

การคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ท้องถิ่นจากภาคใต้ของประเทศไทยเพื่อนำไปสู่การพัฒนาชีวภัณฑ์ Selection of Native Entomopathogenic Nematode from Southern Thailand for Developing EPN-based Bioproduct

นัสริน ประดู¹, ดวงฤทัย ศรีช่วย¹ และ ธนัญชนก ไชยรินทร์^{1*}

Nasrin Pradu¹, Duangruetai Srichuay¹, and Thanunchanok Chairin^{1*}

¹ สาขาวิชานวัตกรรมและการจัดการ (วิชาเอกการจัดการศัตรูพืช) คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ สงขลา 90110

¹ Agricultural Innovation and Management Division (Pest Management), Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Songkhla 90110

* Corresponding author: Thanunchanok.c@psu.ac.th

Received 10 April 2025; Revised 21 May 2025; Accepted 25 May 2025

บทคัดย่อ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นอีกหนึ่งชีววิธีที่ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิดที่สำคัญ และมีความปลอดภัยต่อสิ่งมีชีวิตนอกเป้าหมายและสิ่งแวดล้อม การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในท้องถิ่นจากตัวอย่างดิน 4 จังหวัดในภาคใต้ พบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากจังหวัดปัตตานี มีประสิทธิภาพสูงที่สุดในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง โดยทำให้หนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella*) ที่เป็นเหยื่อล่อตาย 100% ในระยะเวลา 2 วัน ซึ่งจากซากหนอนที่ถูกเข้าทำลายรวมทั้งลักษณะทางสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงภายใต้กล้องจุลทรรศน์และศึกษามอร์โฟเมตริก ทำให้ระบุไส้เดือนฝอยระดับสกุลได้คือ *Heterorhabditis* sp. และเมื่อนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงดังกล่าวมาพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยประเมนการละลายผลิตภัณฑ์ ความมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และความสามารถในการเข้าทำลายหนอนกินรังผึ้ง ทำให้ได้ชนิดส่วนผสมที่เหมาะสมในการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ตามการวางแผนการทดลอง Plackett-Burman design ได้แก่ kaolin, tween20, CMC, formalin และ sodium polyacrylate นำส่วนผสมดังกล่าวไปหาอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยวิธี mixture design เพื่อพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จต่อไป

คำสำคัญ: ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง การควบคุมโดยชีววิธี

Abstract

Entomopathogenic nematode (EPN) is one of the important biological control agents for controlling key agricultural insect pests, ensuring safety for non-target organisms and the environment. This study was conducted to screen the effective local EPNs from soil samples collected from four provinces in southern Thailand. The results found that EPN from Pattani province ultimately killed 100% of the tested larvae, wax moth (*Galleria mellonella*), within 2 days. From the visible symptoms of infected wax moth and the morphological characteristics of selected EPN under a microscope and morphometric study, it could be identified that the selected EPN was *Heterorhabditis* sp. Subsequently, *Heterorhabditis* sp. was developed into an EPN-based bioproduct. Regarding the

Plackett–Burman design, evaluating the solubility of the product, viability of EPN, and host infection ability resulted in selecting high-affected formulation components, including kaolin, Tween 20, CMC, formalin, and sodium polyacrylate.

Keywords: Entomopathogenic nematode, EPN-based bioproduct, biological control

บทนำ

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode) เป็นหนอนตัวกลมขนาดเล็ก อาศัยอยู่ในดิน มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 วงศ์ที่มีการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ควบคุมแมลงในระดับอุตสาหกรรมและเชิงพาณิชย์ ได้แก่ Steinernematidae และ Heterorhabditidae ซึ่งมีความสัมพันธ์แบบพึ่งพาอาศัยกับแบคทีเรียในสกุล *Xenorhabdus* sp. และ *Photorhabdus* sp. ตามลำดับ ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเริ่มเข้าทำลายแมลงเมื่ออยู่ในระยะเข้าทำลาย (Infective juveniles; IJs) โดยไส้เดือนฝอยระยะนี้เก็บรักษาแบคทีเรียไว้ในลำไส้ และทำหน้าที่เป็นพาหะเพื่อนำแบคทีเรียเข้าสู่แมลง เมื่อแบคทีเรียถูกปลดปล่อยจากไส้เดือนฝอยเข้าไปในช่องว่างภายในลำตัวของแมลง (hemocoel) แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวน สร้างสารทุติยภูมิ เอนไซม์ สารพิษ และสารประกอบอื่น ๆ ที่ช่วยยับยั้งระบบภูมิคุ้มกันของแมลง ทำให้แมลงตายอย่างรวดเร็ว จากนั้นเปลี่ยนเนื้อเยื่อของแมลงให้กลายเป็นแหล่งอาหาร สำหรับการเจริญเติบโตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (Hazir et al., 2022) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ผลผลิต ผู้ผลิต และผู้บริโภค (Onwong et al., 2021) มีความสามารถควบคุมแมลงศัตรูพืชหลายชนิด ได้แก่ เพลี้ยอ่อน แมลงหวี่ขาว ตัวห้ำตัวเบียน หนอนด้วงแมลงงู หนอนผีเสื้อ ตัวกุดดาบ (Ansari et al., 2009; Noosidum, 2016) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจึงเป็นอีกทางเลือกที่นิยมนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชทดแทนการใช้สารเคมี

ปัจจุบันมีการพัฒนาชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงพร้อมใช้ในหลายประเทศทั่วโลก เช่น ชนิดผงละลายน้ำ พองน้ำสังเคราะห์ เจล แคปซูล และเม็ด (Cruz-Martinez et al., 2017) ชีวภัณฑ์แต่ละชนิดถูกออกแบบเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการทำงาน ความสะดวกในการใช้งาน และความเสถียรในการเก็บรักษา โดยชีวภัณฑ์ชนิดน้ำ สามารถเก็บรักษาได้หลายเดือนในภาชนะที่มีการระบายอากาศและมีอุณหภูมิที่เย็นจัด ชีวภัณฑ์รูปแบบดังกล่าวจึงไม่นิยม เนื่องจากเป็นรูปแบบที่มีต้นทุนการผลิตสูง มีความยุ่งยากในการรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงบางชนิดมีความรอดชีวิตต่ำ และมีความไวในการปนเปื้อนจุลินทรีย์อื่น อีกทั้งชีวภัณฑ์ในรูปแบบน้ำยังระเหยไว ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตายก่อนเข้าทำลายเหยื่อ ส่วนรูปแบบของชีวภัณฑ์ที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาและการขนส่งคือ รูปแบบเม็ด พองน้ำและเวอมิคูไลต์ แต่มีข้อจำกัด โดยรูปแบบเม็ดจะสูญเสียความชื้นในการเก็บรักษา ส่งผลให้ความรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่ำ รูปแบบพองน้ำและเวอมิคูไลต์ เป็นรูปแบบที่ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสามารถเคลื่อนไหวได้ ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหมดพลังงานอย่างรวดเร็ว และเป็นรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาและขนส่งไส้เดือนฝอยในปริมาณน้อย จึงมีการพัฒนาชีวภัณฑ์ให้อยู่ในรูปแบบที่สามารถลดการเคลื่อนไหวของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยการเติมสารยับยั้งเมตาบอลิซึม หรือการกระตุ้นในเกิดภาวะแห้งบางส่วน (anhydrobiosis) เช่น การพัฒนาชีวภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของแอลจินेटและชีวภัณฑ์ในรูปแบบเจล ซึ่งสามารถเก็บความชื้น ป้องกันการแห้งของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในชีวภัณฑ์ โดยชีวภัณฑ์ในรูปแบบเจลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เนื่องจากเจลมีความหนืดสามารถกักเก็บความชื้นได้ดี ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่บนผิวพืชได้นานเพียงพอต่อการพบเหยื่อ (Kagimu et al., 2017; Fallet et al., 2022)

การคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเฉพาะถิ่นจะช่วยส่งเสริมให้การผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง (entomopathogenic nematode-based bioproduct) ประสบความสำเร็จมากขึ้น เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเฉพาะถิ่นมีศักยภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืชเฉพาะถิ่น มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีกว่าสายพันธุ์ต่างประเทศ และมีค่าใช้จ่ายต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ การนำเข้าจากต่างประเทศ (Noosidum et al., 2010) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสายพันธุ์ท้องถิ่นที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมแมลงศัตรูพืช เพื่อนำไปสู่การพัฒนาเป็นสูตรชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเก็บและแยกตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

สุ่มเก็บตัวอย่างดินจังหวัดละ 1 ตัวอย่าง จาก 4 จังหวัดในภาคใต้ของประเทศไทย ได้แก่ จังหวัด ปัตตานี พัทลุง สงขลา และ สุราษฎร์ธานี โดยขุดดินบริเวณต้นไม้ที่มีความอุดมสมบูรณ์จากการประเมินด้วยสายตา พื้นที่โดยรอบไม่มีการใช้สารเคมีและชีวภัณฑ์ในการควบคุมศัตรูพืช ขุดดินขณะที่ขึ้น 5 จุดต่อแปลง แต่ละจุดลึกจากผิวดินประมาณ 10 ซม. (Orozco et al., 2014) นำตัวอย่างดินที่ได้มาแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธี insect baiting technique (Kaya and Stock, 1997) โดยมีขั้นตอนดังนี้ (1) แยกเศษหิน ใบไม้ ฯลฯ ออกจากตัวอย่างดิน จากนั้นชั่งดินใส่กล่องพลาสติก กล่องละ 300 กรัม (ตัวอย่างดินละ 3 กระปุก) วางหนอนกินรังผึ้ง (*Galleria mellonella* L.) ระยะที่ 5 จำนวน 10 ตัว/กระปุก ปิดฝาและคว่ำกระปุกลง วางไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส (2) ตรวจสอบการตายของหนอนทดสอบทุก 3 วัน และคืบซากหนอนที่ตายออกจากกระปุก ล้างทำความสะอาดเศษดินออกจากซากหนอนด้วยน้ำกลั่น วางซากหนอนที่ตายบนกระดาษกรองที่อยู่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มม. ตามวิธีการ White trap (White, 1927) จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อข้างต้นใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มม. ที่มีน้ำกลั่น ปริมาตร 20 มล. อยู่ ปิดฝาจานเลี้ยงเชื้อ และวางไว้ในที่มีอุณหภูมิห้อง จนเห็นตัวอ่อนระยะเข้าทำลาย (ระยะ IJ) ของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนที่ออกจากซากหนอนกินรังผึ้งมาอยู่ในน้ำกลั่น (3) ใช้ปิเปตดูดเก็บตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงปริมาณ 20 มล. ใส่ลงในบีกเกอร์ขนาด 250 มล. รอให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงตกตะกอน ใช้ไมโครปิเปตดูดน้ำส่วนบนทิ้ง จากนั้นเติมน้ำกลั่นมาเชื้อปริมาณ 10 มล. ทำซ้ำจนน้ำในบีกเกอร์ใส (4) เลี้ยงเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยดัดแปลงจากวิธีการของ Kaya and Stock (1997) หยดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงปริมาณ 1 มล. ลงบนหนอนกินรังผึ้ง จำนวน 3 ตัว/จาน ที่มีกระดาษกรองวางอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 60 มม. ปิดฝาและวางไว้ในที่มีมืด หลังจากเห็นหนอนตาย เปิดฝาและนำไปวางในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 90 มม. ที่มีน้ำกลั่น 20 มล. เพื่อรักษาความชื้น และล่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนที่ลงน้ำ จากนั้นใช้ปิเปตดูดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เก็บไว้ในบีกเกอร์ วางในตู้เย็น ที่อุณหภูมิ 10 ± 5 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลองขั้นอื่น ๆ

2. ทดสอบความสามารถในการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

นำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะตัวอ่อน จำนวน 300 ตัว/น้ำกลั่น 1 มล. หยดลงบนหนอนกินรังผึ้งที่อยู่บนกระดาษกรองในจานเลี้ยงเชื้อขนาด 60 มม. ปิดฝา และวางไว้ในที่มีอุณหภูมิ 25 ± 2 องศาเซลเซียส วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely Randomized Design; CRD) โดย 1 จาน ประกอบด้วย หนอนกินรังผึ้งจำนวน 3 ตัว ทำการทดลอง 3 ซ้ำ โดยใช้ น้ำกลั่นในกรรมวิธีควบคุม สังเกตลักษณะการตายของหนอน และบันทึกระยะเวลาการตายของหนอนกินรังผึ้ง ซึ่งลักษณะการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ทำให้หนอนมีลักษณะลำตัวนิ่ม ซากหนอนเปลี่ยนสี และพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเคลื่อนที่ออกจากตัวหนอน เพื่อคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนตัวอย่าง จากนั้นจึงนำไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่คัดเลือกได้ไปเพิ่มปริมาณโดยใช้หนอนกินรังผึ้งเป็นอาหาร ตามวิธีการของ Kaya and Stock (1997) เพื่อนำไปใช้ในการทดสอบอื่น ๆ ต่อไป

3. การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพของดิน

เตรียมตัวอย่างดินทั้ง 4 ตัวอย่าง เพื่อส่งวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีของดิน โดยเตรียมดินตัวอย่างละ 1 กก. แยกเศษพืช เศษหินในตัวอย่างดินออก ผึ่งดินให้แห้งในที่ร่ม และบดตัวอย่างดินให้ละเอียด จากวิธีการของ Office of science for land development, 2004 และส่งตัวอย่างดินเพื่อวิเคราะห์ ค่า pH ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ปริมาณอินทรีย์คาร์บอน และชนิดดิน ณ ห้องปฏิบัติการกลาง คณะทรัพยากรธรรมชาติ

4. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยวิธีการทางสัณฐานวิทยา

ระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยเบื้องต้นด้วยการสังเกตลักษณะการตายของเหยื่อ (หนอนกินรังผึ้ง) และศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงรุ่นที่ 2 โดยคัดเลือกตัวอ่อน ตัวเต็มวัยเพศผู้ และตัวเต็มวัยเพศเมีย วัยละ 10 ตัว จากการเลี้ยงเพิ่มจำนวนในชุดเดียวกัน โดยสังเกตลักษณะของอวัยวะที่สำคัญ ได้แก่ รูปร่างลำตัว หาง และอวัยวะเพศ แล้วเปรียบเทียบกับ key ของ Nguyen and Smart (1996), Lucskai (1999) และ Tangchitsomkid and Kositcharoenkul (2013) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

แบบใช้แสง (Compound light microscope) (Leica, Germany) กำลังขยายต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 4X และ 100X และโปรแกรมถ่ายภาพ Leica Application Suite X

5. การคัดเลือกส่วนผสมในสูตรชีวภัณฑ์

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในรูปแบบเจลตามการออกแบบ Plackett-Burman design (Plackett *et al.*, 1946) ได้ทั้งหมด 12 กรรมวิธี (Table 1) ทำการทดลองกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10,000 ตัว จากส่วนผสมทั้งหมด 7 ชนิด ได้แก่ kaolin, tween 20, carboxymethyl cellulose; carboxy methyl cellulose (CMC), glycerol, formalin, starch และ sodium polyacrylate แต่ละส่วนผสมมีปริมาตรตามค่า low และ high ตามหลักการของ Plackett-Burman design โดยความเข้มข้นอ้างอิงจากชีวภัณฑ์สูตรเจลไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสูตรต่าง ๆ ที่ได้มีการรายงานไว้ (Ansari *et al.*, 2009; Kary *et al.*, 2021; Fallet *et al.*, 2022; Wu *et al.*, 2023) หลังจากนั้น 2 สัปดาห์ จึงนำชีวภัณฑ์ทุกกรรมวิธีมาประเมินความมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยนำชีวภัณฑ์สูตรเจลที่ได้มาแช่น้ำกลั่นอัตราส่วน 1:5 จากนั้นกรองส่วนกากออกด้วย sieve mesh No. 60 และ 200 แล้วเก็บเฉพาะน้ำที่มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง สุ่มนับจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีชีวิต โดยการเขย่าตัวอย่างไส้เดือนฝอยให้กระจายตัวสม่ำเสมอในน้ำ ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างปริมาตร 1 มล. ใส่ลงใน counting dish นำไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ นับแยกไส้เดือนฝอยที่มีชีวิต (เคลื่อนไหวหรือตอบสนองต่อการกระตุ้น) และทำการสุ่ม 3 ซ้ำในแต่ละกรรมวิธี และประเมินความสามารถในการเข้าทำลายหนอนกินรีงผึ้ง โดยสุ่มดูดน้ำที่มีไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 1 มล. หยดลงบนตัวหนอนกินรีงผึ้ง ที่มีกระดากรองวางอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อพลาสติกขนาด 60 มม. ปิดฝาและวางในที่มืด ทดสอบกรรมวิธีละ 3 ซ้ำ ซ้ำละ 2 ตัว สังเกตลักษณะการตายของหนอน และบันทึกระยะเวลาการตายของหนอนกินรีงผึ้ง

Table 1 The 12 treatments of gel formulation of entomopathogenic nematode-based bioproduct according to the Plackett-Burman design

Treatment	Ingredients							
	Kaolin (g)	Tween20 (ml)	CMC (g)	Glycerol (ml)	Formalin (ml)	Starch (g)	Sodium polycrylate (g)	Water (ml)
1	2	0.018	2	2.2	0.002	5	0.4	20
2	2	0.072	0.5	8.8	0.002	5	0.1	20
3	0.5	0.072	2	2.2	0.008	5	0.1	20
4	2	0.018	2	8.8	0.002	20	0.1	20
5	2	0.072	0.5	8.8	0.008	5	0.4	20
6	2	0.072	2	2.2	0.008	20	0.1	20
7	0.5	0.072	2	8.8	0.002	20	0.4	20
8	0.5	0.018	2	8.8	0.008	5	0.4	20
9	0.5	0.018	0.5	8.8	0.008	20	0.1	20
10	2	0.018	0.5	2.2	0.008	20	0.4	20
11	0.5	0.072	0.5	2.2	0.002	20	0.4	20
12	0.5	0.018	0.5	2.2	0.002	5	0.1	20

ผลการทดลองและวิจารณ์

1. การเก็บและคัดแยกตัวอย่างไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ตัวอย่างดินทั้ง 4 ตัวอย่างที่เก็บจากจังหวัดปัตตานี พัทลุง สงขลา และสุราษฎร์ธานี พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในทุกตัวอย่างดิน โดยลักษณะซากหนอนกินรังผึ้งที่ใช้เป็นหนอนล่อตามวิธีการ modified insect baiting technique เมื่อถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเข้าทำลาย ลำตัวมีสีน้ำตาล ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างดินจังหวัดปัตตานี ทำให้หนอนที่นำไปเป็นเหยื่อล่อมีอัตราการตายสะสม 100 % ในระยะเวลา 9 วัน ส่วนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากดินจังหวัดพัทลุงมีอัตราการตายสะสมของหนอนกินรังผึ้งเพียง 26.67 % (Figure 1) การศึกษาจำนวนมากที่ใช้ insect baiting technique ในการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดิน เช่น การศึกษาของ Kaur และคณะ (2024) ใช้เทคนิคดังกล่าวในการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในประเทศอินเดีย โดยใช้หนอนกินรังผึ้งและหนอนผีเสื้อข้าวสารเป็นเหยื่อล่อ Husain และคณะ (2024) ใช้เทคนิคเดียวกันนี้ในการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในประเทศซาอุดีอาระเบีย โดยใช้หนอนกินรังผึ้งและหนอนมอดแป้งเป็นเหยื่อล่อ และ Consabo และคณะ (2025) สามารถแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินในประเทศฟิลิปปินส์ โดยใช้หนอนกินรังผึ้งและหนอนผีเสื้อข้าวสารเป็นเหยื่อล่อ เห็นได้ว่าการใช้ insect baiting technique เป็นเทคนิคที่แยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากดินได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งจากการศึกษาของ Ardpairin และคณะ (2020) ใช้หนอนกินรังผึ้งในการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 200 ตัวอย่าง ที่เก็บจากพื้นที่เกษตรกรรมจังหวัดพิษณุโลก ภาคเหนือของประเทศไทย พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงแพร่กระจายร้อยละ 8.0 (16/200 ตัวอย่าง) เมื่อนำมาศึกษาชนิดในระดับโมเลกุลพบว่าไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 15 ตัวอย่างเป็น *Steinernema siamkayai* และจากการศึกษาของ Yooyangket และคณะ (2018) ใช้หนอนกินรังผึ้งในการแยกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากตัวอย่างดิน 940 ตัวอย่าง ที่เก็บในพื้นที่อุทยานแห่งชาติน้ำหนาว จังหวัดเพชรบูรณ์ ภาคเหนือของประเทศไทย พบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมด 12 ไอโซเลต ซึ่งอยู่ในสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* โดยระบุชนิดทางโมเลกุลได้เป็น *Steinernema websteri* จำนวน 10 ไอโซเลต และ *Heterorhabditis baujardi* จำนวน 2 ไอโซเลต

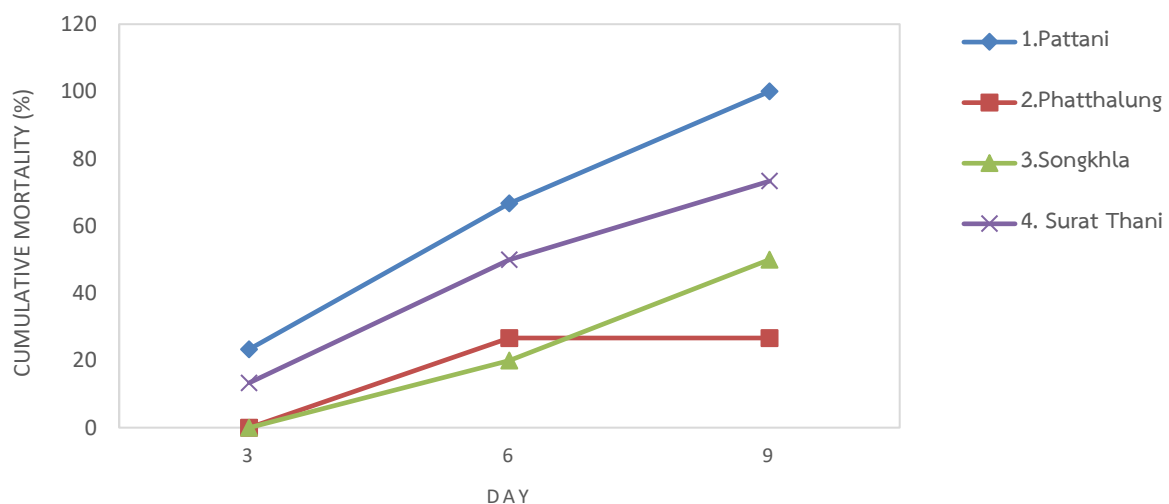


Figure 1 Cumulative mortality percentage of wax moths to entomopathogenic nematode collected from soil samples in Pattani, Phatthalung, Songkhla, and Surat Thani Provinces

2. การทดสอบความสามารถของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการเข้าทำลายตัวอ่อนแมลง

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากจังหวัดปัตตานีทำให้หนอนทดสอบตายทั้งหมดภายใน 2 วัน โดยซากหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายมีลักษณะลำตัวตรง อ่อนนุ่ม และมีสีน้ำตาลแดง ซึ่งต่างจากชุดการทดลองอื่น ๆ ที่หนอนยังคงเคลื่อนไหวอยู่ และลำตัวมีสีขาวเหลือง (Figure 2) ความสามารถของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในการเข้าทำลายเหยื่อได้ภายใน 2 วัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Kaya

and Stock (1997) ที่รายงานว่าไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* และ *Heterorhabditis* มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมแมลงศัตรูในหึ่งปฏิบัติการ โดยทำให้เหยื่อตายได้ภายในเวลา 24-48 ชั่วโมง ซึ่งการที่ซากหนอนเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลแดง เป็นคุณสมบัติของไส้เดือนฝอยสกุล *Heterorhabditis* เนื่องจากการผลิตสารรงควัตถุของแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันกับไส้เดือนฝอย ในขณะที่ซากหนอนที่ถูกทำลายโดยไส้เดือนฝอยสกุล *Steinernema* มักมีสีน้ำตาลอ่อนถึงน้ำตาลเข้ม (Lewis et al., 2006) และจากการศึกษาของ Glazer and Lewis (2000) ได้อธิบายว่า เมื่อแมลงถูกไส้เดือนฝอยเข้าทำลาย โครงสร้างภายในของแมลงจะถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันกับไส้เดือนฝอย ทำให้เนื้อเยื่อภายในแมลงเปลี่ยนเป็นของเหลวที่ไส้เดือนฝอยใช้เป็นแหล่งอาหาร ส่งผลให้ซากหนอนกินรังผึ้งมีลักษณะอ่อนนุ่ม แต่ยังคงรูปร่างไว้เนื่องจากโครงสร้างภายนอก (exoskeleton) ยังไม่ถูกย่อยสลาย จากผลการทดลองดังกล่าวจึงคัดเลือกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากจังหวัดปัตตานีไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ต่อไป



Figure 2 Host (wax moth) infection ability of entomopathogenic nematodes (EPN) from soil samples at 2 days post infection; (A) control treatment (water), (B) EPN from Pattani, (C) EPN from Phatthalung, (D) EPN from Songkhla, and (E) EPN from Surat Thani province

3. การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพของดิน

การวิเคราะห์ลักษณะทางเคมีกายภาพของตัวอย่างดินทั้ง 4 แหล่ง พบว่า ดินตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากจังหวัดปัตตานีซึ่งพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนทดสอบสูงที่สุด มีค่าเป็นกรดอ่อน (pH 5.7) ประเภทเนื้อดินแบบดินทรายร่วน (Loamy sand) มีอนุภาคดิน (soil particle) ส่วนใหญ่เป็นทราย (sand) 81.76% และมีอนุภาคแบบทรายแป้ง (silt) 8.33% และดินเหนียว (Clay) 9.91% ซึ่งเป็นดินที่มีช่องว่างสูงเมื่อเปรียบเทียบกับดินตัวอย่างที่สุ่มเก็บจากจังหวัดพัทลุง สงขลา และ สุราษฎร์ธานี ที่มีลักษณะเนื้อดินเป็นดินร่วนเหนียวปนทราย (Silty clay loam) ดินร่วนปนทราย (Clay loam) และ ดินร่วนเหนียวปนทราย (Sandy clay loam) ที่มีเนื้อดินแน่นกว่าเนื่องจากมีอนุภาคดินเหนียวสูงถึง 36.88, 35.51 และ 24.94% ตามลำดับ (Table 2) ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมักพบในดินที่มี pH ประมาณ 6.0 เนื่องจากสภาพแวดล้อมที่มีความเป็นกรดอ่อนเหมาะกับการดำรงชีวิตและการสืบพันธุ์ของไส้เดือนฝอย รวมถึงเหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่เป็นซิมไบโอติกซึ่งมีส่วนสำคัญในการฆ่าเหยื่อ (Dziegielewska and Skwiercz, 2018; Sharmila et al., 2018) และจากการศึกษาของ Alekseev et al. (2006) พบว่าดินที่มีช่องว่างสูงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสามารถในการเคลื่อนที่เข้าหาเหยื่อ และการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เนื่องจากดินทรายร่วนจัดอยู่ในกลุ่มดินเนื้อหยาบที่มีลักษณะสำคัญคือ ร่วน การระบายน้ำและถ่ายเทอากาศดี นอกจากนี้ปัจจัยของลักษณะดิน ได้แก่ ความชื้นในดิน อุณหภูมิของดิน รวมถึงความหนาแน่นของเหยื่อในดิน ล้วนส่งผลต่อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ทั้งในแง่ของการเคลื่อนที่ การค้นหาเหยื่อ การแพร่พันธุ์ และการดำรงชีวิต (Dziegielewska and Skwiercz, 2018)

Table 2 Soil chemical properties

Soil sample (Province)	pH	Organic matter (%)	Organic carbon (%)	Particle size			Texture
				% Clay	% Silt	% Sand	
Pattani	5.37	1.34	0.78	9.91	8.33	81.76	Loamy sand
Phatthalung	5.65	3.86	2.24	36.88	48.98	14.14	Silty clay loam
Songkhla	5.4	5.32	1.74	35.51	29.27	35.22	Clay loam
Surat Thani	5.7	6.48	3.77	24.94	20.94	54.33	Sandy clay loam

4. การระบุชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากผลการทดลองทั้งหมดที่ได้กล่าวมาข้างต้น ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างดินในจังหวัดปัตตานีจึงถูกคัดเลือกเพื่อนำไปพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์ และระบุชนิดด้วยลักษณะทางสัณฐานวิทยา ซึ่งเบื้องต้น ชากหนอนกินรังผึ้งที่ถูกเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง มีลำตัวเป็นสีน้ำตาลแดง (Figure 2B) ตรงกับคุณสมบัติของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Heterorhabdus* (Onwong et al., 2021) เนื่องจากแบคทีเรีย *Photorhabdus* ที่มีความสัมพันธ์กับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุลนี้แบบเกื้อกูลซึ่งกันและกัน สามารถผลิตสารประกอบ anthraquinone และ pigmented secondary metabolites ที่มีส่วนสำคัญทำให้เหยื่อเปลี่ยนเป็นสีชมพู แดง หรือน้ำตาลแดง อีกทั้งสามารถผลิตสารพิษ (toxin complex protein) ซึ่งทำให้เซลล์ของเหยื่อเกิดการแตกตัว และทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของเหยื่อตอบสนองโดยการเปลี่ยนแปลงเมตสึและเนื้อเยื่อ (Cimen, 2023)

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในรุ่นที่ 2 พบว่า ตัวอ่อนมีลำตัวตรงเรียวยาว มีความยาวลำตัวเฉลี่ย 648.03 ไมครอน ความกว้างขนาดลำตัวเฉลี่ย 37.00 ไมครอน ปลายหางมีลักษณะยาวแหลม ไม่พบอวัยวะสืบพันธุ์ ผังลำตัว (cuticle) เรียบยาวขนานกับลำตัว ช่องทวารหนัก (anus) เล็ก และแคบมองเห็นได้ยาก (Figure 3) ตัวเต็มวัยเพศผู้มีขนาดลำตัวเล็กกว่าเพศเมีย ลำตัวมีความยาวและความกว้างเฉลี่ย 952.82 ไมครอน และ 57.33 ไมครอน ตามลำดับ ที่ปลายหางมีลักษณะคล้ายถุงใสหุ้ม (peloderan) และพบอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (spicule) 1 คู่ ยื่นออกมา ลักษณะคล้ายตะขอ (Figure 4) ส่วนตัวเต็มวัยเพศเมียมีขนาดลำตัวใหญ่กว่าเพศผู้ โดยมีความยาวเฉลี่ย 1,821.56 ไมครอน ความกว้างขนาดลำตัวเฉลี่ย 110.53 ไมครอน มีหางเรียวยาว อวัยวะสืบพันธุ์เพศเมีย (vulva) อยู่กึ่งกลางลำตัว มีลักษณะยื่นนูนออกนอกจากผนังลำตัว ช่องเปิดของอวัยวะเพศเล็กเป็นรอยแยก มักพบกลุ่มไข่ หรือตัวอ่อนอาศัยอยู่ในตัว (Figure 5) จากการศึกษาทางมอร์โฟเมตริก (morphometric study) เบื้องต้นจึงระบุเป็นไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสกุล *Heterorhabdus* สอดคล้องกับการรายงานของ Poinar (1990); Hominick et al. (1997); Stock and Kaya (1996); Adams and Nguyen (2002); Nguyen and Hunt (2007) ดังแสดงใน Table 3



Figure 3 The juvenile of entomopathogenic nematode; (A) entire juvenile body, (B) anterior end, (C) tail region, and (D) cuticle



Figure 4 Adult male of entomopathogenic nematode; (A) entire body, (B) anterior end, and (C) tail region with a pair of spicules (S)

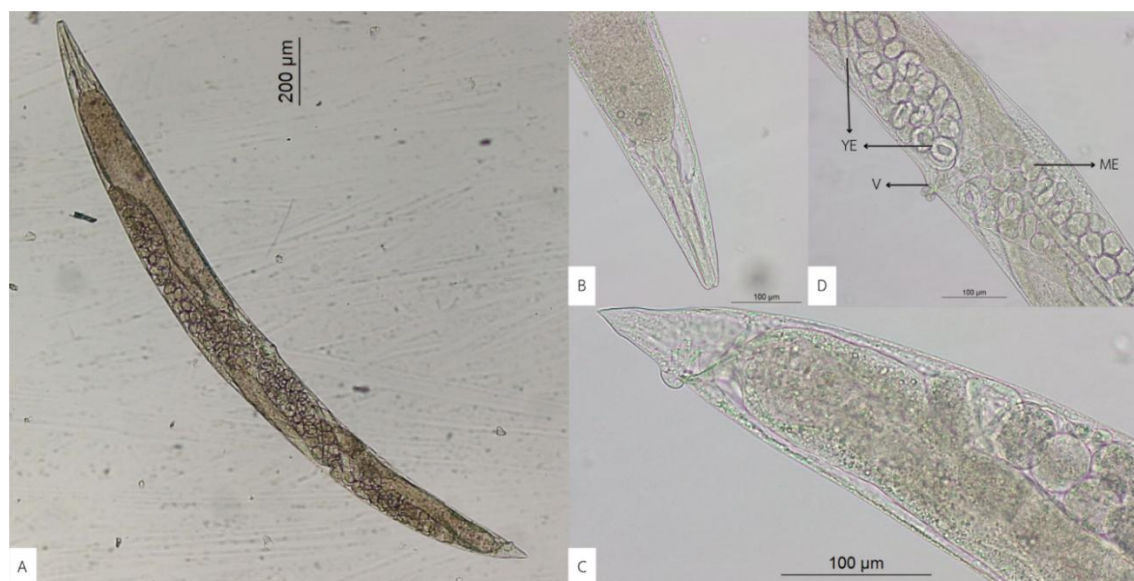


Figure 5 Adult female of entomopathogenic nematode: (A) entire body, (B) anterior end, (C) tail region, and (D) vulval region (V) with matured egg (ME), young egg (YE), and juvenile inside female body

Table 3 Morphometric study of entomopathogenic nematode in this study and *Heterorhabditis* spp.

Parameter	This study (average)	<i>Heterorhabditis</i> spp.*			
		<i>H. bacteriophora</i> /1,3	<i>H. megidis</i> /2,3	<i>H. indica</i> /3,4	<i>H. zealandica</i> /3,5
Juvenile					
Body length (μm)	648.03	556-720	580-650	510-660	590-680
Body width (μm)	37.00	25-35	28-38	22-32	26-36
L/W ratio**	17.50	18-22	16-20	17-21	18-22
Adult Male					
Body length (μm)	952.82	850-1100	900-1200	800-1050	920-1150
Body width (μm)	57.33	45-60	50-65	40-55	48-62
L/W ratio	16.60	17-22	16-20	18-22	17-21
Spicule length (μm)	56.50	42-52	48-58	40-50	45-55
Adult Female					
Body length (μm)	1,821.56	1,500-2,200	1,600-2,400	1,400-2,000	1,550-2,100
Body width (μm)	110.53	85-120	95-130	80-110	90-125
L/W ratio	16.50	15-20	14-19	16-21	15-20
Vulva position from head tip (%)	50	48-52	49-53	47-51	48-52
Vulva position (%)	50	50±2	51±2	49±2	50±2

* min-max value, ** body length (L) to body width (W) ratio, ^{/1} Poinar (1990), ^{/2} Adam and Nguyen (2002), ^{/3} Stock and Kaya (1996), ^{/4} Hominick et al. (1997), and ^{/5} Nguyen and Hunt (2007)

ทั้งนี้การศึกษาลักษณะการตายของเหยื่อและลักษณะสัณฐานวิทยาเบื้องต้นของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพียงอย่างเดียว สามารถระบุสกุลของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้เท่านั้น เนื่องจากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงมีขนาดเล็กและมีความใกล้เคียงกัน จึงยังต้องมีการจำแนกชนิดด้วยวิธีทางอนุชีวโมเลกุลเพิ่มเติม เพื่อระบุชนิดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้อย่างถูกต้องและแม่นยำ (Onwong *et al.*, 2021)

5. การคัดเลือกส่วนผสมในชีวภัณฑ์ที่มีผลกระทบหลัก (main effect) ต่อคุณสมบัติของชีวภัณฑ์

ชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงสูตรเจลในการศึกษารั้งนี้ได้ผสมส่วนผสมตามการวางแผนการทดลองแบบ Plackett-Burman design (Plackett *et al.*, 1946) ซึ่งพบว่าทุกสูตรมีสีขาว เนื้อละเอียด ไม่สามารถละลายจนเป็นเนื้อเดียวกันกับน้ำ มีเพียงสูตรที่ 2 ที่มีส่วนผสมของ CMC, formalin และ sodium polycrylat ในปริมาณต่ำ ที่สามารถละลายน้ำได้บางส่วนในเวลา 5-10 นาที ส่วนชีวภัณฑ์สูตรที่ 9 ซึ่งมีส่วนผสมของ formalin และ starch สูง มีจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีชีวิต (active nematode) ต่ำ (111.11 ± 100.09 ตัว) ซึ่งแตกต่างจากสูตรที่ 12 และ 3 ซึ่งมีจำนวนไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่มีชีวิต 777.70 ± 242.16 และ 833.34 ± 96.22 ตัว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ทั้งนี้จำนวนการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยจากแต่ละสูตรไม่ได้การันตีถึงประสิทธิภาพในการเข้าทำลายแมลง (Table 4)

Table 4 Properties of entomopathogenic nematode-based bioproduct

Treatment	Partial solubility ^{1/}	Viability (active nematode/ml) ^{2/}	Host mortality (%)
1	-	611.11 ± 277.78 abc	16.67 a
2	++	500.00 ± 346.95 abc	16.67 a
3	-	833.34 ± 96.22 a	16.67 a
4	-	333.33 ± 192.45 abc	16.67 a
5	+	388.88 ± 242.16 abc	16.67 a
6	-	444.40 ± 55.56 abc	0.00 a
7	-	166.67 ± 100.67 bc	33.33 a
8	-	222.22 ± 55.55 abc	0.00 a
9	+	111.11 ± 100.09 c	0.00 a
10	-	388.89 ± 111.10 abc	0.00 a
11	-	499.99 ± 166.67 abc	0.00 a
12	+	777.70 ± 242.16 ab	16.67 a

^{1/} - refers to not soluble, + refers to partially soluble within 5-10 min, and ++ refers to soluble in less than 5 minutes

^{2/} Data shown as mean $\pm$ standard error of 3 replicates and values with the same letter within a column are not significantly different ($p > 0.05$) according to Duncan multiple range test

เมื่อทำการวิเคราะห์ส่วนผสมที่มีผลกระทบหลัก (main effect) ต่อคุณสมบัติของชีวภัณฑ์โดยพิจารณาความสามารถในการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นหลัก พบว่า kaolin และ tween 20 มีค่า main effect เชิงบวก เท่ากับ 9.25 และ 27.75 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเมื่อมีปริมาณส่วนประกอบดังกล่าวมากยิ่งขึ้นส่งผลต่อความสามารถในการมีชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง แต่ในทางตรงกันข้ามพบว่า glycerol และ starch มีค่า main effect ในเชิงลบสูงเท่ากับ -157.42 และ -111.08 ตามลำดับ ซึ่งชี้ว่าเมื่อมีปริมาณส่วนผสมดังกล่าวมากจะส่งผลให้การรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในชีวภัณฑ์ลดลง (Table 5) จากผลการทดลองข้างต้น การผลิตชีวภัณฑ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในรูปแบบเจล จึงควรคัดเลือกส่วนผสมที่มีค่า main effect เชิงบวก ได้แก่ kaolin และ

tween20 และส่วนผสมที่มีค่า main effect เชิงลบน้อย ได้แก่ CMC, formalin และ sodium polycrylate ไปหาอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยวิธี mixture design ต่อไป

Table 5 Main effects of each ingredient according to the Plackett-Burman design experiment for EPN-based bioproduct production

Ingredient	Solubility	Viability
CMC	4.83	-9.25
formalin	0.5	-37.08
glycerol	-2.17	-157.42
kaolin	-0.17	9.25
sodium polyacrylate	2.5	-55.58
starch	2.83	-111.08
tween 20	-0.17	27.75

ชีวภัณฑ์ในรูปแบบเจลเป็นผลิตภัณฑ์ที่สามารถยืดอายุการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยชีวภัณฑ์ในรูปแบบเจลช่วยเพิ่มประสิทธิภาพของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง เนื่องจากเจลมีความหนืดสามารถกักเก็บความชื้นได้ดี ทำให้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอยู่บนผิวพืชได้นานเพียงพอต่อการพบเหยื่อ และเมื่อเจลสัมผัสกับความชื้นในดินหรือบนใบพืชจะเกิดการดูดซับน้ำและเกิดการบวมตัวเกิดเป็นไฮโดรเจลทำให้เกิดการปลดปล่อยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงอย่าง ง่าย (Hiltpold, 2015; Kagimu *et al.*, 2017; Fallet *et al.*, 2022) โดย sodium polycrylate เป็นสารก่อเจลและเพิ่มความหนืดให้แก่ชีวภัณฑ์ formalin มีคุณสมบัติเป็นสารฆ่าเชื้อเพื่อลดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ๆ (Martinez *et al.*, 2017) ส่วน kaolin และ tween20 เป็นส่วนผสมที่นิยมใช้ในการผลิตชีวภัณฑ์สูตรสำเร็จเนื่องจากพบว่ามีความเหมาะสมทั้งในควบคุมแมลงศัตรูพืช เช่น แมลงหวี่ขาว (Nimkingrat *et al.*, 2014) และยังนิยมใช้เป็นส่วนผสมของชีวภัณฑ์ในรูปแบบอื่น ๆ เช่น รูปแบบสเปรย์ (Bamel *et al.*, 2021)

สรุป

ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่แยกได้จากตัวอย่างดินจากจังหวัดปัตตานีมีประสิทธิภาพในการเข้าทำลายหนอนทอดสอบ โดยดินบริเวณนั้นมีลักษณะเป็นดินทรายร่วน ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่พบจัดอยู่ในสกุล *Heterorhabditis* sp. และจากการคัดเลือกส่วนผสมในชีวภัณฑ์รูปแบบเจล พบว่าส่วนผสมที่มีผลกระทบหลักต่อความสามารถในการรอดชีวิตของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง ได้แก่ kaolin, Tween20, CMC, formalin และ sodium polycrylate และจะได้นำส่วนผสมดังกล่าวไปหาอัตราส่วนที่เหมาะสมด้วยวิธี mixture design เพื่อพัฒนาเป็นสูตรสำเร็จต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากเงินสนับสนุนการเรียนการสอนรายวิชาปัญหาพิเศษ สาขาวิชานวัตกรรมการจัดการเกษตร และการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

Adams, B.J., and Nguyen, K.B. (2002). Taxonomy and systematics of the genus *Heterorhabditis*. *Nematology*, 4, 26–54.

- Alekseev, E., Glazer, I., and Samish, M. (2006). Effect of soil texture and moisture on the activity of entomopathogenic nematodes against female *Boophilus annulatus* Ticks. *BioControl*, 51, 507–518. <https://doi.org/10.1007/s10526-005-2935-9>
- Ansari, M. Hussain, M.A., and Moens, M. (2009). Formulation and application of entomopathogenic nematode-infected cadavers for control of *Hoplia philanthus* in turfgrass. *Pest Management Science*, 65, 367–374. <https://doi.org/10.1002/ps.1699>
- Ardpairin, J., Muangpat, P., Sonpom, S., Dumidae, A., Subkrasae, C., Tandhavanant, S., Thanwisai A. and Vitta, A. (2020). A survey of entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria in agricultural areas of northern Thailand. *Journal of Helminthology*, 94, e192. <https://doi.org/10.1017/S0022149X20000735>
- Bamel, V., Sirohi, A., and Sabir, N. (2021). Survival and infectivity of entomopathogenic nematode *Heterorhabditis indica* Poinar, Karunakar & David incubated in solutions containing different spray adjuvants. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 9, 794–799.
- Cimen, H. (2023). The role of Photorhabdus-induced bioluminescence and red cadaver coloration on the deterrence of insect scavengers from entomopathogenic nematode-infected cadavers. *Journal of Invertebrate Pathology*, 196, 107871. <https://doi.org/10.1016/j.jip.2022.107871>
- Consabo, L., Pillada, E.M.G., Gallego, A.M. and Panaligan, A.C.G. (2025). Occurrence, isolation, and identification to genus level of entomopathogenic nematodes (epns) in Central Panay Island, Philippines. *International Journal of Agricultural Technology*, 21, 603–616. <https://doi.org/10.63369/ijat.2025.21.2.603-616>
- Cruz-Martinez, H., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortiz, P.T., Cortés-Martínez, C.I. and Rosas-Díaz, J. (2017). Formulation of entomopathogenic nematodes for crop pest control—a review. *Plant Protection Science*, 53, 15. <https://doi.org/10.17221/35/2016-PPS>
- Dziegielewska, M. and Skwiercz, A. (2018). The influence of selected abiotic factors on the occurrence of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae) in soil. *Polish Journal of Soil Science*, 51. <https://doi.org/10.17951/pjss/2018.51.1.11>
- Fallet, P., Bazagwira, D., Guenat, J. M., Bustos-Segura, C., Karangwa, P., Mukundwa, I. P., Kajuga, J., Degen, T., Toepfer, S., and Turlings, T.C.J. (2022). Laboratory and field trials reveal the potential of a gel formulation of entomopathogenic nematodes for the biological control of fall armyworm caterpillars (*Spodoptera frugiperda*). *Biological Control*, 176, 105086. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2022.105086>
- Glazer, I., and Lewis, E.E. (2000). Bioassays for entomopathogenic nematodes. In: Navon, A. and Ascher, K.R.S. (Eds.). *Bioassays of Entomopathogenic Microbes and Nematodes*. CABI Publishing, Wallingford, UK, pp. 229–247.
- Hazir, S., Kaya, H., Touray, M., Cimen, H., and Ilan, D.S. (2022). Basic laboratory and field manual for conducting research with the entomopathogenic nematodes, *Steinernema* and *Heterorhabditis*, and their bacterial symbionts. *Turkish Journal of Zoology*, 46, 305–350. <https://doi.org/10.55730/1300-0179.3085>
- Hiltpold, I. (2015). Prospects in the application technology and formulation of entomopathogenic nematodes for biological control of insect pests. *Nematology*, 17, 499–507. https://doi.org/10.1007/978-3-319-18266-7_7
- Hominick, W.M., Briscoe, B.R., del Pino, F.G., Heng, J., Hunt, D.J., Kozodoy, E., Mracek, Z., Nguyen, K.B., Reid, A.P., Spiridonov, S., Stock, P., Sturhan, D., Waturu, C., and Yoshida, M. (1997). Biosystematics of entomopathogenic nematodes. *Journal of Helminthology*, 71, 271–298. <https://doi.org/10.1017/S0022149X00016096>

- Husain, M., Rasool, K.G., Sutanto, K.D., Omer, A.O., Tufail, M., and Aldawood, A.S. (2024). Laboratory evaluation of indigenous and commercial entomopathogenic nematodes against red palm weevil, *Rhynchophorus ferrugineus* (Coleoptera: Curculionidae). *Insects*, 15, 290. <https://doi.org/10.3390/insects15040290>
- Kagimu, N., Ferreira, T., and Malan, A.P. (2017). The attributes of survival in the formulation of entomopathogenic nematodes utilised as insect biocontrol agents. *African Entomology*, 25, 275–291. <https://hdl.handle.net/10520/EJC-9e1e16147>
- Kary, N.E., Chahardoli, S., Mohammadi, D., and Dillon, A.B. (2021). Efficacy of carboxymethyl cellulose as an inert water-soluble carrier for formulation of entomopathogenic nematodes, *Heterorhabditis bacteriophora* and *Steinernema carpocapsae*. *Biological Control*, 160, 104690. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104690>
- Kaur, S., Thakur, N., and Yadav, A.N. (2024). Evaluation of different mass production techniques to enhance the progeny of isolated indigenous entomopathogenic nematodes from Indian Himalayan region. *National Academy Science Letters*, 1–6. <https://doi.org/10.1007/s40009-024-01506-0>
- Kaya, H.K., and Stock, S.P. (1997). Techniques in insect nematology. *Manual of Techniques in Insect Pathology*, 281–324 <https://doi.org/10.1016/B978-012432555-5/50016-6>
- Lewis, E.E., Campbell, J., Griffin, C., Kaya, H., and Peters, A. (2006). Behavioral ecology of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 38, 66–79. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2005.11.007>
- Lucskai, A. (1999). Identified key to entomopathogenic nematode species. *Acta phytopathologica et entomologica hungarica*, 34, 317–325. <https://doi.org/10.1556/aphyt.34.1999.4.7>
- Martinez, H.C., Ruiz-Vega, J., Matadamas-Ortiz, P.T., Martínez, C.I.C., and Diaz, J.R. (2017). Formulation of entomopathogenic nematodes for crop pest control: A review. *Plant Protection Science*, 53, 15–24. <https://doi.org/10.17221/35/2016-PPS>
- Nimkingrat, P., Siri, N., and Chadamek, C. (2014). Efficacy of the entomopathogenic nematodes against whiteflies, *Bemisia tabaci* (Homoptera: Aleyrodidae), in chili peppers under laboratory and field conditions. *Khon Kaen Agriculture Journal*, 42, 255–264.
- Nguyen, K.B. and Smart, Jr. G.C. (1996). Identification of entomopathogenic Nematode in the Steinernema and Heterorhabditidae (nemata: Rhabditida). *Journal of Nematology*, 28, 286–300.
- Nguyen, K.B., and Hunt, D.J. (2007). Entomopathogenic nematodes: systematics, phylogeny and bacterial symbionts. *Nematology Monographs*, 5, 1–816.
- Noosidum, A., Hodson, A.K., Lewis, E.E., and Chandrapatva, A. (2010). Characterization of new entomopathogenic nematodes from Thailand: Foraging behavior and virulence to the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Journal of Nematology*, 42, 281–291.
- Noosidum, A., Chandrapatya, A., and Lewis E.E. (2016). An important method for entomopathogenic nematode application to control diamondback moth, *Plutella xylostella* L. (Lepidoptera: Plutellidae) and common cutworm, *Spodoptera litura* F. (Lepidoptera: Noctuidae) larvae in vegetable crops. Available from: https://digital.library.tu.ac.th/tu_dc/digital/api/DownloadDigitalFile/download/64578 [accessed 24 November 2024]

- Office of Science for Land Development. (2004). Methods of soil analysis and interpretation for soil survey and classification: Physical Properties. Available from: http://www1.ddd.go.th/WEB_PSD/pdf/expert%20work/ex22/3-3.pdf [accessed 21 December 2024]
- Onwong, R., Khwanket, N., Rattanawanee, A., Rajchanuwong, P., and Noosidum, A. (2021). Molecular identification of entomopathogenic nematodes of the Genus *Heterorhabditis* in Thailand and pathogenicity to larvae of the greater wax moth, *Galleria mellonella* L. (Lepidoptera: Pyralidae). *Khon Kaen Agriculture Journal*, 49, 1583–1586.
- Orozco, A.R., Lee, M., and Stock, S.P. (2014). Soil sampling and isolation of entomopathogenic nematodes (Steinernematidae, Heterorhabditidae). *Journal of Visualized Experiments*, 89, 52083. <https://doi.org/10.3791/52083>
- Plackett, R.L., and Burman, J.P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33, 305–325. <https://doi.org/10.2307/2332195>
- Poinar, G.O.Jr. (1990). Taxonomy and biology of Heterorhabditidae and Steinernematidae. In Kaya, H.K. and Guagler, R. (Eds.). *Entomopathogenic Nematodes in Biological Control*. CRC Press. Boca Raton. Florida, USA. page 42. <https://doi.org/10.1201/9781351071741>
- Sharmila, R., Priya, M.S., Subramanian, S., Poornima, K., and Pandiyan, M. (2018). Review on ecology of entomopathogenic nematodes. *Journal of Entomology and Zoology Studies*, 6, 1086–1093.
- Stock, S.P. and Kaya, H.K. (1996). A multivariate analysis of morphometric characters of *Heterorhabditis* species. *Journal of Parasitology*, 82, 806–813. <https://doi.org/10.2307/3283895>
- Tangchitsomkid, N., and Kositcharoenkul, N. (2013). Taxonomy of *Steinernema* and *Heterorhabditis*. Availability from: <https://www.doa.go.th/research/attachment.php?aid=2004> [accessed on 24 November 2024]
- White, G.F. (1927). A method for obtaining infective nematode larvae from cultures. *Science*, 66, 302–303. <https://doi.org/10.1126/science.66.1709.302.b>
- Wu, S., Li, Y., Toews, M. D., Mbata, G., and D. I. Shapiro-Ilan. (2023). Novel formulations improve the environmental tolerance of entomopathogenic nematodes. *Biological Control*, 186, 105329. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2023.105329>
- Yooyangket, T., Muangpat, P., Polseela, R., Tandhavanant, S., Thanwisai, A. and Vitta, A. (2018). Identification of entomopathogenic nematodes and symbiotic bacteria from Nam Nao National Park in Thailand and larvicidal activity of symbiotic bacteria against *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus*. *PloS One*, 13, e0195681. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195681>