การแยกและเก็บรักษาจุลินทรีย์

อาจารย์ ดร. หัสลินดา บินมะแอ
หลักสูตรจุลชีววิทยา
คณะวิทยาศาสตร์เทคโนโลยีและการเกษตร
มหาวิทยาลัยราชภัฏยะลา

ในการนำจุลินทรีย์มาใช้ในอุตสาหกรรม ซึ่งในขั้นตอนแรกของการคัดเลือกเชื้อ (screening) ได้แก่ การแยกเชื้อ (isolation) ในบางกรณีการแยกเชื้อที่สร้างผลผลิตที่ต้องการได้ในขั้นเดียว แต่บางกรณีก็อาจจะต้องใช้วิธีการสุ่มแยกเชื้อ (random isolation) ที่มีแนวโน้มว่าจะสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ออกมาก่อน ต่อจากนั้นจึงนำมาทดสอบความสามารถในการสร้างผลผลิตที่ต้องการในขั้นต่อไป หลังจากที่แยกจุลินทรีย์ที่สามารถสร้างผลผลิตที่ต้องการได้แล้ว ก็นำมาคัดเลือกสายพันธุ์ที่เหมาะสมสำหรับการผลิตในอุตสาหกรรมอีกครั้ง โดยพิจารณาจากความสามารถในการสร้างผลผลิตควบคู่ไปความประหยัดของกระบวนการผลิตที่ใช้

หลักเกณฑ์พื้นฐานในการพิจารณาคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์เพื่อใช้ในอุตสาหกรรมการหมัก

1. ความต้องการอาหารของจุลินทรีย์

ควรเลือกจุลินทรีย์ที่ใช้อาหารราคาถูก หรือ อาหารที่ต้องการให้ใช้ได้ เช่น สามารถใช้เมทานอล เป็นแหล่งพลังงานได้

2. อุณหภูมิที่เหมาะสม

การใช้จุลินทรีย์ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญสูงกว่า 40 องศาเซลเซียล ในกระบวนการหมักขนาดใหญ่ จะช่วยลดค่าใช้จ่ายในการทำให้เย็นได้อย่างมาก

3. ปฏิกิริยาระหว่างจุลินทรีย์กับเครื่องมือเครื่องใช้

ควรเลือกใช้จุลินทรีย์ที่ไม่ทำให้เกิดปฏิกิริยาใดๆ กับเครื่องมือที่ใช้และมีความเหมาะสมกับกระบวนการผลิตที่ใช้

หลักเกณฑ์พื้นฐานในการพิจารณาคัดเลือกชนิดของจุลินทรีย์ (ต่อ)

4. ความคงตัวของจุลินทรีย์และความเป็นไปได้ที่จะปรับปรุงพันธุกรรม

5. ความสามารถในการสร้างผลผลิต

ซึ่งวัดได้จากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสับสเตรตไปเป็นผลผลิตต่อหน่วยเวลา

6. การเก็บเกี่ยวผลผลิต

ควรทำได้ง่าย

7. ความเป็นพิษ

ควรใช้จุลินทรีย์ที่ไม่เป็นพิษ โดยทำการตรวจสอบความเป็นพิษของจุลินทรีย์และผลผลิต ก่อนที่นำไปใช้ในกระบวนการผลิตในระดับอุตสาหกรรม

แหล่งของจุลินทรีย์

แหล่งของจุลินทรีย์ที่จะนำมาแยกและคัดเลือกเชื้อไว้ใช้ได้นั้น อาจจะได้

- **สภาพแวดล้อมตามธรรมชาติ**
- **ศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์**

ในปัจจุบันเกือบทุกประเทศจะมีศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ ไว้ให้บริการแก่บุคคลทั่วไป เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาวิจัย ในไทยก็มีศูนย์เก็บรวบรวม เรียกว่า TISTR (Thailand Institute of Scientific and Technological Research) อยู่ที่สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

แหล่งของจุลินทรีย์

ศูนย์เก็บรวบรวมจุลินทรีย์ส่วนใหญ่ จีข้อมูลเกี่ยวกับลักษณะและคุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อที่เก็บรวบรวม การเลือกเชื้อจากศูนย์จะมีราคาถูกกว่าการแยกเชื้อจากธรรมชาติแต่มีให้เลือกไม่มากนัก และมักไม่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุด ในขณะเลือกจากแหล่งธรรมชาติต่างๆ มีจุลินทรีย์จำนวนมาก และมีหลายชนิดมากกว่า ดังนั้นการแยกและคัดเลือกวิธีที่เหมาะสมอาจได้เชื้อที่มีคุณสมบัติที่ดีที่สุดได้

วิธีการแยกเชื้อ

วิธีการแยกเชื้อที่ดีนั้น ควรเริ่มต้นด้วยการแยกเชื่อจากแหล่งธรรมชาติที่สำคัญ คือ ดิน ซึ่งมีจุลินทรีย์ชนิดต่างๆ โดยพยายามเลือกดินที่มีแนวโน้มที่จะมีจุลินทรีย์ที่ต้องการอยู่ด้วย นำมาผสมเจือจางให้เหมาสมเพาะเลี้ยงในสภาวะที่เหมาะสม และใช้วิธีการง่ายๆ ในการทดสอบคุณสมบัติหรือลักษณะเฉพาะที่ต้องการ

แต่บางกรณีที่ไม่สามารถใช้คุณสมบัติ หรือลักษณะเฉพาะที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือกได้ ก็อาจใช้วิธีการสุ่มแยกจุลินทรีย์เฉพาะกลุ่ม ซึ่งมีแนวโน้มสูงกว่าจะมีคุณสมบัติ หรือลักษณะเฉพาะตามต้องการออกมาก่อนแล้วจึงนำไปทดสอบต่อในภายหลัง

วิธีการแยกเชื้อ โดยใช้คุณสมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก

1. Enrichment liquid culture

เป็นเทคนิคการแยกเชื้อโดยใช้อาหารเหลว ซึ่งเติมสารบางอย่างที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ต้องการ เช่น การใส่สับเตรตที่จำเพาะที่เหมาะกับการเจริญ หรือเติมสารบางอย่างที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ชนิดที่ไม่ต้องการ เช่น การเติมสารปฏิชีวนะ

การแยกเชื้อโดยใช้วิธีนี้จึงนิยมถ่ายเชื้อจาก Enriched culture ลงไปในอาหารใหม่ ซึ่งมีส่วนประกอบเหมือนเดิมซ้ำอีกหลายๆ ครั้ง โดยที่ถ่ายเชื้อแต่ละครั้งนั้นจะต้องเลือกระยะเวลาที่เหมาะสม ซึ่งเป็นช่วงที่มีจุลินทรีย์ที่ต้องการเจริญอยู่เป็นจำนวนมาก กว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ จากนั้นจึงนำเชื้อจาก Enriched culture ปริมาณเพียงเล็กน้อย ไปกระจาย บนอาหารแข็งเพื่อแยกเชื้อที่ต้องการออกมา ทำให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ และเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

เทคนิค **Enrichment liquid culture** ที่กล่าวมาแล้ว เป็นการแยกเชื้อโดยใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อแบบ batch และเชื้อที่แยกได้จะเป็นเชื้อที่มีอัตราการเจริญจำเพาะสูงสุด และสูงกว่าจุลินทรีย์ชนิดอื่นๆ ส่วนการแยกเชื้อโดยใช้วิธี continuous **enrichment culture** นี้มีประโยชน์ในการแยกจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถแยกแบบ batch และเหมาะสำหรับการแยกเพื่อใช้ในกระบวนการหมักต่อเนื่องในอุตสาหกรรม แต่ก็มีปัญหาที่สำคัญคือ การชะล้างเซลล์เริ่มต้นออกจากระบบจนหมด แก้ไขโดยเริ่มต้นเพาะเชื้อแบบ batch ก่อน เมื่อเชื้อเจริญเพิ่มจำนวนมากขึ้นจนกระทั่งสังเกตเห็นได้แล้ว จึงนำไปเพาะเลี้ยงในระบบต่อเนื่อง

2. การใช้อาหารแข็ง (Solidified medium)

การแยกเชื้อโดยใช้อาหารแข็งนี้ นิยมใช้ในการแยกจุลินทรีย์ที่ผลิตเอนไซม์ โดยเติมสับเสตรตของเอนไซม์ชนิดที่ต้องการลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น การแยกเชื้อ *Bacillus* spp. ที่ผลิตเอนไซม์อัลคาลีนโปรติเอส จากดิน โดยนำดินมาพลาสเจอไรส์ เพื่อกำจัดจุลินทรีย์ที่ไม่สร้างสปอร์ออกก่อน จากนั้นนำไปเพาะเลี้ยงบนอาหารแข็งที่มีโปรตีนที่ไม่ละลายน้ำเป็นส่วนผสมอยู่ และมี pH 9-10 เชื้อสร้างเอนไซม์อัลคาลีนโปรติเอส ได้ จะสามารถเจริญและทำให้เกิดบริเวณวงใส แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเหลว ดังนั้นการแยกเชื้อโดยวิธีนี้จึงเป็นเพียงการแยกเชื้อขั้นต้น เพื่อให้ได้จุลินทรีย์ที่มีความสามารถในการผลิตสารที่ต้องการเท่านั้น ถ้าต้องการคัดเลือกเชื้อที่ให้ผลผลิตสูง จะต้องนำเชื้อที่แยกได้นี้ไปทำการทดสอบในขั้นต่อไป

วิธีการแยกเชื้อโดยไม่ได้ใช้คุณสมบัติที่ต้องการเป็นปัจจัยในการคัดเลือก

การแยกจุลินทรีย์บางชนิดที่ไม่สามารถใช้ให้เป็นประโยชน์ในการแยกเชื้อได้โดยตรง จึงต้องเริ่มจากการสุ่มแยกเชื้อกลุ่มที่มีแนวโน้มว่าจะสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ออกมาก่อน แล้วจึงใช้เทคนิคที่สามารถคัดเลือกจุลินทรีย์ที่สร้างผลผลิตตามต้องการได้ในภายหลัง เช่น การแยกจุลินทรีย์เพื่อใช้ในการผลิตสารปฏิชีวนะ สารส่งเสริมการเจริญ กรดอะมิโน และนิวคลีโอไทด์ เป็นต้น สำหรับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อที่แยกได้ก่อนจะนำไปวิเคราะห์คุณสมบัติที่ต้องการนั้น ควรเป็นอาหารที่สามารถทำให้เชื้อแสดงลักษณะทางพันธุกรรมที่มีอยู่ออกมาได้มากที่สุด และสร้างผลผลิตที่ต้องการได้ในปริมาณสูง

วิธีการแยกเชื้อ

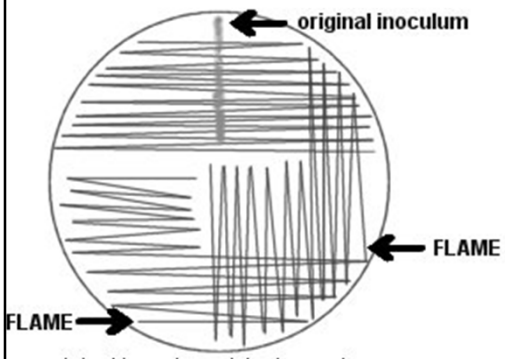
การคัดเลือกเชื้อเพื่อใช้ในอุตสาหกรรม

1. Primary screening
2. Secondary screening

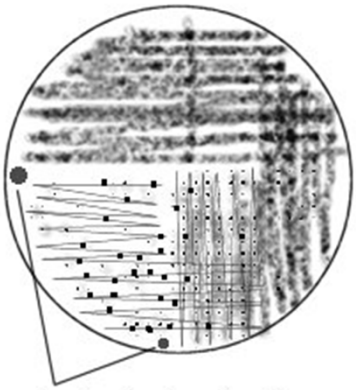
Primary screening

- แยกจุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์ออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่เป็นประโยชน์
- แยกตรวจสอบจุลินทรีย์ที่อาจเป็นประโยชน์ต่ออุตสาหกรรม
- Spread plating, streak plating, crowded plating, replica plating

Streak plating



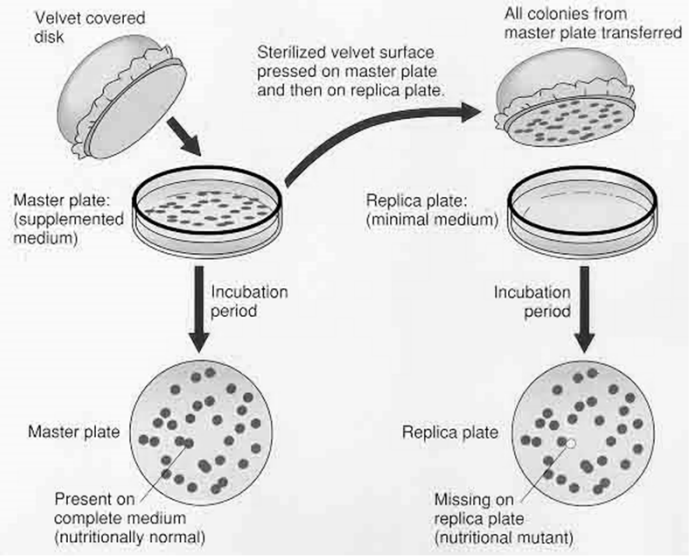
original inoculum picked up only once
loop glides over top of agar medium
loop flamed at beginning of new section
3-5 crossovers from new section into previous
then streak only within that section



contaminants not on streak lines

well-isolated colonies in 3rd section

Replica plating

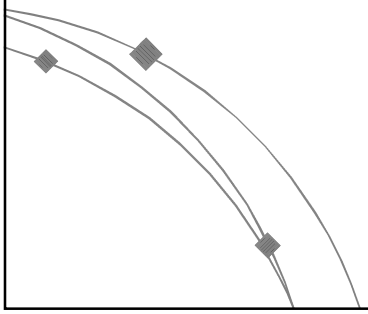


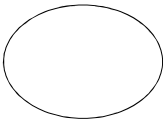
วิธีเจือจาง (Dilution)

Sample ⇨ dilute ⇨ spread on optimal media

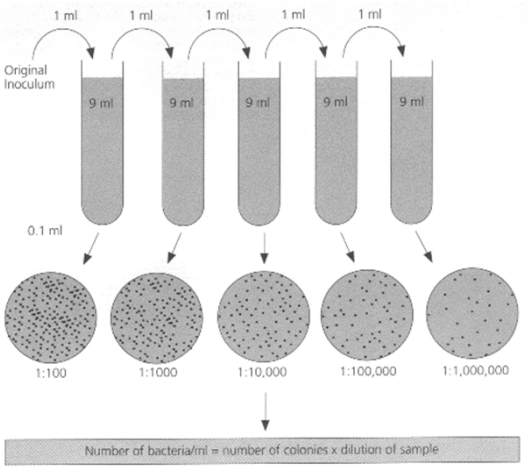
⇩

single colony





Dilution



Crowded plate

- Antibiotic produced microorganism

Samples ⇒ ditute ⇒ pour plate
300-400 colony

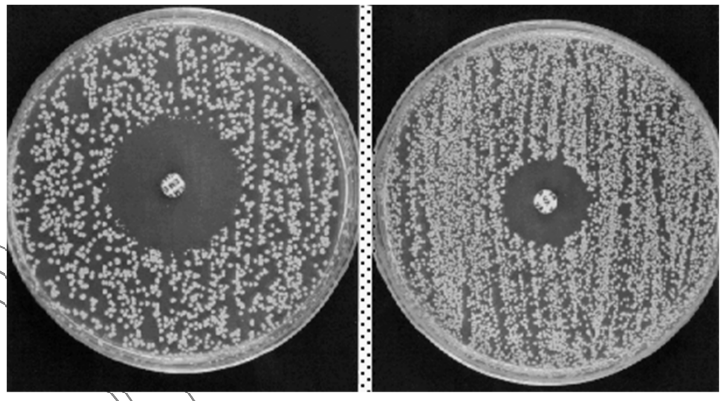
⇩

clear zone

⇩

microbial inhibition spectrum ⇦ purity

Clear zone



Secondary screening

- ศึกษาคุณสมบัติ/ ประสิทธิภาพของจุลินทรีย์ที่ได้รับการคัดเลือกมาแล้ว
- วัตถุประสงค์และขอบเขต

1. ตรวจสอบคุณสมบัติของสารที่จุลินทรีย์สร้าง
2. อาหารเลี้ยงเชื้อ
3. identify ⇨ Family/Genus
   - เปรียบเทียบกับเชื้อที่จดสิทธิบัตรแล้ว
   - คุณสมบัติการก่อโรคของเชื้อ
   - คุณสมบัติต่างๆ ของเชื้อ
4. สร้างสารเคมีชนิดใหม่หรือไม่

5. สภาวะในการเจริญและผลิตสาร

6. คุณสมบัติทางฟิสิกส์และเคมีที่ช่วยให้หาปริมาณสารเคมีได้

7. ความคงตัวทางพันธุกรรม

8. ทดสอบความเป็นพิษของสาร

9. กระบวนการหมัก/ สร้าง end product/intermediates

10. จุลินทรีย์ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีหรือทำลายสารที่ผลิตหรือไม่

หลักในการคัดเลือก

- ความสามารถของจุลินทรีย์
- การคงสภาพของจุลินทรีย์

  - คงสภาพของคุณสมบัติ มีกิจกรรมในการทำให้เกิดผลิตภัณฑ์คงเดิม มีผลผลิตสม่ำเสมอแน่นอน
  - คงสภาพความบริสุทธิ์ ไม่มีจุลินทรีย์อื่นปนเปื้อน

การเก็บรักษาจุลินทรีย์

การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ทางอุตสาหกรรม

สิ่งสำคัญที่ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่ว่าจะเป็นพืช สัตว์และจุลินทรีย์ แตกต่างไปจากสิ่งที่ไม่มีชีวิต ก็คือ สิ่งมีชีวิตจะต้องมี สารพันธุกรรมหรือยีน ประกอบอยู่ด้วย ยีนจะเป็นตัวกำหนด หรือบังคับพฤติกรรม และปฏิกิริยาชีวเคมี ของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ และถ่ายทอดสู่ลูกหลาน จุลินทรีย์มียีนที่ควบคุมคุณสมบัติหลากหลาย ทั้งที่เป็นโทษและเป็นประโยชน์ต่อมนุษย์ เช่น มนุษย์ได้นำจุลินทรีย์มาใช้ประโยชน์ในการทำยาปฏิชีวนะหรือในอุตสาหกรรมผลิตสารต่างๆ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพที่มีชีวิตอยู่ จึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง ซึ่งก็หมายถึงการเก็บรักษายีนให้คงอยู่ตลอดไปและสามารถนำไปใช้ได้เมื่อต้องการ

วัตถุประสงค์เพื่อ

1. เพื่อเก็บจุลินทรีย์ไว้ให้อยู่ในสภาพมีชีวิตต่อไป
2. เพื่อเก็บเชื้อในสภาพที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ปราศจากการปนเปื้อนจากเชื้อชนิดอื่น
3. เพื่อเก็บรักษาเชื้อให้คงสภาพเดิมต่อไป ไม่มีการเปลี่ยนแปลงด้านพันธุกรรม
4. มีอายุการเก็บรักษานานที่สุด

การเก็บรักษาจุลินทรีย์

ลักษณะของจุลินทรีย์ในระหว่างเก็บรักษา

1. ความสามารถในการขยายพันธุ์
2. ความสามารถในการทำงาน
3. ความสมบูรณ์ทางพันธุกรรม

หลักการ

หยุด/ ลดอัตราการเจริญของจุลินทรีย์ โดยการควบคุมหรือกำจัดปัจจัยสำคัญของการเจริญ เช่น ออกซิเจน น้ำ อุณหภูมิ และสารอาหาร เป็นต้น

+++ จุดประสงค์ในการเก็บรักษา +++++

- จุลินทรีย์มีชีวิตยาวนาน
- จุลินทรีย์บริสุทธิ์
- ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรม

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการเก็บรักษาจุลินทรีย์

- ชนิดของจุลินทรีย์
- วัตถุประสงค์ของการเก็บ
- ความพร้อมของอุปกรณ์
- บุคลากร
- งบประมาณ
- สถานที่ในการเก็บรักษา

ข้อคำนึงในการเก็บรักษา

- long time

- low metabolism

- not usually transfer

- viable

--- liquid paraffin -> mold, bacteria

yeast, not freezing microorganism

--- liquid nitrogen -> mold, bacteria

--- freeze-dry / liophilization

--- soil culture -> mold, actinomyces

Method for Preservative

1. **subculturing**

   - เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม

   - เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ต้องใช้งานบ่อยๆ

   - เก็บบนอาหารวุ้นเอียง

   - อายุการเก็บ 6 เดือน

วิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

1. เตรียมอาหาร NA นำไปปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. นำตัวอย่างของแบคทีเรีย streak plate บนอาหาร NA

3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

วิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียบนอาหารแข็งเอียง

1. เตรียมอาหาร NA ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นนำมาเอียง

2. นำตัวอย่างของแบคทีเรีย Streak บนอาหารเอียงที่เตรียมไว้ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3. สังเกตลักษณะของแบคทีเรียเจริญในหลอดทดลองของอาหารเลี้ยงเชื้อ

วิธีการเก็บรักษาแบคทีเรียในอาหารเหลว

1. เตรียมอาหาร NB ลงในหลอดทดลอง จากนั้นนำไปปราศจากเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

2. ใช้ลูปแตะตัวอย่างของแบคทีเรีย 1 ลูป ฟูลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ คนให้เข้ากัน

3. บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

Method for Preservative

2. Reduce matabolic rate

2.1 เก็บภายใต้พาราฟินเหลว (liquid paraffin)

- เทพาราฟินเหลวปลอดเชื้อทับให้ท่วมโคโลนีบนอาหารวุ้นเอียง ประมาณ 0.5 นิ้ว

- เก็บที่อุณหภูมิห้อง 0-5 องศาเซลเซียส

- เหมาะกับเชื้อรา (เก็บได้ 1 ปี)

2.2 เก็บในน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (distilled water)

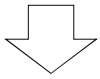
- นำน้ำกลั่นปลอดเชื้อผสมกับจุลินทรีย์

- เก็บที่อุณหภูมิห้อง

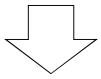
- แบคทีเรีย/ ยีสต์บางชนิด เก็บได้ 4 ปี ราบางชนิดเก็บได้ 8 ปี

วิธีการ : การเก็บรักษาแบคที่เรียบนอาหารวุ้นเอียงภายใต้พาราฟินเหลว

เพาะเชื้อโดยถ่ายเชื้อบนอาหารวุ้น



เมื่อเชื้อเจริญบนอาหารเต็มที่แล้วจึงเทพาราฟินเหลว (ซึ่งทำการฆ่าเชื้อแล้ว) ทับลงไปให้ท่วมโคโลนีของเชื้อราโดยให้ระดับพาราฟินอยู่สูงจากบริเวณที่เชื้อเจริญ



นำเก็บที่อุณหภูมิห้องหรือจะให้ดีบ่มที่อุณหภูมิ 0-5 องศาเซลเซียส

วิธีการเก็บรักษาเชื้อราในน้ำกลั่น

ทำโดยตัดชิ้นวุ้นรูปสี่เหลี่ยมขนาด 6 ตร.ซม.
จากโคโลนีให้ได้ปลายเส้นใยที่กำลังเจริญ

2จากนั้นนำโคโลนีที่ได้ใส่ลงในน้ำที่ปราศจากเชื้อที่เตรียมไว้ในหลอดทดลอง

บ่มที่อุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียล

Method for Preservative

3. Drying
: ดึงน้ำออกจากเซลล์จุลินทรีย์เพื่อหยุดการเจริญ
3.1 storage in sterile soil

cell suspension ⇒ sterile soil

dry at room temp. 10 days

keep at 4-7 ^{o}C, many years

วิธีการเก็บเชื้อราโดยวิธีการเก็บในดิน

1. นำดินสวนมาผสมกับทรายอย่างละครึ่ง ความชื้นประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์
2. นำดินที่ผสมกันแล้วใส่ลงหลอดทดลอง ประมาณ 1/3 หลอด เช็ดปากหลอดให้สะอาดก่อนปิดฝาอย่าให้ดินติดปากหลอดที่จะทำให้ปิดหลอดไม่สนิท
3. นำหลอดที่เตรียมไว้นำไปบ่มฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทำซ้ำ 2 ครั้ง เพื่อฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ในดินทั้งหมด
4. เตรียมเชื้อราที่เจริญเต็มเพลตเพื่อที่จะนำมาทำสปอร์ซัสเพนชัน
5. จากนั้นดูดน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อแล้วใส่ลงเพลตที่มีเชื้อราเจริญ
6. ใช้ลูปเขี่ยของสปอร์หรือเส้นใยของเชื้อรา
7. ดูดซัสเพนชั่นของสปอร์ราที่เตรียมไว้น้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วใส่ลงหลอดประมาณ 1 มิลลิลิตร
8. บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 วัน ปิดฝาเพื่อให้ความชื้นคงอยู่ในหลอด
9. คลายฝาหลอดเล็กน้อยในช่วงวันท้ายๆ เพื่อให้ความชื้อระเหยออกและให้ดินแห้ง
10. เก็บหลอดเชื้อในสภาพที่คลายฝาเล็กน้อยในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4-7 องศาเซลเซียส

Method for Preservative

3.2 storage on paper strips or discs

Sterile paper strips ⇨ cell suspension
+
evaporated milk
⇩
Desicator
(2-3 years)

วิธีการ : เก็บรักษายีสต์โดยการทำให้แห้งบนกระดาษกรอง

1. เพาะยีสต์ลงบนอาหาร yest exyract peptone dextorse (YPD) agar ที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ซึ่งใช้เวลา 24 ชั่วโมง

2. เตรียมซัสเพนชันจากหางนมที่ผสมกับน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้วใส่ยีสต์ลงไปผสมให้เข้ากัน

3. ถ่ายเชื้อที่ได้จากสารละลายหางนมปริมาณ 0.2 มิลลิลิตร บนจานเพาะเชื้อที่ปลอดเชื้อ

4. เตรียมกระดาษกรองเบอร์ 4 โดยตัดเป็นชิ้นสีเหลี่ยมขนาดปริมาณ 1 ตารางเซนติเมตรใส่กระดาษกรอง 4-5 ชิ้น ลงบนแผ่นอะลูมิเนียมฟรอยด์ขนาด 7 × 6 ตารางเซนติเมตร พับปิดเป็นรูปสี่เหลี่ยมแล้วทำการนำไปปลอดเชื้อโดยการฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

5. นำกระดาษกรองที่ปลอดเชื้อไปแช่ในซัสเพนชันของเซลล์แล้ว นำกลับมาไว้ในฟรอยด์ตามเดิมพับ
ฟรอยด์ปิดหนึ่งด้านส่วนอีกสามด้านเปิดไว้ เพื่อให้น้ำในซัสเพนชันระเหยจนแห้ง

6. นำห่อฟรอยด์ไปไว้ใน desccator เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2-3 สัปดาห์หรือจนแห้ง

Method for Preservative

3.3 predried plug (เก็บบนวัตถุระเหิดแห้ง)

: starch, peptone, dextran

- เหมาะกับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเก็บโดยวิธี freeze-dry
- นำสารตัวกลางเข้าเครื่อง freeze-dryer ให้แห้งก่อนแล้วจึงนำสารผสมจุลินทรีย์หยดลงไป และทำให้ภายในหลอดเป็นสุญญากาศก่อนปิดให้สนิท

Method for Preservative

3.4 เก็บบนแผ่นเจลาติน (gelatin discs)

- nutrient gelatin + 0.25% ascorbic acid 2-5 ml
- 10^{10} cell/ml
- หยดลงบนจานอาหารทีละหยด
- ทำให้แห้งใน desicator ที่ใช้ vacuum pump/ freeze-dry
- เก็บในหลอดปลอดเชื้อ

Desicator

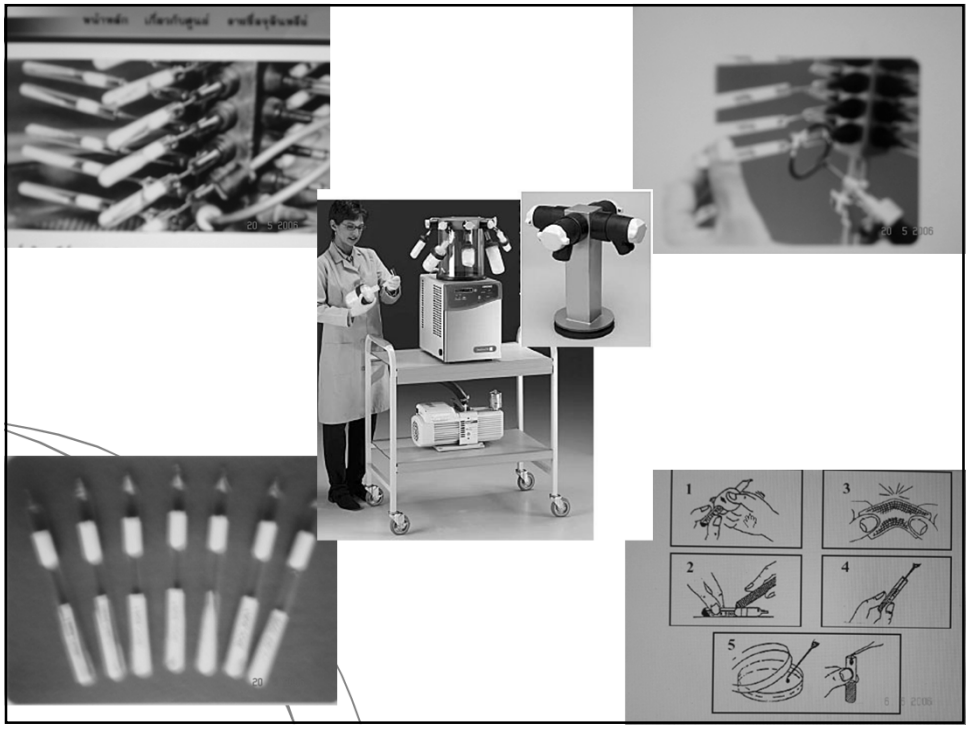
Method for Preservative

3.5 freeze-drying / lyophilization

- **suspending medium → skim milk, glucose serum**
- **จุลินทรีย์บนอาหารวุ้นผสม suspending medium**
- **ทำให้เซลล์แข็งตัวในสภาพสุญญากาศ น้ำในเซลล์ถูกดึงออกโดยการระเหิด**

จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแห้งและแข็ง

- **เก็บได้นานกว่า 10 ปี**
- **ลักษณะของเซลล์ อายุ ความเข้มข้น อาหารแขวนลอย มีผลต่ออัตราการรอดชีวิต**
- **พื้นที่ในการเก็บน้อย สะดวกต่อการเคลื่อนย้าย**
- **เครื่องมือราคาแพง**
- **ไม่เหมาะกับเห็ด และราที่ไม่สร้างสปอร์**



Method for Preservative

4. Freezing

: ทำให้น้ำในเซลล์กลายเป็นน้ำแข็งโดยการลดอุณหภูมิ

4.1 storage in liquid nitrogen

- cryoprotactant -> glyceral, dimethyl sulphoxide

- ผสมจุลินทรีย์กับ cryoprotactant แล้วถ่ายใส่ cryotube

- นำเข้าเครื่องลดอุณหภูมิ -20 ถึง – 30 ^{o}C

- rate of freezing and thawing 1 ^{o}C/1 min

- เก็บในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ – 196 ^{o}C

- low metabolism /ใช้ได้กับจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด

- การสูญเสียระหว่างเก็บรักษาเกิดขึ้นน้อย

- ข้อเสีย คือ ค่าบำรุงรักษาแพง และอันตรายถ้าอุปกรณ์ขัดข้อง

Method for Preservative

4.2 storage at -80 ^{o}C

ใช้หลักการเดียวกับการเก็บในไนโตรเจนเหลว แต่สามารถนำหลอดเชื้อ ใส่ในตู้แช่ได้โดยไม่ต้องลดอุณหภูมิก่อนนำเข้าตู้แช่

Method for Preservative

วิธีการปลีกย่อยอื่นๆ

- เก็บในซิลิกาเจล โดยอบซิลิกาเจลขนาด 6-22 mesh ให้ปลอดเชื้อ
  - ผสมเซลล์จุลินทรีย์กับหางนมให้เข้ากัน
  - ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดเซลล์แขวนลอยหยดลงบนซิลิกาเจล
  - เขย่าให้ทั่ว ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนาน 2 อาทิตย์
  - เก็บในตู้เย็นนาน 2-4 ปี

Method for Preservative

- เก็บแบบเคลือบบนเม็ดแก้ว
  - เม็ดแก้วขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. 15-20 เม็ด ใส่ในหลอดแก้วฝาเกลียว นึ่งฆ่าเชื้อ
  - ผสมจุลินทรีย์ด้วยอาหารเหลว +15% (v/v) glyceral
  - ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดสารแขวนลอยของเชื้อใส่หลอดเม็ดแก้ว คลุกให้ทั่ว แล้วดูดสารละลายที่เหลืออกจากหลอดให้หมด
  - นำหลอดเม็ดแก้วเก็บในตู้แช่แข็ง

การควบคุมคุณภาพจุลินทรีย์ที่เก็บรักษา

- นำโคโลนีเดี่ยวๆ ที่จะเก็บรักษาไปเลี้ยงในอาหารเหลว เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติต่างๆว่า ถูกต้อง ก่อนเก็บรักษา

- เก็บรักษาแล้วต้องตรวจความบริสุทธิ์ การมีชีวิต และความสามารถในการสร้างผลผลิตของจุลินทรีย์

- ถ้าพบว่ามีคุณสมบัติไม่ถูกต้อง จะต้องทำลายแอมพูลทั้งหมด ไม่สามารถเก็บไว้ใช้เป็น stock culture ได้

หน่วยงานเก็บรักษาจุลินทรีย์

- American Type Culture Collection (ATCC) U.S.A.
- Institute for Fermentation, Osaka (IFO) Japan
- Microbiological Resource Center for the Southeast Asian Region (Bangkok MIRCEN) Thailand
- National Collection of Type Culture (NCTC), U.K.
- Institute Pasteur (IP), France