20918

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษปริญญาตรี

เรื่อง

ประสิทธิภาพของไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม คีโตเมี่ยม และบาซิลลัส ซับทิลิสในการย่อยสลายสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส

Efficacy of *Trichodderma harzianum*, *Chaetomium* sp. and *Bacillus subtilis* in degradation of Chlorpyrifos

T099094

โดย

นายศศิพงศ์ มณีมงคล

Mr.Sasiphong Maneemongkhol

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....99094
วัน,เดือน,ปี.....15 JUN 2009

ปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

พ.ศ. 2548

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

ปริญญา

วิทยาศาสตรบัณฑิต (เกษตรศาสตร์)

เรื่อง

ประสิทธิภาพของไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม คีโตเมี่ยม และบาซิลลัส ซับทิลิสในการย่อยสลายสาร

กำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส

Efficacy of *Trichodderma harzianum*, *Chaetomium* sp. and *Bacillus subtilis* in degradation of Chlorpyrifos

โดย

นายศศิพงศ์ มณีมงคล

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

.....

(ผศ.มานพ นชะพงษ์)

อาจารย์ที่ปรึกษา

ภาควิชารับรองแล้ว

.....

(รศ.ชวาลา บุรณศิริ)

หัวหน้าภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช

วันที่ ..... เดือน ..... พ.ศ. .....

บทคัดย่อ

เรื่อง	:	ประสิทธิภาพของไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม คีโตเมี่ยม และบาซิลลัส ซับทิลิสในการย่อยสลายสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส
โดย	:	นายศศิพงศ์ มณีมงคล
ปริญญา	:	วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เกษตรศาสตร์)
สาขาวิชา	:	เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช
อาจารย์ที่ปรึกษา	:	..... 27/เม.ย./49
		(ผศ.มานพ นชะพงษ์)

การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อ ไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม คีโตเมี่ยม และบาซิลลัส ซับทิลิสในการย่อยสลายสารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอส ทำโดยวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด มี 3 ซ้ำ 6 กรรมวิธี ได้แก่ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสารคลอร์ไพริฟอสผสมอยู่ 5 พีพีเอ็ม โดยมีการปลูกเชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส และ ไม่มีการปลูกเชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสารคลอร์ไพริฟอสผสมอยู่ 5 พีพีเอ็ม โดยมีการปลูกเชื้อไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัมและไม่มีการปลูกเชื้อไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม และ อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสารคลอร์ไพริฟอสผสมอยู่ 5 พีพีเอ็ม โดยมีการปลูกเชื้อคีโตเมี่ยมและไม่มีการปลูกเชื้อคีโตเมี่ยม แล้วตรวจวิเคราะห์หาสารคลอร์ไพริฟอสด้วยวิธีของ Steinwandter (1985) ผลการตรวจวิเคราะห์พบว่า เชื้อบาซิลลัส ซับทิลิส มีปริมาณสารคลอร์ไพริฟอสเหลืออยู่น้อยที่สุดคือ 3.3527 , 3.03884 และ 0.7827 พีพีเอ็ม เมื่อเวลาผ่านไป 1 , 4 และ 8 วัน ซึ่งจะเหลือน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อไตรโคเดอร์มา ฮาร์เซียนัม มีปริมาณสารเหลือน้อยรองลงมาคือ 3.5491 , 2.83425 และ 1.3185 พีพีเอ็ม ซึ่งจะเหลือน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 8 แต่ในวันที่ 1 และ 4 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อคีโตเมี่ยม มีปริมาณสารเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุดคือ 3.6791 , 3.46433 และ 3.0573 พีพีเอ็ม และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่ไม่มีการใส่เชื้อแล้วจะมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

Abstract

Title	:	Efficacy of *Trichodderma harzianum*, *Chaetomium* sp. and *Bacillus subtilis* in degradation of Chlorpyrifos
By	:	Mr. Sasiphong Maneemongkhol
Degree	:	Bachelor of Science in Agriculture
Major Field	:	Plant Pest Management Technology
Advisor	:	Manop Nachapong 27 April 2006

(Asst.Prof.Manop Nachapong)

Investigation on the efficacies of *Trichodderma harzianum*, *Chaetomium* sp. and *Bacillus subtilis* in degradation of chlorpyrifos was carried out in CRD with 3 replications and 6 treatments as the followings; nutrient broth (NB) containing chlorpyrifos 5 ppm and *B. subtilis* , NB with chlorpyriffos 5 ppm (check) , potato dextrose broth (PDB) with chlorpyrifos 5 ppm and *T. harzianum* , PDB with chlorpyrifos 5 ppm (check) , PDB with chlorpyrifos 5 ppm and *Chaetomium* sp. and PDB with chlorpyrifos 5 ppm (check) , respectively. Chlorpyrifos residues were extracted and isolated by using the method of Steinwandter (1985). The results showed that chlorpyrifos in inoculated with *B. subtilis* was significantly less than that of no inoculation (check) on 1 , 4 and 8 days , respectively. Chlorpyrifos residues in PDB inoculated with *T. harzianum* was significantly less than that of no inoculation (check) on 8 days but there were not significantly different on 1 and 4 days. Chlorpyrifos residues in PDB inoculated with *Chaetomium* sp. was not significantly different from that of no inoculation on 1 , 4 and 8 days.

คำนิยม

ปัญหาพิเศษปริญญาตรีครั้งนี้ สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องมาจาก ได้รับความกรุณาจาก ผศ. มานพ นชะพงษ์ ซึ่งเป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ที่คอยให้คำปรึกษาและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆทั้งในการทดลองและการทำรายงาน และ คุณ จรงค์ศักดิ์ พุมนวน นักวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช ที่อำนวยความสะดวก รวมทั้งยังช่วยให้แนวคิดในการทดลองและช่วยดูแลการทำงานอย่างต่อเนื่องตลอดมา

ขอขอบคุณมูลนิธิโครงการหลวงศูนย์อารักขาพืช ฝ่ายวิเคราะห์สารพิษตกค้าง และ ศูนย์โรคพืชที่ได้มอบเอกสารวิธีการตรวจสารพิษตกค้างรวมถึงเชื้อไตรโคเดอมา ฮาร์เซียนัม เพื่อใช้ในการทดลอง และภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากรที่ได้ให้ความอนุเคราะห์ด้านเชื้อบาซิลลัส ซับทิลิสในการทดลอง

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดา มารดา ที่ได้ช่วยส่งเสริมในด้านปัจจัยต่างๆ ตลอดจนเพื่อนๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการทำปัญหาพิเศษปริญญาตรีฉบับนี้ ทั้งในด้านกำลังใจและการช่วยเหลือในการทำครั้งนี้ด้วยครับ

ศศิพงศ์ มณีมงคล

มีนาคม 2549

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	I
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	II
คานยม	III
สารบัญ	IV
สารบัญตาราง	V
สารบัญภาพ	VII
คำนำ	1
วัตถุประสงค์	3
ตรวจเอกสาร	4
อุปกรณ์และสารเคมี	20
วิธีการทดลอง	22
ผลการทดลอง	26
วิจารณ์ผลการทดลอง	40
สรุปผลการทดลอง	41
เอกสารอ้างอิง	42
ภาคผนวก	46

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 32
2. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 35
3. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 38

ตารางผนวกที่

1. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 47
2. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 48
3. แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 49

4. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน 50
5. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลียงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน 51
6. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลียงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน 52
7. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ทีเหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน 53
8. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ทีเหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน 54
9. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ทีเหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน 55
10. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลียงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน 56
11. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลียงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน 57
12. แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลียงเชื้อทีมีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน 58

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

1. แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของ chlorpyrifos 1
2. แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *Trichoderma harzianum* 7
3. แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *Chaetomium* sp. 10
4. แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp. 13
5. แสดงส่วนประกอบพื้นฐานการทำงานของเครื่อง Gas Chromatography 18
6. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* บนอาหาร NA 26
7. แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ เชื้อ *Bacillus subtilis* (1000 เท่า) 27
8. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนอาหาร PDA 28
9. แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ เชื้อรา *Trichoderma harzianum* (1000 เท่า) 28
10. แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium* sp. บนอาหาร PDA 29
11. แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของ เชื้อรา *Chaetomium* sp. (100 เท่า) 30
12. แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 33
13. แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 36
14. แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Chaetomium* sp. และ ไม่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Chaetomium* sp. โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน 39

คำนำ

สารกำจัดศัตรูพืชเป็นปัจจัยสำคัญในการทำการเกษตรซึ่งทั่วโลกได้พยายามคิดค้นและพัฒนากันอย่างมากในช่วง 2-3 ทศวรรษที่ผ่านมา (Imran et al., 2004) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในช่วงหลังสงครามโลกครั้งที่ 2 มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืชอย่างกว้างขวางเพื่อตอบสนองความต้องการของผู้บริโภคทั้งภายในและส่งออกต่างประเทศทำให้ต้องมีการป้องกันและกำจัดศัตรูพืชเพื่อไม่ให้ผลผลิตได้รับความเสียหาย เนื่องจากประเทศไทยอยู่ในเขตร้อนชื้นทำให้สามารถเพาะปลูกพืชได้ตลอดทั้งปี จากสภาพดังกล่าวแมลงศัตรูพืชสามารถเจริญและแพร่พันธุ์ได้มากและรวดเร็ว การระบาดของแมลงศัตรูพืชจึงรุนแรงกว่าประเทศในเขตหนาว ส่งผลให้เกษตรกรต้องหาวิธีการป้องกันและกำจัดแมลงมากขึ้น การใช้สารกำจัดศัตรูพืชเป็นอีกวิธีหนึ่งที่สะดวก สามารถควบคุมและกำจัดแมลงที่ระบาดรุนแรงอย่างได้ผล ทำให้ประเทศไทยมีแนวโน้มการนำเข้าสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชจำนวนมากตั้งแต่ปี พ.ศ. 2512 เป็นต้นมา (ลักขณา , 2544)

สารกำจัดศัตรูพืชที่ไทยนำเข้าส่วนใหญ่นั้นเป็นสารเคมีประเภท 1a ที่มีพิษร้ายแรงยิ่ง (extremely hazardous) และประเภท 1b คือพิษร้ายแรง (highly hazardous) สภาพการณ์นี้ทำให้เกษตรกรและผู้ที่เกี่ยวข้องได้รับพิษภัยจากสารเคมีดังกล่าวเป็นจำนวนมาก และจากผลการตรวจระดับโคลินเอสเตอเรสจากเลือดของเกษตรกรของกรมอาชีวอนามัยกระทรวงสาธารณสุขพบว่า มีเกษตรกรที่มีผลการตรวจเลือดอยู่ในเกณฑ์ที่ไม่ปลอดภัย และเสี่ยงต่อการเกิดพิษสูง นอกจากนี้มลพิษที่ได้จากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังกระจายไปสู่ผู้บริโภคโดยการตกค้างในผลผลิต (วิฑูรย์ , 2542)

ปัจจุบันสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต เป็นสารเคมีที่ใช้กันอย่างกว้างขวางจึงก่อให้เกิดปัญหาตามมามากมาย เช่นปัญหาสิ่งแวดล้อม (Digrak and Kazanici , 2001) ก่อให้เกิดการปนเปื้อนในในธรรมชาติ โดยเฉพาะสาร chlorpyrifos ที่ใช้กันทั่วโลกเพราะเป็นสารกำจัดแมลงที่สำคัญในการเกษตร แต่ได้มีการประกาศห้ามใช้เมื่อไม่นานมานี้และเนื่องจากมีการใช้เป็นเวลานานจึงเกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม ทำให้พืชสามารถนำสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมไปใช้เพราะเหตุนี้จึงมีสารตกค้างอยู่ในพืชด้วย (ลักขณา , 2545) จึงมีการนำจุลินทรีย์ในดิน มาควบคุมมลภาวะต่างๆ โดยจุลินทรีย์เหล่านี้มีอัตราการเจริญเติบโต และ metabolism สูงขึ้นเมื่อเกิดมลภาวะต่างๆขึ้น (Imran et. al. , 2004)

ในปี 1965 มีรายงานว่าสาร chlorpyrifos สามารถถูกย่อยสลายได้โดยพวกจุลินทรีย์ในดิน ในพื้นที่ที่มีการปลูกอ้อย ในประเทศ Australia (Singh et. al., 2003)

ในปี 1977 Laveglia และ Dahm ได้รายงานว่า *Bacillus subtilis* สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้ในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Charoensri et. al., 2001)

สำหรับแบคทีเรียในดินที่สำคัญที่สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตที่ตกค้างในดินคือ เชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งพบว่าเชื้อ *Pseudomonas* sp. สามารถย่อยสลายสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้โดยการสร้างเอนไซม์ phosphatase หรือ phosphotriasterase ขึ้นมาย่อยสลายสารเหล่านี้เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ (Irene et al., 2001)

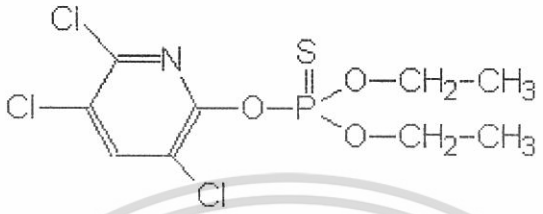
แต่เนื่องจาก เชื้อ *Pseudomonas* sp. มีสาร fluorescent ซึ่งเป็นอันตรายต่อมนุษย์ทำให้ไม่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ในการย่อยสลายสารเคมีที่ตกค้างในธรรมชาติได้ การศึกษาครั้งนี้จึงได้ทดลองนำเอาจุลินทรีย์ในดินตัวอื่นมาใช้แทนเชื้อ *Pseudomonas* sp. ซึ่งได้แก่เชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อ *Trichoderma harzianum* เชื้อ *Chaetomium* sp. ซึ่งเชื้อเหล่านี้มีประโยชน์ต่อพืชในด้านการช่วยป้องกันโรคแก่พืชและยังไม่เป็นอันตรายต่อมนุษย์และสิ่งแวดล้อมอีกด้วย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาสัณฐานวิทยาของเชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อ *Trichoderma harzianum* และเชื้อ *Chaetomium* sp. ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos
2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อ *Bacillus subtilis* เชื้อ *Trichoderma harzianum* และเชื้อ *Chaetomium* sp. ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

ตรวจเอกสาร

คลอร์ไพริฟอส (chlorpyrifos)



รูปที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของ chlorpyrifos

ชื่อทางเคมีตามระบบ IUPAC คือ O , O-diethyl O-(3 , 5 , 6-trichloro-2-pyridyl) phosphorothioate คลอร์ไพริฟอส เป็นชื่อสามัญ มีสูตรโมเลกุล คือ $C_9H_{11}C_{13}NO_3PS$ (Mol . wt . 350.6) ชื่อทางการค้าได้แก่ เดอร์สแบน (Dursban®) เอซิแบน (Aciban®) เจนเพสท์ (Genpest®) ไพริแบน (Pyriban®) ดีวิแบน (Deviban®) พิริเดน (Piridane®) ลอร์สแบน (Lorsban®) คลาสสิก (Classic®) โบรแดน (Brodan®) อีแรเดกซ์ (Eradex®) ซุลแบน (Sulban®) และคลอร์ไพริฟอส (Chlorpyrifos®) คลอร์ไพริฟอสมีลักษณะเป็นผลึกสีขาว มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 41-42 °C ละลายได้ใน อะซิโตน เบนซีน คลอร์โรฟอร์ม เอทธิลแอลกอฮอล์ เมทธิลแอลกอฮอล์ ไอโซออกเทนและสารทำละลายอินทรีย์อื่นๆ คลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมนาน มีพิษต่อสัตว์ที่อาศัยอยู่ในน้ำ จึงมีข้อจำกัดในการใช้ควบคุมแมลงในน้ำ หรือใช้กับพืชน้ำ และยังมีพิษต่อผึ้งสูงอีกด้วย (ลักขณา , 2544) คลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่มีอัตราการสลายตัวเพิ่มขึ้นตามการเพิ่มขึ้นของค่า pH โดยมี DT_{50} เท่ากับ 1.5 วัน (น้ำ pH 8 ที่ 25 °C) ถึง 100 วัน (phosphate buffer pH 7 ที่ 15 °C) และมีการสลายตัวในดินอย่างช้าๆ โดยมี DT_{50} ในดินประมาณ 60-120 วัน(ดำริห์ , 2543 ; Fest and Schmidt , 1983)

ประสิทธิภาพในการกำจัดศัตรูพืช

คลอร์ไพริฟอสมีประสิทธิภาพในการกำจัดเพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง เพลี้ยกระโดด มด หนอนใยผัก หนอนกอลาย หนอนเจาะสมอสีชมพู หนอนผีเสื้อขาวกะหล่ำ หนอนกระทู้ต่างๆ ไรแดง ไรสนิมส้ม แมลงวันทอง แมลงหวี่ขาว ด้วงงวงเจาะสมอ

วัตถุประสงค์ของการใช้คลอร์ไพริฟอส

ใช้กับผักต่างๆ เช่น ข้าว ข้าวโพด ฝ้าย ถั่วเหลือง ถั่วลิสง มันฝรั่ง ยาสูบ ส้ม สตรอเบอร์รี่ หน่อไม้ฝรั่ง ไม้ผล มะเขือเทศ ไม้ดอกและไม้ประดับทั่วไป

การใช้คลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารอื่น

คลอร์ไพริฟอส + บีพีเอ็มซี (5+15 %) ใช้ป้องกันกำจัดเพลี้ยอ่อน เพลี้ยหอย เพลี้ยจั๊กจั่น เพลี้ยแป้ง เพลี้ยกระโดด หนอนกอข้าว และหนอนกระทู้ข้าวโพด ที่ทำลายข้าว ยาสูบ และพริกไทย

ข้อควรระวังในการใช้คลอร์ไพริฟอส

1) มีฤทธิ์ตกค้างสั้นการฉีดพ่นลงบนใบพืชควรใช้ก่อนการเก็บเกี่ยว 7-14 วัน
2) คลอร์ไพริฟอสเป็นพิษต่อปลา อันตรายกับผึ้ง ไม่ควรใช้ในระยะที่ต้นไม้ออกดอก
3) ห้ามใช้ร่วมกับ zineb

การออกฤทธิ์

คลอร์ไพริฟอส เป็นสารกำจัดแมลงในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ประเภทไม่ดูดซึม ออกฤทธิ์ในการสัมผัสตายและกินตาย โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ระบบประสาทเช่นเดียวกับสารออร์กาโนฟอสเฟตชนิดอื่นๆ สารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะออกฤทธิ์โดยการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส (acetylcholineesterase:AChE) ทำให้มีการสะสมอะเซตทิลโคลิน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter) ที่จุดเชื่อมต่อระหว่างประสาท (synaptic junction) โดยปกติอะเซตทิลโคลินเมื่อจับกับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสแล้วจะแตกตัวเป็นกรดแอซิติกและโคลิน ซึ่งจะไม่ทำปฏิกิริยาใดๆ คือมีความเฉื่อย แต่อะเซตทิลโคลินที่ไม่แตกตัวและสะสมอยู่ ณ จุดเชื่อมต่อระหว่างประสาทจะทำให้การส่งสัญญาณทางประสาทตลอดเวลา มีผลทำให้กล้ามเนื้อกระตุกและเป็นอัมพาตได้ (พาลาภ , 2537 ; ลักขณา , 2544)

อะเซตทิลโคลินเป็นสารสื่อประสาทที่สร้างจาก อะเซตทิลโคเอนไซม์ เอ (acetyl coenzyme A) และโคลิน (choline) โดยมีเอนไซม์โคลินอะเซตทิลเลส (choline acetylase) เป็นตัวกระตุ้น (catalyst) โดยอะเซตทิลโคลินจะถูกเก็บไว้ที่ไซแนปติคเมมเบรน (presynaptic membrane) เมื่อไซแนปติคเวสิเคิลมีอะเซตทิลโคลินเต็ม ไซแนปติคเวสิเคิลจะเคลื่อนที่ไซแนปติคเคลฟท์ (synaptic cleft) แล้วเชื่อมกับพรีไซแนปติคเมมเบรน โดยผนังไซแนปติคเวสิเคิลจะเปิดออก ปล่อยให้อะเซตทิลโคลินเข้ามาในบริเวณจุดเชื่อมต่อของไซแนปติค (synaptic junction) แล้วอะเซตทิลโคลินจะเข้าจับกับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส หลังจากนั้นอะเซตทิลโคลินจะถูกทำลายโดยปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ได้โคลินและกรดแอซิติก (acetic acid) โดยกระบวนการดังกล่าวโมเลกุลของอะเซตทิลโคลินจะจับเกาะกับเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่ตำแหน่งเอสเทอราติก (esteratic site) ซึ่งมีหมู่ไฮดรอกซีของเซริน (E-OH) และที่ตำแหน่งแอนไอออนนิค (anionic site) ซึ่งมีประจุลบ การจับเกาะระหว่างโมเลกุลของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสเริ่มที่การจับเกาะของแอมโมเนียไอออนของอะเซตทิลโคลินกับตำแหน่งแอนไอออนนิคของอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส และการจับเกาะที่ตำแหน่งเอสเทอราติค ซึ่งปฏิกิริยาจะเกิดขึ้นเป็นขั้นตอน คือขั้นตอนแรกเกิดปฏิกิริยาอะเซตทิเลชัน (acetylation) ซึ่งจะทำให้

เกิดสารเชิงซ้อน enzyme-substrate complex ต่อมาโมเลกุลของโคลินจะแยกออก และสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาดีอะเซตทิเลชัน (deacetylation) (ลักขณา , 2544)

การยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส โดยสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เกิดจากสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตทำปฏิกิริยาฟอสฟอรีเลชัน (phosphorelation) กับอะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสที่อยู่ส่วนปลายประสาท ซึ่งขั้นตอนการทำปฏิกิริยาเริ่มจากการเกิด enzyme-inhibitor complex ซึ่งเป็นปฏิกิริยาที่ผันกลับได้ ต่อมาเกิดฟอสฟอรีเลชัน ซึ่งจะเกิดการยับยั้งเอนไซม์อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรส ทำให้มีการสะสมอะเซตทิลโคลินซึ่งมีผลทำให้มีการถ่ายทอดสัญญาณระหว่างปลายประสาทตลอดเวลา ทำให้แมลงหรือสัตว์แสดงอาการว่องไวผิดปกติ (hyperactivity) สั่นหรือชัก เป็นอัมพาต และตายในที่สุด และสุดท้ายจะเกิดปฏิกิริยาดีฟอสฟอรีเลชัน เนื่องจากปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส ซึ่งจะทำให้อะเซตทิลโคลินเอสเทอเรสกลับสู่สภาวะปกติ (สุภาณี , 2540 ; ลักขณา , 2544)

ความเป็นพิษ

คลอร์ไพริฟอสมีค่า LD_{50} โดยทางปากสำหรับหนูขาวและกระต่ายเท่ากับ 135-163 และ1000-2000 mg/kg ตามลำดับ และมีค่า LD_{50} โดยทางผิวหนังและทางปากสำหรับผึ้งเท่ากับ 59 และ250 ng/bee ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีค่า LC_{50} โดยทางสูดดมติดต่อกัน 4-6 ชั่วโมง สำหรับหนูขาว > 0.2 mg/l (14 ppb) (ดำริห์ , 2543 ; Fest and Schmidt , 1983)

อาการพิษ

ผู้ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสจะมีอาการเซื่องซึม ตาพร่า ช่องท้องปวดเกร็ง แน่นหน้าอก กล้ามเนื้ออ่อนเปลี้ย ปวดศีรษะ หายใจขัด ม่านตาหรี่ น้ำลายไหล คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง เหงื่อออกมาก และตัวสั่น (ปรีชา , 2542)

คำแนะนำในการแก้พิษ (ดำริห์ , 2543)

1) ช่วยให้ผู้ป่วยหายใจสะดวก โดยการให้ออกซิเจนก่อนอื่นใด

2) ให้สารอะโทรปีนซัลเฟต (atropine sulfate) เป็นยาต้านฤทธิ์ โดยให้ 1-2 มิลลิกรัมโดยฉีดเข้าเส้นเลือด ในรายที่มีอาการรุนแรงจะให้สารนี้ในขนาด 4 มิลลิกรัม ก่อนแล้วให้อีก 2 มิลลิกรัมทุกๆ 10-15 นาที จนเกิดอาการอะโทรปีไนเซชัน (atropinization , ซึ่งจะมีอาการหน้าแดง ปากแห้ง ม่านตาขยาย และชีพจรเต้นเร็ว อาจจะถึง 140 ครั้ง/นาที) นานอย่างน้อย 24-48 ชั่วโมง หรือจนกว่าผู้ป่วยมีอาการทุเลาดีขึ้น ในเด็กอายุต่ำกว่า 12 ปี จะให้ในอัตรา 0.05 มิลลิกรัม/น้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

3) หากได้รับโดยการกินให้ล้างท้องด้วยโซเดียมไบคาร์บอเนต 5% ตามด้วยผงถ่านแอคติเวทเทต (activated carbon) 30-50 กรัม/น้ำ 1 แก้ว แล้วตามด้วยยาระบายโซเดียมซัลเฟต

4) ในขณะให้สารอะโทรปีนซัลเฟตนั้น อาจให้สารกระตุ้นการทำงานของเอนไซมอะเซทิลโคลินเอสเทอเรส (cholinesterase activator) เช่น พราลิด็อกซิม (pralidoxime protopam pyridine-2-aldoximemethochloride 2-PAM) ให้โดยการฉีดเข้าเส้นเลือดช้าๆ (ในอัตราไม่เกิน 0.5 กรัม/นาที) ด้วยการผสมกับน้ำตาลกลูโคสในอัตราส่วน พราลิด็อกซิม 1 กรัม ผสมกับสารละลายกลูโคส 5% จำนวน 250 ซีซี ในรายที่รุนแรงจะให้ซ้ำใน 1-2 ชั่วโมง และถ้าจำเป็นก็จะให้อีกในช่วง 10-12 ชั่วโมง แต่ไม่เกิน 24-48 ชั่วโมง (อาจใช้ obidoxime chloride (Toxogenin) ขนาด 0.25 กรัม แทน 2-PAM ขนาด 1 กรัมก็ได้)

5) ห้ามให้ยาพวกมอร์ฟีน (morphine) ธีโอฟิลลีน (theophylline) เอมิโนฟิลลีน (aminophylline) บาร์บิทูเรท (barbiturate)

6) ไม่ควรให้น้ำเข้าทางเส้นเลือดมากเกินควร เพราะว่าผู้ป่วยเหล่านี้มีอาการหลั่งของเหลวออกมามากและมีแนวโน้มที่จะเกิดปอดบวมได้ง่าย

เชื้อรา *Trichoderma harzianum*

รูปที่ 2 แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *Trichoderma*

เชื้อรา *Trichoderma harzianum* เป็นเชื้อราชนิดหนึ่งที่สามารถเจริญเติบโตได้ดีในดิน เศษซากพืช ซากสิ่งมีชีวิตรวมทั้งจุลินทรีย์และอินทรีย์วัตถุตามธรรมชาติ จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Deuteromycota, form-class Hyphomycetes, form-family Moniliaceae มี teleomorph (perfect stage) อยู่ใน genus *Hypocrea* spp. ซึ่งเป็นเชื้อราใน Phylum Ascomycota, Order hypocreales (Samuels , 1996) ลักษณะทาง anamorph (imperfect stage)ของเชื้อราชนิดสร้าง conidiophores มีสีจาง หรือไม่มีสี แตกแขนงมาก พบ phialides เกิดเป็นเดี่ยวๆ หรือเป็นกลุ่ม conidia (phialospore)เป็นแบบเซลล์เดียว

รูปไข่ ไม่มีสี เกิดเป็นกลุ่มเล็กๆทีปลาย phialides โคโลนีสามารถเจริญบนอาหารเทียมได้อย่างรวดเร็ว ลักษณะของเส้นใยระยะแรกจะมีสีขาว เมื่อเจริญเต็มทีเส้นใยจะเป็นสีเขียว เนื่องจากมีการสร้างสปอร์มากขึน ก้านชูสปอร์จะแตกกิงก้านเป็นช่อ สปอร์ส่วนใหญ่จะมีสีเขียวมี 1 เซลล์รูปไข่ ผิวเรียบ หรือขรุขระเจริญออกมาจากส่วนปลายของเส้นใย มีขนาดเฉลีย 3.2 x 2.7 ไมครอน สามารถเจริญได้อย่างรวดเร็ว chamydospore จะเจริญระหว่างหรือส่วนปลายของเส้นใย มีลักษณะกลมใส เส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ย 6.9 ไมครอน (Homer et al., 1972) เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ที่พบทั่วไปในดินสามารถที่จะเจริญแข่งขันกับเชือโรคพืชได้ทีอุณหภูมิตังแต่ 15-21 องศาเซลเซียส และสามารถมีชีวิตรอดอยู่ได้ในทีมีอุณหภูมิเย็นจัดประมาณ 10-12 องศาเซลเซียส (Johnson et al., 1897) เชือบางสายพันธุ์สามารถเป็น parasite โดยการพันรัดเส้นใยเชือโรคแล้วสร้างเอนไซม์ เช่น chitinase , cellulose , b-1 , 3-glucanase ซึงมีคุณสมบัติในการย่อยสลายผนังเส้นใยของเชือโรคพืช จากนันจึงแทงเส้นใยเข้าไปเจริญอยู่ภายในเส้นใยเชือโรคพืชทำให้เชือโรคพืชสูญเสียความมีชีวิต ซึงมีผลทำให้ปริมาณของเชือโรคพืชลดลงนอกจากนีเชือรา *Trichoderma harzianum* ส่วนใหญ่จะเจริญโดยสร้างเส้นใย และ spore ได้ค่อนข้างรวดเร็ว จึงมีความสามารถสูงในการแข่งขันกับเชือโรคพืช ด้านการใช้อาหารและแร่ธาตุต่างๆจากแหล่งอาหารในธรรมชาติ ตลอดจนการใช้สารทีจำเป็นต่อการเจริญของเส้นใยได้เป็นอย่างดี ขณะทีบางสายพันธุ์ สามารถสร้างสารปฏิชีวนะชือว่า ไตรโคเดอร์มิน (trichodermin) ออกมาเพือยับยังหรือทำลายเส้นใยของเชือโรคจนเกิดการเหียวสลาย (lysis) ได้ด้วยคุณสมบัตินีจึงได้มีการนำเชือรา *Trichoderma harzianum* มาใช้เพือควบคุมเชือราสาเหตุโรคพืชหลายชนิด (จิระเดช , 2546)

ประโยชน์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

1. ช่วยลดกิจกรรมของเชื้อโรคพืชได้
   - ยับยั้งและทำลายการงอกของสปอร์
   - แข่งขันการใช้อาหารเพือการเจริญของเส้นใยเชือโรคพืช
   - ยับยั้งกิจกรรมต่าง ๆ ของเชื้อโรคทำให้ความรุนแรงลดลง
2. ช่วยลดปริมาณเชื้อโรคพืช
   - ทำลายเส้นใยของเชื้อราสาเหตุโรคพืชโดยการพันรัดและแทง
   - ทำลายโครงสร้างที่เชื้อโรคสร้างขึ้นสำหรับการขยายพันธุ์
   - ทำลายโครงสร้างที่เชื้อโรคพืชสร้างขึ้นเพื่ออยู่ข้ามฤดูกาล
3. ช่วยเพิ่มการเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช
   - เชื้อราไตรโคเดอร์มาป้องกันระบบรากพืชจากการเข้าทำลายของเชื้อรา สาเหตุโรคพืช ทำให้ระบบรากพืชสมบูรณ์แข็งแรง
   - เชื้อราไตรโคเดอร์มาผลิตสารเร่งการเจริญเติบโตของพืชได้

- เชื้อราไตรโคเดอร์มาช่วยให้เมล็ดงอกและเจริญเติบโตดี

4. ช่วยเพิ่มความต้านทานโรคของพืช
   - กระตุ้นให้เกิดความต้านทานโรคขึ้นภายในพืช
   - พืชที่มีระบบรากดี เจริญเติบโตดี แข็งแรง จึงต้านทานโรคได้ดีขึ้น

การใช้เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการควบคุมโรคพืช

Trichoderma harzianum เป็นเชื้อราที่มีศักยภาพในการขัดขวางรบกวนขบวนการต่างๆของเชื้อโรคพืชหลายชนิด เช่น เชื้อรา *Phytoppthora* spp. ที่ทำให้เกิดโรครากเน่าโคนเน่า เชื้อรา *Fusarium oxysporum* ทำให้เกิดโรคกล้าไหม้ โรคเหี่ยว เชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ทำให้เกิดโรคกล้าไหม้ เชื้อรา *Rhizoctonia* sp. ทำให้เกิดโรคเมล็ดเน่า โรคเน่าคอดิน เชื้อรา *Pythium* sp. สาเหตุของโรคเน่าระดับดิน โดยมีกลไกลในการแข่งขันแย่งอาหารกับเชื้อราโรคพืช เส้นใยจะแทงรัดพันรอบเส้นใยโรคพืช บางชนิดจะผลิตเอ็นไซด์ ทำให้เส้นใยของโรคพืชเหี่ยวสลาย (lysis)

การควบคุมเชื้อสาเหตุโรคพืชในดินโดยวิธีชีววิธี เป็นทางเลือกใหม่นอกจากการใช้สารเคมีเพื่อลดปัญหามลพิษต่อสิ่งแวดล้อม *Trichoderma* spp. หลายสปีชี่ส์ที่แยกได้จากดินพบว่า เป็นจุลินทรีย์ปฏิปักษ์ที่มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราทั้งภายใต้สภาพเรือนทดลองและแปลงปลูก (Chet and Inbar , 1994)

นิภาพร (2538) ได้ทดสอบการควบคุมเชื้อโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ด้วยเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในสภาพแปลงปลูกทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตาย 61.1 % หากใช้ร่วมกับ mancozeb ที่ความเข้มข้น 18,000 µg/ml ทำให้ต้นมะเขือเทศรอดตายถึง 88.9 %

นอกจากนี้ยังมีการค้นพบสายพันธุ์ของ *Trichoderma harzianum* ที่สามารถควบคุมโรคพืชเดหลายชนด เชน เรคเหยวของมะเขอเทศ แตง ผาย และ fusarium disease ของขาวสาล dry eye rot ของแอปเปิ้ล (Windels and Lindow , 1991 ; อ้างตาม จินตนา , 2543)

สนชัย (2539) ได้ทำการทดลองศึกษาศักยภาพของจุลินทรีย์ที่มีผลต่อการควบคุมเชื้อรา *Phytophthora palmivora* สาเหตุที่ทำให้เกิดโรครากเน่า โคนเน่าของทุเรียน โดยการเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหวางเชอราทมคุณสมบตเปนจุลินทรีย์ต่อต้าน กับเชื้อรา *Phytophthora palmivora* พบว่าเชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Phytophthora palmivora* ได้ดีที่สุดในห้องปฏิบัติการ มีค่าเฉลี่ย 76.77 %

สุมิตรา (2540) ศึกษาการเลี้ยงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* กับเชื้อราที่เป็นจุลินทรีย์ต่อต้าน พบว่า *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของโคโลนีและการสร้างสปอร์ของเชื้อราสาเหตุโรคแอนแทรกโนสได้ 74.13 และ 97.31 % ตามลำดับ

ธารทิพย์ (2544) ได้ศึกษาการเลียงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma harzianum* กับเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* ได้ โดยมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีเท่ากับ 2.19 เซนติเมตร และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 67.63 เปอร์เซ็นต์ และจากการนับจำนวนสปอร์ พบว่า สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ได้ โดยมีปริมาณสปอร์เท่ากับ 17.50 x 10^5 spore/ml และมีเปอร์เซ็นต์ยับยังการสร้างสปอร์เท่ากับ 93.85 เปอร์เซ็นต์ และยังได้ศึกษาการเลียงเชื้อร่วมบนอาหาร PDA ระหว่างเชื้อรา *Trichoderma harzianum* กับเชื้อรา *Fusarium oxysporum* พบว่า เชื้อรา *Trichoderma harzianum* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุของโรคเหี่ยวของมะเขือเทศได้ โดยมีเส้นผ่าศูนย์กลางโคโลนีของเชื้อเท่ากับ 2.22 เซนติเมตร และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการเจริญเติบโตเท่ากับ 72.27 เปอร์เซ็นต์ และจากการนับจำนวนสปอร์ พบว่า สามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อได้ โดยมีปริมาณสปอร์เท่ากับ 0.00 x 10^5 spore/ml และมีเปอร์เซ็นต์ยับยั้งการสร้างสปอร์เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์

เชื้อรา *Chaetomium* sp.

รูปที่ 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อ *Chaetomium* sp.

Chaetomium sp. เป็นเชื้อราพวก saprophytes ที่จัดอยู่ในกลุ่ม Ascomycetes สามารถเจริญได้ดีในเศษซากพืชและสัตว์ที่เน่าเปื่อยผุพัง และอินทรียวัตถุต่างๆ จัดจำแนกอยู่ใน sub-division Ascomycotina, class Pyrenomycetes, order Sphaeriales, family Melanosporaceae และอยู่ใน genus *Chaetomium* sp. ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีเป็นสีเขียวอ่อนถึงเข้มหรือออกเหลืองเมื่อแก่ และจะมีการหลั่งสารสีแดงบนอาหารวุ้น ascocrap เป็นแบบ perithecia มีผนังบาง hair มีลักษณะงอ

เป็นคลื่น ขนาดแตกต่างกัน ascospore รูปไข่ ผนังบางสีน้ำตาล ขยายพันธุ์โดยใช้เพศ และสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมต่างๆได้ดี โดยพบว่ามี *Chaetomium globosum* และ *Chaetomium cupreum* สายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจง สามารถควบคุมเชื้อราสาเหตุที่ทำให้เกิดโรคพืช ได้แก่ *Fusarium* spp., *Rhizoctonia* spp., *Pythium* spp. โดยได้มีการทดลองการควบคุมโรคทั้งในพืชผักและไม้ผล พบว่าสามารถควบคุมโรคได้เท่าเทียมกับ การใช้สารเคมีป้องกันกำจัดเชื้อรา และช่วยให้การเจริญเติบโตของพืชและผลผลิตดีกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและยังมีคุณสมบัติป้องกันโรคในลักษณะ broad spectrum mycofungicide ได้ด้วย (เกษม และ กอบบุญ , 2538)

การใช้เชื้อรา *Chaetomium* sp. ในการควบคุมโรคพืช

เกษม (2534ก) ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium gracile* ในการยับยั้งโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* โดยวิธีการ biculture test พบว่าเชื้อรา *Chaetomium gracile* สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ได้ 52 เปอร์เซ็นต์

เกษม (2534ข) รายงานว่า การทดสอบประสิทธิภาพในการควบคุมโรคโดยชีววิธี ใช้เชื้อรา *Chaetomium globosum* ต่อต้านเชื้อสาเหตุ ที่ทำให้เกิดโรคใบจุดของข้าวโพดหวาน พบว่า จุลินทรีย์สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อสาเหตุโรคได้ 74 % และมีบริเวณยับยั้ง 0.4 ซ.ม. และในสภาพเรือนทดลอง การใช้สปอร์แขวนลอยของจุลินทรีย์ต่อต้าน ทำให้เกิดโรคต่ำ 26-27 % ซึ่งให้ผลใกล้เคียงกับการใช้สารเคมีประเภท benlate

เกษม (2535) รายงานว่า จากการทดลองการใช้ยาเชื้อที่ผลิตจากเชื้อรา *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศพันธุ์สีดา ที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* ในสภาพไร่ พบว่า มะเขือเทศมีการเกิดโรคลดต่ำลงเพียง 7 % ในขณะที่แปลงที่ไม่ได้ใช้ยาเชื้อผสมปุ๋ยหมักมีการเกิดโรคถึง 28 % และพบว่าแปลงที่ใช้ยาเชื้อให้ผลผลิตที่สูงกว่าแปลงที่ไม่ได้ใช้ยาเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เกษม และ กอบบุญ (2538) รายงานว่า การผลิตชีวภัณฑ์คีโตเมียมโดยใช้สายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงของเชื้อรา *Chaetomium cupreum* KMITL-N 4320 และ *Chaetomium cupreum* KMITL-N 0802 ในรูปเมล็ดและผง สามารถควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* และโรคโคนเน่าของข้าวโพดหวาน สาเหตุจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* ได้ผลเท่าเทียมกับการใช้สารเคมี pentachoronitrobenzeme นอกจากนี้ ยังพบชีวภัณฑ์คีโตเมี่ยมที่ผลิตจากเชื้อรา *Chaetomium cupreum* สายพันธุ์ที่เฉพาะเจาะจงสามารถใช้ในการป้องกันกำจัดโรครากเน่าของทุเรียน และส้มเขียวหวานที่เกิดจากเชื้อรา *Phythophthora* spp. โรคแอนแทรคโนสของมะม่วงและส้มโชกุนที่เกิดจากเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* โดยลดการเกิดโรคให้ต่ำกว่าระดับความ

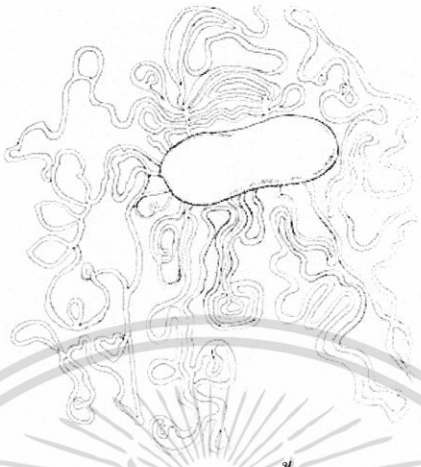
เสียหายทางเศรษฐกิจ ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีการใช้ดีโตเมี่ยม มีประสิทธิภาพในการป้องกันกำจัดโรคในลักษณะ broad spectrum mycofungicide

วัชรินทร์ (2540) ทดสอบคุณสมบัติของสารสกัดจาก *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์ โชคอนันต์ พบว่า สารสกัดจาก *Chaetomium cupreum* (crude hexane) *Chaetomium cupreum* (crude Hexane filtrate) และ *Chaetomium cupreum* (crude methanol filtrate) มีประสิทธิภาพสูงสุดในการควบคุมโรค คือ มีค่า ED_{50} เท่ากับ 1006 µm/ml มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งทุกสารสกัด

เสาวภาคย์ และ เกษม (2545) รายงานว่า ทดสอบสารออกฤทธิ์ที่สกัดจากเชื้อรา *Chaetomium globosum* CG ทำการสกัดโดยใช้ hexane , ethyl acetate และ methanol เป็นตัวทำละลาย ได้สารสกัด Chg-H , Chg-Et , Chg-M นำสารสกัดดังกล่าวมาทดสอบการยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อ *Colletotrichum gloeosporioides* isolate CT01 , CT02 , CT03 และ CT04 (สาเหตุของโรคแอนแทรคโนสส้ม) มีค่าในการยับยั้งสปอร์ 50 % (ED_{50}) ดังนี้ สารสกัดจาก *Chaetomium globosum* CG มีค่า ED_{50} เท่ากับ 51 , 1361 และ 2843 µm/ml ตามลำดับ และสามารถยับยั้งการสร้างสปอร์ของเชื้อรา *Fusarium oxysporum* สาเหตุโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ มีค่าในการยับยั้งสปอร์ 50 % (ED_{50}) เท่ากับ 185 , 4487 และ 16 µm/ml ตามลำดับ

Biswas et al. (2003) รายงานว่า การประยุกต์ใช้สารสกัดจากเชื้อรา *Chaetomium globosum* ในการขัดขวางการติดเชื้อ *Cochliobolus sativus* จะแสดงการลดการเกิด spot blotch ในข้าวสาลีจาก 41.5 ถึง 2.1 เปอร์เซ็นต์ โดยก่อนทำการปลูกเชื้อ ให้ฉีดพ่นสารสกัดให้กระจายไปที่เมล็ดที่กำลังงอก เพื่อชักนำให้เพิ่มระดับการผลิตโปรตีนรวม โปรตีนที่สามารถละลายได้ และ phenol ซึ่งสามารถแสดงความเป็นไปได้ในการนำโปรตีนเหล่านี้มาใช้ในการชักนำให้พืชเกิดความต้านทานต่อการเกิดโรค spot blotch ในข้าวสาลี

เชื้อ *Bacillus subtilis*



รูปที่ 4 แสดงลักษณะโครงสร้างของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus* sp.

Bacillus subtilis เป็นเชื้อจุลินทรีย์ชนิด aerobic หรือ facultatively anaerobic สร้าง catalase มี endospores รูปไข่ กลม หรือ ทรงกระบอก ติดสีแกรมบวกหรืออาจติดสีแกรมหลากหลาย (gram variable) อยู่ในตระกูล Bacillaceae พบได้ทั่วไปในดินและพืช เป็นแบคทีเรียที่จัดอยู่ในกลุ่มที่ไม่ก่อให้เกิดโรค (non-pathogen) ต่อคนและสัตว์ยกเว้นบาง species เช่น *Bacillus anthracis* (ซึ่งก่อให้เกิดโรคแอนแทรกซ์) และ *Bacillus cereus* ซึ่งอาจเป็นสาเหตุของอาหารเป็นพิษ เป็นต้น (สุวิณา , 2538) รูปร่างของ *Bacillus subtilis* มีลักษณะเป็นท่อนๆ ลักษณะตรงหรือโค้ง ขนาด 0.5-2.5x1.2-10 mm กลุ่มของเซลล์ จะอยู่ในรูปเส้นตรงหรือเป็นลูกโซ่สั้นๆ สปอร์จะมีลักษณะเป็น oval เคลื่อนที่โดยใช้ flagella มีประมาณ 8-12 peritrichous flagella (Arthur et al. , 1962) *Bacillus subtilis* ถูกจัดจำแนกอยู่ใน division Bacteria , class Schizomycetes , order Eubacteriales , family Bacillaceae , genus *Bacillus* , species *subtilis* มี endospores ซึ่งทำให้ทนต่อสภาวะ แวดล้อมที่ไม่ดีได้ เจริญได้ดีที่ pH 5.5-8.5 สร้าง hydrolytic enzyme ที่สลาย polysaccharide, nucleic acid และ lipid โดยใช้สารดังกล่าวเป็นแหล่งคาร์บอนและแตกตัวให้อิเลกตรอน มี ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเลคตรอน *Bacillus subtilis* สามารถปล่อยเอนไซม์โปรติเอสออกมาย่อยโปรตีนได้

เอนไซม์โปรติเอส (protease)

เอนไซม์โปรติเอสเป็นเอนไซม์กลุ่มใหญ่ มีหน้าที่ในการย่อย พันธะเปบไตด์ ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงมีบทบาทสำคัญอย่างมากในสิ่งมีชีวิต โดยเฉพาะในการตัดเปลี่ยนโปรตีนและเอนไซม์ตัวอื่น ๆ เพื่อทำ หน้าที่ต่าง ๆ ในการดำรงอยู่อย่างสมดุล ในสมัยแรกเริ่ม เอนไซม์ โปรติเอสจะแบ่งออกตามขนาดของโมเลกุล ประจุและความจำเพาะ เจาะจงกับสับสเตรท (substrate) ปัจจุบันได้มีการจัดระบบ

ที่ใช้หลัก การทำงานของเอนไซม์ที่บริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) นอกจากนี้ ในการเกิดปฏิกิริยาของเอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ เอนไซม์ ที่ทำปฏิกิริยาที่ C-terminal หรือ N-terminal ของสายโพลีเปปไตด์ เรียกว่าเอนไซม์เอกโซเปปติเดส (exopeptidase), และเอนไซม์ที่ตัด ภายในสายโพลีเปปไทด์เรียกว่า endopeptidase (Polgar, 1989)

International Union of Biochemistry (IUB) แบ่ง เอนไซม์เป็น 4 กลุ่มตามการทำงานบริเวณเร่งปฏิกิริยา (active site) (National nomenclature committee of the international union of biochemistry , 1984)

1. Serine protease (EC 3.4.21) โดยที่ active site มีกรดอะมิโน serine และ histidine
2. Cysteine protease of thiol protease (EC 3.4.22) active site มี cysteine และ histidine
3. Aspartic protease (EC 3.4.23) active site มีกรด อะมิโนที่เป็นกรด (acidic amino acids)
4. Metalloprotease (EC 3.4.24) active site มีกรด กลูตามิคและอะตอมโลหะ (metal atom)

เอนไซม์โปรติเอสได้มีการศึกษาและแบ่งกลุ่มมากมายทั้ง ลำดับกรดอะมิโนและโครงสร้างสามมิติ Serine protease แบ่งออก เป็น 2 family คือ mammalian serine protease และ bacterial serine protease โดย 2 family จะแตกต่างกันในลำดับกรดอะมิโน และโครงสร้างสามมิติ ส่วนในเอนไซม์ matalloprotease ประกอบ ด้วย 2 family คือ mammalian pancreatic carboxypeptidase และ bacterial protease , thermolysin (Neurath , 1984)

การทำงานของเอนไซม์โปรติเอส

กระบวนการเกดการสลายพนธะเปบไตด์ (peptide bond) คือ polarization ของพันธะเปบไตด์ โดย nucleophillic attack ที่ ตำแหน่งพันธะ carbon-oxygen ทั้งโดยตรงหรือโดยผ่านโมเลกุลของ น้ำ ปฏิกิริยาจะมีการให้โปรตอนกับ peptide nitrogen หรือที่เรียกว่า leaving group ในแต่ละกลุ่มหรือ family ของโปรติเอสจะมีชุดของ กรดอะมิโนทีทำให้เกิดตำแหน่ง active site ต่าง ๆ กัน (James,1980)

การใช้เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการควบคุมโรคพืช

มณจันทร์ และ ชัยวัฒน์ (2535) ได้ศึกษาการใช้ *Bacillus subtilis* AP01 ในการป้องกันกำจัดเชื้อรา *P. palmivora* สาเหตุโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียน ในสภาพห้องปฏิบัติการ พบว่า การใช้ความเข้มข้นของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AP01 ในผงลาร์มิน่า คือ 1x 10^9 cfu/g ในอัตรา 2.5 กรัมต่อน้ำกลั่น 250 ลบ.ซม. ในอาหาร PDA พบว่า *Bacillus subtilis* AP01 สามารถยับยั้งโคโลนีของเชื้อรา *P. palmivora* ได้

องอาจ และ คณะ (2535) รายงานว่า การควบคุมโรครากเน่าที่เกิดจากเชื้อรา *Phytophthora* ของกิ่งส้มเขียวหวาน โดยใช้ผงจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่างๆ ผสมกับ รำข้าว ปุ๋ยหมัก และ กากอ้อย ในอัตรา 1:1:3 และคลุกให้ทั่ว ใส่รอบโคนต้นส้ม และหลังใส่ผงยาเชื้อ 20-23 วัน ก็ย้ายกิ่งตอน

ส้มเขียวหวานที่มีเชื้อ *P. parasitica* ลงปลูก พบว่า การใช้เชื้อ *Bacillus subtilis* (B-03) มีประสิทธิภาพในการควบคุมโรครากเน่าของกิ่งตอนส้มเขียวหวานได้ดีที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (T-13) , *Penicilium* sp. (P-15) และ *Pseudomonas* sp. (Ps-2)

อุรัจฉทา และ คณะ (2535) คัดเลือกเชื้อแบคทีเรียในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. solanacearum* จากบริเวณรากและดินที่ปลูกมะเขือที่เป็นโรคและไม่เป็นโรคได้ 154 isolate จากดินปลูกอ้อย 20 isolate และเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ CH4 1 สายพันธุ์ สามารถคัดเลือกสายพันธุ์ที่มีคุณสมบัติในการยับยัง *P. solanacearum* ได้ 6 สายพันธุ์ ได้แก่ สายพันธุ์ NA1 , NA25 , NA37 , PH9 , SU1 และ CH4 จากการทดลองในสภาพเรือนทดลอง พบว่า การปลูกเชื้อโดยวิธีตัดรากด้านเดียวแล้วลดสารละลายเชื้อแอนทาโกนิสต์ทันที ทุกสายพันธุ์สามารถควบคุมโรคได้

Alppi et al. (1994) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* , *Bacillus pumilus* , *Bacillus licheniformis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Sclerotium rolfsii* และเชื้อ *Fusarium solani* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค damping-off ของมะเขือเทศในห้องปฏิบัติการได้

Hamed (1999) ได้ทดลองนำเอาเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* 2 isolate มาทำการทดสอบเพื่อศึกษาว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อ *Pythium ultimum* และ *Fusarium oxysporum* ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลอง จากผลการทดลอง พบว่าเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ทั้ง 2 สายพันธุ์มีความสามารถในการต่อต้านการเจริญของเชื้อสาเหตุโรคได้ ทั้งในสภาพห้องปฏิบัติการและสภาพเรือนทดลองได้

Sarhan et al. (2001) รายงานว่า เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ เส้นใย การเจริญของเส้นผ่าศูนย์กลาง การงอกของสปอร์ และความยาวของ germ-tubes ของ *Fusarium oxysporum* รวมทั้งการสร้างกรด fusaric โดยการพ่นสารละลายสปอร์ของ *Bacillus subtilis* ในเมล็ดที่เพิ่งงอกของมะเขือเทศ เพื่อลดการเกิดโรคเหี่ยว

นอกจาก *Bacillus subtilis* จะช่วยในการควบคุมโรคพืชแล้ว ยังสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้หลายๆด้านทั้งทางการแพทย์และด้านอุตสาหกรรมดังต่อไปนี้

1. *Bacillus subtilis* เป็นประโยชน์ในการทำ clinical assays เช่น
   - Hexachlorophene assays (*Bacillus subtilis* ATCC 6533)
2. นำไปใช้ในการประเมินประสิทธิภาพของกระบวนการฆ่าปลอดเชื้อ และในการเก็บถนอมอาหารและยา (*Bacillus subtilis* NCTC 10073)
3. เป็นแหล่งผลิตยาปฏิชีวนะชนิดต่างๆ เช่น
   - bacitracin , subtilin , mersacidin
4. สามารถสร้างสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อรา เช่น itulin , surfactin

5. สามารถสร้างเอนไซม์ และสารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor) หลายชนิด
6. สามารถสร้าง Biocompounds ที่เป็นประโยชน์ในการกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูพืช เช่น
   - crystal protein
   - biosporin probiotic

การสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงโดยขบวนการทางชีววิทยา

จุลินทรีย์ในดิน ได้แก่ bacteria fungi และ actinomycete มีบทบาทสำคัญในการย่อยสลายสารเคมีกำจัดแมลงในดิน ซึ่งจุลินทรีย์จะมีระบบเอนไซม์ เพื่อเปลี่ยนแปลงสารเคมีกำจัดแมลงมาเป็นประโยชน์ในด้านธาตุอาหารและแหล่งพลังงาน ทั้งนี้การใช้ประโยชน์อาจเป็นในรูปของแหล่งคาร์บอน ไนโตรเจน หรือธาตุอาหาร

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ในดิน ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงในดินได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น การถ่ายเทอากาศ ความเป็นกรดเป็นด่าง ปริมาณอินทรีย์วัตถุ และคุณสมบัติของสารเคมีกำจัดแมลง ซึ่งจากผลการทดลองในห้องปฏิบัติการพบว่า การเพิ่มอุณหภูมิทุก 10 ℃ ทำให้อัตราการการสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลง โดยจุลินทรีย์เพิ่มขึ้นเป็น 2.5-3 เท่า และอัตราการสลายตัวจะเพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเพิ่มความชื้นของดินจากสภาพแห้งแล้งไปจนถึงจุดความชื้นของดิน อุณหภูมิและความชื้นของดิน ทั้งนี้ในสภาพแปลงปลูกพืช อุณหภูมิและความชื้น มักมีการเปลี่ยนแปลงเสมอๆ ซึ่งจะส่งผลต่อการสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงด้วย

การสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงโดยจุลินทรีย์ในดิน มีความสำคัญต่อการคงสภาพหรือการตกค้างของสารเคมีกำจัดแมลงอย่างยิ่ง นอกจากปัจจัยด้านต่างๆที่มีผลต่อการทำงานของจุลินทรีย์ดังที่กล่าวมาแล้ว ชนิดของสารเคมีกำจัดแมลง อัตราการใช้ และจำนวนครั้งที่ใช้ก็มีส่วนในการส่งเสริมหรือลดอัตราการสลายตัวของจุลินทรีย์ได้ โดยสารเคมีกำจัดแมลงบางชนิดอาจทำให้เกิดการเพิ่มจำนวนจุลินทรีย์ที่ใช้ย่อยเฉพาะสารเคมีกำจัดแมลงชนิดนั้นๆมากขึ้น ส่งผลให้อัตราการสลายตัวของสารเคมีกำจัดแมลงที่ใช้ในครั้งต่อไปเพิ่มขึ้น (พนิดา , 2538)

Gas Chromatography

เป็นเครื่องมือที่ใช้แยกและวิเคราะห์สารทั้งในเชิงปริมาณและคุณภาพ เทคนิคของ Gas Chromatography คือ แยกของผสมให้เป็น gas phase ที่อุณหภูมิหนึ่งๆ แล้วผ่านไปยังคอลัมน์ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) มาสัมผัสกับตัวกลางที่อยู่กับที่นั้น ซึ่งสารแต่ละชนิดมีพฤติกรรมในการแยกตัว (partition) ต่างกัน ทำให้เมื่อ mobile phase พาสารเคลื่อนที่ผ่านไปตาม stationary phase ในช่วงเวลาหนึ่งๆ สารแต่ละตัวจะถูกแยกจากกันได้ในเวลาที่ต่างกัน

Gas Chromatography แบ่งตาม stationary phase เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ ได้ดังนี้

1. Gas – Solid Chromatography (GSC)

ใช้ stationary phase ที่เป็นของแข็ง เป็นตัว absorbtion สารที่เป็นแก๊ส และไม่มีสารอื่นเคลือบอยู่ และเป็นโมเลกุลเล็กๆ เพราะฉะนั้นในคอลัมน์ที่บรรจุด้วย active solids เป็นโมเลกุล sieves หรือ porous polymers , silica gel , alumina , activated carbon เป็นต้น

2. Gas – Liquid Chromatography (GLC)

สารที่อยู่ด้วยกันจะสามารถแยกออกจากกันได้ ด้วยการกระจายตัวที่ต่างกันของแก๊ส ระหว่าง stationary phase {ที่มีของเหลว (liquid phase) ฉาบอยู่บนของแข็ง (solid support) ในลักษณะเป็นแผ่นฟิล์มบางๆ} กับ mobile phase หรือมีค่า partition : coefficient ต่างกัน Gas Chromatography ชนิดที่มีของเหลวเป็น stationary phase มีความสำคัญมากกว่าทั้งนี้นับตั้งแต่ Martin และ James ได้เสนอรายงานแนะนำ Gas – Liquid Chromatography เป็นครั้งแรกใน ค.ศ. 1952 ก็ได้พัฒนามาประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่างๆเช่น เคมี ชีววิทยา ตลอดจนงานทางด้านวิศวกรรม

ส่วนประกอบของเครื่อง Gas Chromatography

เครื่อง Gas Chromatography โดยทั่วไปจะประกอบด้วยส่วนประกอบพื้นฐานที่สำคัญดังรูปที่ 5 ทั้งนี้เครื่องจะทำงานโดย carrier gas ที่ทำหน้าที่เป็น mobile phase ซึ่งจะถูกทำให้ไหลเข้าไปในคอลัมน์ เมื่อสารผสมที่จะถูกวิเคราะห์ถูกฉีด (inject) เข้าที่ส่วนที่ใช้ฉีดสาร (injection part) สารนั้นจะถูกพาเข้าไปในคอลัมน์ ซึ่งต่อกับเครื่องตรวจวัด (detector) เครื่องตรวจวัดจะทำหน้าที่ให้สัญญาณเมื่อได้รับสารที่ออกจากคอลัมน์ และส่งสัญญาณต่อไปยังเครื่องบันทึกข้อมูล (recorder) ซึ่งจะบันทึกข้อมูลออกมาเพื่อนำไปแปรผล ส่วนประกอบที่สำคัญของ Gas Chromatography จะมีลักษณะและคุณสมบัติ ดังนี้

Carrier gas : ทำหน้าที่นำสารตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์ผ่านเข้าไปในคอลัมน์ไปยังเครื่องตรวจวัด แก๊สที่ใช้เป็น carrier gas ต้องมีคุณสมบัติเป็นแก๊สเฉื่อย มีมวลโมเลกุลต่ำ และมีค่าความจุความร้อนสูง carrier gas ที่นิยมใช้คือ ไนโตรเจน (N_2) และฮีเลียม (He) การใช้แก๊สเป็น mobile phase นี้ทำให้ความสมดุลระหว่างสองตัวกลางเป็นไปอย่างรวดเร็ว จึงทำให้ Gas Chromatography เป็นเทคนิคที่มีประสิทธิภาพสูง

Column : ถือเป็นหัวใจของเครื่อง Gas Chromatography ทั้งนี้เพราะกระบวนการแยกสารจะเกิดขึ้นที่คอลัมน์ ลักษณะทั่วไปของคอลัมน์จะประกอบด้วยสองส่วนคือ หลอดหรือท่อ (tubing) และ stationary phase ที่บรรจุอยู่ภายใน ในกรณีที่คอลัมน์มีลักษณะเป็นหลอดแก้วหรือโลหะเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 1.5-3.5 มม. และ stationary phase มีลักษณะเป็นของเหลวที่เคลือบอยู่บน solid support ที่มีลักษณะเป็นเม็ดๆ เส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 0.15-0.25 มม. เรียกคอลัมน์ชนิดนี้ว่า

99094

packed column นอกจากนี้ยังมีชนิด capillary column เป็นคอลัมน์แบบท่อเปิด liquid stationary phase จะถูกเคลือบเป็นชั้นบางๆที่ผนังด้านใน มีความหนา 0.1-1 ไมครอน มีเส้นผ่าศูนย์กลางภายในเล็กมาก 0.1-0.5 มม. เนื่องจากเป็นคอลัมน์แบบท่อเปิด จึงสามารถมีความยาวของคอลัมน์ได้มากกว่า stationary phase เพราะว่ามี back pressure น้อยกว่า คอลัมน์ชนิดนี้จะจุ stationary phase ได้น้อยกว่า packed column มาก จึงต้องใช้ตัวอย่างที่มีขนาดน้อยๆเท่านั้น

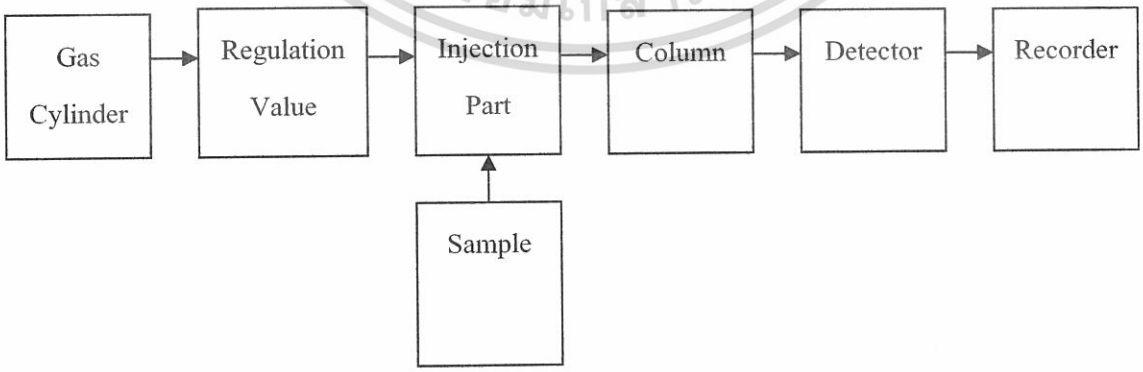
Capillary column แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

1. คอลัมน์แบบ wcot (Wall-coated open tubular) เป็นคอลัมน์ที่ได้จากการเคลือบผนังของคอลัมน์ด้วย liquid stationary phase
2. คอลัมน์แบบ plot (Porous layer open tubular) ผนังภายในช่องจะเคลือบด้วยตัวดูดซับ (absorbent) แต่ถ้าเคลือบด้วยตัวดูดซับที่มี liquid phase ด้วย เรียกคอลัมน์ชนิดนี้ว่า scot (Support coated open tubular)

ผนังของ capillary column ส่วนใหญ่ที่นิยมใช้ทำมาจากแก้ว และ fused silica (ทำมาจากซิลิกาออกไซด์ที่เคลือบด้วย poly-amide)

ประสิทธิภาพของ capillary column นี้จะสูงมากกว่า packed column การแยกสกัดสารก็จะใช้เวลาน้อยกว่า อุณหภูมิที่ใช้ต่ำกว่าใน packed column และ flow rate ของ carrier gas ที่ใช้กับ capillary column น้อยกว่าใน packed column โดยทั่วไปใช้เพียง 0.5-4 ml/min สำหรับ ไนโตรเจน และ 1-10 ml/min สำหรับ ฮีเลียม

Injection part : เป็นส่วนที่ใช้ฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ ในกรณี packed column ซึ่งสามารถรับปริมาณสารตัวอย่างได้มาก ระบบจะไม่ยุ่งยาก สามารถฉีดสารเข้าสู่คอลัมน์ได้ โดยใช้เข็ม (microsyringe) ฉีดสารตัวอย่างเข้าไปใน injection part การตั้งอุณหภูมิที่ injection part ต้องตั้งให้สูงกว่าจุดเดือดของสารตัวอย่าง



รูปที่ 5 แสดงส่วนประกอบพื้นฐานการทำงานของเครื่อง Gas Chromatography

ประโยชน์ของเครื่อง Gas Chromatography

1. ให้ผลการตรวจวิเคราะห์อย่างรวดเร็ว
2. ใช้ตัวอย่างน้อย
3. เชื่อถือได้
4. อ่านผลได้ง่าย
5. อายุการใช้งานนาน

การประยุกต์ใช้

1. สามารถแยกสารผสมได้หลายชนิด รวมทั้งสารที่คล้ายคลึงกัน และสารที่มีส่วนประกอบเหมือนกันได้
2. วิธีการใช้ จะใช้ได้กับตัวอย่างหลายชนิด
3. มีความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์ทางปริมาณและคุณภาพสูง แม่นยำ
4. ใช้ศึกษาโครงสร้างของสารเคมีตามปฏิกิริยาเคมีต่างๆ
5. ใช้ในการวิเคราะห์สารในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น การวิเคราะห์คุณภาพอาหาร การวิเคราะห์สารกำจัดศัตรูพืชและสารพิษต่างๆ ในอุตสาหกรรมปิโตรเลียม รวมทั้งการศึกษาทางสิ่งแวดล้อม เช่น สารมลภาวะในอากาศ แหล่งน้ำ และดิน (สุกัญญา , 2534)

อุปกรณ์

วัสดุอุปกรณ์

1. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose agar (PDA)
2. อาหารเลี้ยงเชื้อรา Potato dextrose broth (PDB)
3. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient agar (NA)
4. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย Nutrient broth (NB)
5. เชื้อรา *Trichoderma harzianum*
6. เชื้อรา *Chaetomium* sp.
7. เชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* สายพันธุ์ พลายแก้ว
8. จานเลี้ยงเชื้อ (plate)
9. หลอดทดลอง
10. ขวดกลม
11. สำลี
12. Cork borer
13. เข็มเขี่ยเชื้อ
14. ตะเกียงแอลกอฮอล์
15. ตู้บ่มเชื้อ
16. ตู้อบความร้อนแห้ง (hot air oven)
17. หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave)
18. เครื่องชั่งทศนิยม 2 ตำแหน่ง (electronic balance)
19. เครื่องปั่นสารเนื้อละเอียด (homogenizer)
20. เครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำ (rotary evaporator) ยี่ห้อ Buchi รุ่น B-169
21. เครื่องตรวจวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารพิษตกค้าง Gas Liquid Chromatography (GLC , GC) – FPD ยี่ห้อ Shimadzu รุ่น 14 A
22. กรวยแก้ว (funnel)
23. หลอดหยด (dropper)
24. ขวดรูปกรวย (erlenmeyer flask)
25. บีกเกอร์ (beaker)
26. ขวดก้นกลม (round evaporation flask and receiving flask)

20918

27. กระบอกตวง (cylinder)
28. ขวดใส่สาร (vial)
29. ขาตั้ง (stand)
30. ออโตปิเปต (automatic pipette) ขนาด 200-1000 µl และ ขนาด 1-5 ml
31. โถดูดความชื้น (desiccator)
32. ตู้ดูดควัน (hood)

สารเคมี

1. Acetone
2. Sodium chloride (NaCl)
3. Sodium sulfate (Na_2SO_4)
4. Dichloromethane
5. Ethyl acetate
6. Silica gel
7. สารละลายมาตรฐาน chlorpyrifos เข้มข้น 1.0038 ppm
8. สารกำจัดแมลงคลอร์ไพริฟอสยี่ห้อ เอฟฟอร์ท เข้มข้น 40% W/V EC

ห้องสมุดเฉพาะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

วิธีการทดลอง

1. การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) จำนวน 3 ซ้ำ มี 3 กรรมวธ คือ

วิธีที่ 1 อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสาร chlorpyrifos ผสมอยู่ 5 ppm โดยมีการปลูกเชื้อ *Bacilus subtilis* และ ไม่มีการปลูกเชื้อ *Bacilus subtilis*

วิธีที่ 2 อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสาร chlorpyrifos ผสมอยู่ 5 ppm โดยมีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum*

วิธีที่ 3 อาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีสาร chlorpyrifos ผสมอยู่ 5 ppm โดยมีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp.

แล้วนำผลการทดลองที่ได้จากทั้ง 3 กรรมวิธี ไปวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SAS

2. การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

ทำการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacilus subtilis* ที่ได้จาก ภาควิชา จุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร โดยการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย *Bacilus subtilis* ไว้ในหลอดอาหาร nutrient agar (NA) แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อ ที่อุณหภูมิ 20 °C เมื่อจะนำมาใช้ในการทดลองเราจะนำเอาเชื้อที่เก็บไว้เป็น stock culture มาทำการ streak บน plate อาหาร NA แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

3. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

โดยทำการ cork เชื้อแบคทีเรีย *Bacilus subtilis* จาก plate อาหาร NA ลงในอาหาร nutrient broth (NB) ที่มีสาร chlorpyrifos ที่มีความเข้มข้น 5 ppm ผสมอยู่ และทำการทดลองแบบนี้โดยมีการใส่สาร chlorpyrifos ในปริมาณที่เท่ากัน แต่ไม่มีการ cork เชื้อแบคทีเรีย *Bacilus subtilis* ลงไปในอาหาร NB ควบคู่ไปด้วย จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำอาหารเหลวที่มีการปลูกเชื้อและไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacilus subtilis* เหล่านี้ไปทำการตรวจหาปริมาณสาร chlorpyrifos ทุกๆ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน ด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography (GLC)

4. การเลี้ยงเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ทำการแยกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* จากดินที่ได้จาก มูลนิธิโครงการหลวง ศูนย์อารักขาพืช จ.เชียงใหม่ เมื่อเราแยกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บริสุทธิ์ได้แล้ว จึงนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไปเลี้ยงใน plate อาหาร potato dextrose agar (PDA) แล้วนำเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ไปบ่มที่อุณหภูมิห้องเพื่อเก็บไว้เป็น stock culture เมื่อจะนำมาใช้ในการทดลองเราจะนำเอาเชื้อที่เก็บไว้เป็น stock culture มาทำการเขี่ยเชื้อลงบน plate อาหาร PDA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

5. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

โดยการ cork เชื้อรา *Trichoderma harzianum* จาก plate อาหาร PDA ลงในอาหาร potato dextros broth (PDB) ที่มีสาร chlorpyrifos ที่มีความเข้มข้น 5 ppm ผสมอยู่ และทำการทดลองแบบนี้โดยมีการใส่สาร chlorpyrifos ในปริมาณที่เท่ากัน แต่ไม่มีการ cork เชื้อรา *Trichoderma harzianum* ลงในอาหาร PDB ควบคู่ไปด้วย จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำอาหารเหลวที่มีการปลูกเชื้อและไม่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* เหล่านี้ไปทำการตรวจหาปริมาณสาร chlorpyrifos ทุกๆ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน ด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography (GLC)

6. การเลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium* sp.

ทำการเลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium* sp. ที่ได้จาก ภาควิชา เทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง โดยการเลี้ยงเชื้อรา *Chaetomium* sp. ไว้ใน plate อาหาร PDA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเพื่อเก็บไว้เป็น stock culture เมื่อจะนำมาใช้ในการทดลองเราจะนำเอาเชื้อที่เก็บไว้เป็น stock culture มาทำการเขี่ยเชื้อลงบน plate อาหาร PDA แล้วนำไปบ่มไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

7. การศึกษาประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

โดยการ cork เชื้อรา *Chaetomium* sp. จาก plate อาหาร PDA ลงในอาหาร PDB ที่มีสาร chlorpyrifos ที่มีความเข้มข้น 5 ppm ผสมอยู่ และทำการทดลองแบบนี้โดยมีการใส่สาร chlorpyrifos ในปริมาณที่เท่ากัน แต่ไม่มีการ cork เชื้อรา *Chaetomium* sp. ลงในอาหาร PDB ควบคู่ไปด้วย จำนวน 3 ซ้ำ แล้วนำอาหารเหลวที่มีการปลูกเชื้อและไม่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. เหล่านี้ไปทำการตรวจหาปริมาณสาร chlorpyrifos ทุกๆ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน ด้วยเครื่อง Gas Liquid Chromatography (GLC)

8. วิธีการสกัดสารจากอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

7.1 เทอาหารเหลว 100 ml (W) ใส่ลงในบีกเกอร์ เติมอะซิโตน 100 ml (V_{a1}) แล้วทำการปั่นละเอียดด้วยเครื่องปั่นเนื้อละเอียด (homogenizer) ที่ระดับ high speed ประมาณ 13,500 rpm เป็นเวลา 2 นาที เติม sodium chloride (NaCl) 15 กรัม และเติม dichloromethane 75 ml (V_{a2}) ทำการปั่นละเอียดอีกครั้งเป็นเวลา 1 นาที

7.2 ถ่ายส่วนใสใส่ลงในขวดรูปกรวย แล้วเติม sodium sulfate (Na_2SO_4) ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ หรือ 30 กรัม ปิดฝาขวดเขย่าแรงๆ ตั้งทิ้งไว้ 20 นาที แล้วนำมากรองผ่าน sodium sulfate (Na_2SO_4) 2 ช้อนโต๊ะ ให้ได้ส่วนที่เป็นของเหลว 100 ml (V_b) โดยใช้กระบอกตวง ตวงไว้ จากนั้นถ่ายใส่ลงในขวดก้นกลม และล้างกระบอกตวงด้วย acetone 10 ml 2 ครั้ง แล้วเทรวมลงในขวดก้นกลมอันเดิม

7.3 นำสารละลายในขวดก้นกลมไประเหยด้วยเครื่องลดปริมาตรอุณหภูมิต่ำที่อุณหภูมิ 40 ºC ความดัน 500 บาร์ จนสารเกือบแห้งให้เติม ethyl acetate 10 ml แล้วทำการระเหยอีกรอบจนสารเกือบแห้งอีกครั้ง

7.4 ใช้ออโตปิเปตดูดสารละลายที่ทำการระเหยแล้วใส่ขวดใส่สาร(vial) แล้วทำการปรับปริมาตรด้วย ethyl acetate ให้ได้ปริมาตร 5 ml

7.5 นำสารสกัดที่ได้ไปทำการตรวจวิเคราะห์หาสาร chlorpyrifos ด้วยเครื่องGC-FPD

8. การตรวจวิเคราะห์หาสาร Chlorpyrifos โดยใช้เครื่อง Gas Chromatography

8.1. ข้อกำหนดของเครื่อง GC-FPD เพื่อการตรวจวิเคราะห์

เครื่องตรวจวัด (detector)	: ชนิด Flame Photometric Detector (FPD)
Column	: ใช้ packing column ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 mm ยาว 2.1 m บรรจุด้วย 3 %OV-1 on 80/100 support silicon supelcoport
Temperature	: column 210 °C
	: injector 250 °C
	: detector 260 °C
Carrier gas	: N_2 50 ml/min
	: H_2 35 ml/min
	: air 100 ml/min

8.2. การฉีดสารเพื่อตรวจวิเคราะห์

Calibrate peak ของ standard จนกว่าค่า retention time และค่าความเข้มข้นคงที่ ซึ่งเท่ากับความเข้มข้นของ standard แล้วจึงฉีดสารสกัดจากตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

หมายเหตุ - ต้อง calibrate standard ทุกครั้งก่อนทำการฉีดสารสกัดจากตัวอย่างอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ

- ถ้า peak ที่ได้ มีลักษณะหัวตัด จะต้องทำการเจือจาง (dilution) สารสกัดตัวอย่างลงอีก เพื่อให้ได้ peak ที่ดี

9. การคำนวณปริมาณทั้งหมดของสาร Chlorpyrifos จากการสกัดตัวอย่าง

นำพื้นที่ใต้กราฟของ chlorpyrifos ที่ได้จากเครื่องมาทำการคำนวณ หาความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่ตกค้างในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อดังนี้

$$P = \frac{R_x \times S \times V_f \times V_a}{R_s \times W \times V_b}$$

เมื่อ P = ความเข้มข้นของสารพิษในตัวอย่าง (ml/L)

R_x = พื้นที่ใต้กราฟของตัวอย่าง

R_s = พื้นที่ใต้กราฟของสารมาตรฐาน

S = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน (mg/L)

V_f = ปริมาตรสุดท้าย final volume (5 ml)

V_a = ปริมาตรทั้งหมดของชั้นอินทรีย์ ($V_{a1} + V_{a2}$, ml)

V_b = ปริมาตรของ aliquot ที่แบ่งมา (100 ml)

W = ปริมาตรของตัวอย่าง (ml)

ผลการทดลอง

1. ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อ

รายละเอียดของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis*

รูปร่างมีลักษณะเป็นท่อนๆ ลักษณะตรงหรือโค้ง กลุ่มของเซลล์ จะอยู่ในรูปเส้นตรงหรือเป็นลูกโซ่สั้นๆ สปอร์จะมีลักษณะเป็น oval เคลื่อนที่โดยใช้ flagella มีประมาณ 8-12 peritrichous flagella (Arthur et al., 1962)

การจัดจำแนก *Bacillus subtilis*

Division Bacteria

Class Schizomycetes

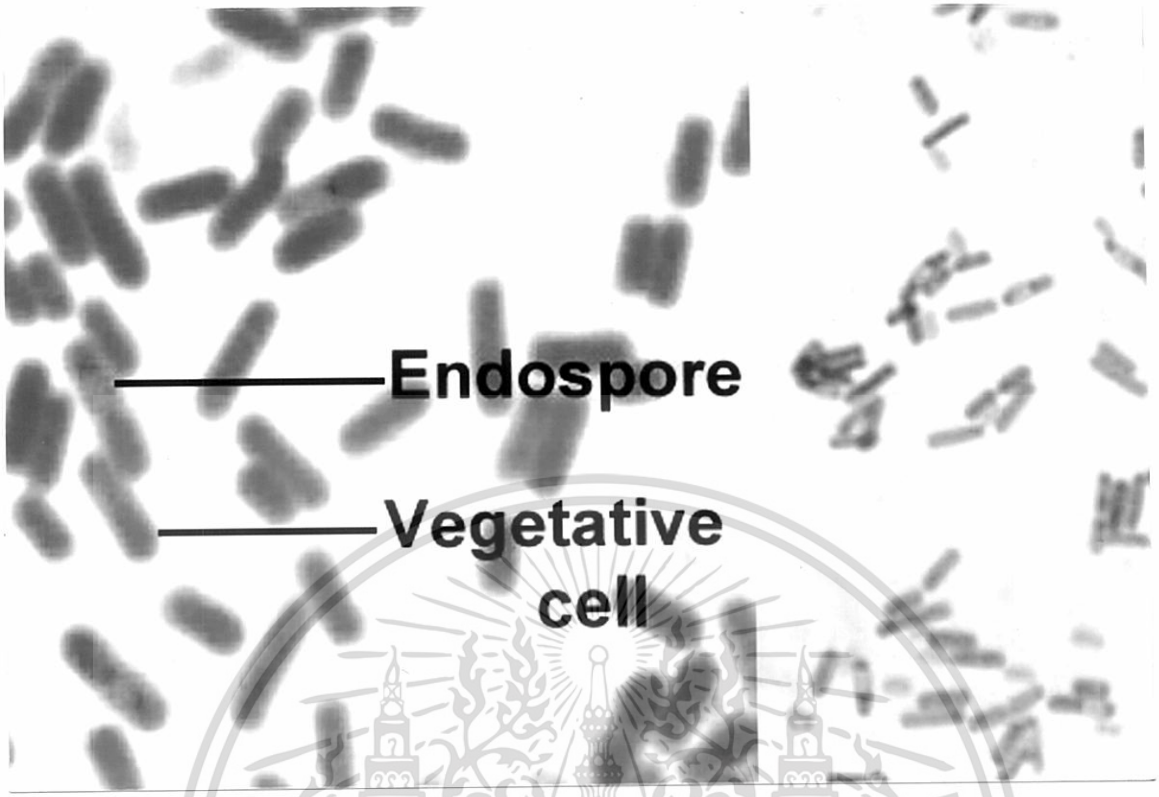
Order Eubacteriales

Family Bacillaceae

Genus *Bacillus*

Species *Subtilis*

รูปที่ 6 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อ *Bacillus subtilis* บนอาหาร NA



รูปที่ 7 แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อ *Bacillus subtilis* (1000 เท่า)

รายละเอียดของเชื้อรา *Trichoderma harzianum*

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA พบว่ามีการเจริญซ้อนกันเป็นวงหลายๆวง ไม่มีการปลดปล่อย pigment ลักษณะ phialophore มีสีใสและมีผนังกั้น หนาประมาณ 2.5-5.0 ไมครอน ส่วน phialide กำเนิดมาจาก phialophore มีลักษณะรูปร่างเรียวยาวประมาณ 7-8 ไมครอน จำนวน 3-4 phialide ลักษณะ phialospore มีรูปร่างกลม (Domsch et. al., 1980)

การจัดจำแนก *Trichoderma harzianum*

Division Eumycota

Sub-division Deuteromycotina

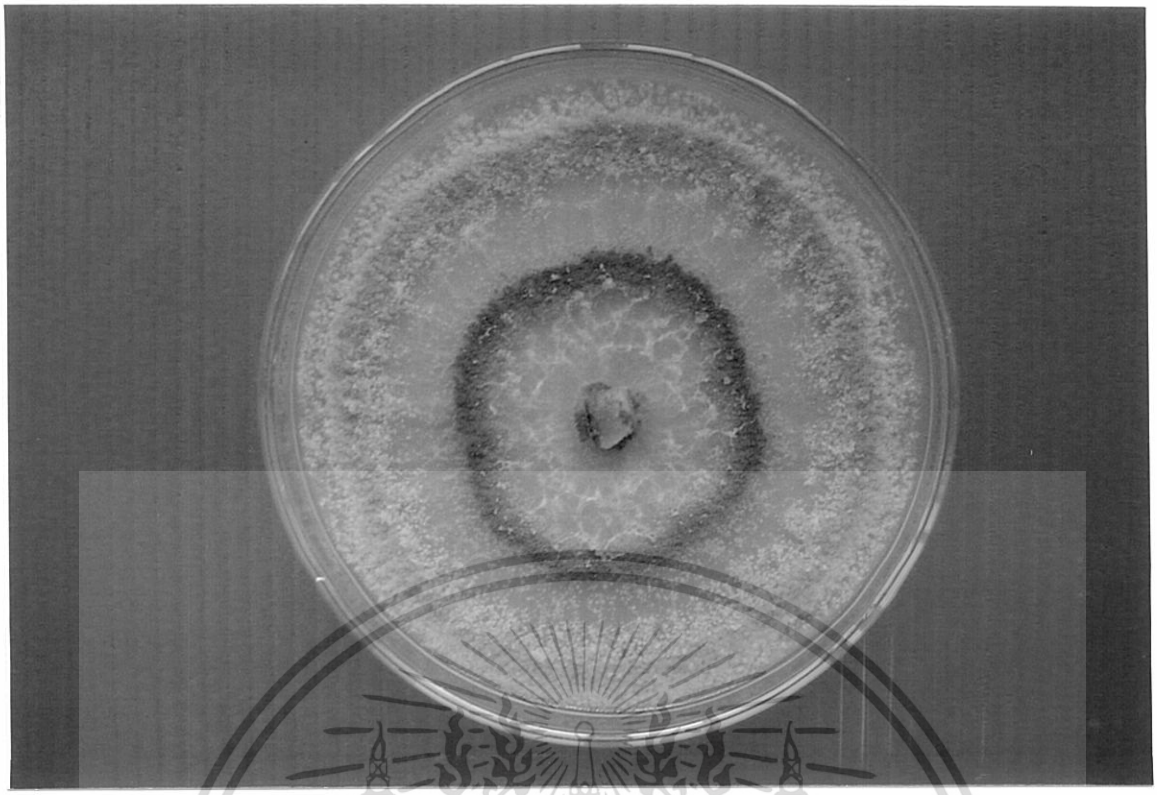
Class Hyphomycetes

Order Moniliales

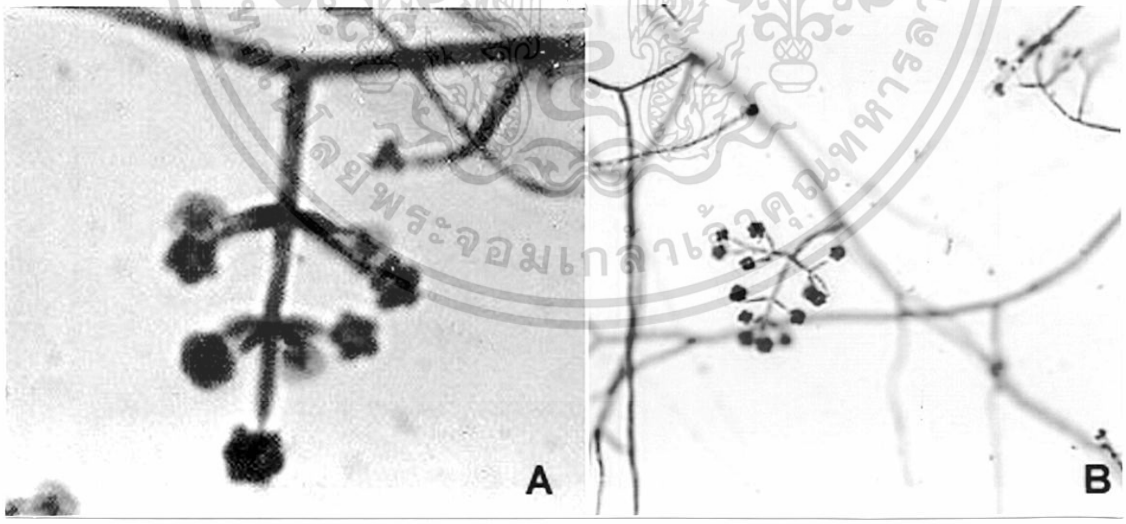
Family Moniliaceae

Genus *Trichoderma*

Species *harzianum*



รูปที่ 8 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* บนอาหาร PDA



รูปที่ 9 แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* (1000 เท่า)

รายละเอียดของเชื้อรา *Chaetomium* sp.

ลักษณะโคโลนีบนอาหาร PDA โคโลนีสีเขียวมะกอก ascocarp เป็นแบบ perithecia ลักษณะ ascomata hair มีความยาวแตกต่างกัน และมีความงอเป็นคลื่น asci รูปทรงกระบอก ภายในมี 8 ascospore ascospore รูปไข่ ผนังสีน้ำตาล

การจำแนกเชื้อ *Chaetomium* sp.

Division Eumycota

Sub-division Ascomycotina

Class Pyrenomycetes

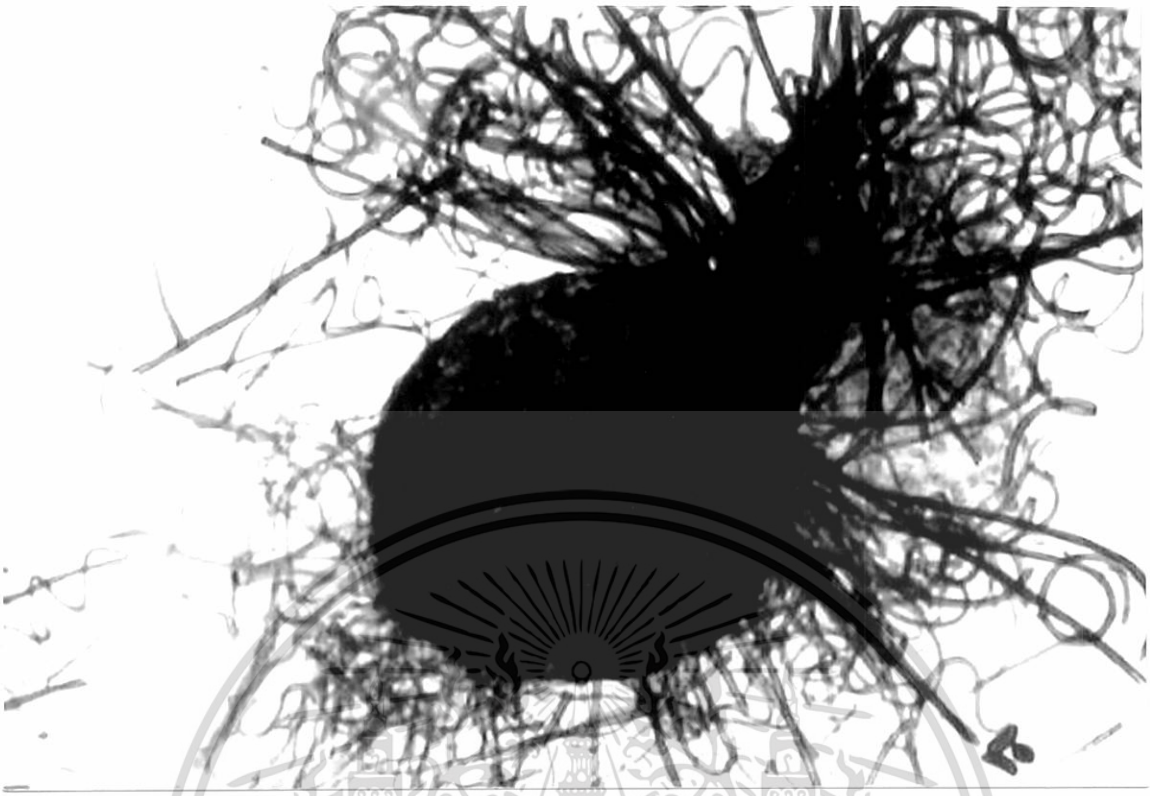
Order Sphariales

Family Melanosporaceae

Genus *Chaetomium*

Species -

รูปที่ 10 แสดงลักษณะโคโลนีของเชื้อรา *Chaetomium* sp. บนอาหาร PDA



รูปที่ 11 แสดงลักษณะโครงสร้างภายใต้กล้องจุลทรรศน์ของเชื้อรา *Chaetomium* sp. (100 เท่า)

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

2. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

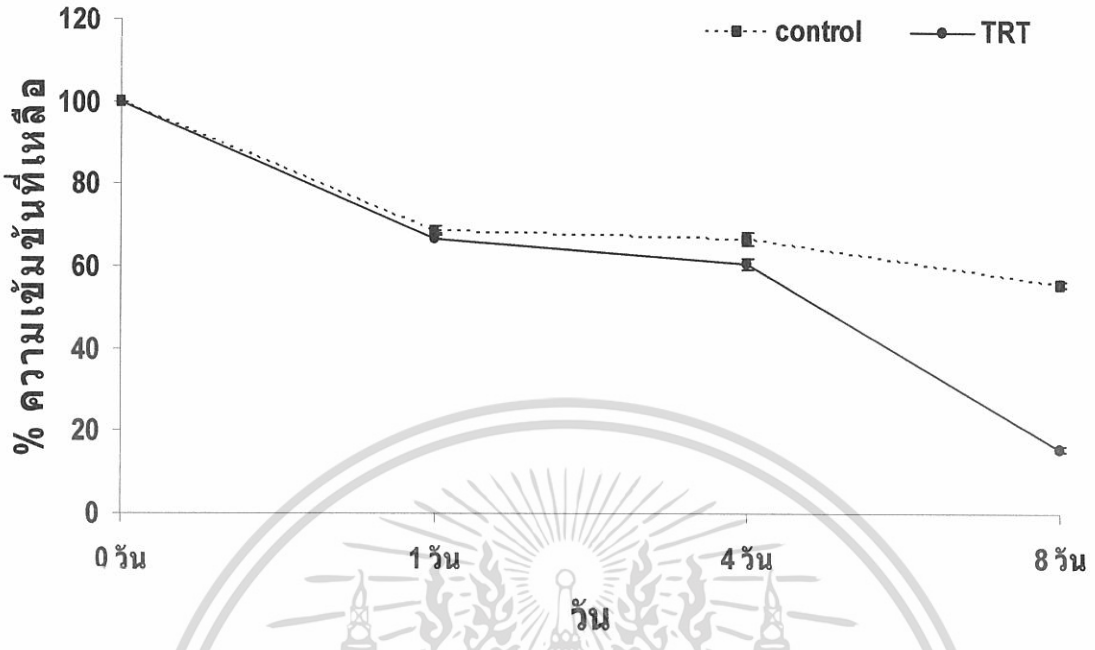
จากการตรวจวิเคราะห์หาสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน สาร chlorpyrifos ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ มีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.3527 ppm หรือเมื่อคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 67.1 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนที่ไม่มีการปลูกเชื้อ มีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.4453 ppm หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 68.9 % ของปริมาณสารทั้งหมด และเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน สาร chlorpyrifos ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ มีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.03884 ppm หรือ 60.8 %ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปลูกเชื้อเหลือ 3.35491 ppm หรือ 67.1 % ของปริมาณสารทั้งหมด และเมื่อเวลาผ่านไป 8 วัน สาร chlorpyrifos ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่เพียง 0.7827 ppm หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์คือ 15.7 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่ 2.82334 ppm หรือคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ได้เท่ากับ 56.1 % (ตารางที่ 1 , รูปที่ 12) จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* สามารถย่อยสลายสาร chlorpyrifos ได้ 1.8 , 6.3 และ 40.4 % หลังจากการใส่เชื้อแล้ว 1 , 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)							
	ก่อนการทดลอง		หลังการทดลอง (วัน)					
			1 วัน		4 วัน		8 วัน	
	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ
Control	5.0 ± 0.0	100	3.4453 ± 0.0504 A	68.9	3.35491 ± 0.0690 A	67.1	2.8029 ± 0.0342 A	56.1
Treat.	5.0 ± 0.0	100	3.3527 ± 0.0136 B	67.1	3.03884 ± 0.0626 B	60.8	0.7827 ± 0.0347 B	15.7

[1/] ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT



รูปที่ 12 แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

3. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา*Trichoderma harzianum* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

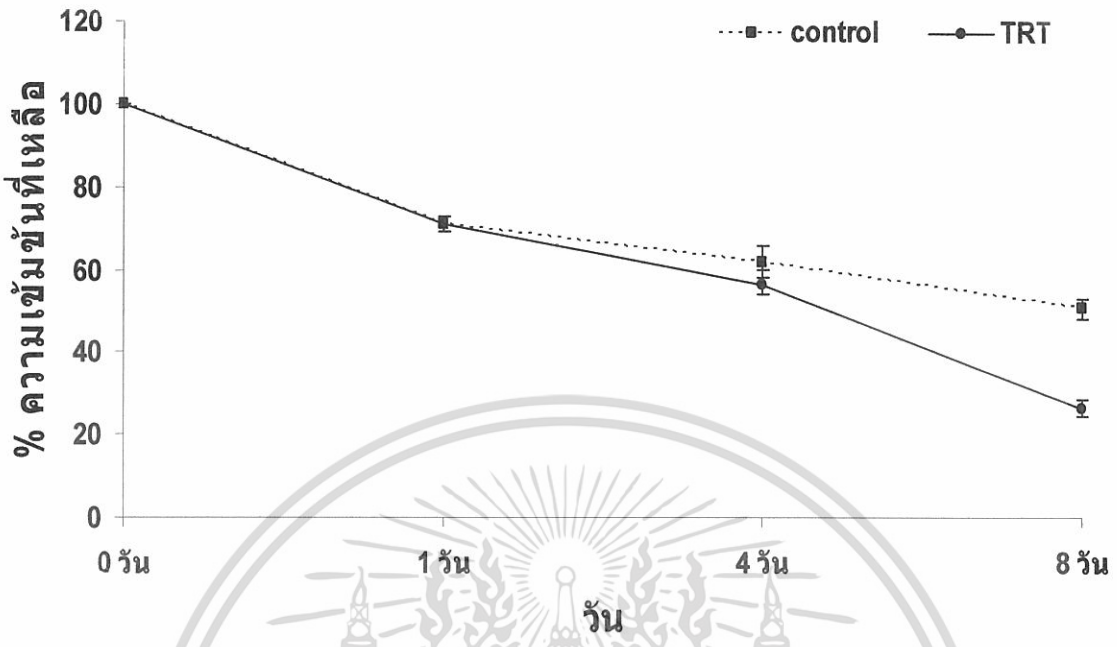
จากการตรวจวิเคราะห์หาสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน สาร chlorpyrifos ในอาหารที่มีการปลูกเชื้อมีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.5491 ppm หรือเท่ากับ 71.0 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนที่ไม่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่ 3.5643 ppm หรือ 71.3 % ของปริมาณสารทั้งหมด และเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารที่มีการปลูกเชื้อ เท่ากับ 2.83425 ppm หรือ 56.7 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนอาหารที่ไม่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่ 3.11192 ppm หรือ 62.2 % ของปริมาณสารทั้งหมด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 8 วัน พบว่าปริมาณสาร chlorpyrifos ในอาหารเหลวที่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่เพียง 1.3185 ppm หรือ 26.4 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนอาหารที่ไม่มีการปลูกเชื้อปริมาณสาร chlorpyrifos เหลืออยู่ 2.5438 ppm หรือ 50.9 % ของปริมาณสารทั้งหมด (ตารางที่ 2 , รูปที่ 13) จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Trichoderma harzianum* สามารถย่อยสลายสาร chlorpyrifos ได้ 0.3 , 5.5 และ 24.5 % หลังจากการใส่เชื้อแล้ว 1 , 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 2 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)							
	ก่อนการทดลอง		หลังการทดลอง (วัน)					
			1 วัน		4 วัน		8 วัน	
	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ
Control	5.0 ± 0.0	100	3.5643 ± 0.0881 A	71.3	3.11192 ± 0.1866 A	62.2	2.5438 ± 0.1210 A	50.9
Treat.	5.0 ± 0.0	100	3.5491 ± 0.0922 A	71.0	2.83425 ± 0.1121 A	56.7	1.3185 ± 0.0964 B	26.4

[1/] ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT



รูปที่ 13 แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Trichoderma harzianum* โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

4. การทดสอบประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos

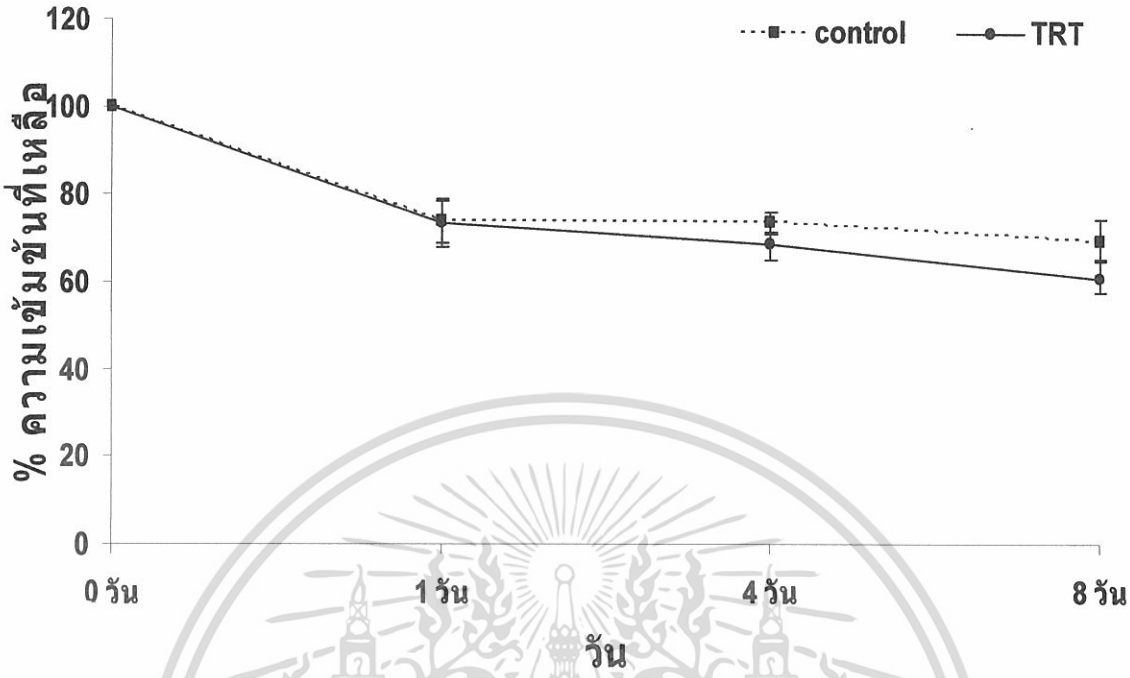
จากการตรวจวิเคราะห์หาสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ เพื่อศึกษาถึงประสิทธิภาพของเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในการย่อยสลายสาร chlorpyrifos พบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 1 วัน สาร chlorpyrifos ในอาหารที่มีการปลูกเชื้อมีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.6791 ppm หรือ คิดเป็น 73.6 % ของปริมาณสารทั้งหมด และในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการปลูกเชื้อมีปริมาณสารเหลืออยู่ 3.7055 ppm หรือ คิดเป็น 74.1 % ของปริมาณสารทั้งหมด และเมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน ปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารที่มีการปลูกเชื้อ เท่ากับ 3.46433 ppm หรือ 69.3 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนอาหารที่ไม่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่ 3.7081 ppm หรือ 74.2 % ของปริมาณสารทั้งหมด แต่เมื่อเวลาผ่านไป 8 วัน พบว่า ปริมาณสาร chlorpyrifos ในอาหารเหลวที่มีการปลูกเชื้อเหลืออยู่เพียง 3.0573 ppm หรือ 61.1 % ของปริมาณสารทั้งหมด ส่วนอาหารที่ไม่มีการปลูกเชื้อปริมาณสาร chlorpyrifos เหลืออยู่ 3.5045 ppm หรือ 70.1 % ของปริมาณสารทั้งหมด (ตารางที่ 3 , รูปที่ 14) จากผลการทดลองพบว่า เชื้อ *Chaetomium* sp. สามารถย่อยสลายสาร chlorpyrifos ได้ 0.5 , 4.9 และ 9.0 % หลังจากการใส่เชื้อแล้ว 1 , 4 และ 8 วัน ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

กรรมวิธี	ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)							
	ก่อนการทดลอง		หลังการทดลอง (วัน)					
			1 วัน		4 วัน		8 วัน	
	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ	ค่าเฉลี่ย[1/] ± S.D.	%ที่เหลือ
Control	5.0 ± 0.0	100	3.7055 ± 0.2533 A	74.1	3.7081 ± 0.1142 A	74.2	3.5045 ± 0.2424 A	70.1
Treat.	5.0 ± 0.0	100	3.6791 ± 0.2595 A	73.6	3.46433 ± 0.2020 A	69.3	3.0573 ± 0.1426 A	61.1

[1/] ค่าเฉลี่ย 3 ซ้ำ

ตัวเลขที่กำกับด้วยตัวอักษรเหมือนกันในแนวตั้งแถวเดียวกันมีความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และตัวเลขที่กำกับด้วยอักษรที่ต่างกันมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95 % โดยวิธี DMRT



รูปที่ 14 แสดงปริมาณความเข้มข้นที่เหลืออยู่ของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อเชื้อรา *Chaetomium* sp. โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

วิจารณ์ผลการทดลอง

ทำการแยกเชื้อหรือเลี้ยงเชื้อโดยวิธี streak plate แล้วทำการ cork เชื้อ ลงในอาหารเหลว ในบางครั้ง ถ้าหากว่าตู้เขี่ยเชื้อสกปรกหรือว่าทำการฆ่าเชื้อไม่ดีพอ จะทำให้เกิดการเจือปนของเชื้อตัวอื่นด้วย เพราะฉะนั้นก่อนทำการ streak plate หรือว่า cork เชื้อ ลงในอาหารเหลว ต้องทำความสะอาดตู้เขี่ยเชื้อให้เรียบร้อย โดยการฉีด แอลกอฮอล์ 70 % ใส่ในตู้เขี่ยเชื้อ แล้วเปิดหลอด UV เพื่อทำการฆ่าเชื้อภายในตู้เขี่ยเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อในการทดลอง nutrient broth (NB) ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงเชื้อ และการทดลองกับ *Bacillus subtilis* พบว่าแบคทีเรียแพร่กระจายอยู่ในอาหารเหลว NB อย่างสม่ำเสมอ จึงทำให้การใช้สาร chlorpyrifos เป็นแหล่งอาหารได้ค่อนข้างดี โดยพบว่า ช่วยในการย่อยสลายสารนี้ได้ถึง 1.8 % (68.9-67.1 %) , 6.3 %(67.1-60.8 %) และ 40.4 % (56.1-15.7 %) ในเวลา 1 , 4 และ 8 วัน ตามลำดับ จากผลการทดลองนี้แสดงว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* ช่วยย่อยสลายสาร chlorpyrifos ได้ดี และช่วยทำให้สารนี้สลายตัวได้เร็วขึ้น ซึ่ง ลักขณา (2544) รายงานว่า มีการใช้สารเคมีในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตกันมากมาย โดยเฉพาะสาร chlorpyrifos มีการใช้กันมากและเป็นเวลานาน ทำให้เกิดการสะสมในสิ่งแวดล้อม และมีการตกค้างในพืชด้วย การใช้เชื้อจุลินทรีย์ *Bacillus subtilis* จะช่วยย่อยสลายสารนี้ได้เร็วขึ้น

ในขณะที่การใช้อาหาร PDB กับ เชื้อ *Trichoderma harzianum* และ *Chaetomium* sp. เชื้อราทั้ง 2 ชนิดจะเจริญเติบโตโดยลอยอยู่บนอาหารเหลว อาจมีผลทำให้สลายสารเคมีได้น้อยลง ส่วนเชื้อรา *Chaetomium* sp. ช่วยย่อยสลายสาร chlorpyrifos ได้น้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากไม่มีความสามารถในการใช้สาร chlorpyrifos เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดี และการเจริญเติบโตอยู่เฉพาะส่วนผิวหน้าของอาหาร PDB ก็อาจมีส่วนด้วยเช่นกัน

สรุปผลการทดลอง

จากการตรวจวิเคราะห์สาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อพบว่า เชื้อ *Bacillus subtilis* มีปริมาณสาร chlorpyrifos เหลืออยู่น้อยที่สุดคือ 3.3527 , 3.03884 และ 0.7827 ppm เมื่อเวลาผ่านไป 1 , 4 และ 8 วัน ซึ่งจะเหลือน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อ *Trichoderma harzianum* มีปริมาณสารเหลือน้อยรองลงมาคือ 3.5491 , 2.83425 และ 1.3185 ppm ซึ่งจะเหลือน้อยกว่าในอาหารที่ไม่มีการใส่เชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 8 แต่ในวันที่ 1 และ 4 แตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อ *Chaetomium* sp. มีปริมาณสารเหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อมากที่สุดคือ 3.6791 , 3.46433 และ 3.0573 ppm และเมื่อเปรียบเทียบกับอาหารเหลวที่ไม่มีการใส่เชื้อแล้วจะมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อนำเชื้อทั้ง 3 มาเปรียบเทียบปริมาณสารที่เหลืออยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อพบว่าในวันที่ 1 เชื้อทั้ง 3 จะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเวลาผ่านไป 4 วัน เชื้อ *Chaetomium* sp. จะแตกต่างกับเชื้อ *Bacillus subtilis* และ เชื้อ *Trichoderma harzianum* อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนเชื้อ *Bacillus subtilis* กับ เชื้อ *Trichoderma harzianum* จะแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเวลาผ่านไป 8 วันปริมาณสารที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อทั้ง 3 เชื้อ จะแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การทดลองนี้เป็นการทดลองที่ทำในห้องปฏิบัติการ ซึ่งจะมีการควบคุมปัจจัยภายนอกต่างๆ เช่น อุณหภูมิ ความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ความหนาแน่นของเชื้อ และ pH ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เป็นต้น ซึ่งทำให้ได้ผลการทดลองเหมือนข้างต้นแต่เมื่อทำนอกห้องปฏิบัติการหรือในธรรมชาติอาจจะได้ผลการทดลองที่แตกต่างไปจากข้างต้นได้ เพราะจะมีปัจจัยภายนอกที่กล่าวมาเข้ามามีส่วนเกี่ยวข้องด้วยฉะนั้นจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

เกษม สร้อยทอง. 2534. ก. การใช้เชื้อรา *Chaetomium gracile* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* งานวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร. (12)8. : 7-1.

เกษม สร้อยทอง. 2534. ข. การใช้เชื้อรา *Chaetomium globosum* ในการควบคุมโรคใบจุดของข้าวโพด. หน้า . 275-269. ในรายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 29 มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

เกษม สร้อยทอง. 2535. การใช้ยาทีผลิตจาก *Chaetomium cupreum* ในการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici.* ในสภาพดินที่มีคุณสมบัติในการป้องกันกำจัดโรคพืช. วารสารศูนย์บางพระ. (9)7. : 16-13.

เกษม สร้อยทอง และ กอบบุญ สร้อยทอง. 2538 . คีโตเมี่ยมควบคุมโรคพืช . ข่าวสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ. (392)36. : 9-8.

จิระเดช แจ่มสว่าง. 2546. การควบคุมโรคพืชที่เกิดจากเชื้อราด้วยเชื้อราไตรโคเดอร์มา. ตอนที่ 2 หลักการและบทบาท. วารสารเคหการเกษตร.(10)19. : 159-165.

ดำริห์ รุ่งสุข. 2543. สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์. ภาควิชาอารักขาพืช คณะผลิตกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้. เชียงใหม่.

ธารทิพย์ สำโรงแสง. 2544. การคัดเลือกสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ต่อต้านเชื้อราสาเหตุทำให้เกิดโรคพืช. ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

นิภาพร บุญศักดาพร. 2538. การคัดเลือกเชื้อ *Trichoderma* spp. ไอโซเลทที่ต้านทานต่อต้านสารเคมีเพื่อควบคุมโรคโคนเน่าของมะเขือเทศที่เกิดจากเชื้อรา *Sclerotium rolfsii* Sacc. โดยวิธีประสมประสาน. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม คณะบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น. ขอนแก่น.

ปรีชา พุทธปรีชาพงศ์. 2542. สารกำจัดศัตรูพืชในประเทศไทย . ฝ่ายสารวัตรเกษตร กองควบคุมพืชและวัสดุการเกษตร กรมวิชาการเกษตร.

พาลาภ สิงหเสนี. 2537. พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม. สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย . กรุงเทพฯ. 117 หน้า.

มณจันทร์ เมฆธน และ ชัยวัฒน์ กระตุกฤกษ์. 2535. การป้องกันกำจัดโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนโดยชีววิธีด้วยเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* AP01 (ลาร์มิน่า). หน้า 200-208. รายงานการ

ประชุมทางวิชาการ ครั้งที่ 32 สาขาพืช วันที่ 3-5 กุมภาพันธ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

ลักขณา อมรสิน. 2544. เคมีของสารกำจัดแมลง. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

ลักขณา อมรสิน. 2545. การป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช. ภาควิชาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ . 105 หน้า.

วัชรินทร์ ศรสวัสดิสกุลมี. 2540. การใช้สารสกัด *Chaetomium cupreum* Ames. ในการยับยังการเจริญเติบโตของเชื้อรา *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. และเชื้อรา *Phytophthora palmivora* (Butler). ปัญหาพิเศษปริญญาตรี สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะเทคโนโลยีการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

วิฑูรย์ เลี่ยนจำรูญ. 2542. การส่งเสริมการเกษตรกับการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืช. หน้า 91-114. รายงานสรุปการสัมมนาแนวทางการสร้างมติในการปฏิรูปนโยบายสารกำจัดศัตรูพืชเพื่อการดำเนินการในอนาคต 2542. กรุงเทพฯ.ฝ่ายเศรษฐกิจรายสาขาสถาบันวิจัยเพื่อพัฒนาประเทศไทย.

สนชัย เพ็ชรพรหม. 2539. การควบคุมโรครากเน่าโคนเน่าของทุเรียนที่เกิดจากเชื้อรา. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

สุกัญญา มหาธีรานนท์. 2534 . แนะนำเครื่องมือวิทยาศาสตร์ Gas Liquid Chromatograph. ข่าวศูนย์. (3)4. 119-123.

สุภาณี พิมพ์สมาน. 2540. สารฆ่าแมลง. โรงพิมพ์คลังนานาวิทยา. ขอนแก่น. หน้า 69-71.

สุมิตรา น้อยเอี่ยม. 2540. การควบคุมโรคแอนแทรคโนสของมะม่วงพันธุ์โชคอนันต์. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต วิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีการจัดการศัตรูพืช คณะบัณฑิตวิทยาลัย สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. กรุงเทพฯ.

เสาวภาคย์ สุวรรณพงษ์ และ เกษม สร้อยทอง. 2545. การทดสอบสารออกฤทธิ์ที่สกัดจากเชื้อจุลินทรีย์ต่อต้าน. 693. ในการประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 28. กรุงเทพฯ. สมาคมวิทยาศาสตร์แห่งประเทศไทยในพระบรมราชูปถัมภ์.

องอาจ เติมเกียรติไพศาล , จิระเดช แจ่มสว่าง , อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ และ รวี เสรฐภักดี. 2535. การคัดเลือกจุลินทรีย์จากดินเพื่อควบคุมโรครากเน่า *Phytophthora* ของกิ่งตอน

ส้มเขียวหวานโดยชีววิธี. หน้า 685-694. รายงานการประชุมวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.กรุงเทพฯ.

อุรัจฉทา กสิกรรมไพบูลย์ , วิชัย โฆสิตรัตน์ , นิพนธ์ ทวีชัย และ อลิต้า เมฆสองสี. 2535. ผลของเชื้อแบคทีเรียแอนทาโกนิสต์ต่อการควบคุมโรคเหี่ยวของมะเขือเทศ. หน้า 321-328. การประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. ครั้งที่ 30 สาขาพืช วันที่ 29 มกราคม-1 กุมภาพันธ์ ณ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.

Alippi,A.M. and C.I. Monaco. 1994. In vitro antagonism of *Bacillus* spp. against *Sclerotium rolfsii* and *Fusarium solani*. Revista de la Facultad de Agronomia La Plata.70 : 91-95.

Arthur,H. B.,Charles A. B. and Chatles G. B.1962. Bacteriology : Principles and Practice. Sixth Edition. New York. Evanston, San Francisco, London. 422 pp.

Biswas, S.K., Srivastava, K.D., Aggarwal R., Praveen, S. and Singh, D.V. 2003. Biochemical changes in wheat induced by *Chaetomium globosum* against spot blotch pathogen. Indian Phytopathology.56(4):374-379.

Digrak, M. and Kazanici, F. 2001. Effect of some Organophosphorus Insecticides on Soil Microorganisms. Department of Microbiology Kahramanmaras Sutcu Imam University. Turkey Jounal Biology.25 :51-58.

Domsh, K.H., Gams, W. and Anderson, T.H. 1980. Compendium of Soil Fungi Vol.1 Academic Press. London. 859 pp.

Fest, C. and K.J. Schmidt. 1983. Organophosphorus Insecticides. *In* Buchel , K.H. (Editor). Chemistry of Pesticide. Translated by Holmwood , G.M.John Wiley & Sons. New York. Pp. 48-125.

Hamed, H.A. 1999. Biological control of basal stem rot and wilt of Cucumber caused *by Pythium ultimum* and *Fusarium oxysporum* f.sp. *cucumerinum*. African Jounal of Mycology and Biotechnology. 7(1):81-91.

Imran, H., Altaf, K.M. and Guk Kim J. 2004. Malathion degradation by *Pseudomonas* using activated sludge treatment system (Biosimulator). Department of Environmental Engineering Chonbuk National University.Biotechnology.3(1):82-89.

Keprasertsup, C., Upatham, S., Sukhapanth, N. and Prempree, P. 2001. Degradation of methyl parathion in an aqueous medium by soil bacteria. Department of Environmental Engineering Rungsit University. Bangkok Science Asia. 27:261-270.

Sarhan, M.M., Tohamy, M.R.A., Ezzat, S.M., Ei-Essawy, A.A. and Mohamed, F.A. 2001. Biocontrol of Fusarium tomato wilt disease by *Bacillus subtilis*. Egyptian jornal of Microbiology. 36(1):103-118.

Singh, K.B., Walker, A., Morgan, W.A.J. and Wright, J.D. 2003. Effects of Soil pH on the biodegradation of chlorpyrifos and isolation of a chlorpyrifos-degrading bacterium. Applied and Environmental Microbiology. 69(9):5198-5206.

Stienwandter H. 1985. Universal 5 min on-line method for extracting and isolating pesticide residues and industrial chemicals. Fresenins Z Anl. Clumie.Pp. 724-752

ตารางภาคผนวก

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อแบคทีเรีย *Bacillus subtilis* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)																			
กรรมวิธี	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง 1 วัน					หลังการทดลอง 4 วัน					หลังการทดลอง 8 วัน				
	ซ้ำที่				ซ้ำที่					ซ้ำที่					ซ้ำที่				
	1	2	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd
Control	5	5	5.0000	0.0000	3.50103	3.40301	3.432	3.4453	0.0504	3.34139	3.29368	3.42966	3.35491	0.0690	2.82204	2.76341	2.82334	2.8029	0.0342
Treat.	5	5	5.0000	0.0000	3.36817	3.34295	3.34685	3.3527	0.0136	3.06098	2.96816	3.08737	3.03884	0.0626	0.80535	0.74282	0.80002	0.7827	0.0347

มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพพรรณี วิทยาลัยการจัดการและนวัตกรรม

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Trichoderma harzianum* ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)																			
กรรมวิธี	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง 1 วัน					หลังการทดลอง 4 วัน					หลังการทดลอง 8 วัน				
	ซ้ำที่				ซ้ำที่					ซ้ำที่					ซ้ำที่				
	1	2	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd
Control	5	5	5.0000	0.0000	3.661	3.48875	3.543	3.5643	0.0881	2.929	3.10475	3.302	3.11192	0.1866	2.68175	2.4555	2.49425	2.5438	0.1210
Treat.	5	5	5.0000	0.0000	3.61375	3.4435	3.59	3.5491	0.0922	2.88	2.91625	2.7065	2.83425	0.1121	1.3925	1.3535	1.2095	1.3185	0.0964

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อ ที่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อรา *Chaetomium* sp. ในวันที่ 0 , 1 , 4 และ 8 วัน

ปริมาณความเข้มข้นของสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ (ppm)																			
กรรมวิธี	ก่อนการทดลอง				หลังการทดลอง 1 วัน					หลังการทดลอง 4 วัน					หลังการทดลอง 8 วัน				
	ซ้ำที่				ซ้ำที่					ซ้ำที่					ซ้ำที่				
	1	2	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd	1	2	3	เฉลี่ย	sd
Control	5	5	5.0000	0.0000	3.8124	3.8879	3.4163	3.7055	0.2533	3.5936	3.8219	3.7088	3.7081	0.1142	3.4124	3.7794	3.3217	3.5045	0.2424
Treat.	5	5	5.0000	0.0000	3.7908	3.8641	3.3825	3.6791	0.2595	3.4639	3.6665	3.2626	3.46433	0.2020	2.9795	2.9704	3.2219	3.0573	0.1426

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.0129	0.0129	9.48	7.71	21.20	0.0374
Ex.Error	4	0.0054	0.0014				
Total	5	0.0183	0.0037				

GRAND MEAN = 3.39900163809458

CV = 1.0849 %

LSD .05 = 8.35860935765513E-02

LSD .01 = .138627656637767

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 1.3599420204109E-03

STANDARD ERROR OF MEAN = 2.12911720392193E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.4453	A
trt		3.3527	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.4453	A
trt		3.3527	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.1499	0.1499	34.53	7.71	21.20	0.0055
Ex.Error	4	0.0174	0.0043				
Total	5	0.1672	0.0334				

GRAND MEAN = 3.19687330722809

CV = 2.0608 %

LSD .05 = .149322385446413

LSD .01 = .247651391424815

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 4.34012436169517E-03

STANDARD ERROR OF MEAN = .038035616474103

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.3549	A
trt		3.0388	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.3549	A
trt		3.0388	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 6 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Bacillus subtilis* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	6.1218	6.1218	5158.47	7.71	21.20	0.0002
Ex.Error	4	0.0047	0.0012				
Total	5	6.1266	1.2253				

GRAND MEAN = 1.79283002018929

CV = 1.9215 %

LSD .05 = 7.80824387277467E-02

LSD .01 = .129499837140687

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 1.18674954432763E-03

STANDARD ERROR OF MEAN = 1.98892730244859E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		2.8029	A
trt		0.7827	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		2.8029	A
trt		0.7827	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 7 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.0003	0.0003	0.04	7.71	21.20	0.8398
Ex.Error	4	0.0325	0.0081				
Total	5	0.0329	0.0066				

GRAND MEAN = 3.55666665236155

CV = 2.5350 %

LSD .05 = .204358838600164

LSD .01 = .338929428283558

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 8.12903862707159E-03

STANDARD ERROR OF MEAN = 5.20545823377462E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.5642	A
trt		3.5491	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.5642	A
trt		3.5491	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 8 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.1156	0.1156	4.88	7.71	21.20	0.0913
Ex.Error	4	0.0948	0.0237				
Total	5	0.2104	0.0421				

GRAND MEAN = 2.97308333714803

CV = 5.1775 %

LSD .05 = .348898617711734

LSD .01 = .578648860210672

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 2.36946791977939E-02

STANDARD ERROR OF MEAN = 8.88719663294598E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.1119	A
trt		2.8343	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.1119	A
trt		2.8343	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 9 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Trichoderma harzianum* และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	2.2522	2.2522	188.21	7.71	21.20	0.0008
Ex.Error	4	0.0479	0.0120				
Total	5	2.3000	0.4600				

GRAND MEAN = 1.93116666873296

CV = 5.6644 %

LSD .05 = .247941867608145

LSD .01 = .411211944693047

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 1.19660846792913E-02

STANDARD ERROR OF MEAN = 6.31561152470376E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		2.5438	A
trt		1.3185	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		2.5438	A
trt		1.3185	B

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 10 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 1 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.0010	0.0010	0.02	7.71	21.20	0.9012
Ex.Error	4	0.2630	0.0658				
Total	5	0.2641	0.0528				

GRAND MEAN = 3.69233338038127

CV = 6.9447 %

LSD .05 = .581203114728275

LSD .01 = .963926203245309

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 6.57518840543965E-02

STANDARD ERROR OF MEAN = .148044907662502

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.7055	A
trt		3.6791	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.7055	A
trt		3.6791	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 11 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 4 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.0891	0.0891	3.31	7.71	21.20	0.1422 Ex.Error
4	0.1076	0.0269					
Total	5	0.1968	0.0394				

GRAND MEAN = 3.58621668815613

CV = 4.5740 %

LSD .05 = .371799393520515

LSD .01 = .616629829887771

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 2.69072732744924E-02

STANDARD ERROR OF MEAN = 9.47052854464705E-02

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.7081	A
trt		3.4643	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.7081	A
trt		3.4643	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

ตารางภาคผนวกที่ 12 แสดงการวิเคราะห์ความแปรปรวนปริมาณสาร chlorpyrifos ที่เหลืออยู่ในอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่มีการปลูกเชื้อ *Chaetomium* sp. และไม่มีการปลูกเชื้อหลังการทดลอง 8 วัน

Analysis of Variance

Source	df	SS	MS	F	F.05	F.01	F-Prob
Treatment	1	0.3000	0.3000	7.59	7.71	21.20	0.0512 Ex.Error
4	0.1582	0.0395					
Total	5	0.4582	0.0916				

GRAND MEAN = 3.2808833916982

CV = 6.0609 %

LSD .05 = .4507131318592

LSD .01 = .747508378631036

DUNCAN'S MULTIPLE-RANGE TEST

NUMBER OF MEANS = 2

ERROR DEGREE OF FREEDOM = 4

ERROR MEAN SQUARE = 3.95414652929666E-02

STANDARD ERROR OF MEAN = .114806308324015

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .01
con		3.5045	A
trt		3.0573	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.

NAME	ID	MEAN	RANKED AT PROBABILITY LEVEL .05
con		3.5045	A
trt		3.0573	A

MEANS NOT SHARING LETTER IN COMMON DIFFER SIGNIFICANTLY

BY DUNCAN'S MULTIPLE RANGE TEST.