การศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า

Study of the effectiveness of preservatives and sodium hypochlorite for eradiation of microorganism in plant tissue culture medium for Bucephalandra aquatic plant

ชนากานต์ ลักษณะ[1*] ยุพา เพ็งสา[1] และ อรสุรางค์ โสภิพันธ์[1]

Chanakan Laksana[1*], Yupa Pengsa[1] and Onsulang Sophipan[1]

บทคัดย่อ

การขยายพันธุ์พืชด้วยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นต้องมีการลงทุนสูงเนื่องจากการที่ต้องใช้อุปกรณ์ที่มีราคาแพง โดยเฉพาะหม้อนึ่งความดันไอน้ำ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใช้สารกันเสียความเข้มข้น 0.25-1.25 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) และสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์ความเข้มข้นสุดท้าย 0.10-0.50 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) ของผลิตภัณฑ์การค้า แล้วนำอาหารดังกล่าวไปเพาะเลี้ยงไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้าที่ปลอดเชื้อโดยไม่มีการนึ่งฆ่าเชื้ออาหาร พบว่าในสูตรอาหารที่ใส่สารกันเสียและโซเดียมไฮโปคลอไรท์สามารถเพิ่มจำนวนยอดได้ในทุกความเข้มข้นและไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยให้จำนวนยอดเฉลี่ย 6.0±0.70-6.8±0.70 ยอด แต่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P>0.05) กับสูตรอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.0±0.07-4.2±0.44 ยอด โดยอาหารที่ใส่สารกันเสีย 0.25-0.75 เปอร์เซ็นต์โดยปริมาตร (v/v) พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในขณะที่อาหารที่เติมโซเดียมไฮโปคลอไรท์ทุกความเข้มข้นไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อ ผลการยืนยันประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อของสารกันเสียและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อบูเซปฟาแลนดร้า โดยการนำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่พบการปนเปื้อนจุลินทรีย์มาใส่บนอาหารแข็งสูตร Luria-Bertani (LB) พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมโดยใช้สารกันเสียมีการเจริญของจุลินทรีย์ ขณะที่อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมโดยใช้โซเดียมไฮโปคลอไรท์ไม่มีการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ดังนั้นสรุปได้ว่าสารกันเสียมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ในขณะที่โซเดียมไฮโปคลอไรด์มีฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้

คำสำคัญ: บูเซปฟาแลนดร้า สารกันเสีย โซเดียมไฮโปคลอไรท์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออย่างง่าย

[1] คณะเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยบูรพา วิทยาเขตสระแก้ว

[1] Faculty of Agriculture Technology, Burapha University, Sakaeo campus

[*] Corresponding author. E-mail: chanakanl@buu.ac.th

Received: December 13, 2022; Revised: February 8, 2023; Accepted: March 1, 2023

Abstract

Plant propagation via tissue culture techniques requires a high investment due to the expensive equipment especially autoclave. Consequently, the objective of this study was to examine the effectiveness of preservative and sodium hypochlorite in sterilizing plant tissue culture media to lower the cost of culturing. Using 0.25 to 1.25% (v/v) preservative and final concentration of 0.10-0.50% (v/v) of sodium hypochlorite of commercial product were trialed. These media were not autoclaved and then used for culturing the sterile Buceparandra. It was found that in media containing preservative and sodium hypochlorite were able to increase the number of shoots at all concentrations and there was no statistical difference. The average number of shoots was 6.0±0.70-6.8±0.70 but there was a statistical difference from the autoclaved media which yielded 4.0±0.07-4.2±0.44 shoots. The media containing 0.25-0.75% of preservative were found to be contaminated with microorganisms while all concentrations of sodium hypochlorite-containing medium were not contaminated by microorganisms. Confirmation of the antiseptic efficiency of preservative and sodium hypochlorite in the preparation of Buceparandra tissue culture media was done by evaluating media without microbiological contamination on Luria-Bertani (LB) solid medium. It was discovered that preservative-treated tissue culture medium enhanced bacteria growth. While tissue culture medium prepared with sodium hypochlorite did not support the growth of germ-free cells, Therefore, it may be concluded that preservatives prevent the growth of bacteria, whereas sodium hypochlorite can eliminate microorganisms.

Keywords: Bucephalandra, preservative, sodium hypochlorite, simple-plant tissue culture

บทนำ

เทคนิคเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นอีกเทคนิคที่ได้รับความนิยมในการขยายพันธุ์พืชเป็นอย่างมากในปัจจุบัน เนื่องจากเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้สำหรับการขยายพันธุ์พืชพันธุ์ดีให้ได้ต้นที่ปลอดโรค มีลักษณะเหมือนต้นแม่ สามารถผลิตได้เป็นจำนวนมากในระยะเวลาสั้น ๆ ต้นที่ได้มีความสม่ำเสมอเหมาะสำหรับการผลิตในเชิงอุตสาหกรรม (Romadanova, Tolegen, Kushnarenko, Zholdybayeva, & Bettoni, 2022) ปัจจุบันเทคนิคนี้ได้ถูกนำไปใช้ขยายพันธุ์พืชหลายชนิด เช่น กล้วยไม้ กล้วย อ้อย ไม้ดอกไม้ประดับ และไม้โตเร็ว เป็นต้น แต่เทคนิคดังกล่าวนี้มีการนำมาใช้จำกัดเฉพาะกับบริษัทใหญ่ ๆ ทำให้กับเกษตรกรหรือผู้ประกอบการรายย่อยที่สนใจจะใช้เทคนิคนี้ในการขยายพันธุ์ขาดโอกาสในการสร้างอาชีพเนื่องจากเป็นเทคนิคที่ต้องการเงินทุนสูงจึงมีโอกาสเข้าถึงเทคโนโลยีได้ยาก ดังนั้นเพื่อเป็นการส่งเสริมให้เกิดการเข้าถึงเทคโนโลยี งานวิจัยนี้จึงมีการประยุกต์เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพื่อให้ง่ายต่อการเข้าถึงของบุคคลทั่วไป โดยการศึกษาสารเคมีที่สามารถฆ่าเชื้อในอาหารได้เพื่อทดแทนการฆ่าเชื้ออาหารโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ซึ่งมีราคาสูง ปัจจุบันมีงานวิจัยที่ศึกษาการใช้สารเคมีในการกำจัดเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น ethanol (EtOH), sodium hypochlorite (NaClO), mercury chloride ($HgCl_2$) และ chlorine dioxide (ClO_2) เป็นต้น (Chotikadachanarong, 2014; Cardoso, & Imthurn, 2018; Suaib et al., 2018) หากการปนเปื้อนมีสาเหตุมา

จากเชื้อราก็สามารถใช้สารที่ฆ่าเชื้อราได้โดยเฉพาะ เช่น คาร์บอกซิน เบนโนมิล คาร์เบนดาซิม และคอปเปอร์ไฮดรอกไซด์ (Nuchnuanrat, & Jitsatta, 2021) ซึ่งสารเคมีแต่ละชนิดจะมีการศึกษาในพืชต่าง ๆ ถึงประสิทธิภาพของสาร เช่น Sookruksawong (2022) พบว่าการใช้ไฮเตอร์ที่ระดับความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มิลลิลิตรต่อลิตร ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมันเหน็บไม่พบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และ Cardoso, & Imthurn (2018) ใช้ ClO_2 แทนการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ พบว่าอาหารที่ใส่ ClO_2 ความเข้มข้น 0.0035-0.0105 เปอร์เซ็นต์ สามารถกำจัดเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเยอบีร่าได้ 100 เปอร์เซ็นต์ นอกจากสารเคมีต่าง ๆ เหล่านี้แล้วยังมีสารกลุ่ม plant preservative mixture™ หรือที่เรียกว่า PPM™ ซึ่งเป็นสารที่สามารถควบคุมการปนเปื้อนเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้ สามารถฆ่าเซลล์แบคทีเรียและเชื้อรา ป้องกันการงอกของสปอร์เชื้อราในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยใน PPM™ ประกอบไปด้วยสารหลายชนิด คือ 5-chloro 2-methyl 3 (2H) isothiazolone, 2-methyl-3 (2H) isothiazolone, magnesium chloride, magnesium nitrate, potassium sorbate และ sodium benzoateisothia แต่สาร PPM™ มีราคาค่อนข้างสูงหากนำมาใช้จะเป็นการเพิ่มต้นทุนของการทำธุรกิจ นอกจากนี้สารกันเสียเป็นอีกทางเลือกในการนำมาใช้เพื่อยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งสารกันเสียมีส่วนประกอบของสารเคมีเหมือนกับ PPM™ แต่ราคาถูกกว่า ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงนำสารกันเสียมาประยุกต์ใช้กับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เนื่องจากสารที่เป็นส่วนประกอบในสารกันเสียที่ประกอบด้วย methyl chloro isothiazolinone, methyl isthiazolinone, magnesium chloride และ magnesium ออกฤทธิ์โดยการยับยั้งเอนไซม์ที่ใช้ในกลไกของวัฏจักรเครบส์ (Krebs cycle) และการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) ทำให้แบคทีเรียและเชื้อราไม่สามารถเจริญเติบโตได้ และตายในที่สุด (Compton, & Koch, 2001)

บูเซปฟาแลนดร้า (*Bucephalandra* spp.) เป็นไม้น้ำอีกชนิดหนึ่งที่เริ่มได้รับความนิยม มีความต้องการเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ และมีมูลค่าสูง บูเซปฟาแลนดร้าเป็นพืชน้ำเฉพาะถิ่นของเกาะบอร์เนียว และเป็นที่นิยมมากในกลุ่มผู้ที่ชื่นชอบพันธุ์ไม้น้ำของโลก และใช้เป็นไม้ประดับในงานออกแบบภูมิทัศน์น้ำ (Nugraha et al., 2022) มีลักษณะเด่น คือ มีจุดสว่างหรือที่เรียกว่ามุกบนใบ จากลักษณะเด่นดังกล่าวจึงทำให้ราคาขายต่อต้นของพรรณไม้น้ำชนิดนี้สูงมาก (Laohavisuti, Ruangdej, Seesanong, & Wangwibulkit, 2018) ดังนั้นจึงเป็นที่มาของงานวิจัยนี้โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียและสารไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแทนการนึ่งโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ ถ้าสามารถขยายพันธุ์ไม้น้ำชนิดนี้โดยใช้วิธีการดังกล่าวได้จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งให้กับผู้ที่สนใจการขยายพันธุ์พืชชนิดนี้แต่ไม่มีเงินทุนซื้อหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และจะเป็นการเพิ่มรายได้ให้กับผู้ที่สนใจที่เป็นเกษตรกรรายย่อยได้

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมเนื้อเยื่อต้นบูเซปฟาแลนดร้า (wavy green)

นำต้นพันธุ์ไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า มาเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ โดยนำต้นมาล้างด้วยน้ำสะอาด แล้วนำชิ้นส่วนยอดไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า ลงแช่ในแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 นาที แล้วฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกขาวที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 ฟอกด้วยสารฟอกขาว ความเข้มข้น 20 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที และฟอกฆ่าเชื้อครั้งที่ 2 ด้วยสารฟอกขาว ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 10 นาที หลังจากนั้นล้างเนื้อเยื่อด้วยน้ำปลอดเชื้อ 2 ครั้ง ๆ ละ 1 นาที นำเนื้อเยื่อมาตัดส่วนที่ถูกทำลายด้วยสารฟอกขาว ตัดให้เหลือเฉพาะส่วนยอดและฐานของส่วนยอด นำไปวางเลี้ยงบนอาหาร MS (Murashige, & Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต N6-benzyladenine (BA) และ 1-naphthalene acetic acid (NAA) ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เป็นเวลา 45 วัน หลังจากนั้นแยกยอดไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้าที่จะใช้ในการทดลองที่ 2 มาเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA ที่และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ตรวจสอบสภาพการปลอดเชื้อ

2. การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการฆ่าเชื้อด้วยสารกันเสียและสารโซเดียมไฮโปคลอไรท์

เตรียมอาหารเหลวสำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับสารกันเสียที่มีส่วนประกอบของ methyl chloro isothiazolinone, methyl isthiazolinone, magnesium chloride และ magnesium nitrate โดยใส่สารกันเสียให้ความเข้มสุดท้ายเป็น 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ และสารฟอกขาวที่มีโซเดียมไฮโปคลอไรท์เข้มข้น 6 เปอร์เซ็นต์ โดยเติมสารผลิตภัณฑ์ลงในอาหารเพาะเลี้ยงให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทุกสูตรเติมน้ำตาลทราย 30 กรัมต่อลิตร และปรับ pH 5.6-5.8 โดยอาหารทุกสูตรไม่มีการให้ความร้อน และวางอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อไว้ 1 สัปดาห์ก่อนนำไปใช้เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อ แล้วนำเนื้อเยื่อไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้าที่ปลอดเชื้อจากข้อ 1 มาย้ายลงสูตรอาหารที่เตรียมไว้เพาะเลี้ยงในสภาพแสง 55 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที โดยให้แสงเป็นเวลา 16 ชั่วโมงต่อวัน ที่อุณหภูมิ 25±2 องศาเซลเซียส เพาะเลี้ยงนาน 45 วัน

3. การตรวจสอบการเจริญเติบโตและการเพิ่มจำนวนของไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยอาหารเพาะเลี้ยงที่เตรียมโดยใช้สารเคมี

บันทึกผลการทดลองคือ จำนวนยอดที่เกิดขึ้น ลักษณะโดยรวม และจำนวนขวดที่ปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ วางแผนการทดลองแบบ completely randomized design (CRD) ทำการทดลองสูตรละ 10 ซ้ำ วิเคราะห์ผลทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (P<0.05) ด้วยวิธี ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างค่าเฉลี่ยโดยวิธีการ Duncan's multiple range test (DMRT)

4. การศึกษาประสิทธิภาพของสารกันเสียและสารฟอกขาวต่อการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์

นำอาหารเหลวสูตร MS ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในข้อที่ 2 มาตรวจสอบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 45 วัน โดยนำอาหารเหลวแต่ละสูตรปริมาณ 500 ไมโครลิตร มาเกลี่ย (spread-plate) ลงบนผิวหน้าของอาหารแข็งสูตร Luria Bertani (LB) เพาะเลี้ยงในที่มืดที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 สัปดาห์ แล้วตรวจสอบผลการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์โดยสังเกตการเจริญของเชื้อบนจานอาหาร

ผลการศึกษาและอภิปรายผล

1. ผลของสารกันเสียและสารฟอกขาวที่มีต่อการเกิดยอดของไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า ในสภาพเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

เมื่อนำยอดของบูเซปฟาแลนดร้า มาเพาะเลี้ยงบนอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับสารกันเสียที่ความเข้ม 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00 และ 1.25 เปอร์เซ็นต์ และสารฟอกขาวที่ความเข้ม 0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4 และ 0.5 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารกันเสียที่ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่ 6.0-6.4 ยอด แต่จำนวนยอดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารนึ่งฆ่าเชื้อที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ยเพียง 4 ยอด ดัง (Table 1) เช่นเดียวกันกับสูตรอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยสารฟอกขาวที่ทุกระดับความเข้มข้นให้จำนวนยอดไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยให้ค่าเฉลี่ยจำนวนยอดที่ 6.2±0.44-6.8±0.70 ยอด แต่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับสูตรอาหารนึ่งฆ่าเชื้อที่ให้จำนวนยอดเฉลี่ย 4.2±0.44 ยอด ดัง (Table 2) และจำนวนยอดเฉลี่ยของไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในอาหารที่เติมสารกันเสียทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างกันทางสถิติกับจำนวนยอดที่ได้จากอาหารที่เติมสารฟอกขาวทุกความเข้มข้น จากผลการทดลองจะเห็นว่าสูตรอาหารที่เติมสารกันเสียและสารฟอกขาวไม่มีผลยับยั้งการเกิดยอดของไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า ในขณะที่อาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำให้จำนวนยอดน้อยกว่าสูตรอาหารที่เติมสารกันเสียและสารฟอกขาว สาเหตุที่สูตรอาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยความดันไอน้ำนั้นเกิดจำนวนต้นต่ำกว่าไม่นึ่งฆ่าเชื้อนั้น เพราะว่าการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำนั้นต้องใช้ความร้อนสูงถึง 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ส่งผลต่อการสลายตัวของธาตุอาหาร นอกจากนี้ค่า pH อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงหลังจากการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งแรงดันไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที โดย Robert et al. (1986) พบว่าเมื่ออาหารสูตร MS ได้รับการนึ่งฆ่าเชื้อค่า pH จะเปลี่ยนแปลงไปโดยก่อนการนึ่งฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงมีค่า pH อยู่ที่ 5.20-5.80 แต่เมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้วพบว่าค่าเปลี่ยนแปลงเป็น 5.70-8.50 และ Cardoso, & Imthurn (2018) พบการเปลี่ยนแปลงค่า pH ในอาหารก่อนและหลังนึ่งฆ่าเชื้อ โดยก่อนนึ่งฆ่าเชื้อมีค่า pH 5.4 และเมื่อนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว pH ลดลงเหลือ 4.04 ค่า pH นอกจากจะมีผลโดยตรงต่อความเป็นประโยชน์ได้ของธาตุอาหารแล้ว ยังมีผลต่อการดูดซึมสารอาหารเข้าสู่เซลล์พืชด้วย ถ้า pH ในอาหารเพาะเลี้ยงไม่เหมาะสมก็จะไม่สามารถดูดสารอาหารได้เต็มที่

นอกจากนี้การนึ่งฆ่าเชื้ออาหารยังส่งผลให้มีการผลิตสารพิษที่มีผลต่อพืช เช่น สาร 5-(hydroxymethyl) -2-furaldehyde และ phenolics (Wang, & Hsiao, 1995) การให้ความร้อนทำให้สารเคมีหรือฮอร์โมนบางส่วน

สลายตัวไปทำให้การทดลองที่ไม่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำมีการเจริญเติบโตดีกว่า เช่นเดียวกับการทดลองของ Cardoso, & Imthurn (2018) ที่พบว่ายอดของเยอบีร่าที่เพาะเลี้ยงในอาหารที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำมีการเจริญเติบโตที่น้อยกว่าการใช้สารเคมี chlorine dioxide และการนึ่งอาหารด้วยความดันสูงจะส่งผลเสียโดยเกิดการไฮโดรไลซิสของซูโครสให้เป็นเป็นกลูโคสและฟรุกโตส (Druart, & De Wulf, 1993; Wann, Veazey, & Kaphammer, 1997) ซึ่งมีรายงานว่าฟรุกโตสมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของพืชหลายชนิดโดยไปยับยั้งปฏิกิริยาในกระบวนการ glycolysis (Redei, 1973)

2. ประสิทธิภาพของสารกันเสียและโซเดียมไฮโปคลอไรท์ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

จากการเพาะเลี้ยงไม้น้ำบูเซปฟาแลนดร้า ในอาหาร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต BA และ NAA ที่ระดับความเข้มข้น 2 และ 0.50 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ร่วมกับสารกันเสียและสารฟอกขาวเป็นระยะเวลา 45 วัน พบว่าสูตรอาหารที่เติมสารกันเสียที่ระดับความเข้ม 0.25, 0.50 และ 0.75 เปอร์เซ็นต์ มีการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สังเกตได้จากอาหารเหลวมีความขุ่น โดยพบการปนเปื้อนของเชื้อตั้งแต่ 14 วันแรกของการเพาะเลี้ยงทั้งนี้พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่เตรียมโดยใช้สารกันเสียที่ความเข้ม 0.25 เปอร์เซ็นต์ มีจำนวนการปนเปื้อนเชื้อสูงที่สุดคือ 70 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อครบ 45 วันนำอาหารที่ไม่แสดงการปนเปื้อนเชื้อมาตรวจสอบโดยนำมาเกลี่ยด้วยอาหารแข็ง LB ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 สัปดาห์ พบว่าอาหาร MS ที่เติมสารกันเสียทุกความเข้มข้นที่ก่อนหน้านี้ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อมีการปนเปื้อนเชื้อทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้น 1.25 เปอร์เซ็นต์ พบว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้อรา ดัง (Table 1) และ (Figure 1) ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Romadanova, Tolegen, Kushnarenko, Zholdybayeva, & Bettoni (2022) ทดสอบใช้ PPM™ ในการกำจัดเชื้อเอนโดไฟติคชนิด *Bacillus megaterium* ในแอปเปิ้ลจำนวน 6 สายพันธุ์ ในสภาพปลอดเชื้อพบว่า การทดลองที่ได้รับ PPM™ ที่ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 12 สัปดาห์ สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียชนิดนี้ได้ แต่เมื่อย้ายเนื้อเยื่อเหล่านี้ไปยังสูตรอาหารที่ไม่มี PPM™ เป็นเวลา 24 สัปดาห์ พบว่ามีแอปเปิ้ลจำนวน 2 สายพันธุ์ที่เชื้อยังมีการปนเปื้อนแม้ว่าจะเคยเพาะเลี้ยงในอาหารที่มี PPM™ ที่ความเข้มข้น 0.20 เปอร์เซ็นต์ (v/v) เป็นเวลา 12 สัปดาห์แล้วก็ตาม ดังนั้นควรมีการศึกษาในระดับความเข้มข้นที่สูงกว่านี้ในไม้น้ำเพื่อที่จะสามารถยับยั้งหรือฆ่าเชื้อราและแบคทีเรียได้

ส่วนอาหาร MS ที่เติมสารฟอกขาวที่ทุกระดับความเข้มข้นนั้นไม่แสดงการปนเปื้อนเชื้อ และเมื่อนำไปตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์โดยการเกลี่ยบนอาหารแข็ง LB พบว่า ไม่มีการเจริญของทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา ดัง (Table 2) และ (Figure 2) เนื่องจากในสารฟอกขาวมีส่วนประกอบของโซเดียม-ไฮโปคลอไรท์ (sodium hypochlorite: NaClO) ซึ่งเป็นสารที่ใช้อย่างกว้างขวางในการกำจัดเชื้อ ซึ่งพบว่ามีการใช้ NaClO ผสมในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อโดยไม่ต้องนึ่งฆ่าเชื้อและสามารถกำจัดเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เช่น ในการขยายพันธุ์อ้อยในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ใช้ 0.10 เปอร์เซ็นต์ของผลิตภัณฑ์ที่มี NaClO เป็นองค์ประกอบสามารถกำจัดเชื้อ

ได้ดีที่สุด (Tiwari, Tripathi, Lal, & Mishra, 2012) และ Brondani et al. (2013) ได้เพาะเลี้ยงข้อตาของ *Eucalyptus benthamii* ในอาหารที่เติม 0.001 เปอร์เซ็นต์ และ 0.003 เปอร์เซ็นต์ NaClO เป็นเวลา 28 วัน พบว่าไม่มีเชื้อปนเปื้อน เช่นเดียวกับสูตรอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ แสดงให้เห็นว่า NaClO ที่มีอยู่สารฟอกขาวนั้นมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา รวมทั้งมีราคาถูกเหมาะสำหรับนำไปใช้กับธุรกิจเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ไม่ต้องการลงทุนซื้อหม้อนึ่งความดันไอน้ำซึ่งมีราคาสูง โดยเมื่อเปรียบเทียบต้นทุนที่ใช้ฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแล้วพบว่า การฆ่าเชื้อโดยใช้สารฟอกขาวมีต้นทุนต่ำที่สุด (0.06 บาทต่อลิตร) รองลงมาคือการฆ่าเชื้อด้วยสารกันเสีย (1.60 บาทต่อลิตร) ส่วนการฆ่าเชื้อโดยการนึ่งในหม้อนึ่งความดันไอน้ำมีต้นทุนสูงที่สุด (16.90 บาทต่อลิตร) ดัง (Table 3)

Table 1 Number of shoots, percentage of contamination and type of contamination of culture medium sterilized by autoclaving or preservative.

concentration of biocide 150® (V/V percent)	number of shoots	percentage of contamination	type of contamination (fungi / bacteria)
autoclaved (control)	4.00^{b}±0.70	0	-
0.25	6.40^{a}±0.55	70	fungi and bacteria
0.50	6.40^{a}±0.89	30	fungi and bacteria
0.75	6.20^{a}±0.44	10	fungi and bacteria
1.00	6.40^{a}±0.89	0	fungi
1.25	6.00^{a}±0.70	0	fungi

The number of shoots present as mean±S.D. The means in the same column followed by the same letter are not significantly difference according to DMRT, $p<0.05$.

Table 2 Number of shoots, percentage of contamination and type of contamination of culture medium sterilized by autoclaving or bleach.

bleach (V/V percent)	number of shoots	percentage of contamination	type of contamination (fungi / bacteria)
autoclaved (control)	4.20^{b}±0.44	0	-
0.10	6.60^{a}±0.89	0	-
0.20	6.40^{a}±0.54	0	-
0.30	6.20^{a}±0.44	0	-
0.40	6.80^{a}±0.70	0	-
0.50	6.60^{a}±0.54	0	-

The number of shoots present as mean ± SD. The means in the same column followed by the same letter are not significantly difference according to DMRT, $p<0.05$.

Figure 1 Bucepharandra *in vitro* culture in MS supplemented with preservative and microbial contamination; (A) Autoclaved (control), (B) 0.25%, (C) 0.5%, (D) 0.75%, (E) 1.0% and (F)1.25% of preservative. scale bar: 1 cm.

Figure 2 Bucepharandra *in vitro* culture in MS supplemented with bleach; (A) Autoclaved (control), (B) 0.1%, (C) 0.2%, (D) 0.3%, (E) 0.4% and (F) 0.5% of bleach. scale bar: 1 cm.

Table 3 Cost of three difference sterilization methods (baht/liter).

cost	sterilization method		
	autoclave	bleach	preservative
power	9.40[1]	-	-
depreciation	7.50[2]	-	-
chemical	-	0.06[3]	1.60[4]
total	16.90	0.06	1.60

note: [1] Autoclave with 3,000 w/h and the sterilization time is 1.5 h. The cost is calculated based on the current power cost + Ft value.

[2] The price of the equipment is 300,000 baht and the depreciation is 10%/year with 250 working days/year and 1.5 h/day.

[3] The product price is 15 baht/250 mL and 1.0 mL is used per a liter of medium (0.1%).

[4] The product price is 320 baht/1,000 mL and 5.0 mL is used per a liter of medium (0.5%).

สรุป

การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีเป็นอีกทางเลือกที่น่าสนใจสำหรับใช้ในการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทดแทนการฆ่าเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีราคาสูง การใส่สารกันเสียในความเข้มข้นสูงสุด 1.25 เปอร์เซ็นต์ ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชมีประสิทธิภาพเพียงพอต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เท่านั้นแต่ไม่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ในขณะที่การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยสารฟอกขาวจะสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ดังนั้นแนวทางหนึ่งในการลดลงต้นทุนของการขยายพันธุ์พืชในระดับอุตสาหกรรมขนาดเล็กสามารถเลือกใช้การฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยการใช้สารเคมีแทนการฆ่าเชื้อด้วยการใช้การนึ่งโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำสูง

คำขอบคุณ

งานวิจัยนี้ได้รับงบประมาณสนับสนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยบูรพา “ผ่านกองทุนส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม ปีงบประมาณ พ.ศ. 2565 งบประมาณด้านวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (ววน.)” เลขที่สัญญา ววน. 15.10/2565

เอกสารอ้างอิง

Brondani, G. E., Silva de Oliveira, L., Bergonci, T., Ebling Brondani, A., Macedo França, F. A., Lopes da Silva, A. L., & Natal Gonçalves, A. (2013). Chemical sterilization of culture medium: a low cost alternative to *in vitro* establishment of plants. *Scientia Forestalis, 41*(98), 257-264.

Cardoso, J. C., & Imthurn, A. C. P. (2018). Easy and efficient chemical sterilization of the culture medium for *in vitro* growth of gerbera using chlorine dioxide (ClO_2). *Ornamental Horticulture, 24*(3), 218-224.

Chotikadachanarong, K. (2014). Influence of commercial bleach on sterilization of Persian Violet (*Exacum affine* Balf. F. ex Regel) tissue. *Rajabhat Journal of Science*, *Humanities & Social Science*, *14*(2), 34-43. (in Thai)

Compton, M., & Koch, J. M. (2001). Influence of plant preservative mixture (PPM)™ on adventitious organogenesis in melon, petunia, and tobacco. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant*, *37*, 259-261.

Druart, P., & De Wulf, O. (1993). Activated charcoal catalyzes sucrose hydrolysis during autoclaving. *Plant Cell Tissue Organ Culture, 32*, 97-99.

Laohavisuti, N., Ruangdej, U., Seesanong, S., & Wangwibulkit, S. (2018). Effect of disinfectants and plant growth regulator in aquatic plant *Bucephalandra* sp. micropropagation. *King Mongkut's Agricultural Journal, 35*(2), 95-103. (in Thai)

Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiology Planta*, *15*, 473-497.

Nuchnuanrat, P., & Jitsatta, N. (2021). Evaluation of fungicide carbendazim resistance in *Colletotrichum gloeosporioidescausing* anthracnose disease of mango cv. Aokrong in Chanthaburi province. *RMUTSB Academic Journal*, *9*(2), 164-173. (in Thai)

Nugraha, M. F. I., Putra, T. A., Yunita, R., Enggarini, W., Erlinawati, I., Sahroni, D., Subamia, I. W., Ardi, I., & Cahyadi, A. (2022). The genetic diversity of genus *Bucephalandra* traded in the aquatic biota markets in Jakarta and the surrounding area based on RbCl markers. *Acta Horticulturae, 1334*, 389-396.

Redei, G. P. (1973). Effects of degradation products of fructose on the glycolytic pathway. *Z. Pflanzenphysiologie*, *70*, 97-106.

Robert, M. S., Chu, M. C., Mann, M. L., Young, H., Sullivan, J., & Fermanian, T. (1986). Stability of tissue culture medium pH as a function of autoclaving, time, and cultured plant material. *Plant Cell Reports*, *5*(4), 292-294.

Romadanova, N. V., Tolegen, A. B., Kushnarenko, S. V., Zholdybayeva, E. V., & Bettoni, J. C. (2022). Effect of plant preservative mixture™ on endophytic bacteria eradication from *in vitro*-grown apple shoots. *Plants*, *11*, 2624.

Sookruksawong, S. (2022). Sterilization and low-cost tissue culture techniques of *Dioscorea bulbifera*. *Science, Technology, and Social Sciences Procedia*, *2022*(4), rspg014. (in Thai)

Suaib, S., Arief, N., Sadimantara, G. R., Suliartini, N. W. S., Rakian, T. C., & Ardhi. (2018). *In vitro* seeds germination and plantlets growth of hot pepper (*Capsicum frutescens* L.) on non-autoclaved murashige and skoog basal medium. *Asian Journal Plant Science, 17*(4), 173-181.

Tiwari, A. K., Tripathi, S., Lal, M., & Mishra, S. (2012). Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during *in vitro* micropropagation of sugarcane. *Sugar Technology*, *14*(4), 364-369.

Wang, X. J., & Hsiao, K. C. (1995). Sugar degradation during autoclaving: Effects of duration and solution volume on breakdown of glucose. *Physiologia Plantarum*, *94*(3), 415-418.

Wann, S. R., Veazey, R. L., & Kaphammer, J. (1997). Activated charcoal does not catalyze sucrose hydrolysis in tissue culture media during autoclaving. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, *50*(3), 221-224.