วิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทนอุณหภูมิสูง *Steinernema riobrave* เพื่อการควบคุมแมลงศัตรูพืช

Research and Development of Entomopathogenic Nematode, *Steinernema riobrave* for Utilization in Agriculture

วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี อิศเรส เทียนทัด
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

บทคัดย่อ

ศึกษาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ทนอุณหภูมิสูง *Steinernema riobrave* ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2551 ถึงเดือนกันยายน 2553 แบ่งเป็น 3 การทดลอง **1**. ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัย พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเลี้ยงให้มีปริมาณมากได้ด้วยแมลงอาศัยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria melonella* นาน 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายเฉลี่ย 117,477 - 253,547 ตัวต่อหนอน 1 ตัว **2.** ศึกษาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ทนอุณหภูมิสูง *S. riobrave* ด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว 2 สูตร และเลี้ยงด้วยอาหารเหลวสูตรTsb3 พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตได้โดยเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารสุนัข และสูตรไข่ นาน 18 วัน ได้ผลผลิตเฉลี่ย 2.1×10^5 - 2.90×10^5 ตัวต่ออาหาร 1 กรัม และเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยอาหารเหลวสูตร TSb3 ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยเข้มข้น 10^7 เป็นเวลา 48 ชม. ก่อนนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลานาน 12 วันได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 14,780 ตัวต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร **3.** ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii* ในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth หลังการเลี้ยงแบคทีเรียนาน 24 ชั่วโมงจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่ตรวจนับได้ประมาณ 10^4 cell/ml ที่เวลา 0 - 12 ชั่วโมง หลังจากนั้นจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น การเจริญเติบโตหลังจากชั่วโมงที่ 24 จำนวนเซลล์จะอยู่ที่ 10^5 cell/ml ในช่วง 0 – 12 ชั่วโมงไม่พบ crystalline inclusion protein

คำหลัก : ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, *Steinernema riobrave*, อุณหภูมิ, การผลิตขยาย

รหัสการทดลอง 07-01-49-06-04-04-03-51

คำนำ

ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อมันสามารถไชเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุลนี้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Kaya, 1985; Klein, 1990; Poinar, 1979) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัย เช่น หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงขยายเป็นปริมาณมากได้ง่าย จึงนิยมใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (วัชรี, 2540) ไส้เดือนฝอยสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง (Bedding, 1981, 1984) และในอาหารเหลว (Friendman, 1990; Gaugler and Han, 2002) การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช จะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียม และพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรก เลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนเรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพง เช่น ตับของกระต่ายที่ตั้งท้อง แต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดีนัก ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981)

ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ คือ หนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง (วัชรี และคณะ, 2529) ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว (วัชรี และคณะ, 2534ก) ด้วงงวงมันเทศ (วัชรี และคณะ, 2534ข) หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง (วัชรี และคณะ, 2537) นอกจากนี้ยังได้วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงขยายปริมาณมากด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยปรับปรุงสูตรอาหารบางส่วนให้เหมาะสม และศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอยและการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปผสมในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย ซึ่งพบว่าสูตรอาหารที่สามารถเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ได้ดีมี 3 สูตร คือสูตรที่ 1 ประกอบด้วยอาหารสุนัขกระป๋องสำเร็จรูป ผสมน้ำ น้ำมันหมู และวุ้น สูตรที่ 2 เนื้อไก่และเครื่องในไก่ น้ำ NaCl และวุ้น และสูตรที่ 3 ตับไก่ น้ำ น้ำมันหมู และวุ้น (วัชรี และ

พิมลพร, 2535) และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยวัชรี และสุทธิชัย (2544) เป็นผลสำเร็จและเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว

จากรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งพบในเขตภูมิอากาศใกล้แถบร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ซึ่งภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย *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* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 35 ^{0}ซ จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 ^{0}ซ ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรอาหารสุนัขผสมฟองน้ำได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง IJ ซึ่งเป็นเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง เช่นแบคทีเรียร่วมอาศัย การเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเลี้ยงเชื้อและในอาหารเหลวเลี้ยงไส้เดือนฝอย รวมทั้งต้นเชื้อไส้เดือนฝอยที่นำมาใช้ เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตขยายในอนาคตต่อไป

วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii*
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

<u>การทดลองที่ 1.</u> เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัย

ใช้หนอนกินรังผึ้ง (*G. mellonella* L.) เป็นแมลงทดสอบ ทำการทดลองในจานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยระยะ IJ อัตรา 2,000 ตัว/น้ำ 1 มล. ลงบนกระดาษกรอง ก่อนใส่หนอนกินรังผึ้งวัย 5-6 ลงไปจานละ 10 ตัว ปิดฝาและนำเก็บที่ 25 $^{\circ}$ซ นาน 48 ชั่วโมง ก่อนนำซากหนอนที่ตายมาล้างด้วยฟอร์มารีน 0.1% และวางเรียงบนผ้าขาวบางที่ปูอยู่บนจานแก้วที่คว่ำอยู่ในกล่องพลาสติก ภายในหล่อด้วยน้ำกลั่นให้ระดับน้ำสูงประมาณ 3/4 ของความสูงของจานแก้ว ปิดฝากล่องและนำเก็บที่อุณหภูมิ 25 $^{\circ}$ซ เป็นเวลา 10 วัน จึงทำการเก็บไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่ออกจากตัวหนอนมาอยู่ในน้ำที่หล่อไว้ทุกวัน และบรรจุไส้เดือนฝอยลงฟองน้ำในถุงพลาสติกเก็บที่อุณหภูมิ 15 $^{\circ}$ซ

<u>การทดลองที่ 2</u>. เลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ทนอุณหภูมิสูง *S. riobrave* ด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดอาหารแข็งกึ่งเหลว และอาหารเหลว มีขั้นตอนการปฏิบัติงานดังนี้

2.1. การเตรียมแบคทีเรียร่วมอาศัย (inoculum)

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

2.2 การเตรียมต้นเชื้อไส้เดือนฝอย (inoculum)

นำไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJs) ที่เลี้ยงได้จากการเลี้ยงขยายด้วยหนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* มาล้างให้สะอาดด้วยน้ำยา hyamine 0.1% แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นที่อบนึ่งฆ่าเชื้อ ปรับปริมาณให้ได้ตามอัตราที่ต้องการ คือ 5,000 ตัว/ มล.

2.3. การเตรียมอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว (Semi solid media)

เตรียมอาหารเทียม 2 สูตร โดยชั่งส่วนผสมและวัตถุดิบต่างๆ ได้แก่ สูตรที่ 1 ประกอบด้วย อาหารสุนัข 22% น้ำมันหมู 5% น้ำ 66% และฟองน้ำสังเคราะห์ 7% สูตรที่ 2 อาหารไข่ ประกอบด้วย ไข่ไก่ 10 ฟอง น้ำมันหมู 220 มล. น้ำกลั่น 331 มล และฟองน้ำ 140 กรัม ผสมส่วนผสมต่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร แล้วนำมาขยำรวมกับชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดลูกเต๋า ชั่งอาหารเทียมใส่ในถุงเพาะเห็ด ถุงละ 45 กรัม และใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ขวดละ 30 กรัม ปิดจุกสำลีและหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียมก่อนนำ

อาหารที่เตรียมไว้นั้นเข้าตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปเลี้ยงไส้เดือนฝอยในขั้นตอนต่อไป

2.4. การเตรียมอาหารเทียมอาหารเหลว (Liquid media)

เตรียมเหลวสูตร Tsb3 (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 ทิ้งไว้ให้เย็นจึงนำไปทดลองในขั้นตอนต่อไป

2.5. การเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

นำเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรีย *Xenorhabdus cabanillasii* ลงเลี้ยงในอาหารเทียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนนำไส้เดือนฝอยที่ได้จากข้อ 2.1 ลงเลี้ยงในอาหารเทียมในข้อ 2.3 ด้วยวิธีปลอดเชื้อ ตั้งขวดเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ บันทึกการพัฒนาของไส้เดือนฝอยทุกวันจนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ IJ 95-100% จึงทำการล้างเก็บผลผลิตและนับจำนวน

2.6. การเก็บล้างและนับผลผลิตไส้เดือนฝอย

หลังการเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25 °ซ ประมาณ 12 วัน ไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงมากกว่า 95% จึงทำการเก็บผลผลิตโดยเทอาหารและไส้เดือนฝอยล้างผ่านตะแกรงขนาด 60 และ 100 mesh เพื่อแยกเศษอาหารขนาดใหญ่ ก่อนกรองไส้เดือนฝอยที่แขวนลอยอยู่ในน้ำผ่านตะแกรงขนาด 200 mesh ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 30 นาที ไส้เดือนฝอยจะตกตะกอนเทน้ำส่วนบนทิ้ง และนำตะกอนไส้เดือนฝอยที่ได้กรองผ่านตะแกรงขนาด 375 mesh เพื่อแยกไส้เดือนฝอยออกจากเศษอาหารขนาดเล็ก และกรองตะกอนไส้เดือนฝอยผ่านผ้ากรองขนาด 48 ไมครอน เพื่อแยกไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง และนับจำนวนที่เลี้ยงได้จากอาหารเทียมแต่ละสูตรภายใต้กล้องจุลทรรศน์โดยวิธี dilution counting

<u>การทดลองที่3</u>. ศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii* 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°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการปนเปื้อนของแบคทีเรียโดยวิธีย้อมแกรม จึงนำมาทดลอง ด้วยวิธีการ spread plate เพื่อนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย พร้อมทั้งตรวจนับจำนวนเซลล์ที่สร้าง crystalline inclusion protein

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2549 – เดือนกันยายน 2553

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองที่ 1 จากการศึกษาการเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัย

1.1 การพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* จากการทดลองดำเนินการโดยการฉีดตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงอัตรา 2,00 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ก่อนนำซากหนอนที่ตายมาผ่าเพื่อตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยและการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า หลังการ inoculation ตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยเข้าทำลายแมลง (Infective juvenile ; IJS) เข้าสู่ตัวแมลงแล้ว 4 วัน ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงที่สามารถผ่านเข้าสู่ช่องว่างในตัวแมลงสำเร็จ ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้เฉลี่ยเท่ากับ 86.73 ตัว/หนอน 1 ตัว คิดเป็น 67.73%และตัวเต็มวัยเพศเมียเฉลี่ยเท่ากับ 40.06 ตัว/หนอน 1 ตัว คิดเป็น 32.26% ตามลำดับ สัดส่วนของไส้เดือนฝอยที่พัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศเมีย 1 ตัวต่อไส้เดือนฝอยเพศผู้ 2.09 ตัว ซึ่งอาจมีผลต่อจำนวนตัวอ่อนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJs) ที่ได้จากการจับคู่ผสมพันธ์ของตัวเต็มวัยไส้เดือนฝอย แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่ได้นับจำนวน (ตารางที่ 1) และการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยของไส้เดือนฝอยไปเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้หรือเพศเมียนั้นไม่สามารถอธิบายได้ว่ามีปัจจัยใดบ้างที่เกี่ยวข้อง แต่อาจขึ้นอยู่กับสารอาหารในตัวแมลง หรืออาจเป็นเพราะอุณหภูมิ และหรือฮอร์โมนที่ไส้เดือนฝอยขับออกมา

1.2 จากการทดลองเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ด้วยการหยดไส้เดือนฝอย 2,000 ตัวลงบนกระดาษกรองที่วางอยู่บนจานทดลองพลาสติก ก่อนใส่หนอนกินรังผึ้งที่มีน้ำหนักตัวเท่ากับ 0.3 มิลลิกรัม และ 0.44 มิลลิกรัม หลังเก็บที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 26 ± 2 องศาเซลเซียส นาน 10 วัน พบว่าจำนวนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงที่เทเก็บได้จากหนอนกินรังผึ้งน้ำหนัก 0.44 มิลลิกรัม เท่ากับ 253,547 ตัว สูงกว่าหนอนน้ำหนัก 0.3 มิลลิกรัม ซึ่งได้ผลผลิตเท่ากับ 117,477 ตัว (ตารางที่ 2)

การทดลองที่ 2 การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ด้วยอาหารเทียม

2.1 เปรียบเทียบการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ด้วยอาหารเทียม 2 สูตร คือ สูตรอาหารสุนัข และ สูตรไข่ หลังการเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย โดย

การนำแบคทีเรียร่วมอาศัยลงเลี้ยงในอาหารเทียมเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงและเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกบแบคทีเรียเป็นเวลานาน 16-18 วัน จึงทำการเก็บล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยตามวิธีการ พบว่า สูตรไข่ ซึ่งมีส่วนประกอบหลัก คือไข่ไก่ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะข้าทำลายแมลงเฉลี่ย 2.90×10^{5} ตัวต่ออาหาร 1 กรัม สูงกว่า สูตรอาหารสุนัขได้ผลผลิตเฉลี่ย 2.16×10^{5} ตัวต่ออาหาร 1 กรัม (ตารางที่ 3) จะเห็นว่าจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงด้วยอาหารทั้ง 2 สูตร ให้ผลผลิตที่ต่างกันเล็กน้อย อาจเนื่องจากสูญเสียไส้เดือนฝอยไปบางส่วนในขั้นตอนการเก็บล้าง อาหารเทียมสูตรไข่องค์ประกอบหลักเป็นของเหลวเมื่อผสมกับฟองน้ำสังเคราะห์ และอาหารไข่จะแทรกไปตามรูพรุนของฟองน้ำและเป็นเนื้อเดียวกัน ต่างจากสูตรอาหารสุนัขส่วนที่เป็นของเหลวและตะกอน ที่ไม่สามารถคลุกเคล้ากับฟองน้ำได้ เมื่อเก็บล้างอาหารสูตรไข่จึงล้างเก็บไส้เดือนฝอยได้สะอาดและง่ายกว่าอาหารสุนัขซึ่งมีเศษตะกอนเป็นสาเหตุของการสูญเสียผลผลิตไส้เดือนฝอยไปบางส่วนได้ นอกจากจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้จากอาหารทั้ง 2 สูตร แล้ว ยังต้องเปรียบเทียบคุณภาพ (QC) และประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอยด้วย โดยการทดสอบ QC ตาม วิธีมาตรฐานของ Miller (1989) แต่จากการทดลองในครั้งนี้ไม่ได้ทดสอบ QC

2.2 จากการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลว สูตร Tsb3 (ตารางที่ 4) พบว่าไส้เดือนฝอยมีการพัฒนาเติบโตช้า ใช้เวลาในการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมียในอาหารเหลวประมาณ 4 วัน และเมื่อเก็บล้างผลผลิตไส้เดือนฝอยพบว่า กรรมวิธีแรกที่มีการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหารเหลว 48 ชั่วโมงก่อน แล้วจึงใส่ไส้เดือนฝอยลงไปเลี้ยงได้ผลผลิต 5.0×10^{6} ตัว/มล สูงกว่าการเลี้ยงแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเหลว 72 และ 96 ชั่วโมง ทั้งนี้ ซึ่งให้ผลผลิตน้อยกว่า การเลี้ยงไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียด้วยอาหารเทียม Tsb3 แบคทีเรียและไส้เดือนฝอยจะอาศัยอาหารเหลวในการขยายปริมาณโดยการแบ่งเซลล์เป็นจำนวนมากและมีการผลิตสารซึ่งมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอย ระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเทียมนาน 96 ชั่วโมง ช่วงเวลาดังกล่าวแบคทีเรียในอาหารบางส่วนอาจหยุดการพัฒนา หรืออาจเพราะอาหารเทียมที่ใช้เลี้ยงไส้เดือนฝอยอาจมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย และอาจมีผลต่อการพัฒนาและการขยายพันธุ์ไส้เดือนฝอยซึ่งต้องศึกษาข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป

2.3 ผลของจำนวนเซลแบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอย ดำเนินการทดลองโดยเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ด้วยอาหารเหลวสูตรอาหาร TSb3 แบบ monoxenic ด้วยการนำแบคทีเรียเข้มข้น 10^{5} 10^{6} และ 10^{7} เซลลงเลี้ยงในอาหารเหลวนาน 48 ชั่วโมงก่อนนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยง ประมาณ 12 วัน ก่อนเก็บล้างไส้เดือนฝอยเมื่อมีการพัฒนาเป็นระยะเข้าทำลายแมลงมากกว่า 95% พบว่าผลผลิตไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียเข้มข้น 107 ให้ผลผลิตสูงสุด 14,780 ตัวต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร แตกต่างทางสถิติกับที่ 10^{5} 10^{6} (ตารางที่ 5)

<u>การทดลองที่ 3</u> จากการศึกษาการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp ที่ได้จากการตัดขาหนอน แล้วนำ hemolymph มา streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA ไว้ 48 ชั่วโมง แล้วคัดเลือกโคโลนีลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเลี้ยงเชื้อ Ys broth เขย่าเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำมาทดลอง ด้วยวิธีการ 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 %

สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* สามารถเลี้ยงมีปริมาณมากได้ด้วยแมลงอาศัย และอาหารเทียม การเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยหนอนกินรังผึ้งที่มีขนาดโต จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่มากกว่าหนอนขนาดเล็ก การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยด้วยหนอนทำได้โดยการหยดไส้เดือนฝอยอัตรา 2,000 ตัว บนกระดาษกรองในจานพลาสติก ที่ใส่หนอนกินรังผึ้ง *Galleria melonera* จานละ 10 ตัว เก็บจานพลาสติกที่ 25 องศาเซลเซียส จากนั้น 48 ชั่วโมง นำซากหนอนมา Trap ในกล่องชื้น

ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* หลังการ inoculation สู่ตัวหนอนกินรังผึ้งแล้ว 4 วัน จึงมีการพัฒนาการพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย พบไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศผู้ร้อยละ 50-70 และพัฒนาเป็นตัวเต็มวัยเพศเมียร้อยละ20-40 ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* สามารถเจริญเติบโตจนครบวงจรชีวิตได้ในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวทั้ง สูตรอาหารสุนัข และสูตรไข่ โดยต้องเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ได้ผลผลิตไม่แตกต่างกันอยู่ระหว่าง 2.1×10^5 - 2.90×10^5 ตัวต่ออาหาร 1 กรัม

การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเหลวสูตร TSb3 ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยเข้มข้น 10^7 เป็นเวลา 48 ชม. ก่อนนำไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงร่วมกันเป็นเวลานาน 12 วันได้ผลผลิตสูงสุดเท่ากับ 14,780 ตัวต่ออาหาร 1 มิลลิลิตร ทั้งนี้การผลิตไส้เดือนฝอยเป็นปริมาณมาก ต้องคำนึงถึงวิธีการเลี้ยงแต่ละชนิด ว่าชนิดไหนมีความสะดวกในการปฏิบัติงานแล้วยังต้องคำถึงประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงในแต่ละวิธีการด้วย วิธีการเลี้ยงที่ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยที่มีประสิทธิภาพต่ำย่อมมีผลกับการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชให้ประสบความสำเร็จ

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.

ตารางที่ 1 จำนวนไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ที่พบในหนอนกินรังผึ้ง *Galleria Mellonella* จำนวนตัวเต็มวัยเพศผู้ และเพศเมีย

ครั้งที่	ไส้เดือนฝอยที่พบในหนอน $\bar{x} \pm$ S.D. [1/]		เปอร์เซ็นต์การพัฒนาเป็นตัวเต็มวัย		
	(ตัว/หนอน 1 ตัว)	พิสัย	เพศเมีย (F)	เพศผู้ (M)	สัดส่วน (F: M)
1	84.2 ± 36.5	(53-181)	42.57	57.43	1:1.34
2	139.7 ± 35.9	(51-179)	25.37	74.63	1:2.94
3	146.5 ± 46.5	(64-200)	28.86	71.14	1:2.46
เฉลี่ย	123.46		32.26	67.73	1 :2.09

[1/] ค่าเฉลี่ยจากหนอน 10 ตัว

ตารางที่ 2 จำนวนไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ที่จากการเลี้ยงขยายด้วยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*

น้ำหนักหนอน (มก.)	ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะ (IJs) $\bar{x} \pm$ S.D. [1/]
0.34	117,477 ± 91986
0.44	253,547 ± 146746

[1/] ค่าเฉลี่ยจากหนอน 15 ตัว

ตารางที่ 3 จำนวนไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงที่ได้จากการเลี้ยงด้วยอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว แบบ monoxenic

สูตรอาหาร	ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะ (IJs) $\bar{x} \pm$ S.D. [1/]
สูตรไข่	290,941 ± 4,125
อาหารสุนัข	216,600 ± 9,747

[1/] ค่าเฉลี่ยจากหนอน 4 ซ้ำ ๆ ละ 5 ถุง

ตารางที่ 4 ผลของระยะเวลาการเลี้ยงแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ในอาหารเหลวต่อจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*

ระยะเวลา (ชั่วโมง)	ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (ตัว/อาหาร 1 มิลลิลิตร)
เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 48	5.088×10^{6}
เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 72	3.088×10^{5}
เลี้ยงแบคทีเรียเป็นเวลา 96	2.760×10^{5}

ตารางที่ 5 ผลของจำนวนเซลแบคทีเรีย *Xenorhabdus cabanillasii* ในอาหารเหลวต่อจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave*

จำนวนเซลแบทีเรีย	ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (ตัว/อาหาร 1 มิลลิลิตร)
10^{5}	12,413 b
10^{6}	12,693 b
10^{7}	14,780 a