

ผลของคลอรีนไดออกไซด์ต่อการทำให้ปลอดเชื้อในการเพาะเลี้ยง สับปะรดภูแลด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์

Effect of chlorine dioxide (ClO_2) on sterilization in micropropagation of pineapple cv. Phulae by bioreactor system

วุฒิชัย ศรีช่วย¹ และ สมปอง เตชะโต^{1*}

Wutthichai Srichuay¹ and Sompong Te-chato^{1*}

บทคัดย่อ: การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชนั้นกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อทั้งในอาหารเพาะเลี้ยง และชิ้นส่วนพืชมีความสำคัญมาก การทำให้ปลอดเชื้อด้วยสารเคมีเป็นวิธีหนึ่งที่นิยมใช้ คลอรีนไดออกไซด์เป็นสารฆ่าเชื้อที่มีความเหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์ ที่เกิดการปนเปื้อนได้ง่าย จากการศึกษาการทำให้ปลอดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอบริเวณเทียบกับการใช้คลอรีนไดออกไซด์พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ฆ่าเชื้อด้วยคลอรีนไดออกไซด์ส่งผลให้สับปะรดภูแลที่เพาะเลี้ยงสร้างยอดรวมที่ดีกว่าในอาหารที่ฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอบริเวณเทียบ อาหารเพาะเลี้ยงเดิม 6-benzyladenine (BA) ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร เหมาะสมต่อการชักนำยอดรวม การใช้ความเข้มข้นของ BA สูงทำให้สับปะรดภูแลมีจำนวนยอดรวมเพิ่มขึ้นแต่ให้ความสูงลดลง คลอรีนไดออกไซด์ยังมีประสิทธิภาพในการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อราโดยคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 100 ppm ไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อราหลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์

คำสำคัญ: คลอรีนไดออกไซด์, ไบโอรีแอคเตอร์, ขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลอง, สับปะรดภูแล

ABSTRACT: In plant tissue culture, sterilization of culture medium and explant was very important sterilization by chemical substance is a potent method. Chlorine dioxide (ClO_2) could reduce microorganism in culture medium and explant and increased efficiency in micropropagation of pineapple cv. Phulae by bioreactor system. Culture of pineapple in culture medium sterilized with ClO_2 promoted shoot formation better than autoclaved-sterilized-medium. Culture medium supplemented with 0.25 mg/L BA gave an optimum number of shoots. Even concentrations at higher than this gave higher number of shoots but shoot height was decreased. Effective concentration of ClO_2 at 100 ppm could remove fungal contamination at 100%

Keywords: chlorine dioxide, bioreactor, micropropagation, pineapple cv. Phulae

¹ ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ วิทยาเขตหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112
Department of Plant Science, Faculty of Natural Resources, Prince of Songkla University, Hatyai, Songkhla
90112, Thailand.

* Corresponding author: Sompong Te-chato e-mail: stechato@yahoo.com

บทนำ

การขยายพันธุ์พืชโดยกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อเป็นวิธีการที่ผลิตพืชได้จำนวนมากในระยะเวลานาน ดังนั้นการพัฒนาของเทคโนโลยีเพื่อลดต้นทุนการผลิต จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ การใช้ไบโอรีแอคเตอร์ และคลอรีนไดออกไซด์ในการขยายพันธุ์พืชในหลอดทดลองโดยไบโอรีแอคเตอร์สามารถลดต้นทุนการผลิตได้จริง และสามารถเพิ่มจำนวนของต้นพืชได้มากกว่าการเลี้ยงบนอาหารแข็ง และการเขย่าเลี้ยงในอาหารเหลว ซึ่งได้มีการรายงานความสำเร็จการเพิ่มปริมาณจำนวนมากด้วยไบโอรีแอคเตอร์ในกาแฟ (Ducos *et al.*, 2007) ปาล์มน้ำมัน (Gorret *et al.*, 2004) ส่วนคลอรีนไดออกไซด์ช่วยเพิ่มความรวดเร็วในการเตรียมอาหารสังเคราะห์ ลดการใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำที่มีราคาสูง และลดการใช้พลังงาน

การทำให้อาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืชปลอดเชื้อโดยใช้หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เป็นกรรมวิธีที่ใช้มายาวนาน ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ต้นทุนค่อนข้างสูง ปัจจุบันจึงได้มีการศึกษาแนวทางเลือกอื่น เพื่อใช้ในการฆ่าเชื้อ การใช้สารเคมีเป็นอีกทางเลือกหนึ่ง คลอรีนไดออกไซด์เป็นสารกำจัด เชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และไวรัสที่มีประสิทธิภาพในช่วง pH กว้าง ตั้งแต่ 3.0 ถึง 9.0 (Huang *et al.*, 1997) จึงทำให้มีเปอร์เซ็นต์การปนเปื้อนต่ำ ไม่ทำปฏิกิริยากับสารอินทรีย์ และไม่ผลิตสารคลอรามินที่เป็นพิษแก่สิ่งมีชีวิตรวมทั้งมีความสามารถกำจัดเชื้อปนเปื้อนได้ดีแม้ใช้ความเข้มข้นต่ำ (Cardoso and Silva, 2012) ประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อโรคดีกว่าคลอรีน และสารประกอบคลอรีนชนิดอื่นๆ (สุภัทราพร, 2536) นอกจากนี้ยังมีการใช้คลอรีนไดออกไซด์ในการกำจัดการปนเปื้อนของเชื้อ *Escherichia coli* และ *Salmonella* ในผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร (Han *et al.*, 2000; López-Velasco *et al.*, 2012) และใช้ในการควบคุมเชื้อในการเก็บรักษาผลพลัม (Chen and Zhu, 2011) คลอรีนไดออกไซด์เป็นสารกำจัดเชื้อที่สามารถนำมาประยุกต์ใช้ร่วมกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์เพื่อ

เพิ่มประสิทธิภาพในการขยายพันธุ์พืชจำนวนมากเชิงพาณิชย์ต่อไป

วิธีการศึกษา

เพาะเลี้ยงต้นสับปะรดบนอาหารแข็งสูตร MS เดิม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ และผงวุ้น เข้มข้น 0.75 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 เดือน นำต้นสับปะรดที่ได้มาเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์ที่ทำการเติมอากาศเป็นเวลา 2 นาที ทุก 2 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเหลวสูตร MS เดิม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร 5.7 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการใช้น้ำหม้อนึ่งความดันไอน้ำที่อุณหภูมิสูง 121 องศาเซลเซียส ความดัน 1.07 กิโลกรัมต่อตารางเซนติเมตร เป็นเวลา 15-30 นาที และคลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 15 ppm บันทึกการปนเปื้อน การสร้างยอดรวม ความสูง จำนวนใบ และความยาวใบ หลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 16 สัปดาห์

การศึกษาผลของ BA ต่อการเพิ่มจำนวนยอดรวม
นำต้นสับปะรดที่ได้มาเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์ โดยใช้อาหารเหลวสูตร MS เดิม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร BA เข้มข้น 0.03, 0.06, 0.10 และ 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร 5.7 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการใส่คลอรีนไดออกไซด์ เข้มข้น 15 ppm บันทึกการสร้างยอดรวม ความสูง จำนวนใบ และความยาวใบ หลังจากเพาะเลี้ยง 12 สัปดาห์

การศึกษากำจัดการปนเปื้อนของเชื้อราด้วยคลอรีนไดออกไซด์ นำต้นสับปะรดที่มีการปนเปื้อนเชื้อรา มาล้างให้สะอาด ตัดแต่งส่วนที่ได้รับความเสียหายจากเชื้อราออก จากนั้นเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์โดยใช้อาหารเหลวสูตร MS เดิม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ ปรับค่าความเป็นกรด-ด่าง ของอาหาร 5.7 ทำให้ปลอดเชื้อโดยการใส่คลอรีนได

ออกไซด์ เข้มข้น 1, 5, 10, 15, 50 และ 100 ppm บันทึกการปนเปื้อนทุกสัปดาห์เป็นเวลา 4 สัปดาห์

การอนุบาลต้นกล้าลงดินปลูก นำต้นสับปะรดที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในไบโอรีแอคเตอร์โดยใช้อาหารเหลวสูตร MS เติม NAA เข้มข้น 0.06 มิลลิกรัม/ลิตร BA เข้มข้น 0.03 มิลลิกรัม/ลิตร น้ำตาลซูโครส เข้มข้น 3 เปอร์เซ็นต์ มาล้างให้สะอาด ย้ายลงปลูกในกระถางพลาสติกบรรจุดินผสม แล้วครอบด้วยขวดแก้ว หลังจากนั้นรดน้ำในตอนเช้าวันละหนึ่งครั้ง เมื่อปลูกเป็นเวลา 7 วัน นำแก้วที่ครอบออก ทำการบันทึกอัตราการรอดชีวิตหลังจากอนุบาลต้นกล้าเป็นเวลา 1 เดือน ในการศึกษานี้ทุกการทดลองวางเลี้ยงที่อุณหภูมิ 26 ± 2 องศาเซลเซียส ให้แสงสว่าง 14 ชั่วโมงต่อวัน ความเข้มแสง 12.95 ไมโครโมลต่อตารางเมตรต่อวินาที เปรียบเทียบการปนเปื้อน การเจริญเติบโต และการสร้างยอดโดยวางแผนการทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Least Significant Different (LSD) ทำการทดลอง 4 ซ้ำ ซ้ำละ 3 ชิ้นส่วน

ผลการศึกษา และวิจารณ์

จากการศึกษาผลของคลอรีนไดออกไซด์ในการทำให้ปลอดเชื้อในอาหารสังเคราะห์สำหรับการเพาะเลี้ยงสับปะรดพันธุ์ภูแลในไบโอรีแอคเตอร์ พบว่าอาหารเพาะเลี้ยงที่ไม่ผ่านกระบวนการฆ่าเชื้อโดยใช้

ความร้อนสูงส่งผลให้ต้นสับปะรดมีการเจริญเติบโตที่ดี (Figure 1A, C) โดยอาหารสังเคราะห์ที่ผ่านกระบวนการทำให้ปลอดเชื้อด้วยคลอรีนไดออกไซด์เข้มข้น 15 ppm ให้ต้นสับปะรดมีความสูง จำนวนใบ ความยาวใบ และการสร้างยอดสูงกว่าการเพาะเลี้ยงในอาหารที่ผ่านการทำให้ปลอดเชื้อด้วยความร้อนสูงโดยหม้อนึ่งความดันไอ (Table 1) สอดคล้องกับการรายงานการเจริญเติบโตของโพโทคอร์มไลบอดี ฟาแลนนอปซิส บนอาหารเหลวสังเคราะห์สูตรดัดแปลง Hyponex ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดย Sodium hypochlorite เข้มข้น 5.25 เปอร์เซ็นต์ และ iodine เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ร่วมกับ potassium iodine เข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งให้การเจริญเติบโตของโพโทคอร์มไลบอดีดีกว่าอาหารเหลวสังเคราะห์ที่ทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ (Thepsithar and Thongpukdee, 2013) และจากการรายงานในการเพิ่มจำนวนยอดของอ้อยอาหารสังเคราะห์ที่ทำให้ปลอดเชื้อด้วย Sodium hypochlorite เข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ และ Mercuric chloride เข้มข้น 0.15 และ 0.20 เปอร์เซ็นต์ ให้จำนวนยอดต่อชิ้นส่วนที่สูงกว่าการฆ่าเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันสูง (Tiwari *et al.*, 2012) เป็นไปได้ว่าการฆ่าเชื้อในอาหารสังเคราะห์โดยไม่ผ่านความร้อนทำให้สารอาหารที่มีอยู่ไม่เกิดการสูญเสียและสารที่เติมเพื่อทำให้ปลอดเชื้อเป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของต้นพืชได้ด้วย

Table 1 Effect of ClO_2 on development of pineapple cv. Phulae cultured in bioreactor containing liquid MS medium supplemented with 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA for 16 weeks.

Sterilization method	Height (cm)±SD	No. of leaves ±SD	Leaf length (cm)±SD	No. of shoots ±SD
Autoclave	7.38±1.27 ^b	9.70±1.06 ^b	6.93±1.13 ^b	2.50±0.97 ^b
15 ppm ClO_2	10.13±1.00 ^a	11.00±1.41 ^a	9.77±1.02 ^a	6.10±2.13 ^a
C.V.(%)	13.08	12.07	12.85	38.53

Means of the same category followed by different letters are significantly different from each other using LSD test at 0.05 level of probability.

BA เป็นสารความคุมการเจริญเติบโตในพืชที่จัดอยู่ในประเภทไซโตไคนินมีบทบาทสำคัญในกระบวนการแบ่งเซลล์ การขยายตัวของเซลล์ การเกิดตาข้าง และการชักนำการเกิดยอดรวมในกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อ จากการศึกษานี้พบว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ BA ส่งผลให้สับปะรดมีการสร้างยอดที่มากขึ้น (Figure 1B) เมื่อใช้ BA เข้มข้น 0.25 มิลลิกรัม/ลิตร ให้จำนวนยอดสูงสุด 7.8 ยอดต่อชิ้นส่วน (Table 2) เมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 12 สัปดาห์ แต่พบว่าเมื่อมีการสร้างยอด และจำนวนใบที่มากขึ้นกลับทำให้มีการ

เจริญเติบโตทางด้านความสูง และความยาวใบลดลง สอดคล้องกับรายงานการเพาะเลี้ยงกระจุยซึ่งพบว่าการเพิ่มความเข้มข้นของ BA ส่งผลให้มีการสร้างยอดรวมมากขึ้น แต่ความสูงของต้นลดลง (Domyos and Te-chato, 2013) อย่างไรก็ตามการเพาะเลี้ยงกล้วยไม้หวาย Sakura Pink ในอาหารเดิม BA เข้มข้นสูงทำให้จำนวนยอดลดลง (โสภา และ วลีณี, 2555) เช่นเดียวกับการเพาะเลี้ยง *Bienertia sinuspersici* ซึ่งพบว่า BA ความเข้มข้นสูงส่งผลให้ยอดยืดยาวได้ช้า (Northmore *et al.*, 2012)

Table 2 Effect of BA on shoot formation of pineapple cv. Phulae cultured in bioreactor containing liquid MS medium supplemented with 15 ppm ClO₂ for 12 weeks.

NAA/BA	Height (cm)±SD	No. of leaves±SD	Leaf length (cm)±SD	No. of shoots±SD
0.06/0.03	6.49±2.57 ^a	7.23±1.53 ^{ab}	4.25±1.57 ^a	3.00±1.58 ^b
0.06/0.06	3.21±2.83 ^b	5.27±3.12 ^{ab}	2.08±2.20 ^b	2.60±2.70 ^b
0.06/0.10	2.02±1.67 ^b	4.91±3.33 ^b	1.15±0.96 ^b	3.20±2.59 ^b
0.06/0.25	3.69±1.49 ^{ab}	8.41±1.13 ^a	1.92±0.75 ^b	7.80±3.77 ^a
C.V.(%)	57.48	38.30	63.07	66.76

Means of the same category followed by different letters are significantly different from each other using LSD test at 0.05 level of probability.

การศึกษาความเข้มข้นที่เหมาะสมในการกำจัด การปนเปื้อนของเชื้อรา คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงมีประสิทธิภาพดีกว่าที่ความเข้มข้นต่ำ และที่ คลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้น 100 ppm พบการปนเปื้อนของเชื้อรา 0 เปอร์เซ็นต์ (Table 3) หลังจากวางเลี้ยงเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังนั้นคลอรีนไดออกไซด์มีประสิทธิภาพในการกำจัดการปนเปื้อนได้ 100 เปอร์เซ็นต์ สอดคล้องกับการทำให้ปลอดเชื้อในอาหารเพาะเลี้ยงเยอร์บีรา (Cardoso and Silva, 2012) แต่ผลของคลอรีนไดออกไซด์ความเข้มข้นสูงทำให้การ

เจริญเติบโตของสับปะรดชะงักในระยะแรก และการเจริญเติบโตดีขึ้นหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 2 เดือน ต้นสับปะรดที่สมบูรณ์มีทั้งรากและยอดมีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์ (Figure 1D) หลังจากอนุบาลเป็นเวลาหนึ่งเดือน นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้ก๊าซ คลอรีนไดออกไซด์ว่ามีประสิทธิภาพในการกำจัดเชื้อปนเปื้อนในอากาศของห้องในโรงพยาบาล (Lowe *et al.*, 2013) และควบคุมการปนเปื้อนในน้ำ อาหาร และอื่นๆ (Zhengyong *et al.*, 2010)

Table 3 Effect of different concentrations of ClO_2 on contamination of fungi in pineapple cv. Phulae cultured in bioreactor for 4 weeks.

Conc. of ClO_2	Percentage of contamination			
	1 week	2 weeks	3 weeks	4 weeks
1 ppm	100	100	100	100
5 ppm	100	100	100	100
10 ppm	0	100	100	100
15 ppm	0	100	100	100
50 ppm	0	0	50	100
100 ppm	0	0	0	0

สรุป

การเพาะเลี้ยงสับปะรดด้วยระบบไบโอรีแอคเตอร์สามารถเพิ่มจำนวนต้นสับปะรดได้อย่างรวดเร็วโดยไม่ต้องสิ้นเปลืองแรงงานในการย้ายเลี้ยง และการใช้คลอรีนไดออกไซด์ทำให้อาหารเหลือสำหรับเพาะเลี้ยงปลอดเชื้อนั้นมีประสิทธิภาพที่ดีกว่าการทำให้ปลอดเชื้อโดยหม้อนึ่งความดันไอน้ำ และการเพิ่มความเข้มข้น

ของ BA มีผลให้ต้นสับปะรดมีการสร้างยอดรวมมากขึ้น แต่มีการเจริญเติบโตที่ลดลง ด้านการกำจัดกาปนเปื้อนของเชื้อราจำเป็นต้องใช้คลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูง และการใช้คลอรีนไดออกไซด์ที่ความเข้มข้นสูงส่งผลให้การเจริญเติบโตของต้นสับปะรดชะงักในช่วงแรก ทำการอนุบาลต้นสับปะรดในดินผสม มีอัตราการรอดชีวิต 100 เปอร์เซ็นต์

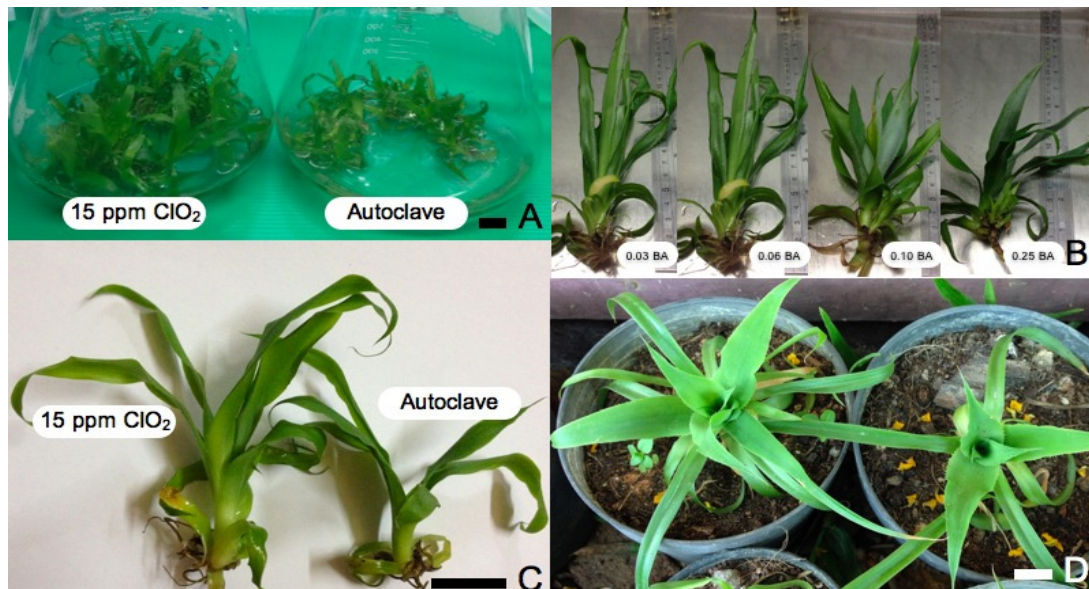


Figure 1 Micropropagation of pineapple cv. Phulae in bioreactor. (A) Multiple shoot development in MS medium with 3% sucrose, 0.06 mg/l NAA and 0.03 mg/l BA sterilized with 15 ppm ClO_2 and autoclave for 4 weeks. (B) Shoot development on MS medium supplemented with 0.06 mg/l NAA and 0.03-0.25 mg/l BA for 12 weeks. (C) Development of shoot after culture for 16 weeks. (D) Survival of plantlets after transferring to soil for 1 month (scale bars = 2 cm).

คำขอบคุณ

ขอขอบคุณห้องปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพของพืชปลูก ภาควิชาพืชศาสตร์ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์วิทยาเขตหาดใหญ่ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยนราธิวาสราชนครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- สุภัทราพร มหาแก้ว. 2536. ประสิทธิภาพของคลอรีนไดออกไซด์ ในการลดปริมาณเชื้อ *Salmonella typhimurium* ใน กระบวนการผลิตไก่แช่เยือกแข็ง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- โสหา ชูเพ็ง และ วลีณี ไชยสุวรรณ 2555. ผลของ PBZ BA และ TDZ ต่อการเจริญเติบโตของกล้วยไม้หวาย Sakura Pink ในสภาพปลอดเชื้อ. แก่นเกษตร 40 ฉบับพิเศษ : 381-387.
- Cardoso, J.C. and J.A.T. Silva. 2012. Micropropagation of gerbera using chlorine dioxide (ClO₂) to sterilize the culture medium. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 48(3): 362–368.
- Chen, Z. and C. Zhu. (2011). Modelling inactivation by aqueous chlorine dioxide of *Dothiorella gregaria* Sacc. and *Fusarium tricinctum* (Corda) Sacc. spores inoculated on fresh chestnut kernel. *Letters in Applied Microbiology* 52(6): 676–684.
- Domyos, P. and S. Te-chato. 2013. *In vitro* propagation of *Lepironia articulate* in Kuan Kreng Peatlands, Nakhon Si Thammarat. *Journal of Agricultural Technology* 9(6):1595-1605.
- Ducos, J.P., C. Lambot and V. Pétiard. 2007. Bioreactors for coffee mass propagation by somatic embryogenesis. *International Journal of Plant Developmental Biology* 1(1): 1-12.
- Gorret, N., S.K. Rosli, S.F. Oppenheim, L.B. Willis, P.A. Lessard, C. Rha, A.J. Sinskey. 2004. Bioreactor culture of oil palm (*Elaeis guineensis*) and effects of nitrogen source, inoculum size, and conditioned medium on biomass production. *Journal of Biotechnology* 108(3): 253–263.
- Han, Y., D.M. Sherman, R.H. Linton, S.S. Nielsen, P.E. Nelson. 2000. The effects of washing and chlorine dioxide gas on survival and attachment of *Escherichia coli* O157: H7 to green pepper surfaces. *Food Microbiology* 17(5): 521–533.
- Huang, J., L. Wang, N. Ren, F. Ma and J. Ma. 1997. Disinfection effect of chlorine dioxide on bacteria in water. *Water Research* 31(3): 607-613.
- López-Velasco, G., A. Tomás-Callejas, A. Sbodio, F. Artés-Hernández, T. V. Suslow. 2012. Chlorine dioxide dose, water quality and temperature affect the oxidative status of tomato processing water and its ability to inactivate Salmonella. *Food Control* 26(1): 28–35.
- Lowe J.J., S.G. Gibbs, P.C. Iwen, P.W. Smith and A.L. Hewlett. 2013. Impact of chlorine dioxide gas sterilization on nosocomial organism viability in a hospital room. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 10(6): 2596-2605.
- Northmore, J.A., V. Zhou and S.D.X. Chuong. 2012. Multiple shoot induction and plant regeneration of the single-cell C4 species *Bienertia sinuspersici*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 108(1): 101-109.
- Thepsithar, C. and Thongpukdee, A. 2013. Sterilisation of hyponex medium by chemicals without autoclaving and growth of phalaenopsis protocorms. *World Academy of Science, Engineering and Technology* 7(6) 810-813.
- Tiwari, A. K., S. Tripathi, M. Lal and S. Mishra. 2012. Screening of some chemical disinfectants for media sterilization during *in vitro* micropropagating of sugarcane. *Sugar technology* 14 (4) 364-369.
- Zhengyong, W., L. Fupin, L. Jianrong, L. Wenchu, Z. Yangsheng, T. Peichan and H. Ziran. 2010. Inactivation and mechanisms of chlorine dioxide on *Nosema bombycis*. *Journal of Invertebrate Pathology* 104: 134–139.