

ชื่อโครงการ การคัดเลือกแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่มีศักยภาพในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟาง

Screening for Endospore Forming Bacteria Potentially Increase Straw Mushroom

บทคัดย่อ

จากการทดลองแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์จากสภาพแวดล้อมในการเพาะเห็ดฟางและวัสดุเพาะเห็ดฟาง สามารถแยกแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้ทั้งสิ้น 25 ไอโซเลต เมื่อนำแบคทีเรียที่แยกได้มาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อ ราสาเหตุโรคพืช ราแข่งขันในโรงเพาะเห็ด และเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่ามีเชื้อแบคทีเรียจำนวน 8 ไอโซเลต ที่ให้ผลการยับยั้งได้ดีในทุกการทดสอบ ได้แก่ BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, MK07, BF02 และ BF04 ผลการจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยศึกษาสัณฐานวิทยา คุณสมบัติทางชีวเคมีและ สรีรวิทยาของเชื้อ พบว่าทั้ง 8 ไอโซเลต มีความคล้ายกับ *B. subtilis* มากที่สุด แต่มีคุณสมบัติที่ต่างจาก *B. subtilis* ตรงที่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ ผลการทดลองเพื่อหาสภาวะในการใช้เชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ให้ผลการเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางดีที่สุด พบว่าการใช้แบคทีเรียที่เลี้ยงแบบเขย่าในอาหาร nutrient broth (สารละลายเชื้อ) นาน 24 ชั่วโมง และการใช้ตะกอนเชื้อ ให้ผลผลิตของเห็ดฟางได้ดีกว่าการใช้น้ำใส และกรรมวิธีควบคุม (น้ำและ nutrient broth) จึงเลือกใช้วิธีเตรียมเชื้อในรูปสารละลายเชื้อสำหรับการทดลองครั้งต่อไป ซึ่งจากการทดลองใช้สารละลายเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ไอโซเลตต่างๆ ที่แยกได้จำนวน 10 ไอโซเลต มีปริมาณเซลล์ประมาณ $10^7 - 10^8$ cfu/ml ฉีดพ่นลงบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง 8 สายพันธุ์ (สายพันธุ์อยุธยา, Vvol-009, Vvol-019, Vvol-024, Vvol-029, Vvol-037, Vvol-045 และ Vvol-071) ปริมาตร 1 ลิตรต่อพื้นที่เพาะเห็ด 4 ตารางเมตร ซึ่งมีน้ำ และ/หรืออาหาร nutrient broth เป็นกรรมวิธีควบคุม พบว่า แบคทีเรีย 5 ไอโซเลต คือ BC02, BC03, BC05, BF02 และ BF04 มีแนวโน้มว่าสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม และเมื่อวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยใช้แบคทีเรียทดสอบ 4 ไอโซเลต คือ BC02, BC03, BC05 และ BF02 ปริมาตร 250 มิลลิลิตรต่อพื้นที่เพาะเห็ด 1 ตารางเมตร ทดสอบกับเชื้อเห็ดฟาง 2 สายพันธุ์ คือ สายพันธุ์อยุธยาและ Vvol-009 โดยไม่มีการฉีดพ่นใดๆเป็นกรรมวิธีควบคุม พบว่าการใส่เชื้อแบคทีเรียให้ผลผลิตของเห็ดฟางไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จากกรรมวิธีควบคุม ซึ่งปัจจัยภายนอกอาจมีบทบาทสำคัญต่อการให้ผลผลิตของเห็ดฟางด้วย ดังจะเห็นได้จากการที่ผลการทดลองมีความผันแปรค่อนข้างมากในแต่ละการทดสอบ แต่สังเกตพบว่าการปนเปื้อนของราแข่งขันภายในโรงเรือนเพาะเห็ดฟางลดลง ซึ่งให้เห็นว่าเชื้อแบคทีเรียอาจสามารถช่วยลดปัญหาเชื้อราแข่งขันในโรงเพาะเห็ดฟางได้

Abstract

Twenty-five isolates of the endospore-forming bacteria were isolated from the mushroom farm and mushroom substrate. The isolated bacteria were checked for their antagonistic with plant pathogenic fungi, the competitive fungi in mushroom farm and the straw mushroom cultures using dual culture method. The result shown that eight bacterial isolates; BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, MK07, BF02 and BF04 could inhibited all fungi tested. The isolated bacteria were identified by their morphological, biochemical and physiological properties. The result indicated that the bacterial isolates were closed related to *Bacillus subtilis* but shown urease activity. The next experiments were done in mushroom farm to found out the best condition for bacterial cultures preparation. We found that the bacteria which cultivated in nutrient broth and shaken for 24 hours (suspension) and pellet (in sterile water) could gained highest straw mushrooms yield when compared with another treatments (supernatant and control). Thus, the cells suspension was selected for the next experiments. Ten bacterial isolates were cultivated in nutrient broth and shaken for 24 hours, which gave bacterial cells about 10^7 - 10^8 cfu/ml. One liter of bacterial suspension were sprayed on 4 m^2 of mushroom cultivated areas for each treatment. The experiments were done with 8 mushroom strains; Ayutthaya, Vvol-009, Vvol-019, Vvol-024, Vvol-029, Vvol-037, Vvol-045 and Vvol-071. Water and /or nutrient broth were used as control. The result shown that 5 bacterial isolates (BC02, BC03, BC05, BF02 and BF04) tended to be increased the straw mushroom yield when compared with control. Moreover, the RCBD experiment was done using 4 bacterial isolates ; BC02, BC03, BC05 and BF02 with 2 strains of straw mushroom (Ayutthaya and Vvol-009). Two hundred and fifty milliliters of each bacterial suspension was sprayed on 1 m^2 of mushroom cultivated areas. The results showed no significant difference ($p>0.05$) of the straw mushroom yields between bacterial spraying treatments and control. The environmental factors might be taken an important role to the mushroom production in mushroom farm. Interestingly, we found that the competitive fungi in mushroom farm were decreased which indicated the endospore-forming bacteria might affected to the competitive fungi in mushroom farm.

บทนำ

จากอดีตจนถึงปัจจุบันทั้งนักวิชาการเกษตรและเกษตรกรผู้เพาะเห็ดได้มีความพยายามพัฒนาเทคนิคการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางเพื่อเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับเกษตรกร ซึ่งวิธีการเพาะเห็ดโดยเฉพาะเห็ดฟาง มีผู้คิดค้นดัดแปลงทั้งวัสดุเพาะ หัวเชื้อ สายพันธุ์เห็ด จนปัจจุบันมีวิธีการเพาะที่หลากหลาย แต่การคิดที่จะนำจุลินทรีย์มาช่วยในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางเพิ่งจะได้รับความสนใจเมื่อไม่นานมานี้เอง (Payapanon และคณะ, 2011) นอกจากนี้ปัญหาต่างๆในโรงเรือนเพาะเห็ดได้แก่ ปัญหาจากศัตรูเห็ด เช่น เชื้อราแข่งขันที่เจริญบนวัสดุเพาะยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ด ไร หนอนแมลงต่างๆ เข้าไปทำลายเส้นใยหรือดอกเห็ด ทำให้เกิดการเน่าเสีย ผลผลิตต่ำไม่คุ้มทุน จนบางรายต้องเลิกกิจการไปเพราะประสบปัญหาการขาดทุน บุชบา (2542) กล่าวว่า เชื้อราที่เป็นสาเหตุของโรคเห็ดเช่น *Sclerotium rolfii* ก่อโรคราเม็ดผักกาด ทำให้เห็ดไม่เป็นดอกหรือดอกนึ่มกว่าปกติ นอกจากนี้ยังมีโรคราเขียวที่เกิดจากราเขียว ได้แก่ *Trichoderma* และ *Gliocladium* ซึ่งจะมีสีเขียวอ่อนหรือเขียวเข้ม ราเขียว *Penicillium* มีสีเขียวอมเทา ที่เจริญจากขี้ฟ้ายหรือฟางข้าว เจริญแข่งขันกับเชื้อเห็ดฟาง ทำลายดอกเห็ดอ่อนๆ ทำให้ผลผลิตของเห็ดต่ำ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจค้นหาวิธีในการป้องกันกำจัดศัตรูของเห็ด เพื่อเพิ่มผลผลิตเห็ดให้มากขึ้น

มีรายงานจาก Payapanon และคณะ (2011) พบว่าการนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* B2 ที่แยกได้จากพื้นที่ที่ใช้เพาะเห็ดฟาง และ *Paenibacillus polymyxa* N10 แยกได้จากเปลือกปอสา (mulberry) มาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะ ในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อพื้นที่ 4 ตารางเมตร พบว่าแบคทีเรียมีผลในการควบคุมเชื้อราแข่งขันและช่วยเพิ่มสารอาหารทำให้ผลผลิตเห็ดฟางเพิ่มขึ้นได้ อย่างไรก็ตาม งานวิจัยดังกล่าวยังไม่ชัดเจนว่าการเพิ่มขึ้นของผลผลิตเห็ดฟาง เป็นผลมาจากตัวเชื้อแบคทีเรีย หรือจากสาร metabolite ที่เชื้อสร้างขึ้นระหว่างการเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ หรือด้วยเหตุผลทั้งสองประการ ซึ่งถ้าได้ข้อสรุปที่ชัดเจนจะเป็นประโยชน์อย่างมากต่อการทดลองขั้นต่อไป ในการเพาะระดับโรงเพาะเห็ดของเกษตรกร ก่อนการพัฒนาไปเป็นผลิตภัณฑ์และเผยแพร่ต่อเกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟางทั่วประเทศต่อไป ประกอบกับสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางที่นิยมเพาะในประเทศไทยมีหลายสายพันธุ์ การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียชนิดใหม่ๆ ที่มีคุณสมบัติเหมาะสมต่อแต่ละสายพันธุ์ของเห็ดฟางยังไม่เคยมีผู้ทำการศึกษามาก่อน คณะผู้วิจัยจึงเห็นว่าน่าจะมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อช่วยยืนยันผลการทดลองที่ผ่านมาให้เป็นที่ยอมรับ และเพื่อค้นหาเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์ใหม่ๆ ที่สามารถนำมาใช้เพิ่มผลผลิตเห็ดฟางและนำมาทำเป็นผลิตภัณฑ์ต้นทุนต่ำ เพื่อเผยแพร่ออกสู่เกษตรกรต่อไป

การพบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ลักษณะทั่วไปของเห็ดฟาง (ประสาน, 2549)

เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) มีการเจริญ 2 ระยะ คือ ระยะเป็นเส้นใย และระยะที่เป็นดอกเห็ดเส้นใย มีสีนวลขาว เมื่อเส้นใยรวมตัวกันเป็นก้อนจะกลายเป็นตุ่มนูน ค่อยๆเจริญเติบโตขึ้น มีลักษณะเป็นรูปไข่ที่มีเยื่อหุ้มดอก เห็ดจะมีลักษณะคล้ายกระดิ่ง ต่อมาจะค่อยๆบานออก หมวกเห็ดเจริญเต็มที่ที่จะคล้ายร่ม เมื่อแก่จัดจะมีสีเทาในระยะแรกครีบหมวกจะเป็นสีขาว ต่อมาจะเปลี่ยนเป็นสีชมพูสด และเป็นสีน้ำตาล

คุณค่าทางอาหาร

เห็ดฟางเป็นเห็ดที่มีเนื้อหนานุ่ม รสชาติอร่อย มีกลิ่นหอม มีกรดอะมิโน โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรตและวิตามินหลายชนิด ในเห็ดฟางสดมีน้ำ 92.39 % โปรตีน 2.68% ไขมัน 2.24 % น้ำตาล 2.6 % และเห็ดฟางทุกๆ 100 กรัม จะมีวิตามินบี 206.27 มิลลิกรัม

ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดฟาง

ถึงแม้ว่าจะมีสายพันธุ์ที่ดี และวัสดุอุปกรณ์ที่ดี ก็อาจทำให้การเพาะเห็ดฟางไม่ประสบความสำเร็จ หรือได้ผลผลิตต่ำ ถ้าไม่มีการควบคุม หรือจัดสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยและการเกิดดอก ซึ่งเห็ดฟางเป็นเห็ดชนิดหนึ่งที่อ่อนไหว (sensitive) ได้ง่ายต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อม ดังนั้นผู้เพาะเห็ดฟางจึงต้องศึกษาเรียนรู้ถึงสภาพการเจริญเติบโต และความต้องการของเห็ดฟาง เพื่อปรับสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมดังต่อไปนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

ควรปรับสภาพวัสดุเพาะให้มีสภาพเป็นกลาง หรือเป็นกรดอ่อนๆ จึงจะเหมาะต่อการเจริญเติบโตของเส้นใย และการเกิดดอก ช่วง pH ที่เหมาะสม คือ 6.5-7.0 ดังนั้นน้ำที่ใช้ในการหมักฟาง และวัสดุเพื่อผลิตเชื้อเห็ดฟางจะต้องมีสภาพเป็นกลาง น้ำที่ใช้จะต้องสะอาด ไม่มีโคลนตม ไม่มีตะกอน ของหินปูนและโลหะหนักต่างๆสะสมอยู่

2. อุณหภูมิ (Temperature)

เห็ดฟางเป็นเห็ดในเขตร้อนชื้น ดังนั้นอุณหภูมิที่เหมาะสมกับการเจริญของเห็ดฟางจึงค่อนข้างสูง อุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการงอกของสปอร์ประมาณ 40 องศาเซลเซียส และอุณหภูมิ 30-35 องศาเซลเซียสจะเหมาะต่อการเกิดดอก ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 20 องศาเซลเซียส เห็ดฟางจะไม่เกิดดอก ดังนั้นการเพาะเห็ดฟางในฤดูหนาว จึงให้ผลผลิตค่อนข้างต่ำ จึงเป็นต้องมีการคลุมพลาสติก เพื่อให้อุณหภูมิภายในกองสูงขึ้น หรือเพิ่มไอร้อนสำหรับการเพาะเห็ดฟางในโรงเรือน

3. ความชื้น (Moisture)

การเพาะเห็ดฟางจำเป็นต้องให้มีความชื้นสูง ประมาณร้อยละ 60-65 วัสดุเพาะจึงต้องใช้ประเภทที่ดูดความชื้นไว้ได้ การใช้พลาสติกคลุมกอง เพื่อควบคุมความชื้น ลดการสูญเสียน้ำไปจากกองเพาะเห็ด จึงนำมาใช้ในการเพาะเห็ดฟางแบบกองเตี้ยที่เพาะกลางแจ้ง แต่ถ้ามีฝนตกก็จำเป็นต้องทำหลังคาคลุม และทางระบายน้ำ เพื่อป้องกันไม่ให้น้ำขัง มิฉะนั้น เส้นใยเห็ดก็จะเน่าเสีย และไม่เกิดดอกเช่นกัน

4. แสงสว่าง (Light)

เห็ดฟางไม่ต้องการแสงสว่าง เพราะไม่มีสารคลอโรฟิลล์ (chlorophyll) แต่แสงก็มีส่วนช่วยในการสร้างดอก (fruit body) โดยเฉพาะแสงสีน้ำเงิน ดังนั้นในโรงเรือนเพาะเห็ดฟางแบบอุตสาหกรรม หรือในโรงเรือน จึงให้แสงสว่างสีน้ำเงิน หรือใช้ผ้าพลาสติกสีน้ำเงิน ให้แสงส่องผ่าน ปกติดอกเห็ดที่ถูกแสงแดดทำให้ดอกเห็ดมีสีคล้ำ หมวกดอกมีสีดำและบานเร็ว

วิธีการเพาะเห็ดฟาง

วิธีการเพาะเห็ดฟางทำได้หลายวิธีดังนี้ คือ การเพาะเห็ดฟางแบบกองสูง การเพาะเห็ดฟางแบบกองเตี้ย การเพาะเห็ดฟางแบบอุตสาหกรรม หรือแบบโรงเรือน การเพาะเห็ดฟางในตะกร้า การเพาะเห็ดฟางในกล่อง

1. การเพาะเห็ดฟางแบบกองสูง การเพาะเห็ดฟางแบบกองสูง เป็นวิธีการเพาะเห็ดฟางแบบดั้งเดิม ซึ่งปัจจุบันไม่ค่อยนิยมเพราะเปลืองฟางซึ่งเป็นวัสดุเพาะที่สำคัญ และใช้แรงงานมาก เห็ดฟางจะทยอยให้ผลผลิต ทำให้เสียเวลาในการดูแล ผลผลิตที่ได้จึงไม่ค่อยสม่ำเสมอเหมือนการเพาะแบบอื่น

2. การเพาะเห็ดฟางแบบอุตสาหกรรมหรือแบบในโรงเรือน เป็นวิธีการเพาะที่นิยมของเกษตรกร ได้ผลผลิตที่ดีกว่า และแน่นอนกว่าแบบกลางแจ้ง แต่ต้องลงทุนสูงกว่า โดยเฉพาะโรงเรือน และต้องเข้าใจธรรมชาติ และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเห็ดฟางต้องมีเครื่องกำเนิดไอน้ำ มีชั้นวางวัสดุเพาะในโรงเรือน ที่ควบคุมความชื้น และอุณหภูมิได้ มีอ่างสำหรับหมักวัสดุเพาะ แต่ก็ให้ผลผลิตที่คุ้มค่ากับการลงทุน

3. การเพาะเห็ดฟางในตะกร้า เป็นรูปแบบการเพาะเห็ดฟางอีกแบบหนึ่งที่ทำได้ง่าย ใช้พื้นที่น้อยขั้นตอนไม่ยุ่งยาก ต้นทุนน้อย สามารถเพาะฟองบริเวณในครัวเรือนได้ ดอกเห็ดสามารถทยอยออกได้เรื่อยๆ เป็นการลดรายจ่ายด้านอาหารในครัวเรือน และสามารถทำเป็นกิจกรรมเสริมเพื่อพักผ่อนหย่อนใจได้ด้วย วัสดุที่ใช้เพาะสามารถใช้วัสดุเศษเหลือในไร่นาได้ เช่นเดียวกับการเพาะเห็ดฟางแบบอื่นๆ และยัง สามารถนำก้อนเชื้อเห็ดถุงที่เก็บดอกหมดแล้วทิ้งเห็ดขนขาว เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม มาเป็นวัสดุเพาะได้อีกด้วย

ปัญหาอุปสรรคของการเพาะเห็ดฟาง

1. การหมักวัสดุเพาะแล้วอุณหภูมิในกองปุ๋ยไม่สูงเท่าที่ควร มักพบเสมอถ้าวัสดุเพาะเก่าหรือมีการเก็บรักษาไม่ดีทำให้อาหารเหลือน้อย จึงทำให้เกิดกิจกรรมการหมักของจุลินทรีย์น้อย มีผลทำให้อุณหภูมิในกองปุ๋ยไม่สูงเท่าที่ควร เกษตรกรจึงควรเลือกวัสดุเพาะใหม่ๆ มีธาตุอาหารสำหรับจุลินทรีย์มาก

2. อบไอน้ำในโรงเรือนไม่ได้รับระดับอุณหภูมิที่ต้องการ อาจเนื่องมาจากอุปกรณ์กำเนิดไอน้ำไม่สามารถให้ไอน้ำได้เพียงพอกับที่ต้องการ คือ 60–72 องศาเซลเซียส นานต่อเนื่องอย่างน้อย 3–6 ชั่วโมง

3. โรยเชื้อแล้วเส้นใยไม่เดินหรือเดินไม่ดีเท่าที่ควร เนื่องจากเชื้อเห็ดฟางคุณภาพไม่ดี เกษตรกรจึงควรเลือกซื้อจากแหล่งที่เชื่อถือได้ และอายุของเชื้อพอเหมาะไม่แก่จนเกินไป

4. หลังจากตัดเส้นใยแล้ว 2–3 วันเส้นใยไม่รวมตัวกันเป็นดอก อาจมีสาเหตุมาจากห้องปิดมิดไม่ได้รับแสงเพื่อกระตุ้นการสร้างดอก ถ้าตำแหน่งโรงเรือนทำให้ได้รับแสงไม่พออาจติดตั้งหลอดไฟฟ้าเพิ่มให้

5. การเกิดราเขียวขึ้นบนชั้นเพาะ มักมีสาเหตุมาจากการอบไอน้ำอุณหภูมิไม่สูงถึง 60–72 องศาเซลเซียส และนานอย่างน้อย 3-6 ชั่วโมง ทำให้เกิดราเขียวเข้ารบกวน

6. การเกิดเห็ดถั่วหรือเห็ดขยาขึ้นบนชั้นเพาะ มักเกิดกับปุ๋ยหมักที่มีแอมโมเนีย หรือใส่ยูเรียมากเกินไป หรือควรหลีกเลี่ยงการใช้ยูเรียโดยการใช้สูตร 15-15-15 แทน

7. การเกิดราอ่อนเป็นวงสีขาวขึ้นบนชั้นเพาะ มักมีสาเหตุมาจากการอบไอน้ำไม่ได้ตามกำหนด และอีกสาเหตุหนึ่งคือเชื้อเห็ดฟางไม่แข็งแรง ทำให้ราอ่อนเจริญขึ้นคลุมวัสดุเพาะ ซึ่งอาจแก้ปัญหาโดยการโรยปูนขาว บริเวณที่มีราอ่อนในระยะเริ่มแรก

8. ดอกเห็ดที่มีขนาดเล็กและบานเร็ว ผลผลิตน้อยมีสาเหตุ คือ สาเหตุแรก เชื้อเห็ดฟางไม่แข็งแรง เนื่องจากการต่อเชื้อหลายครั้ง อีกประการหนึ่งคือวัสดุเพาะมีอาหารอยู่น้อย หรือวัสดุเก่าเก็บรักษาไม่ดี

9. ดอกเห็ดมีลักษณะคล้ายหนังคางคก เนื่องจากอากาศร้อนเกินไป ควรมีการเปิดช่องระบายอากาศ และรดน้ำบริเวณพื้นและผนังโรงเรือนรักษาอุณหภูมิให้อยู่ที่ 28–32 องศาเซลเซียส

10. โรคศัตรูเห็ดเข้าทำลาย มักเกิดจากเชื้อเห็ดฟางไม่บริสุทธิ์ มีไรหรือไข่ไรปะปนมา

วิธีการแก้ไขและควบคุมศัตรูของเห็ดฟาง

1. การใช้สารเคมีควบคุมศัตรูเห็ด เกษตรกรจะให้สารเคมีที่มีขายตามท้องตลาด นำมาช่วยในการกำจัดไร ศัตรูเห็ดและควบคุมเชื้อราแข่งขันในการเพาะเห็ดฟาง อย่างไรก็ตามวิธีนี้ แม้ว่าจะได้ผลดี แต่สารเคมีจะส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและเป็นอันตรายต่อผู้ใช้อย่างยิ่ง

2. การควบคุมโดยชีววิธี ในปัจจุบันมีเกษตรกรผู้เพาะเห็ดฟางหลายคน เริ่มหันมาให้ความสนใจในการเลือกใช้เชื้อจุลินทรีย์แทนการใช้สารเคมีในการควบคุมเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางกันมากขึ้น เพราะนอกจากจะไม่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมแล้ว ยังเป็นการช่วยลดการใช้สารเคมีในการเกษตรให้น้อยลง รวมทั้งไม่เป็นอันตรายต่อเกษตรกรผู้นำไปใช้

จุลินทรีย์บีเอสพลายแก้ว ปราบเชื้อราศัตรูตัวสำคัญของเกษตรกรผู้เพาะเห็ด (มนตรี, 2553)

การเพาะเห็ดในปัจจุบันกำลังเป็นที่นิยมอย่างมาก เนื่องจากคนกำลังหันมาให้ความสนใจทำการเกษตรพอเพียง เกษตรอินทรีย์หรือเกษตรปลอดสารพิษ ซึ่งถือเป็นจุดเริ่มต้นที่ดี สะดวก ง่าย ประหยัดไม่ต้องลงทุนสูง แต่อย่างไรก็ตามในการเพาะเห็ดในปัจจุบันยังคงพบปัญหาอยู่บ่อยๆคือ ปัญหาเรื่องเชื้อรา ที่สะสมเพิ่มจำนวนมากขึ้นที่ละน้อยสอดคล้องสัมพันธ์ไปกับแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ไปพร้อมกัน โดยเฉพาะปัญหาที่เกิดจากเชื้อราที่เข้ามาทำลายดอกเห็ด ดังต่อไปนี้

1. เชื้อรา *Aspergillus* sp. ลักษณะที่พบทั่วไปของถุงเห็ด คือ บางส่วนของถุงเห็ดมีสีเขียวเข้มเกือบดำ อาจเกิดที่ส่วนบนใกล้ปากถุงแล้วลามลงไปข้างล่างหรือเกิดจากด้านล่างขึ้นไปถึงได้ บางส่วนของถุงเห็ดมีสีน้ำตาลเกิดขึ้น ติดกับบริเวณที่มีสีเขียวเข้ม

2. เชื้อราดำ *Botryodiplodia* sp. พบว่าเชื้อราในถุงเห็ดมีสีน้ำตาลเข้มเกือบดำ ซึ่งในระยะแรกเชื้อราจะมีสีขาว ต่อมาเจริญขยายกว้างขึ้นเรื่อยๆ เมื่อทิ้งไว้นานๆ จะเกิดก้อนเล็กๆ สีดำ ที่เป็นส่วนขยายพันธุ์ของเชื้อรานูนออกมาที่ผิวของถุงพลาสติก

3. เชื้อราเขียว *Trichoderma* sp. และ *Gliocladium* sp. ลักษณะการปนเปื้อนจะสังเกตเห็นได้ง่ายเนื่องจากสปอร์ของเชื้อราสีเขียวอ่อนใส เมื่อเกิดรวมกันหนาแน่นจะเห็นเป็นหย่อมสีเขียวมะกอกหรือสีเขียวเข้มในถุงเห็ด นอกจากนี้ยังมีราเขียว *Penicillium* sp. และ *Paecilomyces* sp. ซึ่งเชื้อราทั้ง 2 ชนิดนี้มีลักษณะรูปร่างทางสัณฐานวิทยาคล้ายคลึงกันมาก มีการเจริญเติบโตที่รวดเร็วสามารถสร้างสปอร์ได้เป็นจำนวนมาก เชื้อรา *Penicillium* sp. เป็นราที่ชอบอุณหภูมิปานกลาง ลักษณะบนถุงเห็ดจะเห็นเป็นหย่อมสีเขียวตองอ่อน สีเหลืองอ่อนอมเขียว หรือสีเทาอ่อนมองดูคล้ายฝุ่นเกาะสกปรก มักเกิดบริเวณด้านล่างของถุงเห็ด ส่วนเชื้อรา *Paecilomyces* sp. เป็นราชอบร้อน สามารถทนต่ออุณหภูมิสูงได้ มักจะเกิดกับถุงเห็ดหอม ลักษณะที่ปรากฏ คือ มองเห็นเป็นฝุ่นสีขาวซีด เช่น สีน้ำตาลซีดๆ ปนเหลืองอ่อน หรือสีเหลืองซีดจางๆ สังเกตเห็นเส้นแบ่งเขตการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดและเชื้อราได้อย่างชัดเจน

5. ราสีส้มหรือราร้อน *Neurospora* sp. มักเกิดเป็นกระจุกบริเวณปากถุงมีลักษณะเป็นผงสีชมพูอมส้ม

6. ราเมือก (Slime mould) จะเกิดกับถุงเห็ดที่เปิดถุงเก็บดอกไปแล้วหลายรุ่นและเป็นถุงที่อยู่ด้านล่างสุด จะสังเกตเห็นเส้นใยสีเหลืองซีดเจอบริเวณด้านข้างถุงและบริเวณปากถุง โดยมากมักจะเกิดกับถุงเห็ดหนูที่มีการกรีดถุงด้านข้างและรดน้ำนานๆ จนทำให้ถุงขึ้นฉะ นอกจากนี้ยังเกิดได้กับถุงเห็ดที่หมดรุ่นแล้วแต่ยังไม่มีกรณย้ายทำความสะอาดโรงเรือน

โรคของเห็ดถุงที่เกิดจากเชื้อราโดยทั่วไปเกิดได้ทั้งเชื้อราปนเปื้อน หรือเชื้อราแข่งขัน และเชื้อราโรคเห็ด ซึ่งเชื้อราปนเปื้อนส่วนใหญ่เป็นพวกที่มีเส้นใยเจริญเร็วมาก ทำให้เส้นใยเห็ดชะงักการเจริญเติบโต สังเกตเห็นเส้นแบ่งเขตที่เส้นใยเห็ดมาบรรจบกันเส้นใยของเชื้อราปนเปื้อน การเกิดเชื้อราปนเปื้อนในถุงเพาะเห็ดมักเป็นสาเหตุให้ผลผลิตเห็ดลดลง ถ้ามีเชื้อราเหล่านี้เกิดบริเวณปากถุงก็จะเป็นเหตุให้เกิดการระบาดไปทั่วทั้งโรงเพาะเห็ด ผลผลิตลดลงได้

สาเหตุของการเกิดเชื้อราปนเปื้อนมีหลายประการ เช่น การทิ้งถุงก้อนเชื้อเห็ดที่เก็บดอกแล้วในบริเวณฟาร์ม ทำให้เชื้อรากระจายอยู่ในบริเวณนั้น เมื่อมีฝนตก ลมพัด หรือตกลงไปในน้ำที่ไช้รดเห็ด นอกจากนี้ยังมีสาเหตุอื่นๆ อีกเช่น หัวเชื้อไม่บริสุทธิ์ การนึ่งฆ่าเชื้อถุงเห็ดที่ทำลายเชื้อไม่หมด ถุงแตกหรือถูกแมลงทำลาย เป็นต้น

ปัญหาสาเหตุเหล่านี้ในปัจจุบันมีจุลินทรีย์ ปิเอสฟลายแคว์ ที่พัฒนาโดยท่านอาจารย์ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ อดีตนายกสมาคมผู้เพาะเห็ดแห่งประเทศไทย อดีตข้าราชการบำนาญประจำภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ โดยผู้ที่ค้นพบคือคุณพลายแก้ว เพชรบ่อแก้ว ซึ่งเป็นนิสิตคณะประมงในขณะนั้นได้พบโดยบังเอิญจากกึ่งแห่งในขณะที่ได้ทำปัญหาพิเศษโดยอาจารย์ดีพร้อมเป็นที่ปรึกษา จุลินทรีย์ปิเอสฟลายแคว์เป็นแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งทำลายเชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพโดยที่เห็ดซึ่งก็เป็นเชื้อราเหมือนกันไม่ตายตามไปด้วย เนื่องจากว่าเห็ดนั้นเป็นเชื้อราที่จัดว่าเป็นสายพันธุ์สูงกว่า เกษตรกรผู้เพาะเห็ดมือใหม่จึงให้ความสนใจ

จุลินทรีย์นี้เป็นอย่างมากในการนำมาใช้เพื่อแก้ไขปัญหาการเพาะเห็ดแทนสารเคมี หรือยาฆ่าเชื้อรา ซึ่งมีอันตรายต่อสิ่งแวดล้อมตลอดจนเกษตรกรผู้เพาะเห็ดด้วย

นอกจากนี้ยังพบเชื้อราก่อโรคพืชและเห็ดบางชนิด รวมทั้งเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟาง ที่ทำให้เห็ดฟางเกิดโรคเน่าเสีย และเจริญเติบโตไม่ดี ทำให้ผลผลิตของเห็ดฟางน้อยลง (ดังแสดงในตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 แสดงเชื้อราก่อโรคในพืชและเห็ดฟางบางชนิด และลักษณะของการก่อโรค

ลำดับ	ชื่อเชื้อรา	สาเหตุและการก่อโรค
1	<i>Alternaria brassicola</i>	เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในพืช
2	<i>Aspergillus niger</i>	เชื้อราสาเหตุโรคโคนเน่า และ เชื้อราแข่งขันของเห็ด
3	<i>Bolbitius fissus</i>	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
4	<i>Coprinus</i> sp.	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
5	<i>Coprinus</i> sp. cin-003	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
6	<i>Coprinus</i> sp. cin-004	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
7	<i>Coprinus</i> sp. cin-006	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
8	<i>Coprinus</i> sp. cin-009	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
9	<i>Coprinus</i> sp. cin-011	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
10	<i>Coprinus</i> sp. cin-016	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
11	<i>Coprinus</i> sp. cin-026	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
12	<i>Coprinus</i> sp. cin-031	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
13	<i>Coprinus</i> sp. cin-037	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
14	<i>Coprinus</i> sp. cin-057	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
15	<i>Curvularia lunata</i> TISTR 3282	เชื้อราสาเหตุโรคใบจุดในพืช

ตารางที่ 1(ต่อ)

ลำดับ	ชื่อเชื้อรา	สาเหตุและการก่อโรค
16	<i>Gliocladium</i> sp. T2	เชื้อราแข่งขันของเห็ด
17	<i>Monilia</i> sp.	เชื้อราสาเหตุโรคสมอเน่าในฝ้าย และเชื้อราแข่งขันของเห็ด
18	<i>Fusarium</i> sp.	เชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	เชื้อราสาเหตุโรคต้นเหี่ยวในมะเขือเทศ
20	<i>Rhizoctonia solani</i>	เชื้อราสาเหตุโรคกาบใบแห้งในข้าว
21	<i>Pythium</i> sp.	เชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน
22	<i>Sclerotium rolfsii</i>	เชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน และเชื้อราแข่งขันของเห็ด
23	<i>Trichoderma harzianum</i>	เชื้อราสาเหตุโรคพืชในดิน และเชื้อราแข่งขันของเห็ด

มีรายงานว่า Ferreira และคณะ (1991) สามารถนำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* มาใช้ในการควบคุมเชื้อราก่อโรคพืชได้ Nalisha และคณะ (2006) ได้ศึกษาการนำเชื้อ *Bacillus subtilis* มาใช้ควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* โดยศึกษาด้วยสภาวะต่างๆคือ แสง pH และอุณหภูมิ พบว่าเชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถสร้างสารมาควบคุมเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้อย่างคงที่คือ 58.3 % ที่อุณหภูมิ 80 °C pH ที่ให้ผลดีที่สุดคือ pH 11 ยับยั้งได้ 31.57 % และสภาวะที่อยู่ในที่มีดจะสามารสร้างสารมาควบคุมเชื้อราได้ดีคือ 46.24 % และจากรายงานของ Payapanon และคณะ (2011) พบว่าการนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* B2 ที่แยกได้จากพื้นที่ใช้เพาะเห็ดฟาง และ *Paenibacillus polymyxa* N10 แยกได้จากเปลือกปอสามาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง ในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อพื้นที่ 4 ตารางเมตร พบว่าแบคทีเรียมีผลในการควบคุมเชื้อราแข่งขันและทำให้ผลผลิตของเห็ดฟางเพิ่มขึ้นได้ 5-10% นับเป็นรายงานแรกที่สามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางโดยใช้แบคทีเรีย

Gerben และคณะ (1994) ได้แยกเชื้อ *Scytalidium thermophilum* จากเห็ด เชื้อนี้สามารถเจริญได้ที่อุณหภูมิ 70 °C เมื่อนำมาใช้ช่วยยับยั้งเชื้อราศัตรูของเห็ด *Agaricus bisporus* มีผลทำให้ผลผลิตของเห็ดสูงขึ้น และจากงานวิจัยของ พรศิลป์ และคณะ (2551) สามารถนำเชื้อปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. จำนวน 5 สายพันธุ์ ซึ่งคัดแยกได้จากก้อนเชื้อเห็ดเป็นโรค นำมาทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งเชื้อราเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ด้วยวิธี dual culture บนอาหาร NA พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราเหี่ยวได้ 30-43.75 % เมื่อนำแบคทีเรีย

ปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. ไปฉีดพ่นเพื่อควบคุมโรคราเขียวของเห็ดหูหนูในโรงเรือน พบว่าเชื้อปฏิปักษ์สายพันธุ์ A001 มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ช่วยทำให้ผลผลิตของเห็ดหูหนูเพิ่มขึ้นมากกว่าที่ไม่ได้ฉีดพ่นด้วยเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งเป็นโรคถึง 80 % และให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 35.88 กรัมต่อถุงเท่านั้น

อัจฉราและคณะ (2544) ได้ใช้เชื้อ *S. thermophilum* ที่แยกจากกองปุ๋ยหมักเดิมในกองฟาง ขย ขบวนการหมัก และเมื่อนำปุ๋ยหมักไปเพาะเห็ดฟางจะได้ผลผลิตมากกว่าการใช้ฟางขาวที่หมักโดยไม่เติมรารอน ประมาณ 1- 4% อัจฉราและสัจชัย (2531 ; 2535) ได้ศึกษาสูตรปุ๋ยเพาะเห็ดฟางจากการใช้วัสดุเพาะต่าง ๆ กัน เช่น ฟางขาว ขี้เลื่อยไมยางพารา ทะลายปาลมน้ำมัน ขี้เถ้า ซึ่งให้ผลผลิตแตกต่างกัน การรอบไอน้ำปุ๋ยหมัก ปุ๋ยหมักเป นวัตถุที่ผ่านการหมักโดยขบวนการทางชีวเคมีจะเป็นกิจกรรมของ จุลินทรีย์ต่างๆ ซึ่งมีทั้งที่เป็นประโยชน์และ ที่เป็นศัตรูเห็ด

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

อุปกรณ์

1. ครุภัณฑ์ autoclave, hot air oven, shaker, โรงเรือนเพาะเห็ดฟางขนาดเล็ก
2. เครื่องมือ ได้แก่ loop, needle, ตะเกียงแอลกอฮอล์, ตู้เขี่ยเชื้อ, เครื่องชั่ง, ซ้อนตักสาร, cork borer No.2, อุปกรณ์การฉีดเชื้อแบบคทีเรีย
3. เครื่องแก้ว ได้แก่ จานเพาะเชื้อ หลอดทดลอง ขวดแก้ว
4. สารเคมี alcohol 95% และ 70%
5. อาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar, nutrient agar, nutrient broth
6. เชื้อราแข่งขันและเชื้อราก่อโรคพืช จำนวน 23 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 2
7. เชื้อเห็ดฟางทดสอบ จำนวน 13 สายพันธุ์ ดังแสดงในตารางที่ 3
8. วัสดุเพาะเห็ดฟาง

ตารางที่ 2 แสดงสาเหตุ การก่อโรค และแหล่งที่มาของเชื้อราทดสอบ

ลำดับ	ชื่อเชื้อรา	สาเหตุและการก่อโรค	แหล่งที่มา
1	<i>Alternaria brassicola</i>	โรคใบจุดในพืช	กรมวิชาการเกษตร
2	<i>Aspergillus niger</i>	โรคโคนเน่าและเชื้อ แ่งชั้นของเห็ด	กรมวิชาการเกษตร
3	<i>Bolbitius fissus</i>	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	โรงเรียนของเกษตรกร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา ภาควิชาจุลชีววิทยา
4	<i>Coprinus</i> sp.	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตบางเขน
5	<i>Coprinus</i> sp. cin-003	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	ฟางข้าว จังหวัดสระบุรี
6	<i>Coprinus</i> sp. cin-004	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	การหมักฟางข้าว กรุงเทพมหานคร
7	<i>Coprinus</i> sp. cin-006	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	การหมักฟางข้าว จังหวัดเชียงใหม่
8	<i>Coprinus</i> sp. cin-009	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	ทะเลสาบปาล์ม จังหวัดสุราษฎร์ธานี
9	<i>Coprinus</i> sp. cin-011	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	การหมักฟางข้าว จังหวัด พระนครศรีอยุธยา
10	<i>Coprinus</i> sp. cin-016	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	กากเมล็ดกาแฟ กรุงเทพมหานคร
11	<i>Coprinus</i> sp. cin-026	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	เปลือกถั่ว กรุงเทพมหานคร
12	<i>Coprinus</i> sp. cin-031	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	ทะเลสาบปาล์ม จังหวัดชุมพร
13	<i>Coprinus</i> sp. cin-037	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	เปลือกมันสำปะหลัง จังหวัด นครราชสีมา
14	<i>Coprinus</i> sp. cin-057	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	ต้นปาล์ม จังหวัดเพชรบุรี
15	<i>Curvularia lunata</i> TISTR 3282	โรคใบจุดในพืช	ศูนย์จุลินทรีย์ สถาบันวิจัย วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่ง
16	<i>Gliocladium</i> sp. T2	เชื้อแ่งชั้นของเห็ด	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยา เขตบางเขน

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ลำดับ	ชื่อเชื้อรา	สาเหตุและการก่อโรค	แหล่งที่มา
17	<i>Monilia</i> sp.	โรคสมอเน่าในฝ้ายและ เชื้อแป้งชั้นเห็ด	กรมวิชาการเกษตร
18	<i>Fusarium</i> sp.	โรคพืชในดิน	ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	โรคเหี่ยวในมะเขือเทศ	กรมวิชาการเกษตร
20	<i>Rhizoctonia solani</i>	โรคกาบใบแห้งในข้าว	ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน
21	<i>Pythium</i> sp.	โรคพืชในดิน	ผักกวางตุ้ง ภาควิชาโรคพืช มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต บางเขน
22	<i>Sclerotium rolfsii</i>	โรคพืชในดิน และเชื้อ แป้งชั้นของเห็ด	กรมวิชาการเกษตร
23	<i>Trichoderma harzianum</i>	โรคพืชในดิน และเชื้อ แป้งชั้นของเห็ด	กรมวิชาการเกษตร

ตารางที่ 3 ตารางแสดงสายพันธุ์ของเห็ดฟางทดสอบและแหล่งที่มาของเชื้อเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ (ได้รับความอนุเคราะห์จาก ศูนย์รวบรวมเชื้อเห็ด กรมวิชาการเกษตร)

ลำดับ	ชื่อเชื้อเห็ดฟาง	แหล่งแยกเชื้อ/จังหวัด
1	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-002	ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร
2	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-006	ทะเลายปาล์มน้ำมัน จังหวัดสตูล
3	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-007	ทะเลายปาล์มน้ำมัน จังหวัดชลบุรี
4	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-009	ฟางข้าว อำเภอนิคมพัฒนา จังหวัดสระบุรี
5	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-010	ฟางข้าว จังหวัดอ่างทอง
6	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-019	ประเทศฮ่องกง
7	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-024	เปลือกกาแฟ อำเภอสวี จังหวัดชุมพร
8	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-029	ประเทศฮ่องกง
9	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-037	ปุ๋ยเชื้อเพาะซีฟ้าย V45 จังหวัดนนทบุรี
10	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-045	ฟางข้าว จังหวัดนนทบุรี
11	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-058	ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร
12	เชื้อเห็ดฟาง Vvol-071	ทะเลายปาล์มน้ำมัน V47-ทลป จังหวัดนนทบุรี
13	เชื้อเห็ดฟาง สายพันธุ์อุยธยา	แยกจากดอกเห็ดฟาง ฟาร์มเห็ดฟาง จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

วิธีการวิจัย

I. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเห็ดฟางและการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

1. สถานที่และวิธีการเก็บตัวอย่าง

การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์เพื่อใช้ในการทดลอง ทำ 2 วิธี คือ

1.1 การคัดแยกจากสภาพแวดล้อมบริเวณที่เพาะเห็ดฟาง โดยการนำจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar เปิดฝาไปวางไว้บริเวณที่เพาะเห็ดฟาง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วเก็บจานอาหารเพื่อนำมาบ่มต่อในห้องปฏิบัติการ

1.2 การเก็บตัวอย่างวัสดุเพาะเห็ดฟางจากสถานที่ต่างๆ โดยการเก็บตัวอย่างใส่ถุงพลาสติกที่ปราศจากเชื้อ พร้อมบันทึกรายละเอียดของตัวอย่าง จำนวน 3 แหล่ง ประกอบด้วย

1.2.1 โรงเรือนทดลองเพาะเห็ด ภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขต
บางเขน

1.2.2 แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย ในการฝึกอบรมการเพาะเห็ดฟาง ภาควิชาจุล
ชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

1.2.3 ฟาร์มผลิตเชื้อเห็ดฟางบางบัว-บัวขาว ตำบลบางบัวทอง อำเภอบางบัวทอง
จังหวัดนนทบุรี

2. วิธีการคัดแยกเชื้อแบคทีเรีย

2.1 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากสภาพแวดล้อมบริเวณที่เพาะเห็ดฟาง

นำตัวอย่างจานอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar ไปวางและเปิดฝาไว้ในแต่ละจุดทดสอบแล้วมาบ่มที่
อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน จนโคโลนีปรากฏ คัดแยกเอาเชื้อที่มีลักษณะคล้ายกับเชื้อแบคทีเรีย นำไป cross
streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar plate จนสามารถแยกได้โคโลนีเดี่ยว นำมาเก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ
nutrient agar slant เพื่อทำการย้อมสีแบบแกรมทดสอบลักษณะเบื้องต้น และเก็บตัวอย่างไว้เพื่อนำไปทดสอบการ
ยับยั้งเชื้อราต่อไป

2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง

นำตัวอย่างที่เก็บตามข้อ 1. มาซึ่ง 1 กรัม ใส่ในน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร
บรรจุในขวดฝาเกลียว ทำจนได้ความเจือจางที่ 10^{-5} เลือกความเจือจางที่ 10^{-3} , 10^{-4} และ 10^{-5} ปิเปตมา 0.1
มิลลิลิตร นำไป spread บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1-2 วัน จน
โคโลนีปรากฏ คัดแยกเอาเชื้อที่มีลักษณะคล้ายแบคทีเรียที่มีลักษณะโคโลนีที่แตกต่างกันนำไป cross streak บน
อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar plate จนได้เชื้อที่บริสุทธิ์ แล้วนำมาแยกเก็บใน nutrient agar slant เพื่อทดสอบ
ลักษณะเบื้องต้น และเก็บตัวอย่างไว้เพื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเชื้อราต่อไป

II. การตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราแข่งขันของเห็ดฟาง เชื้อราสาเหตุโรค พืชบางชนิด และเชื้อเห็ดฟาง

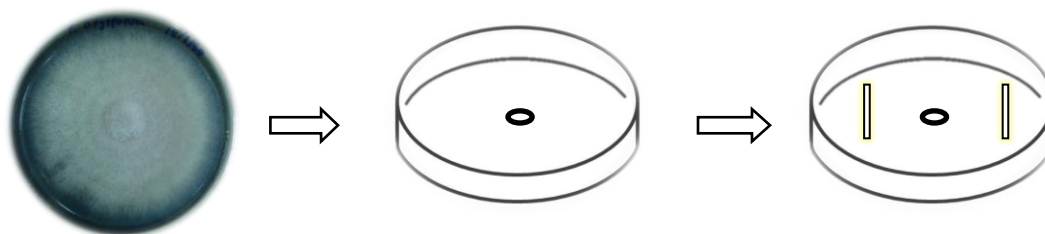
เชื้อราที่นำมาใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อรามีจำนวน
23 สายพันธุ์ และเชื้อเห็ดฟาง จำนวน 13 สายพันธุ์ ทำการทดสอบโดยวิธี dual culture และนำเชื้อแบคทีเรีย *B.*
subtilis B2 ที่ได้จากงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) มาทดสอบการยับยั้งการเจริญกับเชื้อเห็ดฟางด้วย

1. วิธีการทดสอบการยับยั้งการเจริญด้วย dual culture method

1.1) เลี้ยงเชื้อราทดสอบบนอาหาร potato dextrose agar จนเชื้อราเจริญเกือบเต็มจานอาหาร
เลี้ยงเชื้อ

1.2) นำ cork borer เบอร์ 2 ตัดเส้นใยบริเวณปลายโคโลนีของเชื้อรา นำไปวางบริเวณกลางจาน
อาหาร potato dextrose agar ใหม่ โดยแต่ละการทดลองทำ 3 ซ้ำ

1.3) นำ loop เชื้อเชื้อแบคทีเรียอายุ 24 ชั่วโมง ไปขีดลากขนานสองข้างของชั้นวุ้นเชื้อราทดสอบ โดยการลากในแนวขนาน ให้มีความยาว และระยะห่างจากชั้นวุ้นเท่ากัน ดังภาพด้านล่าง



ภาพที่ 1 ลักษณะการทดสอบเชื้อด้วยวิธี dual culture

1.4) การทำชุดควบคุมของเชื้อรา โดยการตัดเส้นใยบริเวณปลายโคโลนีของเชื้อรา นำไปวางบน บริเวณตรงกลางของจานอาหาร potato dextrose agar โดยไม่ลากเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

1.5) นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญของเชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย และทำการบันทึก ข้อมูลเมื่อโคโลนีของชุดควบคุมของเชื้อราเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยการถ่ายรูป และวัดรัศมีการเจริญของ เชื้อรา รวมทั้งระยะห่างระหว่างเส้นใยของเชื้อรากับแนวการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย

2. การคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ ตามสมการ

2.1) สูตรการคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการเจริญของเชื้อราทดสอบ ดังสมการ

$$\frac{A - B}{A} \times 100$$

โดยที่ A คือ รัศมีการเจริญของเชื้อราชุดควบคุม

B คือ รัศมีการเจริญเฉลี่ยของเชื้อราทดสอบ

III. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย ทำการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียโดยใช้ 3 วิธี คือ

1. การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา

นำตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากข้อ 2. มาทำการศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาโดยวิธีการ ย้อมสีแบบแกรม แล้วนำมาตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พร้อมทั้งบันทึกผล คัดเลือกเฉพาะเชื้อที่ สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ เพื่อนำไปตรวจสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราแข่งขัน ของเห็ดฟาง และราสาเหตุโรคพืชบางชนิด

2. การจำแนกชนิดโดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method)

ทำโดยตรวจสอบคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยา ชีวเคมี และสรีรวิทยาของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ตามวิธีการ ของ Gordon (1989) รวมทั้ง Claus and Berkeley (1986) ที่ใช้วิธีการแบ่งกลุ่มแบคทีเรียสร้างสปอร์ออกเป็น 4 กลุ่มตามสัณฐานวิทยาของเซลล์และสปอร์ และตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี และสรีรวิทยาดังต่อไปนี้ ทดสอบ

ความต้องการอากาศ เพื่อระบุว่าเป็นเชื้อกลุ่ม aerobe หรือ facultative anaerobe โดยใช้ อาหาร anaerobic agar, VP test, nitrate reduction test, motility, การเจริญในอาหาร nutrient broth pH 5.7, การเจริญในอาหาร nutrient broth ที่อุณหภูมิ 55 °C การเจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth ที่ผสมเกลือ NaCl 5, 7 และ 10% ตามลำดับ ทดสอบการสร้างกรดจากน้ำตาล D-glucose, L-arabinose, D-xylose, D-mannitol และ lactose ตามลำดับ การเจริญโดยใช้ citrate และ propionate เป็นแหล่ง carbon และการทดสอบความสามารถในการสร้างเอนไซม์ catalase, oxidase, phenylalanine deaminase, esculinase, amylase, caseinase, gelatinase, lipase, urease และ lecithinase โดยผลการทดสอบที่ได้จะนำไปเทียบเคียงเพื่อระบุชนิดกับข้อมูลของ Gordon (1989) รวมทั้ง Claus and Berkeley (1986)

3. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ GEN III Microplate

หลักการของวิธี Biolog GEN III คือการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของเชื้อ 95 คุณสมบัติที่ทางผู้ผลิตได้คัดเลือก และทำเป็นอาหารแห้งใส่ในแต่ละหลุมของ microplate ถ้าเชื้อทดสอบสามารถเจริญได้จะเปลี่ยนสีอินดิเคเตอร์ (tetrazolium) ที่ผสมไว้ ทำให้สามารถตรวจสอบผลการวิเคราะห์ผ่านเครื่องอ่านผล (Microplate reader) และประมวลผลจาก metabolic pattern ที่ได้โดยเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลของบริษัทผู้ผลิต ซึ่งมีขั้นตอนและวิธีการดังต่อไปนี้

3.1 ขั้นตอนและวิธีการเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

คัดแยกเชื้อแบคทีเรียทดสอบให้ได้เชื้อที่บริสุทธิ์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar (NA) ให้เชื้อทดสอบอายุประมาณ 14-24 ชั่วโมง ถ้าเป็นเชื้อในกลุ่ม *Bacillus* ควรให้เจริญน้อยกว่า 16 ชั่วโมง เพื่อไม่ให้เข้าสู่สภาวะการสร้างสปอร์ หลังจากนั้นใช้ไม้พันสำลี ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว (sterile cotton swap) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร โดยนำส่วนปลายมาแตะ single colony ของเชื้อทดสอบที่เจริญอยู่บนบริเวณผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) นำมาถ่ายลงในสารละลาย Inoculation Fluid (IF-A) โดยการใช้ส่วนปลายของไม้พันสำลีที่มีเชื้อแบคทีเรียติดอยู่มาป้ายลงที่ด้านในบริเวณข้างๆของหลอดบรรจุสารละลาย IF-A เบาๆ เพื่อให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทดสอบที่เกาะกลุ่มกันอยู่เป็นก้อนเกิดการกระจายตัวและหลุดออกมาจากไม้พันสำลีมาติดอยู่ที่บริเวณด้านข้างของหลอดบรรจุสารละลาย IF-A กลับหลอดบรรจุสารละลายเชื้อ IF-A ไปมาเบาๆ 2-3 ครั้ง เพื่อให้เซลล์ของเชื้อแบคทีเรียกับสารละลายเข้ากันดี หลังจากนั้น นำไปวัดความหนาแน่นของเชื้อโดยการวัดเปอร์เซ็นต์แสงส่องผ่าน (%T) ด้วยเครื่อง Biolog Turbidimeter ให้ได้ค่าความขุ่นอยู่ในช่วง 93-98% (สำหรับเชื้อแบคทีเรียกลุ่มที่ต้องการอากาศ) ถ้าในกรณีที่เซลล์มีความขุ่นน้อยไปให้ใส่เชื้อเพิ่มเข้าไปอีก แต่ถ้าหากว่าเซลล์มีความหนาแน่นมากจนเกินไปให้เติมสารละลาย IF-A ลงไปเจือจาง

3.2 ขั้นตอนและวิธีการทดสอบ

บันทึกรายละเอียดของเชื้อแบคทีเรียทดสอบลงใน microplate หลังจากนั้นนำสารละลายเซลล์ที่เตรียมไว้มาเทลงใน sterile multichannel pipet reservoir แล้วนำ pipette tips ที่ปราศจากเชื้อใส่เข้า

กับ electronic 8-channel micropipettor และปรับปริมาตรเป็น 100 ไมโครลิตร ดูดเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในแต่ละหลุมของ Biolog GEN III microplate ระวังอย่าให้สารละลายของเชื้อทดสอบเกิดการปนเปื้อนหรือกระเด็นไปสู่หลุมอื่นๆ และควรใช้เวลาในการถ่ายเชื้อใส่ Biolog GEN III microplate อย่างรวดเร็ว และเปลี่ยน pipette tips ออกจาก electronic 8-channel micropipettor ปิดฝา Biolog GEN III microplate นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิ 33 °C เป็นเวลา 16-24 ชั่วโมง

3.3 การอ่านผล และการวิเคราะห์ผลเพื่อจัดจำแนกเชื้อ

เมื่อบ่มเชื้อทดสอบจนครบตามเวลาที่กำหนด นำ microplate ออกมาอ่านผลด้วยเครื่อง Biolog Microstation Reader และพริ้นท์ข้อมูลผลการตรวจออกมาวิเคราะห์เพื่อจัดจำแนกชนิดของเชื้อทดสอบ

IV. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในการส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟางในฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร

นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B2 ที่แยกได้จากพื้นที่ที่ใช้เพาะเห็ดฟาง ซึ่งเป็นผลงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ที่รายงานว่ามีความสัมพันธ์ในการส่งเสริมการเจริญและช่วยเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟาง ได้มาทดสอบเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเชื้อไปใช้ในการส่งเสริมการเจริญของเห็ดฟางในฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกรได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กรรมวิธี ได้แก่

- 1) กรรมวิธีที่ 1 ใช้น้ำเปล่า (control)
- 2) กรรมวิธีที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (control)
- 3) กรรมวิธีที่ 3 น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกเอาแต่ส่วนใส (supernatant)
- 4) กรรมวิธีที่ 4 ตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหลังปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกไป (pellet)
- 5) กรรมวิธีที่ 5 เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (suspension)

1. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

- 1.1) นำเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B2 มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.2) ถ่ายเชื้อจากข้อ 1.1) จำนวน 1 loop ลงในอาหาร nutrient broth ปริมาตร 100 มิลลิลิตร และนำไปเขย่า ที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.3) นำเชื้อจากข้อ 1.2) มาตรวจนับจำนวนเชื้อตั้งต้นด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และถ่ายเชื้อ ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ที่บรรจุอาหาร nutrient broth ปริมาตร 200 มิลลิลิตร จำนวนทั้งหมด 60 flask และนำไปเขย่า ที่ความเร็ว 130 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- 1.4) แบ่งเชื้อทดสอบ ออกเป็นสองส่วนเท่าๆกัน ส่วนละ 6,000 มิลลิลิตร โดยส่วนแรก นำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อร่อนนำไปทดลองเป็นกรรมวิธีที่ 5 (suspension) ก่อนนำไปใช้ตรวจนับจำนวน

แบคทีเรียด้วยวิธี spread plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient agar และส่วนที่สอง นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แยกเก็บส่วนใส ตรวจนับจำนวนเชื้อที่เหลือในส่วนใส และนำไปเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดลองเป็นกรรมวิธีที่ 3 (supernatant) และเก็บตะกอนเซลล์ นำมาเติมน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปรับปริมาตรให้เท่ากับกรรมวิธีอื่นๆ นำไปตรวจนับจำนวนเซลล์ที่ปั่นแยกออกมาได้ และนำไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอนำไปทดลองเป็นกรรมวิธีที่ 4 (pellet) ก่อนจะนำทุกส่วนที่เตรียมไว้ไปใช้ฉีดพ่นที่ฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกรต่อไป

2. การเตรียมก้อนเชื้อของเห็ดฟาง

คัดเลือกสายพันธุ์ของเห็ดฟางที่ได้รับมาจากกรมวิชาการเกษตร โดยการคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีผลการถูกยับยั้งจากเชื้อแบคทีเรีย น้อย และเส้นใยสามารถเจริญได้เร็ว

การเตรียมก้อนเชื้อเห็ดฟางให้เกษตรกรที่อำเภอภาชี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา เตรียมก้อนเชื้อเห็ดฟางให้ ซึ่งส่วนประกอบในการทำปุ๋ยหมักสำหรับทำก้อนเชื้อเห็ดฟาง ประกอบด้วยส่วนผสมต่างๆ ได้แก่ ชี๊ฝ้าย 900 กิโลกรัม เปลือกกล้วย 900 กิโลกรัม ชี๊ม่า 100 กิโลกรัม และ รำข้าว 30 กิโลกรัม นำมาผสมให้ความชื้นประมาณ 60-65 % หลังจากนั้นนำมาบรรจุใส่ถุงพลาสติกให้ได้ถุงละ ½ กิโลกรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง ความดัน 3 psi ทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนจะนำมาถายเส้นใยของเชื้อเห็ดฟางที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) ลงไปและนำไปมจนเส้นใยเจริญเต็มถุง ซึ่ง 1 ชั้นเพาะ มีพื้นที่ 4 ตารางเมตร จะใช้ก้อนเชื้อจำนวน 5 ถุงต่อชั้นเพาะ

3. การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดฟางและโรงเรือนทดสอบ

3.1 การเตรียมวัสดุเพาะเห็ดฟาง เตรียมโดยเกษตรกรเจ้าของฟาร์มเป็นผู้จัดเตรียมให้ ซึ่งส่วนผสมของวัสดุเพาะเห็ดฟางที่ใช้ในการทดลอง ประกอบด้วย ฟางข้าว 15 กิโลกรัม และชี๊ฝ้าย 220 กิโลกรัมของน้ำหนักเปียก ต่อโรงเรือน ส่วนอาหารเสริม ได้แก่ รำข้าว ร้อยละ 10, ยิปซัม ร้อยละ 1 ปูนเปลือกหอย ร้อยละ 1 แป้งข้าวเหนียว ร้อยละ 1 และยูเรีย ร้อยละ 0.7 ซึ่งเกษตรกรจะนำวัสดุเพาะ คือ ชี๊ฝ้ายแช่น้ำให้เปียกทิ้งไว้ในลานคอนกรีตที่ใช้สำหรับการหมักวัสดุเพาะเป็นเวลา 1 คืน แล้วปล่อยน้ำทิ้ง หลังจากนั้นนำอาหารเสริมมาผสมกับชี๊ฝ้าย แล้วหมักทิ้งไว้เป็นเวลา 2 คืน นำฟางข้าวที่รดด้วยน้ำจนเปียกชุ่มวางรองบนชั้นก่อนนำเอาชี๊ฝ้ายที่หมักผสมกับอาหารเสริมขึ้นบนชั้นเพาะ และทิ้งไว้ในชั้นเพาะที่อยู่ในโรงเรือนต่ออีกเป็นเวลา 1 คืน หลังจากนั้นเกษตรกรจะอบไอน้ำ เพื่อกำจัดเชื้อปนเปื้อนในโรงเรือน ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 6 ชั่วโมง และปล่อยทิ้งไว้ให้เย็นลง ก่อนนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้มาฉีดพ่นลงบนวัสดุเพาะ

3.2 การเตรียมโรงเรือนทดสอบ ลักษณะของโรงเรือนทดสอบ มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้า ขนาด 5.8 x 6.8 เมตร สูงประมาณ 3.5 เมตร ตัวโรงเรือนและหลังคามุงด้วยหญ้าทั้งหมด พื้นเป็นพื้นดิน ภายในบุด้วยแผ่นพลาสติกทนความร้อนทุกด้าน รวมทั้งหลังคาของโรงเรือน เพื่อช่วยควบคุมอุณหภูมิและความชื้นภายในโรงเรือน มีประตูทางเข้า-ออก สองด้าน ด้านละ 2 ประตู ใน 1 โรงเรือน ประกอบด้วยชั้นเพาะเห็ด จำนวน 3 แถว แถวละ 4

ชั้น ขนาดประมาณ 80 เซนติเมตร x 5 เมตร (แต่ละชั้นมีพื้นที่ 4 ตารางเมตร) ทำจากไม้และปูด้วยตาข่ายเพื่อรองรับวัสดุเพาะ ชั้นล่างสุดอยู่ห่างจากพื้นดิน 30 เซนติเมตร แต่ละชั้นมีความสูงห่างกันประมาณ 60 เซนติเมตร ตั้งห่างจากฝาน้ำโรงเรือนโดยรอบประมาณ 80 เซนติเมตร ส่วนการอบไอน้ำโรงเรือนทดสอบ หลังจากนำวัสดุเพาะที่เตรียมไว้ตามข้อ 3.1 นำมาขึ้นชั้นเพาะและหมักทิ้งไว้ในโรงเรือนเป็นเวลา 1 คืนเรียบร้อยแล้ว เกษตรกรจะทำการอบไอน้ำเพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ภายในโรงเรือนและวัสดุเพาะ ที่อุณหภูมิ 60-65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยแหล่งกำเนิดความร้อน ใช้ถังขนาด 200 ลิตร มีฝาเปิดด้านข้าง นำมาวางในแนวนอน หันด้านที่เปิดฝาขึ้นสำหรับเติมน้ำ ต่อท่อเหล็กฝาเกลียวเข้ากับฝาทิ้ง แล้วนำสายยางต่อจากท่อเหล็กยื่นเข้าไปที่โรงเรือน แหล่งพลังงานความร้อนใช้ฟืนในการต้มน้ำในถังให้เดือด ไอน้ำจะออกจากท่อเหล็กและสายยางผ่านเข้าสู่โรงเรือน หลังจากครบเวลา 6 ชั่วโมง ปลอ่ยให้อุณหภูมิเย็นลง แล้วจึงนำสารละลายเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่เตรียมไว้มาทำการฉีดพ่น จากนั้นเกษตรกรจะนำเชื้อเห็ดฟางที่เตรียมตามข้อ 2. มาโรยเชื้อลงบนวัสดุเพาะ

4. การฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียทดสอบในโรงเรือนเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร จังหวัดพระนครศรีอยุธยา

- 4.1) นำเอาเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมจากข้อ 1. มาฉีดพ่นลงบนวัสดุเพาะในโรงเรือนเพาะเห็ด
- 4.2) สุ่มเลือกพื้นที่ของชั้นเพาะในแต่ละโรงเรือนทดสอบ ก่อนทำการฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียทดสอบบนวัสดุเพาะบนชั้นเพาะก่อนใส่เชื้อเห็ดฟาง



ภาพที่ 2 แสดงลักษณะชั้นเพาะเห็ดฟางและวัสดุเพาะในโรงเรือนของเกษตรกร อำเภอภาชี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 1) ก่อนฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย และ 2) ขณะนำเชื้อแบคทีเรียฉีดพ่นเพื่อทดสอบ

4.3) ฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง โดยในแต่ละ กรรมวิธีทำการฉีดพ่นบนวัสดุเพาะบนชั้นเพาะที่ยังไม่ได้ใส่เชื้อเห็ดฟาง ซึ่งแต่ละโรงเรือนมีจำนวน 3 แถว แต่ละแถวมี 4 ชั้นเพาะ ซึ่ง 1 ชั้นมีพื้นที่ 4 ตารางเมตร โดยการฉีดพ่น ทำดังนี้

4.3.1) กรรมวิธีที่ 1 ใช้น้ำเปล่า (control) ฉีดพ่นบนวัสดุเพาะ ฉีดพ่นแยกต่างหากอีก 1 โรงเรือน แต่อยู่ในบริเวณเดียวกัน

4.3.2) กรรมวิธีที่ 2 อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (control) ฉีดพ่นชั้นบนสุดของทุกแถวเพาะ

4.3.3) กรรมวิธีที่ 3 น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกเอาแต่ส่วนใส (supernatant) ฉีดพ่นชั้นที่สองถัดจากด้านบนสุดของทุกแถวเพาะ

4.3.4) กรรมวิธีที่ 4 ตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหลังปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกไป (pellet) ฉีดพ่นชั้นที่สามถัดจากด้านบนสุดของทุกแถวเพาะ

4.3.5) กรรมวิธีที่ 5 เชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (suspension) ฉีดพ่นชั้นล่างสุดของทุกแถวเพาะ

แต่ละกรรมวิธีฉีดพ่น 3 ซ้ำต่อโรงเรือน ในปริมาตรเท่าๆกัน คือ 1,000 มิลลิลิตรต่อพื้นที่ 4 ตารางเมตร หลังฉีดพ่นเสร็จจึงจะทำการใส่เชื้อเห็ดฟางในวันเดียวกัน

4.4) ตรวจสอบผลการทดลองโดยการชั่งน้ำหนักของดอกเห็ดฟางที่ได้ และตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อราแข่งขันบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง เปรียบเทียบผลผลิตที่ได้ในแต่ละกรรมวิธี

V. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟางเพื่อนำไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียจากการทดสอบการยับยั้งในห้องปฏิบัติการ โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม คือ ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อราแข่งขันของเห็ด และเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ผลดี แต่สามารถยับยั้งเชื้อเห็ดฟางได้ คัดเลือกไปทำการทดลอง จำนวน 6 ไอโซเลต ได้แก่ BC02, BC03, BC05, MK07, BF02 และ BF04 ส่วนอีกกลุ่มมีจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ MA02, MK02 และ MK05 เป็นกลุ่มที่ยับยั้งเชื้อราแข่งขันของเห็ด เชื้อราสาเหตุโรคพืช และเชื้อเห็ดฟางได้น้อย นำแบคทีเรียมาเตรียมในรูปแบบของ suspension นำไปทดสอบในโรงเรือนเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร เพื่อคัดเลือกหาเชื้อแบคทีเรียที่มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมผลผลิตเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ได้อย่างเหมาะสม ที่ฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร อำเภอภาชี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 ครั้ง โดยแสดงเชื้อแบคทีเรียทดสอบ สายพันธุ์เห็ดฟาง และช่วงเวลา ดังตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงการทดลองแต่ละครั้งเพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียให้เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเห็ดฟาง

ครั้งที่	ช่วงเวลา	โรงเรือนที่ 1		โรงเรือนที่ 2	
		เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ดฟาง	เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ดฟาง
1	15 มิ.ย.55-	BC05	อยุธยา	BC02	Vvol-019
	6 ก.ค. 55	MK02		BF04	
		MA02		MK05	
		Control (น้ำเปล่า)		Control (น้ำเปล่า)	
2	17 ก.ค.-	BC05	Vvol-009	BC05	Vvol-037
	4 ส.ค.55	BC03		BC03	
		BF02		BF02	
		Control (NB)		Control (NB)	
3	21 ส.ค.-	MK07	Vvol-045	MK07	Vvol-071
	4 ก.ย.55	7A/2(1)		7A/2(1)	
		Control (NB)		Control (NB)	
		Control (น้ำเปล่า)		Control (น้ำเปล่า)	
4	18 ก.ย.-	MK07	Vvol-024	MK07	Vvol-029
	3 ต.ค.55	7A/2(1)		7A/2(1)	
		Control (NB)		Control (NB)	
		Control (น้ำเปล่า)		Control (น้ำเปล่า)	

หมายเหตุ; เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต 7A/2(1) เป็นเชื้อที่มีรายงานจากสุรศักดิ์และคณะว่ามีความสามารถในการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดี แต่มีผลในการยับยั้งเชื้อเห็ดฟางได้น้อย (ผลงานไม่ได้ตีพิมพ์) ในการทดลองครั้งที่ 3 และ 4 จึงนำมารวมทดลองด้วย เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่เราคัดแยกได้และให้ผลการยับยั้งเชื้อราอื่นดี สามารถยับยั้งเชื้อเห็ดฟางได้ดีเช่นกัน ส่วนที่ไม่ยับยั้งเชื้อเห็ดฟาง ก็จะไม่สามารถยับยั้งเชื้อราแข่งขันของเห็ดและเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้

VI. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี คือ

วิธีที่ 1 แบ่งพื้นที่เพาะเห็ดในแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน วิธีนี้ทำการทดลองระหว่างเดือนมีนาคม-เดือนมิถุนายน 2556 การทดลองนี้ได้วางแผนการทดลองเป็นแบบ Randomized Complete Block

Design; RCBD มีการนำเอาวัสดุมาแบ่งกันแต่ละชั้นเพาะ ให้การทดลองในแต่ละกรรมวิธีอยู่ในชั้นเพาะเดียวกัน เพื่อให้สภาพแวดล้อมของการทดลองในทุกกรรมวิธีใกล้เคียงกันมากที่สุด ซึ่งทำให้สามารถนำข้อมูลผลการทดลองที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติและทำให้ผลการทดลองมีโอกาสผิดพลาดจากการทดลองน้อยลง ส่วนขั้นตอนและวิธีการในการเตรียมเชื้อทดสอบยังทดสอบตามวิธีเดิมเหมือนเช่นการทดลองทั้ง 4 ครั้งที่ผ่านมาแต่แตกต่างกันที่มีการแบ่งพื้นที่ของชั้นเพาะในแต่ละแถวเพื่อให้สามารถนำการทดลองแต่ละวิธีการทดลอง มาทดสอบอยู่ในชั้นเดียวกัน ซึ่งใน 1 โรงเรือน มีจำนวน 3 แถว แต่ละแถวมีจำนวน 4 ชั้น และแต่ละชั้น มีพื้นที่ 4 ตารางเมตร ซึ่งจะแบ่งแต่ละชั้นออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน (ส่วนละ 1 ตารางเมตร ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 250 มิลลิลิตร) โดยใช้วัสดุกันแต่ละส่วนไม่ให้ยู่ชิดกัน เพื่อป้องกันการปนเปื้อนระหว่างกันในแต่ละวิธีการทดลอง และที่แตกต่างกันอีกประการคือ ในแต่ละวิธีการทดลอง ทำการทดลอง จำนวน 4 ซ้ำ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ครั้ง ครั้งละ 2 โรงเรือน ดังตารางที่ 5ก

ตารางที่ 5ก แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองเป็นแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 4 ส่วน)

ครั้งที่	ช่วงเวลา	โรงเรือนที่ 1		โรงเรือนที่ 2	
		เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด
1	6-24 มี.ค.56	BC02	อยุธยา	BC05	อยุธยา
		BC03		BF02	
		<i>B. subtilis</i> B2 ^a		<i>B. subtilis</i> พลายแก้ว ^b	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	
2	10-22 เม.ย.56	BC02	Vvol-009	BC05	Vvol-009
		BC03		BF02	
		<i>B. subtilis</i> B2 ^a		<i>B. subtilis</i> พลายแก้ว ^b	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	
3	29 พ.ค. - 19 มิ.ย.56	ทำการทดลองเช่นเดียวกับครั้งที่ 1 ทุกประการทั้ง 2 โรงเรือน			
4	10-22 เม.ย.56	BC02	อยุธยา	BC02	อยุธยา
		BC05		BC05	
		<i>B. subtilis</i> B2 ^a		<i>B. subtilis</i> B2 ^a	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	

ตารางที่ 5ก (ต่อ)

หมายเหตุ: ^a *B. subtilis* B2 ได้มาจากการวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ซึ่งมีรายงานว่าช่วยส่งเสริมผลผลิตเห็ดฟางได้ดี

^b *B. subtilis* พลายแก้ว คือ เชื้อแบคทีเรียทางการค้า ซึ่งใช้ในการช่วยยับยั้งเชื้อราแข่งขัน แล ะ เชื้อราก่อโรคในเห็ด

วิธีที่ 2 แบ่งพื้นที่เพาะเห็ดในแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน วิธีนี้ทำการทดลองระหว่างเดือนพฤศจิกายน 2556-เดือนมีนาคม 2557 เนื่องจากพบปัญหาว่า ผลผลิตของการทดลองในช่วงแรกที่ผ่านมาทั้ง 4 ครั้ง ให้ผลผลิตที่ค่อนข้างต่ำในทุกวิธีการทดลอง ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่เราทำการแบ่งพื้นที่เพาะเห็ดจนมีพื้นที่น้อยเกินไป มีผลทำให้การเจริญของเส้นใยเห็ดเจริญได้ไม่เต็มที่ การทดลองในช่วงนี้จึงได้ปรับเปลี่ยนวิธีการทดลองใหม่ โดยทำการแบ่งพื้นที่แต่ละชั้นเพาะ จากเดิมที่แบ่งออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆ กัน ลดพื้นที่การแบ่งลงเหลือเพียง 2 ส่วนเท่าๆ กัน (ส่วนละ 2 ตารางเมตร ฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรีย ปริมาตร 500 มิลลิลิตร) โดยใช้วัสดุกันแต่ละส่วนแยกออกจากกันให้กว้างขึ้นกว่าในวิธีที่ 1 เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการปนเปื้อนระหว่างกันในแต่ละวิธีทดลอง ส่วนวิธีการเตรียมตัวอย่างเชื้อแบคทีเรียและเชื้อเห็ดฟางทดสอบเหมือนเดิมกับในช่วงแรกทุกประการ แบ่งการทดลองออกเป็น 3 ครั้ง ครั้งละ 2 โรงเรือน ดังตารางที่ 5ข

ตารางที่ 5ข แสดงการคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองเป็นแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 2 ส่วน)

ครั้งที่	ช่วงเวลา	โรงเรือนที่ 1		โรงเรือนที่ 2	
		เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	เชื้อแบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด
1 ^a	13-26 พ.ย.56	BC02	อยุธยา	BC02	อยุธยา
		BC03		BC03	
		BC05		BC05	
		BF02		BF02	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	
2 ^b	24 ธ.ค.56- 6 มกราคม 57	BC02	อยุธยา	BC02	อยุธยา
		BC05		BC05	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	
3 ^b	26 ก.พ. 57- 15 มีนาคม 57	BC05	อยุธยา	BC05	อยุธยา
		<i>B. subtilis</i> B2		<i>B. subtilis</i> B2	
		Control (ไม่ฉีดพ่น)		Control (ไม่ฉีดพ่น)	

ตารางที่ 5ข (ต่อ)

หมายเหตุ: *B. subtilis* B2 ได้มาจากการวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ซึ่งมีรายงานว่าช่วย ส่งเสริม
ผลผลิตเห็ดฟางได้ผลดี

^a ทำการทดลองกรรมวิธีละ 4 ชั่วโมง

^b ทำการทดลองกรรมวิธีละ 8 ชั่วโมง

ผลการวิจัย

1. การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเห็ดฟางและการทดสอบในห้องปฏิบัติการ

การแยกเชื้อแบคทีเรียจากวัสดุเพาะเห็ดฟางจากทั้ง 3 แหล่ง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 38 ไอโซเลต
ดังนี้

1.1) เชื้อที่แยกได้จากโรงเรือนทดลองภาควิชาจุลชีววิทยา 10 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อที่แยกจาก
สภาพแวดล้อมภายในโรงเรือน 3 ไอโซเลต เชื้อแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง 7 ไอโซเลต

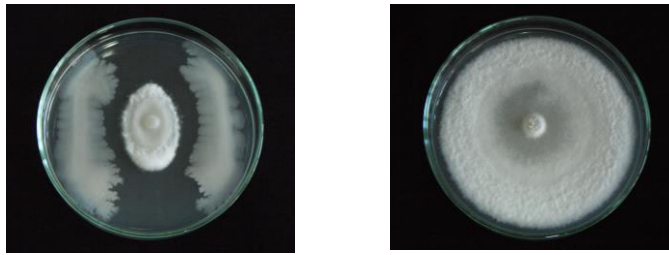
1.2) เชื้อที่แยกได้จากฟาร์มผลิตเชื้อเห็ดฟางบางบัว-บัวขาว 22 ไอโซเลต ได้แก่ เชื้อที่แยกจาก
สภาพแวดล้อมภายในโรงเรือน 12 ไอโซเลต เชื้อแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง 10 ไอโซเลต

1.3) เชื้อที่แยกได้จากแปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเตี้ย 6 ไอโซเลต ได้แก่เชื้อที่แยกจากสภาพแวดล้อม
ภายในโรงเรือน 2 ไอโซเลต เชื้อแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง 4 ไอโซเลต

2. การตรวจสอบความสามารถของแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญของราแข่งขันของเห็ดฟาง และราสาเหตุ โรคพืชจำนวน 23 สายพันธุ์ และเชื้อเห็ดฟาง 13 สายพันธุ์ ด้วยวิธี dual culture

จากเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ 38 ไอโซเลต สามารถคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ได้ 25 ไอโซเลต
นำมาตรวจสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งเชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางและเชื้อราสาเหตุโรคพืช
ในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี Dual culture บนอาหาร potato dextrose agar (PDA) เมื่อนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์
การถูกยับยั้ง พบเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งดีจำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ BC01, BC02, BC03,
BC05, BC06, BF02, BF04 และ MK07 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคพืชได้ดีที่สุดและสามารถยับยั้ง
เชื้อราทดสอบได้ทุกสายพันธุ์ คือ BC05 รองลงมาคือ BC02 แต่เมื่อนำไปทดสอบการยับยั้งเส้นใยของเชื้อเห็ดฟาง
พบว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถยับยั้งเชื้อเห็ดฟางได้เช่นเดียวกัน

คณะผู้วิจัยได้นำเชื้อ *B. subtilis* B2 จากงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) มาทดสอบการยับยั้ง
เชื้อเห็ดฟางทั้ง 13 สายพันธุ์ (แต่ไม่ได้ทดสอบกับเชื้อราแข่งขันของเห็ดและเชื้อราสาเหตุโรคพืช) พบว่าสามารถ
ยับยั้งเชื้อเห็ดฟางได้เช่นเดียวกัน (ดังแสดงผลในตารางที่ 7) และจากงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ก็
มีรายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 ยับยั้งเส้นใยของเชื้อเห็ดฟางได้ สำหรับลักษณะการถูกยับยั้งของเส้นใย
ด้วยเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้และเปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้ง แสดงไว้ในภาพที่ 3-6 และตารางที่ 6-7



ภาพที่ 3 การถูกยับยั้งเส้นใยของเชื้อเห็ด *Coprinus* sp. cin-037 โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC02 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 10 วัน



ภาพที่ 4 การถูกยับยั้งเส้นใยของเชื้อรา *Gliocladium* sp. T2 โดยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC05 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 4 วัน



ภาพที่ 5 การยับยั้งของเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์ยูธยาของแบคทีเรียไอโซเลต BC05 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 6 วัน



ภาพที่ 6 การยับยั้งของเชื้อเห็ดฟางสายพันธุ์ยูธยาและ *B. subtilis* B2 (ซ้าย) เปรียบเทียบกับ control ที่ไม่มีการฉีดเชื้อแบคทีเรีย (ขวา) อายุทดสอบ 4 วัน

ตารางที่ 6 แสดงผลการยับยั้งเชื้อราในห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

ลำดับ	เชื้อราทดสอบ	อายุ(วัน)	เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรีย (%)																								
			BC01	BC02	BC03	BC05	BC06	BC07	BF01	BF02	BF03	BF04	BF05	BF06	BF07	BF10	MA01	MA02	MK01	MK02	MK03	MK05	MK06	MK07	MT01	MTC04	MTC05
1	<i>Alternaria brassicola</i>	13	57	70	72	74	63	0	0	65	0	66	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	68	0	0	0	
2	<i>Aspergillus niger</i>	10	0	45	0	55	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
3	<i>Bolbitius fissus</i>	4	64	61	63	63	62	0	0	62	0	60	-	0	0	0	0	0	0	-	0	-	0	0	0	0	
4	<i>Coprinus sp.</i>	4	51	52	53	58	50	1	0	48	0	47	3	1	1	1	1	1	1	33	0	0	24	0	0	0	
5	<i>Coprinus sp. cin-003</i>	8	51	58	54	59	55	39	38	35	0	54	-	38	0	29	0	36	20	42	-	0	-	51	0	41	38
6	<i>Coprinus sp. cin-004</i>	9	50	50	35	39	52	51	46	55	0	51	-	48	51	40	23	0	52	40	-	0	-	0	0	34	46
7	<i>Coprinus sp. cin-006</i>	8	43	47	50	50	50	44	32	43	0	37	-	35	0	34	33	30	42	37	-	0	-	48	4	33	34
8	<i>Coprinus sp. cin-009</i>	8	55	53	56	55	56	47	38	57	43	57	-	39	43	41	36	35	46	18	-	0	-	56	0	47	43
9	<i>Coprinus sp. cin-011</i>	9	50	59	55	59	56	33	0	48	0	43	-	0	0	0	0	0	0	14	-	0	-	50	13	0	0
10	<i>Coprinus sp. cin-016</i>	8	54	57	53	53	49	44	33	54	0	43	-	34	0	25	0	33	37	23	-	0	-	51	36	32	37
11	<i>Coprinus sp. cin-026</i>	8	73	76	65	70	59	59	70	74	0	61	-	50	64	63	41	31	37	40	-	0	-	27	37	48	39
12	<i>Coprinus sp. cin-031</i>	12	63	68	72	72	66	39	37	69	0	79	-	38	0	26	0	60	0	59	-	60	-	66	62	43	25
13	<i>Coprinus sp. cin-037</i>	10	67	66	67	65	70	19	19	66	0	59	-	21	0	0	0	24	0	41	-	0	-	67	38	14	25
14	<i>Coprinus sp. cin-057</i>	8	38	44	33	49	33	22	0	29	0	29	-	21	0	0	0	0	23	22	-	0	31	0	0	31	0
15	<i>Curvularia lunata</i> TISTR 3282	6	24	63	63	62	59	0	24	61	0	27	0	26	0	24	24	34	24	27	26	24	39	62	24	24	24
16	<i>Gliocladium sp. T2</i>	4	30	51	41	56	44	0	0	43	0	28	-	0	0	0	0	0	0	0	-	0	-	43	0	0	0
17	<i>Monilia sp.</i>	1	0	0	0	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
18	<i>Fusarium sp.</i>	7	42	45	47	55	46	0	0	49	0	31	0	0	46	0	0	0	30	29	40	22	0	49	0	16	44
19	<i>Fusarium oxysporum</i>	8	33	33	33	44	41	29	29	44	0	33	0	29	0	29	0	0	29	29	33	29	29	33	0	29	29
20	<i>Rhizoctonia solani</i>	2	37	40	44	46	37	13	21	37	16	39	13	13	20	18	12	35	25	35	33	10	31	38	21	14	22
21	<i>Pythium sp.</i>	2	0	0	39	34	0	0	0	41	0	43	0	0	0	0	0	0	0	0	41	0	0	42	0	0	0
22	<i>Sclerotium rolfsii</i>	3	49	53	50	53	51	0	0	54	0	50	0	0	49	0	0	0	0	0	35	0	0	51	0	0	0
23	<i>Trichoderma harzianum</i>	3	33	41	31	45	35	4	8	34	8	34	7	5	21	9	11	18	13	19	26	5	21	34	12	4	9

หมายเหตุ; - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทดสอบตาย

ตารางที่ 7 แสดงผลการยับยั้งเชื้อเห็ดฟางในห้องปฏิบัติการของเชื้อแบคทีเรียทดสอบและเชื้อ

B. subtilis B2

ลำดับ	สายพันธุ์เห็ดฟาง	อายุ (วัน)	เปอร์เซ็นต์การถูกยับยั้งโดยเชื้อแบคทีเรีย (%)																									
			BC01	BC02	BC03	BC05	BC06	BC07	BF01	BF02	BF03	BF04	BF05	BF06	BF07	BF10	MA01	MA02	MK01	MK02	MK03	MK05	MK06	MK07	MT01	MTC04	MTC05	B2
1	Vvol-002	11	66	59	74	64	70	0	44	64	0	58	-	0	0	0	44	40	49	-	0	-	69	61	0	0	59	
2	Vvol-006	5	48	60	52	62	61	19	0	58	0	48	-	23	0	0	16	24	32	-	0	-	58	0	0	22	57	
3	Vvol-007	6	59	62	70	62	50	43	43	76	0	69	-	42	0	0	35	40	0	56	-	0	-	60	0	0	0	59
4	Vvol-009	5	50	55	56	62	53	0	0	54	0	43	-	0	0	0	0	0	32	-	0	-	54	0	0	0	50	
5	Vvol-010	9	62	57	61	65	53	0	0	66	0	52	-	0	0	0	0	0	53	-	54	-	77	0	0	0	58	
6	Vvol-019	6	44	59	60	58	63	0	0	59	0	29	-	0	0	0	25	15	40	-	0	-	64	0	0	0	57	
7	Vvol-024	6	41	52	52	61	47	0	0	45	0	0	-	0	0	0	0	0	0	-	0	-	45	0	0	0	51	
8	Vvol-029	6	46	62	61	63	63	0	0	60	0	46	-	0	0	0	32	40	43	-	0	-	61	0	0	0	61	
9	Vvol-037	5	33	53	49	60	46	0	0	46	0	35	-	0	0	0	0	0	27	-	0	-	52	0	0	0	54	
10	Vvol-045	6	41	53	49	60	51	0	0	47	0	0	-	0	0	0	0	0	36	-	0	-	47	0	0	0	50	
11	Vvol-058	14	61	64	61	67	62	0	0	62	0	49	-	0	0	0	0	0	53	-	57	-	69	0	0	0	61	
12	Vvol-071	6	41	51	51	58	50	0	0	54	0	27	-	0	0	0	0	37	28	-	0	-	53	0	0	0	53	
13	สายพันธุ์ อยุธยา	4	51	58	57	58	52	0	0	58	0	44	-	0	0	0	0	13	0	36	-	0	-	54	5	0	0	56

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่มีการทดสอบ เนื่องจากเชื้อแบคทีเรียทดสอบตาย

3. การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรีย

3.1) การศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้

เมื่อนำมาทดสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา โดยการย้อมสีแบบแกรม (Gram's stain) พบเซลล์ที่ติดสีแกรม บวก (Gram positive) มีลักษณะรูปร่างเป็นท่อน (rod shape) การจัดเรียงตัวเป็นแบบเดี่ยวๆ (singly) และเส้นสาย (streptobacilli) สามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้ จำนวน 25 ไอโซเลต (ดังแสดงในตารางที่ 8)

ตารางที่ 8 ตารางแสดงชื่อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ จำนวน 25 ไอโซเลต ที่คัดแยกได้

ลำดับ	ไอโซเลต	แหล่งที่มา
1	BC01	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่1
2	BC02	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่1
3	BC03	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่2
4	BC04	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่2
5	BC05	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่2
6	BC06	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่3
7	BC07	วัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มบางบัว-บัวขาวจุดที่3
8	BF01	วาง NA plate บนกองปุ๋ยหมักวัสดุเพาะหัวเชื้อเห็ดฟางอายุ 3 วัน ฟาร์มบางบัว-บัวขาว
9	BF02	วาง NA plate บนกองปุ๋ยหมักวัสดุเพาะหัวเชื้อเห็ดฟางอายุ 3 วัน ฟาร์มบางบัว-บัวขาว
10	BF03	วาง NA plate บนกองปุ๋ยหมักวัสดุเพาะหัวเชื้อเห็ดฟางอายุ 5 วัน ฟาร์มบางบัว-บัวขาว
11	BF05	วาง NA plate บนกองปุ๋ยหมักวัสดุเพาะหัวเชื้อเห็ดฟางอายุ 20 วัน ฟาร์มบางบัว-บัวขาว
12	BF06	วาง NA plate บนแปลงทดลองเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยวฟาร์มบางบัว-บัวขาว จุดที่1
13	BF07	วาง NA plate บนแปลงทดลองเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยวฟาร์มบางบัว-บัวขาว จุดที่1
14	BF10	กองปุ๋ยหมักร้อนก่อนทำวัสดุเพาะหัวเชื้อเห็ดฟางอายุ 30 วัน ฟาร์มบางบัว-บัวขาว
15	MA01	วาง NA plate บนตะกร้าเพาะเห็ดฟางภายในบริเวณโรงเรือนทดลองจุดที่ 1
16	MA02	วาง NA plate บนตะกร้าเพาะเห็ดฟางภายในบริเวณโรงเรือนทดลองจุดที่2
17	MK01	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่1
18	MK02	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่2 จุดที่1
19	MK03	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่2 จุดที่2
20	MK05	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่3
21	MK06	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่4
22	MK07	วัสดุเพาะเห็ดฟาง โรงเรือนทดลองตะกร้าที่5
23	MT01	วาง NA plate บนแปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว
24	MTC04	วัสดุเพาะเห็ดฟาง แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว
25	MTC05	วัสดุเพาะเห็ดฟาง แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว

หมายเหตุ: BC คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟาง ฟาร์มเพาะเห็ดฟางบางบัว-บัวขาว

BF คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อมของกองปุ๋ยหมักและการเพาะเห็ดฟาง กองเดี่ยว

MA คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อม ในโรงเรือนทดลองภาควิชาจุลชีววิทยา

MK คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟางในตะกร้าในโรงเรือนทดลองภาควิชาจุลชีววิทยา

MT คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากสภาพแวดล้อม แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว

MTC คือ เชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกจากวัสดุเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว แปลงสาธิตการเพาะเห็ดฟางกองเดี่ยว

3.2 ผลการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method) ให้ผลดังตารางที่ 9

ตารางที่ 9 แสดงผลการจัดจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยวิธีดั้งเดิม (Conventional method)

การทดสอบ	แบคทีเรียทดสอบ										
	BC01	BC02	B03	BC05	BC06	BF02	BF04	MK07	MA02	MK02	MK05
Bacillus group	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IB	IA	IA	IA
Aerobe	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Facul. Anaerobe	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Oxidase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Catalase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
VP test	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
pH in 7days VP	5.8	6	6	6.1	6.1	6	5.9	6	4.8	5.2	4.9
Nitrate reduction	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Growth in											
NB pH 5.7	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NB+NaCl 5%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NB+NaCl 7%	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
NB+NaCl 10%	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-
Acid from											
D-glucose	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
L-arabinose	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-
D-xylose	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
D-mannitol	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Lactose	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Utilization of											
Citrate	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Propionate	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Enzyme production											
Amylase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Caseinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Gelatinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Urease	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
Esculinase	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Phenylalanine deaminase	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Lecithinase	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
Lipase (Tween 80 agar)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(Tween 40 agar)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
(Tween 20 agar)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

แบคทีเรียทั้งหมดที่นำมาจำแนกชนิดสามารถจัดเข้าในสกุล *Bacillus* ตามเกณฑ์เดิมของ Claus and Berkley (1986) และ Gordon (1989) เนื่องจาก มีรูปร่างท่อน สร้างสปอร์ เป็น aerobe หรือ facultative anaerobe และจากคุณสมบัติทางสัณฐานวิทยาพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้มีความแตกต่างในเรื่องของขนาดความกว้างของเซลล์ จึงสามารถจัดได้เป็น 2 กลุ่มคือกลุ่ม IA ได้แก่ ไอโซเลต MA02, MK02 และ MK05 แบคทีเรียกลุ่มนี้มีขนาดความกว้างของเซลล์ มากกว่า 1 μm และมีแกรนูลในเซลล์ มีสปอร์เป็นรูปวงรีหรือทรงกระบอก ที่ไม่ทำให้เซลล์โป่งออก กลุ่ม IB ได้แก่ ไอโซเลต BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, BF02, BF04 และ MK07 แบคทีเรียกลุ่มนี้ขนาดความกว้างของเซลล์น้อยกว่า 1 μm มีสปอร์เป็นรูปวงรีหรือทรงกระบอก ที่ไม่ทำให้เซลล์โป่งออก

เมื่อนำผลทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียในกลุ่ม IA จำนวน 3 ไอโซเลต ดังกล่าว (ผลได้แสดงไว้ในตารางที่ 9) ไปเปรียบเทียบกับข้อมูลของ Claus and Berkley (1986) และ Logan and De Vos (2009) พบว่าใกล้เคียงกับ *Bacillus thuringiensis* มากที่สุด เนื่องจากอยู่ในกลุ่ม IA ที่เป็น facultative anaerobe, สร้าง crystal protein ใน cytoplasm ให้ผลบวกกับการทดสอบ VP, nitrate reduction เจริญได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth pH 5.7 nutrient broth (NB) ที่ผสมเกลือ NaCl 5% และ 7% แต่ไม่เจริญใน NB ที่ผสมเกลือ NaCl 10% สามารถสร้างเอนไซม์ catalase, amylase, caseinase, gelatinase, lipase (จาก Tween 20, Tween 40 และ Tween 80) lecithinase esculinase ไม่สร้างเอนไซม์ phenylalanine deaminase, urease สามารถสร้างกรดจาก D-glucose แต่ไม่สร้างกรดจาก L-arabinose, D-xylose, D-mannitol และ lactose สามารถใช้ citrate และ propionate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ยกเว้น MA02 ที่ให้ผลต่างออกไปคือให้ผลลบกับ VP test รวมทั้งการใช้ propionate เป็นแหล่งคาร์บอนได้ ซึ่งโดยปกติแล้ว *Bacillus thuringiensis* ควรให้ผล VP เป็นบวก และไม่สามารถใช้ propionate เป็นแหล่งคาร์บอน

เมื่อนำผลทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาของแบคทีเรียในกลุ่ม IB 8 ไอโซเลต เปรียบเทียบกับข้อมูลจาก Claus and Berkley (1986) พบว่าแบคทีเรียเหล่านี้มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากที่สุด เนื่องจากเป็น *Bacillus* ในกลุ่ม IB ที่ให้ผลบวกกับเกือบทุกคุณสมบัติที่ทำการทดสอบดังข้อมูลที่แสดงไว้ในตารางที่ 9 การทดสอบที่ให้ผลลบคือ การสร้างเอนไซม์ oxidase, phenylalanine deaminase utilization of citrate การทดสอบที่ให้ผลแตกต่างกันในกลุ่มคือมีทั้งบวกและลบได้แก่ การเจริญในอาหาร NB ที่มีเกลือ NaCl 10% การสร้างเอนไซม์ lipase และการสร้างเอนไซม์ urease ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับข้อมูลเกี่ยวกับ *B. subtilis* ที่ได้เคยมีรายงานไว้ใน Logan and De Vos (2009) ว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* ให้ผลการทดสอบ urease เป็นลบ ทำให้การระบุชนิดยังไม่ชัดเจนพอ นอกเหนือไปกว่านี้ยังมีแบคทีเรียชนิดใหม่ที่แตกออกมาจาก *B. subtilis* และใกล้เคียงกับ *B. subtilis* หลายสปีชีส์ เช่น *B. amyloliquefaciens*, *B. mojavensis*, *B. atrophaeus*, *B. vallismortis* เป็นต้น ดังนั้นจึงควรทำการทดสอบทางชีวเคมีเพิ่มเติมหรือทำการทดสอบโดยวิธีอื่น เช่น นำไปทดสอบด้วยวิธีการทางโมเลกุลเพื่อให้สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ชัดเจนยิ่งขึ้น

3.3 การจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ GEN III Microplate

ทดสอบกับเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC02, BC05 และ BF02 พบว่าแบคทีเรียทั้ง 3 ไอโซเลต ดังกล่าวมีค่าความเหมือนที่ใกล้เคียงกับ *B. subtilis* มากที่สุดดังข้อมูลในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 แสดงผลการจัดจำแนกเชื้อแบคทีเรียด้วยชุดทดสอบ GEN III Microplate

ลำดับที่	ชื่อไอโซเลต	ค่าความเหมือน	ชื่อเชื้อ
1	BC02	0.592	<i>Bacillus subtilis</i>
2	BC05	0.793	<i>Bacillus subtilis</i>
3	BF02	0.838	<i>Bacillus subtilis</i>

หมายเหตุ: ค่าความเหมือน หมายถึงค่าที่แสดงถึงความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิง ซึ่งค่าที่วัดได้ควรเข้าใกล้ 1.0 มากที่สุด

4. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการนำเชื้อแบคทีเรียไปใช้ในการส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟางในฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร

4.1 การทดสอบเบื้องต้นโดยใช้เชื้อ *B. subtilis* B2

การตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดลอง โดยวิธีการ spread plate บนอาหาร nutrient agar บ่มไว้เป็นเวลา 1 วัน นำมาตรวจนับจำนวนให้ผลดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดลอง โดยวิธีการ spread plate บนอาหาร nutrient agar

ลำดับที่	กรรมวิธีทดลอง	จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (cfu/ml)
1	เชื้อตั้งต้น (1 loop ใน NB 100 ml) Suspension (10 ml ใน NB 200ml)	5.35×10^7
2	(กรรมวิธีที่ 5)	3.65×10^7
3	Supernatant (กรรมวิธีที่ 3)	5.4×10^4
4	Pellet (กรรมวิธีที่ 4)	8.3×10^7

หมายเหตุ: -กรรมวิธีที่ 3 คือ น้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่แยกเอาแต่ส่วนใส (supernatant)
-กรรมวิธีที่ 4 คือ ตะกอนเซลล์ของเชื้อแบคทีเรียหลังปั่นแยกอาหารเลี้ยงเชื้อออกไป (pellet)
-กรรมวิธีที่ 5 คือ เชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (suspension)

4.2 การฉีดพ่นเชื้อแบคทีเรียทดสอบในฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร

จากการศึกษาวิธีต่างๆในการนำเชื้อแบคทีเรียทดสอบไปฉีดพ่นในฟาร์มเพาะเห็ดฟางของเกษตรกร ที่อำเภอภาชี จังหวัดพระนครศรีอยุธยา พบว่าการฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าซึ่งเป็นกรรมวิธีควบคุม (control) ผลผลิตของเห็ดฟางจะน้อยกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรีย และเมื่อนำแต่ละวิธีในการทดสอบมาเปรียบเทียบกัน พบว่าการนำเอาเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหาร nutrient broth (suspension) มาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟางนั้นสามารถให้ผลผลิตของเห็ดฟางได้มากที่สุด ดังแสดงในตารางที่ 12

ตารางที่ 12 แสดงผลผลิตเห็ดฟางสายพันธุ์อยุธยาเมื่อฉีดพ่น เชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 เพื่อหาสถานะที่เหมาะสมในการนำแบคทีเรียไปใช้ช่วยส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟาง

กรรมวิธีทดลอง	น้ำหนักของเห็ดฟาง (กก./ตร.ม.)		สายพันธุ์เห็ดฟาง	เวลาเก็บผลผลิต
	โรงเรือนที่ 1	โรงเรือนที่ 2		
Water (Control)	2.36 ^a (ผลจาก 1 โรงเรือน)			
Nutrient broth (NB) (control)	2.40 ^a	3.26 ^b		
Supernatant	3.52 ^b	3.95 ^{bc}	อยุธยา	12 วัน
Pellet	3.50 ^b	4.57 ^c		
Suspension	3.64 ^b	4.63 ^c		

หมายเหตุ: ^{a,b,c} คือ ค่าการจัดกลุ่มจากการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ ตามวิธีของ Duncan หมายถึงสามารถจัดกลุ่มได้เป็น 3 กลุ่ม คือ a, b และ c เนื่องจากมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ลักษณะของดอกเห็ดฟางสายพันธุ์อยุธยาจากการทดลองในแต่ละกรรมวิธี ดังแสดงในภาพที่ 7-9



ภาพที่ 7 (ชั้นบน) ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลองกรรมวิธีที่ 2 (NB (control)) และ (ชั้นล่าง) ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลองกรรมวิธีที่ 3 (supernatant)



ภาพที่ 8 (ชั้นบน) ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลองกรรมวิธีที่ 4 (pellet) และ (ชั้นล่าง) ลักษณะดอกเห็ดฟางจากการทดลองกรรมวิธีที่ 5 (suspension)



ภาพที่ 9 ลักษณะดอกเห็ดฟางบนชั้นเพาะที่ฉีดพ่นด้วยน้ำเปล่าเป็นกรรมวิธีควบคุม (control)



ภาพที่ 10 แสดงลักษณะของเชื้อราแข่งขันที่พบบริเวณชั้นเพาะเห็ดฟางในโรงเรือนทดสอบ

1) ลักษณะของ *Bolbitius fissus* (เห็ดถั่วอกหัวโต) เชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางในโรงเรือนทดลอง

2) ลักษณะของ *Coprinus* sp. (เห็ดน้ำหมึก) เชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางในโรงเรือนทดลอง

5. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟางเพื่อการนำไปใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ

5.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียตั้งต้นในแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดลอง โดยวิธีการ spread plate บนอาหาร nutrient agar บ่มไว้เป็นเวลา 1 วัน นำมาตรวจนับจำนวน ผลดังแสดงในตารางที่ 13

ตารางที่ 13 แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบตั้งต้นที่ใช้ในการทดลอง

ครั้งที่	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแบคทีเรีย (10 ml ในอาหาร	เชื้อแบคทีเรีย ตั้งต้น (1 loop ใน
		NB 200 ml (cfu/ml))	อาหาร NB 100 ml (cfu/ml))
1	BC05	6.60×10^7	5.55×10^7
	BC02	6.65×10^7	5.20×10^7
	BF04	4.45×10^7	4.35×10^7
	MA02	1.30×10^8	1.31×10^8
	MK02	1.52×10^8	1.52×10^8
	MK05	9.95×10^7	1.74×10^8
2	BC05	5.65×10^7	5.30×10^7
	BC03	7.50×10^7	7.10×10^7
	BF02	8.30×10^7	7.60×10^7
3	MK07	4.40×10^7	4.50×10^7
	7A/2(1)	4.90×10^7	4.75×10^7
4	MK07	6.85×10^7	5.90×10^7
	7A/2(1)	4.65×10^7	5.10×10^7

5.2 การเก็บผลผลิตของดอกเห็ดฟางและการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ได้ พบว่า การใช้น้ำเปล่า อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth และเชื้อแบคทีเรียในการฉีดพ่นบนวัสดุเพาะของเห็ดฟาง ให้ผลผลิตที่ไม่แตกต่างกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 14

ตารางที่ 14 ผลผลิตของเห็ดฟางในการนำเชื้อแบคทีเรียไปทดสอบการส่งเสริมผลผลิตของเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ (แต่ละกรรมวิธีที่ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)

ครั้งที่	โรงเรือนที่ 1			โรงเรือนที่ 2			ผลผลิตเห็ดฟาง
	แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	ผลผลิตเห็ด (กก./ตร.ม.)	แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	ผลผลิตเห็ด (กก./ตร.ม.)	
1	BC05	อยุธยา	4.12 ^a	BC02	Vvol-019	3.47 ^a	13 วัน
	MK02		3.73 ^a	BF04		3.53 ^a	
	MA02		3.67 ^a	MK05		3.15 ^a	
	น้ำเปล่า			น้ำเปล่า			
	(control)		3.85 ^a	(control)		3.26 ^a	
2	BC05	Vvol-009	4.66 ^a	BC05	Vvol-037	4.64 ^a	4 วัน
	BC03		4.43 ^a	BC03		4.10 ^a	
	BF02		4.64 ^a	BF02		4.22 ^a	
	NB			NB			
	(control)		4.52 ^a	(control)		3.87 ^a	
3	MK07	Vvol-045	3.37 ^a	MK07	Vvol-071	3.37 ^a	8 วัน
	7A/2(1)		3.42 ^a	7A/2(1)		3.47 ^a	
	NB			NB			
	(control)		3.64 ^a	(control)		3.49 ^a	
	น้ำเปล่า			น้ำเปล่า			
	(control)		3.42 ^a	(control)		3.38 ^a	
4	MK07	Vvol-024	3.71 ^a	MK07	Vvol-029	3.17 ^a	7 วัน
	7A/2(1)		3.73 ^a	7A/2(1)		3.14 ^a	
	NB			NB			
	(control)		3.60 ^a	(control)		3.29 ^a	
	น้ำเปล่า		3.68 ^a	น้ำเปล่า		3.31 ^a	
	(control)			(control)			

หมายเหตุ: ^a คือ ค่าการจัดกลุ่ม จากการวิเคราะห์ทางสถิติ สามารถจัดกลุ่มได้กลุ่มเดียว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

เนื่องจากว่า เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการเก็บผลผลิตของดอกเห็ดฟางที่ได้ในการทดลองแต่ละวิธี จากการทดลองทั้ง 4 ครั้ง นำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 พบว่าผลผลิตที่ได้ในแต่ละครั้งและแต่ละวิธีการทดลอง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) จึงทำให้การทดลองทั้ง 4 ครั้ง ยังไม่สามารถจะคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมกับสายพันธุ์ของเห็ดฟางได้ แต่ถ้าหากลองพิจารณาจากค่าน้ำหนักของดอกเห็ดที่ได้จะพบว่า ผลผลิตที่ได้จากการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC05 จะให้ผลผลิตที่ค่อนข้างสูงมากกว่าแบคทีเรียไอโซเลตอื่นๆ ซึ่งมีแนวโน้มที่น่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรียที่อาจจะช่วยส่งเสริมผลผลิตเห็ดฟางได้ผลดี จึงต้องมีการทดลองเพื่อพิสูจน์ต่อไปอีกครั้ง โดยทำการวางแผนการทดลองใหม่ด้วยวิธี Randomized Complete Block Design (RCBD) เพื่อช่วยลดปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกที่นำจะมีผลกระทบต่อผลการทดลอง

6. การคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เหมาะสมต่อสายพันธุ์ของเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธีการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD)

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี คือ วิธีที่ 1 นำวัสดุมาทั้งบนวัสดุเพาะ เพื่อแบ่งพื้นที่การทดลองแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกัน และวิธีที่ 2 แบ่งพื้นที่ในการทดลองของแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน เพื่อควบคุมให้การทดลองในแต่ละกรรมวิธีอยู่ในสภาวะแวดล้อมเดียวกัน และช่วยลดปัจจัยเสี่ยงจากภายนอกที่อาจจะมีผลกระทบต่อผลการเจริญของดอกเห็ด เช่น อุณหภูมิ ความชื้น เป็นต้น

6.1 การทดลองวิธีที่ 1 แบ่งพื้นที่การทดลองแต่ละชั้นเพาะออกเป็น 4 ส่วนเท่าๆกันทำการทดลองในระหว่างเดือนมีนาคม-เดือนมิถุนายน 2556 เตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบแบบ suspension และทำการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละวิธีที่ใช้ในการทดลอง โดยวิธี spread plate บนอาหาร nutrient agar บ่มไว้เป็นเวลา 1 วัน ตรวจนับจำนวนให้ผลดังแสดงในตารางที่ 15

ตารางที่ 15 แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 1

ครั้งที่	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแบคทีเรีย (10 ml ในอาหาร NB 200 ml (cfu/ml))	เชื้อแบคทีเรีย ตั้งต้น (1 loop ในอาหาร NB 100 ml (cfu/ml))
1	BC02	7.10×10^7	6.13×10^7
	BC03	8.45×10^7	7.80×10^7
	BC05	ND	ND
	BF02	ND	ND
	<i>B. subtilis</i> B2	1.18×10^8	9.10×10^7
	<i>B. subtilis</i> พลายแก้ว	ND	ND
2	BC02	ND	ND
	BC03	ND	ND
	BC05	5.10×10^8	1.25×10^8
	BF02	1.32×10^8	8.85×10^7
	<i>B. subtilis</i> B2	ND	ND
	<i>B. subtilis</i> พลายแก้ว	ND	ND
3	BC02	ND	ND
	BC03	ND	ND
	BC05	1.20×10^8	8.96×10^7
	BF02	ND	ND
	<i>B. subtilis</i> B2	ND	ND
	<i>B. subtilis</i> พลายแก้ว	1.34×10^8	9.85×10^7
4	BC02	1.10×10^8	9.16×10^7
	BC05	8.70×10^7	7.10×10^7
	<i>B. subtilis</i> B2	1.18×10^8	9.70×10^7

หมายเหตุ: ND หมายถึง ไม่ได้ทำการตรวจนับเชื้อแบคทีเรียทดสอบ

การเก็บผลผลิตของดอกเห็ดฟางและการวิเคราะห์ข้อมูลในการทดลองวิธีที่ 1 เก็บผลผลิตของเห็ดฟางที่ได้มาชั่งน้ำหนักและนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS (Statistics Package for the Social Sciences) version 11.5 เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากการทดลองในแต่ละวิธี ดังแสดงผลในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 แสดงผลผลิตเห็ดฟางจากการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD
(แบ่งชั้นเพาะเป็น 4 ส่วน)

ครั้งที่	ผลผลิตของเห็ดฟาง										เวลาเก็บผลผลิต
	โรงเรือนที่1					โรงเรือนที่2					
	กรรมวิธี		น้ำหนัก(กก./ตรม.)			กรรมวิธี		น้ำหนัก(กก./ตรม.)			
	แบบที่เรีย	สายพันธุ์เห็ดฟาง	แถวที่1	แถวที่2	แถวที่3	แบบที่เรีย	สายพันธุ์เห็ดฟาง	แถวที่1	แถวที่2	แถวที่3	
1	1) BC02 2) BC03 3) <i>B.subtilis</i> B2 ^b 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	1.68 ^a 1.28 ^a 1.38 ^a 1.13 ^a	1.35 ^a 1.38 ^a 1.28 ^a 1.30 ^a	1.33 ^a 1.01 ^a 1.20 ^a 1.10 ^a	1) BC05 2) BF02 3) <i>B. subtilis</i> พลายแก้ว ^c 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	1.15 ^a 1.15 ^a 1.58 ^a 1.60 ^a	1.03 ^a 1.18 ^a 1.03 ^a 1.08 ^a	0.93 ^a 0.90 ^a 0.68 ^a 0.88 ^a	7 วัน
2	1) BC02 2) BC03 3) <i>B.subtilis</i> B2 ^b 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	Vvol-009	1.11 ^a 1.21 ^a 0.98 ^a 1.17 ^a	1.17 ^a 1.30 ^a 1.25 ^a 1.34 ^a	1.28 ^a 1.00 ^a 1.24 ^a 1.41 ^a	1) BC05 2) BF02 3) <i>B. subtilis</i> ^c พลายแก้ว 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	Vvol-009	1.15 ^a 1.18 ^a 1.05 ^a 0.89 ^a	1.17 ^a 1.00 ^a 1.10 ^a 1.01 ^a	0.72 ^a 0.64 ^a 0.87 ^a 0.82 ^a	3 วัน
3	1) BC02 2) BC03 3) <i>B.subtilis</i> B2 ^b 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	2.73 ^a 2.98 ^a 2.88 ^a 2.63 ^a	2.65 ^a 2.63 ^a 2.58 ^a 2.98 ^a	2.53 ^a 2.43 ^a 2.63 ^a 2.83 ^a	1) BC05 2) BF02 3) <i>B. subtilis</i> พลายแก้ว ^c 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	2.65 ^a 2.98 ^a 2.63 ^a 2.65 ^a	2.83 ^a 2.55 ^a 2.83 ^a 2.60 ^a	2.25 ^a 2.53 ^a 2.33 ^a 2.45 ^a	8 วัน
4	1) BC02 2) BC05 3) <i>B.subtilis</i> B2 ^b 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	3.75 ^a 3.78 ^a 3.78 ^a 3.86 ^a	3.55 ^a 3.68 ^a 3.73 ^a 2.73 ^a	3.53 ^a 3.38 ^a 3.70 ^a 3.93 ^a	1) BC02 2) BC05 3) <i>B.subtilis</i> B2 ^b 4) Control (ปกติไม่ฉีดพ่น)	อูรุธยา	3.48 ^a 3.58 ^a 3.23 ^a 3.68 ^a	3.65 ^a 3.48 ^a 3.83 ^a 3.75 ^a	3.35 ^a 3.30 ^a 3.50 ^a 3.75 ^a	5 วัน

ตารางที่ 16 (ต่อ)

หมายเหตุ: ^a คือ ค่าการจัดกลุ่มจากการวิเคราะห์ทางสถิติ สามารถจัดกลุ่มได้กลุ่มเดียว หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

^b *B. subtilis* B2 คือ เชื้อแบคทีเรียจากงานวิจัยของ Payapanon และคณะ (2011) ซึ่งมี รายงานว่าช่วยส่งเสริมผลผลิตเห็ดฟางได้ผลดี

^c *B. subtilis* พลายแก้ว คือ เชื้อแบคทีเรียทางการค้า ซึ่งใช้ในการช่วยยับยั้งเชื้อรา แข่งขันและเชื้อราก่อโรคในเห็ด

6.2 การทดลองวิธีที่ 2 แบ่งพื้นที่เพาะแต่ละชั้นออกเป็น 2 ส่วนเท่าๆกัน ทำการทดลองระหว่างเดือน พฤศจิกายน 2556-เดือนมีนาคม 2557 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียทดสอบและการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียแต่ละ วิธีที่ใช้ในการทดลองทำเช่นเดียวกับวิธีการทดลองที่ 1 ผลการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบแสดงใน ตารางที่ 17

ตารางที่ 17 แสดงการตรวจนับจำนวนของเชื้อแบคทีเรียทดสอบที่ใช้ในการทดลองวิธีที่ 2

ครั้งที่	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแบคทีเรีย (10 ml ใน อาหาร NB 200 ml (cfu/ml))	เชื้อแบคทีเรีย ตั้งต้น (1 loop ในอาหาร NB 100 ml (cfu/ml))
1	BC02	7.80×10^7	6.90×10^7
	BC03	6.10×10^7	5.03×10^7
	BC05	5.95×10^7	5.15×10^7
	BF02	8.35×10^7	7.60×10^7
	<i>B. subtilis</i> B2	7.22×10^7	7.76×10^7
2	BC02	7.30×10^7	6.90×10^7
	BC05	6.80×10^7	6.60×10^7
3	BC05	5.15×10^8	4.15×10^8
	<i>B. subtilis</i> B2	5.70×10^8	4.55×10^8

การเก็บผลผลิตของดอกเห็ดฟางและการวิเคราะห์ข้อมูลในการทดลองวิธีที่ 2 ผลผลิตเห็ดฟางที่ได้นำมาชั่ง น้ำหนักและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 11.5 เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของผลผลิตที่ได้แต่ละวิธีการทดลอง ดังตารางที่ 18

ตารางที่ 18 แสดงผลผลิตเห็ดฟางจากการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design; RCBD (แบ่งชั้นเพาะเป็น 2 ส่วน)

ครั้งที่	โรงเรือนที่ 1			โรงเรือนที่ 2			เวลาเก็บผลผลิต
	เชื้อ แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	ผลผลิตเห็ด (กก./ตร.ม.)	เชื้อ แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	ผลผลิตเห็ด (กก./ตร.ม.)	
1	BC02	อยุธยา	2.48 ^a	BC02	อยุธยา	2.94 ^a	6 วัน (21-22 ^o C)
	BC03		2.23 ^a	BC03		3.08 ^a	
	BC05		2.96 ^a	BC05		3.03 ^a	
	BF02		2.53 ^a	BF02		2.96 ^a	
	<i>B. subtilis</i> B2		2.61 ^a	<i>B. subtilis</i> B2		3.06 ^a	
	ไม่ฉีดพ่น		2.16 ^a	ไม่ฉีดพ่น		2.76 ^a	
	(control)			(control)			
2	BC02	อยุธยา	-	BC02	อยุธยา	-	ไม่มีผลผลิต (16-18 ^o C)
	BC05		-	BC05		-	
	ไม่ฉีดพ่น			ไม่ฉีดพ่น			
	(control)		-	(control)		-	
3	BC05	อยุธยา	2.66 ^a	BC05	อยุธยา	2.71 ^a	8 วัน (21-22 ^o C)
	<i>B. subtilis</i> B2		2.63 ^a	<i>B. subtilis</i> B2		2.36 ^a	
	ไม่ฉีดพ่น			ไม่ฉีดพ่น			
	(control)		2.70 ^a	(control)		2.58 ^a	

หมายเหตุ: - หมายถึง ไม่สามารถเก็บผลผลิตเห็ดฟางได้ เนื่องจากอุณหภูมิภายในโรงเรือนทดลองต่ำเกินไป (ประมาณ 16-18 °C) ทำให้เส้นใยเห็ดเจริญช้า และไม่สามารถพัฒนาเป็นดอกเห็ดได้

จากตารางที่ 16 และ 18 ผลการทดลองที่ได้จากการวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) โดยการแบ่งพื้นที่ออกเป็น 4 ส่วน และ 2 ส่วนนั้น เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า การไม่ฉีดพ่นใดๆ (control) และการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียแต่ละไอโซเลต บนวัสดุเพาะเห็ดฟางก่อนการเพาะเห็ด ให้ผลการทดลองไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยจะเห็นได้จากข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 16 และ 18 ในแต่ละการทดลองมีค่าที่ใกล้เคียงกันมาก จนไม่สามารถเปรียบเทียบความแตกต่างกันได้

อภิปรายและวิจารณ์ผล

จากการทดลอง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์จากสภาพแวดล้อมในการเพาะเห็ดฟางและวัสดุเพาะเห็ดฟางได้จำนวน 25 ไอโซเลต และเมื่อนำแบคทีเรียที่คัดแยกได้มาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชและราแข่งขันเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธี dual culture พบว่าผลไม่เป็นไปตามที่คณะผู้วิจัยตั้งไว้ คือแบคทีเรียที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ดีจะสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางด้วย แต่ก็ไม่ได้ช่วยในการกระตุ้นการสร้างตุ่มดอกในเห็ด ซึ่งถ้าแบคทีเรียมีผลชะลอการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางและมีผลให้เห็ดฟางสร้างตุ่มดอกได้ น่าจะสามารถกระตุ้นให้เห็ดฟางออกดอกได้มากขึ้นเมื่อนำไปใช้ในระดับโรงเรือน ดังนั้น ผู้วิจัยจึงได้ทดลองนำแบคทีเรียทั้งชนิดที่ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ดี และชนิดที่ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ไม่ดี ไปทำการทดสอบในโรงเรือน ผลพบว่าแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ดีให้ผลผลิตของเห็ดฟางมากกว่าแบคทีเรียที่ยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ไม่ดี และรวมถึงกรรมวิธีควบคุมด้วย แต่เมื่อนำมาทำการทดลองแบบ RCBD พบว่าผลผลิตเห็ดฟางที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ในทุกการทดสอบ ซึ่งผลนี้ไม่สอดคล้องกับผลการทดลองที่ผ่านมาของ Payapanon และคณะ (2011) ที่รายงานว่า การนำน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนโดสปอร์ของ *Bacillus subtilis* B2 ที่แยกได้จากพื้นที่ที่ใช้เพาะเห็ดฟาง และ *Paenibacillus polymyxa* N10 แยกได้จากเปลือกปอสา (mulberry) มาฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟาง ในอัตราส่วน 1 ลิตรต่อพื้นที่ 4 ตารางเมตร สามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้ ผู้วิจัยคิดว่าสภาวะแวดล้อมน่าจะมีบทบาทสำคัญอย่างมากต่อการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง ดังนั้นหากเราทำการควบคุมปัจจัยภายนอกโดยการสร้างโรงเรือนที่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ให้เหมาะสมกับความต้องการของเห็ดฟางทั้งในระยะเดินเส้นใยและในระยะสร้างดอก และทำการทดลองซ้ำๆ จะทำให้สามารถได้ผลการทดลองที่คงที่และน่าเชื่อถือ จากผลการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียที่คัดแยกได้ พบว่ายังไม่สามารถจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ ควรทำการทดสอบเพิ่มเติมทั้งในด้านคุณสมบัติทางชีวเคมี และรวมถึงการนำไปศึกษาด้วยวิธีทางโมเลกุลเพื่อให้สามารถจัดจำแนกชนิดได้อย่างชัดเจน

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์จากสภาพแวดล้อมในการเพาะเห็ดฟางและวัสดุเพาะเห็ดฟาง สามารถแยกเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ได้จำนวน 25 ไอโซเลต นำมาทดสอบการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ต่อเชื้อราสาเหตุโรคพืชและราแข่งขันเชื้อเห็ดฟาง โดยวิธี dual culture พบว่าสามารถแบ่งแบคทีเรียได้ 2 กลุ่ม คือกลุ่มที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้ดีแต่ในขณะเดียวกันก็สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางด้วย ซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียในกลุ่มนี้จำนวน 8 ไอโซเลตและ กลุ่มที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อราสาเหตุโรคและราแข่งขันได้น้อย และสามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางได้น้อยด้วย ผู้วิจัยจึงได้ทดลองคัดเลือกแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งดีและไม่ดีจากทั้งสองกลุ่มนี้มาทดสอบความสามารถในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางในโรงเรือน ผลพบว่าแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งดีจะสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้มากกว่าแบคทีเรียที่มีผลการยับยั้งไม่ดี เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียมาจำแนกชนิดโดยวิธี

ดั้งเดิม (conventional method) พบว่าแบคทีเรียที่คัดแยกได้จำนวน 8 ไอโซเลต ได้แก่ BC01, BC02, BC03, BC05, BC06, BF02, BF04 และ MK07 มีคุณสมบัติทางชีวเคมีและสรีรวิทยาที่ใกล้เคียงกับเชื้อ *Bacillus subtilis* แต่สามารถสร้างเอนไซม์ urease ได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้แตกต่างจากคุณสมบัติของ *B. subtilis* ที่เคยมีรายงานไว้ใน Logan and De Vos (2009) เมื่อทดลองนำแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต ได้แก่ BC05, BC02 และ BF02 ไปทดสอบการจำแนกชนิดโดยวิธี Biolog Gen III microplate พบว่าใกล้เคียงกับเชื้อ *B. subtilis* มากที่สุด แต่ค่าความเหมือนกับเชื้อแบคทีเรียอ้างอิงยังไม่มากพอที่จะระบุว่าเป็น *B. subtilis* ได้ จึงยังไม่สามารถระบุได้ว่าแบคทีเรียกลุ่มนี้คือ *Bacillus subtilis* ซึ่งควรมีการทำการทดลองเพิ่มเติมเพื่อให้ได้ผลการจัดจำแนกที่แน่นอนต่อไป เช่น อาจจะต้องนำไปศึกษาด้วยวิธีทางโมเลกุลต่อไป เพื่อให้ได้ผลการจำแนกที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ส่วนเชื้อแบคทีเรียอีก 3 ไอโซเลต ได้แก่ MA02, MK02 และ MK05 จากผลการจัดจำแนกชนิดโดยวิธีดั้งเดิม พบว่าใกล้เคียงกับ *Bacillus thuringiensis* มากที่สุด

การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเตรียมเชื้อแบคทีเรียเพื่อนำไปใช้ในการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางในโรงเรือนที่มีประสิทธิภาพที่สุด พบว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth (suspension) ให้ผลผลิตมากกว่ากรรมวิธีอื่น และเมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ไปทำการทดสอบความสามารถเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางในระดับโรงเรือน ผลพบว่าการทดลองในแต่ละกรรมวิธีจะให้ผลผลิตเห็ดที่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และปริมาณของผลผลิตเห็ดแต่ละครั้งในกรรมวิธีควบคุมมีความผันแปรค่อนข้างมาก ซึ่งอาจเพราะมีปัจจัยภายนอกหลายประการที่ส่งผลกระทบต่ออาการเจริญของเส้นใยและการสร้างดอกเห็ด เช่น ปัจจัยของ อุณหภูมิ ความชื้น ที่เปลี่ยนแปลงไปในแต่ละฤดูกาลที่แตกต่างกันทำให้ผลการทดลองในแต่ละครั้งที่ทำการศึกษามีความผันแปรค่อนข้างมาก ดังนั้นการทำการทดลองเพิ่มเติมหลายๆ ครั้ง และควบคุมปัจจัยภายนอกที่อาจมีผลต่อการเจริญและสร้างดอกเห็ดจะทำให้ได้ผลการทดลองที่แน่ชัดขึ้นว่าเชื้อแบคทีเรียสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดได้จริงหรือไม่ แต่จากการทดลองพบว่า เชื้อราแข่งขันของเห็ดฟางในโรงเรือนลดลง และเมื่อพิจารณาจากค่าของตัวเลขจากผลผลิตของเห็ดฟางที่ได้จากการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต BC05 ให้ผลการทดลองที่โดดเด่นกว่าไอโซเลตอื่นๆ และมีแนวโน้มว่าจะสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้

เรื่องที่ควรดำเนินการวิจัยต่อ

1. ควรทำการศึกษาโดยพยายามควบคุมปัจจัยภายนอกที่มีผลต่อการให้ผลผลิตของเห็ดฟาง เพื่อให้การทดลองในแต่ละครั้งให้ผลผลิตที่แน่นอนคงที่ โดยทำการทดลองซ้ำๆ เพื่อให้สามารถได้ผลการทดลองที่แน่นอนและมั่นใจได้ว่าผลผลิตเห็ดฟางที่เพิ่มขึ้น เป็นผลมาจากการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียทดสอบจริงๆ
2. สร้างโรงเรือนที่สามารถควบคุมปัจจัยต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญและสร้างดอกเห็ด เพื่อให้ผลการทดลองที่เชื่อถือได้
3. เมื่อได้ผลการทดลองที่ชัดเจนแล้ว ควรทำการทดลองเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตที่ให้ผลการเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางดีจนสร้าง endospore แล้วลองเก็บในรูปแบบแห้ง แล้วทดลองให้เกษตรกรนำไปเพิ่มจำนวนในนมถั่วเหลือง

ที่มีขายตามท้องตลาด แทนการเพิ่มจำนวนในอาหาร nutrient broth แล้วนำไปฉีดพ่นในโรงเรือนเพาะเห็ดฟาง เพื่อทดสอบว่ายังคงสามารถเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางได้หรือไม่ เพื่อจะได้พัฒนาเชื้อแบคทีเรียไอโซเลตนั้นให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่มีประโยชน์และสามารถใช้ได้ง่ายเพื่อแจกจ่ายให้เกษตรกรที่อื่นๆ ได้ทดลองใช้ต่อไป

4. ควรศึกษาวิธีการตรวจสอบประสิทธิภาพการเกิดดอกมากน้อยของสายพันธุ์ต่างๆ ของเห็ดฟางในห้องปฏิบัติการ เพื่อทดแทนการทดลองในโรงเรือน เช่น ทดสอบการกระตุ้นการเกิดตุ่มดอกโดยการบ่มใน growth chamber ที่สามารถควบคุมความชื้น และอุณหภูมิที่ต่างๆ กันได้

บรรณานุกรม

- บุษบา ล้อประเสริฐ. 2542. **เห็ดฟาง**. ชมรมนักเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย. เพื่อนเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ประสาน ยิ้มอ่อน. 2549. **การเพาะเห็ด**. คณะเทคโนโลยีการเกษตร, มหาวิทยาลัยราชภัฏวไลยอลงกรณ์ในพระบรมราชูปถัมภ์, กรุงเทพฯ.
- มนตรี บุญจรัส. 2553. **จุลินทรีย์บีเอสพลาเยกัว ปราบเชื้อราศัตรูตัวสำคัญของเกษตรกรผู้เพาะเห็ด; ผืนแผ่นดินไทย ปลุกพืชได้ไร้สารพิษ**. ชมรมเกษตรปลอดสารพิษ. แหล่งที่มา: <http://tree2520.wordpress.com/2012/01/04/จุลินทรีย์บีเอสพลาเยกัว>, 29 มิถุนายน 2556.
- พรศิลป์ สีเผือก และ คมสัน นันทสุนทร. 2548. **การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มศักยภาพการเพาะเห็ดของชุมชน: กรณีศึกษาจังหวัดนครศรีธรรมราช**. คณะเกษตรศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย, นครศรีธรรมราช.
- สุทธิชัย สมสุข. 2553. ผลของการใช้วัสดุเพาะและวัสดุอาหารเสริมชนิดต่าง ๆ ร่วมกับกลุ่มจุลินทรีย์และน้ำหมักชีวภาพต่อผลผลิตเห็ดฟางที่เพาะในตะกร้าพลาสติก. น. 17-36. ใน **วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี 8(2)**. ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี, มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์, กรุงเทพฯ. แหล่งที่มา: http://www.tstj.research.tu.ac.th/Issue18No2_PDF/paper3.pdf, 29 มิถุนายน 2556.
- สำเนาวิ ฤทธิสุข. 2551. **สูตรเด็ดการเพาะเห็ดฟางในตระกร้า**. เกษตรกรรมธรรมชาติ, กรุงเทพฯ.
- อัจฉรา พยัพพานนท และ สัญชัย ตันตยาภรณ์. 2535. การใช้ขี้เลื่อยไมยางพาราและขี้ฟ้ายเพาะเห็ดฟางในโรงเรือน. น. 73-84. ใน **รายงานผลงานวิจัยกองโรคพืชและจุลชีววิทยา ป 2535**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- อัจฉรา พยัพพานนท์ พัฒนา รุ่งระวี เทวินทร์ กุลปิยะวัฒน์ และอภิรัชต์ สมฤทธิ. 2550. การจัดระบบการผลิตที่มีผลต่อการให้ผลผลิตเห็ดฟาง. ใน **แบบรายงานเรื่องเต็มผลการทดลองที่สิ้นสุดปีงบประมาณ 2550**. กรมวิชาการเกษตร, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, กรุงเทพฯ.
- Castle, A., Speranzini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinde, D. and Bissett. J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolated on north American mushroom farms. **Appl. Environ. Microbiol.** 64: 133-137.
- Claus, D. and R. C. W. Berkeley. 1986. Endospore forming Gram positive Rods and Cocci, pp. 1105-1139. In Sneath, P. H. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, J. G. Holt, M. D. Baltimore, Williams and Wilkins, eds. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology** 2. Springer, London.

- Gerben, S. W., O. Tineke. P.G.G. Jane, M. A. Jos, J.M. OP Den Camp Huub and J.L.D. Van Griensven Leo. 1994. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in Botton Mushroom Compostand Its Effect on Yield. **Applied and Environment Microbiology**. 6(9): 3049-3054.
- Gordon, R. E. 1989. The genus *Bacillus*. pp. 109–126. *In* W. M. O Leary, ed. **Practical Handbook of Microbiology**. CNC press, Florida.
- Ferreira, J.H.S., F.N. Matther and A.C. Thomas. 1991. Biological control of *Euthypa lata* on grapevine by an antagonistic strain of *Bacillus subtilis*. **Phytopathology**. 81: 283-287.
- Fermor, T.R., P.E. Randle and J.E. Smith. 1985. Compost as a subtrate and its preparation. pp. 81-109. *In* P.B. Flegg, D.M. Spencer and D.A. Wood, eds. **The Biology and Technology of The Cultivated Mushroom**. Jonh Wiley & Sons, Chichester United Kingdom.
- Fiddaman, P.J. and S. Rossall. 1993. The production of antifungal volatiles by *Bacillus subtilis*. **Journal of Applied Bacteriology**. 74: 119-126.
- Logan, N. A and P. De Vos. 2009. Genus1 *Bacillus*. pp. 20-122. *In* The Firmicutes, ed. **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, 2nd ed (3)**. Springer, London.
- Nalisha, I., M. Muskhazli and T. NorFarizan. 2006. Production of bioactive compounds by *Bacillus subtilis* against *Sclerotium rolfsii*. **Malaysian Journal of Microbiology**. 2(2): 19-23.
- Payapanon, A. 1998. **Technique for indoor straw mushroom production**. Technical paper, Division of Plant Pathology and Microbiology, Department of Agriculture, Bangkok. 65p.
- Payapanon, A. and P. Pitukpriwan. 2003. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in straw mushroom compost for promoting the production of *Volvariella volvacea*. (Abstracts). pp. 41. *In* **Bio Thailand 2003 Technology for Life. 17-20 July 2003**. PEACH, Pattaya, Chonburi, Thailand.
- Payapanon, A., S. Suthirawut, P. Roongrawee, T. Kulpiyawat and A. Somrith. 2008. Production process on the composting for straw mushroom cultivation. pp 1694-1701. *In* **Plant Protection Research and Development Office Annual Report**. Agriculture, Ministry of Agriculture and Cooperatives, Bangkok.

- Payapanon, A. Suthirawut, S., Roongrawee, P., Kulpiyawat, T. and A. Somrith. 2011. Increase in Yield of the Straw mushroom (*Volvariella volvacea*) by Supplement with *Paenibacillus* and *Bacillus* to the Compost. **Journal Faculty of Agriculture**. Kyushu University, Hakazoki, Fukuoka 812, Japan. 56 (2): 249-254.
- Sittidilokratna, C., S. Suthirawut, L. Chitradon, V. Punsuvon, P. Vaithanomsat and P. Siriacha. 2007. **Screening of Pectinase Producing Bacteria and Their Efficiency in Bio Pulping of Paper Mulberry Bark**. Science Asia. 33:131–135.

ชื่อโครงการ 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

บทคัดย่อ

เพื่อหาวิธีตรวจสอบประสิทธิภาพการเกิดดอกมากน้อยของสายพันธุ์เห็ดฟางในห้องปฏิบัติการที่สะดวกและประหยัดกว่าวิธีเดิมที่ต้องทดสอบในแปลงเพาะ จึงออกแบบการทดสอบโดยการกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกของเห็ดฟางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Agar โดยเลี้ยงเชื้อเห็ดฟางกลางจานอาหารแล้วขีดเชื้อแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10 หรือ *Bacillus subtilis* B2 ล้อมรอบเป็นรูปสี่เหลี่ยม บ่มให้เชื้อเห็ดเจริญนานกว่า 4 สัปดาห์แล้วตรวจผลโดยสังเกตจากจำนวนและขนาดของตุ่มดอกที่พบ จากการทดสอบกับเชื้อเห็ดฟาง 8 สายพันธุ์ในอาหาร PDA ที่เตรียมโดยใช้น้ำประปาและน้ำกรอง ปรับ pH ของอาหารให้เป็น 6, 6.5, 7 และ 7.5 ตลอดจนปรับปริมาณวุ้นในอาหารเป็น 1.5 %และ 2% เพื่อปรับความชื้นของอาหารเลี้ยงเชื้อให้แตกต่างกัน บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ผลการทดลองพบว่าไม่สามารถเกิดตุ่มดอกได้ไม่ว่าใช้เชื้อเห็ดสายพันธุ์ใด อย่างไรก็ตามยังไม่ได้มีการทดลองเปรียบเทียบการบ่มเชื้อใน อุณหภูมิและความชื้นที่แตกต่างกัน

Abstract

To find method for evaluate the quality of production yield of straw mushroom culture which more comfortable and low cost than testing in farm, laboratory test by dual culture between antagonistic bacteria and mushroom mycelium was designed. Each mushroom mycelium was cut by cork boiler and put on the center of Potato Dextrose Agar plate and bacterial culture of *Paenibacillus polymyxa* N10 or *Bacillus subtilis* B2 was streak in rectangle direction around mushroom culture. A number of different size of pinheads formation were expected to appear after 2 weeks incubation at room temperature. Anyway, there was no pinhead formation found from any of 8 strains of mushroom tested by this method inspite of varying pH of PDA to 6, 6.5, 7 and 7.5 or changing % agar from 1.5 to 2% for comparing the moisture content in agar medium. However, comparative studies including incubation temperature and moisture level were still not determined.

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

การตรวจสอบคุณภาพเส้นใยเห็ดฟางในห้องปฏิบัติการว่าสามารถให้ผลผลิตได้มากน้อยเพียงใดยังไม่มีรายงาน ดังนั้นการเก็บเชื้อเห็ดฟางในแหล่งเก็บเชื้อโดยวิธีเส้นใยเห็ดในน้ำหรือในแซนวิชไนโตรเจนเหลวซึ่งเป็นที่

นิยมในปัจจุบันอาจทำให้เกิดความผันแปรทางพันธุกรรมบางประการที่มีผลต่อผลผลิตเห็ดที่ได้ การตรวจสอบการให้ผลผลิตของเส้นใยเห็ดฟางในปัจจุบันที่หน่วยเก็บเชื้อเห็ดที่กรมวิชาการเกษตรทำได้คือทำในแปลงเพาะเห็ด ซึ่งต้องสิ้นเปลืองทางเศรษฐกิจ เปลืองพื้นที่ และใช้เวลา งานวิจัยนี้จึงออกแบบการทดลองเพื่อให้สามารถตรวจสอบคุณภาพเส้นใยเห็ดฟางได้ง่ายในห้องปฏิบัติการ โดยใช้แบคทีเรียสร้างสปอร์ 2 ชนิดคือ *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus subtilis* B2 เลี้ยงร่วมเชื้อเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์ และตรวจสอบการสร้างตุ่มดอก (pinhead) บนอาหารวุ้น หากพบว่าเห็ดฟางสายใดเกิดตุ่มดอกมาก หลังจากเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย ชนิดดังกล่าว จะได้นำไปทดสอบในโรงเรือนต่อไปว่าสามารถให้ผลผลิตสูงสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งหากเป็นจริงดังคาดก็จะได้วิธีตรวจสอบเส้นใยเห็ดฟางว่ามีประสิทธิภาพในการออกดอกที่ง่าย รวดเร็วและประหยัด

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

ปัจจัยที่สำคัญต่อการผลิตเห็ดฟางในโรงเรือนมีหลายประการ เช่น ประสิทธิภาพของเชื้อในการสร้างดอกเห็ด คุณภาพของวัสดุเพาะเห็ด อุณหภูมิและความชื้นของอากาศ หัวเชื้อเห็ดฟางเป็นปัจจัยหลักซึ่งยังไม่มีวิธีชี้วัดว่าเห็ดฟางที่ใช้มีประสิทธิภาพในการเกิดดอกได้ดีหรือไม่ นอกจากการตรวจสอบในแปลงเพาะซึ่งยุ่งยาก สิ้นเปลืองแรงงาน เวลา และต้นทุน ซึ่งบางครั้งมีการต่อเชื้อบนอาหารวุ้นเป็นระยะ ทำให้เชื้อเห็ดเสื่อมคุณภาพลง ซึ่งเป็นผลเสียในแง่เศรษฐกิจเนื่องจากเกษตรกรไม่สามารถตรวจสอบก่อนว่า เชื้อเห็ดมีประสิทธิภาพเพียงใด อัจฉราและคณะ (2541) ได้รวบรวมและคัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางไว้เป็นเชื้อพันธุ์บริการของศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์แห่งประเทศไทย โดยจำนวนไม่น้อยกว่า 6 สายพันธุ์ เป็นสายพันธุ์สำหรับจำหน่าย เป็นสายพันธุ์ที่คงลักษณะพันธุ์เดิมด้วยวิธีการเก็บรักษาแบบต่างๆ กัน เช่น การเก็บในน้ำกลั่นนิ่งฆ่าเชื้อ หรือเก็บในไนโตรเจนเหลว อย่างไรก็ตาม ขั้นตอนในการตรวจสอบคุณภาพสายพันธุ์ เป็นสิ่งจำเป็นที่หน่วยเก็บรวบรวมเชื้อเห็ดฟาง จำเป็นต้องทำเป็นระยะ เพื่อตรวจสอบว่าแต่ละสายพันธุ์ ยังคงลักษณะเดิมจริงหรือไม่ โดยวิธีตรวจสอบจากผลผลิตในแปลงเพาะ เนื่องจากงานวิจัยของ อัจฉราและคณะ (2553) พบว่าแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus* sp. B2 สามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟาง (Biological efficiency yield) ได้อย่างมีนัยสำคัญจากการทดลองเพาะในระดับโรงเรือนเป็นเวลานาน 2-3 ปี นอกจากนี้ยังพบว่า เมื่อเลี้ยงแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้ร่วมกับเชื้อเห็ดฟางบนอาหาร PDA เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์ เชื้อเห็ดฟางมีการสร้างตุ่มดอก (pinheads) เกิดขึ้นซึ่งเป็นจุดเริ่มต้นของการสร้างดอกเห็ดที่พบได้ทั่วไปในแปลงเพาะ (Chang, S.T and T.H. Quimio, 1989) โดยทั่วไปการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางบนอาหารวุ้นจะพบการสร้างตุ่มดอกได้น้อยมากไม่ว่าจะเลี้ยงนานเท่าใดก็ตาม (Payapanon, A., personal communication) เนื่องจากข้อมูลนี้ยังไม่มีผู้รายงานมาก่อนจึงมีสมมุติฐานว่าแบคทีเรียทั้งสองชนิดอาจสร้างสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่กระตุ้นการเกิดดอกได้ ดังนั้นได้นำไปทดสอบกับเชื้อเห็ดฟางชนิดต่างๆ จากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางของกรมวิชาการเกษตรเพื่อตรวจสอบว่าสายพันธุ์ใดสามารถสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้นที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย โดยเปรียบเทียบทั้งจำนวนและขนาดของตุ่มดอกตลอดจนเวลาที่ใช้ เมื่อได้สายพันธุ์ที่สร้างตุ่มดอกมากน้อยต่างกัน แล้ว

จึงทำการทดสอบผลผลิตในระดับแปลงเพาะเพื่อให้ผลสอดคล้องกันหรือไม่ ซึ่งหากเป็นไปตามสมมุติฐาน วิธีนี้จะสามารถพัฒนาเป็นแนวทางในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางหรือเป็นตัวบ่งชี้ต่อการให้ผลผลิตในแปลงเพาะที่ง่าย สะดวกและประหยัดต่อไป การวิจัยนี้ จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อพัฒนาวิธีการตรวจสอบคุณภาพสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางที่ง่ายสะดวกและประหยัดต้นทุนกว่าวิธีเดิม

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1.1 การเตรียมสายพันธุ์เชื้อเห็ดฟางจากแหล่งรวบรวมสายพันธุ์จากกรมวิชาการเกษตร

ถ่ายเชื้อจากแหล่งเก็บเชื้อในน้ำและถ่ายเชื้อสายพันธุ์เดียวกันที่เก็บในไนโตรเจนเหลวมาทำ stock เชื้อเห็ดฟางที่พร้อมใช้โดยเก็บเชื้อชั่วคราวในอาหารวุ้น PDA

1.2 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย (สำหรับการทดลองบนอาหารวุ้น PDA)

ถ่ายเชื้อจาก stock เชื้อ *Bacillus subtilis* B2 และ *Paenibacillus polymyxa* N-10 โดยเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar ให้มีอายุ 24-48 ชั่วโมง นอกจากเชื้อดังกล่าวยังใช้ *Bacillus* spp. ชนิดต่างๆที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทดลอง ทดสอบร่วมด้วยเพื่อเป็น negative control

1.3 การเตรียมอาหารวุ้น PDA สำหรับการทดสอบการเกิด pinhead

เตรียมอาหาร PDA โดยใช้น้ำประปาและน้ำกรอง ในส่วนของน้ำประปาปรับค่า pH ของอาหาร ให้เป็น 6.0, 6.5, 7.0 และ 7.5 และน้ำประปาปรับค่า pH ให้เป็น 6.0 และอาหารอีกหนึ่งชุดปรับความเข้มข้นของวุ้นให้เป็น 2% หลังจากนั้นนำไป sterile โดยวิธี autoclave แล้วใช้กรดแลคติก และโซเดียมไฮดรอกไซด์เพื่อปรับค่า pH

1.4 การทดสอบการเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA

เทอาหารวุ้นแต่ละชนิดปริมาณ 15 มิลลิตรลงในแต่ละจาน ใช้ cock borer ขนาด 4 มิลลิเมตรตดขึ้นวุ้นที่มีเส้นใยเห็ดฟางเจริญที่ระยะเดียวกัน (ที่เลี้ยงไว้ล่วงหน้าบนจานอาหารวุ้น PDA นาน 4-6 วัน ขึ้นกับชนิดสายพันธุ์) วางตรงกลางจานอาหารแล้วขีดเชื้อแบคทีเรียจาก ข้อ 1.2 เป็นเส้นสี่เหลี่ยมล้อมรอบเส้นใยเห็ดฟางโดยแต่ละเส้นห่างจากขอบจานอาหาร 2 เซนติเมตร บ่มเชื้อให้เจริญนานประมาณสองถึงสามสัปดาห์ที่อุณหภูมิห้องสังเกตผลการเกิดตุ่มดอก โดยเปรียบเทียบจากปริมาณ ขนาด และเวลาที่พบ เปรียบเทียบการเกิดตุ่มดอกในสถานะของอาหารเลี้ยงพร้อมที่แตกต่างกันพร้อมทั้งตรวจสอบการสร้าง pinheads บนอาหารวุ้น PDA ที่มี pH ต่างกันว่าให้ผลแตกต่างกันอย่างไร

1.5 การตรวจสอบผลผลิตของเห็ดฟางในแปลงเพาะ

คัดเลือกสายพันธุ์เห็ดฟางจากผลที่สามารถสร้าง ตุ่มดอก มาก สร้างน้อยและไม่สร้าง มาตรวจสอบการสร้างผลผลิตเห็ดฟางจากแปลงเพาะในโรงเรือนในฟาร์มเพาะเห็ดของเกษตรกรจังหวัดพระนครศรีอยุธยา โดยเปรียบเทียบผลผลิตจากแต่ละสายพันธุ์ทั้งวิธีใส่เชื้อแบคทีเรียในวัสดุเพาะและไม่ใส่

ผลการวิจัย

1. ได้เก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดฟาง ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ โดยได้รับความอนุเคราะห์จากกรมวิชาการเกษตรและจากฟาร์มเห็ด อำเภอกาฬสินธุ์ จังหวัดอุดรธานี ข้อมูลของแหล่งที่มาได้แสดงไว้ใน ตารางที่ 19

ตารางที่ 19 สายพันธุ์เห็ดฟางที่รวบรวมเพื่อใช้ในการวิจัย (ทุกสายพันธุ์ได้รับความอนุเคราะห์จากศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร)

ลำดับที่	สายพันธุ์เห็ดฟาง	แหล่งที่มา (จังหวัด)
1	Vvol-002	ศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ด กรมวิชาการเกษตร
2	Vvol-006	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ จ.สตูล
3	Vvol-007	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ จ.ชลบุรี
4	Vvol-009	ฟางข้าว/ อ. วิหารแดง สระบุรี
5	Vvol-010	ฟางข้าว/ จ.อ่างทอง
6	Vvol-011	ฟางข้าว/ จ.อุดรธานี
7	Vvol-014	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ จ.สุราษฎร์ธานี
8	Vvol-016	ซังข้าวโพด/ จ.ลพบุรี
9	Vvol-017	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ ฟาร์มโกหย่ง จ.ปทุมธานี
10	Vvol-019	ฮ้องกง
11	Vvol-021	ฟางข้าว/จ.เชียงใหม่
12	Vvol-023	ฟางข้าว/ จ.เชียงราย
13	Vvol-024	เปลือกกาแฟ / อ.สวี่ จ.ชุมพร
14	Vvol-025	ผักตบชวา/ ศูนย์พิภูลทอง จ.นราธิวาส
15	Vvol-029	ฮ้องกง
16	Vvol-030	เปลือกมัน/จ. ชัยภูมิ
17	Vvol-033	ฟางข้าว/ จ.อุดรธานี
18	Vvol-037	ปุ๋ยเชื้อเพาะขี้เถ้า/ V45 จ. นนทบุรี
19	Vvol-040	ฟางข้าว/ จ.เชียงใหม่
20	Vvol-042	ปุ๋ยเชื้อเพาะขี้เถ้า/ จ.นนทบุรี
21	Vvol-044	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ จ.ชุมพร
22	Vvol-045	ฟางข้าว/จ.นนทบุรี
23	Vvol-050	ฟางข้าว /ต.วังอ้อ อ. เขื่องใน จ.อุบลราชธานี
24	Vvol-051	ฟางข้าว / จ.อุดรธานี
25	Vvol-071	หาดใหญ่/ จ.สงขลา
26	Vvol-076	ทะเลสาบปาล์มน้ำมัน/ V47-ทลป-บัวขาว จ. นนทบุรี

2. การทดสอบการเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA

2.1 ใช้อาหารวุ้นที่ทำมาจากน้ำกรองที่ไม่ได้ปรับ pH ทำการทดสอบเบื้องต้นในการสร้างตุ่มดอกของเห็ดฟางบางสายพันธุ์

จากผลการทดลองตามแผนงานการวิจัยได้ทำการเก็บรวบรวมสายพันธุ์เห็ดฟางได้ทั้งหมด 26 สายพันธุ์ ซึ่งเห็ดฟางแต่ละสายพันธุ์นั้นพบลักษณะการเจริญของเส้นใยที่แตกต่างกันบนอาหารวุ้น PDA บางสายพันธุ์พบการเจริญของเส้นใยที่ฟู ส่วนบางสายพันธุ์นั้นเส้นใยแบนราบติดกับอาหารวุ้น ในตอนต้นได้เริ่มทำการทดสอบเบื้องต้นเรื่องการสร้างตุ่มดอกของเห็ดฟาง 5 สายพันธุ์โดยเลือกจากสายพันธุ์ที่เกษตรกรนิยมนำใช้ในการเพาะเห็ด จากผลการทดสอบหลังจากบ่มเชื้อนานกว่า 1 เดือนพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* B2 และ *Paenibacillus polymyxa* N10 มีการยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดฟางทั้ง 5 สายพันธุ์คือ Vvol-002, Vvol-006, Vvol-007, Vvol-009 และ Vvol-0010 อย่างเห็นได้ชัดคือ เส้นใยของเห็ดฟางจะเจริญกระจุกอยู่ตรงกลาง ไม่สามารถแผ่กระจายได้เต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อเหมือนจานควบคุมโดย *Paenibacillus polymyxa* N10 สามารถยับยั้งเส้นใยเห็ดแต่ละสายพันธุ์ได้มากกว่า *Bacillus subtilis* B2 เนื่องจากเส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญข้ามแนวเชื้อแบคทีเรียได้ ขณะที่เมื่อทดสอบ ร่วมกับ *Bacillus subtilis* B2 เส้นใยเห็ดจะชะงักการการเจริญ ในช่วงแรกไม่สามารถเจริญข้ามแนวแบคทีเรียได้ แต่เมื่อผ่านไประยะเวลาหนึ่ง เส้นใยเห็ดสามารถเจริญข้ามแนวแบคทีเรียได้แม้ว่าเส้นใยจะเบาบางลงเมื่อเทียบกับจานควบคุม (ในบางสายพันธุ์ของเชื้อเห็ด) อย่างไรก็ตามไม่พบการสร้างตุ่มดอกในการทดสอบครั้งนี้เลย (ผลการทดสอบได้แสดงไว้ในตารางที่ 20) จึงไม่สอดคล้องกับที่ Payapanon และคณะ (2011) ได้รายงานไว้ขั้นตอนไปจึงวางแผนการทดลองโดยควบคุมปัจจัยต่างๆที่อาจเกี่ยวข้อง เช่น ค่า pH ความชื้นของอาหาร อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มเชื้อ เป็นต้น เนื่องจากการเตรียมอาหารครั้งแรกอาหารวุ้นแต่ละครั้งที่เตรียมและนำมาใช้มีค่าความเป็นกรดต่างที่แตกต่างกันเนื่องจากใช้น้ำกรองของหน่วยงาน ที่มีค่าความเป็นกรดและต่างที่ไม่แน่นอนและผู้วิจัยไม่ได้ตระหนักถึงปัญหาข้อนี้ สภาวะหลังจากเจริญของแบคทีเรียอาจจะไม่เหมาะสมต่อการสร้างตุ่มดอกของเห็ดฟางในจานอาหารที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียก็อาจเป็นไปได้ เนื่องจากอาหารนี้มี สาร dextrose เป็นแหล่ง คาร์โบไฮเดรต ซึ่งแบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้ในขบวนการหมักและเกิดผลิตภัณฑ์ที่เป็นกรดต่างๆได้ ซึ่งจะมีผลให้ ค่า pH ของอาหารเปลี่ยนแปลงเป็นกรดมากขึ้น ซึ่งหากไม่ได้ปรับค่า pH เริ่มต้นของอาหารแต่ละครั้ง ย่อมทำให้ pH ของอาหารที่เตรียมแต่ละครั้งแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลให้ค่า pH ในอาหารหลังจากการเจริญของแบคทีเรียแตกต่างกันไปด้วย

ตารางที่ 20 ผลการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างตุ่มดอกโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด	สูตรอาหารเลี้ยง	ผลการทดลอง
<i>Paenibacillus polymyxa</i> N10	Vvol -002	อาหาร PDA ปกติ	ไม่พบการสร้างตุ่มดอก
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Vvol -006		
	Vvol -007		
	Vvol -009		
	Vvol -010		

2.2 การทดสอบการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้น potato dextrose agar ที่มีการปรับสูตร

ในการทดลองขั้นต่อไปได้มีการปรับเปลี่ยนวิธีการ โดยเปรียบเทียบชนิดของน้ำที่ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้งน้ำประปาและน้ำกรอง และมีการปรับค่า pH ให้ได้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี pH เริ่มต้นแตกต่างกัน คือ 6, 6.5, 7, 7.5 รวมถึงปรับความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อโดยเพิ่มปริมาณวุ้นเป็น 2% เพื่อให้ความเข้มข้นของอาหารเลี้ยงเชื้อลดลง โดยแผนการศึกษาได้แสดงไว้ในตารางที่ 21

ตารางที่ 21 แผนการศึกษาประสิทธิภาพการสร้างตุ่มดอกโดยแบคทีเรียสร้างสปอร์ที่ใช้อาหาร PDA ที่มีการปรับสูตร

สายพันธุ์แบคทีเรีย	สายพันธุ์เห็ด ฟางที่ใช้ทดสอบ	อาหาร PDA ที่มีการปรับสูตร
<i>Paenibacillus polymyxa</i> N10	Vvol-019	น้ำประปา pH 6
<i>Bacillus subtilis</i> B2	Vvol-021	น้ำกรอง pH 6
	Vvol-024	น้ำกรอง pH 6.5
	Vvol-029	น้ำกรอง pH 7
	Vvol-045	น้ำกรอง pH 7.5
	Vvol-051	น้ำกรองวุ้น 2%
	Vvol-071	
	อยุธยา	

ผลการศึกษา พบว่าเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 จะเจริญได้ดีจนเข้าใกล้รอยแบคทีเรียที่ขีดไว้ แต่ไม่สามารถเจริญเต็มจานอาหารเหมือนจานควบคุมที่ไม่ได้ขีดรอยแบคทีเรียไว้ และเมื่อเวลาผ่านไปช่วงหนึ่งเส้นใยของเชื้อเห็ดฟางจะสามารถเจริญผ่านแนวแบคทีเรียที่ขีดได้ (ในบางสายพันธุ์) ส่วนเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรีย *P. polymyxa* N10 เส้นใยเห็ดฟางจะถูกยับยั้งได้มากกว่าเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับ แบคทีเรีย *B. subtilis* B2 คือเส้นใยเห็ดฟางจะเจริญกระจุกอยู่บริเวณตรงกลางของจานอาหารและเจริญอย่างหนาแน่น และบางสายพันธุ์

เส้นใยของเห็ดฟางจะพยายามเจริญขึ้นเป็นแนวตรงขึ้นบนผาจานอาหาร ซึ่งอาจเนื่องมาจากเส้นใยเห็ดฟางถูกแบคทีเรียยับยั้งจึงต้องพยายามเจริญหนีไปในทิศทางอื่นอย่างไรก็ตาม ในทุกกรรมวิธีที่ทดสอบ ไม่พบการสร้างตุ่มดอกเลย ซึ่งแสดงให้เห็นว่า จากสายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ทั้งหมด 8 สายพันธุ์ รวมกับสายพันธุ์ที่ทดสอบในเบื้องต้นอีก 5 สายพันธุ์ รวมสายพันธุ์เห็ดฟางที่ใช้ทั้งหมด 13 สายพันธุ์ เมื่อเลี้ยงร่วมกับแบคทีเรียคัดเลือกจะสามารถเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้ คือ *P. polymyxa* N10 และ *B. subtilis* B2 ไม่สามารถเกิดตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA ในช่วง pH 6, 6.5, 7 และ 7.5 ตลอดจนอาหาร PDA pH 6 ที่เตรียมจากน้ำประปาก็ตาม นอกจากนี้การลดความชื้นในอาหารโดยเพิ่มปริมาณวุ้นให้เป็น 2% ก็ไม่มีผลต่อการสร้างตุ่มดอกบนอาหารวุ้น PDA เช่นกัน

เนื่องจากการทดลองนี้ขาดข้อมูลเรื่องปัจจัยที่มีผลต่อการสร้างตุ่มดอกของเชื้อเห็ดฟางในจานอาหารเลี้ยงเชื้อเนื่องจากไม่มีข้อมูลที่รายงานจากงานวิจัยทำให้เป็นอุปสรรคต่อการทดลองครั้งนี้ การเกิดตุ่มดอกในสภาพธรรมชาติที่พบจากโรงเรือนเพาะเห็ดเกิดได้ง่ายกว่าอาจเนื่องจากความสมบูรณ์ของอาหารที่มาจากปุ๋ยหมักและฟางข้าว ตลอดจนความชื้นในวัสดุเพาะเห็ด ความชื้นและอุณหภูมิในโรงเรือนเป็นต้น สิ่งที่ไม่สามารถทำได้ในการทดลองนี้คือ เรื่องอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ในการบ่มเชื้อ เนื่องจากในห้องปฏิบัติการขาด moist chamber ที่สามารถควบคุมเรื่องอุณหภูมิ และความชื้น จึงทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถบรรลุผล

ตารางที่ 22 การทดสอบการสร้างตุ่มดอกของเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *B. subtilis* B2

สายพันธุ์เห็ดฟาง	อาหารวุ้น PDA ที่ปรับสูตร					
	น้ำประปา	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง+วุ้น
	pH 6	6	6.5	7	7.5	2%
Vvol-019	-	-	-	-	-	-
Vvol-021	-	-	-	-	-	-
Vvol-024	-	-	-	-	-	-
Vvol-029	-	-	-	-	-	-
Vvol-045	-	-	-	-	-	-
Vvol-051	-	-	-	-	-	-
Vvol-071	-	-	-	-	-	-
อยุธยา	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + คือพบการสร้างตุ่มดอก - คือไม่พบการสร้างตุ่มดอก

ตารางที่ 23 การทดสอบการสร้างตุ่มดอกของเชื้อเห็ดฟางที่เลี้ยงร่วมกับแบคทีเรีย *Paenibacillus polymyxa* N10

สายพันธุ์เห็ดฟาง	อาหารวุ้น PDA ที่ปรับสูตร					
	น้ำประปา	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง pH	น้ำกรอง+วุ้น
	pH 6	6	6.5	7	7.5	2%
Vvol-019	-	-	-	-	-	-
Vvol-021	-	-	-	-	-	-
Vvol-024	-	-	-	-	-	-
Vvol-029	-	-	-	-	-	-
Vvol-045	-	-	-	-	-	-
Vvol-051	-	-	-	-	-	-
Vvol-071	-	-	-	-	-	-
อยุธยา	-	-	-	-	-	-

หมายเหตุ + คือพบการสร้างตุ่มดอก - คือไม่พบการสร้างตุ่มดอก

อภิปรายและวิจารณ์ผล

การที่ไม่ประสบความสำเร็จในการกระตุ้นให้เกิดตุ่มดอกบนอาหารเลี้ยงเชื้อไม่ว่าจะปรับสภาพแวดล้อมทางกายภาพเช่น ความชื้นของอาหาร ความเป็นกรดต่างของอาหาร เนื่องจากข้อมูลจาก Payapanon., *et al.* (2011) ที่รายงานการเกิดตุ่มดอกนั้นไม่มีข้อมูลในเรื่องปัจจัยทางกายภาพอธิบายไว้ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบได้ อีกทั้งยังไม่มีรายงานเรื่องการเกิดตุ่มดอกเห็ดฟางบนอาหารจากงานวิจัยอื่นๆ ทำให้เป็นอุปสรรคต่อการทดลองครั้งนี้ การเกิดตุ่มดอกในสภาพธรรมชาติที่พบจากโรงเรือนเพาะเห็ดเกิดได้ง่ายกว่า เนื่องจากความสมบูรณ์ของอาหารที่มาจากปุ๋ยหมักและฟางข้าว ตลอดจนความชื้นในวัสดุเพาะเห็ด ความชื้นและอุณหภูมิในโรงเรือน เป็นต้น สิ่งที่ไม่สามารถทำได้ในการทดลองนี้คือ เรื่องอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ในการบ่มเชื้อ เนื่องจากในห้องปฏิบัติการขาด moist chamber ที่สามารถควบคุมเรื่องอุณหภูมิ และความชื้น จึงทำให้การทดลองนี้ไม่สามารถทดสอบเพิ่มเติมในเรื่องของอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ในการบ่มเชื้อว่าจะมีผลต่อการสร้างตุ่มดอกหรือไม่ อย่างไรก็ตามเนื่องจากวัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้เพื่อต้องการตรวจสอบสายพันธุ์เห็ดฟางในห้องปฏิบัติการว่ามีประสิทธิภาพในการเกิดดอกมากน้อยเพียงใด ซึ่งโดยหลักการแล้วถ้าใช้วัสดุเพาะจากธรรมชาติจะไม่สามารถควบคุมสารอาหารให้เท่ากันได้ ทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลได้ การเปลี่ยนไปใช้อาหาร synthetic medium หลายๆ สูตร ที่มีแหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แร่ธาตุ วิตามิน growth factor ที่แตกต่างกัน เพื่อเลียนแบบวัสดุเพาะจากธรรมชาติให้มากที่สุด อาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจ นอกเหนือจาก ความชื้นของอาหาร ความเป็นกรดต่างของอาหาร ตลอดจนอุณหภูมิ ความชื้นในการบ่มเชื้อดังที่กล่าวมาแล้ว

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียสร้างสปอร์ *Paenibacillus polymyxa* N10 และ *Bacillus subtilis* B2 ร่วมกับ เชื้อเห็ดฟาง 8 สายพันธุ์ บนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar ที่ปรับปริมาณวุ้นให้เป็น 1.5% และปรับ pH ให้อยู่ในระดับ 6, 6.5, 7 และ 7.5 หรือปรับ pH ให้เป็น 6 แต่ใส่วุ้น 2% หรือ ใช้น้ำประปาเปรียบเทียบกับน้ำกรอง ในการเตรียมอาหาร ก็ไม่สามารถทำให้เกิดตุ่มดอกได้

เนื่องจากยังขาดการทดสอบเรื่องอุณหภูมิและความชื้นที่ใช้ในการบ่ม จึงขอเสนอแนะให้ใช้อุณหภูมิและความชื้นร่วมเป็นตัวแปรในการทดสอบต่อไปหากสามารถทำได้

บรรณานุกรม

- อัจฉรา พยัพพานนท์, 2541. การเชื้อเห็ดฟางในน้ำ. หน้า 24-48 ใน **เห็ดไทย 2540-2541**. สมาคมนักวิจัยและเพาะเห็ดแห่งประเทศไทย, กรุงเทพมหานคร.
- Chang, S.T. and T.H. Quimio. 1982. **Tropical Mushrooms Biological Nature and Cultivation Methods**. The Chinese University Press. 489 pp.
- Hu, K.J., S.F. Song and P.G. Miles, 1976. **The comparison of compost made of different raw materials for *Volvariella volvacea***. Mushroom Sci. 9(1):687-90.
- Payapanon, A. and P. Pitukpriwan. 2003. Inoculation of *Scytalidium thermophilum* in straw mushroom compost for promoting the production of *Volvariella volvacea*. (Abstracts) pp.41. In **Bio Thailand 2003 Technology for Life. 17-20 July 2003**. PEACH, Pattaya, Chonburi, Thailand.
- Payapanon, A. Suthirawut, S., Roongrawee, P., Kulpiyawat, T. and A. Somrith. 2010. To increase the straw mushroom yield with *Bacillus* sp. pp.432-435. In **The proceeding of 16th Asean Agricultural Symposium 1th International on Agricultural Technology (Sufficiency Agriculture)**. King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang, Bangkok, Thailand.
- Payapanon, A., Suthirawut, S., Shompoosang, S., Tsuchiya, K., Furuya, N., Roongrawee, P., Kulpiyawat, T. and Somrith, A. 2011. **Increase in yield of the straw mushroom by supplemented with *Paenibacillus* and *Bacillus* to the compost**. J. Fac. Agr., Kyushu Univ., 56((2):249-254.

ชื่อหัวหน้าแผนงานและคณะนักวิจัย

1. ชื่อ - นามสกุล(ภาษาไทย) นาง สุรางค์ สุธีราวุธ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Surang Suthirawut
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
โทรศัพท์ 02-562-5555 โทรสาร 02-5792081
e-mail : fscisrs@ku.ac.th
2. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางอัจฉรา พัยพานนท์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Ahchara Payapanon
หน่วยงาน กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ โทร. 02-579-8558
e-mail : ahchara_p@yahoo.com
3. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาง เยวภา อร่ามศิริรุจิเวทย์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mrs. Yaovapa Aramsirujiwet
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ
โทรศัพท์ 02-562-5555 ต่อ 4012 โทรสาร 02-579-2081
e-mail: fsciypt@ku.ac.th
4. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายสุเทพ ญาติ
หน่วยงาน ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทรศัพท์ 02-562-5555 ต่อ 4028 โทรสาร 02-579-2081
5. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นาย อภิรัชต์ สมฤทธิ์
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) MR. APIRUSHT SOMRITH
หน่วยงาน กลุ่มวิจัยโรคพืช สำนักวิจัยพัฒนาการอารักขาพืช กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร
กรุงเทพฯ 10900, โทรศัพท์: 0-2579-5581
e-mail: apirush009@yahoo.com
6. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นายกรกช จันทร
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Mr. Korakoch Chantorn
หน่วยงาน สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด กรมวิชาการเกษตร เขตจตุจักร
กรุงเทพมหานคร 10900
โทรศัพท์ 02-5798558
e-mail: peter_corp_doremon@hotmail.com, kerogoch@gmail.com