

การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

หลังจากการแยกเชื้อบริสุทธิ์ของจุลินทรีย์ได้แล้ว ก่อนที่จะนำไปศึกษาคุณสมบัติด้านต่างๆนั้น ต้องนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเพิ่มปริมาณให้มากพอ และมีการเก็บรักษาให้ถูกวิธี เพื่อไม่ให้เชื้อเกิดการปนเปื้อนกับเชื้ออื่นๆ และสามารถเก็บไว้ได้นานโดยไม่สูญเสียพันธุ์หรือกลายพันธุ์ หรือสูญเสียคุณสมบัติไป ในปัจจุบันหลายประเทศมีสถาบันเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เพื่อบริการแก่หน่วยงานที่ต้องการนำเชื้อจุลินทรีย์ไปศึกษาวิจัย หรือปฏิบัติทางพันธุวิศวกรรม ในประเทศไทยมีหน่วยงานเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่สถาบันวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

วิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ดังนี้

1. Subculture เป็นการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในหลอดอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งเป็นวิธีการที่ง่ายที่สุด และมักใช้ในหองปฏิบัติการทั่วไป โดยการนำเชื้อมาเลี้ยงในหลอดอาหาร เมื่อเชื้อเจริญสูงสุดและเข้าสู่ระยะที่จะตายลง ต้องทำการถ่ายเชื้อไปสู่หลอดอาหารใหม่ ซึ่งระยะเวลาในการถ่ายเชื้อแต่ละครั้งจะแตกต่างกันไป แล้วแต่นิตของจุลินทรีย์ อาหารที่ใช้ และสภาพในการเก็บรักษา การเก็บหลอดเลี้ยงเชื้อในที่ที่มีอากาศเย็น เช่น ในตู้เย็น จะทำให้เชื้อเจริญได้ช้าลง การใช้ฝาเกลียวปิดหลอดอาหารแทนการใช้จุกสำลี จะทำให้อากาศไม่ผ่านเข้าออก ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแห้งช้าลง เชื้อเจริญอยู่ได้นาน นอกจากนี้การปิดทับผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยพาราฟินเหลว (Liquid parafin) เป็นการยืดอายุการเก็บเชื้อให้ยาวนานออกไปได้อีกวิธีการเก็บรักษาเชื้อโดยการถ่ายเชื้อบ่อยๆ อาจทำให้เกิดผลเสียหายหลายประการ เช่น เกิดการปนเปื้อนกับเชื้ออื่น (Contamination)

2. เก็บภายใต้พาราฟินเหลวหรือน้ำมันแร่ ทำเหมือนวิธีแรก แต่เมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้วให้เทพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วทับให้ท่วมโคโลนีเชื้อ ให้ระดับพาราฟินอยู่สูงจากปลายวุ้นอาหารครึ่งนิ้ว เก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 0-5 °C วิธีนี้มีข้อดีคือเสียเหมือนวิธีแรก แต่จะเก็บได้นาน 1-2 ปี และไม่สะดวกเวลาจะมาใช้เนื่องจากมีน้ำมันเททับ

3. Drying เป็นการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในสภาพแห้ง เป็นการทำให้จุลินทรีย์มีอัตรา Metabolism ต่ำลง วิธีนี้ไม่ค่อยนิยมใช้ เพราะจุลินทรีย์บางชนิดเก็บรักษาโดยวิธีนี้จะไม่ได้ผล เพราะจะตายในสภาพแห้งและขาดน้ำ วิธีนี้จะใช้กับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถทนทานต่อสภาพเย็นจัดได้ และใช้กับจุลินทรีย์ที่มีสปอร์

4. Freezing เป็นการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพเย็นจัด ใช้ได้กับจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด และมีอายุการเก็บรักษายาวนาน วิธีการ คือ เพาะเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้นจนเชื้อเจริญดีแล้วก็ผสมสาร

ป้องกันไม่ให้เซลล์ถูกทำลาย (Cryoprotective agent) ในขณะแช่แข็ง เช่น glycerol หรือ dimethyl sulphoxide ผสมให้เข้ากันดี แล้วถ่ายใส่หลอดขนาดเล็กปิดฝาให้แน่น ใส่ในเครื่องลดอุณหภูมิ แล้วนำไปเก็บในถังบรรจุไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส วิธีการนี้จะเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้นาน ซึ่งวิธีการนี้สามารถเก็บได้นานถึง 30 ปี วิธีการนี้ใช้ได้กับจุลินทรีย์เกือบทุกชนิด อายุการเก็บนานกว่าวิธีอื่น แต่ข้อเสีย คือ เครื่องมือและหลอดเก็บราคาสูง สิ้นเปลืองไนโตรเจนเพราะระเหยตลอดเวลา

5. Lyophilization หรือ Freeze-drying เป็นวิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำมากๆ ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง จะทำให้กิจกรรมของจุลินทรีย์หยุดชะงักเป็นวิธีการที่นิยมในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่ และมีเชื้อบริสุทธิ์จำนวนมาก วิธีการเก็บรักษาทำโดยเลี้ยงจุลินทรีย์บนอาหารวุ้น จนเชื้อเจริญดีจึงผสมของเหลว เช่น horse serum ลงไป แล้วถ่ายเชื้อลงในหลอดแก้ว นำไปเข้าเครื่อง lyophilizer ซึ่งทำให้เชื้ออยู่ในสภาพเย็นจัดและแข็งตัวในสภาพสุญญากาศ วิธีการนี้ทำให้จุลินทรีย์คงสภาพรูปร่างและมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นสิบปี

การเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละชนิดมีวิธีการที่แตกต่างกันไป ขึ้นอยู่กับชนิด จำนวนของจุลินทรีย์ และความเหมาะสมในการปฏิบัติงาน นอกจากนี้ยังมีวิธีการอื่นๆ อีก เช่น การเก็บรักษาแบคทีเรียบนอาหารวุ้นภายใต้พาราฟินเหลว ซึ่งเป็นวิธีการที่ไม่ยุ่งยาก และยังสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้นาน ยีสต์สามารถเก็บรักษาโดยการทำให้แห้งบนกระดาษกรอง เชื้อราบางชนิด เช่น *Aspergillus* sp., *Penicillium* sp. สามารถเก็บรักษาได้หลายวิธี แต่มีวิธีหนึ่งที่นิยมและเก็บรักษาได้ดี คือ การเก็บรักษาในดิน ซึ่งสามารถเก็บรักษาได้นานถึง 10 ปี และเชื้อรายังคงมีสภาพทางพันธุกรรมไม่เปลี่ยนแปลง

วิธีการรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ยกตัวอย่างมานี้ ทุกวิธีมีกระบวนการมีขั้นตอนที่จะต้องปฏิบัติสรุปได้ดังนี้ คือ การทดสอบความบริสุทธิ์ และคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อที่ต้องการจะเก็บ โดยต้องทราบข้อมูลเกี่ยวกับจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บ คุณสมบัติเฉพาะของจุลินทรีย์ที่จะเก็บรักษา อาหาร, อุณหภูมิ และ เวลาที่เหมาะสม ที่ใช้ในการบ่มเชื้อ และบันทึกไว้

การเตรียมหลอดสำหรับการจัดเก็บเชื้อ หลอดแก้วเก็บเชื้อ (Ampoules) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว มีการติดป้ายชื่อรหัสให้เรียบร้อยเพื่อป้องกันการสับสนการเลี้ยงเชื้อ จุลินทรีย์ให้เจริญ พร้อมใช้งาน รอรับการถ่าย

เตรียมเชื้อให้อยู่ในรูปสารละลาย (Suspension Cell) ในอาหารเก็บเชื้อ สารละลายที่เหมาะสม

เก็บรักษาเชื้อ จุลินทรีย์ ในหลอดแก้วเก็บเชื้อ (Ampoules) เหล่านี้ตามวิธีที่กำหนด วิธีที่เลือกซึ่งเหมาะกับห้องปฏิบัติการของตน

จัดทำบันทึก หลักฐาน ข้อมูลต่างๆ วันที่จัดเก็บ จำนวนหลอดที่จัดเก็บ

เมื่อนำเชื้อ จากหลอดมาใช้งาน ต้องตรวจสอบ คุณภาพของเชื้อ คือ ทดสอบการมีชีวิตรอด คุณสมบัติทางพันธุกรรม และคุณสมบัติเฉพาะของเชื้อ นั้น ๆ ซึ่งต้องถูกต้องตรงกันก่อนนำไปใช้งานจริง

จุดประสงค์การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ คือ การรักษาจุลินทรีย์ ที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ไว้ในสภาพที่มีชีวิตอยู่ มีคุณสมบัติเหมือนเดิม ไม่เกิดการปนเปื้อนเพื่อ

- ใช้งานประจำ (Working Culture)
- การควบคุมคุณภาพของผลิตภัณฑ์
- เก็บไว้เพื่อเป็นเชื้ออ้างอิง (Reference Culture) ในการตรวจสอบความถูกต้องวิธีวิเคราะห์ทดสอบ ควบคุมคุณภาพทางจุลชีววิทยา ซึ่งเป็นสิ่งสำคัญที่จะเพิ่มความเชื่อมั่นในผลการทดสอบ

การทดลองที่ 1 การเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยเก็บภายใต้พาราฟินเหลว

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น แบคทีเรีย โดยการเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง แล้วทำการ streak ในอาหาร NA slant เมื่อจุลินทรีย์เจริญเต็มที่แล้วให้เทพาราฟินเหลวที่ฆ่าเชื้อแล้วทับให้ท่วมโคโลนีเชื้อ ให้ระดับพาราฟินอยู่สูงจากปลายวุ้นอาหารครึ่งนิ้ว เก็บที่อุณหภูมิห้อง หรือที่ 0-5 °C โดยการเก็บรักษาเชื้อละ 2 หลอด จำนวน 1 เดือน และหลอดควบคุมคือไม่เติมพาราฟินเหลว

การทดลองที่ 2 การเก็บรักษาจุลินทรีย์ภายใต้กลีเซอรอล 15%

การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ เช่น แบคทีเรีย รา โดยการเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อใส่ในหลอดกลีเซอรอล 15% สำหรับเตรียมเก็บรักษาหลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยการเก็บรักษาเชื้อละ 2 หลอด จำนวน 1 เดือน และหลอดควบคุมคือไม่เติมกลีเซอรอล

การตรวจสอบ

นำเชื้อไปเก็บรักษาทั้ง 2 วิธี ดังนี้ คือ การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ภายใต้น้ำมันพาราฟินเหลวและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 15% และแช่เย็นที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำเชื้อมาเพาะเลี้ยง ใหม่เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตบนอาหาร Nutrient agar หลังการเก็บรักษาไว้เชื้อ 1 เดือน

บันทึกผลการทดลอง

ภาพการเจริญของเชื้อหลังจากการเก็บรักษาสายพันธุ์	บรรยายลักษณะของโคโลนี

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

.....

.....

.....

คำถามท้ายบท

1. เพราะเหตุใดจึงจำเป็นต้องเก็บรักษาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์
2. เชื่อสามารถอยู่รอดภายใต้พาราฟินเหลวเพราะเหตุใด
3. การ subculture คือ
4. เชื่อสามารถอยู่รอดภายใต้กลีเซอรอล 15%เพราะเหตุใด