



เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส์

วราภรณ์ แก้วคอน

โปรแกรมวิชา ชีววิทยา

คณะครุศาสตร์

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

(งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากมหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย)

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยในครั้งนี้สำเร็จลงด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาในการให้คำแนะนำตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องจากอาจารย์นิคม นาคสุพรรณ อาจารย์ประจำสาขาวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยพะเยา ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ในโอกาสนี้ ขอขอบคุณทีมงานวิจัย ผศ.ดร.สมบูรณ์ คำเตจา และอาจารย์ปรีดาภรณ์ สุวรรณดี ที่ช่วยในการตรวจสอบและวิเคราะห์ข้อมูลในการทำวิจัยครั้งนี้ให้มีความสมบูรณ์มากขึ้น

ขอขอบคุณ คณบดีและผู้บริหารคณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงรายทุกท่านที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการทำวิจัยจนสำเร็จด้วยดี

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนา มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย ที่ให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนทุนวิจัย ปีงบประมาณ ๒๕๖๗ เพื่อทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยหวังว่ารายงานวิจัยฉบับนี้คงเป็นประโยชน์สำหรับหน่วยงานที่เกี่ยวข้องและผู้ที่เกี่ยวข้องศึกษาต่อไป

วราภรณ์ แก้วคอน

มกราคม ๒๕๖๘

ชื่อเรื่อง : เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีตส์

ชื่อผู้วิจัย : นางสาว วราภรณ์ แก้วคอน และคณะ

สาขาวิชา/คณะ : สาขาวิชาชีววิทยา คณะครุศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยประจำปีงบประมาณ : 2567

ระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัยปี : มกราคม 2567 ถึง มกราคม 2568

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อสร้างต้นแบบผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* ชนิดเม็ดบีตส์ เพื่อความสะดวกในการใช้งาน ยืดอายุการเก็บรักษา และคงคุณสมบัติการมีชีวิตของสปอร์เชื้อรา โดยใช้วัสดุเพาะก้อนเห็ดเก่า ไดอะตอม แป้งมันสำปะหลัง และสปอร์แขวนลอยของเชื้อรา 2×10^7 โค尼เตียต่อมิลลิลิตร จากการศึกษา พบว่า สามารถผลิตและปั้นเม็ดบีตส์ได้ 4 กรรมวิธี โดยใช้ไไดอะตอม 0%, 10%, 20% และ 30% ตามลำดับ และเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ได้เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยที่สปอร์ของเชื้อราจากไตรโคเดอร์มาภายในเม็ดบีตส์ มีชีวิตและสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อราได้ จากนั้นจึงนำไปทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหน่อข้าวขึ้น เป็นระยะเวลา 2 เดือน พบว่า ผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีตส์ 5-15 เม็ดต่อดินเพาะกล้า 1.5 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตด้านความสูงและจำนวนใบได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมลบ (ไม่ใส่ปุ๋ย) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด 15 เม็ดต่อดิน 1.5 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูงและจำนวนใบได้ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี (กลุ่มควบคุมบวก) จึงสรุปได้ว่า สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*T. longibrachiatum*) ในรูปแบบเม็ดบีตส์ มีความสะดวกในการใช้งานมากขึ้น ช่วยยืดอายุการเก็บรักษาและคุณสมบัติของสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาได้ดี และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

คำสำคัญ : เชื้อราไตรโคเดอร์มา หัวเชื้อสดไตรโคเดอร์มา เม็ดบีตส์

Research Title : *Trichoderma* Beads

Author : Waraporn Kaewkhon

Faculty : Biology, Education

Fiscal Year : 2024

Year of Research : January 2024 to January 2025

Abstrat

The objective of this research is to develop a pellet of *Trichoderma longibrachiatum* for convenient usage, prolonged storage life, and maintenance of spore viability. By using spent mushroom substrate (SMS), diatomaceous earth (DE), cassava starch, and a spore suspension of the *Trichoderma* 2×10^7 conidia/ml. From the study, it was found that *Trichoderma* beads can be produced and molded using four methods with DE content of 0%, 10%, 20%, and 30%, respectively. Then it can be stored at 4 °C for 60 days. The *Trichoderma* beads contain alive *Trichoderma* spores that can proliferate on culture medium. After that, it was tested for its efficiency in promoting the growth of Ruzi grass for 2 months. The results found that *Trichoderma* beads, 5-15 beads per 1.5 kg of seeding soil, significantly promote growth of height and number of leaves when compared to the control group (no fertilizer) with statistical significance ($P < 0.05$). In addition, by using *Trichoderma* beads, 15 beads per kg of seeding soil show the effectiveness in promoting growth in terms of height and number of leaves is comparable to the use of chemical fertilizers (positive control group). It can be concluded that the *Trichoderma* bead, a bio-product from *T. longibrachiatum*, is more convenient to use, helps extend the shelf life and properties of *Trichoderma* spores effectively, and is efficient in promoting plant growth.

Keywords : *Trichoderma*, fresh *Trichoderma* culture, Bead

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ii
บทคัดย่อ	iii
Abstract	iv
สารบัญ	v
สารบัญตาราง	vii
สารบัญภาพ	viii
 บทที่	
1 บทนำ	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย	3
ประโยชน์ของงานวิจัย	3
ขอบเขตของงานวิจัย	3
นิยามศัพท์เฉพาะ	4
2 แนวคิด ทฤษฎี เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	
แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง	5
งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	7
ข้อสรุปงานแนวคิดและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	9
3 วิธีดำเนินการวิจัย	
การเตรียมวัสดุในการผลิตเม็ดบีดส์	10
การเตรียมสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา	10
กระบวนการผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์	10
การทดสอบความมีชีวิตของเชื้อราไตรโคเดอร์มา	11
การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์ต่อการเจริญเติบโตของพืช	11
การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	11

สารบัญ (ต่อ)

บทที่	หน้า
4 ผลการวิจัย	
การคัดเลือกก้อนเห็ดเก่า	12
การเตรียมชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปหัวเชื้อสด	13
การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสด้วยเครื่องอัดเม็ด	14
การทดสอบลักษณะทั่วไปของเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส	14
การทดสอบการมีชีวิตรอดของเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส	16
การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสต่อพืช	18
5 สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ	
สรุปผลการวิจัย	22
อภิปรายผลการวิจัย	22
ข้อเสนอแนะ	24
บรรณานุกรม	25
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก ต้นแบบผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา.....	28
ภาคผนวก ข วารสารตีพิมพ์.....	31
ประวัติผู้วิจัย	38

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	กรรมวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดบีดส์	14
2	ลักษณะทั่วไปเชื้อรา <i>T. longibrachiatum</i> ในรูปแบบเม็ดบีดส์	16
3	ความสูงเฉลี่ยของต้นหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ ในระยะเวลา 2 เดือน	19
4	จำนวนใบเฉลี่ยของต้นหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ ในระยะเวลา 2 เดือน	20

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะทางกายภาพของก้อนเห็ดภายหลังการเก็บผลผลิตในโรงเพาะเห็ด	13
2	เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงบนอาหาร Cooked-rice media เวลา 5 - 7 วัน ..	14
3	ลักษณะภายนอกของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์	15
4	การเจริญของสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM	17
5	การศึกษาการเจริญเติบโตของหนักรูซี่ ระยะเวลา 1 สัปดาห์	19
6	การศึกษาการเจริญเติบโตของหนักรูซี่ ระยะเวลา 4 สัปดาห์	21
7	การศึกษาการเจริญเติบโตของหนักรูซี่ ระยะเวลา 8 สัปดาห์	21

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันการผลิตพืชทางการเกษตรเน้นความปลอดภัยและตระหนักถึงสารเคมีที่ตกค้างในผลผลิตทางการเกษตรมากขึ้น ทำให้มีการกำหนดเงื่อนไขสินค้าการเกษตรภายในและภายนอกประเทศต้องไม่มีสารเคมีตกค้างในผลผลิตเกินมาตรฐานที่กำหนด เกษตรกรจึงจำเป็นต้องผลิตสินค้าเกษตรโดยลดการใช้สารเคมีและเน้นการใช้สารชีวภัณฑ์เพื่อควบคุมโรคและศัตรูพืชตามแบบชีววิถี สารชีวภัณฑ์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่ใช้ป้องกันศัตรูพืชซึ่งพัฒนามาจากสิ่งมีชีวิต สามารถแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ (1) กลุ่มรา เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา เชื้อบิวเวอร์เรีย เชื้อราเมตาไรเซียม (2) กลุ่มแบคทีเรีย เช่น เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัส และ (3) กลุ่มไวรัส เช่น ไวรัสเอ็นพีวี (กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2563) ซึ่งสารชีวภัณฑ์แต่ละชนิดจะมีวิธีการควบคุมศัตรูและโรคพืชที่แตกต่างกัน เช่น เชื้อราบิวเวอร์เรีย เชื้อราเมตาไรเซียม และเชื้อไวรัสเอ็นพีวี เน้นการทำลายแมลงศัตรูพืช ในขณะที่เชื้อแบคทีเรียบาซิลลัสและเชื้อราไตรโคเดอร์มาเน้นการควบคุมโรคพืช เกษตรกรจึงต้องมีการสังเกตสาเหตุของการเกิดโรคและศัตรูพืชที่ทำลายผลผลิตอย่างสม่ำเสมอเพื่อเลือกใช้สารชีวภัณฑ์ให้เหมาะสมกับการควบคุมโรคและศัตรูพืช

เชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นสารชีวภัณฑ์ที่เกษตรกรส่วนใหญ่ที่ได้รับการอบรมจากหน่วยงานเกษตรมีความรู้ความเข้าใจเป็นอย่างดีเกี่ยวกับวิธีการเตรียม การใช้ในการควบคุมโรค และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช แต่เนื่องจากการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นการใช้เพื่อควบคุมและป้องกันการเกิดโรคในพืช เป็นสารชีวภัณฑ์ที่มีชีวิตต้องมีระยะเวลาในการเจริญเติบโต ดังนั้นมีนำมาใช้ในการควบคุมหรือป้องกันโรคจึงให้ผลช้ากว่าการใช้ปุ๋ยหรือสารเคมี และมีข้อจำกัดที่ยู่งยากกว่าการใช้สารเคมีสำเร็จรูป เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นสิ่งมีชีวิตที่ไม่ทนทานกับการสัมผัสแสงแดดจัดโดยตรง เมื่อนำมาใช้ในการกำจัด โรคพืชไม่สามารถพ่นบริเวณที่ก่อโรคได้โดยตรง ต้องใช้ในปริมาณมากกว่าสารเคมี และต้องใช้บ่อยครั้งอย่างสม่ำเสมอ และมีความต่อเนื่องจึงจะเห็นผล มีวิธีในการเตรียมที่ยุ่งยาก เช่น เมื่อเลือกใช้ในรูปแบบของเชื้อสด ต้องมีการเตรียมล่วงหน้า อย่างน้อย 3-5 วัน จากนั้นจึงนำเชื้อสดไปละลายสปอร์จากเชื้อสดแล้วนำมาผสมกับน้ำเพื่อเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสปอร์พร้อมใช้ ซึ่งขั้นตอนนี้ใช้ระยะเวลาประมาณ 7 วัน กว่าจะได้เชื้อราในรูปแบบสปอร์ที่ละลายในน้ำ และเมื่อสปอร์อยู่ในรูปน้ำจะมีระยะเวลาจำกัดไม่เกิน 7 วัน ต้องใช้ให้หมด ถ้าเก็บในตู้เย็นประสิทธิภาพของสปอร์เชื้อราจะลดลง และเมื่อต้องการใช้อีกครั้งก็ต้องเริ่มขั้นตอนการเตรียมใหม่ ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้สารเคมีที่ใช้ในปริมาณน้อยกว่า เห็นผลทันที จึงเป็นเหตุผลหนึ่งที่เกษตรกรบางส่วนยังไม่เลือกใช้สารชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาเนื่องจากมีความยุ่งยาก (ธิดารัตน์ เสือ

ทรงศีล และ พัทธราตรี ศรีบุญเรือง, 2561) ดังนั้น ถ้าต้องการสนับสนุนให้เกษตรกรเลือกใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มามากขึ้น รูปแบบของเชื้อราไตรโคเดอร์มาต้องมีความเหมาะสมกับวิถีชีวิตของเกษตรกรมากขึ้น ทางผู้วิจัยจึงมุ่งเน้นไปที่การพัฒนาารูปแบบเม็ดบีดส์ที่ง่ายต่อการใช้งานของเกษตรกร เพื่อให้เกษตรกรสามารถหว่านเม็ดบีดส์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาลงไปในพื้นที่การเกษตรได้สะดวกมากขึ้น แม้ว่าในปัจจุบันร้านเกษตรจะมีเชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปแบบที่หลากหลายมากขึ้น เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดน้ำ (1L ราคา 250-300 บาท) ชนิดสเปรย์ (500 ml ราคา 200-250 บาท) ชนิดผงเพื่อเตรียมเชื้อสด (1kg ราคา 280-300 บาท) แต่ทั้งนี้เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นสิ่งมีชีวิต หากมีวิธีการเตรียมไม่ถูกวิธีหรือเก็บรักษาไว้ในสภาพแวดล้อมไม่เหมาะสม อาจจะทำให้ประสิทธิภาพของเชื้อราลดลง เช่น ชนิดน้ำและสเปรย์เก็บในตู้เย็นได้ไม่เกิน 3 เดือน ชนิดผงเก็บไว้ในที่อุณหภูมิห้อง (25-27 องศาเซลเซียส) มีอายุ 1 ปี จึงจะยังมีประสิทธิภาพและนำมาเพาะขยายต่อได้ นอกจากนี้ เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นสิ่งมีชีวิตที่เจริญเติบโตในดินและบริเวณระบบรากพืช จึงมีความจำเพาะของสปอร์ในดินแต่ละพื้นที่ และมีอายุขัยจำกัด หากเกษตรกรใช้แล้วเก็บไม่ถูกวิธีอาจจะมีการเสื่อมสภาพตามระยะเวลา ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืชหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชลดลง การพัฒนาเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่เน้นความสะดวกในการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา และช่วยยืดอายุในการเก็บเชื้อราไตรโคเดอร์มาแก่เกษตรกรทั่วไป ดังนั้นเมื่อเกษตรกรเลือกใช้สารชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาในการควบคุมโรคพืชหรือส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช จึงควรมีความสม่ำเสมอในการเติมเชื้อราไตรโคเดอร์มารูปเชื้อสดให้กับดินที่ทำการเพาะปลูกเป็นระยะและต่อเนื่อง เพื่อรักษาระบบนิเวศของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในดินเพาะปลูกให้มีความสมดุลย์ สามารถควบคุมโรคพืช เสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้กับรากของต้นพืช จนได้ผลผลิตที่มีความปลอดภัยและมีคุณภาพตามแนวทางเกษตรแบบชีววิถี

นโยบายของกรมส่งเสริมการเกษตรในปัจจุบันเน้นการผลิตสินค้าเกษตรที่ปลอดภัยและมีมาตรฐานเพื่อให้ได้ผลผลิตและผลิตภัณฑ์แปรรูปปลอดภัยเคมีหรืออยู่ในระดับที่ปลอดภัยกับผู้บริโภค โดยเน้นการส่งเสริมการใช้สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาแก่เกษตรกร ทำให้เกษตรกรส่วนใหญ่เลือกใช้สารชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาเพิ่มมากขึ้น ซึ่งหากไม่มีความรู้ความเข้าใจและทักษะในการเตรียมหัวเชื้อสดอย่างชำนาญ อาจส่งผลให้การใช้สารชีวภัณฑ์ของเกษตรกรไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอสำหรับการป้องกันและควบคุมโรคพืช จนเป็นต้นเหตุของการกลับไปเลือกใช้สารเคมีอีกครั้ง ดังนั้น ผู้วิจัยจึงมีแนวคิดที่จะสร้างเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด ภายใต้แนวคิด “เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ (*Trichoderma* beads)” เพื่อให้เม็ดบีดส์เป็นตัวกลางในการรักษาคุณสมบัติของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปแบบสปอร์ก่อนกลับลงสู่ดิน เพื่อช่วยปรับระบบนิเวศของเชื้อราในดินให้มีความเหมาะสม ส่งผลในการส่งเสริมการเจริญของพืชอย่างต่อเนื่อง ช่วยป้องกันควบคุมเชื้อราก่อโรค

พืช และเสริมสร้างระบบรากของพืชให้แข็งแรง จนสุดท้ายได้ผลผลิตทางการเกษตรที่มีความปลอดภัยและได้มาตรฐาน

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อสร้างต้นแบบชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* ชนิดเม็ดบีดส์ เพื่อความสะดวกในการใช้งาน ยืดอายุการเก็บรักษา และมีคุณสมบัติใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ประโยชน์ของการวิจัย

1. ได้ผลิตภัณฑ์ต้นแบบเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* เม็ดบีดส์ พร้อมบรรจุภัณฑ์
2. ผลิตภัณฑ์เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* เม็ดบีดส์ มีความสะดวกในการใช้งาน และยังคงมีคุณสมบัติใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

ขอบเขตและแนวทางของงานวิจัย

1. ขอบเขตด้านเนื้อหา

การสร้างต้นแบบชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ที่มีความสะดวกในการใช้งาน ยืดอายุการเก็บรักษา และมีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

2. ขอบเขตด้านประชากร

การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ต่อการเจริญเติบโตของหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ปลูกเมล็ดหญ้ารูซี่ 5 กระถางต่อซ้ำ จำนวน 3 ทรีตเมนต์

ทรีตเมนต์ที่ 1 กลุ่มควบคุมลบ (ไม่ใส่ปุ๋ยและเชื้อรา *Trichoderma* Beads)

ทรีตเมนต์ที่ 2 กลุ่มควบคุมบวก (ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15)

ทรีตเมนต์ที่ 3 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 1 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 4 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 5 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 5 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 10 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 6 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 15 เม็ด

3. ขอบเขตด้านระยะเวลา

3.1 การสร้างต้นแบบชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ระยะเวลา 6 เดือน

3.2 ศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้ารูซี่เลี้ยงสัตว์รูซี่ ระยะเวลา 2 เดือน

นิยามศัพท์เฉพาะ

สารชีวภัณฑ์ (microbial pesticide) หมายถึง กลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่มีประโยชน์ต่อการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช เช่น เชื้อราไตรโคเดอร์มา เชื้อจุลินทรีย์ไรโซแบคทีเรีย เพื่อพัฒนาเป็นดินสำหรับปลูกพืชแก่เกษตรกรได้

เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma*) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพสูง พบได้ทั่วไปในระบบนิเวศดิน มีลักษณะเส้นใยสีเขียว ปรับตัวเข้ากับสภาพแวดล้อมได้ดี และมีคุณสมบัติส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช และชักนำให้พืชมีความต้านทานเชื้อราก่อโรค

หญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) เป็นหญ้าที่ได้รับความนิยมในกลุ่มเกษตรกรที่ทำการเกษตรกึ่งปศุสัตว์ มีถิ่นกำเนิดจากทวีปแอฟริกาแถบประเทศคองโก (Congo) จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อว่าหญ้าม้าคองโก สามารถเจริญเติบโตได้ดีในประเทศเขตร้อน จึงนิยมปลูกเพื่อเป็นหญ้าสดเพื่อเป็นอาหารสัตว์

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎี เอกสารงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ผลิตภัณฑ์จากเชื้อราไตรโคเดอร์มาในปัจจุบันมีหลายรูปแบบ ทั้งนี้เพื่อเพิ่มความสะดวกสบายให้แก่เกษตรกร เนื่องจากกระบวนการเตรียมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสด มีขั้นตอนในการเตรียมค่อนข้างยุ่งยากประสิทธิภาพในการออกฤทธิ์ช้ากว่าการเลือกใช้สารเคมี และเกษตรกรบางส่วนยังขาดความรู้ความเข้าใจหลักการในการทำงานของเชื้อราไตรโคเดอร์มาจึงส่งผลให้ประสิทธิภาพการทำงานของเชื้อราลดลง ทำให้มีความจำเป็นต้องพัฒนาวิธีการเก็บรักษาเชื้อรา รูปแบบการนำไปใช้ และความสะดวกต่อการใช้งาน

แนวคิดและทฤษฎีที่เกี่ยวข้อง

ประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม ประชากรส่วนใหญ่ประกอบอาชีพเกษตรกรรม การพัฒนาประเทศจึงเน้นการพัฒนาทางการเกษตรเป็นอันดับแรก เพราะเป็นพื้นฐานให้ประชากรโดยรวมมีความเป็นอยู่ที่ดีและมีคุณภาพมากขึ้น การทำเกษตรกรรมในประเทศไทยมีหลายประเภท ได้แก่ การผลิตพืชเพื่อการบริโภคและการส่งออก เช่น ข้าว ยางพารา มันสำปะหลัง ผักและผลไม้ การผลิตพืชเพื่อเป็นอาหารสัตว์ เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลือง หญ้าเลี้ยงสัตว์ การเลี้ยงสัตว์เพื่อส่งออกและการบริโภคในประเทศ ซึ่งปัญหาในการทำเกษตรกรรมมีหลายอย่าง เช่น สภาพดินเพาะปลูกเสื่อมโทรม การระบาดของโรคพืชและศัตรูพืช การสร้างความต้านทานของแมลงศัตรูพืชต่อสารกำจัดศัตรูพืช สารพิษตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร (ชนวน รัตนวราหะ, 2550) ปัญหาจากโรคและแมลงศัตรูพืช เป็นปัจจัยสำคัญที่มีผลทำให้ผลผลิตของเกษตรกรลดลง ไม่เพียงพอต่อการบริโภคและการจำหน่าย เกษตรกรจึงเลือกใช้สารเคมีในการกำจัดโรคและศัตรูของพืช เนื่องจากสารเคมีสามารถกำจัดศัตรูและโรคพืชได้รวดเร็ว ใช้ง่ายและใช้ปริมาณน้อย ประหยัดแรงงาน กำจัดศัตรูพืชได้ทันระยะเวลาในการเก็บเกี่ยวผลผลิต แต่ขณะเดียวกันก็ส่งผลให้ต้นทุนการผลิตของเกษตรกรมีราคาสูงขึ้น นอกจากนี้ เกษตรกรบางส่วนยังขาดความรู้ความเข้าใจในการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคและศัตรูพืชที่ถูกต้อง จึงใช้สารเคมีแบบต่อเนื่อง ทำให้โรคและศัตรูพืชหลายชนิดเกิดความต้านทานต่อสารเคมี จึงต้องเพิ่มปริมาณการใช้สารเคมีหรือเลือกใช้สารเคมีที่มีความรุนแรงมากขึ้น ทำให้สารเคมีตกค้างในผลผลิต ระบบนิเวศดิน และสภาพแวดล้อม ก่อให้เกิดปัญหาด้านสุขภาพแก่เกษตรกร ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยง กรมส่งเสริมการเกษตรภายใต้สังกัดของกระทรวงเกษตรและสหกรณ์จึงมีกรมส่งเสริมให้เกษตรกรใช้สารชีวภัณฑ์ในการป้องกันและควบคุมศัตรูพืช โดยเน้นการให้ความรู้ความเข้าใจในการใช้สารชีวภัณฑ์มาตรฐาน คือ เชื้อราบีวเวอร์เรีย เชื้อราเมตาไรเซียม และเชื้อราไตรโคเดอร์มา (กรมส่งเสริมการเกษตร กระทรวงเกษตรและสหกรณ์, 2563)

เชื้อราไตรโคเดอร์มาเป็นเชื้อราที่มีคุณสมบัติและศักยภาพสูงในการใช้ควบคุมเชื้อราสาเหตุโรคพืช ตรงตามหลักการและแนวคิดของการควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชโดยชีววิธี เพราะเป็นเชื้อราที่สามารถดำรงชีวิตอยู่ในดินเกือบทุกประเภท โดยอาศัยซากพืช ซากสัตว์และอินทรีย์วัตถุเป็นแหล่งอาหาร เชื้อราไตรโคเดอร์มาจัดเป็นเชื้อราชั้นสูงที่สามารถกำจัดเชื้อราสาเหตุโรคพืชและชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อเชื้อโรคพืชได้ (จิระเดช แจ่มสว่าง, 2563) ในปัจจุบันมีงานวิจัยที่เน้นการศึกษาสายพันธุ์และทำการจัดจำแนกประเภทของเชื้อราไตรโคเดอร์มา โดยพบว่าเชื้อราไตรโคเดอร์มามีมากกว่า 100 สปีชีส์ (Druzhinina et al., 2006) และแต่ละสปีชีส์มีคุณสมบัติในการควบคุมโรคพืชแตกต่างกันไป เช่น เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ควบคุมโรคราเน่าสีเทาของสตรอเบอร์รี่ (Anita Puyam, 2016) เชื้อรา *Trichoderma hamatum* ควบคุมโรครากเน่าในแตงกวา (Khan et al., 2004) เชื้อรา *Trichoderma asperellum* ควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศ (วาริน อินทนา และคณะ, 2559) เชื้อราไตรโคเดอร์มาบางชนิดสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชและเพิ่มผลผลิตแก่พืชโดยสร้างเส้นใยที่สามารถเจริญเข้าไปในรากพืชและช่วยดูดซึมสารอาหารจากดินให้แก่พืช บางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์กลูคาเนสหรือเซลลูเลสเพื่อช่วยในการเปลี่ยนรูปสารอาหารของพืชในดินทำให้พืชดูดซึมไปใช้ได้มากขึ้น (สายทอง แก้วฉาย, 2555) เช่น เชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ส่งเสริมการเจริญเติบโตของข้าวหอมมะลิ (วราภรณ์ แก้วคอน และคณะ, 2563) เป็นต้น จึงเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะช่วยให้เกษตรกรสามารถลดการใช้สารเคมีในการกำจัดโรคพืชและยังช่วยส่งเสริมการเจริญของพืชทดแทนการใช้ปุ๋ยเคมีได้ ปัจจุบันสารชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มามีหลายรูปแบบ เช่น ผงหัวเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับการเตรียมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดสดด้วยเมล็ดข้าวฟ่างหรือข้าวเสาไห้ วิธีนี้ใช้ระยะเวลาในการเตรียมประมาณ 5-7 วัน เมื่อล้างสปอร์จากเมล็ดข้าวและอยู่ในรูปสปอร์แขวนลอยในน้ำแล้วควรใช้ให้หมดในครั้งเดียว เนื่องจาก เชื้อราจัดเป็นสิ่งมีชีวิต มีอายุขัย จึงควรใช้ขณะที่เชื้อราอยู่ในระยะกำลังเจริญ แต่หากเกษตรกรยังไม่พร้อมที่จะใช้เชื้อสด อาจจะเลือกใช้ชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาในรูปแบบผงหัวเชื้อแห้งสำหรับผสมน้ำเพื่อใช้พ่นบริเวณรอยโรคของพืช หรือหัวเชื้อชนิดอัดเม็ดเพื่อละลายในน้ำ แต่ทั้งนี้ประสิทธิภาพของเชื้อราย่อมขึ้นอยู่กับความมีชีวิตของสปอร์ภายหลังการละลายด้วยน้ำและต้องมีสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมเพื่อให้เชื้อราสามารถเจริญเติบโตและมีฤทธิ์ในการป้องกันและควบคุมโรคได้

การเกษตรกึ่งปศุสัตว์ เป็นการผลิตพืชเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ในประเทศไทยเริ่มมีแนวโน้มขยายตัวเพิ่มมากขึ้น ส่งผลให้ความต้องการวัตถุดิบสำหรับเป็นอาหารสัตว์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามไปด้วย เกษตรกรเลี้ยงสัตว์เริ่มมีความสนใจในการปลูกหญ้าเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์เพิ่มขึ้น สามารถแบ่งกลุ่มหญ้าอาหารสัตว์ได้ตามสภาพอากาศ คือ หญ้าอาหารสัตว์เขตร้อน และหญ้าอาหารสัตว์เขตอบอุ่น นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับวิธีการเจริญเติบโตและการให้ผลผลิตของสัตว์เคี้ยวเอื้อง (ศรัณย์พงศ์ ทองเรือง และคณะ, 2563) หญ้าที่นิยมปลูกเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์มีหลายชนิดขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมและชนิดของ

ดิน เช่น หญ้าเนเปียร์ หญ้ารูซี่ หญ้าแพงโกล่า เป็นต้น (สายัณห์ ทัดศรี, 2547) ทำให้คุณภาพของหญ้าอาหารสัตว์มีความสำคัญ ทั้งนี้หญ้าที่ ขึ้นเองในสภาพธรรมชาติก็สามารถนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงสัตว์ได้ แต่เนื่องจากมีคุณค่าทางโภชนาต่ำ และมักพบการตกค้างของสารเคมีในการกำจัดวัชพืชชนิดอื่น ทำให้อาจจะเกิดอันตรายต่อสัตว์เลี้ยงและส่งผลต่อการเจริญเติบโตของสัตว์ได้ ในขณะเดียวกันพื้นที่ สาธารณะที่หญ้าสามารถขึ้นได้เองเริ่มมีปริมาณลดลง จึงไม่เพียงพอต่อการบริโภคของสัตว์ จึงเป็น สาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกษตรกรหันมาสนใจในการปลูกหญ้าเพื่อเป็นอาหารสัตว์ในครัวเรือนเพิ่มมากขึ้น โดยเน้นการปลูกหญ้าเลี้ยงสัตว์ที่มีคุณค่าทางโภชนาการสูงและมีความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยง

หญ้ารูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) เป็นหญ้าที่นิยมปลูกเพื่อใช้เลี้ยงโคนม โคเนื้อ ในรูปหญ้าสด หญ้าแห้ง หรือหญ้าหมัก หญ้ารูซี่มีถิ่นกำเนิดมาจากแอฟริกา มีอายุหลายปี เจริญเติบโตได้ดีในดินแทบ ทุกชนิดที่มีการระบายน้ำดี เมื่อปลูกด้วยเมล็ด เจริญเติบโตเร็ว แตกกอดี มีใบอ่อนนุ่มที่ เหมาะกับสัตว์ และให้ผลผลิตเมล็ดสูง เกษตรกรจึงสามารถเก็บเมล็ดพันธุ์เพื่อใช้ในการปลูกขยายพันธุ์ต่อไปได้ เมื่อปลูกด้วยเมล็ด สามารถตัดครั้งแรกประมาณ 60-70 วันเพื่อใช้เป็นอาหารสัตว์ได้ และเมื่อตัดสูงจากพื้นดินประมาณ 10-15 เซนติเมตร หญ้าจะสามารถเจริญเติบโตอีกครั้ง และสามารถ ใช้เลี้ยงสัตว์ในรอบถัดไปประมาณ 30-45 วันหลังจากตัดครั้งแรก (สายัณห์ ทัดศรี, 2548) ดังนั้น เมื่อเกษตรกรลงทุนปลูกหญ้าเพียงครั้งเดียวและมีการบำรุงหญ้าตามแบบชีววิธี จึงมีส่วนช่วยให้สามารถเก็บเกี่ยวหญ้าเพื่อเป็นอาหารสัตว์ได้เป็นระยะเวลาหลายปี ช่วยลดต้นทุนค่าอาหารสัตว์ และมีความปลอดภัยต่อการใช้เลี้ยงสัตว์

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ประภาส กาวีชา และคณะ (2563) ศึกษาและพัฒนาเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด เพื่อยืดอายุการเก็บของเชื้อราไตรโคเดอร์มาและควบคุมราก่อโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ ซึ่งวางแผนศึกษาเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดในด้านสูตรห่อหุ้ม อุณหภูมิในการเก็บ และระยะเวลาในการเก็บ โดยกำหนดจำนวนสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ *Trichoderma asperellum* และ Sodium alginate ที่เท่ากัน จากนั้นเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1-9 เดือน ผลการศึกษาพบว่า สปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma asperellum* จากสูตร (Sodium alginate 0.88%+ glycerol 1.5%) ที่เก็บ ณ อุณหภูมิห้อง มีจำนวนสปอร์ที่รอดชีวิตสูงสุดที่ระยะเวลา 5 เดือน และเมื่อเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่า จำนวนสปอร์มีชีวิตรอดสูงสุดที่ระยะเวลา 9 เดือน และยังคงมีประสิทธิภาพในการควบคุมราก่อโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศในทุกสูตร

พลฤทธิ์ ทองคลี (2562) ศึกษาความเข้มข้นของสปอร์เชื้อรา *Trichoderma harzianum* และความเข้มข้นของกากน้ำตาลที่เหมาะสมต่อการผลิตปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดที่ผสมเชื้อรา *T. harzianum* โดยวางแผนการทดลองด้วยวิธีการสุ่มแบบสมบูรณ์ (Completely Randomized Design: CRD) จำนวน 20 ดำรับ จากนั้นศึกษาผลของความเข้มข้นสปอร์เชื้อรา *T. harzianum* และ

เปอร์เซ็นต์ของสารละลายกากน้ำตาลที่มีต่ออัตราการมีชีวิตรอด ปริมาณสปอร์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สมบัติทางกายภาพและทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ด จากผลการทดลอง พบว่า ความเข้มข้นสปอร์ 6.70×10^8 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับกากน้ำตาล 10% และ ความเข้มข้นสปอร์ 1.0×10^9 สปอร์ต่อมิลลิลิตร ผสมกับกากน้ำตาล 10% มีความเหมาะสมในการนำไปผลิตผลิตภัณฑ์อินทรีย์อัดเม็ดที่ผสมเชื้อรา *T. harzianum* ส่วนคุณภาพทางเคมีของปุ๋ยอินทรีย์ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มา พบว่า ความชื้น ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าการนำไฟฟ้า ปริมาณอินทรีย์วัตถุ ฟอสฟอรัสและโพแทสเซียมทั้งหมด ผ่านมาตรฐานปุ๋ยอินทรีย์ของกรมวิชาการเกษตร แต่ปริมาณไนโตรเจนในเม็ดปุ๋ยอินทรีย์ลดลงมาก จึงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาสูตรต่อไป

บุญรุ่ง ศรีสุข และ สุกาญจน์ รัตนเลิศนุสรณ์ (2559) ศึกษาการเจริญเติบโตของโองกางใบใหญ่ด้วยการใช้หัวเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดอัดเม็ด ตามสิทธิบัตรปี 2557 พบว่า เมื่อใช้ไตรโคเดอร์มาชนิดอัดเม็ด เปรียบเทียบกับการไม่ใส่หัวเชื้อไตรโคเดอร์มา พบว่า เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดอัดเม็ดสามารถเพิ่มความสูง ขนาดลำต้น และจำนวนใบของต้นโองกางใบใหญ่ได้ดีกว่าการไม่ใส่เชื้อราไตรโคเดอร์มา และยังมีส่วนช่วยส่งเสริมความแข็งแรงในระบบรากค้ำยันของต้นโองกางให้มีโอกาสรอดเพิ่มขึ้น

Cintia Rodrigues Maruyama *et al.* (2020) ศึกษาการพัฒนาารูปแบบการเก็บรักษาสปอร์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในรูปของพอลิเมอร์ ไมโครพาติเคิล (polymeric microparticles) เพื่อประเมินความเสถียรภาพ ความมีชีวิตของสปอร์เชื้อราในดิน คุณสมบัติของเชื้อราในการต้านทาน ราก่อโรคพืชในห้องปฏิบัติการ และประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ของเชื้อราในหลอดทดลอง จากการศึกษาพบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในรูปพอลิเมอร์ ไมโครพาติเคิล มีความทนทานต่อการได้รับรังสียูวี (ultraviolet radiation) และปัจจัยอื่นในสภาพแวดล้อมได้ มีประสิทธิภาพในการทำงานของเอนไซม์ไคไติเนสและเซลลูเลสในหลอดทดลอง (chitinolytic and cellulosic activity) สปอร์ของเชื้อรายังมีชีวิตและสามารถต้านทานเชื้อราก่อโรครากเน่าโคนเน่าที่มีสาเหตุมาจากเชื้อรา *Sclerotium sclerotiorum* ในห้องปฏิบัติการได้ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าการเก็บสปอร์ในรูปของ ไมโครพาติเคิล เป็นทางเลือกหนึ่งในการประยุกต์ใช้ในการเกษตรกรรม

Mariana Brondi *et al.* (2022) ศึกษาการใช้ นาโนคริสตัลเซลลูโลส (cellulose nanocrystals ,CNC) และนาโนคอมโพสิต (nanocomposite) ของ CNC ด้วยคาร์บอกซีเมทิลเซลลูโลส (carboxymethyl cellulose, CMC) เป็นวัสดุห่อหุ้มเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ซึ่งภายในบรรจุสปอร์ของเชื้อรา (CNC:CMC:spores beads)จากผลการศึกษาพบว่า สามารถเก็บสปอร์ของเชื้อราได้และยังมีคุณสมบัติของเชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นทางเลือกหนึ่งในการยืดอายุของเชื้อราและช่วยป้องกันสปอร์ให้สามารถอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมได้

ข้อสรุปจากแนวคิดทฤษฎีเกี่ยวกับงานวิจัย

เชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นเชื้อราปฏิปักษ์ที่สามารถควบคุมโรคพืชได้หลายชนิด สามารถชักนำให้พืชมีความต้านทานต่อโรคพืช และส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ แต่ต้องมีความรู้ความเข้าใจในธรรมชาติของเชื้อรา เพื่อให้สามารถใช้เชื้อราได้อย่างมีประสิทธิภาพ จากงานวิจัยที่ได้ผลิตดินชีวภาพไตรโคเดอร์มาจากก้อนเห็ดเก่า และได้ทดสอบการเจริญเติบโตในข้าวหลายสายพันธุ์ พบว่า สามารถกระตุ้นการเจริญเติบโตของข้าวได้ดี

ดังนั้น การนำองค์ความรู้ในการผลิตดินชีวภาพไตรโคเดอร์มาจากก้อนเห็ดเก่า ในงานวิจัยเดิมจากปีงบประมาณ 2564 ซึ่งได้มีการทดสอบประสิทธิภาพของดินชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของต้นข้าวและยืนขอจดอนุสิทธิบัตรเรียบร้อยแล้ว เพื่อนำมาพัฒนาต่อยอดเป็นการสร้างสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาใช้สายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* ที่แยกได้จากดินในเขตจังหวัดพะเยา-เชียงราย ชนิดเม็ดบีดส์ เพื่อช่วยยืดอายุการเก็บรักษาสปอร์ของเชื้อรา สะดวกในการใช้ และคงประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่สามารถควบคุม ป้องกันโรคพืช รวมถึงการใช้เป็นปุ๋ยชีวภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโต การปรับปรุงฟื้นฟูสภาพของดินปลูกในแปลงปลูกของเกษตรกร เพื่อช่วยลดต้นทุนการใช้ปุ๋ยเคมี และอาจจะมีการต่อยอดไปยังกลุ่มเกษตรกรที่ปลูกหญ้าเลี้ยงสัตว์เพื่อความปลอดภัยต่อสัตว์เลี้ยงแก่เกษตรกรเลี้ยงสัตว์ต่อไป

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การผลิตและพัฒนาดินชีวภาพจากก้อนเห็ดเก่าร่วมกับสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้เป็นดินเพาะกล้า และดินพร้อมปลูกสำหรับพืช มีแนวทางการดำเนินการวิจัย ดังนี้

1. การเตรียมวัสดุในการผลิตเม็ดบีดส์โดยใช้ก้อนเห็ดเก่า

เลือกก้อนเห็ดที่เก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วและทิ้งไว้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี นำมาทำให้ร้อน ชุยและเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมก้อนเห็ด เพื่อใช้เป็นวัสดุในการทำเม็ดบีดส์

2. การเตรียมสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา

เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในเขตจังหวัดพะเยา-เชียงราย และทำการระบุ สายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* นำมาเลี้ยงบน อาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน หรือสังเกตการ สร้างสปอร์ของเชื้อรา เก็บสปอร์ในรูปของผงแห้งด้วยไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (*diatomaceous earth*) และเก็บรักษาสปอร์เพื่อเตรียมในรูปหัวเชื้อสดที่ ตู๋เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดหัวเชื้อสดด้วยอาหาร Cooked-rice media เป็น ระยะเวลา 5 - 7 วัน จนเชื้อราไตรโคเดอร์มาสร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง เก็บเฉพาะส่วนของสปอร์ ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตด้วยเครื่องฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemocytometer) และปรับความเข้มข้นของสปอร์รา ให้ได้ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

3. การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ด้วยเครื่องอัดเม็ด

นำวัสดุเพาะเชื้อจากก้อนเห็ดเก่าผสมให้เป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมก้อนเห็ด นำสปอร์ ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่อยู่ในน้ำกลั่นมาผสมกับวัสดุเพาะจากก้อนเห็ดเก่าให้มีปริมาณของสปอร์ใน วัสดุ ประมาณ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อกรัม จากนั้นเก็บแพคในถุงและเจาะรูเพื่อให้เชื้อราได้รับอากาศใน การเจริญเติบโต เป็นระยะเวลา 1 เดือน นำเชื้อราที่มีการเจริญบนวัสดุสำหรับอัดเม็ด ใส่ในเครื่อง อัดเม็ดเพื่อทำการอัดเม็ดให้มีขนาดเม็ดบีดส์ประมาณ 5 มิลลิเมตร จากนั้นนำไปผึ่งในที่ร่ม และเก็บใส่ ถุงเพื่อรอการทดสอบการมีชีวิตรอดและประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญของพืช

4. การทดสอบการมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์

เมื่อบ่มเชื้อราไตรโคเดอร์มากับวัสดุเพาะ ครบระยะเวลา 1 เดือน ทำการทดสอบความ บริสุทธิ์ของสายพันธุ์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาด้วยการเลี้ยงด้วยอาหารแข็ง *Trichoderma selective media* บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน เพื่อสังเกตการเจริญของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่มี

การเจริญเป็น กลุ่มโคโลนีสีเขียว และเพาะเลี้ยงให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ด้วยอาหาร PDA อีกครั้งเพื่อเป็นการยืนยันลักษณะเฉพาะของสายพันธุ์

5. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส์

การศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส์ที่มีต่อการงอกและการเจริญเติบโตของหญ้าเลี้ยงสัตว์รู่ชี (*Brachiaria ruziziensis*) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ปลุกเมล็ดหญ้ารู่ชี 5 กระถางต่อซ้ำ จำนวน 3 ทรีตเมนต์

ทรีตเมนต์ที่ 1 กลุ่มควบคุมลบ (ไม่ใส่ปุ๋ยและเชื้อรา *Trichoderma* Beads)

ทรีตเมนต์ที่ 2 กลุ่มควบคุมบวก (ใส่ปุ๋ยสูตร 15-15-15)

ทรีตเมนต์ที่ 3 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 1 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 4 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 5 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 5 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 10 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 6 กลุ่มเชื้อรา *Trichoderma* Beads ผสมในวัสดุปลูกจำนวน 15 เม็ด

หลังจากเพาะเมล็ดหญ้ารู่ชีในกระถางปลูก 1 เมล็ดต่อ 1 กระถาง ในดินชีวภาพเห็ดคุณครู เก็บข้อมูลการเจริญเติบโตทุกสัปดาห์ เป็นระยะเวลา 2 เดือน

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (Analysis of Variance: ANOVA) และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี Duncan's Multiple Range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การผลิตและพัฒนาดินชีวภาพจากก้อนเห็ดเก่าร่วมกับสารชีวภัณฑ์เพื่อใช้เป็นดินเพาะกล้า และดินพร้อมปลูกสำหรับพืช มีผลการวิเคราะห์ข้อมูล ดังนี้

1. การคัดเลือกก้อนเห็ดเก่า

เลือกก้อนเห็ดที่เก็บเกี่ยวผลผลิตแล้วและทิ้งไว้เป็นระยะเวลาอย่างน้อย 1 ปี นำมาทำให้ ร่วนซุยและเป็นเนื้อเดียวกันด้วยเครื่องผสมก้อนเห็ด เพื่อใช้เป็นวัสดุในการทำเม็ดปิดสั ลักษณะทาง กายภาพของก้อนเห็ดภายหลังการเก็บผลผลิตในโรงเพาะเห็ด แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม (ภาพที่ 1)

- 1.1 ก้อนเห็ดที่ทิ้งไว้โดยเปล่าประโยชน์อย่างน้อย 1 ปี ก้อนเห็ดที่ถูกทิ้งไว้จะเริ่มมีการย่อยสลายตนเอง เหมาะสำหรับการนำไปใช้ต่อยอดเป็นดิน
- 1.2 ก้อนเห็ดปกติ หมายถึง ก้อนเห็ดที่มีอายุ 3 เดือนหลังจากเข้าโรงเพาะเห็ด เป็นก้อนเห็ดที่มีธาตุอาหารสมบูรณ์ และเส้นใยเห็ดยังเดินอยู่ สามารถเก็บดอกเห็ดได้ต่อไป จนกว่าจะหมดสภาพ
- 1.3 ก้อนเห็ดกินก้อน หมายถึง ก้อนเห็ดที่มีอายุมากกว่า 3 เดือนขึ้นไป หลังจากเข้าโรงเพาะเห็ด ลักษณะของก้อนเห็ดเริ่มยุบ เนื่องจากสารอาหารภายในก้อนเห็ดเริ่มย่อยสลายไป เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของดอกเห็ด
- 1.4 ก้อนเห็ดตาย หมายถึง ก้อนเห็ดที่ขาดธาตุอาหารก่อนระยะเวลา 3 เดือน หลังจากเข้าโรงเพาะเห็ด เส้นใยเห็ดตาย หรือ หยุดเดินในระหว่างการเพาะเห็ด ก้อนเห็ดชนิดนี้สามารถนำมาทำดินได้ แต่ต้องทิ้งไว้อีกประมาณ 3-4 เดือน ขึ้นอยู่กับเนื้อวัสดุเพาะและชนิดของเห็ด
- 1.5 ก้อนเห็ดเน่า หมายถึง ก้อนเห็ดที่มีการปนเปื้อนของเชื้อราหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น ในระหว่างการเพาะเลี้ยงเห็ด โดยจะเริ่มการย่อยสลายตนเองตั้งแต่เริ่มการปนเปื้อน เหมาะสำหรับการนำไปใช้ต่อยอดเป็นดิน



ภาพที่ 1 ลักษณะทางกายภาพของก้อนเห็ดภายหลังการเก็บผลผลิตในโรงเพาะเห็ด

2. การเตรียมสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาในรูปหัวเชื้อสด

เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ท้องถิ่นที่พบในเขตจังหวัดพะเยา-เชียงราย และทำการระบุสายพันธุ์ด้วยเทคนิคทางชีวโมเลกุลเป็นสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* นำมาเลี้ยงบนอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 7-14 วัน หรือสังเกตการสร้างสปอร์ของเชื้อรา เก็บสปอร์ในรูปของผงแห้งด้วยไดอะตอมมาเซียส เอิร์ธ (diatomaceous earth) และเก็บรักษาสปอร์เพื่อเตรียมในรูปหัวเชื้อสดที่ ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

การเตรียมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดหัวเชื้อสดด้วยอาหาร Cooked-rice media เป็นระยะเวลา 5 - 7 วัน จนเชื้อราไตรโคเดอร์มาสร้างสปอร์สีเขียวอมเหลือง (ภาพที่ 2) เก็บเฉพาะส่วนของสปอร์ด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อ นับจำนวนสปอร์ที่มีชีวิตด้วยเครื่องฮีมาไซโทมิเตอร์ (Haemocytometer) และปรับความเข้มข้นของสปอร์ให้ได้ 10^8 - 10^9 เซลล์ต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 2 เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่เลี้ยงบนอาหาร Cooked-rice media เวลา 5 - 7 วัน

3. การผลิตชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสด้วยเครื่องอัดเม็ด

นำก้อนเห็ดเก่า ขุยมะพร้าว และสปอร์เชื้อรา *T. longibrachiatum* ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน ด้วยเครื่องผสมวัสดุ บรรจุลงในถุงและปิดปากถุงให้เรียบร้อย จากนั้นพักวัสดุเพาะกล้าฟิชประมาณ 1 เดือน กรรมวิธีการเตรียมตามเลขที่คำขออนุญาตสิทธิบัตร 2303002039 เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบ สำหรับการเตรียมเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดกลม

นำเชื้อรา *T. longibrachiatum* ที่แยกได้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ มาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA ที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 7 วัน สังเกตลักษณะของโคโลนี (colony) รูปแบบของโคโลนี และสีของรงควัตถุ (pigments) ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ (aseptic technique) ตัก ไดอะตอม 1 กรัมใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ เพื่อขูดเก็บสปอร์ใส่ในซองกระดาษ และ เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้เป็นส่วนประกอบสำหรับการเตรียมเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดกลมด้วยเครื่องปั้นเม็ดกลมอัดโนมัติ โดยมีส่วนผสมในการผลิต (ตารางที่ 1)

ตารางที่ 1 กรรมวิธีการผลิตชีวภัณฑ์ชนิดเม็ดปิดส

กรรมวิธี	ก้อนเห็ดเก่า (% w/w)	ไดอะตอม (% w/w)	แป้งมันฝรั่ง (% w/w)	สารแขวนลอยสปอร์ (2×10^7 cells/ml)
กรรมวิธี 1	90	-	10	100
กรรมวิธี 2	80	10	10	100
กรรมวิธี 3	70	20	10	100
กรรมวิธี 4	60	30	10	100

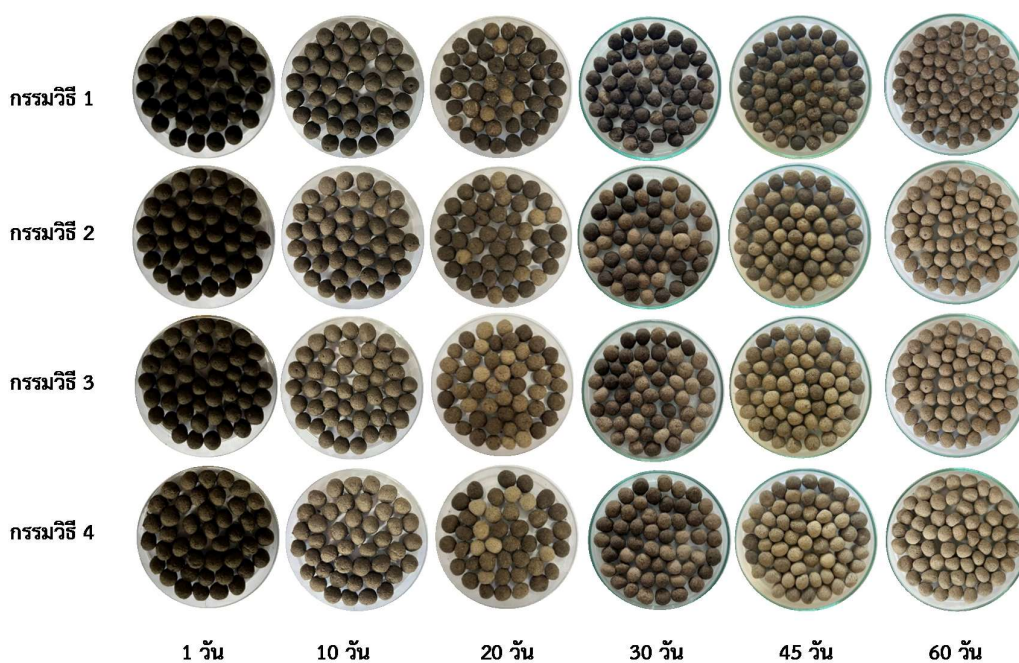
หมายเหตุ: แต่ละกรรมวิธีกำหนดได้เม็ดปิดส 100 เม็ดต่อสูตร (น้ำหนัก 1 กรัมต่อเม็ดปิดส)

4. การทดสอบลักษณะทั่วไปของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส

เลือกเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดกลมจากแต่ละกรรมวิธีละ 10 เม็ดเพื่อทำการทดสอบลักษณะ 4 อย่าง คือ (1) ลักษณะผิวของเม็ด โดยการบันทึกภาพลักษณะพื้นผิวภายนอกเพื่อศึกษาสภาพผิวที่มีผลต่อการเจริญต่อเชื้อรา (2) น้ำหนัก โดยชั่งน้ำหนักเชื้อรา รูปแบบเม็ดกลมที่อายุ 1 วันและ 60 วัน หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาน้ำหนักหลังจากผ่านไป 60 วัน (3) ขนาด โดยวัดเชื้อราในรูปแบบเม็ดกลมที่อายุ 60 วัน หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยใช้เวอร์เนียคาลิเปอร์ (Vernier

Caliper) วัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางหลังจากผ่านไป 60 วัน (4) การละลายน้ำ โดยนำเชื้อรา รูปแบบเม็ดกลมมาวางบนน้ำและบันทึกระยะเวลาในการละลายน้ำ (หน่วยนาทีก) เพื่อทดสอบระยะเวลาการลอยบนน้ำของเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดกลม

จากการทดลองในแต่ละกรรมวิธี พบว่า รูปทรงของเม็ดเชื้อราหลังจากปั้นเป็นเม็ดกลมด้วยเครื่องปั้นอัตโนมัติ พบว่า ทุกเม็ดมีสีดำ ลักษณะเป็นรูปทรงกลม ผิวด้านนอกขรุขระเล็กน้อยในแต่ละกรรมวิธีการผลิต จากนั้นเก็บรักษาที่ อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 1, 10, 20, 30, 45 และ 60 วัน พบว่า สีของเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดกลมเริ่มมีความแตกต่างกัน โดยที่กรรมวิธีที่ 1 มีสีดำเข้มมากกว่ากรรมวิธีที่ 2, 3, และ 4 ตามลำดับ เนื่องจากมีอัตราส่วนของวัสดุเพาะซากลำพืชเพียงอย่างเดียว ในขณะที่กรรมวิธีที่ 2, 3, และ 4 ตามลำดับ มีสีอ่อนกว่าเนื่องจากมีอัตราส่วนของไคอะตอม (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 ลักษณะภายนอกของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส เมื่อเก็บรักษาที่ระยะเวลา 1, 10, 20, 30, 45 และ 60 วัน

การศึกษาน้ำหนักของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส ภายหลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1 วันและ 60 วัน ตามลำดับ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส ที่ระยะเวลา 1 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยน้ำหนักเฉลี่ยทั้ง 4 กรรมวิธีมีค่าเท่ากับ

1.01±0.04, 1.03±0.04, 1.04±0.06 และ 1.05±0.06 กรัม ตามลำดับ ในขณะที่การเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า น้ำหนักเฉลี่ยของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสักรวมวิธีที่ 3 และ 4 (น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.36 ±0.02 และ 0.37±0.04 กรัม) มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกรรมวิธีที่ 1 (น้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 0.33±0.02 กรัม)

การศึกษาขนาดของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสักรายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน โดยใช้การวัดความยาวเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดปิดสักรวม พบว่า กรรมวิธีที่ 1 มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 9.40±0.27 มิลลิเมตร และมีขนาดเล็กที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับกรรมวิธีที่ 2-4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

การศึกษาระยะเวลาการละลายน้ำของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสักรายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 วัน พบว่า กรรมวิธีที่ 1 ใช้ระยะเวลาในการละลายน้ำมากที่สุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 11.12±0.89 นาที แตกต่างจากกรรมวิธีที่ 2 (1.32±0.14 นาที) กรรมวิธีที่ 3 (0.33±0.18 นาที) และกรรมวิธีที่ 4 (0.26±0.08 นาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ลักษณะทั่วไปเชื้อรา *T. longibrachiatum* ในรูปแบบเม็ดปิดสักรวม

กรรมวิธี	น้ำหนัก (กรัม) ¹		ความยาวเส้นผ่านศูนย์กลาง(มิลลิเมตร) ¹	การละลายน้ำ ¹ (นาที)
	1 วัน	60 วัน		
1	1.01±0.04 ^{ns}	0.33±0.02 ^a	9.40±0.27 ^a	11.12±0.89 ^a
2	1.03±0.04 ^{ns}	0.35±0.04 ^{ab}	10.37±0.32 ^b	1.32±0.14 ^b
3	1.04±0.06 ^{ns}	0.36±0.02 ^b	10.46±0.48 ^b	0.33±0.18 ^c
4	1.05±0.06 ^{ns}	0.37±0.04 ^b	10.89±0.65 ^c	0.26±0.08 ^c

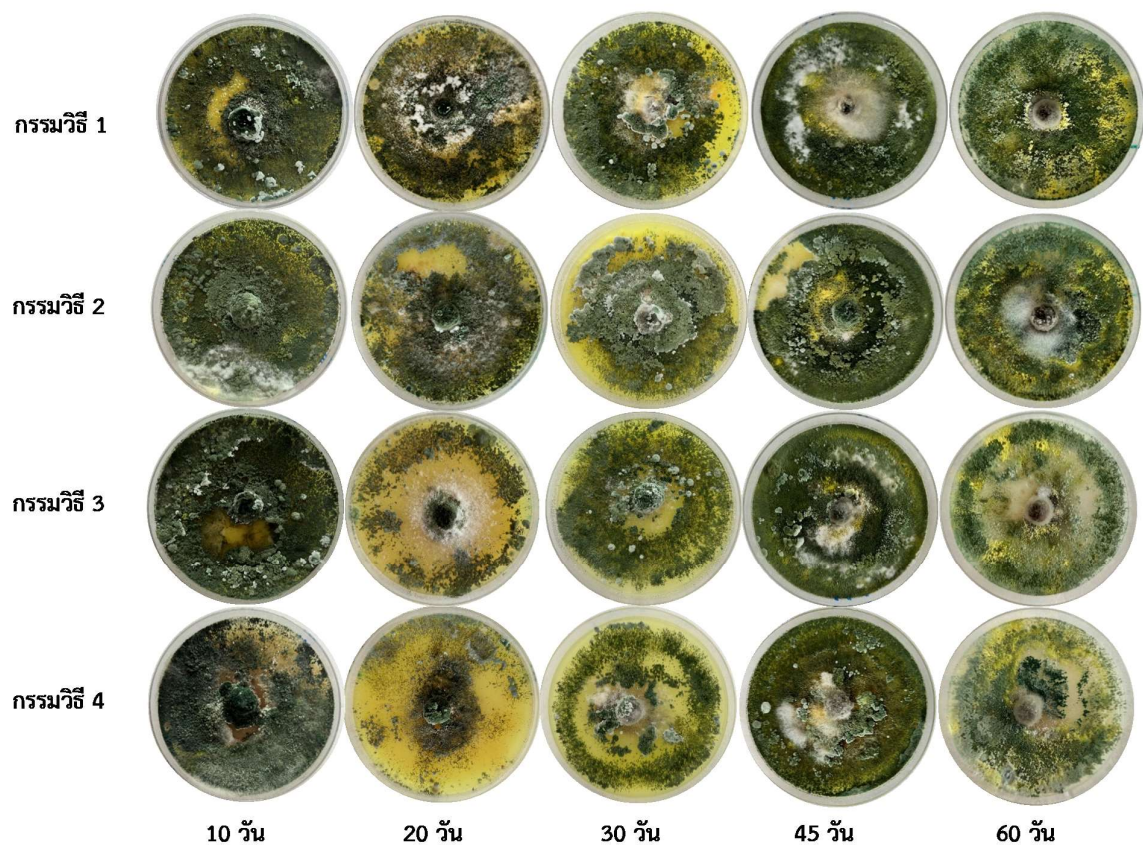
หมายเหตุ : ¹ ข้อมูลเป็นค่าเฉลี่ย±ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน; ns. หมายถึง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ, ตัวอักษรที่ต่างกันแนวตั้ง หมายถึง ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ ($p<0.05$) จากการทดสอบทางสถิติด้วยวิธี DMRT

² สัญลักษณ์ + แสดงถึง ค่าความแข็งแรง

5. การทดสอบการมีชีวิตรอดของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสักรวม

การศึกษากิจกรรมชีวิตของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดสักรวม โดยการวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อราชนิด *Trichoderma Selective media* (TSM) ที่อุณหภูมิ 27-28 องศาเซลเซียส พบว่า เมื่อใช้วัสดุเพาะกล้าจากก้อนเห็ดเก่าที่มีเชื้อราไตรโคเดอร์มาเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM เพื่อเป็น

ตัวแทนของเชื้อราไตรโคเดอร์มาที่แยกได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM จะสังเกตเห็นโคโลนีเริ่มแรกมีสีขาว เป็นเส้นใยพุกปุยุเนื่องจากเชื้อรามีอายุน้อย จากนั้นจะเริ่มเจริญเติบโตได้รวดเร็ว สีของโคโลนีส่วนใหญ่เกิดมาจากการสร้างสปอร์ซึ่งอาจจะมียั้งแต่โคโลนีสีเขียวอมเหลืองจนถึงเขียวเข้ม (Rifai, 1969; Rajesh, 2016) จากนั้น จึงนำชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ในแต่ละกรรมวิธี ที่เก็บรักษาเป็นเวลา 10, 20, 30, 45 และ 60 วัน ตามลำดับ มาวางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM ผลการศึกษา พบว่า กรรมวิธีการผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ทั้ง 4 กรรมวิธี สปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถเจริญเติบโตบนอาหารเลี้ยงเชื้อรา TSM ได้ แสดงให้เห็นว่า สปอร์ของเชื้อราไตรโคเดอร์มาสามารถ (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 การเจริญของสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาที่วางบนอาหารเลี้ยงเชื้อ TSM หลังจากเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10, 20, 30, 45 และ 60 วัน

6. การทดสอบประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส์ต่อการเจริญเติบโตของหญ้ารูซี่

การศึกษาประสิทธิภาพของชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส์ที่มีต่อการเจริญเติบโตของหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ (*Brachiaria ruziziensis*) โดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ ปลูกลงในกระถางต่อซ้ำ

ทรีตเมนต์ที่ 1 กลุ่มควบคุมลบ (ไม่ใส่เชื้อรา *Trichoderma* Beads)

ทรีตเมนต์ที่ 2 กลุ่มเชื้อรา ผสม *Trichoderma* Beads ในวัสดุปลูกจำนวน 1 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 3 กลุ่มเชื้อรา ผสม *Trichoderma* Beads ในวัสดุปลูกจำนวน 5 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 4 กลุ่มเชื้อรา ผสม *Trichoderma* Beads ในวัสดุปลูกจำนวน 10 เม็ด

ทรีตเมนต์ที่ 5 กลุ่มเชื้อรา ผสม *Trichoderma* Beads ในวัสดุปลูกจำนวน 15 เม็ด

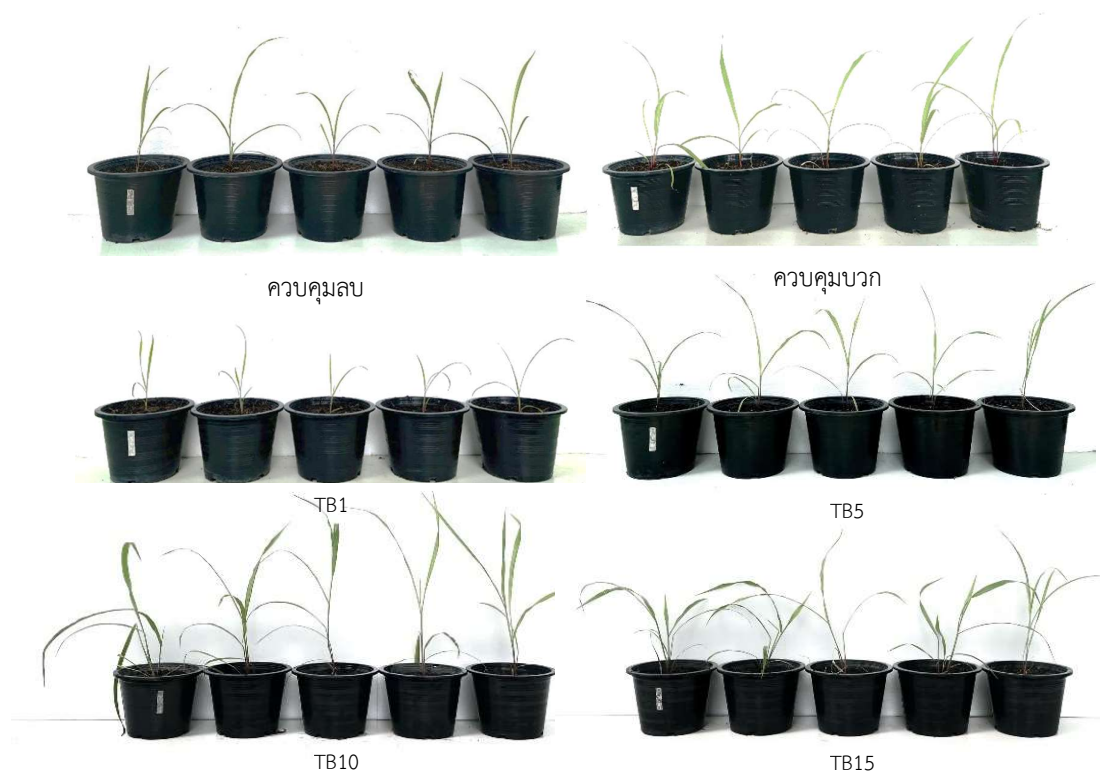
ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้ารูซี่ด้านความสูง (ตารางที่ 3) พบว่า ความสูงของต้นหญ้ารูซี่สัปดาห์ที่ 1 ภายหลังการลงปลูกในกระถาง พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 5) ในสัปดาห์ที่ 2 พบว่า กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 5, 10 และ 15 เม็ด (TB5, TB10 และ TB15) มีความสูงเท่ากับ 26.55 ± 2.57 , 26.20 ± 3.58 และ 26.05 ± 3.39 เซนติเมตร ตามลำดับ เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมบวกที่ผสมปุ๋ย (28.05 ± 4.23 เซนติเมตร) และมีความสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลองผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 1 เม็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เช่นเดียวกับในสัปดาห์ที่ 4 พบว่า กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 5, 10 และ 15 เม็ด (TB5, TB10 และ TB15) มีความสูงเท่ากับ 41.85 ± 4.68 , 45.30 ± 3.17 และ 45.90 ± 3.38 เซนติเมตร ตามลำดับ เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมบวกที่ผสมปุ๋ย (41.80 ± 4.83 เซนติเมตร) และมีความสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมลบและกลุ่มทดลองผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 1 เม็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ในขณะที่ความสูง สัปดาห์ที่ 6 พบว่า กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด 15 เม็ด (TB15) มีความสูงเท่ากับ 59.75 ± 3.19 เซนติเมตร เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมบวกที่ผสมปุ๋ย (62.10 ± 3.64 เซนติเมตร) และมีความสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มทดลองผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 1 เม็ด 5 เม็ด และ 10 เม็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสัปดาห์ที่ 8 พบว่า กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด 10 เม็ด และ 15 เม็ด (TB10 และ TB15) มีความสูงเท่ากับ 76.30 ± 6.65 และ 79.85 ± 5.52 เซนติเมตร ตามลำดับ เทียบเท่ากับกลุ่มควบคุมบวกที่ผสมปุ๋ย (77.50 ± 6.77 เซนติเมตร) และมีความสูงมากกว่ากลุ่มควบคุมลบและกลุ่มทดลองผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 1 เม็ด และ 5 เม็ด อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 3 ความสูงเฉลี่ยของต้นหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ ในระยะเวลา 2 เดือน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยความสูงของหญ้าเลี้ยงสัตว์รูซี่ (เซนติเมตร)				
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
กลุ่มควบคุมลบ	12.85±2.67 ^{ns}	18.00±4.16 ^b	34.45±6.00 ^b	45.20±2.52 ^d	60.40±7.56 ^c
กลุ่มควบคุมบวก	14.65±5.00 ^{ns}	28.05±4.23 ^a	41.80±4.83 ^a	62.10±3.64 ^a	77.50±6.77 ^a
TB1	13.45±2.13 ^{ns}	20.60±2.53 ^b	37.10±3.03 ^b	47.45±3.51 ^d	62.20±9.28 ^c
TB5	12.80±4.16 ^{ns}	26.55±2.57 ^a	41.85±4.68 ^a	51.95±1.80 ^c	68.40±4.58 ^b
TB10	13.90±2.63 ^{ns}	26.20±3.58 ^a	45.30±3.17 ^a	56.45±4.57 ^b	76.30±6.65 ^a
TB15	14.90±4.27 ^{ns}	26.05±3.39 ^a	45.90±3.38 ^a	59.75±3.19 ^a	79.85±5.52 ^a

หมายเหตุ : จำนวนต้นหญ้ารูซี่ 10 ต้นต่อกลุ่มการทดลอง; TB1 = *Trichoderma* Bead 1 เม็ด; TB5 = *Trichoderma* Beads 5 เม็ด; TB10 = *Trichoderma* Beads 10 เม็ด; TB15 = *Trichoderma* Beads 15 เม็ด; สัญลักษณ์ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ; ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้ง หมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ผลด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 5 การศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดรา *Trichoderma* Bead 1 เม็ด; TB5 = ผสมเชื้อรา *Trichoderma* Beads 5 เม็ด; TB10 = ผสมเชื้อรา *Trichoderma* Beads 10 เม็ด; TB15 = ผสมเชื้อรา *Trichoderma* Beads 15 เม็ด)

ผลการศึกษาการเจริญเติบโตของเห็ดรา *Trichoderma* ด้านจำนวนใบ (ตารางที่ 4) ในสัปดาห์ที่ 1 หลังจากลงเพาะในกระถางปลูก พบว่า ทุกกลุ่มการทดลองไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัปดาห์ที่ 2 จำนวนใบเฉลี่ยของเห็ดรา *Trichoderma* กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 15 เม็ด (TB15) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 5.10 ± 0.32 ใบ มีจำนวนใบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ผสมปุ๋ย (5.60 ± 0.70 ใบ) แต่มีจำนวนใบเฉลี่ยมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ (4.00 ± 0.67 ใบ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ในสัปดาห์ที่ 4 (ภาพที่ 6) พบว่า จำนวนใบเฉลี่ยของเห็ดรา *Trichoderma* กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 5 เม็ด 10 เม็ด และ 15 เม็ด (TB5, TB10 และ TB15) ตามลำดับ มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 43.40 ± 6.38 , 41.30 ± 9.24 และ 48.70 ± 9.89 ใบ มีจำนวนใบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ผสมปุ๋ย (48.80 ± 8.18 ใบ) แต่มีจำนวนใบมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ และ TB1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) สัปดาห์ที่ 6 พบว่า จำนวนใบเฉลี่ยของเห็ดรา *Trichoderma* กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 10 เม็ด และ 15 เม็ด (TB10 และ TB15) ตามลำดับ มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 76.30 ± 6.65 และ 79.85 ± 5.52 ใบ มีจำนวนใบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ผสมปุ๋ย (77.50 ± 6.77 ใบ) แต่มีจำนวนใบมากกว่ากลุ่มควบคุมลบ, TB1 และ TB5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และสัปดาห์ที่ 8 (ภาพที่ 7) พบว่า จำนวนใบเฉลี่ยของเห็ดรา *Trichoderma* กลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด จำนวน 15 เม็ด (TB15) มีจำนวนใบเฉลี่ยเท่ากับ 132.33 ± 4.37 ใบ มีจำนวนใบมากที่สุดในทุกกลุ่มการทดลองและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

ตารางที่ 4 จำนวนใบเฉลี่ยของต้นเห็ดราเลี้ยงสัตว์รู่ชี ในระยะเวลา 2 เดือน

กลุ่มการทดลอง	ค่าเฉลี่ยจำนวนใบของเห็ดราเลี้ยงสัตว์รู่ชี (ใบ)				
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 6	สัปดาห์ที่ 8
กลุ่มควบคุมลบ	3.50 ± 0.53^{ns}	4.00 ± 0.67^d	34.60 ± 9.69^b	60.40 ± 7.56^c	62.33 ± 5.51^d
กลุ่มควบคุมบวก	3.70 ± 0.48^{ns}	5.60 ± 0.70^a	48.80 ± 8.18^a	77.50 ± 6.77^a	98.33 ± 5.86^b
TB1	3.50 ± 0.53^{ns}	4.20 ± 0.79^{cd}	33.60 ± 9.96^b	62.20 ± 9.28^c	70.67 ± 2.08^c
TB5	3.60 ± 0.52^{ns}	4.70 ± 0.48^{bc}	43.40 ± 6.38^a	68.40 ± 4.58^b	76.17 ± 1.76^c
TB10	3.60 ± 0.52^{ns}	4.80 ± 0.63^b	41.30 ± 9.24^a	76.30 ± 6.65^a	102.67 ± 5.13^b
TB15	3.70 ± 0.48^{ns}	5.10 ± 0.32^{ab}	48.70 ± 9.89^a	79.85 ± 5.52^a	132.33 ± 4.37^a

หมายเหตุ : จำนวนต้นเห็ดรา *Trichoderma* 10 ต้นต่อกลุ่มการทดลอง; TB1 = *Trichoderma* Bead 1 เม็ด; TB5 = *Trichoderma* Beads 5 เม็ด; TB10 = *Trichoderma* Beads 10 เม็ด; TB15 = *Trichoderma* Beads 15 เม็ด; สัญลักษณ์ ns = ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ; ค่าเฉลี่ยที่กำกับด้วยตัวอักษรแตกต่างกันในแนวตั้งหมายถึง มีความแตกต่างกันทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% จากการวิเคราะห์ด้วยวิธี Duncan multiple range test (DMRT)



ภาพที่ 6 การศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้ารูชี ระยะเวลา 4 สัปดาห์ (กลุ่มควบคุมลบ = ไม่ใส่เชื้อรา; กลุ่มควบคุมบวก = ใส่ปุ๋ย; TB1 = เชื้อรา *Trichoderma* Bead 1 เม็ด; TB5 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 5 เม็ด; TB10 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 10 เม็ด; TB15 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 15 เม็ด)



ภาพที่ 7 การศึกษาการเจริญเติบโตของหญ้ารูชี ระยะเวลา 8 สัปดาห์ (กลุ่มควบคุมลบ = ไม่ใส่เชื้อรา; กลุ่มควบคุมบวก = ใส่ปุ๋ย; TB1 = เชื้อรา *Trichoderma* Bead 1 เม็ด; TB5 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 5 เม็ด; TB10 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 10 เม็ด; TB15 = เชื้อรา *Trichoderma* Beads 15 เม็ด)

บทที่ 5

สรุป อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

สรุปผลการวิจัย

การพัฒนาต้นแบบเชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ *Trichoderma longibrachiatum* ชนิดเม็ดบีดส์ จากวัสดุเพาะก้อนเห็ดเก่า โดยใช้สปอร์เชื้อรา ไดอะตอมและแป้งมันสำปะหลัง สามารถผลิตและขึ้นเป็นเม็ดบีดส์ได้ 4 กรรมวิธี ซึ่งกรรมวิธีทั้ง 4 วิธี สามารถยืดอายุของสปอร์เชื้อราเมื่อเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสได้ 60 วัน โดยที่สปอร์ของเชื้อรายังมีชีวิตและเจริญเติบโตได้ใหม่ในระดับห้องปฏิบัติการ และเมื่อนำไปทดสอบประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญเติบโตของหน่อกล้วยในการเลี้ยงสัตว์ ในระยะเวลา 2 เดือน เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ปริมาณ 5 - 15 เม็ดต่อดินเพาะกล้า 1.5 กิโลกรัม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตในด้านความสูงและจำนวนใบได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ไม่ใส่ปุ๋ย) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยกลุ่มทดลองที่ผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ 15 เม็ดต่อดิน 1.5 กิโลกรัม มีประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตทั้งในด้านความสูงและจำนวนใบได้ใกล้เคียงกับการใช้ปุ๋ยเคมี (15-15-15) ในกลุ่มควบคุมบวก สรุปได้ว่าสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา (*Trichoderma longibrachiatum*) เมื่อผลิตในรูปแบบเม็ดบีดส์ มีความสะดวกในการใช้งาน สามารถยืดอายุการเก็บรักษา คงคุณสมบัติของสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มาได้ และมีคุณสมบัติใช้ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช

อภิปรายผลการวิจัย

การพัฒนาเชื้อรา *Trichoderma longibrachiatum* ชนิดเม็ดบีดส์ เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของสปอร์และคงประสิทธิภาพในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช โดยใช้วัสดุเพาะก้อนเห็ดเก่า ไดอะตอม แป้งมันฝรั่งและสปอร์ของเชื้อรา *T. longibrachiatum* พบว่า รูปร่างของเม็ดบีดส์จาก 4 กรรมวิธีมีรูปร่างกลมและผิวหยาบเล็กน้อยขึ้นกับอัตราส่วนของไดอะตอมในแต่ละกรรมวิธีและไม่มีผลต่อประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืช สอดคล้องกับการศึกษาของ Locatelli และคณะ (2018) ที่พบว่าผิวของเม็ดชีวภัณฑ์ที่ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน ไม่มีความขรุขระ และไม่ปนรูปพูนจะส่งผลต่อการมีชีวิตของโคนินเดีย

การควบคุมทางชีววิธีโดยใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาจะมีประสิทธิภาพมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย เช่น การเจริญและสร้างโคนินเดียหรือสปอร์ของราไตรโคเดอร์มา ปัจจัยด้านอุณหภูมิ แสง องค์ประกอบของสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเชื้อรา เป็นต้น (Mishra and Khan, 2015) และสายพันธุ์ของเชื้อรา (Adan et al., 2015) ดังนั้น ประสิทธิภาพของเชื้อราไตรโคเดอร์มาในผลิตภัณฑ์ส่วนใหญ่จึง

ขึ้นอยู่กับความมีชีวิตของโคนิเดียหรือสปอร์เชื้อราไตรโคเดอร์มา (Küçük & Kivanç, 2005; Kawicha et al., 2020; Martinez et al., 2023).

ปัจจุบันการพัฒนารูปแบบผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มามีหลากหลายรูปแบบที่สามารถช่วยยืดอายุการเก็บรักษาโคนิเดียของเชื้อราให้ยาวนานขึ้น และนิยมเก็บรักษาลักษณะที่อุณหภูมิ 4-10 องศาเซลเซียสมากกว่าอุณหภูมิห้อง เนื่องจากช่วยยืดอายุของสปอร์เชื้อราได้เป็นระยะเวลา 6 เดือนถึง 1 ปี ขึ้นอยู่กับกรรมวิธีในการผลิต (Kawicha et al., 2020) ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงเลือกใช้โคนิเดียของเชื้อราไตรโคเดอร์มา สายพันธุ์ *T. longibrachiatum* ในรูปของสารแขวนลอย มาต่อยอดเป็นผลิตภัณฑ์พร้อมใช้ในรูปแบบเม็ดบีดส์ และเลือกเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ซึ่งจากการศึกษาพบว่า สามารถเก็บได้นานถึง 60 วัน สอดคล้องกับการศึกษาของ Jurić et al. (2019) ที่พบว่า โคนิเดียที่ยังคงมีชีวิตอยู่จากเม็ดชีวภัณฑ์ ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และ 4 องศาเซลเซียส เมื่อนำมาเลี้ยงใหม่และนำไปทดสอบการยับยั้งการเจริญของราก่อโรคยังคงประสิทธิภาพในการยับยั้งได้ดี และไม่แตกต่างกับการใช้เชื้อสดที่เตรียมใหม่

ในงานวิจัยนี้เน้นศึกษาความมีชีวิตของโคนิเดียของเชื้อราในแต่ละกรรมวิธีที่ระยะเวลา 60 วัน โดยพบว่ากรรมวิธีที่ 1 เม็ดบีดส์ ไม่มีไโดอะตอมเป็นองค์ประกอบ ทำให้เม็ดบีดส์มีการเปลี่ยนสีจากดำเป็นสีน้ำตาลเข้ม และมีขนาดที่เล็กกว่ากรรมวิธีอื่น ในขณะที่กรรมวิธีที่ 2-4 มีไโดอะตอมซึ่งใช้เป็นสารรักษาสภาพของโคนิเดีย (Ziaee et al., 2021). เบื้องค์ประกอบที่แตกต่างกัน (10-30%) จึงมีสีของเม็ดบีดส์แตกต่างกันขึ้นกับอัตราส่วนของไโดอะตอม ในเมื่อเพิ่มปริมาณไโดอะตอมมากกว่า 30% ไม่สามารถทำได้เนื่องจากมีผลต่อการรักษาความชื้นของโคนิเดียในกรรมวิธีและการขึ้นรูปเป็นเม็ด

ในด้านการศึกษาน้ำหนักของเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ภายหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 1 วันและ 60 วัน ตามลำดับ พบว่าน้ำหนักเฉลี่ยของเม็ดบีดส์ ที่ ระยะเวลา 1 วัน มีน้ำหนักเฉลี่ยไม่แตกต่างกัน ในขณะที่ระยะเวลา 60 วัน กรรมวิธีที่ 3 และ 4 มีน้ำหนักเฉลี่ยมากกว่าและแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากกรรมวิธีที่ 1 และเมื่อวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของเม็ดบีดส์ พบว่ากรรมวิธีที่ 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเล็กที่สุดและแตกต่างจากกรรมวิธีที่ 2-4 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แสดงให้เห็นว่าไโดอะตอมมีผลต่อการช่วยคงรูปร่างของเม็ดบีดส์ซึ่งส่งผลโดยตรงต่อน้ำหนักและขนาดของเม็ดบีดส์

ในการประเมินคุณสมบัติทางกายภาพของเม็ดในสภาพแวดล้อมจริงโดยศึกษาการทดสอบการละลายน้ำเนื่องจากความสามารถในการละลายน้ำมีความสำคัญต่อการปล่อยและการเจริญเติบโตของสปอร์ในสภาพแวดล้อม จากการศึกษาใช้เม็ดบีดส์ 10 เม็ดจากแต่ละสูตรละลายในน้ำกลั่น 1,000 มิลลิลิตร และบันทึกระยะเวลาที่ใช้ในการละลาย พบว่า กรรมวิธีที่ 1 แสดงเวลาระยะเวลาในการละลายนานที่สุด (11.12 ± 0.89 นาที) ในขณะที่กรรมวิธีที่ 2, 3, และ 4 ละลายในเวลาที่สูงลงเรื่อยๆ

(1.32 ± 0.14 นาที, 0.33 ± 0.18 นาที, และ 0.26 ± 0.08 นาที ตามลำดับ) โดยเฉพาะกรรมวิธีที่ 4 มีการละลายที่เร็วที่สุด จึงมีความเหมาะสมสำหรับเลือกใช้ผลิตเป็นเม็ดบีดส์ ซึ่งผลการศึกษานี้ สอดคล้องกับการศึกษาของ Sukyai et al. (2020) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายในน้ำมีผลกระทบ อย่างมีนัยสำคัญต่อความเสถียรของผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา

ความมีชีวิตของสปอร์หรือโคนิเดียเป็นพารามิเตอร์สำคัญในการประเมินประสิทธิภาพของ สารพาหะที่ใช้ในสารควบคุมทางชีวภาพ สารพาหะเหล่านี้ต้องสนับสนุนอัตราการรอดชีวิตสูงในระยะ ยาว รักษาความมีชีวิตของโคนิเดียในระหว่างการเก็บรักษานาน และไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Martinez et al., 2023) วิธีการประเมินความมีชีวิตของโคนิเดียถูกปรับใช้จาก Francisco et al. (2006) การใช้ PDA เป็นสื่อกลางในการเจริญเติบโตมีข้อดีเพราะช่วยส่งเสริมการงอกของโคนิเดียและทำให้มองเห็น โคนิเดียได้ง่าย (Oliveira et al., 2015)

ในด้านประสิทธิภาพการส่งเสริมการเจริญของพืช ผลิตภัณฑ์ต้นแบบไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด บีดส์สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนใบของหนุ่กล้วยสัตรูซึ่ง ซึ่งการใช้ไตรโคเดอร์มา มีการเจริญเติบโตเทียบเท่ากับปุ๋ย สอดคล้องกับงานวิจัยของ (Adebayo et al, 2020) ที่ได้ศึกษา เปรียบเทียบผลการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา และปุ๋ยหมักต่อการเจริญเติบโตของเฟื่องฟ้าพบว่าการใช้ ปุ๋ยหมักเพียงอย่างเดียว หรือการใช้ปุ๋ยร่วมกับเชื้อราไตรโคเดอร์มา และการใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มา เพียงอย่างเดียวในปริมาณที่เหมาะสม สามารถส่งเสริมการเจริญเติบโต จำนวนใบ เส้นผ่านศูนย์กลาง และน้ำหนักแห้งของเฟื่องฟ้า (*Bougainvillea spectabilis*)

ข้อเสนอแนะในการนำผลวิจัยไปใช้

การใช้ชีวภัณฑ์ต้นแบบเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ เพื่อใช้ส่งเสริมการเจริญเติบโตของ พืช เป็นการผลิตในระดับห้องปฏิบัติการ จึงควรมีการศึกษาในประเด็นอื่นเพิ่มขึ้น ดังต่อไปนี้

1. ควรใช้ช่วงระยะในการทดสอบการเจริญเติบโตของต้นหนุ่กล้วยสัตรูซึ่งให้มีระยะเวลา ทดสอบนานขึ้น เพื่อให้ต้นหนุ่กล้วยสัตรูซึ่งสามารถผลิตรวงและรวงแก่พร้อมเก็บเมล็ดได้ทันใน ระยะเวลาที่กำหนด
2. เนื่องจากต้นหนุ่กล้วยสัตรูซึ่งมีระยะเวลาในการเจริญเติบโตที่ค่อนข้างนาน จึงควรมี การศึกษาระยะเวลาในการเติมสารชีวภัณฑ์ในต้นหนุ่กล้วยสัตรูซึ่งให้สอดคล้องกับระยะเวลาในการ ปลูกลงแปลงจริงเพิ่มเติม
3. ควรนำชีวภัณฑ์ต้นแบบเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ที่ผลิตได้ทดสอบกับพืชชนิด อื่นๆ ที่มีอายุการเก็บเกี่ยวระยะสั้นหรือพืชสวยงาม พืชกลุ่มไม้ดอกไม้ประดับในกระถางขนาดเล็ก เพื่อ ประเมินประสิทธิภาพของ เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดบีดส์ ในการส่งเสริมการเจริญเติบโตของพืชได้ ดีมากขึ้น

บรรณานุกรม

- กรมส่งเสริมการเกษตร. (2563). การใช้เชื้อจุลินทรีย์ (ชีวภัณฑ์) ในการควบคุมศัตรูพืช. (พิมพ์ครั้งที่ 2). https://opac.tistr.or.th/Multimedia/STJN/2021-3603/tistr-stjn_3603-07.pdf
- จิระเดช แจ่มสว่าง. (2563). ไตรโคเดอร์มา: เชื้อราปฏิปักษ์ควบคุมโรคพืช. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน คณะเกษตร กำแพงแสน ภาควิชาโรคพืช, นครปฐม.
- ชนวน รัตนวราหะ. (2550). เกษตรอินทรีย์. สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร, กรุงเทพฯ.
- ธิดารัตน์ เสือทรงศีล และ พัทธราวุธ ศรีบุญเรือง. (2561). การใช้เชื้อราไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืชของเกษตร อำเภอบ้านแพ้ว จังหวัดสมุทรสาคร. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 49(2), 159-167.
- บุญรุ่ง ศรีสุข และ สุภาภรณ์ รัตนเลิศนุสรณ์. (2559). ศึกษาการเจริญเติบโตของโรงกางใบใหญ่ด้วยการใช้หัวเชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดอัดเม็ด. *วารสารวิจัยมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลศรีวิชัย*, 8(1), 81-90.
- ประภาส กาวิชา, วณรัตน์ นาดีโน และ วิไลวรรณ พัฒนาสันต์. (2563). การพัฒนาชีวภัณฑ์ไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดเพื่อควบคุมโรคเหี่ยวเหลืองของมะเขือเทศ. *วารสารวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี*, 9(6), 832-843.
- พลฤทธิ์ ทองคลี. (2562). การพัฒนาผลิตภัณฑ์ปุ๋ยอินทรีย์อัดเม็ดผสมเชื้อราไตรโคเดอร์มา. *วารสารดินและปุ๋ย*, 41(1), 4-13.
- วรารณณ์ แก้วคอน, นิคม นาคสุพรรณ, พัทธพร ไชยอาม, ปราบธนา อ่วมหมี่, สาวิตรี คำพิละธรรม, วรรัตน์ ยะระนะ, อรรยา ทาขาว, และอรจิรา หน่อคำ. (มกราคม, 2563). ฤทธิ์การส่งเสริมการเจริญของต้นข้าวโดยการใส่เชื้อราไตรโคเดอร์มาสายพันธุ์ท้องถิ่นสำหรับปลูกข้าวแบบชีววิถีในจังหวัดเชียงราย. [Poster presentation]. การประชุมวิชาการระดับชาติ พะเยาว์วิทย์ ครั้งที่ 9. มหาวิทยาลัยพะเยา, พะเยา, ประเทศไทย.
- วาริน อินทนา, อรรถกร พรหมวี, และ ปณณวิชญ์ เย็นจิตต์. (2559). การใช้เชื้อรา *Trichoderma asperellum* สายพันธุ์ท้องถิ่นร่วมกับสายพันธุ์กลายเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการควบคุมโรคเน่าระดับดินของมะเขือเทศ. *วารสารวิทยาศาสตร์เกษตร*, 47(3), 351-362.

- ศรัณย์พงศ์ ทองเรือง, จันทนา ไชยโชค, และ สุภาวดี มานะไตรนนท์. (2563). การศึกษาผลผลิต ลักษณะ ทางพืชอาหารสัตว์และคุณค่าทางโภชนาของหญ้ารูซี่และหญ้ามูลาโต 2 ที่อายุการ ตัดต่างกัน. *วารสารแก่นเกษตร*, 48(1), 675-682.
- สายทอง แก้วฉาย. (2555). การใช้ไตรโคเดอร์มาควบคุมโรคพืช. *วารสารมหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์*, 4(3), 108-123.
- สายัณห์ ทัดศรี. (2547). พืชอาหารสัตว์เขตร้อน. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- สายัณห์ ทัดศรี. (2548). หญ้าอาหารสัตว์และหญ้าพื้นเมืองในประเทศไทย. สำนักพิมพ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- Adan, J., Baque, A., Rahman, M., Islam, R. & Jahan, A. (2015). Formulation of *Trichoderma* based biopesticide for controlling damping off pathogen of eggplant seedling. *Universal Journal of Agricultural Research*, 3(3), 106-113.
- Adebayo, A. G., Kareem, K. T., Olatunji, M. T., Shokalu, A. O., Akintoye, H. A., & James, I. E. (2020). Effects of *Trichoderma longibrachiatum* (NGJ167) and compost on early growth of *Bougainvillea spectabilis*. *Ornamental Horticulture*, 26(4), 614–620.
- Anita Puyam. (2016). Advent of *Trichoderma* as a bio-control agent- A review. *Journal of Applied and Natural Science*, 8(2), 1100-1109.
- Brondi, M., Florencio, C., Mattoso, L., Ribeiro, C & Farinas, C. (2022). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* with nanocellulose/carboxymethyl cellulose nanocomposite. *Carbohydrate Polymers*, 295, 1-9.
- Druzhinina, I., Kopchinskiy, A.G. & Kubicek, C.P. (2006). The first 100 *Trichoderma* species characterized by molecular data. *Mycoscience*, 47(2), 55-64.
- Francisco, E.A., Mochi, D.A., Correia, A.C.B., & Monteiro, A.C. (2006). Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciencia Rural*, 36(4), 1309-1312.
- Jurić, S., Đermić, E., Topolovec-Pintarić, S., Bedek, M. and Vinceković, M. (2019). Physicochemical properties and release characteristics of calcium alginate microspheres loaded with *Trichoderma viride* spores. *Journal of Integrative Agricultural*, 18(11), 2534-2548.

- Kawicha, P., Natino, W., & Phatthanasan, W. (2020). Development of encapsulated granule of *Trichoderma*-based bioproduct for tomato *Fusarium* wilt disease control. *Thai Journal of Science and Technology*, 9(6), 832-843.
- Khan, J., Ooka, J.J., Miller, S.A., Madden, L.V. & Hoitink, H.A.J. (2004). Systemic Resistance Induced by *Trichoderma hamatum* 382 in Cucumber Against Phytophthora Crown Rot and Leaf Blight. *Plant disease*, 88(3), 280-286.
- Küçük, Ç., & Kivanç, M. (2005). Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. *African Journal Biotechnology*, 4(5), 483-486.
- Locatelli, G.O., Santos, G.F., Priscila, S. Botelho, P.S., Finkler, C.L.L. & Bueno, L.A. (2018). Development of *Trichoderma* sp. Formulations in encapsulated granules (CG) and evaluation of conidia shelf-life. *Biological Control*, 117, 21-29.
- Martinez, Y., Ribera, J., Schwarze, F.W.M.R., & France, K.D. (2023). Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107, 5595-5612.
- Maruyama, C.R., José, N.B., Lima, R. & Fraceto, L.F. (2020). Encapsulation of *Trichoderma harzianum* Preserves Enzymatic Activity and Enhances the Potential for Biological Control. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8, 1-14.
- Mishra, P.K. & Khan, F.N. (2015). Effect of different growth media and physical factors on biomass production of *Trichoderma viride*. *People's Journal of Scientific Research*, 8(2), 11-16.
- Oliveir, D.G.P., Pauli, G., Mascarin, G.M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 44-52.
- Sukyai, S., Suwannarach, N., & Nuangmek, W. (2020). Study of suitable materials for bioformulation development of endophytic fungus *Trichoderma* sp. (L3I1). *Khon Kaen Agricultural Journal*, 48(1), 331-336.
- Ziaee, M., Ebadollahi, A., & Wakil, W. (2021). Integrating inert dusts with other technologies in stored products protection. *Toxin Reviews*, 40(4), 404-419.

ภาคผนวก ก

ต้นแบบการออกแบบผลิตภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ดปิดส

ด้านหน้าของผลิตภัณฑ์



TRICHOBEAD
สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด
Trichoderma longibrachiatum

**ผลิตภัณฑ์ควบคุมโรคพืช ชนิดสารชีวภัณฑ์
ไม่มีส่วนผสมของสารเคมี ปลอดภัย**

จุดเด่นของเชื้อราไตรโคเดอร์มา

- ป้องกันการเกิดโรคพืช เป็นปรีๆกับเชื้อราก่อโรคพืช อาทิเช่น
สามารถควบคุมโรครากเน่า โคนเน่า โรคใบจุด โรคใบไหม้ ไม่ควรรอง โรคเมล็ดด่าง
- กระตุ้นการเจริญเติบโตของพืช เพิ่มผลผลิต เร่งระบบราก สร้างระบบภูมิคุ้มกันของพืช

100 เม็ด

บริการวิชาการ

Manufacturer
RDI Chiang Rai Rajabhat University
Contact Information:
Phone: 081-785-8184
ดร. วราภรณ์ แก้วคอน

ด้านหลังซองผลิตภัณฑ์







TRICHOBEAD

สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด
Trichoderma longibrachiatum

ลักษณะและรูปแบบการใช้ผลิตภัณฑ์

สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มาชนิดเม็ด เหมาะสำหรับพืชที่มีการเพาะปลูกในรูปแบบกระถาง (พืชดอก ไม้ด่าง ไม้กระถาง ไม้ประดับ) **ถาดเพาะกล้า หรือแปลงปลูกขนาดเล็ก-กลาง** (เพาะกล้าผัก กล้าดอกไม้มิ กล้าพันธุ์ไม้) ทั้งแบบ single pot และ multi-pot **ไม่เหมาะสมในการปลูกแบบแปลงใหญ่เนื่องจากอาจส่งผลต่อต้นทุนการผลิตที่เพิ่มขึ้น**

วิธีการใช้

- 1 สำหรับพืชชนิดปลูกในกระถาง ผสมไตรโคเดอร์มา ชนิดเม็ดกับดิน**
อัตราส่วน นำสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา ชนิดเม็ด จำนวน 10 เม็ดต่อดิน หรือวัสดุเพาะ น้ำหนัก 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าผสมให้เข้ากัน บรรจุใส่กระถางปลูกพืช หรือกล้าพืช และรดน้ำ
- 2 สำหรับพืชชนิดถาดเพาะกล้า**
นำสารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา ชนิดเม็ด จำนวน 10 เม็ดต่อวัสดุเพาะกล้า น้ำหนัก 1 กิโลกรัม คลุกเคล้าผสมให้เข้ากัน รดน้ำให้ชุ่ม บ่มวัสดุเพาะและเชื้อนี้ นาน 5-7 วัน (เพื่อให้เชื้อราเกิดการเจริญเพิ่มจำนวนขยายตัว) เมื่อครบเวลา นำวัสดุเพาะแบ่งใส่ถาดหลุมเพาะกล้า และทำการเพาะปลูกต่อไป

หมายเหตุ ปริมาณเชื้อ $1 \times 10^{10-12}$ CFU ต่อ กิโลกรัมวัสดุเพาะ เก็บรักษาในตู้เย็น อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

ระยะเวลาที่ใช้

- ควรใช้ผลิตภัณฑ์ชีวภาพนี้ในช่วงตั้งแต่เริ่มการปลูกพืช เพื่อให้เชื้อราไตรโคเดอร์มาออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการควบคุมโรค และสนับสนุนการเจริญเติบโตของพืช
- ควรใช้ซ้ำทุก 30-45 วัน หรือตามความเหมาะสม ในช่วงที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรค หรือเมื่อสังเกตเห็นอาการของโรค

ข้อจำกัด

สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา เป็นเชื้อราที่มีชีวิต มีการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้เอง **แต่** เมื่อมีการใช้สารเคมีอื่น ๆ ร่วมด้วยในการเพาะปลูก เช่น สารเคมีกำจัด เชื้อโรคประเภทต่าง ๆ สารเคมีนี้อาจเข้าไปทำลายเชื้อราไตรโคเดอร์มาด้วย ทำให้สารชีวภัณฑ์เชื้อราไตรโคเดอร์มา ไม่ออกฤทธิ์ตามที่ควร





ภาคผนวก ข
วารสารตีพิมพ์



Journal of Food Health and Bioenvironmental Science

Journal homepage : <http://jfhb.dusit.ac.th/>

Optimizing *Trichoderma longibrachiatum* Pellets with Spent Mushroom Substrate: A Study on Conidial Viability and Shelf Life

Waraporn Kaewkhon^{**}, Nikhom Naksupan^b, Somboon Kamtaeja^a, Preedaporn Suwandee^c, Sabaiprae Molamsa^a & Wannakarn Inpan^a

^a Biology Program, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, 57100 Thailand

^b Division of Microbiology and Parasitology, School of Medical Sciences, University of Phayao, Phayao, 56000 Thailand

^c Physics Program, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, Chiang Rai, 57100 Thailand

Article info

Article history:

Received : 15 June 2024

Revised : 15 August 2024

Accepted : 17 October 2024

Keywords:

Trichoderma longibrachiatum,
Spent mushroom substrate, Pellets

Abstract

Spent mushroom substrate (SMS), a byproduct of mushroom production, is commonly used as growth media in plant nurseries and horticulture. This study aimed to develop *Trichoderma longibrachiatum* pellets using SMS to extend conidial shelf life and enhance efficiency for biological control. *T. longibrachiatum* strains isolated from paddy field soils in Phayao and Chiang Rai provinces were formulated into pellets using SMS and diatomaceous earth (DE) across four formulations. Each formulation contained viable conidia of *T. longibrachiatum* at a concentration of 2×10^7 conidia/mL of distilled water, with varying ratios of SMS and DE. The pellets were characterized based on weight, diameter, water solubility, and conidial shelf life after storage at 4°C for 60 days. Formulations 2–4 showed a significant increase in weight compared to formulation 1, depending on the percentage of DE. The average pellet diameters ranged from 9.40 ± 0.27 mm (formulation 1) to 10.89 ± 0.65 mm (Formulation 4). Water solubility tests revealed significant differences among the formulations ($P < 0.05$). formulation 1 had the longest dissolution time (11.12 ± 0.89 min), while formulation 4 had the shortest (0.26 ± 0.08 min). All formulations maintained conidial viability when cultured on *Trichoderma* selective media (TSM). Based on water solubility and conidial viability, formulation 4 emerged as the optimal formulation for potential use in biological control applications in agriculture.

Introduction

Biological control refers to the use of living organisms, such as antagonistic microorganisms, to manage pests and diseases. Historically, pest and disease

control in agriculture has largely relied on chemical-based pesticides due to their convenience and effectiveness. However, the extensive use of these chemicals has led to significant issues, including environmental contamination, decreased biodiversity, pathogen

* Corresponding Author
e-mail: waraporn.kae@crju.ac.th

resistance, and risks to human health (Zhu et al., 2018). As a result, biological control has gained importance, driven by consumer demand for reduced pesticide use (Martinez et al., 2023; Symondson et al., 2002). In particular, pesticide pollution poses serious health risks, especially to farmers who are in direct contact with these chemicals (Tang et al., 2021).

Among biological control agents, *Trichoderma* species are widely used to combat plant pathogens and promote plant growth (Martinez et al., 2023; Hermosa et al., 2012). *Trichoderma* spp. are highly effective antagonistic fungi, commonly employed in organic farming due to their adaptability to various environmental conditions. These fungi are characterized by their bright green conidia, which are produced asexually and dispersed through conidiophores (Gams & Bissett, 1998). They exert direct biological control through mechanisms such as mycoparasitism, competition, and antibiosis, and indirect control through the induction of systemic resistance and growth promotion in host plants. *Trichoderma* spp. can rapidly colonize and penetrate plant pathogenic fungi, secreting enzymes that inhibit their growth. The efficacy of *Trichoderma* depends on several factors, including soil pH, water retention, temperature, and heavy metal presence (Mukhopadhyay & Kumar, 2020). *Trichoderma* is now widely used in agriculture as a biological control agent. There are many species of *Trichoderma*, but 20 species of the genus *Trichoderma* such as *T. harzianum*, *T. koningii*, *T. viride*, *T. atroviride*, *T. pseudokoningii*, *T. longibrachiatum*, *T. hamatum*, *T. polysporum* and *T. reesei* are the most important species that act as potential antagonists (Monaco et al., 1991).

Since *T. harzianum* was first registered by the U.S. Environmental Protection Agency in 1989 for plant pathogen control (Fravel, 2005), *Trichoderma* species have become the most widely commercialized biological control agents globally. Commercial formulations of *Trichoderma* products are now available in various forms, including powders, granules, microgranules, encapsulated granules, and liquid emulsions, to improve convenience for farmers to prepare (Martinez et al., 2023). However, challenges remain due to the limited shelf life of these formulations and the potential for uncontrolled germination during storage (Kumar et al., 2014). Fresh *Trichoderma* cultures can be difficult to prepare and may be less effective compared to chemical pesticides. Additionally, some farmers lack awareness of *Trichoderma*'s mode of action, which may hinder its

adoption. Thus, enhancing the stability, usability, and effectiveness of *Trichoderma*-based products is crucial.

Spent mushroom substrate (SMS), a by-product rich in organic matter and nutrients, has been widely used in horticulture and plant nurseries. Research indicates that integrating SMS with *Trichoderma* can improve crop yields and reduce plant diseases (Kumar et al., 2022). Therefore, to enhance the long-term effectiveness of *Trichoderma*, the development of suitable storage methods and user-friendly formulations is essential. This research aims to develop *Trichoderma longibrachiatum* pellets from SMS to extend conidia shelf life and improve biological control efficacy.

Materials and methods

1. Strain of *T. longibrachiatum*

Trichoderma longibrachiatum was locally isolated from the paddy field soil in Phayao and Chiang Rai provinces, Thailand and classified based on molecular techniques. It is the most prevalent *Trichoderma* species in these regions. The spent mushroom substrate (SMS) was prepared according to the methodology outlined in petty patent number 2303002039. SMS, the residual substrate after harvesting mushroom fruiting bodies, was sterilized by autoclaving and passed through a 1 mm sieve prior to use.

2. Preparation of *T. longibrachiatum* pellets

The *Trichoderma* strain was cultured on Difco™ potato dextrose agar (PDA) (Difco, Becton, Dickinson and Company, USA) culture medium for 7 days at room temperature (27–28 °C). Conidia of *T. longibrachiatum* were collected from the surface of colonies on a PDA plate by washing with distilled water. The concentration of conidia was determined with a hemacytometer before pellet preparation.

Diatomaceous earth (Sigma-Aldrich, Merk, Germany) was used to collect and protect stored conidia of *T. longibrachiatum* from the surface of colonies on a PDA plate by using a cell scraper (Corning®E, Merk, Germany), then stored at 4°C in sterile paper bags before being dried and refrigerated at -20°C until further use. Potato starch (Sigma-Aldrich, Merk, Germany) was incorporated to achieve a homogeneous formulation.

Four pellet formulations were prepared, each containing SMS, *T. longibrachiatum* conidia, diatomaceous earth, and potato starch (see Table 1). The SMS, diatomaceous earth, and potato starch were autoclaved and air-dried before use. Pellet formation

followed a patented method, wherein the SMS was mixed with diatomaceous earth and starch before adding *T. longibrachiatum* conidia suspended in distilled water. The final conidia concentration was adjusted to 2×10^9 cells/100 mL. The ingredients were homogenized, then formulated into 10 mm diameter pellets (1 g/pellet) using conventional pill-making machines. The pellets were stored at 4°C in sterile paper bags, with 100 pellets/bag.

Table 1 Compositions of pellets

Formulations	Spent mushroom substrate (% w/w)	Diatomaceous earth (% w/w)	Potato starch (% w/w)	Conidia of <i>T. longibrachiatum</i> in distilled water (2×10^9 cells/mL)
F1	90	-	10	100
F2	80	10	10	100
F3	70	20	10	100
F4	60	30	10	100

Remark: Each formulation contains 100 pellets (weight: 1.00 g/pellet)

3. Characterization and physical properties of *T. longibrachiatum* pellets

Ten *T. longibrachiatum* pellets were randomly selected from each formulation for characterization. Pellet shape was documented using photography, and the diameter of the dried pellets, after 60 days of storage at 4°C, was measured with a vernier caliper. The weight of the pellets was determined using an analytical balance. Ten pellets from each formulation were weighed immediately after formulation and again after 60 days of storage at 4°C.

The physical properties of the pellets, including water solubility, were assessed based on the solubility of the carrier material, diatomaceous earth. As diatomaceous earth is generally insoluble and inert, its use in formulations can significantly impact on the water solubility of *Trichoderma* products (Chen et al., 2023). To determine solubility, each pellet was dissolved in 1,000 mL of distilled water in a graduated cylinder, and the dissolution time of the pellet carrier was recorded over a 20-min period.

4. Effect of conidia viability on *Trichoderma* selective media

The viability of *T. longibrachiatum* conidia in the pellets was evaluated through an in-vitro recovery test. Pellets from each formulation were assessed both immediately after formulation and after storage at 4°C for 10, 20, 30, 45, and 60 days. Each pellet was placed in the center of a Petri dish containing *Trichoderma* selective media (TSM).

The plates were incubated at room temperature (27-28°C), and the growth and development of *T. longibrachiatum* were observed and photographed. All assays were performed in triplicate. After 2-3 days of incubation, the colonies on the TSM plates were sub-cultured onto potato dextrose agar (PDA) plates to confirm the identity of *T. longibrachiatum*.

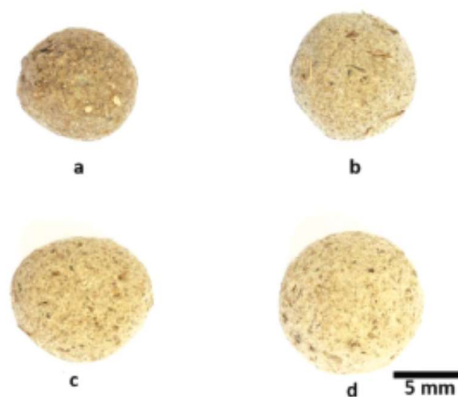
5. Statistical analyses

Data were statistically analyzed using one-way analysis of variance (ANOVA). Significant differences among the parameters were determined using Duncan's Multiple Range Test (DMRT) at a significance level of $P < 0.05$.

Results and discussion

1. Characterization of the *T. longibrachiatum* pellets

The *T. longibrachiatum* was used for pellets formulation. The pellets contain spent mushroom substrate, diatomaceous earth (DE), starch and conidia of *T. longibrachiatum*. The characteristics of the *T. longibrachiatum* pellets from four formulations showed that all of the *T. longibrachiatum* pellets appeared to be spherical shape and the surface of the pellets was a little rough depending on the percentage of DE in the formulation process (Fig.1).



Previous studies have demonstrated the important impact of *Trichoderma* based on *Trichoderma* spore suspension (Küçük & Kıvanç, 2005; Kawicha et al., 2020; Martinez et al., 2023). Based on these studies, the importance of *Trichoderma* conidia suspension on plant growth promotion, defense response and stress tolerance

depends on the conidia viability and dose responses of *Trichoderma* spore. Several types of formulations have been developed and have shown a long shelf life when stored at 4–10°C for 6 months up to 1 year depending on the formulation. So, storage of conidia of *Trichoderma* at 4°C showed a greater extension of conidia viability than at room temperature. Therefore, in this study, *T. longibrachiatum* pellets were stored at 4°C and characterized conidia viability for 6 months (Fig.2).

After 60 days, conidia viability was assessed for each formulation. The pellet color varied depending on the DE content. Formulation 1 (F1), which lacked DE, changed from black to dark brown after 60 days, while formulations 2–4 changed from black to shades of brown and pale brown (Fig. 2). The DE is used as a preservative in grains and in combination with other seed protectants (Ziaee et al., 2021). Several studies have been conducted to combine DE with entomopathogenic fungi to enhance conidial attachment (Abdelgaleil et al., 2021). The decrease in color intensity of formulation 2–4 was due

to an increase in the percentage of DE in the formulation. So, optimization of the DE factor is important. The formulation of 40% DE in pellets was difficult to formulate due to its fragility. In this study, the maximum percentage of DE in their formulation process was 30% because it affected the hardness of pellets. The formulation of DE tested in this study apparently had a non-toxic effect on conidia viability similar to that of Luz et al. (2012), who studied the effect of DE on the *in vitro* germination of *Metarhizium anisopliae* conidia without affecting viability.

The weight of the pellets was measured with a digital balance. Ten pellets from each formulation were randomly measured after being formulated and then measured again 60 days after storage at 4 °C as presented in Table 2. The results revealed that the pellets of formulations of 1–4, showed no significant differences between the formulations. After being stored at 4°C for 60 days, the results showed a decrease in the average weight of the pellets in all formulations. The reason for

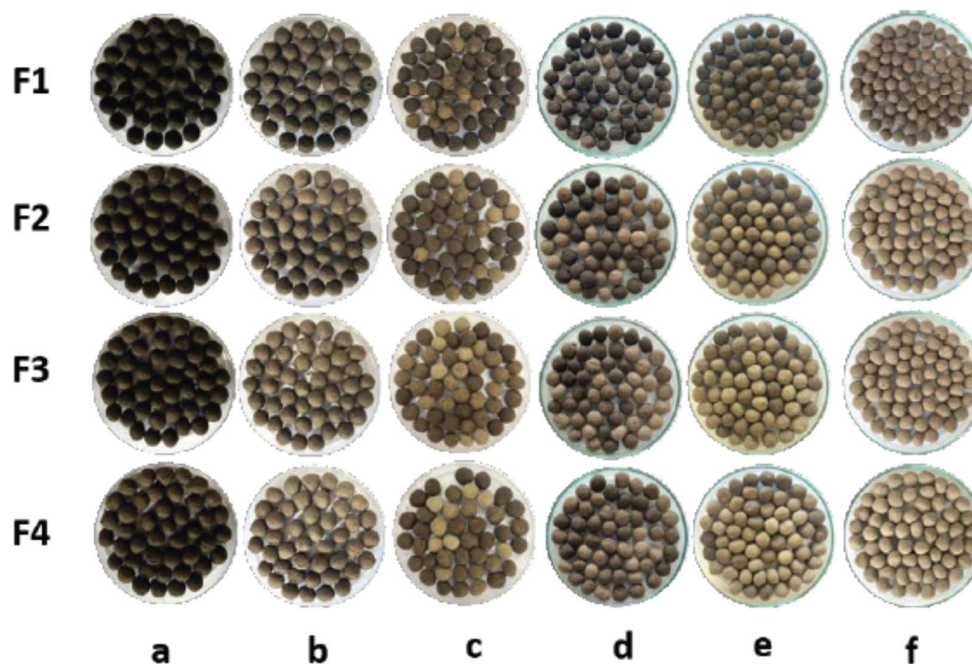


Fig. 2 Characteristics of *T. longibrachiatum* pellets (a: after formulation, b-f: after formulation and storage at 4°C for 10, 20, 30, 45, 60 days, respectively)

these decreases in weight is caused by the evaporation of distilled water in the formulation process. The average weight of *T. longibrachiatum* pellets from formulation 1 was 0.33 ± 0.02 g, showing a significant decrease in pellet weight when compared to the other formulation. This is due to formulation 1 not having a combination of DE in the formulation process. The weight of pellets from Formulations 2-4 showed a significant increase in weight when compared to formulation 1, depending on the percentage of DE ($P < 0.05$).

Pellet diameter was measured after 60 days of storage (Table 2). The average diameter for Formulations 1-4 was 9.40 ± 0.27 mm, 10.37 ± 0.32 mm, 10.46 ± 0.48 mm, and 10.89 ± 0.65 mm, respectively. Formulation 4 had the largest diameter, while formulation 1 was significantly smaller than the others ($P < 0.05$). This indicates that DE percentage influences both pellet weight and size.

To evaluate the pellets' physical properties in field conditions, water solubility tests were conducted. Solubility is crucial for conidia release and growth in the environment, particularly in rice fields. Ten pellets from each formulation were dissolved in 1,000 mL of distilled water, and dissolution time was recorded. Significant differences in water solubility were observed across formulations ($P < 0.05$). Formulation 1 exhibited the longest dissolution time (11.12 ± 0.89 min), while formulations 2, 3, and 4 dissolved in progressively shorter times (1.32 ± 0.14 min, 0.33 ± 0.18 min, and 0.26 ± 0.08 min, respectively). Formulation 4 demonstrated the fastest dissolution, indicating its potential as the optimal formulation for *T. longibrachiatum* pellets. These findings are consistent with those of Sukyai et al. (2020), who demonstrated that water solubility significantly affects the stability of *Trichoderma* products.

Table 2 Physical properties of pellets

Formulations	Weight (g)		Diameter size after storage 60 days (mm)	Water solubility (min)
	After being formulated into pellets	After storage 60 days		
F1	$1.01 \pm 0.04^{**}$	$0.33 \pm 0.02^*$	$9.40 \pm 0.27^*$	$11.12 \pm 0.89^*$
F2	$1.03 \pm 0.04^{**}$	$0.35 \pm 0.04^{**}$	$10.37 \pm 0.32^*$	$1.32 \pm 0.14^*$
F3	$1.04 \pm 0.06^{**}$	$0.36 \pm 0.02^*$	$10.46 \pm 0.48^*$	$0.33 \pm 0.18^*$
F4	$1.05 \pm 0.06^{**}$	$0.37 \pm 0.04^*$	$10.89 \pm 0.65^*$	$0.26 \pm 0.08^*$

Remark: The values are mean $\pm$ standard deviation. Means followed by same letter (s) in the same column do not differ significantly at 5% level of probability; ns: non-significant at 5% level of probability.

2. Characteristics of *T. longibrachiatum* pellets on conidia viability

The conidia viability of *T. longibrachiatum* pellets was assessed by culturing on *Trichoderma* selective media (TSM) for 10, 20, 30, 45, and 60 days at room temperature ($27-28^\circ\text{C}$). Colony morphology was compared to a control plate with purified *T. longibrachiatum* culture (Fig. 3a). The results demonstrated rapid conidia growth, with colonies reaching 8-9 cm in diameter within 3-5 days. Initially, colonies appeared as fluffy white tufts with crusts, which gradually transitioned into light green to dark green, and the reverse side of the colonies turned pale greenish-yellow by day 7-8 (Fig. 3b).



Fig. 3 Character of *T. longibrachiatum* pellet on PDA (a) and TSM (b) media

Following initial growth on TSM, selected colonies were transferred to potato dextrose agar (PDA) plates. On PDA, the conidia from all pellet formulations demonstrated rapid growth at all time points (10, 20, 30, 45, and 60 days) at room temperature ($27-28^\circ\text{C}$), matching the growth patterns of the control culture. This confirmed that all formulations preserved maximum conidia viability for up to 60 days (Fig. 4).

Conidia viability is a key parameter in evaluating the effectiveness of carrier substances used in biological control agents. These carriers must support high survival rates over time, maintain conidia dormancy/viability during extended storage, and be non-toxic to the cells (Martinez et al., 2023). The conidia viability assessment method was adapted from Francisco et al. (2006). Using PDA as a growth medium is advantageous because it promotes conidial germination and facilitates easy visualization of the conidia (Oliveira et al., 2015).

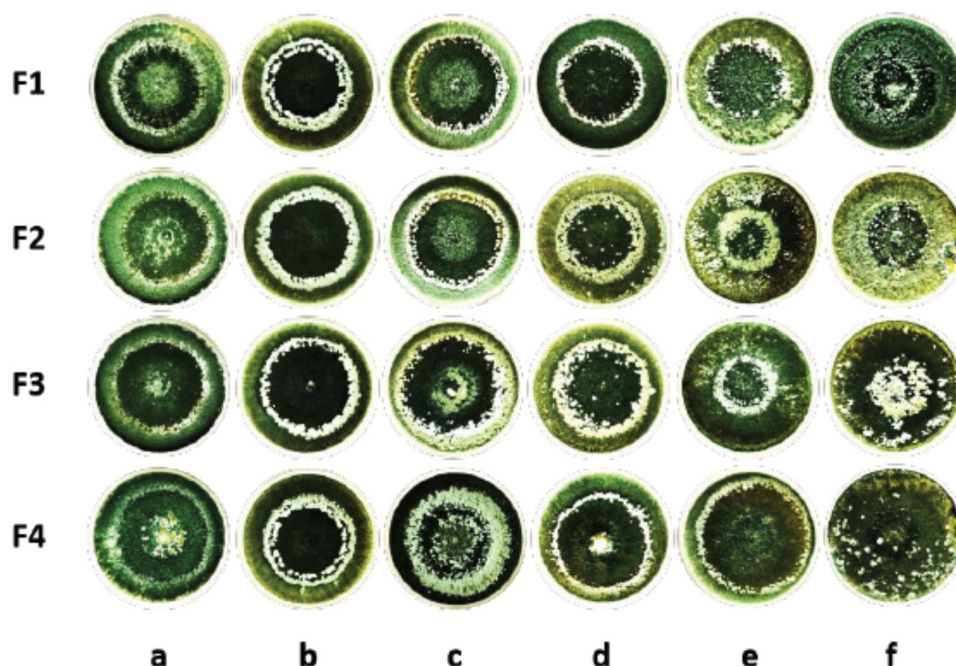


Fig. 4 Colony patterns of *T. longibrachiatum* on PDA from four pellets formulations. (a: after formulation, b-f: after formulation and storage at 4°C for 10, 20, 30, 45, 60 days, respectively)

Conclusion

T. longibrachiatum pellets can be formulated using spent mushroom substrate and diatomaceous earth (DE) in ratios of 0%, 10%, 20%, and 30% (w/w), respectively. These pellets maintain conidia viability for up to 60 days when stored at 4°C. Based on water solubility and conidia viability, formulation 4 was identified as the optimal formulation for pellet production. The ability of *T. longibrachiatum* pellets to maintain conidial properties and extend shelf life makes them a promising method for enhancing plant growth and controlling diseases in agricultural settings.

Acknowledgments

This work was supported by the Research and Development Institute of Chiang Rai Rajabhat University Grant (B167006, 2024). The authors are

grateful to the Biology Program, Faculty of Education, Chiang Rai Rajabhat University, for providing essential instrumental facilities. The authors also extend gratitude to Assistant Professor Kritchaya Issakul, School of Energy and Environment, University of Phayao, for editing and language review.

References

- Abdelgaleil, S.A.M, Gad, H.A., Hamza, A.F., & Al-Anany, M.S. (2021). Insecticidal efficacy of two inert dusts and *Trichoderma harzianum*, applied alone or in combination, against *Callosobruchus maculatus* and *Callosobruchus chinensis* on stored cowpea seeds. *Crop Protection*, 146, 105656.
- Chen, L., Hao, D., Dou, K., Lang, B., Wang, X., Li, Y., & Chen, J. (2023). Preparation of high water-soluble *Trichoderma* co-culture metabolite powder and its effects on seedling emergence rate and growth of crops. *Journal of Fungi*, 9(7), 767-785.

- Francisco, E.A., Mochi, D.A., Correia, A.C.B., & Monteiro, A.C. (2006). Influence of culture media in viability test of conidia of entomopathogenic fungi. *Ciencia Rural*, 36(4), 1309-1312.
- Fravel, D.R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annual Review of Phytopathology*, 43, 337-359.
- Gams, W., & Bissett, J. (1998). Morphology and identification of *Trichoderma*. In C.P. Kubicek, & G.E. Harman (Eds.), *Trichoderma and Gliocladium* (pp. 3-34). London, England: Taylor and Francis.
- Hermosa, R., Viterbo, A., Chet, I., & Monte, E. (2012). Plant-beneficial effects of *Trichoderma* and of its genes. *Microbiology*, 158(1), 17-25.
- Kawicha, P., Natino, W., & Phatthanasan, W. (2020). Development of encapsulated granule of *Trichoderma*-based bioproduct for tomato *Fusarium* wilt disease control. *Thai Journal of Science and Technology*, 9(6), 832-843.
- Küçük, Ç., & Kıvanç, M. (2005). Effect of formulation on the viability of biocontrol agent, *Trichoderma harzianum* conidia. *African Journal Biotechnology*, 4(5), 483-486.
- Kumar, S., Thakur, M., & Rani, A. (2014). *Trichoderma*: Mass production, formulation, quality control, delivery and its scope in commercialization in India for the management of plant diseases. *African Journal of Agricultural Research*, 9(53), 3838-3852.
- Kumar, S., Chugh, R.K., & Singh, J. (2022). Impact of spent mushroom substrate integration with *Trichoderma harzianum* on yield and gummosis disease incidence in bottle gourd (*Lagenaria siceraria*). *International Journal of Plant & Soil Science*, 34(18), 69-76.
- Luz, C., Rodrigues, J., & Rocha, L.F.N. (2012). Diatomaceous earth and oil enhance effectiveness of *Metarhizium anisopliae* against *Triatoma infestans*. *Acta Tropica*, 122, 29-35.
- Martinez, Y., Ribera, J., Schwarze, F.W.M.R., & France, K.D. (2023). Biotechnological development of *Trichoderma*-based formulations for biological control. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 107, 5595-5612.
- Monaco, C., Perello, A., Alippi, H.E., & Pasquare, A.O. (1991). *Trichoderma* spp.: a biocontrol agent of *Fusarium* spp. and *Sclerotium rolfsii* by seed treatment. *Advances in Horticultural Science*, 5(3), 92-95.
- Mukhopadhyay, R., & Kumar, D. (2020). *Trichoderma*: a beneficial antifungal agent and insights into its mechanism of biocontrol potential. *Egypt Journal of Biological Pest Control*, 30, 133.
- Oliveir, D.G.P., Pauli, G., Mascarin, G.M., & Delalibera, I. (2015). A protocol for determination of conidial viability of the fungal entomopathogens *Beauveria bassiana* and *Metarhizium anisopliae* from commercial products. *Journal of Microbiological Methods*, 119, 44-52.
- Sukyai, S., Suwannarach, N., & Nuangmek, W. (2020). Study of suitable materials for bioformulation development of endophytic fungus *Trichoderma* sp. (L311). *Khon Kaen Agricultural Journal*, 48(1), 331-336.
- Symondson, W.O.C., Sunderland, K.D., & Greenstone, M.H. (2002). Can generalist predators be effective biocontrol agents? *Annual Review of Entomology*, 47, 561-594.
- Tang, F.H.M., Lenzen, M., McBratney, A., & Maggi, F. (2021). Risk of pesticide pollution at the global scale. *Nature Geoscience*, 14, 206-210.
- Zhu, J., Wang, J., Ding, Y., Liu, B., & Xiao, W. (2018). A systems-level approach for investigating organophosphorus pesticide toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 149, 26-35.
- Ziaee, M., Ebadollahi, A., & Wakil, W. (2021). Integrating inert dusts with other technologies in stored products protection. *Toxin Reviews*, 40(4), 404-419.

ประวัตินักวิจัย

ชื่อ - สกุล นางสาววราภรณ์ แก้วคอน

วัน เดือน ปี เกิด 19 พฤศจิกายน 2521

ที่อยู่ปัจจุบัน

เลขที่ 499/345 ถนนกลางเวียง ตำบลริมกก

อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย

ประวัติการศึกษา

พ.ศ. 2555 วิทยาศาสตร์คชู้บัณฑิต

มหาวิทยาลัยนเรศวร

พ.ศ. 2565 ประกาศนียบัตรบัณฑิต

มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

ประสบการณ์การทำงาน

พ.ศ. 2558 - ปัจจุบัน อาจารย์ คณะครุศาสตร์ มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงราย

อำเภอเมือง จังหวัดเชียงราย