*บทความวิจัย*

# ผลของเทคนิคการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีและไมโครเวฟต่ออาหาร และอุปกรณ์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการย้ายเนื้อเยื่อ โดยไม่ใช้ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ

**ปวีนันทร์ รังแก้ว[1*] และ รักชนก โคโต[2]**


## บทคัดย่อ

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้คือการศึกษาวิธีการใหม่เพื่อฆ่าเชื้ออุปกรณ์และอาหารสำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้วิธีทางเคมีหรือกายภาพ โดยนำอุปกรณ์ 3 ชนิดคือ ปากคีบ ด้ามมีดผ่าตัด และจานเพาะเลี้ยง มาฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี 3 ชนิด ที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน พบว่าคลอร็อกซ์ความเข้มข้น 15% ใช้เวลา 10 นาที และ 20% เวลา 5 นาที ฆ่าเชื้อได้ 80% ส่วนการฆ่าเชื้อในอาหารกึ่งแข็งสูตร Murashige และ Skoog (MS) ด้วยคลอร็อกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตรต่อขวดขึ้นไป ไม่พบการปนเปื้อนเช่นเดียวกับการใช้ไมโครเวฟที่ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที เมื่อนำอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร และเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที มาเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของพิทูเนีย (*Petunia hybrida* E.Vilm) มิ้นต์ (*Mentha arvensis* L.) และคาโมมายล์ (*Matricaria chamomilla* L.) ศึกษาการเจริญของยอด ใบและความสูงของลำต้นเป็นเวลา 4 สัปดาห์ พิทูเนียและคาโมมายล์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟไม่แตกต่างกัน แต่มิ้นต์มีการเจริญเติบโตแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P \leq 0.05$) การเพาะเลี้ยงพิทูเนียในตู้ปลาดัดแปลงและบนโต๊ะปฏิบัติการที่ทำให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อด้วยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยงที่ทำในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ


**คำสำคัญ:** การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช การฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางเคมี การฆ่าเชื้อด้วยวิธีทางกายภาพ

[1]นิสิตปริญญาโท หลักสูตรการศึกษามหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[2]ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

[*]ผู้นิพนธ์ประสานงาน, e-mail: paweenun@gmail.com

# Effects of Chemical and Microwave Techniques on Sterilization of Medium and Materials Plant Tissue Culture and Subculture without Using Laminar Air Flow Cabinet

**Paweenun Rangkaew[1*] and Rakchanok Koto[2]**

## ABSTRACT

The aim of this research was to investigate the new sterilization techniques for materials and plant culture medium by using chemical or physical methods. Three kinds of tools (forceps, scalpel handles and petri dishes) were sterilized by three different chemicals at various times and concentrations. The results indicated that Clorox bleach applied at concentration levels 15%, 10 min and 20%, 5 min gave 80% aseptic rate. To eliminate microbes in semi-solid Murashige and Skoog (MS) media sterilized by Clorox bleach at 50 µl per bottle and more were found contamination free every volume as well as using microwave oven at power levels 800 W for 3 min. Then, the media containing Clorox bleach (50 µl) and the media irradiated in microwave oven (800 W for 3 min) were used to culture stem explants of petunia (*Petunia hybrida* E. Vilm.), mint (*Mentha arvensis* L.) and camomile (*Matricaria chamomilla* L.). Number of shoots, leaves and total stem length were evaluated in 4 weeks. Petunia and camomile cultured on Clorox bleach and microwaved media were not significantly different, but mint was significantly different ($P \leq 0.05$) on number of leaves and total stem length. The culturing of petunia in modified aquarium and lab bench cleaned with ethyl alcohol 70% was not found to be contaminated similar to culturing in the laminar air flow cabinet.

**Keywords:** plant tissue culture, chemical sterilization, physical sterilization

[1]Graduate Student in Master of Education Program (Biology), Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University.

[2]Department of Biology, Faculty of Science, Srinakharinwirot University

[*]Corresponding author, email: paweenun@gmail.com

## บทนำ

เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นการขยายพันธุ์พืชแบบไม่อาศัยเพศ โดยเป็นการนำชิ้นส่วนของพืช เช่น ยอด ตาข้าง ลำต้น ใบ ก้านใบ เป็นต้น มาเพาะเลี้ยงในอาหารสังเคราะห์ และมีการควบคุมสภาพแวดล้อมให้เหมาะสมทั้งความเข้มแสง ความชื้นและอุณหภูมิ ชิ้นส่วนของพืชที่นำมาเพาะเลี้ยงนั้นสามารถเจริญเติบโตเป็นต้นพืชที่สมบูรณ์ สามารถนำออกปลูกในสภาพธรรมชาติได้ [1] ปัจจุบันเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อมีบทบาทสำคัญในการผลิตพืชเพื่อการขยายพันธุ์และเพื่อการค้า เนื่องจากสามารถผลิตได้ในปริมาณมากในระยะเวลาอันสั้นเมื่อเทียบกับการขยายพันธุ์โดยวิธีอื่น และพืชต้นใหม่ที่ได้ยังมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนต้นพันธุ์เดิมทุกประการ อย่างไรก็ตามสิ่งที่ควรคำนึงเป็นหลักในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อคือจะต้องทำภายใต้สภาวะปลอดเชื้อ (aseptic zone) เพื่อกำจัดหรือลดความเสี่ยงต่อการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่จะเกิดกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากวัสดุเพาะเลี้ยงได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงและเครื่องมือเครื่องใช้ นอกจากนี้ยังอาจพบสาเหตุจากสถานที่ปฏิบัติงานอีกด้วย โดยแบคทีเรียที่พบบ่อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้แก่ *Bacillus subtilis, B. cereus, Escherichia coli, Pseudomonas flurescens, Micrococcus* sp. และรา ได้แก่ *Aspergillus niger, Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum, F. culmorum, Rhizopus nigricans* และ *Saccharomyces* sp. [2] โดยทั่วไปการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) พบว่าให้ประสิทธิภาพดี แต่เนื่องจากมีราคาสูงจึงเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับเกษตรกรรายย่อยหรือผู้ที่เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีงบประมาณไม่มากนักในการลงทุน

ที่ผ่านมาได้มีผู้ศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารเคมีแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ แต่เมื่อนำมาใช้แล้วปรากฏว่าได้ผลที่ไม่แน่นอนทำให้ไม่เป็นที่นิยมใช้ [3] อย่างไรก็ตามปัจจุบันมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ได้แก่ การฆ่าเชื้อด้วยสารเคมี (chemical sterilization) เช่น โซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite, NaClO) [3] คลอรีน (Chlorine, Cl) [4, 5] ซิลเวอร์ไนเตรท (silver nitrate, $AgNO_3$) [6] ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide, $H_2O_2$) [7] การฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งไอน้ำ (steaming sterilization) [8] และการฆ่าเชื้อด้วยไมโครเวฟ (microwave sterilization) [9, 10, 11] ในบรรดาวิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ที่กล่าวมาข้างต้นการใช้สารเคมีและไมโครเวฟนับว่าเป็นตัวเลือกที่น่าสนใจ เนื่องจากสารเคมีโดยเฉพาะโซเดียมไฮโปคลอไรต์จัดว่าหาซื้อได้ง่าย มีราคาถูกไม่เป็นอันตรายหรือเป็นอันตรายน้อยมากต่อคนและชิ้นส่วนพืช มีคุณสมบัติเป็นของเหลวใส สีเหลืองอมเขียว ความเข้มข้นประมาณ 16% โดยน้ำหนัก นิยมใช้เป็นส่วนผสมในน้ำยาซักผ้าขาวโดยมีความเข้มข้น 5.25-6.15% ใช้ในอุตสาหกรรมฟอกกระดาษและสิ่งทอ ใช้กำจัดกลิ่นและฆ่าเชื้อในน้ำ สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สปอร์ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส โดยเฉพาะชนิดที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้ม [12, 13] สำหรับไมโครเวฟซึ่งเป็นคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่สูง ถูกผลิตขึ้นในเตาไมโครเวฟมีกลไกในการทำงานคือ แมกนีตรอน (magnetron) ที่อยู่ภายในเตาเป็นแหล่งกำเนิดพลังงานที่เปลี่ยนคลื่นไฟฟ้าเป็นคลื่นไมโครเวฟ และคลื่นไมโครเวฟนี้จะถูกดูดกลืนโดยอาหารที่ใส่เข้าไปทำให้โมเลกุลของน้ำเกิดการสั่นและเกิดการเสียดสีกันของโมเลกุลจึงเกิดความร้อนและทำให้อุณหภูมิสูงขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งความร้อนที่เกิดขึ้นนี้เพียงพอที่จะทำลายจุลินทรีย์ได้ [14]

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของการใช้สารเคมีชนิดต่างๆ ที่สามารถหาได้ในท้องตลาดมาใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ของวัสดุเพาะเลี้ยง รวมถึงการศึกษาผลของอาหารสูตร MS (Murashige and Skoog) [15] ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยโซเดียมไฮโปคลอไรต์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช โดยศึกษากับพืชตัวอย่าง 3 ชนิด คือ พิทูเนีย (*Petunia hybrida* E. Vilm.) มิ้นต์ (*Mentha arvensis* L.) และคาโมมายล์ (*Matricaria chamomilla* L.) เหตุผลที่เลือกพืชทั้ง 3 ชนิดนี้เนื่องจากพิทูเนียเป็นพืชในอุดมคติ (ideal plant) สำหรับการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเพราะสามารถตอบสนองต่อสภาวะในหลอดทดลองได้เป็นอย่างดี สามารถเลือกชิ้นส่วนที่จะนำมาเพาะเลี้ยงได้อย่างหลากหลายทั้งเมล็ด อับเรณู โปรโตพลาสต์ ลำต้น ใบและยอด โดยพบว่าส่วนของเมล็ดสามารถเพาะเลี้ยงได้ง่าย และส่วนของยอดสามารถเจริญเติบโตได้ดีและสามารถเพาะเลี้ยงได้ตลอดทั้งปี [16] สำหรับมิ้นต์และคาโมมายล์ จัดเป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในการผลิตน้ำมันหอมระเหย (essential oils) ซึ่งสกัดจากส่วนของส่วนดอก ใบ ผล ลำต้น เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ด้านอุตสาหกรรมความงาม เช่น ผลิตน้ำหอม เครื่องสำอาง สบู่ ด้านการบำบัดโรคและเพื่อสุขภาพ เช่น ใช้เป็นส่วนผสมในเวชสำอางเพื่อต้านเชื้อจุลินทรีย์ ใช้นวดหรือสูดดมเพื่อช่วยให้ร่างกายผ่อนคลาย และในด้านอุตสาหกรรมอาหาร [17, 18] เป็นต้น ด้วยประโยชน์ที่หลากหลายนี้ทำให้มูลค่าการส่งออกของพืชดังกล่าวอยู่ในระดับสูง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความเป็นไปได้ในการที่จะขยายพันธุ์พิทูเนียรวมทั้งมิ้นต์และคาร์โมมายล์ซึ่งไม่ใช่พืชเศรษฐกิจของประเทศไทยด้วยเทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายเพื่อลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชให้ต่ำลง โดยไม่ต้องใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำและตู้ย้ายเนื้อเยื่อที่มีราคาแพง เพื่อในอนาคตจะสามารถต่อยอดให้เกษตรกรเพาะปลูกในเชิงพาณิชย์ และสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเศรษฐกิจอื่นๆ เพื่อสร้างอาชีพ สร้างรายได้ อีกทั้งยังสามารถใช้เป็นแนวทางในการเรียนการสอนแก่นักเรียน นักศึกษาต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีทดลอง

### การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีแทนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

ทำการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้ออุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ 1 ชุด ซึ่งประกอบด้วยด้ามมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยง 1 คู่ อย่างละ 1 ชิ้น ด้วยสารเคมี 3 ชนิด ได้แก่ คลอร็อกซ์ (clorox) ซึ่งมี 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% เป็นเวลา 15, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ แอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) 70% เป็นเวลา 10 และ 15 นาที เดทตอล (dettol) ที่ความเข้มข้น 5% และเดทตอลผสมร่วมกับเอทิลแอลกอฮอล์ 70% อัตราส่วน 1:20 เป็นเวลา 10 นาที โดยด้ามมีดผ่าตัดและปากคีบใช้วิธีแช่ในสารละลายเคมี สำหรับจานเพาะเลี้ยงใช้สำลีจุ่มสารละลายเคมีและเช็ดให้ทั่วบริเวณ จากนั้นนำอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อไปผึ่งให้แห้งในที่อับลม โดยมีชุดควบคุมทางบวก (positive control) คืออุปกรณ์ที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และชุดควบคุมทางลบ (negative control) คืออุปกรณ์ที่ไม่ทำการฆ่าเชื้อโดยวิธีใดๆ รวมเป็น 9 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ

ทดสอบประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อโดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่เตรียมโดยวิธีปกติ (autoclave) ในการทดสอบดังนี้ สำหรับด้ามมีดผ่าตัดและปากคีบ ทดสอบโดยทำการแตะอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วลงในอาหารแข็งสูตร MS ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยง เป็นเวลา 3 นาที สำหรับจานเพาะเลี้ยงทดสอบโดย

ทำการเทอาหารแข็งสูตร MS ลงในจานเพาะเลี้ยง ปิดฝา แล้วนำจานเพาะเลี้ยงทั้งหมดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์วันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง โดยขั้นตอนการทดสอบประสิทธิภาพนี้ ทำภายในตู้ปลอดเชื้อ

**การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟ**

**การเตรียมอาหารสังเคราะห์สูตร MS**

เตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยชั่งสารเคมีตามส่วนประกอบของอาหารสังเคราะห์สูตร MS [15] โดยเตรียมเป็นสารละลายเข้มข้น (stock solution) ที่ไม่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโตใดๆ เติมน้ำตาลซูโครสลงไปในอาหารสังเคราะห์ 30 กรัม/ลิตร ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นตามต้องการ ปรับความเป็นกรดเป็นด่างของอาหารให้มีค่า 5.-5.8 และเติมผงวุ้น 7 กรัม/ลิตร ต้มวุ้นให้ละลายและรอให้อาหารอุ่น เทอาหารที่เตรียมลงในขวดเพาะเลี้ยงขวดเนื้อเยื่อขนาด 4 ออนซ์ ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ขวด จากนั้นนำไปทำการศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารที่เหมาะสม

**การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ**

การฆ่าเชื้ออาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ปริมาตร 20 มิลลิลิตร/ขวด ประกอบด้วย ชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ ซึ่งมี 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ โดยใช้ปริมาตร 50, 100, 150, 200 และ 250 ไมโครลิตร/ขวด โดยเติมในขณะที่อาหารยังอุ่น และชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ ที่กำลังไฟ 160, 320, 480, 640 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที จำนวน 5 ขวด/ครั้ง โดยมีชุดควบคุมทางบวก (positive control) คืออาหารที่นึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และชุดควบคุมทางลบ (negative control) คืออาหารที่ไม่ทำการฆ่าเชื้อโดยวิธีใดๆ รวมเป็น 12 ชุดการทดลองๆ ละ 10 ซ้ำ จากนั้นนำขวดอาหารทั้งหมดไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง บันทึกจำนวนการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง

**การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช**

**การเตรียมตัวอย่างพืชในการทดลอง**

นำเมล็ดพิทูเนีย (*P. hybrida* E. Vilm รุ่น F1 ของบริษัท Gartenland GmbH Aschersleben, Denmark) มิ้นต์ (*M. arvensis* L. ของบริษัท Suttons Seeds, England) และคาโมมายล์ (*M. chamomilla* L. ของบริษัท Daiso, Japan) มาทำการฟอกด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ที่ผสมสารลดแรงตึงผิว (tween 20) 1-2 หยด โดยฟอกครั้งที่ 1 ที่ความเข้มข้น 10% และฟอกครั้งที่ 2 ที่ความเข้มข้น 5% โดยใช้เวลาในการฟอกครั้งละ 5 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS และนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิห้อง $25 \pm 2$ องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 45 วัน จึงนำไปทดสอบในขั้นตอนต่อไป

**การทดลองเพาะเลี้ยง**

คัดเลือกอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟที่ดีที่สุด ซึ่งสามารถปลอดเชื้อจุลินทรีย์ได้นานถึง 28 วัน มาทำการเพาะเลี้ยงพิทูเนีย มิ้นต์และคาโมมายล์ โดยพิทูเนียและมิ้นต์ใช้ชิ้นส่วนลำต้นความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ส่วนคาโมมายล์ใช้ชิ้นส่วนลำต้นความยาว 0.5 เซนติเมตร ที่มีรากติดอยู่ด้วย จำนวน 1 ชิ้น/ขวด โดยใช้อาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำเป็นชุดควบคุม ทำการทดลอง 10 ซ้ำ/ชุดการทดลอง แล้วนำไปเพาะเลี้ยงไว้ในอุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน บันทึกจำนวนยอด จำนวนใบและความสูงของลำต้นทุกๆ สัปดาห์ เป็นเวลา 4 สัปดาห์

**การศึกษาบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ**

**การเตรียมบริเวณปฏิบัติงาน**

เตรียมบริเวณปฏิบัติงานที่แตกต่างกัน 2 บริเวณ คือ ในตู้ปลาซึ่งถูกดัดแปลงเป็นตู้ถ่ายเนื้อเยื่อและบนโต๊ะปฏิบัติการในห้องที่สะอาด ไม่มีลมพัด ซึ่งทั้งสองบริเวณนี้จะมีการเตรียมให้อยู่ในสภาวะปลอดเชื้อโดยทำการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ให้ครอบคลุมบริเวณที่จะปฏิบัติงานก่อนเริ่มทำการทดลอง และใช้ผ้าที่สะอาดหรือกระดาษทิชชูเช็ด และในขณะทำการทดลองจะมีการพ่นแอลกอฮอล์เป็นระยะๆ

**การทดลองเพาะเลี้ยง**

ตัดชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียความยาว 2 เซนติเมตร มาเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ โดยทำการทดลอง 10 ซ้ำ/ชุดการทดลอง โดยให้การปฏิบัติงานในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อเป็นชุดควบคุม แล้วนำไปเก็บไว้ในอุณหภูมิห้อง 25 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงที่ความเข้มแสง 35 ไมโครโมล/ตารางเมตร/วินาที เป็นเวลา 16 ชั่วโมง/วัน บันทึกจำนวนการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อวันที่ 2, 7, 14, 21 และ 28 ของการทดลอง

**การวิเคราะห์ทางสถิติ (statistical analysis)**

การทดลองนี้ใช้แผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) โดยแสดงผลการวิจัยเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน และวิเคราะห์ความแปรปรวนทางเดียว (one-way ANOVA) จากนั้นทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's multiple range test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

## ผลการทดลอง

**การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีแทนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ**

จากการศึกษาพบว่าด้ามมีดผ่าตัด ปากคีบ และจานเพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะเริ่มเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในวันที่ 2 ของการทดลอง และเกิดการปนเปื้อนทั้งหมดภายหลังการทดลองเป็นเวลา 7 วัน ซึ่งการปนเปื้อนที่พบมีทั้งเชื้อราและแบคทีเรีย ในขณะที่อุปกรณ์เพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์เกิดการปนเปื้อนน้อยกว่าชุดการทดลองที่ฆ่าเชื้อโดยเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเดทตอล โดย

คลอร็อกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 10%, 15% และ 20% เป็นเวลา 15, 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ด้ามมีดผ่าตัดเกิดการปนเปื้อน 30%, 20% และ 20% ตามลำดับ ปากคีบเกิดการปนเปื้อน 40%, 20% และ 20% ตามลำดับ และจานเพาะเลี้ยงเกิดการปนเปื้อน 20% ในทุกระดับความเข้มข้น (ตารางที่ 1) โดยการปนเปื้อนของอุปกรณ์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์นี้ เริ่มขึ้นหลังจากวันที่ 21 ของการทดลอง

**ตารางที่ 1** การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (%) ในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารเคมีที่แตกต่างกัน

| ชุดการทดลอง | การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อหลังครบ 28 วัน | | | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|
| | ด้ามมีดผ่าตัด | | ปากคีบ | | จานเพาะเลี้ยง | |
| | จำนวน (ชิ้น) | % | จำนวน (ชิ้น) | % | จำนวน (ชิ้น) | % |
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | 1 | 10 | 2 | 20 | 0 | 0 |
| ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |
| คลอร็อกซ์ 10%, 15 นาที | 3 | 30 | 4 | 40 | 2 | 20 |
| คลอร็อกซ์ 15%, 10 นาที | 2 | 20 | 2 | 20 | 2 | 20 |
| คลอร็อกซ์ 20%, 5 นาที | 2 | 20 | 2 | 20 | 2 | 20 |
| เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 10 นาที | 10 | 100 | 4 | 80 | 10 | 100 |
| เอทิลแอลกอฮอล์ 70%, 15 นาที | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |
| เดทตอล 5%, 10 นาที | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |
| เดทตอล+เอทิลแอลกอฮอล์ 70% (1:20), 10 นาที | 10 | 100 | 10 | 100 | 10 | 100 |

**การศึกษาวิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS**

จากการศึกษาพบว่าอาหารแข็งสูตร MS ที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจะเริ่มเกิดการปนเปื้อนในวันที่ 2 ของการทดลอง และเกิดการปนเปื้อนทั้งหมดภายหลังการทดลองเป็นเวลา 5 วัน ซึ่งลักษณะการปนเปื้อนที่พบส่วนใหญ่เป็นแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารเพาะเลี้ยง ในขณะที่ชุดควบคุมซึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำไม่พบการปนเปื้อนของอาหารตลอดการทดลอง 28 วัน เช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ปริมาตร 50-250 ไมโครลิตร ก็ไม่พบการปนเปื้อนของอาหารในทุกชุดการทดลอง สำหรับการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ พบว่าที่กำลังไฟ 620 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที สามารถทำให้อาหารเพาะเลี้ยงปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ได้ 90% และ 100% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

**การศึกษาประสิทธิภาพของอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟต่อการเจริญเติบโตของพืช**

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของพิทูเนีย มิ้นต์และคาโมมายล์บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยคลอร็อกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครลิตร และอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ (รูปที่ 1) พบว่าจำนวนยอด/ลำต้น ใบและความสูงของลำต้นพิทูเนียและคาโมมายล์ไม่มีความแตกต่างกัน (ตารางที่ 3 และ 5) สำหรับมิ้นต์พบว่ามีจำนวนยอด/ลำต้นเท่านั้นที่ไม่แตกต่างกัน แต่จำนวนใบและความสูงของลำต้นที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟมีค่าสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยจำนวนใบและความสูงของลำต้นเท่ากับ 13.90 ± 2.66 และ 0.96 ± 0.26 ตามลำดับ (ตารางที่ 4) เมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมจะเห็นว่าการเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นคาโมมายล์ทั้งบนอาหารที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยคลอร็อกซ์และอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟให้ผลดีเท่ากับชุดควบคุมซึ่งเป็นอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ

**ตารางที่ 2** การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ (%) ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS หลังจากทำการฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟ

| ชุดการทดลอง | การปนเปื้อนจากเชื้อจุลินทรีย์ของอาหารเพาะเลี้ยง | |
|---|---|---|
| | เนื้อเยื่อสูตร MS หลังครบ 28 วัน | |
| | จำนวน(ขวด) | % |
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | 0 | 0 |
| ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ | 10 | 100 |
| คลอร็อกซ์ (μL) | | |
| 50 | 0 | 0 |
| 100 | 0 | 0 |
| 150 | 0 | 0 |
| 200 | 0 | 0 |
| 250 | 0 | 0 |
| เตาไมโครเวฟ (W), 3 นาที | | |
| 160 | 10 | 100 |
| 320 | 10 | 100 |
| 480 | 8 | 80 |
| 620 | 1 | 10 |
| 800 | 0 | 0 |

**ตารางที่ 3** จำนวนยอด/ลำต้น ใบ และความสูงของลำต้นของพิทูเนีย (*P. hybrida* E. Vilm.) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟ

| ชุดการทดลอง | จำนวนยอด/ลำต้น | จำนวนใบ | ความสูงของลำต้น (ซม.) |
|---|---|---|---|
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | $1.80 \pm 0.24^{a}$ | $13.60 \pm 1.25^{a}$ | $2.38 \pm 0.39^{a}$ |
| คลอร็อกซ์ | $1.20 \pm 1.33^{b}$ | $10.00 \pm 0.61^{b}$ | $2.38 \pm 0.36^{a}$ |
| เตาไมโครเวฟ | $1.20 \pm 1.33^{b}$ | $10.07 \pm 0.54^{b}$ | $2.29 \pm 0.43^{a}$ |

*จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย DMRT

**ตารางที่ 4** จำนวนยอด/ลำต้น ใบ และความสูงของลำต้นของมิ้นต์ *(M. arvensis* L.) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟ

| ชุดการทดลอง | จำนวนยอด/ลำต้น | จำนวนใบ | ความสูงของลำต้น (ซม.) |
|---|---|---|---|
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | $3.80 \pm 0.42^{a}$ | $21.40 \pm 4.65^{a}$ | $1.45 \pm 0.21^{a}$ |
| คลอร็อกซ์ | $2.80 \pm 0.99^{b}$ | $9.30 \pm 1.33^{b}$ | $0.61 \pm 0.17^{b}$ |
| เตาไมโครเวฟ | $3.40 \pm 0.84^{ab}$ | $13.90 \pm 2.66^{c}$ | $0.96 \pm 0.26^{c}$ |

*จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย DMRT

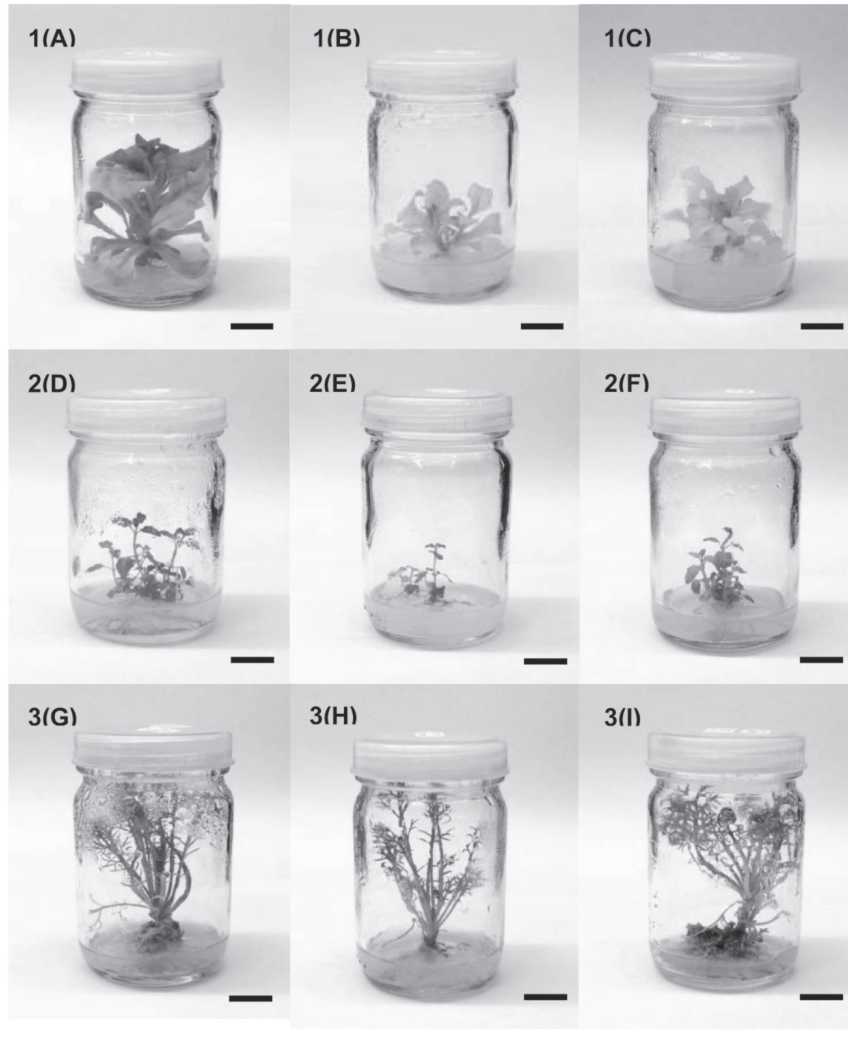
**ตารางที่ 5** จำนวนยอด/ลำต้น ใบ และความสูงของลำต้นของคาโมมายล์ (*M. chamomilla* L.) บนอาหารเพาะเลี้ยงสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยสารละลายคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟ

| ชุดการทดลอง | จำนวนยอด/ลำต้น | จำนวนใบ | ความสูงของลำต้น (ซม.) |
|---|---|---|---|
| หม้อนึ่งความดันไอน้ำ | $1.00 \pm 0.00^{a}$ | $11.4 \pm 0.70^{a}$ | $0.51 \pm 0.35^{a}$ |
| คลอร็อกซ์ | $1.00 \pm 0.00^{a}$ | $11.1 \pm 0.63^{a}$ | $0.50 \pm 0.00^{a}$ |
| เตาไมโครเวฟ | $1.00 \pm 0.00^{a}$ | $10.7 \pm 0.68^{a}$ | $0.50 \pm 0.00^{a}$ |

*จากการทดลอง 10 ซ้ำ, ตัวเลข (ค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน) ในคอลัมน์เดียวกันที่ตามด้วยอักษรเหมือนกัน ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญที่ $P < 0.05$ วิเคราะห์โดย DMRT

**การศึกษาบริเวณปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ**

จากการศึกษาพบว่าการย้ายชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียไปยังอาหารเพาะเลี้ยงใหม่ทั้งในตู้ปลาและบนโต๊ะปฏิบัติการในห้องที่สะอาด ไม่มีลมพัด ไม่ทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตลอดการทดลอง 28 วัน เช่นเดียวกับชุดควบคุมซึ่งทำภายในตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ




**รูปที่ 1** การเจริญของยอด ใบและลำต้นของชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนีย (1) มิ้นต์ (2) และคาโมมายล์ (3) ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (ชุดควบคุม) (A, D, G) อาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์ 50 ไมโครลิตร (B, E, H) และอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที (C, F, I) และเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ (สเกล เท่ากับ 0.5 เซนติเมตร)

## สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

วิธีการฆ่าเชื้อในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยคลอร็อกซ์ที่ระดับความเข้มข้น 15% และ 20% ระยะเวลา 10 และ 5 นาที ตามลำดับ ให้ผลในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี โดยสามารถทำให้ปราศจากเชื้อได้ 100% นานถึง 21 วัน หลังจากนั้นจึงเริ่มเกิดการปนเปื้อน แสดงให้เห็นว่าคลอร็อกซ์มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีกว่าเอทิลแอลกอฮอล์ 70% และเดทตอลที่ส่วนใหญ่เริ่มเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตั้งแต่วันที่ 2 และเกิดการปนเปื้อน 100% เมื่อครบ 28 วัน ทั้งนี้เนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของสารเคมีทั้ง 3 ชนิดที่แตกต่างกัน โดยคลอร็อกซ์ที่มีส่วนผสมของโซเดียมไฮโปคลอไรต์เมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้กรดไฮโปคลอรัส ออกฤทธิ์เข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนภายในเซลล์ของเชื้อจุลินทรีย์โดยการออกซิไดซ์หมู่ซัลฟ์ไฮดริล (sulfhydryl group, -SH) ทำให้โปรตีนถูกทำลายและตกตะกอน สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส รวมทั้งสปอร์ [13, 19] แตกต่างจากเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ที่ออกฤทธิ์โดยการละลายไขมันที่เยื่อหุ้มเซลล์ และทำให้โปรตีนของจุลินทรีย์ตกตะกอน สามารถฆ่าแบคทีเรียได้ทั้งแกรมบวกและแกรมลบ รวมทั้งเชื้อวัณโรค รา และไวรัสบางชนิด แต่ไม่มีผลต่อสปอร์ของจุลินทรีย์ [19, 20] ส่วนเดทตอลเป็นสารประกอบในกลุ่มฟีนอล (phenols) ที่เรียกว่าคลอโรไซลีนอล (Chloroxylenol) ออกฤทธิ์โดยไปมีผลรบกวนการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ให้ผิดปกติ สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแกรมลบ โดยเฉพาะ สแตฟิโลค็อกคัส ออเรียส (*Staphylococcus aureus*) แต่ไม่ค่อยมีผลต่อไวรัสหรือสปอร์ [21] จะเห็นได้ว่าคลอร็อกซ์มีประสิทธิภาพดีที่สุดในสารเคมีทั้ง 3 ชนิด เนื่องจากสามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ครอบคลุมที่สุด สามารถฆ่าสปอร์ได้ ซึ่งสารเคมีอีก 2 ชนิดที่เหลือไม่สามารถทำได้ สอดคล้องกับงานวิจัยของ Arirachakaran และคณะ [22] ที่ทดสอบฤทธิ์การทำลายสปอร์ของสารฆ่าเชื้อที่ใช้งานในคลีนิคทันตกรรม ได้ผลว่าโซเดียมไฮโปคลอไรต์ที่ระดับความเข้มข้น 0.25% สามารถทำลายสปอร์ของเบซิลัส อโทรเพียส *(Bacillus atropheas)* และจีโอเบซิลัส สตีโรเทอร์โมฟิลัส *(Geobacillus stearothermophilus)* ได้ จากผลทดลองในงานวิจัยครั้งนี้แม้ว่าสารเคมีต่างๆ จะมีประสิทธิภาพในการลดการปนเปื้อนไม่ถึง 100% แต่ในการปฏิบัติงานเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อปากคีบและมีดผ่าตัดต้องมีการฆ่าเชื้อก่อนนำไปใช้งานโดยนำไปผ่านเปลวไฟจากตะเกียงแอลกอฮอล์ร่วมด้วย ซึ่งสามารถช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ได้

วิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยคลอร็อกซ์ซึ่งมี 5.25% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ พบว่า คลอร็อกซ์ปริมาตร 50-250 ไมโครลิตร สามารถทำให้อาหารปราศจากเชื้อได้ 100% สอดคล้องกับงานวิจัยของ Deein และคณะ [23] รายงานว่า 6% โซเดียมไฮโปคลอไรต์ปริมาตรที่เหมาะสม คือระหว่าง 36-396 ไมโครลิตร/อาหาร 20 มิลลิลิตร มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างสมบูรณ์ เช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ ที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที ก็ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ตลอดการทดลอง 28 วัน แต่ปริมาตรอาหารในขวดเพาะเลี้ยงลดลงเล็กน้อย ในขณะที่กำลังไฟต่ำกว่า 800 วัตต์ เกิดการปนเปื้อน 80-100% ผลการทดลองดังกล่าวแตกต่างกับงานวิจัยของ กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์ [8] รายงานว่าการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารด้วยเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 600 และ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที สามารถทำให้อาหารปราศจากเชื้อได้ 93.30% และที่กำลังไฟ 360 วัตต์ ทำให้อาหารปราศจากเชื้อ 76.60% สาเหตุน่าจะเกิดจากการเดือดของอาหารที่แปรผันกับกำลังไฟ โดยที่กำลังไฟต่ำอาหารจะใช้เวลาในการเดือดนานกว่าที่กำลังไฟสูง ซึ่งอาหาร

อาจมีความร้อนเพิ่มขึ้นแต่ไม่ถึงจุดเดือดหรือถึงจุดเดือดเพียงชั่วครู่จึงทำให้ไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการฆ่าเชื้อโดยเฉพาะสปอร์ของเชื้อราบางชนิด นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับจำนวนขวดอาหารที่นำไปฆ่าเชื้อ ถ้าหากมีจำนวนมากจะทำให้อาหารแต่ละขวดได้รับความร้อนไม่เท่ากันทำให้บางขวดเกิดการปนเปื้อน แม้ว่าจะจัดวางขวดอาหารให้มีระยะห่างเท่ากันๆ แล้วก็ตาม

การเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นของพิทูเนีย มิ้นต์และคาโมมายล์ บนอาหารแข็งสูตร MS ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยคลอร็อกซ์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร และเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟ 800 วัตต์ เป็นเวลา 3 นาที เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่าจำนวนยอด จำนวนใบและความสูงของลำต้นพิทูเนียและคาโมมายล์ จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่มีความแตกต่างกัน แต่เมื่อพิจารณาเทียบกับอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ พิทูเนียที่เพาะบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์และเตาไมโครเวฟจะมีลักษณะใบที่ซีดเหลืองและมีจำนวนน้อยกว่าอย่างเห็นได้ชัด เป็นไปได้ว่าคลอร็อกซ์ที่ใช้มีความเข้มข้นสูงเกินไปอาจมีผลยับยั้งหรือทำลายการเจริญเนื้อเยื่อพืช สอดคล้องกับงานวิจัยของ Yildiz และ Er [24] ได้ทำการศึกษาผลกระทบของความเข้มข้นสารละลายโซเดียมไฮโปคลอไรต์ในการเพาะเลี้ยงปอ *(Linum usitatissimum)* ในหลอดทดลอง พบว่าการงอกของเมล็ด การเจริญเติบโตและการเกิดยอดได้รับผลกระทบทางลบจากการเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไฮโปคลอไรต์ นอกจากนี้ความร้อนของเตาไมโครเวฟที่กำลังไฟสูงอาจทำให้สารอาหารบางชนิดสลายตัวได้ ส่วนคาโมมายล์นั้นไม่มีความแตกต่างกันในทุกชุดการทดลอง สำหรับมิ้นต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยสารละลายคลอร็อกซ์ จำนวนยอดที่เกิดขึ้นไม่มีความแตกต่างกับการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟ แต่จำนวนใบและความสูงของลำต้น จากการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ทั้งนี้มิ้นต์ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟให้ผลที่ดีกว่าการเพาะเลี้ยงบนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอร็อกซ์

จากการศึกษาสถานที่ปฏิบัติงานในการย้ายเนื้อเยื่อ โดยเพาะเลี้ยงชิ้นส่วนลำต้นพิทูเนียในตู้ปลาและบนโต๊ะปฏิบัติการในห้องที่สะอาด ไม่มีลมพัด พบว่าไม่เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ตลอดการทดลอง แสดงให้เห็นว่าการฉีดพ่นเอทิลแอลกอฮอล์ 70% ทำให้ตู้ปลาหรือโต๊ะปฏิบัติการในห้องที่อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ สามารถทดแทนการปฏิบัติงานในตู้ย้ายเนื้อเยื่อได้

จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในวัสดุเพาะเลี้ยงไม่ว่าจะด้วยคลอร็อกซ์หรือเตาไมโครเวฟ หากใช้ปริมาตรและเวลาที่เหมาะสม สามารถทดแทนการฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำได้ ซึ่งทำให้ประหยัดค่าใช้จ่ายด้านอุปกรณ์และเวลาในการเตรียม รวมถึงการปฏิบัติงานในตู้ปลาและห้องที่สะอาดโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์ 70% เป็นสารฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ เป็นการลดข้อจำกัดในด้านสถานที่ปฏิบัติงานโดยไม่จำเป็นต้องใช้ตู้ถ่ายเนื้อเยื่อ นับว่าเป็นประโยชน์อย่างยิ่งในการนำไปเผยแพร่ความรู้ให้แก่เกษตรกร ใช้ในการเรียนการสอนแก่นักเรียน นักศึกษาและผู้สนใจทั่วไป ทั้งนี้ความสำเร็จขึ้นอยู่กับวิธีปฏิบัติที่ต้องเข้าใจหลักการและสามารถคิดดัดแปลงวิธีการต่างๆ ได้อย่างเหมาะสม

จากการศึกษาค้นคว้าและวิจัยในครั้งนี้ ผู้วิจัยมีข้อเสนอแนะเรื่องการฆ่าเชื้อด้วยเตาไมโครเวฟอาจมีปัญหาในทางปฏิบัติ กรณีที่มีขวดอาหารเป็นจำนวนมาก ดังนั้นควรมีการวางแผนในการเตรียมอาหารให้เหมาะสมสำหรับการฆ่าเชื้อในแต่ละครั้ง รวมถึงรูปแบบการจัดเรียงขวดอาหารควรจัดเรียงให้แต่ละขวดห่างกันด้วยระยะที่สม่ำเสมอเพื่อให้ได้รับความร้อนในการฆ่าเชื้ออย่างทั่วถึง นอกจากนี้การใช้สารเคมีหรือเตาไมโครเวฟเพื่อฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออาจมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของพืชซึ่งเป็นปัจจัย

สำคัญในการเพาะเนื้อเยื่อ ดังนั้นหากเกษตรกรหรือผู้ที่สนใจจะนำวิธีการดังกล่าวไปใช้ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในพืชที่ต้องการว่าสามารถใช้วิธีฆ่าเชื้อด้วยวิธีดังกล่าวได้หรือไม่ หรือศึกษาระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงให้นานขึ้น หลังจากนั้นเมื่อย้ายพืชออกปลูกแล้วควรทำการศึกษาการเจริญเติบโตของต้นพืชว่าเป็นอย่างไรเมื่อเทียบกับต้นพืชชนิดเดียวกันที่ปลูกด้วยวิธีดั้งเดิม

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณบัณฑิตศึกษา มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สำหรับทุนการศึกษาเพื่อทำปริญญานิพนธ์ ประจำปีงบประมาณ 2559

## เอกสารอ้างอิง

1. รังสฤษดิ์ กาวีต๊ะ. 2541. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช: หลักการคิดและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 1.
2. Odutayo, O.I., Amusa, N.A., Okutade, O.O., and Ogunsanwo, Y.R. 2007. Determination of the Sources of Microbial Contaminations of Cultured Plant Tissues. *Plant Pathology Journal.* 6(1):77-81.
3. Teixeira, S.L., Ribeiro, J.M., and Teixeira, M.T. 2006. Influence of NaClO on Nutrient Medium Sterilization and on Pineapple (*Ananas comosus* cv. Smooth cayenne) Behavior. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 86: 375-378.
4. Yanagawa, T., Tanaka, R. and Funai, R. 2007. Simple Micropropagation of Ornamentals by Direct Application of Chlorine Disinfectants without Equipment. *Acta Horticulturae.* 64:289-298.
5. King, C.H., Shotts, E.B.Jr., Wooley, R.E. and Porter, K.G. 1988. Survival of Coliforms and Bacterial Pathogens within Protozoa During Chlorination. *Applied and Environmental Microbiology.* 54(12): 3023-33.
6. Kubota, C. and Tadokoro, N. 1999. Control of Microbial Contamination for Large-Scale Photoautotrophic Micropropagation. *In Vitro Cellular and Developmental Biology.* 35: 296-298.
7. Curvetto, N., Marinangeli, P., and Mockel, G. 2006. Hydrogen Peroxide in Micropropagation of Lilium. A Comparison with a Traditional Methodology. *Biocell.* 30: 497-500.
8. กิตติศักดิ์ โชติกเดชาณรงค์. 2553. ผลของเทคนิคการนึ่งและไมโครเวฟต่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. ใน: การประชุมทางวิชาการ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 53. 3-6 กุมพาพันธ์ 2558. กรุงเทพมหานคร. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. หน้า 305-312.
9. Teixeira, S.L., and Torres, A.C. 1998. Plant Tissue Culture Laboratory Organization. Brasélia. Embrapa p. 71-86.

10. Tisserat, B., Jones, D. and Galletta, P.D. 1992. Microwave Sterilization of Plant Tissue Culture Media. *HortScience.* 27(4): 358-361.
11. Fuller, M.P. and Pizzey, T. 2001. Teaching Fast and Reliable Tissue Culture Using PPM and Brassicas. *International Society for Horticultural Science. Acta Horticulturae.* 560: 567-570.
12. Lantagne, D.S, Blount, B. C., Cardinali, F. and R. Quick. 2008. Disinfection by-Product Formation and Mitigation Strategies in Point-of-use Chlorination of Turbid and Non-turbid Waters in Western Kenya. *Journal of Water and Health.* 6(1): 67-82.
13. Bennett, E.J., Dolin, R. and Blaser, J.M. 2015. Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th Ed. Canada. Elsevier Inc. p. 3297-3299.
14. World Health Organization. 2005. Electromagnetic Fields & Public Health: Microwave Ovens. Available from URL: http://www.who.int/peh-emf/publications/facts/info_microwaves/en/. 24 July 2016.
15. Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Culture. *Plant Physiology.* 15(3): 473-497.
16. Preece, J.E. 1999. Shoot Organogenesis from Petunia Leaves. 2rd Ed. Boca Raton. CRC press. 167-171.
17. Kumar, S., Gupta, S.K., Bhat, S. and Tuli, R. 1999. Tissue Culture Process for Producing a Large Number of Viable Mint Plants *In vitro* from Internodal Segments. Available from URL: http://www.google.com/patents/US5898001. 25 July 2016.
18. Singh, O., Khanam, Z., Misra, N. and Srivastava, M.K. 2011. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): An overview. *Pharmacognosy Reviews.* 5(9): 82-95.
19. Healthcare Infection Control Practices Advisory Committee (HICPAC). 2009. Guideline for Disinfection and Sterilization in Healthcare Facilities, 2008. Available from URL: http://www.cdc.gov/hicpac/Disinfection_Sterilization/6_0disinfection.html. 5 May 2016.
20. McDonnell, G. and Russell, A.D. 1999. Antiseptics and Disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews.* 12(1): 149-179.
21. ณัฐสิทธิ์ ตันสกุล. 2016. สารฆ่าเชื้อ (Antiseptic and Disinfectant). ได้จาก https://ic2topsecret.files.wordpress.com/2011/01/antiseptic_and_disinfectant.pdf. 5 พฤษภาคม 2559.
22. Arirachakaran, P., Sinheng, W., Theparee, T. and Arirachakaran, A.A. 2008. Sporicidal Effects of Common Disinfectants and Their Practical Application in Dental Practice in Thailand. *Chulalongkorn University Dental Journal.* 31: 11-8.
23. Deein, W., Thepsithar, C. and Thongpukdee A. 2013. *In vitro* Culture Medium Sterilization by Chemical and Essential Oils without Autoclaving and Growth of Chrysanthemum Nodes. *World Academy of Science, Engineering and Technology.* 7: 1041-1044.

24. Yildiz, M. and Er, C. 2002. The Effect of Sodium Hypochlorite Solutions on *In vitro* Seedling Growth and Shoot Regeneration of Flax (*Linum usitatissimum*). *Naturwissenschaften.* 89(6): 259-61.

*ได้รับบทความวันที่ 27 พฤษภาคม 2559*
*ยอมรับตีพิมพ์วันที่ 27 กรกฎาคม 2559*