การเก็บและรักษาสภาพของเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เพื่อใช้ในห้องปฏิบัติการ

Preservation and maintenance of *Pseudomonas aeruginosa* for use in the laboratory

สุจิตรา ยาหอม[1*], จิตรสุดา กุลวัฒน์[1], สุทธิวรรณ ธรรมวัตร[1]

Sujitra Yahom[1*], Jitsuda Kullawat[1], Sutthiwan Thammawat[1]

Received: 1 June 2018 ; Revised : 7 August 2018 ; Accepted: 15 August 2018

บทคัดย่อ

การรักษาเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ มีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษาและดูแลเชื้อบริสุทธิ์ให้อยู่ในสภาพที่ยังมีชีวิตอยู่ โดยเมื่อนำกลับมาเพาะเลี้ยงแล้วเชื้อต้องมีคุณสมบัติเหมือนเชื้อดั้งเดิม ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น โดยการเก็บรักษาแบคทีเรีย *Pseudomonas aeruginosa* สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้แค่ 2-3 สัปดาห์เท่านั้น จึงทำให้เกิดปัญหาต้องถ่ายเชื้อสู่อาหารเลี้ยงเชื้อบ่อย อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและเกิดการปนเปื้อนระหว่างการถ่ายเชื้ออาจทำให้เชื้อไม่บริสุทธิ์ได้ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาและทดลองโดยการเก็บรักษาเชื้อ 3 วิธี คือการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ การเก็บรักษาเชื้อภายใต้น้ำมันพาราฟินเหลวและแช่ตู้เย็น การเก็บรักษาเชื้อในกลีเซอรอล15% และแช่แข็ง และการตรวจสอบชีวเคมีของเชื้อ ผลการทดลองพบว่าอาหารที่สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานที่สุดคือ Nutrient agar และ Luria Bertani agar โดยสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นเวลา 2 เดือน รองลงมาคือ Brain heart infusion agar และ Skim milk agar โดยสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เพียง 1 เดือน ส่วนการเก็บรักษาภายใต้พาราฟินเหลวแช่เย็นและเก็บใน กลีเซอรอล 15% แช่แข็งที่ -20 กับ -80 องศาเซลเซียส พบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อได้มากกว่า 12 เดือน ดังนั้นผลการวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปใช้ในการเลือกวิธีการเก็บรักษาเชื้อเพื่อให้เหมาะสมกับแบคทีเรียได้

คำสำคัญ: การเก็บรักษา ดูแลรักษาสภาพ *Pseudomonas aeruginosa*

Abstract

The purpose of preserving and maintaining bacterial cultures in a university setting is to ensure they remain viable for laboratory classes and research, and generate consistent laboratory test results over time. *Pseudomonas aeruginosa* can be preserved by refrigeration at 4°C, but this is only suitable for short-term storage (2-3 weeks). Longer-term storage can be achieved if the bacteria being stored at 4°C are periodically sub-cultured. This is known as the 'periodic transfer method', but it has the disadvantage of failing to prevent changes in the characteristics of the strain. Changes can arise due to genetic drift or contamination. In the present study, we investigated three categories of method for preserving *P. aeruginosa*: (a) periodic transfer to fresh media and refrigeration and (b) storage in mineral oil or liquid paraffin and refrigeration and (c) freezing with 15% (v/v) glycerol, followed by retrieval of bacterial culture from frozen stock. Biochemical tests were performed on recovered cultures. *P. aeruginosa* was found to remain viable for up to 2 months on nutrient agar and Luria-Bertani agar, but just 1 month on brain heart infusion agar and skimmed milk agar. By contrast, *P. aeruginosa* suspended in mineral oil or liquid paraffin and frozen with 15% (v/v) glycerol remained viable for over 12 months. Data presented here will help laboratorians make a more informed choice about how they preserve and maintain their bacterial cultures.

Keywords: Preservation, Maintenance, *Pseudomonas aeruginosa*

---

[1] *คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม 44000*

[1] *Faculty of Medicine, Mahasarakham University, Muang District, Maha Sarakham 44000, Thailand*

* *Corresponding author, Sujitra Yahom : sujitra.yahom@gmail.com*

บทนำ

การรักษาเชื้อแบคทีเรียให้บริสุทธิ์ มีจุดประสงค์เพื่อเก็บรักษาเชื้อให้บริสุทธิ์ ในสภาพที่มีชีวิตอยู่ โดยมีคุณสมบัติเหมือนเดิม ไม่มีการปนเปื้อนของเชื้อชนิดอื่น มักจะมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่นาน ๆ เพื่อนำมาใช้ในงานประจำ การเรียนการสอน การวิจัยและงานอื่น ๆ โดยการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์จะมีวิธีการเก็บทั้งระยะสั้นและระยะยาว เช่น การเก็บรักษาระยะสั้นโดยปกติในห้องปฏิบัติการจะมีการถ่ายเชื้อบริสุทธิ์ไปสู่อาหารใหม่ เลี้ยงให้เจริญเติบโตเพื่อถ่ายเชื้อใหม่ (subculturing) เมื่อเชื้อเจริญเติบโตแล้วนำไปเก็บที่ตู้แช่เย็น 4 องศาเซลเซียส[1] วิธีนี้ปกติจะใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้ในระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น เพราะเชื้อจุลินทรีย์ยังคงมีกิจกรรมเมตาบอลิซึมเป็นไปอย่างช้า ๆ มีการใช้สารอาหารและสร้างของเสียในอาหารเป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตายได้หลังจากนั้น[2] ข้อเสียของการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่หลายครั้งคือ อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนจุลินทรีย์ชนิดอื่น ทำให้เกิดความเสี่ยงต่อการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเชื้อบริสุทธิ์นั้น ๆได้[3] ส่วนการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ในระยะยาวสามารถเก็บรักษาได้หลายวิธี เช่น การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้พาราฟินเหลว (liquid paraffin) สามารถเก็บได้นาน 1-2 ปี[1] วิธีการเก็บรักษาแบบแช่แข็งเชื้อจุลินทรีย์ (freezing) ซึ่งวิธีนี้จะผสมเซลล์ของจุลินทรีย์รวมกับกลีเซอรอลปลอดเชื้อ 15 % แล้วนำไปเก็บไว้ที่ตู้ - 80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้ประมาณ 6 ปี[4] นอกจากนี้ยังมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์อีกหลายวิธี เช่น การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในน้ำและสารละลาย Phosphate Buffer Saline (PBS) โดยการนำสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ปลอดเชื้อผสมกับเซลล์จุลินทรีย์ใส่ไว้ในหลอดเก็บเชื้อไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งสามารถอยู่ได้เป็นเวลานานถึง 4 ปี[5] วิธี Freeze drying หรือ Lyophilization เป็นวิธีการทำให้แห้งและเย็นเยือกแข็ง สามารถเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้นานมาก แต่ข้อเสียคือ เครื่องมือแพงและขั้นตอนการเก็บค่อนข้างซับซ้อน[6,7] วิธี Cryopreservation เป็นการเก็บรักษาตัวอย่างจุลินทรีย์ภายใต้อุณหภูมิต่ำตั้งแต่ -20 ถึง -85 องศาเซลเซียส วิธีที่ง่ายคือการแช่ลูกปัดกระเบื้องที่มีรูพรุน (cryobeads) ลงไปในของเหลวที่ใช้ในการเก็บรักษาโดยการแช่แข็ง (cryopreservation fluid) เช่น กลีเซอรอล หลังจากบ่มเชื้อแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้แช่แข็ง[8] และการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ในไนโตรเจนเหลว เป็นการเก็บรักษาเชื้อไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส สามารถรักษาเชื้อได้เกือบทุกชนิด และสามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นานมากประมาณ 10-30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ แต่ข้อเสียคือ เครื่องมือและหลอดที่ใช้ในการเก็บราคาค่อนข้างสูงและสิ้นเปลืองไนโตรเจนเหลวเพราะระเหยตลอดเวลา[9] เป็นต้น

แบคทีเรีย *P. aeruginosa* เป็นแบคทีเรียแกรมลบ พบทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ดำรงชีวิตอย่างอิสระ สามารถเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเจริญเติบโตได้หลายสภาวะและหลายอุณหภูมิ โดยจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและสามารถเจริญเติบโตแบบไม่ใช้ออกซิเจนได้ในอาหารที่มีแหล่งคาร์บอนบวกกับไนเตรต[10] *P. aeruginosa* สามารถสร้างรงควัตถุสีเขียวอมน้ำเงิน มีกลิ่นคล้ายองุ่นหมักดอง เรียกว่า ไพโอไซยานิน (pyocyanin) ซึ่งรงควัตถุนี้สามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมบวกและยีสต์ *Candida* ได้อย่างสมบูรณ์และสามารถยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เช่น *Salmonella* Typhi และ *Proteus mirabilis* ได้เล็กน้อย ส่วน *Klebsiella pneumoniae* และ *P. aeruginosa* ดื้อต่อรงควัตถุ pyocyanin[11] การทดสอบความไวของเชื้อต่อยาปฏิชีวนะมาตรฐาน พบว่ามีการดื้อต่อยาปฏิชีวนะ trimethoprim , ceftazidine และ gentamycin และมีความไวต่อยาปฏิชีวนะ penicillin[12] ซึ่งจากการเพาะเลี้ยงเชื้อ *P. aeruginosa* สำหรับใช้ในการเรียนในภาคปฏิบัติการ พบปัญหาคือเชื้อ *P. aeruginosa* จะมีช่วงอายุในการเก็บรักษาเพื่อใช้ในการเรียนการสอนที่สั้นกว่าแบคทีเรียชนิดอื่นที่สามารถเก็บเชื้อไว้ในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียส ได้นาน 2-3 เดือน แต่เชื้อ *P. aeruginosa* สามารถเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นได้แค่ 2-3 สัปดาห์เท่านั้น จึงทำให้เกิดปัญหาต้องถ่ายเชื้อสู่อาหารเลี้ยงเชื้อบ่อย ซึ่งอาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมและเกิดการปนเปื้อนระหว่างการถ่ายเชื้อได้ อาจทำให้เชื้อไม่บริสุทธิ์ ดังนั้น ผู้วิจัยจึงต้องการจะศึกษาถึงวิธีการเก็บและรักษาเชื้อ *P. aeruginosa* เพื่อหาชนิดของอาหารและวิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรีย เพื่อให้ได้วิธีที่เหมาะสมและสามารถยืดอายุของเชื้อเพื่อใช้งานในห้องปฏิบัติการให้ได้นานขึ้นด้วย

วิธีการดำเนินงานวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ จะทดลองการเก็บรักษาเชื้อ *P. aeruginosa* ATCC27853 โดยการเลี้ยงเชื้อให้เจริญในอาหาร Nutrient broth เป็นเวลา 18 ชั่วโมง จากนั้นดูดเชื้อใส่ในหลอดสำหรับเตรียมเก็บรักษา หลอดละ 1 มิลลิลิตร โดยการเก็บรักษาเชื้อจะเก็บวิธีการละ 3 หลอดต่อเดือน จำนวน 12 เดือน และนำเชื้อไปเก็บรักษาทั้ง 3 วิธี ดังนี้ คือ การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่และแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Transfer to fresh media and refrigeration) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ Nutrient agar (Hi-media), Luria Bertani agar (TM-media), Brain heart infusion agar (Hi-media) และ skim milk agar (Hi-media) การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ภายใต้น้ำมันพาราฟินเหลวและแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Liquid Paraffin

storage)[1] และการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ในกลีเซอรอล 15% และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส (Freezing bacteria using sterile glycerol)[10] จากนั้นนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงใหม่เพื่อตรวจสอบการเจริญเติบโตบนอาหาร Nutrient agar หลังการเก็บในแต่ละเดือนและบันทึกข้อมูลการทดลองโดยการสังเกตลักษณะของผิว สี กลิ่นของโคโลนีและประเมินการสร้างรงควัตถุของเชื้อและการตรวจสอบชีวเคมีของเชื้อก่อนการใช้งาน เช่น การสังเกตลักษณะโคโลนีของ *P. aeruginosa* ที่เจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar การย้อมสีแกรม การทดสอบการเจริญในอาหาร TSI การทดสอบการเคลื่อนที่ในอาหาร Motile-Indole ทดสอบ Catalase ทดสอบใน Glucose Fermentation[13] โดยทำการศึกษาในช่วงเดือน มิถุนายน พ.ศ. 2560 ถึงเดือน พฤษภาคม พ.ศ. 2561 การเก็บข้อมูลจะเก็บข้อมูลการเจริญเติบโตของเชื้อ *P. aeruginosa* ทุก ๆ 1 เดือน บันทึกผลว่าเชื้อจุลินทรีย์ยังมีการเจริญเติบโตได้หรือไม่ แล้วนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ข้อมูลในเชิงบรรยายพรรณนาและสรุปถึงวิธีที่เหมาะสมในการเก็บรักษาสายพันธุ์ เชื้อ *P. aeruginosa* ต่อไป โดยโครงการวิจัยครั้งนี้ได้ผ่านความเห็นชอบจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบันจากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เลขที่การรับรอง:IBC 004/2560

ผลการทดลอง

ในการทดลองการเก็บรักษาสายพันธุ์ของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ด้วยวิธีการเก็บรักษาแบบ การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่และแช่เย็น การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ภายใต้น้ำมันพาราฟินเหลวและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ใน 15% กลีเซอรอลและแช่แข็ง พบว่าการเก็บรักษาสายพันธุ์ของเชื้อในแต่ละวิธีจะสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ของ *P. aeruginosa* ได้เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน ดังนี้

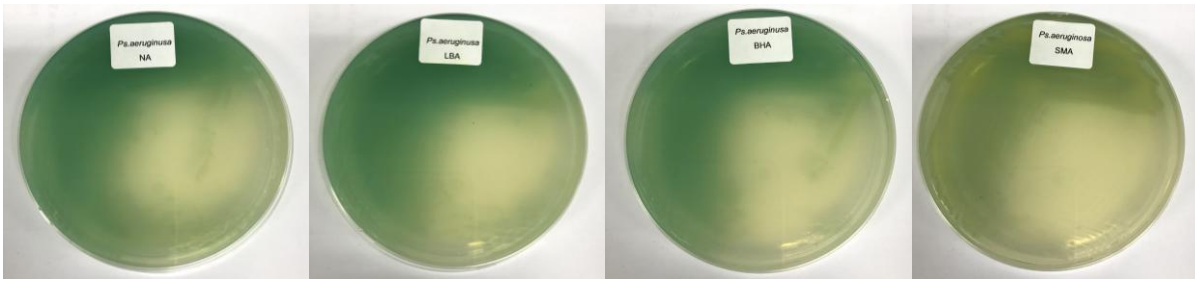
Table 1 Survival and pigmentation of *P. aeruginosa* from storage by transfer to fresh media and refrigeration method

Month / Media	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
NA	+**	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LBA	+**	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
BHA	+**	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
SMA	+*	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

NA: Nutrient agar, LBA: Luria bertani agar, BHA: Brain heart infusion agar, SMA: Skim milk agar

+ Growth, - No Growth , * Create a little pigment, ** Create a lot pigment

จาก Table 1 พบว่าการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ อาหารที่สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้นานที่สุดคืออาหาร Nutrient agar และ Luria Bertani agar โดยสามารถเก็บรักษาแบคทีเรียได้เป็นเวลา 2 เดือน รองลงมาคือการเก็บรักษาในอาหาร Brain heart infusion agar และ Skim milk agar สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์เชื้อแบคทีเรียได้เป็นเวลา 1 เดือน และพบว่าเมื่อมีการนำเชื้อที่เก็บในอาหาร Skim milk agar กลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ เชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้ แต่มีการเจริญเติบโตและสร้างรงควัตถุ pyocyanin ที่มีสีเขียวอมน้ำเงินได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเชื้อในวิธีเดียวกันแต่เก็บในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar, Luria Bertani agar และ Brain heart infusion agar (Figure 1)



a. b. c. d.

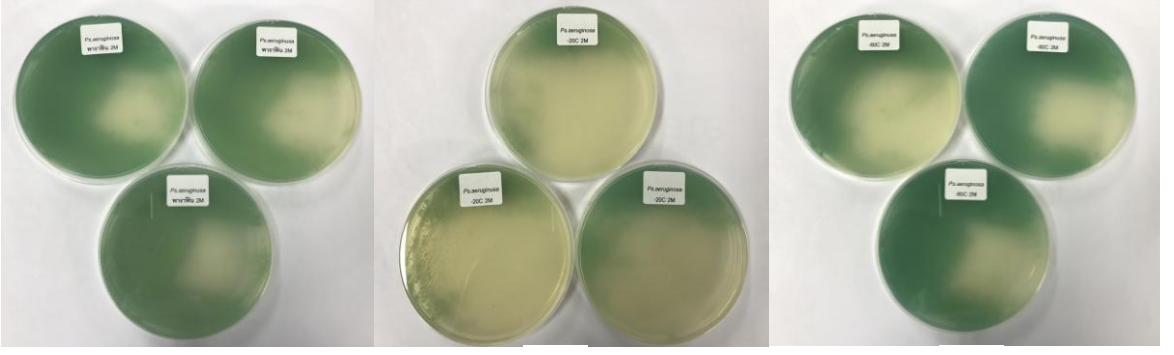
Figure 1 Growth and pigmentation on nutrient agar after collection by transfer to fresh media and refrigeration method (a.: Nutrient agar, b.: Luria bertani agar, c.: Brain heart infusion agar, d.: Skim milk agar)

Table 2 Survival and pigmentation of *P. aeruginosa* from storage by liquid paraffin and freezing bacteria using 15% glycerol method

Month / Preserve	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Liquid paraffin 4 °C	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**
15% Glycerol -20 °C	+**	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*	+*
15% Glycerol -80 °C	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**	+**

+ Growth, - No Growth , * Create a little pigment, ** Create a lot pigment

จาก Table 2 การเก็บรักษาเชื้อ *P. aeruginosa* ด้วยวิธีการเก็บในภายใต้พาราฟินเหลว พบว่าวิธีการเก็บภายใต้พาราฟินเหลวสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ของแบคทีเรียได้เป็นเวลามากกว่า 12 เดือน ซึ่งพบว่าการนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar เชื้อยังมีการเจริญเติบโตและยังสามารถสร้างรงควัตถุ pyocyanin ได้ตามปกติ ส่วนวิธีการเก็บในกลีเซอรอล 15 % แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาแบคทีเรียได้เป็นเวลามากกว่า 12 เดือนเช่นกัน แต่ภายหลังจากการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 15% และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 เดือนขึ้นไป เมื่อมีการนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่าแบคทีเรียยังสามารถเจริญเติบโตได้ แต่มีการสร้างรงควัตถุ pyocyanin ได้ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาในกลีเซอรอล 15 % และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และการเก็บรักษาสายพันธุ์ภายใต้พาราฟินเหลวที่เก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (Figure 2)



a. b. c.

Figure 2 Growth and pigmentation on nutrient agar after collection by liquid paraffin storage and freezing bacteria using sterile glycerol (a.:Liquid paraffin 4 °C, b.:15% Glycerol -20 °C, c.:15% Glycerol -80 °C)

Table 3 Biochemical tests of *P. aeruginosa*

Characteristic	*Pseudomonas aeruginosa*
Morphology on Nutrient agar	Irregular and spreading, Wavy, Glistening, Raised
Pigment	Blue - green (pyocyanin)
Gram's stain	Negative gram, Rod shape
Catalase test	Positive
TSI test	K/N
Motile test	Positive motile
Indole test	Negative
Glucose Fermentation test	Non fermentative

จาก Table 3 จากการทดสอบชีวเคมีของเชื้อ *P. aeruginosa* ที่ได้จากการเก็บรักษาสายพันธุ์โดยวิธีต่าง ๆ ผลการทดสอบพบว่าเชื้อแบคทีเรียมีผลชีวเคมีเหมือนกันในทุกวิธีการเก็บรักษา โดยการทดสอบการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar พบว่าเชื้อแบคทีเรียที่มีการเก็บรักษาทั้ง 3 วิธี เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงใหม่ จะมีการเจริญเติบโต โดยมีลักษณะของโคโลนีรูปร่างไม่แน่นอนแผ่กระจายเกือบทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ ขอบของโคโลนีเป็นเส้นซ้อนกันเป็นคลื่น โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย ผิวของโคโลนีสะท้อนแสงมันวาวโคโลนีมีสีเขียวอมน้ำเงินมีกลิ่นคล้ายองุ่นหมักดอง การทดสอบการย้อมสีแกรม พบว่าแบคทีเรียติดสี แกรมลบ เซลล์มีสีแดง รูปร่างเซลล์เป็นแบบแท่งยาว การทดสอบ Catalase มีผลเป็นบวก คือเมื่อมีการแตะเชื้อลงบนแผ่นสไลด์แล้วหยด H_2O_2 ลงไปบนจะเกิดฟองฟู่เกิดขึ้น การทดสอบในอาหาร Triple sugar iron agar (TSI) ผลการทดสอบเป็น K/N โดยพบว่าเชื้อเจริญเติบโต โดยไม่มีการใช้น้ำตาลชนิดใดเลย คือ ส่วน slant เปลี่ยนเป็นสีแดงเข้ม (K) และส่วนของ butt ไม่มีการเปลี่ยนสี (N) การทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อในอาหาร Motile-Indole-Lysine medium ผลการทดสอบเป็นบวก โดยพบว่าเชื้อมีการเคลื่อนที่รอบ ๆ รอยที่แทงลงในหลอดอาหารทดสอบด้วยเข็มเขี่ยปลายตรงบริเวณรอบ ๆ รอยที่แทงเชื้อลงไปมีความขุ่นเนื่องจากเชื้อมีการเจริญและมีการเคลื่อนที่ การทดสอบ Indole ผลเป็นลบคือสีของน้ำยาไม่เกิดการเปลี่ยนแปลง รวมถึงการทดสอบ Glucose Fermentation เป็นการทดสอบความสามารถของเชื้อในการใช้น้ำตาล Glucose ผลการทดสอบพบว่าเป็นลบคือเชื้อมีการเจริญเติบโต โดยสังเกตจากอาหารที่ขุ่นขึ้น แต่เชื้อไม่มีการใช้น้ำตาลกลูโกส โดยพบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ทดสอบยังคงมีสีเขียวเหมือนเดิม

สรุปผลและวิจารณ์ผลการทดลอง

การทดลองในครั้งนี้แตกต่างจากการทดลอง อื่น ๆ ที่ผ่านมา คือ การทดลองในครั้งนี้จะมีการเพิ่มปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ขึ้นมา เช่น ชนิดของอาหารที่ใช้ในการเก็บรักษา วิธีการเก็บรักษาและอุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา อาหารที่สามารถเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ได้นานที่สุดคือ อาหาร Nutrient agar และ Luria bertani agar โดยสามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นเวลา 2 เดือน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียว่าสามารถเก็บรักษาในอาหาร Nutrient agar ได้หลายสัปดาห์จนถึง 2 เดือน[1] และอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถเก็บเชื้อได้รองลงมาคืออาหาร Brain heart infusion agar และ อาหาร Skim milk agar ซึ่งสามารถเก็บเชื้อได้เพียง 1 เดือน เท่านั้น โดยการทดสอบการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ จะพบว่าการเลี้ยงเชื้อและเก็บรักษาเชื้อไว้ในอาหารทั้ง 4 ชนิด และเก็บรักษาไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น หลังจากเวลาผ่านไป 1-2 เดือน เมื่อนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ พบว่าเชื้อจะมีการเจริญเติบโตน้อยมากหรือในอาหารบางชนิดเมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานกว่า 2 เดือน เมื่อนำเชื้อมาเพาะเลี้ยงใหม่ ไม่พบว่ามีการเจริญเติบโตเลย เมื่อเปรียบเทียบกับการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการอื่น นับว่าวิธีการนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้เป็นระยะเวลาที่สั้นมาก ซึ่งมีสาเหตุมาจากการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่และเก็บรักษาในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสนั้น เชื้อจุลินทรีย์ยังมีกิจกรรมเมตาบอลิซึม โดยไม่มีการหยุดการเจริญเติบโต แต่กลับมีการเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ และมีการเจริญเติบโตอย่างต่อเนื่อง มีการใช้สารอาหารและปล่อยของเสียออกมาสู่อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษา เป็นผลให้เชื้อจุลินทรีย์ตายในเวลาต่อมา[2] นอกจากนี้แล้วปัจจัยที่ส่งผลต่อ

การเก็บรักษาเชื้ออีกปัจจัยหนึ่งคือส่วนประกอบของอาหาร ซึ่งมีผลต่อระยะเวลาของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ เนื่องจากส่วนประกอบบางอย่างในอาหารมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและการปลดปล่อยของเสียออกมาออกมาอย่างรวดเร็ว จึงมีการลดส่วนประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลงและปลดปล่อยของเสียออกมาน้อยลง เช่น ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลงเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็ว ไม่มีโปรตีนหรือคาร์โบไฮเดรต แต่จะประกอบด้วยเกลือแร่ต่าง ๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเป็นกรด-ด่าง[14] เป็นต้น

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีการเก็บรักษาในอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar ภายใต้พาราฟินเหลวแล้วเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส พบว่าหลังจากการเก็บรักษาเชื้อภายใต้พาราฟินเหลวเป็นเวลา 12 เดือน เมื่อนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงใหม่ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อยังมีการเจริญเติบโตและสร้างรงควัตถุ pyocyanin ได้มาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเก็บรักษาเชื้อ *Pseudomonas* ในอาหาร Yeast extract peptone ภายใต้พาราฟินเหลว พบว่าสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานกว่า 19 เดือน เมื่อนำเชื้อกลับมาเพาะเลี้ยงเชื้อยังสามารถเจริญเติบโตได้[15] ซึ่งสาเหตุที่การเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการเก็บรักษาด้วยการเก็บภายใต้พาราฟินเหลวที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานกว่าการเก็บรักษาเชื้อแบบการถ่ายสู่อาหารใหม่ เพราะว่ามีการเติมพาราฟินเหลวปลอดเชื้อเพื่อปกป้องผิวหน้าของอาหารที่เชื้อเจริญอยู่เพื่อจำกัดการได้รับปริมาณออกซิเจนให้น้อยลง ทำให้เชื้อจุลินทรีย์ลดกิจกรรมเมตาบอลิซึมและลดการเจริญเติบโตในระหว่างการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์[1]

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียในกลีเซอรอล 15% และแช่แข็ง เมื่อเก็บรักษาเป็นเวลา 12 เดือนขึ้นไป แล้วนำกลับมาเพาะเลี้ยงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ พบว่าเชื้อมีการเจริญเติบโตและสร้างรงควัตถุ pyocyanin ได้ตามปกติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาการเจริญและการเก็บรักษาแบคทีเรีย *P. aeruginosa* ซึ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้ได้นานกว่า 2 ปี ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส[10] แต่ควรหลีกเลี่ยงการเก็บรักษาเชื้อที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสหรือมากกว่า เนื่องจากจะทำให้เซลล์เสียหาย ทำให้การเก็บรักษาจุลินทรีย์ทำได้ในระยะเวลาสั้น ซึ่งโดยทั่วไปแล้วยิ่งอุณหภูมิต่ำยิ่งสามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานและยิ่งมีความคงตัวทางพันธุกรรมสูง อุณหภูมิที่ดีคืออุณหภูมิระหว่าง -30 ถึง -70 องศาเซลเซียส[16] ซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่าการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีนี้เป็นวิธีที่ดีและสามารถเก็บรักษาเชื้อได้ทั้งแบคทีเรียและเชื้อรา โดยการเติมกลีเซอรอลจะช่วยรักษาเซลล์ภายใต้สภาวะการแช่แข็ง ซึ่งวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นาน 1-2 ปี ที่อุณหภูมิ -30 องศาเซลเซียส หรือเก็บได้นานกว่า 2 ปี ที่ -80 องศาเซลเซียส[1] นอกจากนี้ยังมีการศึกษาการเก็บรักษาคลังเชื้อแบคทีเรีย โดยใช้ Skim milk เพื่อช่วยยืดระยะเวลาในการเก็บรักษาแบคทีเรียที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียได้นานกว่า 6 ปี[4] วิธีการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ในกลีเซอรอลและแช่แข็ง สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรียได้เป็นระยะเวลานาน เนื่องจากมีกลีเซอรอลเป็นตัว protective agent มีการเกิดอิเล็กโตรไลซิสต่ำและไม่ละลายเป็นของเหลวได้ง่าย เซลล์ของจุลินทรีย์อยู่ในสภาวะแช่แข็ง จุลินทรีย์จึงไม่มีการใช้สารอาหารและไม่เกิดกระบวนการเมตาบอลิซึมเกิดขึ้นในขณะที่จุลินทรีย์ถูกเก็บรักษาด้วยการแช่แข็ง มีการลดอัตราการเผาผลาญ (metabolism rate) ทำให้สามารถเก็บรักษาสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ได้เป็นเวลานาน[16]

ผลการทดสอบเพื่อยืนยันชนิดของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* โดยการสังเกตลักษณะของโคโลนี การเจริญเติบโตและการสร้างรงควัตถุบนอาหารเลี้ยงเชื้อ การย้อมสีแกรม พบว่า การเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะพบโคโลนีใหญ่แบนและแผ่กระจายเกือบทั่วจานอาหารเลี้ยงเชื้อ โคโลนีมีสีเขียวอมน้ำเงิน มีกลิ่นคล้ายองุ่นหมัก การย้อมสีแกรมเป็นแกรมลบ มีรูปร่างแบบแท่ง เรียงตัวเดี่ยว[17] ส่วนการทดสอบทางชีวเคมีต่าง ๆ พบว่ามีความสอดคล้องกับการศึกษาคุณลักษณะของแบคทีเรีย *P. aeruginosa* สายพันธุ์ DN1 คือ เมื่อมีการทดสอบ catalase test พบว่ามีผลเป็นบวก การทดสอบในอาหาร Triple sugar iron sugar ผลการทดสอบเป็น K/N[13] และการทดสอบการหมักในอาหาร Glucose fermentation มีผลเป็นลบ[18]

ข้อเสนอแนะ

จากผลการทดลองจะพบว่าการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ภายใต้พาราฟินเหลวแช่เย็นที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและการเก็บในกลีเซอรอล 15% แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 และ -80 องศาเซลเซียส สามารถเก็บรักษาเชื้อได้นานที่สุด ดังนั้นการเลือกใช้วิธีใดในการเก็บรักษาอยู่ที่ผู้ปฏิบัติงานจะเลือกใช้ โดยหากห้องปฏิบัติการที่มีวัสดุ ครุภัณฑ์ทุกอย่างพร้อม ควรเลือกเก็บรักษาในกลีเซอรอลและแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แต่ในบางห้องปฏิบัติการที่ยังขาดเครื่องมือและครุภัณฑ์ที่มีราคาค่อนข้างสูง สามารถเลือกใช้วิธีการเก็บภายใต้พาราฟินเหลวและแช่เย็นในตู้เย็นแทนได้ ซึ่งสามารถเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ได้เป็นเวลานานเช่นกัน แต่ในกรณีที่ต้องการใช้เชื้อจุลินทรีย์อย่างต่อเนื่อง ตัวอย่างเช่น มีการใช้เชื้อเป็นประจำประมาณ 1-2 สัปดาห์ต่อครั้ง ควรมีการเก็บ

รักษาเชื้อโดยการถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่บนอาหารเลี้ยงเชื้อ Nutrient agar และ Luria bertani agar เพราะเชื้อยังสามารถเจริญและสร้างรงควัตถุได้ตามปกติ ซึ่งวิธีนี้เหมาะแก่การเก็บรักษาเชื้อระยะเวลาสั้น

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยต้องขอขอบพระคุณ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่สนับสนุนงบประมาณทุนส่งเสริมและพัฒนาการวิจัยสำหรับบุคลากร ปีงบประมาณ 2560 และอนุเคราะห์เครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย ขอขอบพระคุณคณะสาธารณสุขศาสตร์ ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการปฏิบัติงานวิจัยในครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

1. Kumar S, Kashyap P.L., Singh S.,Srivastava A.k. Preservationand maintenance of microbial culture. Analyzing microbes. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 2013; 135-152
2. Tankeshwar A. Maintenance and preservation of pure culture of bacteria. Microbe online. 2010. Serch online : 2017 Aug 21 https://microbeonline.com/maintenance-and-preservation-of-pure-cultures-of-bacteria/
3. อรทัย ลีลาพจนาพร. การเก็บรักษา ดูแลจุลินทรีย์อ้างอิง. วารสาร พศ.สาร (BLPD Newsletter). 2555;4(48):1-4
4. William L.C., James W.W., David R.H., Kevin S.M., Kayla E.H., Ott C.M., Cheryl A.N., Michael J.S.. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 °C bacterial stocks. J Microbiol Method. 2009; 75(1): 135-38
5. Liao C.H. and Shollenberger L.M.. Survivability and long-term preservation of bacteria in water and in phosphate-buffered saline. Letters in Applied Microbiology.2003;37:45-50
6. Morgan C.A., Herman H., White P.A., Vesey G.. Preservation of microorganism by drying ; A review. Journal of Microbiological Methods. 2006;66:183-193
7. Shinohara Y.M., Sukennobe J, Imaizumi T, Nakahara T. Survival curves for microbial species stored by freeze-drying. Cryobiology. 2006;52:27-32
8. Prakash O, Nimonkar Y, Shouch Y.S.. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol Lett. 2013;339:1-9
9. Tedeschi R and Paoli P.D.. Collection and preservation of frozen microorganism. Methods in Biobanking. 2011;675:313-314
10. LaBauve A.E, , Matthew J.W.. Growth and laboratory maintenance of *Pseudomonas aeruginosa*. Curr Protoc Microbiol. 2015;1-11
11. El-Fouly M.Z., Sharaf A.M., Shahin A.A.M.,El-Bialy H.A., Omara A.M.A.. Biosynthesis of pyocyanin pigment by *Pseudomonas aeruginosa*. Journal of Radiation Research and Applied Sciences. 2015;8: 36-48
12. Kanokporn C., Sonvanee T., Sutthiwan T. and Thotsapol C.. Antibiotic resistance of environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa* in maha sarakham province and nong bua lamphu province. J Sci Technol MSU. 2016; 35(2):174-181
13. Ningthoujam D.S. and Shovarani N.. Isolation and characterization of a *Pseudomonas aeruginosa* strain DN1 degrading p-nitrophenol. Res J Microbiol. 2008;3(5):345-351
14. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. พิมพ์ครั้งที่ 2. อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์. กรุงเทพฯ. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2541
15. Rhodes M.E.. The preservation of *Pseudomonas* under mineral oil. J appl Bact. 1957:20(1):108-118
16. รวิวรรณ อาจสำอาง. การเก็บรักษาเชื้ออ้างอิง (Maintenance and Preservation of reference cultures). [ออนไลน์]. [อ้างถึงวันที, 21 กันยายน 2560] เข้าถึงข้อมูลได้จากอินเทอร์เน็ต : http://www.dss.go.th/images/starticle/bsp_7_25 45_reference_culturer.pdf
17. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ. จุลชีววิทยาทั่วไป. พิมพ์ครั้งที่ 6. กรุงเทพ สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2550:84
18. UK Standards for Microbiology Investigation. Identification of *Pseudomonas* species and other non-glucose fermenters. Standard Unit, Public Health England. 2013;17(3):9-10