

ประสิทธิภาพของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ในการควบคุมเชื้อรา *Trichoderma atroviride* และ *Trichoderma longibrachiatum* สาเหตุของโรคราเขียวในเห็ดนางฟ้าภูฐาน (*Pleurotus pulmonarius*)

Efficacy of *Bacillus tequilensis* S3.1 to control fungal *Trichoderma atroviride* and *Trichoderma longibrachiatum* caused green mold disease in phoenix oyster mushroom (*Pleurotus pulmonarius*)

เจนจิรา เดชรักษา^{1*} และ ปาริสีชชา แสงสุวรรณ¹

Janejira Detraksa^{1*} and Parisatcha Sangsuwan¹

Received: 15 October 2024 ; Revised: 8 January 2025 ; Accepted: 25 April 2025

บทคัดย่อ

Trichoderma spp. เป็นสาเหตุของโรคราเขียวในเห็ดนางฟ้าภูฐาน การควบคุมโรคด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นการควบคุมโดยชีววิธีที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และเป็นมิตรต่อสิ่งแวดล้อม งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. และทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราเขียวระดับโรงเรือน โดยสามารถแยก *Trichoderma* spp. จากก้อนเชื้อเห็ดที่เป็นโรคได้ 3 ไอโซเลต เมื่อจำแนกชนิดโดยการวิเคราะห์ลำดับ นิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS พบว่าคือ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 ทำการแยกแบคทีเรีย *Bacillus* spp. จากก้อนเชื้อเห็ดได้ 20 ไอโซเลต จากนั้นทดสอบการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. ด้วยวิธี dual culture พบว่า *Bacillus* sp. S3.1 ยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 ได้สูงที่สุดเท่ากับร้อยละ 63.01, 55.99 และ 53.96 ตามลำดับ *Bacillus* sp. S3.1 สามารถสร้างสารระเหยที่สามารถยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้ เมื่อจำแนกชนิดโดยวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ 16s rDNA พบว่าคือ *Bacillus tequilensis* จากนั้นทดสอบประสิทธิภาพการควบคุมเชื้อราบนก้อนเชื้อเห็ดในระยะบ่มเส้นใยและระยะเปิดดอกในโรงเรือน พบว่าชุดการทดลองที่มี *Bacillus tequilensis* S3.1 ร่วมกับ *Trichoderma* sp. มีค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำกว่าในชุดการทดลองที่มีเชื้อราเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และให้ผลผลิตไม่แตกต่างจากชุดควบคุมที่ไม่เป็นโรค จากผลการทดสอบทั้งหมดแสดงให้เห็นว่า *Bacillus tequilensis* S3.1 สามารถควบคุมโรคราเขียวและลดการสูญเสียผลผลิต สามารถพัฒนาเป็นชีวภัณฑ์สำหรับควบคุมโรคราเขียวในเห็ดนางฟ้าภูฐานต่อไป

คำสำคัญ: แบคทีเรียปฏิปักษ์, การควบคุมโดยชีววิธี, โรคราเขียว, เห็ดนางฟ้าภูฐาน

Abstract

Trichoderma spp. are important causative agents of green mold disease in the production of phoenix oyster mushroom. Disease control using antagonistic bacteria is one of the biological control methods that is safe for humans and environmentally friendly. This research aimed to screen antagonistic bacteria against *Trichoderma* spp. and investigate the efficiency of these bacteria in controlling *Trichoderma* spp. in the greenhouse. The three fungal isolates were isolated from infected cultivating bag samples. Based on morphological characteristics and sequence analysis of the ITS region, the results showed that they were identified as *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3, and *Trichoderma longibrachiatum* GM4. Twenty isolates of *Bacillus* spp. were isolated and screened for their ability to control the pathogenic fungi. In dual culture testing, *Bacillus* sp. S3.1 exhibited the highest efficacy to inhibit the growth of *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3, and *Trichoderma longibrachiatum*

¹ สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเทพสตรี, ลพบุรี

¹ Biology Program, Faculty of Science and technology, Thepsatri Rajabhat University, Lopburi

* Corresponding author, e-mail : janejira.d@lawasri.tru.ac.th

GM4 by 63.01%, 55.99%, and 53.96, respectively. The volatile organic compounds (VOCs) production analysis of *Bacillus* sp. S3.1 showed the inhibition of the growth and sporulation of the tested fungi. Based on 16S rDNA gene analysis, isolate S3.1 was identified as *Bacillus tequilensis*. *In vivo* experiments, the spawning and cropping stages, all antagonist treatments reduced the disease incidence compared to the single pathogen treatments. In addition, the mushroom yields of antagonist treatments were not significantly different from those of uninfected treatments. This antagonist isolate could reduce the incidence of green mold disease and decrease the loss of fresh mushroom production. This study suggests *Bacillus tequilensis* S3.1 is a promising biocontrol agent and could be developed as a biological fungicide for oyster mushroom production.

Keywords: Antagonistic bacteria, Biological control, Green mold disease, Phoenix oyster mushroom

บทนำ

เห็ดนางฟ้าภูฐาน (phoenix oyster mushroom; *Pleurotus pulmonarius*) เป็นเห็ดเศรษฐกิจที่สามารถเพาะได้ง่าย มีอายุการพักเชื้อสั้นและให้ผลผลิตที่ดีในสภาพอากาศในประเทศไทยได้ตลอดทั้งปี การเพาะเห็ดนางฟ้าภูฐานนิยมเพาะในถุงพลาสติกและวางในโรงเรือน ปัญหาสำคัญของการเพาะเห็ดในถุงพลาสติกคือ เชื้อราที่ทำลายก้อนเชื้อเห็ด โดยเฉพาะโรคราเขียวที่มีสาเหตุจาก *Trichoderma* spp. ซึ่งเส้นใยของเชื้อราชนิดนี้สามารถเจริญแข่งขันกับเส้นใยของเห็ด ส่งผลให้ผลผลิตดอกเห็ดลดลงร้อยละ 30-50 (Kumar & Sarathi, 2017) สายพันธุ์ของ *Trichoderma* spp. ที่พบว่าปนเปื้อนในก้อนเชื้อเห็ด เช่น *Trichoderma atroviride*, *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma pleurotum* และ *Trichoderma pleuroticola* เป็นต้น (Cao *et al.*, 2024; Qiu *et al.*, 2017) โดยในช่วงแรก *Trichoderma* spp. สร้างเส้นใยสีขาวอัดแน่นที่มีลักษณะเหมือนกับเส้นใยของเห็ด ทำให้แยกออกจากเส้นใยเห็ดได้ยาก จากนั้นจะสร้างปอร์สีย่อยจำนวนมากเกิดเป็นบริเวณสีเขียวยาว เชื้อราจะเข้าทำลายวัสดุเพาะเห็ดอย่างรวดเร็ว สร้างเอนไซม์ย่อยสลายเส้นใยเห็ด ทำให้เห็ดไม่สามารถออกดอกได้ และทำให้เกิดจุดสีน้ำตาลบนดอกเห็ดอีกด้วย (Shah *et al.*, 2013; Sasic Zoric *et al.*, 2023) การกำจัดก้อนเห็ดที่เป็นโรคและการทำความสะอาดโรงเรือนเป็นวิธีการป้องกันและกำจัดโรคเชื้อราเขียวที่ยังไม่มีประสิทธิภาพมากนัก สารเคมีที่ใช้ในการป้องกันและกำจัดโรค เช่น thiophanate-methyl, carbendazim, prochloraz, hexaconazole, metrafenone และ tebuconazole เป็นต้น (Zeng *et al.*, 2022) ซึ่งการใช้สารเคมีกำจัดเชื้อราเป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ แต่หากใช้ในความเข้มข้นสูง จะส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยและการพัฒนาเป็นดอกเห็ด (Potocnik *et al.*, 2019)

ในปัจจุบันมีการศึกษาการควบคุมโรคในเห็ดเศรษฐกิจโดยชีววิธี (biological control) เช่น สารสกัดจากพืช จุลินทรีย์ปฏิปักษ์หรือสารเมแทบอลิซึมจากจุลินทรีย์ เป็นต้น การควบคุม

โดยชีววิธีถือเป็นวิธีที่ปลอดภัยต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อม เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีควบคุมโรคในเห็ด โดยเฉพาะจุลินทรีย์ปฏิปักษ์มีกลไกการควบคุมเชื้อรา ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะ การแก่งแย่งอาหาร พื้นที่อาศัย และกระบวนการเป็นปรสิต โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ผลิตในทางการค้าเป็นแบคทีเรียในสกุล *Bacillus* และ *Pseudomonas* (Stanojevic *et al.*, 2016) *Bacillus* spp. เป็นแบคทีเรียที่มีความสามารถแข่งขันกับจุลินทรีย์อื่นได้สูง สามารถผลิตสารเมแทบอลิซึมได้หลายชนิด เช่น สารปฏิชีวนะ แบคเทอริโอซิน สารประกอบอินทรีย์ระเหย (volatile organic compounds: VOCs) เอนไซม์ย่อยสลายผนังเซลล์ (chitinase, galactanase, isoamylase) ไซเดอร์โอฟอร์ (siderophores) และสารประเภท lipopeptide เป็นต้น (Calvo *et al.*, 2020) โดยเฉพาะสารประเภท lipopeptide เช่น iturin, fengycin และ surfactin เป็นต้น สามารถต่อต้านเชื้อราก่อโรคพืชหลายชนิด เช่น *Rhizoctonia solani*, *Pythium ultimum*, *Botrytis cinerea*, *Podosphaera fusca*, *Fusarium graminearum* (Li *et al.*, 2016) ทำให้ *Bacillus* spp. มีศักยภาพในการควบคุมโรคพืชจากเชื้อราได้ดี ปัจจุบัน *Bacillus* spp. เป็นจุลินทรีย์ที่ได้รับความนิยมในการผลิตเป็นชีวภัณฑ์ทางการค้า เนื่องจากสามารถสร้างเอนโดสปอร์ (endospore) ที่ช่วยให้มีชีวิตรอดในระบอบนิเวศและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้ จึงทำให้ชีวภัณฑ์จาก *Bacillus* spp. มีอายุการเก็บรักษาที่ยาวนาน นอกจากนี้ *Bacillus* spp. หลายสายพันธุ์ยังคงปลอดภัยต่อสิ่งแวดล้อม ไม่เป็นอันตรายต่อสุขภาพของมนุษย์ และโดยทั่วไปได้รับการยอมรับว่าปลอดภัย (GRAS) (Potocnik *et al.*, 2019) มีรายงานการศึกษา *Bacillus amyloliquefaciens*, *Bacillus licheniformis* และ *Bacillus subtilis* ในการควบคุมเชื้อรา *Trichoderma* spp. ในเห็ดตระกูลนางรมและเห็ดกระดุม (Mwangi *et al.*, 2017; Roberti *et al.*, 2019; Stanojevic *et al.*, 2016) การใช้เซลล์แขวนลอยของผงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. PB6 พ่นในก้อนวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้าภูฐานสามารถลดการเกิดโรคราดำได้ร้อยละ

ละ 76.83 (Yenjit & Intana, 2016) ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. สาเหตุของโรคโรคราเขียวจากก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน คัดแยก *Bacillus* spp. ที่สามารถยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* spp. และศึกษาประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. สายพันธุ์ปฏิบัติการในการควบคุมโรคโรคราเขียวของเห็ดนางฟ้าภูฐานในระดับโรงเรือน

การทดลอง

การแยกเชื้อราเขียวจากก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน

เก็บตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานที่เป็นโรคราเขียวจากโรงเพาะเห็ดกลุ่มวิสาหกิจชุมชนเกษตรพร้อมใจบ้านโพธิ์พร้อมจิต ตำบลธารเกษม อำเภอพระพุทธรบาท จังหวัดสระบุรี ทำการแยกเชื้อราโดยวิธี dilution pour plate บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar (PDA) (HiMedia, India) บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-7 วัน คัดแยกเชื้อราโคโลนีสีเขียวมาทำเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเส้นใยและสปอร์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ นำตัวอย่างเชื้อราที่แยกได้ส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen Inc. ประเทศเกาหลี โดยใช้ primer ITS4 และ ITS5 จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ The National Center for Biotechnology Information (NCBI) ด้วยโปรแกรม BLAST และสร้าง Phylogenetic tree ด้วยโปรแกรม MEGA11 โดยวิธี Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

การแยก *Bacillus* spp. จากก้อนเชื้อเห็ด

แยก *Bacillus* spp. จากก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานด้วยวิธี dilution pour plate โดยนำวัสดุเพาะในก้อนเชื้อเห็ด 10 กรัม เจือจางในสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 ปริมาตร 90 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที ทำเจือจางแบบ serial dilution และเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar (NA) (HiMedia, India) บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เลือกลโคไลที่เรียบมาทำเชื้อบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยาใต้กล้องจุลทรรศน์ด้วยการย้อมแกรม ศึกษาการสร้างเอนโดสปอร์ โดยการย้อมด้วย malachite green ทดสอบการสร้างเอนไซม์คะตะเลส (catalase) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ความเข้มข้นร้อยละ 3

ศึกษาการจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* spp. ที่แยกได้โดยส่งไปวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์ที่บริษัท MacroGen Inc. ประเทศเกาหลี โดยใช้ primer 27F และ 1492R จากนั้นนำลำดับนิวคลีโอไทด์ที่ได้ไปเปรียบเทียบกับความเหมือนกับฐานข้อมูล GenBank บนเว็บไซต์ NCBI ด้วยโปรแกรม BLAST และสร้าง Phylogenetic tree โดยใช้โปรแกรม MEGA11 โดยวิธี Neighbor-joining และ Bootstrap จำนวน 1,000 ซ้ำ

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการยับยั้งเชื้อราเขียวในระดับห้องปฏิบัติการ

การทดสอบการยับยั้งเชื้อราด้วยวิธี dual culture โดยนำโคโลนีของ *Bacillus* spp. มาขีดเป็นเส้นตรงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA โดยมีระยะห่างจากขอบจานเพาะเชื้อ 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นตัดปลายเส้นใยเชื้อราอายุ 7 วันด้วย cork-borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ในแนวตรงข้ามกับแบคทีเรีย โดยมีระยะห่างจากขอบจานเลี้ยงเชื้อ 2.5 เซนติเมตร บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 7 วัน ในขณะที่ชุดควบคุมมีเชื้อราเพียงอย่างเดียว ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ วัดขนาดของรัศมีโคโลนีเชื้อราและคำนวณร้อยละการยับยั้งการเจริญ (percent inhibition of radial growth: PIRG) จากสูตร $R1 - R2/R1 \times 100$ เมื่อ $R1$ = รัศมีของเชื้อราในชุดควบคุม และ $R2$ = รัศมีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* spp.

การทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหย

เตรียมเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* spp. โดยเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient Broth (HiMedia, India) บ่มที่อุณหภูมิห้องบนเครื่องเขย่าความเร็ว 180 รอบต่อนาที (rpm) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที แยกส่วนตะกอนเซลล์ไปละลายในสารละลาย NaCl เข้มข้นร้อยละ 0.85 และปรับให้มีความเข้มข้น 1×10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยโดยวิธี double petri-dish assay (Calvo *et al.*, 2020) โดยเปิดเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* spp. 20 ไมโครลิตร เกลี่ยบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตัดปลายเส้นใยเชื้อราอายุ 7 วันด้วย cork-borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA อีกจานหนึ่ง จากนั้นนำจานเลี้ยงเชื้อ *Bacillus* spp. และเชื้อรามารวมกันแล้วพ่นด้วยพาราฟิล์มให้แน่น ทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ บ่มที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส เป็นเวลา

7 วัน จากนั้นวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของโคโลนีเชื้อราในแต่ละชุดการทดสอบ เปรียบเทียบกับชุดควบคุม และคำนวณหาร้อยละการยับยั้งการเจริญของเชื้อราจากสูตร จากสูตร $R1 - R2/R1 \times 100$ เมื่อ $R1$ = รัศมีของเชื้อราในชุดควบคุม และ $R2$ = รัศมีของเชื้อราที่เพาะเลี้ยงร่วมกับ *Bacillus* spp.

การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของ *Bacillus* sp. ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดในก้อนเชื้อเห็ด

นำก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ฆ่าเชื้อแล้วมาหยอดหัวเชื้อเห็ดในเมล็ดข้าวฟ่างและบ่มไว้เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นเปิดกระดาดที่ปิดบริเวณปากถุงออก เติมเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* spp. ปริมาตร 5 มิลลิลิตรบริเวณปากถุงด้วยไซริง (syringe) ปราศจากเชื้อ บ่มก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 วัน สังเกตการเจริญของเส้นใยเห็ดในก้อนเชื้อ

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราเขียวในระดับโรงเรือน

การเตรียมก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานที่ใช้ในการทดสอบ โดยในงานวิจัยนี้ นำก้อนเชื้อเห็ดที่ผลิตจากกลุ่มวิสาหกิจชุมชนเกษตรพร้อมใจบ้านโพธิ์พร้อมจิต ตำบลธารเกษม อำเภอพระพุทธรบาท จังหวัดสระบุรี โดยมีส่วนผสมได้แก่ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา 100 กิโลกรัม รำข้าว 6 กิโลกรัม โดโลไมท์ 2 กิโลกรัม แปะข้าวเหนียว 1 กิโลกรัม และยิปซัม 2 กิโลกรัม นำส่วนผสมทั้งหมดคลุกเคล้าให้เข้ากัน เครื่องผสม เติมน้ำจนให้มีความชื้นประมาณร้อยละ 60 (สังเกตจากการใช้มือกำขี้เลื่อยขึ้นมาบีบจนแห้ง โดยที่ขี้เลื่อยรวมกันเป็นก้อนแล้วแตกออก) จากนั้นบรรจุในถุงพลาสติกน้ำหนัก 900 กรัมต่อถุง เมื่ออัดก้อนแน่นดีแล้ว ใส่คอขวดพลาสติก อุดด้วยสำลี ปิดด้วยกระดาษ และรัดยางให้แน่น ทำการฆ่าเชื้อก้อนวัสดุเพาะเห็ดในถังึ่ง เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมงหลังน้ำเดือดทิ้งให้ก้อนวัสดุเพาะเย็นลง จากนั้นเติมหัวเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานในเมล็ดข้าวฟ่างลงในก้อนเชื้อ ปิดปากถุงด้วยสำลีและกระดาษ และทำการบ่มก้อนวัสดุเพาะเห็ดต่อไป

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* spp. ในการควบคุมโรคราเขียวในระยะบ่มเส้นใย

หลังจากหยอดหัวเชื้อเห็ดเมล็ดข้าวฟ่างลงในก้อนเชื้อเห็ดและบ่มไว้เป็นเวลา 7 วันแล้ว ใช้ไซริงขนาด 5 มิลลิลิตร เติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเขียว (1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) ปริมาตร 3 มิลลิลิตรลงบริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ด จากนั้นใช้ไซริงเติมเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* spp. 5 มิลลิลิตรลงในถุง วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (Completely

randomized design; CRD) ชุดทดลอง (treatment) ละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ก้อน บ่มก้อนเห็ดที่อุณหภูมิห้องต่ออีก 21 วัน ประเมินพื้นที่การเกิดโรคโดยให้คะแนน 0 ถึง 5 (Rassami *et al.*, 2020) คะแนน 0 คือ ไม่เกิดโรค คะแนน 1 คือ พื้นที่เกิดโรคร้อยละ 1-20 คะแนน 2 คือ พื้นที่เกิดโรคร้อยละ 21-40 คะแนน 3 คือ พื้นที่เกิดโรคร้อยละ 41-60 คะแนน 4 คือ พื้นที่เกิดโรคร้อยละ 61-80 และคะแนน 5 คือ พื้นที่เกิดโรคร้อยละ 81-100 และคำนวณหาร้อยละดัชนีการเกิดโรค (Disease Severity Index; % DSI) ในแต่ละชุดการทดลองโดยใช้สูตรดังนี้ (Tummarattanapong *et al.*, 2021)

$$\% DSI = \sum \left(\frac{Ni \times Vi}{N \times V} \right) \times 100$$

เมื่อ Ni คือ จำนวนก้อนเชื้อเห็ดที่เกิดโรคในแต่ละระดับคะแนน

Vi คือ ระดับคะแนนต่าง ๆ (0, 1, 2, 3, 4, 5)

N คือ จำนวนก้อนเชื้อทั้งหมด

V คือ ระดับคะแนนสูงสุด

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus* sp. ในการควบคุมเชื้อราเขียวในระยะเปิดดอก

หลังการเติมหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟ่างและบ่มก้อนเชื้อเห็ดเป็นเวลา 30 วัน เป็นระยะเปิดดอก ใช้ไซริงเติมสปอร์แขวนลอยของเชื้อราเขียว (1×10^5 สปอร์ต่อมิลลิลิตร) 3 มิลลิลิตรลงบริเวณปากถุง จากนั้นเติมเซลล์แขวนลอยของ *Bacillus* spp. 5 มิลลิลิตร วางแผนการทดลองแบบ CRD ชุดทดลองละ 3 ซ้ำ ๆ ละ 10 ก้อน นำก้อนเห็ดวางในโรงเรือน ฉีดพ่นละอองน้ำช่วงเวลาเช้าและเย็น บันทึกน้ำหนักสดของผลผลิตต่อก้อนเชื้อเห็ด และการเกิดโรคบนก้อนเชื้อเห็ดหลังการเปิดดอกวันที่ 30 และคำนวณหาร้อยละดัชนีการเกิดโรค

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

นำค่าเฉลี่ยแต่ละการทดลองมาวิเคราะห์ค่า ความแตกต่างทางสถิติด้วยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ โดยใช้ โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS)

ผลการทดลอง

การแยกเชื้อราเขียวจากก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐาน

ผลการนำตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดที่เป็นโรคราเขียวมาแยกเชื้อราโดยวิธี dilution pour plate พบว่าสามารถแยกเชื้อราที่มีเส้นใยสีขาวและสร้างสปอร์สีเขียวได้ 3 ไอโซเลต ได้แก่

BM1.2, GM3 และ GM4 โดยโคโลนีของไอโซเลต BM2.1 มีสปอร์อัดแน่นเป็นเม็ดมีสีเขียวสลับกับสีขาวเป็นวงซ้อนกัน ส่วนโคโลนีของ GM3 และ GM4 กลุ่มของสปอร์อัดแน่นจากบริเวณกลางโคโลนีมีสีเขียวอ่อนถึงสีเขียวเข้ม ผลการจำแนกชนิดของเชื้อราด้วยวิธีการทางลักษณะสัณฐานวิทยา พบว่าเส้นใยระยะแรกมีสีขาว มีลักษณะเรียบและเปลี่ยนเป็นสีเขียวเมื่ออายุมากขึ้น เส้นใยมีผนังกัน โคโคนิดี (conidia) มีรูปร่างค่อนข้างกลม สีเขียวใส ฟูอะไลด์ (phialides) แตกกิ่งก้านคล้ายเขาสัตว์ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างทางจุลภาคกับ Barnett and Hunter (1972) สามารถบ่งชี้ว่าเชื้อราดังกล่าวจัดอยู่ในสกุล *Trichoderma* เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของเชื้อราโดยการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ internal transcribed spacer (ITS) ของเชื้อรา 3 ไอโซเลตไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูล NCBI โดยโปรแกรม BLAST พบว่าไอโซเลต BM1.2 มีความคล้ายคลึงกับ *Trichoderma atroviride* โดยมีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) เท่ากับร้อยละ 100 ส่วน ไอโซเลต GM3 และ GM4 มีความคล้ายคลึงกับ *Trichoderma*

longibrachiatum โดยมีค่าร้อยละความเหมือนเท่ากับร้อยละ 100.00 และ 99.50 ตามลำดับ เมื่อแสดงแผนภาพ Phylogenetic tree ด้วยวิธี Neighbor-joining (Figure 1) พบว่าไอโซเลต BM1.2 สามารถระบุได้เป็น *Trichoderma atroviride* และไอโซเลต GM3 และ GM4 สามารถระบุได้เป็น *Trichoderma longibrachiatum*

การแยก *Bacillus* spp. จากก้อนเชื้อเห็ด

จากการแยกแบคทีเรียจากตัวอย่างก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานโดยวิธี dilution pour plate สามารถคัดแยกแบคทีเรียแกรมบวก รูปร่างท่อน และสร้างเอนโด-สปอร์ในสภาวะที่มีอากาศได้ทั้งหมด 20 ไอโซเลต โดยเอนโดสปอร์มีรูปร่างกลมรี เมื่อทำการทดสอบการสร้างเอนไซม์อะไมเลส พบว่าทุกไอโซเลตสามารถสร้างเอนไซม์อะไมเลสได้ ซึ่งจากคุณสมบัติทั้งหมดดังกล่าวแบคทีเรียที่แยกได้ทั้งหมดจัดอยู่ในสกุล *Bacillus* (Al-Dhabaan, 2019; Holt *et al.*, 1994)

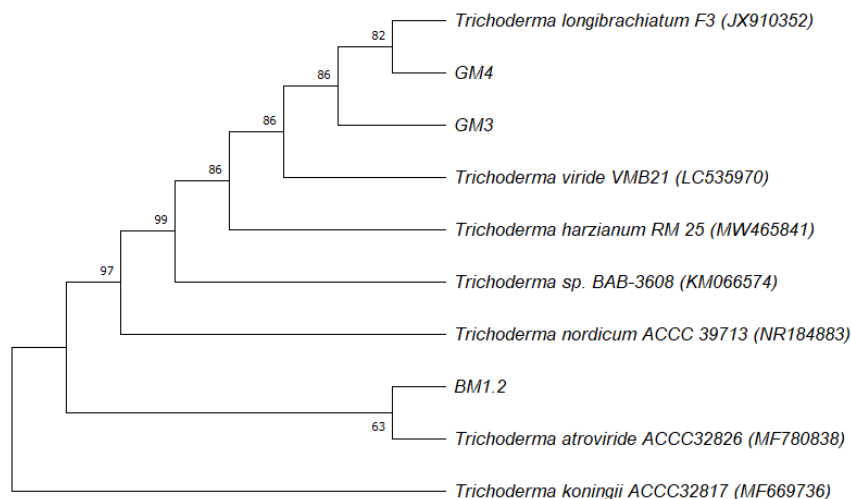


Figure 1 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Trichoderma* isolate BM1.2, GM3 and GM4 based on ITS region sequence analysis.

จากนั้นนำ *Bacillus* spp. ที่แยกได้ทั้งหมดไปทดสอบการยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 โดยวิธี dual culture บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ผลการทดสอบพบว่ามี *Bacillus* spp. เพียง 3 ไอโซเลต คือ B1, S1.4 และ S3.1 ที่พบบริเวณใสบยับยั้งการเจริญระหว่างเชื้อราและแบคทีเรีย ซึ่งแสดงถึงความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ

เชื้อรา โดย *Bacillus* sp. S3.1 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราทั้ง 3 ชนิดได้สูงที่สุด โดยมีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma atroviride* BM1.2 เท่ากับร้อยละ 63.01 และยับยั้ง *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ GM4 เท่ากับร้อยละ 55.99 และ 53.96 ตามลำดับ (Figure 2 และ Figure 3) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงเลือก *Bacillus* sp. S3.1 ไปทำการทดลองในขั้นตอนต่อไป

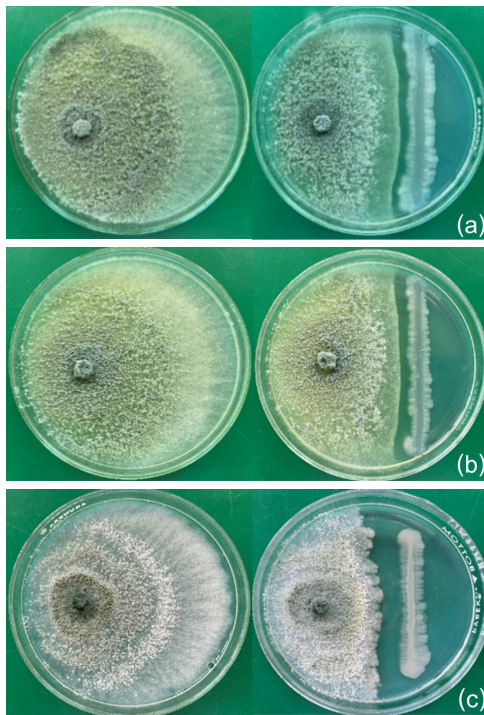
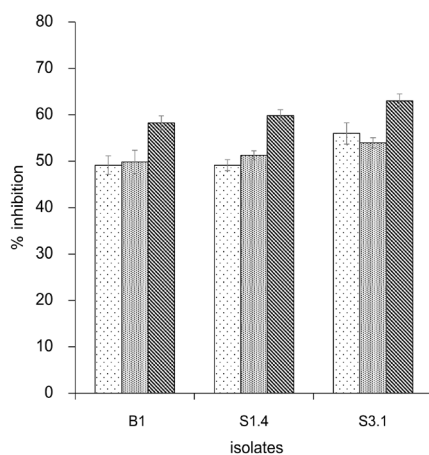


Figure 2 Dual culture assay of *Bacillus* sp. S3.1 against: (a) *Trichoderma longibrachiatum* GM3; (b) *Trichoderma longibrachiatum* GM4; (c) *Trichoderma atroviride* BM1.2 (right) in comparison to controls (left).



□ *T. longibrachiatum* GM3 ▒ *T. longibrachiatum* GM4 ▨ *T. atroviride* BM1.2

Figure 3 Antagonistic activities against *Trichoderma longibrachiatum* GM3 and GM4, *Trichoderma atroviride* BM1.2 of the *Bacillus* sp. isolate B1, S1.4 and S3.1.

การทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหย

จากการทดสอบการสร้างสารประกอบอินทรีย์ระเหยของ *Bacillus* sp. S3.1 ต่อการยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *T. longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 พบว่าโคโลนีของเชื้อราที่มีขนาดเล็กกว่าชุดควบคุม เส้นใยเจริญบางและไม่สร้างสปอร์สีเขียว (Figure 4) โดย *Bacillus* sp. S3.1 สามารถยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 เท่ากับร้อยละ 33.62 ± 1.79 , 13.56 ± 0.38 และ 11.62 ± 1.66 ตามลำดับ จากการทดสอบชี้ให้เห็นว่า *Bacillus* sp. S3.1 สามารถสร้างสารอินทรีย์ระเหยยับยั้งการเจริญและการสร้างสปอร์ของเชื้อราได้

การจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* sp. S3.1

ผลการศึกษาลักษณะโคโลนีของ *Bacillus* sp. S3.1 พบว่าโคโลนีมีรูปร่างกลม ขอบเรียบ แบนราบกับอาหาร มีสีขาวยุ่นและผิวหน้าทึบแสง จากการนำลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ 16S rDNA ของ *Bacillus* sp. S3.1 ไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลออนไลน์ NCBI โดยโปรแกรม BLAST *Bacillus* sp. S3.1 มีค่าร้อยละความเหมือน (% similarity) มากกว่าร้อยละ 99 กับ *Bacillus* หลายสายพันธุ์ เช่น *B. subtilis* ELBS012, *Bacillus tequilensis* TN147 และ *Bacillus inaquosorum* T1 เป็นต้น โดยค่าความเหมือนเท่ากับร้อยละ 99.80, 99.73 และ 99.87 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจาก Phylogenetic tree มีความใกล้เคียงกับ *Bacillus tequilensis* TN147 (Figure 5)

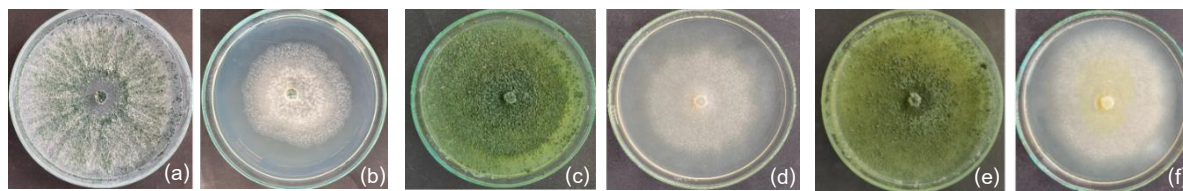


Figure 4 Effect of VOCs of *Bacillus* sp. S3.1 on the growth of *Trichoderma atroviride* BM1.2 (b), *Trichoderma longibrachiatum* GM3 (d), and *Trichoderma longibrachiatum* GM4 (f) in comparison to controls (a, c and e) after 7 days of incubation.

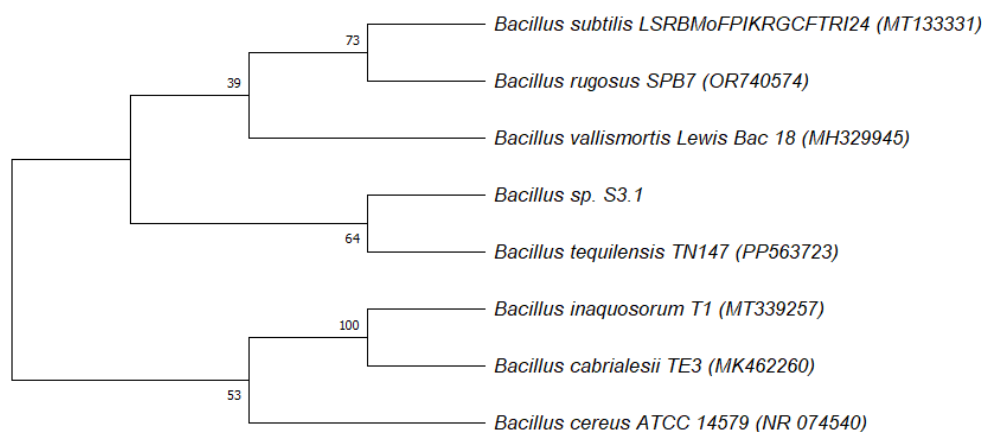


Figure 5 Neighbor-joining phylogenetic tree of *Bacillus* sp. S3.1 based on 16S rDNA sequences analysis.

การทดสอบปฏิสัมพันธ์ของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ต่อการเจริญของเห็ดนางฟ้าภูฐานในก้อนเชื้อเห็ด

ทำการทดสอบการเจริญร่วมกันของ *Bacillus tequilensis* S3.1 กับเส้นใยของเห็ด โดยการเติมเซลล์แขวนลอย *Bacillus tequilensis* S3.1 ลงในก้อนเชื้อที่มีการหยอดหัวเชื้อเห็ดแล้วเป็นเวลา 7 วัน จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิห้องต่อจนครบ 30 วัน พบว่าชุดการทดลองที่มีเติม *Bacillus tequilensis* S3.1 มีเส้นใยเห็ดมีสีขาวเจริญจนถึงด้านล่างของถุงก้อนเชื้อเห็ด และมีเม็ดเส้นใยสีขาวกระจายเต็มถุง ในขณะที่ชุดควบคุมที่เติมน้ำกลั่นเส้นใยเห็ดมีการเจริญประมาณร้อยละ 80 ของพื้นที่ถุงก้อนเชื้อ แสดงให้เห็นว่า *Bacillus tequilensis* S3.1 ไม่ขัดขวางการเจริญของเส้นใยเห็ด

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ต่อการควบคุมโรคราเขียวของเห็ดในระยะบ่มเส้นใย

ผลการเติมเซลล์แขวนลอยของ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 บริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ด และเติมเซลล์แขวนลอย *Bacillus tequilensis* S3.1 บ่มก้อนเชื้อเป็นเวลา 30 วัน พบว่าในชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อราพบว่าบริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ดที่มีหัวเชื้อเมล็ดข้าว

ฟางจะมีเส้นใยสีขาวเจริญกระจายสม่ำเสมอ เส้นใยเจริญลงไปถึงก้นถุง ส่วนในชุดการทดลองที่เติมเชื้อราอย่างเดียวยังพบว่ามีเส้นใยสีเขียวเจริญที่ปากถุงของก้อนเชื้อบริเวณที่มีหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟาง บริเวณคอพลาสติกที่สวมปากถุง และบริเวณไหล่ของก้อนเชื้อ (Figure 6) ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีการเติม *Bacillus tequilensis* S3.1 ร่วมกับ *Trichoderma* sp. ทั้ง 3 ชนิดพบว่าก้อนเชื้อเห็ดมีเส้นใยสีเขียวเจริญบริเวณปากถุงของก้อนเชื้อเท่านั้น โดยเฉพาะบริเวณหัวเชื้อเมล็ดข้าวฟาง

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพการควบคุม *Trichoderma* sp. ของ *Bacillus tequilensis* S3.1 (Table 1) พบว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อ *Bacillus tequilensis* S3.1 ร่วมกับ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 มีค่าดัชนีการเกิดโรคในช่วงร้อยละ 30.00 - 41.67 ในขณะที่ชุดการทดลองที่มีเชื้อราอย่างเดียวยังมีค่าดัชนีการเกิดโรคในช่วงร้อยละ 58.33 - 63.33 ซึ่ง *Bacillus tequilensis* S3.1 ทำให้ค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีเชื้อราเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงถึงความสามารถของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ในการควบคุม *Trichoderma* sp. ทั้งสามชนิดในระยะบ่มเส้นใยได้

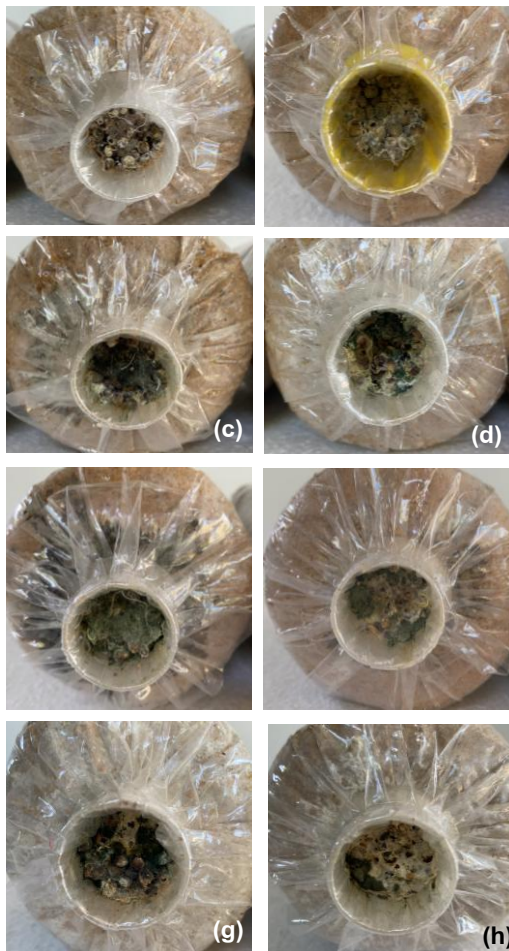


Figure 6 Effect of *Bacillus tequilensis* S3.1 on controlling *Trichoderma* sp. in the spawning stage; control (a), *Bacillus tequilensis* S3.1 (b), *Trichoderma longibrachiatum* GM3 (c), *Trichoderma longibrachiatum* GM3 + *Bacillus tequilensis* S3.1 (d), *Trichoderma longibrachiatum* GM4 (e), *Trichoderma longibrachiatum* GM4 + *Bacillus tequilensis* S3.1 (f), *Trichoderma atroviride* BM1.2 (g), and *Trichoderma atroviride* BM1.2 + *Bacillus tequilensis* S3.1 (h).

Table 1 The effects of *Bacillus tequilensis* S3.1 on controlling *Trichoderma* sp. of phoenix oyster mushrooms in the spawning stage.

Treatments	Disease Severity Index (%) *
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM3	60.00 ± 8.66 ^{***}
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM3 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	41.67 ± 5.77 ^b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM4	63.33 ± 12.58 ^a
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM4 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	30.00 ± 5.00 ^b
<i>Trichoderma atroviride</i> BM1.2	58.33 ± 7.64 ^a
<i>Trichoderma atroviride</i> BM1.2 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	31.67 ± 2.88 ^b
<i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	0.00 ^c
Untreated	0.00 ^c

* Data are means ± standard deviations (SD) of five replicates

** Values with different letters within the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ต่อการควบคุมโรคราเขียวของเห็ดในระยะเปิดดอก

ผลการทดสอบพบว่าในชุดการทดลองที่มีการเติมเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 3 ชนิด พบว่าบริเวณปากถุงของก้อนเห็ดมีเส้นใยสีขาวนวลหรือเหลืองอ่อนกระจายทั่วถุง และมีบริเวณสีเขียวกระจายอยู่บริเวณปากถุงและไหล่ของก้อนเชื้อราสามารถสังเกตเห็นรอยโรคสีเขียวได้หลังวันที่ 20 ของการบ่มก้อน ทั้งนี้ในช่วงแรกของการเจริญเส้นใยเชื้อรา *Trichoderma* sp. จะมีสีขาวเหมือนกับเส้นใยของเห็ดทำให้ไม่สามารถสังเกตเห็นความแตกต่างได้ เมื่อรอยโรคสีเขียวปรากฏขึ้นทำให้ดอกเห็ดที่เกิดขึ้นมามีขนาดเล็ก มีอาการเน่า หรือบางถุงไม่มีดอกเห็ดเกิดขึ้นมา

ผลการศึกษาพบว่าชุดการทดลองที่เติม *Bacillus tequilensis* S3.1 ร่วมกับ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 มีค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีเชื้อราเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2) จากการทดสอบผลการใช้แบคทีเรียปฏิชีวนะควบคุมโรคราเขียวต่อปริมาณผลผลิตเห็ดสด พบว่าชุดการทดลองเติมเชื้อราพร้อมกับแบคทีเรียปฏิชีวนะ *Bacillus tequilensis* S3.1 ให้ผลผลิตเห็ดสดสูงกว่าชุดการทดลองที่ฉีดพ่นเชื้อราเพียงอย่างเดียว โดยที่ชุดการทดลอง *Trichoderma atroviride* BM1.2 ร่วมกับ *Bacillus tequilensis* S3.1 ให้ผลผลิตเห็ดเฉลี่ยสูงที่สุด 120.76 กรัมต่อก้อน และมีปริมาณไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมเชื้อและชุดการทดลองที่เติมแบคทีเรียปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่าการใช้ *Bacillus tequilensis* S3.1 สามารถควบคุมการเกิดโรคและไม่ส่งผลกระทบต่อการเจริญเป็นดอกเห็ด

Table 2 The effects of *Bacillus tequilensis* S3.1 on controlling *Trichoderma* sp. of phoenix oyster mushrooms in the cropping stage.

Treatments	Disease Severity Index (%) *	Yields (g per bag) *
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM3	43.33±5.77 ^{a**}	84.73±7.22 ^b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM3 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	23.33±5.77 ^b	105.00±15.55 ^a
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM4	38.33±10.40 ^a	83.43±7.48 ^b
<i>Trichoderma longibrachiatum</i> GM4 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	22.33±5.77 ^b	107.97±15.37 ^{ab}
<i>Trichoderma atroviride</i> BM1.2	35.00±5.00 ^a	85.60±13.25 ^b
<i>Trichoderma atroviride</i> BM1.2 + <i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	18.33±2.89 ^b	120.76±16.85 ^a
<i>Bacillus tequilensis</i> S3.1	0.00 ^c	125.93±15.77 ^a
Untreated	0.00 ^c	121.40±16.21 ^a

* Data are means ± standard deviations (SD) of five replicates

** Values with different letters within the same column are significantly different at $P \leq 0.05$ according to Duncan's multiple range test

วิจารณ์ผลการวิจัย

โรคราเขียวที่มีสาเหตุจาก *Trichoderma* spp. เป็นโรคที่มีความสำคัญกับเห็ดเศรษฐกิจหลายชนิด เช่น เห็ดกระดุม (*Agaricus* spp.) เห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) รวมทั้งเห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus* spp.) (Fu et al., 2023) โดยสายพันธุ์ของ *Trichoderma* spp. ที่มีการพบอย่างกว้างขวางคือ *Trichoderma harzianum* ในการวิจัยนี้สามารถคัดแยกเชื้อรา *Trichoderma* spp. จากวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้าภูฐานจากฟาร์มเพาะเห็ดในจังหวัดสระบุรีได้ 3 ไอโซเลต เมื่อจำแนกโดยอาศัยลักษณะสัณฐานวิทยาและการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณ ITS สามารถระบุได้คือ *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 โดยมีรายงานการตรวจพบ *Trichoderma longibrachiatum* ก่อโรคราเขียวในวัสดุเพาะเห็ดสกุลนางรมและเห็ดกระดุม (Schuster & Schmoll, 2010) ในขณะที่ *Trichoderma atroviride* ก่อให้เกิดโรคราเขียวในเห็ดหอม (*Lentinula edodes*) (Cao et al., 2024) และเห็ด Morel (*Morchella* spp.) (Fu et al., 2023)

จากการคัดแยก *Bacillus* spp. จากก้อนเชื้อเห็ดและทดสอบประสิทธิภาพการเป็นแบคทีเรียปฏิชีวนะในการควบคุมโรคราเขียวโดยวิธี dual culture พบว่า *Bacillus* sp. ไอโซเลต B1, S1.4 และ S3.1 มีความสามารถในการเป็นปฏิชีวนะโดยการเกิดบริเวณใสระหว่าง *Bacillus* spp. และเชื้อรา แสดงถึงกลไกการสร้างสารยับยั้งออกมานอกเซลล์ มีรายงานว่าโดยทั่วไป *Bacillus* spp. หลายชนิดสามารถสร้างสารปฏิชีวนะประเภท lipopeptide หลายชนิด เช่น iturin, fengycin และ surfactin เป็นต้น รวมถึงเอนไซม์ที่สามารถยับยั้งเชื้อราได้ (Hussain et al., 2024; Li et al., 2016) จากการทดสอบพบว่า *Bacillus* sp. S3.1 มีศักยภาพในการยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma*

atroviride BM1.2 เท่ากับร้อยละ 63.01 และยับยั้ง *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ GM4 เท่ากับร้อยละ 55.99 และ 53.96 ตามลำดับ ซึ่งใกล้เคียงกับการศึกษาของ Potocnik et al. (2019) พบว่า *Bacillus* spp. ที่แยกจากวัสดุเพาะเห็ดนางฟ้า 10 ไอโซเลต สามารถยับยั้งเชื้อรา *Trichoderma pleuroti* ในช่วงร้อยละ 54.44-62.22 และยับยั้ง *Trichoderma pleuroticola* ในช่วงร้อยละ 55.56-69.62

จากการทดสอบผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยของ *Bacillus* sp. S3.1 ต่อการยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichoderma* sp. ทั้ง 3 ชนิด พบว่าสามารถทำให้โคโลนีของเชื้อราที่มีขนาดเล็กลงและไม่สามารถสร้างเม็ดสปอร์สีเขียวได้ มีรายงานที่แสดงถึงความสามารถของ *Bacillus* spp. ในการผลิตสารประกอบอินทรีย์ระเหยหลายชนิดที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อรา ได้แก่ alcohols, aldehydes, ketones, phenolic compounds และ sulfides (Song et al., 2024) โดยมีรายงานถึงผลของสารประกอบอินทรีย์ระเหยที่ผลิตจาก *Bacillus* spp. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้หลายชนิดเช่น *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Botryosphaeria* spp., *Trichoderma* spp., และ *Penicillium* spp. (Calvo et al., 2020; He et al., 2020) จากการทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อราในระดับห้องปฏิบัติการ แสดงให้เห็นว่า *Bacillus* sp. S3.1 สามารถสร้างสารประกอบชนิดต่าง ๆ ที่หลั่งออกมานอกเซลล์ รวมทั้งสารประกอบอินทรีย์ระเหยในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้

เมื่อทำการจัดจำแนกชนิดของ *Bacillus* sp. S3.1 โดยการวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์บริเวณยีน 16S rDNA และ Phylogenetic tree พบว่ามีความคล้ายกับ *Bacillus tequilensis* โดยมีรายงานการศึกษา *Bacillus tequilensis* สามารถยับยั้งเชื้อราก่อโรคพืชได้หลายชนิด เช่น

Colletotrichum acutatum ที่เป็นสาเหตุของโรคแอนแทรคโนส ในพริกแดง (red pepper) (Kwon et al., 2022), *Fusarium solani* สาเหตุรากเน่าในโกฐเชียง (Rehmannia glutinosa) (Wang et al., 2023), *Magnaporthe oryzae* สาเหตุของโรคไหม้ในข้าว (Zhou et al., 2021) รวมถึงสามารถยับยั้งเชื้อราสกุล *Fusarium* ที่ก่อโรคในพืชได้ ได้แก่ *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum*, *Fusarium culmorum* และ *Fusarium verticillioides* (Baard et al., 2023)

การทดสอบประสิทธิภาพของ *Bacillus tequilensis* S3.1 ต่อการควบคุมเชื้อรา *Trichoderma atroviride* BM1.2 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 ในระยะบ่มเส้นใยพบว่า *Bacillus tequilensis* S3.1 ทำให้ค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำกว่าชุดควบคุมที่ปลูกเชื้อราเพียงอย่างเดียว แสดงให้เห็นว่า *Bacillus tequilensis* S3.1 สามารถควบคุมโรคราเขียวในเห็ดนางฟ้าภูฐานในระยะบ่มเส้นใยได้ ในขณะที่ผลการทดสอบประสิทธิภาพในระยะเปิดดอกพบว่าชุดการทดลองที่มี *Bacillus tequilensis* S3.1 ร่วมกับเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* GM3, *Trichoderma longibrachiatum* GM4 และ *Trichoderma atroviride* BM1.2 มีค่าดัชนีการเกิดโรคต่ำกว่าชุดการทดลองที่มีเชื้อราเพียงอย่างเดียวอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และชุดการทดลองเติมเชื้อราร่วมกับแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้ผลผลิตเห็ดสูงกว่าชุดการทดลองที่เติมเชื้อราเพียงอย่างเดียวและใกล้เคียงกับชุดควบคุม ดังนั้น *Bacillus tequilensis* S3.1 สามารถลดความรุนแรงของโรคราเขียวและช่วยให้ผลผลิตเห็ดไม่แตกต่างจากชุดควบคุม

สรุปผลการวิจัย

การทดสอบประสิทธิภาพของแบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus tequilensis* S3.1 ต่อการควบคุมเชื้อรา *Trichoderma atroviride* BM1.2, *Trichoderma longibrachiatum* GM3 และ *Trichoderma longibrachiatum* GM4 ทั้งในระดับห้องปฏิบัติการและในระดับโรงเรือน พบว่า *Bacillus tequilensis* S3.1 สามารถควบคุมการเจริญของเชื้อรา ช่วยลดการเกิดโรคราเขียวในก้อนเชื้อเห็ดได้ และให้ผลผลิตเห็ดไม่แตกต่างกับการใช้ *Bacillus tequilensis* S3.1 อย่างเดียวและชุดควบคุม อย่างไรก็ตามควรมีการทดสอบอีกครั้งในสภาพโรงเรือนของเกษตรกร รวมถึงศึกษาการพัฒนาการผลิตชีวภัณฑ์จาก *Bacillus tequilensis* S3.1 เพื่อนำไปเป็นควบคุมโรคราเขียวโดยชีววิธีต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.) สำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกว.) ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 และขอขอบคุณกลุ่มวิสาหกิจชุมชนเกษตรพร้อมใจบ้านโพธิ์พร้อมจิต ตำบลธารเกษม อำเภอพระพุทธบาท จังหวัดสระบุรีเป็นอย่างสูงที่อนุเคราะห์สถานที่และวัตถุดิบสำหรับการเตรียมก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าภูฐานในการวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Dhabaan, F. A. (2019). Morphological, biochemical and molecular identification of petroleum hydrocarbons biodegradation bacteria isolated from oil polluted soil in Dhahran, Saudi Arabia. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 26(6), 1247–1252.
- Baard, V., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Nkomo, M., Gokul, A., Keyster, M., & Klein, A. (2023). A biocontrol potential of *Bacillus subtilis* and *Bacillus tequilensis* against four *Fusarium* species. *Pathogens*, 12(2), 254. <https://doi.org/10.3390/pathogens12020254>
- Barnett, H. L., & Hunter, B. B. (1972). *Illustrated genera of imperfect fungi* (3rd ed.). Burgess Publishing Company.
- Calvo, H., Mendiara, I., Arias, E., Gracia, A. P., Blanco, D., & Venturini, M. E. (2020). Antifungal activity of the volatile organic compounds produced by *Bacillus velezensis* strains against postharvest fungal pathogens. *Postharvest Biology and Technology*, 166, Article 111208. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2020.111208>
- Cao, Z., Zhao, J., Liu, Y., Wang, S., Zheng, S., & Qin, W. (2024). Diversity of *Trichoderma* species associated with green mold contaminating substrates of *Lentinula edodes* and their interaction. *Frontiers in Microbiology*, 14, Article 1288585. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2023.1288585>
- Fu, Y., Wu, H., Wang, S., Yu, Q., Tian, D., & Xu, X. (2023). First report of *Trichoderma atroviride* causing rot of *Morchella sextelata* in Anhui Province, China. *Crop Protection*, 168, Article 106206. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2023.106206>

- He, C., Ye, W., Zhu, Y., & Zhou, W. (2020). Antifungal activity of volatile organic compounds produced by *Bacillus methylotrophicus* and *Bacillus thuringiensis* against five common spoilage fungi on loquats. *Molecules*, 25(15), 3360. <https://doi.org/10.3390/molecules25153360>
- Holt, J. G., Krieg, N. R., Sneath, P. H. A., Staley, J. T., & Williams, S. T. (1994). *Bergey's manual of determinative bacteriology* (9th ed.). Lippincott Williams and Wilkins.
- Hussain, S., Tai, B., Ali, M., Jahan, I., Sakina, S., Wang, G., Zhang, X., Yin, Y., & Xing, F. (2024). Antifungal potential of lipopeptides produced by the *Bacillus siamensis* Sh420 strain against *Fusarium graminearum*. *Microbiology Spectrum*, 12(4), Article e04008-23. <https://doi.org/10.1128/spectrum.04008-23>
- Kumar, R. S., & Sarathi, V. (2017). Screening of competitor mould in oyster mushroom (*Pleurotus florida*) cultivation and their management. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6(1), 264–270.
- Kwon, H. T., Lee, Y., Kim, J., Balaraju, K., Kim, H. T., & Jeon, Y. (2022). Identification and characterization of *Bacillus tequilensis* GYUN-300: An antagonistic bacterium against red pepper anthracnose caused by *Colletotrichum acutatum* in Korea. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 826827. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.826827>
- Li, X., Zhang, Y., Wei, Z., Guan, Z., Cai, Y., & Liao, X. (2016). Antifungal activity of isolated *Bacillus amyloliquefaciens* SYBC H47 for the biocontrol of peach gummosis. *PLoS ONE*, 11(9), Article e0162125. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0162125>
- Mwangi, R. W., Kariuki, S. T., & Wagara, I. N. (2017). Biocontrol of green mould disease of oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*) using *Bacillus amyloliquefaciens*. *Journal of Biology, Agriculture and Healthcare*, 7(10), 25–30.
- Potocnik, I., Milijasevic-Marcic, S., Stanojevic, O., Beric, T., Stankovic, S., Kredics, L., & Hatvani, L. (2019). The activity of native *Bacillus subtilis* strains in control of green mould disease of oyster mushroom (*Pleurotus* spp.). *Pesticides & Phytomedicine (Belgrade)*, 34(2), 97–102.
- Qiu, Z., Wu, X., Zhang, J., & Huang, C. (2017). High temperature enhances the ability of *Trichoderma asperellum* to infect *Pleurotus ostreatus* mycelia. *PLoS ONE*, 12(10), Article e0187055. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0187055>
- Rassami, W., Yenjit, P., Pengphol, S., & Intana, W. (2020). Efficacy of essential oils to control black mold disease caused by *Aspergillus niger* in grey oyster mushrooms (*Pleurotus pulmonarius*). *King Mongkut's Agricultural Journal*, 38(2), 185–192.
- Roberti, R., Francesco, A. D., Innocenti, G., & Mari, M. (2019). Potential for biocontrol of *Pleurotus ostreatus* green mould disease by *Aureobasidium pullulans* De Bary (Arnaud). *Biological Control*, 135, 9–15.
- Sasic Zoric, L., Janjusevic, L., Djislov, M., Knezic, T., Vunduk, J., Milenkovic, I., & Gadjanski, I. (2023). Molecular approaches for detection of *Trichoderma* green mold disease in edible mushroom production. *Biology*, 12(2), 299. <https://doi.org/10.3390/biology12020299>
- Schuster, A., & Schmoll, M. (2010). Biology and biotechnology of *Trichoderma*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 87, 787–799.
- Shah, S., Nasreen, S., & Kousar, S. (2013). Efficacy of fungicides against *Trichoderma* spp. causing green mold disease of oyster mushroom (*Pleurotus sajor-caju*). *Research Journal of Microbiology*, 8(1), 13–24.
- Stanojevic, O., Milijasevic-Marcic, S., Potocnik, I., Stepanovic, M., Dimkic, I., Stankovic, S., & Beric, T. (2016). Isolation and identification of *Bacillus* spp. from compost material, compost and mushroom casing soil active against *Trichoderma* spp. *Archives of Biological Sciences*, 68(4), 845–852.
- Song, C., Zhang, Y., Zhao, Q., Chen, M., Zhang, Y., Gao, C., Jia, Z., Song, S., Guan, J., & Shang, Z. (2024).

Volatile organic compounds produced by *Bacillus aryabhattai* AYG1023 against *Penicillium expansum* causing blue mold on the Huangguan pear. *Microbiological Research*, 278, Article 127531. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2023.127531>

Tummarattanapong, T., Meurchang, P., Namvong, U., & Suwankadee, S. (2021). Study on efficient treatments for controlling pathogenic *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* tropical race 4 (Foc TR4) causing Fusarium wilt of Cavendish banana. *Thai Agricultural Research Journal*, 38(2), 185–192.

Wang, R., Li, H., Qin, Z., Wang, Y., Yang, Q., Zhang, H., & Li, M. (2023). Antifungal activity and application of *Bacillus tequilensis* A13 in biocontrol of *Rehmannia glutinosa* root-rot disease. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10, Article 20. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00390-y>

Yenjit, P., & Intana, W. (2016). Study on efficacy of *Bacillus* powder and its application to control black mold disease of grey oyster mushroom. *Agricultural Science Journal*, 47(3), 405–416.

Zeng, X. Y., Yuan, X. X., Peng, K. Q., Pan, Y. T., Tan, T. J., Wu, N., & Tian, F. H. (2022). Taxonomy and control of *Trichoderma hymenopellicola* sp. nov. responsible for the first green mold disease on *Hymenopellis raphanipes*. *Frontiers in Microbiology*, 13, Article 991987. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.991987>

Zhou, H., Zhu, H., Ren, Z., Li, X., Zhong, J., & Liu, E. (2021). Efficacy of *Bacillus tequilensis* strain JN-369 to biocontrol of rice blast and enhance rice growth. *Biological Control*, 160, Article 104652. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2021.104652>