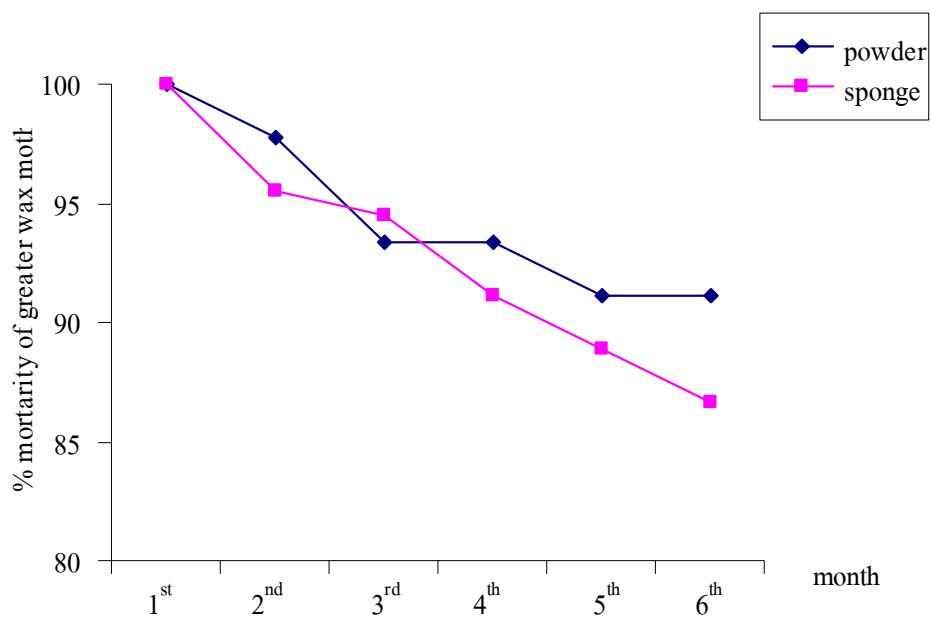


Fig. 4 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 6 months at 7°C

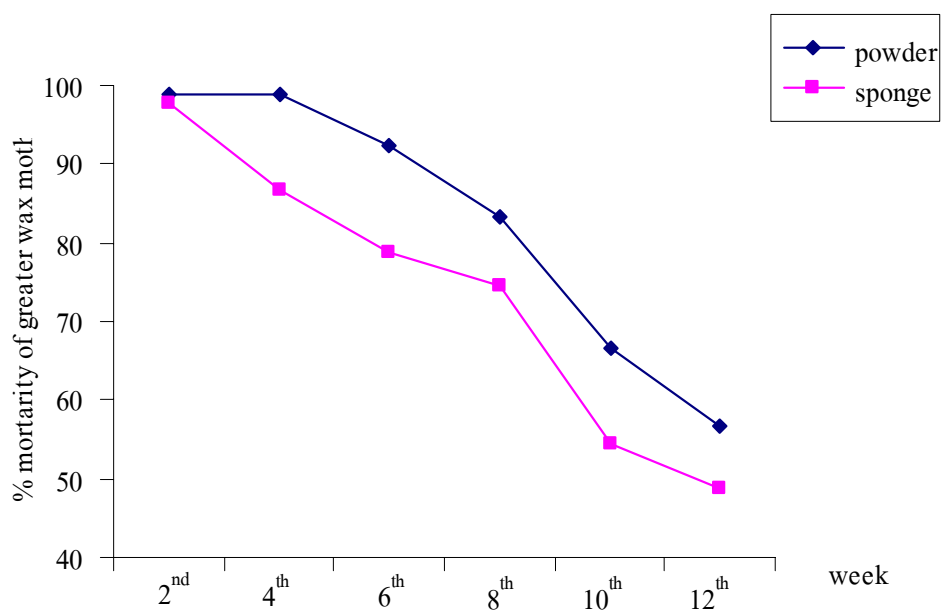


Fig. 5 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 12 weeks at 25°C

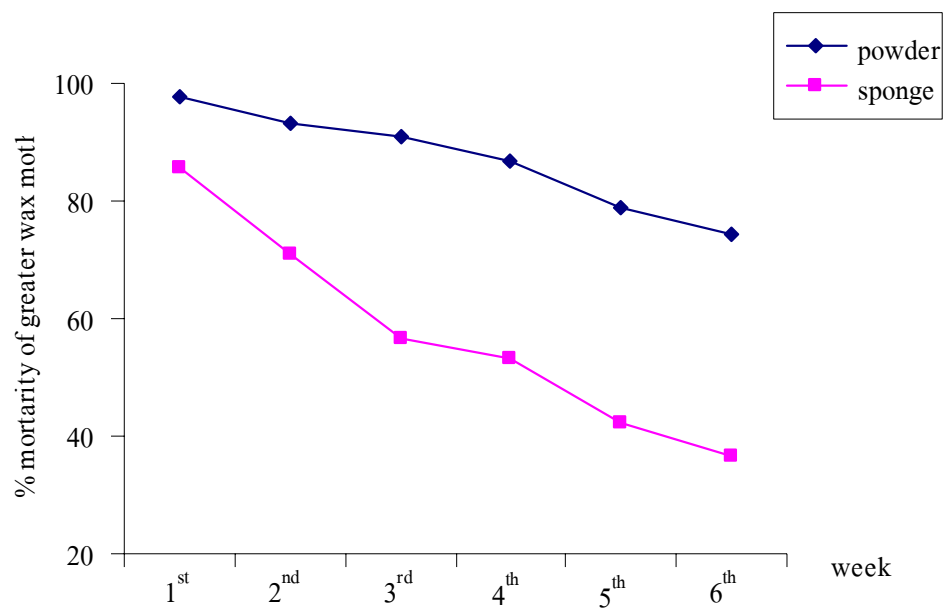


Fig. 6 Comparative mortality percentage of greater wax moth caused by entomopathogenic nematode *Steinernema carpocapsae* maintained in powder formula and in sponge during 6 weeks at 30°C.

2.6 ต้นทุนการบรรจุไส้เดือนฝอยสูตรดินผงเป็นผลิตภัณฑ์ (บรรจุ 50 ถ้วย/กระป๋อง)

1. ต้นทุนสูตรสำเร็จดินผง 1 กระป๋อง

ดินผงสูตรสำเร็จบรรจุในกระป๋องพลาสติกขนาดปริมาตร = 311 ลบ.ซม.
 มีน้ำหนักดินผสม + ไส้เดือนฝอย = 100 กรัม/กระป๋อง
 ซึ่งประกอบด้วย

Attapulgate	35.68	กรัม
Zeolite	23.7	กรัม
Benzoic acid	0.4	กรัม
Ethylene glycol	0.5	มล.
ไส้เดือนฝอย	39.64	มล.

ราคาดัชนีเฉพาะดินผสม/กระป๋อง = 1.2 บาท

2. ต้นทุนไส้เดือนฝอยปริมาณ 50 ถ้วย/กระป๋อง

ราคาไส้เดือนฝอย 50 ถ้วย = 83.48 บาท (ต้นทุนการผลิตไส้เดือนฝอย)

3. ต้นทุนกระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม.

ราคาใบละ = 4.50 บาท

4. ต้นทุนสลากติดกระป๋องผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยขนาด (กxย) 8.5 x 21 ซม.

ราคาใบละ = 3.00 บาท

∴ รวมราคาผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยสูตรผง 1 กระป๋อง (1+2+3+4) = 92.18 บาท

ภาคผนวก I

สูตรอาหาร สูตรน้ำยาเคมี

อาหารเลี้ยงเชื้อ

Yeast Salt หรือ Ys broth (Akhurst 1980)

- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	0.5	g
- K_2HPO_4	0.5	g
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.2	g
- Yeast Extract	5.0	g
- NaCl	5.0	g
- Distilled water	1,000	ml

NBTA

- Nutrient agar	20	g
- Bromothymol blue	0.025	g
- Triphenyl tetrazolium chloride	0.04	g
- Distilled water	1,000	ml

อาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว (เพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณต้นเชื้อไส้เดือนฝอยบริสุทธิ์)

- อาหารสุนัข	99	g
- น้ำมันหมู	22	g
- น้ำกลั่น	331	ml
- ฟองน้ำ	36	g

น้ำยาเคมี

Ringer's solution

- NaCl	45	g
- KCl	2.1	g
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.85	g
- NaHCO_3	1	g
- Distilled water	5,000	ml

Steriled egg's solution

- 4 M NaOH (1.60 g + water 10 ml)	1.25	ml
- sodium Hypochlorite	1	ml
- Distilled water	7.75	ml

Hyamine's solution

- Hyamine	0.15	g
- Distilled water	100	ml

ภาคผนวก II

ราคา วัสดุ อาหาร และสารเคมี

ต้นทุน วัสดุอาหารเลี้ยงไส้เดือนฝอย

ราคาอาหารเหลวสูตร Tsb₃

- Tryptic soy broth	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา 1,510 บาท
- Yeast cell	1 ถุง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา 190 บาท
- ไข่ไก่ เบอร์ 0	30 ฟอง		ราคา 99 บาท
- น้ำมันข้าวโพด	1 ขวด	บรรจุ 1 ลิตร	ราคา 140 บาท

ราคาอาหารเทียมกึ่งแข็งกึ่งเหลว

- อาหารสุนัข	1 กระสอบ	น้ำหนัก 20 กก.	ราคา 10,000 บาท
- น้ำมันหมู		1 กก.	ราคา 40 บาท
- ฟองน้ำ (ตัดชิ้นขนาด 1 ลบ.ซม.)		36 กรัม	ราคา 92.64 บาท

ราคาออกซิเจน	ขนาด 2,000 ปอนด์/ถัง	ราคา 100 บาท
--------------	----------------------	--------------

ต้นทุนสารเคมี

ราคาสาร Steriled egg's solution

- 4 M NaOH	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 1,000 กรัม	ราคา 345 บาท
- sodium Hypochlorite	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 1,000 กรัม	ราคา 1,840 บาท

ราคาสาร Ringer's solution

- NaCl	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา 300 บาท
- KCl	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 1,000 กรัม	ราคา 655 บาท
- CaCl ₂ · 2H ₂ O	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 1,000 กรัม	ราคา 830 บาท
- NaHCO ₃	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 1,000 กรัม	ราคา 380 บาท

ต้นทุนอาหารเลี้ยงเชื้อ

ราคาอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA

- Nutrient agar	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	3,305	บาท
- Bromothymol blue	1 ขวด	น้ำหนัก 5 กรัม	ราคา	1,650	บาท
- Triphenyl tetrazolium chloride	1 ขวด	น้ำหนัก 10 กรัม	ราคา	1,150	บาท

ราคาอาหาร Ys broth เลี้ยงแบคทีเรียรวมอาศัย

- $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	650	บาท
- K_2HPO_4	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	580	บาท
- $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	690	บาท
- Yeast Extract	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	1,570	บาท
- NaCl	1 กระป๋อง	น้ำหนัก 500 กรัม	ราคา	300	บาท

ภาคผนวก III

ต้นทุนวัสดุทำสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยสูตรผงบรรจุกระป๋อง

ต้นทุนวัสดุทำสูตรสำเร็จไส้เดือนฝอยสูตรผง

ราคาต้นทุนวัสดุที่ใช้สำหรับทำไส้เดือนฝอยสูตรดินผง

Attapulgate	บรรจุ	50	ปอนด์	ราคา	600	บาท (1 กก. = 26.40 บาท)
Zeolite	กระสอบ	20	กก.	ราคา	180	บาท (1 กก. = 9 บาท)
Benzoic acid	บรรจุ	1	กก.	ราคา	300	บาท
Ethylene glycol	บรรจุ	25	ลิตร	ราคา	1,600	บาท

ต้นทุนกระป๋องพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 ซม. สูง 11 ซม. พร้อมฝาปิด

ถัง 1 pack	1,500	ใบ	ราคา	6,750	บาท
ราคาใบละ				4.50	บาท

ต้นทุนสลากติดกระป๋องผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยขนาด (กxย) 8.5 x 21 ซม.

(สั่งพิมพ์ครั้งละ 3,000 ใบ)	ราคาใบละ	3.00	บาท
-----------------------------	----------	------	-----



ผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง
สูตรผงละลายน้ำ

ภาคผนวก IV

ต้นทุนการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*)

ศักยภาพการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง สำหรับใช้ในห้องปฏิบัติการได้เดือนฝอยศัตรูแมลง
ของกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ

ในเวลา 1 เดือน สามารถผลิตหนอนวัย 5 ได้ จำนวน = 12,000 ตัว

รายละเอียดต้นทุนการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง ประกอบด้วย

1. ต้นทุนอาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง

สูตรอาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 1 สูตร ประกอบด้วย

- ถั่วเขียว	2	กิโลกรัม	72	บาท
- แป้งข้าวโพด	3	กิโลกรัม	81	บาท
- ปลาช่อน	2	กิโลกรัม	28	บาท
- นมผง	700	กรัม	150	บาท
- แผลนึ่ง	9	แผ่น ($\approx$ 2 กิโลกรัม)	198	บาท
- น้ำผึ้ง	1	ลิตร	70	บาท
- กลีเซอริน	1	ลิตร	135	บาท
- วิตามิน	1	ขวด (120 มล.)	55	บาท
- น้ำ	1.5	ลิตร		

รวมอาหารน้ำหนัก 17 กิโลกรัม = 789 บาท

$\therefore$ อาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 1 กิโลกรัม = 50 บาท (46.41 บาท)

ปริมาณการเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 3,000 ตัว ใช้อาหารประมาณ = 4.5 กิโลกรัม

ใน 1 เดือน เพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้งได้ จำนวน 12,000 ตัว

ใช้อาหารประมาณ = 18 กิโลกรัม

$\therefore$ ใน 1 เดือน ต้นทุนอาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง = 900 บาท

2. ต้นทุนแรงงาน

เจ้าหน้าที่วุฒิ ปวส. 1 อัตรา พร้อมค่าล่วงเวลา = 10,000 บาท/เดือน

3. ค่าใช้จ่ายอื่นๆ (ค่าน้ำ ค่าไฟ ค่าเสื่อมราคาครุภัณฑ์)

$$\begin{aligned}
 &\text{คิด 60\% ของต้นทุนอาหาร+แรงงาน} &= & \frac{900+10,000 \times 60}{100} \\
 & &= & 6,540 \text{ บาท} \\
 &\text{ใน 1 เดือน ต้นทุนการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 12,000 ตัว} &= & 900+10,000+6,540 \text{ บาท} \\
 & &= & 17,440 \text{ บาท} \\
 & &= & (1 + 2 + 3) \\
 &\therefore \text{ต้นทุนการเพาะเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว} &= & \mathbf{1.45 \text{ บาท}}
 \end{aligned}$$