วิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทนอุณหภูมิสูง *Steinernema riobrave* เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Research and development of Entomopathogenic Nematode, *Steinernema riobrave* for utilization in agriculture

วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี อิศเรส เทียนทัด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

วิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทนอุณหภูมิสูง *Steinernema riobrave* เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยรดำเนินการทดลอง ที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2552 โดย ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth โดยเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* จากหนอนกินรังผึ้งที่ได้รับการก่อโรคด้วยไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมงและแยกน้ำเลือด (heamolymp) หนอนไปขีดเป็นแนวบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA นาน 48 ชั่วโมง และคัดเลือกโคโลนีบริสุทธิ์ลงเลี้ยงในอาหาร YS broth เพื่อศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth นาน 24 ชม. แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้สูงถึง 10^8 และเมื่อนำแบคทีเรียไปลี้ยงในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอยสูตรมาตรฐาน Tsb3 พบว่า แบคทีเรียสามารถเพิ่มจำนวนได้ 10^5 10^7 และ 10^9 เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเทียมเป็นเวลานาน 24 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ และจากการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยอาหารเทียมสูตรอาหารมาตรฐานที่ใช้เลี้ยง *S. carpocapsae* พบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียนาน 48 ชั่วโมงก่อนการใส่ไส้เดือนฝอยลงเลี้ยง สามารถเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ร่วมกับแบคทีเรีย ได้ผลผลิต 5.0x10^6 ตัว แต่การเลี้ยงไส้เดือนฝอย โดยไม่ใส่แบคทีเรีย พบว่าไส้เดือนฝอยไม่สามารถพัฒนาจนครบวงจรชีวิตได้ และ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ตามสูตรมาตรฐานที่ใช้เลี้ยง *S. carpocapsae* ได้ เช่นเดียวกัน โดยต้องเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย แต่การเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพียงลำพังโดยไม่ใส่แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอยสามารถพัฒนาได้แต่ไม่ครบวงจรชีวิต และไม่สามารถเก็บผลผลิตได้

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-04-04-03-51

คำนำ

มีรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในเขตภูมิอากาศใกล้แถบร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มี *Xenorhabdus* sp. เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Poinar and Thomas, 1965) โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่เป็นพาหะนำแบคทีเรียเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไชผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปล่อยแบคทีเรียออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีความสามารถในการทนอุณหูมิสูงได้ถึง 35 ^{O}ซ จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 ^{O}ซ ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียม (สูตรอาหารสุนัขผสมฟองน้ำ) ที่ใช้เลี้ยง *S. carpocapsae* ได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง IJ ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง เช่นแบคทีเรียร่วมอาศัย การเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย รวมทั้งต้นเชื้อไส้เดือนฝอยที่นำมาใช้ เพื่อศึกษาผลของแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus* sp. ต่อผลผลิตและคุณภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตขยายในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobravee* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus* sp.
4. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์
5. เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
6. อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
7. สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine, KH_2PO_4 , NaCl ฯลฯ
8. วัสดุอื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคีบ

วิธีการ

ดำเนินการทดลอง 2 การทดลองย่อย คือ

<u>การทดลองที่ 1</u>. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus* sp. ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth (Yeast Salt Broth)

ทำการทดลองโดยแยกแบคทีเรียที่ได้จากหนอนกินรังผึ้งที่ก่อโรคด้วยไส้เดือนฝอยอัตรา 200 ตัว/หนอน 1 ตัว จากนั้น 24 ชั่วโมง ทำการตัดขาหนอน แล้วใช้ loop แตะเอาน้ำเลือดหนอน streak ลงบนอาหาร NBTA เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการคัดเลือก colony ที่สมบูรณ์นำลงเลี้ยงในอาหาร Ys broth ปริมาตร 150 มล. เขย่าเลี้ยงที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม จึงนำมาทดลอง ด้วยวิธีการ spread plate เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนเซลล์ที่สร้าง crystalline inclusion protein และทำการวัดค่าดูดกลืนแสงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ Ys broth ด้วยเครื่อง spectrophotometer

<u>การทดลองที่ 2</u>. เลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ทนอุณหภูมิสูง *S. riobrave* ด้วยอาหารเทียม ตามสูตร มาตรฐานของวัชรี และสุทธิชัย (2544)
มีขั้นตอนการปฏิบัติงานดังนี้

1. การเตรียมแบคทีเรียร่วมอาศัย (inoculum)

แยกเชื้อบริสุทธิ์ แบคทีเรียร่วมอาศัยโดยการนำหนอนกินรังผึ้งที่ได้รับการปลูกเชื้อมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นใช้กรรไกรตัดบริเวณขาเทียมของหนอน ใช้ loop แตะน้ำเลือด (haemolymph) ขีดเป็นแนวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA (nutrient bromothymol blue triphenyl tetrazolium chloride agar) และนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงคัดเลือกโคโลนีเดี่ยวของแบคทีเรีย ซึ่งมีลักษณะสีน้ำเงินตรงกลางเข้ม ขอบไม่เรียบ ลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth นำไปเขย่าที่ความเร็ว 180 รอบ/นาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธีย้อมแกรมแบคทีเรีย

2. การเตรียมต้นเชื้อไส้เดือนฝอย (inoculum)

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะ IJ ที่เลี้ยงได้จากหนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ คือ 5,000 ตัว/ มล.

3. การเตรียมอาหารเทียมอาหารเหลว (Liquid media)

เตรียมอาหารสูตรมาตรฐานของ วัชรี และสุทธิชัย (2544) ซึ่งประกอบด้วย Tryptic soy broth 0.75%, Yeast cell 0.50%,ไข่ 6.67%, น้ำมัน 1.6% และ น้ำกลั่น 100% ผสมให้เข้ากัน ก่อนเทใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ขวดละ 40 มล. ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปทดลอง

4. การเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

เลี้ยงขยายปริมาณแบคทีเรียร่วมอาศัย ในอาหาร Tsb3 เป็นเวลา 24 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนใส่ไส้เดือนฝอยที่ได้จากข้อ 2. ลงเลี้ยงในอาหาร Tsb_3ด้วยวิธีปลอดเชื้อ เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียร่วมอาศัย ที่ระดับอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลาประมาณ 14 วัน จนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ IJ 100% จึงทำการเก็บการผลิตและนับผลผลิตและนับผลผลิตที่ได้ในทุกวิธีการ

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2551 – เดือนกันยายน 2552

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์การทดลอง

จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp ที่ได้จากการตัดขาหนอนแล้วนำ hemolymph มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA ไว้ 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ys broth เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาทดลองด้วยวิธีการ spread plate เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย พบว่า หลังการเลี้ยงแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมงจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจนับได้ประมาณ 10^4 cell/ml ที่เวลา 0 - 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโต หลังจากชั่วโมงที่ 24 จำนวนเซลล์จะอยู่ที่ 10^5 cell/ml เมื่อสุ่มนับ crystalline inclusion protein ในช่วง 0 – 12 ชั่วโมง ยังไม่พบเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง crystalline inclusion protein ที่ 24 ชั่วโมง ตรวจพบจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่สร้าง crystalline inclusion protein จำนวน 60% ของเซลล์ที่สุ่มนับ และจะเพิ่มสูงขึ้นเรื่อยๆ ที่เวลา 24 ชั่วโมงพบจำนวนเซลล์ที่สร้าง crystalline inclusion protein 88 % ทั้งนี้ควรมีการบันทึกค่าดูดกลืนแสงจากความขุ่นของ Ys broth และศึกษา growth curve อย่างละเอียดโดยวัดการเจริญของแบคทีเรียทุก 3 หรือ 6 ชั่วโมง เพื่อหาระยะการเจริญของแบคทีเรีย ในแต่ละระยะทั้งระยะ lag phase , log phase, stationary phase และ death phase ของแบคทีเรียที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ และอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย

จากเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวสูตรมาตรฐาน (Table1) พบว่า ไส้เดือนฝอยมีการพัฒนาเติบโตช้า ใช้เวลาในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียในอาหารเหลว ประมาณ 4 วัน และเมื่อเก็บล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยพบว่า กรรมวิธีแรกที่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว 48 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงจะให้ผลผลิต $5.0x10^6$ ตัว/มล ซึ่งให้ผลผลิตน้อยกว่า การเลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียด้วยอาหารเทียม Tsb3 แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยจะอาศัยอาหารเหลวในการขยายปริมาณโดยการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตสารซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยทั้งนี้อาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยอาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และอาจมีผลต่อการพัฒนาและการขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอยซึ่งต้องศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป

และไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ตามสูตรมาตรฐานที่ใช้เลี้ยง *S. carpocapsae* ได้ เช่นเดียวกัน โดยต้องเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย แต่การเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพียงลำพังโดยไม่ใส่แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอยสามารถพัฒนาได้แต่ไม่ครบวงจรชีวิต และไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ และ การพัฒนาของไส้เดือนฝอยเมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยจะมีการพัฒนาได้ครบวงจรชีวิตโดยใช้เวลาสั้นกว่า

สรุปผลการทดลอง

ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเลี้ยงด้วยอาหารเหลว Tsb3 ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยได้ และไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวตามสูตรมาตรฐานที่ใช้เลี้ยง S. carpocapsae ได้ เช่นเดียวกัน โดยต้องเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย แต่การเลี้ยงไส้เดือนฝอยเพียงลำพังโดยไม่ใส่แบคทีเรีย ไส้เดือนฝอยสามารถพัฒนาได้แต่ไม่ครบวงจรชีวิต และไม่สามารถเก็บผลผลิตได้ และ การพัฒนาของไส้เดือนฝอยเมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยจะมีการพัฒนาได้ครบวงจรชีวิตโดยใช้เวลาสั้นกว่า แต่ต้องมีการพัฒนาสูตรอาหารทั้ง 2 สูตรให้เหมาะสมต่อการเจริญของทั้งแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย *S. riobrave* รวมทั้งขนาดของ inoculum ไส้เดือนฝอย และแบคทีเรียให้เหมาะสม เพื่อจะให้ได้จำนวนของผลผลิตไส้เดือนฝอยมีปริมาณมาก และต้องศึกษาการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเหลวอย่างละเอียด ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

วัชรี สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. ศึกษาอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ใน “ผลงานวิจัย โครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้า” หน้า 28-40. จัดพิมพ์โดยกรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์.

Cabanillas, H.E., G.O. Jr. Poinar and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobravis* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. Fundam. Appl. Nematol. 17:123-131

Poiner, G.O. and G.M. Thomas 1965. A new bacterium, *Achromobacter nematophilus* sp. NOV (Achromobacteriaceae : Eubacteriales) associated with a nematode. International bulletin of bacteriological nomenclature and taxonomy Vol. 15: 4 , 249-252.