1. **ชุดโครงการวิจัย** วิจัยการพัฒนาอารักขาพืช

2. **โครงการวิจัย** วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี

กิจกรรม การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

กิจกรรมย่อยที่ การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช

3. **ชื่อการทดลอง (ภาษาไทย)** ปัจจัยที่มีผลต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* ชนิดผง

ชื่อการทดลอง (ภาษาอังกฤษ)

4. **คณะผู้ดำเนินงาน**

หัวหน้าการทดลอง วิไลวรรณ เวชยันต์

ผู้ร่วมงาน สาทิพย์ มาลี อิศเรส เทียนทัด

กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. **บทคัดย่อ**

ทำการศึกษาผลของไคโตซาน และ กัม ตอความอยูรอดและประสิทธิภาพของไสเดือนฝอยศัตรูแมลง *S. carpocapsae* ชนิดผง พบว่า หลังการผสมสารไคโตซาน และ กัม อัตรา 0.05% ในผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยผง พบว่า ไคโตซาน และ กัม ไม่มีผลต่อการมีชีวิตและคุณภาพของไส้เดือนฝอย เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน และที่เวลา 3 เดือน ไส้เดือนฝอยยังคงมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับสูง และยังคงมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงสูงเช่นเดียวกัน ศึกษาขนาดบรรจุต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง โดยบรรจุไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง 10, 15, 20 และ 25 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร พบว่า ที่อัตรา 10 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดสูงกว่ากรรมวิธีอื่น

6. **คำนำ**

ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีศักยภาพสูงมีการศึกษาวิจัยและพัฒนาเป็นสารชีวินทรีย์นำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด (Klein, 1990; Poinar, 1979) เนื่องจาก ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล มีการดำรงชีวิตร่วมกับแบคทีเรียที่เป็น symbiotic bacterium โดยไส้เดือนฝอยตัวอ่อนวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (infective juvenile) จะมีแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในลำไส้ส่วนหน้า และจะปลดปล่อยในระบบเลือดของแมลงเมื่อสามารถไชเข้าไปอยู่ในตัวแมลง ซึ่งเป็นสาเหตุสำคัญทำให้แมลงตายภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง (Poinar and Thomas, 1966) สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยแมลงอาศัยซึ่งนิยมใช้หนอน

กินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ซึ่งเป็นหนอนที่เลี้ยงให้มีปริมาณมากได้ง่ายด้วยอาหารเทียม (วัชรี, 2540) ไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* สามารถเลี้ยงเพิ่มปริมาณได้ในอาหารเทียมทั้งอาหารแข็ง และในอาหารเหลว (Bedding, 1981, 1984, Friendman, 1990) เป้าหมายของการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. ให้ได้ปริมาณมากเพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชจะต้องผลิตให้ได้ไส้เดือนฝอยตัวอ่อนระยะที่ 3 ที่เป็นระยะเข้าทำลายแมลงซึ่งเป็นระยะที่สามารถปรับตัวให้อยู่รอดในสภาพที่ไม่เหมาะสม เช่น สภาพที่ไม่มีอาหารหรือไม่มีแมลงอาศัย ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าสูตรอาหารเทียมและพัฒนาวิธีการผลิตไส้เดือนฝอยให้ได้ปริมาณมากแต่ต้นทุนการผลิตต่ำ เพื่อการนำไปใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืชในพื้นที่กว้างขวางได้ทุกระดับ การเลี้ยงเพิ่มปริมาณด้วยอาหารเทียมระยะแรกเลี้ยงบนอาหารเทียมที่ไม่มีเชื้ออื่นเจือปนเรียกว่า axenic culture ซึ่งส่วนประกอบของอาหารที่ใช้มีราคาแพงแต่การเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยไม่ดีนัก ต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยบนอาหารเทียมร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัยในอาหารแข็ง เรียกการเลี้ยงแบบนี้ว่า monoxenic culture (Bedding, 1981) ในประเทศไทยโดยกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร ได้ทำการทดลองนำไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ไปควบคุมแมลงศัตรูพืชต่างๆ หลายชนิดได้เป็นผลสำเร็จ ทั้งหนอนกินใต้ผิวเปลือกลองกอง ตัวอ่อนของด้วงหมัดผักในผักกาดหัว ด้วงงวงมันเทศ หนอนกระทู้หอมในดาวเรือง นอกจากนี้ยังได้วิจัยและพัฒนาการเลี้ยงขยายปริมาณมากด้วยอาหารเทียมทั้งชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลวโดยปรับปรุงสูตรอาหารบางส่วนให้เหมาะสม และศึกษาวิธีการแยกเชื้อแบคทีเรียที่ติดอยู่ที่ลำไส้ของไส้เดือนฝอยและการเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปผสมในอาหารเทียมเลี้ยงไส้เดือนฝอย และต่อมามีการพัฒนาการเลี้ยงไส้เดือนฝอยในอาหารเหลว (วัชรี และสุทธิชัย,2544) และเทคโนโลยีดังกล่าวได้ถ่ายทอดสู่ภาคเอกชนผลิตเป็นการค้าแล้ว วิธีการเก็บไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ในรูปผงชื้นละลายน้ำ เป็นหนึ่งในวิธีการเก็บรักษาชีวภัณฑ์ที่เกษตรกรนำไปใช้งานได้ง่าย เพียงละลายน้ำฉีดพ่น และเป็นวิธีการที่เก็บรักษาไส้เดือนฝอยให้มีอายุการเก็บรักษา (shelf- life) โดยมีอัตราการอยู่รอดไม่ต่ำกว่า 90% และยังคงมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลงไม่เปลี่ยนแปลง โดยเก็บในดินผงใส่ในกระบอกทึบพลาสติก ขนาด 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส มีอายุการเก็บนาน 6 เดือน

7. วิธีดำเนินการ

อุปกรณ์

- ไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง
- หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella* (L.)
- แบคทีเรียร่วมอาศัย *Xenorhabdus nematophila*
- อุปกรณ์เครื่องมือต่างๆ ได้แก่ ตู้อบนึ่งฆ่าเชื้อ ตู้ปลอดเชื้อ เครื่องเขย่า กล้องจุลทรรศน์

- เครื่องแก้วต่างๆ ได้แก่ flask, beaker, cylinder, petri dish และ test tube
- อาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ Ys broth, Yeast extract, และ Tryptic soy broth
- สารเคมีต่างๆ ได้แก่ alcohol, formalin, hyamine,
- วัสดุและอุปกรณ์อื่นๆ ได้แก่ สำลี กระดาษอลูมิเนียม ปากคีบ ถาดนับไส้เดือนฝอย

วิธีการ

1. การเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae*

โดยการเลี้ยงไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ร่วมกับแบคทีเรียร่วมอาศัย ในอาหารสูตร TSB3 (วัชรี และสุทธิชัย, 2544) ที่บรรจุในขวดรูปชมพู่ วางบนเครื่องเขย่า ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เมื่อไส้เดือนฝอยพัฒนาเป็นระยะเข้าทำลายแมลง (IJ) มากกว่า 90 % จึงทำการเก็บไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง โดยการล้างตกตะกอน เทเก็บไส้เดือนฝอยใส่ในฟองน้ำสังเคราะห์ในถุงพลาสติก เก็บไว้ในตู้เย็น เพื่อนำไปเตรียมสูตรสำเร็จต่อไป

2. การเตรียมผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง

นำสารแขวนลอยของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* วัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง จำนวน 50 ล้านตัว ผสมกับดินสูตรของวัชรี และสุทธิชัย (2544) ผสมให้เข้ากัน นำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในถุงพลาสติกเก็บในตู้เย็น เพื่อนำใช้ในขั้นตอนต่อไป

3. ทดสอบผลของสารเสริมประสิทธิภาพต่อการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง

นำสารเสริม 2 ชนิด คือ ไคโตซาน และ กัม ในอัตราชนิดละ 0.05% มาผสมกับไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* จากข้อ 2 จำนวน 100 กรัม ผสมให้เข้ากันดีด้วยเครื่องผสม ก่อนนำส่วนผสมที่ได้ใส่ลงในกระป๋องพลาสติกขนาด 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ทำสูตรละ 3 ซ้ำ) ทำตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอย ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงและทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ทุกเดือน

4. ทดสอบขนาดบรรจุต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง

ศึกษาขนาดบรรจุไส้เดือนฝอยชนิดผง 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 20 และ 25 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทุกเดือน สุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอยจำนวน 1 กรัมนำมาละลายน้ำและตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller 1989

การบันทึกข้อมูล

- จำนวนไส้เดือนฝอยที่รอดชีวิต
- จำนวนหนอนตายที่เวลา 48 ชั่วโมง เมื่อทดสอบคุณภาพของไส้เดือนฝอยตามวิธีมาตรฐานของ Miller (1989)

เวลาและสถานที่

เวลา : เดือนตุลาคม 2554 – เดือนกันยายน 2558

สถานที่ : ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา

สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

หลังการผสมสารไคโตซาน และ กัม อัตรา 0.05% ในผลิตภัณฑ์ไส้เดือนฝอยผง พบว่า ภายในเวลา 1 ชั่วโมง ไคโตซาน และ กัม ไม่มีผลต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอย และเมื่อนำไส้เดือนฝอยนี้ไปทดสอบคุณภาพตามวิธีมาตรฐานของ Miller (1989) โดยนำสารแขวนลอยของไส้เดือนฝอย 1 ตัว หยดลงบนกระดาษกรองในถาดหลุมขนาด 24 หลุมต่อถาด ก่อนใส่หนอนกินรังผึ้ง 1 ตัว ไส้เดือนฝอยนี้ยังคงมีคุณภาพสามารถเข้าทำลายแมลงได้ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเวลาผ่านไป 2 สัปดาห์ ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน และที่เวลา 3 เดือน ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดในระดับสูง และยังคงมีประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลง

ทดสอบขนาดบรรจุ ต่อความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผง โดยศึกษาขนาดบรรจุไส้เดือนฝอยชนิดผง 4 ระดับ ได้แก่ 10, 15, 20 และ 25 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร ทุก 2 สัปดาห์ สุ่มตัวอย่างไส้เดือนฝอยจำนวน 1 กรัมนำมาละลายน้ำและตรวจการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยและประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงตามวิธีการของ Miller 1989 พบว่า ขนาดบรรจุไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ชนิดผงปริมาตร 5 กรัม ซึ่งมีไส้เดือนฝอยเข้มข้นอัตรา 10 ล้านตัวต่อภาชนะบรรจุขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร เป็นกรรมวิธีที่ไส้เดือนฝอยมีชีวิตรอดสูงกว่ากรรมวิธีอื่น จะเห็นว่าภาชนะในการเก็บรักษาและปริมาตรชีวภัณฑ์ที่บรรจุในภาชนะ มีความสัมพันธ์กัน หากไม่เหมาะสม จะทำให้ชีวภัณฑ์หรือผงชื้นที่ภายในมีไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* ซึ่งเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการความชื้นในการดำรงชีวิต ได้รับผลกระทบ จากการทดลอง กรรมวิธีที่บรรจุไส้เดือนฝอย อัตราตั้งแต่ 15-25 ล้านตัว ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การตายสูง และพบว่าผงชื้นนั้นมีการระเหยของน้ำสูง และแห้ง หลังการทดลอง 5 เดือน ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถวัดความชื้นของชีวภัณฑ์ผงละลายน้ำได้เนื่องจากขาดเครื่องมือ ขนาดบรรจุชีวภัณฑ์เดิม คือ ปริมาตร 75 กรัม ซึ่งมีไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัวบรรจุในกระป๋องทรงสูงปริมาตร 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตสูงกว่า และเมื่อเก็บภาชนะในสภาพที่มีการรักษาอุณหภูมิให้คงที่ตลอดระยะเวลาการเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 5-7 องศาเซลเซียส พบว่า ความชื้นของชีวภัณฑ์มีการเปลี่ยนแปลงลดลง แต่อยู่ในระดับที่ปลอดภัยและไม่มีผลกระทบต่อการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง (ชีวภัณฑ์) ที่บรรจุภายในภาชนะ

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

สารเสริมประสิทิภาพที่เพิ่มไปในชีวภัณฑ์ทั้ง กัมและไคโตซานไม่มีผลต่อเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของไส้เดือนฝอย ขนาดของภาชนะที่บรรจุและปริมาตรชีวภัณฑ์ที่บรรจุในภาชนะ มีความสัมพันธ์กัน ขนาดที่เหมาะสมสำหรับชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยผงละลายน้ำ คือ ปริมาตรผงชื้น 75 กรัม ซึ่งมีไส้เดือนฝอย 50 ล้านตัว ต่อ ภาชนะขนาด 300 ลูกบาศก์เซนติเมตร ขนาดบรรจุที่เล็กลง ปริมาตรที่บรรจุต้องปรับลดในอัตราที่เหมาะสม จาก

การทดลองครั้งนี้พบว่าภาชนะขนาด 80 ลูกบาศก์เซนติเมตร สามารถบรรจุผงดินปริมาตร 5 กรัมซึ่งมีไส้เดือนฝอยชื้น 10 ล้านตัว เป็นอัตราที่เหมาะสม ไส้เดือนฝอยมีเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตได้สูง หลังการทดลอง 5 เดือน

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

11. คำขอบคุณ (ถ้ามี)

12. เอกสารอ้างอิง

วัชรี สมสุข. 2544. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง, หน้า 209-244. ใน การควบคุมแมลงศัตรูพืชโดยชีววิธีเพื่อการเกษตรยั่งยืน. เอกสารวิชาการ กองกีฏและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร.

วัชรี สมสุข และสุทธิชัย สมสุข. 2544. รายงานผลงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ เรื่องผลงานวิจัยโครงการวิจัยและพัฒนาการผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในระดับการค้าจัดพิมพ์โดย กรมวิชาการเกษตร สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย และมหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ 172 หน้า.

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.

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

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. 1966. Significance of Achromobacter nematophilus Poinar and Thomas (Achromobacteriaceae: Eubacteriales) in the development of the nematode, DD-136 (Neoaplectana sp.,Steinernematidae). J. Parasitol. 56:385-390.

13. ภาคผนวก

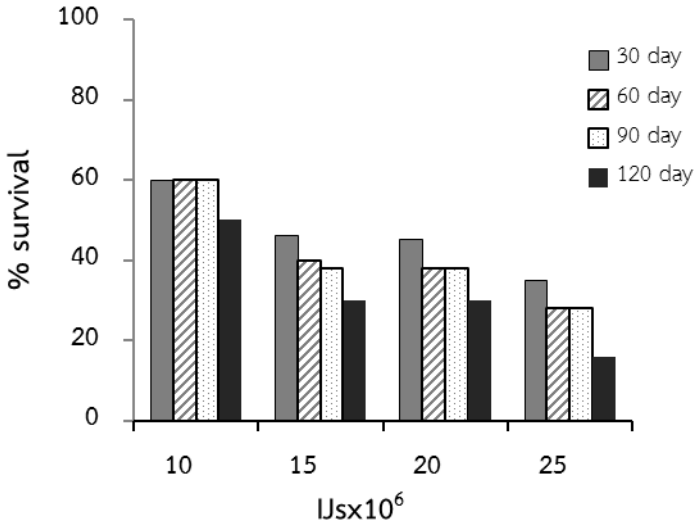

Figure 1 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* Maintained in powder formulation at 5-7 ^{0}c.

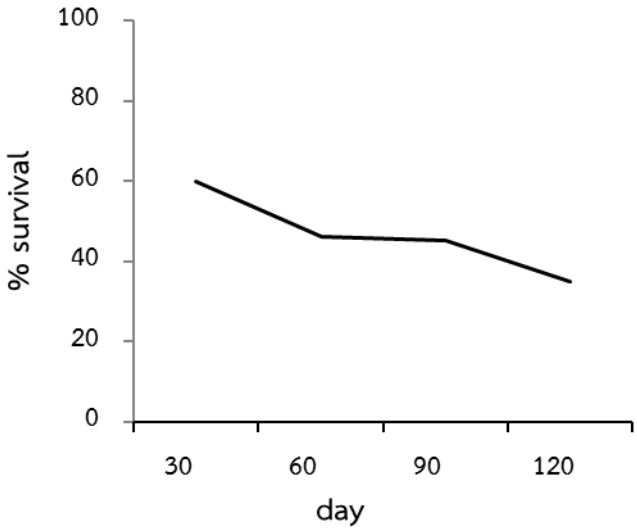

Figure 2 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* after maintained in powder formulation at 30 day.

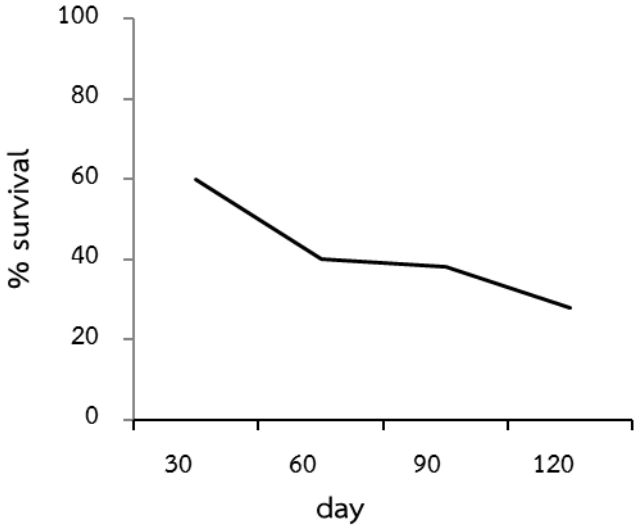

Figure 3 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* after maintained in powder formulation at 60 day.

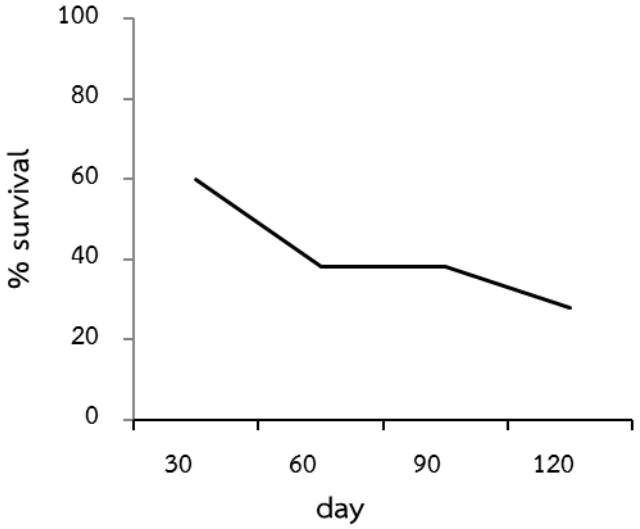

Figure 4 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* after maintained in powder formulation at 90 day.

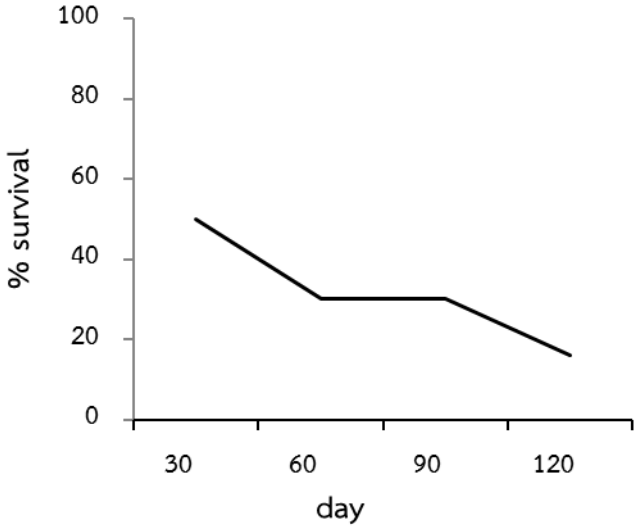

Figure 5 Survival percentage of entomopathogenic nematode, *Steinernema riobrave* after maintained in powder formulation at 120 day.