นิพนธ์ต้นฉบับ

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai) ของเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.)

พรศิลป์ มณีฉาย[1] วสันณ์ เพชรรัตน์[2] เสมอใจ ชื่นจิตต์[3] และ จรัสศรี นวลศรี[4]

Abstract

Maneechai, P.[1], Petcharat, V.[2], Chuenchit, S.[2] and Nualsri, C.[3]

Screening of antagonistic bacteria against the green mold disease (*Trichoderma harzianum* Rifai) of Grey Oyster Mushroom (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.)

Songklanakarin J. Sci. Technol., 2005, 27(1) : 25-37

A total of 174 strains of bacteria antagonistic against the green mold (*Trichoderma harzianum*), isolated from cultivating bags and fruiting bodies of the mushrooms, were screened for effects on mushroom mycelia and ability to control the green mold disease. Twenty-eight of them promoted the primodia formation of the *Pleurotus pulmonarius* mycelia on agar plates. Twenty-two isolates were selected and further tested in a mushroom house. Cell suspension of each isolate was prepared and sprayed onto the spawn surface of

[1]Faculty of Agriculture Nakhon Si Thammarat, Rajamangala Institute of Technology, Nakhon Si Thammarat Campus, Thong Yai, Nakhon Si Thammarat, 80240 Thailand. [2]Department of Pest Management, [3]Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hat Yai, Songkhla, 90112 Thailand.

[1]วท.ม.(โรคพืชวิทยา), คณะเกษตรศาสตร์นครศรีธรรมราช สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล อำเภอทุ่งใหญ่ จังหวัดนครศรีธรรมราช 80240 [2]Ph.D.(Plant Pathology), รองศาสตราจารย์ [3]วท.ม.(เกษตรศาสตร์), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาการจัดการศัตรูพืช [4]Ph.D. (Agronomy), ผู้ช่วยศาสตราจารย์, ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

Corresponding e-mail: vasun.p@psu.ac.th

รับต้นฉบับ 29 เมษายน 2547 รับลงพิมพ์ 5 สิงหาคม 2547

***P. pulmonarius*. Fifteen isolates shortened the times required from watering to 2nd and 3rd flushing and increased yield of the basidiocarps by 1.1-34.3% over 30 days.**

Six isolates of bacteria which showed an inhibitory effect against *T. harzianum*, enhanced primordia formation and increased yield of *P. pulmonarius* were selected and used for control testing in a cultivation house. The suspension of each isolate was sprayed onto the spawn surface immediately after exposure to the air in the mushroom house, followed by spore suspension of *T. harzianum* two days later. The number of infected bags was counted at 30 days after inoculation and the cumulative yield was compared after 60 days. The results showed that bacteria isolate B012-022 was highly effective in suppressing the green mold disease. Only 6.7% of the cultivating bags were found to be infected by *T. harzianum* when bacteria isolate B012-022 was applied. Cumulative yield obtained from 900 g of 94% sawdust + 5% rice bran + 1% $Ca(OH)_2$ was 300.0 g/bag after 60 days, 71.1% higher than the bags infected by the green mold and without bacterial spraying. Identification of the six bacterial isolates showed all to be *Bacillus* spp.

Key words : biological control, *Trichoderma*, antagonistic bacteria, *Pleurotus*

บทคัดย่อ

พรศิลป์ มณีฉาย วสันณ์ เพชรรัตน์ เสมอใจ ชื่นจิตต์ และ จรัสศรี นวลศรี

การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เพื่อการควบคุมโรคราเขียว (*Trichoderma harzianum* Rifai) ของเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius* (Fr.) Quel.)

ว. สงขลานครินทร์ วทท. 2548 27(1) : 25-37

ได้ทำการแยกและคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *T. harzianum* จากก้อนเชื้อเห็ดและดอกเห็ด จำนวน 174 ไอโซเลท นำเชื้อไปศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์กับเส้นใยเห็ดนางฟ้า (*P. pulmonarius*) ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 28 ไอโซเลท มีความสามารถในการกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกได้ ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์นี้จำนวน 22 ไอโซเลท ไปทดสอบในโรงเรือนเพาะเห็ด โดยการนำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของแต่ละไอโซเลท ฉีดพ่นบริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า พบว่า 15 ไอโซเลท ทำให้ระยะเวลาของการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 2 และ 3 เร็วขึ้น และทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น 1.1-34.3% ในช่วงเก็บเกี่ยว 30 วัน

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 ไอโซเลท ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* ส่งเสริมให้เห็ดสร้างดอกมาก และเพิ่มผลผลิตเห็ดนางฟ้าให้สูงขึ้น ไปใช้ในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือน โดยทำการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ของแต่ละไอโซเลท ลงบนเส้นใยเห็ดบริเวณปากถุงก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้าหลังจากเปิดปากถุง หลังจากนั้น 2 วัน ฉีดพ่นสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *T. harzianum* ลงบนเส้นใยเห็ด เพื่อทำให้เห็ดเกิดโรค ตรวจนับการเกิดโรคของถุงเห็ดในเวลา 30 วันหลังการปลูกเชื้อ และเก็บผลผลิตเห็ดในช่วงเวลา 60 วัน ผลการทดลองพบว่า แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 มีประสิทธิภาพสูงในการควบคุมโรคราเขียวคือ ทำให้ถุงเห็ดเกิดโรคเพียง 6.7% การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 ทำให้ผลผลิตเห็ดสูงขึ้น โดยได้รับผลผลิตเฉลี่ย 300.0 กรัม/ถุง เมื่อเพาะด้วยขี้เลื่อย 94% ผสมรำละเอียด 5% และปูนขาว 1% ปริมาณ 900 กรัม ในช่วงเก็บเกี่ยว 60 วัน ซึ่งสูงกว่าถุงเห็ดเป็นโรคที่ไม่ฉีดพ่นแบคทีเรีย 71.1% จากการจำแนกแบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 6 ไอโซเลท พบว่าเป็น *Bacillus* spp. ทั้ง 6 ไอโซเลท

โรคราเขียว (green mold disease) ของเห็ดเกิดจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. ทำความเสียหายให้กับเห็ดชนิดต่างๆ ได้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเชื้อรา *Trichoderma* spp. เจริญได้อย่างรวดเร็วและสร้างสปอร์ปริมาณมากทำให้เกิดการระบาดอย่างรวดเร็ว ราเขียวที่สำคัญคือ *T. harzianum* เป็นราที่พบได้ทั่วไปในวัสดุเพาะ

เห็ด ปุ๋ยหมัก และดินที่ใช้ปิดผิวหน้า (casing) กองเห็ดเชื้อราเขียวเข้าทำลายวัสดุในถุงเพาะเห็ดและกระบะเพาะเห็ด โดยลักษณะเริ่มแรกเห็นเป็นเส้นใยสีขาว ต่อมาสร้างสปอร์สีเขียวและเจริญลุกลามปกคลุมวัสดุเพาะอย่างรวดเร็ว เส้นใยของเชื้อ *T. harzianum* เข้าเกาะกินเส้นใยเห็ด พร้อมทั้งสร้างเอนไซม์ย่อมสลายเส้นใย ส่งผลให้เห็ดไม่สามารถออกดอกได้ (Beyer *et al*., 2001)

การระบาดของโรคราเขียวเกิดขึ้นครั้งแรกในประเทศไอร์แลนด์ และประเทศในแถบทวีปอเมริกาเหนือ (Sinden and Hauser, 1953) และในปี ค.ศ.1985 พบว่าเกิดการระบาดของเชื้อ *T. koningii* กับเห็ดกระดุม (*Agaricus bisporus*) โดยทำให้เห็ดมีอาการเน่า เชื้อ *T. koningii* นี้เป็นเชื้อที่ติดมากับวัสดุเพาะเห็ด (Staunton, 1987) หลังจากนี้พบว่าในปี ค.ศ. 1996 เกิดการระบาดในประเทศเนเธอร์แลนด์และเยอรมัน (Sharma *et al*., 1999) และการระบาดในประเทศสกอตแลนด์และอังกฤษ ทำให้เกิดความเสียหายกับอุตสาหกรรมการเพาะเห็ดกระดุมคิดเป็นมูลค่าประมาณ 30 ล้านดอลลาร์ (Seaby, 1998) ในรัฐเพนซิลวาเนียประเทศสหรัฐอเมริกาก็เช่นเดียวกัน มีรายงานว่าในปี ค.ศ.1995-1997 เชื้อราเขียว *T. harzianum* ที่ระบาดทำความเสียหายให้กับเห็ดเป็นเชื้อ *T. harzianum* biotype Th2 และ Th4 (Ospina-Giraldo *et al*., 1999; Castle *et al*., 1998; Seaby, 1998)

ในประเทศไทยพบว่าราเขียวระบาดทำความเสียหายให้กับเห็ดที่เพาะเลี้ยงทุกชนิด ทั้งที่เพาะในถุงพลาสติก เพาะกลางแจ้งและเพาะในโรงเรือน ราเขียวที่พบได้แก่ *T. harzianum*, *T. harmatum*, *T. aureoviride* และ *T. virens* (*Gliocladium virens*) (ประไพศรี, 2542) ในปี 2544 พบการระบาดของราเขียวในจังหวัดสงขลา ทำให้ผลผลิตเห็ดที่เพาะในถุงพลาสติกลดลงมากกว่า 70% (กองบรรณาธิการ, 2544)

ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการควบคุมโรคราเขียวอย่างมีประสิทธิภาพ วิธีการส่วนใหญ่ใช้วิธีกำจัดแหล่งเพาะเชื้อและทำความสะอาดอุปกรณ์ต่างๆ สำหรับเพาะเห็ด การป้องกันกำจัดราเขียวโดยใช้สารเคมีขณะเพาะเห็ดทำได้ยาก เนื่องจากมีพิษต่อเส้นใยเห็ดและมีปัญหาเรื่องพิษตกค้าง เกษตรกรบางรายหาวิธีจำกัดโรคด้วยตนเอง เช่น การใช้จุลินทรีย์ EM ฉีดพ่นถุงก้อนเชื้อเห็ด การใช้ปุ๋ยหมักชีวภาพรดก้อนเชื้อเห็ด ซึ่งวิธีการต่างๆ เหล่านี้ เกษตรกรบางรายเชื่อว่าลดการระบาดของโรคราเขียวได้

การควบคุมโรคราเขียวโดยใช้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์เป็นอีกวิธีหนึ่งที่กำลังได้รับความสนใจ โดย Romaine และคณะ (1996) รายงานว่าแบคทีเรีย *Bacillus* sp. ที่อาศัยอยู่ในแปลงเพาะเห็ดกระดุม สามารถยับยั้งการเจริญของ *Trichoderma* sp. สาเหตุโรคราเขียวได้ Singh และ Singh (2001) ศึกษาแบคทีเรียที่แยกได้จากวัสดุเพาะเห็ดกระดุม พบว่าแบคทีเรียที่เรืองแสงได้ fluorescent *Pseudomonas* ไอโซเลท Cllb และ Cvla สามารถควบคุมปริมาณเชื้อ *Trichoderma* spp. ได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัยเพื่อให้ได้เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ซึ่งเป็นสาเหตุโรคราเขียวในเห็ดนางฟ้า (*Pleurotus pulmonarius*)

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

1. เชื้อเห็ด

เชื้อเห็ดนางฟ้าที่ใช้ทดลองแยกจากดอกเห็ดนางฟ้าสายพันธุ์ที่เพาะปลูกเป็นการค้า โดยวิธีเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบนอาหารวุ้น พีดีเอ และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10ºC เมื่อจะทำการทดลองจึงย้ายลงบนอาหารวุ้น พีดีเอ เลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิห้อง (28-32ºC) เป็นเวลา 5 วัน

2. เชื้อ *T. harzianum*

เชื้อ *T. harzianum* แยกจากถุงเห็ดนางฟ้าที่เป็นโรคราเขียว โดยเก็บมาจากฟาร์มเห็ดบ้านท่าหรั่ง อำเภอคลองหอยโข่ง จังหวัดสงขลา นำมาแยกเชื้อโดยวิธี dilution pour plate แล้วจึงแยกโคโลนีเดี่ยวลงเลี้ยงไว้บนอาหารวุ้นพีดีเอ เก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 10ºC เมื่อจะนำมาทดลองจึงย้ายลงเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ เป็นเวลา 2 วัน

3. เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์แยกจากแหล่งต่างๆ 4 แหล่ง คือ จากถุงเห็ดที่เป็นโรคราเขียว ถุงเพาะเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดผิดปกติ โดยตักวัสดุเพาะเห็ดจากก้อน

เชื้อเห็ดหรือหมวกเห็ดน้ำหนัก 1 กรัม ใส่ในหลอดน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 9 มล. บดวัสดุเพาะหรือเห็ดด้วยแท่งแก้วเขย่าให้เข้ากันประมาณ 15 นาที จึงใช้เข็มเขี่ยตัดโคโลนีเชื้อรา *T. harzianum* ที่สร้างสปอร์แล้วขนาดประมาณ 0.5×0.5 ตร.ซม. ใส่ลงไปในหลอดเดียวกัน เขย่าให้เข้ากันอีกครั้งประมาณ 1 นาที ตั้งทิ้งไว้ให้เศษวัสดุต่างๆ ตกตะกอน จึงใช้ไปเปตดูดเอาสารละลายด้านบนไปทำให้เจือจาง (serial dilution) 10^{-2} - 10^{-6} นำสารละลายที่ได้ไปเพาะเลี้ยงบนอาหารพีดีเอ บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 2-5 วัน จะปรากฏโคโลนีของเชื้อ *T. harzianum* และแบคทีเรียเจริญปะปนกันอยู่ในจานเลี้ยงเชื้อ เลือกเก็บเฉพาะแบคทีเรียที่มีวงใส (clear zone) ล้อมรอบ วงใสนี้เกิดเนื่องจากแบคทีเรียตัวนั้นสร้างสารที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* จึงทำให้ *T. harzianum* ไม่สามารถเจริญเข้าใกล้โคโลนีของแบคทีเรียได้ ทำการนับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียที่มีวงใส และย้ายลงเลี้ยงบนอาหาร nutrient agar slant (NA slant) ในหลอดทดลองเพื่อเก็บไว้ศึกษาต่อไป

4. การทดสอบแบคทีเรียต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้า

นำแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์ต่อเชื้อ *T. harzianum* ที่คัดเลือกได้ มาทำการทดสอบกับเชื้อเห็ด โดยวิธี dual culture บนอาหาร PDA โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม.เจาะเส้นใยเห็ดนางฟ้า นำไปวางในอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบจานอาหารเลี้ยง 1 ซม. เลี้ยงไว้ประมาณ 2 วัน หลังจากนั้นขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA slant อายุ 24 ชั่วโมง เป็นแนวยาวบริเวณขอบอีกด้านหนึ่งของจานอาหาร สังเกตปฏิกิริยาสัมพันธ์ บันทึกการเจริญของเส้นใยเห็ด และการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้า

5. เปรียบเทียบความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ ไอโซเลทที่กระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ศึกษาเบื้องต้นแล้วพบว่าสามารถยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* และสามารถกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดสร้างตุ่มดอก มาศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* ในจานทดลองอีกครั้งหนึ่ง โดยใช้วิธี dual culture โดยใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 ซม. เจาะบริเวณขอบโคโลนีของเชื้อ *T. harzianum* วางบนอาหาร PDA ให้ห่างจากขอบ 1 ซม. หลังจากนั้น 1 วัน ทำการขีดเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่เลี้ยงไว้บนอาหาร NA slant อายุ 24 ชม. เป็นแนวยาวบริเวณอีกด้านหนึ่งของจานอาหารเลี้ยงเชื้อ นำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เลือกเก็บเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพดีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* เพื่อนำไปใช้ทดลองต่อไป

6. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการออกดอกของเห็ดในโรงเรือนเพาะเห็ด

6.1 การเตรียมเซลล์แขวนลอยของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์

เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ได้จากข้อ 5 บนอาหาร NA slant ที่อุณหภูมิ 25ºC เป็นเวลา 48 ชม. เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อใส่หลอดอาหาร ปริมาตร 10 มล. ใช้แท่งแก้วขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียปฏิปักษ์โดยใช้ haemacytometer ปรับความเข้มข้นของน้ำละลายเชื้อให้มีความเข้มข้นประมาณ 1×10^6 เซลล์/มล. แล้วจึงเทน้ำละลายเชื้อลงในบีกเกอร์

6.2 การเตรียมก้อนเชื้อเห็ด

ผสมขี้เลื่อย 94% + รำ 5% + ปูนขาว 1% และปรับส่วนผสมให้มีความชื้น 65% บรรจุลงถุงร้อนขนาด 6×14 นิ้ว น้ำหนัก 900 กรัม ใส่คอขวดพลาสติก ปิดด้วยจุกสำลีและกระดาษ นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 120ºC ความดัน 15 ปอนด์/ตร.นิ้ว เป็นเวลา 2 ชม. เมื่อวัสดุเพาะเย็นจึงเทหัวเชื้อเห็ดที่เตรียมไว้บนเมล็ดข้าวฟ่างถุงละ 15-20 เมล็ด ปิดจุกสำลีอย่างเดิม บ่มไว้เป็นเวลา 30 วัน ซึ่งเส้นใยเห็ดจะเจริญเกือบเต็มถุง จึงนำไปทดสอบในโรงเรือนเปิดดอก

6.3 การทดสอบ

นำเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่คัดเลือกไว้ ไปฉีดพ่นบนถุงก้อนเชื้อเห็ด โดยฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียบริเวณปากถุงเห็ดปริมาตร 3 มล./1 ถุง ชนิดละ 10 ถุง เปรียบเทียบกับฉีดพ่นด้วยน้ำกลั่น (control) บันทึกระยะเวลาในการออกดอก จำนวนดอกและน้ำหนักเห็ดในช่วงเก็บเกี่ยว 30 วันหลังจากฉีดพ่นเชื้อ

คัดเลือกเฉพาะแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็ว จำนวนดอกมาก และได้น้ำหนักมาก เพื่อใช้ในการทดลองขั้นต่อไป

7. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือน

7.1 การเตรียมสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *T. harzianum*

เลี้ยงเชื้อ *T. harzianum* บนอาหาร PDA เป็นเวลา 7 วัน บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง (26-32ºC) เทน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อใส่จานอาหารเลี้ยงเชื้อ ใช้แท่งแก้วที่ฆ่าเชื้อขูดผิวหน้าอาหารเบาๆ โดยใช้น้ำกลั่นปริมาตร 25 มล. ต่อจานอาหารเลี้ยงเชื้อรา 4 จาน เทสปอร์แขวนลอยของเชื้อราลงในบีกเกอร์ ทำการปรับความเข้มข้นของสปอร์แขวนลอยของเชื้อให้มีความเข้มข้น ประมาณ 1×10^6 สปอร์/มล. โดยใช้ haemacytometer

7.2 การเตรียมเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์และก้อนเชื้อเห็ด

ทำการทดลองด้วยวิธีเช่นเดียวกับข้อ 6.1 และ 6.2

7.3 การทดลอง

นำแบคทีเรียที่คัดเลือกแล้วว่าส่งผลให้เห็ดออกดอกดี และให้น้ำหนักมาก จากข้อ 6 จำนวน 6 สายพันธุ์ ไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือนเพาะเห็ด โดยวางแผนการทดลองแบบ Randomized Complete Block Design (RCB) จำนวน 8 สิ่งทดลอง ทำ 3 ซ้ำ แต่ละซ้ำประกอบด้วยก้อนเชื้อเห็ดจำนวน 10 ถุง รวม 240 ถุง โดยแบ่งเป็นชุดดังนี้

1. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B004-013 + *T. harzianum*
2. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B006-017 + *T. harzianum*
3. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-021 + *T. harzianum*
4. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 + *T. harzianum*
5. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-034 + *T. harzianum*
6. แบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-054 + *T. harzianum*
7. *T. harzianum* (control)
8. น้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ (check)

การทดลองทำโดยฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรีย ปฏิปักษ์บริเวณปากถุงเห็ด ปริมาตร 3 มล./1 ถุง หลังจากนั้น 2 วัน จึงฉีดพ่นด้วยสปอร์แขวนลอยของเชื้อ *T. harzianum* ปริมาตร 3 มล./1 ถุง บันทึกอัตราการเกิดโรคในระยะเวลา 30 วัน หลังปลูกเชื้อ บันทึกระยะเวลาในการออกดอก จำนวนดอกเห็ด และน้ำหนักเห็ด เปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะสปอร์ *T. harzianum* และฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ในช่วงเก็บเกี่ยวเวลา 60 วัน

ผลการทดลอง

1. แบคทีเรียปฏิปักษ์

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เป็นปฏิปักษ์กับเชื้อ *T. harzianum* จากแหล่งต่างๆ คือ ถุงเห็ดเป็นโรค ถุงเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดผิดปกติ พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ ประมาณ 65.5% ของประชากรแบคทีเรียที่เจริญบนจานเลี้ยงเชื้อทั้งหมด ได้ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียไว้จำนวน 174 ไอโซเลทสำหรับศึกษาต่อไป

2. ผลของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเจริญและการสร้างตุ่มดอกของเห็ดนางฟ้า

จากการทดสอบปฏิกิริยาสัมพันธ์ระหว่างเส้นใยเห็ดกับแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 174 ไอโซเลท สามารถแบ่งเป็น 5 แบบ ตามลักษณะการเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดดังนี้

แบบที่ 1 เส้นใยเห็ดชะงักการเจริญเติบโตเมื่อพบกับเชื้อแบคทีเรียที่ขีดไว้ เส้นใยเห็ดจะไม่เจริญเข้าไปใกล้แบคทีเรีย รวมแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้ จำนวน 12 ไอโซเลท คิดเป็น 6.9%

แบบที่ 2 เส้นใยเห็ดมีสีขาว หนาฟูตรงตำแหน่งที่สัมผัสกับแบคทีเรีย แต่ไม่มีการเจริญข้ามผ่านแบคทีเรียที่ขีดไว้ได้ รวมแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้เป็นจำนวน 22 ไอโซเลท คิดเป็น 12.5%

แบบที่ 3 เส้นใยเห็ดบริเวณสัมผัสกับแบคทีเรียจะ

มีสีขาว เส้นใยจะหนาและฟูขึ้น เส้นใยเห็ดเจริญข้ามผ่านแบคทีเรียที่ขีดไว้ เส้นใยเห็ดที่เจริญข้ามผ่านไปได้นั้นจะมีลักษณะหนาและฟูยิ่งขึ้น มีลักษณะคล้ายสำลี รวมจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้ 83 ไอโซเลท คิดเป็น 47.8% นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียในกลุ่มนี้จำนวน 20 ไอโซเลท สามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกได้ ในระยะเวลา 25-30 วัน ได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ B003-043, B003-052, B004-011, B004-013, B004-015, B004-024, B004-027, B004-0315, B004-043, B004-047, B004-049, B005-013, B006-017, B006-018, B010-041, B010-047, B012-021, B012-022, B012-034 และ B012-054

แบบที่ 4 เส้นใยเห็ดเจริญข้ามแบคทีเรียที่ขีดไว้ได้ เส้นใยเห็ดบริเวณสัมผัสกับแบคทีเรียจะหนาและเข้มขึ้นอย่างชัดเจน เส้นใยส่วนที่เจริญข้ามไปได้ จะเป็นเส้นใยเห็ดธรรมดา ไม่มีลักษณะฟู หรือหนาขึ้น รวมจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้ 30 สายพันธุ์ คิดเป็น 17.2% แบคทีเรียในกลุ่มนี้จำนวน 7 ไอโซเลท สามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกได้ ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียสายพันธุ์ B003-013, B003-015, B003-034, B004-041, B004-042, B004-0411 และ B012-055

แบบที่ 5 เส้นใยเห็ดเจริญข้ามผ่านแบคทีเรียที่ขีดไว้ได้ และเส้นใยเห็ดบริเวณสัมผัสกับแบคทีเรียมีสีเข้มหนาและฟูขึ้น บริเวณเส้นใยที่เจริญข้ามผ่านมีลักษณะสีค่อนข้างเหลือง รวมจำนวนแบคทีเรียปฏิปักษ์ในกลุ่มนี้ 27 ไอโซเลท คิดเป็น 15.5% มี 1 ไอโซเลท ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอกได้ คือแบคทีเรียสายพันธุ์ B004-029

3. ความสามารถในการยับยั้งเชื้อ *Trichoderma* ของเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถกระตุ้นให้เห็นางฟ้าสร้างตุ่มดอก

นำแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* และกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก จำนวน 28 ไอโซเลท มาทดลองกับการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* อีกครั้ง พบว่ามีเพียง 22 ไอโซเลท ที่ยังมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้ดี โดยการสร้างสารปฏิชีวนะ ทำให้ปลายเส้นใยของเชื้อราที่สัมผัสกับแบคทีเรียแสดงอาการผิดปกติไป ส่งผลให้เชื้อราไม่สามารถเจริญต่อไปได้ ส่วนอีก 6 ไอโซเลทที่เหลือมีความสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้น้อยมาก จึงคัดเลือกเฉพาะเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 22 ไอโซเลท ไว้ศึกษาต่อไป

4. การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการเจริญดอกเห็ดในโรงเรือนเพาะเห็ด

ผลของแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 สายพันธุ์ ต่อระยะเวลาในการออกดอก จำนวนดอก และน้ำหนักดอกเห็ดนางฟ้า เมื่อทำการทดลองฉีดพ่นแบคทีเรียลงบนก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า เปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ (control) ได้ผลการทดลอง (Table 1) ดังนี้

4.1 ระยะเวลาที่ให้ผลผลิตในแต่ละรุ่น และจำนวนถุงที่ออกดอก

ในช่วงเก็บเกี่ยว 30 วัน เห็ดในรุ่นที่ 1 ออกดอกหมดทุกถุง โดยระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 1 อยู่ระหว่าง 4.8-8.4 วัน ในขณะที่การไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 4.9 วัน ในรุ่นที่ 2 เห็ดออกดอกหมดทุกถุง ยกเว้นถุงที่ฉีดด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B004-035 ออกดอกเพียง 8 ถุง และสายพันธุ์ B003-043 ออกดอกเพียง 9 ถุง ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก รุ่นที่ 2 อยู่ในช่วง 13.2-20.6 วัน ส่วนการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 17.0 วัน ส่วนรุ่นที่ 3 การออกดอกของเห็ดไม่ครบทุกถุง จำนวนถุงที่ออกในรุ่นที่ 3 มากที่สุดคือ ออกดอกจำนวน 9 ถุง จาก 10 ถุง เมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-034 รองลงมาคือ 7 ถุง เมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 และ B004-035 ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอกในรุ่นนี้อยู่ในช่วง 23.7-29.5 วัน ส่วนการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 28.3 วัน และรุ่นที่ 3 มีการออกดอกเพียง 2 ถุง

4.2 จำนวนดอกเห็ด

จำนวนดอกเห็ดเฉลี่ยในรุ่นที่ 1 อยู่ในช่วง 4.7-8.1 ดอก/ถุง เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ พบว่าออกดอกเฉลี่ย 6.1 ดอก/ถุง รุ่นที่ 2 จำนวนดอกเห็ดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 2.5-7.4 ดอก/ถุง ในขณะการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ออกดอกเฉลี่ยเพียง 2.3 ดอก/ถุง และรุ่นที่ 3 เห็ดออกดอกไม่ครบทุกถุง จำนวนดอกเห็ด

Table 1. Average yield of *Pleurotus pulmonarius* on sawdust supplemented with 5% rice bran and 1% $Ca(OH)_2$, sprayed with different isolates of antagonistic bacteria during 30 days of harvesting.

Treatment (bacterial Isolates)	1st flush			2nd flush			3rd flush			Total			No. of bags fruited at 3nd flush
	No. of days from exposure to harvest	No. of basidocarps/ bags	Weight (g)	No. of days from exposure to harvest	No. of basidocarps/ bags	Weight (g)	No. of days from exposure to harvest	No. of basidocarps/ bags	Weight (g)	No. of basidocarps/ bags	Total weight (g)	% increased/ decreased	
B003-013	6.1	5.8	87.0	18.5	4.1	38.5	28.2	2.3	10.0	12.2	135.5	-3.2	2
B003-015	7.0	5.8	94.0	20.6	4.0	32.0	29.4	6.0	20.0	15.8	146.0	-4.3	2
B003-034	5.5	8.1	106.0	15.1	2.8	31.0	26.6	3.3	12.5	14.2	149.5	6.8	4
B003-043	8.1	7.6	88.0	18.3	3.1	33.0	26.9	3.0	16.5	13.7	137.5	1.8	4
B004-013	4.9	7.2	110.0	15.6	3.3	42.0	27.3	3.2	23.0	13.7	175.0	25.0	5
B004-024	6.6	5.5	91.0	20.1	3.9	38.0	29.5	0.1	0.5	9.5	129.5	-7.5	1
B004-027	7.4	6.5	77.0	17.4	3.1	33.5	27.6	6.0	18.0	15.6	128.5	-8.2	3
B004-029	6.6	6.1	93.0	19.7	3.8	42.5	28.5	3.8	11.5	13.7	147.0	5.0	3
B004-035	8.4	6.0	68.0	17.6	3.4	34.5	25.5	4.2	39.0	13.6	141.5	1.1	7
B004-041	5.5	4.7	88.0	17.7	4.9	55.0	28.7	2.5	3.5	12.1	146.5	4.6	3
B004-042	5.8	5.5	74.0	17.1	4.5	63.0	28.5	5.0	13.0	15.0	150.0	7.1	2
B004-043	6.1	6.2	115.0	19.3	2.5	25.0	27.7	4.0	9.5	12.7	149.5	6.8	3
B004-049	6.8	6.3	75.0	18.1	3.4	39.0	27.2	3.7	16.0	13.4	130.0	-7.1	4
B006-017	6.8	7.8	89.0	17.8	4.5	55.0	28.6	3.7	6.5	16.0	150.5	7.5	3
B006-018	4.8	6.6	119.0	19.4	2.5	15.5	27.4	2.8	10.5	11.9	145.0	3.6	4
B010-041	6.2	6.9	90.0	19.8	3.9	39.5	28.4	3.0	8.5	13.8	138.0	-1.4	3
B010-047	5.3	7.1	113.0	17.6	2.8	23.5	29.0	1.5	8.0	11.4	144.5	3.2	2
B012-021	5.1	7.8	113.0	14.9	2.9	33.0	26.0	5.1	31.5	15.8	177.5	26.8	6
B012-022	7.0	7.2	93.0	16.5	7.4	62.0	26.3	8.1	31.5	22.7	186.5	33.2	6
B012-034	4.9	7.0	109.0	13.2	2.7	40.0	23.7	4.7	39.0	14.4	188.0	34.3	9
B012-054	7.0	7.2	109.0	15.8	4.3	46.5	24.5	5.3	19.0	16.8	174.5	24.6	2
B012-055	6.2	6.4	84.0	18.1	3.4	37.0	27.4	4.5	11.0	14.3	132.0	-5.7	4
Control	4.9	6.1	106.0	17.0	2.3	30.0	28.3	2.0	4.0	10.4	140.0	0.0	2

เฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.1-8.1 ดอก/ถุง ส่วนการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดออกดอกเฉลี่ย 4.0 ดอก/ถุง

จำนวนดอกเห็ดเฉลี่ยทั้งหมดอยู่ในช่วง 9.5-22.7 ดอก/ถุง โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ที่ทำให้เห็ดออกดอกเฉลี่ยมากคือ B012-022 ออกดอก 22.7 ดอก/ถุง ส่วนถุงที่ไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดออกดอกเฉลี่ยเพียง 10.4 ดอก/ถุง ซึ่งพบว่า ถุงที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวนดอกเพิ่มขึ้นเป็น 2 เท่า ของถุงที่ไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์

4.3 น้ำหนัก

รุ่นที่ 1 น้ำหนักเห็ดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 68.0-119.0 กรัม/ถุง ในขณะที่ไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดมีน้ำหนักเฉลี่ย 106 กรัม/ถุง ในรุ่นที่ 2 น้ำหนักเห็ดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 15.5-63.0 กรัม/ถุง ในขณะที่ การไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดมีน้ำหนักเฉลี่ย 30.0 กรัม/ถุง ส่วนรุ่นที่ 3 การออกดอกไม่ครบทุกถุง น้ำหนักเห็ดเฉลี่ยอยู่ในช่วง 0.5-39.0 กรัม/ถุง เมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-034 และ B004-035 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ทำให้เห็ดออกดอกเฉลี่ยมากที่สุดคือ 39.0 กรัม/ถุง ในขณะที่การไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดมีน้ำหนักเฉลี่ยเพียง 4.0 กรัม/ถุง

ผลผลิตรวมของเห็ดเมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ที่ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (1.1-34.3%) เมื่อเปรียบเทียบกับการไม่ฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ ซึ่งมีน้ำหนักรวม 140 กรัม/ถุง ได้แก่ B003-015, B003-034, B004-013, B004-029, B004-035, B004-041, B004-042, B004-043, B006-017, B006-018, B012-021, B012-022, B012-034, B010-047 และ B012-054 ส่วนแบคทีเรีย 7 ไอโซเลท ทำให้ผลผลิตเห็ดเฉลี่ยลดลง (1.4-8.2%) ได้แก่ B003-013, B003-043, B004-024, B004-027, B004-049, B010-041 และ B012-055

ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 สายพันธุ์ เพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป โดยพิจารณาจากไอโซเลทที่ให้น้ำหนักดอกเห็ดสูง ระยะเวลาในการออกดอกเร็ว และจำนวนดอกมาก เพื่อนำไปทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคราเขียวของเห็ดในโรงเรือนอีกครั้ง แบคทีเรียปฏิปักษ์ทั้ง 6 ไอโซเลท ได้แก่ B004-013, B006-017, B012-021, B012-022, B012-034 และ B012-054 จากการจำแนกพบว่า ทั้ง 6 ไอโซเลท เป็น *Bacillus* spp. โดยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-021, B012-022, B012-034 และ B012-054 แยกเชื้อมาจากถุงเห็ดหูหนูเป็นโรค สายพันธุ์ B004-013 และ B006-017 แยกได้จากดอกเห็ดนางฟ้าผิดปกติ

5. การทดสอบความสามารถของแบคทีเรียปฏิปักษ์ต่อการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือน

จากการนำแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกแล้วว่าส่งผลให้เห็ดออกดอกดี และให้ผลผลิตสูง มาทดสอบความสามารถในการควบคุมโรคราเขียวในโรงเรือนเพาะเห็ดอีกครั้งในช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิต 60 วัน ได้ผลการทดลอง (Table 2) ดังนี้

5.1 ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 1

ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอกของเห็ดนางฟ้ารุ่นที่ 1 การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 ใช้เวลาในการออกดอกเฉลี่ยของเห็ดน้อยที่สุดคือ 7.8 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 11.5 วัน ส่วนการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B006-017, B012-021, B004-013, B012-054 และ B012-034 ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 8.6, 9.6, 9.9, 10.6 และ 15.0 วัน ตามลำดับ ส่วนการฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ระยะเวลาเฉลี่ยในการออกดอก 8.8 วัน ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

5.2 จำนวนดอกเห็ด

จำนวนดอกเห็ดนางฟ้าเฉลี่ยสะสมในช่วงเก็บเกี่ยว 60 วัน พบว่าการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 ทำให้เห็ดออกดอกเฉลี่ยมากที่สุดคือ 21.0 ดอก/ถุง รองลงมาคือ การฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีจำนวนดอกเฉลี่ย 17.0 ดอก/ถุง การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B004-013, B012-021, B012-054, B006-017 และ B012-034 ทำให้เห็ดออกดอกเฉลี่ย 16.5, 16.4, 16.0, 16.0 และ 15.0 ดอก/ถุง ตามลำดับ ส่วนการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T. harzianum* จำนวนดอกเห็ดเฉลี่ยน้อยที่สุดคือ 14.0 ดอก/ถุง ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ

5.3 น้ำหนักผลผลิต

น้ำหนักเฉลี่ยสะสมของดอกเห็ดนางฟ้า ในช่วง

Table 2. Average yield of *Pleurotus pulmonarius* on sawdust supplemented with 5% rice bran + 1% $Ca(OH)_2$, sprayed with different isolates of antagonistic bacteria and *Trichoderma harzianum* during 60 days of harvesting.

Treatment	No. of days from exposure to 1st cropping	No. of basidiocarps/bag	Cumulative yield (g/bag)	% increase	% infected bag
1. Bacteria B004-013+ *T. harzianum*	9.9	16.5	192.0 b	9.5	73.3a
2. Bacteria B006-017+ *T. harzianum*	8.6	16.0	244 ab	39.4	23.3c
3. Bacteria B012-021+ *T. harzianum*	9.6	16.4	190.7b	8.0	63.0ab
4. Bacteria B012-022+ *T. harzianum*	7.8	21.0	300.0a	71.1	6.7c
5. Bacteria B012-034+ *T. harzianum*	15.0	15.0	183.5b	4.7	73.3a
6. Bacteria B012-054 *T. harzianum*	10.6	16.0	187.5b	7.0	80.0a
7. *T.harzianum* (control)	11.5	14.0	175.3b	0.0	80.0a
8. Distilled water (check)	8.8	17.0	191.7b	8.8	33.3bc
C.V. (%)	27.1	16.8	14.6	-	23.9
F-test	ns	ns	*		**

Means followed by the same letter in a column are not significantly different at the 5% level by DMRT.

เก็บเกี่ยว 60 วัน พบว่าการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 น้ำหนักเห็ดเฉลี่ยมากที่สุดคือ 300.0 กรัม/ถุง รองลงมาคือ ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B006-017 น้ำหนักเฉลี่ย 244.3 กรัม/ถุง มีน้ำหนักดอกเพิ่ม 71.1 และ 39.4% ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T. harzianum* ให้น้ำหนักเฉลี่ยสะสมน้อยสุดคือ 175.3 กรัม/ถุง ส่วนการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-034, B012-054, B012-021 และ B004-013 น้ำหนักเฉลี่ย 183.5, 187.5, 190.7 และ 192.0 ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับการฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อมีน้ำหนักเฉลี่ย 191.7 กรัม/ถุง ให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ

5.4 เปอร์เซ็นต์ถุงเห็ดนางฟ้าที่เป็นโรค

เมื่อทำการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ต่างๆ ก่อน 2 วัน แล้วฉีดพ่นตามด้วยเชื้อ *T. harzianum* เปรียบเทียบกับการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* เพียงอย่างเดียว พบว่าภายในระยะเวลา 5 วัน ถุงเห็ดแสดงอาการเกิดโรค ปรากฏสปอร์สีเขียวขึ้นภายในถุงเห็ดนางฟ้าที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* โดยทำให้ถุงเห็ดเกิดโรคถึง 80.0% ส่วนการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ผสมกับเชื้อ *T. harzianum* ถุงเห็ดแสดงอาการเกิดโรคในระยะเวลา 10 วันหลังจากฉีดพ่น การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 ทำให้ถุงเห็ดนางฟ้าเกิดโรคน้อยที่สุดคือ 6.7% รองลงมาคือ การฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B006-017 ทำให้ถุงเห็ดนางฟ้าเกิดโรค 23.3% ส่วนการฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-021, B004-013, B012-034 และ B012-054 ทำให้ถุงเห็ดนางฟ้าเกิดโรค 63.0, 73.3, 73.3% และ 80% ตามลำดับ ในขณะที่การฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ ทำให้ถุงเห็ดเป็นโรค 33.3% ให้ค่าความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญยิ่ง (Table 2)

การเกิดโรคของถุงเห็ดนางฟ้า เมื่อสังเกตภายในถุงเห็ดจะปรากฏสปอร์สีเขียวของเชื้อ *T. harzianum* โรคเริ่มแสดงอาการครั้งแรกกับถุงเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T.*

harzianum หลังจากฉีดพ่นเชื้อ 5 วัน ส่วนถุงเห็ดที่มีการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์เห็ดจะแสดงอาการเกิดโรคหลังจากฉีดพ่นเชื้อ 10 วัน ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคประมาณ 30 วัน หลังจากนั้นตรวจสอบการเกิดโรคอีกครั้งในวันที่ 50 พบว่าไม่ปรากฏสปอร์สีเขียวของเชื้อ *T. harzianum* บนถุงเห็ดที่เป็นโรค แต่ถุงเห็ดที่เคยถูกเชื้อ *T. harzianum* เข้าทำลาย เกิดอาการเน่าเละ เส้นใยเห็ดเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลทำให้เห็ดไม่ออกดอก

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ของเชื้อราเขียว (*T. harzianum*) จากแหล่งต่างๆ คือ ถุงเห็ดเป็นโรค ถุงเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดที่มีลักษณะผิดปกติ พบว่ามีแบคทีเรียปฏิปักษ์ในปริมาณค่อนข้างสูงโดยมีปริมาณเฉลี่ย 65.5% (54.7-70.4%) ของประชากรแบคทีเรียทั้งหมด แบคทีเรียเหล่านี้จะมีผลต่อการระบาดของราเขียวในโรงเรือนเห็ดได้ ในการแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่อาศัยร่วมกับถุงเห็ดเป็นโรค และจากแหล่งอื่นๆ ที่ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อโรค สามารถใส่สปอร์เชื้อ *T. harzianum* ลงไปผสมกับตัวอย่างก่อนจะนำไปเพาะเลี้ยงในจานเลี้ยงเชื้อ (pour plate) จะสามารถแยกแบคทีเรียปฏิปักษ์ออกจากพวกที่ไม่เป็นปฏิปักษ์ได้ทันที เป็นวิธีการง่าย สะดวก ใช้ระยะเวลา 2 วัน ก็สามารถคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ และแบคทีเรียที่ได้จะมีประสิทธิภาพสูง โดยเลือกเก็บเฉพาะโคโลนีแบคทีเรีย ที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใยเชื้อราไม่ให้สามารถเจริญเข้ามาใกล้บริเวณที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ ซึ่งจะปรากฏลักษณะวงใสเกิดขึ้น วงใสที่มีขนาดใหญ่ย่อมแสดงว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทนั้นมีประสิทธิภาพสูงในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์ ซึ่งเบื้องต้นสามารถเก็บแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้จำนวน 174 ไอโซเลท

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์กับเส้นใยเห็ด พบว่ามีเพียง 12 ไอโซเลทเท่านั้นที่ทำให้เส้นใยเห็ดไม่สามารถเจริญเข้าใกล้แบคทีเรียที่ขีดไว้ได้ ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สร้างสารปฏิชีวนะได้หลายชนิด ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* และเส้นใยเห็ดได้ด้วย แบคทีเรียส่วนที่เหลือพบว่าสามารถส่งเสริมให้เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีขึ้น และเมื่อคัดเลือกต่อไป พบว่ามีเพียง 28 ไอโซเลทที่มีประสิทธิภาพสูง สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกในจานอาหาร PDA ในระยะเวลา 25 วัน น่าจะเป็นเพราะว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์นอกจากผลิตสารปฏิชีวนะได้แล้ว ยังผลิตสารอื่นๆ ที่มีประโยชน์ในด้านส่งเสริมให้เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีและสามารถสร้างตุ่มดอกได้ในสภาวะที่มีอาหารเหมาะสม จากการศึกษาเบื้องต้นของ Stanek (1974b) พบว่าแบคทีเรียที่อยู่ร่วมกันกับเห็ดกระดุมมีประโยชน์ในด้านการปรับความเหมาะสมของธาตุอาหารในวัสดุเพาะ ทำให้เส้นใยเห็ดมีความสมบูรณ์ นอกจากนี้ Stanek (1974a) ยังรายงานว่าแบคทีเรียที่อาศัยร่วมกับเส้นใยเห็ดเป็นแบคทีเรียพวกที่ทนร้อน (thermotolerant) สามารถผลิตสารพวกเซลลูโลส เช่น โพลีแซคคาไรด์ และวิตามินบางชนิด ที่เป็นประโยชน์ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ด ส่วนแบคทีเรียปฏิปักษ์ไอโซเลทอื่นๆ ที่ไม่ทำให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกอาจเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์เหล่านั้นอาจจะผลิตสารที่มีประโยชน์ได้แต่สร้างในปริมาณน้อย จึงไม่สามารถที่กระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกได้ จากการทดลองของ Eger (1963 อ้างโดย Hume และ Hayes 1974) ในเห็ดกระดุม พบว่าแบคทีเรีย *P. putida* และ *Pseudomonas* Group IV สามารถกระตุ้นให้เห็ดกระดุมสร้างตุ่มดอก นอกจากนี้ยังพบแบคทีเรียที่มีคุณสมบัตินี้อยู่ในสกุล *Bacillus* และ *P. fluorescenses* อีกด้วย (Stanek, 1974a; Hume and Hayes, 1974; Singh and Singh, 2001)

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่กระตุ้นให้เห็ดสร้างตุ่มดอก และยับยั้งเชื้อ *T. harzianum* พบว่าแบคทีเรียทั้ง 28 ไอโซเลท ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก เมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ก็พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์จำนวน 22 ไอโซเลทเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเส้นใย *T. harzianum* ได้ อาจเกิดจากประสิทธิภาพของตัวเชื้อแบคทีเรียเอง กล่าวคือ แบคทีเรียเมื่อเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลานาน หรือการย้ายเชื้อเพื่อเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้ประสิทธิภาพหรือความสามารถในการเป็นเชื้อปฏิปักษ์เปลี่ยนแปลงหรือลดลงไปได้ จึงทำให้แบคทีเรียอีก 6 ไอโซเลท ไม่มีความสามารถในการเป็นแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้อีกต่อไป

การทดสอบเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 22 ไอโซเลท ที่สามารถกระตุ้นให้เห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอก และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ *T. harzianum* บนจานอาหารเลี้ยงเชื้อแล้ว ขั้นตอนต่อไปคือ การนำไปทดสอบความสามารถในการกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอกในโรงเรือนเห็ด พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ทำให้เปอร์เซ็นต์ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น (1.1-34.3%) การที่แบคทีเรียทั้งหมดไม่สามารถทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นทุกไอโซเลท อาจเป็นไปได้ว่าการผลิตสารที่มีประโยชน์เพื่อกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอกมากขึ้นและให้น้ำหนักเห็ดเพิ่มขึ้นนั้น เกิดได้ดีในสภาพที่แบคทีเรียปฏิปักษ์อยู่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีธาตุอาหารสมบูรณ์มากกว่าอยู่ในวัสดุเพาะเห็ด ดังนั้นการจะใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียปฏิปักษ์ให้มีประสิทธิภาพเป็นที่น่าพอใจในสภาพธรรมชาติ จึงควรศึกษาถึงการผลิตสูตรตำรับซึ่งมีแหล่งพลังงานที่เหมาะสมเป็นส่วนประกอบเพื่อให้แบคทีเรียปฏิปักษ์สามารถผลิตสารปฏิชีวนะได้ดี และสามารถควบคุมการเกิดโรคได้เช่นเดียวกับการทดสอบในห้องปฏิบัติการ และเมื่อพัฒนาสูตรตำรับที่มีประสิทธิภาพแล้ว การนำไปใช้ควบคุมโรคราเขียวในเห็ดโดยเกษตรกรจะมีแนวโน้มประสบความสำเร็จมากยิ่งขึ้น

หลังจากนั้นได้คัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ให้ผลผลิตเห็ดสูง จำนวน 6 ไอโซเลท และเมื่อจำแนกชนิดพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus* sp. จากการศึกษาพบว่า *Bacillus* sp. สามารถผลิตสารปฏิชีวนะ (Katz and Kemain, 1977) ซึ่งมีฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Boer and Diderichsen, 1991) เช่น *B. brevis* สามารถผลิตสาร gramicidin S (Ovchinnikov and Lvanov, 1982) ซึ่งเป็นสารปฏิชีวนะที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการงอกของคอนิเดีย (Edwards and Seddon, 1992 อ้างโดย นริสา จันทร์เรือง, 2543) *B. subtilis* ผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น iturin จะออกฤทธิ์ต่อต้านเชื้อราและยีสต์ (Sandrin *et al*., 1990) surfactin เป็นสารปฏิชีวนะที่ยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ (Cooper *et al*., 1981)

การทดสอบแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 6 ไอโซเลท ต่อการควบคุมโรคราเขียว *T. harzianum* ในโรงเรือนซึ่งเป็นไอโซเลทที่ทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้นสูงสุด ได้แก่ แบคทีเรียปฏิปักษ์ *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-021, B012-022, B012-034, B012-054, B004-013 และ B006-017 โดยปลูกเชื้อร่วมกับ *T. harzianum* เพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคของเชื้อราในสภาพโรงเรือนทดลอง พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์เชื้อ *Bacillus* สายพันธุ์ B012-022 และ B006-017 มีประสิทธิภาพในการควบคุมการเกิดโรคได้ดีที่สุด ให้ผลผลิตเห็ดสูงสุด และทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดรุ่นที่ 1 เร็วขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับงานทดลองของ Curto และ Favelli (1974) ที่พบว่าการฉีดพ่นเซลล์แขวนลอยเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ลงบนดินที่ปิดผิวหน้า (casing) แปลงเพาะเห็ดกระดุมสามารถทำให้ผลผลิตเห็ดเพิ่มขึ้น 37% และระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดจะเร็วขึ้น การที่ฉีดพ่นน้ำกลั่นเพียงอย่างเดียว ให้ผลผลิตน้อยกว่าการฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T. harzianum* เพียงอย่างเดียว เนื่องจากมีการระบาดของเชื้อ *T. harzianum* จากถุงใกล้เคียง ทำให้เกิดโรคถึง 33.3%

ถุงเห็ดที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* เพียงอย่างเดียว จะแสดงอาการเกิดโรคเร็วและรวดเร็วกว่าการฉีดพ่นแบคทีเรียปฏิปักษ์ร่วมด้วย ระยะเวลาในการแสดงอาการของโรคในถุงเห็ดที่ฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์และเชื้อ *T. harzianum* ประมาณ 30 วัน หลังจากนั้นเมื่อตรวจสอบอาการของโรคอีกครั้ง ในวันที่ 50 ของการทดสอบโรค พบว่าอาการของโรคปรากฏไม่ชัดเจน โดยสังเกตเห็นเส้นใยเห็ดนางฟ้าเกิดอาการเน่ามีสีน้ำตาลอ่อนไม่ปรากฏสปอร์สีเขียวของเชื้อ *T. harzianum* ได้ชัดเจนเหมือนระยะแรกของการเกิดโรค และถุงเห็ดที่ถูกเชื้อเข้าทำลายจะยังคงให้ดอกเห็ดอยู่ แต่ให้ในปริมาณที่น้อยลง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์ที่ทำการฉีดพ่นบนก้อนเชื้อเห็ดก่อนที่จะฉีดพ่นด้วยเชื้อ *T. harzianum* แบคทีเรียปฏิปักษ์มีการเจริญ และเข้าครอบครองพื้นที่ได้ดีกว่าเชื้อ *T. harzianum* เพื่อหาอาหาร และสามารถอยู่รอดได้ เมื่อมีเชื้อ *T. harzianum* เข้าไปภายหลัง เชื้อ *T. harzianum* จึงไม่สามารถเข้าแก่งแย่งพื้นที่ครอบครองจากแบคทีเรียปฏิปักษ์ได้ ส่งผลให้เชื้อ *T. harzianum* ไม่สามารถเจริญได้ และไม่แสดงอาการเกิดโรคในที่สุด

ดังนั้นการใช้แบคทีเรียปฏิปักษ์ เช่น *Bacillus* sp. สายพันธุ์ B012-022 และ B006-017 ฉีดพ่นก่อนการเกิดโรคน่าจะมีผลในการควบคุมโรคที่เกิดจากเชื้อ *T. harzianum* ในเห็ดได้ดี นอกจากนี้ยังพบว่าแบคทีเรียทั้ง 2 ไอโซเลท ทำให้ระยะเวลาในการออกดอกของเห็ดเร็วขึ้น

สรุป

จากการแยกเชื้อแบคทีเรียปฏิปักษ์ จำนวน 174 ไอโซเลท จากแหล่งต่างๆ คือ ถุงเห็ดที่เป็นโรคราเขียว ถุงเห็ดปกติ ดอกเห็ดปกติ และดอกเห็ดผิดปกติ เชื้อทั้ง 174 ไอโซเลทนี้สามารถยับยั้งการเจริญของราเขียว (*T. harzianum*) โดยสามารถทำให้เกิดวงใส (clear zone) ระหว่างโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา และเมื่อนำแบคทีเรียทั้ง 174 ไอโซเลท มาศึกษาปฏิกิริยาสัมพันธ์กับเส้นใยเห็ดนางฟ้า (*P. pulmonarius*) พบว่ามีจำนวน 28 ไอโซเลท สามารถกระตุ้นให้เส้นใยเห็ดนางฟ้าสร้างตุ่มดอกในจานเลี้ยงเชื้อได้ ต่อมาได้ทำการคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์เหลือ 22 ไอโซเลท ที่มีความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อ *T. harzianum* ได้ดีเพื่อใช้ศึกษาต่อไป

เมื่อนำแบคทีเรียปฏิปักษ์ 22 ไอโซเลท มาทดสอบผลต่อการออกดอกของเห็ดนางฟ้าในโรงเรือนเพาะเห็ดโดยฉีดเซลล์แขวนลอยแบคทีเรียแต่ละไอโซเลทลงที่ปากถุงก้อนเชื้อเห็ดนางฟ้า พบว่าผลผลิตรวมของเห็ดเมื่อฉีดพ่นด้วยแบคทีเรียปฏิปักษ์ 15 ไอโซเลท ทำให้ผลผลิตเฉลี่ยเพิ่มขึ้น (1.1-34.3%) เมื่อเปรียบเทียบกับผลผลิตที่ไม่ได้ฉีดพ่นแบคทีเรียทำการคัดเลือกแบคทีเรียจำนวน 6 ไอโซเลท คือ B004-013, B006-017, B012-21, B012-21, B012-022, B012-034 และ B012-054 เพื่อใช้ศึกษาความสามารถในการควบคุมโรคราเขียวของเห็ดนางฟ้าในโรงเรือนต่อไป การศึกษาคุณสมบัติของเชื้อแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทในเบื้องต้นพบว่าเป็นแบคทีเรียสกุล *Bacillus*

นำแบคทีเรียทั้ง 6 ไอโซเลทที่คัดเลือกได้คือมีความสามารถยับยั้งการเจริญของราเขียว *T. harzianum* และกระตุ้นให้เห็ดสร้างดอกมากขึ้น มาใช้ควบคุมโรคราเขียวของเห็ดในโรงเรือนอีกครั้งในช่วงเก็บเกี่ยวผลผลิต 60 วัน พบว่าแบคทีเรียปฏิปักษ์สายพันธุ์ B012-022 มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคราเขียว และให้ผลผลิตเห็ดเฉลี่ยดีที่สุด คือ ถุงเห็ดเป็นโรคมีเพียง 6.7% ผลผลิตเฉลี่ย 300.0 กรัม/ถุง ซึ่งสูงกว่าชุดควบคุมที่ฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* 71.1% ส่วนการฉีดพ่นเฉพาะเชื้อ *T. harzianum* ทำให้ถุงเห็ดเกิดโรคมากที่สุดคือ 80.0% เห็ดให้ผลผลิตเฉลี่ยเพียง 175.3 กรัม/ถุง ส่วนถุงเห็ดที่ฉีดพ่นน้ำกลั่นนึ่งฆ่าเชื้อ เกิดโรค 33.3% และเห็ดให้ผลผลิต 191.7 กรัม/ถุง (8.8%) สาเหตุที่เกิดโรคกับถุงที่ไม่ได้ฉีดพ่น *T. harzianum* เนื่องจากมีการระบาดของโรคเกิดขึ้นภายในโรงเรือน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนจากศูนย์วิจัยควบคุมศัตรูพืชโดยชีวินทรีย์แห่งชาติภาคใต้ สภาวิจัยแห่งชาติ และบางส่วนจากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ผู้เขียนใคร่ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ศูนย์ฯ ทุกท่านที่ช่วยเหลืออนุเคราะห์สถานที่ และอุปกรณ์ต่างๆ เพื่อการวิจัย

เอกสารอ้างอิง

กองบรรณาธิการ. 2544. ฟาร์มเห็ดสงขลาระทม “ราสีเขียว” ระบาดหนัก. นิตยสารเส้นทางเกษตร 1: 87-80.

นริสา จันทร์เรือง. 2543. การคัดเลือกแบคทีเรียปฏิปักษ์ในการควบคุมเชื้อ *Phytophthora botryosa* ของยางพาราโดยชีววิธี. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาโรคพืชวิทยา มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์.

ประไพศรี พิทักษ์ไพรวัน. 2542. โรคเห็ดในการบริหารศัตรูเห็ด. กองส่งเสริมพืชสวน กรมส่งเสริมการเกษตร หน้า 16-40.

Beyer, D.M., Wuest, P.J. and Anderson, M.G. 2001. Green mold of mushrooms. [online]. Available from http://www.personal.psy.edu/users/m/g/mga3/GMEB. Html [2001 June 25].

Boer, A.S. and Diderichsen, B. 1991. On the safety of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 36: 1-4.

Castle, A., Speranizini, D., Rghei, N., Alm, G., Rinder, D. and Bissett. J. 1998. Morphological and molecular identification of *Trichoderma* isolates on north American mushroom farms. Appl. Environ. Microbiol. 64: 133-137.

Cooper, D.G., MacDonald, C.R., Duff, S.J.B. and Kosaric, N. 1981. Enhanced production of surfactin by *Bacillus subtilis* by continuous remove and metal cation additions. Appl.Environ. Microbiol. 42: 408-412.

Curto, S. and Favelli, F. 1974. Stimulative effect of certain micro-organisms (bacteria, yeasts, micro-algae) upon fruit-body formation of *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. Mush. Sci. 8: 67-73.

Hume, D.P. and Hayes, W.A. 1974. The production of fruit-body primordia in *Agaricus bisporus* (Lange) Sing. on agar media. Mush. Sci. 8: 527-531.

Katz, E. and Kemain, A.L. 1977. The peptide antibiotics of *Bacillus*: chemistry, biogenesis and possible functions. Bact. Rev. 41: 499-574.

Ospina-Giraldo, M.D., Royse, D.J., Chen, X. and Romaine, C.P. 1999. Molecular phylogenetic analyses of biological control strains of *Trichoderma harzianum* and other biotype of *Trichoderma* spp. associated with mushroom green mold. Phytopathol. 89: 308-313.

Ovchinnikov, Y.A. and Lvanov, V.T. 1982. The cyclic peptides, structures, conformation and function. **In**: The protein. (eds. H. Neurath and R.L.Hill.) Vol.5, pp.310-642. New York: Interscience Publishers.

Romaine, C.P., Royse, D.J., Wuest, P.J. and Beyer, D.M. 1996. Mushroom green mold: cause, epaphic factors & control. Mush. News. 44: 20-23.

Sandrin, C., Peypoux, F. and Michel, G. 1990. Co-production of surfactin and iturin A, lipopeptides with surfactant and antifungal properties by *Bacillus subtilis*. Biotechnol. Appl. Biochem. 12: 370-375.

Sharma, H.S.S., Kilpatrich, M., Ward, F., Lyon, G. and Burns, L. 1999. Colonization of phase II compost by biotype of *Trichoderma harzianum* and the effect on mushroom yield and quality. Appl. Microbiol. Biotechnol. 51: 527- 578.

Seaby, D. 1998. *Trichoderma* as a weed mould or pathogen in mushroom cultivation. In *Trichoderma* and *Gliocladium* Basic Biology, Taxonomy and Genetic. (eds. G.E. Harman. and C.P. Kubicek). Vol.2, pp.267-285. London: Toylor & Francis Ltd.

Sinden, J. and Hauser, E. 1953. Nature and control of three mildew disease of mushroom in America. Mush. Sci. 2: 177-180.

Singh, M. and Singh, R.P. 2001. Siderophore producing bacteria - as potential biocontrol agents of mushroom disease. [online]. Available from http:// www. uio.no/conferences June2000.htm# Samuels[2001 July 3].

Stanek, M. 1974a. Bacteria associated with mushroom mycelium *Agaricus bisporus* (Lg.) Sing. in hyphosphere. Mush. Sci. 8: 197-207.

Stanek, M. 1974b. Microorganisms inhibiting mushroom compost during fermentation. Mush.Sci. 8: 797-809.

Staunton, L. 1987. *Trichoderma* green mold in mushroom compost. The Mush. J. 179: 362-363.