รายงานการวิจัย

ความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียในก้อนเชื้อเห็ดเก่า และแนวทางการใช้ประโยชน์

Diversity of Fungi and Bacteria Occurring on Spent Mushroom Compost and Utilization

พรศิลป์ สีเผือก Pornsil Seephueak
ชัยสิทธิ์ ปรีชา Chaisit Preecha
วุฒิชัย สีเผือก Wuttichai Seephueak

คณะเกษตรศาสตร์
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย

ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย
งบประมาณแผ่นดิน ประจำปี พ.ศ. 2559-2560

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ ก

บทคัดย่อภาษาไทย ข

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ง

สารบัญ ฉ

สารบัญตาราง ช

สารบัญภาพ ฌ

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา 1

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 2

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย 20

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 20

บทที่ 2 วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า 21

2.2 การคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 22

2.3 การศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการสร้างตุ่มดอกและการออกดอกของเห็ดในห้องปฏิบัติการ 24

2.4 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียต่อการออกดอกของเห็ดในโรงเรือน 25

บทที่ 3 ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า 26

3.2 เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส 38

3.3 ผลของแบคทีเรียต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกเห็ดนางฟ้าใน ห้องปฏิบัติการ 44

3.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการออดดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในโรงเรือน 45

บทที่ 4 สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 57

เอกสารอ้างอิง 58

ภาคผนวก 66

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1.1 :	ลักษณะทั่วไปของก้อนเชื้อเห็ดเก่า	4
ตารางที่ 1.2 :	ปริมาณธาตุอาหารในก้อนเชื้อเห็ดเก่าตระกูล *Pleurotus*	6
ตารางที่ 1.3 :	ปริมาณธาตุอาหารที่ได้จากปุ๋ยหมักจากก้อนเชื้อเห็ดเก่า	9
ตารางที่ 1.4 :	ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส	12
ตารางที่ 1.5 :	ชนิดของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด	19
ตารางที่ 3.1 :	สถานที่เก็บตัวอย่าง จำนวนฟาร์ม ชนิดก้อนเชื้อเห็ดเก่า และจำนวนเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้	28
ตารางที่ 3.2 :	ความหลากหลายของเชื้อราที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	30
ตารางที่ 3.3 :	ชนิดของเชื้อราสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่าแต่ละชนิด	31
ตารางที่ 3.4 :	ดัชนีความหลากหลายของเชื้อราที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	33
ตารางที่ 3.5 :	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	35
ตารางที่ 3.6 :	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	36
ตารางที่ 3.7 :	ดัชนีความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	38
ตารางที่ 3.8 :	ชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC	40
ตารางที่ 3.9 :	ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC	42
ตารางที่ 3.10 :	การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใย และการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA	44

ตารางที่ 3.11 :	ระยะเวลาที่เห็ดออกดอกแต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	46
ตารางที่ 3.12 :	จำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานแต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	48
ตารางที่ 3.13 :	น้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานแต่ละรุ่น เมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	49
ตารางที่ 3.14 :	ความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	51
ตารางที่ 3.15 :	ความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	52
ตารางที่ 3.16 :	เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	53
ตารางที่ 3.17 :	ระยะเวลาออก ความยาวของก้านดอกเห็ด เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ด ความกว้างของดอกเห็ด จำนวนดอก น้ำหนัก และประสิทธิภาพการใช้อาหารของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)	56

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 2.1 : ตำแหน่งการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง CMC 24

ภาพที่ 3.1 : การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนอาหารแข็ง CMC 41

ภาพที่ 3.2 : การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง CMC 43

ภาพที่ 3.3 : การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในห้องปฏิบัติการ 45

ตารางภาคผนวก

หน้า

ตารางผนวกที่ 1 :	ผลการจำแนกแบคทีเรีย (IDENTIFICATION'S REPORT)	71
ตารางผนวกที่ 2 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาที่เห็ดนางฟ้าภูฐานออกดอก รุ่นที่ 1	88
ตารางผนวกที่ 3 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาที่เห็ดนางฟ้าภูฐานออกดอก รุ่นที่ 2	88
ตารางผนวกที่ 4 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาที่เห็ดนางฟ้าภูฐานออกดอก รุ่นที่ 3	88
ตารางผนวกที่ 5 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของระยะเวลาที่เห็ดนางฟ้าภูฐานออกดอก รุ่นที่ 4	88
ตารางผนวกที่ 6 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 1	89
ตารางผนวกที่ 7 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 2	89
ตารางผนวกที่ 8 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 3	89
ตารางผนวกที่ 9 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 4	89
ตารางผนวกที่ 10 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 1	90
ตารางผนวกที่ 11 :	การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเห็ดนางฟ้าภูฐาน	90

รุ่นที่ 2

ตารางผนวกที่ 12 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 3 90

ตารางผนวกที่ 13 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของน้ำหนักเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 4 90

ตารางผนวกที่ 14 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความกว้างดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 1 91

ตารางผนวกที่ 15 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความกว้างดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 2 91

ตารางผนวกที่ 16 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความกว้างดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 3 91

ตารางผนวกที่ 17 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความกว้างดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 4 91

ตารางผนวกที่ 18 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวก้านดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 1 92

ตารางผนวกที่ 19 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวก้านดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 2 92

ตารางผนวกที่ 20 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวก้านดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 3 92

ตารางผนวกที่ 21 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนของความยาวก้านดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 4 92

ตารางผนวกที่ 22 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่าศูนย์กลางดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 1 93

ตารางผนวกที่ 23 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่าศูนย์กลางดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 2 93

ตารางผนวกที่ 24 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่าศูนย์กลางดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 3 93

ตารางผนวกที่ 25 : การวิเคราะห์ความแปรปรวนเส้นผ่าศูนย์กลางดอกเห็ด นางฟ้าภูฐาน รุ่นที่ 4 93

ภาพภาคผนวก

หน้า

ภาพผนวกที่ 1 :	ตัวอย่างชนิดของเชื้อราที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า	70
ภาพผนวกที่ 2 :	ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าชนิดต่างๆ	86
ภาพผนวกที่ 3 :	ชุดทดลองที่ 1 การใช้เชื้อ *B. tequilensis*	94
ภาพผนวกที่ 4 :	ชุดทดลองที่ 2 การใช้เชื้อ *B. subtilis* subsp. *subtilis*	94
ภาพผนวกที่ 5 :	ชุดทดลองที่ 3 การใช้เชื้อ *Ps. aeruginosa*	94
ภาพผนวกที่ 6 :	ชุดทดลองที่ 4 การใช้เชื้อ *B. subtilis* subsp. *inaquosorum*	95
ภาพผนวกที่ 7 :	ชุดทดลองที่ 5 ชุดควบคุม (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	95

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย สำหรับการสนับสนุนงบประมาณในการทำวิจัย ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559-2560 ขอขอบคุณเจ้าของฟาร์มเห็ดต่างๆ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สงขลา พัทลุง และตรัง สำหรับการอนุเคราะห์ก้อนเชื้อเห็ดเก่าเพื่อใช้ในการทำวิจัย ซึ่งผลงานการวิจัยนี้สามารถใช้เป็นแนวทางในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านอื่นในอนาคต

ขอขอบคุณผู้เกี่ยวข้องทุกฝ่ายที่ได้ให้ความช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทั้งความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และเครื่องมือวิเคราะห์ ตลอดจนสถานที่ในการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่าง ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ ที่ให้การช่วยเหลือและอำนวยความสะดวก ขอขอบคุณผู้ร่วมวิจัยที่อุทิศกำลังกายและกำลังใจ ช่วยให้การวิจัยครั้งนี้ลุล่วงสำเร็จได้ด้วยดี

พรศิลป์ สีเผือก
ชัยสิทธิ์ ปรีชา
วุฒิชัย สีเผือก
ตุลาคม 2560

ความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียในก้อนเชื้อเห็ดเก่า และแนวทางการใช้ประโยชน์

พรศิลป์ สีเผือก[1] ชัยสิทธิ์ ปรีชา[2] และวุฒิชัย สีเผือก[1]

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อ ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ เห็ดโคนน้อย และเห็ดแครง ที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้ว เก็บตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าจากฟาร์มเห็ดจำนวน 80 ฟาร์มในภาคใต้ ได้แก่ จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สงขลา พัทลุง และตรัง แยกเชื้อด้วยวิธี dilution pour plates โดยเชื้อรา (microfungi) ใช้อาหาร GANA (Glucose Ammonium Nitrate Agar) และแบคทีเรียใช้อาหาร NA (Nutrient Agar) เชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้นำมาศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส บนอาหาร CMC (Carboxymethyl Cellulose Agar)

ผลการศึกษาพบเชื้อราทั้งหมด 24 สปีชีส์ แบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ anamorphic 23 สปีชีส์ และ basidiomyces 1 สปีชีส์ เชื้อราที่พบบ่อย ได้แก่ จีนัส *Trichoderma*, *Aspergillus* และ *Penicillium* โดยพบเชื้อราบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้ามากที่สุด 19 สปีชีส์ (79.17 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือบนก้อนเชื้อเห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อ พบเชื้อราอย่างละ 16 สปีชีส์ (66.67 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ เห็ดแครง และเห็ดโคนน้อย พบจำนวน 14, 13, 11 และ 9 สปีชีส์ คิดเป็น 58.33, 54.17, 45.83 และ 37.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เชื้อราจำนวน 20 สปีชีส์ (83.33 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยที่เชื้อรา 2 สปีชีส์ ได้แก่ *Aspergillus niger* และ *Penicillium oxalicum* มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ระดับสูง (+++)

สำหรับเชื้อแบคทีเรียที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่ามีทั้งหมด 13 สปีชีส์ แบคทีเรียสายพันธุ์เด่นและพบได้บ่อย ได้แก่ จีนัส *Bacillus* และ *Pseudomonas* พบเชื้อแบคทีเรียมากที่สุดบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า จำนวน 11 สปีชีส์ (84.61 %) รองลงมาคือบนก้อนเชื้อเห็ดนางรม เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เห็ดโคนน้อย เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดแครง พบจำนวน 9, 8, 7, 7, 6 และ 6 สปีชีส์ ตามลำดับ โดยที่เชื้อแบคทีเรียจำนวน 10 สปีชีย์ (76.92 เปอร์เซ็นต์) มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ เซลลูเลส ในขณะที่มีแบคทีเรียเพียง 3 สปีชีส์ มีประสิทธิภาพระดับสูง (+++) ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ *Bacillus tequilensis, Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* และ *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*

ผลการศึกษาปฏิกิริยาของแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดโดยวิธีการ dual culture ในห้องปฏิบัติการพบว่า แบคทีเรีย 4 สปีชีส์ ได้แก่ *Bacillus tequilensis, Bacillus subtilit* subsp. *inaquosorum*, *Bacillus* subsp. *subtilis* และ *Pseudomonas aeruginosa* สามารถส่งเสริมการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้า และเมื่อนำไปใช้ทดสอบการออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในสภาพโรงเรือน โดยการฉีดพ่นบริเวณปากถุง และเก็บผลผลิตใน

ระยะเวลา 4 รุ่น พบว่าการใช้เชื้อ *Bacillus tequilensis* ส่งผลให้เห็ดมีจำนวนดอก น้ำหนัก และเส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอก มีค่าสูงสุด เท่ากับ 24.81 ดอก/ถุง, 245.86 กรัม/ถุง (BE 91.41 เปอร์เซ็นต์) และ 0.91 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ในขณะที่การใช้เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* มีผลให้ความยาวของก้านและความกว้างของดอกเห็ดมีค่าสูงสุดเท่ากับ 7.38 และ 7.87 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ

คำสำคัญ: เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย ก้อนเชื้อเห็ดเก่า การสร้างตุ่มดอก เห็ด

[1] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช
[2] คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งสง จ.นครศรีธรรมราช

Diversity of Fungi and Bacteria Occurring on Spent Mushroom Compost and Utilization

Pornsil Seephueak[2] Chaisit Preecha[2] and Wuttichai Seephueak[1]

Abstract

The objective of this research was to study the diversity of fungi and bacteria associated with spent mushroom compost. The spent mushroom compost of *Pleurotus pulmonarius*, *Pleurotus ostreatus*, *Pleurotus cystidiosus*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia polytricha*, *Coprinus fimetarius* and *Schizophyllum commune* were collected from 80 mushroom farms in five Provinces of southern Thailand, via Nakhon Si Thammarat, Surathani, Songkhla, Pattalung and Trang. Isolation of fungi and bacteria from spent mushroom compost were by dilution pour plate technique on GANA (Glucose Ammonium Nitrate Agar) for fungi and NA (Nutrient Agar) for bacteria. All fungal and bacterial were tested to produce cellulolytic enzyme on CMC (Carboxymethyl Cellulose Agar).

The result showed that a total of 24 fungal species were detected. Twenty-three fungal species were anamorphic fungi and one was a species from basidiomyces. The frequency of fungi was high in genus *Trichoderma*, *Aspergillus* and *Penicillium*. Nineteen species (79.17%) obtained from spent of *Pleurotus pulmonarius*, 16 species (66.67%) obtained from spent of *Pleurotus ostreatus* and *Pleurotus cystidiosus*. Whereas, 14, 13, 11 and 9 species (58.33, 54.17, 45.83 and 37.5%) were found form spent of *Auricularia polytricha*, *Ganoderma lucidum*, *Schizophyllum commune* and *Coprinus fimetarius*, respectively. Twenty species (83.33%) showed effective to produce cellulolytic enzyme. However, only two species, *Aspergillus niger* and *Aspergillus oxalicum* showed strong cellulolytic activity (+++).

A total of 13 bacterial species were found on spent mushroom compost. Two species, *Bacillus* and *Pseudomonas* were dominant and frequency species. The highest bacterial obtained from spent of *Pleurotus pulmonarius* was 11 species (84.61%), follow by spent of *Pleurotus ostreatus*, *Ganoderma lucidum*, *Auricularia polytricha*, *Coprinus fimetarius, Pleurotus cystidiosus* and *Schizophyllum commune* were found 9, 8, 7, 7, 6 and 6 species, respectively. Ten isolates of bacteria were showed produce cellulolytic enzyme, but only three species showed high

effective (+++) such as *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilis* subsp. *inaquosorum* and *Bacillus subtilis* subsp. *subtilis*.

The effective of bacteria on mushroom mycelium growth by dual culture in laboratory showed that four species, *Bacillus tequilensis*, *Bacillus subtilit* subsp. *inaquosorum, Bacillus* subsp. *subtilis* and *Pseudomonas aeruginosa* had promoted and stimulated primordial formation and selected for tested in mushroom house. Cell suspension of each isolate prepared and sprayed on the spawn surface of *Pleurotus pulmonarius* and the yield recorded in four flushes of harvesting time. The result showed that the use of *Bacillus tequilensis* showed the highest of number of basidiocarp, yield and stalk diameter were 24.81 basidiocarp/bag, 245.86 g/bag (B.E. = 91.41%) and 0.91 cm/basidiocarp. While, the use of *Pseudomonas aeruginosa* showed the longest of stalk and biggest of cap diameter obtained 7.38 and 7.87 cm/basidiocarp, respectively.

Keywords: Fungi, Bacteria, Spent mushroom substrate, Primordial, Mushroom

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้ว (spent mushroom compost) เป็นอีกเศษวัสดุที่เหลือใช้อย่างหนึ่งทางการเกษตร หลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเห็ด แม้ว่าอยู่ในสภาพที่เสื่อมสลาย แต่ยังมีสารอาหารหลงเหลืออยู่เป็นจำนวนมาก โดยทั่วไปเกษตรกรจะเรียกว่าก้อนเชื้อเห็ดเก่า จัดว่าเป็นแหล่งของฮิวมัสและสารอาหารที่เป็นประโยชน์ ทั้งนี้ก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้ว อาจประกอบด้วย ขี้เลื่อย ฟางข้าว มูลสัตว์ ซังข้าวโพด กากฝ้าย หรือวัสดุเพาะอย่างอื่น และมีอาหารเสริมร่วมอยู่ด้วย ขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดที่เพาะ (Perkins, 2006) มีลักษณะเป็นสีดำหรือสีน้ำตาลเข้ม คล้ายดินหรือบางครั้งอาจสลายเป็นเนื้อเดียวกันกับดินก็ได้ (Landschoot and McNitt, 2014) มีปริมาณอินทรียวัตถุและธาตุอาหารค่อนข้างสูง ก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้วส่วนใหญ่จะมีความชื้นประมาณ 30-50 เปอร์เซ็นต์ ค่า C:N ratio มีค่าเท่ากับ 30:1 (Beyer, 2006) จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า ในก้อนเชื้อเห็ดเก่าจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิดเข้าเจริญและย่อยสลายวัสดุเพาะนอกเหนือจากเส้นใยเห็ดที่เจริญอยู่แล้ว โดยเฉพาะเชื้อราจีนัส Aspergillus, Trichoderma, Mucor และ Penicillium และแบคทีเรียจีนัส Bacillus, Lactobacilli และ Micrococcus (Ashraf, Shahid, and Ali, 2007) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย โดยชนิดและความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์จะมีความแตกต่างกันขึ้นกับชนิดของวัสดุเพาะเห็ดที่นำมาใช้ รวมถึงปัจจัยภายนอกอื่น เช่น อุณหภูมิ ความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง และปริมาณสารอาหารในวัสดุเพาะ (Butlera, Sikora, Steinhilberb, and Douglassb, 2001)

การศึกษาถึงชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญบนก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้วยังมีการศึกษาค่อนข้างน้อย เชื้อจุลินทรีย์ที่อาศัยบนก้อนเชื้อเห็ดเก่ามีความหลากหลายขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ดและวัสดุที่นำมาใช้เพาะ (Ashraf, Shahid, and Ali, 2007) เป็นที่ทราบกันดีว่าเชื้อราและแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญ ในการย่อยสลายเศษซากอินทรียวัตถุให้กลายเป็นดินที่อุดมสมบูรณ์กลับคืนสู่ธรรมชาติ มีบทบาทสำคัญในวัฏจักรของคาร์บอนและไนโตรเจน (Rukachaisirikul, Kaewbumrung, Phongpaichi, and Hajiwangoh, 2005; Reategui, Gloer, Campbell, and Shearer, 2005) งานวิจัยเรื่องนี้เป็นการศึกษาความหลากหลายของชนิดเชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญบนก้อนเชื้อเห็ด และแนวทางการนำไปใช้ประโยชน์ เป็นเรื่องที่น่าสนใจซึ่งยังไม่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง ประโยชน์จากการศึกษาความหลากหลากของชนิดเชื้อราและแบคทีเรียจะเป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาและประยุกต์ใช้ทางการเกษตร อุตสาหกรรม และการแพทย์ต่อไปในอนาคต

1.2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1.2.1 ความสำคัญของเศษวัสดุทางการเกษตร

ปัจจุบันเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นตามจำนวนประชากรที่สูงขึ้น (Woulters, Spaan, Douwes, Doekes, and Heederik, 2005) มีหลายวิธีการที่สามารถจัดการกับเศษวัสดุที่เพิ่มขึ้นเหล่านี้ได้ เช่น การกำจัด การการฟอก และการนำกลับมาใช้ใหม่

ซึ่งวิธีการเหล่านี้เป็นระบบการจัดการทางสิ่งแวดล้อมเพื่อลดปริมาณของเสียหรือเศษวัสดุเหลือใช้ อย่างไรก็ตามเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรยังคงมีธาตุอาหารที่เป็นประโยชน์ค่อนข้างสูง (Iranzo et al., 2004) และมีการศึกษาถึงการนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าไปใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางในต่างประเทศ (Perkins, 2006) ในระหว่างกระบวนการย่อยสลายเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์ เช่น เชื้อราและแบคทีเรียซึ่งมีบทบาทสำคัญในกระบวนการย่อยสลาย ซึ่งวัสดุทางการเกษตรเหล่านี้มีเซลลูโลสเป็นส่วนประกอบหลัก โดยเซลลูโลสเป็นสารประกอบอินทรีย์ที่พบมากที่สุดประมาณ 45 เปอร์เซ็นต์ ของสารอินทรีย์ทั้งหมดในธรรมชาติ ส่วนใหญ่สะสมอยู่ที่ผนังเซลล์ในพืชชั้นสูงทุกชนิด เซลลูโลสประกอบด้วยกลูโคสสายยาวเรียงขนานกันและภายในโมเลกุลจะยึดติดกันแน่นทำให้เซลลูโลสทำปฏิกิริยากับสารต่างๆ ได้ช้า (Fan, Gharpuray, and Lee, 1987) ดังนั้นจำเป็นต้องอาศัยการทำงานของจุลินทรีย์ที่มีกิจกรรมของเอนไซม์เซลลูเลส (cellulase activity) หรือสามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้ในปริมาณมาก Taiwo and Oso (2004) กล่าวว่า ความเหมาะสมของเศษวัสดุแต่ละชนิดจะเป็นตัวกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ในเศษวัสดุนั้นๆ สำหรับกระบวนการย่อยสลายในธรรมชาตินั้นจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องอาศัยจุลินทรีย์ โดยทั่วไปชีวมวลของเชื้อราต่อโปรคาริโอตในเศษวัสดุเหลือใช้จะมีอัตราส่วน 2:1 (Wiegant, 1992) โดยเฉพาะเชื้อราที่ต้องใช้แหล่งคาร์บอนเพื่อการเจริญเติบโต โดยเฉพาะลิกโนเซลลูโลส ซึ่งสามารถเจริญได้ดีในเศษวัสดุที่ย่อยสลายในขั้นตอนสุดท้าย ทั้งนี้เชื้อราสามารถย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลเชิงซ้อนได้เป็นอย่างดี จึงมีการนำมาพัฒนามาใช้ประโยชน์ในหลายด้าน เช่น เพื่อย่อยสลายพลาสติก เพื่อการบำบัดทางชีวภาพ (bioremediation) ของสารปนเปื้อนในดินและมลพิษ (Ashraf and Ali, 2006) และการทำปุ๋ยหมัก (Seephueak, 2012) เป็นต้น แบคทีเรียเป็นอีกกลุ่มจุลินทรีย์ที่พบมากในเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและโรงงานอุตสาหกรรม คิดเป็นร้อยละ 80-90 ของจุลินทรีย์ทั้งหมดที่พบ (Bentitez, Nogales, Elvira, Msciandaro, and Ceccanti, 1999) โดยแบคทีเรียส่วนใหญ่อยู่ในกลุ่ม Pseudomonas sp., Bacillus sp., Cellulomonas sp., Flavobacterium sp., Micrococcus sp., และ Achromobacter sp., เป็นต้น โดยเฉพาะเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Bacillus และ Pseudomonas มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวางทางด้านการเกษตรในปัจจุบัน

1.2.2 ก้อนเชื้อเห็ดเก่า

การเพาะเห็ดในปัจจุบันมีการใช้เทคโนโลยีต่างๆ มากขึ้น ทำให้เพาะได้ง่าย ใช้อุปกรณ์น้อย ไม่สิ้นเปลืองแรงงานและสถานที่ สามารถเพาะให้ออกดอกได้ตลอดทั้งปี เศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตรและอุตสาหกรรมสามารถนำมาใช้เพาะเห็ดได้เป็นอย่างดี เช่น ทะลายปาล์มน้ำมัน ฟางข้าว ผักตบชวา เปลือกถั่วต่าง ๆ (ดีพร้อม, 2540) เปลือกสบู่ดำ (อัจฉรา, 2548) และเปลือกหมากแห้ง (พรศิลป์ และคมสัน, 2548) ซึ่งเหมาะต่อการเพาะเห็ดฟาง ส่วนซากตะไคร้ (สุทธิพันธุ์ และศศิธร, 2546) หญ้าแขม หญ้าเลา หญ้าก๋ง กากกาแฟ ขี้เลื่อยไม้จำปา ใบกระถินเทพา ใบกระถินณรงค์ (พรศิลป์ และคมสัน, 2548) รวมถึงหญ้าอาหารสัตว์ และวัชพืชบางชนิด (อภิรัชต์, 2548) ซึ่งสามารถนำมาใช้เพื่อเพาะเห็ดตระกูล Pleurotus ได้เป็นอย่างดี

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า (spent mushroom compost) คือวัสดุที่เหลือใช้ตาม

ธรรมชาติหลังจากเสร็จสิ้นกระบวนการเพาะเห็ด โดยก้อนเชื้อเห็ดเก่าจะเป็นแหล่งของฮิวมัสและสารอาหารที่เป็นประโยชน์ ทั้งนี้ก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้ว ประกอบด้วยวัสดุเพาะหลัก เช่น ขี้เลื่อย ฟางข้าว ซังข้าวโพด กากฝ้าย หรือวัสดุเพาะอย่างอื่น และมีอาหารเสริมเช่นรำละเอียด กากถั่วเหลืองป่น มูลสัตว์ ดีเกลือ ปูนขาว และยิปซัม ผสมอยู่ด้วยขึ้นอยู่กับสูตรอาหารและชนิดของเห็ดที่เพาะ (Perkins, 2006) โดยทั่วไปก้อนเชื้อเห็ดเก่า จะมีสีน้ำตาลเข้ม ลักษณะเป็นเส้นใยเนื้อเหนียว อุดมไปด้วยอินทรียวัตถุในปริมาณสูง เมื่อผ่านกระบวนการเพาะเห็ดก้อนเชื้อเห็ดเหล่านี้สามารถนำมาใช้ใหม่ได้ โดยการนำมานึ่งฆ่าเชื้อเพื่อกำจัดแมลง เชื้อโรค และเส้นใยเห็ดบางส่วนที่ยังคงเหลืออยู่ (Lanschoot and McNitt, 2014) ลักษณะทั่วไปของก้อนเชื้อเห็ดเก่า แสดงไว้ในตารางที่ 1.1

ตารางที่ 1.1 ลักษณะทั่วไปของก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ลักษณะ (appearance)	
สี (color)	น้ำตาล ถึงดำ
ขนาด (size)	0.01-0.05 มิลลิเมตร (วัสดุเพาะหลักคือขี้เลื่อย)
กลิ่น (odor)	เหมือนดิน
คุณสมบัติทางกายภาพ (physical properties)	
ความชื้น (moisture content)	30-50 %
อินทรียวัตถุ (organic matter)	> 40 %
เถ้า (ash content)	< 60 %
คุณสมบัติทางเคมี (chemical properties)	
C:N ratio	น้อยกว่า หรือเท่ากับ 30:1
ไนโตรเจน (nitrogen)	1.5-3.0 %
ฟอสฟอรัส (P_2O_5)	0.5-2.0 %
โพแทสเซียม (K_2O)	1-3 %

ความเป็นกรด-ด่าง (pH) 6.0-8.0
ที่มา : ดัดแปลงจาก Lanschoot and Mcnitt (2014)

1.2.2.1 ลักษณะของก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ก้อนวัสดุเพาะเห็ดที่เสร็จสิ้นกระบวนการออกดอกหรือไม่ให้ผลผลิตแล้ว โดยทั่วไปก้อนเห็ดเก่าที่หมดอายุจะเป็นก้อนเห็ดที่เก็บดอกเห็ดไปแล้วนานกว่า 3 เดือน ทั้งนี้ลักษณะก้อน เชื้อเห็ดเก่าสามารถพิจารณาคัดแยก เพื่อนำไปใช้ทำประโยชน์ ทั่วไปก้อนเห็ดเก่าแบ่งได้เป็น 4 กลุ่มดังนี้

1) ก้อนเห็ดปกติ คือก้อนเห็ดที่มีอายุ 3 เดือนหลังจากเปิดหน้าก้อนเก็บดอกเห็ด เป็นก้อนเห็ด ที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ และเส้นใยเห็ดยังเดินอยู่ สามารถเก็บดอกเห็ดได้ต่อไปจนกว่าจะหมดสภาพ เริ่มเสื่อมให้ปล่อยไว้ก่อน

2) ก้อนเห็ดกินก้อน คือก้อนเห็ดที่มีอายุการเก็บดอกเห็ดแล้ว 3 เดือน แต่ธาตุอาหารที่มากกับก้อนเห็ดเดิมเริ่มหมด และเป็นเวลาที่ก้อนเห็ดเริ่มย่อยสลายก้อนจะเริ่มยุบตัว มีเส้นใยเห็ดยังเดินอยู่จาก การกินธาตุอาหารอินทรีย์จากการย่อยสลายก้อน ยังสามารถเก็บดอกเห็ดได้อยู่จนกว่าก้อนจะยุบตัวมาก เส้นใยเห็ดจะเริ่มเสื่อม

3) ก้อนเห็ดตาย คือก้อนเห็ดที่ขาดธาตุอาหารก่อน 3 เดือน เส้นใยเห็ดตายเนื่องจากไม่มีธาตุ อาหารเพียงพอ เศษวัสดุที่มากับก้อน (ขี้เลื่อย) ยังไม่สามารถเป็นปุ๋ยได้ สามารถนำไปใช้หมักทำปุ๋ยได้เลย โดยใช้เวลาหมัก 45 วันจึงใช้เป็นปุ๋ยได้

4) ก้อนเห็ดเน่า คือก้อนเห็ดที่เชื้อเห็ดหรือเส้นใยของเห็ดตายก่อนอายุ 1 เดือน ก้อนเห็ดจะถูก ย่อยสลายในตัวเองตั้งแต่เริ่มแรก จากจุลินทรีย์ภายในก้อน สามารถนำไปใช้ทำเป็นปุ๋ยหมักได้ ใช้เวลาหมัก 2 รวมเวลาที่เปิดหน้าก้อนกับเวลาหมักทั้งหมดเป็นเวลา 3 เดือน จึงนำไปใช้เป็นปุ๋ยให้กับต้นไม้ได้ (นิรนาม, 2560)

1.2.2.2 ปริมาณธาตุอาหารในก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ปัจจุบันเห็ดที่เกษตรกรเพาะปลูกเห็ดเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เห็ดนางรมฮังการี เห็ดนางฟ้าภูฏาน เห็ดหูหนู และเห็ดฟาง เป็นต้น มีการประมาณการว่าการผลิตเห็ด 1 กิโลกรัม ต้องใช้ปริมาณเศษ ก้อนเชื้อเห็ดเก่าประมาณ 5 กิโลกรัม (Williams, McMullan, and McCahey, 2001) และภายหลังการเพาะเห็ดจึงเกิดปัญหามีเศษก้อนเชื้อเห็ดเก่าเหลือทิ้งในพื้นที่เป็นจำนวนมาก จากรายงานของ Fazaeli and Masoodi (2006) กล่าวว่า วัสดุเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ดมีคุณสมบัติเป็นวัสดุจาพวกลิกโนเซลลูเลส (linocellulosic material) อีกทั้งยังประกอบด้วยเชื้อจุลินทรีย์ และเอนไซม์ที่สร้างขึ้นภายในเซลล์ (extracellular enzymes) (Ball and Jackson, 1995) จากรายงานของ Ko, Park, Kim, Gu, and Park (2005) พบว่า กิจกรรมของ เอนไซม์อะไมเลส เซลลูเลส และไซแลนเนส นอกจากนี้ยังพบส่วนประกอบของกลุ่มเส้นใย (hypha) และเศษเห็ดบางส่วนในก้อนเชื้อเห็ดเหลือทิ้ง รวมถึงเยื่อใยที่ละลายในน้ำ (soluble fiber) คือ non starch glycan ประมาณ 442-901 กรัมต่อกิโลกรัม และกลูแคนในรูปแบบอื่น เช่น ไคติน และ กาแลคโตแมนแนน เป็นต้น (Synytsya et al., 2009) ก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่ผ่านการเพาะเห็ดมาแล้วมี คุณสมบัติ

เป็นอินทรีวัตถุ อุดมไปด้วยสารอาหารที่จำเป็นค่อนข้างสูง (Beyer, 2006) โดยเฉพาะก้อนเชื้อ เห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดตระกูล Pleurotus พบว่ามีปริมาณธาตุอาหารหลักในปริมาณสูง กล่าวคือ ประกอบด้วย ไนโตรเจน (N) 1.70 เปอร์เซ็นต์ ฟอสฟอรัส (P_2O_5) 0.61 เปอร์เซ็นต์ และโพแทสเซียม (K_2O) 1.13 เปอร์เซ็นต์ (Rinker, 2004) ปริมาณธาตุอาหารในก้อนเชื้อเห็ดเก่า แสดงไว้ในตารางที่ 1.2

ตารางที่ 1.2 ปริมาณธาตุอาหารในก้อนเชื้อเห็ดเก่าตระกูล Pleurotus

รายการ ปริมาณ หน่วย	
โซเดียม (Na)	
โพแทสเซียม (K)	
แมกนีเซียม (Mg)	
แคลเซียม (Ca)	
อลูมินัม (Al)	
เหล็ก (Fe)	
ฟอสฟอรัส (P)	
แอมโมเนีย (NH_4)	
สารอินทรีย์ไนโตรเจน (organic nitrogen)	
ไนโตรเจนทั้งหมด (total nitrogen)	
ของแข็ง (solids)	
ของแข็งละลายเมื่อเผา (volatile solids)	
ความเป็นกรด-ด่าง (pH)	
อัตรา ไนโตรเจน-ฟอสฟอรัส-โพแทสเซียม (N-P-K ratio)	0.21 - 0.33
	1.93 - 2.58
	0.45 - 0.82
	3.63 - 5.15
	0.17 - 0.28
	0.18 - 0.34
	0.45 - 0.69
	0.06 - 0.24
	1.25 - 2.15

1.42 - 2.05
33.07 - 40.26
52.49 - 72.42
5.8 - 7.7
1.8- 0.6 - 2.2 เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์
เปอร์เซ็นต์

เปอร์เซ็นต์
ที่มา: Bayer (2006)

1.2.2.3 การใช้ประโยชน์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า

โดยทั่วไปสามารถนำก้อนเชื้อเห็ดเก่าและเศษวัสดุเหลือทิ้งของการตัดแต่งดอกเห็ดไปใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน ดังนี้

1) การแปรรูปเศษเห็ดเพื่อใช้เป็นแหล่งโปรตีนสำหรับผลิตอาหารปลา

วุฒิพร, สันติ, สุภัทรา, ยุทธวัฒน์ และนันท์ (2557) ศึกษาการใช้เศษเหลือเห็ดนางฟ้าทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลานิลแดงที่มีน้ำหนักเริ่มต้นเฉลี่ย 3.84 กรัม อาหารทดลองมี 6 สูตร โดยมีโปรตีน 30 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 14.5 เมกะจูล/กิโลกรัม อาหารใกล้เคียงกันทุกสูตร โดยสูตรที่ 1 ถึง 6 มีการแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยเศษเหลือเห็ดนางฟ้าที่ระดับ 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 เปอร์เซ็นต์ จากการทดลองพบว่า การเจริญเติบโตและอัตรารอดตายของปลาในระหว่างชุดการทดลองไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ เมื่อพิจารณาถึงประสิทธิภาพการใช้อาหารพบว่า การแทนที่โปรตีนในระดับไม่เกิน 20 เปอร์เซ็นต์ ให้ผลดีที่สุดแต่ไม่แตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม ($p>0.05$) การใช้ประโยชน์จากโปรตีนสุทธิ และค่าสัมประสิทธิ์การย่อยโปรตีนมีแนมโน้มลดลง เมื่อแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยเศษเหลือเห็ดนางฟ้าในปริมาณที่สูงขึ้น ($p<0.05$) แต่ทั้งนี้ค่าประสิทธิภาพการใช้โปรตีนไม่มีความแตกต่างทางสถิติระหว่างชุดทดลอง จากการทดลองครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า สามารถแทนที่โปรตีนจากปลาป่นด้วยเศษเหลือเห็ดนางฟ้าในระดับที่ไม่เกิน 30 เปอร์เซ็นต์ ในอาหารสำหรับปลานิลแดงโดยไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเติบโตและการแทนที่ที่ระดับ 28 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ต้นทุนการผลิตปลาต่ำที่สุด

2) การนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาใช้เป็นอาหารสัตว์

มีการศึกษาคุณค่าทางโภชนะและการปรับปรุงเศษเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ เช่น ได้แก่ โคนม แพะ สุกร ไก่เนื้อ ไก่ไข่ โดยที่ มนัสนันท์, พรพรรณ, อัญญา และวรางคณา (2560) การศึกษาโภชนะจากเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ดและ การปรับปรุงเศษเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด ด้วยวิธีการหมัก พบว่าสามารถปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ดได้ โดยส่งผลให้ไขมันรวม พลังงานรวม โปรตีนหยาบ อินทรียวัตถุ แคลเซียมรวม ฟอสฟอรัสรวม และเฮมิเซลลูโลสเพิ่มขึ้น ($P<0.01$) หากแต่ทำให้เซลลูโลสและลิกนินลดลง ($P<0.01$) นอกจากนี้ยังพบว่า การดัดแปลงเศษเห็ดนางรมตัดแต่งเหลือทิ้งด้วยวิธีการหมักสามารถปรับปรุงคุณค่าทางโภชนะของ เศษเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ดได้ โดยส่งผลให้ไขมันรวม พลังงานรวม โปรตีนหยาบ อินทรียวัตถุ แคลเซียมรวม และฟอสฟอรัสรวมเพิ่มขึ้น ($P<0.01$) หากแต่ทำให้เยื่อใยหยาบลดลง ($P<0.01$) การทดลองนี้สามารถสรุปได้ว่าวิธีการหมักสามารถเพิ่มคุณค่าทางโภชนะของเศษเหลือทิ้งจากกระบวนการเพาะเห็ด

3) การนำไปเป็นส่วนผสมในการทำก้อนใหม่

ทั้งนี้สามารถนำขี้เลื่อยจากก้อนเห็ดเก่าผสมกับก้อนเห็ดใหม่ และผสมร่วมกับอาหารเห็ดและนึ่งฆ่าเชื้อ จะเป็นการลดต้นทุนในการทำก้อนครั้งต่อๆ ไป โดยสูตรอาหารนี้เกษตรกรจะนำไปประยุกต์ใช้ เพื่อเพาะเห็ดฟางในตะกร้าและการเพาะเห็ดฟางในกระสอบ นอกจากนี้ณัฐวุฒิ และวสันต์ (2557) ได้การศึกษาการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นวัสดุสำหรับเพาะเห็ดยานางิ (Agrocybe cylindracea) พบว่าการใช้ก้อนเชื้อเก่า 100 เปอร์เซ็นต์ เห็ดยานางิให้จำนวนดอกเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 61.00 ดอก/ถุง รองลงมาคือ การใช้ก้อนเชื้อเก่าผสมขี้เลื่อยไม้ยางพารา อัตรา 3:1 เห็ดให้จำนวนดอกเฉลี่ยเท่ากับ 41.29 ดอก/ถุง สำหรับการใช้ก้อนเชื้อเก่าผสมขี้เลื่อยไม้ยางพารา อัตรา 1:1 และ 1: 3 ให้จำนวนดอกเฉลี่ย เท่ากับ 35.75 และ 35.32 ดอก/ถุง ตามลำดับส่วนการใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 เปอร์เซ็นต์ (ชุดควบคุม) เห็ดให้จำนวนดอกเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 31.25 ดอก/ถุง ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ ส่วนผลของการศึกษาน้ำหนักผลผลิตเห็ด พบว่า การใช้ก้อนเชื้อเก่า 100 เปอร์เซ็นต์ ให้น้ำหนักดอกเห็ดสูงสุด เท่ากับ 135.63 กรัม/ถุง (B.E.=40.79 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือ การใช้ก้อนเชื้อเก่าผสมขี้เลื่อยไม้ยางพาราอัตรา 3:1 เห็ดให้น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 111.42 กรัม/ถุง (B.E.=33.51 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่การใช้ก้อนเชื้อเก่าผสมขี้เลื่อยยางพาราอัตรา 1:1 และ 1:3 น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 97.38 กรัม/ถุง (B.E.= 29.28 เปอร์เซ็นต์) และ 84.44 กรัม/ถุง (B.E.=25.40 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ ส่วนการใช้ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 เปอร์เซ็นต์ เห็ดให้น้ำหนักดอกเฉลี่ยน้อยที่สุด เท่ากับ 56.46 กรัม/ถุง (B.E.=16.91 เปอร์เซ็นต์) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

4) การผลิตแท่งเชื้อเพลิงเขียว

พิมพา, สุริสา, รวิภา และพิบูลย์ (2552) ศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิง และความเป็นไปได้ในการนำก้อนวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดแล้วมาใช้กับเทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชั่นแบบต่างๆ รวมถึง ศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิงของก้อนวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดแล้วนำมาใช้เป็นเชื้อเพลิงให้กับเทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชั่น เมื่อนำก้อนวัสดุที่ใช้เพาะเห็ดแล้วมาทำการทดสอบคุณสมบัติของการเป็นเชื้อเพลิงได้แก่ ค่าความร้อนถ่านคงที่ เถ้า และสารระเหย ค่าความชื้นต่างๆ พบว่ามี

ประสิทธิภาพ จึงเป็นอีกแนวทางเพื่อการประยุกต์ใช้เทคโนโลยีด้านพลังงานทดแทน และการลดปริมาณขยะจากกิจกรรมทางการเกษตรได้อีกทางหนึ่งด้วย

5) การนำไปเป็นส่วนผสมของปุ๋ยหมัก

โดยนำขี้เลื่อยจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าไปหมักทำเป็นส่วนผสมของปุ๋ยหมัก เนื่องจากก้อนเห็ดเก่าอุดมไปด้วยสารอาหาร แร่ธาตุต่าง ๆ ซึ่งผ่านระยะเวลาในการย่อยสลายของจุลินทรีย์ และยังคงมีปริมาณสารอาหารเป็นจำนวนมาก ปุ๋ยหมักจากก้อนเชื้อเห็ดจึงเป็นปุ๋ยหมักชั้นดี การผลิตปุ๋ยหมักจากก้อนเห็ด โดยการนำก้อนเชื้อเห็ดเก่ามาทุบให้แหลกตั้งกองไว้ผสมกับปุ๋ยคอกแห้ง เช่น ปุ๋ยขี้วัว ปุ๋ยขี้ไก่ผสมแกลบ อัตราส่วนก้อนเชื้อเห็ดเก่าต่อปุ๋ยคอก 1 : 3 ตามปริมาตร คลุกเคล้าให้เข้ากัน ใช้หัวเชื้อจุลินทรีย์ช่วยย่อยสลาย (น้ำอีเอ็ม) ผสมน้ำอัตรา 1 : 100 หรือใช้สารเร่ง พด.1 และเชื้อราเมธาไรเซียม หรือบูวาเรีย แบบผงผสมน้ำอัตรา 50-100 กรัม ต่อน้ำ 20 ลิตร ทำการคลุกเคล้าให้เข้ากันผสมกับน้ำที่เตรียมไว้ความชื้นประมาณ 60 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเข้ากันดีแล้วหมักกองปุ๋ยไว้ 45 วัน ทำการกลับกองทุก 7 วัน เพื่อช่วยระบายความร้อนป้องกันเชื้อจุลินทรีย์ตายเมื่อครบ 45 วัน นำปุ๋ยหมักที่ได้ไปใช้เป็นปุ๋ยอินทรีย์สำหรับไม้ดอกไม้ประดับในกระถางหรือพืชผักผลไม้ทั่วไป (นิรนาม, 2560) ปริมาณธาตุอาหารที่ได้จากปุ๋ยหมักก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่ผลิตจาก สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อำเภอทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช โดยพัฒนาที่ดินเขต 8 กรมวิชาการเกษตร จังหวัดสุราษฎร์ธานี แสดงไว้ในตารางที่ 1.3

ตารางที่ 1.3 ปริมาณธาตุอาหารที่ได้จากปุ๋ยหมักก้อนเชื้อเห็ดเก่า

รายการ			
OM (% w/w)	OC (% w/w)	C/N ratio	N (%)
P2O5 (%)	K2O (%)	pH (%)	ดิน : น้ำ (1 : 1)
EC(Ds/M)	ดิน : น้ำ (1 : 5)	Moisture (% w/w)	

35.51	20.6	10	2.06	1.60	1.48	9.66	1.86	76.47

1.2.3 จุลินทรีย์กับการย่อยสลาย

ในกระบวนการย่อยสลายเศษซาก จุลินทรีย์มีบทบาทโดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งการย่อยสลายเซลลูโลส ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของพืช เนื่องจากเซลลูโลสมีลักษณะโครงสร้างทางเคมีสายยาว จุลินทรีย์ไม่สามารถเข้าสู่เซลล์ได้โดยตรง ดังนั้นจุลินทรีย์ต้องสร้าง extracellular enzyme ออกมาย่อยเซลลูโลสให้เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ละลายน้ำได้ และสามารถผ่านเข้าไปในเซลล์ได้ เอนไซม์ที่ย่อยสลายเซลลูโลสได้เรียกว่า เอนไซม์เซลลูเลส มีสิ่งมีชีวิตหลายชนิดสร้างเอนไซม์นี้ได้ (พรเทพ, 2538) จุลินทรีย์นับว่ามีความสำคัญในการย่อยสลายเซลลูโลสมาก ในกระบวนการย่อยสลายซึ่งเป็นกิจกรรมของจุลินทรีย์ ดังนั้น จำนวนของจุลินทรีย์จึงมีความสัมพันธ์กับ ปริมาณคาร์บอน และธาตุอาหารที่มีเพื่อสนับสนุนกิจกรรมของจุลินทรีย์ (Butlera, Sikora, Steinhilberb, and Douglassb, 2001) ปริมาณอินทรียวัตถุ จุลินทรีย์สามารถย่อยสลายธาตุอาหารและน้ำเพื่อการเจริญบนกองวัสดุนั้น ดังนั้นความชื้นที่เหมาะสมมีความจำเป็นต่อกิจกรรมของจุลินทรีย์ เช่นเดียวกับอุณหภูมิซึ่งมีอิทธิพลต่ออัตราการย่อยสลายและชนิดของจุลินทรีย์บนเศษวัสดุนั้น หากอุณหภูมิลงต่ำลง กระบวนการย่อยสลายก็จะช้าตามไปด้วย ในขณะเดียวกันถ้าอุณหภูมิสูงขึ้นอัตราการย่อยสลายก็จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว ชนิดของจุลินทรีย์เองก็จะเปลี่ยนแปลงไปขึ้นอยู่กับความหลากหลายของปัจจัยเช่นเดียวกัน โดยเฉพาะเชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญได้ดีบนเศษซากที่มีการทับถมและที่อุณหภูมิค่อนข้างสูง

ปัจจุบันมีการวิจัยและศึกษาความหลากหลายของเชื้อจุลินทรีย์ที่ย่อยสลายเศษซากอินทรียวัตถุกันมากขึ้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์อย่างกว้างขวาง ดังแสดงในตารางที่ 1.4 Eriksson, Blanchette, and Ander (1990) รายงานว่า เชื้อราที่มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายซากพืช ได้แก่เชื้อรา Helicosporium, Volutella, Wiesneriomyces และ Zygosporium นอกจากนี้ยังพบเชื้อราหลายชนิดที่สามารถสร้างเอนไซม์เซลลูเลสได้เป็นอย่างดี เช่น Chaetomium cupreum, Gilmaniella humicola, Memmaria echinobotryoides, Scytalidium lignicola, Trichoderma harmatum และ T. harzianum เป็นต้น ซึ่งเชื้อราเหล่านี้สามารถนำมาใช้เพื่อการทำปุ๋ยหมักได้เป็นอย่างดี (Seephueak, 2012) Taiwo and Oso (2004) รายงานว่าความอุดมสมบูรณ์และความเหมาะสมของอินทรียวัตถุแต่ละชนิดจะเป็นตัวกำหนดชนิดของจุลินทรีย์ในเศษวัสดุนั้นๆ โดยเฉพาะเชื้อราที่สามารถย่อยสลายสารประกอบโมเลกุลเชิงซ้อนได้เป็นอย่างดี จึงได้มีการนำมาพัฒนาเพื่อการกำจัดขยะที่เป็นพลาสติก มลพิษและสารปนเปื้อนในดิน (Ashraf and Ali, 2006) เป็นต้น

Ashraf, Shahid, and Ali (2007) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อรา แบคทีเรีย และแอคติโนมัยซิส บนเศษวัสดุเหลือใช้ทางการเกษตร พบเชื้อจุลินทรีย์ทั้งหมด 119 สปีชีส์ โดยพบเชื้อรามากที่สุด ได้แก่ เชื้อราจีนัส Aspergillus, Trichoderma, Mucor, Penicillium, Alternaria และ Cladosporium เป็นต้น เชื้อแอคติโนมัยซีส ได้แก่ Nocardia และเชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Bacillus, Lactobacilli, Micrococcus, Pseudomomas และ Clostridium เป็นต้น Kleyn and Wetzler (1981) ศึกษาชนิดของเชื้อจุลินทรีย์บนก้อนเชื้อเห็ดเก่า พบว่า เชื้อราที่พบได้บ่อย

ได้แก่ Aspergillus fumigatus และ Humicola grisea var. thermoidea เชื้อแบคทีเรีย ได้แก่ Bacillus licheniformis และเชื้อแอคติโนไมซีส ได้แก่ Streptomyces diastaticus และ Thermoactinomyces vulgaris เป็นต้น

1.2.4 เอนไซม์เซลลูเลสกับการย่อยสลายของเชื้อจุลินทรีย์

เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบในกองเศษวัสดุเหลือใช้ขยะและของเสียต่างๆ ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์เซลลูเลส ซึ่งจัดเป็น extracellular hydrolytic enzyme พบได้ในเชื้อราหลายชนิด เช่น Aspergilus spp., Chaetomium spp., Penicillium spp., Fusarium spp. ในแบคทีเรียหลายชนิด เช่น Cellulomonas spp., Bacillus spp., Pseudomonas spp. และ ในแอคติโนมัยซีส เช่น Streptomyces spp., Thermonospora spp. (Bellamy, 1977) เอนไซม์ดังกล่าวประกอบด้วย endo 1,4-β-glucanases, exo 1,4-β-glucanases และ 1,4-β-glucosidase ซึ่งเอนไซม์ทั้ง 3 ชนิดนี้ จะร่วมกันย่อยเซลลูโลสได้เป็นกลูโคส (Eriksson, Blanchette, and Ander, 1990; Bhat, 1997) Asha and Prema (2007) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตขึ้นโดยแบคทีเรียสายพันธุ์ Bacillus pumilis โดยการทดลองเลี้ยงเชื้อในอาหารแข็ง เพื่อศึกษาความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ทำการเลี้ยงเชื้อในอาหารที่มีสารประกอบด้วยแหล่งวัตถุดิบที่เหลือทิ้งทางการเกษตรหลายชนิด เช่น ขี้เลื่อย, ฟางข้าว, เปลือกข้าว, ชานอ้อย และรำข้าวสาลี ผลการศึกษาพบว่า แบคทีเรียมีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุดในรำข้าวสาลี ทั้งนี้เนื่องจากรำข้าวสาลีประกอบด้วยน้ำตาลที่ละลายน้ำได้ เช่นกลูโคส (glucose) 42.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ไซโลส (xylose) 15.4 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง อะราบิโนส (arabinose) 3.1 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง และกาแลคโตส (galactose) 2.7 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักแห้ง ซึ่งจัดว่าเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์ นอกจากนี้ Asha and Prema (2007) ยังได้ทำการศึกษาผลของความชื้นและค่าความเป็นกรด-ด่าง ที่เหมาะสมต่อการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส พบว่าที่ความชื้นมากกว่า 75 เปอร์เซ็นต์ และค่าความเป็นกรด-ด่าง 8 ถึง 9 เป็นสภาวะที่เหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญของจุลินทรีย์

Juhasz, Szengyel, Reczey, Suka-Aho, and Viikari (2005) ศึกษาลักษณะของเอนไซม์เซลลูเลสที่ผลิตได้จากเชื้อรา Trichoderma reesei RUT C30 โดยทำการศึกษาแหล่งคาร์บอน (carbon source) ที่เหมาะสมที่ทำให้เชื้อรา T. reesei RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด โดยใช้ ต้นสนใบสั้น, ต้นหลิว, ซังข้าวโพด และ Solka Floc เป็นแหล่งคาร์บอน ผลการศึกษาพบว่า ซังข้าวโพดเป็นแหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมที่สุด ทำให้เชื้อรา T. reesei RUT C30 มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสมากที่สุด

ดิเรก และสุรัตน์ (2556) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียที่ย่อยสลายไม้ผุ ฟางข้าวหมัก และมูลวัว พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลท และเชื้อรา 27 ไอโซเลท ในจำนวนนี้ เชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท และเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเมื่อนำไปใช้ทดสอบอัตราการย่อยสลายฟางข้าวในแปลงนา พบว่า เชื้อแบคทีเรีย Salmonella paratyphi, Bacillus cereus, B. subtilis และ Proteus mirabilis และเชื้อรา ได้แก่ Penicillium spp., Chaetomium sp. และ Aspergillus

terreus มีประสิทธิภาพสูงในการเร่งกระบวนการย่อยสลายให้เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว Tsao and Chaing (1983) ศึกษากระบวนการย่อยสลายเศษซาก พบว่าเชื้อราจัดเป็นกลุ่มจุลินทรีย์ที่มีบทบาทสำคัญ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยปัจจุบันพบว่าการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสเพื่อการค้ามักเป็นเอนไซม์เซลลูเลสผสม ที่สกัดได้จากเชื้อราชนิดที่แตกต่างกันไป และให้ปริมาณเอนไซม์ที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับสายพันธุ์ของเชื้อราที่ใช้องค์ประกอบของอาหาร และสภาวะที่ใช้ในการผลิต ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส แสดงไว้ในตารางที่ 1.4

ตารางที่ 1.4 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อรา	เชื้อแบคทีเรีย	เชื้อแอคติโนมัยสิท
Agaricus bisporus		
Alternaria sp.		
Ascobolus furfuraceus		
Aspergillus sp.		
A. aculeatus		
A. phoenicis		
A. terreus		
A. niger		
A. fumigatus		
A. wentii		
Botryodiplodia theobromae		
Chaetomium globosum		
Chaetomium sp.		
Cladosporioides		
Chrysosporium lignorum		
Coriolus versicolor		
Coprinus sp.		
Cladosporium		
Dichomistus sqalens		

Fomes sp.
Eupenicillium javanicum
Fusarium sp.
F. moniliforme
F. solani
Myrothecium sp.
Penicillium sp.
Polyporus sp. Bacillus sp.
Cellulomonas sp.
Clostridium sp.
Corynebacterium sp.
Cytophaga sp.
Polyangium sp.
Pseudomonas sp.
Sporocytophaga sp.
Vibrio sp. Micromonospora sp.
Nocardia sp.
Streptomyces sp.
Streptosporangium sp.

ตารางที่ 1.4 ชนิดของจุลินทรีย์ที่สามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลส (ต่อ)

เชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย เชื้อแอคติโนมัยสิท
Rhizoctonia sp.
Sporotrichum sp.
Thielavia sp.
Thraustotheca clavata
Torula thermophile
Trametes sp
Trichothecium sp.
Trichoderma sp.
Verticillium sp.
Volvariella volvacea
Verticillium albo-atrum
Zygorhynchus sp.
ที่มา: พรเทพ (2538) : ดัดแปลงมาจาก Eriksson, Blanchette, and Ander (1990)

1.2.5 ประโยชน์และการประยุกต์ใช้เอนไซม์เซลลูเลสจากจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีการใช้เอนไซม์เซลลูเลส หรือจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างเอนไซม์ย่อยสลายเซลลูโลสได้ในอุตสาหกรรม และเกษตรกรรม เช่น การใช้ในการสลายพืชผัก และกากเหลือจากเกษตรกรรม การย่อยขยะเป็นปุ๋ยหมัก (พิจิตรา, 2548) เป็นต้น ตัวอย่างการใช้ประโยชน์ได้แก่

1) อุตสาหกรรมกระดาษ เอนไซม์เซลลูเลสบางชนิดมีความเหมาะสมในส่วนการช่วยลดเวลาในการตี (beating time) ช่วยต้านไข (grease resistance) ทำให้กระดาษมีคุณภาพดี

2) ในกระบวนการทำน้ำผักกระป๋อง

3) ใช้ในการสกัดน้ำผลไม้เปรี้ยว และทำให้ใส (extraction and clarification of juice) และการทำให้น้ำผลไม้เป็นเนื้อเดียวกัน

4) เอนไซม์เซลลูเลสนำมาใช้เป็นส่วนประกอบในส้วมถังเกรอะ (septic tank)

5) เชื้อรา T. reesei สร้างเอนไซม์เซลลูเลส ช่วยสลายผนังเซลล์พืช ทำให้มีการเชื่อมโปรโตพลาสต์ (protoplast) ของเซลล์พืชสองชนิด

6) ใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น อุตสาหกรรมเครื่องดื่ม

7) ช่วยเพิ่มอัตราการย่อยในอุตสาหกรรมอาหารสัตว์

8) ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์จากเมล็ดธัญพืช

9) ใช้จุลินทรีย์ที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลสในอุตสาหกรรมการผลิตปุ๋ยหมัก

10) นอกจากนี้ยังมีการนำเอนไซม์เซลลูเลสมาผลิตเป็นยา โดยใช้เอนไซม์เซลลูเลสร่วมกับเอนไซม์ชนิดอื่นช่วยเป็นยาขับลมในกระเพาะ และช่วยลดอาการแน่นท้อง เนื่องจากเอนไซม์เซลลูเลสไปย่อยเส้นใยได้

1.2.6 แหล่งอาหารของเห็ด

ในการเพาะเห็ดให้ประสบความสำเร็จนั้น ต้องอาศัยปัจจัยหลายประการนอกเหนือจากการฝึกปฏิบัติ การสังเกต ความรู้พื้นฐานด้านชีววิทยา การแบ่งเซลล์และวงจรชีวิตของชนิดเห็ดที่ เพาะปลูกแล้ว ยังจำเป็นที่จะต้องทราบถึง แหล่งและชนิดของอาหาร รวมทั้งปัจจัยอื่นที่เกี่ยวข้อง เห็ดได้รับอาหารและพลังงานจากการย่อยสลายสารอินทรีย์ โดยการปล่อยน้ำย่อยหรือเอนไซม์มาย่อยสลายอินทรีย์สารโมเลกุลใหญ่ให้เล็กลง แล้วจึงดูดซึมสู่ภายในเซลล์ แหล่งอาหารเห็ดมีดังนี้ (แสงแก้ว, 2548; ชยพร, 2550)

1) แหล่งคาร์บอน (carbon) เห็ดใช้คาร์บอนเป็นแหล่งพลังงาน เพื่อการเจริญเติบโต แหล่งอาหารคาร์บอนที่มีโมเลกุลขนาดเล็ก ได้แก่ น้ำตาล เช่น น้ำตาลกลูโคส ไซโลส อะราบิโนส แหล่งคาร์บอนที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ ได้แก่ แป้ง เซลลูโลส และลิกนิน เป็นต้น ดังนั้นการใช้วัสดุเพาะที่เป็นขี้เลื่อยไม้เนื้ออ่อนในการเพาะเห็ดในถุงพลาสติก และมีการเติมแหล่งคาร์บอนที่อยู่ในรูปอย่างง่าย เช่น เซลลูโลส แป้ง และน้ำตาลเสริมเข้าไปในวัสดุเพาะในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโตได้ดี

2) แหล่งไนโตรเจน (nitrogen) เห็ดใช้ไนโตรเจนเพื่อสังเคราะห์โปรตีน แหล่งไนโตรเจน ได้แก่ ปุ๋ยแอมโมเนีย ปุ๋ยไนเตรท และสารอินทรีย์ที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ

ไนโตรเจนมีส่วนสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด โปรตีนที่อยู่ในรำละเอียด ส่าเหล้า หรือแม้แต่กระถินป่น จะช่วยในการกระตุ้นให้เห็ดออกดอกได้ดียิ่งขึ้น

3) แหล่งธาตุอาหาร (element) ธาตุอาหารมีความจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเห็ด โดยเฉพาะระยะที่เป็นเส้นใยเห็ดต้องการธาตุอาหาร แคลเซียม แมกนีเซียม ฟอสฟอรัส และโพแทสเซียม เห็ดต้องการธาตุอาหารในปริมาณเล็กน้อย เพื่อกระบวนการทางสรีรวิทยา ดังนั้นในสูตรวัสดุเพาะเห็ดจึงมีความจำเป็นต้องใส่ ยิปซัม ($CaSO_4$) ดีเกลือ ($MgSO_4$) ปุ๋ยฟอสฟอรัส และปุ๋ยโพแทสเซียม เพื่อช่วยให้เห็ดเจริญเติบโตได้ดีขึ้น

4) แหล่งเกลือแร่ (mineral) เกลือแร่เป็นอาหารที่สำคัญมีผลต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด เกลือแร่ที่สำคัญ ได้แก่ ฟอสฟอรัส โพแทสเซียม กำมะถัน แคลเซียม แมกนีเซียม โมลิบดินัม โบรอน ทองแดง แมงกานีส และสังกะสี เป็นต้น

5) แหล่งวิตามิน (vitamin) วิตามิน มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด พบว่า ฮอร์โมนเขียวที่ได้จากการสกัดจากเปลือก กุ้งหรือปู ในอัตราความเข้มข้น 0.1-0.2 เปอร์เซ็นต์ หรือวิตามิน บี1 (thiamine) อัตราความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร สามารถเร่งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดได้

6) แหล่งสารกระตุ้นการเจริญเติบโตหรือฮอร์โมน (growth promoting activity) ฮอร์โมนหลายชนิดมีคุณสมบัติในการกระตุ้นหรือเร่งการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดได้ เช่น giberellic acid ที่สกัดจากเชื้อรา Gibberella fujikuroi อัตราความเข้มข้น 0.001 เปอร์เซ็นต์ มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดโคนญี่ปุ่น พบว่าในปัจจุบันการเพาะเห็ดฟางเกษตรกรนิยมใช้สารกลุ่มฮอร์โมนเพิ่มมากขึ้น

1.2.7 ปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด

การเพาะเห็ดมีปัจจัยที่สำคัญส่งผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด ดังกล่าวไปแล้วข้างต้นยังมีปัจจัยด้านสภาพแวดล้อม อันประกอบด้วย อุณหภูมิ ความชื้น แสง และการถ่ายเทอากาศ และอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง ผู้เพาะเห็ดจะต้องดูแลและควบคุมปัจจัยเหล่านี้ ให้เหมาะสมต่อความต้องการของเห็ดแต่ละชนิด สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด มีดังนี้

1) แสงสว่าง (light)

แม้ว่าเห็ดจะไม่มีคลอโรฟิลล์ที่ใช้ในการสังเคราะห์แสง แต่แสงสว่างก็มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดทุกระยะการเจริญเติบโต การได้รับแสงสว่างของเห็ดนั้นต้องอยู่ในระดับที่เหมาะสม ไม่มากหรือน้อยเกินไป จากการศึกษาพบว่า เมื่อเราแยกเลี้ยงเชื้อในอาหาร พีดีเอ และเส้นใยเดินเต็มอาหารวุ้นแล้ว ควรให้เส้นใยได้รับแสงบ้าง เพราะแสงจะช่วยกระตุ้นให้เส้นใยรวมตัวกันเป็นตุ่มดอกเห็ด (สุทธิชัย, 2545) และพัฒนาการไปเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้ แสงสว่างมีผลต่อการเจริญของเห็ดแตกต่างกัน เช่น ดอกเห็ดนางฟ้า นางรม เป๋าฮื้อ ที่เพาะในโรงเรือนที่มีแสงสว่างมากดอกเห็ดจะมีลักษณะเป็นสีดำ คล้ำ แต่ถ้าเพาะในโรงเรือนที่มืดหรือมีแสงสว่างน้อย ดอกเห็ดที่ได้จะมีสีขาว ดอกมีขนาดเล็ก ก้านดอกยืดยาว เนื่องจากดอกเห็ดจะเอนเข้าหาแสง (แสงแก้ว, 2548) นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของแสงต่ำ หรือไม่มีแสงอาจมีผลต่อการเจริญของก้านดอก และการเจริญเติบโต

ของหมวกเห็ด เช่น เห็ดหอม (Lentinula edodes) หากไม่ได้รับแสงจะทำให้การสร้างครีบใต้หมวกผิดปกติ แต่ในเห็ดบางชนิดเช่น เห็ดนางรม หากได้รับแสงที่เหมาะสมจะทำให้การปล่อยสปอร์ดีขึ้น

2) ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

เห็ดเจริญเติบโตได้ดีในสภาพ pH ที่เป็นกลาง พบว่าในสภาพอาหารหรือวัสดุเพาะที่เป็นกรด เห็ดจะไม่พัฒนาเป็นดอกเห็ด การเจริญเติบโตจะเกิดขึ้นเฉพาะเส้นใยเท่านั้น แต่อาจสร้างโครงสร้างที่เรียกว่า ออยเดีย (oidia) ซึ่งเป็นสปอร์ที่เส้นใยเห็ดสร้างขึ้นมาโดยไม่อาศัยเพศ ค่า pH มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด เช่น เห็ดหอม ในระยะเจริญเติบโตบนอาหารวุ้นควรมี pH 5.0-6.0 เห็ดนางรม ระยะที่เป็นเส้นใยและพัฒนาเป็นดอกเห็ด เจริญได้ดีที่ pH 5.5-6.5 และเห็ดหูหนูวัสดุเพาะควรมีค่า pH 6.5-7.5 เป็นต้น

3) อุณหภูมิ (temperature)

อุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดทุกชนิด และทุกช่วงของการเจริญเติบโต โดยปกติระยะที่เป็นเส้นใยจะต้องการอุณหภูมิที่สูงกว่าช่วงที่เป็นดอกเห็ด ซึ่งจะแตกต่างกันไปตามชนิดของเห็ด จากการศึกษาพบว่าอุณหภูมิมีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด เห็ดเป๋าฮื้อเจริญเติบโตและออกดอกได้ดีที่อุณหภูมิที่ 25-30 องศาเซลเซียส แต่ถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 12 หรือสูงกว่า 35 องศาเซลเซียส เห็ดจะไม่ออกดอก (สุทธิชัย, 2545) หรือดอกที่ออกมาจะมีลักษณะแคระแกรน รูปร่างผิดปกติ

4) อากาศ (air)

อากาศมีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเห็ด ทั้งในระยะเส้นใยและพัฒนาไปเป็นดอกเห็ด ตามปกติแล้วระยะของการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดจะสามารถทนต่อสภาพการขาดออกซิเจนได้ดีกว่าระยะออกดอก การเพาะเห็ดในโรงเรือนมักประสบปัญหา เรื่องการถ่ายเทอากาศ เนื่องจากมีการหายใจของเส้นใยและดอกเห็ด เกิดเป็นการสะสมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ถ้ามีเพียงเล็กน้อยจะมีผลดี คือ เป็นการกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดเปลี่ยนเป็นตุ่มดอกได้เร็วขึ้น แต่ถ้ามีปริมาณมากเกินไป จะทำให้ดอกเห็ดมีลักษณะบิดเบี้ยว แคระแกรน เจริญเติบโตไม่เต็มที่ และก้านดอกยืดยาว โรงเรือนเห็ดที่มีสภาพน้ำท่วมขังหรือมีการให้น้ำมากเกินไป จะทำให้เห็ดขาดออกซิเจน ดังนั้นภายในโรงเรือนเพาะเห็ดที่ดีจะต้องถ่ายเทอากาศได้อย่างเหมาะสม

5) ความชื้นในวัสดุเพาะ (moisture)

เห็ดเป็นสิ่งมีชีวิตที่ต้องการความชื้นสูงในการเจริญเติบโต เพราะฉะนั้นวัสดุที่เตรียมเพาะเห็ดจึงต้องมีความชื้นในปริมาณที่เหมาะสม การทดสอบกระทำได้โดย การใช้มือบีบวัสดุเพาะ ถ้าบีบแล้วมีน้ำไหลหรือซึมออกมาจากง่ามนิ้วมือแสดงว่าชื้นเกินไป แต่ถ้าบีบวัสดุเพาะแล้วไม่มีน้ำไหลออกมาและเมื่อแบมือออกพบว่าวัสดุเพาะนั้นแตกออก แสดงว่าแห้งเกินไป ความชื้นที่เหมาะสมสำหรับเพาะเห็ดคือ เมื่อบีบวัสดุเพาะจะต้องไม่มีน้ำไหลออกมา และเมื่อแบมือออกวัสดุจะต้องจับตัวเป็นก้อนจึงจะนำไปใช้ได้ การเพาะเห็ดที่ความชื้นในวัสดุเพาะไม่เหมาะสมจะส่งผลเสีย เช่น ความชื้นในวัสดุต่ำ เกินไป ทำให้ก้อนเชื้อเห็ดแห้งเส้นใยเจริญเติบโตไม่เต็มที่ เนื่องจากธาตุอาหารในวัสดุเพาะไม่สามารถละลายออกมาเพื่อใช้เป็นแหล่งอาหารของเห็ดได้ อีกทั้งเส้นใยเห็ดจะแสดงอาการขาดน้ำ มีผลทำให้เส้นใยชะงักการเจริญเติบโตและตายในที่สุด

6) ความชื้นในอากาศ (humidity)

เห็ดเจริญเติบโตได้ดีในสภาพความชื้นอากาศสูง เนื่องจากมีความสำคัญต่อพัฒนาการ ในการเปิดถุงให้เกิดดอกเห็ด จึงต้องกระทำในโรงเรือนที่สามารถเก็บความชื้นได้เป็นอย่างดี นอกจากนี้ถ้าโรงเรือนมีสภาพแห้ง ควรเพิ่มความชื้นด้วยการฉีดพ่นละอองน้ำเข้าไปในโรงเรือน หรือเพิ่มความชื้นโดยการรดน้ำบนพื้นโรงเรือนซึ่งปูด้วยทรายหนา ถ้าโรงเรือนมีสภาพโปร่งเกินไปก็ไม่สามารถเก็บความชื้นไว้ได้เช่นกัน ความชื้นในอากาศต่ำจะทำให้ดอกเห็ดมีลักษณะบอบบาง เหี่ยวเหนียวและชะงักการเจริญเติบโต แต่ถ้าความชื้นในอากาศสูงเกินไปบริเวณโคนดอกเห็ดจะมีเส้นใยเจริญงอกออกมา ทำให้ดอกเห็ดอิ่มน้ำและมีคุณภาพต่ำ ความชื้นในอากาศที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของ เห็ดแตกต่างกัน เช่น เห็ดเป๋าฮื้อ ต้องการความชื้นอากาศที่ 90-95 เปอร์เซ็นต์ เห็ดนางฟ้า-นางรม ต้องการความชื้นอากาศที่ 85-90 เปอร์เซ็นต์ เห็ดหูหนูต้องการความชื้นอากาศที่ 70-90 เปอร์เซ็นต์ การวัดความชื้นภายในโรงเรือนจะใช้เครื่องมือไฮโกรมิเตอร์ (hygrometer) หรือเทอร์โมมิเตอร์แบบตุ้มแห้งตุ้มเปียก (wet and dry thermometer) ค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

นอกจากต้องทราบปัจจัยที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ดดังกล่าวข้างต้นแล้ว ผู้เพาะเห็ดจำเป็นต้องทราบปัจจัยภายนอกอื่นๆ ที่มีผลต่อการเพาะเห็ดโดยตรง ดังต่อไปนี้

1) เชื้อเห็ด ไม่ว่าจะเป็นการเพาะเห็ดในถุงพลาสติกหรือการเพาะเห็ดฟาง ส่วนใหญ่ต้องสั่งซื้อหัวเชื้อมาจากผู้ผลิตรายใหญ่ หากผู้ผลิตหัวเชื้อเกิดปัญหาการปนเปื้อน หรือการผันแปรทางพันธุกรรม ก็จะมีผลกระทบโดยตรงต่อการเพาะเห็ด ปัจจุบันพบว่าพบปัญหาเรื่องคุณภาพของหัวเชื้อที่ไม่ได้มาตรฐานเป็นจำนวนมาก ผู้เพาะเห็ดบางรายถึงกับเลิกอาชีพเพาะเห็ดไปเลย ปัญหาที่พบได้แก่ เห็ดให้ผลผลิตน้อยหรือไม่ให้ผลผลิต ไม่ตรงตามสายพันธุ์ หัวเชื้ออ่อนแอ หรือหัวเชื้อแก่เกินไป และการปนเปื้อนของโรคและศัตรูเห็ด ทำให้การเพาะเห็ดไม่ประสบความสำเร็จ

2) โรคและแมลงศัตรู ปกติการเพาะเห็ดมักมีโรคแมลงศัตรูเห็ดระบาดศัตรูที่สำคัญได้แก่ เชื้อราเขียว Trichoderma sp. ซึ่งมีอัตราการเจริญเติบรวดเร็ว ทำให้เชื้อเห็ดชะงักการเจริญเติบโต ราดำ A. niger เกิดในถุงที่มีอาหารเสริมสูง ราสีส้ม Neurospora และราเมือกสีเหลือง Physarum polycepharum ซึ่งมักพบตามถุงเห็ดที่วัสดุเพาะเน่าและภายในโรงเห็ดมีความชื้นสูง โรงเพาะเห็ดไม่มีอากาศถ่ายเทพอ หนอนแมลงหวี่เซียริดหรือแมลงหวี่เห็ดปีกดำ เป็นอีกศัตรูเห็ดที่มีความสำคัญ ตัวหนอนมีลำตัวสีขาวใสหรือสีเขียวอ่อน เคลื่อนไหวเร็ว ตัวอ่อนจะกัดกินเส้นใยเห็ด

1.2.8 แบคทีเรียกับการออกดอกของเห็ด

ปัจจุบันมีการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียหลายชนิดต่อการตอบสนองของเส้นใยและการออกดอกของเห็ดเพิ่มมากขึ้น วัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการเพิ่มผลผลิตเห็ดให้สูงขึ้น โดยเฉพาะแบคทีเรียในกลุ่ม Pseudomonas Rainey, Cole, Fermor, and Wood (1990); Rainey (1991); Zarenejad, Yakhchail, and Rosooli (2012) ศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเห็ดกินได้กับชนิดของแบคทีเรียที่มีผลต่อการชักนำให้เห็ดสร้างตุ่มดอก พบว่า เชื้อแบคทีเรีย P. putida มีผลไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ด ทำให้เส้นใยเห็ดมีอัตราการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว และมีผลต่อการออกดอกของเห็ดในระยะแรก สอดคล้องกับงานวิจัยของ Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003)

รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย fluorescent Pseudomonas ที่แยกได้จากเส้นใยเห็ด P. ostreatus สายพันธุ์ที่เพาะเพื่อการค้า มีผลในการกระตุ้นการเจริญเติบโตของเส้นในเห็ดและการเกิดออกของเห็ดเช่นกัน

Grewal and Rainey (1991) รายงานว่าเห็ดกระดุม (A. bisporus) จะเจริญเติบโตได้เป็นอย่างดีและสร้างตุ่มดอกมากขึ้นเมื่อมีแบคทีเรียกลุ่ม Pseudomonas เจริญร่วมด้วย ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Noble et al. (2003) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรีย P. putida ที่เจริญบนผิวหน้าวัสดุเพาะเห็ดกระดุม มีผลให้เห็ดเจริญเป็นตุ่มดอกเร็วขึ้น ในขณะที่ Young, Chu, Hameed, and Young (2013) ได้ศึกษาชนิดและผลของแบคทีเรียที่แยกได้จากดอกเห็ด A. blazei ต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกเห็ด พบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมดจำนวน 56 ไอโซเลท โดยที่ 12 ไอโซเลท มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดเจริญเติบโต และส่งผลให้เห็ดมีผลผลิตเพิ่มสูงขึ้น 21.50 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามความสัมพันธ์ระหว่างแบคทีเรียกับการสร้างตุ่มดอกของเห็ด ยังไม่ปรากฏหลักฐานยืนยันแน่นอน ทั้งนี้เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของผลผลิตเห็ดอาจเกิดจากหลายปัจจัย เช่น ชนิดของวัสดุที่ใช้เพาะ Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003) และอาหารเสริมที่ใส่เข้าไป (พรศิลป์, ปุณพิชญ์, พิชยา, และวุฒิชัย, 2557) ชนิดของเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด แสดงไว้ในตารางที่ 1.5

ตารางที่ 1.5 ชนิดของแบคทีเรียบางสายพันธุ์ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเห็ด

แบคทีเรีย	เห็ด	ผล	แหล่งที่พบ
Pseudomonas putida	A. bisporus	chemotaxis	เส้นใย
		sporophore initation	ดอกเห็ด วัสดุคลุมผิวหน้า
		hypha growth	เส้นใย
		primordial production	วัสดุคลุมผิวหน้า
		attachment	เส้นใย
	P. ostreatus	primodia production	เส้นใย

Pseudomonas fluorescens	A. bisporus	sporophore initation	ดอกเห็ด วัสดุคลุมผิวหน้า
	polysaccharideวัสดุคลุมผิวหน้า		
Bacillus subtilis	A. bisporus	survival	วัสดุเพาะเห็ด
Bacillus macerans	P. ostreatus	Decomposition of wheat straw	ฟางข้าวสาลี

ที่มา : ดัดแปลงจาก Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003)

1.3 วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียที่เจริญบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า
2. เพื่อคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส
3. เพื่อคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีคุณสมบัติในการกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกได้

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. การเผยแพร่ผลงานวิจัยในระดับชาติและนานาชาติ
2. การเผยแพร่ผลงานในลักษณะเอกสาร แผ่นพับ หรือหนังสือวิชาการ

หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1. เกษตรกรผู้เพาะเห็ด
2. หน่วยงานราชการ เช่น มหาวิทยาที่จัดการเรียนการสอนสายเกษตรศาสตร์ สมาคมผู้เพาะเห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร และกรมส่งเสริมการเกษตร เป็นต้น

บทที่ 2
วิธีการดำเนินการวิจัย

2.1 การศึกษาความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

2.1.1 การเก็บรวบรวมตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ด

เก็บตัวอย่างถุงก้อนเชื้อเห็ดที่ผ่านการเพาะเห็ดและถุงก้อนเชื้อเห็ดที่กำลังให้ผลผลิตจากฟาร์มเห็ดต่างๆ ในจังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี ตรัง สงขลา และพัทลุง โดยเก็บตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดฟาร์มละ 3-5 ก้อน เลือกถุงก้อนเชื้อที่มีลักษณะแตกต่างกัน จากก้อนเห็ดหลายชนิด เช่น ถุงเห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดหูหนู และเห็ดโคนน้อย เป็นต้น เพื่อนำมาจำแนกชนิดของ เชื้อราและแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการ

2.1.2 การแยกเชื้อ และการจัดจำแนกชนิดของราและแบคทีเรีย

นำถุงเห็ดชนิดต่างๆ ที่เก็บรวบรวมมาได้ มาทำการแยกเชื้อในห้องปฏิบัติการ โดยวิธี dilution pour plate ใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อปริมาตร 9 มิลลิลิตร ต่อวัสดุเพาะ 1 กรัม เขย่าให้เข้ากัน 10 นาที ทำ serial dilution ที่ระดับความเข้มข้น 10-2 - 10-6 ใช้ปิเปตดูดน้ำละลายเชื้อปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ใส่ในจานเพาะเชื้อ เทอาหาร PDA, GANA (สำหรับเชื้อรา) และ NA (สำหรับแบคทีเรีย) ขณะอุ่นประมาณ 45 องศาเซลเซียส แกว่งให้เข้ากัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32 องศาเซลเซียส) เป็นเวลา 2-5 วัน เมื่อเชื้อเจริญจึงแยกโคโลนีเดี่ยวๆ ไปเลี้ยงบนอาหาร PDA และ NA อีกครั้ง บันทึกข้อมูลจำนวนไอโซเลทที่แยกได้ สำหรับเชื้อราที่พบนำไปแยกให้ได้เชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยวิธีการ hyphal tip isolation เก็บเส้นใยเชื้อราใน PDA slant บันทึกลักษณะลักษณะของโคนิดิโอฟอร์ ไฟอะไลด์ และโคนิเดีย ด้วยกล้องบันทึกภาพ เปรียบเทียบกับหนังสือและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง เพื่อจำแนกต่อไป

สำหรับการศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียและการจัดจำแนก ดำเนินการโดย
เลี้ยงแบคทีเรียที่เก็บรวบรวมได้ในอาหารชนิดต่างๆ เพื่อใช้จำแนกชนิด โดยใช้คู่มือของ Schaad, Jones, and Chun (2001) ลักษณะที่ใช้ในการจำแนกเบื้องต้น ได้แก่
การทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อกับ KOH 3 เปอร์เซ็นต์ โดยการเลี้ยงเชื้อบนอาหาร NA slant บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง หยด KOH บนสไลด์ 1 หยด เขี่ยเชื้อแตะบนหยด KOH คนให้เข้ากัน ยกลูปขึ้นตรงๆ หากเชื้อนั้นเหนียวติดลูปขึ้นมา อ่านผลเป็นบวกแสดงว่าแบคทีเรียชนิดนั้นเป็นแกรมลบ แต่หากไม่ติดลูปขึ้นมาอ่านผลเป็นลบแสดงว่าแบคทีเรียตัวนั้นเป็นชนิดแกรมบวก

การทดสอบความสามารถในการเจริญของเชื้อในสภาพมีหรือไม่มีออกซิเจน โดยใช้อาหาร H-L medium จำนวน 2 หลอด ใช้เข็มเขี่ยแทงลงไปตรงๆ ประมาณครึ่งของอาหารทั้ง 2 หลอด เทปิดด้วย paraffin oil สูงประมาณ 1 เซนติเมตร 1 หลอดทันที บ่มที่อุณหภูมิห้อง ตรวจผลในวันที่ 1, 3 ,5 และ 7 โดยดูการเปลี่ยนสีของอาหารทั้ง 2 หลอดทุกวัน หากอาหารในหลอดที่ปิดทับด้วย paraffin oil เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าไม่ต้องการออกซิเจน

การสร้างสารเรืองแสงในอาหาร KB เป็นการตรวจดูการสร้างสารเรืองแสงสีเขียว (fluorescin) จากอาหาร KB ซึ่งสามารถแพร่ละลายออกมาผสมในอาหาร โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน ตรวจผลโดยการนำจานเลี้ยงเชื้อไปส่องใต้หลอดไฟซึ่งมีคลื่นแสงยาว

360 นาโนเมตร (black light) ดูการสร้างสาร fluorescin ซึ่งแพร่ออกมาในอาหาร หากมีสารเรืองแสงอ่านผลเป็นบวก

นอกจากนี้ยังทำการทดสอบการเจริญบนอาหาร YDC การสร้างสปอร์และความสามารถในการ oxidase เมื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการบางส่วนแล้ว จะส่งตัวอย่างไปวิเคราะห์ยืนยันชนิดของแบคทีเรียระดับโมเลกุล 16s rDNA ณ ศูนย์เทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech)

2.2 การคัดเลือกเชื้อราและแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

2.2.1 การแยกเชื้อราจากตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ด

2.2.1.1 ทำการเจือจางตัวอย่างวัสดุเพาะเห็ดในสารละลายซาลีน (saline) ปลอดเชื้อที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 โดยน้ำหนักต่อปริมาตร (% w/v) ในระดับความเข้มข้น 10-1 - 10-6 วางทิ้งไว้จนอนุภาควัสดุเพาะตกตะกอน ประมาณ 2-3 นาที (พิรุฬห์พร, 2552)

2.2.1.2 ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่ผ่านการเจือจางที่ระดับความเข้มข้น 10-4 - 10-6 จำนวน 0.1 มิลลิลิตร ลงบนอาหารแข็งแอลฟาเซลลูโลส ใช้แท่งแก้วจุ่มแอลกอฮอล์ เผาไฟ นำไปเกลี่ยสารละลายจุลินทรีย์ให้กระจายทั่วอาหาร (spread plate) กระทำ 4 ซ้ำต่อการเจือจางแต่ละความเข้มข้น

2.2.1.3 บ่มเชื้อที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส สังเกตและเก็บรวบรวมเชื้อราที่เจริญและสามารถย่อยสลายเซลลูโลสได้ โดยสังเกตจากวงใส (clear zone) ที่ปรากฏรอบโคโลนี

2.2.1.4 แยกเชื้อราที่คัดเลือกได้มาเลี้ยงบนอาหาร PDA บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทำการถ่ายเชื้อทุกเดือน หรือตามปริมาณการใช้งาน ซึ่งมีอายุเก็บได้ประมาณ 6 เดือน และทำการเก็บเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง (freezing and cryogenic storage) โดยเลี้ยงเชื้อในหลอดทดลองจนกระทั่งเชื้อสร้างสปอร์แล้วเติมสารละลายกลีเซอรอล (glycerol) ปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปิดฝาให้สนิท นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

2.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียจากก้อนเชื้อเห็ด

2.2.2.1 กระทำการเช่นเดียวกับการแยกเชื้อรา

2.2.2.2 การแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ใช้เทคนิค cross streak จากนั้นนำเชื้อที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหาร NA บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เก็บตัวอย่างเชื้อบนอาหารวุ้นเอียง เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และทำการสำรองเชื้อด้วยวิธีการแช่เยือกแข็ง โดยเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว NB ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ในสภาวะนิ่ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำสารละลายมาผสมกับสารละลายกลีเซอรอลปลอดเชื้อความเข้มข้นร้อยละ 20 ปริมาตรต่อปริมาตร ปิดฝาให้สนิท แล้วนำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

2.2.3 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อรา

เตรียมอาหารเพื่อทดสอบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อราบนอาหารแข็ง MEA ตามวิธีการของ Kasana, Salwan, Dhar, Dutt, and Gulati (2008); Abu- Bakar,

Abu-Azia, Hassan, and Ghazali (2010) ย้ายเชื้อราที่อายุ 7 วันมาเลี้ยงบนอาหารวุ้น carboxymethyl cellulose (CMC) ที่อุณหภูมิห้องประมาณ 28-30 องศาเซลเซียส ในที่มืด เมื่อเส้นใยเชื้อรามีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 เซนติเมตร เทสารละลาย gram's iodine ให้ท่วมผิวหน้าอาหารและโคโลนีเชื้อราเป็นเวลา 15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เติม 1M NaCl ให้ท่วมวางทิ้งไว้ 5 นาที เทน้ำออก จากนั้นวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของการเกิดบริเวณใส (clear zone) ในหน่วยเซนติเมตร ทำการประเมินระดับการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดของเชื้อรา จาก hydrolysis capacity (HC value) บนอาหารแข็งโดยคำนวณจากอัตราส่วนระหว่างรัศมีของ clear zone และโคโลนี (Xu and Yang, 2010; Taechapoempol et al., 2010)

+	=	< 1.00	เซนติเมตร
++	=	1.01-2.00	เซนติเมตร
+++	=	2.01-3.00	เซนติเมตร
++++	=	> 3.00	เซนติเมตร

2.2.4 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรีย

สำหรับแบคทีเรียทดสอบโดยวิธี agar spot (Spellhaug and harlander, 1989) โดยการเพาะเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลว Nutrient broth (NB) นำไปบ่มเขย่าบนเครื่องด้วยความเร็ว 150 รอบต่อนาที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร เจือจางเชื้อให้ได้ปริมาณเชื้อเริ่มต้นมีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.5 จากนั้นปิเปตสารละลายที่เจือจางแล้วปริมาตร 10 ไมโครลิตร หยดลงบนจานอาหาร CMC จานละ 4 จุด บ่มที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 72 ชั่วโมง (พิรุฬห์พร, 2552) กระทำการทดลองไอโซเลทละ 4 ซ้ำ ทำการทดสอบความสามารถในกายย่อยเซลลูโลสด้วยการเทสารละลาย 0.25 เปอร์เซ็นต์ไอโอดีน (iodine) (Hendricks Doyle, and Hugley, 1995) ให้ท่วมเชื้อเป็นเวลา 15 นาที เททิ้งแล้วเททับด้วยสารละลาย NaCl เข้มข้น 1 N เป็นเวลา 15 นาที จะปรากฏวงใสที่ไม่ติดสีของ 0.25 เปอร์เซ็นต์ไอโอดีน วัดเส้นผ่านศูนย์กลางของวงใสและเส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนีของไอโซเลท คำนวณหาอัตราส่วนระหว่างเส้นผ่านศูนย์กลางวงใสต่อขนาดโคโลนี (HC) (Lu, Hong, Shi, Zhi, and Yong, 2005) ทำการประเมินระดับการผลิตเอนไซม์แต่ละชนิดของเชื้อแบคทีเรีย เช่นเดียวกับการทดสอบของเชื้อรา

เส้นผ่านศูนย์กลางโซนใสรอบโคโลนี (cm)
เส้นผ่านศูนย์กลางโคโลนี (cm)

ภาพที่ 2.1 ตำแหน่งการหยดสารละลายเซลล์แบคทีเรีย ด้วยวิธี agar spot
บนอาหารแข็ง CMC

2.3 การศึกษาผลของแบคทีเรียต่อการสร้างตุ่มดอกและการออกดอกของเห็ดในห้องปฏิบัติการ

2.3.1 การทดสอบปฏิกิริยาของเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด

ทดสอบความสามารถของเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ ต่อการเจริญของเส้นใยและกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอก โดยใช้วิธี dual culture บนอาหาร PDA ในการทดลองนี้ใช้เห็ดนางฟ้าภูฐานเป็นตัวแทน ใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร เจาะเส้นใยเห็ด ไปวางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยงเชื้อ 1 เซนติเมตร วางไว้ 2 วัน หลังจากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA slant อายุ 24 ชั่วโมง เป็นแนวยาวบริเวณขอบอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร สังเกตปฏิริยาสัมพันธ์ระหว่างเส้นใยเห็ดกับเชื้อแบคทีเรีย เป็นระยะเวลา 30 วัน บันทึกการเจริญของเส้นใยเห็ดว่า เชื้อแบคทีเรียมีผลต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกเห็ดนางฟ้าอย่างไร คัดเลือกแบคทีเรียที่ส่งผลดีต่อการการเจริญของเส้นใยเห็ด เพื่อนำไปใช้ทดสอบในสภาพโรงเรือนต่อไป

2.4 การทดสอบเชื้อแบคทีเรียต่อการออกดอกของเห็ดในโรงเรือน

2.4.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

นำแบคทีเรียที่ศึกษาเบื้องต้นและพบว่ามีความสามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกได้ มาเลี้ยงในอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อใส่หลอดอาหาร ใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ ปรับน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียโดยเครื่อง spectrophotometer ตรวจวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 660 นาโนเมตร และปรับความเข้มข้นของเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียจนมีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2 เก็บเซลล์แขวนลอยเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

2.4.2 การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

ทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐาน ในสูตรอาหารขี้เลื่อยไม้ยางพารา ผสมรำละเอียด 5 เปอร์เซ็นต์ ปูนขาว 2 เปอร์เซ็นต์ และดีเกลือ 0.2 เปอร์เซ็นต์ ละลายรดบนกองวัสดุเพาะ ปรับความชื้นให้ได้ 65 เปอร์เซ็นต์ บรรจุลงถุงร้อนพับก้น ขนาด 6 x 14 นิ้ว น้ำหนัก 900 กรัม/ถุง ใส่คอขวดพลาสติก ปิดด้วยจุกลำลีและกระดาษ นึ่งฆ่าเชื้อได้ไอน้ำร้อน อุณหภูมิประมาณ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อวัสดุเพาะเย็น จึงเทหัวเชื้อเห็ดที่เตรียมไว้บนเมล็ดข้าวฟ่าง ถุงละ 15-20 เมล็ด ปิดจุกสำลีไว้อย่างเดิม บ่มไว้ในโรงเรือน เมื่อเส้นใยเห็ดเจริญเต็มถุงก้อนเชื้อ ให้ตั้งทิ้งไว้ต่ออีก 7 วัน จึงนำไปทดสอบ

2.4.3 การทดสอบเชื้อ

นำน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียที่เตรียมไว้ไปฉีดพ่นบริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ด โดยฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อแบคทีเรียปริมาตร 3 มิลลิลิตร/ 1 ถุง เปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรีย วางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCBD) จำนวน 10 สิ่งทดลอง 4 ซ้ำๆ ละ 10 ก้อน ทำการฉีดพ่นน้ำละลายเชื้อซ้ำหลังออกดอกในแต่ละรุ่น เป็นระยะเวลา 4 รุ่น บันทึกระยะเวลาที่เห็ดออกดอกแต่ละรุ่น จำนวนดอก เส้นผ่านศูนย์กลางดอกเห็ด เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ด และน้ำหนักของเห็ด คำนวณค่าประสิทธิการใช้อาหารของเห็ด (Biological efficiency; B.E.) จากสูตร

$$\% \text{ B.E.} = \frac{\text{น้ำหนักผลผลิตเห็ดสดที่ได้รับ}}{\text{น้ำหนักแห้งของวัสดุเพาะที่ใช้เพาะ}}$$

บทที่ 3
ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

3.1 ความหลากหลายของเชื้อราและแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

3.1.1 การเก็บรวบรวมก้อนเชื้อเห็ดเก่า

จากการเก็บตัวอย่างถุงก้อนเชื้อเห็ดเก่าจำนวน 80 ฟาร์ม ใน 5 จังหวัดภาคใต้ ได้ก้อนเชื้อเห็ดเก่าทั้งหมด 224 ก้อน โดยเก็บก้อนเชื้อเห็ดเก่าจากฟาร์มในจังหวัดนครศรีธรรมราช และจังหวัดสงขลา มากที่สุดจำนวน 19 ฟาร์ม (23.75 เปอร์เซ็นต์) เก็บในจังหวัดพัทลุง 17 ฟาร์ม (21.25 เปอร์เซ็นต์) จังหวัดสุราษฎร์ธานี 14 ฟาร์ม (17.50 เปอร์เซ็นต์) และจังหวัดตรัง 11 ฟาร์ม (13.75 เปอร์เซ็นต์) ชนิดของก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่เก็บมากที่สุดคือ เห็ดนางฟ้า รองลงมาคือ เห็ดนางรม เห็ดหูหนู เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดแครง เห็ดหลินจือ และเห็ดโคนน้อย ตามลำดับ ทั้งนี้ชนิดเห็ดที่พบมากเป็นเห็ดตระกูล Pleurotus (นางฟ้า นางรม เป๋าฮื้อ) เนื่องจากเป็นเห็ดเศรษฐกิจของภาคใต้ จึงพบการเพาะมากที่สุด (ตารางที่ 3.1)

3.1.2 ความหลากหลายของเชื้อราบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ผลการศึกษาความหลากหลายของเชื้อราบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า ด้วยวิธี dilution pour plate พบเชื้อราทั้งหมด 24 สปีชีส์ แบ่งเป็นเชื้อราในกลุ่ม anamorphic 23 สปีชีส์ และ basidiomyces 1 สปีชีส์ โดยพบเชื้อราบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้ามากที่สุด 19 สปีชีส์ (79.17 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือบนก้อนเชื้อเห็ดนางรม และเห็ดเป๋าฮื้อ พบเชื้อราอย่างละ 16 สปีชีส์ (66.67 เปอร์เซ็นต์) ในขณะที่เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ เห็ดแครง และเห็ดโคนน้อย พบจำนวน 14, 13, 11 และ 9 สปีชีส์ คิดเป็น 58.33, 54.17, 45.83 และ 37.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 3.2)

เชื้อรา 18 สปีชีส์ (94.74 เปอร์เซ็นต์) จาก 19 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นซึ่งพบมากที่สุดบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า ได้แก่ Aspergillus sp., Aspergillus flavus, Aspergillus niger, Aspergillus fumigatus, Aspergillus tubingenesis, Lasiodiplodia theobromae, Curvularia lunata, Fusarium oxysporum, Fusarium solani, Neurospora sp., Penicillium sp., Penicillium janthinellum, Penicillium oxalicum, Trichoderma sp., Trichoderma harzianum, Trichoderma inhamatum, Trichoderma koningii และ Trichoderma viride

ในขณะที่เชื้อรา 9 สปีชีส์ (56.25 เปอร์เซ็นต์) จาก 16 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดนางรม ได้แก่ A. flavus, A. niger, A. fumigatus, L. theobromae, C. lunata, F. oxysporum, Neurospora sp., Rhizoctonia sp. และ T. viride ในขณะที่เชื้อรา 10 สปีชีส์ (62.50 เปอร์เซ็นต์) จาก 16 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ ได้แก่ A. flavus, A. niger, L. theobromae, F. solani, P. janthinellum, P. oxalicum, Rhizoctonia sp., T. atroviride, T. inhamatum และ T. viride

เชื้อรา 6 สปีชีส์ (42.86 เปอร์เซ็นต์) จาก 14 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบ

บนก้อนเชื้อเห็ดหูหนู ได้แก่ Aspergillus sp., A. flavus, A. niger, Neurospora sp., P. janthinellum และ Rhizoctonia sp. นอกจากนี้เชื้อรา 6 สปีชีส์ (46.15 เปอร์เซ็นต์) จาก 13 สปีชีย์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดหลินจือ ได้แก่ F. oxysporum, Neurospora sp., P. oxalicum, Trichoderma sp., T. harzianum และ T. inhamatum

นอกจากนี้เชื้อรา 9 สปีชีส์ (81.82 เปอร์เซ็นต์) จาก 11 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดโคนน้อย ได้แก่ Alternaria sp., A. flavus, L. theobromae, Chaetomium sp., C. lunata, F. oxysporum, P. oxalicum, T. atroviride และ T. harzianum ในขณะที่เชื้อรา 3 สปีชีส์ (27.27 เปอร์เซ็นต์) จาก 9 สปีชีส์ เป็นราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดแครง ได้แก่ A. flavus, A. niger และ Neurospora sp. เชื้อราสายพันธุ์เด่นที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดแต่ละชนิด แสดงไว้ในตารางที่ 3.3

เชื้อราสายพันธุ์เด่นและสามารถพบได้บ่อยบนก้อนเชื้อเห็ดเก่าทุกชนิด ได้แก่ จีนัส Trichoderma, Aspergillus และ Penicillium พบจำนวน 6, 5 และ 3 สปีชีส์ คิดเป็น 25, 20 และ 12.50 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าก้อนเชื้อเห็ดเก่าจะมีความหลากหลายและปริมาณที่พบใกล้เคียงกัน โดยพบเชื้อราจากก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าสูงที่สุด รองลงมา คือ เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหูหนู เห็ดหลินจือ เห็ดโคนน้อย และเห็ดแครง ตามลำดับ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Ashraf and Prema (2007) ซึ่งได้ศึกษาความหลากหลายของจุลินทรีย์บนก้อนเชื้อเห็ดเก่า รายงานว่า บนก้อนเชื้อเห็ดเก่าจะมีกลุ่มของจุลินทรีย์หลายชนิดเข้าเจริญ และย่อยสลายวัสดุเพาะนอกเหนือจากเส้นใยเห็ดที่เจริญอยู่ โดยเฉพาะเชื้อราจีนัส Aspergillus, Penicillium และ Trichoderma นอกจากนี้ Kalpana, Moorthi, and Kumari (2013) ได้ทำการศึกษาและคัดเลือกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส จากก้อนเชื้อเห็ดกระดุมและเห็ดหอม พบเชื้อราทั้งหมด 45 ไอโซเลท โดยที่เชื้อรา 23 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ตัวอย่างเช่น Trichoderma, Aspergillus, Rhizopus และ Penicillium เป็นต้น ในขณะที่ดิเรก และสุรัตน์ (2556) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่ย่อยสลายไม้ผุ ฟางข้าวหมัก และมูลวัว พบเชื้อราจำนวน 27 ไอโซเลท ในจำนวนนี้เชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเมื่อนำไปทดสอบอัตราการย่อยสลายฟางข้าวในแปลงนา พบว่าชื้อ Penicillium spp., Chaetomium sp. และ Aspergillus terreus มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายสูงสุด

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง จำนวนฟาร์ม ชนิดก้อนเชื้อเห็ดเก่า และจำนวนเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้

สถานที่เก็บ (ไอโซเลท)	จำนวนฟาร์ม (ไอโซเลท)	จำนวนเชื้อรา จำนวนเชื้อแบคทีเรีย ก้อนเชื้อเห็ด		
จ.นครศรีธรรมราช	19	18	22	
อ.เมือง	3	3	3	นางฟ้า นางรม

อ.จุฬาภรณ์	1	1	2	นางฟ้า
อ.ฉวาง 3	2	3	นางฟ้า เป๋าฮื้อ	
อ.ท่าศาลา	1	2	2	นางฟ้า
อ.ทุ่งใหญ่	5	3	5	นางฟ้า หูหนู หลินจือ เป๋าฮื้อ แครง
อ.ทุ่งสง 2	3	3	นางฟ้า หูหนู	
อ.ร่อนพิบูลย์	2	2	2	นางฟ้า นางรม
อ.ลานสกา	2	2	2	นางฟ้า หูหนู
จ.พัทลุง 17	14	15		
อ.เขาชัยสน	2	3	2	นางฟ้า หูหนู
อ.ควนขนุน	4	4	4	นางฟ้า นางรม หลินจือ เป๋าฮื้อ
อ.ป่าพะยอม	2	1	2	นางฟ้า
อ.เมือง 3	2	3	นางฟ้า นางรม	
อ.ศรีนครินทร์	4	2	2	นางฟ้า นางรม
อ.ศรีบรรพต	2	2	2	นางฟ้า หูหนู
จ.สงขลา	19	17	20	
อ.กระแสสินธุ์	2	3	3	นางฟ้า นางรม
อ.คลองหอยโข่ง	2	2	2	นางฟ้า
อ.ควนเนียง	2	1	2	นางฟ้า
อ.บางกล่ำ	2	1	2	นางฟ้า

ตารางที่ 3.1 สถานที่เก็บตัวอย่าง จำนวนฟาร์ม ชนิดก้อนเชื้อเห็ดเก่า และจำนวนเชื้อราและแบคทีเรียที่แยกได้ (ต่อ)

สถานที่เก็บ (ไอโซเลท)	จำนวนฟาร์ม จำนวนเชื้อแบคทีเรีย (ไอโซเลท)	จำนวนเชื้อรา ก้อนเชื้อเห็ดเก่า		
อ.ระโนด	4	5	4	นางฟ้า นางรม
อ.รัตภูมิ 3	2	2	นางฟ้า	
อ.สทิงพระ	2	1	2	นางฟ้า
อ.สิงหนคร	2	2	3	นางฟ้า
จ.ตรัง 11	10	12		
อ.นาโยง2	2	2	นางฟ้า	
อ.ปะเหลียน	1	1	1	นางฟ้า
อ.เมือง 2	1	2	นางรม, นางฟ้า เป๋าฮื้อ	
อ.ย่านตาขาว	2	2	1	นางฟ้า
อ.รัษฎา 1	1	1	นางฟ้า	

อ.วังวิเศษ	2	1	2	นางฟ้า,โคนน้อย
อ.ห้วยยอด	3	2	3	นางฟ้า โคนน้อย
จ.สุราษฎร์ธานี	14	17	13	
อ.กาญจนดิษฐ์	2	3	2	นางฟ้า
อ.ไชยา 1	2	1	นางฟ้า แครง	
อ.ท่าชนะ	2	2	2	นางฟ้า
อ.บ้านนาเดิม	2	2	3	นางฟ้า นางรม
อ.นาสาร	2	3	1	นางฟ้า นางรม
อ.พุนพิน	2	2	1	แครง
อ.เมือง 2	2	2	นางฟ้า หูหนู	
อ.เวียงสระ	1	1	1	นางฟ้า นางรม

ตารางที่ 3.2 ความหลากหลายของเชื้อราที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ชนิดเชื้อรา	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า								
	นางฟ้า	นางรม	เป๋าฮื้อ	หูหนู	หลินจือ	โคนน้อย	แครง		
Deuteromyces									
Alternaria sp.	5.26	6.25	6.25	7.14		22.22	9.09		
A. alternata					7.69				
Aspergillus sp.	10.53	6.25	6.25	14.29					
A. niger	42.10	18.75	25	28.57	7.69		27.27		
A. flavus	36.84	18.75	18.75	14.29	7.69	33.33	36.36		
A. fumigatus	15.79	12.50		7.14					
A. tubingenesis	15.79	6.25							
Lasiodiplodia theobromae			31.58	12.50	12.50	7.14	7.69	22.22	9.09
Chaetomium sp.					7.14		11.11		
Cunninghamella elegans				6.25					
Curvularia lunata		21.05	12.50	6.25		7.69	22.22	9.09	
Fusarium oxysporum		15.79	12.50			15.38	33.33		
F. solani	21.05		12.50						
Neurospora sp.		26.32	12.50		14.29	15.38		18.18	
Penicillium sp.		31.58	6.25			7.69		9.09	
P. janthinellum		15.79		12.50	14.29	7.69		9.09	
P. oxalicum	10.53	6.25	12.50	7.14	15.38	44.44			
Trichoderma sp.		15.79	6.25	6.25	7.14	15.38			

T. atroviride		12.50	18.75			11.11	
T. harzianum	15.79	6.25		7.14	30.77	11.11	9.09
T. inhamatum	10.53		12.50	7.14	15.38		
T. koningii	10.53		6.25				9.09
T. viride	10.53		12.50				9.09
Basidiomyces							
Rhizoctonia sp.			12.50	18.75	14.29		
รวม	19	16	16	14	13	9	11

ตารางที่ 3.3 ชนิดของเชื้อราสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่าแต่ละชนิด

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า เชื้อราสายพันธุ์เด่น

เห็ดนางฟ้า A. niger (42.10)
A. flavus (36.84)
L. theobromae (31.58)
Penicillium sp. (31.58)
Neurospora sp. (26.32)
C. lunata (21.05)
F. solani (21.05)
A. fumigatus (15.79)
A. tubingenesis (15.79)
F. oxysporum (15.79)
P. janthinellum (15.79)
Trichoderma sp. (15.79)
T. harzianum (15.79)
Aspergillus sp. (10.53)
P. oxalicum (10.53)
T. inhamatum (10.53)
T. koningii (10.53)
T. viride (10.53)

เห็ดนางรม A. niger (18.75)
A. flavus (18.75)
A. fumigatus (12.50)
L. theobromae (12.50)
C. lunata (12.50)
F. oxysporum (12.50)

Neurospora sp. (12.50)
T. atroviride (12.50)
Rhizoctonia sp. (12.50)

ตารางที่ 3.3 ชนิดของเชื้อราสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่าแต่ละชนิด (ต่อ)

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	เชื้อราสายพันธุ์เด่น
เห็ดเป๋าฮื้อ	A. niger (25.00)
	A. flavus (18.75)
	T. atroviride (18.75)
	Rhizoctonia sp. (18.75)
	L. theobromae (12.50)
	F. solani (12.50)
	P. janthinellum (12.50)
	P. oxalicum (12.50)
	T. inhamatum (12.50)
	T. viride (12.50)
เห็ดหูหนู	A. niger (28.57)
	Aspergillus sp. (14.29)
	A. flavus (14.29)
	Neurospora sp. (14.29)
	P. janthinellum (14.29)
	Rhizoctonia sp. (14.29)
เห็ดหลินจือ	T. harzianum (30.77)
	F. oxysporum (15.38)
	Neurospora sp. (15.38)
	P. oxalicum (15.38)
	Trichoderma sp. (15.38)
	T. inhamatum (15.38)
เห็ดโคนน้อย	P. oxalicum (44.44)
	A. flavus (33.33)
	F. oxysporum (33.33)
	Alternaria sp. (22.22)

ตารางที่ 3.3 ชนิดของเชื้อราสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่าแต่ละชนิด (ต่อ)

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า เชื้อราสายพันธุ์เด่น

L. theobromae (22.22)

C. lunata (22.22)

Chaetomium sp. (11.11)

T. atroviride (11.11)

T. harzianum (11.11)

เห็ดแครง A. flavus (36.36)

A. niger (27.27)

Neurospora sp. (18.18)

ตารางที่ 3.4 ดัชนีความหลากหลายของเชื้อราที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	จำนวนชนิด	Index D	Index H
เห็นนางฟ้า	19	0.9478	2.8269
เห็ดนางรม	16	0.9600	2.6225
เห็ดเป๋าฮื้อ	16	0.9300	2.2689
เห็ดหูหนู	14	0.9423	2.5239
เห็ดหลินจือ	13	0.9476	2.4504
เห็ดโคนน้อย	9	0.9123	2.0868
เห็ดแครง	11	0.9150	2.1972

3.1.3 ความหลากหลายของแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

เชื้อแบคทีเรียที่แยกได้จากก้อนเห็ดนำมาเลี้ยงให้บริสุทธิ์และส่งตัวอย่างไปจำแนกระดับโมเลกุล 16S rDNA ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (Biotech) ผลการจำแนกพบเชื้อแบคทีเรียทั้งหมด 13 สปีชีส์ โดยพบบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้ามากที่สุด 11 สปีชีส์ (84.61 เปอร์เซ็นต์) รองลงมาคือพบบนก้อนเชื้อเห็ดนางรม เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เห็ดโคนน้อย เห็ดเป๋าฮื้อ และเห็ดแครง พบจำนวน 9, 8, 7, 7, 6 และ 6 สปีชีส์ (69.23, 61.54, 53.85, 53.85, 46.15 และ 46.15 เปอร์เซ็นต์) ตามลำดับ (ตารางที่ 3.5) เชื้อ Bacillus subtilis subsp. subtilis และ Serratia sp. เป็นเชื้อที่สามารถพบได้บนก้อนเชื้อเห็ดเก่าทุกชนิด ยกเว้นบนก้อนเชื้อเห็ดเป๋าฮื้อ นอกจากนี้ เชื้อ Ps. oryzihabitans พบบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าเพียงอย่างเดียว ในขณะที่เชื้อ Ps. psychrotolerans พบบนก้อนเชื้อเห็ดเพียง 2 ชนิด ได้แก่ ก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า และเห็ดหลินจือ เชื้อแบคทีเรียทั้งหมดที่พบส่วนใหญ่เป็นสายพันธุ์เด่นยกเว้น 2 สปีชีส์ คือ Paraburkholderia kururiensis และ Pseudomonas psychrotolerans ซึ่งพบเพียง 9.09 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งพบเฉพาะบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า

Gbolagade (2006) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียบนก้อนเชื้อเห็ด

Pleurotus tuber-regium และ Lentinus squarrosulus พบแบคทีเรียจำนวน 11 สปีชีส์ ได้แก่ Bacillus polymyxa, B. licheniformis, B. subtilis, B. cereus, Enterobacter aerogenes, Micrococcus roseus, M. roseus, Citrobacter freundii, Clostridium perfringens, Pseudomonas aeruginosa และ Escherichia coli ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ โดยที่ชนิดเชื้อแบคทีเรียที่พบมากได้แก่ จีนัส Bacillus พบ 4 สปีชีส์ Pseudomonas 3 สปีชีส์ Chryseobactrium, Ochrobactrium, Ralstonia, Serratia และ Xanthomonas อย่างละ 1 สปีชีส์ ในขณะที่ Watabe et al. (2014) รายงานว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 9 สปีชีส์ จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า ได้แก่ Bacillus licheniformis, B. subtilis, Klelosiella sp., Enterobacter sp., Microbacterium sp., Paenibacillus lentimorbus, Pseudomonas mevalonii, Sphingobacterium multivorum และ Stenotrophomonas sp.

การเปลี่ยนแปลงแบบแทนที่ของแบคทีเรียในก้อนเชื้อเห็ดเก่ามักจะเป็นแบคทีเรีย กลุ่ม thermophilic และ mesophilic microbes ซึ่งเป็นกลุ่มแบคทีเรียที่มีบทบาทในการย่อยสลายก้อนเชื้อเห็ดแบบใช้ออกซิเจน (aerobic composting) จึงเป็นประโยชน์ในการนำไปใช้เป็นวัสดุปลูกพืชได้ (Szmidt, 1994; Levanon and Danai, 1995) อย่างไรก็ตามแบคทีเรียบางชนิดที่แยกได้จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสามารถก่อโรคในมนุษย์และสัตว์ได้ (Watabe et al., 2014)

ตารางที่ 3.5 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ชนิดแบคทีเรีย	ก้อนเชื้อเห็ดเก่า									
	นางฟ้า	นางรม	เป๋าฮื้อ	หูหนู	หลินจือ	โคนน้อย	แครง			
Bacillus aryabhattai		36.36	11.11	33.33	-	-	14.29	-		
B. subtilis subsp. inaquosorum			18.18	33.33	50.00	-	12.50	14.29	-	
Bs. subsp. subtilis		27.27	11.11	-	57.14	50.00	42.86	50.00		
B. tequilensis	18.18		66.67	-	-	14.29	16.67			
Chryseobacterium gleum			18.18	22.22		28.57	25.00	-	33.33	
Ochrobactrum haematophilum				-	11.11	-	42.86	25.00	-	
	16.67									
Paraburkholderia kururiensis			9.09	-	33.33	42.86	12.50	-	-	
Pseudomonas aeruginosa			-	11.11	-	14.29	-	28.57	16.67	
Ps. oryzihabitans		18.18	-	-	-	-	-	-		
Ps. psychrotolerans		9.09	-	-	-	12.50	-	-		
Ralstonia sp.	18.18	11.11	16.67	14.29	-	-	-			
Serratia sp.	18.18	11.11	-	28.57	12.50	28.57	16.67			
Xanthomonas sp.		18.18	11.11	16.67	-	25.00	14.29	-		
รวม	11	9	6	7	8	7	6	7	6	

ตารางที่ 3.6 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	แบคทีเรียสายพันธุ์เด่น
เห็ดนางฟ้า	B. aryabhattai (36.36)
	Bs. subsp. subtilis (27.27)
	Bs. subsp. inaquosorum (18.18)
	B. tequilensis (18.18)
	Chryseobacterium gleum (18.18)
	Ps. oryzihabitans (18.18)
	Ralstonia sp. (18.18)
	Serratia sp. (18.18)
	Xanthomonas sp. (18.18)
เห็ดนางรม	B. aryabhattai (36.36)
	Bs. subsp. inaquosorum (33.33)
	Chryseobacterium gleum (22.22)
	B. aryabhattai (11.11)
	Bs. subsp. subtilis (11.11)
	Ochrobactrum haematophilum (11.11)
	Ps. aeruginosa (11.11)
	Ralstonia sp. (11.11)
	Serratia sp. (11.11)
	Xanthomonas sp. (11.11)
เห็ดเป๋าฮื้อ	B. tequilensis (66.67)
	Bs. subsp. inaquosorum (50.00)
	B. aryabhattai (33.33)
	Paraburkholderia kururiensis (33.33)
	Ralstonia sp. (16.67)
	Xanthomonas sp.(16.67)

ตารางที่ 3.6 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า (ต่อ)

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	แบคทีเรียสายพันธุ์เด่น

เห็ดหูหนู Bs. subsp. subtilis (57.14)
Ochrobactrum haematophilum (42.86)
Paraburkholderia kururiensis (42.86)
Chryseobacterium gleum (28.57)
Serratia sp. (28.57)
Ps. aeruginosa (14.29)
Ralstonia sp. (14.29)
เห็ดหลินจือ Bs. subsp. subtilis (50.00)
Paraburkholderia kururiensis (33.33)
Chryseobactrium gleum (25.00)
Ochrobactrum haematophilum (25.00)
Xanthomonas sp. (25.00)
Bs. subsp. inaquosorum (12.50)
Ps. psychrotolerans (12.50)
Serratia sp.(12.50)
เห็ดโคนน้อย Bs. subsp. subtilis (42.86)
Ps. aeruginosa (28.57)
Serratia sp. (28.57)
B. aryabhattai (14.29)
Bs. subsp. inaquosorum (14.29)
B. tequilensis (14.29)
Xanthomonas sp. (14.29)

ตารางที่ 3.6 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เด่น (≥10 % occurrence) ที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า (ต่อ)

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	แบคทีเรียสายพันธุ์เด่น
เห็ดแครง	Bs. subsp. subtilis (50.00)
	Chryseobacterium gleum (33.33)
	B. tequilensis (16.67)
	Ochrobactrum haematophilum (16.67)
	Ps. aeruginosa (16.67)

Serratia sp. (16.67)

ตารางที่ 3.7 ดัชนีความหลากหลายของเชื้อแบคทีเรียที่พบบนก้อนเชื้อเห็ดเก่า

ก้อนเชื้อเห็ดเก่า	จำนวนชนิด	Index D	Index H
เห็ดนางฟ้า	11	0.9368	2.3292
เห็ดนางรม	9	0.9394	2.0947
เห็ดเป๋าฮื้อ	6	0.8590	1.6716
เห็ดหูหนู	7	0.8833	1.8407
เห็ดหลินจือ	8	0.9011	1.9459
เห็ดโคนน้อย	7	0.9091	1.8462
เห็ดแครง	6	0.8889	1.6770

3.2 เชื้อราและเชื้อแบคทีเรียที่มีความสามารถในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

3.2.1 เชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

เชื้อราจำนวน 20 สปีชีส์ (83.33 เปอร์เซ็นต์) จาก 24 สปีชีส์ ซึ่งมีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อทดสอบเชิงคุณภาพ (quantitative test) ด้วยอาหารแข็ง CMC โดยที่เชื้อรา 2 สปีชีส์ (8.33 เปอร์เซ็นต์) ได้แก่ A. niger และ P. oxalicum แสดงอัตราส่วนเส้นผ่าศูนย์กลางของวงใสรอบโคโลนีต่ออัตราส่วนเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนี (clear zone ratio) อยู่ในช่วง 2.01- 3.00 เซนติเมตร ซึ่งแสดงให้เห็นถึงการผลิต CMCase สูงสุด รองลงมาได้แก่เชื้อรา จำนวน 10 สปีชีส์ (41.67 เปอร์เซ็นต์) คือ A. flavus, A. tubingenis, L. theobromae, Fusarium sp. F. solani, Neurospora sp., Penicillium sp., P. janthinellum, Rhizoctonia sp. และ T. harzianum ซึ่งมีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสอยู่ในระดับ 1.01-2.00 เซนติเมตร ในขณะที่เชื้อราจำนวน 8 สปีชีส์ (33.33 เปอร์เซ็นต์) ที่มีการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสในระดับต่ำ (< 1 เซนติเมตร) คือ Alternaria sp., A. alternata, Aspergillus sp., A. fumigatus, Chaetomium sp., Curvularia lunata, Trichoderma koningii และ T. viride อย่างไรก็ตามเชื้อราจำนวน 4 สปีชีส์ (16.67 %) ไม่พบการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่เชื้อรา Cunninghamella elegans, Trichoderma sp., T. atroviride และ T. inhamatum (ตารางที่ 3.8 และ ภาพที่ 3.1)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเชื้อราที่สามารถผลติเอนไซม์เซลลูเลสและพบได้บ่อย ได้แก่ จีนัส Aspergillus, Neurospora, Penicillium และ Trichoderma ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bellamy (1997) ที่ศึกษาเอนไซม์เซลลูเลสเกี่ยวข้องกับการย่อยสลายสารประกอบในกองเศษวัสดุเหลือใช้ ขยะและของเสียต่างๆที่สำคัญ พบเชื้อราหลายชนิด เช่น Aspergillus spp., Chaetomium spp., Penicillium spp. และ Fusarium spp. นอกจากนี้ ดิเรก และสุรัตน์ (2556)

ได้ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราที่ย่อยสลายไม้ผุ ฟางข้าวหมัก และมูลวัว พบเชื้อราจำนวน 3 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส และเมื่อนำไปใช้ทดสอบอัตราการย่อยสลายฟางข้าวในแปลงนา ได้แก่ เชื้อ Penicillium spp., Chaetomium sp. และ Aspergillus terreus ในขณะที่การศึกษาของ Manikandan, Surumbar, and Kumuthakalavalli (2012) ซึ่งคัดเลือกเชื้อราจากก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายสารประกอบเชิงซ้อนและสีย้อมได้ พบว่าเชื้อราที่แยกได้มีประสิทธิภาพในการบำบัดสี เมื่อคัดเลือกเบื้องต้นในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง โดยเชื้อ A. niger, Penicillium spp. และ Rhizopus spp. มีประสิทธิภาพสูงสุดในการบำบัดสีในอุตสาหกรรมสิ่งทอ นอกจากนี้การศึกษาของ Kalpana, Moorthi, and Kumari (2013) ได้ทำการคัดเลือกและแยกเชื้อราที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากก้อนเชื้อเห็ดกระดุมและเห็ดหอม พบเชื้อราจำนวน 23 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ เชื้อTrichoderma, Aspergillus, Rhizopus และ Penicillium เป็นต้น

ตารางที่ 3.8 ชนิดของเชื้อราที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC

ชนิดของเชื้อรา (Hydrolysis capacity) *	ประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์
Alternaria sp.	+ (2 day)
A. alternata	+ (2 day)
Aspergillus sp.	+ (2 day)
A. niger	+++ (2 day)
A. flavus	++ (2 day)
A. fumigatus	+ (2 day)
A. tubingenesis	++ (2 day)
Lasiodiplodia theobromae	++ (3 day)
Chaetomium sp.	+ (3 day)
Cunninghamella elegans	- (2 day)
Curvularia lunata	+ (3 day)
Fusarium sp.	++ (3 day)
F. solani	++ (3 day)

Neurospora sp. ++ (3 day)
Penicillium sp. ++ (4 day)
P. janthinellum ++ (4 day)
P. oxalicum +++ (3 day)
Rhizoctonia sp. ++ (3 day)
Trichoderma sp. - (2 day)
T. atroviride - (2 day)
T. harzianum ++ (2 day)
T. inhamatum - (2 day)
T. koningii + (2 day)
T. viride + (2 day)

หมายเหตุ : * Hydrolysis capacity (cm.) + = < 1.00 cm; ++ = 1.01-2.00 cm, +++ = 2.01-3.00 cm, ++++ = > 3.00 cm.

(ก) (ข)

ภาพที่ 3.1 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อราบนอาหารแข็ง CMC
(ก) การเกิดวงใสบนอาหาร CMC ของเชื้อราที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส
(ข) ไม่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC

3.2.2 เชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

ผลการศึกษาพบเชื้อแบคทีเรีย จำนวน 12 ไอโซเลท (92.31 เปอร์เซ็นต์) จาก 13 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพในการย่อยสลายเซลลูโลส เมื่อทดสอบเชิงคุณภาพ (quantitative test) ด้วยอาหารแข็ง CMC โดยมีอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคโลนีสูงกว่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทม์มากกว่า 60 ซึ่งเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยและผลิตเอนไซม์เซลลูเลสสูงสุด คือ B. tequilensis, B. subsp. inaquosorum และ B. subtilis subsp. subtilis ในขณะที่พบเชื้อแบคทีเรีย ที่มีอัตราส่วนของวงใสต่อขนาดโคโลนีต่ำกว่าตำแหน่งเปอร์เซ็นต์ไทม์มากกว่า 60 เชื้อที่พบบ่อยได้แก่ Ps. aeruginosa และ B. aryabhattai ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่ไม่มีการย่อยสลายเซลลูโลส (no reaction) คือ Chryseobacterium gleum

Ntougias, Zervakis, Kavroulakis, Ehaliotis, and Papadopoulou (2004) ศึกษาความหลากหลายของแบคทีเรียในวัสดุเพาะเห็ดพบว่าเชื้อแบคทีเรียได้แก่ B. licheniformis พบว่ามีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ในขณะที่ดิเรก และสุรัตน์ (2556) ศึกษาความหลากหลายของเชื้อราแบคทีเรียที่ย่อยสลายไม้ผุ ฟางข้าวหมัก และมูลวัว พบเชื้อแบคทีเรียจำนวน 49 ไอโซเลท ในจำนวนนี้เชื้อแบคทีเรียจำนวน 14 ไอโซเลท มีประสิทธิภาพสูงในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส ได้แก่ เชื้อแบคทีเรีย Salmonella paratyphi, B. cereus, B. subtilis และ Proteus mirabilis นอกจากนี้ Viji, Sharma, and Lakhanpal (2002) รายงานว่าเชื้อ

แบคทีเรียที่สามารถพบได้บนก้อนเห็ดเก่า ได้แก่ Enterobacter sp., B. polymxa, Micrococcus roseus, Citrobacter fruedi, B. subtilis, Clostridium perfringens, Ps. aeruginosa, B. cereus, B. licheniformis และ Escherichia coli

Stanojevic (2016) ได้คัดแยกเชื้อแบคทีเรียจาก ฟางข้าว และมูลไก่ที่เป็นส่วนผสมของวัสดุเพาะที่ใช้เพาะเห็ดกระดุม พบว่าสามารถแยกเชื้อแบคทีเรียได้ทั้งหมด 103 ไอโซเลท เพื่อนำไปใช้ในการยับยั้งเชื้อรา Trichoderma aggressivum f. europaeum ซึ่งจากการทดสอบพบเชื้อแบคทีเรีย 23 ไอโซเลท สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ T. aggressivum f. europaeum, T. harzianum และ T. koningii ในขณะที่มีเชื้อเพียง 13 ไอโซเลตที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ T. atroviride T. aggressivum f. europaeum ได้ ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ B. subtilis, B. amyloliquefaciens, B. licheniformis และ B. pumilus

ตารางที่ 3.9 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ผลิตเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC

ชนิดแบคทีเรีย	การเกิดโซนใสบนอาหาร CMC
Bacillus aryabhattai	++
B. tequilensis	+++
Bacillus subtilis subsp. inaquosorum	+++
Bacillus subtilis subsp. subtilis	+++
Chryseobacterium gleum	-
Ochrobactrum haematophilum	+
Paraburkholderia kururiensis	++
Pseudomonas aeruginosa	++
Ps. oryzihabitans	++
Ps. psychrotolerans	++
Ralstonia sp.	+
Serratia sp.	+
Xanthomonas sp.	+

หมายเหตุ : * Hydrolysis capacity (cm.) + = < 1.00 cm; ++ = 1.01-2.00 cm, +++ = 2.01-3.00 cm, ++++ = > 3.00 cm.

(ก) (ข)

ภาพที่ 3.2 การทดสอบการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสของเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธี agar spot บนอาหารแข็ง CMC

(ก) การเกิดวงใสบนอาหาร CMC ของเชื้อแบคทีเรียที่สร้างเอนไซม์เซลลูเลส

(ข) ไม่มีการสร้างเอนไซม์เซลลูเลสบนอาหาร CMC

3.3 ผลของแบคทีเรียต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกเห็ดนางฟ้าในห้องปฏิบัติการ
ผลการทดสอบปฏิกิริยาของแบคทีเรีย 13 สปีชีส์ ที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐาน พบว่า มีแบคทีเรียเพียง 4 สปีชีส์ (33.37 เปอร์เซ็นต์) เท่านั้นที่สามารถเจริญร่วมกับเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐาน และสามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอก (primodia) ได้บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ได้แก่ เชื้อ B. tequilensis, Bs. supsp. inaquosorum, Bs. subsp. subtilis และ Ps. aeruginosa ในขณะที่แบคทีเรีย 9 สปีชีส์ มีผลยับยั้งการเจริญของเส้นใยเห็ดนางฟ้าภูฐาน (ตารางที่ 3.10 ภาพที่ 3.3)

ตารางที่ 3.10 การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA

ชนิดแบคทีเรีย	ความสามารถในการกระตุ้นให้เส้นใยสร้างตุ่มดอก
Bacillis aryabhattai	-
B. tequilensis	+
Bs. subsp. inaquosorum	+
Bs. subsp. subtilis	+
Chryseobacterium gleum	-
Ochrobactrum haematophilum	-

Paraburkholderia kururiensis -
Pseudomonas aeruginosa +
Ps. oryzihabitans -
Ps. psychrotolerans -
Ralstonia sp. -
Serratia sp. -
Xanthomonas sp. -

หมายเหตุ : + = เชื้อแบคทีเรียส่งเสริมการเจริญของเส้นใย และกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอก
- = เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย

(ก) (ข)

ภาพที่ 3.3 การทดสอบปฏิกิริยาระหว่างเชื้อแบคทีเรียต่อการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดในห้องปฏิบัติการ
(ก) เชื้อแบคทีเรียที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเส้นใย
(ข) เชื้อแบคทีเรียที่ส่งเสริมการเจริญเติบโตของเส้นใย และกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกบนอาหาร PDA

3.4 ประสิทธิภาพของแบคทีเรียต่อการออดดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในโรงเรือน

3.4.1 ระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในแต่ละรุ่น

ผลการศึกษาระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 1 พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยที่การใช้เชื้อ B. tequilensis และ Bs. subsp. inaquosorum มีผลทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็วที่สุด เฉลี่ย 5.17 วัน รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis และ Ps. aeruginosa เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอก 5.25 และ 7.30 วัน ส่วนชุดควบคุมเห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอกช้าสุด เฉลี่ย 8.15 วัน (ตารางที่ 3.11)

ระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 2 พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็วที่สุด เฉลี่ย 14.47 รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis เห็ดออกดอกใช้ระยะเวลาเฉลี่ย 14.95 วัน ส่วนการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอก 15.17 และ 17.75 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุม เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอกนานที่สุด เฉลี่ย 18.20 วัน (ตารางที่ 3.11)

สำหรับระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 3 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ การใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็วที่สุด เฉลี่ย 19.95 วัน รองลงมา คือการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum, Bs. subsp. subtilis, และ B.

tequilensis เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอก เท่ากับ 24.32, 24.60 และ 24.72 วัน ส่วนชุดควบคุมเห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอกช้าที่สุด 26.47 วัน (ตารางที่ 3.11)

ส่วนระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 4 พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis ทำให้เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอกเร็วที่สุด เฉลี่ย 33.80 รองลงมาคือการใช้เชื้อ B. tequilensis เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอก 33.90 วัน ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa เห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอก 34.00 และ 34.65 วัน ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมเห็ดใช้ระยะเวลาในการออกดอกช้าที่สุด เฉลี่ย 35.32 วัน (ตารางที่ 3.11)

เมื่อพิจารณา ระยะเวลาออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐาน ทั้ง 4 รุ่น ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ โดยที่การใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สปีชีส์ เห็ดออกดอกใช้เวลาเฉลี่ย 19.56-19.91 วัน ในขณะที่ชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) เห็ดออกดอกใช้เวลาเฉลี่ย 22.03 วัน (ตารางที่ 3.11)

ตารางที่ 3.11 ระยะเวลาที่เห็ดออกดอกแต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง	ระยะเวลาออกดอก (วัน)				
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	เฉลี่ย
1. B. tequilensis	5.17c	14.47d	24.72	33.90c	19.56
2. Bs. subsp. subtilis	5.25c	14.95c	24.60	33.80c	19.65
3. Ps. aeruginosa	7.30b	17.75b	19.95	34.65b	19.91
4. Bs. subsp. inaquosorum	5.17c	15.17c	24.32	34.00c	19.66
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	8.15a	18.20a	26.47	35.32a	22.03
CV (%)	5.38	1.68	21.73	0.76	7.49
Significant Difference	**	**	ns	**	ns

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ns ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

3.4.2 จำนวนดอกเห็ด

ผลการศึกษาจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ในรุ่นที่ 1 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้เห็ดมีจำนวนดอกมากที่สุดเฉลี่ย 8.37 ดอก/ถุง รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum ทำให้เห็ดมีออกดอกเห็ดเฉลี่ย 7.97 ดอก/ถุง ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis และ การใช้เชื้อ

Ps. aeruginosa เห็ดออกดอกเฉลี่ย 7.50 และ 6.90 ดอก/ถุง ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุม เห็ดมีจำนวนดอกเฉลี่ยน้อยสุด เท่ากับ 6.07 ดอก/ถุง (ตารางที่ 3.12)

โดยที่จำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 2 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ยังคงทำให้เห็ดออกดอกมากที่สุด เฉลี่ย 6.12 ดอก/ถุง ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa เห็ดออกดอกเฉลี่ย 5.60, 5.52 และ 5.25 ดอก/ถุง ส่วนชุดควบคุม เห็ดดอกออกน้อยที่สุดเฉลี่ย 4.42 ดอก/ถุง (ตารางที่ 3.12)

สำหรับจำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 3 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้เห็ดออกดอกมากที่สุดเฉลี่ย 5.27 ดอก/ถุง ส่วนการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum และ Bs. subsp. subtilis และ Ps. aeruginosa เห็ดออกดอกเฉลี่ย 5.02, 5.02 และ 4.95 ดอก/ถุง ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม เห็ดออกดอกน้อยที่สุดเฉลี่ย 4.05 ดอก/ถุง (ตารางที่ 3.12)

การออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 4 เป็นไปในทิศทางเดียวกับการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 3 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis เห็ดออกดอกมากที่สุดเฉลี่ย 5.05 ดอก/ถุง รองลงมาคือ Ps. aeruginosa, Bs. subsp. subtilis และ Bs. subsp. inaquosorum เห็ดออกดอกเฉลี่ย 4.90, 4.85 และ 4.80 ดอก/ถุง (ตามลำดับ) ส่วนชุดควบคุมเห็ดออกดอกน้อยที่สุดเฉลี่ย 3.97 ดอก/ถุง (ตารางที่ 3.12)

เมื่อพิจารณาจำนวนดอกเห็ด รวม 4 รุ่น พบว่ามีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) โดยที่การใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้เห็ดมีจำนวนดอกสูงสุดเท่ากับ 24.81 ดอก/ถุง รองลงมาคือ การใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum, Bs. subsp. subtilis และ Ps. aeruginosa เห็ดให้จำนวนดอกเห็ดเท่ากับ 23.31, 22.97 และ 22.00 ดอก/ถุง ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมมีจำนวนดอกเห็ดน้อยที่สุดเท่ากับ 18.51 ดอก/ถุง (ตารางที่ 3.12)

ตารางที่ 3.12 จำนวนดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานแต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง	จำนวนดอกเห็ด (ดอก/ถุง)				
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	รวม
1. B. tequilensis	8.37a	6.12a	5.27a	5.05a	24.81a
2. Bs. subsp. subtilis	7.50ab	5.60ab	5.02a	4.85a	22.97a
3. Ps. aeruginosa	6.90ab	5.25b	4.95a	4.90a	22.00b
4. Bs. subsp. inaquosorum	7.97a	5.52ab	5.02a	4.80a	23.31ab
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	6.07b	4.42c	4.05b	3.97b	18.51c
CV (%)	14.16	9.71	10.56	6.87	4.89

Significant Difference ** ** ** ** **

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

3.4.3 น้ำหนักดอก

ผลการศึกษาน้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) (ตารางที่ 3.13) ในรุ่นที่ 1 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้เห็ดมีน้ำหนักเฉลี่ยมากสุดเท่ากับ 81.00 กรัม/ถุง รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa น้ำหนักเห็ดเฉลี่ย 74.25, 71.25 และ 65.75 กรัม/ถุง ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม น้ำหนักดอกเห็ดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 60.75 กรัม/ถุง

น้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 2 พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้ดอกเห็ดมีน้ำหนักมากที่สุด เช่นเดียวกับรุ่นที่ 1 เฉลี่ย 57.87 กรัม/ถุง รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum, Ps. aeruginosa และ Bs. subsp. subtilis น้ำหนักดอกเห็ดเฉลี่ย 55.62, 54.50 และ 54.12 กรัม/ถุง ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุม เห็ดมีน้ำหนักน้อยที่สุดเฉลี่ย 47.00 กรัม/ถุง

สำหรับน้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 3 และ 4 เป็นไปในทิศทางเดียวกัน โดยที่การใช้เชื้อ B. tequilensis ดอกเห็ดมีน้ำหนักมากที่สุดเฉลี่ย 57.12 และ 49.87 กรัม/ถุง ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, Ps. aeruginosa และ Bs. subsp. inaquosorum น้ำหนักดอกเห็ดเฉลี่ยรุ่นที่ 3 และ 4 เท่ากับ 50.00 และ 49.50, 49.00 และ 45.70, 49.87 และ 45.37 กรัม/ถุง ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมน้ำหนักดอกเห็ดเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 39.12 และ 36.87 กรัม/ถุง ตามลำดับ

เมื่อพิจารณาน้ำหนักดอกเห็ดรวมทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) โดยที่การใช้เชื้อ B. tequilensis เห็ดมีให้น้ำหนักมากที่สุดเท่ากับ 245.86 กรัม/ถุง ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (B.E.) เท่ากับ 94.41 เปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa น้ำหนักเห็ดรวมเท่ากับ 227.87, 222.11 และ 214.95 กรัม/ถุง ค่าประสิทธิภาพการใช้อาหารเท่ากับ 85.36, 81.28 และ 76.63 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับในขณะที่ชุดควบคุมน้ำหนักดอกเห็ดรวมน้อยที่สุดเท่ากับ 183.74 กรัม/ถุง ประสิทธิภาพการใช้อาหารเท่ากับ 65.58 เปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.13 น้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานแต่ละรุ่น เมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง	น้ำหนัก (กรัม/ถุง)				ประสิทธิภาพการใช้อาหาร (%B.E.)
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	รวม

1. B. tequilensis	81.00a	57.87a	57.12a	49.87a	245.86a	94.41
2. Bs. subsp. subtilis	74.25ab	54.12a	50.00a	49.50a	227.87b	81.28
3. Ps. aeruginosa	65.75c	54.50a	49.00a	45.70a	214.95b	76.63
4. Bs. subsp. inaquosorum	71.25abc	55.62a	49.87a	45.37a	222.11b	85.36
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	60.75c	47.00b	39.12b	36.87b	183.74c	65.58
CV (%)	11.36	7.60	9.31	8.39	4.30	
SignificantDifference	**	**	**	**	**	

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

3.4.4 ความยาวของก้านดอกเห็ด

ผลการศึกษาความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) (ตารางที่ 3.14) ในรุ่นที่ 1 พบว่าการใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ทำให้ความยาวของก้านดอกเห็ดยาวที่สุดเฉลี่ย 7.38 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, B. tequilensis และ Bs. subsp. inaquosorum ความยาวของก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ย 7.28, 7.20 และ 7.00 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมความยาวของก้านดอกเห็ดเฉลี่ยน้อยสุดเท่ากับ 6.88 เซนติเมตร/ดอก

สำหรับความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 2 พบว่าการใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ทำให้ก้านดอกเห็ดยาวที่สุดเฉลี่ย 7.95 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือ Bs. subsp. subtilis, Bs. subsp. inaquosorum และ ชุดควบคุม ก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ย 7.33, 7.21 และ 6.80 เซนติเมตร/ดอก ในขณะที่การใช้เชื้อ B. tequilensis ก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 6.68 เซนติเมตร/ดอก ส่วนความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 3 พบว่าการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis ทำให้ก้านดอกเห็ดยาวที่สุด เฉลี่ย 7.26 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum, Ps. aeruginosa และ B. tequilensis ก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ย 7.14, 7.06 และ 6.98 เซนติเมตร/ดอก ส่วนชุดควบคุมก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 6.57 เซนติเมตร/ดอก

ในขณะที่ความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานในรุ่นที่ 4 พบว่าการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum ทำให้ก้านดอกเห็ดยาวที่สุด เฉลี่ย 7.80 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, B. tequilensis และ Ps. aeruginosa ก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ย 7.51, 7.21 และ 7.16 เซนติเมตร/ดอก ส่วนชุดควบคุมก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ยน้อยที่สุดเท่ากับ 6.64 เซนติเมตร/ดอก และเมื่อพิจารณาความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน ทั้ง 4 รุ่น พบว่าการใช้เชื้อ

แบคทีเรียทั้ง 4 สปีชีส์ ทำให้ก้านดอกเห็ดยาวเฉลี่ยอยู่ในช่วง 7.01-7.38 เซนติเมตร/ดอก ในขณะที่การใช้น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้ก้านเห็ดสั้นที่สุดเท่ากับ 6.72 เซนติเมตร

ตารางที่ 3.14 ความยาวของก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง	ความยาวของก้านดอกเห็ด (เซนติเมตร/ดอก)				
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	เฉลี่ย
1. B. tequilensis	7.20abc	6.68c	6.98a	7.21b	7.01ab
2. Bs. subsp. subtilis	7.28ab	7.33b	7.26a	7.51ab	7.34a
3. Ps. aeruginosa	7.38a	7.95a	7.06a	7.16b	7.38a
4. Bs. subsp. inaquosorum	7.00bc	7.21bc	7.14a	7.80a	7.28a
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	6.88c	6.80bc	6.57b	6.64c	6.72b
CV (%)	3.13	4.75	3.31	4.24	3.84
Significant Difference	**	**	**	**	**

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

3.4.5 ความกว้างของดอกเห็ด

ผลการศึกษาความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) (ตารางที่ 3.15) ในรุ่นที่ 1 พบว่าการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis ทำให้ดอกเห็ดกว้างที่สุด เท่ากับ 7.90 เซนติเมตร/ดอก รองลงมาคือการใช้เชื้อ Ps. aeruginosa, Bs. subsp. inaquosorum และ B. tequilensis ดอกเห็ดกว้างเฉลี่ย 7.87, 7.68 และ 7.65 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมดอกเห็ดกว้างน้อยที่สุดเฉลี่ย 6.75 เซนติเมตร/ดอก

สำหรับความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน ในรุ่นที่ 2 และ 3 พบว่าความกว้างของดอกเห็ดเป็นไปในทิศทางเดียวกัน พบว่าการใช้เชื้อ B. tequilensis, Bs. subsp. subtilis และ Ps. aeruginosa ทำให้ดอกเห็ดกว้างเฉลี่ย 7.82-7.82, 7.58-7.62 และ 7.80-7.91 เซนติเมตร/ดอก แตกต่างจากการใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum ซึ่งทำให้ดอกเห็ดรุ่นที่ 2 และ 3 กว้างเฉลี่ย

7.32 และ 7.10 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ในขณะที่ชุดควบคุมดอกเห็ดกว้างน้อยที่สุดเฉลี่ยเท่ากับ 6.48 และ 6.36 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ

ส่วนความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน ในรุ่นที่ 4 พบว่าการใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ทำให้ดอกเห็ดกว้างที่สุด เฉลี่ยกว้าง 7.93 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือการใช้เชื้อ B. tequilensis, Bs. subsp. inaquosorum และ Bs. subsp. subtilis ความกว้างของดอกเห็ดเฉลี่ยกว้าง 7.66, 7.26 และ 7.19 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมดอกเห็ดกว้างน้อยที่สุดเท่ากับ 6.21 เซนติเมตร/ดอก

เมื่อพิจารณาความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานทั้ง 4 รุ่น พบว่า การใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ดอกเห็ดกว้างเฉลี่ยมากที่สุด 7.87 เซนติเมตร/ดอก รองลงมาคือการใช้เชื้อ B. tequilensis, Bs. subsp. subtilis และ Bs. subsp. inaquosorum ดอกเห็ดนางฟ้าภูฐานกกว้างเฉลี่ย 7.72, 7.57 และ 7.34 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ส่วนชุดควบคุมดอกเห็ดกว้างน้อยที่สุดเท่ากับ 6.45 เซนติเมตร/ดอก

ตารางที่ 3.15 ความกว้างของดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง	ความกว้างของดอกเห็ด (เซนติเมตร/ดอก)				
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	เฉลี่ย
1. B. tequilensis	7.65a	7.82a	7.76a	7.66a	7.72a
2. Bs. subsp. subtilis	7.90a	7.58a	7.62a	7.19b	7.57ab
3. Ps. aeruginosa	7.87a	7.80a	7.91a	7.93a	7.87a
4. Bs. subsp. inaquosorum	7.68a	7.32b	7.10b	7.26b	7.34b
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	6.75b	6.48c	6.36c	6.21c	6.45c
CV (%)	3.76	2.14	2.59	2.68	2.75
Significant Difference	**	**	**	**	**

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

3.5.6 เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ด

ผลการศึกษาเส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดนางฟ้าภูฐานเฉลี่ยทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$) อย่างไรก็ตามในรุ่นที่ 1 ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ การใช้เชื้อ Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa ทำให้ก้านเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลางกว้างมากสุด เฉลี่ย 0.92 เซนติเมตร/ดอก ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, B. tequilensis และชุดควบคุม เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดกว้างเฉลี่ย 0.89, 0.88 และ 0.56 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ

สำหรับเส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดนางฟ้าภูฐาน ในรุ่นที่ 2 และ 3 พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) ระหว่างการใช้แบคทีเรียกับชุดควบคุม โดยที่การใช้เชื้อแบคทีเรียทุกตัวทำให้ก้านดอกเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลางรุ่นที่ 2 เฉลี่ย 0.86-0.93 เซนติเมตร/ดอก และ 0.82-0.93 เซนติเมตร/ดอกในรุ่นที่ 3 ซึ่งมีขนาดกว้างกว่าชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ) เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดเฉลี่ย 0.53 และ 0.46 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ในขณะที่เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดนางฟ้าภูฐาน ในรุ่นที่ 4 พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) การใช้เชื้อ Ps. aeruginosa ทำให้ก้านเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์เฉลี่ยสูงสุด 0.96 เซนติเมตร/ดอก รองลงมา คือการใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, B. tequilensis และ Bs. subsp. inaquosorum ก้านเห็ดมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 0.93, 0.93 และ 0.86 เซนติเมตร/ดอก ส่วนชุดควบคุมเส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดกว้างน้อยที่สุดเท่ากับ 0.54 เซนติเมตร/ดอก

เมื่อพิจารณาเส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดนางฟ้าภูฐาน เฉลี่ยทั้ง 4 รุ่น พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01) (ตารางที่ 3.16) โดยที่การใช้เชื้อ B. tequilensis ทำให้เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดกว้างสุดเฉลี่ย 0.91 เซนติเมตร/ดอก ในขณะที่การใช้เชื้อ Bs. subsp. subtilis, Ps. aeruginosa และ Bs. subsp. inaquosorum เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดมีความกว้างเท่ากันคือ 0.89 เซนติเมตร/ดอก ส่วนชุดควบคุมเส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดเฉลี่ยน้อยสุดเท่ากับ 0.52 เซนติเมตร/ดอก

ตารางที่ 3.16 เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ดนางฟ้าภูฐาน แต่ละรุ่นเมื่อทดสอบด้วยเชื้อแบคทีเรีย 4 สปีชีส์ เปรียบเทียบการชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดการทดลอง เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ดนางฟ้าภูฐาน (เซนติเมตร/ดอก)					
	รุ่นที่ 1	รุ่นที่ 2	รุ่นที่ 3	รุ่นที่ 4	เฉลี่ย
1. B. tequilensis	0.88	0.93a	0.93a	0.93ab	0.91a
2. Bs. subsp. subtilis	0.89	0.90a	0.87a	0.93ab	0.89a
3. Ps. aeruginosa	0.92	0.86a	0.82a	0.96a	0.89a
4. Bs. subsp. inaquosorum	0.92	0.92a	0.87a	0.86b	0.89a
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)	0.56	0.53b	0.46b	0.54c	0.52b
CV (%)	6.43	5.41	12.62	6.81	4.86
Significant Difference	ns	**	**	**	**

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ns ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

จากผลการศึกษานี้พบว่าเชื้อ B. tequilensis, Bs. subsp. subtilis, Bs. subsp. inaquosorum และ Ps. aeruginosa มีผลต่อการส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ดและการออกดอกของเห็ดนางฟ้าภู

ฐานทั้งในห้องปฏิบัติการและในสภาพโรงเรือน โดยที่การใช้เชื้อแบคทีเรียฉีดพ่นบริเวณปากก้อนเชื้อเห็ด มีผลให้เห็ดออกดอกเร็วกว่าการไม่ฉีดเชื้อแบคทีเรียเฉลี่ย 2.12-2.47 วัน จำนวนดอกเพิ่มขึ้น 18.85-34.04 เปอร์เซ็นต์ น้ำหนักผลผลิตเพิ่มขึ้น 16.99-33.81 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ ความยาวของก้านดอก เส้นผ่านศูนย์กลางก้านเห็ด และความกว้างของดอกเห็ด มีค่ามากกว่าชุดควบคุมที่ไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย (ตารางที่ 3.17) สอดคล้องกับการศึกษาของ Rainey (1991); Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003); Kim, Pitts, Stewart, Camper, and Yoon (2008); Colauto, Fermor, Eira, and Linde (2016) รายงานว่า แบคทีเรียบางชนิดสามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยและการออกดอกของเห็ดได้ โดยเฉพาะเชื้อ Pseudomonas spp. และ P. putida ซึ่งมีรายงานว่าสามารถกระตุ้นการเจริญของเส้นใยเห็ดและการออกดอกของเห็ด A. bitorquis (Colauto, Fermor, Eira, and Linde, 2016) และ A. bisporus (Rainey and Cole, 1987; Egar, 1972; Rainey, Cole, Fermor, and Wood, 1990; Reddy and Patrick, 1990; Zarenejad, Yakhchail, and Rasooli, 2012) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

นอกจากนี้ Kim, Pitts, Stewart, Camper, and Yoon (2008) รายงานการศึกษาเชื้อ Pseudomanas sp. P7014 ที่แยกจากวัสดุคลุมผิวหน้าเห็ด Pleurotus มาใช้ทดสอบการเจริญของเส้นใยเห็ด Pleurotus eryngii ในอาหารเหลวพบว่า เชื้อแบคทีเรียสามารถกระตุ้นให้เห็ดออกดอกเร็วและมีน้ำหนักผลผลิตเพิ่มขึ้น โดยที่เส้นใยเจริญเร็วขึ้น 5 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรีย ในขณะที่ Colauto, Fermor, Eira, and Linde (2016) ทดสอบใช้เชื้อ P. putida ที่แยกได้จากวัสดุคลุมผิวหน้าเห็ด A. bisporus มาใช้กระตุ้นการออกดอกของเห็ด A. bitorquis พบว่าทำให้เห็ดมีผลผลิตเพิ่มขึ้น 12 เปอร์เซ็นต์ นอกจากนี้ Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003) รายงานว่าแบคทีเรียกลุ่ม fluorescent pseudomonads สามารถกระตุ้นการเจริญของเห็ด P. ostreatus ได้ เมื่อทดสอบโดยการใส่เชื้อ Pseudomonas ในอาหารที่มีสารอาหารต่ำแล้วใช้เลี้ยงเชื้อเห็ด พบว่า เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีขึ้น เห็ดมีเส้นใยหนา และสามารถพัฒนาเป็นตุ่มดอกได้อีกด้วย โดยที่ Colauto, Fermor, Eira, and Linde (2016) รายงานว่าสำหรับการเจริญของเส้นใยเห็ดหากมีจุลินทรีย์อื่นปะปนอยู่ในปริมาณเล็กน้อยจะเป็นผลดีต่อการสร้างดอกเห็ด

Young, Chu, Hameed, and Young (2013) รายงานว่าเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Actinobacteria, Firmicutes และ Proteobacteria ที่แยกได้จากดินมีประโยชน์ได้ด้านเช่น ละลายฟอสเฟต (phosphate-solubilization) ตรึงไนโตรเจน (nitrogen-fixation) และ ส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ด (stimulating of mycelia) โดยแบคทีเรียไฟลัม Proteobacteria เช่น Enterobacter, Pseudomonas และ Serratia เป็นจีนัสที่สามารถเจริญร่วมกับผิวพืช (plant rhizosphere) สามารถผลิตสารเพื่อส่งเสริมการเจริญของพืชได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่ง Pseudomonas (Saharan and Nehra, 2011) อย่างไรก็ตาม Young, Chu, Hameed, and Young (2013) รายงานว่าผลผลิตเห็ดกระดุมรุ่นที่ 1 ในชุดทดลองที่ใช้แบคทีเรียผสมดินเพื่อคลุมวัสดุเพาะ มีผลทำให้ปริมาณผลผลิตเพิ่มขึ้นจาก 170 เป็น 215 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ใช้เชื้อแบคทีเรียกระตุ้น อย่างไรก็ตามยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างชัดเจนถึงกลไกหรือสารประกอบที่มีผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ทั้งนี้อาจเกิดจากสารประกอบที่จุลินทรีย์ผลิตออกมาเนื่องจากอยู่ในภาวะเครียดหรือสภาวะที่กดดัน (Coluato, Fermor, Eira, and Linde, 2016) สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่า

แบคทีเรียจีนัส Bacillus ทั้ง 3 สปีชีส์ มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของเส้นใยและการออกดอกของเห็ดนางฟ้าภูฐานได้ดีทั้งในห้องปฏิบัติการและโรงเรือนทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับงานศึกษาของ Cho, Kim, Crowley, and Cho (2003) รายงานว่า B. subtilis และ B. macerans ที่แยกได้จากวัสดุคลุมผิวหน้าเห็ดกระดุมและก้อนเห็ดนางรม มีผลดีต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ในขณะที่ Maneechai (2003) รายงานว่า Bacillus สามารถส่งเสริมการเจริญของเส้นใยและการออกดอกของเห็ดแล้วยังสามารถควบคุมโรคราเขียวที่เกิดจากเชื้อ Trichoderma ได้อย่างมีประสิทธิภาพ

ตารางที่ 3.17 ระยะเวลาออก ความยาวของก้านดอกเห็ด เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ด ความกว้างของดอกเห็ด จำนวนดอก น้ำหนัก และประสิทธิภาพการใช้

อาหารของเห็ดนางฟ้าภูฐาน เมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรีย 4 สปีชีย์ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม (น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ)

ชุดทดลอง ระยะเวลาออกดอกรุ่นที่ 1
(วัน) ความยาวของก้านดอกเห็ด
(ซม./ดอก) เส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ด
(ซม./ดอก) ความกว้างของดอกเห็ด
(ซม./ดอก) จำนวนดอก

(ดอก/ถุง)	น้ำหนัก						
(กรัม/ถุง)							
	ประสิทธิภาพการใช้อาหาร						
(เปอร์เซ็นต์)							
1. B. tequilensis	19.56	7.01ab	0.91a	7.72a	24.81a	245.86a	94.41
2. Bs. subsp. subtilis	19.65	7.34a	0.89a	7.57ab	22.97a	227.87b	81.28
3. Ps. aeruginosa	19.91	7.38a	0.89a	7.87a	22.00b	214.95b	76.63
4. Bs. subsp. inaquosorum		19.66	7.28a	0.89a	7.38b	23.31ab	222.11b
85.36							
5. Control (น้ำกลั่นฆ่าเชื้อ)		22.03	6.72b	0.52b	6.45c	18.51c	183.74c
65.58							
CV (%)	7.49	3.84	4.86	2.75	4.89	4.30	
Significant different	ns	**	**	**	**	**	

หมายเหตุ : ** ค่าเฉลี่ยในสดมภ์เดียวกัน ที่ตามด้วยตัวอักษรต่างกัน มีความแตกต่างกันทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P<0.01$)

ns ไม่พบความแตกต่างทางสถิติ

บทที่ 4
สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

1. ตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่เก็บได้จาก จังหวัดนครศรีธรรมราช สุราษฎร์ธานี สงขลา พัทลุง และตรัง รวมทั้งสิ้น 80 ฟาร์ม ได้ก้อนเชื้อเก่าทั้งหมด 244 ก้อน ชนิดก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่เก็บได้แก่ เห็ดนางฟ้า เห็ดนางรม เห็ดเป๋าฮื้อ เห็ดหลินจือ เห็ดหูหนู เห็ดแครง และเห็ดโคนน้อย

2. บนก้อนเชื้อเห็ดเก่าพบเชื้อราจำนวน 24 สปีชีส์ และเชื้อแบคทีเรียจำนวน 13 สปีชีส์ โดยเชื้อราที่พบแบ่งเป็นกลุ่ม anamorphic 23 สปีชีส์ และ basidiomyces 1 สปีชีส์ เชื้อราสายพันธุ์เด่นและชนิดของเชื้อราที่พบบ่อย คือ จีนัส Trichoderma, Aspergillus และ Penicillium ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียสายพันธุ์เด่นและพบได้บ่อย คือ จีนัส Bacillus และ Pseudomonas

3. เชื้อราจำนวน 20 สปีชีส์ มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยเชื้อรา 2 สปีชีส์ ได้แก่ A. niger และ P. oxalicum มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์ระดับสูง (+++) ในขณะที่เชื้อแบคทีเรีย 10 สปีชีส์ มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส โดยที่แบคทีเรีย 3 สปีชีส์ คือ B. tequilensis, Bs. subsp. inaquosorum และ Bs. subsp. subtilis มีประสิทธิภาพระดับสูง (+++) ในการผลิตเอนไซม์เซลลูเลส

4. แบคทีเรียจำนวน 4 สปีชีส์ ได้แก่ Bs. subsp. inaquosorum, Bs. subsp. subtilis, B. tequilensis และ Ps. aeruginosa สามารถส่งเสริมการเจริญของเส้นใยและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้าได้ในห้องปฏิบัติการและสภาพโรงเรือน พบว่าระยะเวลาการออกดอกของเห็ดไม่มีแตกต่างกันทางสถิติ โดยที่การใช้เชื้อแบคทีเรียทั้ง 4 สปีชีส์ ให้ระยะเวลาเฉลี่ย 19.56-19.91 วัน

ในขณะที่ชุดควบคุมระยะเวลาออกดอกเฉลี่ย 22.03 วัน ในขณะที่การใช้เชื้อ B. tequilensis ส่งผลให้เห็ดมีจำนวนดอก น้ำหนักเห็ด และเส้นผ่านศูนย์กลางก้านดอกเห็ด มีค่าสูงสุด เท่ากับ 24.81 ดอก/ถุง , 245.86 กรัม/ถุง (BE 91.41 เปอร์เซ็นต์) และ 0.91 เซนติเมตร/ดอก ตามลำดับ ส่วนการใช้เชื้อ Ps. aeruginosa มีผลให้ความยาวของก้านและความกว้างของดอกเห็ดมีค่าสูงสุด เท่ากับ 7.38 และ 7.87 เซนติเมตร/ดอก พบความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (P<0.01)

ข้อเสนอแนะ

แบคทีเรียที่จำแนกได้หลายชนิดยังไม่พบการรายงานในประเทศไทย ซึ่งอาจเป็นแบคทีเรียชนิดใหม่ (new species) ซึ่งจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติม เพื่อให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้อย่างมีประสิทธิภาพ นอกจากนี้แบคทีเรียที่คัดเลือกได้หลายชนิดมีประสิทธิภาพสามารถยับยั้งการเกิดโรคของพืช และสามารถผลิตเอนไซม์เซลลูเลสได้ในระดับสูง ควรมีการศึกษาต่อยอดเพื่อพัฒนาให้สามารถนำไปใช้ประโยชน์ด้านเกษตรและอุตสาหกรรมในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

ชยพร เอคะรัจน์. 2550. เทคนิคและวิธีการเพาะเห็ด. แหล่งที่มา: http://www.geocities.com/ruiversity2u, 19 มิถุนายน 2560.

ดิเรก ฉิมชนะ และ สุรัตน์ วังพิกุล. 2556. ผลิตภัณฑ์ชุมชนเพื่อการย่อยสลายฟางในนาข้าว. สถาบันวิจัยและพัฒนา. มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลสุวรรณภูมิ

ดีพร้อม ไชยวงศ์เกียรติ. 2540. การเพาะเห็ดฟาง. แหล่งที่มา: http://www.ku.ac.th/agri/mush.htm, 9 มิถุนายน 60.

นิรนาม. 2560. ก้อนเห็ดทำปุ๋ยหมัก. ศูนย์เกษตรอินทรีย์นาโน. แหล่งที่มา : http://www.phikanes.com/ปุ๋ยเอ็นฟังก์ชั่นกับเห็ด/ปุ๋ยก้อนเห็ด.html, 30 กันยายน 2560.

ณัฐวุฒิ พุทธกูล และวสันต์ นุ่นสง. 2557. ผลของการใช้ก้อนเชื้อเห็ดเก่าเป็นวัสดุเพาะเห็ดยานางิ. ปัญหาพิเศษระดับปริญญาตรี สาขาพืชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย อ.ทุ่งใหญ่ จ.นครศรีธรรมราช.

พิมพา โจ้นทาวงศ์, สุริสา อินอุด, รวิภา ยงประยรู, และพิบูลย์ หมองเชย 2552. แนวทางการศึกษาคุณสมบัติการเป็นเชื้อเพลิงของก้อนวัสดุในการเพาะเห็ดมาใช้กับเทคโนโลยีแก๊สซิฟิเคชั่น. วารสารวิชาการคณะเทคโนโลยีอุตสาหกรรม 2: 23-36.

พรศิลป์ สีเผือก, ปุณพิชญ์ ผดุงมาศ, พิชยา แก้วมโน และวุฒิชัย สีเผือก. 2557. การใช้กากสลัดจ์ปาล์มน้ำมันเป็นอาหารเสริมสำหรับเพาะเห็ดนางฟ้าภูฐาน. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 42: 374-379.

พรศิลป์ สีเผือก และคมสัน นันทสุนทร. 2548. การพัฒนาสูตรอาหารเพื่อเพิ่มศักยภาพการเพาะเห็ดของชุมชน: กรณีศึกษาจังหวัดนครศรีธรรมราช. รายงานการวิจัย, คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย.

พรเทพ ถนนแก้ว. 2538. ภาวะเหมาะสมของการผลิตเซลลูเลสจากเชื้อราที่คัดแยกจากบริเวณปลูกป่าศรนารายณ์. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

พิจิตรา ตั้งเขื่อนขันธ์, รสรินทร์ รุจนานนท์ และอัญชลี อานาทสมบูรณ์. 2548. การคัดเลือกเชื้อราเพื่อผลิตเอนไซม์เซลลูเลสจากวุ้นมะพร้าวที่เป็นเศษเหลือทิ้งจากโรงงาน. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. พิรุฬห์พร ศรีมงคล. 2552. การคัดเลือกจุลินทรีย์ในการผลิตเซลลูเลสและไซแลนเนส. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

มนัสนันท์ นพรัตน์ไมตรี, พรพรรณ แสนภูมิ, อณัญญา ปานทอง, และวรางคณา กิจพิพิธ. 2560. คุณค่าทางโภชนะและการปรับปรุงเศษเหลือทิ้งจากการเพาะเห็ด เพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์. วารสารแก่นเกษตร (ฉบับพิเศษ) 1: 715-721.

วุฒิพร พรหมขุนทอง, สันติ ยกรัตน์, สุภัทรา อินทศร, ยุทธวัฒน์ รัตนกาล และนัทท์ นันทพงศ์. 2557. การใช้เศษเหลือจากการแปรรูปเห็ดนางฟ้า (Pleurotus sajor-caju (Fr.) Singers) เพื่อทดแทนโปรตีนจากปลาป่นในอาหารปลานิลแดง (Oreochromis niloticus x O. mossambicus). วารสารเกษตรพระวรุณ 11(1): 25-38.

สุทธิชัย ปทุมล่องทอง. 2545. เห็ดพืชเศรษฐกิจยั่งยืน. สำนักพิมพ์ธารบัวแก้ว, กรุงเทพ ฯ.

สุทธิพันธุ์ แก้วสมพงษ์ และศศิธร จินตนาสุนทรศิริ. 2546. การนำวัสดุเหลือใช้จากโรงงานอุตสาหกรรมเครื่องหอมไทย-จีน มาทดลองเพาะเห็ด. วารสารข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด 8(3): 7-14.

อภิรัชต์ สมฤทธิ์. 2548. เทคนิคการใช้หญ้าเพาะเห็ด ในประเทศจีน (ตอนที่ 1). วารสารข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด 10(1): 20-27.

แสงแก้ว คำกวน. 2548. การเพาะเห็ด. เอกสารประกอบการสอน, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลล้านนา วิทยาเขตน่าน.

อัจฉรา พยัพพานนท์. 2548. วัสดุจากสบู่ดำพืชพลังงานเพื่อเพาะเห็ดฟาง. วารสารข่าวสารเพื่อผู้เพาะเห็ด 10(2): 17-30.

Abu-baker, N.K., Abu-Azia, S., Hassan, M.A. and Ghazali, F.M. 2010. Isolation and selection of appropriate cellulolytic mixed microbial cultures for cellulases production from oil palm empty fruit bunch. Journal of Biotechnology 9: 73-78.

Asha, C. and Prema, P. 2007. Production of cellulose-free endoxylanase from novel alkalophikic thermotolerent Bacillus pumilus by solid-state fermentation and its application in wastepaper recycling. Bioresource Technology 98 (3): 485-490.

Ashraf, R. and Ali, T.A. 2006. Effect of oil (crude petroleum) on the survival and growth of soil fungi. Bioresource Technology 3: 127-133.

Ashraf, R., Shahid, F. and Ali, T.A. 2007. Association of fungi, bacteria and actinomycetes with different compost. Pakistan Journal of Botany 39: 2141-

2151.

Ball, A.S. and Jackson, A.M. 1995. The recovery of lignocellulose-degrading enzymes from spent mushroom compost. Bioresource Technology 54: 311-314.

Bellamy, W.D. 1977. Cellulose and lignocellulose digestion by thermophilic actinomycetes for single-cell protein production. Journal of industrial microbiology and biotechnology 18: 249-254.

Benitez, E., Nogales, R., Elvira, C., Masciandaro, G. and Ceccanti, B. 1999. Enzyme activities as indication of the stabilization of sewage sludge composting with Eisenia foetida. Bioresource Technology 67: 297-303.

Beyer, D. 2006. Spent mushroom substrate. Available Source: www.http://mushroomspawn.cas.psu.edu/spent.html, November 21, 2016.

Bhat, S. 1997. Cellulase degrading enzymes and their potential industrial application. Biotechnology Advances 15: 538-620. Bhat, M.K. and Bhat, S. 1997. Cellulose degrading enzymes and their potential industrial applications. Biotechnology Advances 15: 583-620.

Butlera, T.A., Sikora, L.J., Steinhilberb, P.M. and Douglassb, L.W. 2001. Compost age and sample storage effects on maturity indicators of biosolids compost. Journal of Environmental Quality 30: 2141-2148.

Cho, Y.S., Kim, J.S., Crowley, D.E. and Cho, B.G. 2003. Growth promotion of the edible fungus Pleurotus ostreatus by fluorescent pseudomonads. FEMS Microbiology Letters 218: 271-276.

Colauto, N.B., Fermor, T.R., Eira, A.F. and Linde, G.A. 2016. Pseudomonas putida stimulates primordia on Agaricus bitorquis. Current Microbiology 72: 482-488.

Eger, G. 1972. Experiments and comments on the action of bacteria on sporophore initiation in A. bisporus. Mushroom Science 8: 719-725.

Eriksson, K.E.L., Blanchette, R.A. and Ander, P. 1990. Microbial and Enzymatic Degradation of Wood and Wood Components. Springer-Verlag Berlin heiberg, New York.

Fan, L.T., Gharpuray M.M. and Lee, Y.H. 1987. Cellulose Hydrolysis. Berlin, Germany: Springer-Verlag.

Fazaeli, H. and Masoodi, A.R.T. 2006. Spent wheat straw compost of Agaricus bisporus mushroom as ruminant feed. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 19(6): 845-851.

Gbolagade, J.S. 2006. Bacteria associated with compost used for cultivation of

Nigerian edible mushrooms Pleurotus tuber-regium (Fr.) Singer, and Lentinus squarrosulus (Berk.). African Journal of Biotechnology 5: 338-342.
Grewal, S.I.S. and Rainey, P.B. 1991. Phenotypic variation of Pseudomonas putida and P. tataasii affects the chemotactic response to Agaricus bisporus mycelia exudates. Journal of General Microbiology 137: 2761-2768.
Hendricks, C.W., Doyle, J.D. and Hugley, B. 1995. A new solid medium for enumerating cellulose-utilizing bacteria in soil. Applied and Environmental Microbiology 61(5): 2016-2019.
Iranzo, M., Canizares, J.V., Roca-Perez, L., Sainz-Pardo, I., Mormeneo, S. and Boluda, R. 2004. Characteristic of rice straw and sewage sludge as composting materials in Valencia (Spain). Bioresource Technology 95: 107-112.
Juhasz, T., Szengyel, Z., Reczey, K., Suka-Aho, M. and Viikari, L. 2005. Characterization of cellulase and hemicellulases produced by Trichoderma reesei on various carbon sources. Process Biochemistry 3519-3525.
Kalpana, S., Moorthi, S. and Kumari, S. 2013. Antimicrobial activity of different extracts of leaf of Moringa oleifera (Lam) against gram positive and gram negative bacteria. International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences 2(12): 514-518.
Kasana, R.C., Salwan, R., Dhar,H., Dutt, S. and Gulati, A. 2008. A rapid and easy method for the detection of microbial cellulases on agar plates using Gram's Iodine. Current Microbiology 57: 503-50.
Kim, J., Pitts, B., Stewart, P.S., Camper, A. and Yoon, J. 2008. Comparison of the antimicrobial effect of chlorine, silver ion, and tobramycin on biofilm. Antimicrobial Agents and Chemotherapy 52: 1446-1456.
Kleyn, J.G. and Wetzler, T.F. 1981. The microbiology of spent mushroom compost and its dust. Canadian Journal of Microbiology 27: 748-753.
Ko, H.G., Park, S.H., Kim S.H., Gu S.H. and Park W.M. 2005. Folia. Detection and recovery of hydrolytic enzymes from spent compost of four mushroom species. Folia Microbiology 50 (2): 103-106.
Lanschoot, P. and Mcnitt, A. 2014. Using spent mushroom substrate (mushroom soil) as a soil amendment to improve turf. Center for Turfgrass Science, penn State University. Available Sources: http://plantscience.psu. edu/ research/centers/turf/extension/factsheets/mushroom-soil. October 10, 2017.
Levanon, D. and Danai, O. 1955 Chemical, physical and microbiology considerations in recycling spent mushroom substrate. Compost Science & Utilization 3(1): 72-79.
Lu, W.J., Hong-Tao, W., Shi-Jian, Y., Zhi-Chao, W. and Yong-Feng, N. 2005. Isolation

and characterization of mesophilic cellulose-degrading bacteria from flower stalks-vegetable waste co-composting system. The Journal of General and Applied Microbiology 5: 353-360.

Maneechai, P. 2003. Screening of Antagonistic Bacteria against the Mushroom Green Mold Disease (Trichoderma spp.). Master of Science Thesis in Plant Pathology, Prince of Songkla University.

Manikandan, N., Surumbar Kuzhali, S. and Kumuthakalavalli, R. 2012. Decolorization of textile dye effluent using fungal microflora isolated from spent mushroom substrate (SMS). Journal of Microbiology and Biotechnology Research 2(1): 57-62.

Noble, R., Fermor, T.R., Lincoln, S., Dobrovin-Pennington, A., Evered, C. and Mead, A. 2003. Primodia initiation of mushroom (Agaricus bisporus) strains on axenic casing material. Mycologia 95: 620-629.

Ntougias, S., Zervakis, G.I., Kavroulakis, N., Ehaliotis, C. and Papadopoulou, K.K. 2004. Bacterial diversity in spent mushroom compost assessed by amplified rDNA restriction analysis and sequencing of cultivated isolates. Systematic and Applied Microbiology 27: 746-754.

Perkins, S. 2006. Discussion for using spent mushroom substrate. In : A report funded by Mushrooms International 103: 19-21.

Pointing, S.B. 1999. Qualitative methods for the determination of lignocellulolytic enzyme production by tropical fungi. Fungal Diversity 2: 17-33.

Rainey, P.B. 1991. Effect of Pseudomonas putida on hyphal growth of Agaricus bisporus. Mycological Research 95: 699-704.

Rainey, P.B. and Cole, A.L.J. 1987. Evidence for the involvement of plasmids in sporophore initiation and development in Agaricus bisporus, pp. 235-248. In Wuest, P.J., Royse, D.J. and Beelman R.B. eds. Developments in Crop Science Vol 10 (Proceedings of the International Symposium on Scientific and Technical Aspects of Cultivating Edible Fungi. Elsevier, Amsterdam, The Netherlands.

Rainey, P.B., Cole, A.L.J., Fermor, T.R. and Wood, D.A. 1990. A model system for examining involvement of bacteria in basidiome initiation of Agaricus bisporus. Mycological Research 94: 191-195.

Reategui, R.F., Gloer, J.B., Campbell, J. and Shearer, C.R. 2005. Ophiocerins A-D and ophioceric acid : tetrahydropyran derivatives and an africane sesquiterpenoid from the freshwater aquatic fungi Ophioceras venezuelence. Journal of Natural Products 68: 701-705.

Reddy, M.S. and Patrick, Z.A. 1990. Effect of bacteria associated with mushroom

compost and casing materials on basidiomata formation in Agaricus bisporus. Canadian Journal Plant Pathology 12: 236-242.

Rukachisirikul, V., Kaewbumrung, C., Phongpaichi, S. and Hajiwangoh, Z. 2005. Eudesmane sesquiterpenes from the aquatic fungus Beltrania rhombica. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 53: 238-240.

Saharan, B.S. and Nehra, V. 2011. Plant growth promoting rhizobacteria: A critical review. World Journal of Life Sciences and Medical Research 21: 1-30.

Sangkaew, P. 2007. Diversity of Freshwater Hyphomycetes in Sirindhorn Swamp Forest Ecoxystem, Narathiwat Province. Master of Science in Plant Pathology, Prince of Songkla University.

Schaad, N.W., Jones, J.B. and Chun, W. 2001. Laboratory Guide for Identification of Plant pathogenic Bacteria. The American Phytopatholgical Society, Minnesota.

Seephueak, P. 2012. Fungi Associated with Degradation of Rubber Wood Logs and Leaf Litter. Ph.D. Dissertation. Prince of Songkla University.

Spelhaug, S. and Harlander, S. 1989. Inhibition of food-borne pathogens by bacteriocins from Lactococcus lactis and Pediococcus pentosaceous. Journal of Food Protection 52: 856-862.

Stanojevic, O. 2016. Isolation and identification of Bacillus spp. from compost material, compost and mushroom casing soil active against Trichoderma spp. Archives of Biological Sciences 68: 845-852.

Synytsya, A., Mckova, K., Synytsya, A., Jablonsky, I., Spevacek, J., Erban, V., Kovarkova, E. and Copkova, J. 2009. Glucans from cultivate mushrooms Pleurotus ostreatus and Pleurotus eryngii: structure and potential prebiotic activity. Carbohydrate Polymer 76: 548-556.

Szmidt, P.A.K. 1994. Recycling of spent mushroom substrates by aerobic composting to produce novel horticultural substrates. Compost Science & Utilization 2(3): 63-72.

Taechapoempol, K., Sreethawong, T., Rangsunvigit, P., Namprohm, W., Thamprajamchit, B. and Rengpipat, S. 2010. Cellulase-producing bacteria from Thai higher termites: enzymatic activities and ionic liquid tolerance. Applied Biochemistry and Biotechnology 10: 1-16.

Taiwo, L.B. and Oso, B.A. 2004. Influence of composting techniques on microbial succession, temperature and pH in a composting municipal solid waste. African Journal of Biotechnology 95: 107-112.

Tsao, G. T. and Chiang, L. 1983. Cellulose and hemicellulos technology, pp. 296-326. In Smith, J.E., Berry, D.R. and Kristiansen, B. eds. The filamentous Fungi : Fungal Technology. New York : John Wiley & Sons Ins.

Viji, B., Sharma, S.R. and Lakhanpal, T.N. 2002. Role of thermophilic fungi in compost production for Agaricus bisporus. Journal of Plant Pathology and Microbiology 32: 204-210.

Watabe, M., Rao, J.R., Xu, J., Miller, B.C., Ward, J.E. and Moore, J.E. 2014. Identification of novel eubacteria from spent mushroom compost (SMC) waste by DNA sequence typing: ecological considerations of disposal on agricultural land. Waste Management 24: 81-86.

Wiegant, J.M. 1992. Ecological consideration involved in commercial development of biological control agents of soil-borne disease, pp. 525-546. In Van Elsas, J.D., Trevors, J.T. and Wellington, E.M.H. eds. Modern Soil Microbiology. NewYork. Marcel Dekker.

Williams, B.C., McMullan, J.T. and McCahey, S. 2001. An initial assessment of spent mushroom compost as a potential energy feedstock. Bioresource. Technology 79(3): 227-230.

Woulters J.M., Spaan, S., Douwes, J., Doekes, G. and Heederik, D. 2005. Overview of personal occupational exposure levels to inhale dust, endotoxin, B(1-3) glucan and fungal extracellular polysaccharides in the waste management chain. The Annals of Occupational Hygiene 47: 1-15.

Xu, J., and Yang, Q. 2010. Isolation and characterization of rice straw degrading Streptomyces griseorubens C-5. Biodegradation 21: 107-116.

Young, L.S., Chu, J.N., Hameed, A. and Young, C.C. 2013. Cultivable mushroom growth-promoting bacteria and their impact on Agaricus blazei productivity. Pesquisa Agropecuária Brasileira 48: 636-644.

Zarenejad, F., Yakhchail, B. and Rasooli, I. 2012. Evaluation of indigenous potent mushroom growth promoting bacteria (MGPB) on Agaricus bisporus production. Journal of Microbiology and Biotechnology 28: 99-104.