รายงานผลงานเรื่องเต็มการทดลองที่สิ้นสุด

1. ชุดโครงการ **วิจัยและพัฒนาการอารักขาพืช**

2. โครงการวิจัย **วิจัยและพัฒนาการควบคุมศัตรูพืชทางการเกษตรโดยชีววิธี**

กิจกรรม **การผลิตและการใช้เชื้อจุลินทรีย์และไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช**

กิจกรรมย่อย **การผลิตและการใช้ไส้เดือนฝอยควบคุมแมลงศัตรูพืช**

3. ชื่อการทดลอง **เทคนิคการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation**

Maintenance of Entomopathogenic Nematodes Species and Their Symbiotic Bacteria by Cryopreservation Technique

4. คณะผู้ดำเนินงาน

หัวหน้าการทดลอง	**นางสาวพัชรีวรรณ จงจิตเมตต์**	**สังกัด**	**สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช**
ผู้ร่วมงาน	นายสาทิพย์ มาลี	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาววิไลวรรณ เวชยันต์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางสาวสุชลวัจน์ ว่องไวลิขิต	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางเสาวนิตย์ โพธิ์พูนศักดิ์	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช
	นางอัมพร วิโนทัย	สังกัด	สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

5. บทคัดย่อ

การเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง และแบคทีเรียร่วมอาศัยด้วยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation ดำเนินการที่กลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2558 การดำเนินงานสามารถเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิด ได้แก่ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica* และสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด คือแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* จากไส้เดือนฝอย *S. minutum* และแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จากไส้เดือนฝอย *H. indica* บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA เมื่อนำแบคทีเรียแต่ละชนิดทดลองนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth ทำการตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี slide smear ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น การเก็บรักษาแบคทีเรียในสารละลายกลีเซอรีนตามระดับความเข้มข้นต่างๆ พบว่าแบคทีเรียอ่อนแอ และมีสภาพไม่คงที่ จำนวนเซลล์ลดลง ดังนั้นไม่สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสได้ สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด สามารถทำการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยโดยใช้แมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) ได้เป็นปริมาณมาก

The maintenance of the entomopathogenic nematodes and their symbiotic bacteria by Cryopreservation technics were conducted at the Biological Control Research Group, Entomology and Zoological Group, Plant Protection Research and Development Office, during October 2012 - September 2015. Mass rearing of two nematodes species were *Steinernema*

minutum and *Heterorhabditis indica*, including the isolation of symbiotic bacteria of these two nematodes species, are *Xenorhabdus stockiae* isolated from *S. minutum* and *Photorhabdus luminescens* isolated from *H. indica*, they were growing on NBTA selected media, which each bacteria species were reared to multiply in culture medium YS Broth. Checking the purity of both the symbiotic bacteria by slide smear showed no contamination. Keeping bacteria in various concentrations glycerin at lower temperature -20°C was showed weakness and instability bacteria and the number of cell reduced. Thus, it is unsuitable to storage these bacteria at -20°C. For the two nematodes species can be cultured to augmentation by rearing with the insect host (*Galleria mellonella*).

6. คำนำ

เนื่องด้วยประเทศไทยค้นพบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ จากพื้นที่ต่างๆ กัน โดยพบทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่เป็นชนิดใหม่ๆ และที่เป็นชนิดเดียวกันกับที่ได้เคยมีการศึกษามาแล้ว ซึ่งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้งหมดนี้ยังเก็บรักษาในรูปแบบที่สามารถเก็บรักษาได้ในระยะเวลาสั้นเพียง 1-2 เดือน จำเป็นต้องนำออกมาต่อเชื้อขยายพันธุ์อย่างสม่ำเสมอ ดังนั้นการศึกษาวิจัยเพื่อปรับปรุงวิธีการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้เป็นระยะเวลานาน 2-3 ปี โดยไม่จำเป็นต้องเสียเวลาในการต่อเชื้อ อีกทั้งยังไม่เป็นการลดประสิทธิภาพของต้นเชื้อเนื่องจากไม่ต้องผ่านกระบวนการต่อเชื้อหลายๆ ครั้ง

ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยรูปแบบที่เหมาะสมสำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อทั้งไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย และรวมถึงเป็นแหล่งรวบรวมและสถานที่เก็บรักษาชนิดพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ยังคงมีชีวิตชนิดต่างๆ ไว้

ดังนั้นวัตถุประสงค์ในการดำเนินงานเพื่อได้เทคนิคการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย ด้วยวิธีการเก็บแบบ cryopreservation และเพื่อเป็นแหล่งหรือสถานที่เก็บรักษาชนิดพันธุ์ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัย ประหยัดเวลาและแรงงานลดขั้นตอนในการต่อเชื้อเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังสามารถพัฒนาต่อยอดนำเทคนิคนี้ไปใช้กับไส้เดือนฝอยและแบคทีเรียชนิดอื่นๆ ได้ และถ่ายทอดเผยแพร่เทคนิคนี้ให้กับหน่วยงานที่รับผิดชอบงานทางด้านที่เกี่ยวข้องกันนี้

7. วิธีดำเนินการ

- อุปกรณ์

1. ไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica*
2. หนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*
3. อาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA, YS broth, อาหารเทียมเลี้ยงหนอนกินรังผึ้ง
4. สารเคมี glycerin, แอลกอฮอล์
5. อุปกรณ์วิทยาศาสตร์ จานแก้ว, แท่งแก้วสามเหลี่ยม, ออโตไปเปท, eppendopf, ขวดแก้ว

6. วัสดุอื่นๆ สำลี, แท่งเหล็กสำหรับเขี่ยเชื้อ

- วิธีการ

ขั้นตอนที่ 1. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสม ต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงโดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

คัดแยกแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica*

วางแผนการทดลองแบบ CRD 10 ซ้ำ 3 กรรมวิธี

1. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 33%
2. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 50%
3. เก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยโดยใช้ความเข้มข้นกลีเซอรีน 66%

- เลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) นำเก็บที่อุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำหนอนที่ตายมาตัดขา ใช้ loop แตะ haemolymph แล้วขีดลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA ในจานแก้ว นำเก็บที่อุณหภูมิ 28°ซ จากนั้นคัดเลือก 1 โคโลนี ลงเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth ปริมาตร 150 มล. ในขวดแก้วขนาด 500 มล. เขย่าเลี้ยงเชื้อที่ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที อุณหภูมิ 28°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมกลีเซอรีนลงในขวดแบคทีเรียตามปริมาตรในแต่ละกรรมวิธี นำเก็บรักษาตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจและเก็บบันทึกข้อมูลผลการทดสอบ ทุกๆ 1 เดือนวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดแบคทีเรียร่วมอาศัย)

การบันทึกข้อมูล

- นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยวิธีการ spread plate

ขั้นตอนที่ 2. การศึกษาเทคนิคและทดสอบปัจจัยที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง โดยการประยุกต์ใช้วิธีการ Cryopreservation

ทดสอบไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* และ *Heterorhabditis indica* (แยกทดสอบ และวิเคราะห์ผลในแต่ละชนิดไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง) โดยวางแผนการทดลองแบบมี 2 ปัจจัย 4x4 factorial in CRD 3 ซ้ำ 16 กรรมวิธี

ปัจจัยที่ 1 อัตราความหนาแน่นของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่ระดับต่างๆ 4 ระดับ คือ

1. 5,000 ตัว/หลอด
2. 10,000 ตัว/หลอด
3. 50,000 ตัว/หลอด
4. 100,000 ตัว/หลอด

ปัจจัยที่ 2 ความเข้มข้นของสารละลายกลีเซอรีนสำหรับเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 4 ระดับ คือ

1. 10%
2. 14%

3. 18%

4. 22%

เลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงด้วยแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง) เก็บผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงวัย 3 ระยะเข้าทำลายแมลง (Infective Juvenile) หลังออกจากซากแมลงอาศัย 1-3 วัน จากนั้นกรองไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อกำจัดเศษซากหนอนและสิ่งสกปรกออก แล้วนำมาล้างทำความสะอาดด้วย 0.1% ฟอร์มาลีน และ 0.1% ไฮยามีน ในครั้งสุดท้ายเพื่อลดการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น เตรียมไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการทดสอบในแต่ละปัจจัย ในสารละลายกลีเซอรีนที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ตามปัจจัยที่ต้องการทดสอบ จากนั้นนำเก็บที่ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 25°ซ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ 72 ชั่วโมง สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* ก่อนนำมาทดสอบในขั้นตอนต่อไปตามวิธีการ Cryopreservation ตรวจผลการทดสอบโดยสุ่มตัวอย่างทุกเดือน บันทึกข้อมูลผลการทดสอบ วิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลด้วยโปรแกรมทางสถิติ

บันทึกผลการทดลอง

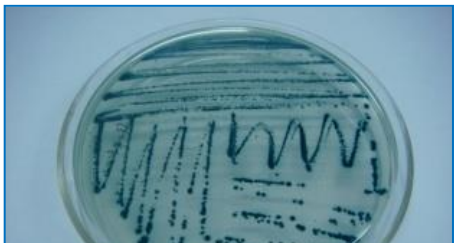
- นับจำนวนและคิดเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง
- ทดสอบประสิทธิภาพการเข้าทำลายแมลงอาศัย (หนอนกินรังผึ้ง)

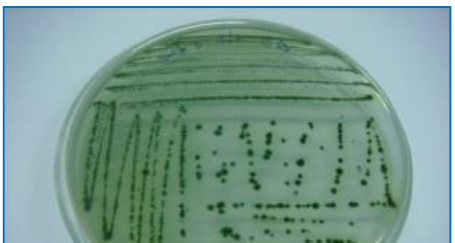
- เวลาและสถานที่

- ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2555 ถึงเดือนกันยายน 2558
- ห้องปฏิบัติการกลุ่มงานวิจัยการปราบศัตรูพืชทางชีวภาพ กลุ่มกีฏและสัตววิทยา สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช

8. ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการดำเนินงานสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง 2 ชนิด คือ *Steinernema minutum* ได้แก่ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* และ *Heterorhabditis indica* ได้แก่ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA โดยโคโลนีของแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* มีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีน้ำเงินเข้มตรงกลาง และขอบโคโลนีไม่เรียบ มีสีอ่อน ซึ่งเป็นบริเวณที่เรียกว่า clear zone สำหรับโคโลนีของแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จะมีลักษณะเป็นโคโลนีเดี่ยว กลม นูน สีเขียวเข้มตรงกลาง และขอบไม่เรียบมีสีอ่อน จากนั้นได้นำแบคทีเรียทั้ง 2 ชนิด ทดลองนำลงเลี้ยงในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย YS Broth (แยกขวด) ทำการตรวจความบริสุทธิ์ของเชื้อโดยวิธี slide smear ปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น สามารถนำเก็บในสารละลายกลีเซอรีนตามระดับความเข้มข้นต่างๆ ได้ แต่เนื่องจากมีอุปสรรคในงานทดลอง เนื่องจากตู้ควบคุมอุณหภูมิ -80°ซ ชำรุด และไม่สามารถจัดหาเครื่องใหม่มาใช้ทดแทนได้ ทำให้ต้องทดลองด้วยตู้ควบคุมอุณหภูมิ -20°ซ แต่ผลการทดลองทั้ง 3 ครั้งพบว่า แบคทีเรียมีสภาพไม่คงที่ ซึ่งก่อนทำการเก็บรักษามีจำนวนเซลล์ตั้งต้น 10^7 เซลล์/มล. หลังการเก็บรักษาจำนวนเซลล์ลดลงเหลือ 10^2 - 10^3 เซลล์/มล. ดังนั้นจึงไม่สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -20°ซ ได้



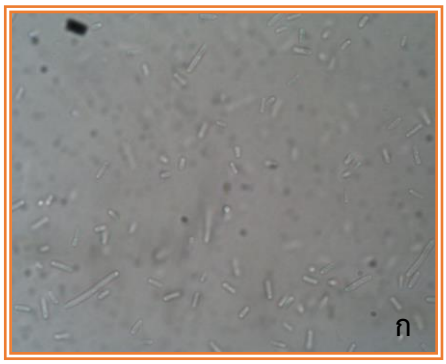


ภาพ ก โคโลนีแบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA

ภาพ ข โคโลนีแบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NBTA

ภาพ ก เครื่องปั่นเหวี่ยงควบคุมอุณหภูมิที่ 28 องศาเซลเซียส ความเร็วรอบ 180 รอบ/นาที

ภาพ ข อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ YS Broth (ซ้าย) และ แบคทีเรียในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ (ขวา)



ภาพ ก เซลล์แบคทีเรียร่วมอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง

ภาพ ข เซลล์แบคทีเรียร่วมอาศัยไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงจากการย้อมแกรม

สำหรับการเพาะเลี้ยงขยายปริมาณไส้เดือนฝอยด้วยหนอนกินรังผึ้ง พบว่าไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดสามารถเพาะเลี้ยงขยายได้เป็นปริมาณมากด้วยหนอนกินรังผึ้ง *Galleria mellonella*

ภาพแสดงลักษณะหนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยทั้ง 2 ชนิดเข้าทำลาย
ภาพ ก หนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* ทำลาย
ภาพ ข หนอนกินรังผึ้งถูกไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Heterorhabditis indica* ทำลาย

สำหรับการเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด พบปัญหาเกี่ยวกับเครื่องมือที่จำเป็นต้องใช้ในการทดลอง และไม่สามารถดำเนินการทดสอบได้อย่างต่อเนื่อง เนื่องจากมีการตัดลดงบประมาณในการดำเนินงาน ทำให้ไม่สามารถดำเนินงานตามที่ได้วางแผนการดำเนินงานไว้ จึงทำได้เพียงการเพาะเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด ให้ได้เป็นปริมาณมากเท่านั้น

โดยทั่วไปแล้วการเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตให้อยู่ได้อย่างมีชีวิตเป็นระยะเวลายาวนานคือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำกว่า –130°ซ (White and Wharton, 1984) และวิธีการ Cryopreservation ซึ่งเป็นกระบวนการที่ใช้ในการเก็บรักษาตัวอย่างของสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องหาวิธีการที่เหมาะสมสำหรับการเตรียมตัวอย่างสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เพื่อการรักษาสภาพเนื้อเยื่อ และองค์ประกอบสำคัญของการมีชีวิต อีกทั้งอุณหภูมิที่คงที่ตลอดเวลาควบคุมการเก็บรักษามีส่วนสำคัญอย่างยิ่ง นอกจากนี้การควบคุมอัตราการละลายขณะนำสิ่งมีชีวิตออกจากการควบคุมอุณหภูมิก็คงความสำคัญเช่นกัน (Triantaphyllou and McCabe, 1989) รายงานของ Popiel and Vasquez (1991) ศึกษาวิธีการ Cryopreservation สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงระยะเข้าทำลายชนิด *Steinernema carpocapsae* และ *Heterorhabditis bacteriophora* ต่อมา Curran *et al* (1992) ทำการศึกษาเพิ่มเติมในกระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยชนิดดังกล่าว

สำหรับในประเทศไทยยังไม่มีรายงานการพัฒนากระบวนการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้ออย่างเฉพาะเจาะจง การเก็บรักษายังคงเก็บรักษาในรูปแบบเดียวกันกับการนำไปใช้ประโยชน์ คือเก็บในรูปของ suspension nematode ในชิ้นฟองน้ำสังเคราะห์ หรือเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ (Short-term) คือ เก็บในขวดพลาสติกเลี้ยงเชื้อ ที่อุณหภูมิ 6-10°ซ ซึ่งระยะเวลาในการเก็บรักษาประมาณ 6-9 เดือน สำหรับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงในสกุล *Steinernema* แต่สำหรับไส้เดือนฝอยในสกุล *Heterorhabditis* ระยะเวลาในการเก็บรักษาจะสั้น

กว่าคือประมาณ 3-4 เดือน (Kaya and Stock, 1997) ในส่วนของแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงนั้น การเก็บรักษาแบบระยะสั้นๆ จะเก็บรักษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA และเก็บที่อุณหภูมิ 12-25°ซ ซึ่งจำเป็นต้องทำการต่อเชื้อแบคทีเรีย ทุกๆ เดือน กรณีเก็บที่ 12°ซ หรือ 2 ครั้งต่อเดือน เมื่อเก็บที่ 25°ซ (Kaya and Stock, 1997) สำหรับการเก็บรักษาแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเป็นระยะเวลานาน จำเป็นต้องเก็บรักษาแบคทีเรียเมื่อแบคทีเรียอยู่ในระยะ Phase I โดยการคัดเลือกโคโลนีและนำลงเลี้ยงขยายปริมาณในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย นอกจากนี้การตรวจนับเซลล์และระยะเวลาที่เหมาะสมก่อนนำเก็บรักษามีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

9. สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

ผลการดำเนินงานสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียร่วมอาศัยของไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิด คือ แบคทีเรีย *Xenorhabdus stockiae* จากไส้เดือนฝอยศัตรูแมลง *Steinernema minutum* และ แบคทีเรีย *Photorhabdus luminescens* จาก *Heterorhabditis indica* ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย NBTA โดยปราศจากการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่น ดังนั้นสามารถนำไปใช้ศึกษาต่อในเรื่องของการเก็บรักษาในอุณหภูมิต่ำ หรืองานทดสอบด้านอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงทั้ง 2 ชนิดนี้ต่อไป

จากปัญหาและอุปสรรคที่เกิดขึ้นในระหว่างการดำเนินงาน จึงไม่สามารถทราบผลการเก็บรักษาแบคทีเรียและไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงได้ ดังนั้นถ้ามีการศึกษาเพิ่มเติมการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อให้มีชีวิตอยู่รอดได้เป็นเวลานาน และมีความแข็งแรงเมื่อนำออกมาใช้ประโยชน์เพื่อให้สามารถคงประสิทธิภาพในการกำจัดแมลงศัตรูพืชได้อย่างสูงสุด โดยที่รูปแบบวิธีการเก็บรักษาไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต้นเชื้อ และไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงที่นำไปใช้ประโยชน์กำจัดแมลงศัตรูพืชจะมีรูปแบบที่แตกต่างกัน คือ การเก็บรักษาต้นเชื้อไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงเพื่อรักษาชนิดพันธุ์ หรือเพื่อนำไปเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงต่อนั้นจำเป็นต้องคำนึงถึงระยะเวลาการมีชีวิตรอด การคงสภาพ และความสามารถในการพัฒนาการเจริญเติบโตได้หลังการเก็บรักษา ส่วนการเก็บรักษาผลผลิตไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงหลังจากผ่านการเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณเพื่อนำไปใช้ประโยชน์ สิ่งที่ต้องคำนึงถึง คือ คุณภาพและประสิทธิภาพสูงสุดเมื่อนำไปใช้กำจัดแมลงศัตรูพืช อายุการเก็บรักษาในวัสดุภัณฑ์ที่เหมาะสม ความสะดวกในการเก็บรักษาและการขนส่ง และต้องง่ายและเหมาะสมเมื่อนำไปใช้ฉีดพ่นในสภาพไร่นา

10. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

ได้ข้อมูลเบื้องต้นวิธีการเพาะเลี้ยงขยายไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและวิธีการคัดแยกแบคทีเรียร่วมอาศัย เพื่อการพัฒนาต่อยอดงานวิจัยด้านไส้เดือนฝอยศัตรูแมลงและแบคทีเรียร่วมอาศัยเพื่องานทดสอบอื่นๆ ต่อไป

เอกสารอ้างอิง

Curran J. and J. Heng. 1992. Comparison of three methodes for estimating the number of entomopathogenic nematodes present in soil samples. *J. Nematol*. 24: 170-176.

Kaya, H.K. and S.P. Stock. 1997. Techniques in insect nematology, pp. 281-324. *In*: *Manual of Techniques in Insect Pathology* L.A. Lacey, (ed). Biological Techniques Series, Academic Press, San Diego.

Popiel I. and E.M. Vasquez. 1991. Cryopreservation of *Steinernema carpocapsae* and *Heterorhabditis bacteriophora*. *J. Nematol*. 23: 432-437.

Triantaphyllou A.C. and E. McCabe. 1989. Efficient preservation of root-knot and cyst nematode in liquid nitrogen. *J. Nematol*. 21: 423-426.

White W. and K.L. Wharton. 1984. Development of a cryogenic preservation system. *Am. Lab*. June: 65-76.