

เรื่อง การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิชโดยใช้สารเคมี
และสารสกัดจาก ธรรมชาติดแทนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วย Autoclave

โดย 1. นางสาวธิษณา กิติเรืองลาภ
2. นางสาวครรศุวรรณ เชื้อชา�
3. นางสาวกัญญาวิริ์ ศรีแท่นแก้ว
โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย

รายงานฉบับนี้เป็นส่วนประกอบของโครงการวิทยาศาสตร์ ระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
ในงานเวทีวิชาการนวัตกรรมสะเต็มศึกษาขั้นพื้นฐานแห่งชาติ ครั้งที่ 1 (ออนไลน์)

The 1st National Basic STEM Innovation E-Forum 2021

วันที่ 18 – 19 กันยายน พ.ศ. 2564

เรื่อง การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซโดยใช้สารเคมี
และสารสกัดจาก ธรรมชาติทดแทนการฆ่าเชื้อจุลทรรศ์ด้วย Autoclave

โดย	1. นางสาวธิษณา	กิติเรียงลาภ
	2. นางสาวศรีสุวรรณ์	เข็อชา�
	3. นางสาวกัญญาวีร์	ครีแท่นแก้ว

โรงเรียนยุพราชวิทยาลัย

อาจารย์ที่ปรึกษา	นายมงคล ปัญญารัตน์
ที่ปรึกษาพิเศษ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กิตติศักดิ์ โชติเดชาณรงค์

ชื่อโครงการ	การพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชโดยใช้สารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติ ทดสอบการฆ่าเชื้อจุลทรรศ์ด้วย Autoclave	
ชื่อนักเรียน	1. นางสาวธิชนา กิติเรืองลักษณ์	กิติเรืองลักษณ์
	2. นางสาวศรีสุวรรณ์ เชื้อชาญ	เชื้อชาญ
	3. นางสาวกัญญาภิญญา ศรีแท่นแก้ว	ศรีแท่นแก้ว
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา	นายมงคล ปัญญาธัตน์	
โรงเรียน	ยุพราชวิทยาลัย	
ที่อยู่	238 ถนนพระปกเกล้า ตำบลศรีภูมิ อำเภอเมืองเชียงใหม่ จังหวัดเชียงใหม่ 50200 โทรศัพท์ 053-418673-5 โทรสาร 053-241213	
ระยะเวลาทำโครงการ	ตั้งแต่ 15 มกราคม 2562 – 31 สิงหาคม 2563	

บทคัดย่อ

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อการขยายพันธุ์พืชในมุมมองของเกษตรกรเป็นเรื่องที่ทำให้สำเร็จได้ยาก เนื่องจากทุกกระบวนการต้องปลดออก เชื้อ โดยเฉพาะอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ซึ่งเป็นเครื่องมือที่มีราคาสูง โครงการวิทยาศาสตร์ฉบับนี้จึงต้องการศึกษาหาสารเคมีและสารสกัด จากพืชที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรากที่พบรูปแบบปี/non ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อ นำมาทดลองการการใช้ Autoclave จากการคัดแยกเชื้อจุลทรรศ์พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อ พบเชื้อแบคทีเรีย 3 ไอโซเลต คือ YRC01 YRC02 และ YRC03 และเชื้อราก 4 ไอโซเลต คือ YRCf01 YRCf02 YRCf03 และ YRCf04 เมื่อนำสารเคมีจำนวน 9 ชนิด และสารสกัดจากธรรมชาติ 6 ชนิดมาทดสอบ ความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรากที่คัดแยกได้รวม 7 ไอโซเลต ด้วยวิธี paper disc diffusion พบรากซีเม่าโลชั่นสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรากได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลตโดย ให้ค่ารวมใส่ต่อการยับยั้งเชื้อทดสอบ YRC01 YRC02 YRC03 YRCf01 YRCf02 YRCf03 และ YRCf04 เท่ากับ 2.72 ± 0.01 , 2.63 ± 0.01 , 2.66 ± 0.03 , 1.69 ± 0.03 , 1.99 ± 0.02 , 2.10 ± 0.02 และ 1.96 ± 0.01 ตามลำดับ รองลงมาคือ สารสกัดจากกระเทียม ไอกเตอร์สูตรสีฟ้า และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin สามารถยับยั้งเชื้อ แบคทีเรียและเชื้อรากได้ 6 5 และ 4 ไอโซเลตตามลำดับ ทั้งนี้เนื่องมาสารที่คัดเลือกได้คือ ซีมาโลชั่น สารสกัดจาก กระเทียม ไอกเตอร์สูตรสีฟ้า และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin มาศึกษาความสามารถในการทำให้อาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อปลดออก เชื้อ โดยผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบรียบเทียบกับวิธีการทำให้อาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อปลดออก เชื้อ โดย Autoclave พบรากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรผสมซีมาโลชั่น 1 mL/L และสูตรผสมไอกเตอร์สูตรสีฟ้า 1 mL/L สามารถทำให้เกิดสภาพปลดออก เชื้อได้เทียบเท่ากับการใช้ Autoclave เมื่อนำสารที่คัดเลือกได้ทั้งชนิดมา ทดลองฟอกฆ่าเชื้อกิ่งติดตากุหลาบพบว่าสารละลายไอกเตอร์ที่ความเข้มข้น 20% และ 10% ให้ผลการฆ่าเชื้อไม่ แตกต่างกับสารละลาย Clorox ที่ความเข้มข้นเดียวกันทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชกิ่งติดตากุหลาบด้วยสูตร อาหารเมื่อผสมซีมาโลชั่น 1 mL/L และสูตรผสมไอกเตอร์กลินสีฟ้า 1 mL/L พบรากเจริญเติบโตของกิ่งติดตากุหลาบไม่แตกต่างจากสูตรอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วย Autoclave เมื่อสังเกตด้วยตาเป็นระยะเวลา 1 เดือน

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดีเนื่องจากได้รับความกรุณาอย่างสูงจาก คุณครูมงคล ปัญญาตัน คุณครูที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำแนะนำปรึกษาตลอดจนปรับปรุงแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ด้วยความเอาใจใส่อย่างดียิ่งผู้จัดทำทราบก็ถึงความตั้งใจจริงและความทุ่มเทของคุณครูและขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กิตติศักดิ์ โชคเดชาณรงค์ ซึ่งเป็นผู้ทรงคุณวุฒิที่กรุณารับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาพิเศษ และให้ความอนุเคราะห์สนับสนุนให้ใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ศูนย์วิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่ ในการทำการทดลอง และแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ พร้อมทั้งให้ข้อมูลและคำแนะนำต่าง ๆ ที่เอื้อต่อการทำโครงการ และเป็นประโยชน์ ทำให้สามารถนำไปใช้กับกลุ่มเกษตรกรได้จริงตามวัตถุประสงค์ จนทำให้โครงการฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

อนึ่ง ผู้จัดทำหวังว่า โครงการฉบับนี้จะมีประโยชน์อยู่มีน้อย จึงขอขอบส่วนที่ดีทั้งหมดนี้ ให้แก่เหล่าคณาจารย์ ที่ได้ประสิทธิประสาทวิชาจนทำให้ผลโครงการเป็นประโยชน์ต่อผู้ที่เกี่ยวข้อง และขอขอบความกตัญญูต่ำตาน แคร์ดิ まるดา และผู้มีพระคุณทุกท่าน สำหรับข้อบกพร่องต่าง ๆ ที่อาจจะเกิดขึ้นนั้น ผู้จัดทำขออภัยเพียงผู้เดียว และยินดีที่จะรับฟังคำแนะนำจากทุกท่านที่ได้เข้ามาศึกษา เพื่อเป็นประโยชน์ในการพัฒนาโครงการต่อไป

คณะผู้จัดทำ

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	ก
กิตติกรรมประกาศ	ข
สารบัญ	ค
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 เอกสารที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	5
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง	10
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง	15
เอกสารอ้างอิง	16

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

เมื่อกล่าวถึง “การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช” เกษตรกรต่างมองว่าเป็นเทคนิคการเพาะขยายพันธุ์ที่ยกมีต้นทุนการทำที่สูง และต้องมีความรู้ทางวิทยาศาสตร์สูงมากต่อการทำให้สำเร็จ ยิ่งกระบวนการต้องสะอาด ปลอดเชื้อโรค ซึ่งต้องใช้เครื่องมือที่มีราคาแพงมาก คือ Autoclave หรือเครื่องนึ่งความดันไอน้ำ ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เวลา 15 นาที (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554) ยิ่งทำให้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชไม่สามารถนำมาใช้ได้ในกลุ่มเกษตรกรซึ่งเป็นผู้ใช้งานเพาะขยายพันธุ์พืชโดยตรง นอกจากนี้สารเคมีบริสุทธิ์ ฮอร์โมนพืช อุปกรณ์วิทยาศาสตร์อื่น ๆ ก็มีราคาแพง เช่นกัน จึงทำให้เทคนิคการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสำเร็จอยู่ในระดับห้องปฏิบัติการวิทยาศาสตร์มากกว่าในกลุ่มผู้ใช้งานจริงอย่างเกษตรกร

ปัจจุบันจึงมีนักวิทยาศาสตร์คิดค้นสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชใหม่ส่วนประกอบของสารอาหารที่มีต้นทุนต่ำลง อาทิ เช่นการใช้ปุ๋ยชนิดน้ำไฮโดรโปนิกส์เป็นส่วนผสมในการทำอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (กิตติศักดิ์, 2558) อย่างไรก็ตามก็ยังพบปัญหาที่ทำให้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชยังไม่สามารถนำไปใช้ได้จริงในระดับปฏิบัติการของเกษตร คือ ขาดแคลนเครื่อง Autoclave ซึ่งต้องใช้ในการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงให้อยู่ในสภาพ “ปลอดเชื้อ” อันเป็นหัวใจของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้งนี้ เพราะมีราคาแพงมาก ไม่คุ้มทุนต่อการลงทุนของเกษตรกร

ด้วยปัญหาที่พบดังกล่าว ผู้จัดทำโครงการจึงหันมาของวิธีการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงด้วยวิธีใช้สารเคมีทัดแทน โดยเน้นคัดเลือกสารเคมีในห้องทดลองที่ราคาไม่แพงหากซื้อด้วย自己 หรือสารสกัดสมุนไพรซึ่งมีงานวิจัยว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ได้ มาทำการทดลองฆ่าเชื้อที่มักจะพบปนเปื้อนในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช หากพบว่ามีสารเคมีหรือสารสกัดสมุนไพรชนิดใดสามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ ก็จะนำมาประยุกต์ผสมลงในสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช เพื่อสร้างสูตรอาหารที่ปลอดเชื้อ ต้นทุนต่ำ ไม่ต้องใช้เครื่อง Autoclave และสามารถนำไปใช้เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อขยายพันธุ์พืชในกลุ่มเกษตรกรต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ในการศึกษา

1. เพื่อแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
2. เพื่อศึกษาผลของสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
3. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงอีอฟีที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีโดยใช้ Autoclave ต่อการทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ
4. เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการฟอกฆ่าเชื้อขั้นส่วนของกิงติดตากุหลาบให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ
5. เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีโดยใช้เครื่อง Autoclave
6. เพื่อพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอย่างง่ายโดยไม่ต้องใช้ Autoclave ในกระบวนการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์

1.3 สมมติฐาน

1. สารเคมีที่พับในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดในครัวเรือนที่มีฉากโขไซด์ว่า “ฆ่าเชื้อแบคทีเรียได้” และสกัดธรรมชาติจากสมุนไพรในครัวเรือนบางชนิดสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ที่พับป่นเป็นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชได้เทียบเท่าการใช้ Autoclave ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

2. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ที่ความเข้มข้น ระดับต่าง ๆ ต่อลิตร สามารถทำให้เกิดสภาพปลอดเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงได้แตกต่างกัน

3. สารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ความเข้มข้นระดับต่าง ๆ ต่อลิตรสามารถใช้ฟอกฆ่า เชื้อชิ้นส่วนของพืชให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อได้

4. กิงติดตากุหลาบสามารถเจริญเติบโตบนสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้ได้เทียบเท่ากับสูตรอาหารที่ยับยั้งการเจริญของ เชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Autoclave

1.4 ตัวแปร

ตอนที่ 1	เพื่อยแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พับป่นเป็นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
	ตัวแปรต้น เชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา
	ตัวแปรตาม จำนวนชนิดของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พับ
	ตัวแปรควบคุม อาหารเพาะเลี้ยงและวิธีการที่ใช้ในการแยกเชื้อแบคทีเรีย และเชื้อรา
ตอนที่ 2	การศึกษาผลของสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พับป่นเป็นในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
	ตัวแปรต้น สารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติ
	ตัวแปรตาม การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา
	ตัวแปรควบคุม สูตรอาหารวิธีการที่ใช้ในการทดสอบปริมาณที่ใช้ทดสอบ
ตอนที่ 3	เพื่อศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับวิธีการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ Autoclave ต่อการทำให้เกิดสภาพปลอดเชื้อ
	ตัวแปรต้น ความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
	ตัวแปรตาม การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา
	ตัวแปรควบคุม สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพื้นฐานปริมาณอาหารอุณหภูมิในการบ่ม
ตอนที่ 4	เพื่อศึกษาผลของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ที่ระดับต่าง ๆ ต่อการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นส่วนของกิงติดตากุหลาบให้อยู่ในสภาพปลอด
	ตัวแปรต้น ความเข้มข้นของสารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
	ตัวแปรตาม การเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรานบนชิ้นส่วนพืช
	ตัวแปรควบคุม 1. สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชพื้นฐาน 2. ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงต่อชุดเพาะเลี้ยง 3. อุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 4. ระยะเวลาในการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง

ตอนที่ 5	เพื่อศึกษาเบริญบเที่ยบการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลทรีย์ที่ระดับที่คัดเลือกได้กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลทรีโดยใช้เครื่อง Autoclave	
ตัวแปรต้น	สูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งจุลทรีย์ที่คัดเลือกได้	
ตัวแปรตาม	การเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบ	
ตัวแปรควบคุม	1. ปริมาณอาหารเพาะเลี้ยงต่อขวดเพาะเลี้ยง 2. อุณหภูมิในการบ่มเพาะเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา 3. ระยะเวลาในการทดสอบความสามารถในการยับยั้ง	

1.5 ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้สารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพืชใช้ทำสภาพปลอดเชื้อทดแทนวิธีการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave
2. เพื่อเป็นแนวทางในการนำไปประยุกต์ใช้เพาะขยายพันธุ์พืชในระดับกลุ่มเกษตรกร

1.6 ขอบเขตการศึกษาค้นคว้า

เนื้อหาการศึกษา	การเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพืช การกำจัดและการยับยั้งการเจริญของจุลทรรศน์ด้วยวิธีทางเคมี สารสกัดจากธรรมชาติฆ่าเชื้อจุลทรีย์
ระยะเวลาในการศึกษา	ตั้งแต่เดือนมกราคม ถึง เดือนสิงหาคม 2563

สถานที่ที่ใช้ในการศึกษา ห้องปฏิบัติการชีววิทยา โรงเรียนยุพราชวิทยาลัยจังหวัดเชียงใหม่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่

1.7 นิยามเชิงปฏิบัติการ

การเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพืช (Plant tissue culture) คือการนำเอาส่วนใดส่วนหนึ่งของพืช เช่น อวัยวะ เนื้อยื่อ เซลล์ มาเลี้ยงในอาหารสั่งเคราะห์ในสภาพปลอดเชื้อจุลทรีย์ (แสงจันทร์, 2544)

สูตรอาหารกิตติศักดิ์, 2558 คือ สูตรอาหารที่ประกอบด้วยปุ๋ยไฮโดโปนิกส์ชนิดน้ำ A สูตร B และน้ำตาล ในสภาพปลอดเชื้อจุลทรีย์ aseptic (condition) (กิตติศักดิ์, 2558)

การฆ่าเชื้อด้วย Autoclave คือ การฆ่าเชื้อด้วยใช้เครื่องนึ่งความดันไอร้อนที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 psi เวลา 15 นาที (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554)

บทที่ 2

เอกสารที่เกี่ยวข้อง

2.1 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช คือ การนาส่วนได้ส่วนหนึ่งของพืชไม่ว่าจะเป็นส่วนเนื้อเยื่อ อวัยวะต่าง ๆ ของพืชหรือเซลล์ มาเลี้ยงในสภาพที่ปลอดเชื้อจุลินทรีย์โดยการควบคุมสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ แสง ความชื้น ส่วนต่าง ๆ ของพืชเหล่านี้จะสามารถเจริญเติบโตพัฒนาเป็นต้นใหม่ โดยที่พืชทุกต้นจะมีลักษณะเหมือนกัน ด้วยเหตุนี้การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชจึงมีประโยชน์ในหลายสาขา เช่น ทางด้านการเกษตรทำให้สามารถขยายพันธุ์ได้จำนวนมากในเวลาอันรวดเร็ว หรือสามารถผลิตต้นพันธุ์ที่ปลอดเชื้อได้ จำนวนมากและยังสามารถสร้างพันธุ์ใหม่ ๆ ได้ (กิตติศักดิ์, 2558) สภาพปลอดเชื้อ (Aseptic condition) คือ ระบบที่ปราศจากการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ทุกชนิด (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554)

2.2 การกำจัดและการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์

การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้หม้อนึ่งความดันน้ำ (autoclave) หลักการคือ การนำสิ่งของที่ต้องการทำให้ปราศจากการฆ่าเชื้อ ไว้ในห้องที่มีความร้อนสูง และแรงดันของไอน้ำสูงกว่าสภาวะบรรยายกาศปกติในช่วงระยะเวลาหนึ่ง การนึ่งฆ่าเชื้อด้วยท่วาไปจะใช้สภาวะที่ อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส แรงดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วโดยใช้ระยะเวลา 15 นาที (กิตติศักดิ์, 2558)

การกำจัดจุลินทรีย์โดยวิธีการทางเคมี (chemical method) เป็นการใช้สารเคมีบางชนิด ที่มีคุณสมบัติในการทำลายจุลินทรีย์ เช่น สารที่ มีคุณสมบัติเป็นแก๊ส อาทิ Formaldehyde และ ethylene oxide ส่วนสารเคมีที่มักใช้ในรูปสารละลาย เช่น ethanol 70 % ต่างทับทิม ไฮโดรเจน Peroxide ใช้การตายของจุลินทรีย์เนื่องมาจากการเคมี ทำให้โปรตีนและกรดนิวคลีอิกของจุลินทรีย์เสียสภาพไป (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554)

การกำจัดจุลินทรีย์โดยการใช้สารปฏิชีวนะ (antibiotics) สารปฏิชีวนะหรือยาปฏิชีวนะสามารถ ฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ โดยยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดจะมีฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์เพียงบางชนิดเท่านั้น แต่ยาปฏิชีวนะบางชนิด จะออกฤทธิ์ต่อจุลินทรีย์หลายชนิด (ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554)

2.3 งานวิจัยเกี่ยวข้อง

เกตันغا ไทยหนุ่ม (2555) การใช้สารเคมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (H_2O_2) แทนการใช้หม้อนึ่งความดัน ไอน้ำ โดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร Murashige and Skoog, MS (1962) เป็นอาหารพื้นฐาน แล้วเติม H_2O_2 อัตราความเข้มข้น 0, 0.0025, 0.005, 0.075 และ 0.01 % v/v ทำการบันทึกข้อมูล 17 สัปดาห์ พบว่าอาหารที่ไม่มีการฆ่าเชื้อเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์สปดาห์ที่ 5 อาหารที่ใส่ H_2O_2 0.0025 % v/v เกิดการปนเปื้อนในสปดาห์ 13 ส่วนอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยน้ำ ความดันไอน้ำ อาหารที่เติม H_2O_2 0.005, 0.075 และ 0.01% v/v ไม่พบการปนเปื้อน

ปynnath มิตรอุดม (2549) การยืดอายุการเก็บรักษาแตงร้านและผักกาดให้นานขึ้น จากการทดลองพบว่าการล้างด้วยไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 5 % ช่วยยืดอายุได้ 7 วัน ลดปริมาณจุลินทรีย์ลงได้ 1.0 และ 2.0 log CFU/g ตามลำดับ

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 วัสดุและอุปกรณ์

1. บีกเกอร์แก้วขนาด 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ml	อย่างละ	5 บีกเกอร์
2. บีกเกอร์สแตนเลสขนาด 500, 1000 ml	อย่างละ	5 บีกเกอร์
3. ขวดรูปชมพู่ขนาด 250, 500 ml	อย่างละ	5 ขวด
4. กระบอกตวงขนาด 100, 500, 1000 ml	อย่างละ	2 กระบอก
5. ปีเปตขนาด 0.1, 1 ml	อย่างละ	5 ปีเปต
6. ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิชขนาด 4 และ 8 ออนซ์		100 ขวด
7. จานเพาะเชือแก้ว		100 จาน
8. ตู้ตัดเนื้อเยื่อพิช		1 ตู้
9. หลอดหยอด		1 หลอด
10. โกร่งบด		1 โกร่งบด
11. มีดผ่าตัดเบอร์ 3		1 ด้าม
12. ตะเกียงแอลกอฮอล์		1 ขวด
13. คีมคีบขนาดต่างๆ	อย่างละ	2 อัน
14. เข็มเขียวและ loop	อย่างละ	3 ด้าม

3.2 สารเคมี และสารสกัดจากธรรมชาติ

1. ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดน้ำ สูตร A	5 mL/L
2. ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดน้ำ สูตร B	5 mL/L
3. น้ำตาลซูครัส	30 mL/L
4. ผงวุ่น (ตราชางเงือก)	7 g/L
5. ซีเม่โลชั่น ไฮเตอร์ ชันไลน์ น้ำยาล้างห้องน้ำโปรแกรมกซ์ น้ำยาบ้วนปากคลอเลต	2 ml
6. ผงซักฟอก (บรีส) ผงซักผ้าขาว (แวนิช)	2 g
7. ยาปฏิชีวนะ Amoxycillin ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin	2 g
8. สารสกัดจากการเทียม ขมิ้น มะกรูด กระชาย มะนาว หัวหอม	5 ml
9. สารละลายคลอร์อ๊อก	1 ขวด
10. แอลกอฮอล์	20 L

3.3 เครื่องมือวัดต่างๆ

1. เครื่องชั่งสองตัวหนึ่ง	1 เครื่อง
2. เตาไฟฟ้า	1 เครื่อง
3. เครื่องวัด pH	1 เครื่อง
4. Autoclave (ศูนย์วิทยาศาสตร์ ม.ราชภัฏเชียงใหม่)	1 เครื่อง

3.4 วิธีการทดลอง

ตอนที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีช

1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีช

ทำการคัดแยกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชตันกุหลาบหนูที่ป่นเปื้อนเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ มาแยกเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 h ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่าย บ่มเพาะเชื้อที่ลักษณะ colony แตกต่างกันออกไป Steak plate อีกครั้งหนึ่งบนจานอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพีชอย่างง่าย เมื่อพบว่ามีเพียงเชื้อแบคทีเรียนิดเดียวเจริญบนอาหารให้เก็บจานอาหารที่คัดเลือกได้ดังกล่าวใส่ถุงพลาสติกทันร้อนแซ่ตตูเย็นที่อุณหภูมิ 8°C

1.2 การคัดแยกเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีช

ทำการคัดแยกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชตันกุหลาบหนูที่ป่นเปื้อนเชื้อร่านิดต่าง ๆ มาแยกให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตัดเส้นใยเชื้อรานาดประมาณ 2×2 mm ด้วยเข็มเขียวที่ปlodot เชื้อจากการเผาไฟจนแดงแล้ววางบนอาหารเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชแล้วบ่มเพาะเชื้อร่าที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 h ทำการแยกเชื้อร่าที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่ายที่ลักษณะรูปร่างเส้นใยแตกต่างกันออกไปเลี้ยงใหม่อีกครั้งหนึ่งบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีช เมื่อพบว่ามีเพียงเชื้อรานิดเดียวเจริญบนอาหารให้เก็บจานอาหารที่มีเชื้อร่าที่คัดแยกได้แซ่ตตูเย็น

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีช

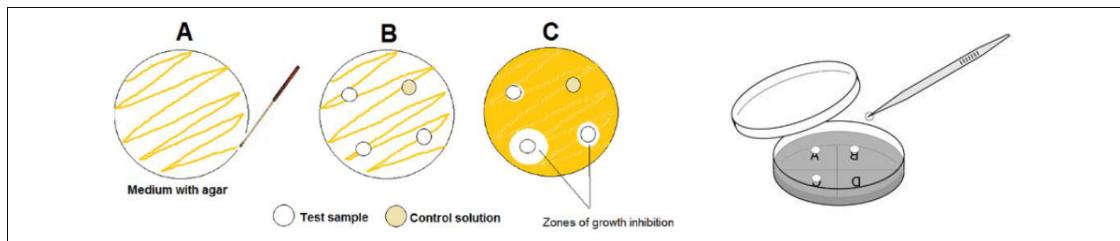
2.1 การเตรียมสารสกัดจากธรรมชาติ ทำการนำพืชสมุนไพรที่ต้องการสกัดมาซึ่งน้ำหนักปริมาณ 10 g และนำมาหั่นให้เป็นชิ้นขนาดเล็ก จากนั้นบดผสมแลกอซอล 10 ml ให้เซลล์แตกด้วยโกร่งบด ได้สารสกัดจากธรรมชาติที่ต้องการ (การเก็บรักษาสารสกัดจากธรรมชาติที่สกัดได้โดยการบรรจุใส่ในขวดแก้ว ปิดฝาให้สนิทและนำไปแขวนตู้เย็นอุณหภูมิ 2°C)

2.2 การเตรียมสารเคมีที่ใช้ทดสอบ หากสารเคมีที่ใช้ทดสอบมีสถานะเป็นของเหลวให้ใช้สารเคมีบริสุทธิ์จำนวน 10 ml ในการทดสอบ หากสารเคมีที่ใช้ทดสอบมีสถานะเป็นของแข็งหรือเป็นผงให้นำมาผสมน้ำกลิ่นในอัตราส่วน 1 g/ml ต่อละลายให้เข้ากันจำนวน 10 ml ในการทดสอบ

2.3 การเตรียมเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ นำเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 1 มาเพาะบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่ายนิดเดียว ในหลอดทดลองจำนวน 5 ml โดยทำการใช้ 100p ปลอดเชื้อ (ลงไฟให้แดง) แตะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้ และนำเชื้อที่แตะได้ลงไปเพาะในหลอดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่ายนิดเดียวจำนวน 5 ml บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 h

2.4 การเตรียมเชื้อร่าที่คัดเลือกได้ นำเชื้อร่าที่คัดเลือกได้มาตัดให้เป็นช 2*2 mm ด้วยเข็มเขียวปlodot เชื้อแล้ววางลงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่ายแบบแข็งจำนวนบ่มเพาะที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 72 hr

2.5 การทดสอบสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติต่อการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้ โดยการทำ paper disc diffusion มีขั้นตอนคือ เพาะเชื้อแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากตอนที่ 1 มาเพาะเลี้ยงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชโดยการใช้มีพันสำลีชุบน้ำเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแล้วบิดให้หยอด จากนั้นมา Swab บนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีชอย่างง่ายดังภาพ 3.1



ภาพ 3.1 paper disc diffusion

ที่มา <https://www.researchgate.net>

จากนั้นนำ disc ลงไปแข็งในสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่จะใช้ทดสอบเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาผึ่งบนขอบภาชนะที่บรรจุสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติให้หมวด หยิบ disc ด้วยคิมคีบปลอดเชื้อไปวางบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซ ที่ Swab เชือแบคทีเรียที่คัดแยกได้ ทำการบ่มเพาะเชือแบคทีเรียที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 h สังเกตการณ์กิตรวิเคราะห์ผลการทดสอบสารสกัดจากธรรมชาติที่ใช้ทดสอบและทำการวัดวงเส้นที่เกิดขึ้นในหน่วย mm

2.6 การทดสอบสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติต่อการยับยั้งเชื้อร้ายที่คัดเลือกได้ ทำโดยวิธี paper disc diffusion มีขั้นตอนคือ ทำการเพาะเชื้อร้ายที่คัดแยกได้มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซโดยการตัดส่วนใหญ่ของรากขนาด 2×2 mm นำมาวางบนกลางจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซจากนั้นนำ disc ลงไปแข็งในสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่จะใช้ทดสอบเป็นเวลา 5 นาที แล้วนำมาผึ่งบนขอบภาชนะที่บรรจุสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติให้หมวด หยิบ disc ด้วยคิมคีบปลอดเชื้อไปวางบนจานอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซ อย่างง่ายที่ทำการเพาะเชื้อร้ายที่คัดแยกได้ข้างตัน ทำการบ่มเพาะเชื้อร้ายที่อุณหภูมิห้องเป็นสังเกตการณ์กิตรวิเคราะห์ผลการทดสอบสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่ใช้ทดสอบและทำการวัดวงเส้นที่เกิดขึ้นเป็น mm

ตอนที่ 3 ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ คัดเลือกได้ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์โดยใช้ Autoclave ต่อ การทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

นำสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร้ายที่ดีที่สุดจากตอนที่ 2 มาทำการผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซสูตร เกียรติศักดิ์, 2558 เพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้อาหารปลอดเชื้อเปรียบเทียบกับการใช้เครื่อง Autoclave โดยมีขั้นตอนคือ

3.1 ทำการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพีซสูตร เกียรติศักดิ์, 2558 ซึ่งประกอบด้วย ปุ๋ยไนโตรโป-นิกซ์ชนิดเหลว สูตร A 5 mL/L สูตร B 5 mL/L น้ำตาลทราย 30 g/L และวัน 7 g/L ทำการต้มจนเดือดและรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60°C แล้วนำไปโดยการผสมสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่คัดเลือกได้คือ ชีม่าโลชั่น สารสกัดจากกระเทียม ไอเตอร์สูตรสีฟ้า และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin ลงไป ปริมาณอย่างละ 1 mL/L 5 mL/L 10 mL/L จากนั้นเทอาหารลงบนจานอาหารเชื้อปิดฝาตั้งทิ้งไว้อุณหภูมิห้อง

3.2 ทำการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรเกียรติศักดิ์ 2558 ซึ่งประกอบด้วย ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ ชนิดเหลว สูตร A 5 ml/L สูตร B 5 ml/L น้ำตาลทราย 30 g/L และวัน 7 g/L ที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave ที่ความร้อน 121°C ความดัน 15 ปอนด์ 20 นาที เท่านั้นจะสามารถเพาะเชื้อปีกผ้าแล้วตั้งทิ้งไว้ ที่อุณหภูมิห้อง

3.3 นำขวดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อจากข้อ 3.1 และ 3.2 อย่างละ 20 ขวด ไปวางบนชั้นวางขวด เพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่อุณหภูมิห้องทำการสังเกตการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากสิ่งแวดล้อมเป็นเวลา 1 เดือน เปรียบเทียบกับสูตรอาหารที่ใช้ Autoclave และไม่ผ่านการฆ่าเชื้อเป็นตัวควบคุมการให้สังเกต เจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เลือกสูตรที่ไม่พบรการเจริญของจุลินทรีย์หรือให้ผลใกล้เคียงกับการใช้ Autoclave ตลอดระยะเวลา 1 เดือนมาทำการทดลองเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกิ่งติดตากองต้นกุหลาบต่อไป

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ฟอกฆ่าเชื้อชั้นส่วนของกิ่งติดตากุหลาบให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

นำสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่ดีที่สุดจากตอนที่ 2 มาทำการฟอกฆ่าเชื้อชั้นเนื้อเยื่อกิ่งติดตากองต้นกุหลาบ โดยเปรียบเทียบกับวิธีฟอกฆ่าเชื้อมาตรฐานคือสารละลาย Clorox ความเข้มข้นร้อยละ 100 20 และ 10 โดยใช้น้ำกลั่นเป็นการทดลองควบคุม มีวิธีการคือ

4.1 เลือกต้นกุหลาบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรงจำนวน 1 ต้น ตัดกิ่งติดตากุหลาบ ขนาด 1.5 cm มาล้างด้วยน้ำเปล่า 100 ml ผสมน้ำยาล้างจานชั้นoline 2 หยด ด้วยการถูเบา ๆ และนำมาแช่ในสารละลายที่คัดเลือกได้คือ ซีเม่โลชั่น สารสกัดจากกระเทียม ไอยเตอร์สูตรสีฟ้า และยาปฏิชีวนะ Amoxicilin ความเข้มข้นร้อยละ 100 ร้อยละ 20 และร้อยละ 10 เปรียบเทียบกับสารละลามาตรฐานที่ใช้ฟอกฆ่าเชื้อคือ สารละลายคลอร์อกความเข้มข้นร้อยละ 100 ร้อยละ 20 และร้อยละ 10 เขย่าเบาๆ เป็นเวลา 20 นาที (แสงจันทร์, 2544) และใช้น้ำกลั่นเป็นการทดลองควบคุม

4.2 นำกิ่งติดตากุหลาบปักลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตร (กิตติศักดิ์, 2558) 1 ขวด/ชั้น ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราจากบริเวณชั้นเนื้อเยื่อทุกวันเป็นเวลา 1 เดือน คัดเลือกเลือกสูตร การฟอกฆ่าเชื้อที่ดีที่สุดคือไม่พบรการเจริญของเชื้อ หรือให้ผลเทียบเท่ากับสารละลาย Clorox

ตอนที่ 5 ศึกษาเบรียบเทียบการเจริญเติบโตของกิ่งติดตากุหลาบเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Autoclave

5.1 การเตรียมสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่คัดเลือกได้ นำสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้จากตอนที่ 3 มาทำการทดลองเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อกิ่งติดตากองต้นกุหลาบ เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการใช้เครื่อง Autoclave โดยมีสูตรอาหารที่คัดเลือกได้ดังนี้

1. สูตรอาหาร(YRC CUTURE1, 2560) มีส่วนประกอบ (1) ปุ๋ยไนโตรโพนิกซ์นิเดลว สูตร A 5 ml/L (2) ปุ๋ยไนโตรโพนิกซ์นิเดลว สูตร B 5 ml/L (3) น้ำตาลทราย 30 g/L (4) วัุนตราชาง เงือก 7 g/L ทำการต้มจนเดือดและรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60°C แล้วนำไปโดยการผสมซึ่งกันแล้วปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน

2. สูตรอาหาร(YCR CUTURE2, 2560) มีส่วนประกอบ เหมือนกับสูตร (YRC CUTURE1, 2560) ต้มจนเดือดและรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60°C แล้วนำไปโดยการผสมไอกเตอร์ลจไปประมาณ 1 ml/L คนให้เข้ากัน เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้วปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน

3. สูตรอาหารปกติ (กิตติศักดิ์, 2558) มีส่วนประกอบเหมือนกับสูตร (YRC CUTURE1, 2560) ต้มจนเดือดแล้วนำไปเข้าขีดด้วย Autoclave ที่ความร้อน 121°C ความดัน 15 psi 15 นาที เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชแล้วปิดฝาทิ้งไว้เป็นเวลา 5 วัน

5.2 การฟอกผ่าเข้ากึ่งติดตากุหลาบ เลือกต้นกุหลาบที่มีความสมบูรณ์แข็งแรง 1 ต้น ตัดกิ่งติดตากุหลาบ ขนาด 1.5 cm มาทำการฟอกผ่าเข้าด้วยสารเคมีที่คัดเลือกได้ในตอนที่ 4 คือ ไอกเตอร์ 20 m/L โดยมีขั้นตอนคือ นำกิ่งติดตากุหลาบล้างด้วยน้ำกลั่นผสมน้ำยาล้างจานชั้นoline ถูเบา ๆ และนำมาแช่ในสารละลายไอกเตอร์ความเข้มข้น 20 m/L เขย่าเบา ๆ 20 นาที นำมาล้างด้วยการแช่น้ำกลั่นเขย่าเบา ๆ 5 นาที นำชิ้นเนื้อเยื่อกิ่งติดตากุหลาบปักลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่ทำการทดลองทั้ง 3 สูตร ขวดละ 2 ชิ้น

5.3 การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกิ่งติดตากุหลาบ นำกิ่งติดตากุหลาบที่ฟอกผ่าเข้าแล้วจากข้อ 5.2 ปักบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่ทดลองทั้ง 3 สูตร โดยปัก 2 ขีนต่อ 1 ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ จำนวน 20 ขวดต่อ 1 สูตรอาหาร นำไปวางบนชั้นวางเนื้อเยื่อให้ได้รับแสง 16 ชั่วโมงต่อวัน อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของกิ่งติดตากุหลาบ 5 สัปดาห์ สังเกตการเจริญเติบโต

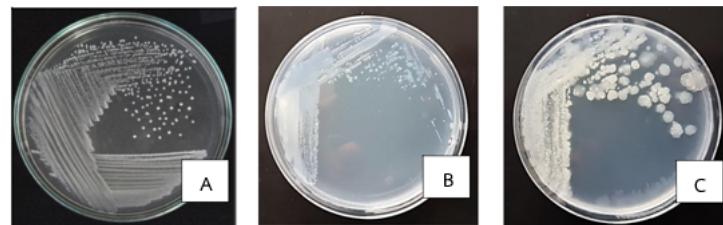
บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

ตอนที่ 1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช

1.1 การคัดแยกเชื้อแบคทีเรียที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช

จากการคัดแยกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีชตันกุหลาบที่ป่นเปื้อนเชื้อแบคทีเรียต่าง ๆ มาทำการแยกเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์โดยวิธีการ Steak plate บนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช บ่มเพาะเชื้อที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทำการแยกเชื้อแบคทีเรียที่เจริญบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีชอย่างจ่ายจ่ายที่มีลักษณะ colony พบเชื้อแบคทีเรียที่ป่นเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีชจำนวน 3 โอลเซเลต ดังภาพ 4.1



ภาพที่ 4.1 แสดงลักษณะของโคโลนีและรูปร่างของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อ

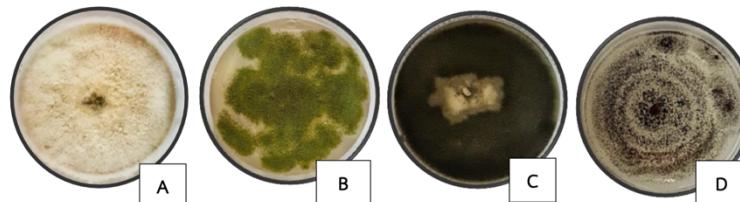
A: โอลเซเลต YRCb01 B: โอลเซเลต YRCb02 C: โอลเซเลต YRCb03

ตาราง 4.1 แสดงลักษณะรูปร่างและการติดสีแกรมของเชื้อแบคทีเรียที่แยกได้

ลำดับ	เชื้อแบคทีเรีย	รูปร่าง	การติดสีแกรม	หมายเหตุ
A	YRCb01	แท่ง	บวก	ส่งตรวจที่
B	YRCb02	กลม	บวก	ศูนย์วิทยาศาสตร์
C	YRCb03	แท่ง	บวก	ม.ราชภัฏเชียงใหม่

1.2 การคัดแยกเชื้อร่าที่พบปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช

จากการคัดแยกขวดเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีชตันกุหลาบและตันอิน ที่ป่นเปื้อนเชื้อร่าทำการแยกเชื้อร่าให้บริสุทธิ์โดยวิธีการตัดเส้นไข่เข้า 2*2 mm ด้วยเข็มเขียวที่ปlodot เชื้อแล้ววางบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช บ่มเพาะที่อุณหภูมิห้อง 72 h ทำการแยกเชื้อร่าที่มีลักษณะรูปร่างเส้นไข้แตกต่างกันพบเชื้อร่าที่มีลักษณะทางกายภาพเมื่อส่องดูตาเปล่าและใต้กล้องจุลทรรศน์แตกต่างกันจำนวน 4 โอลเซเลต



ภาพที่ 4.2 แสดงลักษณะของโคโลนีและรูปร่างของแบคทีเรียที่คัดแยกได้จากอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่อพีช

A: โอลเซเลต YRCf01 B: โอลเซเลต YRCf02 C: โอลเซเลต YRCf03 D: โอลเซเลต YRCf04

ตอนที่ 2 ศึกษาผลของสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่พับบนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพิช

จากการนำสารสารเคมีจำนวน 9 ชนิด และสกัดจากพืชจำนวน 6 ชนิด มาทดสอบความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราที่คัดเลือกได้ด้วยวิธีการ paper dise diffusion สังเกตการณ์เกิดวงใส ทำการวัดวงใสที่เกิดขึ้นในหน่วย cm ได้ผลตามตารางที่ 4.2

ตาราง 4.2 ผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี paper dise diffusion ของสารเคมีและสารสกัดธรรมชาติที่ใช้ทดสอบ

สารเคมี/ สารสกัดธรรมชาติ	ความสามารถในการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราคัดเลือกได้ ค่าเฉลี่ยวงใสรอบแผ่น dise (cm)						
	เชื้อแบคทีเรียที่คัดเลือกได้				เชื้อราที่คัดเลือกได้		
	YRCb01	YRCb02	YRCb03	YRCf01	YRCf02	YRCf03	YRCf04
1. ซีม่าโลชั่น	2.72±0.01	2.63±0.01	2.66±0.03	1.69±0.03	1.99±0.02	2.10±0.02	1.96±0.01
2. ไฮเตอร์ (สูตรสีฟ้า)	2.84±0.01	2.99±0.07	2.86±0.01	1.68±0.03	1.06±0.01	0.00	0.00
3. น้ำยาล้างจาน(ชั้นไลน์)	0.98±0.02	1.16±0.02	1.21±0.01	0.00	1.16±0.02	0.00	0.00
4. น้ำยาล้างห้องน้ำ (โปรแมกซ์)	1.62±0.01	1.39±0.02	1.96±0.01	0.00	1.06±0.03	0.00	0.00
5. น้ำยาบ้วนปาก (คอลเกต)	2.12±0.02	2.39±0.36	2.16±0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
6. ผงซักฟอก (บรีส)	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
7. ผงซักผ้าขาว (แวนิช)	1.64±0.02	1.36±0.01	1.78±0.03	0.00	0.00	0.00	0.00
8. ยาปฏิชีวนะ Amoxycilin	1.92±0.02	2.63±0.03	1.86±0.02	0.00	1.16±0.04	0.00	0.00
9. ยาปฏิชีวนะ Norfloxacin	1.82±0.02	1.95±0.01	1.95±0.05	0.00	0.00	0.00	0.00
10. สารสกัดจากกระเทียม	1.69±0.08	1.54±0.04	1.62±0.02	2.86±0.02	2.59±0.01	2.48±0.01	0.00
11. สารสกัดจากขมิ้น	0.78±0.02	0.86±0.01	0.75±0.05	0.00	1.69±0.01	0.00	0.00
12. สารสกัดจากมะกรูด	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
13. สารสกัดจากกระชาย	1.12±0.14	0.98±0.03	0.96±0.01	0.00	0.00	0.00	0.00
14. สารสกัดจากมานาว	1.06±0.01	0.96±0.03	0.95±0.02	0.00	0.00	0.00	0.00
15. สารสกัดจากหัวหอม	1.12±0.02	1.26±0.03	1.12±0.02	0.00	1.69±0.02	0.00	0.00
16. น้ำกลิ่น	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
17. แอลกอฮอล์ 95%	0.78±0.01	0.76±0.04	0.82±0.02	0.00	0.00	0.00	0.00

หมายเหตุ น้ำกลิ่น คือ ชุดควบคุมสำหรับสารเคมีแอลกอฮอล์ 95% คือ ชุดควบคุมสำหรับสารสกัดสมุนไพร

จากการแสดงผลการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราโดยวิธี paper dise diffusion ของสารเคมีและสารสกัดธรรมชาติที่ใช้ทดสอบจำนวน 15 ชนิด พบว่าซีม่าโลชั่นสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมด 7 ไอโซเลต รองลงมาคือสารสกัดจากกระเทียมสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมด 6 ไอโซเลต ไฮเตอร์สูตรสีฟ้าสามารถยับยั้งแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมด 5 ไอโซเลต ส่วนน้ำยาล้างจาน (ชั้นไลน์) น้ำยาล้างห้องน้ำ (โปรแมกซ์) ยาปฏิชีวนะ Amoxycilin สารสกัดจากหัวหอมมารยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราทดสอบได้ทั้งหมดเพียง 4 ไอโซเลต จากผลการสังเกตจะเห็นได้ว่าส่วนใหญ่สารเคมีและสารสกัดสมุนไพรจะสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียได้แต่พบรการยับยั้งการเจริญของเชื้อราได้น้อยตั้งนั้นผู้ทำรายงานจึงเลือกซีม่าโลชั่น สารสกัดจากกระเทียม ไฮเตอร์ สูตรสีฟ้า และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin มาทำการทดสอบในขั้นต่อไป

ตอนที่ 3 ศึกษาเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อ คัดเลือกได้ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กับวิธีการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้ Autoclave ต่อ การทำให้อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชอยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

นำสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรากที่คัดเลือกได้ได้แก่ ชีม่าโลชั่น สารสกัดจากกระเทียมไฮเตอร์สูตรสีฟ้าและยาปฏิชีวนะ Amoxycilin ปริมาณอย่างละ 1 ml และ 5 ml มาทำการผสมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเพื่อทดสอบความสามารถในการทำให้อาหารปลอดเชื้อ เป็นเวลา 1 เดือนเปรียบเทียบกับการฆ่าเชื้อด้วยการใช้เครื่อง การสังเกตการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย และ เชื้อรากจากสิ่งแวดล้อมบนอาหารทุกวันพบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ดังตาราง 4.3

ตาราง 4.3 แสดงร้อยละของขาดอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชสูตรต่างๆที่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ระยะเวลา ในการ สังเกต	ร้อยละของขาดอาหารที่พบการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ (%)									
	อาหารเพาะเลี้ยง		อาหารเพาะเลี้ยง		อาหารเพาะเลี้ยง		อาหารเพาะเลี้ยง		อาหารเพาะเลี้ยง	
	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ผสม	ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ
ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า	ชีม่าโลชั่น	Amoxycilin	กระเทียม							
1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	1 ml	5 ml	ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อ
วันที่ 1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
วันที่ 3	0	0	0	0	0	0	10	0	0	60
วันที่ 5	0	0	0	0	25	25	30	0	0	75
วันที่ 7	0	0	0	0	50	25	60	25	0	100
วันที่ 9	0	0	0	0	60	55	100	75	0	100
วันที่ 11	0	0	0	0	100	75	100	100	0	100
วันที่ 13	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100
วันที่ 15	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100
วันที่ 19	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100
วันที่ 23	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100
วันที่ 27	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100
วันที่ 30	0	0	0	0	100	100	100	100	0	100

จากการบันทึกผลการทดลอง 4.3 พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช (สูตรกิตติศักดิ์, 2558) ที่ผสมไฮเตอร์สูตรสีฟ้า 1 ml และอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมชีม่า 1 และ 5 ml อย่างละ 20 ขวด ไม่พบการเจริญของจุลินทรีย์เมื่อทำการสังเกตเป็นเวลา 1 เดือน อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชที่ผสมยาปฏิชีวนะ Amoxycilin 1 และ 5 ml พบการเจริญของจุลินทรีย์วันที่ 5 ของการทดลอง ร้อยละ 25 ทั้งอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชที่ผสมยาปฏิชีวนะ Amoxycilin 1 และ 5 ml และปนเปื้อนร้อยละ 100 ในวันที่ 9 ของการทดลอง 100 ส่วนอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารสกัดจากกระเทียม 5 ml พบการเจริญของจุลินทรีย์ในวันที่ 7 ร้อยละ 25 และร้อยละ 100 ในวันที่ 11 ส่วนอาหารสูตรปกติที่ไม่ผ่านการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีใด ๆ พบเชื้อจุลินทรีย์เจริญในขาดอาหารในวันที่ 3 ร้อยละ 60 และปนเปื้อนร้อยละ 100 ในวันที่ 7 ของการทดลอง

ดังนั้นไฮเตอร์และชีม่าโลชั่นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะนำมาผสมในอาหารเพื่อฆ่าเชื้อ ทดแทนการใช้ Autoclave ใน การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชทั้งนี้ควรศึกษาความเข้มข้น ที่ต่ำสุดที่ควรใช้ และการเป็นพิษต่อเซลล์พืชในขั้นต่อไป

ตอนที่ 4 ศึกษาผลของสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์ที่คัดเลือกได้ที่ระดับความเข้มข้น พอกฆ่าเชื้อชั้นส่วนของกิงติดตากุหลาบให้อยู่ในสภาพปลอดเชื้อ

เมื่อนำสารเคมีหรือสารสกัดจากธรรมชาติที่ให้ผลการยับยั้งเชื้อจุลทรรศ์ได้ดีที่สุดได้แก่ ซีม่าโลชั่น สารสกัดจากกระเทียมไ乂เตอร์สูตรสีฟ้าและยาปฏิชีวนะ Amoxycilin มาทำการทดลองพอกฆ่าเชื้อชั้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบขนาด 1.5 cm 10 ชิ้น ในอัตราส่วนร้อยละ 100, 20 และ 10 ตามลำดับเบ耶่าๆ 20 นาที โดยใช้สารคลอร็อกเป็นการทดลองควบคุม และนำชิ้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบปักลงบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสูตรที่คัดเลือกได้ในตอนที่ 4 ทำการสังเกตการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์ เวลา 1 เดือนได้ผลการทดลองดังตาราง 4.4-4.6

ตาราง 4.4 แสดงร้อยละของชั้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบที่พอกฆ่าเชื้อด้วยสารต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 100 เป็นเวลา 20 นาที ที่พบรการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์

สารพอกฆ่า เชื้อ	ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์/ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ (%)											
	ซีม่าโลชั่น		สารสกัดจากกระเทียม		ไ乂เตอร์สูตรสีฟ้า		Amoxycilin		คลอร็อก		น้ำกั่น	
	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	100%	A	B
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0
วันที่ 4	0	0	30	30	0	0	30	0	0	0	30	0
วันที่ 6	10	0	30	30	0	0	30	0	0	0	100	10
วันที่ 8	10	20	50	30	0	10	30	20	0	0	100	10
วันที่ 10	10	20	100	30	0	10	30	20	0	0	100	20
วันที่ 15	30	20	100	30	10	10	100	20	0	0	100	20
วันที่ 20	30	20	100	30	10	10	100	20	0	0	100	20
วันที่ 25	30	20	100	30	10	10	100	20	0	0	100	20
วันที่ 30	30	20	100	30	10	10	100	20	0	0	100	20

หมายเหตุ : A = ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์ B = ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ

ตาราง 4.5 แสดงร้อยละของชั้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบที่พอกฆ่าเชื้อด้วยสารต่างๆ ความเข้มข้นร้อยละ 20 เป็นเวลา 20 นาที ที่พบรการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์

สารพอกฆ่า เชื้อ	ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์/ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ (%)											
	ซีม่าโลชั่น		สารสกัดจากกระเทียม		ไ乂เตอร์สูตรสีฟ้า		Amoxycilin		คลอร็อก		น้ำกั่น	
	20 %	20 %	A	B	A	B	A	B	A	B	A	B
วันที่ 2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	30	0
วันที่ 4	0	0	30	0	0	0	0	0	0	0	30	0
วันที่ 6	10	0	100	10	0	10	0	0	10	0	60	20
วันที่ 8	10	50	100	10	10	10	50	20	10	20	100	20
วันที่ 10	50	50	100	10	10	60	50	20	10	70	100	20
วันที่ 15	50	50	100	10	10	60	50	20	10	70	100	20
วันที่ 20	50	50	100	10	10	60	50	20	10	70	100	20
วันที่ 25	50	50	100	10	10	60	50	20	10	70	100	20
วันที่ 30	50	50	100	10	10	60	50	20	10	70	100	20

หมายเหตุ : A = ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลทรรศ์ B=ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ (นับรวมขวดที่ป่นเปื้อน)

จากตารางแสดงให้เห็นว่าสารละลายไ乂เตอร์สูตรสีฟ้าความเข้มข้นร้อยละ 20 ให้ผลการพอกฆ่าเชื้อชั้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบใกล้เคียงกับสารละลายคลอร็อกความเข้มข้นร้อยละ 20 หากที่สุด และยังพบการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบร้อยละ 60 และ 70 ตามลำดับ

ตาราง 4.6 แสดงร้อยละของชิ้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบที่ฟอกฆ่าเชื้อด้วยสารต่าง ๆ ความเข้มข้นร้อยละ 10 เป็นเวลา 20 นาที ที่พบรการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

ระยะเวลา/ สารฟอกฆ่า/ เชื้อ	ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์/ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ (%)										
	ซีมาโลชั่น 10 %		สารสักจาก กระเทียม 10 %		ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า 10%		Amoxycillin 10%		คลอร์ออก 10%		
	A	A	A	B	A	B	A	B	A	B	A
วันที่ 2	0 0		0 0		0 0		0 0		0 0		10 0
วันที่ 4	0 0		30 0		0 0		10 0		0 0		30 0
วันที่ 6	10 10		30 0		10 0		30 0		10 0		100 10
วันที่ 8	10 10		50 0		10 70		30 10		10 80		100 10
วันที่ 10	50 50		100 0		10 70		50 10		10 80		100 10
วันที่ 15	50 50		100 0		10 70		100 10		10 80		100 10
วันที่ 20	50 50		100 0		10 70		100 10		20 80		100 10
วันที่ 25	50 50		100 0		10 70		100 10		20 80		100 10
วันที่ 30	50 50		100 0		10 70		100 10		20 80		100 10

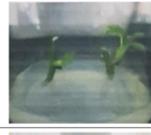
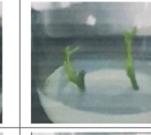
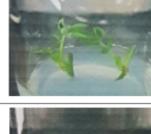
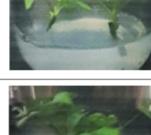
หมายเหตุ: A = ร้อยละการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ B=ร้อยละการเจริญของกิงติดตากุหลาบ(นับรวมขาดที่ป่นเปื้อน)

จากตารางแสดงให้เห็นว่าสารละลายไฮเตอร์สูตรสีฟ้าความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ผลการฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบใกล้เคียงกับสารละลายคลอร์อิกความเข้มข้นร้อยละ 10มากที่สุด และยังพบการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบท่ากันคือร้อยละ 80 ดังนั้นควรเลือกใช้ไฮเตอร์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 10 ใน การฟอกฆ่าเชื้อชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างพืช

ตอนที่ 5 ศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบเมื่อเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้กับวิธีการ ยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์โดยใช้เครื่อง Autoclave

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบ ขนาด 1.5 cm 30 ชิ้น บนสูตรอาหารเพาะเลี้ยง เนื้อเยื่อพืชที่ผสมสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่ระดับความเข้มข้นที่คัดเลือกได้คือ ซีมาโลชั่น และ ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า 1 mL (ร้อยละ 0.1) เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์โดย วิธีการใช้เครื่อง Autoclave ที่อุณหภูมิ 120 องศา ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที เป็นชุด control ทำการ เพาะเลี้ยงบนชั้นวางเนื้อเยื่อ อุณหภูมิห้อง สังเกตการเจริญเติบโตของกิงติดตากุหลาบจำนวน 4 สัปดาห์ เป็นเวลา 1 เดือน ได้ผลการทดลองดังตาราง 4.7 คือกิงติดตากุหลาบที่เพาะเลี้ยงด้วยอาหารเพาะเลี้ยง ทั้ง 2 สูตร มีการเจริญเติบโตไม่แตกต่างจากสูตรอาหารที่ฆ่าเชื้อโดยใช้เครื่อง Autoclave

ตาราง 4.7 แสดงการเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบหนูบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเยื่อสูตรต่างๆ

ระยะเวลา	การเจริญเติบโตของชิ้นเนื้อเยื่อกิงติดตากุหลาบที่หนูบนอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเยื่อสูตรต่างๆ		
	Control	ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า 1 mL	ซีมาโลชั่น 1 mL
สัปดาห์ที่ 1	ไม่พบการเจริญ	ไม่พบการเจริญ	ไม่พบการเจริญ
สัปดาห์ที่ 2			
สัปดาห์ที่ 3			
สัปดาห์ที่ 4			
สัปดาห์ที่ 5 (ครบ 1 เดือน)			

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

4.1 จากการออกแบบการทดลองเพื่อตรวจสอบสมมติฐานสามารถสรุปผลได้ดังนี้

1. พบเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชจำนวน 3 ไอโซเลต ได้แก่ YRCb01, YRCb02 และ YRCb03 และพบเชื้อร่าที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชจำนวน 4 ไอโซเลต ได้แก่ YRCf01, YRCf02, YRCf03 และ YRCf04

2. พบสารเคมีและสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรียและเชื้อร่าที่ปนเปื้อนในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืช ได้แก่ มิโนซิน ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า สารสกัดจากกระเทียม และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin โดยมีประสิทธิภาพการยับยั้งตามลำดับ

3. เมื่อเปรียบเทียบสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชที่ผสมสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกได้คือ ซีม่าโลชั่น ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า สารสกัดจากกระเทียม และยาปฏิชีวนะ: Amoxycillin ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กับการฆ่าเชื้อด้วย Autoclave ต่อการปนเปื้อนจุลินทรีย์ พบว่า อาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมซีม่าโลชั่น และอาหารเพาะเลี้ยงที่ผสมไฮเตอร์สูตรสีฟ้าปริมาณ 1 ml ต่อลิตร (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) ไม่พบการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ในขาด อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชซึ่งให้ผลเช่นเดียวกับการฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave

4. เมื่อทดลองนำสารยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ที่คัดเลือกได้คือ ซีม่าโลชั่น ไฮเตอร์สูตรสีฟ้าสารสกัดจากกระเทียม และยาปฏิชีวนะ Amoxycilin ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการฟอกฆ่าเชื้อชั้นส่วนของกิงติดตากุหลาบเบรียบเทียบกับการใช้สารคลอร์อิก พบว่า สารละลายไฮเตอร์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 20 และ 10 ให้ผลการยับยั้งการเจริญเต็บท่องเชื้อจุลินทรีย์และพบการเจริญของกิงติดตากุหลาบได้ใกล้เคียงกับการใช้สารละลายคลอร์อิก(สารมาตราฐานในการฟอกฆ่าเชื้อ) ที่ระดับความเข้มข้นเดียวกัน

5. เมื่อทดลองเพาะเลี้ยงกิงติดตากุหลาบบนอาหารเพาะเลี้ยงด้วยสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชที่ผสมสารฆ่าเชื้อที่คัดเลือกได้คือ ซีม่าโลชั่น ไฮเตอร์สูตรสีฟ้า ปริมาณ 1 ml ต่อลิตร (ความเข้มข้นร้อยละ 0.1) เปรียบเทียบกับสูตรอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยเครื่อง Autoclave พบว่า ขึ้นเนื้อยื่นเยื่อ กิงติดตากุหลาบเจริญเต็บทบនอาหารทั้ง 3 สูตรอาหารไม่แตกต่างกันเมื่อสังเกตด้วยตา เป็นระยะเวลา 1 เดือน

6. จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถพัฒนาสูตรอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืชให้เกิดสภาพปลอดเชื้อ ทดลองการใช้เครื่อง Autoclave ใน การฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ ได้จำนวน 2 สูตรอาหาร ได้แก่

4.2 สูตรอาหาร (YRC CUTURE1, 2560) มีส่วนประกอบ (1) ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดเหลว สูตร A 5 m/L (2) ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดเหลว สูตร B 5 mVL (3) น้ำตาลทราย 30 g/L (4) วุ้นตราช้างเงือก 7 g/L ทำการต้มจนเดือดและรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60 องศาเซลเซียสแล้วฆ่าเชื้อด้วยการผสมซีม่าโลชั่นลงไป 1 m/L คนให้เข้ากัน เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืช

4.2 สูตรอาหาร (YRC CUTURE1, 2560) มีส่วนประกอบ (1) ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดเหลว สูตร A 5 m/L (2) ปุ๋ยไฮโดรโปนิกส์ชนิดเหลว สูตร B 5 mVL (3) น้ำตาลทราย 30 g/L (4) วุ้นตราช้างเงือก 7 g/L ทำการต้มจนเดือดและรอให้อุณหภูมิลดลงเหลือ 60 องศาเซลเซียสแล้วฆ่าเชื้อด้วยการผสมไฮเตอร์ลงไป 1 m/L คนให้เข้ากัน เทใส่ขวดเพาะเลี้ยงเนื้อยื่นเยื่อพืช

เอกสารอ้างอิง

- . กระเทียมรักษาภัยภัย [ระบบออนไลน์]: <http://www.the-than.com/samonpai/P/3.html> (1.มิ.ย. 2560)
- . กุหลาบหนู. [ระบบออนไลน์]: <http://www.swu.ac.th> (30.มิ.ย. 60)
- . ซึ่งมาโลชั่นใน 1 ขวด. [ระบบออนไลน์]: <http://muaydrugstore.blogspot.com/2012/06/blog-post.html> (1 มิ.ย. 2560)
- . หม้อนึ่งความดันไอน้ำ. [ระบบออนไลน์]: <http://www.autoclavesale.com> (30.มิ.ย. 2560)
- . Paper disc diffusion. [ระบบออนไลน์]: <https://www.researchgate.net> (30.มิ.ย. 60)
- กรณิกา เนื่องภา, ปรากรม ประยูรรัตน, แสงมนีชิงดวง. 2554. ประสิทธิภาพของพืชสมุนไพรบางชนิดที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของ *Colletotrichum gloeosporioides* และ *Fusarium sp.* ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์มหาวิทยาลัยบูรพาจังหวัดชลบุรี
- กิตติศักดิ์ โชคิกเดชานรงค์, 2556. อาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชต้นทุนต่ำเพื่อการขยายพันธุ์หญ้าหวาน Low Cost Plant Tissue Culture Media for Micropropagation of *Stevia rebaudiana Bertoni*. คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- กิตติศักดิ์ โชคิกเดชานรงค์, 2558. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการสอน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่
- เกตุนภา ไทยหนุ่ม. 2555. ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์สารที่มีประสิทธิภาพในการผ่าเชือเข็ือในอาหารเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. วารสารวิจัยราชภัฏเชียงใหม่ 13(1)ฉ 150-154.
- ภาควิชาจุลชีววิทยา, 2554. คู่มือการปฏิบัติการจุลชีววิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่.
- ปิยนันท์ มิตรอุดม. 2549. การยืดอายุการเก็บรักษาแตงร้าน ผักกาดหอมแปรรูปเบื้องต้น โดยการใช้ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์และไอโอดีน. สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.
- สถาบันวิจัยและฝึกอบรมการเกษตรลำปาง, 2540. เอกสารประกอบการฝึกอบรมหลักสูตรการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชเบื้องต้น. สถาบันเทคโนโลยีราชมงคล. ลำปาง.
- สุวรรณ เหลืองชลธร, 2543. เคมีอนินทรีย์ทางเกษตรศาสตร์ เล่ม 2. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ หน้า 154
- แสงจันทร์, 2544. การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช. เอกสารประกอบการสอน คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏเชียงใหม่