สารบัญเรื่อง

ส่วนประกอบตอนต้น

สารบัญเรื่อง (i)

สารบัญตาราง (iii)

สารบัญภาพ (v)

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (vi)

บทนำรวม (แผนงานวิจัย) (vii)

ส่วนประกอบเนื้อเรื่อง

โครงการย่อยที่ 1 การคัดเลือกแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟาง

Screening for Endospore Forming Bacteria Potentially Increase Straw Mushroom Yield

บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ 1

บทนำ (โครงการย่อย) 3

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 4

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย 10

ผลการวิจัย 24

อภิปรายและวิจารณ์ผล 41

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 41

บรรณานุกรม 44

โครงการย่อยที่ 2 บทบาท ของ *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus subtilis* B2 ต่อการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นและการให้ผลผลิตในแปลงเพาะของเชื้อเห็ดฟาง

Role of *Paenibacillus polymyxa* N10 *and Bacillus subtilis* B2 on agar media pinheads formation and yield of indoor straw mushroom production

บทคัดย่อภาษาไทยและบทคัดย่อภาษาอังกฤษ 47

บทนำ (โครงการย่อย) 47

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 48

ระเบียบวิธีการดำเนินการวิจัย 49

สารบัญเรื่อง(ต่อ)

ผลการวิจัย 50

อภิปรายและวิจารณ์ผล 54

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 55

บรรณานุกรม 56

ส่วนประกอบตอนท้าย

ชื่อหัวหน้าแผนงานและคณะนักวิจัย 57

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
ตารางที่ 1	แสดงเชื้อราก่อโรคในพืชและเห็ดฟางบางชนิด และลักษณะของการก่อโรค	8
ตารางที่ 2	แสดงสาเหตุ การก่อโรค และแหล่งที่มาของเชื้อราทดสอบ	11
ตารางที่ 3	ตารางแสดงสายพันธุ์ของเห็ดฟางทดสอบและแหล่งที่มาของเชื้อเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์	13
ตารางที่ 4	แสดงการทดลองแต่ละครั้งเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเห็ดฟาง	21
ตารางที่ 5ก	แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองเป็นแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 4 ส่วน)	22
ตารางที่ 5ข	แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองเป็นแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 2 ส่วน)	23
ตารางที่ 6	แสดงผลการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ	26
ตารางที่ 7	แสดงผลการยับยั้งเชื้อเห็ดฟางในห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียทดสอบและเชื้อ *B. subtilis* B2	27
ตารางที่ 8	ตารางแสดงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ จำนวน 25 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้	28
ตารางที่ 9	แสดงผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method)	29
ตารางที่ 10	แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ GEN III Microplate	31
ตารางที่ 11	แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดลอง โดยวิธีการ spread plate บนอาหาร nutrient agar	31
ตารางที่ 12	แสดงผลผลิตเห็ดฟางสายพันธุ์อยุธยากับเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำแบคทีเรียไปใช้ช่วยส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟาง	32
ตารางที่ 13	แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง	34
ตารางที่ 14	แสดงผลผลิตเห็ดฟางในการนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบการส่งเสริมผลผลิตแต่ละสายพันธุ์ (แต่ละกรรมวิธีทำการทดลอง 3 ซ้ำ)	35
ตารางที่ 15	แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 1	37

สารบัญตาราง(ต่อ)

ตารางที่		**หน้า**
ตารางที่ 16	ผลผลิตเห็ดฟางจากการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 4 ส่วน)	38
ตารางที่ 17	แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 2	39
ตารางที่ 18	แสดงผลผลิตเห็ดฟางจากการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 2 ส่วน)	40
ตารางที่ 19	สายพันธุ์เห็ดฟางที่รวบรวมเพื่อใช้ในงานวิจัย	50
ตารางที่ 20	ผลการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างตุ่มดอกโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์	52
ตารางที่ 21	แผนการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างตุ่มดอกโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ใช้อาหาร PDA ที่มีการปรับสูตร	52
ตารางที่ 22	การทดสอบการสร้างตุ่มดอกของเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* B2	53
ตารางที่ 23	การทดสอบการสร้างตุ่มดอกของเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10	54

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
ภาพที่ 1	ลักษณะการทดสอบเชื้อด้วยวิธี dual culture	15
ภาพที่ 2	แสดงลักษณะชั้นเพาะเห็ดฟางและวัสดุเพาะในโรงเรือนของเกษตรกร อำเภอภาชี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา	19
ภาพที่ 3	การยับยั้งของเชื้อ *Coprinus* sp. cin-037 ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC02 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่การขีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 10 วัน	25
ภาพที่ 4	การยับยั้งของเชื้อรา *Gliocladium* sp. T2 ของเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC05 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่การขีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 4 วัน	25
ภาพที่ 5	การยับยั้งของเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์อยุธยาของแบคทีเรียไอโซเลต BC05 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่การขีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 6 วัน	25
ภาพที่ 6	การยับยั้งของเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์อยุธยาและ *B. subtilis* B2 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่การขีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 4 วัน	25
ภาพที่ 7	ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลอง กรรมวิธีที่ 2 (NB) และลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลอง กรรมวิธีที่ 3 (supernatant)	32
ภาพที่ 8	ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลอง กรรมวิธีที่ 4 (pellet) และลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลอง กรรมวิธีที่ 5 (suspension)	33
ภาพที่ 9	ลักษณะดอกเห็ดฟางบนชั้นเพาะที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีควบคุม	33
ภาพที่ 10	แสดงลักษณะของเชื้อราแข่งขันที่พบบริเวณชั้นเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนทดสอบ	33

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย

1. BC = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง
2. BF = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมของกองปุ๋ยหมักและการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย
3. MA = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมในโรงเรือนทดลองภาควิชาจุลชีววิทยา
4. MK = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟางในตะกร้าในโรงเรือนทดลองภาควิชาจุลชีววิทยา
5. MT = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมแปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย
6. MTC = เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย
7. CFU/ml = colony forming unit per milliliter
8. NA = อาหาร Nutrient agar
9. NB = อาหาร Nutrient broth
10. ND = No data
11. IF-A = Inoculation Fluid-A
12. PDA = Potato dextrose agar
13. RCBD = Randomized Complete Block Design

บทนำรวม (แผนงานวิจัย)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เห็ดฟางเป็นผลิตผลทางเศรษฐกิจที่มีผลผลิตปีละกว่า 84,000 ตัน หรือประมาณ 70% ของผลผลิตเห็ดทั้งประเทศ คิดเป็นมูลค่า 3,780 ล้านบาท และก่อให้เกิดธุรกิจหมุนเวียนประมาณ 8,400 ล้านบาทต่อปี (นรินทร์และนุภาษ, 2549) วิวัฒนาการการเพาะเห็ดฟางในประเทศไทย เริ่มจากการใช้ตอซังฟางข้าว และวัสดุอื่นๆ เป็นวัสดุเพาะบนพื้นดินกลางแจ้งแบบกองสูง กองเตี้ย และพัฒนาสู่การเพาะในโรงเรือนประมาณปี 2521 ซึ่งการเพาะในโรงเรือนจะให้ผลผลิตสูงกว่าการเพาะแบบดั้งเดิม ในปัจจุบันหน่วยงานของกรมวิชาการเกษตร ได้รวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางเป็นเชื้อพันธุ์บริการ จำหน่ายแก่เกษตรกรผู้เพาะเห็ด หรือเกษตรกรผู้ผลิตเชื้อเห็ดขาย โดยศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์มีวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์เห็ด 2 วิธีหลัก คือ เก็บในน้ำและเก็บในไนโตรเจนเหลว (อัจฉราและคณะ, 2541) ซึ่งการตรวจสอบคุณภาพเส้นใยเห็ดฟางที่ผ่านการเก็บรักษาในห้องปฏิบัติการว่าจะสามารถให้ผลผลิตได้มากน้อยเพียงใดยังไม่มีรายงาน ดังนั้นการเก็บเชื้อเห็ดฟางในแหล่งเก็บโดยเก็บในน้ำหรือแช่ในถังไนโตรเจนเหลวซึ่งเป็นที่นิยมในปัจจุบันอาจทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมบางประการที่มีผลต่อการให้ผลผลิตของเห็ด การตรวจสอบการให้ผลผลิตของเส้นใยเห็ดฟางในปัจจุบันที่หน่วยเก็บเชื้อเห็ดที่กรมวิชาการเกษตรทำได้คือการทดลองเพาะในแปลงเพาะเห็ด ซึ่งมีความสิ้นเปลืองทางเศรษฐกิจ เปลืองพื้นที่ และใช้เวลา จากรายงานการวิจัยของอัจฉราและคณะ (2553) ที่พบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus* sp. B2 สามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟาง (Biological efficiency yield) ได้อย่างมีนัยสำคัญจากการทดลองเพาะในระดับโรงเรือนเป็นเวลานาน 2-3 ปี นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ร่วมกับเชื้อเห็ดฟางบนจานอาหาร PDA เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เชื้อเห็ดฟางมีการสร้างตุ่มดอก (pinheads) เกิดขึ้น ซึ่งการสร้างตุ่มดอกเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ดที่พบได้ทั่วไปในแปลงเพาะ (Chang, S.T and T.H. Quimio,1989) โดยทั่วไปการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางบนอาหารวุ้นจะพบการสร้างตุ่มดอกได้น้อยมากไม่ว่าจะเลี้ยงนานเท่าใดก็ตาม (Payapanon, A., personal communication) เนื่องจากข้อมูลนี้ยังไม่มีผู้รายงานมาก่อนจึงมีสมมุติฐานว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดอาจสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่กระตุ้นการเกิดดอกได้ ดังนั้นถ้านำไปทดสอบกับเชื้อเห็ดฟางชนิดต่างๆ จากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางของกรมวิชาการเกษตรเพื่อตรวจสอบว่าสายพันธุ์ใดสามารถสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบทั้งจำนวนและขนาดของตุ่มดอกตลอดจนเวลาที่ใช้ หากพบว่าแบคทีเรียใดสามารถกระตุ้นให้เห็ดฟางเกิดตุ่มดอกมากหลังจากเลี้ยงร่วมกัน จะได้นำไปทดสอบในโรงเรือนต่อไปว่าสามารถให้ผลผลิตสูงสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งหากเป็นจริงดังคาดก็จะได้วิธีตรวจสอบประสิทธิภาพของเส้นใยเห็ดฟางที่ง่าย รวดเร็วและประหยัด

ในเรื่องการจัดการเพื่อให้ได้ผลผลิตเห็ดสูง ในปัจจุบันเกษตรกรจะเน้นเรื่องประสิทธิภาพของปุ๋ยหมักการอบไอน้ำเพื่อทำลายแมลงหรือไข่แมลง ตลอดจนเชื้อราในวัสดุเพาะเห็ดเพื่อลดปริมาณราแข่งขันที่จะไป

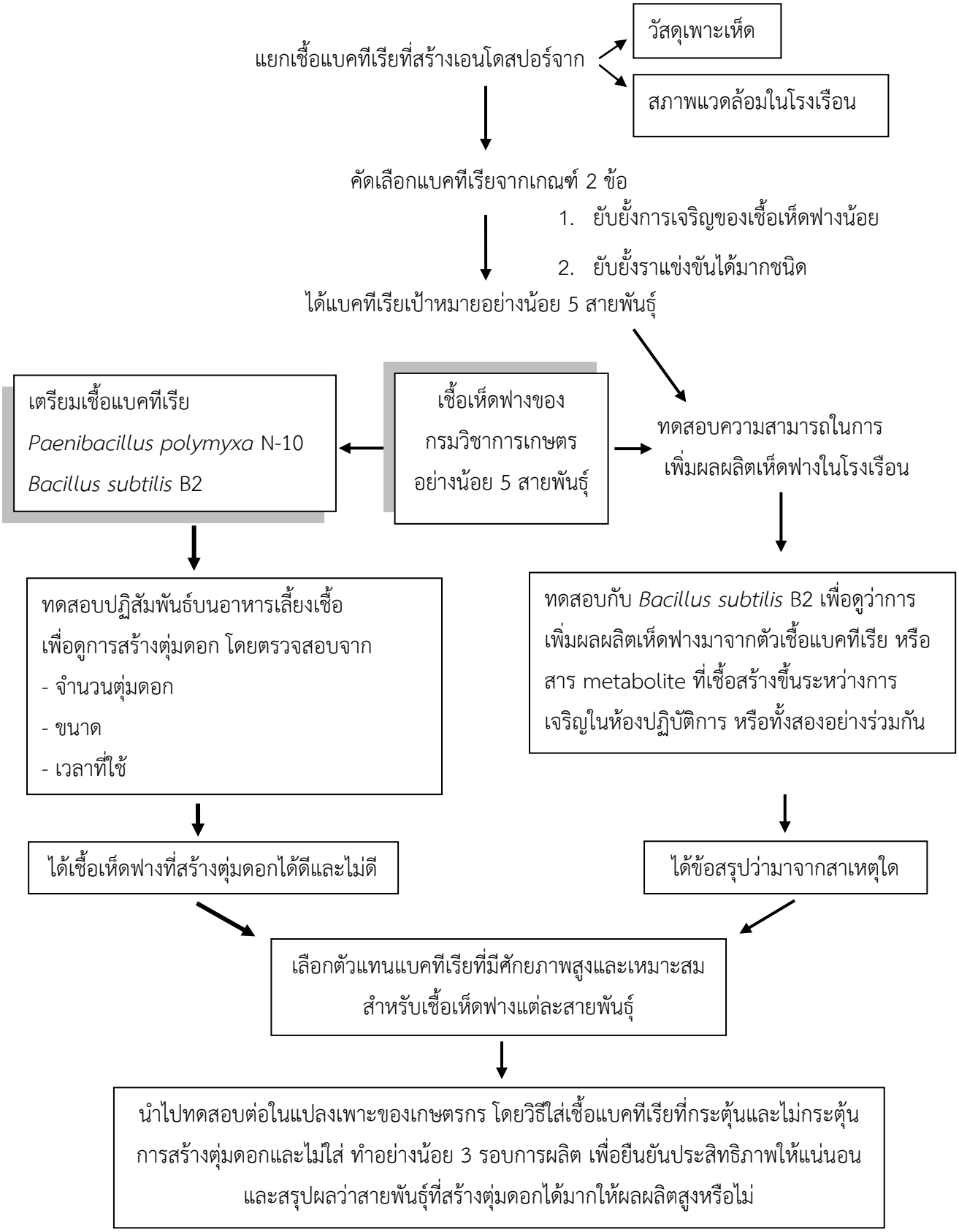
แย่งอาหารเชื้อเห็ดฟาง หรือเพื่อให้วัสดุเพาะเห็ดเอื้อต่อการเจริญของเชื้อเห็ดฟางมากขึ้น แต่หากวัสดุเพาะเห็ดไม่ได้คุณภาพ ผลผลิตก็จะน้อยลง เนื่องจากปริมาณราแข่งขันจะเพิ่มจำนวนมากขึ้น แย่งอาหารเห็ดฟาง ชนิดของราแข่งขันหลักๆ ที่มีรายงานได้แก่ *Coprinus* sp., *Aspergillus fumigatus*, *A. niger, Trichoderma* sp., *Monilia* sp. นอกจากนี้ยังมีโรคราเขียวที่เกิดจากราเขียว ได้แก่ *Trichoderma* และ *Gliocladium* ซึ่งจะมีสีเขียวอ่อนหรือเขียวเข้ม ราเขียว *Penicillium* มีสีเขียวอมเทา ที่เจริญจากขี้ฝ้ายหรือฟางข้าวเจริญแข่งขันกับเชื้อเห็ดฟาง ทำลายดอกเห็ดอ่อนๆ ทำให้ผลผลิตของเห็ดต่ำ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจค้นหาวิธีในการป้องกันกำจัดศัตรูและเชื้อราแข่งขันของเห็ด เพื่อเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางให้มากขึ้น ประกอบกับการนำจุลินทรีย์มาช่วยในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางเพิ่งจะได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้ Payapanon และคณะ (2011) พบว่าการนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* B2 ที่แยกได้จากพื้นที่ใช้เพาะเห็ดฟาง และ *Paenibacillus polymyxa* N10 แยกได้จากเปลือกปอสา (mulberry) มาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะ ในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อพื้นที่ 4 ตารางเมตร พบว่าแบคทีเรียมีผลในการควบคุมเชื้อราแข่งขันและช่วยเพิ่มสารอาหารทำให้ผลผลิตเห็ดฟางเพิ่มขึ้นได้ถึง 5-10% ซึ่งถ้าเกษตรกรสามารถผลิตเห็ดขายได้อย่างน้อยวันละ 30 กิโลกรัม ตามคำแนะนำของกรมวิชาการเกษตร (อัจฉราและคณะ, 2552) เกษตรกรจะสามารถเพิ่มผลผลิตได้ 2-3 กิโลกรัม/วัน ทำให้มีกำไรเพิ่มขึ้น 120-180 บาทต่อวัน (โดยคำนวณจากต้นทุนการผลิตราคากิโลกรัมละ 40 บาท ราคาขายกิโลกรัมละ 60บาท) หรือ 3,600-5,400 บาทต่อเดือน เนื่องจากงานวิจัยดังกล่าวยังไม่ได้ทำการทดสอบว่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตเห็ดฟาง เป็นผลมาจากตัวเชื้อแบคทีเรีย หรือจากสาร metabolite ที่เชื้อสร้างขึ้นระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือด้วยเหตุผลทั้งสองประการ ซึ่งถ้าได้ข้อสรุปที่ชัดเจนจะเป็นประโยชน์ต่อการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์และเผยแพร่ต่อเกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟางทั่วประเทศต่อไป ประกอบกับสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางที่นิยมเพาะในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อแต่ละสายพันธุ์ของเห็ดฟางยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อน แผนงานนี้จึงสนใจศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยยืนยันผลการทดลองที่ผ่านมาให้เป็นที่ยอมรับ และเพื่อค้นหาเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตใหม่ๆ ที่สามารถนำมาใช้เพิ่มผลผลิตเห็ดฟางและนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต้นทุนต่ำ เพื่อเผยแพร่ออกสู่เกษตรกรต่อไป

2. วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

2.1 เพื่อพัฒนาวิธีการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางโดยใช้สายพันธุ์แบคทีเรียสร้างสปอร์และสายพันธุ์เห็ดฟางที่เหมาะสม

2.2 เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางที่สะดวก และประหยัดต้นทุนกว่าวิธีเดิม

3. รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย (1 และ 2)



4. สรุปผลการวิจัย

จากการคัดแยกแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเห็ดฟางและบริเวณที่เพาะเห็ด สามารถคัดแยกแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้จำนวน 25 ไอโซเลต และเมื่อทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟาง ราสาเหตุโรคพืช และเชื้อเห็ดฟาง ในระดับห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต ที่ให้ผลการยับยั้งได้ดีในทุกการทดสอบ ได้แก่ BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, MK07, BF02 และ BF04 ซึ่งเมื่อนำเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 ที่ได้จากงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ซึ่งเป็นเชื้อที่เคยมีรายงานว่าสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางได้มาทดสอบกับเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์ต่างๆ ในระดับห้องปฏิบัติการ ก็พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 ยับยั้งการเจริญของเชื้อเห็ดฟางเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบการสร้างตุ่มดอกของเห็ดฟางเมื่อทำการเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้เห็ดฟาง 5 สายพันธุ์ (ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมนำไปใช้ในการเพาะเห็ด) ผลการทดสอบพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B2 และ *Paenibacillus polymyxa* N10 มีการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 5 สายพันธุ์อย่างเห็นได้ชัดคือ เส้นใยของเห็ดฟางจะเจริญกระจุกอยู่ตรงกลาง ไม่สามารถแผ่กระจายได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนจานควบคุม อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างตุ่มดอกในการทดสอบเบื้องต้นครั้งนี้ ซึ่งไม่สอดคล้องกับที่ Payapanon และ คณะ (2011) ได้รายงานไว้ ซึ่งผู้วิจัยได้ทดลองวางแผนการทดลองโดยควบคุมปัจจัยต่างๆที่อาจเกี่ยวข้อง เช่น ค่า pH ความชื้นของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ เป็นต้น แต่ก็พบว่า ในทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ ไม่พบการสร้างตุ่มดอกเลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จากสายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ทั้งหมด 5 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus subtilis* B2 ไม่สามารถเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA ที่มี pH 6, 6.5, 7 และ 7.5 ตลอดจนอาหาร PDA pH 6 ที่เตรียมจากน้ำประปาก็ตาม นอกจากนี้การลดความชื้นในอาหารโดยเพิ่มปริมาณวุ้นให้เป็น 2% ก็ไม่มีผลต่อการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA เช่นกัน จะเห็นว่าไม่เป็นไปตามสมมติฐานที่ตั้งไว้ อย่างไรก็ตามยังขาดการศึกษาเรื่องอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ในการบ่มเชื้อว่ามีผลต่อการเกิดตุ่มดอกหรือไม่เนื่องจากไม่มี moist chamber ที่ควบคุมอุณหภูมิได้ จึงไม่อาจดำเนินงานในขั้นต่อไปที่วางแผนไว้ จึงขอหยุดการทดลองในส่วนนี้ ส่วนแบคทีเรียที่แยกได้จากการทดลองนี้และให้ผลการทดสอบประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟาง ราสาเหตุโรคพืช ผู้วิจัยได้นำบางไอโซเลตมาจัดจำแนกชนิดโดยการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาของเชื้อ พบว่าสามารถจำแนกชนิดว่าเป็น *Bacillus thuringiensis* 3 ไอโซเลต คือ MA02, MK02 และ MK05 และ 8 ไอโซเลต คือ BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, MK07, BF02 และ BF04 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่ใกล้เคียง *B. subtilis* มากที่สุดแต่ต่างจาก *B. subtilis* ตรงที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ ดังนั้นจึงยัง

ไม่สามารถสรุปได้ว่าแบคทีเรียเหล่านี้เป็นแบคทีเรียชนิดใด จึงควรทำการทดลองเพิ่มเติมในด้านอื่นๆ เพื่อให้สามารถระบุชนิดของแบคทีเรียที่ชัดเจนได้

การศึกษาวิธีการใส่เชื้อแบคทีเรียทำโดยนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B2 มาเพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth อายุ 24 ชั่วโมง และนำมาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนก่อนการใส่เชื้อเห็ดฟาง โดยทดสอบวิธีการใส่เชื้อแบคทีเรียในแบบต่างๆ กัน คือ ใส่เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (suspension), ใส่น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกเก็บแต่ส่วนใส (supernatant) และ ใส่ตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (pellet) ที่ละลายอยู่ในน้ำกลั่นฆ่าเชื้อ โดยมีวิธีการควบคุมคือ การใช้น้ำเปล่า และ อาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth ที่ไม่มีเชื้อแบคทีเรีย ผลการทดลองพบว่าชุดควบคุมที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่า ให้ผลผลิตเฉลี่ยรวมน้อยที่สุดคือ 2.36 กิโลกรัมต่อพื้นที่เพาะ 1 ตารางเมตร รองลงมาคือการฉีดพ่นด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (control) ให้ผลผลิตเฉลี่ยรวม 2.82 กิโลกรัมต่อพื้นที่เพาะ 1 ตารางเมตร การฉีดพ่นด้วยส่วนใสของน้ำเลี้ยงแบคทีเรียที่แยกเซลล์ออก (supernatant) ให้ผลผลิต 3.71 กิโลกรัมต่อพื้นที่เพาะ 1 ตารางเมตร ส่วนตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรีย (pellet) และการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (suspension) ให้ผลผลิตไม่ค่อยแตกต่างกันมากนัก คือ 4.05 และ 4.13 กิโลกรัมต่อพื้นที่เพาะ 1 ตารางเมตร ตามลำดับ ซึ่งนอกจากความแตกต่างของผลผลิตเห็ดฟางที่ได้แล้ว ยังพบว่าระยะเวลาที่ใช้ในการเก็บเกี่ยวผลผลิตในวัสดุเพาะที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่ามีระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตเพียง 8 วัน ซึ่งสั้นกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่สามารถเก็บเกี่ยวผลผลิตได้เป็นเวลา 11-12 วัน และเมื่อเปรียบเทียบเชื้อราแข่งขันที่พบภายในโรงเพาะเห็ดฟาง พบว่าโรงเพาะที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่า (control) จะมีเชื้อราแข่งขันเช่น *Coprinus* sp. และ *Bolbitius fissus* เจริญบนชั้นเพาะมากกว่าโรงเรือนที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียทดสอบ จากผลการทดลองที่ได้ในการทดลองครั้งนี้ สามารถสรุปได้ว่า เชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการสร้างเอนโดสปอร์ คือ *Bacillus subtilis* B2 นั้นสามารถช่วยในการส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟางในโรงเรือนของเกษตรกรได้จริง และให้ผลผลิตที่สูงกว่าการเพาะด้วยวิธีปกติของเกษตรกร อย่างเห็นได้ชัด และในการทดลองวิธีการใส่เชื้อแบบต่างๆ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม พบว่าวิธีที่ให้ผลผลิตสูงมากที่สุด คือ การฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (suspension) และตะกอนเชื้อแบคทีเรีย (pellet) อีกทั้งยังสามารถลดปริมาณเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางให้น้อยลง และช่วยให้ระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิตสามารถเก็บได้นานขึ้น ดังนั้นทางคณะผู้วิจัยจึงเลือกวิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียแบบที่เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (suspension) ในการทดลองขั้นต่อไป เนื่องจากสามารถเตรียมเชื้อทดสอบได้ง่าย สะดวก และประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีการใช้ตะกอนเซลล์ (pellet) ซึ่งให้ผลที่มีค่าใกล้เคียงกัน

การทดลองต่อมาเป็นการทดลองใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ไอโซเลตต่างๆที่แยกได้จำนวน 10 ไอโซเลต โดยการเลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร nutrient broth (สารละลายเชื้อ หรือ suspension)

นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งจะมีปริมาณเซลล์แบคทีเรียประมาณ 10^7- 10^8 cfu/ml ฉีดพ่นลงบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์อยุธยา, Vvol-009, Vvol-019, Vvol-024, Vvol-029, Vvol-045 และ Vvol-071) ปริมาตร 1 ลิตรต่อพื้นที่เพาะเห็ด 4 ตารางเมตร ซึ่งมีน้ำ และ/หรืออาหาร nutrient broth เป็นกรรมวิธีควบคุม โดยทำการทดลองทั้งหมด 4 ครั้ง พบว่าแบคทีเรีย 5 ไอโซเลต คือ BC02, BC03, BC05, BF02 และ BF04 มีแนวโน้มว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมเนื่องจากให้ผลผลิตเห็ดมากกว่า แต่เมื่อวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) เพื่อให้สามารถคำนวณผลได้ถูกต้องตามหลักสถิติ และทำการทดสอบใหม่ทั้งหมด 4 ครั้ง โดยใช้แบคทีเรียทดสอบ 4 ไอโซเลตคือ BC02, BC03, BC05 และ BF02 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เพาะเห็ด 1 ตารางเมตร ทดสอบกับเชื้อเห็ดฟาง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อยุธยาและ Vvol-009 โดยไม่มีการฉีดพ่นใดๆเป็นกรรมวิธีควบคุม พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียให้ผลผลิตของเห็ดฟางไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากกรรมวิธีควบคุม ซึ่งปัจจัยภายนอกเช่นอุณหภูมิ และความชื้น น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง ดังจะเห็นได้จากการที่ผลการทดลองมีความผันแปรค่อนข้างมากในแต่ละการทดสอบ แต่สังเกตพบว่าการปนเปื้อนของราแข่งขันภายในโรงเรือนเพาะเห็ดฟางลดลง ชี้ให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียอาจสามารถช่วยลดปัญหาเชื้อราแข่งขันในโรงเพาะเห็ดฟางได้ จากผลการทดลองที่ได้นี้คณะผู้วิจัยมีความคิดเห็นว่า การที่เราแบ่งย่อยกองปุ๋ยหมักขนาด 4 ตารางเมตรในแต่ละชั้นเพาะออกเป็นขนาด 1 ตารางเมตรเพื่อให้ได้ 4 ส่วนใน 1 ชั้นเพาะ เพื่อให้ทุก treatment อยู่ในชั้นเดียวกันตามหลักการวางแผนการทดลองแบบ RCBD ทำให้ขนาดพื้นที่เล็กลงเหลือเพียง 1 ใน 4 ของขนาดแปลงเดิม อาจมีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดฟาง เนื่องจากเดิมเส้นใยเห็ดฟางจะมีพื้นที่ถึง 4 ตารางเมตร ให้เส้นใยได้เจริญและสร้างเป็นดอกเห็ด แต่เมื่อเราแบ่งย่อยทำให้มีขนาดจำกัดเพียง 1 ตารางเมตร อาจทำให้เส้นใยเห็ดเดินได้ไม่เต็มที่ ซึ่งหมายความว่าการออกแบบในโรงเรือนลักษณะนี้อาจไม่สอดคล้องกับสภาพธรรมชาติของการเจริญของเห็ดฟาง ทำให้ไม่สามารถสร้างดอกเห็ดได้อย่างที่ควรจะเป็น จึงได้ทำการทดสอบโดยการแบ่งพื้นที่ทดลองในแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 2 ส่วนส่วนละ 2 ตารางเมตร ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 500 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เพาะเห็ด 2 ตารางเมตร วางแผนการทดลองแบบ RCBD เช่นเดียวกัน แต่ใช้แบคทีเรียทดสอบ 5 ไอโซเลต คือ BC02, BC03, BC05, BF02 และ *Bacillus subtilis* B2 ทดสอบกับเชื้อเห็ดฟางที่เป็นที่นิยมของเกษตรกรเพียง 1 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อยุธยา โดยไม่มีการฉีดพ่นใดๆ เป็นกรรมวิธีควบคุม ผลพบว่าปัจจัยภายนอกมีผลกระทบต่อการทดลองค่อนข้างมากคือ สามารถเก็บผลผลิตเห็ดได้เพียง 2 ครั้ง จากการทดลอง 3 ครั้ง เนื่องจากการทดลองในครั้งที่ 2 ทำตรงกับช่วงที่มีอากาศหนาวเย็นในเดือนธันวาคม ทำให้ไม่ได้ผลผลิตเห็ดฟางเลย และในการทดลองครั้งที่ 3 พบว่ามีสภาพแห้งแล้งทำให้เกิดการรบกวนจากหนูซึ่งเข้ามาคุ้ยเขี่ยเส้นใยเห็ดในโรงเรือนทำให้ได้ผลผลิตเห็ดน้อยลง แต่โดยสรุปส่วนมากผลผลิตเห็ดฟางที่ได้จากพื้นที่ที่ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียเมื่อเปรียบเทียบกับที่ไม่ได้ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียให้ผลผลิตของเห็ดฟางมากกว่า โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียไอโซเลต BC05 และพบว่าโรงเรือนมี

การปนเปื้อนของเชื้อราแข่งขันน้อยกว่า แต่เมื่อนำผลผลิตที่ได้มาคำนวณทางสถิติโดยใช้ SPSS program version 11.5 ผลการวิเคราะห์ทางสถิติ พบว่าการใช้แบคทีเรียฉีดพ่นในโรงเรือนให้ผลผลิตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) กับกรรมวิธีควบคุม แม้ว่าผลผลิตที่ได้จะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม แต่เกษตรกรผู้เพาะเห็ดมีความพึงพอใจในผลผลิตที่เพิ่มขึ้นกว่าการเพาะแบบปกติที่เคยปฏิบัติโดยไม่ใช้แบคทีเรีย และพบว่ามีเชื้อราแข่งขันในโรงเรือนเพาะเห็ดลดน้อยลง คณะผู้วิจัยมีความเห็นว่าควรทำการทดลองเพิ่มเติม โดยพยายามควบคุมปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง เพื่อให้การทดลองในแต่ละครั้งให้ผลผลิตที่แน่นอนคงที่ โดยทำการทดลองซ้ำๆ เพื่อให้สามารถได้ผลการทดลองที่แน่นอนและมั่นใจได้ว่าผลผลิตเห็ดฟางที่เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียทดสอบจริงๆ เช่น การสร้างโรงเรือนที่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างดอกเห็ด เพื่อให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้ และควรศึกษาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพการเกิดดอกมากน้อยของสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดฟางในห้องปฏิบัติการ เพื่อทดแทนการทดลองในโรงเรือน เช่น ทดสอบการกระตุ้นการเกิดตุ่มดอกโดยการบ่มใน growth chamber ที่สามารถควบคุมความชื้น และอุณหภูมิที่ต่างๆ กันได้ เพื่อเลียนแบบการเกิดตุ่มดอกในสภาพธรรมชาติให้มากที่สุด หรือศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องของสูตรอาหาร เพื่อหา Synthetic media ที่เหมาะสมในการเกิดตุ่มดอกไปพร้อมกัน เมื่อสามารถกระตุ้นให้เห็ดฟางสร้างตุ่มดอกในห้องปฏิบัติการได้จะสามารถพัฒนาไปสู่วิธีการทดสอบคุณภาพสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางที่สะดวก และประหยัดต้นทุนต่อไป และเมื่อได้ผลการทดลองที่คงที่และชัดเจนแล้ว ควรทำการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่ให้ผลการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางดีจนสร้าง endospore แล้วลองเก็บในรูปแบบแห้ง แล้วทดลองให้เกษตรกรนำไปเพิ่มจำนวนในนมถั่วเหลืองที่มีขายตามท้องตลาด แทนการเพิ่มจำนวนในอาหาร nutrient broth ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมที่ยุ่งยากสำหรับเกษตรกร แล้วนำไปฉีดพ่นในโรงเรือนเพาะเห็ดฟาง เพื่อทดสอบว่ายังคงสามารถเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางได้หรือไม่ เพื่อจะได้พัฒนาเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตนั้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และสามารถใช้ได้ง่ายเพื่อแจกจ่ายให้เกษตรกรที่อื่นๆ ได้ทดลองใช้ต่อไป

5. ประโยชน์ที่ได้รับ

จากแนวทางการวิจัยที่ทำในทั้งสองโครงการย่อย ถ้าได้ผลการทดลองที่เป็นไปตามสมมติฐาน จะสามารถช่วยเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางให้แก่เกษตรกรได้ เป็นการเพิ่มรายได้ให้แก่เกษตรกร และสามารถตรวจสอบสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟางอย่างง่ายๆ ได้ว่าจะให้ผลผลิตได้หรือไม่ แต่จากการทดลองที่ได้ดำเนินการไป คณะผู้วิจัยยังไม่สามารถหาวิธีการกระตุ้นการสร้างตุ่มดอกในระดับห้องปฏิบัติการๆได้ ยังคงต้องการการศึกษาทดลองเพิ่มเติม ส่วนการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางในโรงเรือน แม้ว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียจะไม่มีผลต่อการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่ามีการปนเปื้อนของเชื้อราแข่งขันน้อยลง ซึ่งเป็นที่พอใจของเกษตรกรผู้ให้ความช่วยเหลือการทดลองในครั้งนี้

6. หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

คือ เกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟาง และหน่วยงานที่รับผิดชอบนำผลงานไปทำเป็นผลิตภัณฑ์ ผลการวิจัยจากโครงการนี้ ทำให้ได้เชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีความสามารถในการควบคุมราแข่งขันในโรงเพาะเห็ดฟางซึ่งจะทำให้เกษตรกรลดหรือหยุดใช้สารเคมีป้องกันกำจัดราแข่งขัน ลดต้นทุนการผลิต เป็นการช่วยแก้ปัญหาและพัฒนาประเทศตามประเด็นยุทธศาสตร์การพัฒนาประเทศตามแผนพัฒนาเศรษฐกิจและสังคมแห่งชาติ ฉบับที่ 10 (พ.ศ. 2550-2554) และฉบับที่ 11 (พ.ศ. 2555-2559) และสู่การสร้างความร่วมมือทางการวิจัยให้เป็นระบบเครือข่ายระหว่างภาครัฐและเอกชน