

เทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema riobrave*  
Production techniques on Entomopathogenic Nematode,  
*Steinernema riobrave*

วิไลวรรณ เวชยันต์ สาทิพย์ มาลี อิศเรศ เทียนทัต  
กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

รายงานความก้าวหน้า

ดำเนินการทดลองที่ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ระหว่างเดือนตุลาคม 2553 ถึงเดือนกันยายน 2556

**การทดลองที่ 1** ทำการศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculum) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ในการเลี้ยงขยายด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ด้วยวิธี Paper bioassay ใช้จานแก้วภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เริ่มต้น 3 อัตรา คือ 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* อัตรา 2,000 – 4,000 ตัวต่อน้ำ 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร พบหนอนกินรังผึ้งตาย 82-100 เปอร์เซ็นต์ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (J) และเริ่มออกจากซากหนอนวันที่ 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210,000 – 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว การใช้ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ความเข้มข้นเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอน 1 ตัว ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ยสูงสุด 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว

**การทดลองที่ 2** ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculum) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว พบว่า การเลี้ยงไส้เดือนฝอยร่วมกับแบคทีเรียโดยใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว/อาหาร 40 กรัม ให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงกว่าและแตกต่างทางสถิติกับการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 20,000 และ 30,000 ตัว

รหัสการทดลอง 03-04-54-01-02-04-01-54

## คำนำ

ไส้เดือนฝอยที่อยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อมันสามารถไขเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุลนี้เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวอินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Poinar, 1979) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัย เช่น หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงขยายเป็นปริมาณมากได้ง่าย จึงนิยมใช้เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (วัชร, 2540) ไส้เดือนฝอยสามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง (Bedding, 1981, 1984) และในอาหารเหลว (Friendman, 1990) การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช จะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลง ซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสมได้ เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียม และพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรก เลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนเรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพง เช่น ตับของกระต่ายที่ตั้งท้อง แต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดัดนัก ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981)

ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ คือ หนอนกินใต้ผิวเปลือกกลองกอง ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ด้วงวงมันเทศ หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง 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 (วัชร และ พิมลพร, 2535) และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลวโดยวัชร และสุทธิชัย (2544) เป็นผลสำเร็จและเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว

จากรายงานการค้นพบไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งพบในเขตภูมิอากาศกึ่งแลบร้อนที่มลรัฐเท็กซัส (Cabanillas, 1994) ซึ่งภายในลำไส้ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มี *Xenorhabdus cabanillasii* เป็นแบคทีเรียที่อาศัยอยู่ร่วมกันแบบพึ่งพาอาศัย (Poinar and Thomas, 1965) โดยไส้เดือนฝอยทำหน้าที่เป็นพาหะนำแบคทีเรียเข้าสู่ภายในลำตัวแมลงทางช่องเปิดต่างๆ เช่น ปาก ทวาร ช่องรูหายใจ จากนั้นจะไขผ่านเข้าไปสู่ช่องว่างของลำตัว (haemocoel) และจะปลดปล่อยแบคทีเรียออกมาสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง แบคทีเรียจะมีการแบ่งเซลล์และเพิ่มปริมาณอย่างรวดเร็วและทำให้แมลง

ตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง เพราะเลือดเป็นพิษ (septicemia) ในขณะเดียวกันแบคทีเรียก็จะสร้างสารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ของไส้เดือนฝอยต่อไปจนอาหารภายในตัวแมลงหมด ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีความสามารถในการทนอุณหภูมิสูงได้ถึง 35 °C จากผลการทดลองเบื้องต้น พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* มีประสิทธิภาพสามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิ 35 °C ได้ ในขณะที่ *S. carpocapsae* ไม่สามารถเข้าทำลายแมลงที่อุณหภูมิดังกล่าว และพบว่า *S. riobrave* สามารถเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเทียมสูตรอาหารสุนัขผสมพองน้ำได้ แต่ผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง J ซึ่งเป้าหมายหลักของการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมยังไม่คงที่ จากข้อมูลดังกล่าวจึงควรพัฒนาวิธีการเลี้ยงและศึกษาปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง การทดลองนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาเทคนิคการผลิตขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *S. riobrave* ด้วยแมลงอาศัยและด้วยอาหารเทียมทั้งอาหารเหลวและอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว ทั้งนี้เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานในการพัฒนาการผลิตขยาย *Steinernema riobrave* ให้มีปริมาณมากสำหรับการนำไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงในสภาพไร่อต่อไปในอนาคตต่อไป

### วิธีดำเนินการ

#### อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.)
3. แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus cabanillasii*
4. อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้บ่มไข่แช่เย็น 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
8. วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคิบบ ภาคนับไส้เดือนฝอย ผ้ากรองขนาด 48 ไมครอน เข็มเขี่ย จุกสำลี จุกยาง petridish

#### วิธีการ

การทดลองที่ 1 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่ใช้เลี้ยงด้วยแมลงอาศัยต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 6 กรรมวิธี ดังนี้

กรรมวิธีที่ 1 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 2 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 2,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 3 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 4 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 3,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 5 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร

กรรมวิธีที่ 6 ไส้เดือนฝอยเข้มข้น 4,000 ตัว/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร

#### วิธีปฏิบัติกรทดลอง

เตรียมไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ให้มีความหนาแน่นตามกรรมวิธี แล้วหยดไส้เดือนฝอยลงบนกระดาษกรองในงานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น ไส้หนอนกินรังผึ้ง *G. mellonella* จำนวน 10 ตัว/งานทดลอง ทำกรรมวิธีละ 10 ซ้ำ (งาน) จากนั้นนำงานทดลองเก็บที่อุณหภูมิ 25 °ซ. หลังการทดลองนาน 48 ชั่วโมงนำซากหนอนที่ตายในแต่ละกรรมวิธีมาล้างด้วยน้ำกลั่น ก่อนนำมาวางเรียงบนผ้าขาวบางที่ปูอยู่บนงานแก้วที่คว่ำอยู่ในกล่องพลาสติก ภายในหล่อด้วยน้ำกลั่นให้ระดับน้ำสูงประมาณ 3/4 ของความสูงของงานแก้ว เพื่อล่อไส้เดือนฝอย (Trap) หลังจากนั้นประมาณ 10 วัน เทเก็บน้ำที่มีไส้เดือนฝอยทุกวัน นำมาล้างด้วยน้ำกลั่นและนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ในแต่ละกรรมวิธี ก่อนเทเก็บไส้เดือนฝอยในชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ในถุงพลาสติกที่อุณหภูมิ 15 °ซ. นาน 2 สัปดาห์ จึงนำไส้เดือนฝอยมาทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ภาค) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง

#### การบันทึกผล

- บันทึกจำนวนหนอนกินรังผึ้งที่ตายในแต่ละกรรมวิธี ที่เวลา 48 ชั่วโมง
- จำนวนไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง ในแต่ละกรรมวิธี

การทดลองที่ 2 ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลว

โดยมีการวางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ มี 4 กรรมวิธี ดังนี้

- กรรมวิธีที่ 1 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 10,000 ตัว
- กรรมวิธีที่ 2 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 20,000 ตัว
- กรรมวิธีที่ 3 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 30,000 ตัว
- กรรมวิธีที่ 4 ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 40,000 ตัว

#### วิธีปฏิบัติการทดลอง

เตรียมอาหารเทียมแข็งกึ่งเหลวสูตรอาหารไข่ ประกอบด้วย ไข่ไก่ 10 ฟอง น้ำมันหมู 220 มล. น้ำกลั่น 331 มล. และฟองน้ำ 140 กรัม ผสมส่วนผสมต่างให้เข้ากันด้วยเครื่องผสมอาหาร แล้วนำมาขยี้รวมกับชั้นฟองน้ำสังเคราะห์ซึ่งตัดเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดลูกเต๋า ซึงอาหารเทียมใส่ในใส่ขวดแก้ว (flask) ขนาด 500 มล. ขวดละ 40 กรัม ปิดจุกสำลี และนำเข้าอบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °ซ เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำเชื้อบริสุทธิ์แบบคที่เรียกร่วมอาศัย *X. cabanillasii* และต้นไส้เดือนฝอยลงเลี้ยงในอาหารเทียมด้วยวิธีปลอดเชื้อตามกรรมวิธี ตั้งขวดเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอยที่ห้องควบคุมอุณหภูมิ 25 °ซ บันทึกการพัฒนาของไส้เดือนฝอยทุกวันจนไส้เดือนฝอยพัฒนาเจริญเติบโตเป็นวัย 3 ระยะ II 95-100% จึงทำการล้างเก็บผลผลิตและนับจำนวน

#### การบันทึกข้อมูล

- บันทึกจำนวนไส้เดือนฝอย ที่เพาะเลี้ยงได้ในแต่ละวิธีการในทุกการกรรมวิธี
- บันทึกคุณภาพผลผลิตไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ในแต่ละวิธีการใช้วิธี Paper bioassay ตามวิธีการมาตรฐานของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ลงบนกระดาษกรองที่รองกันภาดหลุม ปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 6 หลุมละ 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 5 ซ้ำ (ภาค) ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง และทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลง ดัดแปลงจากวิธี soil bioassay (Glazer, 2000) โดยใช้ทรายอบนิ่งฆ่าเชื้อจำนวน 1 กรัม รองกันภาดหลุม ก่อน

หยดใส่เดือนฝอยแต่ละชนิดลงบนทรายในภาดหลุม หลุมละ 60 ไมโครลิตร แล้วนำภาดหลุมเก็บที่ อุณหภูมิ 30 °ซ. เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง ปล่อยหนอนกินรังผึ้งวัย 6 หลุมละ 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 4 ซ้ำ ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

#### เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2556

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

#### ผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

**การทดลองที่ 1.** ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่เหมาะสมในการเลี้ยงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ต่อคุณภาพและประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย ดำเนินการทดลองด้วยวิธี Paper bioassay ใช้จานแก้วขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9.5 ซม. ภายในวางกระดาษกรอง 1 แผ่น โดยหยดไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (IJs) เข้มข้น 3 อัตรา คือ 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.4 มิลลิลิตร และที่อัตราความเข้มข้นของไส้เดือนฝอย 2,000 3,000 และ 4,000 ตัวในน้ำกลั่น 0.5 มิลลิลิตร หลังการทดลอง 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เข้าทำลายและทำให้หนอนกินรังผึ้งตาย เท่ากับ 82-100 เปอร์เซ็นต์ โดยพบหนอนกินรังผึ้งตายสูงสุดเมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเข้มข้นเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตร และ 0.5 มิลลิลิตร เท่ากับ 97 และ 100 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือไส้เดือนฝอยเข้มข้นเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ 0.4 มิลลิลิตร เท่ากับ 89 และ 93 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และที่อัตราความเข้มข้นเริ่มต้นของไส้เดือนฝอย 2000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตร และ 0.4 มิลลิลิตร พบหนอนกินรังผึ้งตายเท่ากับ 88 และ 82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 1)

ปริมาณน้ำที่ใช้ในทุกความเข้มข้นมีผลในการทำให้หนอนกินรังผึ้งตายแตกต่างกัน เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไส้เดือนฝอยเริ่มต้น แต่ลดปริมาณน้ำลง พบหนอนกินรังผึ้งตายลดลง ทั้งนี้อาจเนื่องจาก ปริมาณน้ำที่ลดลงหมายถึงความชื้นต่อหน่วยพื้นที่ทดลองลดลง ส่งผลให้การเคลื่อนที่ค้นหาแมลงและเข้าทำลายแมลงของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เป็นไปได้ไม่ง่ายและล่าช้าลง ทั้งนี้ การทำให้แมลงตายของไส้เดือนฝอยจะเกิดขึ้นภายหลังจากไส้เดือนฝอยค้นหาแมลงพบและเจาะผ่านเข้าสู่ตัวแมลงโดยผ่านทางช่องเปิดธรรมชาติ เช่น ช่องว่างระหว่างข้อปล้องของหนอน ปาก เป็นต้น ภายหลังจากไส้เดือนฝอยผ่านเข้าสู่ตัวแมลงสำเร็จแล้ว ไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงจะพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะต่างๆ จนเป็นตัวเต็มวัยขยายพันธุ์ อยู่ในในซากของแมลง โดยอาศัยของเหลวในตัวแมลงเป็นอาหาร ในการทดลองครั้งนี้ พบว่า ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ที่เข้าสู่ตัวหนอนกินรังผึ้ง เจริญเติบโตอยู่ภายในซากหนอนกินรังผึ้งวัย 5 นั้น ใช้เวลาประมาณ 10-12 วัน ภายหลังจากหล่อให้ไส้เดือนฝอยที่พัฒนาอยู่ภายในซากแมลงจนเป็นไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงออกจากซากแมลงเคลื่อนที่ลงสู่ที่หล่อไว้ในกล่องขึ้น โดยพบการเคลื่อนย้ายของไส้เดือนฝอยออกจากซากแมลงลงสู่ที่หล่อไว้ในวันที่ 10 หลังหนอนตาย ซึ่งได้ทำการเทเก็บไส้เดือนฝอยที่อยู่ในน้ำสะอาดที่หล่อไว้ทุกวัน นำน้ำไส้เดือนฝอยมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2-3 ครั้ง เพื่อกำจัดเศษซากหนอนที่อาจปนเปื้อนมา จากนั้นนำสารแขวนลอยที่มีไส้เดือนฝอยที่สะอาด

อยู่มานับจำนวนไส้เดือนฝอยที่ผลิตขยายในแต่ละกรรมวิธี พบว่าจำนวนไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่เลี้ยงขยายด้วยหนอนกินรังผึ้ง เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นแตกต่างกัน ได้ผลผลิตเฉลี่ยต่อหนอนหนอนกินรังผึ้งหนึ่งตัว เท่ากับ  $2.10 \times 10^5 - 3.60 \times 10^5$  ตัว เมื่อใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 4,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงสุด  $3.60 \times 10^5$  ตัว รองลงมาคือ ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง  $2.80 \times 10^5$  ตัว และไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 2,000 ตัวในน้ำ 0.5 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง สูงกว่ารองลงมาคือ ใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น 3,000 และ 2,000 ตัวในน้ำ 0.4 มิลลิลิตรต่อหนอนกินรังผึ้ง 10 ตัว ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง เท่ากับ  $3.40 \times 10^5$ ,  $2.60 \times 10^5$  และ  $2.10 \times 10^5$  ตัว ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

เมื่อนำไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี นำมาทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยที่ผลิตได้ตามวิธีการของ Miller (1989) โดยใช้ไส้เดือนฝอย 1 ตัว/หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว แต่ละกรรมวิธีทำ 3 ซ้ำ (ภาค) ๆ ละ 24 ตัว ตรวจนับและบันทึกจำนวนหนอนตายภายในเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าไส้เดือนฝอยเลี้ยงขยายได้จากทุกกรรมวิธี มีคุณภาพโดยทำให้แมลงตายไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน

**การทดลองที่ 2** ศึกษาผลของความเข้มข้นเริ่มต้น (Inoculums) ของไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมแข่งกิ้งเหลม พบว่า เลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารเทียมแข่งกิ้งเหลมสูตรอาหารไข่ โดยการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 10,000 ตัว สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้สูงสุดเท่ากับ  $2.2 \times 10^6$  ตัวต่ออาหาร 40 กรัม มีความแตกต่างทางสถิติกับการใช้ต้นเชื้อไส้เดือนฝอย 20,000-30,000 ตัว ซึ่งสามารถผลิตไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ  $1.6 \times 10^6$  ตัว การเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นเป็น 45,000 ตัวต่ออาหาร 40 กรัม สามารถผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงได้เท่ากับ  $1.95 \times 10^6$  ตัวต่ออาหาร 40 กรัม ทั้งนี้จะเห็นว่าการเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นและปริมาณอาหารที่ใช้เลี้ยงอาจมีความสัมพันธ์ต่อจำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย ซึ่งต้องศึกษาต่อไป

### สรุปผลการทดลองและคำแนะนำ

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูง ด้วยแมลงอาศัยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria melonella* โดยวิธี paper bioassay โดยใช้ไส้เดือนฝอยเริ่มต้นตั้งแต่ 2,000 – 4,000 ตัวต่อน้ำ 0.4 และ 0.5 มิลลิลิตร ไส้เดือนฝอย *S. riobrave* เจริญเติบโตและขยายพันธุ์ ออกลูกหลานและพัฒนาเป็นไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) และเริ่มออกจากซากหนอนวันที่ 10 วัน ได้ผลผลิตไส้เดือนฝอยเฉลี่ย 210,000 – 360,000 ตัวต่อหนอน 1 ตัว ไส้เดือนฝอยที่เลี้ยงได้ในทุกกรรมวิธีมีคุณภาพและมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่ต่ำกว่าเกณฑ์มาตรฐาน เมื่อทดสอบตามวิธีการของ Miller (1989) โดยหยดไส้เดือนฝอย 1 ตัว ต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ตรวจผลการทดลองที่ 48 ชั่วโมง แม้ว่าการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ด้วยหนอนกินรังผึ้ง

*G. melonella* จะให้ผลผลิตไส้เดือนฝอยสูงถึง 360,000 ตัวต่อหนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว สำหรับการเลี้ยงไส้เดือนฝอยด้วยอาหารเทียมจำเป็นต้องศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณอาหารและจำนวนไส้เดือนฝอยเริ่มต้นที่ใช้ซึ่งอาจมีผลต่อผลผลิตไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงที่ผลิตได้ ดังนั้นจำเป็นต้องมีการพัฒนารูปแบบและวิธีการผลิตอื่นที่เหมาะสมทั้งนี้เพื่อให้ได้ผลผลิตปริมาณมากเพียงพอสำหรับความต้องการของเกษตรกรในการนำไส้เดือนฝอย *S. riobrave* ซึ่งทนอุณหภูมิสูงไปใช้ควบคุมแมลงในสภาพไร่

### เอกสารอ้างอิง

- วัชรีย์ สมสุข. 2540. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.). วารสารกีฏและสัตววิทยา ปีที่ 19 (2):107-109
- วัชรีย์ สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, หน้า 209-244. ใน การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.
- วัชรีย์ สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้าจัดพิมพ์โดย กรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 172 หน้า.
- Bedding, R.A. 1981. Low cost In Vitro mass production of *Neoplectana* and *Heterorhabditis* species (Nematoda) for field control of insect pests. *Nematologica* 27 : 109-114.
- Cabanillas, H.E., G.O. Jr. Poinar and J.R. Raulston. 1994. *Steinernema riobrave* n. sp. (Rhabditida: Steinernematidae) from Texas. *Fundam. Appl. Nematol.* 17:123-131
- Friedman, M.J. 1990. Commercial production and development. pp. 153-172 In R. Gaugler and H.K. Kaya, eds.. *Entomopathogenic nematodes in biological control*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Miller, R. W. 1989. Novel pathogenicity assessment technique for *Steinernema* and *Heterorhabditis* Entomopathogenic nematodes. *J. Nematol.* 21:574.(abstr.)
- Poinar, 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.
- Poinar, G. O. and G. M. Thomas. 1966. Significance of *Achromobacter nematophilus* Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (*Neoplectana* sp., Steinernematidae). *J. Parasitol.* 56:385-390.

**ตารางที่ 1** เปอร์เซ็นต์การตายของหนอนกินรังผึ้งด้วยไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* ที่ความเข้มข้นเริ่มต้นต่างๆ ภายในเวลา 48 ชั่วโมง

ปริมาณน้ำ (มล.)	ความเข้มข้นเริ่มต้น (inoculums) ของไส้เดือนฝอย <i>S. riobrave</i> (ตัว/มล)		
	2,000	3,000	4,000
0.4	82	89	97
0.5	88	93	100

**ตารางที่ 2** จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่เลี้ยงด้วยหนอนกินรังผึ้ง

ความเข้มข้นเริ่มต้นของไส้เดือนฝอย (ตัว/มล)	จำนวนไส้เดือนฝอย <i>S. riobrave</i> วัย 3 ระยะ II (ตัว/หนอน)
2,000/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร	$2.10 \times 10^5$ a
2,000/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร	$2.40 \times 10^5$ ab
3,000/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร	$2.60 \times 10^5$ ab
3,000/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร	$2.80 \times 10^5$ b
4,000/น้ำ 0.4 มิลลิลิตร	$3.40 \times 10^5$ a
4,000/น้ำ 0.5 มิลลิลิตร	$3.60 \times 10^5$ ab

CV 30.8 %

**ตารางที่ 3** จำนวนผลผลิตไส้เดือนฝอย *Steinernema riobrave* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลงที่เลี้ยงด้วยอาหารแข็งกึ่งเหลว 40 g

ไส้เดือนฝอยเริ่มต้น (ตัว/อาหาร 40 g)	จำนวนไส้เดือนฝอย <i>S. riobrave</i> วัย 3 ระยะ II (ตัว)
10,000	$2.295 \times 10^6$ a
20,000	$1.661 \times 10^6$ b
30,000	$1.600 \times 10^6$ b
40,000	$1.905 \times 10^6$ ab

CV 24.6 %