

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง



ปัญหาพิเศษปริญาตรี

เรื่อง

การทดสอบความปลอดภัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandene* n.sp.

ต่อสัตว์เลือดอุ่นและพืช

Safety Test for Using Nematodes, *Steinernema thailandene* n.sp.,

on Warm-Blood Animal and Plant



T099105

โดย

นายสมเกียรติ ผ่องอำไพ

Mr. Somkiat Phongampai

ศ.ปร.
๘๘๘๘๗
๘ EAF

เลขหมู่.....

เลขทะเบียน.....99105

วัน,เดือน,ปี.....15 JUN 2009

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิตสาขา

เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ.2545

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
ปริญญาตรี
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

การทดสอบความปลอดภัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp.

ต่อสัตว์เลือดอุ่นและพืช

Safety Test for Using Nematodes, *Steinernema thailandense* n.sp.,

on Warm-Blood Animal and Plant

โดย

นายสมเกียรติ ผ่องอำไพ

Mr. Somkiat Phongampai

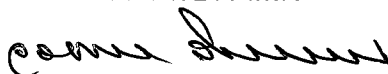
ได้รับการพิจารณาเห็นชอบโดย



(อาจารย์ มานพ นชะพงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว



(รองศาสตราจารย์ ดร.วรเดช จันทรสร)

หัวหน้าภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่ ๒๐ เดือน พฤษภาคม พ.ศ. ๕๖

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อ

ชื่อเรื่อง : การทดสอบความปลอดภัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. ต่อสัตว์เลือดอุ่นและพืช

โดย : นายสมเกียรติ ผ่องอำไพ

ชื่อปริญญา : วิทยาศาสตรบัณฑิต(เกษตรศาสตร์)

สาขาวิชา : เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

อาจารย์ที่ปรึกษา : 20/พ.อ. 46

(อาจารย์มานพ นชะพงษ์)

จากการศึกษาถึงผลกระทบของการนำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. ซึ่งเป็นสายพันธุ์ไทยชนิดใหม่ที่มีการค้นพบในเขตจังหวัด กาญจนบุรีต่อสัตว์เลือดอุ่นและพืช ทำการทดสอบโดยหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. จำนวน 100ตัว ในน้ำเลือดของสัตว์เลือดอุ่นคือ มนุษย์ ไก่ วัว และสุกร ที่อุณหภูมิ 27 องศาเซลเซียส และความชื้น 78 เปอร์เซ็นต์ ทำการทดลองเปรียบเทียบ น้ำเลือดของแมลง และน้ำกลั่น พบว่าในน้ำเลือดของสัตว์มีเลือดอุ่น ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ตายทั้งหมดภายในเวลา 24 ชั่วโมง ในน้ำกลั่นไส้เดือนฝอยสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่ไม่พบว่า มีการเจริญเติบโต ส่วนในน้ำเลือดแมลงไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. มีการเจริญเติบโตและขยายพันธุ์ได้

การทดสอบในสัตว์ทดลองคือ หนูขาว และไก่ โดยการหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ทางปากสัตว์ทดลองครั้งละ 10,000ตัวทุกวันเป็นเวลา 5 วัน เมื่อตรวจสอบอูจาระของสัตว์ทดลองพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่ออกมาทางอูจาระตายทั้งหมดและไม่พบอาการผิดปกติ ของสัตว์ทดลองเมื่อเลี้ยงตามปกติต่อไปเป็นเวลา 4 เดือน

การทดสอบในพืชคือ มะเขือเทศ โดยทำการหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. บริเวณรากของต้นมะเขือเทศที่ความเข้มข้น 100,000ตัว/ต้นเป็นระยะเวลา 1 เดือน เมื่อตรวจสอบที่รากโดยเปรียบเทียบน้ำหนักและลักษณะของรากของมะเขือเทศไม่พบความผิดปกติที่ระบบราก

Abstract

Title : Safety Test for Using Nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp.,
on Warm-Blood Animal and Plant

By : Mr.Somkiat Phongampai

Degree : Bachelor of Science in Agriculture

Major Field : Plant Pest Management Technology

Advisor : *Manop Nachapong 20 May 2003*

Mr.Manop Nachapong

The study on the effect of *Steinernema thailandense* n. sp., the new species nematode found in Kanchanaburee on warm-blood animal and plant, was carried out by dropping nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., into warm blood- animal such as human, chicken, cow and pig at the temperature of 27°C and 78% of humidity, comparing with the insect blood and distilled water. The result was found that in the blood of warm-blood animal, all nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., were dead within 24 hours. However, in distilled water, the nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., were still alive but there is no any growth and reproduction of nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp..

The testing with animals, mice and chicken, by dropping nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., into the mouth of animal, and checking the quantity of dead nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., in its dung, the result was found that the nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., in its dung were dead. The following observing the animal up to 4 months, there was no any sign of symptom or any unusual with them.

The testing with tomatoes by dropping nematodes, *Steinernema thailandense* n. sp., around the root zone at the concentration of one hundred thousand per plant in one month, the result showed that there was nothing change with the root of tomatoes.

คำนิยม

การจัดทำปัญหาพิเศษฉบับนี้ สำเร็จลงได้ด้วยดี โดยได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ อาจารย์ มาณพ นชะพงษ์ ที่ได้ให้ความกรุณาให้คำแนะนำ และคำปรึกษาในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้นระหว่างการทดลอง รวมทั้งการตรวจแก้ไขข้อบกพร่องในส่วนต่างๆของปัญหาพิเศษฉบับนี้ให้สำเร็จเรียบร้อยด้วยดี ขอขอบคุณอาจารย์ นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด ที่กรุณาให้ข้อมูล คำปรึกษาและสถานที่ในการทดลองครั้งนี้ทุกขั้นตอน และขอบคุณเจ้าหน้าที่กลุ่มงาน ไล้เดือนฝอย กรมวิชาการเกษตรทุกท่าน ที่ให้การช่วยเหลือในการทดลอง

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อคุณแม่และพี่ ๆ น้องๆ และเพื่อนๆ ตลอดจนคุณครู อาจารย์ทุกท่านที่ได้กรุณาให้ความรู้และอบรมสั่งสอนข้าพเจ้าให้มีสติ และมีความคิดแตกฉานในทุกด้าน และตลอดจนให้ความช่วยเหลือสนับสนุนในหลายๆเรื่อง ขอขอบคุณสถาบันแห่งนี้ที่ข้าพเจ้าได้มีโอกาสเข้ามาศึกษาหาความรู้และสำเร็จเพื่อทำประโยชน์ต่อประเทศสืบไป

สมเกียรติ ผ่องอำไพ

พฤษภาคม 2546

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

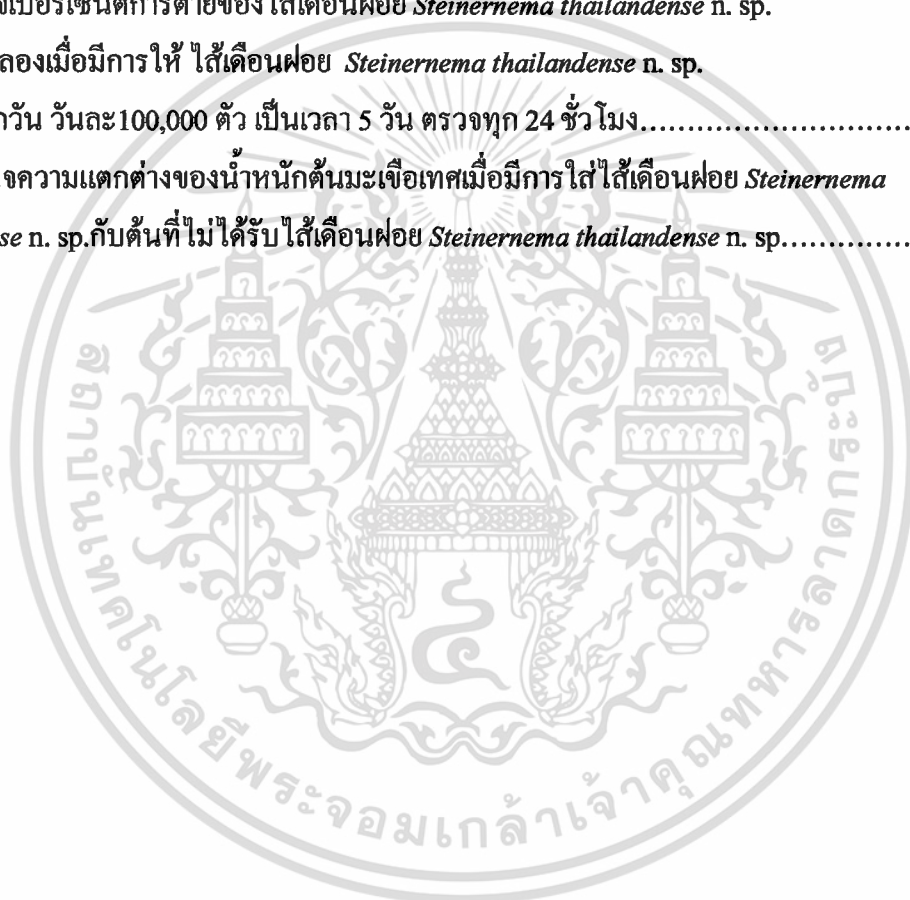
สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	i
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ii
คำนิยม.....	iii
สารบัญ.....	iv
สารบัญตาราง.....	v
สารบัญตารางภาคผนวก.....	vi
สารบัญภาพ.....	vii
คำนำ.....	1
วัตถุประสงค์.....	2
การตรวจเอกสาร.....	3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	10
ผลการทดลอง.....	17
สรุปและวิจารณ์.....	20
เอกสารอ้างอิง.....	21
ภาคผนวก.....	22

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. ผลการตรวจปริมาณเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. ที่ทดสอบในน้ำเลื้อยของ คน ไก่ วัว หมู แมลงและน้ำก้น.....	18
2. ผลการตรวจเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. ในสัตว์ทดลองเมื่อมีการให้ ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. ทางปากทุกวัน วันละ 100,000 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ตรวจทุก 24 ชั่วโมง.....	18
3. ผลการตรวจความแตกต่างของน้ำหนักต้นมะเขือเทศเมื่อมีการใส่ ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. กับต้นที่ไม่ได้รับ ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp.	19



สารบัญตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่	หน้า
1. ผลการตรวจความแตกต่างทางค่าเฉลี่ยของน้ำหนักต้นมะเขือเทศเมื่อมีการใส่ ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. จำนวน 100,000ตัว กับต้นที่ไม่ได้รับ ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp.	23
2. การวิเคราะห์ผลทางสถิติจากตารางที่ 1.....	23



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่ 1	หน้า
1. ทดสอบไข่เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. ในน้ำเลือด.....	14
2. การทดลองกับสัตว์ทดลองหนูขาว.....	15
3. การทดลองกับสัตว์ทดลองไก่.....	15
4. ดัชนีเชื้อเทศในโรงเพาะชำ.....	16
5. การใส่ไข่เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp. กับมะเขือเทศ.....	16



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

คำนำ

ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เป็นสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่มีการค้นพบใหม่ จัดเป็นไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคกับแมลงศัตรูพืชที่สำคัญหลายชนิด คือ หนอนในกลุ่มผีเสื้อและหนอนในกลุ่มด้วงซึ่งหนอนในกลุ่มผีเสื้อเป็นแมลงศัตรูพืชที่มีความสำคัญทางการเกษตรอย่างมากซึ่งมีการระบาดอย่างกว้างขวางมีการทำลายพืชผักจนทำให้เกิดความเสียหายอย่างรุนแรง และทำให้มูลค่าของผลผลิตทางการเกษตรลดลง เกษตรกรจึงนิยมใช้สารเคมีในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเพราะให้ผลเร็วและมีประสิทธิภาพในการจัดการแมลงสูง แต่สารเคมีส่งผลกระทบต่อตัวเกษตรกรและสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดสารพิษตกค้างส่งผลกระทบต่อพืชและสัตว์และยังทำให้แมลงศัตรูพืชเกิดการต้านทานต่อสารเคมี ดังนั้นในปัจจุบันการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบชีววิธีจึงเป็นทางเลือกที่น่าสนใจและมีการส่งเสริมให้มีการใช้มากขึ้น เนื่องจากการควบคุมแบบชีววิธีให้ผลดีทั้งต่อตัวเกษตรกร ผลผลิต ผู้บริโภค และสิ่งแวดล้อมทำให้เกิดทางเลือกในการป้องกันกำจัดแมลงได้หลากหลายมากขึ้น โดยใช้เชื้อรา แบคทีเรีย พืชสมุนไพร ไวรัสและไส้เดือนฝอย

แต่เนื่องจากไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เป็นสายพันธุ์ใหม่การตรวจสอบความปลอดภัยต่อสัตว์และพืชจึงเป็นสิ่งที่จำเป็นต้องปฏิบัติ เพื่อให้เกษตรกรเกิดการยอมรับในการที่จะนำไส้เดือนฝอยไปใช้ในการเกษตร ซึ่งไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เป็นสายพันธุ์ที่เหมาะสมต่อสภาพภูมิอากาศของประเทศไทยและมีประสิทธิภาพในการฆ่าแมลงสูง สามารถเพาะขยายจำนวนด้วยวิธีไม่ซับซ้อนและใช้ต้นทุนต่ำ ซึ่งจะช่วยให้ลดความเสียหายของหนอนแมลงในกลุ่มผีเสื้อต่อผลผลิตทางการเกษตร

วัตถุประสงค์

1. เพื่อทดสอบความปลอดภัยโดยการศึกษาการมีชีวิตรอดของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในน้ำเลือดสัตว์เลือดอุ่น คือ คน ไก่ หมู วัว และสัตว์เลือดเย็น คือ แมลง
2. เพื่อทดสอบความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองคือ ไก่ และหนูขาว
3. เพื่อทดสอบความปลอดภัยกับพืชคือมะเขือเทศ



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การตรวจเอกสาร

เนื่องจากในปัจจุบันมีการให้ความสำคัญถึงปัญหาการใช้สารเคมีในการกำจัดศัตรูพืช จึงมีการตื่นตัวในการที่จะหาแนวทางในการป้องกันกำจัดศัตรูพืชแบบผสมผสาน ซึ่งการใช้ไส้เดือนฝอยในการป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชเป็นการป้องกันกำจัดที่น่าสนใจอีกแนวทางหนึ่งที่ได้รับการนิยมนกันอย่างแพร่หลายและมีการนำมาใช้ในประเทศไทยเป็นระยะเวลาหลายปีมาแล้ว

ไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคนกุ่มแมลง

ไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคนกุ่มแมลง (entomopathogenic nematodes) จัดเป็นจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์และเป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงอีกชนิดหนึ่ง ค้นพบครั้งแรกโดย Steiner ในประเทศเยอรมันนี เมื่อปี ค.ศ. 1923 ไส้เดือนฝอยเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กและเป็น obligate parasite ภายในตัวแมลงในปัจจุบันเริ่มมีการยอมรับในการนำมาใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชในหลายประเทศเนื่องจากไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง มีศักยภาพในการฆ่าแมลงได้มากกว่า 200 ชนิด และแมลงจะตายภายในเวลาอันรวดเร็ว ตลอดจนสามารถเพาะเลี้ยงได้ในอาหารเทียมหลายชนิด (Gaugler and Kaya, 1990)

ไส้เดือนฝอยจัดอยู่ใน order Rhabditida และพบว่ามี 2 วงศ์ (family) เท่านั้นที่มีศักยภาพที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง คือ family Steinernematidae และ Heterorhabditidae มีการศึกษาวิจัยเป็นเวลานานกว่า 75 ปี โดยได้ทำการศึกษาไส้เดือนฝอยทั้งในด้านการจัดจำแนกชนิด พฤติกรรม ความอยู่รอด ความสามารถในการเป็น biological control agent และทำการคัดเลือกสายพันธุ์ที่คืนนำมาเพิ่มปริมาณในอาหารเทียม เพื่อที่จะเพิ่มปริมาณในการควบคุมแมลงซึ่งจะช่วยทดแทนหรือลดปริมาณการใช้สารเคมีในการเกษตร (นุชนารถ, 2543)

Poinar (1986) ได้จัดลำดับชั้นของไส้เดือนฝอยที่ทำให้เกิดโรคกับแมลง ดังนี้

Phylum Nematoda

Class Secernenta

Order Rhabditida

Sub-order Rhabditina

Superfamily Rhabditoidea

Family Steinernematidae

Family Heterorhabditidae

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การจัดจำแนกชนิดโดยศึกษาถึงรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยา จัดเป็นงานพื้นฐานที่มีความสำคัญในการแบ่งแยกชนิด (species) ของไส้เดือนฝอย หลักของการจัดจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยคือการวัดสัดส่วนต่างๆ พิจารณาลักษณะรูปร่างของระยะเข้าทำลาย ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้เพศเมีย โดยใช้ light microscopoe (LM) และ scanning electron microscopoe (SEM) ซึ่งความแตกต่างของขนาดและรูปร่างสามารถจัดจำแนกชนิดได้ (นุชนารถ,2543)

ไส้เดือนฝอยในกลุ่ม entomopathogenic nematode มีการเจริญเติบโตโดยการลอกคราบทั้งหมด 4 ครั้ง ประกอบด้วยระยะตัวอ่อน(juvenile stage) 4 ระยะคือ ระยะตัวอ่อนที่ 1 (J1) พักออกจากไข่ภายในตัวแม่มีการลอกคราบระยะที่ 2 (J2) ตัวอ่อนระยะที่ 3 (J3) และตัวอ่อนระยะที่ 4 (J4) ตามลำดับก่อนเป็นตัวเต็มวัย เพศผู้และเพศเมีย ตัวอ่อนทั้ง 4 ระยะ และตัวเต็มวัยจะเจริญเติบโตภายในตัวแมลงเหยื่อเท่านั้น มีเพียงระยะเดียวที่อยู่ภายนอกแมลงคือระยะ infective juvenile (IJ) ซึ่งก็คือตัวอ่อนในระยะ J2 และ J3 ที่มีการปรับสภาพตัวให้มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมภายนอก และเคลื่อนที่ออกจากซากแมลงดำรงชีพอยู่ในดินโดยไม่กินอาหารเพื่อรอคอยแมลงเหยื่อตัวใหม่ (นุชนารถ,2543)

ไส้เดือนฝอยทั้ง 2 สกุล คือ *Steinernema* และ *Heterorhabditis* เป็นสิ่งมีชีวิตที่มีขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในดินดำรงชีวิตเป็นอิสระโดยไม่กินอาหาร เป็นระยะที่เรียกว่า free living ตัวอ่อนระยะที่ 3 (third-stage juvenile) เป็นตัวอ่อนที่เป็นระยะสำคัญ คือเป็นระยะเข้าทำลายแมลง (infective-stage juvenile) เป็นตัวอ่อนระยะเดียวที่มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อมได้ดีที่สุด โดยถ้าตัวตัวมีผนังใสเรียกว่า cuticle ปกคลุมป้องกันอุณหภูมิและความชื้น มีการสะสมอาหารสำรองพวกไขมัน(lipid reserve) จึงสามารถอยู่ในดินได้นานโดยไม่ต้องกินอาหารเพื่อรอคอยแมลงเหยื่อเมื่อพบแมลงไส้เดือนฝอยจะเข้าสู่ช่องว่างในตัวแมลง (haemocoel) ได้หลายทาง ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยซึ่งสัมพันธ์กับชนิดและสภาพแวดล้อมไส้เดือนฝอย *Steinernema* sp. และ *Heterorhabditis* sp. มีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนในเรื่องของการขยายพันธุ์ โดยพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema* มีการผสมพันธุ์แบบ amphimictic เท่านั้น คือการผสมพันธุ์ระหว่างเพศผู้กับเพศเมีย ส่วนไส้เดือนฝอย *Heterorhabditis* sp. พบว่าใน generation ที่ 1 จะมีการขยายพันธุ์แบบ hermaphroditic โดยตัวเมียสามารถสร้างไข่และสเปิร์มภายในตัวให้ลูกเองได้ และใน generation ที่ 2 เป็นแบบ amphimictic (Poinar, 1990)

เมื่อไส้เดือนฝอยเข้าสู่ช่องว่างภายในลำตัวแมลง จะปลดปล่อย symbiotic bacteria ผู้นำเลือดของแมลง แบคทีเรียจะเพิ่มปริมาณเซลล์อย่างรวดเร็วและสร้างสารพิษ ทำให้แมลงเกิดอาการโลหิตเป็นพิษ (septicemia) และตายภายในเวลาไม่เกิน 48 ชม. แบคทีเรียที่พบในไส้เดือนฝอยจัดอยู่ในสกุล *Xenorhabdus* spp. มีรูปร่างเป็นท่อน (rod-shaped) เป็นพวก facultative anaerobic แกรมลบ

Xenorhabdus spp. ที่แยกจากธรรมชาติมีลักษณะเป็น primary form โดยมีลักษณะโคโลนีโค้งนูน ทึบ แสง บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เติมสี (dye) เชื้อสามารถดูดซับสีทำให้โคโลนีมีสี แต่ถ้าเลี้ยง *Xenorhabdus* spp. ไว้บนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็นเวลานาน เชื้อสามารถเปลี่ยนเป็น secondary form โคโลนีมีลักษณะแบน และไม่สามารถดูดซับสีที่ผสมลงในอาหารได้ ไม่พบความแตกต่างในการทำให้เกิดโรคของเชื้อทั้ง 2 form แต่พบว่ามียุทธศาสตร์ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อกับไส้เดือนฝอย

แมลงที่ถูกทำลายด้วยไส้เดือนฝอยจะพบว่าไม่มีจุลินทรีย์อื่นๆเข้าทำลายซ้ำเติม เป็นผลมาจากแบคทีเรียที่อยู่ในน้ำเลือดของแมลง สร้างสาร antimicrobial ซึ่งจะยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่นๆได้

ในเรื่องอุณหภูมิมีผลต่อการเข้าทำลายของไส้เดือนฝอยที่แตกต่างกัน โดยพบว่า *S. capricapsae* มีความสามารถในการเข้าสู่แมลงเหยื่อได้ดีที่อุณหภูมิ 24 องศาเซลเซียส และ *S. scapterisci* ให้ผลดีที่อุณหภูมิ 32 องศาเซลเซียส (นุชนารถ, 2543)

สำหรับในประเทศไทย งานวิจัยทางด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเริ่มมีการศึกษาค้นคว้าเมื่อประมาณปี 2530 โดยกองกัญและสัตววิทยา กรมวิชาการเกษตร ทำให้ประเทศไทยเริ่มมีการสำรวจและเก็บรวบรวมไส้เดือนฝอยเป็นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2539 สามารถแยกได้ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจำนวน 9 ไอโซเลท จัดอยู่ใน family *Steinernematidae* จำนวน 8 ไอโซเลท โดยพบที่จังหวัด กาญจนบุรี พิจิตร อุดรธานี กากินธุ์ มหาสารคาม ขอนแก่น หนองคาย และสระแก้ว และ family *Heterorhabditidae* sp. จำนวน 1 ไอโซเลท คือ ร้อยเอ็ด นำมาเก็บเป็น culture collection ณ กลุ่มงานไส้เดือนฝอย กองโรคพืช และจุลชีววิทยา กรมวิชาการเกษตร (นุชนารถ, 2543)

ได้ศึกษาถึงรูปร่างลักษณะทางสัณฐานวิทยาและเทคนิค PCR-RFLP เพื่อจำแนกชนิดของไส้เดือนฝอยที่แยกได้จากดินในเขตจังหวัดกาญจนบุรี พบว่าเป็นไส้เดือนฝอยชนิดใหม่และเป็นไส้เดือนฝอยสายพันธุ์ไทย ตั้งชื่อวิทยาศาสตร์คือ *S. thailandense* n. sp. ผลงานวิจัยดังกล่าวตีพิมพ์เผยแพร่ในประเทศไทยเมื่อ 2541 และส่งตีพิมพ์เผยแพร่ในวารสาร Nematology ชื่อเรื่อง *Steinernema thailandense* n.sp. in Thailand : Taxonomy and Biology (นุชนารถ, 2543)

การทดสอบความปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม

เนื่องจากสายพันธุ์ไส้เดือนฝอยที่ได้ค้นพบเป็นสายพันธุ์ไทยซึ่งเป็นสายพันธุ์ใหม่การตรวจสอบเรื่องความปลอดภัยต่อมนุษย์ สัตว์ พืช และสิ่งแวดล้อม เพื่อให้แน่ใจว่าไม่เป็นอันตราย และทำให้เกิดการยอมรับในการนำไส้เดือนฝอยไปใช้ป้องกันกำจัดแมลงศัตรูในทางด้านการเกษตร ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการทำการทดลองตามองค์การป้องกันสิ่งแวดล้อม(EPA)ของประเทศ สหรัฐอเมริกา (The

United States Environmental Protection Agency) กำหนดให้จำเป็นต้องมีข้อมูลที่ต้องการสำหรับการนำไปจดทะเบียน ภายใต้ความรับผิดชอบขององค์การป้องกันสิ่งแวดล้อม (EPA) จะแบ่งออกเป็นหลักใหญ่ๆคือ การวิจัยผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเป็ข้อมูลที่ต้องการสำหรับเกษตรกรที่จะนำไปลงทะเบียนเพื่อให้ได้การยอมรับในการที่จะนำไปใช้ ข้อมูลจะมากหรือน้อยอาจจะขึ้นอยู่กับจุลินทรีย์ที่เจาะจง ธรรมชาติของการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบและการนำไปผลิต และรูปแบบการนำไปใช้ (Marshall,1989)ผลการพิจารณาในแต่ละกรณีจะประเมินผลและทดสอบว่ามีความเสี่ยงกับสุขภาพมนุษย์ สัตว์เลี้ยง พืช และสิ่งแวดล้อม โดยจะทำการทดสอบกับ

ไก่

ไก่เป็นสัตว์ปีกสัตว์เลือดอุ่น จัดอยู่ใน Class Aves เป็นสัตว์ที่มีลักษณะพิเศษ ลำตัวปกคลุมไปด้วยขน (feathers) มีปีก ส่วนใหญ่ใช้บินได้ มีขา 2 ขา ใช้เกาะ ใช้เดิน หรือว่ายน้ำ โดยปกติเท้ามีนิ้ว 4 นิ้ว มีปาก (beak) ยื่นออกมายาว ไม่มีฟัน ปอดติดอยู่กับซี่โครง และมีถุงลมช่วยในการหายใจ ไม่มีกระเพาะปัสสาวะ อุณหภูมิของร่างกายสูงกว่าสัตว์เลี้ยงประเภทอื่น ในไก่ (fowl) มีอุณหภูมิของร่างกายอยู่ระหว่าง 105°ฟ ถึง 109.4° ฟ. ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับเวลาที่ทำการวัด อุณหภูมิเฉลี่ยตอนเที่ยงวันประมาณ 107° ฟ.

การจัดแยกลำดับสัตว์ปีก (Classification of Birds)

สัตว์ปีกจัดอยู่ใน Phylum Chordata เป็นสัตว์ประเภทที่มีกระดูกสันหลังอยู่ใน Class Aves ซึ่งเป็นสัตว์จำพวกนกทั้งหลาย ที่สำคัญมีอยู่ 4 Order ด้วยกันคือ :

Anseriformes	:	เป็ด ห่าน และหงส์
Galliformes	:	ไก่ ไก่วง ไก่ตอก นกยูง และไก่ฟ้า
Columbiformes	:	นกพิราบ
Passeriformes	:	นกคานารี

ไก่ที่เราเลี้ยงกันอยู่ในปัจจุบันมีต้นตระกูลมาจากไก่ป่าจากแถบเอเชีย มีอยู่ 4 ชนิด

ด้วยกัน คือ

1. *Gallus gallus* : ไก่แก่ ไก่ป่าสีแดง (Red Jungle Fowl) มีพบอยู่ทั่วไปในภาคกลางตอนเหนือและทางภาคตะวันออกเฉียงของประเทศอินเดีย ประเทศพม่า ประเทศไทย ประเทศในอินโดจีน ประเทศมาเลเซีย ประเทศ อินโดนีเซีย ประเทศฟิลิปปินส์ มีลักษณะและรูปร่างคล้ายไก่เล็กฮอร์นสีน้ำตาล

2. *Gallus lafayettii* : เป็นไก่ป่าที่อยู่แถบเกาะศรีลังกา (Ceyloness Jungle Fowl) ลักษณะคล้ายไก่ป่าสีแดง แต่ตัวผู้มีขนที่อกและท้องสีแดงส้มและตัวเมียมีขนที่ปลายปีกสีบาร์
3. *Gallus sonnerati* : ไก่ป่าสีเทา (Gray Jungle Fowl) มีอยู่ทางแถบตะวันตกเฉียงใต้ของประเทศอินเดีย
4. *Gallus varius* : ไก่ป่าชาวสีดำหรือเขียว (Black or Green Jungle Fowl) เป็นไก่ป่าที่อยู่แถบเกาะชวา สุมาตรา ตัวผู้มีขนค่อนข้างดำ หรือเขียวคล้ำ หงอนไม่จักรเหมือนไก่ป่า ชนิดอื่น เหนียงสีแดง เหลือง และเขี้ยวน้ำเงิน หงอนสีเขียว และม่วงแดง (ปฐม,2540)

มะเขือเทศ

TOMATO

ไลโคเปอร์ซิคอน เอสคูเลนทัม ตระกูล โซลานาซีอี

Lycopersicon esculentum family Solanaceae

ชื่ออื่น มะเขือ (ทั่วไป), มะเขือส้ม (ภาคเหนือ) Love Apple

ประเภทผัก อายุหลายปี (Perennial) ปลูกเป็นผักอายุปีเดียว(annual)

ถิ่นกำเนิด แถบเทือกเขาแอนดิส ทวีปอเมริกาใต้

อายุปลูก ตั้งแต่ย้ายกล้า จนถึงเก็บเกี่ยวประมาณ 60-75 วัน

ขนาด ต้นสูงประมาณ 15 ซม.-1 เมตร ขนาดของผลแตกต่างกันมากมาย

ผลผลิต บ้านเราเกษตรกรปลูกได้ประมาณ 660-1,750 กก./ไร่ เฉลี่ย 1,535 กก./ไร่
ต่างประเทศ 6.5 –14 ตัน/ไร่

ฤดูปลูก ปลูกได้ดีช่วงเดือน ต.ค. – ธ.ค. แต่ปลูกได้ผลดีที่สุดช่วงเดือน ม.ค.- ก.พ. นอกเหนือจากเวลานี้ต้องเลือกพันธุ์ที่เหมาะสม

มะเขือเทศเป็นพืชผักที่เรabri โภคส่วนของผล นิยมใช้ทั้งรับประทานผลสดปรุงอาหารและในรูปแบบผลิตภัณฑ์อาหารแปรรูปต่างๆ เช่น ซอสมะเขือเทศ, น้ำมะเขือเทศ ฯลฯ เป็นพืชพื้นเมืองในแถบเทือกเขาแอนดิส (Andes Mountains) ทวีปอเมริกาใต้ ซึ่งถูกใช้เป็นอาหารมานานก่อนที่โคลัมบัสจะพบทวีปอเมริกา มะเขือเทศเข้าสู่ยุโรปและกลายเป็นผักที่นิยมมาราวปี ค.ศ. 1500 เข้าสู่ประเทศไทยเมื่อใดไม่ปรากฏหลักฐานแน่ชัด ปัจจุบันเป็นผักที่นิยมปลูกและบริโภคกันมากชนิดหนึ่งในบ้านเรา

สภาพแวดล้อมที่ต้องการ

ประเภทของดิน ดินแทบทุกชนิด ชอบดินร่วน

พีเอชดิน ช่วงที่พอเหมาะ 6.0-6.8

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความชื้น ดินชื้นพอเหมาะ ไม่ขังแฉะ
แสง แสงแดดเต็มที่ตลอดวัน
อุณหภูมิ ช่วงที่เหมาะสม 21-24°ซ. การติดผลมีปัญหา ถ้าอุณหภูมิกลางวันสูงสุดกว่า 38°ซ. หรืออุณหภูมิกลางคืนต่ำสุดสูงกว่า 25-27° ซ.

แปลงปลูก ไถดินลึกประมาณ 30-40 ซม. ตากดินใส่ปุ๋ยคอกเป็นกรด รูปแปลงขึ้นอยู่กับชนิดของพันธุ์มะเขือเทศที่ปลูก พักพันธุ์แบบทอดยอด ต้องการค้ำ นิยมปลูกบนแปลงผิวยาวหน้าแคบ 1 เมตร เป็นแถวคู่ ส่วนพันธุ์แบบพุ่มไม่ต้องการค้ำ นิยมปลูกบนแปลงลูกฟูก ซึ่งสามารถพูนโคนต้นทำให้มีรากค้ำจุนที่โคนต้นแตกออกมาหาอาหารเพิ่มขึ้น การใส่ปุ๋ยรองพื้นอาจใส่ลงใต้ดินตามแนวแถวหรือแนวร่องที่จะปลูก หรือใส่ผสมลงในหลุมปลูก คลุกเคล้าปุ๋ยเข้ากับดินให้ดี และพยายามให้ปุ๋ยอยู่ข้างใต้ห่างจากรากต้นกล้าประมาณ 10 – 15 ซม.

โรคสำคัญ ได้แก่ โรคใบแห้ง โรคใบจุด โรคกินเน่าของผล โรคเหี่ยวเหลืองตาย

โรคใบด่าง โรคยอดหงิก

แมลงสำคัญ ได้แก่ แมลงหวี่ขาว เพลี้ยไฟ เพลี้ยอ่อน หนอนเจาะผลมะเขือเทศ

การเก็บเกี่ยว

มะเขือเทศแก่เก็บเกี่ยวได้เมื่ออายุประมาณ 60 – 75 วัน หลังย้ายปลูกขึ้นกับชนิดของพันธุ์

ในการปลูกเพื่อส่งตลาด จำพวกผลสด ควรเลือกเก็บผลมะเขือเทศที่เริ่มเปลี่ยนสีจากสีเขียวเป็นสีชมพู ไม่ควรปล่อยให้มะเขือเทศสุกแดงอยู่กับต้น เพราะจะมีปัญหาเรื่องการขนส่งและเสียดคุณภาพได้ง่ายเมื่อถึงตลาด แต่กรณีปลูกเพื่อส่งโรงงาน จำเป็นต้องเก็บผลสุกแดงสม่ำเสมอ แต่อย่างไรก็ตามพันธุ์ลูกผสมมะเขือเทศส่งโรงงานใหม่ๆ ปัจจุบันไม่จำเป็นต้องเก็บเกี่ยวขณะผลแก่สุกแดงจัด แต่จะเก็บขณะผลยังเขียวอยู่ (เมฆ,2541)

เลือด

เลือดเป็นของเหลวในร่างกายที่อยู่ภายนอกเซลล์ ในร่างกายของคนจะพบส่วนที่เป็นของเหลวภายในเซลล์ (intracellular fluid) ประมาณ 63 เปอร์เซ็นต์ ของเหลวภายนอกเซลล์ (extracellular fluid) ประมาณ 37 เปอร์เซ็นต์ ของเหลวภายนอกเซลล์ยังแยกออกเป็นส่วน ๆ ตามตำแหน่งที่อยู่ คือ (1) น้ำเลือด (blood plasma) พบอยู่ภายในเส้นเลือดเท่านั้น มีประมาณ 7 เปอร์เซ็นต์ (2) ของเหลวระหว่างเซลล์ ได้แก่ น้ำเหลือง มีประมาณ 28 เปอร์เซ็นต์ (สุชาติ,2530)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้าที่สำคัญของเลือด มี 2 ประการ คือ การลำเลียงและการปรับสภาวะสมดุลของร่างกาย

1. การลำเลียง เลือดสามารถลำเลียงสารหลายอย่างเพื่อนำไปยังส่วนต่างๆ ของร่างกายเม็ดเลือดเป็นตัวขนส่งก๊าซ น้ำเลือดเป็นส่วนประกอบของอาหารพวกน้ำตาล ไขมัน วิตามิน กรดอะมิโน และสารอาหารอื่นๆ และน้ำเลือดยังเป็นตัวขนส่งของเสียไปยังอวัยวะขับถ่าย และขนส่งสารที่ควบคุมการทำงานของกระบวนการต่างๆ
2. การปรับสภาวะสมดุลของร่างกาย ปรับส่วนประกอบของของเหลวในเนื้อเยื่อ ของเหลวระหว่างเซลล์และของเหลวภายในเซลล์

ส่วนประกอบที่สำคัญของเลือด คือ ส่วนที่เรียกว่าน้ำเลือดและส่วนที่เป็นเซลล์

1. **น้ำเลือด** น้ำเลือดเป็นของเหลวเกือบใส มีประมาณ 55-57 เปอร์เซ็นต์ของเลือด ประกอบด้วยสารหลายอย่างคือ
 - น้ำ มีประมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลือด มีหน้าที่สำคัญ คือ ละลายและแขวนลอยสารต่างๆ ทำให้เกิดการมีประจุ และนำความร้อน
 - โปรตีน มีประมาณ 6-8 เปอร์เซ็นต์ของน้ำเลือด ทำให้เลือดมีความหนืดและมีความดันออสโมซิส ซึ่งจะช่วยปรับปริมาตรของเสียและรักษาสมดุลของน้ำในร่างกาย
 - สารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ ประมาณ 33 มิลลิกรัม
 - กลูโคส มีประมาณ 60-100 มิลลิกรัมใน 100 ซม.
 - ก๊าซที่เกี่ยวข้องกับการหายใจ
 - วิตามิน เช่น วิตามินเอ วิตามินดี โทโคเฟอรอล
2. **ส่วนที่เป็นเซลล์และชิ้นส่วนของเซลล์** ได้แก่ เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว และแผ่นเลือด
 - 1) **เม็ดเลือดแดง** เม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่มีลักษณะพิเศษเพื่อทำหน้าที่ขนส่งก๊าซออกซิเจน ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม
 - 2) **เม็ดเลือดขาว** เม็ดเลือดขาวเป็นเซลล์ที่ไม่มีสี เพราะไม่มีฮีโมโกลบิน แต่จะมีนิวเคลียส และมีขนาดใหญ่มากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวของคนมีประมาณ 6,000—9,000 เซลล์/ลูกบาศก์มิลลิเมตร ของเลือด เม็ดเลือดขาวมีหน้าที่สำคัญ คือ ทำลายเชื้อโรคและสารแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย
 - 3) **แผ่นเลือด** สร้างมาจากไขกระดูก ลักษณะเป็นแผ่นเล็กๆ รูปกลมหรือเว้า บรรจุสารเคมีที่มีส่วนเริ่มให้เกิดปฏิกิริยาการแข็งตัวของเลือด (บังอร, 2544)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. ไข่เคียวฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. ตัวอ่อนระยะที่ 3
2. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลวสำหรับเลี้ยงไข่เคียวฝอย
3. กล่องพลาสติกขนาด 18.5x26x65 ซม.
4. ครอบป้องกันพลาสติกสำหรับเลี้ยงไข่เคียวฝอย
5. กระดาษทิชชู
6. ก่อตั้งจุลทรรศน์
7. เครื่องชั่งละเอียดทศนิยม 4 ตำแหน่ง
8. น้ำกลั่น
9. flask ขนาด 250 มล.
10. beaker ขนาด 150, 50 มล.
11. เลือด ไก่แก่ เลือดคน ไก่ หมู วัว และ น้ำเลือดแมลง (ภาพที่ 1)
12. กรงสำหรับเลี้ยงสัตว์
13. อาหารสำหรับเลี้ยงสัตว์
14. น้ำ
15. สัตว์ทดลอง 2 ชนิดคือ หนูขาว และ ไก่บ้าน (ภาพที่ 2 และ 3)
16. plate
17. กระดาษกรอง
18. micropipette
19. syracuse
20. มะเขือเทศ
21. ดิน, ปุ๋ย
22. กระจก
23. โรงเพาะชำ (ภาพที่ 4)
24. เครื่องมือและอุปกรณ์ อื่นๆทางวิทยาศาสตร์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการทดลอง

การเตรียมไส้เดือนฝอย

การเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. เพื่อศึกษาวงจรชีวิตและดู ลักษณะต่างๆ ของไส้เดือนฝอยเพื่อใช้ในการทดลอง

ขั้นตอนและวิธีการเพิ่มจำนวนไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.

- ขั้นตอนในการเตรียมอาหาร

ส่วนประกอบในการเตรียมอาหารชนิดกึ่งแข็งกึ่งเหลว สำหรับเลี้ยงไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ประกอบด้วยโปรตีน ไขมัน และน้ำ โดยใช้อัตราส่วนดังนี้ ไข่ไก่ 60% ไขมันหมู 20% น้ำกลั่น 20% นำมาผสมให้เข้ากันจากนั้นเตรียมฟองน้ำขนาดเท่ากับลูกเต๋าเพื่อเป็นวัสดุให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เกาะอาศัย แล้วนำส่วนผสมของอาหารกับฟองน้ำมาผสมกันโดยที่ใช้อาหาร 30 กรัมต่อ ฟองน้ำ 1.5 กรัม บรรจุ ใน flask ขนาด 250 มล. นำไปอบหนึ่ง ความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส

- ขั้นตอนในการเตรียมไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.

นำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่ได้จาก host คือ หนอนนก มาทำการล้างฆ่าเชื้อด้วย 0.1% hyamine เป็นเวลา 30 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที จะได้ไส้เดือนฝอยที่พร้อมจะทำการต่อเชื้อในอาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว โดยนำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. 10,000 ตัวต่อ flask ทำทุกขั้นตอนสภาพปลอดเชื้อ นำไปเก็บที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 วัน

นำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. มาทำการทดสอบความปลอดภัยต่อพืชและสัตว์เลือดอุ่นต่อไป

วิธีการทดลอง

1. ทดสอบในน้ำเลือด

เพื่อทำการทดสอบ ความอยู่รอดของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandens* n.sp. ในน้ำเลือดของคน ไก่ หมู วัว และแมลง โดยทำการนำเลือดใส่ลงใน syracuse ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 ซม. จากนั้นจึงหยดไส้เดือนฝอย ลงในน้ำเลือดทุกชนิดของเลือดตัวอย่าง ชนิดละประมาณ 100 ตัว ทำการ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ทดลอง 3 ซ้ำ ปิดฝา plate ให้สนิท และวางไว้ในห้องปฏิบัติการ สำหรับการทดลองเปรียบเทียบดำเนินการเช่นกัน เพียงแต่ใช้น้ำกลั่นเท่านั้นแทนน้ำเลือด

2. ทดสอบในสัตว์ทดลอง

แบ่งเป็นการทดลองในไก่และหนูขาว โดยนำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ประมาณ 100,000ตัว/น้ำ 1 มล. ให้ไส้เดือนฝอยทางปากของสัตว์ทดลอง ใช้ไก่บ้านอายุประมาณ 30 วัน และหนูขาว อายุประมาณ 30 วันให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ทางปากทุกวันเป็นเวลา 5 วัน แบ่งเป็นอย่างละ 3 ซ้ำ สำหรับการทดลองเปรียบเทียบดำเนินการอย่างเดียวกันแต่เปลี่ยนเป็นใช้น้ำกลั่นแทน จากนั้นเลี้ยงสัตว์ทดลอง คือ ไก่และหนู ขาวต่อเป็นเวลา 4 เดือนเพื่อสังเกตความผิดปกติ

3. การทดสอบกับพืช

โดยทดสอบกับมะเขือเทศเริ่มจากดำเนินการปลูกมะเขือเทศจำนวน 40 ต้น เมื่อมะเขือเทศมีใบจริง 4-5 ใบ นำมาทดสอบโดยแบ่งเป็น มะเขือเทศที่มีการให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. 20 ต้น โดยหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ต้น ละประมาณ 100,000 ตัว ทำการตรวจสอบน้ำหนักรากและความผิดปกติเป็นปุ่มปมที่เกิดจากเมื่อมะเขือเทศอายุ 30 วัน การทดลองเปรียบเทียบทำเช่นเดียวกัน แต่เปลี่ยนเป็นใช้น้ำกลั่นแทน(ภาพที่ 5)

การเก็บข้อมูล

- ในการทดลองกับเลือด

หลังจากทำการหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในน้ำเลือดแล้ว ทำการนับจำนวนการตายของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่เวลา 24 ชม. และ 48 ชม. ในน้ำเลือดทั้ง 5 ชนิด คือ เลือดคน ไก่ วัว หมู และ น้ำเลือดแมลง และ control ด้วย ตามลำดับ จดบันทึกจำนวนไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่เป็นและตายคำนวณ % ตาย ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างตามวิธีทางสถิติ

- การทดลองกับสัตว์ทดลอง

หลังจากหยดไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ทางปากของสัตว์ทดลองคือ หนูขาวและไก่ ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน ทำการตรวจสอบสภาพของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่ออกมาทางอุจจาระ หลังจากได้รับเป็นเวลา 24 ชม. จดบันทึกจำนวน

ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่ตายและบันทึกผลเพื่อหา % การตาย ซึ่งจะนำไปวิเคราะห์ผลทางสถิติ

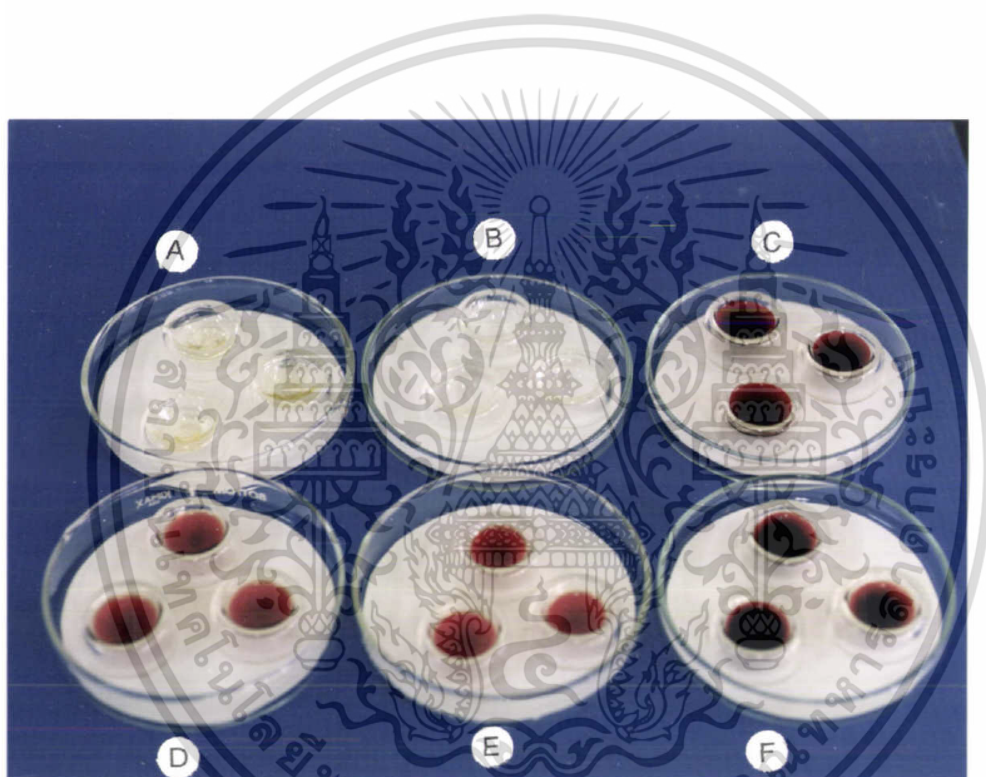
จากนั้นตรวจสอบอาการผิดปกติของสัตว์ทดลองต่อไปโดยตรวจอาการผิดปกติของสัตว์ทดลอง หลังจากทำการทดลองทุกเดือน เป็นเวลา 4 เดือน

- การทดลองกับพืช

เมื่อต้นมะเขือเทศมีใบจริง 4-5 ใบแล้วจึงทำการใส่ไส้เดือนฝอยประมาณ 100,000 ตัว หลังจากใส่ไส้เดือนฝอยทำการตรวจระบบรากและความผิดปกติเมื่อมะเขือเทศมีอายุได้ 30 วัน หลังจากการปลูก



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 ทดสอบไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในน้ำเลือด คือ

A น้ำเลือดแมลง

B น้ำกั้น

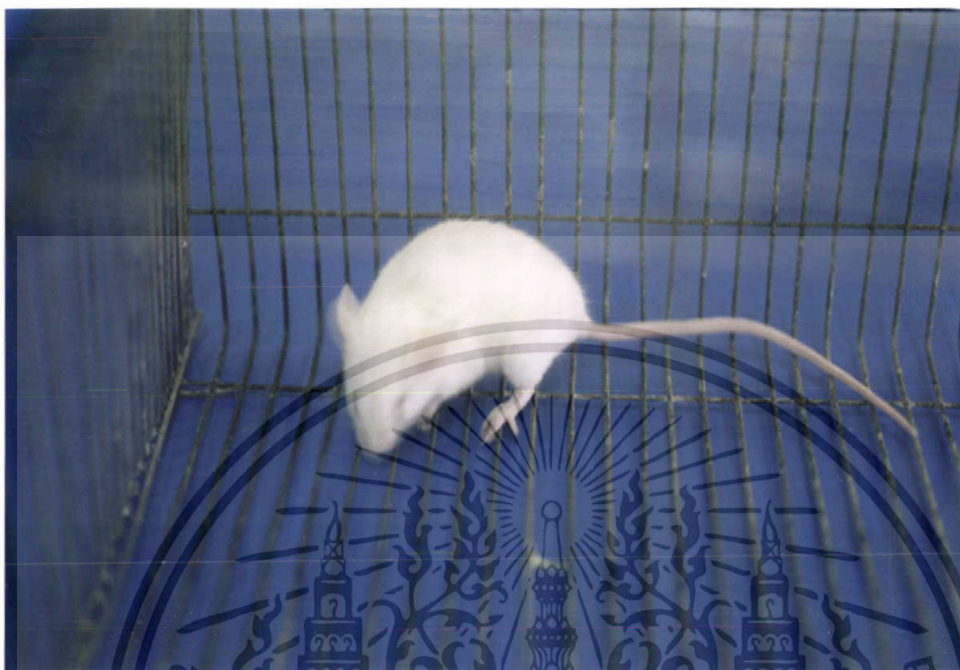
C น้ำเลือดคน

D น้ำเลือดหมู

E น้ำเลือดไก่

F น้ำเลือดวัว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

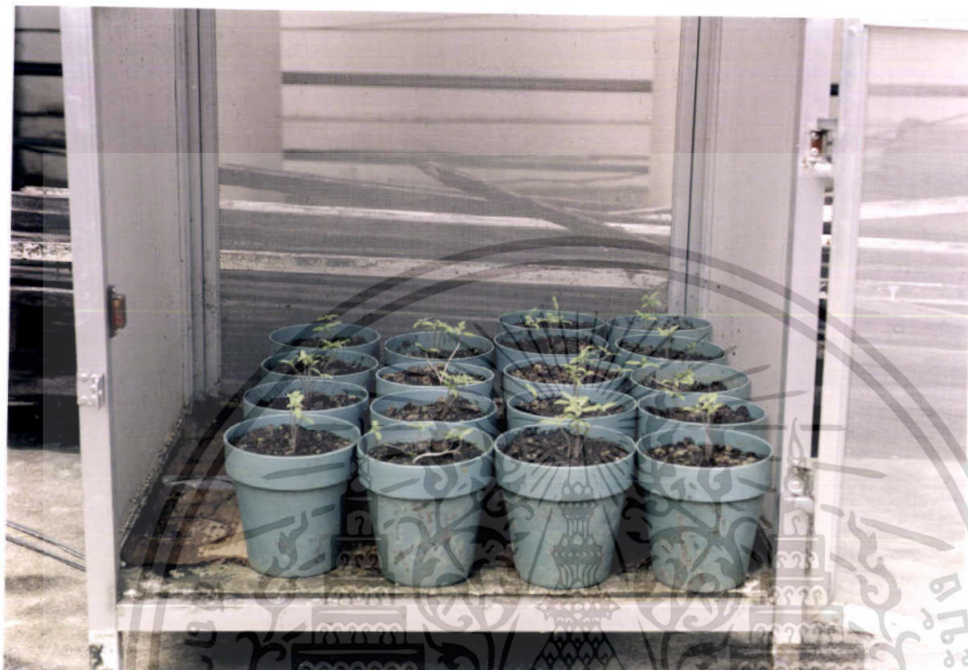


ภาพที่ 2 หนูขาวที่ใช้เป็นสัตว์ทดลอง

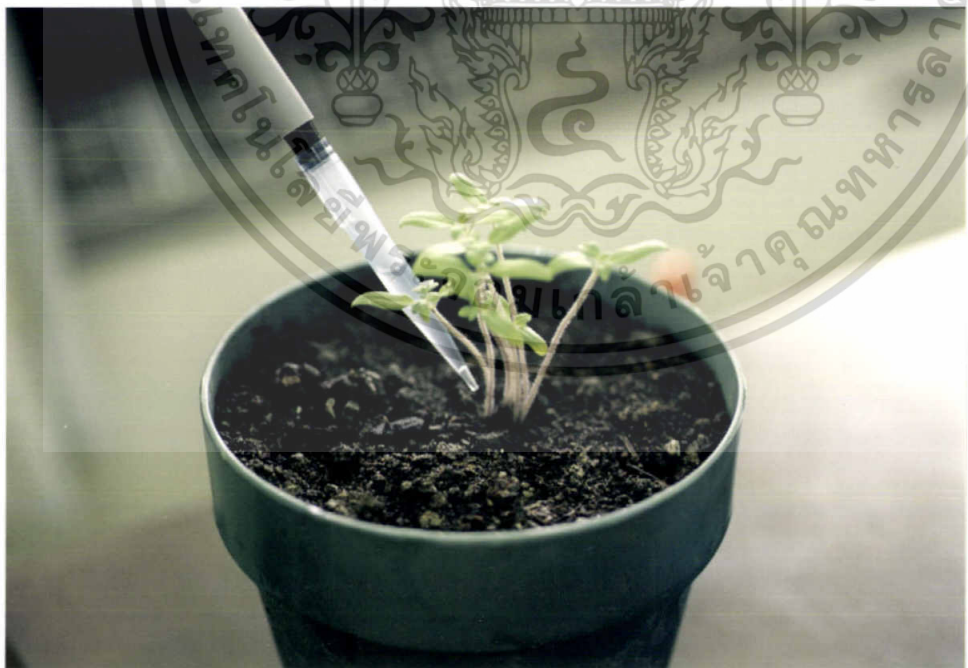


ภาพที่ 3 ไม้บ้านที่ใช้เป็นสัตว์ทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 4 ต้นมะเขือเทศในโรงเพาะชำ



ภาพที่ 5 การใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. กับต้นมะเขือเทศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลอง

1. จากการศึกษาทดลองความปลอดภัยในการใช้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n.sp. โดยทดสอบกับน้ำเลือด ของสัตว์เลือดอุ่นคือ คน วัว ไก่ หมู และสัตว์เลือดเย็นคือ แมลง พบว่าในเลือดของสัตว์เลือดอุ่น ไส้เดือนฝอยจะยังมีชีวิตอยู่ที่ 24 ชม.และเมื่อเวลาผ่านไป 48 ชม.พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ไม่สามารถเจริญเติบโตและตายทั้งหมด100% ส่วนในน้ำเลือดของแมลงพบว่า ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. มีชีวิตมีการเจริญเติบโตและสามารถขยายพันธุ์ได้ สำหรับใน control จะพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. สามารถมีชีวิตรอดได้ (ตารางที่ 1)
2. การทดลองความปลอดภัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในสัตว์ทดลอง คือ ไก่ และหนูขาว โดยการให้ไส้เดือนฝอยทางปากในสัตว์ทดลองทั้งไก่และหนูขาว ซึ่งให้ไส้เดือนฝอยจำนวน 100,000 /ตัว ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน พบว่า ปริมาณการตายของไส้เดือนฝอยที่ ออกมากับอุจจาระของสัตว์ทดลอง คือหนูขาวและไก่พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ตายทั้งหมด100% และเมื่อทำการทดลองต่อไปโดยสังเกตลักษณะอาการของสัตว์ทดลองปรากฏว่าไม่พบความผิดปกติ เมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลองผ่านไป 120วัน (ตารางที่ 2)
3. การทดสอบความปลอดภัยในพืชโดยใช้ มะเขือเทศเป็นพืชในการทดสอบ พบว่าหลังจากการทำการปลูกต้นมะเขือเทศให้มีจำนวนใบจริง 4-5 ใบ ไส้เดือนฝอยจำนวน 100,000 ตัว/ต้นเป็นจำนวน 20 ต้นและไม่ใส่ไส้เดือนฝอยเป็นตัวเปรียบเทียบ20ต้น หลังจากนั้นจึงทำการตรวจสอบเมื่อมะเขือเทศมีอายุ 30 วัน โดยเปรียบเทียบน้ำหนักต้นและตรวจสอบรากเพื่อหาปุ๋ยมที่เป็นลักษณะของการเข้าทำลายโดยไส้เดือนฝอยในกลุ่มที่ทำให้เกิด โรคพืชและสังเกตความผิดปกติอื่นๆพบว่าไม่พบความแตกต่างกันของน้ำหนักต้นมะเขือเทศระหว่างต้นที่ได้รับไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. กับต้นที่ไม่ได้รับไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.(ตารางที่ 3)

ตารางที่ 1 ผลการตรวจปริมาณเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ที่ทดสอบในน้ำเลือดของ คน ไข้ วัณ หนอง แผล และ น้ำก้น

กรรมวิธี	% การตายของไส้เดือนฝอย	
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง
น้ำเลือดคน	100%	-
น้ำเลือดวัว	100%	-
น้ำเลือดหมู	100%	-
น้ำเลือดไก่	100%	-
น้ำเลือดแมลง	0%	0%
น้ำก้น(control)	0%	0%

ค่าที่เป็น 100% แสดงว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

- คือ ไส้เดือนตายทั้งหมด

ในน้ำเลือดแมลง พบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. มีการเจริญเติบโตเป็น

ไส้เดือนฝอยในวัยที่ 4 และสามารถขยายพันธุ์ได้

ในน้ำก้นไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. มีชีวิตแต่ไม่เจริญเติบโต

ตารางที่ 2 ผลการตรวจเปอร์เซ็นต์การตายของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในสัตว์ทดลองเมื่อมีการให้ ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ทางปากทุกวัน วันละ 100,000 ตัว เป็นเวลา 5 วัน ตรวจทุก 24 ชั่วโมง

ชนิดของสัตว์ทดลอง	การตายของไส้เดือนฝอย (%)
ไก่	100%
หนูขาว	100%

ค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เนื่องจากผลการทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่าหลังจากให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. เป็นเวลา 24 ชั่วโมงไส้เดือนฝอยตายทั้งหมด

ตารางที่ 3 ผลการตรวจความแตกต่างของน้ำหนักต้นมะเขือเทศเมื่อมีการใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. กับต้นที่ไม่ได้รับไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.

ต้นมะเขือเทศ	น้ำหนัก (กรัม)
ใส่ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp.	2.36a ^{1/}
ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย <i>Steinernema thailandense</i> n. sp.	2.25a
F-test	0.07
CV (%)	33.44

1/ ค่าเฉลี่ยจาก 3 ซ้ำ ค่าเฉลี่ยที่ตามด้วยตัวอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น P = 0.01 โดยเปรียบเทียบ Treatment Mean แบบ Duncan 's Multiple Range Test



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สรุปผลและวิจารณ์

1. จากการทดสอบความปลอดภัยในการใช้ไส้เดือนฝอยกับน้ำเลือดของสัตว์เลือดอุ่นคือ คน ไก่ วัว หมู พบว่าไส้เดือนฝอยตาย 100% หลังจากทำการทดลองที่เวลา 24ชม. เนื่องจากน้ำเลือดของสัตว์เลือดอุ่นไม่ใช่ host ของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ทำให้มีความปลอดภัยต่อมนุษย์ และสัตว์เลี้ยง ส่วนในน้ำเลือดของแมลงพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. สามารถมี ชีวิตและขยายพันธุ์ในน้ำเลือดแมลงได้โดยแมลงเป็น host เพียงอย่างเดียวของไส้เดือนฝอย แสดงว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.เป็นศัตรูธรรมชาติของแมลงเท่านั้นไม่ทำให้เกิดอันตรายต่อสัตว์เลือดอุ่น ซึ่งเป็นผลดีในการนำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืชโดยเป็นการควบคุมแมลงศัตรูพืชแบบชีววิธี ส่วนในน้ำก้นพบว่าไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.สามารถมีชีวิตอยู่ได้ ซึ่งมาจากการที่ไส้เดือนฝอยสามารถดำรงชีวิตโดยไม่มีอาหารในแหล่งน้ำตามธรรมชาติได้
2. การทดลองกับสัตว์ทดลองพบว่า ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ในสัตว์ทดลองได้ คือเมื่อนำอุจจาระของสัตว์ทดลองที่ทำการให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. มาตรวจสอบพบไส้เดือนฝอยตาย 100% และไม่พบอาการผิดปกติเมื่อเลี้ยงสัตว์ทดลอง คือไก่และหนูขาว ต่อไป เป็นเวลา 120วัน ซึ่ง อาจเป็นเพราะอุณหภูมิภายในร่างกายของสัตว์ทดลองและกรดในกระเพาะอาหารของสัตว์ทดลองมีความเข้มข้นสูงทำให้ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ไม่สามารถมีชีวิตอยู่ได้
3. ทดสอบความปลอดภัยของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ในพืชคือ มะเขือเทศเพื่อตรวจสอบผลกระทบที่อาจเกิดกับพืช พบว่าเมื่อทำการใส่ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ต้นละ 100,000 ตัว ตรวจสอบผลเมื่อมะเขือเทศมีอายุ 30 วัน แล้วทำการตรวจสอบระบบรากของต้นมะเขือเทศพบว่าไม่มีอาการผิดปกติ และไม่พบว่ามี ความเสียหายที่เกิดจากไส้เดือนฝอย

แม้ว่าการทดสอบความปลอดภัยของการนำไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. ไปใช้กับสิ่งแวดล้อม พบว่าไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและสามารถป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจ จึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจของเกษตรกร และยังสามารถเพาะเลี้ยงเพิ่มจำนวนด้วยวิธีที่ไม่ซับซ้อน แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมของไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.แม้จะพบว่ามีความปลอดภัยแต่ เป็นการทดสอบครั้งแรกจึงควรมีการทำซ้ำและเพิ่มสัตว์ทดลองให้หลากหลายเพื่อที่จะให้ผลการทดสอบมีประสิทธิภาพ

เอกสารอ้างอิง

- บั้งอร ชมเดช. 2544. สรีรวิทยาของระบบไหลเวียนโลหิต. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. กรุงเทพฯ. 354 หน้า.
- บุชนาด ตั้งจิตสมคิด. 2543. การสำรวจเก็บรวบรวมและจำแนกชนิด ไร้เดือนฝอยศัตรูแมลงในประเทศไทย. ในรายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์ สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย, กรุงเทพฯ. 85 หน้า.
- เมฆ จันทน์ประยูร. 2541. ผักสวนครัว. ไททรรศ์.กรุงเทพฯ. 144 หน้า.
- สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2530. หลักชีววิทยา สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ. 315 หน้า.
- Gaugler, R. and H.J. Kaya. 1990. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRCpress, Inc., Boca Raton,Florida. 365 p.
- Kaya, H.K. and S.P. 1988. Techniquise in Insect Namatology. Department of Namatology, University of California,Davis California. 100 p.
- Marshall L. 1989. Safety of Microbial Insecticide. CRC Press. Inc., Boca Raton,Florida. 259p.
- Nguyen,K.B. and Smart,G.C. 1992. Life cycle of *Steinernema scapterisci*. Journal of Nematology 1992(24):160-169.
- Poinar, G.O.,J.r. 1990. Texonomy and biology of *Steinernematidae* and *Heterorhaitidae*.In. Gaugler, R. and H.J. Kaya. Entomopathogenic Nematodes in Biological Control. CRCpress,Inc., Boca Raton,Florida. 365 p.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวกตารางที่ 1 ผลการตรวจความแตกต่างทางค่าเฉลี่ยของน้ำหนักต้นมะเขือเทศเมื่อมีการใส่
ไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp. จำนวน 100,000ตัว กับต้นที่ไม่ได้
รับไส้เดือนฝอย *Steinernema thailandense* n. sp.

ต้นที่	กรรมวิธี	
	ใส่ไส้เดือนฝอย	ไม่ใส่ไส้เดือนฝอย
1	2.33	2.82
2	1.39	2.30
3	3.87	1.91
4	2.83	1.95
5	1.46	2.27
ค่าเฉลี่ย	2.36	2.25

ตารางภาคผนวกที่ 2 การวิเคราะห์ผลทางสถิติจากตารางที่ 1

Source	Df	SS	MS	F	F.05	F.01
Treatment	1	0.04	0.04	0.07	5.32	11.26
Ex.Error	8	4.79	0.60			
Total	9	4.83	0.54			

CV = 33.44 %

LSD .05 = 1.127929

LSD .01 = 1.641024

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้