วารสารวิจัยและส่งเสริมวิชาการเกษตร 42(1): 58-68

การศึกษาการใช้สารเคมีเพื่อยับยังจุลินทรีย์ปนเปื้อนและผลต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออ้อยในระบบเปิด

Study of the Use of Chemicals to Reduce Microbial Contamination and Its Effect on the Growth of Sugarcane Tissue in an Open System

จิราพร พรมขุนทด[1] นัฏฐา นิตย์วัฒนกุล[1] กาญจนา กิระศักดิ์[3] ภาคภูมิ ถิ่นคำ[3]
โสภณ วงศ์แก้ว[1] และอารักษ์ ธีรอำพน[1,2*]

Jiraporn Promkunthod[1], Nattha Nitwatthanakul[1], Kanjana Kirasak[3], Parkpoom Thinkum[3]
Sophon Wongkaew[1] and Arak Tira-umphon[1,2*]

[1]สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตพืช สำนักวิชาเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000
[2]ศูนย์วิจัยนวัตกรรมยกระดับคุณภาพผลิตผลทางการเกษตรเพื่ออุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี นครราชสีมา 30000
[3]สถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ขอนแก่น 40000

[1]School of Crop Production Technology, Institute of Agricultural Technology, Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, Thailand 30000
[2]Center of Excellence in Agricultural Product Innovation, Suranaree University of Technology Nakhon Ratchasima, Thailand 30000
[3]Agronomy and Renewable Energy Crops Research Institute (FCRI), Khon Kaen Field Crops Research Center Khon Kaen, Thailand 40000
*Corresponding author:arak@sut.ac.th

Received: *September 23, 2023*
Revised: *October 22, 2024*
Accepted: *December 06, 2024*

Abstract

This study aims to determine the type and concentration of disinfectants that inhibit microbial growth in laboratory conditions while being suitable for sugarcane tissue culture. In the initial step, microorganisms contaminating the Murashige and Skoog (MS) in an open laboratory system (November 2020) were screened. Eight fungal isolates were found, including *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Curvularia* sp. and a yeast, as well as two unknown species lacking identifiable fruiting structures. Five bacterial isolates were also identified, consisting of one gram-positive and four gram-negative bacteria. Subsequently, the type and concentration of disinfectants were tested to control each screened microbial contaminant in the MS medium. It was found that sodium hypochlorite at concentrations of 0.17, 0.25, and 0.33 ml/L effectively controlled microbial contamination. In the sugarcane tissue culture experiment using non-autoclaved MS medium supplemented with 1 mg/L kinetin, 150 mg/L citric acid, and

sodium hypochlorite at concentrations of 0.20, 0.25, and 0.33 ml/L, good growth and development of sugarcane tissue were observed, with no significant differences compared to traditional tissue culture methods.

Keywords: sugarcane, antimicrobial substances, low-cost tissue culture, open tissue culture

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อต่อการยับยังเชื้อจุลินทรีย์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ และเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออ้อย โดยในขั้นตอนแรกทำการคัดกรองหาเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ในสภาพห้องปฏิบัติการระบบเปิด (เดือนพฤศจิกายน 2563) พบเชื้อรา 8 ไอโซเลท ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Curvularia* sp., ยีสต์และอีก 2 ไอโซเลทไม่ทราบชื่อ เนื่องจากไม่สร้างหน่วยขยายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 1 ไอโซเลท แบคทีเรียแกรมลบ 4 ไอโซเลท จากนั้นทดลองหาชนิดของสารฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อควบคุมจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่คัดกรองได้จากการปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS พบว่า Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.17, 0.25 และ 0.33 มิลลิลิตร/ลิตร สามารถควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ดี ในการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยในอาหารสูตร MS ที่ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ เติมไคเนติน 1 มิลลิกรัม/ลิตร กรดซิตริก 150 มิลลิกรัม/ลิตร ร่วมกับสารเคมี Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มิลลิลิตร/ลิตร พบการเจริญเติบโตและการพัฒนาของเนื้อเยื่ออ้อยที่ดี และไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม

คำสำคัญ: อ้อย สารควบคุมจุลินทรีย์ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อต้นทุนต่ำ การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบระบบเปิด

คำนำ

อ้อย (*Saccharum officinarum* L.) เป็นพืชเศรษฐกิจที่สำคัญในอุตสาหกรรมอ้อยและน้ำตาลของประเทศไทย ปัญหาสำคัญของการผลิตอ้อย ได้แก่ โรคที่ถ่ายทอดผ่านทางท่อนพันธุ์ เช่น โรคใบขาว โรคกอตะไคร้ โรคเหี่ยวเน่าแดง และโรคแส้ดำ เป็นต้น การใช้ท่อนพันธุ์ที่ปราศจากเชื้อสาเหตุโรคเป็นการลดแหล่งเชื้อเริ่มต้นของการแพร่ระบาดของโรคพืชในพื้นที่เพาะปลูก วิธีการป้องกันกำจัดเชื้อสาเหตุโรคที่ติดมากับท่อนพันธุ์อ้อย ได้แก่ การแช่ท่อนพันธุ์ในน้ำร้อนและสารเคมีป้องกันกำจัดโรคพืช ซึ่งวิธีการดังกล่าวยังไม่สามารถกำจัดเชื้อสาเหตุโรคที่อาศัยอยู่ในท่อนพันธุ์ให้หมดไปได้ (Kaewpratumrussamee *et al*., 2015) นอกจากนี้ยังส่งผลให้เปอร์เซ็นต์การงอกของท่อนพันธุ์ลดลงอีกด้วย (Kaewmanee and Hanboonsong, 2011) ปัจจุบันยังไม่มียารักษาและไม่มีพันธุ์อ้อยที่ต้านทานโรคใบขาว วิธีที่ดีที่สุด คือ ใช้ท่อนพันธุ์สะอาด ที่จะสามารถช่วยลดอัตราการเกิดโรคใบขาวอ้อยได้ การผลิตอ้อยโดยใช้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชในสภาพปลอดเชื้อ เพื่อนำมาทำเป็นแปลงอ้อยพันธุ์ เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่นำมาใช้ในการผลิตอ้อยปลอดโรค ปัญหาสำคัญในกระบวนการเพาะเลี้ยง

เนื้อเยื่อพืช คือ การปนเปื้อนเชื้อราและแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (Leifert *et al*., 1994) เพื่อขจัดหรือหลีกเลี่ยงการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จำเป็นต้องหาวิธีการฆ่าเชื้ออย่างมีประสิทธิภาพ ประการแรก ห้องปฏิบัติการต้องประเมินสถานภาพการปนเปื้อนและปฏิบัติงานในห้องปฏิบัติการเพื่อหลีกเลี่ยงหรือขจัดสิ่งปนเปื้อน (Reed and Tanprasert, 1995) แล้วฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ (Epiphytic และ endophytic) ในพืชด้วยสารปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตาม เทคโนโลยีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิมมีต้นทุนเริ่มต้นค่อนข้างสูง โดยเฉพาะเครื่องมือและอุปกรณ์ เช่น ตู้อบลมร้อนในการฆ่าเชื้ออุปกรณ์ และใช้หม้อนึ่งความดันสูง (Autoclave) เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Chotikadachanarong, 2015) ซึ่งปัจจุบันมีงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการลดต้นทุนในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ เช่น การใช้สารเคมี Sodium hypochlorite, Mercury bichloride, Ethanol, Hydrogen peroxide, Bromine water, Silver nitrate และ Antibiotics สำหรับการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (Sawant and Tawar, 2011; Tiwari *et al*. 2012) ทดแทนการฆ่าเชื้อด้วยการนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อแรงดัน แต่ยังมีการทดลองในอ้อยน้อยมาก และสารเคมีที่ใช้ยังไม่สามารถควบคุมเชื้อได้ทั้งหมด ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารเคมีต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพห้องปฏิบัติการ และเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออ้อย

อุปกรณ์และวิธีการ

การเตรียมชิ้นส่วนพืช

คัดเลือกต้นพันธุ์อ้อยขอนแก่น 3 ที่สมบูรณ์ปราศจากโรคและแมลงอายุ 8-10 เดือน จากศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ตัดเป็นท่อน ๆ ละ 1 ตา แช่ท่อนพันธุ์อ้อยในน้ำร้อนอุณหภูมิ 50°ซ. นาน 2 ชั่วโมง นำมาเพาะในกระบะทรายที่อบฆ่าเชื้อที่ฉีดน้ำพ่นฝอย เมื่อหน่ออ้อยอายุ 3-4 สัปดาห์ ตัดหน่ออ่อนที่ได้ให้ชิดท่อนพันธุ์ที่สุด ฟอกฆ่าเชื้อด้วยแอลกอฮอลล์ เข้มข้น 70% นาน 1 นาที คลอรอกซ์เข้มข้น 2% นาน 8 นาที จากนั้นนำเข้าตู้เขี่ยเชื้อ ล้างด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อ 3 ครั้ง ตัดเนื้อเยื่อเจริญปลายยอดภายใต้กล้องสเตอริโอ เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเจริญในอาหารที่ดัดแปลงสูตร MS (Murashige and Skoog, 1962) ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต IBA ความเข้มข้น 1 มก./ล. และ GA 2 มก./ล. เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. ปรับค่าความเป็นกรดด่าง (pH) อยู่ที่ 5.6-5.8 บนเครื่องเขย่า ความเร็ว 100 รอบ/นาที ในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°ซ. ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง นาน 6 สัปดาห์ เนื้อเยื่อเจริญจะพัฒนาเป็นหน่อใหม่/ยอดอ่อน จากนั้นนำมาเลี้ยงขยายเพิ่มปริมาณในอาหารที่ดัดแปลงสูตร MS ที่เติมสารควบคุมการเจริญเติบโต ไคเนติน 1 มก./ล. เติมกรดซิตริก 150 มก./ล. และน้ำตาลซูโครส 20 ก./ล. pH 5.6-5.8 วางในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25±2°ซ. ภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง เพื่อเพิ่มปริมาณหน่ออ่อน

การคัดกรองหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ในสภาพห้องปฏิบัติการ

วางแผนการทดลองแบบ Factorial in CRD จำนวน 4 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ A คือ การเติมน้ำตาล ประกอบด้วย เติมน้ำตาลและไม่เติมน้ำตาล ปัจจัยที่ B คือ การอบเครื่องแก้ว/เพลท (Petri dish) ประกอบด้วย อบเพลท (อุณหภูมิ 180°ซ. 3 ชม.) และไม่อบเพลท ปัจจัยที่ C คือ การผ่านเครื่องนึ่งความดันไอ (Autoclave) ประกอบด้วย ผ่าน Autoclave และไม่ผ่าน Autoclave ปัจจัยที่ D คือ การเปิดฝาเพลท ประกอบด้วย เปิดฝาเพลท 30 นาที และไม่เปิดฝาเพลท โดยเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร และไม่เติม มีการอบเพลทและไม่อบเพลท การผ่านและไม่ผ่าน Autoclave และการเปิดฝาเพลท 30 นาที และไม่เปิดฝาเพลท ทดลองในห้องปฏิบัติการ (นอกตู้ปลอดเชื้อ) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (25±2°ซ.) ทำการ

ทดลองชุดละ 10 ซ้ำ ซ้ำละ 1 เพลท ตรวจดูเชื้อที่เจริญบนอาหารทุก ๆ วันติดต่อกันนาน 5 วัน แยกเก็บเชื้อราแต่ละไอโซเลท ใน Potato dextrose agar (PDA) slant และเชื้อแบคทีเรียใน Nutrient agar (NA) slant เพื่อนำไปศึกษาจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม (Gram's stain) และย้อมสีเชื้อราด้วย Lecto-phenal cotton blue ตามวิธีของ Larone ดูลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนำไปใช้ในงานทดลองต่อไป

ทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อน

วางแผนแบบ Factorial in CRD จำนวน 2 ปัจจัย ดังนี้ ปัจจัยที่ 1 คือ เชื้อราและเชื้อแบคทีเรีย ที่ได้จากการทดลองที่ 1 ปัจจัยที่ 2 สารเคมี 2 ชนิด ดังนี้ 1) สาร Sodium hypochlorite เข้มข้น 0.00, 0.17, 0.25 และ 0.33 มล./ล. 2) สาร Povidone iodine เข้มข้น 0.00, 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. โดยทำการละเลงสารแขวนลอยสปอร์เชื้อราหรือเซลล์แบคทีเรียที่ได้จากการคัดกรองในการทดลองที่ 1 ความเข้มข้น 500 spores หรือ cells/ml ลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS เติมน้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร บ่มเชื้อไว้ที่อุณหภูมิ 25±2°ซ. ตรวจนับจำนวนโคโลนีหลังจาก 3-7 วัน เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งโดยเปรียบเทียบกับจำนวนโคโลนีที่ปรากฏในชุดควบคุม (No chemical control)

ผลของสารเคมีต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่ออ้อยในอาหารสูตร MS

วางแผนการทดลองแบบ CRD จำนวน 10 ซ้ำ ทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยปลอดเชื้อพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ที่ไม่ได้นึ่งฆ่าเชื้อ เติมไคเนติน 1 มก./ล. กรดซิตริก 150 มก./ล. น้ำตาลซูโครส 20 กรัม/ลิตร ไม่เติมผงวุ้น ปรับ pH 5.6-5.8 จำนวน 2 ชุด ชุดที่ 1 ไม่เติมสารเคมี เพื่อใช้เป็นตำรับควบคุม (Control) ชุดที่ 2 เติมสารเคมี 2 ชนิด ดังนี้ 1) สาร Sodium hypochlorite เข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. (โดยความเข้มข้น 0.20 มล./ล. เป็นการรีวิวงานทดลองของ Wamaedeesa *et al*. (2021) 2) สาร Povidone iodine เข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. ใส่ชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ 1 ชิ้น/ขวด วางเลี้ยงภายใต้สภาพแสง 16 ชั่วโมง ไม่ให้แสง 8 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25±2°ซ. บันทึกเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อน การ Browning และการรอดชีวิตที่อายุ 30 วัน วิเคราะห์ค่าความแปรปรวน ANOVA ของแต่ละการทดลอง และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของแต่ละกรรมวิธีโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test (DMRT) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

จากการคัดกรองหาเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ในสภาพห้องปฏิบัติการ ทำการจำแนกชนิดแบคทีเรียโดยใช้วิธีการย้อมสีแกรม (Gram's stain) และย้อมสีเชื้อราด้วย Lecto-phenal cotton blue ตามวิธีของ Larone ดูลักษณะสัณฐานวิทยา (Morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์สามารถจำแนกเป็นเชื้อรา 8 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท โดยเชื้อราที่พบ ได้แก่ *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Curvularia* sp ยีสต์ และอีก 2 ไอโซเลท ไม่ทราบชื่อ เนื่องจากไม่สร้างหน่วยขยายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียที่พบได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 1 ไอโซเลท และแกรมลบ 4 ไอโซเลท และยังพบว่าแหล่งเชื้อปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (ไม่นับรวมเชื้อที่ติดมากับเนื้อเยื่อพืช) มาจาก 4 แหล่ง เรียงตามลำดับ คือ 1) อากาศและสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ 2) เพลทที่รองรับหรือบรรจุอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช 3) อาหารเพาะเลี้ยง พบการปนเปื้อนน้อยและสามารถทำลายให้หมดไปได้ในกระบวนการเตรียมอาหาร โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อ 4) น้ำตาล มีส่วนช่วยส่งเสริมการปนเปื้อน (Table 1)

Table 1 Number of fungi and bacteria (colony/petri dish)

Treatment	Sugar (A)	Sterilized petri dish (B)	Auto-clave (C)	Opening the petri dish (D)	Number of fungi and bacteria (colony/petri dish)		Source of contamination
					Fungi	Bacteria	
1	/	/	/	/	4.1	0.3	Air
2	/	/	/	X	0.0	0.0	-
3	/	/	X	/	1.4	0.0	Air and MS
4	/	/	X	X	0.4	0.0	Air and MS
5	/	X	/	/	0.5	0.2	Air and Petri dish
6	/	X	/	X	3.8	0.9	Petri dish
7	/	X	X	/	1.1	0.1	Air, MS and Petri dish
8	/	X	X	X	1.3	0.0	Petri dish and MS
9	X	/	/	/	4.1	0.2	Air
10	X	/	/	X	0.0	0.0	-
11	X	/	X	/	0.5	0.0	Air and MS
12	X	/	X	X	0.0	0.0	-
13	X	X	/	/	3.3	0.4	Air and Petri dish
14	X	X	/	X	0.2	0.1	Petri dish
15	X	X	X	/	1.4	0.0	Air, MS and Petri dish
16	X	X	X	X	0.0	0.0	-

(/) = yes, (x) = no

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งการเจริญของเชื้อราและแบคทีเรียปนเปื้อน เพื่อหาชนิดและความเข้มข้นสารที่เหมาะสมต่อการควบคุมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด โดยทำการทดสอบเชื้อรา 8 ไอโซเลท (F1 = *Aspergillus* sp., F2 = cannot specify type, F3 = *Trichoderma* sp., F4 = *Fusarium* sp., F5 = *Curvularia* sp., F6 = *Gliocladium* sp., F7 = cannot specify type และ Y1 = Yeast) และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท (B1 = แบคทีเรียแกรมบวก และ B2-B5 = แบคทีเรียแกรมลบ) ที่แยกได้ในการทดลองที่ 1 ในอาหารสูตร MS พบว่า Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.33 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อราได้ถึง 6 ไอโซเลท (F1, F2, F3, F5, F6 และ F7) แต่ไม่ยับยั้ง F4 ส่วนการยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบว่าสารเคมี Sodium hypochlorite ระดับความเข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 5 ไอโซเลท และสารเคมี Povidone Iodine ความเข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 6 ไอโซเลท (F2, F3, F4, F5, F6 และ F7)

แต่ไม่ยับยั้งเชื้อราอีก 2 ไอโซเลท (F1 และ Y1) ส่วนการยับยั้งเจริญของเชื้อแบคทีเรีย สารเคมี Povidone iodine ความเข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 5 ไอโซเลท (Figure 1 and 2)

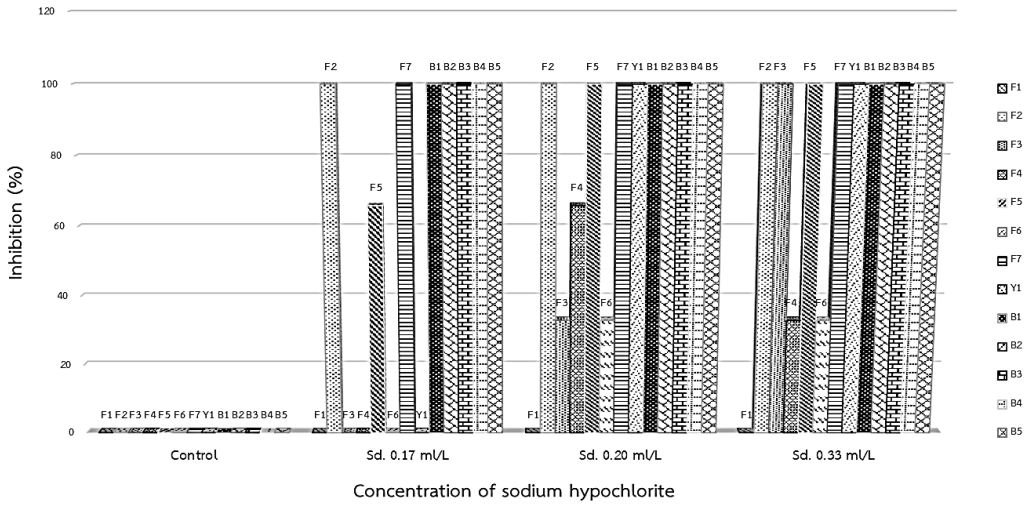

Figure 1 Antimicrobial activities of sodium hypochlorite (Sd) at concentrations of 0.20, 0.25 and 0.33 ml/L. against fungal contaminants (F1 = *Aspergillus* sp., F2 = cannot specify type, F3 = *Trichoderma* sp., F4 = *Fusarium* sp., F5 = *Curvularia* sp., F6 = *Gliocladium* sp., F7 = cannot specify type and Y1 = Yeast) and bacterial contaminants (B1 = gram-positive bacteria and B2-B5 = gram-negative bacteria)

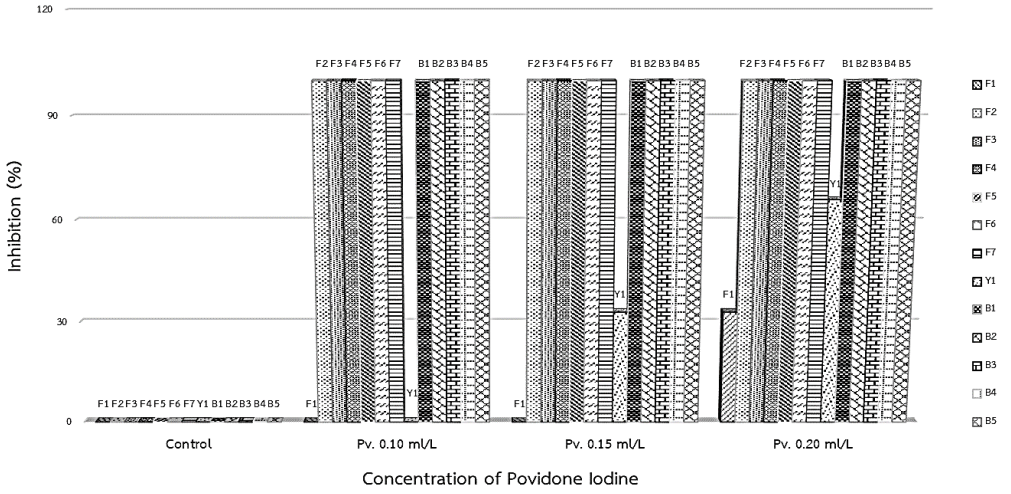

Figure 2 Antimicrobial activities of Povidone iodine (Pv) at concentrations of 10, 15 and 0.20 ml/L. against fungal contaminants (F1 = *Aspergillus* sp., F2 = cannot specify type, F3 = *Trichoderma* sp., F4 = *Fusarium* sp., F5 = *Curvularia* sp., F6 = *Gliocladium* sp., F7 = cannot specify type and Y1 = Yeast) and bacterial contaminants (B1 = gram-positive bacteria and B2-B5 = gram-negative bacteria)

จากการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อยปลอดเชื้อพันธุ์ขอนแก่น 3 (KK3) บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจำนวน 2 ชุด ชุดที่ 1 ไม่เติมสารเคมี ให้นึ่งฆ่าเชื้อ (Control) ชุดที่ 2 เติมสารเคมี 2 ชนิด ดังนี้ 1) สาร Sodium hypochlorite เข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. 2) สาร Povidone iodine เข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. หลังการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่ออ้อย 30 วัน พบว่าสารเคมีมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การ Browning และการแตกหน่อของหน่ออ้อยที่เพาะเลี้ยงบนอาหารสูตร MS แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญยิ่งทางสถิติ ($p<0.01$) โดย Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. ไม่พบการ Browning และพบการแตกหน่อดีที่สุด และพบว่าสารเคมีมีผลต่อเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.01$) และการปนเปื้อนทุกทรีตเมนต์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (Table 2 and Figure 3)

Table 2 The effect of chemicals on the growth and development of sugarcane tissue at 30 days

Treatment	Browning (%)	Contamination (%)	Survival (%)	Number of shoots
Control	0.0±0.0b	0.0±0.0	100.0±0.0a	6.6±1.0a
Sd. 0.20 ml/L	0.0±0.0b	22.0±19.1	77.8±19.2a	5.4±4.6a
Sd. 0.25 ml/L	0.0±0.0b	11.0±19.1	88.9±19.2a	7.3±1.5a
Sd. 0.33 ml/L	0.0±0.0b	0.0±0.0	100.0±0.0a	7.0±1.3a
Pv. 0.10 ml/L	0.0±0.0b	11.0±19.1	88.9±19.2a	4.7±1.7ab
Pv. 0.15 ml/L	22.2±19.2b	0.0±0.0	77.8±19.2a	1.7±0.6bc
Pv. 0.20 ml/L	66.7±33.5a	0.0±0.0	33.3±33.5b	0.6±0.7c
F test	**	ns	*	**
CV (%)	**114.58**	**198.23**	**23.76**	**43.52**

(*) The mean difference is significant at the .05 level., (**) The mean difference is highly significant at the 0.01 level., (ns) The mean non-significant.,(Sd).= Sodium hypochlorite, (Pv). = Povidone Iodine

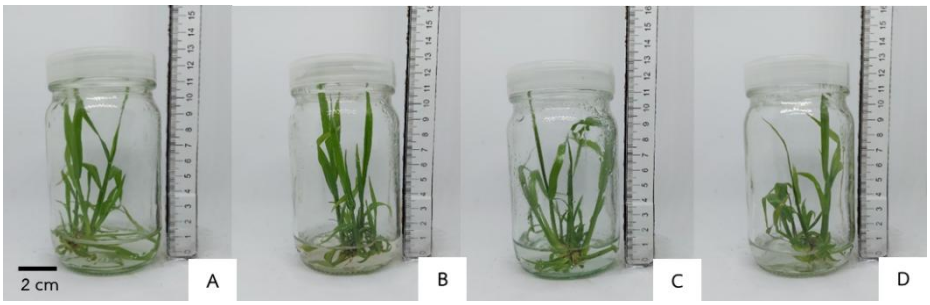

Figure 3 Sugarcane plantlets from conventional tissue culture methods (A), a low-cost open tissue culture technique of 0.20 ml/L sodium hypochlorite (B), 0.25 ml/L sodium hypochlorite (C) and 0.33 ml/L sodium hypochlorite (D) at 30 days

วิจารณ์ผลการวิจัย

จากการคัดกรองหาเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS และในสภาพห้องปฏิบัติการ สามารถจำแนกเป็นเชื้อรา 8 ไอโซเลท และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท โดยเชื้อราที่พบ ได้แก่ *Aspergillus* sp, *Trichoderma* sp, *Fusarium* sp, *Gliocladium* sp, *Curvularia* sp, ยีสต์และอีก 2 ไอโซเลทไม่ทราบชื่อ เนื่องจากไม่สร้างหน่วยขยายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียที่พบ ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 1 ไอโซเลท และแกรมลบ 4 ไอโซเลท Rangkawe and Koto (2016) รายงานว่า การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดกับชิ้นส่วนพืชที่นำมาเพาะเลี้ยง ส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากวัสดุเพาะเลี้ยง ได้แก่ อาหารเพาะเลี้ยงและเครื่องมือเครื่องใช้ นอกจากนี้ยังอาจพบสาเหตุจากสถานที่ปฏิบัติงานอีกด้วย โดยเชื้อแบคทีเรียที่พบบ่อยในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ได้แก่ *Bacilius subtilis*, *B. cereus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas fluorescens*, *Micrococcus* sp. และเชื้อรา ได้แก่ *Aspergillus niger*, *Cladosporium* sp., *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Rhizopus nigricans* และ *Saccharomyces* sp. Odutayo *et al*. (2007) กล่าวว่า โดยทั่วไปการแก้ปัญหาปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์สามารถทำได้โดยใช้หม้อนึ่งแรงดันไอ พบว่าให้ประสิทธิภาพสูง แต่เนื่องจากมีราคาสูงจึงเป็นอุปสรรคสำคัญสำหรับเกษตรกรรายย่อยหรือผู้ที่เริ่มต้นทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีงบประมาณไม่มากนักในการลงทุน

จากการทดสอบประสิทธิภาพของสารเคมีในการยับยั้งเจริญของเชื้อรา 8 ไอโซเลท (F1 = *Aspergillus* sp., F2 = cannot specify type, F3 = *Trichoderma* sp., F4 = *Fusarium* sp., F5 = *Curvularia* sp., F6 = *Gliocladium* sp., F7 = cannot specify type และ Y1 = Yeast) และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท (B1 = แบคทีเรียแกรมบวก และ B2-B5 = แบคทีเรียแกรมลบ) พบว่าการยับยั้งเจริญของเชื้อรา สารเคมี Povidone iodine ความเข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อราได้ 6 ไอโซเลท เลต (F2, F3, F4, F5, F6 และ F7) แบคทีเรียได้ 5 ไอโซเลท (B1-B5) และสารเคมี Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.33 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อราได้ถึง 6 ไอโซเลท (F1, F2, F3, F5, F6 และ F7) สารเคมี Sodium hypochlorite ระดับความเข้มข้น 0.17 0.25 และ 0.33 มล./ล. สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้ทั้ง 5 ไอโซเลท (B1-B5) ซึ่งสอดคล้องกับ Rangkawe and Koto (2016) รายงานว่า วิธีการฆ่าเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ด้วยคลอรอกซ์ซึ่งมีความเข้มข้น 5.25% Sodium hypochlorite พบว่าคลอร็อกซ์ปริมาตร 0.05-0.25 มล. สามารถทำให้อาหารปราศจากเชื้อได้ 100% Wamaedeesa *et al*. (2021) รายงานว่า การเติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้น 2, 4 และ 6 มล./ล. สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเพาะเลี้ยงฟิโลเดนดรอน “รวยทรัพย์” ได้ดี นอกจากนี้ Sodium hypochlorite ยังเป็นสารที่หาซื้อได้ง่าย มีราคาถูก ไม่เป็นอันตรายหรือเป็นอันตรายน้อยมากต่อคนและชิ้นส่วนพืช ใช้กำจัดกลิ่นและฆ่าเชื้อในน้ำ สามารถออกฤทธิ์ฆ่าเชื้อแบคทีเรีย สปอร์ เชื้อรา โปรโตซัว และไวรัส โดยเฉพาะชนิดที่มีไขมันเป็นส่วนประกอบของเปลือกหุ้ม (Lantagne *et al*., 2008 และ Bennet *et al*., 2015)

สารเคมี Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. ส่งผลต่อการเจริญเติบโตและพัฒนาของเนื้อเยื่ออ้อยดีที่สุด (Table 2 and Figure 3) สอดคล้องกับ Balla *et al*. (2022) ศึกษาการเจริญเติบโตของต้นฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” ด้วยการเติม Haiter® และ Betadine® ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 มล./ล. ในอาหาร MS พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารได้ และยอดฟิโลเดนดรอน “เชอร์รี่เรด” สามารถเจริญเติบโตได้ดี Chotikadachanarong (2013) รายงานผลการใช้น้ำยาฟอกผ้าขาวเพื่อการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช โดยการเตรียมอาหารสูตร MS เติมน้ำยาฟอกผ้าขาวความเข้มข้น 0.01, 0.05, 0.3 และ 0.5 มล./ล. ผลการทดลองไม่พบ

การปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ในทุกชุดการทดลอง และอาหารที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยการเติมน้ำยาฟอกขาว ร้อยละ 0.01 มล./ล. มีการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่อไม่แตกต่างจากชิ้นส่วนที่เลี้ยงบนอาหารที่ผ่านการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 Deein *et al.* (2013) รายงานว่าความเข้มข้น 6% Sodium hypochlorite ปริมาตรที่เหมาะสม คือ ระหว่าง 0.2-2.0 มล./ล. มีประสิทธิภาพในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อได้อย่างสมบูรณ์ และเมื่อคำนวณต้นทุนการผลิตต้นกล้าอ้อย พบว่าต้นทุนการผลิตอ้อยแบบดั้งเดิมเท่ากับ 3.16 บาท/ต้น ขณะที่ระบบเปิดเท่ากับ 2.60 บาท/ต้น

สรุปผลการวิจัย

การศึกษาชนิดและความเข้มข้นของสารฆ่าเชื้อต่อการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ ในสภาพห้องปฏิบัติการ และเหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเนื้อเยื่ออ้อย โดยในขั้นตอนแรกทำการคัดกรองหาเชื้อจุลินทรีย์ที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS ในสภาพห้องปฏิบัติการระบบเปิด พบเชื้อรา 8 ไอโซเลท ได้แก่ *Aspergillus* sp., *Trichoderma* sp., *Fusarium* sp., *Gliocladium* sp., *Curvularia* sp., ยีสต์ และอีก 2 ไอโซเลท ไม่ทราบชื่อ เนื่องจากไม่สร้างหน่วยขยายพันธุ์ และเชื้อแบคทีเรีย 5 ไอโซเลท ได้แก่ แบคทีเรียแกรมบวก 1 ไอโซเลท แบคทีเรียแกรมลบ 4 ไอโซเลท จากการทดลองหาชนิดของสารฆ่าเชื้อที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อควบคุมจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่คัดกรองได้จากการปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร MS พบว่า Sodium hypochlorite ความเข้มข้น 0.20, 0.25 และ 0.33 มล./ล. สามารถควบคุมการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีและมีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่ออ้อยพันธุ์ขอนแก่น 3 น้อยที่สุด และไม่แตกต่างจากการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อแบบดั้งเดิม ดังนั้นการใช้สารเคมีจึงสามารถทดแทนการใช้หม้อนึ่งความดันไอ และยังสามารถลดต้นทุนการผลิตได้ถึง 1.2 เท่า

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณสำนักงานการวิจัยแห่งชาติ ศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสถาบันวิจัยพืชไร่และพืชทดแทนพลังงาน ศูนย์วิจัยพืชไร่ขอนแก่น ที่ได้เอื้อเฟื้อบุคลากร สถานที่ทำการทดลอง และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ที่เกี่ยวข้อง

เอกสารอ้างอิง

Balla, N., N. Chanchula, T. Weeplian, B. Nuntha, N. Nunya, S. Pokaew and S. Kashima. 2022. Sterilization methods to prevent contamination in MS medium for the tissue culture of philodendron “Cherry Red”. **Wichcha Journal Nakhon Si Thammarat Rajabhat University** 41(1): 119-129. [in Thai]

Bennett, E.J., R. Dolin and J.M. Blaser. 2015. **Principles and Practice of Infectious Diseases**. 8th Ed. Amsterdam: Elsevier Inc. 3697 p.

Chotikadachanarong, K. 2015. Simple media from hydroponics nutrient solution for tissue culture of *Exacum affine* Balf.f.ex Regel and *Stevia rebaudiana* Bertoni. **Asian Health, Science and Technology Reports** 23(1): 74-81. [in Thai]

Chotikadachanarong, K. 2013. Influence of commercial bleach on sterilization of Persian Violet *(Exacum affine Balf. f.* ex Regel) tissue culture media. **Rajabhat Journal of Sciences Humanities and Social Sciences** 14(2): 35-44. [in Thai]

Deein, W., C. Thepsithar and A. Thongpukdee. 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.

Kaewmenee, C., and Y. Hanboonsong. 2011. Evaluation of the effciency of various treatments used for sugarcane white leaf phytoplasma control. **Bulletin of Insectology** 64: 197-198.

Kaewpratumrussamee, C., R. Koohapitakthum, O. Chatchawankanpanich, H. Chachiyo and A. Wongcharoen. 2015. A suitable culture medium for micropropagation of sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) *in vitro*. **KKU Science Journal** 43(Suppl.1): 170-175. [in Thai]

Lantagne, D.S., B.C. Blount, F. Cardinali, 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.

Leifert, C., B. Waites, J.W. Keetley, S.M Wright, J.R. Nicholas and W.M. Waites. 1994. Effect of medium acidification on filamentous fungi, yeasts and bacterial contaminants in Delphinium tissue cultures. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture** 36: 149-155.

Murashige, T. and F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiol Plant** 15(3): 473-497.

Odutayo, O.I., N.A. Amusa, O.O. Okutade and Y.R. Ogunsanwo. 2007. Determination of the sources of microbial contaminations of cultured plant tissues. **Plant Pathology Journal** 6(1): 77-81.

Rangkawe, P. and R. Koto. 2016. Effects of chemical and microwave techniques on sterilization of medium and materials plant tissue culture and subculture without using laminar air flow cabinet. **Science Journal SWU** 32(2): 161-175. [in Thai]

Reed, B.M. and P. Tanprasert. 1995. Detection and control of bacterial contaminants of plant tissue cultures: a review of recent literature. **Plant Tissue Culture and Biotechnology** 1(3): 137-142.

Sawant, R. and P. Tawar. 2011. Use of sodium hypochlorite as media sterilant in sugarcane micropropagation at commercial scale. **Sugar Tech** 13(1): 27-35.

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

Wamaedeesa, R., B. Ali, N. Chedao and S. Kanjanawattanawong. 2021. Chemical sterilization in MS culture medium for *In vitro* culture of *Philodendron* sp. "Ruaysap"**. Princess of Naradhiwas University Journal** 13(1): 377-387.