การศึกษาประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสและการประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคราดำของเห็ดนางฟ้าภูฐาน

Study on Efficacy of *Bacillus* Powder and Its Application to Control Black Mold Disease of Grey Oyster Mushroom

ปัณณวิชญ์ เย็นจิตต์[1] และ วาริน อินทนา[2*]
Punnawich Yenjit[1] and Warin Intana[2*]

Abstract

A total 8 isolates (PB1-PB8) of *Bacillus* spp. were isolated from grey oyster mushroom using dilution spread plate technique (on nutrient glucose agar). In dual culture test, all isolates provided 3.10 - 5.65 millimetersof inhibition zone against the mycelial growth of *Aspergillus niger*, a causal agent of black mold disease. Only 2 isolates of *Bacillus* spp. (PB6 and PB8) gave no inhibition to the growth of grey oyster mushroom. Therefore,the *Bacillus* isolates were selected to formulate as bacterial powder having the concentrations of 6.28×10^6 and 6.53×10^6 CFU/g. Both bacterial powders showed significant effects to control black mold disease and increase grey oyster mushroom yields compared with the control 2 (only *A. niger*). The bacterial powerof PB6 showed only 19.12% of black mold disease and 763.13 g/bag of mushroom yield, while the control showed highest disease incidence of 85.10% and lowest yield of 408.46 g/bag. PB6 and PB8 isolates of bacterial powder were increased when cultured in 3 media including brown sugar and yeast extract, cow milk UHT, and young coconut water. For the greenhouse testing, all culture treatments significantly controlled the disease and increased the grey oyster mushroom yield when compared with the control 2. Especially, *Bacillus* sp. PB6 cultured in cow milk UHT was found only 8.02% of disease incidence and gave 807.56 g/bag of mushroom yield, while the control 2 showed the highest disease incidence of 84.85% and gave the lowest yield of 410.54g/bag. According to biochemical methods and Biolog Microlog System, *Bacillus* sp. PB6 was identified as *B. subtilis*.

Keywords: Mushroom, *Bacillus* sp., black mold disease, biological control

---

[1] ภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ จังหวัดนครสวรรค์ 6000
Department of Agricultural Technology, Faculty of Agricultural Technology and Industrial Technology, NakhonSawanRajabhat University, NakhonSawan, 60000, Thailand

[2] หน่วยวิจัยไม้ผลเขตร้อน สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยวลัยลักษณ์ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80161
The Tropical Fruit Research Unit, School of Agricultural Technology, Walailak University, Nakhon Si Thammarat, 80161, Thailand

รับเรื่อง : พฤษภาคม 2559
รับตีพิมพ์ : กรกฎาคม 2559

[*] Corresponding author : iwarin@wu.ac.th

บทคัดย่อ

แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 8 ไอโซเลต (PB1 – PB8) จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี dilution spread plate โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient glucose agar เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทุกไอโซเลตสามารถสร้างบริเวณใสยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุโรคราดำบนดอกเห็ดได้ในช่วง 3.10–5.65 มิลลิเมตร แต่มีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เพียง 2 ไอโซเลตคือ PB6 และ PB8 ที่ไม่มีผลกระทบต่อการเจริญของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน จึงได้รับการคัดเลือกเพื่อนำมาผลิตเป็นผงเชื้อที่มีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย 6.28×10^6 และ 6.53×10^6 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ ซึ่งผงเชื้อทั้ง 2 ชนิดมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราดำและเพิ่มผลผลิตดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะ *A. niger*) โดยพบว่าในเห็ดที่พ่นด้วยเซลล์แขวนลอยของผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 มีการเกิดโรคราดำเพียง 19.12 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตดอกเห็ด 763.13 กรัมต่อถุง ในขณะที่กรรมวิธีควบคุมพบการเกิดโรคสูงที่สุดที่ 85.10 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดน้อยที่สุดเพียง 408.46 กรัมต่อถุง เชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PB6 และ PB8 สามารถเพิ่มปริมาณเมื่อเลี้ยงในอาหาร 3 ชนิด คือน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัด น้ำนมวัว UHT และน้ำมะพร้าวอ่อนการทดสอบประสิทธิภาพในโรงเรือนพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 ชนิดสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราดำของผงเชื้อแบคทีเรียและเพิ่มผลผลิตดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ดีกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 โดยเฉพาะผงเชื้อแบคทีเรีย PB6 ที่ขยายเลี้ยงในน้ำนมโค UHT พบการเกิดโรคราดำเพียง 8.02 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ด 807.56 กรัมต่อถุง ในขณะที่ชุดควบคุม 2 พบการเกิดโรคสูงที่สุดที่ 84.85 เปอร์เซ็นต์ และให้ผลผลิตเห็ดน้อยที่สุดเพียง 410.54 กรัมต่อถุง เมื่อทำการจำแนกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 โดยวิธีชีวเคมีและเครื่อง Biolog Microlog System พบว่าเป็นเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis*

คำสำคัญ : เห็ด บาซิลลัส โรคราดำ การควบคุมโดยชีววิธี

คำนำ

เห็ดนางฟ้าภูฐาน (Grey oyster mushroom; *Pleurotuspulmonarius*) เป็นเห็ดที่มีคุณค่าทางโภชนาการซึ่งมีโปรตีนและวิตามินสูง สามารถเพาะได้ทุกภาคของประเทศไทย แต่การเพาะเห็ดในประเทศไทยมักประสบปัญหาการเกิดโรคที่เข้าทำลายโดยราเขียว (green mold) และราดำ (black mold) โดยเฉพาะเชื้อราดำ *Aspergillus niger* ที่ก่อปัญหามากต่อผลผลิตเห็ดและสามารถสร้างสารก่อมะเร็งในมนุษย์ด้วย ได้แก่ โอคราทอกซิน (ochratoxin) และฟูโมนิซิน (fumonisins) (Soares *et al*., 2013) Fadahunsi *et al*. (2013) รายงานการตรวจพบเชื้อรา *A. niger* บนดอกเห็ดถึง 20 เปอร์เซ็นต์ ของเชื้อราทั้งหมด นอกจากนี้ยังพบว่า เชื้อรา *A. niger* เป็นเชื้อราทนร้อน (thermotolerant fungi) สามารถเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิ 40 – 50 องศาเซลเซียสมักพบกระจายอยู่ทั่วไปทั้งในอากาศ ดิน และวัสดุเพาะปลูกจึงยากต่อการป้องกันกำจัด (Metzger, 2008) สำหรับการป้องกันกำจัดเชื้อราดังกล่าวที่ปฏิบัติกันทั่วไปคือการเลือกหัวเชื้อเห็ดจากแหล่งที่เชื่อถือได้ มีความ

แข็งแรงและมีการปนเปื้อนน้อยที่สุด การใช้วัสดุเพาะและเครื่องมือที่ปราศจากการปนเปื้อน การนึ่งก้อนเชื้อเห็ดด้วยความร้อนสูง 95 – 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลานาน 3 – 4 ชั่วโมง การกำจัดก้อนเห็ดติดเชื้อทิ้งและการทำความสะอาดโรงเรือน (Fan *et al*., 2005) ส่วนสารเคมีสังเคราะห์ที่สามารถกำจัดเชื้อราดำ *A. niger* ที่ได้ผลดีคือสารในกลุ่มเบนซิมิดาโซล (benzimidazole) ได้แก่ เบนโนมิล (benomyl) และคาร์เบนดาซิม (carbendazim) แต่สารเคมีเหล่านี้เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคและเป็นสารก่อมะเร็งที่สลายตัวยาก สามารถตกค้างในดอกเห็ดได้ง่าย (Santa Cruz Biotechnology Inc., 2010) และยังมีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ (Hatvani *et al*., 2012) ดังนั้นการควบคุมโรคราดำของเห็ดโดยชีววิธีจึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่ควรนำมาใช้ โดย Fadahunsi *et al*. (2013) พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Pseudomonas fluorescence* CMI F113 และ *Bacillus subtilis* CMI 22BN สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* และพบว่าการประยุกต์ใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงเพิ่มจำนวนในน้ำนมวัวและนมถั่วเหลืองสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราและเพิ่มผลผลิตของเห็ดฟางได้ แต่ยังมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคไม่สูงเท่าที่ควร จึงยังไม่เป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราดำ *A. niger* ก่อนนำมาผลิตเป็นผงเชื้อ และประยุกต์ใช้ในการควบคุมโรคราดำให้สามารถเทียบเท่ากับการใช้สารเคมีสังเคราะห์

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน เชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

1.1 เชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน: แยกเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานที่มีขนาดใหญ่โดยการตัดเนื้อเยื่อดอกเห็ดและนำมาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำการแยกเชื้อเห็ดให้บริสุทธิ์อีกครั้งโดยตัดบริเวณปลายเส้นใยที่ไม่มีเชื้อราอื่นปนเปื้อนและย้ายไปเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเก็บเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.2 เชื้อสาเหตุโรคราดำ: แยกเชื้อรา *Aspergillus niger* จากก้อนเชื้อเห็ดที่เกิดโรคราดำโดยทำการเจือจางวัสดุเพาะจากก้อนเชื้อเห็ดติดโรคด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อเป็น 10^{-1}–10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอยเชื้อเห็ดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร หยดและเกลี่ย (spread) ให้ทั่วบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์โดยเขี่ยเชื้อราที่เจริญจากหนึ่งสปอร์ (single spore isolation) มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ (Diba *et al*., 2007) ก่อนเก็บเชื้อราไว้ที่อุณหภูมิ 10 องศาเซลเซียส

1.3 เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์: แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในพื้นที่อำเภอลาดยาว อำเภอบางม่วง และอำเภอโกรกพระ จังหวัดนครสวรรค์โดยนำดอกเห็ดที่คาดว่ามีเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 5 กรัมใส่ลงในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 45 มิลลิลิตร เขย่าด้วยเครื่องเขย่าความเร็ว 120 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 10 นาที ก่อนเจือจางที่ความเข้มข้น 10^{-1}–10^{-3} เท่า ดูดสารแขวนลอยดอกเห็ดปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยให้ทั่วบนอาหาร nutrient glucose agar (NGA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียจาก

โคโลนีเดี่ยว (single colony isolation) โดยนำมา cross streak บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NGA จนได้เชื้อบริสุทธิ์ก่อนบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการย้อมแกรม (gram staining) ย้อมสปอร์ด้วย malachite green ตรวจสอบลักษณะภายใต้กล้องจุลทรรศน์และศึกษาการสร้างเอนไซม์ catalase ด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (3% H_2O_2) (Payapanon *et al*., 2011)

1.4 การจำแนกชนิดของแบคทีเรีย *Bacillus* spp.: จำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวิธีทางชีวเคมีในการเจริญใน anaerobic agar การย่อยแป้ง (starch hydrolysis) การย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) การย่อยเคซีน (casein hydrolysis) การใช้โพรพิโอเนทในการเจริญเติบโต (propionate utilization) การทนเค็มโซเดี่ยมคลอไรด์ (NaCl) ที่ความเข้มข้น 5 และ 7 เปอร์เซ็นต์ การผลิตกรดจาก D-glucose L-arabinose D-xylose D-manitol Lactose Tween 40 และ Tween 60 และการใช้แหล่งคาร์บอน 95 ชนิด ด้วยเครื่อง BiologMicrolog System, Release 4.2 (Payapanon *et al*., 2011)

2. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อโรคราดำและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน

เลี้ยงเชื้อราดำ *A. niger* และเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 7 วัน ก่อนเจาะบริเวณปลายเส้นใยเชื้อราทั้ง 2 ชนิด ด้วย corkborer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.7 เซนติเมตร แล้วนำไปวางตรงกลางจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นย้ายโคโลนีเดี่ยว (single colony) เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. มาแตะบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีเชื้อรา *A. niger* และเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานเจริญอยู่โดยให้ห่างจากปลายเส้นใยของเชื้อราทั้ง 2 ชนิดเป็นระยะ 3 เซนติเมตร จำนวน 4 จุด ในแนวกากบาท บ่มจานเลี้ยงเชื้อทดสอบไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน จึงทำการวัดบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) เปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely randomized design; CRD)

3. การผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และการเพิ่มปริมาณเชื้อ

3.1 การผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.: ผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ตามวิธีการของ Muis (2006) โดยนำเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (เลี้ยงบนอาหาร NGA เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนขูดเซลล์มาผสมในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) ความเข้มข้น 1.0×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ($O.D._{600}$ = 0.2) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร ใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ potato dextrose broth (PDB) ปริมาตร 50 มิลลิลิตร พร้อมเขย่าบนเครื่องเขย่าด้วยความเร็ว 50 รอบต่อนาที (rpm) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมงจากนั้นนำไปเติมลงในผงผสมทัลคัมปลอดเชื้อ (ทัลคัม100 กรัม yeast extract 0.25 กรัม และสารเหนียว carboxy methyl cellulose 1 กรัม) คลุกเคล้าให้เข้ากันด้วยเครื่องปั่น (blender) ก่อนอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อผงเชื้อ 1 กรัม (CFU/กรัม) ด้วยวิธี dilution spread plate technique โดยนำผงเชื้อมาเจือจางในน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อที่ 10^{-5}-10^{-6} เท่า ก่อนดูดเซลล์แขวนลอยเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร มาเกลี่ยบนอาหาร NGA บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 48 ชั่วโมง จึงตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.

3.2 การเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp.: นำผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (จากข้อ 3.1) ปริมาณ 1.5 กรัม ไปเพิ่มปริมาณเชื้อในอาหารปลอดเชื้อ 3 ชนิดที่มีปริมาตร 50 มิลลิลิตร คือ

1) สารละลายน้ำตาลทรายแดง (5%) ผสมยีสต์สกัด (1%) 2) น้ำนมวัว UHT และ 3) น้ำมะพร้าวอ่อน ก่อนบ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงตรวจนับความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย*Bacillus* spp. ด้วยวิธีการ dilution spread plate technique โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ NGA ตามวิธีการในหัวข้อ 3.1

4. ประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. และการเพิ่มปริมาณเชื้อในการควบคุมโรคราดำในโรงเรือน

4.1 ประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคราดำ: ทำการเปิดดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยการเปิดจุกสำลี ถอดคอขวดออกแล้วพับปากถุงโดยม้วนปากถุงให้อยู่ระดับเดียวกับก้อนเชื้อ จากนั้นพ่นสปอร์แขวนลอยเชื้อรา *A. niger* ความเข้มข้น $1x10^6$ สปอร์ต่อมิลลิลิตร (ตรวจนับด้วย haemocytometer) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ลงบนก้อนเชื้อเห็ดบริเวณปากถุง บ่มก้อนเห็ดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมงทำการควบคุมโรคราดำโดยการพ่นบริเวณปากถุงก้อนเห็ดด้วยผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. (1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) และสารเคมีคาร์เบนดาซิม(50%wp) ในอัตราที่เท่ากัน (1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรต่อถุง สำหรับกรรมวิธีควบคุม 1 (ไม่ใส่เชื้อราดำ) กรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะเชื้อราดำ) ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 10 ก้อนเชื้อเห็ด) วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (Randomized complete block design, RCBD) ในช่วงเวลา 30 วันบันทึกน้ำหนักสดของผลผลิตเห็ดและการเกิดโรคบนก้อนเห็ดนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การเกิดโรคตามวิธีการของ Shah *et al*. (2013)

4.2ประสิทธิภาพของการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการควบคุมโรคราดำ: เปิดดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานและปลูกเชื้อรา *A. niger* ตามวิธีในหัวข้อ 4.1 บ่มก้อนเห็ดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงทำการควบคุมโรคราดำโดยการพ่นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และสารเคมีคาร์เบนดาซิม (50%wp) ในอัตรา 1.5 กรัมต่อน้ำ 1 ลิตร ปริมาตร 3 มิลลิลิตร จำนวน 2 ครั้ง (วันที่ 1 และวันที่ 15 ของการทดลอง) ในช่วง 30 วันของการทดลองบันทึกน้ำหนักสดของผลผลิตเห็ดและการเกิดโรคบนก้อนเห็ด ตามวิธีการข้อ 4.1 โดยเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 1 (ไม่ใส่เชื้อราดำ) และกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะเชื้อราดำ) ทำการทดลองจำนวน 5 ซ้ำ (ซ้ำละ 10 ก้อนเชื้อเห็ด) วางแผนการทดลองแบบสุ่มในบล็อคสมบูรณ์ (RCBD)

5. การวิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ผลโดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance: ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยด้วยวิธี Least Significant Difference (LSD) ด้วยโปรแกรมสถิติ SPSS เวอร์ชั่น 16

ผลการทดลอง

1. การเตรียมเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน เชื้อสาเหตุโรคและเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานที่แยกได้จากดอกเห็ดตัวอย่าง มีความแข็งแรงและเจริญเติบโตรวดเร็ว (ภายใน 4 วัน) บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิห้อง ส่วนเชื้อราดำ *A. niger* ที่แยกได้จากก้อนเห็ดเกิดโรคมีลักษณะสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ตรงตามรายงานของ Diba *et al*. (2007) นอกจากนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้จำนวน 8 ไอโซเลตจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานใน 3 อำเภอของจังหวัดนครสวรรค์ ได้แก่ ไอโซเลต PB1–PB3 (อำเภอลาดยาว) ไอโซเลต PB4–PB6 (อำเภอบางม่วง) และไอโซเลต PB7–PB8 (อำเภอโกรกพระ) โดยทั้งหมดเป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวก

(ติดสีน้ำเงินของ methylene blue) สร้างสปอร์ (ติดสีเขียวของ malachite green) มีรูปวงรี และสามารถสร้างเอนไซม์ catalase เนื่องจากเกิดฟองก๊าซออกซิเจนหลังหยดไฮโดรเจนเปอร์ออกไซม์ (H_2O_2) จึงจำแนกเบื้องต้นเป็นเชื้อแบคทีเรียสกุล *Bacillus* spp.

การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวิธีทางชีวเคมีพบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB1 PB4 และ PB7 เป็น aerobic bacterium (ไม่เจริญใน anaerobic agar) สามารถย่อยแป้ง (starch hydrolysis) ย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) ย่อยเคซีน (casein hydrolysis) ไม่ทนเค็มของโซเดี่ยมคลอไรด์ (5% และ 7% NaCl) ผลิตกรดจาก D–glucose L–arabinose D–xylose D–manitol Lactose Tween 40 และ Tween 80 และผลการเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนจากเครื่อง BiologMicrolog System, Release 4.2 แสดงให้เห็นว่าเป็น *B. amyloliquefaciens* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB2 PB3 และ PB5 เป็น Facultative aerobic bacterium (เจริญเล็กน้อยใน anaerobic agar) ย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) ย่อยเคซีน (casein hydrolysis) ใช้โพรพิโอเนทในการเจริญเติบโต (propionate utilization) ทนเค็มของโซเดี่ยมคลอไรด์ (5% และ 7% NaCl) ผลิตกรดจาก D–glucose L–arabinose D–xylose และ D–manitol และผลการเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนจากเครื่อง BiologMicrolog System, Release 4.2 แสดงให้เห็นว่าเป็น *B. licheniformis*

นอกจากนี้ เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 สามารถย่อยแป้ง (starch hydrolysis) ย่อยเจลาติน (gelatin hydrolysis) ย่อยเคซีน (casein hydrolysis) เป็น aerobic bacterium (ไม่เจริญใน anaerobic agar) ไม่ทนเค็มของโซเดี่ยมคลอไรด์ (5% และ 7% NaCl) ผลิตกรดจาก D–glucose L–arabinose D–xylose และ D–manitol และผลการเจริญเติบโตในแหล่งคาร์บอนจากเครื่อง BiologMicrolog System, Release 4.2 แสดงให้เห็นว่าเป็น *B. subtillis* (Payapanon *et al*., 2011)

2. ประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ในการยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อโรคราดำและผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน

เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 8 ไอโซเลต (PB1-PB8) ที่แยกได้จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราดำ *A. niger* โดยการสร้างบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) ในช่วง 3.10 – 5.65 มิลลิเมตร โดยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB1 มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใยเชื้อราดำ *A. niger* ดีที่สุด พบบริเวณยับยั้งขนาด 5.65 มิลลิเมตร รองลงมาคือ ไอโซเลต PB6 พบบริเวณยับยั้งขนาด 5.43 มิลลิเมตร (Table 1)

ผลกระทบของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ต่อการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 6 ไอโซเลต (PB1, PB2, PB3, PB4, PB5 และ PB7) มีผลในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยการสร้างบริเวณใสยับยั้งในช่วง 1.88 – 3.97 มิลลิเมตร โดยเฉพาะไอโลต PB1 ยับยั้งการเจริญเติบโตได้สูงสุดที่ 3.97 มิลลิเมตร ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จำนวน 2 ไอโซเลต คือ PB6 และ PB8 ไม่พบการสร้างบริเวณใสยับยั้งการเจริญเติบโตเส้นใยของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน (Table 1) ดังนั้นทั้ง 2 ไอโซเลตนี้จึงได้รับคัดเลือกไว้ศึกษาประสิทธิภาพการควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อไป

3. การผลิตผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และการเพิ่มปริมาณเชื้อ

เมื่อตรวจนับปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 ที่ผ่านการทำเป็นผงเชื้อ พบว่ามีความเข้มข้นที่ 6.28×10^6 และ 6.53×10^6 โคโลนีต่อผงเชื้อ 1 กรัม ตามลำดับ และเมื่อนำผงเชื้อดังกล่าวไปขยายในอาหารชนิดต่าง ๆ พบว่าอาหารทุกชนิดทำให้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลตมีปริมาณเพิ่มขึ้น และพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 ที่เลี้ยงในน้ำนมวัวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีปริมาณสูงที่สุดเท่ากับ 8.95×10^8 และ 9.17×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ รองลงมาคือการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรียในสารละลายน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PB6 และ PB8 เท่ากับ 5.61×10^8 และ 5.83×10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ในขณะที่การเพิ่มปริมาณเชื้อในน้ำมะพร้าวเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบปริมาณเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PB6 และ PB8 น้อยที่สุดเท่ากับ 7.96×10^7 และ 8.21×10^7 โคโลนีต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

4. ประสิทธิภาพของผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. และการเพิ่มปริมาณเชื้อในการควบคุมโรคราดำในโรงเรือน

ผลการควบคุมโรคราดำบนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. เปรียบเทียบกับสารเคมีคาร์เบนดาซิม พบว่าทุกกรรมวิธีสามารถลดความรุนแรงของโรคบนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะ *A. niger*) โดยกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม พบการเกิดโรคน้อยที่สุดที่ 7.45 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 ซึ่งพบการเกิดโรคที่ 19.12 และ 23.68 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม 2 พบการเกิดโรคสูงสุดที่ 85.10 เปอร์เซ็นต์ (Table 2) ในด้านผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในช่วง 30 วันของการทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีทดสอบให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 2 อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง โดยกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมให้ผลผลิตเห็ดสูงสุดที่ 789.33 กรัมต่อถุง รองลงมาคือกรรมวิธีที่ใช้ผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 ให้ผลผลิตเห็ด 763.13 และ 728.23 กรัมต่อถุง ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม 2 ให้ผลผลิตเห็ดน้อยที่สุดเพียง 408.46 กรัมต่อถุง (Table 2)

Table 1 Efficacy of *Bacillus* spp. to inhibit of mycelial growth of *Aspergillusniger* and grey oyster mushroomonpotato dextrose agar at room temperature for 3 days

Treatments	Inhibition zone of *A.niger* (millimeters)	Inhibition zone of grey oyster mushroom(millimeters)
Bacillus sp. PB1	5.65 [a1/]	3.97 [a]
Bacillus sp. PB2	4.72 [cd]	3.72 [ab]
Bacillus sp. PB3	3.10 [e]	1.88 [e]
Bacillus sp. PB4	4.42 [b]	3.52 [b]
Bacillus sp. PB5	4.73 [cd]	3.60 [bc]
Bacillus sp. PB6	5.43 [bc]	0.00 [f]
Bacillus sp. PB7	4.18 [de]	3.15 [d]
Bacillus sp. PB8	4.47 [d]	0.00 [f]
Sterile distilled water	0.00 [f]	0.00 [f]

[1/]Mean values within the same columns followed by the same letter are not significantly different according to the Least Significant Difference (P<0.01)

Table 2 Efficacy of *Bacillus* powders to reduce disease incidence caused by *Aspergillusnjger* on the bag of grey oyster mushroom and mushroom yield during harvest for 30 days

Treatments	Disease incidence (%)	Mushroom yield (g/bag)
Bacillus sp. PB6	19.12 [c1/]	763.13 [b]
Bacillus sp. PB8	23.68 [b]	728.23 [c]
Carbendarzim	7.45 [d]	789.33 [a]
Control 1 (no *A. niger*)	00.00 [e]	791.02 [a]
Control2 (only *A. niger*)	85.10 [a]	408.46 [d]

[1/]Mean values within the same columns followed by the same letter are not significantly different according to the Least Significant Difference (P<0.01)

การใช้เชื้อขยายแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงบนอาหารชนิดต่าง ๆ และสารเคมีคาร์เบนดาซิมควบคุมโรคราดำบนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน พบว่าทุกกรรมวิธีทดสอบสามารถลดความรุนแรงของโรคบนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะ *A. niger*) โดยพบการเกิดโรคในช่วง 7.98-18.56 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมกรรมวิธีที่ใช้เชื้อขยายแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 ที่เลี้ยงในน้ำนมวัว UHT และในน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัด ให้ผลในการควบคุมโรคราดำได้ดีไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยพบการเกิดโรคที่ 7.98 8.02 และ 8.18 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ในขณะที่กรรมวิธีควบคุม 2 พบการเกิดโรคสูงสุดที่ 84.85 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) ในด้านผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานในช่วง 30 วันของการทดลอง พบว่าทุกกรรมวิธีทดสอบให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 2 อย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ โดยพบผลผลิตของเห็ดในช่วง 782.35–807.56 กรัมต่อถุง กรรมวิธีที่ใช้เชื้อขยายแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 ที่เลี้ยงในน้ำนมโค UHT และกรรมวิธีที่ใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม ให้ผลผลิตเห็ดสูงที่ 807.56 และ 805.25 กรัมต่อถุง ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างทางสถิติกับกรรมวิธีควบคุม 1 (ไม่ใส่ *A. niger*) ที่ให้ผลผลิตเห็ด 809.32 กรัมต่อถุง ในขณะที่กรรมวิธีที่ใช้เชื้อขยายแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 ที่เลี้ยงในน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัด พบผลผลิตเห็ดที่ 804.24 กรัมต่อถุง และกรรมวิธีควบคุม 2 ให้ผลผลิตเห็ดน้อยที่สุดเพียง 410.54 กรัมต่อถุง (Table 3)

วิจารณ์

การเจริญแข่งขันเพื่อปัจจัยในการดำรงชีวิตนั้นเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถสร้างเอนไซม์และสารปฏิชีวนะหลายชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญหรือทำลายเชื้อจุลินทรีย์อื่น เช่น สาร bacillomycin D bacillomycin fengycin iturin และ surfactin (Nagy *et al*., 2012) ซึ่งการทดลองนี้ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่แยกจากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทุกไอโซเลตสามารถสร้างบริเวณยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Aspergillus niger* ที่เป็นสาเหตุโรคราดำในเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ การจำแนกชนิดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. โดยวิธีทางชีวเคมีและเครื่อง BiologMicrolog System (Payapanon *et al*., 2011)

Table 3 Efficacy of *Bacillus* cultures to reduce disease incidence caused by *Aspergillus njger* on the bag of grey oyster mushroom and mushroom yield during harvest for 30 days

Treatments	Disease incidence (%)	Mushroom yield (g/bag)
Bacillus sp.PB6+ Brown sugar + yeast extract	8.18 [e1/]	804.24 [b]
Bacillus sp.PB8+ Brown sugar + yeast extract	13.54 [d]	789.13 [d]
Bacillus sp.PB6+ Cow milk UHT	8.02 [e]	807.56 [ab]
Bacillus sp.PB8+ Cow milk UHT	12.96 [d]	790.48 [cd]
Bacillus sp.PB6+ Young coconut water	16.65 [c]	793.62 [c]
Bacillus sp.PB8+ Young coconut water	18.56 [b]	782.35 [e]
Carbendazim	7.98 [e]	805.25 [ab]
Control 1 (no *A. niger*)	0.00 [f]	809.32 [a]
Control2 (only *A. niger*)	84.85 [a]	410.54 [f]

[1/] Mean values within the same columns followed by the same letter are not significantly different according to the Least Significant Difference (P<0.01)

พบว่าแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB1 PB4 และ PB7 เป็น *B. amyloliquefaciens* เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB2, PB3 และ PB5 เป็น *B. licheniformis* และแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ไอโซเลต PB6 และ PB8 เป็น *B. subtillis* ซึ่งในการทดลองนี้มีเพียง 2 ไอโซเลต คือ PB6 และ PB8 ที่ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน สอดคล้องกับงานวิจัยของ Nagy *et al*. (2012) ที่แยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้จำนวน 6 สายพันธุ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคราเขียวของเห็ดนางฟ้าได้และมี 3 สายพันธุ์ที่ไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเห็ดนางฟ้าและในปี 2011 Payapanon และคณะพบว่าเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* B2 สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. niger* ที่เป็นสาเหตุโรคของเห็ดฟางได้เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยสร้างบริเวณใสยับยั้งที่ 5 มิลลิเมตร นอกจากนี้ Fadahunsi *et al*. (2013) ได้รายงานว่าสารเหนือตะกอน (supernatant) ของอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *B. subtilis* CMI 22BN สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตเชื้อรา *A. niger* สาเหตุโรคของเห็ดได้ โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณใสยับยั้งที่ 2.5 มิลลิเมตร

ในการผลิตผงเชื้อ *Bacillus* spp. โดยทั่วไปนิยมใช้ผงทัลคัมเป็นสารพาเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแพร่กระจายและการเกาะยึดผิวพืชที่ดีขึ้น (Muis, 2006) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้พบว่าสามารถผลิตผงเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ PB6 และ PB8 ด้วยการใช้ผงทัลคัมเป็นสารพาได้ โดยมีปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่ 6.3×10^6 และ 6.5×10^6 โคโลนีต่อกรัม ตามลำดับ และเมื่อนำผงเชื้อดังกล่าวไปใช้ควบคุมโรคราดำในโรงเรือนเพาะเห็ดในระยะเปิดดอกพบว่าสามารถลดการเกิดโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้สูงกว่ากรรมวิธีควบคุม 2 (ใส่เฉพาะ *A. niger*) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่เทียบเท่าการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิม ทั้งนี้อาจเป็นเพราะเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในรูปเชื้อแห้ง ซึ่งต้องอาศัยระยะเวลาในการงอกและเจริญเติบโต นอกจากนี้ในผงเชื้อยังไม่มีแหล่งอาหารพร้อมใช้จึงทำให้เชื้อแบคทีเรียเจริญเติบโตช้าส่งผลให้ประสิทธิภาพการควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดเห็นผลช้าเช่นกัน (Muis, 2006)

Muis (2006) ได้รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. เจริญเติบโตได้ดีในสารละลายน้ำตาลทรายผสมยีสต์สกัดและน้ำมะพร้าว และ Payapanon *et al*. (2011) รายงานการประยุกต์ใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เพิ่มปริมาณในน้ำนมโค UHT และนมถั่วเหลืองสามารถควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อราของเห็ดและเพิ่มผลผลิตเห็ดฟางได้ สอดคล้องกับการทดลองนี้ที่พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. สามารถเพิ่มปริมาณได้ดีในน้ำนมโค UHT น้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัด และน้ำมะพร้าวอ่อน ตามลำดับ ซึ่งในน้ำนมโค มีคาร์โบไฮเดรต โปรตีน แคลเซี่ยม วิตามินเอ วิตามินบี 2 และวิตามินบี 1 ส่วนน้ำตาลทรายแดงมีคาร์โบไฮเดรต แคลเซียม เหล็ก และฟอสฟอรัสสูง และยีสต์สกัดมีกรดอะมิโน (โปรตีน) และวิตามินสูง (Neogen Europe Ltd., 2011) ซึ่งอาหารเหล่านี้มีจำนวนชนิดและปริมาณสารอาหารสูงกว่าในน้ำมะพร้าว จึงส่งเสริมการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ได้มากกว่าน้ำมะพร้าว (Muis, 2006) เมื่อนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ที่เลี้ยงในอาหารทั้ง 3 ชนิดดังกล่าวไปควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานพบว่ากรรมวิธีที่ขยายเชื้อ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ PB6 ในสารละลายน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัดและน้ำนมโคUHT ให้ผลลดการเกิดโรคราดำและให้ผลผลิตเห็ดนางฟ้าภูฐานไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมความเข้มข้น 0.15 เปอร์เซ็นต์ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ

เชื้อแบคทีเรียดังกล่าวอยู่ในรูปเชื้อสดและมีสารอาหารผสมอยู่ด้วยจึงสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มปริมาณได้อย่างรวดเร็วนอกจากนี้ในขณะเจริญเติบโตเชื้อแบคทีเรียสามารถสร้างสารปฏิชีวนะและปลดปล่อยลงในอาหารเหลวได้ ดังนั้นเมื่อนำมาประยุกต์ใช้จึงมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคสูงกว่าการใช้ผงเชื้อแห้งโดยตรง (Fadahunsi *et al*., 2013) นอกจากนี้ Payapanon *et al*. (2011) พบว่าการใช้เชื้อ *B.subtilis* B2 ความเข้มข้น $1x10^7$ โคโลนีต่อมิลลิลิตร ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient broth (NB) ฉีดพ่นบนวัสดุเพาะเห็ดฟางสามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคของเห็ดฟางได้ นอกจากนี้ยังพบว่าช่วยให้ได้ผลผลิตเห็ดฟางสูงกว่ากรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุป

การวิจัยครั้งนี้สามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ทั้งหมด 8 ไอโซเลต ซึ่งไอโซเลต PB6 และ PB8 มีประสิทธิภาพสูงในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *A. niger* สาเหตุโรคราดำในเห็ดนางฟ้าภูฐาน โดยสร้างบริเวณยับยั้งกว้าง 5.43 และ 4.47 มิลลิเมตร ตามลำดับ และทั้ง 2 ไอโซเลต ไม่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน ซึ่งผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลต สามารถควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานได้เมื่อทำการทดสอบในโรงเรือนเพาะเห็ด นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มปริมาณเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* spp. ทั้ง 2 ไอโซเลต ในน้ำนมโค UHT และสารละลายน้ำตาลทรายแดงผสมยีสต์สกัดทำให้เชื้อแบคทีเรียเพิ่มปริมาณได้ดีและมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราดำบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานสูงไม่แตกต่างทางสถิติกับการใช้สารเคมีคาร์เบนดาซิมซึ่งเชื้อแบคทีเรียไอโซเลต PB6 ได้รับการจำแนกเป็นเชื้อ *B. subtilis* โดยวิธีชีวเคมีและเครื่อง BiologMicrolog System

คำขอบคุณ

คณะวิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ ที่สนับสนุนทุนวิจัย และขอบคุณภาควิชาเทคโนโลยีการเกษตร คณะเทคโนโลยีการเกษตรและเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยราชภัฏนครสวรรค์ สำหรับสถานที่และเครื่องมือในการทำงานวิจัย ทำให้การวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Diba, K., P. Kordbacheh, S.H. Mirhendi, S. Rezaieand M. Mahmoudi. 2007. Identification of *Aspergillus* species using morphological characteristics. Pak. J. Med. Sci. 23(6): 867–872.

Fadahunsi, I., D. Ayansina, and A. Okunrotifa. 2013. Biocontrol of mushroom spoilage fungi and aflatoxin evaluation during storage. Nat. Sci. 11(7): 7–13.

Fan, L., H. Pan, Y. Wu and H. Kwon. 2005. Pest and disease management in Shiitake bag cultivation. Mushroom Growers Handbook 2-Shiitake cultivation. Available source: mushworld/ Shiitake-Mushroom-Cultivation, 5 January 2016.

Metzger, B. 2008. *Aspergillusniger* Tiegh. In Mushroom Observer. Available source: http://mushroomobserver.org/name/show

_name/15030?_js=on&_new=true, 16 May 2016.

Muis, A. 2006. Biomass production and formulation of *Bacillus subtilis* for biological control. Indones. J. Agric. Sci. 7(2): 51–56.

Nagy, A., L. Manczinger, D. Tombácz, L. Hatvani, J. Györfi, Z. Antal, E. Sajben, C. Vágvölgyi and L. Kredics. 2012. Biological control of Oyster mushroom green mold disease by antagonistic *Bacillus* species. IOBC-WPRS Bull. 78: 289–293.

Neogen Europe Ltd. 2011. Media ingredients, yeast extract. Available source: http://www.neogen. com, 3 May 2016.

Payapanon, A., S. Suthirawut, S. Shompoo sang, K. Tsuchiya, N. Furuya, P. Roongrawee, T. Kulpiyawat and A. Somrith. 2011. Increase in yield of the Straw mushroom (*Vovariellavolvacea*) by supplement with *Paenibacillus* and *Bacillus* to the Compost. J. Fac. Agr., Kyushu Univ. 56(2): 249 – 254

Sabolic, P., S. Kocsubé, L. Kredics, D. Czifra, C. Vágvölgyi, J. Kaliterna, D. Ivic, E. Dermic and I. Kosalec. 2012. The first report on mushroom green mould disease in Croatia. Arh. Hig. Rada. Toksikol. 63(4): 481–487.

Santa Cruz Biotechnology, Inc. 2010. Carbendazim. Material safety data sheet. Available source: http://data sheets.scbt.com/sc-211014.pdf, 4 January 2016.

Shah, S., S. Nasreen and S. Kousar. 2013. Efficacy of fungicides against *Trichoderma* spp. causing green mold disease of Oyster mushroom (*Pleurotussajor-caju*). Res. J. Microbiol. 8(1): 13–24.

Soares, C., T. Calado and A. Venâncio. 2013. Mycotoxin production by *Aspergillus niger* aggregate strains isolated from harvested maize in three Portuguese regions. Rev. Iberoam Micol. 30(1): 9–13.