วารสารพืชศาสตร์สงขลานครินทร์ ปีที่ 9 ฉบับที่ 1 (มกราคม-มิถุนายน): 32-38, 2565
Songklanakarin Journal of Plant Science, Vol. 9, No. 1 (January-June): 32-38, 2022

Research article-ISSN: 2351-0846

ผลของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อขยายของเห็ดหลินจือ

Effect of Biochar Derived from Spent *Pleurotus* Mushroom Substrates (SPMS Biochar) for Improving the Production Efficiency of Mother Culture and Mother Spawn of Lingzhi Mushroom

จิตรา กิตติโมรากุล[1] อนุสรณ์ วัฒนกุล[1] นุชนารถ ตั้งจิตสมคิด[1] และ วราพร ไชยมา[1*]

Kittimorakul, J.[1] Wattanakul, A.[1] Tangchitsomkid, N.[1] and Chaiyama, V.[1*]

[1] สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร 50 ถ.พหลโยธิน แขวงลาดยาว เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900
[1] Biotechnology Research and Development Office, Department of Agriculture, 50 Phahonyothin Rd., Lat Yao, Chatuchak, Bangkok 10900

** Corresponding author: varaporn.chai@ku.th*
Received 18 February 2022; Revised 27 May 2022; Accepted 07 June 2022

บทคัดย่อ

เห็ดหลินจือเป็นเห็ดที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจด้วยสรรพคุณทางยาสูงและมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์อย่างแพร่หลาย แต่ในกระบวนการผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์และเชื้อขยายเห็ดหลินจือบางสายพันธุ์ยังประสบปัญหาเส้นใยเจริญช้าและลักษณะของโคโลนีเจริญไม่สม่ำเสมอ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์และเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่างของเห็ดหลินจือ ด้วยการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) ผสมลงในอาหาร PDA และข้าวฟ่างที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ทดสอบกับเห็ดหลินจือ 3 ไอโซเลต (GA025 GA026 และ GA027) ผลการศึกษาพบว่าเส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 3 ไอโซเลต ที่เลี้ยงบนอาหาร PDA + SPMS Biochar 0.1% เจริญได้ดีไม่แตกต่างจากกรรมวิธีควบคุม โดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยที่ 89.18, 89.59, และ 89.68 มิลลิเมตร ตามลำดับ แต่มีลักษณะเส้นใยหนาแน่นกว่ากรรมวิธีควบคุม ในขณะที่เส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 3 ไอโซเลตที่เลี้ยงในเชื้อขยายสูตรข้าวฟ่าง + SPMS Biochar 0.1% มีอัตราการเจริญเฉลี่ยต่อวันที่ 8.74, 9.90 และ 9.12 มิลลิเมตรต่อวัน สามารถเจริญคลุมข้าวฟ่างเฉลี่ยที่ 8.1, 8.50 และ 7.05 วัน ตามลำดับ และมีลักษณะเส้นใยหนาแน่นกว่ากรรมวิธีควบคุม ดังนั้น SPMS Biochar ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% จึงเป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดและเหมาะสมที่สุดเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์และแม่เชื้อขยายสำหรับให้บริการและถ่ายทอดองค์ความรู้สู่เกษตรกร
คำสำคัญ: ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า, แม่เชื้อบริสุทธิ์, เชื้อขยาย, เห็ดหลินจือ

Abstract

Lingzhi mushroom is the one of economically important medicinal mushrooms with high medical properties and is extensively used for medical benefits. But the production process of mother culture and mother spawn, some strains of lingzhi mushrooms have been suffered from slow growth mycelium and irregular colony growth. The objectives of this study were to improve and develop technology to produce mother culture and mother spawn of lingzhi mushroom. Three isolates of lingzhi mushrooms (GA025, GA026 and GA027) were applied to PDA culture and sorghum media with biochar derived from spent *Pleurotus* mushroom substrates (SPMS Biochar) at different concentrations. The results showed that 3 isolates of lingzhi mushrooms on PDA + 0.1% SPMS Biochar were the high mycelium diameter non-significant difference from control at 89.18, 89.59 and 89.68 mm, respectively. However, their mycelium was denser than control group. While 3 isolates of lingzhi mushrooms on sorghum mother spawn + 0.1% SPMS Biochar were the highest growth rate at 8.74, 9.90 and 9.12 mm/day, total colonization at 8.1, 8.50 and 7.05 days, respectively and they were found denser mycelium than control. Therefore, 0.1% of SPMS Biochar was the lowest concentration and recommended for the mother culture and mother spawn production for serviceability and knowledge transfer to mushroom growers.
Keywords: Biochar Derived from Spent Mushroom Substrates, Mother culture, Mother Spawn, Lingzhi mushroom

Published by Agricultural Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University. All rights reserved.
For Permissions, please e-mail: nr-sjps@group.psu.ac.th.

บทนำ

เห็ดหลินจือ (*Ganoderma* spp.) เป็นเห็ดที่มีสรรพคุณทางยาหรือเห็ดสมุนไพรที่ถูกนำมาใช้บำบัดรักษาโรคเป็นระยะเวลานาน และมีการนำมาใช้ประโยชน์ทางการแพทย์กันอย่างแพร่หลายทั้งในประเทศจีน ญี่ปุ่น เกาหลี ไต้หวัน สิงคโปร์ มาเลเซีย และประเทศไทย ในอดีตเห็ดหลินจือเป็นของหายากและมีราคาสูง กรมวิชาการเกษตรเริ่มนำเข้าและรวบรวมสายพันธุ์เห็ดหลินจือเป็นครั้งแรกตั้งแต่ปี พ.ศ. 2528 ด้วยสรรพคุณทางยาด้านการบำรุงร่างกาย กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน ต่อต้านการเจริญของเนื้องอกและเซลล์มะเร็ง ลดไขมันและน้ำตาลในเลือด ป้องกันการเสื่อมของเส้นประสาท แก้หลอดลมอักเสบเรื้อรัง แก้โรคหัวใจ และช่วยเรื่องการนอนหลับ (Jong and Birmingham, 1992; Lin, 2001; Tan and Vanitha, 2004; Boh *et al.,* 2007) เห็ดหลินจือจึงเป็นเห็ดที่ได้รับความนิยมและมีการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลาย โดยเฉพาะในรูปแบบชาชงหรือผงแคปซูล

ปัจจุบันกลุ่มวิจัยและพัฒนาเห็ด สำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร ซึ่งมีภารกิจหลักด้านการวิจัย พัฒนาเห็ด ให้บริการวิชาการเกี่ยวกับเทคโนโลยีการเพาะเห็ด ถ่ายทอดองค์ความรู้การเพาะเห็ดชนิดต่าง ๆ และให้บริการแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ มีความสนใจในการศึกษาและประยุกต์ใช้ไบโอชาร์หรือถ่านชีวภาพ (Biochar) ซึ่งมีลักษณะรูพรุนสูง สามารถดูดซับน้ำ ธาตุอาหารต่าง ๆ ได้ดี เพื่อพัฒนากระบวนการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์และเชื้อขยายสำหรับเพาะเห็ดหลินจือ เนื่องจากเห็ดหลินจือบางสายพันธุ์ เส้นใยเจริญได้ช้า ความหนาแน่นน้อย และลักษณะของโคโลนีไม่สม่ำเสมอในอาหารเลี้ยงเชื้อและเชื้อขยาย โดยไบโอชาร์สามารถผลิตจากวัสดุเหลือทิ้งทางการเกษตรได้หลายชนิด เช่น เศษกิ่งไม้ ไม้ไผ่ ฟางข้าว กะลามะพร้าว รวมถึงก้อนเห็ดเก่าที่เหลือทิ้งหลังกระบวนการเพาะเห็ด ซึ่งไบโอชาร์ที่นำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นไบโอชาร์ที่ผลิตจากก้อนเชื้อเห็ดที่เหลือจากกระบวนการเพาะเห็ดสกุลนางรมของกรมวิชาการเกษตร (SPMS Biochar) ที่พบว่าองค์ประกอบทางเคมีของ SPMS Biochar มีค่าฟอสฟอรัสสูงถึง 2.46% และฟอสฟอรัสเป็นธาตุอาหารอย่างนึงที่ช่วยส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ดหลายชนิด เช่น เห็ดแชมปิญอง (*Agaricus bisporus*) เห็ดสกุลนางรม (*Pleurotus florida*) และเห็ดฟาง (*Volvariella volvacea*) โดยส่งผลให้เส้นใยเห็ดเจริญได้เร็ว มีความหนาแน่นของเส้นใยและมีปริมาณมวลชีวภาพที่สูงขึ้น (Kamal *et al.,* 2012)

ที่ผ่านมามีรายงานการนำไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าผสมลงในวัสดุเพาะแล้วบรรจุในถุงพลาสติกเพื่อเพาะเห็ดสกุลนางรม โดยพบว่าก้อนเห็ดที่ผสมไบโอชาร์มีปริมาณคาร์บอน มีรูพรุนและสามารถกักเก็บความชื้นได้ดีขึ้น ส่งผลให้เส้นใยเห็ดเจริญได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุมในระยะเวลา 8 วัน จึงสามารถประยุกต์ใช้ไบโอชาร์เพื่อส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ดในก้อนวัสดุเพาะได้ (Lam *et al.,* 2019) อย่างไรก็ตาม มีเพียงรายงานการวิจัยประโยชน์ของไบโอชาร์ด้านการปรับปรุงบำรุงดินสำหรับปลูกพืชหรือผสมในก้อนเห็ดเพื่อส่งเสริมการเจริญของเชื้อเห็ด แต่ยังไม่พบรายงานการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์สำหรับการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์และแม่เชื้อขยายของเห็ดชนิดต่าง ๆ ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อปรับปรุงและพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์และเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่างของเห็ดหลินจือ ด้วยการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า เพื่อนำไปต่อยอดงานวิจัยด้านอื่น ๆ และถ่ายทอดองค์ความรู้ให้กับเกษตรกรผู้เพาะเห็ดต่อไปได้

วัสดุ อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมไบโอชาร์เพื่อใช้ในการทดสอบ

ไบโอชาร์ที่ใช้ในการทดสอบครั้งนี้เป็นไบโอชาร์ที่ผลิตจากก้อนเชื้อเก่าจากเห็ดสกุลนางรม (เห็ดนางฟ้าภูฐาน เห็ดนางรมฮังการี และเห็ดเป๋าฮื้อ) โดยคัดเลือกก้อนเห็ดที่เก็บผลผลิตแล้ว 3 – 4 เดือน แต่ยังไม่พบการปนเปื้อนจากจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ นำมาแกะถุงพลาสติกออก แบ่งก้อนเห็ดจาก 1 ก้อน เป็น 4 – 6 ชิ้น แล้วนำมาตากให้แห้งในพื้นที่อากาศถ่ายเทสะดวก จากนั้นนำเข้าสู่กระบวนการผลิตไบโอชาร์ด้วยเทคนิค Pyrolysis โดยใช้เตาเผาแบบเตาเบ็บซี (BEBC Stove) ซึ่งเป็นเตาพลังงานชีวมวลผลิตแก๊สหุงต้มและไบโอชาร์ระดับครัวเรือน ขนาดบรรจุ 50 ลิตร โดยใช้ระยะเวลา 1 ชั่วโมง 15 นาที ต่อรอบการเผา เมื่อสิ้นสุดกระบวนการผลิตจะได้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม หรือ SPMS Biochar สำหรับไบโอชาร์ทางการค้าที่นำมาใช้ทดสอบเปรียบเทียบเป็นไบโอชาร์ที่ผลิตจากกะลามะพร้าว จากนั้นนำไบโอชาร์ทั้ง 2 ชนิด บดด้วยเครื่องบดแห้งอเนกประสงค์ให้เป็นผงละเอียด ร่อนด้วยตะแกรงขนาด 60 Mesh ได้ผงไบโอชาร์ขนาด 0.2 ไมครอน แล้วจึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2. การเตรียมเชื้อเห็ดหลินจือ

นำเชื้อเห็ดหลินจือ จำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ GA025 เป็นสายพันธุ์บริการของกรมวิชาการเกษตร (เห็ดหลินจือ-1) และเชื้อเห็ดหลินจือ GA026 และ GA027 ซึ่งเป็นเชื้อพันธุ์เห็ดที่เก็บรักษาและอนุรักษ์ไว้ภายในศูนย์รวบรวมเชื้อพันธุ์เห็ดแห่งประเทศไทย กรมวิชาการเกษตร ย้ายเลี้ยงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato dextrose agar สำเร็จรูป (PDA; Himedia) ค่า pH 6 บ่มที่อุณหภูมิ 30 – 32 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 3 - 4 วัน แล้วจึงนำไปใช้ศึกษาในขั้นตอนต่อไป

2.1 ศึกษาผลของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ เพื่อผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ (Mother culture)

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA แล้วนำไปผสมไบโอชาร์ทางการค้าและ SPMS Biochar ในอัตราส่วนดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 PDA (Control) กรรมวิธีที่ 2 PDA + ไบโอชาร์ทางการค้า 0.2% (ดัดแปลงจากกรรมวิธีของ Camelini *et al*., 2012) กรรมวิธีที่ 3 PDA + SPMS Biochar 0.1% กรรมวิธีที่ 4 PDA + SPMS Biochar 0.2% กรรมวิธีที่ 5 PDA + SPMS Biochar 0.5% ศึกษาการเจริญของเส้นใยบนอาหารวุ้นชนิดต่าง ๆ ในจานเลี้ยงเชื้อขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 90 มิลลิเมตร อาหารทุกสูตรที่ทำการทดลองใช้ปริมาณ 15 - 20 มิลลิลิตร ต่อจานเลี้ยงเชื้อ จากนั้นปลูกเชื้อเห็ด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 32 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาที่เชื้อเห็ด

เจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อในอาหารสูตรต่าง ๆ โดยวัดการเจริญเส้นใยเห็ดหลินจือ ทุก ๆ 1 วัน บันทึกจำนวนวันที่เส้นใยเจริญเต็มจานอาหารเลี้ยงเชื้อ สีของเส้นใย และประเมินความหนาแน่นของเส้นใย โดยแบ่งเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) เส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง (++) และเส้นใยเจริญหนาแน่นน้อย (+) วางแผนการทดลองแบบ สุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS version 26 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Tukey HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

2.2 ศึกษาผลของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ เพื่อผลิตเชื้อขยาย (Mother spawn)

เตรียมเมล็ดข้าวฟ่างต้มสุก แล้วนำไปผสมไบโอชาร์ทางการค้าและ SPMS Biochar ในอัตราส่วนโดยน้ำหนักดังนี้ กรรมวิธีที่ 1 ข้าวฟ่าง 100% (Control) กรรมวิธีที่ 2 ข้าวฟ่าง + ไบโอชาร์ทางการค้า 0.2% กรรมวิธีที่ 3 ข้าวฟ่าง + DOA SPMS Biochar 0.1% กรรมวิธีที่ 4 ข้าวฟ่าง + SPMS Biochar 0.2% กรรมวิธีที่ 5 ข้าวฟ่าง + SPMS Biochar 0.5% จากนั้นบรรจุเมล็ดข้าวฟ่างในสูตรต่าง ๆ ลงในขวดแก้วปริมาณขวดละ 100 กรัม นำไปนึ่งฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดันที่ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 40 นาที ปล่อยไว้ให้เย็น นำ Cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร เจาะบริเวณปลายเส้นใยของแม่เชื้อเห็ดหลินจือ ใช้เข็มเขี่ยย้ายเชื้อเห็ดหลินจือลงในขวดข้าวฟ่างสูตรต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 30 – 32 องศาเซลเซียส เปรียบเทียบระยะเวลาที่เชื้อเห็ดเจริญเต็มขวดข้าวฟ่างสูตรต่าง ๆ โดยวัดการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือทุก ๆ 2 วัน บันทึกจำนวนวันที่เส้นใยเจริญเต็มขวดข้าวฟ่าง สีของเส้นใย และประเมินความหนาแน่นของเส้นใย โดยแบ่งเป็น 3 ระดับคือ เส้นใยหนาแน่นดี (+++) เส้นใยหนาแน่นปานกลาง (++) และเส้นใยหนาแน่นน้อย (+) วางแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (CRD, completely randomized design) ประกอบด้วย 5 กรรมวิธี ๆ ละ 4 ซ้ำ วิเคราะห์ค่าทางสถิติด้วยโปรแกรม IBM SPSS version 26 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยด้วยวิธีทางสถิติ Tukey HSD test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

ผลการทดลอง

1. ศึกษาผลของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ เพื่อผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ (Mother culture)

ผลการศึกษาการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 3 ไอโซเลตคือ GA025 GA026 และ GA027 บนอาหารวุ้นชนิด PDA ที่ผสมไบโอชาร์ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ พบว่า เชื้อเห็ดหลินจือ GA025 ที่อายุ 5 วัน บ่มที่อุณหภูมิ 30 - 32 องศาเซลเซียส เส้นใยในกรรมวิธีที่ 1, 2, 3 และ 4 เจริญได้ดี ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยที่ 89.50, 88.75, 89.18 และ 86.46 มิลลิเมตร ตามลำดับ และผลจากการประเมินความหนาแน่นของเส้นใย พบว่า กรรมวิธีที่ 2 และ 3 เส้นใยหนาแน่นดีกว่า ในกรรมวิธีที่ 1 และ 4 ในขณะที่กรรมวิธีที่ 5 (PDA + 0.5% SPMS Biochar) เส้นใยเจริญได้ไม่สม่ำเสมอ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยที่สุดที่ 74.75 มิลลิเมตร และมีความหนาแน่นน้อย (+) (Table 1, Figure 1A) สำหรับเชื้อเห็ดหลินจือ GA026 ที่อายุ 6 วัน พบว่า เส้นใยในกรรมวิธีที่ 3, 4 และ 5 ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยสูงไม่แตกต่างกันทางสถิติที่ 89.59, 90.00 และ 89.71 ตามลำดับ และมีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 1 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยที่ 82.12 มิลลิเมตร และกรรมวิธีที่ 2 (PDA + 0.2% Commercial biochar) มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยที่สุดที่ 75.03 มิลลิเมตร เส้นใยมีความหนาแน่นน้อย (+) และเส้นใยเจริญได้ไม่สม่ำเสมอ (Table 1, Figure 1B) ส่วนเชื้อเห็ดหลินจือ GA027 ที่อายุ 6 วัน พบว่า ในกรรมวิธีที่ 1 3 4 และ 5 เส้นใยเจริญได้ดี ไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ย 89.62, 89.68, 89.34 และ 89.65 มิลลิเมตร ตามลำดับ และลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) ในขณะที่กรรมวิธีที่ 2 มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเฉลี่ยน้อยที่สุด คือ 80.18 มิลลิเมตร มีความหนาแน่นของเส้นใยน้อย (+) เจริญไม่สม่ำเสมอ และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม (Table 1, Figure 1C)

Table 1 Effect of different concentrations of SPMS Biochar on mycelial growth of lingzhi mushroom strains for mother culture production

Treatment	Colony diameter (mm)[1/]			Density of mycelium[2/]		
	GA025	GA026	GA027	GA025	GA026	GA027
1. PDA (Control)	89.50a	82.12bc	89.62a	++	+++	++
2. PDA + 0.2% Commercial biochar	88.75a	75.03c	80.18b	+++	+	+
3. PDA + 0.1% SPMS Biochar	89.18a	89.59ab	89.68a	+++	+++	+++
4. PDA + 0.2% SPMS Biochar	86.46a	90.00a	89.34a	++	+++	+++
5. PDA + 0.5% SPMS Biochar	74.75b	89.71ab	89.65a	+	+++	+++
F-test	*	*	*			
C.V. (%)	9.25	11.40	5.13			

[1/] Different letter were significantly different by Tukey HSD test., * = significant at p≤0.05

[2/] +, ++ and +++ denote density of mycelium as dense, denser and much denser growth.

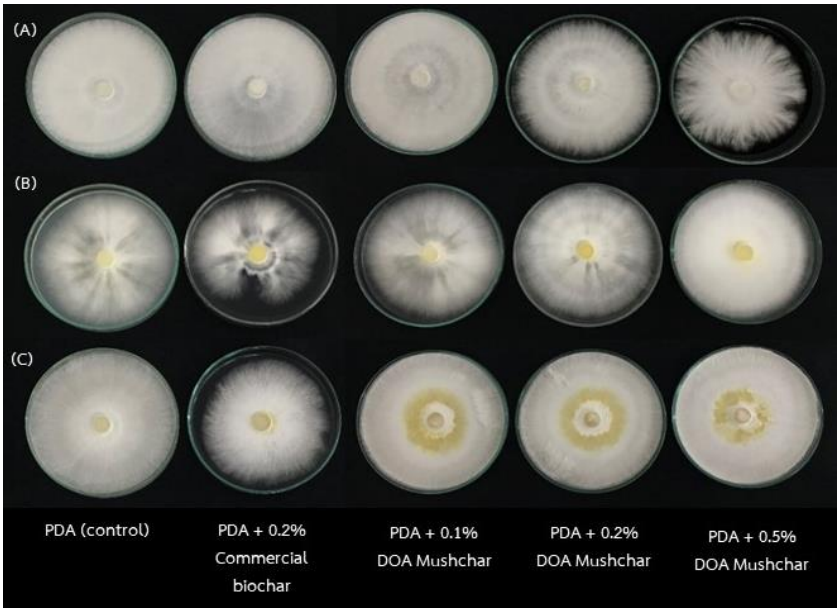

Figure 1 The mycelial growth and density of lingzhi mushroom on PDA supplemented with SPMS Biochar at different concentrations; (A) GA025 at 5 days, (B) GA026 at 6 days, and (C) GA027 at 6 days

2. ศึกษาผลของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) ต่อการเจริญของเห็ดหลินจือ เพื่อผลิตเชื้อขยาย (Mother spawn)

เชื้อเห็ดหลินจือ จำนวน 3 ไอโซเลต เมื่อนำมาทดสอบประสิทธิภาพของไบโอชาร์ต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือเพื่อผลิตเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่าง บ่มที่อุณหภูมิ 30 - 32 องศาเซลเซียส พบว่า เชื้อเห็ดหลินจือ GA025 ในกรรมวิธีที่ 3 และ 4 มีอัตราการเจริญของเส้นใยสูงสุดที่ 8.74 และ 8.59 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2, Figure 3A) โดยเส้นใยเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างได้เร็วที่สุดและไม่แตกต่างกันหลังบ่มเชื้อนาน 8.1 และ 8.3 วัน และมีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) (Table 3, Figure 2A) รองลงมาคือ กรรมวิธีที่ 1 (Control) มีอัตราการเจริญของเส้นใยที่ 8.02 มิลลิเมตร/วัน ส่วนเส้นใยในกรรมวิธีที่ 2 และ 5 มีอัตราการเจริญของเส้นใยช้าสุดและแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 6.84 และ 5.97 มิลลิเมตร/วัน (Table 2, Figure 3A) สำหรับเส้นใยในกรรมวิธีที่ 1 2 และ 5 สามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างได้หลังบ่มเลี้ยงนาน 10.25 11.15 และ 14.15 วัน ตามลำดับ เส้นใยมีความหนาแน่นปานกลาง (++) และความหนานแน่นน้อย (+) (Table 3)

เชื้อเห็ดหลินจือ GA026 พบว่า กรรมวิธีที่ 3 และ 4 เชื้อเห็ดเจริญได้ดีที่สุด โดยมีอัตราการเจริญต่อวันสูงที่สุดที่ 9.90 และ 9.49 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งสูงกว่ากรรมวิธีอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Table 2, Figure 3B) โดยเส้นใยสามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างได้เร็วที่สุดและไม่แตกต่างกันหลังบ่มเชื้อนาน 7.05 และ 7.60 วัน และมีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) (Table 3, Figure 2B) รองลงมาคือ เส้นใยในกรรมวิธีที่ 1 (Control) และ 2 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยไม่แตกต่างกันที่ 8.81 มิลลิเมตร/วัน และกรรมวิธีที่ 5 มีอัตราการเจริญของเส้นใยช้าที่สุดที่ 7.73 มิลลิเมตร/วัน (Table 2, Figure 3B) โดยเส้นใยในกรรมวิธีที่ 1 2 และ 5 สามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างได้หลังบ่มนาน 9.55 9.75 และ 12.05 วัน ตามลำดับ และมีความหนาแน่นของเส้นใยในระดับปานกลาง (++) ทั้ง 3 กรรมวิธี (Table 3)

เชื้อเห็ดหลินจือ GA027 พบว่า กรรมวิธีที่ 4 มีอัตราการเจริญต่อวันสูงสุดที่ 9.69 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เส้นใยในกรรมวิธีที่ 3 มีอัตราการเจริญต่อวันที่ 9.12 มิลลิเมตร/วัน ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากกรรมวิธีที่ 1 (Control) และ 4 (Table 2, Figure 3C) โดยเส้นใยในกรรมวิธีที่ 3 และ 4 สามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างได้ไม่แตกต่างกัน หลังบ่มเลี้ยงเส้นใยนาน 8.50 และ 7.50 วัน และมีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) (Table 3, Figure 2C) รองลงมาคือกรรมวิธีที่ 1 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ย 8.65 มิลลิเมตร/วัน เส้นใยสามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างหลังบ่มเลี้ยงเชื้อนาน 10.30 วัน และมีระดับความหนาแน่นของเส้นใยปานกลาง (++) ส่วนกรรมวิธีที่ 2 และ 5 มีอัตราการเจริญของเส้นใยที่ค่อนข้างช้าและแตกต่างจากกรรมวิธีควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกรรมวิธีที่ 2 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ย 7.40 มิลลิเมตร/วัน เส้นใยสามารถเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่างหลังบ่มเลี้ยงเชื้อนาน 13.05 วัน เส้นใยเจริญหนาแน่นดี (+++) และกรรมวิธีที่ 5 มีอัตราการเจริญของเส้นใยเฉลี่ยช้าสุดที่ 5.62 มิลลิเมตร/วัน เส้นใยคลุมเมล็ดข้าวฟ่างหลังบ่มเลี้ยงเชื้อนาน 19.35 วัน มีลักษณะของเส้นใยเจริญหนาแน่นปานกลาง (++) (Table 3)

Table 2 Effect of different concentrations of SPMS Biochar on mycelium growth rate (mm/day) of lingzhi mushroom strains (GA025, GA026, and GA027) for spawn production

Treatments	Mycelium growth rate (mm/day) [1/]		
	GA025	GA026	GA027
1. Sorghum (Control)	8.02±0.30b	8.81±0.36b	8.65±1.05b
2. Sorghum + 0.2% Commercial biochar	6.84±0.29c	8.81±0.65b	7.40±0.85c
3. Sorghum + 0.1% SPMS Biochar	8.74±0.11a	9.90±0.21a	9.12±0.82ab
4. Sorghum + 0.2% SPMS Biochar	8.59±0.25a	9.49±0.46a	9.69±0.39a
5. Sorghum + 0.5% SPMS Biochar	5.97±0.45d	7.73±0.98c	5.62±0.95d
F-test	*	*	*
C.V. (%)	14.57	10.57	20.70

[1/] Different letter were significantly different by Tukey HSD test, * = significant at p≤0.05

Table 3 Number of days for total colonization of sorghum grains and mycelia density

Treatment	Total colonization (days)[1/]			Density of mycelium[2/]		
	GA025	GA026	GA027	GA025	GA026	GA027
1. Sorghum (Control)	10.25b	9.55b	10.30b	++	++	++
2. Sorghum + 0.2% Commercial biochar	11.15c	9.75b	13.05c	+++	++	+++
3. Sorghum + 0.1% SPMS Biochar	8.1a	7.05a	8.50a	+++	+++	+++
4. Sorghum + 0.2% SPMS Biochar	8.3a	7.60a	7.50a	+++	+++	+++
5. Sorghum + 0.5% SPMS Biochar	14.15d	12.05c	19.35d	+	++	++
F-test	*	*	*			
C.V. (%)	12.52	10.61	15.73			

[1/] Different letter were significantly different by Tukey HSD test, * = significant at p≤0.05

[2/] +, ++ and +++ denote density of mycelium as dense, denser and much denser growth

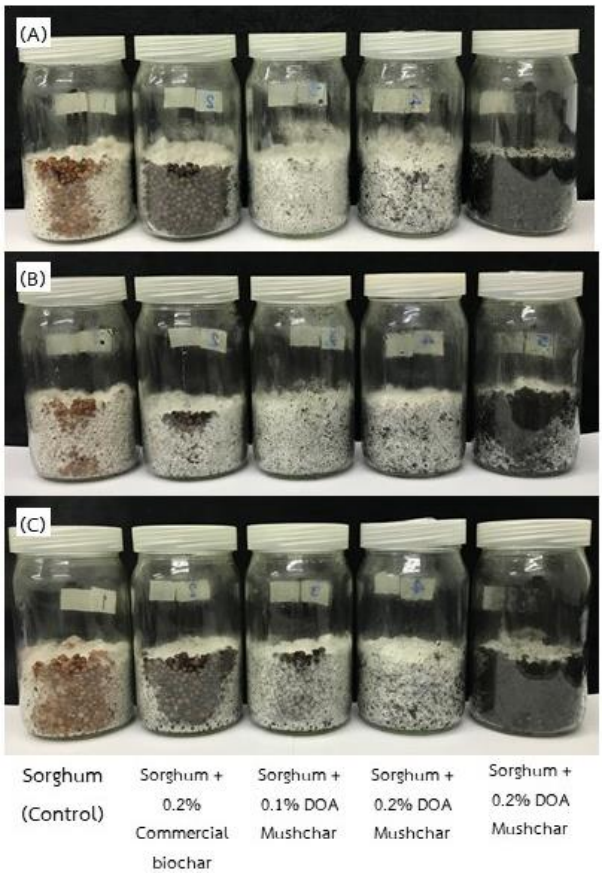

Figure 2 The mycelial growth and density of Lingzhi mushroom on sorghum supplemented with SPMS Biochar at different concentrations; (A) GA025 at 8 days, (B) GA026 at 7 days, and (C) GA027 at 7 days

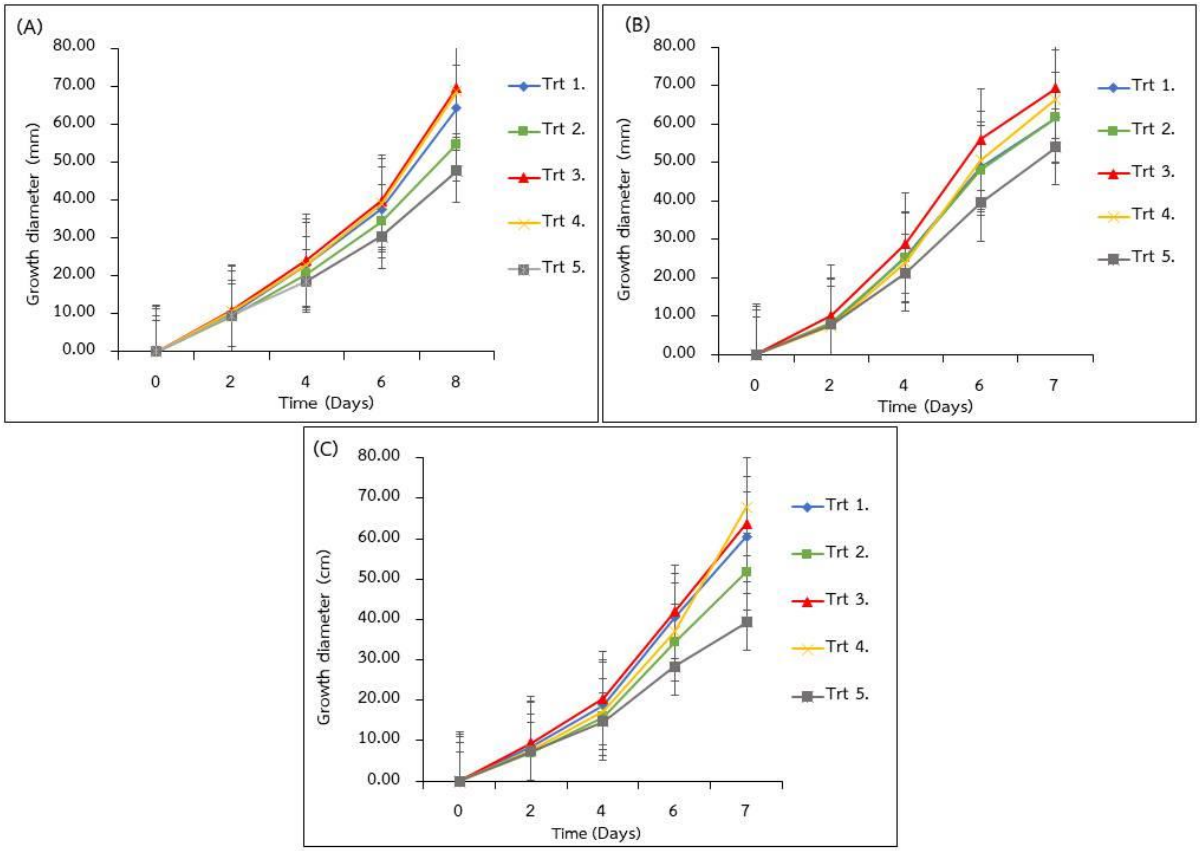

Figure 3 The mycelial growth rate (mm/day) of lingzhi mushroom on sorghum supplemented with SPMS Biochar at different concentrations; (A) GA025 at 8 days, (B) GA026 at 7 days, and (C) GA027 at 7 days

วิจารณ์

จากผลการเจริญของแม่เชื้อเห็ดหลินจือ GA025 และ GA027 ในอาหาร PDA ที่ผสม SPMS Biochar ที่ระดับความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม แต่เส้นใยมีความหนาแน่นกว่ากรรมวิธีควบคุม และไอโซเลต GA026 กรรมวิธีที่ผสม SPMS Biochar 0.2% เส้นใยสามารถเจริญได้ดีกว่ากรรมวิธีควบคุม ดังนั้นการผสม SPMS Biochar ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 และ 0.2% จึงสามารถประยุกต์ใช้ในการปรับปรุงพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Camelini และคณะ (2012) รายงานการประยุกต์ใช้ผงถ่าน (Activated carbon) ระดับความเข้มข้น 0.2% ในอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA เพื่อเลี้ยงเชื้อเห็ดแชมปิญองหลังการเก็บรักษาเชื้อเป็นเวลานานกว่า 12 เดือน ที่อุณหภูมิ 8 องศาเซลเซียส โดยความเข้มข้นดังกล่าวช่วยส่งเสริมฟื้นฟูการเจริญของเส้นใยเห็ดแชมปิญองได้ และไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม อย่างไรก็ตามด้วยคุณสมบัติของไบโอชาร์ที่มีรูพรุนสูง การผสมไบโอชาร์ในอาหารเลี้ยงเชื้อจึงอาจช่วยดูดซับสารทุติยภูมิบางอย่างที่มีการปลดปล่อยในระหว่างการเจริญของเส้นใยเห็ด โดยสารทุติยภูมิต่าง ๆ ในเห็ดและเชื้อราหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ สามารถส่งผลต่อการเจริญของเส้นใย ลักษณะของเส้นใยเจริญไม่สม่ำเสมอของเชื้อชนิดนั้นได้ (Walton *et al.*, 1997) นอกจากนี้ ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อในทุกกรรมวิธีที่ผสมด้วย SPMS Biochar พบว่า ทุกกรรมวิธีมีค่า pH ที่ระดับ 6.0 ซึ่งไม่แตกต่างจากอาหารเลี้ยงเชื้อ PDA สูตรปกติ โดยค่า pH ที่เป็นกลางมักเป็นค่าที่เหมาะสมกับการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือมากที่สุด (Jayasinghe *et al.*, 2008) และจากองค์ประกอบทางเคมีของ SPMS Biochar พบว่ามีค่าฟอสฟอรัสสูงถึง 2.46% ซึ่งเป็นธาตุอาหารที่สามารถส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ดในอาหารที่มีไนโตรเจนสูง โดย Watson (1973) รายงานว่าในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อเห็ดที่มีปริมาณแหล่งไนโตรเจนที่สูง แต่หากมีฟอสฟอรัสในปริมาณที่น้อยเกินไป สามารถส่งผลต่อการเจริญของเส้นใยเห็ดในอาหารได้

อย่างไรก็ตาม ในกระบวนการผลิตเชื้อขยายในเมล็ดข้าวฟ่าง อัตราการเจริญต่อวันของเส้นใย ระยะเวลาที่เชื้อเจริญคลุมเมล็ดข้าวฟ่าง และความหนาแน่นของเส้นใยเห็ดหลินจือทั้ง 3 ไอโซเลต ในข้าวฟ่างผสม SPMS Biochar ความเข้มข้น 0.1% และ 0.2% ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ แต่มีความแตกต่างทางสถิติจากกรรมวิธีควบคุม ดังนั้นสูตรการผลิตเชื้อขยายโดยใช้ข้าวฟ่าง + SPMS Biochar 0.1% จึงมีความเหมาะสมต่อการส่งเสริมการเจริญของเส้นใยเห็ดหลินจือ เนื่องจากการผสมไบโอชาร์ในระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ทำให้สีของเมล็ดข้าวฟ่างมีความเข้มขึ้น และส่งผลต่อการสังเกตการปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ต่าง ๆ ได้ยาก โดยคุณสมบัติการมีรูพรุนสูงของไบโอชาร์ เมื่อนำไปผสมกับข้าวฟ่างซึ่งเป็นวัสดุเพาะสำหรับเชื้อขยายสามารถช่วยเคลือบและเพิ่มพื้นที่ผิวบนเมล็ดข้าวฟ่าง เพิ่มช่องว่างระหว่างเมล็ดให้เส้นใยเจริญได้เร็วขึ้น สามารถดูดซับน้ำจากวัสดุเพาะที่มีความชื้นต่ำ รวมถึงสารอาหารจากเมล็ดข้าวฟ่างเพื่อใช้ในการเจริญของเส้นใยเห็ดได้ดีขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Nam และคณะ (2018) พบว่าการผสมไบโอชาร์จากกะลาปาล์ม 20 กรัม ต่อวัสดุเพาะเห็ดนางรม 100 กิโลกรัม ช่วยเพิ่มการดูดซับน้ำของวัสดุเพาะ ทำให้เส้นใยเห็ดเจริญเต็มถุงได้รวดเร็วขึ้นใน

ระยะเวลา 21 วัน และให้ผลผลิตสูงสุดถึง 550 กรัม/เดือน และ Hammer และคณะ (2014) ทดสอบผสมไบโอชาร์ลงในดินเพื่อเพิ่มพื้นที่การเจริญของเส้นใยเห็ดไมคอร์ไรซาที่เจริญร่วมกับรากพืช โดยพบว่าการเพิ่มไบโอชาร์ลงในดินช่วยเพิ่มการเจริญของเส้นใยเห็ดไมคอร์ไรซาในดินและบริเวณพื้นรากพืชได้ดีขึ้น อีกทั้งช่วยเพิ่มการดูดซับฟอสฟอรัสได้สูงขึ้นถึง 6 เท่าอีกด้วย

สรุป

ผลการศึกษาประสิทธิภาพของไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าสกุลนางรม (SPMS Biochar) เพื่อใช้ในการปรับปรุงพัฒนาเทคโนโลยีการผลิตแม่เชื้อเห็ดบริสุทธิ์ พบว่า ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1% เป็นความเข้มข้นต่ำที่สุดและเหมาะสมที่สุดเพื่อประยุกต์ใช้ในการผลิตแม่เชื้อบริสุทธิ์และแม่เชื้อขยายสำหรับให้บริการและถ่ายทอดองค์ความรู้สู่เกษตรกรผู้เพาะเห็ดต่อไปได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานพัฒนาการวิจัยการเกษตร (องค์การมหาชน) (สวก.) สำหรับแหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัยในโครงการพัฒนาเทคโนโลยีการเพิ่มผลผลิตเห็ดร่างแหสายพันธุ์ไทยและเห็ดหลินจือด้วยการประยุกต์ใช้ไบโอชาร์จากก้อนเชื้อเห็ดเก่า และสำนักวิจัยพัฒนาเทคโนโลยีชีวภาพ กรมวิชาการเกษตร สถานที่ดำเนินงานวิจัยของโครงการวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Boh, B., Berovic, M., Zhang, J. and Zhi-Bin, L. 2007. *Ganoderma lucidum* and its pharmaceutically active compounds. Biotechnology annual review 13: 265-301.

Camelini, C.M., Pena, D.A., Gomes, A., Steindel, M., Rossi, M.J., Giachini, A.J. and Margarida, M.M. 2012. An efficient technique for in vitro preservation of *Agaricus subrufescens* (=*A. brasiliensis*). Annals of Microbiology 62: 1279-1285.

Hammer, E.C., Balogh-Bruntad, Z., Jakobsen, I., Olsson, P.A., Stipp S.L.S. and Rillig M.C. 2014. A mycorrhizal fungus grows on biochar and captures phosphorus from its surfaces. Soil Biology and Biochemistry. 77: 252-260.

Jayasinghe, C., Imtiaj, A., Hur, H., Lee, G.W., Lee, T.S. and Lee, U.Y. 2008. Favorable Culture Conditions for Mycelial Growth of Korean Wild Strains in *Ganoderma lucidum*. Mycobiology 36: 28-33.

Jong, S.C. and Birmingham, J.M. 1992. Medicinal benefits of the mushroom *Ganoderma*. Advances in Applied Microbiology 37: 101-134.

Kamal, S., Upadhyay, R.C., Ahlawat, O.P. and Singh, M. 2012. Effect of phosphate supplementation on growth and extracellular enzyme production by some edible mushrooms. Mushroom Research 21: 23-33.

Lam S.S., Lee, X.Y., Nam, W.L., Phang, X.Y., Liew, R.K., Yek, P.N.Y., Ho, Y.L., Ma, N.L. and Rosli, M.H.N.B. 2019. Microwave vacuum pyrolysis conversion of waste mushroom substrate into biochar for use as growth medium in mushroom cultivation. Journal of Chemical Technology and Biotechnology 94: 1406-1415.

Lin, Z.B. 2001. Modern research of *Ganoderma*, 2nd Ed. Beijing: Beijing Medical University Press.

Nam, W.L., Su, M.H., Phang, X.Y., Chong, M.Y., Liew, R.K., Ma, N.L. and Lam, S.S. 2018. Production of bio-fertilizer from microwave vacuum pyrolysis of palm kernel shell for cultivation of Oyster mushroom (*Pleurotus ostreatus*). Science of The Total Environment 624: 9-16.

Tan, B.K.H. and Vanitha, J. 2004. Immunomodulatory and Antimicrobial Effects of Some Traditional Chinese Medicinal Herbs: a review. Current Medicinal Chemistry 11: 1423-1430.

Walton, K., Coombs, M.M., Walker, R. and Ioannides, C. 1997. Bioactivation of mushroom hydrazines to mutagenic products by mammalian and fungal enzymes. Mutation Research 381: 131-139.

Watson, J.M. 1973. The beneficial effect of certain phosphate sources on commercial mushroom yields. Mushroom Journal 10: 466-468.