

การศึกษากระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ และการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อน ในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

The study of orchid tissue culture processes and Detection of bacterial contamination in the tissue culture bottles

เทพพิทักษ์ จีวร่า¹, พีวา ชัชวาลวิมล¹, พัชรี รุ่งอัครวัฒน์¹, พิมพชนก ศรีปะโค¹
นันทน์ภัส เทพสำราญ², สิริแซ พงษ์สวัสดิ์³, ทรงพล จำดิษฐ์³
สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
39 หมู่ 1 ถนนรังสิต - นครนายก อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี 12110

สถานที่ปฏิบัติสหกิจ : ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออร์คิดส์

บทคัดย่อ

การปฏิบัติงานสหกิจศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ เริ่มตั้งแต่การปฏิบัติกรเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ในตู้ปลอดเชื้อ การตรวจสอบสิ่งปนเปื้อนที่เกิดขึ้นภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและการตรวจสอบเชื้อแบคทีเรียที่ปนเปื้อนในขวดเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นปัญหาที่สำคัญของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้จากการศึกษาพบว่าสาเหตุที่สำคัญของการปนเปื้อน คือ การทำความสะอาดอุปกรณ์และความรู้เรื่องเทคนิคปลอดเชื้อของพนักงานยังไม่เพียงพอ ซึ่งบริษัทได้ใช้ผลการทดลองของนักศึกษาสหกิจชี้แจงและสร้างความเข้าใจ ให้กับพนักงานเกี่ยวกับเทคนิคปลอดเชื้อที่ถูกต้องเพื่อช่วยลดการปนเปื้อนซึ่งเป็นการแก้ปัญหา ที่ต้นเหตุได้อย่างแท้จริง

คำสำคัญ : การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช

1. บทนำ

ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออร์คิดส์ ก่อตั้งขึ้นในปี 1980 โดยนายประยูร พลอยพรหมมาศ ซึ่งเริ่มต้นธุรกิจกล้วยไม้ครั้งแรกในตลาดญี่ปุ่น สหรัฐอเมริกา เกาหลี และจีน ต่อมาประยูร ออร์คิดส์ ได้ขยายสาขาที่สองและสาขาที่สามที่มีห้องปฏิบัติการ และได้เพิ่มจำนวนพนักงานจนถึง 300 คน ภายในระยะเวลา 33 ปี ในปัจจุบันประยูร ออร์คิดส์ เริ่มส่งออกกล้วยไม้ไปยังสหราชอาณาจักร บราซิลและประเทศต่าง ๆ ในทวีปยุโรป

ในปีการศึกษา 2556 สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ได้รับความอนุเคราะห์จากห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออร์คิดส์ รับส่งนักศึกษาไปออกสหกิจที่ประยูร ออร์คิดส์ เพื่อศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ การออกสหกิจครั้งนี้นักศึกษาได้พบปัญหาการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อให้เกิดความเสียหายกับผลผลิตของบริษัท การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นการสำรวจชนิดและแหล่งที่มาของแบคทีเรียที่ปนเปื้อนเพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาต่อไป

2. เนื้อหาของงาน และวิธีการดำเนินงาน

2.1 การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุการปนเปื้อน

2.1.1 การเก็บตัวอย่างโดยวิธีการตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิว
ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์บริเวณพื้นผิวของอุปกรณ์ที่พนักงานใช้สำหรับการตัดชิ้นส่วนกล้วยไม้นั้น เป็นขั้นตอนหนึ่งที่น่าไปสู่การตรวจสอบสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นภายในขวดเพาะเนื้อเยื่อกล้วยไม้ โดยใช้ไม้พันสำลี (Cotton Swab) ป้ายบริเวณพื้นผิวของอุปกรณ์ที่พนักงานใช้ทำงาน ซึ่งขอบเขตที่ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ คีมที่พนักงานใช้สำหรับคีบชิ้นส่วนกล้วยไม้ บริเวณใบมีดที่พนักงานใช้สำหรับตัดชิ้นส่วนกล้วยไม้ บริเวณเตียงรองจานและจานรองตัดชิ้นส่วนกล้วยไม้ บริเวณพื้นตู้ปลอดเชื้อที่มีการตัดชิ้นส่วนกล้วยไม้ บริเวณผิวของขวดเพาะเลี้ยงรวมทั้งภายในขวด และ ป้ายบริเวณพื้นผิวผ้าที่แช่ภายในภาชนะบรรจุแอลกอฮอล์เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไม้พันสำลีจุ่มลงในน้ำเกลือ (Normal saline solution) 0.90 เปอร์เซ็นต์

1. นักศึกษาสหกิจ สาขาชีววิทยา สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
2. ผู้จัดการฝ่ายห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออร์คิดส์
3. อาจารย์นิเทศ

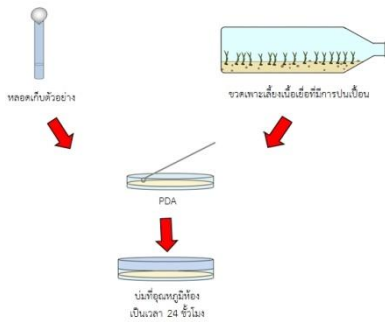
ขั้นตอนการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์



รูปที่ 1 การเก็บตัวอย่างจากอุปกรณ์

2.1.2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เก็บตัวอย่างจากอุปกรณ์แล้วนำกลับมาเพาะเชื้อในห้องปฏิบัติการสาขาวิชาชีววิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี โดยนำตัวอย่างมาเพาะบนอาหาร PDA (Potato Dextrose Agar) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง ตามลำดับ



รูปที่ 2 การเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

2.1.3 การตรวจสอบพื้นฐานวิทยาของเชื้อจุลินทรีย์

หลังบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์บนจานเพาะเลี้ยง เมื่อพบการเจริญของจุลินทรีย์ จึงตรวจสอบพื้นฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียโดยใช้เทคนิคการย้อมแกรม (Gram Stain) แล้วศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ

2.2 การศึกษาลักษณะของแบคทีเรียที่พบในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

นำตัวอย่างขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้ที่พบการเจริญของแบคทีเรียมาตรวจสอบ โดยนำแบคทีเรียที่พบมา Streak ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อ NA (Nutrient Agar) บ่มไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 24 ถึง 48 ชั่วโมง เพื่อดูการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ จากนั้นนำมาย้อมแกรมและส่องดูลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แล้วศึกษารูปร่างและการจัดเรียงตัวของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดเลนส์ประกอบ



รูปที่ 3 เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

3. ผลการดำเนินงาน

3.1 การตรวจหาเชื้อจุลินทรีย์สาเหตุการปนเปื้อน

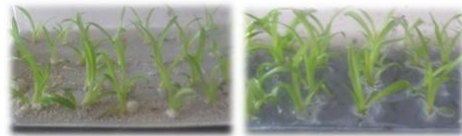
จากการตรวจหาสาเหตุของการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์จากอุปกรณ์ที่พนักงานใช้ทำงาน และขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อที่มีการปนเปื้อนของแบคทีเรีย เมื่อนำผลจากการตรวจสอบลักษณะพื้นฐานวิทยาของแบคทีเรียที่เกิดจากอุปกรณ์มีผลดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การตรวจพบการปนเปื้อนของจุลินทรีย์จากอุปกรณ์

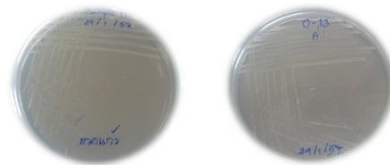
พนักงาน	จุดที่พบเชื้อ							
	เตียง	คีมทำความสะอาด	ถังขยะ	มิด	จาน	ขวดน้ำ	พื้นที่สดไม้ (ก่อน)	พื้นที่สดไม้ (หลัง)
พนักงาน คนที่ 1	+	+	-	+	-	+	+	+
พนักงาน คนที่ 2	-	-	-	+	+	+	-	-
พนักงาน คนที่ 3	+	-	+	-	-	-	-	-
พนักงาน คนที่ 4	-	+	-	-	-	-	-	+

3.2 การตรวจสอบเชื้อภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้

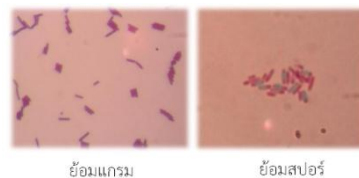
จากการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเชื้อจุลินทรีย์ส่วนใหญ่มีลักษณะเป็นรูปท่อนแกรมบวก และบางชนิดสามารถสร้างเอนโดสปอร์ได้



รูปที่ 4 การปนเปื้อนที่พบภายในขวดเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้



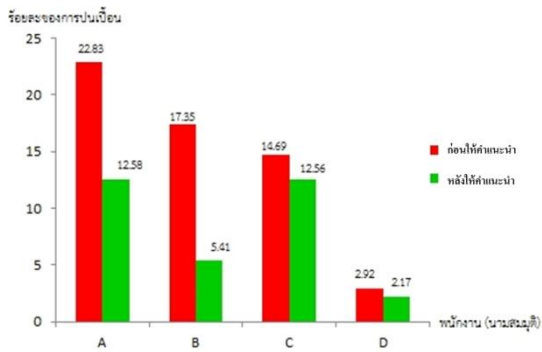
รูปที่ 5 ตัวอย่างการเจริญของแบคทีเรียที่ตรวจพบ



รูปที่ 6 รูปร่าง การจัดเรียงตัวและเอนโดสปอร์ของแบคทีเรียที่พบ

4. สรุป

ผลการทดลองพบว่าแบบที่เรียกที่ปนเปื้อนในขวดเพาะเลี้ยงส่วนใหญ่มีลักษณะคล้ายกับแบบที่เรียกที่พบจากอุปกรณ์ของพนักงาน รวมทั้งจากการสังเกตพนักงานในขณะที่ปฏิบัติงานพบว่า พนักงานบางท่านยังมีวิธีปฏิบัติและเทคนิคปลอดภัยที่ไม่ถูกต้อง ทั้งนี้เมื่อพิจารณาจากข้อมูลของฝ่ายบุคคลพบว่า พนักงานส่วนใหญ่เป็นลูกจ้างที่ไม่ได้จบการศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาโดยตรง ทางบริษัทจึงนำผลการทดลองที่ได้ไปชี้แจงและสร้างความเข้าใจ รวมถึงให้นักศึกษาทดลองแนะนำวิธีการปฏิบัติงานที่ถูกต้องแก่พนักงานกลุ่มตัวอย่าง ซึ่งพบว่าพนักงานกลุ่มตัวอย่างมีเปอร์เซ็นต์เกิดการปนเปื้อนในขวดเพาะเลี้ยงลดลง (ดังรูปที่ 7)



รูปที่ 7 ร้อยละของการปนเปื้อนจุลินทรีย์จากพนักงานกลุ่มตัวอย่าง

5. กิตติกรรมประกาศ

การปฏิบัติสหกิจศึกษาครั้งนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ด้วยความอนุเคราะห์จากสถานประกอบการและผู้เกี่ยวข้องดังนี้

1. ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออคิตส์
2. คุณประยูร พลอยพรหมมาศ ผู้บริหารห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออคิตส์
3. คุณนันทน์ภัส เทพสำราญ ผู้นิเทศงานของสถานประกอบการ
4. คุณอรรรตพล วิศิษฐวณิชช์ ผู้ช่วยผู้จัดการฝ่ายห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช
5. คุณอารีย์ จันทะสุด หัวหน้าตรวจสอบคุณภาพงานภายในห้องปฏิบัติการ
6. ผู้ช่วยศาสตราจารย์ดร.สิริแซ พงษ์สวัสดิ์ อาจารย์นิเทศงาน
7. อาจารย์ทรงพล จำดิษฐ์ อาจารย์นิเทศงาน
8. คณาจารย์สาขาวิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

นักศึกษาขอกราบขอบพระคุณทุกท่านที่ให้การสนับสนุนและให้คำแนะนำต่าง ๆ ในระหว่างการปฏิบัติสหกิจ ทำให้การปฏิบัติงานลุล่วงได้ตามเป้าหมายที่ตั้งไว้ทุกประการ

เอกสารอ้างอิง

คู่มือสหกิจศึกษา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี 2551 คำานูณ กาญจนภูมิ. (2542). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช.

พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รังสฤษฏ์ กาวิต๊ะ. (2545). การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ : หลักการและเทคนิค. พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

รายละเอียดสถานประกอบการ. 2553. [ออนไลน์].

ได้จาก : <http://eureka.bangkokbiznews.com>

ห้างหุ้นส่วนจำกัด ประยูร ออคิตส์ ที่คลอง 11. 2555. [ออนไลน์].

ได้จาก : <http://facebook.com/PrayoonOrchids>

ORCHID LAND. 2555. [ออนไลน์].

ได้จาก : <http://facebook.com/PrayoonOrchids>

ประวัติผู้เขียนบทความ



นายเทพพิทักษ์ จีวร่าง
สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
46 ตำบลเชียงรากน้อย อำเภอบางปะอิน
จังหวัดพระนครศรีอยุธยา 13180
08-55684278
tpt_n06@hotmail.com



นายพีวา ชัยสวัสดิ์
สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
201/1111 ตำบลลำผักกูด อำเภอธัญบุรี
จังหวัดปทุมธานี 12110
08-32415114
Armlj_choco@hotmail.com



นางสาวพัชรี รุ่งอัครวัฒน์
สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
281 ตำบลหนองบอน อำเภอประเวศ
กรุงเทพมหานคร 10250
08-55180380
Prawwa91@hotmail.com



นางสาวพิมพ์ชนก ศรีปะโค
สาขาวิชาชีววิทยา
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
10 หมู่ที่ 4 ตำบลบ้านจั่น อำเภอเมือง
จังหวัดอุดรธานี 41000
08-34507369
purezee_hippii@windowslive.com