abst.

วศ กช
ชว 46

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6 ว

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง อี. โคไล (*E. coli* ATCC 25922) และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048)

นางชุติมา วิไลพันธ์

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

กรมวิทยาศาสตร์บริการ

เอกสารผลงานที่เสนอประเมิน
เพื่อแต่งตั้งให้ดำรงตำแหน่งนักวิทยาศาสตร์ 6 ว

การศึกษาอุณหภูมิที่เหมาะสมสำหรับการเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
อี. โคไล (*E. coli* ATCC 25922) และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส*
(*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048)

เลขหมู่ วฝ กช
อว 46
เลขทะเบียน 11252
วันที่ 9, ส.ค., 46

นางชุติมา วิไลพันธ์

ด้วยอภินันทนาการ
จาก
ชุติมา วิไลพันธ์

กลุ่มงานจุลชีววิทยา
กองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ
กรมวิทยาศาสตร์บริการ
กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม

สำนักหอสมุดและศูนย์สารสนเทศวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี

บทคัดย่อ

จากการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* (*E. coli* ATCC 25922) และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* (*Enterobacter aerogenes* ATCC 13048) ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน ในอาหารนิวเตรียนท์บรอท (nutrient broth) ที่ผสมกลีเซอรอล (glycerol) ในปริมาณร้อยละ 10 ซึ่งเป็นสารป้องกันความเย็นหรือไครโอโพรเทคแตนท์ (cryoprotectant) โดยบรรจุในหลอดพลาสติกขนาดเล็กชนิดที่ใช้หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ (microcentrifuge tube) หลอดละ 1 มิลลิลิตร พบว่าที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ศึกษาทั้งสองชนิดยังคงมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่เท่าเดิมหลังจากการเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตลดลงตามลำดับของระยะเวลาการเก็บตั้งแต่เดือนที่ 1-12 โดยเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในเดือนที่ 12 คิดเป็นร้อยละ 60.21 และ 73.7 ตามลำดับ

ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสจึงเป็นวิธีการที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงเพื่อใช้เตรียมเป็นเชื้อที่ใช้งาน (working culture) ในการควบคุมคุณภาพการวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยา

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	i
สารบัญตาราง	ii
สารบัญภาพ	iii
1. คำนำ	1
ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง	19
วัตถุประสงค์	20
ระยะเวลาดำเนินการ	20
ประโยชน์ที่ได้รับ	20
2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ	21
3. ผลการทดลอง	25
4. วิจารณ์ผลการทดลอง	35
5. สรุปผลการทดลอง	37
กิตติกรรมประกาศ	38
เอกสารอ้างอิง	39
ภาคผนวก	
อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์และวิธีเตรียม	40
สารเคมีและวิธีเตรียม	41

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 จำนวนศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ของแต่ละประเทศ 2

ตารางที่ 2 ศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้บริการเชื้อจุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรม 9

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน 25

ตารางที่ 4 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน 27

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ*เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ -80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน 33

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส 26

ภาพที่ 2 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน 28

ภาพที่ 3 จำนวนเซลล์ เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิต หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ-20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 เดือน และ 12 เดือน 29

ภาพที่ 4 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 เดือน และ 12 เดือน 30

ภาพที่ 5 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิต หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 เดือน และ 12 เดือน 31

ภาพที่ 6 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ที่ระยะเวลา 0 เดือน และ 12 เดือน 32

ภาพที่ 7 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน 34

1. คำนำ

การศึกษาทางจุลชีววิทยาต้องอาศัยเชื้อจุลินทรีย์ที่บริสุทธิ์ (pure culture) และมีลักษณะคงที่ ซึ่งต้องใช้เทคนิคพิเศษในการเก็บรักษา เพราะเชื้อจุลินทรีย์อาจเกิดการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์อื่นและเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะหรือตายไป

เชื้อจุลินทรีย์เกี่ยวข้องกับชีวิตของพืช สัตว์ และมนุษย์ตลอดจนสิ่งแวดล้อมทั้งในปัจจุบันและอดีต โดยเฉพาะประมาณกลางศตวรรษที่ 19 นั้น เชื้อจุลินทรีย์ได้ก่อโรคแอนแทรกซ์ระบาดต่อสัตว์เลี้ยง ซึ่ง Louis Pasteur และ Robert Koch ได้แก้ปัญหาอันเกิดจากแบคทีเรียเป็นสาเหตุและต่อมาการพัฒนาทางด้านจุลชีววิทยาได้เริ่มเข้าสู่ยุคใหม่ มีการแยกเชื้อจุลินทรีย์จากแหล่งธรรมชาติเพื่อนำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแอลกอฮอล์ กรดอินทรีย์ เอนไซม์ และสารปฏิชีวนะ อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากมายที่แยกได้ระหว่างการทำวิจัยได้สูญหาย และไม่มีอยู่แล้วในปัจจุบันเนื่องจากไม่มีการเก็บรักษาไว้ นอกจากนั้นปัจจุบันมีการใช้เชื้อจุลินทรีย์สำหรับการศึกษาทางจุลชีววิทยา ชีวเคมีขั้นสูง พันธุวิศวกรรม อณูชีววิทยาและเทคโนโลยีชีวภาพ เชื้อจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญไม่เพียงทางด้านการศึกษาประยุกต์และทางการแพทย์เท่านั้นแต่หมายถึงวิทยาการเกี่ยวกับชีวิตมนุษย์ด้วย[1,7]

ในช่วงระยะต้นจนถึงกลางศตวรรษที่ 20 ในต่างประเทศมีการก่อตั้งสถาบันเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งในมหาวิทยาลัย และหน่วยงานที่มีการศึกษาและวิจัยทางด้านจุลชีววิทยา เช่น American Type Culture Collection (ATCC) ของสหรัฐอเมริกา Centraalbureau voor Schimmelcultures (CBS) ของเนเธอร์แลนด์ National Collection of Type Culture (NCTC) ของอังกฤษ และ Institute of Applied Microbiology (IAM) ของญี่ปุ่น สถาบันดังกล่าวนี้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทั้งแบคทีเรีย ยีสต์ ราโปรโตซัว สาหร่าย และ ไวรัส ปัจจุบันมีศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ของแต่ละประเทศทั่วโลก ดังตารางที่ 1 สำหรับประเทศไทยนั้นมีศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ทางการเกษตรและอุตสาหกรรม คือ Bangkok MIRCEN (Microbiological Resources Center) ซึ่งเป็นหน่วยงานในสถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

ตารางที่ 1 จำนวนศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ของแต่ละประเทศ

ประเทศ	จำนวนศูนย์
สหรัฐอเมริกา	31
อังกฤษ	25
ฝรั่งเศส	14
สเปน	2
สวีเดน	4
โปแลนด์	5
เยอรมนี	14
แคนาดา	28
รัสเซีย	9
เชคโกสโลวาเกีย	15
เนเธอร์แลนด์	8
นิวซีแลนด์	9
อาฟริกาใต้	3
อินเดีย	12
จีน	12
ไต้หวัน	1
เกาหลีใต้	2
ญี่ปุ่น	23
มาเลเซีย	3
ฟิลิปปินส์	8
อินโดนีเซีย	14

ที่มา : Sugawara *et al.* World Directory of Collection of Cultures of Microorganisms.1993, P.211-222.

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์[1,3,7]

1. สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นจะเป็นไปตามลักษณะของงานว่าต้องการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นระยะเวลานานเท่าใด เช่นระยะสั้น ในช่วงสองถึงสามวัน ซึ่งในกรณีนี้มักเข้าใจว่าเป็นเพียงการบำรุงรักษา (maintenance) มากกว่าการเก็บรักษา (preservation) หรือเก็บรักษาเป็นระยะเวลาที่ไม่จำกัด เช่น การเก็บรักษาของศูนย์รวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งเป็นการเก็บเพื่อยืดอายุเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์ ทั้งนี้การบำรุงรักษาและการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทำได้หลายวิธีตามความแตกต่างของระยะเวลาการเก็บรักษาและลักษณะทางชีววิทยาของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ (แบคทีเรีย ไวรัส สาหร่าย โปรโตซัว ยีสต์และรา)

จุดประสงค์ของการบำรุงรักษาและเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ คือ เพื่อรักษาให้เชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตรอด ไม่มีเชื้อจุลินทรีย์อื่นปะปน และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะรวมทั้งเพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นสต็อกอย่างเพียงพอ และมีระบบที่เหมาะสมเพื่อทำให้มีเชื้อจุลินทรีย์ทดแทนตามความต้องการ

ภาวะงานบางอย่างที่ต้องการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เพียงระยะเวลาสั้น เช่น ในห้องปฏิบัติการวินิจฉัยทางคลีนิกที่มีงานมากมาย การบำรุงรักษาเชื้อจุลินทรีย์จึงจำเป็นเฉพาะระยะเวลาระหว่างการวินิจฉัยเพื่อรายงานผล ซึ่งอาจขาดการระมัดระวังดูแลเชื้อจุลินทรีย์ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ตายหรือสูญหายไป เพราะเสียเวลาวินิจฉัยเชื้อจุลินทรีย์นานหรือต้องส่งเชื้อจุลินทรีย์ไปยังผู้เชี่ยวชาญในห้องปฏิบัติการอื่นเพื่อตรวจสอบซ้ำอีกหรือพบว่าเชื้อจุลินทรีย์อาจไม่ทนทานและตายไปหลังจากที่วางไว้บนโต๊ะเพียงหนึ่งหรือสองวันเช่น แบคทีเรียที่ไม่ต้องการอากาศ จะตายไปภายในเวลาเพียงสองถึงสามชั่วโมงเมื่อสัมผัสออกซิเจน เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์ในภาวะงานช่วงสั้นดังกล่าวนี้ จึงต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์ (subculture) ลงในอาหารที่เหมาะสมภายในภาชนะที่ปิดกันอากาศได้ แล้วเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิต่ำและวางแผนต่อเชื้อจุลินทรีย์ครั้งต่อไป

ข้อควรระวังอย่างง่าย ๆ นี้เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เป็นเดือน แต่จะไม่สะดวกและไว้ใจไม่ได้เมื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากเป็นระยะเวลานาน ปัญหาหลายอย่างที่เกิดขึ้นในการต่อเชื้อจุลินทรีย์เป็นประจำ รวมทั้งความต้องการในการเจริญ

แตกต่างกันของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดที่ต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์บ่อย ๆ เป็นสัปดาห์หรือเดือน เช่น ความเสี่ยงต่อการปะปนของเชื้อจุลินทรีย์จากอากาศระหว่างการต่อเชื้อจุลินทรีย์ ความผิดพลาดจากการเขียนรหัสเชื้อจุลินทรีย์และการเปลี่ยนแปลงพันธุกรรมของเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากนี้ยังเป็นภาระในการเก็บบันทึกข้อมูล

ถ้าต้องการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นเวลานาน เป็นปีหรือหลายปีควรคำนึงถึงวิธีพิเศษอื่น ๆ กรณีงานวิจัยต่าง ๆเช่น การสำรวจและการคัดเลือกเชื้อจุลินทรีย์ หรืออื่นๆ ที่ทราบถึงเป้าหมายแน่นอน ถ้าหากเตรียมโครงการโดยไม่วางแผนการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แล้วนั้นจะส่งผลทำให้โครงการนั้นต้องใช้เวลาหลายปี นักจุลชีววิทยาต้องคิดเสมอว่าเชื้อจุลินทรีย์เป็นวัสดุพื้นฐาน ถ้าปราศจากเชื้อจุลินทรีย์จะทำงานไม่ได้ จึงควรต้องทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นอย่างดี เช่น การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีพิเศษบางอย่างเพื่อบำรุงรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้นานสองถึงสามปี เช่น การทำแห้งอย่างง่าย ๆ ในดินที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์บนเม็ดแก้ว (glass beads) เม็ดพลาสติก (plastic beads) แผ่นกระดาษหรือเจลาตินดิสก์ (paper or gelatin discs) หรือใช้วิธีทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง (freeze drying) และการเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ซึ่งเหมาะสมในการเก็บเชื้อจุลินทรีย์เป็นระยะเวลานาน และเป็นวิธีที่นิยมใช้ในศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์

มีเทคนิคการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์หลายวิธีที่นิยมใช้กัน วิธีการทั้งหมดมีทั้งที่เป็นประโยชน์เฉพาะด้าน และวิธีที่ใช้สำหรับทั่วไป จึงเป็นการยากในการตัดสินใจเลือกวิธีการใดวิธีการหนึ่ง การเลือกวิธีการใดควรอาศัยคุณสมบัติของวิธีการนั้นต่อความต้องการของผู้ใช้ และคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

1. การรักษาให้เชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิต ในระหว่างการเก็บรักษาเซลล์อาจตายได้ เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์จึงควรคำนึงถึงวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์มีชีวิตรอดมากที่สุด ทั้งขณะทำการเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษา

2. การเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเชื้อจุลินทรีย์ระหว่างการเก็บรักษา ในช่วงการเก็บรักษามีสภาวะแวดล้อมที่เปลี่ยนแปลงไปจากสภาวะปกติ ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ต้องมีการปรับสภาพเพื่อให้รอดชีวิต โดยเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความอ่อนแอซึ่งไม่สามารถปรับสภาพให้ทนต่อสภาวะแวดล้อมในการเก็บรักษาได้จะตายไป ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่สามารถรอดชีวิต

จะมีคุณสมบัติเปลี่ยนไปจากเดิมที่เริ่มทำการเก็บรักษาแต่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงในระดับของสารพันธุกรรม ดังนั้นการเก็บรักษาที่ดีควรให้มีเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด และให้คงลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นที่สุด

3. การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาไม่ให้สูญหายไป แต่เชื้อจุลินทรีย์อาจกลายพันธุ์ระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาที่ดีจึงควรลดการเปลี่ยนแปลงนี้

4. ความบริสุทธิ์ เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาควรอยู่ในสภาพบริสุทธิ์และควรลดโอกาสการปะปนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นขณะทำการเก็บรักษา

5. ค่าใช้จ่าย ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์นั้นค่าใช้จ่ายเป็นหัวใจที่สำคัญรวมถึงค่าจ้างผู้ร่วมงาน วัสดุ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่น เช่น สถานที่และพลังงาน รวมทั้งอุปกรณ์ที่มีราคาสูง เช่น เครื่องทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง เป็นต้น

6. จำนวนเชื้อจุลินทรีย์ สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาสัมพันธ์กับวิธีการเก็บรักษารวมทั้งการดำเนินงานช่วงแรกและการดำเนินงานขั้นต่อไป คือจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ เช่นศูนย์เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ขนาดเล็กจะมีภาระมากเมื่อเก็บเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากขึ้น และการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมากนั้นสิ่งที่มีผลกระทบคือสถานที่ที่ต้องใช้มากขึ้นในการเก็บรักษา

7. คุณค่าของเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญและประโยชน์สูงดังนั้นควรเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญด้วยวิธีการที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย ส่วนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีความสำคัญน้อยก็ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษา ทั้งนี้เพื่อความเหมาะสมและให้มีผลประโยชน์ที่สูงสุด

8. การบริการและขนส่งเชื้อจุลินทรีย์ ในกรณีที่ต้องการส่งเชื้อจุลินทรีย์ให้ผู้อื่น จำเป็นต้องมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่อย่างน้อยสองชุด โดยสามารถเลือกวิธีการขนส่งที่มีความสะดวกและเหมาะสมทั้งนี้ขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาและจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการส่ง เช่น การส่งเชื้อจุลินทรีย์ทางไปรษณีย์นั้นควรบรรจุหีบห่อที่เหมาะสม เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์รอดชีวิตขณะขนส่งและป้องกันเชื้อจุลินทรีย์จากสภาวะต่างๆ แต่อย่างไรก็ตามมีข้อจำกัดของการส่งทางไปรษณีย์ภายในประเทศและระหว่างประเทศ จึงต้องทราบถึงรายละเอียดข้อบังคับของแต่ละประเทศนั้นด้วย

9. ความถี่ของการใช้เชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์บางชนิด เช่น เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือการควบคุมคุณภาพอาจต้องใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ จึงควรคำนึงถึงความสะดวกในการเลี้ยงและความเสี่ยงต่อการปะปนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

หลักการในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ให้รอดชีวิต จำเป็นต้องมีความรู้ถึงลักษณะของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด การเก็บรักษาไว้เพียงระยะเวลาสั้นอาจสะดวกกว่าระยะเวลานาน ในการเก็บรักษาระยะเวลาสั้น นักจุลชีววิทยาต้องคุ้นเคยกับเชื้อจุลินทรีย์และวิธีการเก็บรักษา เช่น การต่อเชื้อจุลินทรีย์เป็นลำดับ ต้องเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์อย่างเหมาะสม อย่างไรก็ตามการเลือกใช้วิธีการหนึ่งอาจไม่เหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดหรือบางสายพันธุ์และไม่เหมาะสมตามสัดส่วนของระยะเวลาที่ต้องดูแลเอาใจใส่ การเลือกใช้วิธีใดจึงขึ้นอยู่กับความสมดุลของประโยชน์ที่เกิดขึ้น

การบริการของศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์จะใช้วิธีมาตรฐานที่ไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งจะลดปัญหาต่องานนั้น จากการตรวจสอบเอกสารถึงวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์หลายวิธี พบว่า ไม่สามารถประเมินค่าความแตกต่างของประสิทธิภาพ การปฏิบัติที่สำคัญคือการตรวจสอบว่าเชื้อจุลินทรีย์มีการเจริญอีกหรือไม่หลังจากการเก็บรักษา ควรนับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตจากการทำเริ่มแรกเปรียบเทียบกับผลภายหลังจากเก็บรักษาไว้นาน ผลจากการนับเชื้อจุลินทรีย์ที่นำออกมาเพาะเลี้ยง (recovery) จะทำให้ทราบว่าวิธีการเก็บรักษานั้นดีกว่ากันหรือไม่

2. ประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

Brock และคณะ[1] Sugawaraและคณะ[5] และ สมบูรณ์[7] ได้สรุปรวบรวมการแบ่งกลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้ศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ตามความสำคัญของการนำไปใช้ประโยชน์ ดังนี้

2.1 เชื้อจุลินทรีย์ทางด้านอนุกรมวิธาน (taxonomic strain) เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้เปรียบเทียบ โดยเฉพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสายพันธุ์ดั้งเดิมที่ได้มีการค้นพบเป็นครั้งแรกและมีการตั้งชื่อไว้ก่อนแล้ว (nomenclatural type หรือ type strain) จะต้องเก็บรักษาให้อยู่ในสภาพบริสุทธิ์และมีคุณสมบัติเหมือนเดิม หากเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้สูญหายหรือตายไปจะต้องเสนอเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ใหม่ (neotype

strain) ในชนิดเดียวกันขึ้นแทนเชื้อจุลินทรีย์เดิม โดยตีพิมพ์ลงใน International Journal of Systematic Bacteriology (IJSB) การเสนอนี้ต้องบรรยายถึงลักษณะเชื้อจุลินทรีย์และอ้างอิงเอกสารที่เกี่ยวข้อง และบ่งถึงศูนย์ที่เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์นี้ด้วย นอกจากนี้ยังเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง (reference strain) อื่นๆ เพื่อใช้เปรียบเทียบทั้งด้านอนุกรมวิธานและการตรวจสอบคุณสมบัติทางชีวเคมีบางประการ

2.2 เชื้อจุลินทรีย์ทางด้านการศึกษาและวิจัย (research and studied strain) ในงานด้านการสอนและการค้นคว้าและวิจัยบางอย่างนั้นจำเป็นต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ในการศึกษา ดังนั้นจึงต้องเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับงานสอนเบื้องต้น เช่น แบคทีเรียพวก *เอสเชอริเชีย โคไล (Escherichia coli) ซูโดโมแนส ฟลูออเรสเซน (Pseudomonas fluorescens) เซอราเทีย มาเซสเซน (Serratia marcescens) บาซิลลัส สับทิลิส (Bacillus subtilis)* และเชื้อจุลินทรีย์ประเภทอื่นตามจุดประสงค์ รวมทั้งมีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เกิดการกลายพันธุ์ไปแต่มีลักษณะพิเศษบางประการที่น่าสนใจศึกษา (special mutants) เพื่อใช้สำหรับงานค้นคว้าและวิจัยทั้งทางด้านพันธุศาสตร์ พันธุวิศวกรรมศาสตร์ และชีวเคมี

2.3 เชื้อจุลินทรีย์ทางการแพทย์ (medical strain) เป็นการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่เป็นสาเหตุของโรคต่อคนและสัตว์ เพื่อไว้ใช้เปรียบเทียบในการรักษาและป้องกันโรค แต่การเก็บรักษาจะต้องทำด้วยความระมัดระวัง เช่น แบคทีเรียที่สร้างสารพิษในอาหารได้แก่ *สแตไฟโลคอกคัส ออเรียส (Staphylococcus aureus) วิบริโอ พาราฮีโมไลติคัส (Vibrio parahaemolyticus)* และ *คลอสตริเดียม โบทูลินุม (Clostridium botulinum)*

2.4 เชื้อจุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรม (industrial strain) เชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มนี้เป็นกลุ่มที่มีประโยชน์ในการผลิตเพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ต่างๆ เช่น เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในกระบวนการผลิตแอลกอฮอล์ ขนม และแป้ง เช่น *แซคคาโรมัยซีส ซีรีวิเซีย (Saccharomyces cerevisiae)* เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตสารปฏิชีวนะ เช่น *สเตรปโตมัยซีส (Streptomyces spp.)* เชื้อราที่ใช้ผลิตกรดซิตริก เช่น *แอสเพอจิรัส ไนเจอ (Aspergillus niger)* แบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก เช่น *แลคโตบาซิลลัส (Lactobacillus spp.)* แบคทีเรียที่ผลิตกรดอะมิโน เช่น *คอรินีแบคทีเรียม กลูตามิคัม (Corynebacterium glutamicum)*

และ *อาร์เธอแบคเตอร์ โกลบิฟอร์มิส (Arthrobacter globiformis)* แบคทีเรียที่ผลิตกรดแอซีติก เช่น *อะซีโตแบคเตอร์ อะซิไต (Acetobacter aceti)* นอกจากนี้ยังเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการผลิตวัคซีนและผลิตเอนไซม์ ตลอดจนเชื้อจุลินทรีย์ที่แยกได้ใหม่ระหว่างการทำวิจัย เพื่อพัฒนาเชื้อจุลินทรีย์ในการเปลี่ยนแปลงวัตถุดิบที่มีค่าต่ำให้ได้สารประกอบใหม่ที่มีค่าสูงขึ้น

2.5 เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้สำหรับงานการตรวจวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีววิทยา (bioassay strain) ในงานวิคราะห์ที่ต้องตรวจวัดหาปริมาณสารเฉพาะบางอย่างนั้นจำเป็นต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์ เช่น การวิเคราะห์หาปริมาณสารปฏิชีวนะ วิตามิน และกรดอะมิโน ดังนั้นจึงต้องเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์เหล่านี้ไว้ เช่น *ไมโครคอกคัส ลูเตียส (Micrococcus luteus)* ใช้วิเคราะห์แอมพิซิลิน และเพนนิซิลิน *บาซิลลัส สับทิลิส* ใช้ในการวิเคราะห์สเตรปโตมัยซินและกานามัยซิน *แลคโตบาซิลลัส ลิชแมนนิไอ (Lactobacillus leichmannii)* ใช้ในการวิเคราะห์วิตามิน บี-12 *แลคโตบาซิลลัส แพลนตารัม (Lactobacillus plantarum)* ใช้วิเคราะห์ไบโอติน ไลซีน แมทไทโอนิน เฟนนิลอะลานีน และไทโรซีน เป็นต้น

2.6 เชื้อจุลินทรีย์สิทธิบัตร (patent strain) เป็นการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ได้มีการพัฒนาถึงขั้นการผลิตทางอุตสาหกรรมแล้ว ซึ่งโดยทั่วไปการถือสิทธิบัตรของสิ่งประดิษฐ์ใหม่ จะกระทำเมื่อพัฒนาสิ่งประดิษฐ์นั้นถึงขั้นใช้ประโยชน์สาธารณะแล้ว การเสนอเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ผลิตสารประกอบใหม่นั้นเป็นไปตามกฎหมายของประเทศ และการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์สิทธิบัตรจะต้องมีรายละเอียดข้อมูลของเชื้อจุลินทรีย์และกระบวนการผลิตไว้ในศูนย์เก็บรักษาที่เชื่อถือได้ บางกรณีอาจต้องเสียเงินค่าเก็บรักษาด้วย ศูนย์ที่ทำหน้าที่นี้ได้แก่ American Type Culture Collection และยังมีศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรมต่างๆ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ศูนย์เก็บเชื้อจุลินทรีย์ที่ให้บริการจุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรม

ชื่อย่อ	ชื่อเต็ม	ที่อยู่
ATCC	American Type Culture Collection	Rockville, MD, USA
CBS	Centraalbureau voor Schimmelcultures	Baarn, Netherlands
CCM	Czechoslovak Collection of Microorganisms	J.E. Purkyne University, Brno, Czech Repuplic
CDDA	Canadian Department of Agriculture	Ottawa, Canada
CIP	Collection of the Institute Pasteur	Paris, France
DMI	Commonwealth Mycological Institute	Kew, UK
DSM	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen	Braunschweig, Germany
IAM	Institute of Applied Microbiology	University of Tokyo, Japan
NCIB	National Collection of Industrial Bacteria	Abardeen, Scotland
NCTC	National Collection of Type Cultures	London , UK
NRRL	Northern Regional Research Laboratory	Peoria, IL, USA

(ที่มา: Brock, T.D. *et al.* **Biology of Microorganisms.** 1994, p. 362)

3. วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์

Kirsop และ Doyle [3] Kirsop และ Snell[4] และ สมบูรณ์ [7] ได้กล่าวถึงวิธีการต่างๆในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ดังนี้

3.1 การต่อเชื้อจุลินทรีย์ (subculture)

วิธีการนี้ทำโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารที่เหมาะสมภายในหลอดหรือขวดแล้วบ่มไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสม เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ภายใต้ภาวะเหมาะสม และต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารใหม่อีกครั้งก่อนที่เชื้อจุลินทรีย์เก่าจะตาย ระยะเวลาของการต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสียเชื้อจุลินทรีย์นั้นขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด เช่น กลุ่มสแตไฟโลคอกไค

(staphylococci) และ กลุ่มโคลิฟอร์ม จะรอดชีวิตได้หลายปี ขณะที่ *ไนซีเรีย* (*Neisseria* spp.) เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ตายง่ายหรือเพาะเลี้ยงยากจึงต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์อีกทุกสองถึงสามอาทิตย์ ทั้งนี้สามารถยืดระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้โดยลดอัตราการสร้างและสลายเมตาบอลิซึม (metabolic rate) ของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีหลายวิธี เช่น การจำกัดอากาศโดยใช้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) เททับปิดผิวเชื้อราบนอาหารวุ้นเอียง (agar slant) หรือการเก็บที่อุณหภูมิต่ำประมาณ 5 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้ได้กับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด

ข้อดีของวิธีการนี้คือใช้อุปกรณ์ราคาถูก แต่ต้องใช้แรงงานมากถ้าต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์บ่อยๆ การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ทำได้ง่ายหากต้องการให้เชื้อจุลินทรีย์อยู่ในสภาพที่ใหม่และสมบูรณ์พร้อมที่จะใช้งานและเป็นวิธีการที่ใช้กันกว้างขวางกับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด แต่ข้อเสียของวิธีการนี้คือเกิดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นซึ่งเป็นปัญหาสำคัญและเกิดขึ้นได้ทุกครั้งที่มีการต่อเชื้อจุลินทรีย์ นอกจากการปนเปื้อนเชื้อจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการแล้ว เชื้อจุลินทรีย์ที่ปนเปื้อนอาจเจริญมากทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาตายได้ การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและการบ่ม (incubate) อาหารไว้ก่อนใช้จะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ ควรเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้สองหลอด (two-tube method) โดยเก็บหลอดหนึ่งไว้เป็นสต็อกและอีกหลอดเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน และการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์บ่อยๆ จะช่วยลดการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น นอกจากนั้นยังมีข้อเสียอื่นๆ ของการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีนี้คือ

- มีอัตราการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ต่ำ จึงต้องทราบภาวะต่างๆที่มีผลต่อการรอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์ในแต่ละชนิดที่ทำการเก็บรักษา เช่นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ เป็นต้น
- มีความเสี่ยงสูงต่อการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเชื้อจุลินทรีย์เมื่อต้องทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์บ่อยๆ
- เกิดการผิดพลาดได้ง่ายในการให้รหัสเชื้อจุลินทรีย์ เช่นอาจเขียนรหัสผิด หรือมีการสลับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งการผิดพลาดจะเพิ่มขึ้นถ้าไม่มีการควบคุมดูแลที่ดี
- ไม่สะดวกต่อการขนส่งให้ผู้อื่น เพราะอาจมีการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่นขณะขนส่ง

3.2 การทำแห้ง (drying)

มีการใช้วิธีทำแห้งเพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง โดยการนำน้ำออกและไม่ให้เกิดความชื้นอีก ส่วนใหญ่ใช้เก็บเชื้อราซึ่งต้านทานต่อความแห้งมากกว่าเชื้อจุลินทรีย์กลุ่มอื่น วิธีการนี้ใช้ได้กับเชื้อยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น การทำแห้งโดยใช้วัสดุต่างๆ มีดังนี้

3.2.1 การทำแห้งที่อุณหภูมิปกติโดยผสมสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ (suspension) กับวัสดุที่เป็นตัวกลาง ได้แก่

3.2.1.1 ทราย ดิน ซิลิกาเจล และดินเบา การเก็บด้วยวิธีนี้นิยมใช้เก็บกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดที่เป็นเชื้อรา โดยเชื้อราที่สร้างสปอร์สามารถรอดชีวิตแบบแห้งในดินได้ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่สามารถเก็บด้วยวิธีนี้ได้นานถึงห้าปีโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง แต่ก็มีเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไป เช่น เชื้อยีสต์ เป็นต้น

3.2.1.2 แผ่นกระดาษหรือดิสก์ (paper disc) การเก็บเชื้อบนแผ่นกระดาษใช้ได้กับเชื้อยีสต์และแบคทีเรียกลุ่มสแตไฟโลคอกไค หลังจากทำแห้งแล้วเก็บแผ่นกระดาษหรือดิสก์ที่มีเชื้อจุลินทรีย์ไว้ในห่อฟอยล์ภายในภาชนะปิดสนิท หรือระหว่างแผ่นกระดาษมีสารทำให้ยึดติดกันได้ วิธีการนี้มีราคาถูกและสามารถส่งเชื้อจุลินทรีย์ทางไปรษณีย์ได้จำนวนมาก

3.2.1.3 Predried plugs วัสดุหลายชนิด เช่น แป้ง เปปโตนหรือเดกซ์แตรน เมื่อสัมผัสกับสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ จะช่วยดูดซับก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้ง และเก็บภายใต้สุญญากาศ วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อจุลินทรีย์ที่ตายได้ง่ายหรือเพาะเลี้ยงยาก เช่น *ไนซีเรีย โกโนเรีย* (*Neisseria gonorrhoeae*) และ *วิบริโอ คอเรลลา* (*Vibrio cholerae*) ซึ่งไม่สามรถเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง

3.2.1.4 เจลาตินดิสก์ (gelatin disc) ทำได้โดยผสมเชื้อจุลินทรีย์ลงในอาหารเหลวเจลาติน นำไปหยดและปล่อยให้แข็งบนจานเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ แล้วทำให้แห้งหรือทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง นำดิสก์ที่แห้งเก็บไว้ในที่มีซิลิกาเจลหรือฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ (P_2O_5) นอกจากนี้ยังมีการเติมสารหลายชนิดลงในอาหารเหลวเจลาตินซึ่งสามารถช่วยให้เก็บแบคทีเรียหลายชนิดได้นานหลายปี

3.2.2 การทำแห้งภายใต้สุญญากาศและอุณหภูมิต่ำกับสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์โดยตรง

เป็นวิธีการทำแห้งภายใต้สุญญากาศเพื่อถนอมเชื้อจุลินทรีย์ที่ไว (sensitive) ต่อการแช่เยือกแข็ง โดยไม่ต้องแช่เยือกแข็งเชื้อจุลินทรีย์ จึงเป็นวิธีการที่ดีและเหมาะกับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *สไปริลลา (Spirilla)* และ *แอโรโมแนส อินไซนิส (Azomonas insignis)* โดย เก็บรักษาไว้ได้นานถึง 10 ปี การทำแห้งโดยตรงจากของเหลวหรือสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์นั้นทำโดยเตรียมหลอดแก้วขนาดเล็ก (ampoule) พิมพ์รหัสเชื้อจุลินทรีย์ วันเดือนปี ลงบนแผ่นกระดาษกรองขนาดเล็ก ใส่เข้าไปในหลอดและอุดจุกสำลีแล้วทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นเตรียมสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ โดยผสมเชื้อจุลินทรีย์ในสารละลายซีรัม (ใช้ซีรัม 75 มิลลิลิตรนิวเตรียนท์บรอท 25 มิลลิลิตร และ กลูโคส 7.5 กรัม) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีการกรอง ปิเปตต์สารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ลงในหลอดดังกล่าวหลอดละ 0.1 มิลลิลิตร แล้วตัดปลายจุกสำลีที่ปิดหลอดให้มีความเรียบด้วยกรรไกรที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ หลังจากนั้นใช้แท่งแก้วที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ดันจุกสำลีที่ตัดปลายให้เรียบแล้วนั้นเข้าไปในหลอด นำหลอดที่มีสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่เตรียมไว้ดังกล่าวไปเชื่อมเข้ากับ manifold ซึ่งตั้งเหนืออ่างน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส โดยให้หลอดแช่อยู่ในน้ำลึกประมาณ 40-50 มิลลิเมตร จาก manifold มีท่อต่อไปยัง diaphram valve และ ฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ เพื่อดักไอน้ำและต่อไปยังปั๊มดูดอากาศ การทำงานนั้นเริ่มแรกปิด valve ของ manifold เปิดปั๊มแล้วเปิดปิด valve อย่างรวดเร็วเพื่อดึงอากาศออกจากระบบ โดยไม่ทำให้สารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์เสียหาย เปิด valve ทีละน้อยจนสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์เริ่มเกิดฟอง ควบคุมอัตราการเกิดฟองที่ valve ภายหลังจาก 5 นาที ให้เปิด valve ไว้จนสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์แห้งซึ่งใช้เวลาประมาณ 30 นาที นำหลอดไปทำให้ตีบหรือคอด (constrict) และทำให้แห้งขั้นที่สองแล้วจึงปิดหลอด

3.3 การทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็ง (freeze drying)

เป็นกระบวนการทำให้น้ำระเหยไปจากสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ที่แช่เยือกแข็งแล้ว โดยเตรียมสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์แล้วนำไปทำให้เยือกแข็งและต่อเข้าสู่ระบบสุญญากาศ ไอน้ำที่ระเหยไปจะถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ (refrigerated condenser) หรือที่มีฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์ โดยทั่วไปจะบรรจุเชื้อจุลินทรีย์อยู่ภายใน

ขวดแก้วเล็กๆ (vial) หรือหลอดแก้วขนาดเล็ก (ampoule) แล้วเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ภายใต้สุญญากาศหรือในแก๊สเฉื่อย

ถึงแม้จะมีการทดลองทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งหลายวิธี และทราบข้อผิดพลาดแล้ว โดยสามารถควบคุมตัวแปรเสริม (parameter) หลายอย่างเท่าที่ทำได้เวลาหนึ่งและเหมาะสมต่อเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้น แต่ยังมีปัจจัยทางกายภาพที่ต้องควบคุม เช่น ช่วงการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิของการเจริญเติบโต องค์ประกอบของสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิการทำเยือกแข็ง อัตราและระยะเวลาการทำแห้ง ความชื้นสุดท้าย เป็นต้น

การทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งนั้นเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมากและการแจกจ่ายเชื้อจุลินทรีย์ สามารถเก็บรักษาได้นานไม่ต้องเอาใจใส่อีกและไม่สิ้นเปลืองระหว่างการเก็บ พบว่านิยมใช้ในศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูงถ้าซื้อเครื่องมืออย่างดี ต้องใช้แรงงานมากถ้าเก็บเชื้อจุลินทรีย์จำนวนมาก โดยทั่วไปการเก็บด้วยวิธีนี้เชื้อจุลินทรีย์ไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะ แต่อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงขึ้นได้ในการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์เพื่อเก็บครั้งต่อๆ ไป เช่น การเก็บเชื้อจุลินทรีย์ครั้งที่สองจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาครั้งแรก การเก็บครั้งที่สามจากเชื้อจุลินทรีย์ครั้งสองและต่อไปเรื่อยๆ แต่อย่างไรก็ตามสามารถป้องกันได้โดยเตรียมเชื้อจุลินทรีย์สำหรับเก็บครั้งต่อไปจากเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บไว้ครั้งแรก นอกจากนั้นระหว่างการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งของเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดนั้น อาจพบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเซลล์หรือเชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ การเก็บด้วยวิธีนี้จึงต้องทำการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และสรีรวิทยา ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ เป็นระยะๆอย่างสม่ำเสมอ

4. การแช่เยือกแข็ง (freezing)

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์โดยการแช่เยือกแข็งนั้นความเสียหายของเซลล์จะเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทำให้เย็นลง โดยเมื่อน้ำในเซลล์เปลี่ยนสภาวะกลายเป็นน้ำแข็ง ความเข้มข้นของอิเล็กโทรไลต์ที่เพิ่มขึ้นขณะน้ำถูกดึงออกไปหรือการเกิดผลึกน้ำแข็งจะมีผลในการทำลายเซลล์ แต่สามารถลดความเสียหายโดยปรับอัตราการทำให้เย็นและการเพิ่มอุณหภูมิ และการเติมสารป้องกันความเย็น (cryoprotectants) เช่น ไดเมทิล ซัล

ฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide) หรือกลีเซอรอล (glycerol) ลงในสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 5 และ 10 ตามลำดับ

การทำเยือกแข็งแบ่งตามอุณหภูมิที่ใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ -20 -30 -40 -70 -140 และ –196 องศาเซลเซียส แต่โดยทั่วไปอุณหภูมิสูงกว่า –30 องศาเซลเซียส ให้ผลไม่ดีเพราะเกิดส่วนผสมของเชื้อจุลินทรีย์และสารประกอบในน้ำ (eutectic mixture) ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นและมีผลต่อเซลล์ การเก็บไว้ที่ –70 องศาเซลเซียส ใช้ได้กับเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิด และการเก็บในสภาวะไอของไนโตรเจน (ที่ –140 องศาเซลเซียส) และในไนโตรเจนเหลว (ที่ –196 องศาเซลเซียส) ก็ใช้ได้ผลดีกับเชื้อจุลินทรีย์ การเก็บเชื้อจุลินทรีย์โดยการแช่เยือกแข็งนั้นทำได้หลายวิธี ได้แก่

4.1 การเก็บบนเม็ดแก้วที่ –70 องศาเซลเซียส โดยเตรียมสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ในกลีเซอรอล หยดลงบนเม็ดแก้วภายในขวดแก้วเล็กๆ (vial) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ –70 องศาเซลเซียส พบว่าได้ผลดีสำหรับแบคทีเรียบางชนิด วิธีนี้ทำได้เร็วและง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือมาก เม็ดแก้วแต่ละสีใช้แสดงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดและเก็บได้มากไม่จำกัด แต่มีข้อเสียคือ ต้องใช้ตู้แช่เยือกแข็ง (freezer) ที่ –70 องศาเซลเซียส ซึ่งบางครั้งไฟฟ้าดับทำให้เครื่องหยุดทำงาน จึงจำเป็นต้องเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้สองชุด วิธีนี้ไม่เหมาะสมในการให้บริการเชื้อจุลินทรีย์ เพราะต้องต่อเชื้อจุลินทรีย์ใหม่ก่อนส่งไปยังแหล่งอื่นๆ

4.2 การเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 องศาเซลเซียส) หรือไอไนโตรเจน (-140 องศาเซลเซียส) การเก็บด้วยวิธีนี้แม้ว่าเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดจะมีเซลล์บางส่วนตายไประหว่างการทำให้เย็นและทำให้หายแข็ง แต่ต่อไปจะไม่สูญเสียอีกระหว่างการเก็บรักษา การลดการตายของเชื้อจุลินทรีย์ทำโดยเติมสารป้องกันความเย็น การปรับภาวะการเจริญเติบโตและอัตราการทำให้เย็นและทำให้ละลาย อย่างไรก็ตามมีข้อเสียคือ ไนโตรเจนเหลวระเหยได้และต้องเติมใหม่อยู่เสมอ หากขาดไนโตรเจนเหลวจะทำให้เซลล์เสียหาย วิธีนี้มีค่าใช้จ่ายสูงแต่ใช้แรงงานน้อย และเสี่ยงต่อการระเบิดหรือแตกของภาชนะที่เป็นแก้ว โดยไนโตรเจนเหลวอาจเข้าไปตามรูรั่วและขยายตัวอย่างรวดเร็ว การเก็บในไอไนโตรเจนช่วยลดปัญหานี้แต่ไอไนโตรเจนมีอุณหภูมิที่สูงกว่าไนโตรเจนเหลวทำให้ไม่เหมาะสมสำหรับเชื้อจุลินทรีย์บางชนิด

การเก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงให้เป็นไปตามข้อกำหนดของระบบคุณภาพห้องปฏิบัติการ [3,4,6]

- ห้องปฏิบัติการจำเป็นต้องมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เพื่อให้แน่ใจว่ามีลักษณะคงเดิม ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนวิธีการที่จะใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงดังกล่าว ให้เลือกใช้วิธีใดก็ได้ที่เหมาะสม
- ห้องปฏิบัติการจะต้องใช้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง จากหน่วยงานระดับชาติหรือองค์กรที่เป็นที่ยอมรับ
- ห้องปฏิบัติการต้องจัดให้มีวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ทำให้เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงนั้นมีชีวิตอยู่ แต่มีเมทาบอลิซึมต่ำ
- มีระบบที่จะไม่ให้มีการนำเอาเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน ไปใช้แทนเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา (stock culture) ของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดนั้นๆ ที่กำลังจะหมดลง
- ขั้นตอนในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - ☆ การทดสอบความบริสุทธิ์และคุณสมบัติเฉพาะ
  - ☆ การเตรียมหลอดแก้วขนาดเล็ก รวมถึงการติดป้าย (label) และการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์
  - ☆ การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ให้เจริญ
  - ☆ การทำเชื้อจุลินทรีย์ให้เป็นสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ ในอาหารที่ใช้สำหรับเก็บรักษา (preservation medium)
  - ☆ ถ่ายสารละลายที่มีเชื้อจุลินทรีย์ลงในหลอดแก้วขนาดเล็กที่เตรียมไว้
- ระดับของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - ☆ เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้เริ่มต้นจากหน่วยงานที่เป็นที่ยอมรับ (master cultures) หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปการทำแห้งแบบอบแห้งแช่เยือกแข็งในหลอดแก้วขนาดเล็ก (freeze dried ampoules) หรือเก็บโดยวิธีแช่เยือกแข็งบนเม็ดแก้วที่มีสารป้องกันความเย็น (frozen glycerol beads) ซึ่งมีอายุการเก็บรักษาได้นาน เชื้อจุลินทรีย์ในระดับนี้ใช้ในการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

☆ เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บในรูปของการแช่เยือกแข็งที่มีสารป้องกันความเย็น (frozen glycerol) มีอายุประมาณ 2-5 ปี ขึ้นอยู่กับชนิดของเชื้อจุลินทรีย์และปริมาณที่มีอยู่เริ่มต้น เชื้อจุลินทรีย์ในระดับนี้ใช้ในการเตรียมเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน สำหรับใช้ในงานประจำวัน (routine) โดยเมื่อนำมาใช้ครั้งหนึ่งแล้ว (มีการปล่อยให้ละลาย) จะต้องไม่นำกลับไปแช่เยือกแข็งอีก

☆ เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน มีอายุประมาณ 1-4 สัปดาห์ ขึ้นอยู่กับความถี่ในการใช้งานและชนิดของเชื้อจุลินทรีย์ ปกติเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ในจานอาหารแข็ง (agar plate) และเก็บไว้ในตู้เย็น (ไม่ใช้ตู้แช่เยือกแข็ง) นำมาใช้สำหรับควบคุมคุณภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ วิธีทดสอบ และการพิสูจน์วิธีทดสอบ (method validation) ซึ่งปกติแล้วไม่ควรทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน อย่างไรก็ตามอาจจะทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งานได้ในกรณีที่จำเป็นสำหรับวิธีทดสอบนั้นๆ ซึ่งห้องปฏิบัติการต้องมีการระบุจำนวนครั้งที่ยอมให้ทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งานไว้ และห้องปฏิบัติการสามารถแสดงให้เห็นว่าไม่มีการสูญเสียความมีชีวิต ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของคุณสมบัติทางชีวเคมี และ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างลักษณะของเซลล์ รวมทั้งเชื้อจุลินทรีย์ในระดับนี้จะต้องไม่นำกลับมาทำเป็นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงอีก

แผนภูมิระดับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้เริ่มต้นจากหน่วยงานที่เป็นที่ยอมรับ

(master cultures)

เชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

(stock cultures)

เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน

(working cultures)

- การดำเนินการเมื่อได้รับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - ตรวจสอบว่ามีใบรับรอง (certificate) หรือเอกสารกำกับ มาพร้อมกับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - จดบันทึกวันที่รับเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงเข้ามา ชื่อของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง รวมทั้งการให้เบอร์ (unique ID number)
  - ตรวจสอบสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่จะใช้ในการกระตุ้น (activate) เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง และทำการตรวจสอบความบริสุทธิ์
  - มีขั้นตอนปฏิบัติในการเปิดหลอดแก้วขนาดเล็กที่เก็บเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง การกระตุ้นเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง และการทดสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง จัดทำไว้เป็นเอกสาร
  - ไม่ทำการทดสอบความบริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์จำเพาะ (selective media)
- การบันทึกที่จำเป็นสำหรับระบบการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - ระบุแหล่งที่มาและประวัติของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง
  - วันที่ได้รับมาพร้อมกับใบรับรอง
  - สภาวะในการนำกลับมาใช้ใหม่ (resuscititate) สภาวะการเก็บรักษาเช่น อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ เวลา และอุณหภูมิในการเก็บ
  - จำนวนของหลอดแก้วขนาดเล็กที่เตรียมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละระดับและที่ใช้ไป
  - ผลของการทดสอบความบริสุทธิ์ ปริมาณเริ่มต้น คุณสมบัติทางชีวเคมี และการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์
  - วันที่ทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา เพื่อที่จะเตรียมเป็นเชื้อจุลินทรีย์ใช้งาน
  - ผลของการตรวจสอบความบริสุทธิ์ของเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาสำหรับที่จะนำมาใช้เตรียมเป็นเชื้อจุลินทรีย์ใช้งาน

- สภาวะที่ใช้ในการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ใช้งาน (เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ อุณหภูมิ และเวลา)

ปัญหาและที่มาของการศึกษาทดลอง

กลุ่มงานจุลชีววิทยามีหน้าที่วิเคราะห์ทดสอบอาหาร น้ำและผลิตภัณฑ์อาหารตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข มาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม และวิเคราะห์เพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภค ดังนั้นผลของการวิเคราะห์ทดสอบต้องถูกต้อง เป็นที่เชื่อถือและยอมรับได้จึงต้องมีเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงมาใช้ในการควบคุมคุณภาพของการวิเคราะห์ทดสอบ ซึ่งความสำคัญของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงมีดังนี้คือ

- ใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์มาตรฐานสำหรับการทดสอบ
- ใช้ในการควบคุมคุณภาพอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์
- ใช้ในการพิสูจน์วิธีวิเคราะห์
- ใช้ในการทดสอบประสิทธิภาพของผู้วิเคราะห์

ดังนั้นจึงต้องมีวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เนื่องจากเชื้อจุลินทรีย์เกิดการกลายพันธุ์ได้ง่าย และโอกาสที่จะเกิดการกลายพันธุ์จะมากขึ้นถ้าทำการต่อเชื้อจุลินทรีย์บ่อยครั้ง ห้องปฏิบัติการจึงจำเป็นต้องหาวิธีในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง เพื่อให้คงไว้ซึ่งคุณสมบัติทางพันธุกรรมเดิมและรักษาความมีชีวิตไว้ได้ ซึ่งขั้นตอนในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากและมีค่าใช้จ่ายน้อยคือการเก็บรักษาโดยวิธีแช่เยือกแข็ง ดังนั้นจึงทำการเปรียบเทียบประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการ โดยทำการศึกษาปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตจากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 และ –80 องศาเซลเซียส เมื่อระยะเวลาเพิ่มขึ้น เพราะเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะมีความสามารถในการรอดชีวิตในสภาวะแช่เยือกแข็งที่แตกต่างกันโดยเปรียบเทียบกันระหว่างอุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิของช่องแช่เยือกแข็งตู้เย็นที่มีอยู่ในห้องปฏิบัติการทั่วไปกับที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส ซึ่งเป็นอุณหภูมิที่ใช้กันอย่างกว้างขวางในการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพแช่เยือกแข็ง แต่จำเป็นต้องใช้ตู้แช่เยือกแข็งเฉพาะงานที่มีราคาแพงและในบางห้องปฏิบัติการยังไม่มีอุปกรณ์ดังกล่าว

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาเปรียบเทียบการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 12 เดือน

ระยะเวลาดำเนินการ

1 ปี 6 เดือน (พฤศจิกายน 2540 – พฤษภาคม 2542)

ประโยชน์ที่ได้รับ

1. ได้วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงเพื่อใช้ในระบบควบคุมคุณภาพของวิธีวิเคราะห์ทดสอบทางด้านจุลชีววิทยา ที่ไม่ยุ่งยากทั้งวิธีการเก็บและการนำมาใช้ และมีอายุของการเก็บรักษานาน
2. เป็นข้อมูลเผยแพร่สู่ประชาชนที่สนใจ

2. วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการ

วัสดุ อุปกรณ์ เครื่องมือ

1. เครื่องมือ

1.1 เครื่องฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ด้วยความร้อนแห้ง (hot air sterilizer) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 170-190 องศาเซลเซียส

1.2 เครื่องชั่งที่มีความละเอียด 0.01 กรัม

1.3 ตู้เย็นซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 2-10 องศาเซลเซียส

1.4 ตู้แช่เยือกแข็ง ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ –20 องศาเซลเซียส

1.5 ตู้แช่เยือกแข็ง ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ –80 องศาเซลเซียส

1.6 ตู้อบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 35 ±1 องศาเซลเซียส

1.7 หม้อนึ่งอัดไอ (autoclave) ซึ่งสามารถควบคุมอุณหภูมิที่ 121 ±1 องศาเซลเซียส

1.8 ตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ (biosafety cabinet)

2. วัสดุ

2.1 อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

เป็นอาหารสำเร็จรูปของบริษัท Difco[2] ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิด และวิธีเตรียมอยู่ในภาคผนวก อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้มีดังต่อไปนี้

2.1.1 นิวเตรียนท์บรอท (nutrient broth) ของ Difco

2.1.2 นิวเตรียนท์อะการ์ (nutrient agar) ของ Difco

2.2 เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง

2.2.1 *อี. โคไล*

2.2.2 *เอนเทอโรเบคเตอร์ แอโรจีเนส*

2.3 สารเคมี

2.3.1 สารละลายสำหรับเจือจาง (dilution fluid)

วิธีการเตรียมอยู่ในภาคผนวก

2.3.2 กลีเซอรอล (glycerol)

3. อุปกรณ์

3.1 หลอดพลาสติกขนาดเล็กชนิดที่ใช้หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ (microcentrifuge tube)

3.2 อุปกรณ์ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาของกองวิทยาศาสตร์ชีวภาพ

วิธีการทดลอง[3,4,7]

1. ขั้นตอนการเปิดหลอดแก้วขนาดเล็กที่บรรจุเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี.โคไล* และ *เอนเทอโรเบคเตอร์ แอโรจีเนส* การกระตุ้น และตรวจสอบความบริสุทธิ์

1.1 ปิเปตต์อาหารนิวเตรียนท์บรอท ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็กที่เปิดแล้วของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี.โคไล* และ *เอนเทอโรเบคเตอร์ แอโรจีเนส* เขย่าให้เข้ากัน

1.2 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์ (loop) แตะเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 1 มาขีด (streak) บนจานอาหารนิวเตรียนท์อะการ์ เพื่อแยกให้เป็นโคโลนีเดี่ยว (single colony) เชื้อจุลินทรีย์ละ 2 จาน อบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีเดี่ยวและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

2. ขั้นตอนการเก็บเชื้อจุลินทรีย์

2.1 ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 1.1 ซึ่งมีปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรลงในอาหารนิวเตรียนท์บรอทปริมาตร 90 มิลลิลิตรซึ่งบรรจุอยู่ในขวดรูปชมพู่ (flask) ขนาด 100 มิลลิลิตร เชื้อจุลินทรีย์ละ 2 ขวด อบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง

2.2 ผสมเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดๆ ละ 2 ขวดรูปชมพู่ จากข้อ 2.1 เข้าด้วยกัน ซึ่งรวมแล้วมีปริมาตรของเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดเท่ากับ 180 มิลลิลิตร หลังจากนั้นเติมกลีเซอรอลที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้วลงไปผสมกับเชื้อจุลินทรีย์ชนิดละ 20 มิลลิลิตรเพื่อให้มีความเข้มข้นของกลีเซอรอลร้อยละ 10 หลังจากนั้นเขย่าให้เข้ากัน

2.3 ใช้ห่วงเขี่ยเชื้อจุลินทรีย์แตะเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 4 มาขีดลงบนจานอาหารนิวเตรียนท์อะการ์ ชนิดละ 2 จาน อบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง ตรวจดูโคโลนีเดี่ยวและการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

2.4 นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์เริ่มต้นโดยการทำเจือจาง (dilution) และเพาะเชื้อจุลินทรีย์ลงบนอาหารนิวเตรียนท์อะการ์ อบเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่ 35 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 18-24 ชั่วโมง เลือกนับจานเพาะเชื้อจุลินทรีย์ที่มีจำนวนเชื้อจุลินทรีย์อยู่ในช่วง 25-250 โคโลนี

2.5 ถ่ายเชื้อจุลินทรีย์จากข้อ 2.4 มาใส่ในหลอดพลาสติกขนาดเล็กชนิดที่ใช้หมุนเหวี่ยงแยกเซลล์ที่ฆ่าเชื้อจุลินทรีย์แล้ว โดยการฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในหม้อนึ่งอัดไอ และได้ติดฉลากไว้เรียบร้อยแล้ว หลอดละ 1 มิลลิลิตร ซึ่งขั้นตอนนี้ต้องทำในตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อจุลินทรีย์ ทำการเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ชนิดละ 60 หลอด

2.6 เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 2 ชนิด ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส

2.7 นับจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่รอดชีวิตทุก ๆ 1 เดือน ตามวิธีในข้อ 2.4 โดยใช้เชื้อจุลินทรีย์ชนิดละ 2 หลอด เป็นระยะเวลา 12 เดือน

2.8 การอ่านผล คัดเลือกจานเพาะเชื้อจุลินทรีย์ซึ่งมีจำนวนโคโลนีอยู่ระหว่าง 25-250 โคโลนี มานับจำนวนโคโลนีด้วยเครื่องนับจำนวนโคโลนี (colony counter) แล้วบันทึกผล

2.9 หาค่าเฉลี่ยของจำนวนโคโลนีที่นับได้ แล้วคูณด้วยค่าไดลูชั่นแฟคเตอร์ (dilution factor) ของความเจือจางที่นับจำนวนได้ คำนวณเป็นจำนวนโคโลนี (colony forming unit หรือ CFU) ต่อมิลลิลิตร

แต่ปัจจุบันการรายงานผลจำนวนเชื้อจุลินทรีย์ที่มีในวารสาร (Journal) หรือบทความต่างๆทางจุลชีววิทยานิยมรายงานในรูปของค่า log ฐาน 10 ทั้งนี้เพื่อความสะดวกในการแสดงผลและง่ายต่อความเข้าใจ เช่น ผลที่ได้เท่ากับ 10,000 CFU/มิลลิลิตร จะมีค่าเท่ากับ 4 $\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร

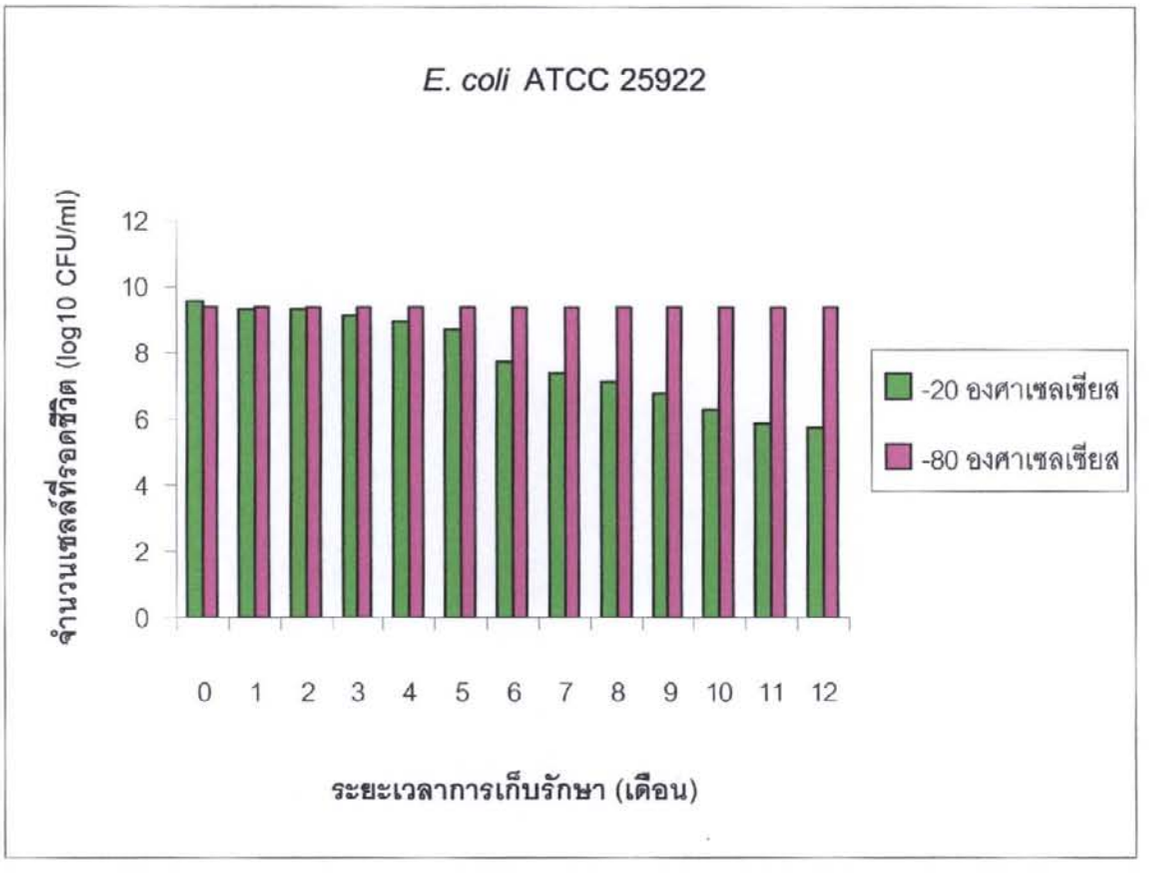
3. ผลการทดลอง

3.1 ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์เริ่มต้นของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่ศึกษาไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์อื่น

3.2 ผลการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส แสดงดังในตารางที่ 3 และภาพที่ 1, 3 และ5

ตารางที่ 3 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน

เวลา (เดือน)	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ($\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร)					
	–20 องศาเซลเซียส			–80 องศาเซลเซียส		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	**เฉลี่ย**	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	**เฉลี่ย**
0	9.36	9.46	**9.55**	9.36	9.46	**9.41**
1	9.38	9.32	**9.35**	9.36	9.43	**9.40**
2	9.32	9.30	**9.31**	9.36	9.45	**9.41**
3	9.36	9.00	**9.18**	9.36	9.45	**9.41**
4	8.80	9.08	**8.94**	9.37	9.44	**9.41**
5	8.72	8.69	**8.71**	9.35	9.46	**9.41**
6	7.49	7.96	**7.73**	9.34	9.45	**9.40**
7	7.40	7.38	**7.39**	9.46	9.36	**9.41**
8	7.48	6.77	**7.13**	9.34	9.48	**9.41**
9	6.74	6.84	**6.79**	9.36	9.44	**9.40**
10	6.28	6.32	**6.30**	9.36	9.46	**9.41**
11	5.91	5.86	**5.89**	9.41	9.38	**9.40**
12	5.54	5.95	**5.75**	9.38	9.44	**9.41**

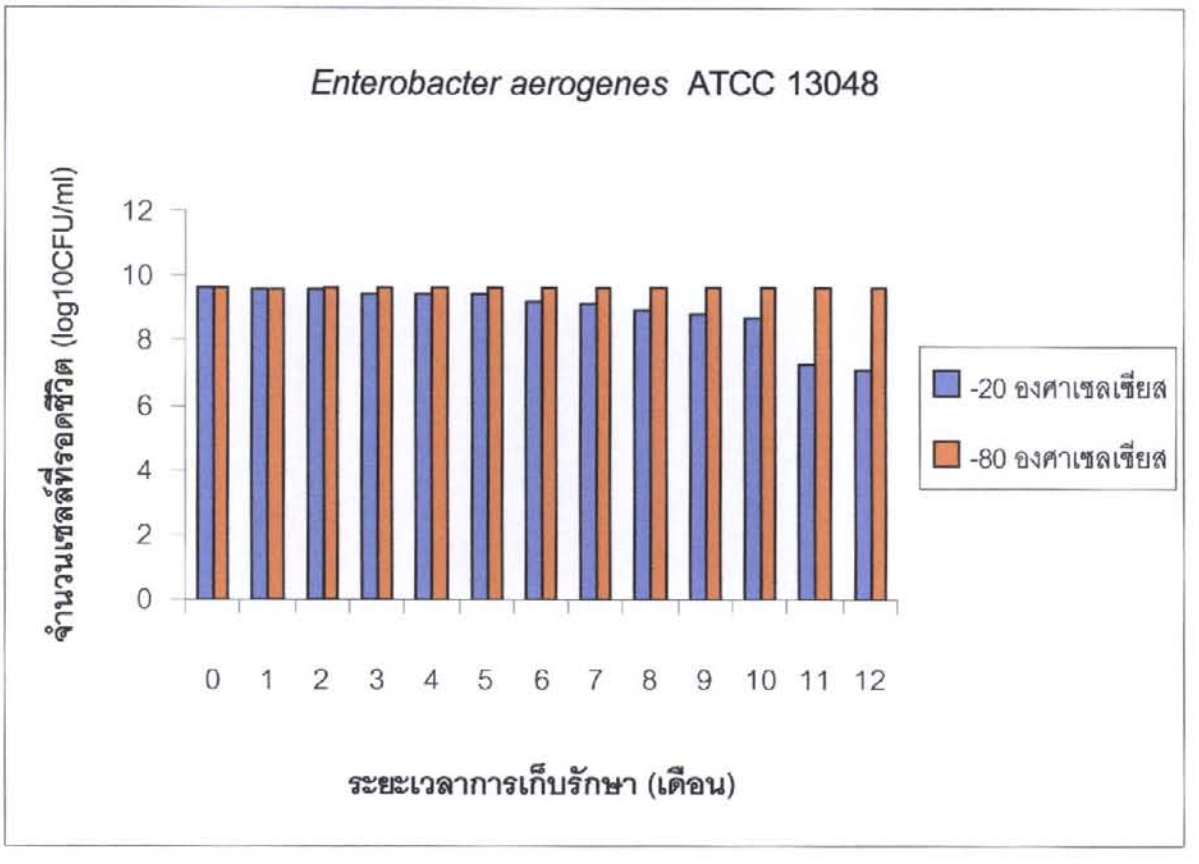


ภาพที่ 1 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ −20 องศาเซลเซียส และ −80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน

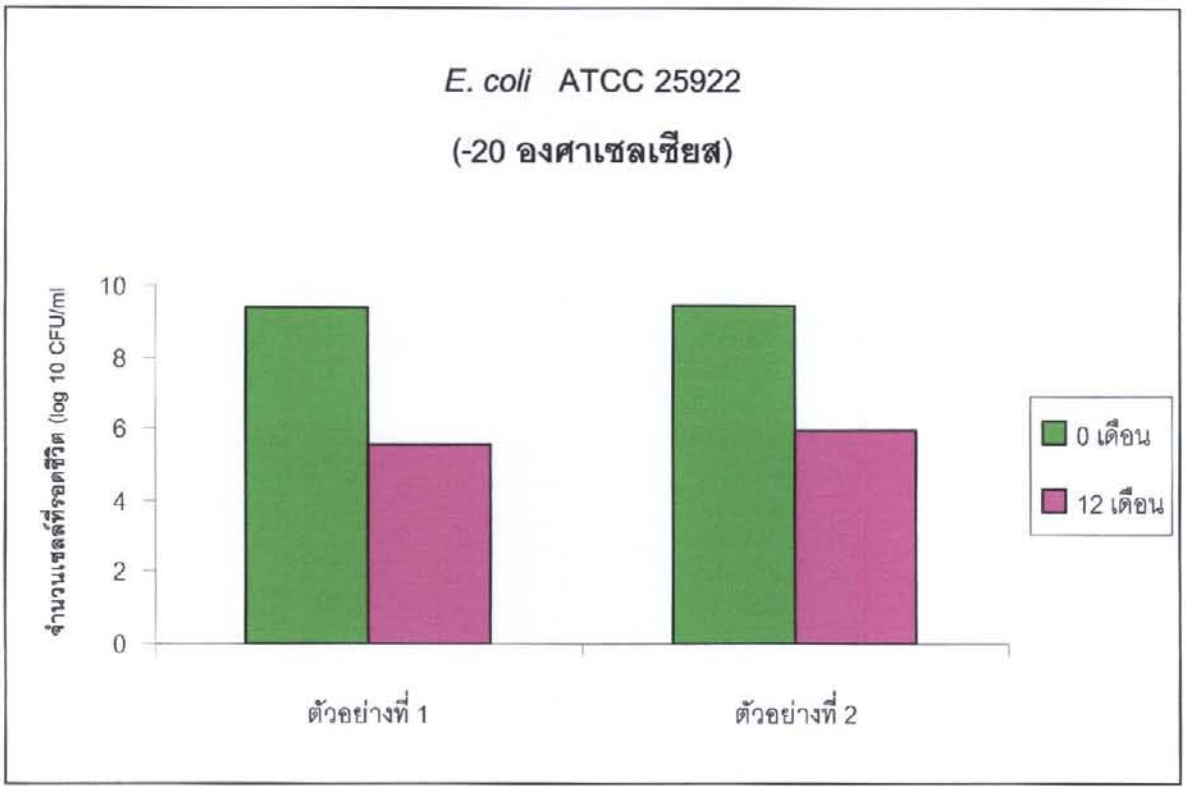
3.3 ผลการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส แสดงดังในตารางที่ 4 และภาพที่ 2, 4 และ 6

ตารางที่ 4 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน

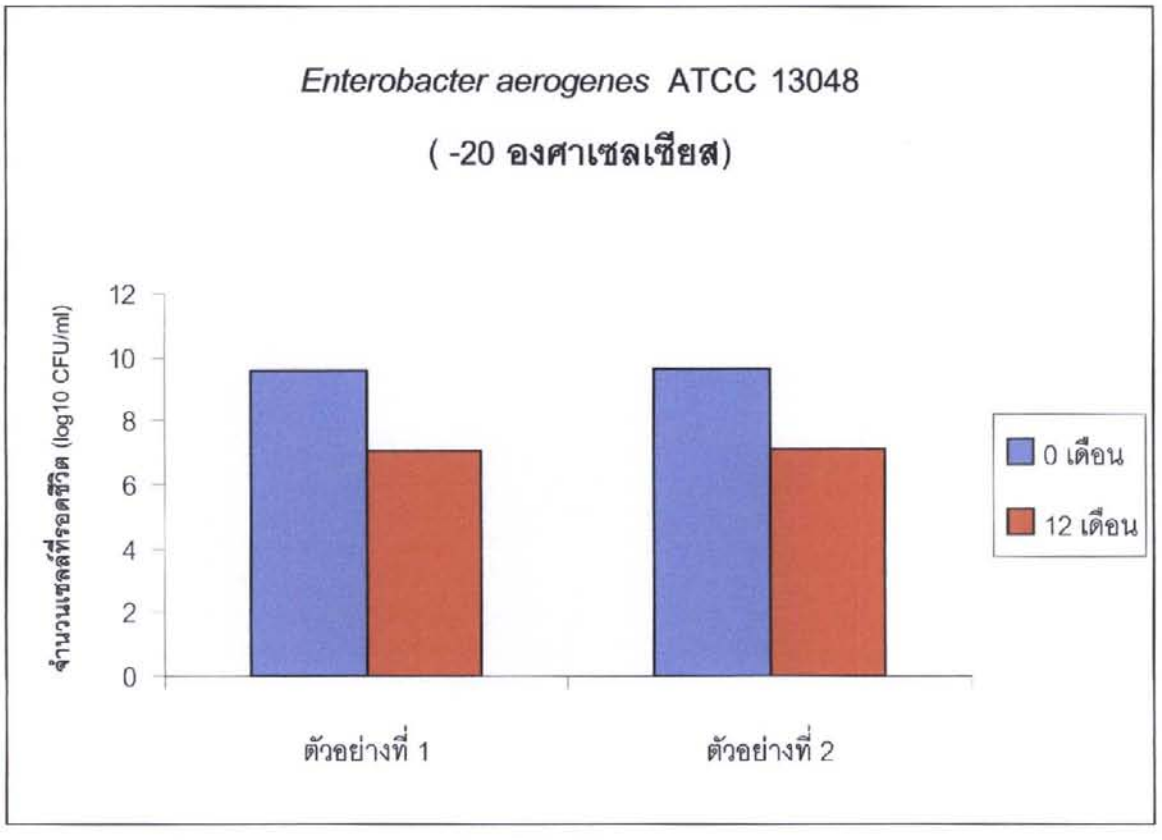
เวลา (เดือน)	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ($\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร)					
	–20 องศาเซลเซียส			–80 องศาเซลเซียส		
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	เฉลี่ย	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	เฉลี่ย
0	9.58	9.67	**9.63**	9.58	9.67	**9.63**
1	9.64	9.56	**9.60**	9.62	9.58	**9.60**
2	9.57	9.56	**9.57**	9.59	9.65	**9.62**
3	9.52	9.43	**9.48**	9.64	9.61	**9.63**
4	9.46	9.45	**9.46**	9.66	9.59	**9.63**
5	9.46	9.43	**9.45**	9.65	9.59	**9.62**
6	9.15	9.23	**9.19**	9.65	9.60	**9.63**
7	9.18	9.11	**9.15**	9.60	9.67	**9.64**
8	8.93	8.93	**8.93**	9.65	9.60	**9.63**
9	8.84	8.79	**8.81**	9.54	9.68	**9.61**
10	8.79	8.66	**8.73**	9.61	9.65	**9.63**
11	7.32	7.23	**7.28**	9.66	9.62	**9.64**
12	7.08	7.11	**7.10**	9.61	9.63	**9.62**



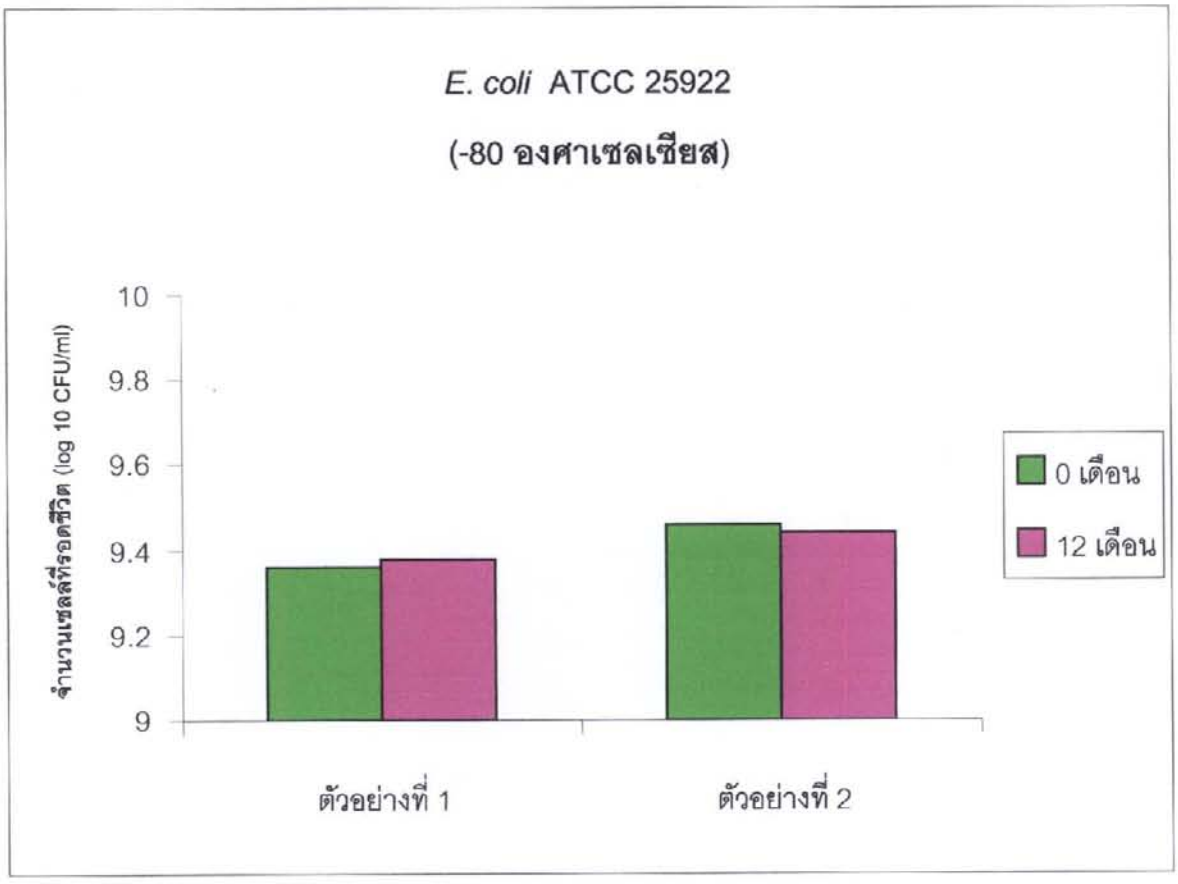
ภาพที่ 2 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิต หลังการเก็บรักษา ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน



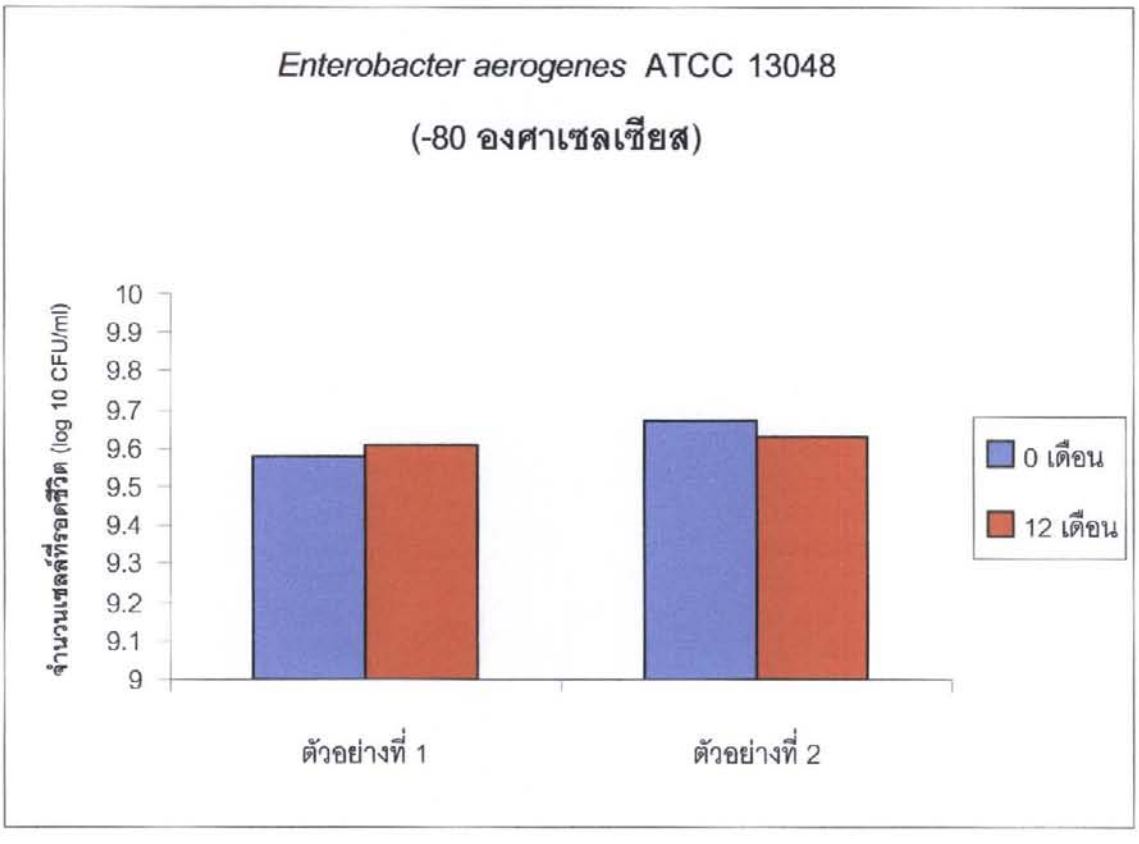
ภาพที่ 3 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ −20 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 0 เดือนและ12 เดือน



<u>ภาพที่ 4</u> จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิต หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ–20 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 0 เดือนและ12 เดือน



ภาพที่ 5 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง อี. โคไล ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 0 เดือนและ12 เดือน

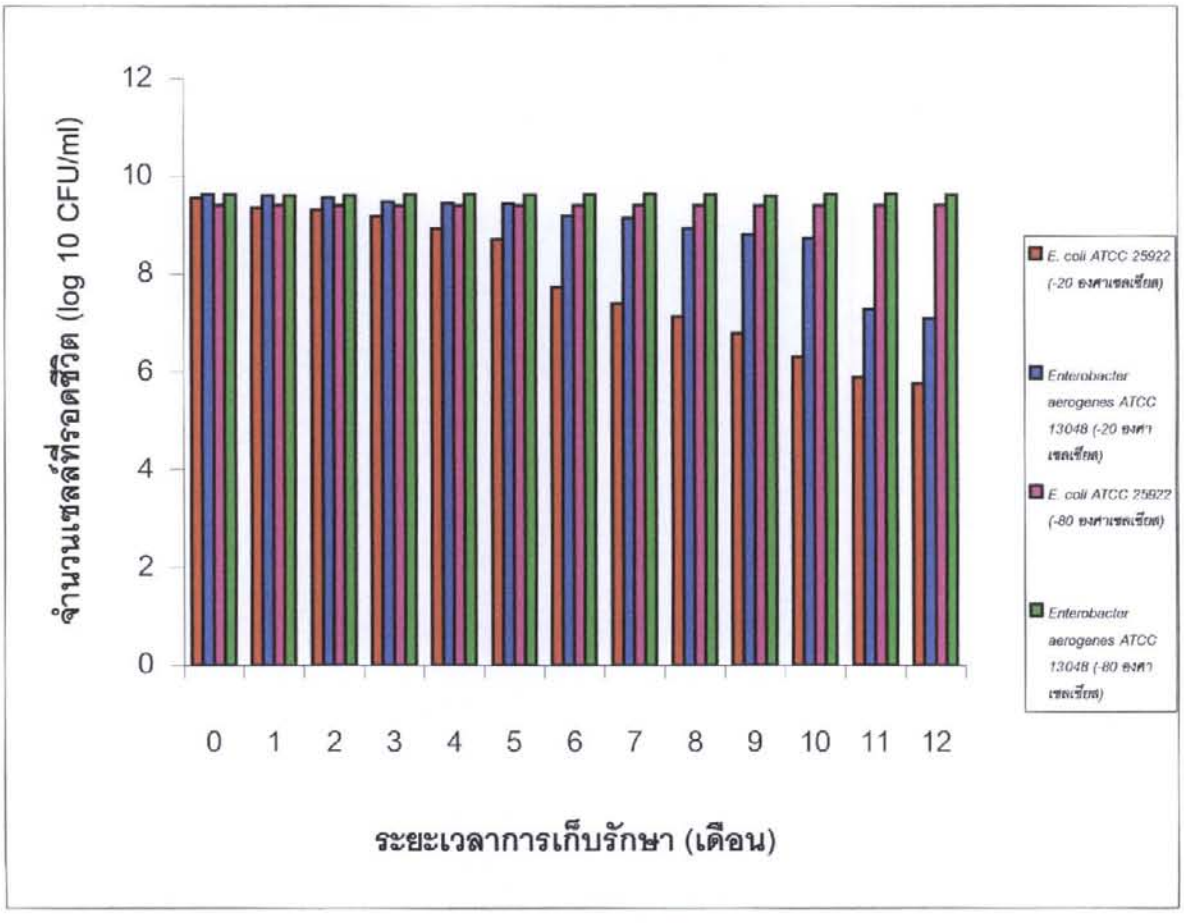


ภาพที่ 6 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิต หลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ-80 องศาเซลเซียสที่ระยะเวลา 0 เดือนและ12 เดือน

3.4 ผลการนับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน แสดงดังในตารางที่ 5 และภาพที่ 7

ตารางที่ 5 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส และ –80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน

เวลา (เดือน)	ปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตเฉลี่ย ($\log_{10}$ CFU/มิลลิลิตร)			
	-20 องศาเซลเซียส		-80 องศาเซลเซียส	
	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล*	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส*	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล*	เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส*
0	9.55	9.63	9.41	9.63
1	9.35	9.60	9.40	9.60
2	9.31	9.57	9.41	9.62
3	9.18	9.48	9.41	9.63
4	8.94	9.46	9.41	9.63
5	8.71	9.45	9.41	9.62
6	7.73	9.19	9.40	9.63
7	7.39	9.15	9.41	9.64
8	7.13	8.93	9.41	9.63
9	6.79	8.81	9.40	9.61
10	6.30	8.73	9.41	9.63
11	5.89	7.28	9.40	9.64
12	5.75	7.10	9.41	9.62



ภาพที่ 7 จำนวนเซลล์เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 และ–80 องศาเซลเซียส ระยะเวลา 12 เดือน

4. วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ลดลงตามลำดับของระยะเวลาการเก็บตั้งแต่เดือนที่ 1-12 ดังแสดงในตารางที่ 3-4 และภาพที่ 1-4 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ 0 เดือน กับหลังจากเก็บรักษา 12 เดือน พบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของ เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 คิดเป็นร้อยละ 59.16 และ 62.90 ตามลำดับ และพบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 คิดเป็นร้อยละ 73.90 และ 73.53 ตามลำดับ

ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส สามารถรักษาให้คงมีสภาพของปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* อยู่ได้เท่ากับปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเริ่มต้นหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลา 12 เดือน ดังแสดงในตารางที่ 3-4 และภาพที่ 1, 2, 5 และ 6 และเมื่อพิจารณาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่ 0 เดือน กับหลังจากเก็บรักษา ที่ 12 เดือน พบว่า มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 คิดเป็นร้อยละ 100 และ 99.79 ตามลำดับ และพบว่ามีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตของเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ตัวอย่างที่ 1 และ 2 คิดเป็นร้อยละ 100 และ 99.59 ตามลำดับ

และเมื่อเปรียบเทียบการเก็บรักษาระหว่างเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* และ *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากตารางที่ 5 และภาพที่ 7 พบว่าเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตอยู่ได้ในปริมาณที่สูงกว่าเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* โดยเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล และ เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* มีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตในเดือนที่ 12 คิดเป็นร้อยละ 60.21 และ 73.7 ตามลำดับ

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 12 เดือน เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงทั้งสองชนิดมีปริมาณอยู่ในค่า log

เดียวกันคือ 9 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตรเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณเริ่มต้น ซึ่งในทางจุลชีววิทยาจัดว่าเป็นปริมาณที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งสามารถนำไปใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ส่วนการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล* มีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วงระยะเวลา 4 เดือน และเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* มีปริมาณค่อนข้างคงที่ในช่วงระยะเวลา 8 เดือน ดังนั้นในกรณีที่จำเป็นต้องเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงทั้งสองชนิดที่ –20 องศาเซลเซียสจึงไม่ควรนำเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิงทั้งสองชนิดดังกล่าวไปใช้เป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งานหลังระยะเวลาการเก็บที่ 4 เดือนและ 8 เดือน ตามลำดับ แต่อย่างไรก็ตามประสิทธิภาพการนำเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไปใช้สำหรับเป็นเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งานควรมีการศึกษาถึงความบริสุทธิ์และคุณสมบัติทางชีวเคมีร่วมด้วย

สรุปผลการทดลอง

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อ้างอิง *อี. โคไล และ เอนเทอโรแบคเตอร์ แอโรจีเนส* ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส เป็นวิธีการที่สามารถรักษาความมีชีวิตหรือมีปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิตได้เท่ากับปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ที่มีอยู่เริ่มต้น ดังนั้นจึงสามารถเตรียมเชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้งาน จากเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา เพื่อใช้ในการควบคุมวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยาโดยวิธีนี้ได้ ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวก และไม่ยุ่งยากทั้งวิธีการเตรียมและการนำไปใช้ แต่อย่างไรก็ตามควรมีการตรวจสอบเชื้อจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา เป็นระยะ ๆ โดยต้องมีการตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ความบริสุทธิ์ และคุณสมบัติทางชีวเคมี เพื่อที่จะสามารถแก้ไขปัญหาได้ทันท่วงทีถ้าพบว่ามีความผิดปกติเกิดขึ้น ทั้งนี้เพื่อให้การวิเคราะห์ทดสอบทางจุลชีววิทยาของห้องปฏิบัติการมีความถูกต้อง แม่นยำ และมีคุณภาพสูงสุด

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณสุจินต์ ศรีคงศรี คุณวรรณี สมพร คุณปรีชา ธรรมนิยม
ุณสุพรรณี เทพอรุณรัตน์ ในการทำวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Brock, T.D. *et. al.* **Biology of Microorgamisms.** 1994.
2. Difco Laboratory. **Difco manual : Dehydrated Culture and Reagents for Microbiology, 10th ed.** Michigan. 1984.
3. Kirsop B.E. and Doyle A. **Maintenance of Microorgamisms and Cultured cells, 2nd ed.** Academic Press. 1991.
4. Kirsop B.E. and Snell J.J.S. **A Manual of Laboratory Methods.** Academic Press. 1984.
5. Sugawara *et. al.* **World Directory of Collection of Cultures of Microorgamisms.** 1993.
6. รวิวรรณ อาจสำอาง. **การเก็บรักษาจุลินทรีย์อ้างอิงเพื่อใช้ในการควบคุมคุณภาพห้องปฏิบัติการทดสอบอาหารทางจุลชีววิทยา.** 29-30 พฤษภาคม 2545. กรมวิทยาศาสตร์บริการ.
7. สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์.** สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2539.

ภาคผนวก

อาหารเลี้ยงเชื้อและวิธีเตรียม

1. นิวเตรียนท์บรอท (nutrient broth) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3 กรัม
เพปโทน (peptone)	5 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น บรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 250 มิลลิลิตร ขวดละ 100 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

ความเป็นกรด – ด่าง ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.8±0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

2. นิวเตรียนท์อะการ์ (nutrient agar) ของ Difco

มีส่วนประกอบดังนี้

สารสกัดจากเนื้อ (beef extract)	3 กรัม
เพปโทน (peptone)	5 กรัม
วุ้น (agar)	15 กรัม
น้ำกลั่น	1 ลิตร

ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ต้มให้ละลายก่อนบรรจุในขวดรูปชมพู่ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดจุกแล้วนำไปอบฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอ ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิประมาณ 50-55 องศาเซลเซียส เทใส่จานเพาะเชื้อจานละประมาณ 15 มิลลิลิตร

ความเป็น กรด – ด่าง ภายหลังการฆ่าเชื้อแล้วเป็น 6.0 ± 0.2 ที่ 25 องศาเซลเซียส

สารเคมีและวิธีเตรียม

1. สารละลายสำหรับเจือจาง (dilution fluid)

เตรียมดังนี้

1.1 ละลายโพแทสเซียม ไดไฮโดรเจน ฟอสเฟต (potassium dihydrogen phosphate) 34 กรัม ในน้ำกลั่น 500 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรด – ด่างด้วยสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ (sodium hydroxide) 1 นอร์มอล ให้ได้ค่าความเป็นกรด – ด่าง เท่ากับ 7.2±0.2 แล้วจึงเติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

1.2 สารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ (phosphate buffer) เตรียมโดยใช้สารละลายที่ได้จากข้อ 2.1.1 ปริมาตร 1.25 มิลลิลตร เติมน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร

1.3 บรรจุสารละลายฟอสเฟต บัฟเฟอร์ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองฝาเกลียว และในขวดแก้วปริมาตร 225 มิลลิลิตร นำไปฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งอัดไอที่ 121 องศาเซลเซียส 15 นาที