รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

---

1. แผนงานวิจัย : อนุรักษ์และใช้ประโยชน์จุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์อย่างยั่งยืน

2. โครงการวิจัย : การใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์และผลิตภัณฑ์จากจุลินทรีย์เชิงพาณิชย์

3. ชื่อการทดลอง : เทคโนโลยีต้นแบบการผลิตไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในอาหารเหลวเชิงพาณิชย์

: Pilot Production Technology of Entomopathogenic Nematode in Liquid Medium for Commercial

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง : นางนุชนารถ ตั้งจิตสมคิด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

ผู้ร่วมงาน : นางบุญเรือนรัตน์ เรืองวิเศษ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

: นางสาวภรณี สว่างศรี สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ

5. บทคัดย่อ : ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. Thai isolate) มีประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้หลายชนิด การนำมาพัฒนาเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเหลวสูตรต่างๆ และศึกษาปัจจัยที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของไส้เดือนฝอยเพื่อได้ต้นแบบเทคโนโลยีการผลิตเชิงพาณิชย์ ผลการทดลองพบว่า สูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25$\pm$2 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90-104 ล้านตัว/ลิตร) โดยการบ่มเพาะในสภาพมีหรือไม่มีแสงพบว่า ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอย ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นที่อัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) เกษตรกรสามารถคัดผักส่งขายตลาดได้ คิดเป็น 92.5 %

ABSTRACT : Thai entomopathogenic nematode (*Steinernema* sp. Thai isolate) are biocontrol to many insect pests. The mass production development are increases on the amount of various liquid formula and studying affecting factors to the increasing number of nematodes in order to obtain a prototype of commercial production technology. The results showed that Soy milk formula + lard + water in ratio 7: 2: 1, fed in a stirring vial type bottle monoxenic culture condition with bacterial *Xenorhabdus* sp. 10^7 cells/ml. The food has a pH

equal to 7, incubation at temperature of 25 $\pm$ 2 °C for 10 days. The nematodes grow and propagate best between 90,000-104,000 nematodes/ml (or equal to 90 and 104 million/liter). The incubation in the presence or absence of light showed that does not affect the growth of nematodes. The nematodes can be stored in the moisture-holding substance for 3 months with the lowest mortality percentage of 32.2%. It has effective to kill the common cutworm and flea beetles In a kale plot. By spraying at a rate of 5 million per plot of 20 square meters, 5 times (with planting after planting at 10, 20, 30 and 40 days). The farmers can select vegetables to sell to the market for 92.5 %

6. คำนำ

ไส้เดือนฝอยในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีศักยภาพในการเป็น bio-pesticide ควบคุมแมลงศัตรูพืชที่ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ได้มีการศึกษาวิจัยในด้านการเพาะเลี้ยงเพิ่มปริมาณในอาหารเทียมตั้งแต่ปี 1931 โดย Glaser ได้เพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. glaseri* และ *S. carpocapsae* เป็นผลสำเร็จในอาหารชนิดวุ้น 1 % ที่ประกอบด้วย 1% rabbit kidney ในสภาพ axenic culture ต่อมาในปี 1953 Stoll พัฒนาการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวที่มี raw liver extract (RLE) เป็นองค์ประกอบ โดยเลี้ยงในหลอดทดสอบที่มีการเขย่า 100 ครั้งต่อนาที สามารถเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวได้ แต่อย่างไรก็ตาม การเพาะเลี้ยงยังเป็นงานวิจัยในห้องทดลอง ผลิตผลที่ได้ต่ำต้นทุนสูง จึงได้มีการค้นคว้าและการพัฒนาการเพาะเลี้ยงอย่างต่อเนื่อง ทั้งในด้านเทคนิคและสูตรอาหาร เพื่อให้ได้ผลผลิตสูงที่สุดและต้นทุนการผลิตต่ำ (Friedman, 1990)

ในปี 1964-1967 Dutky *et al.* พบว่าสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มี symbiotic bacteria ร่วมด้วย ทำให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงขึ้น โดยพบว่าเซลล์ของแบคทีเรียมีผลต่อกระบวนการขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยในอาหารเทียม

ในปี 1981 Bedding ได้พัฒนาเทคนิคการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารชนิดแข็งกึ่งเหลว (semi-solid media) ในสภาพ monoxenic culture ที่มีองค์ประกอบของ 70% pigs kidney, 10% beef fat และ 20% tap water ของการเลี้ยง *Steinernema* sp. และ 60% pigs kidney, 20% beef fat และ 20% tap water ของการเลี้ยง *Heterorhabditis* sp. ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงเฉลี่ย 40 ล้านตัวต่อ flask ขนาด 500 มล. ต่ออาหาร 70 กรัม ต้นทุนการผลิตเท่ากับ $0.50/flask เทคนิคการผลิตนี้ได้รับการยอมรับอย่างกว้างขวาง ต่อมา Bedding (1984) ได้ศึกษาเทคนิคการผลิตเพื่อขยายปริมาณในระดับการค้า โดยเพาะเลี้ยงในถุง polypropylene ขนาด 1.0x0.5 เมตร ได้ผลผลิตสูงถึง 2,000 ล้านตัวต่อถุง

มีการศึกษาวิจัยองค์ประกอบของอาหารที่จำเป็นต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยใน 2 สกุล ในสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ซึ่งมีความแตกต่างกันของสารอาหารที่ไส้เดือนฝอยต้องการ จากรายงานของ Dunphy and Webster (1989) ได้ศึกษาแหล่งอาหารต่างๆ เพื่อการขยายปริมาณ *S. carpocapsae* DD 136

strain และ *H. heliothidis* พบว่าสารอาหารชนิดต่างๆ มีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยแต่ละชนิดแตกต่างกัน โดย culture ที่มี stearic acid พวก sunflower oil (0.1% V/V) เพิ่มผลผลิต *S. carpocapsae* และ cod liver oil (0.5% V/V) เพิ่มผลผลิต *H. heliothidis*

ในปัจจุบันไส้เดือนฝอยสามารถผลิตในอาหารเหลวได้สูงถึง 190,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในระดับ shake flask และ 90,000 ตัวต่อมิลลิลิตร ในถังหมัก (fermenter) (Friedman, 1990) มีผลิตภัณฑ์ที่ผลิตเป็นการค้าในต่างประเทศ เช่น บริษัท MicroBio ผลิต *S. feltiae* ควบคุมหนอนแมลงวันทำลายเห็ด (mushroom sciarids) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys และ *H. megidis* ควบคุมด้วงงวงองุ่น (vine weevil) ในผลิตภัณฑ์ชื่อ Nemasys H บริษัท Biosys ผลิต *S. carpocapsae* ควบคุมหนอนด้วง japanese beetle และบริษัท Ciba-Geigy ผลิต *S. carpocapsae* (S25) และ *S. feltiae* (S27) ควบคุมด้วงงวงองุ่นสีดำ (black vine weevil) (นุชนารถ, 2547)

งานทางด้านไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงในประเทศไทยเริ่มมีการศึกษาวิจัยเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร โดยงานวิจัยมุ่งเน้นทางด้านการผลิตไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* สายพันธุ์ที่นำมาจากสหรัฐอเมริกา โดยใช้เทคนิคการผลิตในอาหารแข็งกึ่งเหลวสภาพ monoxenic culture ดัดแปลงสูตรอาหารและเทคนิคจาก Bedding (1981) นำไปใช้ในสภาพไร่ประสบผลสำเร็จ ได้ผลิตเป็นผลิตภัณฑ์บรรจุซองจำหน่ายในประเทศไทย (วัชรี, 2534)

ในปี 2549-2553 มีการสำรวจเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงในประเทศไทย สามารถแยกไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงได้ในหลายพื้นที่ โดยไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. (KP strain) ที่แยกจาก จ.กำแพงเพชร เป็นสายพันธุ์ที่มีศักยภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืช มีคุณสมบัติทนทานต่ออุณหภูมิสูง จัดเป็นสายพันธุ์ที่เรียกว่า heat tolerant isolate เช่นเดียวกับไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่พบในรัฐ Taxas สหรัฐอเมริกา และ *S. abbasi* สายพันธุ์ที่พบในประเทศ Oman โดยไส้เดือนฝอย KP strain มีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงตายภายในเวลาสั้นที่สุด 10-12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 30-35 ˚ซ รวมทั้งเพาะเลี้ยงขยายปริมาณได้ง่ายในอาหารเทียมราคาถูก (นุชนารถ และ ณัฏฐิมา, 2552) คุณสมบัติดังกล่าวจึงถูกพิจารณาและคัดเลือกมาผลิตเพื่อนำไปใช้ลดหรือทดแทนสารเคมีกำจัดแมลงในผักปลอดภัย GAP และผักอินทรีย์ (นุชนารถ และ มัลลิกา, 2560) ดังนั้น ไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย KP strain จึงควรนำมาพัฒนาการผลิตให้ได้ปริมาณมากในระดับเชิงพาณิชย์ โดยศึกษากระบวนการผลิตในอาหารเหลว ศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณในอาหารระดับถังหมักดัดแปลง และนำไปทดสอบประสิทธิภาพควบคุมแมลงในสภาพแปลงปลูกต่อไป

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. (KP strain)

2. อาหารเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและไส้เดือนฝอย ได้แก่ โปรตีนผง ไข่ผง นมผง นมถั่วเหลือง tryptic soy broth, nutrient broth, yeast extract, NaCl และ น้ำมันหมู

3. อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการไส้เดือนฝอย ได้แก่ กล้องจุลทรรศน์ชนิด Stereo microscope เครื่องแก้ว เครื่องชั่ง ชุดผลิตไส้เดือนฝอยพร้อมใช้ และภาชนะบรรจุอาหารเพาะเลี้ยง

4. สารเคมีและวัสดุเพาะเลี้ยง ได้แก่ แอลกอฮอล์ 70% สารฆ่าเชื้อ และ Hyamine 0.1%

- วิธีการ

1. การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. สายพันธุ์ไทย (KP strain) ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพ monoxenic culture

- กรรมวิธีการทดลอง วางแผนการทดลองแบบ CRD 11 กรรมวิธี 3 ซ้ำ ประกอบด้วยกรรมวิธีสูตรอาหาร 11 สูตร คือ

กรรมวิธีที่ 1 สูตรโปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 2 สูตรโปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 3 สูตรไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 4 สูตรไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 5 สูตรนมถั่วเหลืองผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 6 สูตรนมถั่วเหลืองผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 7 สูตรนมถั่วเหลืองไวตามิล+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 8 สูตรนมถั่วเหลืองไวตามิล+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 9 สูตรนมผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 4:3:3

กรรมวิธีที่ 10 สูตรนมผง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 5:2:3

กรรมวิธีที่ 11 สูตร Pace *et al.* (1986) (สูตรเปรียบเทียบ) (tryptic soy broth+ yeast extract+ NaCl+น้ำมันหมู)

1) เตรียมไส้เดือนฝอย ทำการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในหนอนกินไขผึ้ง ตามวิธีการของ Kaya and Stock (1988) ได้ไส้เดือนฝอยระยะที่ 3 หรือระยะเข้าทำลาย (Infective Juvenile, IJ) นำมาล้างด้วย 0.1 % hyamine เป็นเวลา 30 นาที เพื่อฆ่าเชื้อที่ผิว จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง เก็บไว้ในขวดเก็บเชื้อ (culture flask) ที่อุณหภูมิห้อง ก่อนนำไปใช้

2) เตรียม symbiotic bacteria แยกแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. จากน้ำเลือดของหนอนกินรังผึ้ง ปฏิบัติโดย inoculate ไส้เดือนฝอยระยะ IJ ในหนอน เป็นเวลา 48 ชม. จากนั้นนำหนอนที่ตายมาล้างฆ่าเชื้อที่ผิวด้วยแอลกอฮอล์ 95% และล้างผ่านน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กรรไกรตัดส่วนหัวของหนอนและใช้ลูปแตะน้ำเลือด นำมา streak บน อาหาร NBTA ทุกขั้นตอนทำในสภาพปลอดเชื้อ ทิ้งไว้ 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 25°ซ ได้โคโลนีเดี่ยวนำไป subculture บน NA ได้โคโลนีระยะ primary from ของแบคทีเรียเก็บเป็น stock culture ใน glycerol medium ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส

3) เตรียมอาหารเหลว ผสมอาหารสูตรดัดแปลง 10 สูตร และอาหารสูตรของ Pace *et al.* (1990) (เป็น control) ปริมาตร 1 ลิตร ในขวดกวนขนาดปริมาตร 3 ลิตร นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

4) ย้ายโคโลนีของแบคทีเรียจาก stock culture ลงในขวดขนาด 125 มล. ที่มีอาหารชนิด YS broth ปริมาตร 15 มล. นำไปตั้งบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นนำเซลล์แบคทีเรียที่ได้ไปหยดลงบนอาหารแต่ละสูตร จำนวน 10^7 เซลล์ ตั้งไว้บนเครื่องกวน เป็นเวลา 24 ชม. หลังจากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัวต่อสูตรอาหารชนิดต่างๆ ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง 26+2 ^{o}ซ เป็นเวลา 7 วัน

บันทึกข้อมูล ตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยภายใต้กล้องจุลทรรศน์ จำนวน 3 ซ้ำต่อสูตรอาหาร คำนวณค่าเฉลี่ยและวิเคราะห์ข้อมูลตามแผนการทดลอง เปรียบเทียบคู่เฉลี่ยโดยวิธี DMRT
เลือกอาหารสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดจำนวน 5 สูตร นำมาทดสอบอีกครั้งโดยปฏิบัติการทดลองเหมือนเดิม และเลือกสูตรอาหารที่ให้ไส้เดือนฝอยสูงสุด 3 สูตรอาหาร

2. ศึกษาผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด (ผลจากข้อ 1) บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด ลงในอาหารแต่ละสูตร บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 2 ระดับ คือ ที่ 29$\pm$2 ^{o}ซ และ 25$\pm$2 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 วัน

3 ศึกษาผลของระดับ pH ของอาหารเหลวต่อการเพาะเลี้ยง เตรียมอาหารเหลวสูตรที่ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงสุด (ผลจากข้อ 1) บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด ปรับระดับ pH ของอาหารเป็น 5 6 7 8 และ 9 นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด ลงในอาหารแต่ละระดับ pH บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนเป็นเวลา 10 วัน

4. ศึกษาอิทธิพลของแสงต่อการเพาะเลี้ยง

- วางแผนการทดลองแบบ CRD 3 กรรมวิธี 5 ซ้ำ กรรมวิธีประกอบด้วย การให้แสง ไม่ให้แสง และ ให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. โดยใช้แสงจากหลอด ไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดการเพาะเลี้ยง

- เตรียมอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง บรรจุในขวดกวนใบพัดขนาด 3 ลิตร ปริมาตรอาหาร 1 ลิตร/ขวด ปรับระดับ pH ของอาหารเท่ากับ 7 นำไปอบนึ่งฆ่าเชื้อ เมื่ออาหารเย็น ทำการหยด symbiotic bacteria จำนวน 10^7 เซลล์/ขวด บ่มเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นใส่ไส้เดือนฝอยระยะ IJ จำนวน 1 ล้านตัว/ขวด ทุกขั้นตอนทำให้สภาพปลอดเชื้อ นำไปตั้งวางบ่มเพาะเลี้ยงบนเครื่องกวนที่อุณหภูมิ 25$\pm$2 ^{o}ซ ตามกรรมวิธีการให้แสง ไม่ให้แสง และ ให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. เป็นเวลา 10 วัน ตามกรรมวิธีในสภาพ

5. ทดสอบเก็บรักษาเป็นผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยที่ผลิตจากอาหารเหลวในวัสดุต่างๆ ให้คงความมีชีวิตอย่างน้อย 3 เดือน และยังคงศักยภาพในการเป็น bio-pesticide

6. นำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงจากอาหารเหลวพ่นกำจัดแมลงศัตรูผักที่อัตรา 3 ล้านตัว/น้ำ 5 ลิตร/พื้นที่แปลงผักของเกษตรกร ขนาด 2x10 ตร.ม. ทุก 10 วัน เปรียบเทียบกับพ่นสายพันธุ์ต่างประเทศ

เวลาและสถานที่

เริ่มต้นเดือนตุลาคม 2559 สิ้นสุดเดือนกันยายน 2561

สถานที่ดำเนินการ สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กทม.

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

การขยายปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. สายพันธุ์ไทย (KP strain) ในอาหารเหลวสูตรต่างๆ ในสภาพ monoxenic culture ทำการทดสอบ 11 สูตรอาหารเหลว เพาะขยายไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย {*Steinernema* sp. Thai (KP) isolate} ใส่หัวเชื้อเริ่มต้นจำนวน 1 ล้านตัว ในปริมาตรอาหาร 1 ลิตร สภาพขวดชนิดใบพัดกวนปริมาตร 3 ลิตร ที่มีสภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic (มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร) เป็นเวลา 10 วัน ในสภาพอุณหภูมิห้อง ได้สูตรอาหารเหลว 3 สูตร อัตราส่วนโปรตีน : ไขมัน : น้ำ เท่ากับ 5 : 2 : 3 ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุด ได้แก่ สูตร 1 นมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 76,000 ตัว/มล. (76 ล้านตัวต่อลิตร) สูตร 2 ไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ ได้ผลผลิต 38,000 ตัว/มล. (38 ล้านตัวต่อลิตร) และสูตร 3 โปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ ได้ผลผลิต 31,000 ตัว/มล. (31 ล้านตัวต่อลิตร) โดยสูตร Pace *et al.* (1986) ได้ผลผลิต 37,000 ตัว/มล. ซึ่งไม่แตกต่างทางสถิติกับสูตรที่ 2 และ 3

จากผลการทดลองที่ได้จากการเพาะขยายในอาหารเหลว ซึ่งมีต้นทุนต่ำโดยเฉพาะสูตร 1 ใช้นมถั่วเหลืองเป็นแหล่งอาหารโปรตีนที่หาซื้อได้ง่าย และใช้น้ำมันหมูเป็นแหล่งไขมัน มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่ออาหาร 1 ลิตร ตลอดจนมีขั้นตอนการเตรียมไม่ยุ่งยาก ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยในระดับปานกลาง อย่างไรก็ตามยังสามารถปรับสูตรอาหารโดยเพิ่มอัตราส่วนของโปรตีนจาก 5 ส่วน เป็น 6-7 ส่วนได้

ภาพที่ 1 การเลี้ยงไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) ในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ monoxenic culture

ผลของอุณหภูมิต่อการเพาะเลี้ยง จากการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว 3 สูตร พบว่า สูตรที่ 1 นมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 42,000 ตัว/มล. (42 ล้านตัวต่อลิตร) และ 86,000 ตัว/มล. (86 ล้านตัวต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 29±2 °ซ และ 25±2 °ซ ตามลำดับ ในขณะที่สูตร 2 ไข่ผง+น้ำมันหมู+น้ำ และสูตรที่ 3 โปรตีนผง+น้ำมันหมู+น้ำ ให้ผลผลิตต่ำไม่คุ้มทุน เฉลี่ยเท่ากับ 27,000 ตัว/มล. (27 ล้านตัวต่อลิตร) ที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ และเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 29±2 °ซ เกิดการปนเปื้อน ในอาหารสูตร 2 และ 3 อย่างไรก็ตาม มีการทดสอบซ้ำในอาหารสูตรที่ 1 ตั้งวางเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ พบว่าให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยจำนวน 97,000 ตัว/มล. (97 ล้านตัว/ลิตร)

ผลของระดับ pH ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) ต่อการเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย พบว่าผลผลิตไส้เดือนฝอยจากการเลี้ยงในอาหารเหลวที่มีระดับ pH ต่างกัน เป็นเวลา 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงที่สุดที่ pH ของอาหารที่ระดับ 6 และ 7 มีจำนวนไส้เดือนฝอย 88,000 และ 104,000 ตัว/มล. (88 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ตามลำดับ โดยอาหารเหลวที่ pH 6 และ 7 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ แต่ระดับ pH ของอาหารที่ 5 8 และ 9 ให้ผลผลิตเพียง 45,000 52,000 และ 55,000 ตัว (45 52 และ 55 ล้านตัว/ลิตร) ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

ดังนั้น การใช้สูตรอาหารนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ ในอัตรา 7: 2 : 1 ในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงในอาหารเหลวแบบ monoxenic culture โดยปรับระดับอาหาร pH 7 ตั้งวางที่อุณหภูมิ 25±2 °ซ ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด

ผลของแสงต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ (7 : 2 : 1) พบว่าการให้แสง ไม่ให้แสง และให้แสง-ไม่ให้แสงสลับทุก 12 ชม. โดยใช้แสงจากหลอด ไฟฟลูออเรสเซนต์ตลอดการเพาะเลี้ยง 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอย 89 88 และ 90 ล้านตัวต่อลิตร ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

จากเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว และนำไปเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้น ขี้เลื่อย และดินผสม ตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายหลังเก็บ 3 เดือน พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การตาย เท่ากับ 32.2 56.8 และ 49.3 % ของสารอุ้มความชื้น ขี้เลื่อย และดินผสม ตามลำดับ

ผลของทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยที่เพาะขยายจากอาหารเหลว โดยนำไปทดสอบในแปลงคะน้า ของเกษตรกร พื้นที่ จ.นนทบุรี ขนาดแปลงเท่ากับ 2x10 เมตร ปลูกคะน้าได้เท่ากับ 320 ต้น จำนวน 2 แปลง พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ต่างประเทศที่เลี้ยงจากอาหารเหลว ผลการทดสอบประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) พบการเข้าทำลายของแมลง 2 ชนิด คือหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก สุ่มนับจำนวนแมลงหลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน พบแมลงจำนวน 4 16 56 และ 36 ตัวต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ของแปลงที่พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย และเท่ากับ 1 18 62 และ 68 ตัวต่อ 20 ต้น ตามลำดับ ของแปลงที่พ่นด้วยไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ต่างประเทศ สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50 และ 84.38 ต้น ของสายพันธุ์ไทยและสายพันธุ์ต่างประเทศ ตามลำดับ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงสายพันธุ์ไทย (*Steinernema* sp. KP isolate) สามารถเลี้ยงได้ในอาหารเหลวสูตรนมถั่วเหลือง+น้ำมันหมู+น้ำ อัตราส่วน 7: 2 : 1 มีต้นทุนค่าอาหารต่ำกว่า 50 บาทต่อลิตร เลี้ยงในขวดชนิดใบพัดกวน สภาพการเลี้ยงแบบ monoxenic culture ที่มีแบคทีเรีย *Xenorhabdus* sp. ร่วมด้วย จำนวน 10^7 เซลล์/มิลลิลิตร และอาหารมี pH เท่ากับ 7 ตั้งวางในสภาพอุณหภูมิ 25$\pm$2 ^{o}ซ เป็นเวลา 10 วัน ไส้เดือนฝอยเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้ดีที่สุด ระหว่าง 90,000-104,000 ตัว/มล. (หรือเท่ากับ 90 และ 104 ล้านตัว/ลิตร) ซึ่งแสงไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยขณะเพาะเลี้ยง ผลผลิตไส้เดือนฝอยสามารถเก็บรักษาในสารอุ้มความชื้นได้นาน 3 เดือน มีเปอร์เซ็นต์การตายน้อยที่สุด เท่ากับ 32.2 % และมีประสิทธิภาพในการใช้พ่นกำจัดหนอนกระทู้ผัก และด้วงหมัดผัก ในแปลงผักคะน้า โดยพ่นในอัตรา 5 ล้านตัวต่อพื้นที่แปลง 20 ตร.ม. จำนวน 5 ครั้ง (พร้อมปลูก หลังปลูกที่ 10 20 30 และ 40 วัน) สามารถคัดผักส่งตลาดได้ คิดเป็นร้อยละ 92.50

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. ภาคเอกชนหรือหน่วยงาน นำเทคโนโลยีไปผลิตในเชิงพาณิชย์
2. มีสารชีวภัณฑ์กำจัดแมลงศัตรูพืชเพื่อใช้ลดหรือทดแทนสารป้องกันกำจัดแมลง

11. เอกสารอ้างอิง

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด. 2547. การพัฒนากระบวนการผลิตไส้เดือนฝอยกำจัดแมลงอย่างง่ายเพื่อถ่ายทอดสู่เกษตรกร. รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ 2547. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 182 หน้า.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ ณัฏฐิมา โฆษิตเจริญกุล. 2552. สำรวจรวบรวมและศึกษาสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช. ใน ผลงานวิจัยเรื่องเต็ม สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด และ มัลลิกา แก้ววิเศษ. 2560. การเก็บรวบรวม อนุรักษ์และจำแนกชนิดไส้เดือนฝอยกำจัดแมลง. รายงานผลงานวิจัยเรื่องเต็ม ปี 2560 กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

วัชรี สมสุข. 2534. ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช, หน้า 182-197. ใน เอกสารวิชาการ การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธี. กองกีฏและสัตววิทยา. กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.

Bedding, R.A. 1981. Low cost in vitro mass production of Neoaplectana and Heterorhabditis species (Nematoda) for field control of insect pests. Nematologica 27 : 109-114.

Bedding, R.A. 1984. Large scale production, storage and transport of the insect-parasitic nematodes Neoaplectana spp. and Heterorhabditis spp. Annals of Applied Biology 104 : 117-120.

Dunphy, G.B. and J.M. Webster. 1989. The monoxenic culture of Neoaplectana carpocapsae DD 136 and Heterorhabditis heliothidis. Revue de Nematologie 12 : 113-123.

Dutky, S.R., J.V. Thompson, G.E. Cantwell. 1964. A technique for the mass propagation of the DD-136 nematode. J. Insect Pathol. 6 : 417-422.

Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development, pp. 153-172. In R. Gaugler and H.K.Kaya (eds.). Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRC Press, Inc. Florida.

Glaser, R.W. 1931. The cultivation of a nematode parasite of an insect. Science : 614. Pathol. 62 : 22-28.

Pace, G.W., W. Grote, D.E. Pitt and J.M. Pitt. 1986. Liquid culture of Nematodes. International Patent Publication WO 86/01074.

Stoll, N. 1953. Axenic cultivation of the parasitic nematode, Neoaplectana glaseri, in a fluid medium containing raw liver extract. J. Parasitol. 39 : 422.