

อุปกรณ์และวิธีการ

การทดลองแบ่งเป็น 2 ส่วนคือ การทดลองส่วนแรก เป็นการทดสอบประสิทธิภาพการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ในสภาพห้องปฏิบัติการ โดยเลือกทดสอบกับปลวกงาน *Odontotermes feae* (Wasman) การทดลองส่วนที่ 2 เป็นการเลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยในอาหารเทียมสูตร ATCC 1366 โดยการปรับปรุงอัตราส่วนของ yeast extract, peptone และการเสริมด้วยไขมัน สำหรับเป็นอาหารของไส้เดือนฝอย

การเตรียมไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser)

ไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ที่ใช้ในการศึกษา ได้จากกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ล้างไส้เดือนฝอยที่เก็บอยู่ในฟองน้ำด้วย formalin 0.1% ก่อนใช้กรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 μm เพื่อให้ได้ไส้เดือนฝอยที่แข็งแรง และหาอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย โดยการนับด้วยวิธี dilution counting ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

การเตรียมปลวกที่ใช้ในการศึกษา

ชนิดของปลวกงาน *Odontotermes feae* (Wasmann) ที่ใช้ในการศึกษา ได้จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างปลวกที่ทำลายต้นพืช เศษใบไม้ กิ่งไม้ในบริเวณมหาวิทยาลัยขอนแก่น

วิธีทดสอบแบบ soil inoculation method

ทำการทดลองโดยใส่ไส้เดือนฝอยในน้ำกลั่น 0.5 มล. ต่อจานทดลอง ที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยตามต้องการ ในจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 x 1.5 ซม. ใส่ดินร่วนปนทรายที่มีอนุภาคดินขนาด 0.5-1 มม. ซึ่งอบแห้งแล้วจำนวน 10 กรัมต่อจานทดลอง ใส่ปลวกงานจำนวน 5 ตัว และให้ความชื้นดินโดยการเติมน้ำเปล่าปริมาตร 1 มล. (คิดเป็นความชื้นดินประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก) ปิดฝาเก็บในถุงพลาสติกเพื่อรักษาให้ภายในมี

สภาพความชื้นสูง นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 25 °C ในสภาพมืด จากนั้น 24 ชม. ตรวจนับการตายของแมลงทดสอบ

วิธีการตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยในตัวปลวก

โดยการสุ่มตัวอย่างปลวกที่ตายจำนวน 5 ตัวต่อกรรมวิธีการทดลอง นำมาล้างด้วยน้ำเพื่อกำจัดไส้เดือนฝอยที่อาจติดอยู่บริเวณผิวหนังด้านนอกให้หลุดออก ก่อนจะนำปลวกมาผ่าในน้ำเกลือเข้มข้น 0.7% ภายใต้กล้อง stereomicroscope ทั่วให้ประมาณ 1 ซม. ก่อนตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่พบในตัวแมลง

การศึกษาการทำให้เกิดโรคกับปลวกในห้องปฏิบัติการ

1. ผลของความชื้นของดินต่อการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ระยะเข้าทำลายแมลงกับปลวกงาน *O. feae* (Wasmann) โดยวิธี soil inoculation method ทำการทดลองโดยใส่ไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย 1,000 ตัวลงบนดินในจานทดลองพลาสติก และมีการให้ความชื้นของดินด้วยน้ำเปล่า ความชื้นของดินที่ทำการศึกษาคือ 5, 10, 15, และ 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก แต่ละกรรมวิธี ทำการทดลอง 20 ซ้ำ หลังการปล่อยปลวกงาน 24 ชม. อุณหภูมิ 25 °C ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกในแต่ละกรรมวิธี

2. ผลของอุณหภูมิต่อการทำให้เกิดโรคของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ระยะเข้าทำลายแมลงกับปลวกงาน *O. feae* (Wasmann) ใช้วิธี soil inoculation method ทำการทดลองโดยใส่ไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 1,000 ตัวในน้ำกลั่น 1.5 มล. ต่อจานทดลอง อุณหภูมิที่ทำการศึกษาคือ 20, 25, 30, และ 35 °C ทำ 20 ซ้ำต่อกรรมวิธี หลังปล่อยปลวกงาน 24 ชม. ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกงาน

3. ผลของอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ต่อเปอร์เซ็นต์ของไส้เดือนฝอยที่เข้าสู่ตัวปลวกงาน ใช้วิธี soil inoculation method ทำการทดลองโดยใส่ไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 0, 500, 1,000, 5,000 และ 10,000 ตัวในน้ำกลั่น 1.5 มล. ต่อจานทดลอง จากนั้นปล่อยปลวกงานจำนวน 5 ตัวต่อจานทดลอง ทำ 20 ซ้ำต่อกรรมวิธี หลังปล่อยปลวกงาน 24 ชม. ที่อุณหภูมิ 25 °C ทำการตรวจนับเปอร์เซ็นต์การตายของปลวกงาน

4. ผลของระยะเวลาที่ปล่อยให้ไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมกับแมลงอาศัย ต่อเปอร์เซ็นต์ของจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าสู่ตัวแมลง ใช้วิธี soil inoculation method ที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยที่ทำการทดลองเท่ากับ 2,500 ตัวในน้ำกลั่น 1.5 มล. ต่อจานทดลอง หลังปล่อยให้ไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมกับปลวกงานเป็นเวลานาน 6, 12, 18, และ 24 ชม. ทำการย้ายปลวกทุกตัวในแต่ละกรรมวิธีลงจานทดลองใหม่ที่ไม่มีการใส่ไส้เดือนฝอยแต่มีสภาพการทดลองเหมือนเดิม ทำ 20 ซ้ำต่อกรรมวิธี หลังปลวกตาย 24 ชม. สุ่มตัวอย่างปลวกมาอัตราความหนาแน่นละ 10 ตัวนำปลวกมาผ่าและตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยที่เข้าสู่ตัวปลวกงาน

5. ศึกษาพัฒนาการของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ในปลวกงาน *O. feae* (Wasmann) ทำการทดลองโดย วิธี soil inoculation method ที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 10,000 ตัวต่อจานทดลอง หลังปล่อยให้ไส้เดือนฝอยอยู่ร่วมกับปลวกเป็นเวลานาน 6 ชม. เพื่อให้มีจำนวนไส้เดือนฝอยสามารถเข้าสู่ตัวปลวกงานในจำนวนที่มากพอในการทดลอง จากนั้นทำการย้ายปลวกทุกตัวลงจานทดลองใหม่ซึ่งไม่มีการใส่ไส้เดือนฝอย แต่มีสภาพการทดลองเหมือนเดิม ปลวกที่ตายจะล้างด้วย formalin 0.1 % เก็บในหลอดทดลองภายในมีกระดาษกรองขนาด 1.0x5.0 ซม. และให้ความชื้นภายในหลอดด้วย formalin 0.1 % จำนวน 0.5 มล. ทำการศึกษาคูชีพของไส้เดือนฝอยในปลวกโดยการสุ่มตัวอย่างปลวกที่ตายจำนวน 5 ตัวนำมาผ่า และบันทึกพัฒนาการของไส้เดือนฝอยภายในปลวกทุกวันจนครบวงจรชีวิตของไส้เดือนฝอย

6. ผลของอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้ปลวกทดสอบตายร้อยละ 50 ของปลวกทดสอบ (LC_{50}) ทำการทดลองโดยวิธี soil inoculation method ที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 50, 125, 250, 500, 1,000, 2,000 และ 5,000 ตัวต่อจานทดลอง โดยใส่ปลวกงาน 5 ตัวต่อจานทดลอง แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 3 ซ้ำๆ ละ 20 จานทดลอง

หลังการปล่อยปลวก 24 ชม. ทำการตรวจนับการตายของปลวกในแต่ละอัตราความหนาแน่น วิเคราะห์ LC₅₀ (median lethal concentration) โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quant 13

7. การศึกษาประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอย *S. carpocapsae* (Weiser) ในระยะเข้าทำลายต่อการทำให้เกิดโรคกับปลวกงาน *O. feae* (Wasmann) ในสภาพห้องปฏิบัติการ และเพื่อศึกษาการคงอยู่ของไส้เดือนฝอยในดิน ทำการทดลองโดยใส่ไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยเท่ากับ 10,000, 100,000, และ 1,000,000 ตัวในกล่องพลาสติกขนาด 30x12x20 ซม. ใส่ดินร่วนปนทรายที่มีอนุภาคดินขนาด 0.5-1 มม. จำนวน 500 กรัมต่อกล่อง และมีการให้ความชื้นดินประมาณ 15 % ด้วยการพ่นละอองน้ำ จากนั้นปล่อยปลวกงานจำนวน 30 ตัวต่อกล่อง และตรวจนับการตายของปลวกหลังจากนั้น 24 ชม. หลังจากปล่อยปลวกงานจำนวน 30 ตัว ทุกสัปดาห์ เป็นเวลา 7 สัปดาห์

การศึกษากการเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอย *Steinernema carpocapsae* (Weiser) ด้วยอาหารเทียม

1. การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยงไส้เดือนฝอย ใช้สูตร ATCC 1366 ซึ่งเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Xenorhabdus nematophilus* (Atlas, 1993) ที่ประกอบด้วย peptone 10 ก., yeast extract 5 ก., NaCl 5 ก., agar 12 ก., และ H₂O 1,000 มล. โดยซึ่งส่วนผสมต่างๆ ผสมรวมกันใส่น้ำกลั่น คนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกันเทใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มล. ปิดฝานำเข้าตู้อบนิ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 °C นาน 20 นาที หลังอบนิ่งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลงประมาณ 45-50 °C จึงนำมาเทลงบนจานเลี้ยงเชื้อที่อบฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 มล. ต่อจาน ทดลองทิ้งไว้ให้เย็น

2. การเตรียมเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย *X. nematophilus* ประกอบด้วย 2 ขั้นตอนคือ

2.1 การทำให้หนอนตายด้วยไส้เดือนฝอยโดยใช้หนอนกระทู้ผัก *Spodoptera litura* วัยที่ 5 โดยวิธี filter paper method ในจานทดลองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6x1.5 ซม. รองกันโดยใส่กระดาษกรอง (Whatman # 1, ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 ซม.) 1 แผ่น ใส่หนอนกระทู้วัยที่ 5 ในจานทดลองจานละ 1 ตัว โดยใส่ไส้เดือนฝอยที่อัตราความหนาแน่น 2,000 ตัว ในน้ำกลั่น 0.5 มล. ต่อจานทดลองลงบนกระดาษกรอง ปิดฝาและใส่ในถุงพลาสติกก่อนนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C

2.2 การแยกเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียจากหนอนหลังหนอนตายเป็นเวลานาน 24 ชม. ล้างหนอนให้สะอาดด้วย formalin 0.1 % และทำความสะอาดผิวหนังด้านนอกด้วยแอลกอฮอล์ 70 % ในสภาพปลอดเชื้อ ก่อนนำมาแยกเลือดโดยการตัดผนังลำตัวบริเวณขาเทียม น้ำเลือดหนอนจะไหลออกมาตามแรงกด ต้องระวังไม่กดแรงเกินไปเพราะจะทำให้ลำไส้แตก ใช้เข็มเขี่ยแต่น้ำเลือดไปขีดเป็นแนวลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ YS agar และ YS+2,3,5 triphenyl tetrazolium chloride 0.004 %, bromothymol blue 0.025 % นำไปเก็บที่อุณหภูมิ 25 °C หลังจากนั้น 24 ชม. เลือกโคโลนีของแบคทีเรียที่ติดสีน้ำเงินแยกเป็น stock ทำให้บริสุทธิ์บนอาหาร YS agar เก็บไว้ใช้ต่อไป และทำการย้ายเชื้อลงอาหารใหม่ทุก 15 วัน

3. การเตรียมสารละลายเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* สำหรับเลี้ยงไส้เดือนฝอย

เขี่ยเชื้อบริสุทธิ์แบคทีเรียที่เตรียมไว้ จำนวน 14-20 loop ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth 100 มล. ในขวดรูปชมพู่ตั้งทิ้งไว้ที่ 25 °C เป็นเวลานาน 24 ชม. ทำการเจือจางสารละลายแบคทีเรียด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ YS broth ให้ได้ค่าการดูดกลืนคลื่นแสง 0.382 ที่ความยาวคลื่น 420 nm จะมีแบคทีเรียจำนวน 10^7 cfu/มล. เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การเตรียมไส้เดือนฝอยสำหรับการเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม

ล้างไส้เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงด้วย formalin 0.1% ก่อนใช้กรองผ่านผ้ากรองขนาด 32 μ m เพื่อให้ได้ไส้เดือนฝอยที่แข็งแรง ล้างด้วยสารละลาย thimerosal 0.1 % เพื่อทำความสะอาดผิวของไส้เดือนฝอย (surface sterilized) ก่อน โดยการล้าง 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่นหนึ่งชั่วโมง 3 ครั้งๆ ละ 20 นาที และหาอัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอย

5. การเพาะเลี้ยงไส้เดือนฝอย โดยใส่ไส้เดือนฝอยซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อที่ผิวประมาณ 1,000 ตัว ที่ผสมอยู่ในอาหาร YS broth ที่มีเชื้อแบคทีเรีย *X. nematophilus* ลงบนอาหารเทียมสูตรต่างๆ ที่ทำการทดลอง จำนวน 100 μ l./จานทดลอง เก็บที่ 25 °C เป็นเวลานาน 21 วัน จึงเก็บผลผลิตและตรวจนับจำนวนไส้เดือนฝอยในระยะเข้าทำลายแมลงด้วย nematode counting slide ขนาด 1 มล. (Peters, 1952) ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์โดยวิธี dilution counting นับ 5 ซ้ำ

5.1 การศึกษาผลของไขมัน (lard oil) ที่เสริมลงในอาหารเทียมสูตร ATCC 1366 ต่อผลผลิตจำนวนไข่เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 6 กรรมวิธีคือ อาหารเทียมสูตร ATCC 1366 ที่เสริมด้วยไขมันในอัตรา 1, 2, 3, 4, 5, และ 6 % ทำ 20 ซ้ำต่อกรรมวิธี (1 ซ้ำ = 1 จานทดลอง) นำไปเก็บที่ 25 °C เป็นเวลานาน 21 วันและตรวจนับจำนวนไข่เดือนฝอยในระยะเข้าทำลายแมลง

5.2 ศึกษาผลของการปริมาณ yeast extract และ peptone ในอาหารเทียมสูตร ATCC 1366 ต่อผลผลิตจำนวนไข่เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง โดยวางแผนการทดลองแบบ CRD (Completely Randomized Design) มี 7 กรรมวิธี 20 ซ้ำ ดังนี้คือ ทำการเติม yeast extract และ peptone ในอัตรา 0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, และ 3.0 % ในอาหารสูตร ATCC 1366 นำไปเก็บที่ 25 °C เป็นเวลานาน 21 วัน จึงเก็บเกี่ยวผลผลิตไข่เดือนฝอยและตรวจนับจำนวนไข่เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลง

6. การเก็บผลผลิตหลังการเลี้ยงไข่เดือนฝอยเป็นเวลา 21 วัน จะทำการเก็บไข่เดือนฝอยระยะเข้าทำลายแมลงโดยนำจานอาหารที่เลี้ยงไข่เดือนฝอยมาล้างด้วยน้ำเปล่า นับจำนวนไข่เดือนฝอยในน้ำด้วย nematode counting slide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนำมาตัวอย่างละ 100 μ l นับจำนวน 5 ตัวอย่างต่อจานทดลอง

7. การวิเคราะห์ข้อมูล ทำการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) ของข้อมูล ผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่มีความแตกต่างกันทางสถิติ จะทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วย Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ P เท่ากับ 0.05 ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราส่วนของไข่เดือนฝอยที่ใช้กับจำนวนไข่เดือนฝอยที่เข้าสู่ตัวแมลง วิเคราะห์ด้วย Regression analysis โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS Institute, 1985)