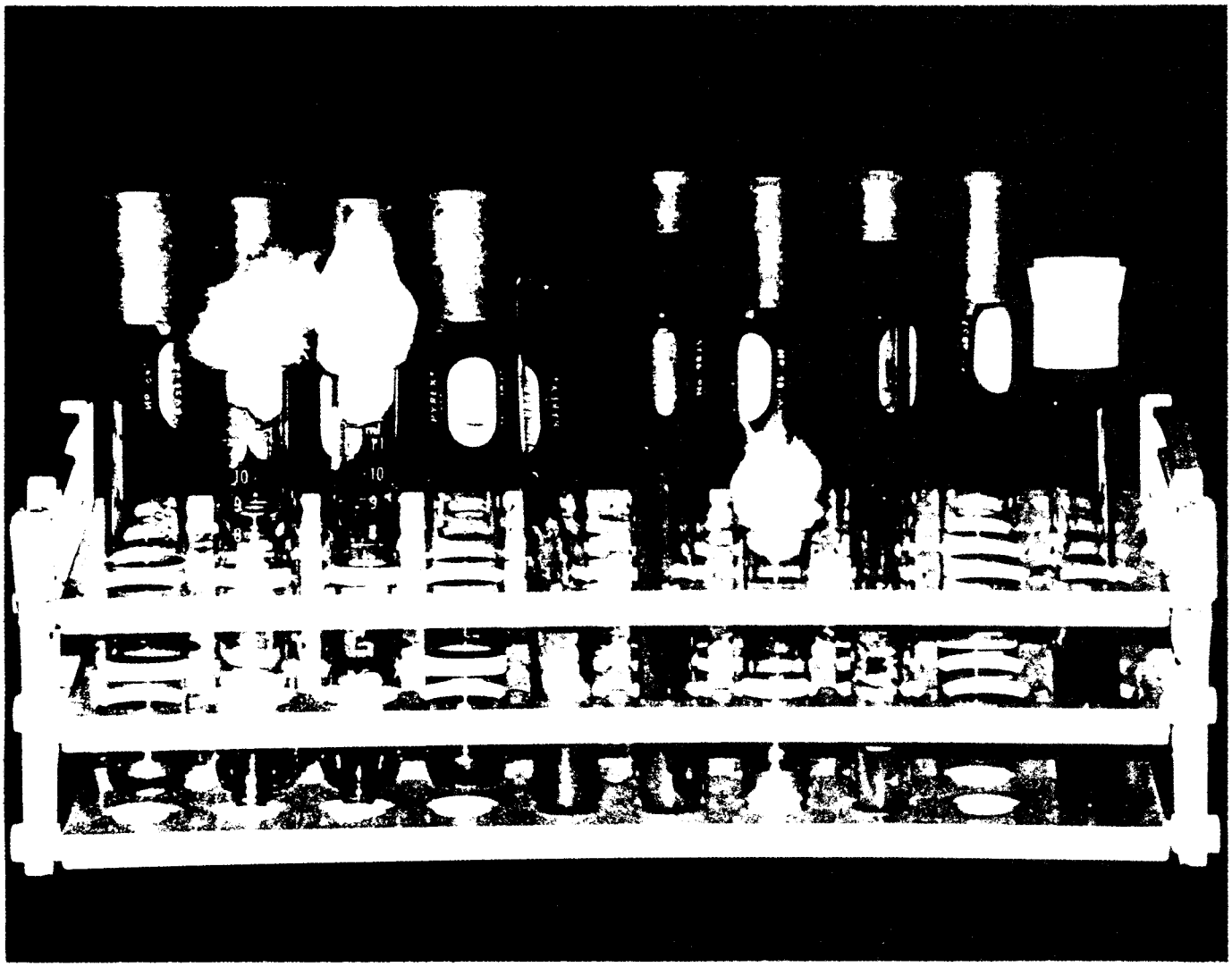
จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

อรทัย ลีลาพจนาพร



เมื่อกล่าวถึงจุลินทรีย์ เรามักนึกถึงแต่ในแง่ลบ เช่น เชื้อโรค การบูดเน่าและสารพิษจากจุลินทรีย์ ความจริงแล้วจุลินทรีย์มีหลายชนิด หลายประเภทที่ให้ประโยชน์แก่เรา เช่น ยีสต์ที่ใช้ในการทำขนมฟู แบคทีเรียที่ใช้การผลิตนมเปรี้ยว เป็นต้น ซึ่งประโยชน์ยังมีอีกมาก ไม่ได้ใช้เฉพาะในการผลิตอาหารเท่านั้น

ปัจจัยที่ทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโต ขยายพันธุ์ ได้แก่ สารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน ค่าความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิและเวลา ซึ่งเกี่ยวข้องสัมพันธ์กัน และต้องอยู่ในสภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด จากการศึกษาเกี่ยวกับปัจจัยการเจริญเติบโต ทางด้านโภชนาการของจุลินทรีย์พบว่าจุลินทรีย์แต่ละชนิดมี

ความต้องการสารอาหารแตกต่างกัน บางชนิดสามารถสังเคราะห์สารประกอบขึ้นมาใหม่จากอาหารเลี้ยงเชื้อธรรมดา บางชนิดต้องการอาหารพิเศษเฉพาะ บางชนิดจะไม่เจริญเติบโตถ้าไม่เติมสารสกัดจากตับหรือเอนไซม์ในอาหารเลี้ยงเชื้อ และพบว่าสารอาหารที่มีความสำคัญต่อจุลินทรีย์และสัตว์ คือ วิตะมิน บี และกรดอะมิโน ความสำคัญของสารอาหารเหล่านี้ที่มีต่อจุลินทรีย์จะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์ จึงเป็นลักษณะเฉพาะเจาะจงของจุลินทรีย์ที่มีต่อสารอาหารตามตารางที่ 1 คุณสมบัติเฉพาะเจาะจงข้อนี้มีผลทำให้มีการนำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในด้านการวิเคราะห์ในห้องปฏิบัติการ

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างจุลินทรีย์กับปัจจัยในการเจริญเติบโต

ปัจจัยในการเจริญเติบโต	จุลินทรีย์	ความสัมพันธ์ต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์
Riboflavin	Lactobacillus helveticus	สำคัญ
	Leuconostoc mesenteroides	สำคัญ
Pantothenic acid	Lactobacillus helveticus	สำคัญ
Nicotinic acid	Lactobacillus arabinosus	สำคัญ
Biotin	Leuconostoc mesenteroides	สำคัญ
p-Aminobenzoic acid	Lactobacillus arabinosus	สำคัญเฉพาะบางสายพันธุ์
Folic acid	Lactobacillus helveticus	สำคัญ
	Streptococcus faecalis	สำคัญ
	Lactobacillus casei	สำคัญ
Adenine	Lactobacillus plantarum	เป็นสารกระตุ้น
	Lactobacillus arabinosus	เป็นสารกระตุ้น
	Lactobacillus helveticus	เป็นสารกระตุ้น
Guanine	Lactobacillus arabinosus	เป็นสารกระตุ้น
	Leuconostoc mesenteroides	เป็นสารกระตุ้น
Xanthine	Leuconostoc mesenteroides	เป็นสารกระตุ้น
Uracil	Lactobacillus arabinosus	เป็นสารกระตุ้น
Thymine	Lactobacillus helveticus	เป็นสารกระตุ้นร่วมกับสาร
	Streptococcus faecalis	purines ในกรณีที่ขาดกรดโฟลิค

การวิเคราะห์โดยอาศัยจุลินทรีย์ (microbiological assay) เป็นเคมีวิเคราะห์แขนงหนึ่งในเชิงปริมาณ ซึ่งใช้ประโยชน์จากการเลือกใช้ชนิดของจุลินทรีย์ที่เหมาะสมกับสารอาหารที่จะวิเคราะห์ ปัจจุบันจัดว่าเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ได้มาตรฐานวิธีหนึ่ง ใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณวิตะมินบีรวม และกรดอะมิโนในตัวอย่างอาหาร

หลักการวิเคราะห์มีดังนี้ คือ สังเกตการเปลี่ยนแปลงระหว่างการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ที่เกิดขึ้นในอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ (basal assay media) อาหารเลี้ยงเชื้อดังกล่าวประกอบด้วยสารอาหารต่าง ๆ ยกเว้น ชนิดที่เราต้องการวิเคราะห์ ซึ่งเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับจุลินทรีย์ โดยจุลินทรีย์จะได้รับจากสารละลายตัวอย่างที่เราจะเติมลงไปในการวิเคราะห์ เปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานภายใต้สภาวะที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ การวัดผลการวิเคราะห์ ทำได้ 2 วิธี คือ วัดความขุ่นที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อ 18-24 ชั่วโมง หรือ ติเตรทกับ N/10 NaOH เพื่อหาปริมาณกรดแลกติกที่เกิดขึ้นภายหลังจากการเลี้ยงเชื้อไว้ 72 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่สำคัญในการวิเคราะห์ตัวอย่างมีดังนี้ คือ

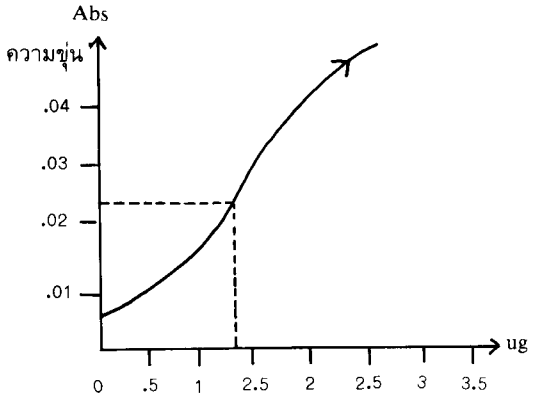
การย่อยสลาย เป็นขั้นตอนสกัดสารอาหารที่จะวิเคราะห์ให้ออกมาในรูปของสารละลาย อาจจะทำโดยการย่อยด้วยกรด (acid hydrolysis) ปกติจะใช้กรดซัลฟูริค ความเข้มข้น 1 นอร์มัล หรือเอนไซม์ (enzyme digestion) เช่น papain และ diastase แล้วปรับ pH ให้เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ใช้

การฆ่าเชื้อด้วยความร้อน (sterilzation) เป็นขั้นตอนที่ต้องทำเพื่อให้สารละลายในหลอดทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้ทุกชิ้น ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่น ๆ ก่อนที่จะใส่เชื้อจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์และการใส่เชื้อลงไปเพื่อวิเคราะห์จำเป็นต้องทำภายในสภาวะปลอดเชื้อด้วย (aseptic technique)

การบ่มเชื้อ (incubation) ก่อนที่เราจะนำจุลินทรีย์มาใช้นั้น ต้องเตรียมถ่ายจากอาหารวุ้นลงอาหารเหลวล่วงหน้า 6-18 ชั่วโมง เพื่อเป็นการกระตุ้นเซลล์ เชื้อที่ใช้วิเคราะห์นั้นจะต้องเจือจางลง 10-100 เท่า เวลาที่ใช้การเพาะเชื้อ (incubation time) ใช้เวลาตั้งแต่ 18-72 ชั่วโมง ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์และสารที่วิเคราะห์

การวัดผล (growth measurements) วิธีวิเคราะห์โดยใช้จุลินทรีย์นี้ ขึ้นอยู่กับกระบวนการ metabolism ของจุลินทรีย์ ซึ่งถูกกำหนดโดยปริมาณสารอาหารในตัวอย่างนั่นเอง ดังนั้นการวิเคราะห์ปริมาณสารจึงสามารถทำได้โดยการวัดความเจริญเติบโตของเชื้อ คือ วัดความขุ่นที่เกิดขึ้นหลังจากเพาะเชื้อไว้ 18-24 ชั่วโมง (turbidimetrically measurement) โดย Spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 650 นาโนเมตร หรือโดยการวัดปริมาณสารที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ metabolism คือกรดแลกติกด้วยการติเตรทกับสารละลายมาตรฐานโซเดียมไฮดรอกไซด์หลังจากการเพาะเชื้อไว้เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

การคำนวณ (calculation) คำนวณหาปริมาณวิตะมินหรือปริมาณสารได้ โดยเปรียบเทียบกับสารละลายมาตรฐานจากกราฟมาตรฐานที่ทำขึ้นทุกครั้งของการวิเคราะห์ เขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความขุ่นหรือปริมาณสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ที่ใช้เป็นแกนตั้งกับความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐานวิตะมินเป็นแกนนอน



ปริมาณ (น้ำหนักสารละลายมาตรฐาน)

จากสารละลายตัวอย่างเราจะทำการวิเคราะห์หลาย ๆ จุด ปริมาตรต่าง ๆ กันแล้วหาค่าเฉลี่ยต่อ 1 หน่วยปริมาตร (มิลลิลิตร) ของสารละลายตัวอย่าง

ปริมาณของวิตะมินในตัวอย่าง = ปริมาณวิตะมินที่อ่านได้จากกราฟ (μg/ml) × Dilution

ตารางที่ 2 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิเคราะห์

รายการ	จุลินทรีย์	อุณหภูมิ ซ.	ระยะเวลา ชม.	วิธีวัดผล	ขีดจำกัดของการตรวจวัด Assay-range μg/ml
Vitamin B2	Leu.mesenteroides	37	72	ติเตรท	0.005-0.04
	L.helveticus				0.05-0.25
Vitamin B6	Sacc.carlsber-genesis	อุณหภูมิห้อง	18-24	วัดความขุ่น	0.025-0.2
Inositol					0.5-2.5
Vitamin B12	L.leichmanii	37	18-24	วัดความขุ่น	0.01-0.05 mμg
Folic acid	L.casei	37	18-24	วัดความขุ่น	0.2-1 mμg
Biotin		37	18-24	วัดความขุ่น	0.05-0.5 mμg
Niacin	L.arabinosus	37	72	ติเตรท	0.025-0.2
Pantothenic acid		37	72	ติเตรท	0.01-0.1
Alanine	Leu.citrovorum	37	18-24	วัดความขุ่น	5-25
L-Glutamic acid	L.plantarum	37	18-24	วัดความขุ่น	5-300
L-lsoleucine	Leu.mesenteroides	37	18-24	วัดความขุ่น	10-60
L-Leucine		37	18-24	วัดความขุ่น	10-60
L-Valine		37	18-24	วัดความขุ่น	10-60

หมายเหตุ : อุณหภูมิ = Temperture of Incubation°C

ระยะเวลา = Incubation Time ชั่วโมง

กรมวิทยาศาสตร์บริการในฐานะห้องปฏิบัติการแห่งหนึ่งของรัฐบาล ใช้วิธีวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์เป็นวิธีมาตรฐานในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณวิตะมิน บี ต่าง ๆ ได้แก่ วิตะมิน บี6 บี12 ไนอะซีน กรดแพนโทธินิค ไบโอติน และอินอซิทอล เป็นต้น

นอกจากวิตะมิน และกรดอะมิโนแล้ว แร่ธาตุและโลหะหนักบางชนิดก็เป็นสิ่งจำเป็นสำหรับจุลินทรีย์บางชนิดด้วย การวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์เป็นวิธีที่ใช้ได้ผลในการหาปริมาณสารปริมาณน้อย ๆ เช่น วิตะมิน ทำให้มีผู้เสนอข้อคิดเห็นให้นำมาใช้ในการวิเคราะห์หาปริมาณแร่ธาตุ และโลหะหนักบางชนิด ทั้งนี้เพราะการวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์ไม่ต้องใช้เครื่องมือพิเศษ ซึ่งต้องใช้ผู้ที่มีความชำนาญเฉพาะทาง เช่น การวิเคราะห์ทางเคมีที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

การวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์นอกจากจะเป็นวิธีวิเคราะห์ที่ให้ผลดีในด้านที่เป็นวิธีที่เชื่อถือได้จัดเป็นวิธีมาตรฐานในการวิเคราะห์เชิงปริมาณตามที่กล่าวมาแล้ว ยังเป็นประโยชน์ต่อผู้วิเคราะห์และสภาวะแวดล้อมด้วย เพราะการวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์นี้ใช้สารเคมีน้อยมาก คือกรดและด่างซึ่งเจือจางจนจัดได้ว่าปลอดภัย ไม่ใช้สารละลายอินทรีย์ในการวิเคราะห์ ดังนั้นของเสียและน้ำทิ้งจากการวิเคราะห์ส่วนใหญ่จะมีคุณสมบัติทางชีวะเท่านั้นที่สามารถทำลายได้ง่ายโดยการต้มให้เดือดไม่ทำให้เกิดปัญหาทางมลพิษต่อสภาพแวดล้อม ฉะนั้นการวิเคราะห์โดยจุลินทรีย์จึงมีความสำคัญในด้านช่วยลดมลพิษอันเกิดจากสารเคมีจากห้องปฏิบัติการอีกด้วย

เอกสารอ้างอิง

1. Barton-Wright, E.C., **The microbiological assay of the vitamin B-complex and amino acid,** London : Sir Isaac Pitman and Sons Ltd., 1952.
2. Collins, C.H., **Microbiological methods,** London : Butterworths & Co. (Publisher) Ltd., 1967.
3. Kusher, D.J., **Microbiological life in extreme environments,** London : Academic Press Inc Ltd., (1978) p.381-398.
4. **Bergey's manual of systematic bacteriology,** Vol 2 editor, Sneath P.H.A. Williams & Wilkins, Baltimore 1986.
5. The association of Vitamin Chemists, Inc. **Methods of vitamin assay,** Chicago, 1966.