ของสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

ใบรับรองปัญหาพิเศษ

เรื่อง

การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียภายหลังจากไลโอฟิไลซ์และในระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษา

(Study on Survival of Lyophilized Bacterial Cultures after Lyophilization Process and Keeping Periods)

จัดทำโดย

นายเกรียงไกร	ทองก้อน	รหัสนักศึกษา	45040788
นางสาวจุฑามาศ	สุขเหมือน	รหัสนักศึกษา	45040789
นายวีระพงศ์	วิรุฬห์ธนกฤษณ์	รหัสนักศึกษา	45040815

ได้รับการพิจารณาเห็นชอบจาก

..../...../..... อาจารย์ที่ปรึกษาปัญหาพิเศษ

(ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21094

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียภายหลังจากไลโอฟิไลซ์และในระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษา

(Study on Survival of Lyophilized Bacterial Cultures after Lyophilization Process and Keeping Periods)

T096500

นายเกรียงไกร ทองก้อน
นางสาวจุฑามาศ สุขเหมือน
นายวีระพงศ์ วิรุฬห์ธนกฤษณ์

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....96500.....
วัน,เดือน,ปี.....

รายงานปัญหาพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต
ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
2544

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เกรียงไกร ทองก้อน , จุฑามาศ สุขเหมือน และ วีระพงศ์ วิรุฬห์ธนกฤษณ์. 2549 : การศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียภายหลังจากไลโอฟิไลซ์และในระหว่างช่วงเวลาการเก็บรักษา ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. อาจารย์ที่ปรึกษา : ดร.บุญเทียม พันธุ์เพ็ง : 73 หน้า

บทคัดย่อ

การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ เป็นวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียวิธีหนึ่งที่สามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นระยะเวลานาน ภายหลังการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียชนิดต่างๆ ที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์จำนวน 35 เชื้อ แล้วศึกษาการมีชีวิตรอดของแบคทีเรียหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ พบว่าหลังการไลโอฟิไลซ์แบคทีเรียมีชีวิตรอดลดลง และเมื่อศึกษาผลของอุณหภูมิในการเก็บรักษาโดยการไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลา 0 , 4 และ8 เดือน พบว่าอัตราการรอดชีวิตจะลดลงตามระยะเวลาที่มากขึ้นโดยแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 องศาเซลเซียส) มีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง (33 ± 3 องศาเซลเซียส) เมื่อทำการเปรียบแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ พบว่ามีอัตราการรอดชีวิตที่ไม่แตกต่างกัน จากการคาดคะเนระยะเวลาในการเก็บรักษาแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นจะเก็บได้นานที่สุดคือเชื้อ AIKL 1008 และเก็บที่อุณหภูมิห้องได้นานที่สุด คือเชื้อ AIKL 1008

เกรียงไกร ทองก้อน
จุฑามาศ สุขเหมือน
วีระพงศ์ วิรุฬห์ธนกฤษณ์

ลายมือชื่อนักศึกษา

ลายมืออาจารย์ที่ปรึกษา

วัน เดือน ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

ปัญหาพิเศษครั้งนี้สำเร็จลุล่วงมาได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากอาจารย์ที่ปรึกษาคือ อาจารย์บุญเทียม พันธุ์เพ็ง ที่สละเวลาคอยดูแลและให้คำแนะนำต่างๆ เพื่อเป็นแนวทางในการแก้ปัญหาที่เกิดขึ้น ตลอดจนอาจารย์คณะกรรมการทั้งสองท่าน ได้แก่ อาจารย์สร้อยสุดา พรภักดีวัฒนา และอาจารย์ศศิวิมล ชื่นอิ่ม อาเหมีด ที่ช่วยในการปรับปรุงแก้ไขโครงร่างปัญหาพิเศษ ซึ่งผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง

ขอขอบพระคุณคุณพ่อและคุณแม่ที่คอยเป็นกำลังใจให้ สนับสนุนด้านการเงิน ขอบคุณเพื่อนๆ ที่คอยเป็นกำลังใจและคอยช่วยเหลือมาตลอดการทำปัญหาพิเศษนี้

คณะผู้จัดทำ

24 มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	ค
กิตติกรรมประกาศ	ง
สารบัญ	จ
สารบัญตาราง	ช
สารบัญภาพ	ซ
บทที่ 1	
บทนำ	1
วัตถุประสงค์	1
บทที่ 2 วารสารปริทัศน์	2
2.1 วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบบทั่วไป	2
2.2 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์	3
2.3 การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์	6
2.4 การทำให้แบคทีเรียแห้งแบบไลโอฟิไลซ์	9
2.5 สาเหตุการบาดเจ็บของเซลล์	11
2.6 ไครโอโปรแทคแทนต์	12
2.7 ผนังเซลล์	14
2.8 เครื่องทำแห้งไลโอฟิไลซ์	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	23
3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง	23
3.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษา	24
3.3 การทำไลโอฟิไลซ์	27
3.4 การตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต	28
บทที่ 4 ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง	30
4.1 ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์	30
4.2 การศึกษาเปรียบเทียบและการรอดชีวิต ของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ	36
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	38
5.1 สรุปผลการทดลอง	38
5.2 ข้อเสนอแนะ	38
เอกสารอ้างอิง	39

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หน้า

ภาคผนวก

ก. ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษา บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และลักษณะทางสัณฐานวิทยา ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา 40

ข. ตารางแสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ ในระหว่างการทดลอง 45

ค. การรายงานผลการตรวจนับด้วยวิธี Viable plate count 61

ง. ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์ 69

ประวัติผู้แต่ง 73

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่

1. ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความกดดันของไอน้ำ 18

2. แสดงการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง ที่ NCTC เก็บรักษาไว้ 21

ข1. แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ ในขั้นตอนการทำไลโอฟิไลซ์ 46

ข2. แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ หลังผ่านกระบวนการทำไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 เดือน 51

ข3. แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ หลังผ่านกระบวนการทำไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 เดือน 56

ค4. แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิปรกติ (33±3 องศาเซลเซียส) 65

ค5. แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4±2 องศาเซลเซียส) 67

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

1. แสดงผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก 15
2. แสดงผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ 15
3.ความสัมพันธ์ของความกดดันและอุณหภูมิ 19
ต่อสภาวะของน้ำบริสุทธิ์ (เฟส-ไดอะแกรม : phase diagram)
4. ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อสารประกอบ 19
(eutectic forming และ glass foring) ในน้ำ
5. แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ 30
6. แสดงอัตราร้อยละของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่เหลือรอด 32
ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน
7. แสดงอัตราร้อยละของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกที่เหลือรอด 33
ในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน
8. แสดงอัตราร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เก็บรักษา 34
ที่ระยะเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย
ที่เหลือรอดอยู่ที่ระยะเวลา 0 เดือน
9. แสดงอัตราร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เก็บรักษา 35
ที่ระยะเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรีย
ที่เหลือรอดอยู่ที่ระยะเวลา 0 เดือน
10. แสดงการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรีย AIKL 1011 36
11. แสดงระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ 36
12. แสดงระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก 37
ก1. ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษา 41
บนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และลักษณะทางสัณฐานวิทยา
ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา
ง1. แสดงเครื่องไลโอฟิไลซ์ 70
ง2. แสดงการคอดหลอด และหลอด ampoule ที่คอดเสร็จแล้ว 70
ง3. แสดงหลอด (ampoule) ที่ทำการปิดปลายหลอดแล้ว 71
ง4. แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่บรรจุอยู่ในหลอด (ampoule) 71
หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้ว
ง5. แสดงการตัดหลอด (ampoule) เมื่อต้องการนำเชื้อแบคทีเรีย 72
ออกมาทำการทดลอง

เอกสารนี้มีไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1

บทนำ

ในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียหลังจากที่ได้ทำการแยกเชื้อบริสุทธิ์แล้ว จะต้องนำมาเก็บรักษา เพื่อศึกษาด้านต่างๆ โดยเชื้อที่นำมาเก็บนี้เรียกว่า stock culture collection เช่น การถ่ายเชื้อ (subculture) เป็นการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชั่วระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนถ่ายสู่อาหารใหม่ที่เป็นชนิดเดียวกัน ซึ่งในการเก็บรักษาแบบนี้เมื่อเปลี่ยนถ่ายสู่อาหารใหม่หลายๆ ครั้ง อาจทำให้เกิดการปนเปื้อนและการกลายพันธุ์ได้ จึงได้มีการใช้วิธีการเก็บรักษาเพื่อให้สามารถเก็บไว้ได้เป็นระยะเวลานาน โดยไม่ต้องเปลี่ยนอาหารบ่อยครั้งจึงได้มีการนำวิธีการเก็บรักษาแบบการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งมาใช้เพื่อยืดอายุการเก็บรักษาของเชื้อบริสุทธิ์ให้สามารถเก็บได้นานขึ้น แต่อย่างไรก็ตามในการเก็บรักษาแบบนี้ยังมีข้อควรระวังในส่วนของกระบวนการทำ เนื่องจากการเก็บรักษาด้วยการเยือกแข็งนี้ จะมีเชื้อแบคทีเรียจำนวนมากที่เกิดการบาดเจ็บเนื่องจากการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างแช่เยือกแข็ง ทำให้เมตาบอริซึมของเซลล์เปลี่ยนแปลงไป เป็นผลให้กิจกรรมภายในเซลล์ไม่สามารถดำเนินไปอย่างปกติ จึงได้มีการนำสารไดโอโปรเทคแทน เช่น skim milk สามารถช่วยลดการบาดเจ็บของเซลล์ในระหว่างการแช่เยือกแข็ง โดยสามารถป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนและสามารถชะลอปฏิกิริยาเคมีที่ไม่ต้องการรวมถึงชะลอการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ จึงเป็นสารที่เพิ่มประสิทธิภาพในการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็ง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาวิธีการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยกระบวนการไลโอฟิไลซ์
2. เพื่อศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียหลังจากผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ และการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาต่างกัน
3. เพื่อศึกษาและเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบหลังจากผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

วารสารปริทัศน์

2.1 วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบบทั่วไป

จุดประสงค์พื้นฐานของการบำรุงรักษาและการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ คือ เพื่อรักษาให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอด ไม่มีเชื้ออื่นปะปน และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะรวมทั้งเพื่อเก็บรักษาเชื้อเป็นสต๊อกอย่างเพียงพอ และมีระบบที่เหมาะสมเพื่อทำให้มีเชื้อทดแทนตามความต้องการ

มีเทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์หลายวิธีที่นิยมใช้กัน วิธีการทั้งหมดมีทั้งเป็นประโยชน์เฉพาะด้าน และที่ไม่เป็นประโยชน์ จึงเป็นการยากในการตัดสินใจเลือกวิธีการใดวิธีการหนึ่ง การเลือกวิธีการใดควรอาศัยคุณสมบัติของวิธีการนั้นต่อความต้องการของผู้ใช้ และคำนึงถึงสิ่งต่อไปนี้

2.1.1 การรักษาให้จุลินทรีย์รอดชีวิต (maintenance of viability) เซลล์อาจตายได้ระหว่างกระบวนการเก็บรักษา ทำให้สูญหายไปในที่สุด เพื่อหลีกเลี่ยงการสูญเชื้อจึงควรคำนึงถึงวิธีการเก็บรักษาที่ทำให้เชื้อมีชีวิตรอดมากที่สุด ทั้งขณะทำการเก็บรักษาและระหว่างการเก็บรักษา

2.1.2 การคัดเลือกทำให้ประชากรเปลี่ยนแปลง (population change through selection) สัดส่วนเซลล์ของประชากรรมอาจลดลงในช่วงเริ่มต้นของกระบวนการเก็บรักษา แต่อาจหมดปัญหาถ้าเชื้อเริ่มต้นมีจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตเป็นผลมาจากการคัดเลือกของประชากรที่ทนทานกว่า และนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงลักษณะบางประการของเชื้อนั้น การเก็บรักษาที่ดีควรให้มีเซลล์รอดชีวิตมากที่สุด และให้คงลักษณะเช่นเดียวกับเชื้อเริ่มต้นมากที่สุด

2.1.3 การเปลี่ยนแปลงพันธุกรรม (genetic change) เนื่องจากจุลินทรีย์บางชนิดมีความสำคัญทางวิทยาศาสตร์และอุตสาหกรรม จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาไม่ให้สูญพันธุ์หรือเสียพลาสมิด (plamid) ระหว่างการเก็บรักษา การเก็บรักษาที่ดีควรลดการเปลี่ยนแปลงนี้

2.1.4 ความบริสุทธิ์ (purlity) เชื้อที่เก็บรักษาควรอยู่ในสภาพบริสุทธิ์และควรลดโอกาสปะปนของเชื้ออื่นขณะทำการเก็บรักษา

2.1.5 ค่าใช้จ่าย (expense) ค่าใช้จ่ายในการเก็บรักษาเชื้อรวมถึงค่าจ้างผู้ร่วมงาน วัสดุ อุปกรณ์ และสิ่งอำนวยความสะดวกอื่น เช่น สถานที่และพลังงาน อุปกรณ์ที่มีราคาสูง เช่น เครื่องทำแห้งแบบเยือกแข็งต้องเสียค่าใช้จ่ายมาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.6 จำนวนเชื้อ (number of cultures) สิ่งที่สำคัญที่ควรพิจารณาสัมพันธ์กับจำนวนเชื้อและวิธีการเก็บรักษา คือ ระยะเวลาในการดำเนินงาน ช่วงแรกและการดำเนินงานในช่วงต่อมา ศูนย์เก็บรักษาเชื้อขนาดเล็กที่ใช้วิธีการเหมาะสมมีภาระมากเมื่อเก็บเชื้อจำนวนมากขึ้น การเลือกวิธีการสำหรับเก็บเชื้อได้จำนวนมาก อาจมีผลต่อสถานที่เก็บรักษา

2.1.7 คุณค่าของเชื้อ (value of cultures) ควรเก็บรักษาเชื้อที่มความสำคัญด้วยวิธีการที่ไม่เสี่ยงต่อการสูญเสีย และเก็บรักษาเชื้อที่มีความสำคัญน้อยก็ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่าย

2.1.8 การบริการและการขนส่ง (supply and transportation of culture) ถ้าต้องการส่งเชื้อให้ผู้อื่น จำเป็นต้องมีเชื้ออย่างน้อยสองชุด จึงอาจเตรียมเชื้อไว้เป็นจำนวนมากเพื่อใช้ส่งไปยังแหล่งอื่นๆ ความสะดวกของแต่ละอย่างขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษาและจำนวนเชื้อที่ต้องการส่ง การส่งเชื้อทางไปรษณีย์ต้องห่อให้เหมาะสมและต้องรอดชีวิตขณะที่เสียเวลาคละภาวะอื่นๆ มีข้อจำกัดของการส่งทางไปรษนีย์ภายในประเทศและระหว่างประเทศ จึงต้องทราบถึงรายละเอียดข้อบังคับของแต่ละประเทศนั้น

2.1.9 ความถี่ของการใช้เชื้อ (frequency of use of cultures) เชื้อที่ใช้ในการวิเคราะห์ การผลิตทางอุตสาหกรรมหรือการควบคุมคุณภาพอาจต้องใช้บ่อยในห้องปฏิบัติการ จึงควรคำนึงถึงความสะดวกในการเลี้ยงและความเสี่ยงต่อการปะปนของเชื้ออื่น

2.2 การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

ในการเก็บรักษาเชื้อโดยทั่วไปสามารถทำได้หลายวิธีเช่น

2.2.1 การต่อเชื้อ(subculture)

วิธีนี้ทำการโดยการเพาะเลี้ยงเชื้อลงบนอาหารที่เหมาะสมภายในหลอดหรือขวดที่บ่มไว้ที่อุณหภูมิเหมาะสม เพื่อให้เชื้อเจริญแล้วนำไปเก็บรักษาไว้ภายใต้ภาวะเหมาะสม และต้องต่อเชื้อลงบนอาหารใหม่อีกครั้งก่อนที่เชื้อเก่าจะตายโดยระยะเวลาในการต่อเชื้อนั้นขึ้นกับชนิดของเชื้อ เช่น coliforms จะรอดชีวิตหลายปี ขณะที่เชื้อบอบบางจำพวก *Neisseria* spp. ตายเร็วจึงต้องต่อเชื้ออีกภายในสองถึงสามสัปดาห์ อย่างไรก็ตามการปะปนของเชื้ออื่นๆ เป็นปัญหาที่สำคัญและเกิดขึ้นได้ทุกครั้งที่มีการต่อเชื้อ ซึ่งเชื้อที่ไม่ต้องการนอกจากจะปะปนแล้ว เชื้อนั้นอาจเจริญมากขึ้นทำให้เชื้อที่เก็บรักษาตายได้ การตรวจสอบทางจุลชีววิทยาและการบ่ม(incubate) อาหารไว้ก่อนใช้จะช่วยลดการปะปนของเชื้อ ควรเก็บเชื้อไว้สองหลอด (two-tube method) โดยเก็บหลอดหนึ่งไว้เป็นสต็อก (seed stock) และอีกหลอดเป็นเชื้อใช้งาน(working culture) และการตรวจสอบเชื้อบ่อย ๆ จะช่วยลดการปะปนของเชื้อปนเปื้อน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.2 การทำแห้ง (drying)

มีการใช้วิธีทำแห้งเพื่อเก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างกว้างขวาง โดยการนำน้ำออกและไม่ให้เกิดความชื้น ส่วนใหญ่เก็บเชื้อรา ซึ่งทานทานต่อความแห้งมากกว่าเชื้อกลุ่มอื่น วิธีนี้ใช้ได้กับยีสต์ และแบคทีเรียบางชนิดเท่านั้น การทำแห้งโดยใช้วัสดุต่าง ๆ ต่างมีดังนี้

1. ทราย ดิน ซิลิกาเจล และดินเบา เชื้อราที่สร้างสปอร์รอดชีวิตแบบแห้งในดิน หลายเชื้อเก็บได้นานถึงห้าปีโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง ยีสต์ รา และแบคทีเรียบางชนิดเก็บรักษาแบบแห้งได้บนซิลิกาเจล มีรายงานว่าแบคทีเรียหลายชนิดรอดชีวิตโดยลักษณะไม่เปลี่ยนแปลง แต่เชื้อยีสต์มีลักษณะเปลี่ยนแปลง

2. แผ่นกระดาษหรือดิสก์ (paper disc) การเก็บเชื้อบนแผ่นกระดาษใช้ได้กับเชื้อยีสต์และ staphylococci หลังจากทำแห้งแล้วเก็บแผ่นกระดาษหรือดิสก์ไว้ในห่อฟอยล์ภายในภาชนะปิดไม่ให้อากาศเข้า หรือระหว่างแผ่นกระดาษมีสารทำให้ยึดติดกันได้ วิธีการนี้มีราคาถูกสำหรับส่งเชื้อทางไปรษณีย์ได้จำนวนมาก

3. Predried plugs วัสดุหลายชนิด เช่น แป้ง เปปโตนหรือ เดกซแตรน เมื่อสัมผัสกับซัสเพนชันเชื้อ จะช่วยดูดซับก่อนนำไปทำแห้งอีกครั้ง และเก็บภายใต้สุญญากาศ วิธีการนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อที่บอบบาง เช่น *Neisseria gonorrhoeae* และ *Vibrio cholerae* ซึ่งเก็บรักษาด้วยวิธีการทำแห้งแบบเยือกแข็งไม่ได้ผล

4. เจลาตินดิสก์ (gelatin disc) ทำโดยผสมเชื้อลงในอาหารเหลวเจลาติน นำไปหยดและปล่อยให้แข็งบนจานเลี้ยงเชื้อ แล้วทำให้แห้งหรือทำแห้งแบบเยือกแข็ง นำดิสก์ที่แห้งเก็บไว้ในที่มีซิลิกาเจลหรือฟอสฟอรัสเพนตาออกไซด์(P_2O_5)มีการเติม สารหลายชนิดลงในอาหารเหลวเจลาติน ใช้เก็บแบคทีเรียหลายชนิดได้นานหลายปี

2.2.3 การทำแห้งจากของเหลว(liquid drying หรือ L-drying)

เป็นวิธีการทำแห้งภายใต้สุญญากาศเพื่อถนอมจุลินทรีย์ที่ไว(sensitive)ต่อการเยือกแข็ง โดยไม่ต้องเยือกแข็งเชื้อจึงเป็นวิธีการที่ดีและเหมาะกับแบคทีเรียหลายชนิด เช่น *Spirilla* เก็บรักษาไว้ได้นานถึง 10 ปี

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.4 การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilization)

เป็นกระบวนการทำให้น้ำระเหยไปจากซัสเพนชันเชื้อที่เยือกแข็งแล้วโดยเตรียมซัสเพนชันเชื้อนำไปทำให้เยือกแข็งและต่อเข้าสู่ระบบสุญญากาศไอน้ำที่ระเหยไปจะถูกจับไว้ที่เครื่องควบแน่นซึ่งมีอุณหภูมิต่ำ หลังการทำแห้งแล้ว เก็บเชื้อไว้ภายใต้สุญญากาศหรือในแก๊สเฉื่อย โดยทั่วไปเชื้ออยู่ภายในขวด (vial) หรือ หลอด (ampoule)

ข้อดีของการทำแห้งแบบเยือกแข็งนั้นเหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อจำนวนมากและการแจกจ่ายเชื้อ สามารถเก็บรักษาได้นานไม่ต้องเอาใจใส่อีกลไม่สิ้นเปลืองระหว่างการเก็บ

วิธีการนี้มีข้อเสียคือ ค่าใช้จ่ายสูงถ้าซื้อเครื่องมืออย่างดี ต้องใช้แรงงานมากถ้าเก็บเชื้อจำนวนมาก โดยทั่วไปไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะ แต่อาจเกิดการคัดเลือกประชากรเพิ่มขึ้นในการเตรียมเชื้อเพื่อเก็บครั้งต่อ ๆ ไป เช่น การเก็บเชื้อครั้งที่สองจากเชื้อที่เก็บรักษาครั้งแรก การเก็บเชื้อครั้งที่สามจากเชื้อครั้งที่สองและต่อไปเรื่อย ๆ ควรเตรียมเชื้อสำหรับเก็บครั้งต่อไปจากเชื้อที่เก็บไว้ครั้งแรก

2.2.5 การเยือกแข็งหรือแช่แข็ง (freezing)

การทำเยือกแข็งแบ่งตามอุณหภูมิที่ใช้ ได้แก่ อุณหภูมิ –20 °ซ -30 °ซ -40 °ซ -70 °ซ -140 °ซ และ -196 °ซ แต่โดยทั่วไปอุณหภูมิสูงกว่า -30 °ซ ให้ผลไม่ดีเพราะเกิดส่วนผสมของเชื้อและสารประกอบในน้ำ (eutectic mixture) ทำให้ความเข้มข้นของเกลือสูงขึ้นและมีผลต่อเซลล์ การเก็บไว้ที่ –70 °ซ ใช้ได้กับจุลินทรีย์หลายชนิดและที่ -140 °ซ (เฟสไอของไนโตรเจน) ที่ -196 °ซ (เฟสไนโตรเจนเหลว) ก็ใช้ได้ดีกับจุลินทรีย์

1. การเก็บบนเม็ดแก้วที่ -70 °ซ เก็บโดยเตรียมซัสเพนชันเชื้อกลีเซอรอล หนดลงบนเม็ดแก้วภายในขวด (vial) แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -70 °ซ พบว่าได้ผลดีแบคทีเรียบางชนิด วิธีนี้ทำได้เร็วและง่ายไม่ต้องใช้เครื่องมือมาก เม็ดแก้วแต่ละสีใช้เก็บเชื้อได้แต่ละชนิดและเก็บได้มากไม่จำกัด ข้อเสียคือ ต้องใช้ตู้เยือกแข็ง (freezer) ที่ -70 °ซ ซึ่งบางครั้งไฟฟ้าดับทำให้เครื่องหยุดการทำงาน จึงจำเป็นต้องเก็บเชื้อไว้สองชุด

2. การเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว (-196 °ซ) หรือไอไนโตรเจน (-140 °ซ) แม้ว่าจุลินทรีย์บางชนิดจะมีเซลล์บางส่วนตายไประหว่างการทำเย็นและทำให้หายแข็ง แม้ลักษณะของเชื้อทั่วไปจะถูกเก็บรักษาไว้ มีรายงานว่า DNA และพลาสมิดเปลี่ยนไป การรอดชีวิตและความคงที่ของเชื้อโดยการเก็บรักษาวิธีนี้มีสูง ทุกวันนี้นิยมใช้สำหรับเก็บรักษา seed stock culture

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

มีข้อเสียคือ ไนโตรเจนเหลวระเหยได้และต้องเติมใหม่อยู่เสมอ หาดขาดไนโตรเจนเหลวจะทำให้เสียหาย ค่าใช้จ่ายสูงแต่ใช้แรงงานน้อย เสี่ยงต่อการระเบิดแตกของภาชนีท่เป็นแก้ว โดยไนโตรเจนเหลวอาจเข้าไปตามรูรั่วและขยายตัวอย่างรวดเร็ว การเก็บในไอไนโตรเจนช่วยลดปัญหานี้แต่อุณหภูมิสูงกว่า ทำให้ไม่เหมาะสมสำหรับบางเชื้อ

อย่างก็ตามการเก็บรักษาแบบเยือกแข็งนั้น น้ำจะมีผลต่อเซลล์เมื่อน้ำถูกดึงออกกลายเป็นน้ำแข็ง ความเสียหายจะเกิดขึ้นระหว่างขั้นตอนการทำให้เย็นลงและการทำให้หายแข็ง(thawing) ซึ่งทั้งหมดนี้อาจนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ได้

2.3 การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilization)

ไลโอฟิไลเซชัน คือกระบวนการทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยการดึงน้ำออกผลิตภัณฑ์ ขณะที่อยู่ในสภาพในสภาพเยือกแข็ง ภายใต้สภาวะที่เป็นสุญญากาศ เพื่อใช้ในการเก็บรักษาผลิตภัณฑ์

Lyophilization อาจเรียกได้ว่ากระบวนการ freeze drying ในทางชีววิทยา ซึ่งเป็นจำพวกวัตถุดิบที่มีความบอบบาง สูญเสียกิจกรรม และปฏิกิริยาเคมีได้เมื่อโดนความร้อน

Lyophilize ได้รากศัพท์มาจากภาษากรีก คือ "made sovent loving"

2.3.1 ผลิตภัณฑ์ที่ใช้วิธีการทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์

1. Non - biological products เช่น การเตรียมผลิตภัณฑ์ยาฉีดชนิดผงสำหรับละลายน้ำการเตรียมผลิตภัณฑ์จากสมุนไพรให้อยู่ในรูปผงแห้ง โดยจะคงสภาพสารสำคัญในสมุนไพรได้ เช่น essential oils, pigment, phytonutrients, polysaccharides และ enzyme

2. Non - living bio products โดย แบ่งเป็น

1. เอนไซม์, ฮอร์โมน, ยาปฏิชีวนะ, วิตามิน, เลือด, กระดูก, เนื้อเยื่อของร่างกาย, antibodies ซึ่งใช้ในการวินิจฉัย และการรักษา

2. ยาใหม่ที่ได้จากเทคโนโลยีชีวภาพ ซึ่งมักเป็น สารประกอบประเภทเปปไทด์หรือโปรตีน เช่น interferon, cytokine, growth hormone และ วัคซีนป้องกันตับอักเสบชนิดบี

3. อาหาร เช่น ผัก ผลไม้ นม สาหร่าย กาแฟ โดยจะยังคงสภาพเดิมทั้งรูปร่าง สี ขนาด พื้นผิว รส กลิ่น และสารอาหาร

3. Living organisms เช่น แบคทีเรีย, รา และวัคซีน โดยหลังจากการทำให้แห้ง สิ่งมีชีวิตจะสามารถเจริญ และสืบพันธุ์ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.2 ขบวนการไลโอฟิไลซ์(lyophilization)

การทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (Lyophilization or Freeze Drying) มีกระบวนการ 3 ขั้นตอน ดังต่อไปนี้

1. การเยือกแข็ง หรือ แช่แข็ง(freezing)

เป็นการทำให้ตัวอย่างเยือกแข็งคือน้ำที่มีอยู่ กลายเป็นน้ำแข็ง ตามความจริงจะมีน้ำยึดแน่นอยู่กับของแข็ง เช่น ยึดเป็นส่วนประกอบของเซลล์ ซึ่งน้ำนี้อาจไม่แข็งตัวด้วย การเยือกแข็งกระทำได้ในอ่าง (shelling bath) ที่มีแอลกอฮอล์หรืออะซิโตน ทำให้อุณหภูมิต่ำประมาณ -40 ซ โดยเครื่องทำความเย็นหรือจะใช้น้ำแข็งแห้งละลายในแอลกอฮอล์ อุณหภูมิประมาณ -70 ซ หรือในไนโตรเจนเหลว และทำเยือกแข็งได้ในอุณหภูมิต่ำ (deep freezer) อุปกรณ์ที่กล่าวนี้ ไม่รวมอยู่กับเครื่องทำแห้ง แต่เครื่องบางชนิดทำเยือกแข็งได้ด้วย การจะเลือกใช้เครื่องมือใดจึงขึ้นอยู่กับค่าใช้จ่าย และ ความสะดวกการเยือกแข็งต้องสมบูรณ์ก่อนเริ่มขั้นตอนต่อไป

การเยือกแข็งตัวอย่างเกิดผลต่อตัวอย่าง สามประการ คือ

1. ตัวอย่างถูกขจัดน้ำออกบางส่วน (partial dehydration) ของแข็งบางชนิดที่ยังมีน้ำอยู่จะเข้มข้นมากขึ้นจึงต้องรักษาอุณหภูมิให้ต่ำพอเพื่อให้ตัวอย่างเยือกแข็งตลอดกระบวนการ นอกจากนี้ชนิดของวัสดุและอุณหภูมิของตัวอย่างก็มีผลด้วย พวก glass- formers จะยังคงมีส่วนที่ไม่เยือกแข็ง

2. ความแข็งตึงของโครงร่างของตัวอย่าง (stiffening of structure) ขึ้นอยู่กับส่วนผสมของการเยือกแข็งของน้ำและส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (concentrated solution) ซึ่งสัมพันธ์กับอุณหภูมิ ความแข็งตึง (stiffness) ของวัสดุส่วนที่ไม่เยือกแข็ง (ของแข็งที่ยึดกับน้ำที่ไม่เยือกแข็ง) ขึ้นอยู่กับน้ำหนักโมเลกุลของสาร รวมทั้งอุณหภูมิ และน้ำที่ประกอบอยู่

3. สัณฐานวิทยาของตัวอย่าง (sample morphology) ลักษณะทางกายภาพของตัวอย่างทั้งขนาดตำแหน่งและทิศทางของผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น จะมีผลต่อการทำแห้ง สัณฐานวิทยาของตัวอย่างจึงขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางกายภาพของตัวอย่าง เช่นความเข้มข้น ความหนืด การมีผนังเซลล์เมมเบรน รวมทั้งภาวะการณ์ขนส่งความร้อน การเยือกแข็งอย่างช้าๆ จะทำให้ เกิดผลึกน้ำแข็งเรียงตัวมีทิศทาง แต่การเยือกแข็งอย่างรวดเร็วจะทำให้เกิดผลึกน้ำแข็งไม่เรียงอยู่ในทิศทางเดียวกันและอาจเป็นผลเสียต่อเซลล์จุลินทรีย์ด้วย ตัวอย่างที่หนืดจะผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กไม่เป็นระเบียบ ทำให้ต้านทานการขนส่งมวลระหว่างขั้นตอนการระเหิด (sublimation) จึงทำให้แห้งช้าและโครงสร้างเปลี่ยนแปลงได้ง่าย ตัวอย่างที่เข้มข้นควรทำให้เจือจาง เพื่อให้เกิดการเยือกแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ดังนั้น เราควรจะทำให้ตัวอย่างเยือกแข็งให้เร็วที่สุดเพื่อที่จะได้ผลึกน้ำแข็งขนาดเล็กและเพื่อลดความเสียหายที่จะเกิดขึ้นกับเซลล์ของอาหาร ซึ่งจะไม่ทำลายคุณลักษณะและคุณภาพของตัวอย่าง แต่จะมีการใช้การแช่เยือกแข็งแบบช้ากับอาหารเหลวเพื่อให้เกิดโครงตาข่ายของผลึกน้ำแข็งเพื่อเป็นช่องให้ไอน้ำเคลื่อนที่ได้

2. การระเหิด (sublimation)

คือการกลายเป็นไอของน้ำแข็ง โดยไม่ผ่านสภาวะของเหลว การระเหิดไม่เกี่ยงข้องกับน้ำที่ไม่แข็งตัว (unfrozen water) ที่ยึดติดอยู่กับของแข็ง ผลึกน้ำแข็งต้องการพลังงาน คือความร้อนในการเปลี่ยนเป็นไอ ไอน้ำจะถูกนำออกไปโดยการขนส่งมวล (mass transport) ซึ่งมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก การระเหิดเกิดขึ้นที่ผิวของตัวอย่างเมื่อเวลาผ่านไประยะหนึ่ง ตัวอย่างบางส่วนจะแห้ง (dry layer) และเหลือส่วนที่เยือกแข็ง (frozen layer) ระหว่างชั้นทั้งสอง เรียกว่า interface การระเหิดจะดำเนินต่อไปที่ interface โดยพลังงานจากตัวอย่าง ความแตกต่างของอุณหภูมิ (temperature gradient) ระหว่างแหล่งให้ความร้อน และ interface การขนส่งความร้อนจากชั้นเยือกแข็งเกิดโดยการนำ (conduction) หรืออาจเกิดจากการพา (convection) และการแผ่รังสี (radiation) ขึ้นอยู่กับชนิดของเครื่อง เมื่อน้ำแข็งละลายน้ำแล้วเกิดไอน้ำที่ interface ซึ่งจะถูกนำไปยังเครื่องควบแน่นโดยการขนส่งมวล ซึ่งต้องอาศัยความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) ระหว่าง interface การรักษาคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ต้องควบคุมอัตราการขนส่งความร้อนต่อ interface ในขั้นตอนการระเหิดนี้ จะระเหิดจนเหลือความชื้นในตัวอย่าง 15% (ของน้ำหนักเปียก)

3. การคาย(desorption)

หลังจากผลึกน้ำแข็งระเหิดออกจากตัวอย่างแล้ว ที่เหลือเป็นสารละลายเข้มข้นอยู่กับส่วน dry layer ซึ่งจะเป็นผลิตภัณฑ์ของเรา ส่วนที่เหลือนี้จะมีน้ำอยู่ 25-30 กรัม/ 100 กรัม ของแข็งจะยึดแน่นและไม่เยือกแข็ง น้ำซึ่งยึดแน่นกับของแข็งที่เป็น องค์ประกอบของตัวอย่าง เรียกว่า sorbed water จะถูกเปลี่ยนเป็นไอน้ำและถูกนำออกไปโดยการคาย (desorption) ซึ่งเป็นส่วนสุดท้ายในการทำแห้ง ความคงที่ของโครงสร้าง หรือเคมีของวัสดุจะขึ้นอยู่กับน้ำที่ยึดอยู่

น้ำที่ยึดอยู่กับของแข็งเป็นน้ำที่ต้องใช้ความกดดันต่ำกว่าน้ำบริสุทธิ์ ที่อุณหภูมิเดียวกัน การลดความกดดันมีผลต่อการยึดระหว่างน้ำและน้ำแข็งการลดความกดดันลงเท่าใดขึ้นอยู่กับความแข็งแรงของการยึด ตามทฤษฎีแล้วผลิตภัณฑ์ของเราจะหยุดปล่อยน้ำ (mass transport stop) เมื่อ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ความกดดันของน้ำที่ตัวอย่าง เท่ากับ ความกดดันของน้ำที่เครื่องควบแน่น ซึ่งแรงขับเคลื่อน (driving force) จะเท่ากับ ศูนย์

เราสามารถลดอุณหภูมิของเครื่องควบแน่นได้จาก -50 ซ ถึง -80ซ ทำให้ความกดดันของน้ำลดลง และจะทำให้ความแตกต่างของความกดดัน (pressure gradient) เป็นศูนย์ที่ความกดดันของน้ำของตัวอย่างเมื่อมีความชื้นน้อยลง นอกจากนี้เราสามารถเพิ่มอุณหภูมิของตัวอย่างเพื่อเพิ่มความกดดันของน้ำของตัวอย่าง ซึ่งก็ทำให้เกิดความแตกต่างของความกดดันด้วย เมื่อเครื่องควบแน่นมีอุณหภูมิคงที่ เช่น เพิ่มอุณหภูมิจาก 20 ซ เป็น 30ซ จะเพิ่มความกดดันจาก 23.2 mbar เป็น 42.3 mbar อย่างไรก็ตามควรคำนึงถึงความคงที่ของโครงสร้างและองค์ประกอบทางเคมีของตัวอย่างด้วยในขั้นตอนการคายน้ำนี้ จะเกิดการคายจนเหลือความชื้นในตัวอย่าง 2% (ของน้ำหนักเปียก)

ในการระเหิดและการคายน้ำ ไอน้ำของผลิตภัณฑ์จะถูกนำออกโดยการขนส่งมวลโดยมีปั๊มดูดอากาศช่วยนำออก แล้วไอน้ำจะถูกนำไปยังเครื่องควบแน่นและกลั่นตัวบนขดลวดทำความยืน

2.4 การทำให้แบคทีเรียแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ (lyophilize of bacteria)

การเก็บรักษาแบคทีเรียโดยวิธีไลโอฟิไลซ์เป็นวิธีการที่ดี ซึ่งนิยมใช้ในศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อและการเก็บรักษาเชื้อระดับภาควิชาหรือหน่วยงาน

2.4.1 การเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ATCC เลี้ยงเชื้อบนอาหารภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนหรืออุณหภูมิเมาะสมแตกต่างกันการตัดสินใจว่าควรใช้ภาชนะ ขนาดและชนิดใด และใช้อาหารวุ้นหรืออาหารเหลวสำหรับเลี้ยงเชื้อนั้นขึ้นอยู่กับวิธีการเก็บรักษา และลักษณะการเจริญของเชื้อ การบ่มเชื้อแต่ละชนิดนานเท่าใดขึ้นอยู่กับอาหาร อุณหภูมิและลักษณะการเจริญของเชื้อ

National Collection of Type Cultures (NCTC) เลี้ยงเชื้อในหลอดวุ้นเอียง (150 x 19 มม.) ใช้อาหาร nutrient หรือ blood agar เชื้อหนึ่งหลอด ใช้เตรียมซัสเพนชันสำหรับทำแห้งได้ 10 หลอด ถ้าเลี้ยงเชื้อในอาหารเหลวต้องนำไปหมุนเหวี่ยงเพื่อรวบรวมให้เซลล์มีความเข้มข้นเหมาะสม
ข้อปฏิบัติที่สำคัญ

การทำแห้งแบบเยือกแข็งควรตระหนักถึงการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์เชื้อบางชนิดเลี้ยงง่าย เช่น *Stapphylococcus aureus* และ enteric bacteria บางพวกเลี้ยงยากและบอบบาง เช่นMycoplasma spp. เชื้ออาจรอดชีวิตน้อย เนื่องจากเจริญไม่ดีพอก่อนการทำแห้ง การรวบรวมเซลล์ของเชื้อก็มีความสำคัญ คือควรเลี้ยงต่อการปะปนของเชื้อชนิดอื่นจากอากาศโดยการเลี้ยงในหลอดอาหารแข็ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ไม่นิยมเลี้ยงเชื้อในจานอาหารเพราะล้างเซลล์ได้ลำบากโดยทั่วไปใช้เชื้อที่เจริญหลังช่วง logarithmic มาเก็บรักษา จะทำให้เซลล์รอดชีวิตได้ดี และการใส ซัลเพนชันเชื้อลงไปในหลอดต้องอาศัยความชำนาญ มีการใช้เครื่องบรรจุอัตโนมัติแต่ก็จำกัดในทางอุตสาหกรรมกรณีที่มีหลอดเชื้อเป็นจำนวนมาก ศูนย์เก็บรวบรวมเชื้อใช้พาสเจอร์ไปเปตดูดเชื้อลงในหลอดเชื้อครั้งละประมาณ 0.1-0.2 มล. โดยไม่ให้เกิดการสัมผัสกับคอของหลอด

หลอดใส่เชื้อมีรูปร่างและขนาดแตกต่างกัน หลักการเลือกใช้ ควรใช้แก้วที่มีคุณภาพ และหลีกเลี่ยงการใช้แก้วไพเรกซ์ เพราะหลอมปิดหลอดได้ยาก และลำบากในการทำให้แตกเพื่อปิดหลอด นอกจากนี้หลอดที่ใช้ควรมีส่วนบนแคบเพื่อปิดสำลี สะดวกในการคอด และสามารถเขียนตัวเลขหรือชื่อบริเวณด้านข้างภายนอกของหลอดและควรมีความยาวที่สามารถใส่แผ่นกระดาษเล็กๆที่มีหมายเลขเชื้อลงไปได้

การทำงานทุกครั้งควรสังเกตให้ดีว่าหลอดมีรอยแตกหรือไม่ ควรเก็บหลอดเชื้อที่ทำแห้งไว้ในห้องมืดที่มีความเย็นคงที่ประมาณ 12 องศาเซลเซียส การเก็บเชื้อในตู้เย็น 4 องศาเซลเซียสหรือตู้เยือกแข็งจะช่วยยืดอายุให้นานขึ้น

2.4.2 การนำเชื้อออกมาเพาะเลี้ยง (recovery)

การนำเชื้อไลโอฟิไลซ์ออกมาเพาะเลี้ยง ในทางปฏิบัติจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตซึ่งมีผล ในทางปฏิบัติจำนวนเชื้อที่รอดชีวิตจะแตกต่างกัน ซึ่งเป็นผลมาจากการละลายเชื้อด้วยอาหารเหลว และการเลี้ยงเชื้อ ในกระบวนการทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์นั้นน้ำจะถูกนำออกไป เมมเบรนของเชื้ออาจเป็นอันตราย แต่การละลายด้วยอาหารเหลวเป็นการเพิ่มน้ำแก่เซลล์ซึ่งอาจทำให้เกิด osmotic shock Choate ด้วยประสบการณ์ NCTC แนะนำให้ใช้ nutrient broth เป็นอาหารละลายเชื้อ

การเปิดหลอดควรทำด้วยความระมัดระวังเพาะเชื้อในลักษณะแห้งนั้นเบามากอาจกระเด็นออกมา ควรทำให้หลอดแตกเบาๆ และปล่อยให้อากาศเข้าไปอย่างช้าๆ โดยใช้ตะไบทำให้หลอดเป็นรอย และใช้แท่งแก้วลนไฟให้ร้อนแดงจี่ให้แตก นำจุกสำลีที่ปราศจากเชื้อมาปิด ใช้พาสเจอร์ปิเปตดูดอาหารเหลวใส่ลงไปในเชื้อที่ทำแห้งภายในหลอด และผสมเบาๆ จะเห็นว่าเชื้อละลายเกือบทันที ระหว่างผสมไม่ควรทำให้กระเด็นหรือเกิดฟองอากาศ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.5 สาเหตุการบาดเจ็บของเซลล์

ในกระบวนการเก็บรักษาเซลล์โปรคารีโอต เพื่อให้สามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานนั้น ได้มีวิธีการเก็บรักษาโดยการลดอุณหภูมิให้ลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็ง ซึ่งเมื่อมีการลดอุณหภูมิต่ำถึง 0 องศาเซลเซียสหรือต่ำกว่าเล็กน้อย ของเหลวที่อยู่รอบเซลล์และภายในเซลล์จะยังไม่แข็งตัว ดังนั้น ของเหลวรอบเซลล์และภายในจะอยู่ในสภาพเย็นจัด ตามปกติในเซลล์จะคงอยู่ในสภาพที่เย็นจัดได้ นานต่อไป ขณะที่ของเหลวรอบ ๆ เซลล์เริ่มเกิดผลึกน้ำแข็งที่อุณหภูมิ
-5 องศาเซลเซียส ซึ่งการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์นั้นจะเกิดขึ้นช้ากว่าการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในของเหลวรอบ ๆ เซลล์

1. ตัวถูกละลายในของเหลวรอบ ๆ เซลล์มีความเข้มข้นสูงขึ้น ตามปริมาณการเกิดผลึกน้ำแข็ง ในขณะที่ยังไม่เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ ดังนั้นเซลล์จึงสูญเสียน้ำ เพราะความไม่สมดุลของ แรงดันออสโมติก

2. อัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างช้าๆ เซลล์ก็จะสูญเสียน้ำเพียงพอที่จะทำให้แรงดันออสโม ติกมีความสมดุลได้ และเซลล์จะมีขนาดเล็กลง อย่างไรก็ตามถ้าการปรับตัวดังกล่าวนี้ ต้องใช้ เวลานานเกินพอดี ก็จะเป็นอันตรายอย่างยิ่งต่อเซลล์ ทั้งนี้เพราะการสูญเสียน้ำและเพราะความ เข้มข้นของตัวถูกละลายสูงเกินควร

3. อัตราการลดอุณหภูมิเป็นไปอย่างรวดเร็ว ความสมดุลของแรงดันออสโมติกก็เกิดขึ้นได้ เพราะความการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์และผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ จะเป็นสาเหตุให้เซลล์ เสียชีวิต เพราะเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทิ่มแทงด้วยผลึกน้ำแข็ง

จะเห็นได้ว่าทั้งอัตราการลดอุณหภูมิอย่างช้าหรืออย่างเร็วก็ก่อให้เกิดอันตรายแก่เซลล์ได้ทั้งนั้น ดังนั้นอัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมย่อมจะทำให้เซลล์ที่นำไปเยือกแข็งมีอัตราการรอดชีวิต สูงขึ้นได้ อัตราการลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้น คือ อัตราการลดอุณหภูมิที่พอเหมาะที่จะป้องกันการ เกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์หรือถ้าเกิดขึ้นก็จะเกิดน้อยที่สุดเท่าที่เป็นไปได้ แต่ขณะเดียวกัน อัตรา การลดอุณหภูมิที่เหมาะสมนั้นก็ยังเป็นอัตราการลดอุณหภูมิที่เร็วพอที่จะไม่ทำให้เซลล์เป็นอันตราย เนื่องมาจากการสูญเสียน้ำ และการตกผลึกของสารเคมีที่เป็นตัวถูกละลายภายในเซลล์

อย่างไรก็ตาม ปัญหาที่เกี่ยวกับการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ และปัญหาเกี่ยวกับอันตราย เนื่องจากการสูญเสียน้ำ จนทำให้ของเหลวภายในเซลล์มีความเข้มข้นสูง จนเป็นอันตรายต่อเซลล์ นั้นพอจะแก้ไขได้ ด้วยการเติมสารเคมีบางอย่างลงไปในของเหลวที่อยู่นอกเซลล์ สารเคมีดังกล่าว นั้นมีหลายชนิด แต่โดยรวมเรียกว่า “cryoprotectant”

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.6 ไครโอโปรเทคแทนต์ (Cryoprotectant)

เป็นสารประกอบใดๆ ที่สามารถช่วยป้องกันการสูญเสียสภาพธรรมชาติของโปรตีนในระหว่างการเก็บรักษาแบบเยือกแข็ง ซึ่งมีผลโดยตรงต่อการเพิ่มอายุการเก็บรักษาและการทำให้กิจกรรมของสิ่งมีชีวิตดำเนินไปได้อย่างตามปกติ

2.6.1 ประเภทของสารป้องกันความเย็น

สามารถแบ่งกลุ่มสารป้องการความเย็นหรือสารที่ใช้เคลือบเซลล์ตามคุณสมบัติความเป็นกรดหรือเบส การเป็นสารรีดิวซ์และขนาดของโมเลกุลดังนี้

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกกรด(acid monomers) เช่น กลูตาเมต แอสปาราจีน (asparagine) มาเลต(malate) และแอสปาเตต(aspartate)

สารประกอบชนิดโมเลกุลเดี่ยวจำพวกเป็นกลาง(neutral monomers) เช่น กลีเซอรอล กลูโคส แลคโตส ซูโครส แรฟฟีโนส(raffinose) ซอร์บิตอล (sorbitol) ไซลิทอล(xyltol) อินอซิตอล และดีแอล-ทรีโอนีน(DL-threonine)

สารประกอบจำพวกพอลิเมอร์และดีเกรดเดทีฟ (polymers and its degradatives) เช่น อัลบูมิน (albumin) เจลาติน มิวซิน (mucin) เปปตา แป้ง เดกตริน (dextrin) เพคติน(pectin) พอลิเมอร์ของซูโครสเดกสแตรน (dextran) ส่วนสกัดจากเนื้อ ส่วนสกัดจากยีสต์ พอลำวนิลไพโรลิโดน (polyvinylpyrrolidone) คาร์บอซีเมทิลเซลลูโลส (carboxy methylcellulose) และฟีคอล(phecol)

สารประกอบธรรมชาติ(natural substances) เช่น สคิมมิลค์ และ ซัรัม

สารประกอบจำพวกรีดิวส์ (reducing agents) เช่น แอสคอร์เบต(ascorbate) ซีสทีอีน (cysteine) ไฮดรอกซิลามีน (hydroxylamine) และ เซมิคาร์บาไซด์ (semicarbazide)

2.6.2 กลไกการออกฤทธิ์ของสารไครโอโปรเทคแทนต์ (cryoprotectant)

เนื่องจากสารดังกล่าวมีมากมายหลายชนิด กลไกการทำงานของสารเหล่านี้จึงเข้าใจได้ยาก เพราะสารเคมีเหล่านี้มีคุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ต่างกัน เช่น กลีเซอรอล ไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และแอลกอฮอล์ เป็นตัวทำละลายที่ระเหยได้ ส่วนน้ำตาลซูโครสและกลูโคสเป็นผลึกน้ำแข็งละลายได้ดีในน้ำ เมื่อพิจารณาถึงอัตราการแพร่ของสารเหล่านี้ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์แต่กลูโคสแพร่ผ่านได้ส่วนแอลกอฮอล์มีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เร็วกว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์ และกลีเซอรอลมีอัตราการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ช้ากว่าไดเมธิลซัลฟอกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อย่างไรก็ตามเป็นที่เข้าใจกันดีว่าไครโอโปรเทคแทนต์ เหล่านี้จะมีผลกระทบต่อคุณสมบัติ ของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ โดยเมื่อเติมสารเหล่านี้เป็นเหตุให้จุดเยือกแข็งลดลง คุณสมบัติข้อนี้มีความสำคัญมากในการออกฤทธิ์ของสารเคมีเหล่านี้ ปกติที่แรงดัน 1 บรรยากาศ น้ำจะแข็งตัวที่ 0 องศาเซลเซียส ซึ่งตามธรรมชาติของของเหลวภายในเซลล์ จะมีจุดเยือกแข็งต่ำกว่า 0 องศาเซลเซียส และถ้ามีการเติมสารไครโอโปรเทคแทนต์ เข้าไปด้วยแล้ว จะยิ่งทำให้จุกเยือกแข็งต่ำลงอีก ของเหลวภายในเซลล์จึงเย็นจัด(supercool) ก่อนที่จะเกิดผลึกน้ำแข็ง และสาร ไครโอโปรเทคแทนต์จะช่วยเปลี่ยนแปลงแรงดันออสโมติกของของเหลวทั้งภายในและภายนอกเซลล์ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสามารถในการแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากน้อย หรือไม่ได้เลย ด้วยการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเหลวสองประการนี้ จะช่วยให้เซลล์รอดชีวิตภายหลังการเก็บรักษาแบบเยือกแข็งได้ เนื่องจาก

2.6.2.1 ป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ เป็นผลเนื่องมาจาก การเติมสารไครโอโปรเทคแทนต์ทำให้ของเหลวภายในเซลล์แข็งตัวช้า หรือแข็งตัวที่อุณหภูมิต่ำกว่าที่ไม่เติมสาร ไครโอโปรเทคแทนต์ด้วยเหตุนี้เซลล์จะสูญเสียน้ำออกสู่นอกเซลล์ ถ้าสูญเสียน้ำไปมาก น้ำก็ย่อมเหลืออยู่ในเซลล์น้อย การเกิดผลึกน้ำแข็งก็ย่อมเกิดน้อยตามไปด้วย ซึ่งการสูญเสียน้ำมากหรือน้ำน้อยขึ้นอยู่กับอัตราการลดอุณหภูมิ สารไครโอโปรเทคแทนต์ช่วยป้องกันการเกิดผลึกน้ำแข็งภายในเซลล์ได้ 2 วิธี คือ ทำให้ของเหลวแข็งตัวช้า และทำให้น้ำในเซลล์มีน้อยลง

2.6.2.2 ป้องกันการลดขนาดของเซลล์ การแพร่ของสารไครโอโปรเทคแทนต์เข้าสู่เซลล์สารนี้ไปแทนที่น้ำที่แพร่ออกจากเซลล์เพราะความแตกต่างของแรงดันออสโมติกที่เปลี่ยนไป เนื่องจากเกิดผลึกน้ำแข็งภายนอกเซลล์ก่อนที่ของเหลวภายในเซลล์จะแข็งตัว

2.6.2.3 ช่วยคงไว้ซึ่งคุณสมบัติเยื่อหุ้มเซลล์

2.6.3 คุณสมบัติของไครโอโปรเทคแทนต์

1. มีความเป็นพิษต่ำ เมื่อใช้ในความเข้มข้นที่ต้องการ
2. ระเหยได้น้อย
3. มีความสามารถที่ซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้
4. ละลายน้ำได้
5. ละลายในสารอิเลคโตรไลต์ได้น้อย
6. ราคาไม่แพง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

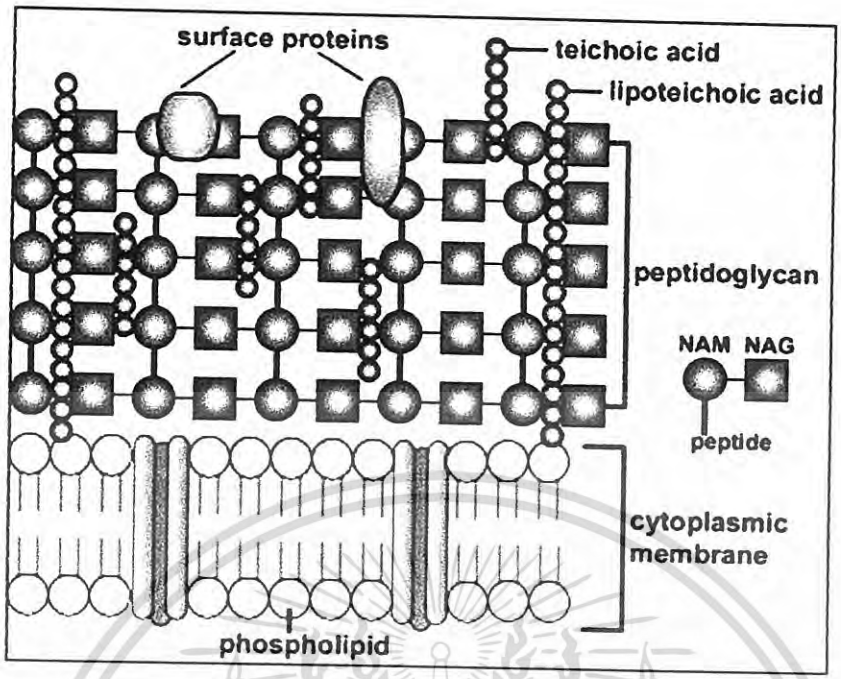
การใช้สารป้องกันความเย็นของศูนย์เก็บรักษาจุลินทรีย์โดยเฉพาะ ATCC ประเทศสหรัฐอเมริกา ใช้สดิมมิลค์ 20% ผสมเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% และอาจใช้สารละลายซูโครส 24% แทนสดิมมิลค์เพื่อเก็บรักษาเชื้อบางจำพวกโดยให้มีส่วนผสมของเชื้อมีความเข้มข้นของน้ำตาลช่วงสุดท้ายเป็น 12% หรืออาจใช้กลีเซอรอล 20% ผสมกับเชื้อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10% สำหรับการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ยีสต์ และรา ศูนย์เก็บรักษาเชื้อ National Collection Of Type Culture (NCTC) ประเทศอังกฤษนิยมใช้ส่วนผสมของซีรัม กับน้ำตาลกลูโคส 7.5% เก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (รวมทั้งมัยโคพลาสมา) ยีสต์ และรา เชื้อแบคทีเรียซึ่งทำให้แห้งแบบเยือกแข็งที่ NCTC สามารถรอดชีวิตได้สูง

การรอดชีวิตของเชื้อที่ทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์นั้นขึ้นอยู่กับน้ำที่เป็นองค์ประกอบภายในเซลล์และผลของปฏิกิริยาของสารป้องกันความเย็นกับองค์ประกอบของผิวเซลล์หรือสารที่มีอยู่ภายในเซลล์ สารป้องกันความเย็นจะทำให้อิเล็กโทรไลต์เป็นกลางไม่ทำให้ความสามารถเลือกนำสารเข้าออกเมมเบรนเปลี่ยนแปลงหรือสูญไป และสารป้องกันความเย็นยังป้องกันไม่ให้เชื้อสัมผัสกับอากาศในขณะที่เปิดหลอดเพื่อนำไปเพาะเชื้อใหม่ การจะเลือกใช้สารป้องกันความเย็นชนิดใดนั้นขึ้นอยู่กับผลการทดลอง โดยสัมพันธ์กับประสิทธิภาพเครื่องทำความเย็นและเครื่องดูดแห้ง การเก็บรักษาเชื้อที่ทำแห้งไว้ ณ อุณหภูมิที่ไม่เป็นอันตรายและการเพาะเลี้ยงเชื้อที่ทำแห้งหลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลานาน โดยเลือกใช้อาหารในการเพาะเลี้ยงใหม่อย่างเหมาะสม ก็จะทำให้เชื้อมีชีวิตรอดเป็นจำนวนมาก

2.7 ผนังเซลล์ (Celll wall)

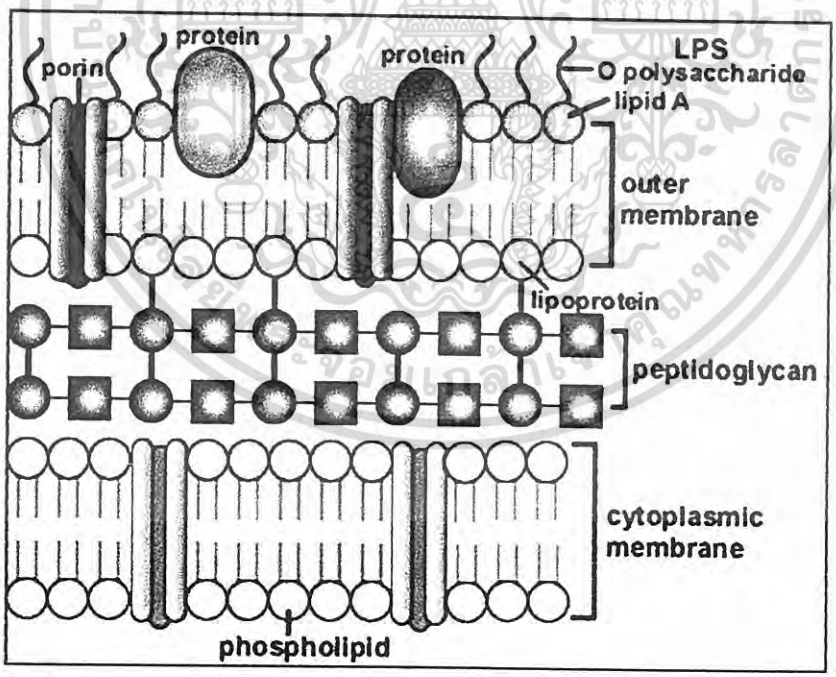
ทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากการกระทำแรงกลและแรงดัน osmotic ผนังเซลล์จะช่วยรักษารูปร่างของเซลล์ไว้ภายใต้สภาวะแวดล้อมรุนแรงผนังเซลล์ประกอบด้วยสารประกอบเชิงซ้อนของโปรตีนและ คาร์โบไฮเดรต (peptidoglycan) รวมเรียกว่า murein layerเราสามารถแบ่งกลุ่มของแบคทีเรียโดยอาศัยปฏิกิริยาการติดสีแกรม(Gram-reaction)ของผนังเซลล์ได้ แบคทีเรียกรมบวกมีผนังเซลล์หนาซึ่งประกอบด้วยโมเลกุลของ teichoic acid และteichuronic acidไม่มีชั้นของ lipopolysaccharide (LPS layer) ส่วนแบคทีเรียแกรมลบมีผนังเซลล์ที่บางกว่าและมีเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอก (outer membrane)ซึ่งประกอบด้วย porin proteinที่ยอมให้สารโมเลกุลใหญ่เคลื่อนที่ผ่านไปได้ง่าย(passive transport)นอกจากนี้เยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของแบคทีเรียแกรมลบยังประกอบด้วย lipopolysaccharideซึ่งมีสมบัติชอบน้ำ (hydrophilic)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 1 แสดงผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก

ที่มา : www.cat.cc.md.us/.../ prostruct/u1fig10b.html



ภาพที่ 2 แสดงผนังเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

ที่มา : www.cat.cc.md.us/.../ prostruct/u1fig10b.html

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8 เครื่องทำแห้งไลโอฟิไลซ์ (Lyophilizer)

เครื่องทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ ต่างมีส่วนประกอบจำเป็นพื้นฐานเหมือนกัน แม้ว่าจะมีขนาดและรูปร่าง แตกต่างกันบ้างก็ตาม

ส่วนประกอบที่สำคัญ คือ ปั๊มดูดอากาศ (vacuum pump) ต่อเชื่อมไปยังระบบ ความเย็นของเครื่องควบแน่น (condenser) ซึ่งทำหน้าที่ช่วยจับไอน้ำด้านหน้าของเครื่องมีปุ่มควบคุมและมิเตอร์บอกความกดดันและอุณหภูมิ เครื่องบางชนิดเป็นตู้ (champer) หรือเป็นชนิดหมุนเหวี่ยง (centrifuge freeze dryer) สามารถวางตัวที่ถาด (tray) ภายในตู้ หรือช่อง หรือต่อเข้ากับ manifold ซึ่งมีท่อต่อไปยังเครื่องควบแน่น

2.8.1 การพิจารณาเลือกส่วนประกอบของเครื่อง

2.8.1.1 เครื่องควบแน่น (condenser) เราจะเลือกเครื่องควบแน่นขนาดเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับความจุ (capacity) ที่สามารถจับไอน้ำได้ (น้ำจากตัวอย่าง) และปริมาณของตัวอย่าง เครื่องขนาดใหญ่ย่อมมีราคาสูง แต่จะมีอัตราการควบแน่นสูงจึงดีกว่า

2.8.1.2 แมนโฟลด์ หรือ แชมเบอร์ (Manifold หรือ chamber) เราสามารถบรรจุตัวอย่างไว้ในหลอด (ampoule) ขวด (bottle) และฟลาสก์ชนิดต่างๆ การเลือกใช้ สิ่งใดขึ้นอยู่กับผลิตภัณฑ์ ภาชนะที่ใส่ตัวอย่างต้องต่อเข้ากับเครื่องส่วนที่เรียกว่า manifold ภาชนะนั้นอยู่ในสภาวะเป็น freeze drying chamber ด้วยเราอาจวางตัวอย่างบนถาดภายในตู้ การใช้ระบบ manifold จะเป็นอิสระในการใส่ตัวอย่าง หรือนำออกเมื่อเสร็จสำหรับบางตัวอย่าง แต่การวางถาดหรือชั้นในตู้ บางเครื่องมีระบบปิดหลอดหรือขวดภายใต้สุญญากาศเมื่อทำแห้งเสร็จสมบูรณ์

2.8.2 คุณสมบัติของวัสดุในการทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์

โดยทั่วไปตัวอย่างประกอบด้วยสองสิ่ง คือ น้ำ และของแข็ง แต่ละส่วนมีความสำคัญต่อความสำเร็จในการทำแห้งแบบไลโอฟิไลซ์ในที่นี้จะกล่าวถึงคุณสมบัติพื้นฐานของน้ำและของแข็งดังนี้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2.1 น้ำ (water)

น้ำสามารถอยู่ได้ 3 สภาวะ (state) ทั้งของแข็ง (solid) ในรูปน้ำแข็ง (icc) ของเหลว (liquid) ในรูปตัวทำละลาย (solvent) และไอน้ำ (vapor) ในรูปการกลายเป็นไอ (steam) สภาวะของน้ำบริสุทธิ์ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิและความกดดัน(ภาพที่ 3) สามารถอธิบายความสัมพันธ์นี้ได้โดยใช้แผนภาพ วัฏภาคหรือเฟสไดอะแกรม (phase diagram) แผนภาพดังกล่าวแสดงให้เห็นความเป็นเนื้อเดียวกันและความแตกต่างทางกายภาพของระบบที่สามารถแยกออกจากระบบอีกระบบโดยเส้นแบ่งของทั้งสองสถานะบริสุทธิ์ เส้นแบ่งแต่ละเส้นแสดงอุณหภูมิและความดันที่ทำให้เกิดสถานะสมดุล จุดทริปเปิล (triple) เป็นจุดที่ทุกเส้นมาตัดกัน เป็นจุดที่แสดงว่าทั้งสามสถานะอยู่ในสภาวะสมดุล

ถ้ามีของแข็งอยู่ในน้ำ องค์ประกอบของตัวอย่างจะมีผลต่อสภาวะของน้ำ (ภาพที่ 4) แสดงถึงอุณหภูมิสัมพันธ์กับเฟสขององค์ประกอบ กล่าวได้ว่าการเปลี่ยนแปลงรูปแบบของน้ำจำเป็นต้องให้พลังงานหรือนำพลังงานออกจากโมเลกุลของน้ำ เช่น การเยือกแข็งน้ำ 1 กรัม พลังงานถูกนำออกจากน้ำ 80 แคลอรี ขณะที่การระเหิดของน้ำแข็ง 1 กรัมต้องใช้พลังงาน 680 แคลอรี

ในการทำแห้งแบบเยือกแข็ง น้ำบริสุทธิ์กลายเป็นของแข็งที่ 0 ซ ที่ความกดดันของบรรยากาศและน้ำทะเลที่ -2.5 ซ หากมีของแข็งผสมอยู่ด้วยของเหลวนั้นจะมีอุณหภูมิเยือกแข็งเปลี่ยนแปลงไป จุดเยือกแข็งของส่วนผสมนี้เรียกว่า eutectic point ผลของการเติมของแข็งต่อจุดเยือแข็งดังแสดงไว้ในภาพที่ 4 การทำให้สารละลายเย็นลงต่ำกว่าจุดเยือกแข็งเป็นผลทำให้เกิด soid water (ice) และยังมีของเหลวที่ไม่แข็งตัว เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลงๆจะเกิดขึ้นน้ำแข็งมากขึ้น ทำให้เหลือส่วนที่ไม่เยือกแข็งน้อยลง ถ้ามีอุณหภูมิต่ำมาก เราพบว่าสามารถแบ่งสารละลายได้สองแบบ คือ eutectic formers จะเยือกแข็งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ ซึ่งอยู่กับของแข็งในตัวอย่าง เช่น สารละลายโซเดียมคลอไรด์เยือกแข็งที่ -21.6 ซ ขณะที่แคลเซียมคลอไรด์เยือกแข็งที่ -55ซ และสารละลาย ซึ่งไม่เยือกแข็งแต่ค่อนข้างเหนียวขึ้นมากหรือเหนียวหนืด เรียกว่า glass formers ความแตกต่างของการเยือกแข็งนี้มีผลต่อความสำเร็จในการทำแห้ง

การระเหิดเกิดขึ้นโดยมีมีการเปลี่ยนแปลงสภาวะน้ำแข็งเป็นของเหลวการระเหิดของน้ำแข็งที่อุณหภูมิ -20 ซจะให้ความกดดัน 1.034 mbar และ ที่ -40 ซ ให้ความกดดัน 0.128 mbar (ตารางที่ 1) ซึ่งจะมีความสำคัญต่อการเคลื่อนที่ของมวล (mass transport) คือการเคลื่อนที่จากน้ำตัวอย่างสู่เครื่องควบแน่น

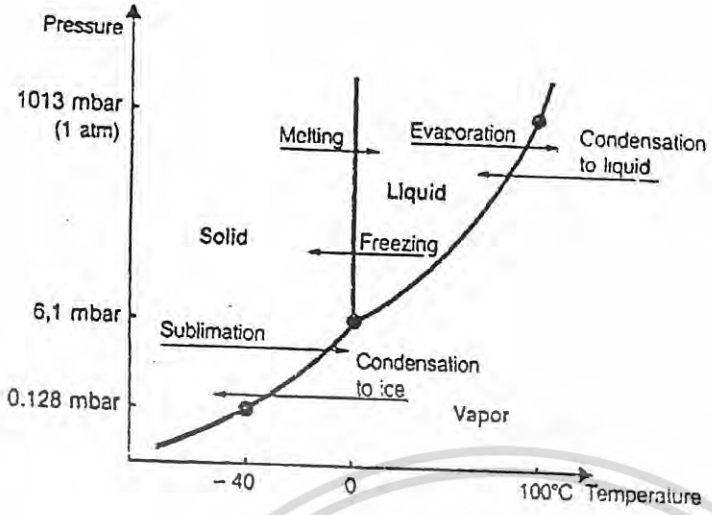
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
96500

ตารางที่ 1 : ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิและความกดดันของไอน้ำ

TEMPERATURE (°C)	Water Vapor Pressure (mbar)
30	42.421
20	23.374
10	12.275
0	6.103
-10	2.599
-20	1.034
-30	0.381
-40	0.128
-50	0.039
-60	0.010
-70	0.025
-80	0.0005

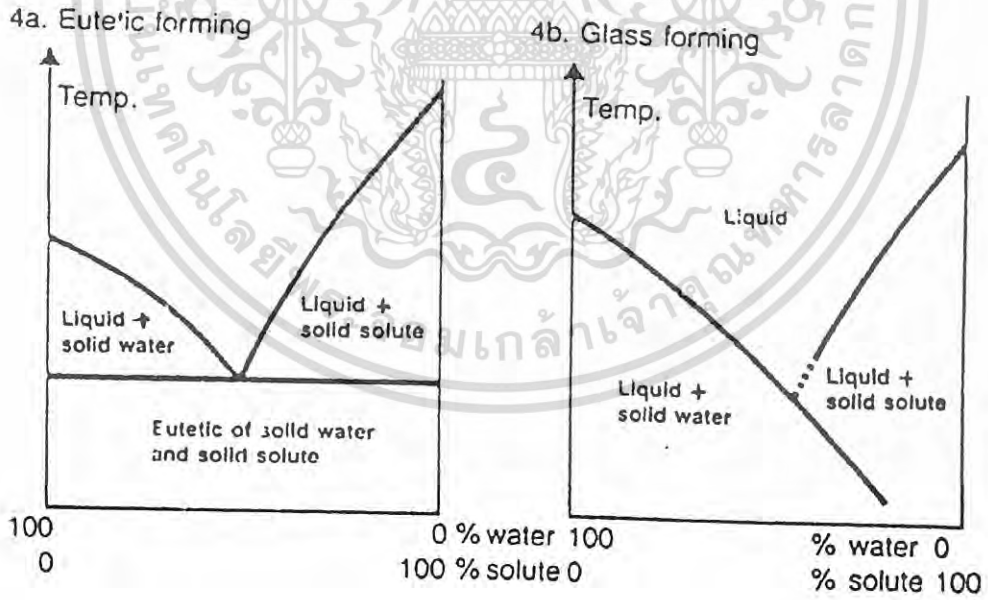
ที่มา : Flink, J. M. and H. Knudsen. 1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ของความกดดันและอุณหภูมิต่อสภาวะของน้ำบริสุทธิ์ (เฟส-ไดอะแกรม : phase diagram)

ที่มา : Flink, J. M. and H. Knusen. 1983



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ของอุณหภูมิต่อสารประกอบ (eutectic forming และ glass foring) ในน้ำ

ที่มา : Fink, J. M. and H. Knudsen.1983

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.8.2.2 ของแข็ง (solids)

เมื่อกล่าวถึงของแข็งในตัวอย่างและอิทธิพลของมันต่อการทำแห้ง เราต้องรวมส่วนของแข็งที่น้ำยึดติดอยู่ด้วย มีวัสดุหลายชนิดซึ่งจะมีผลต่อผลิตภัณฑ์จากการทำแห้งเราเรียก แฟคเตอร์ที่เกี่ยวข้องกับวัสดุ stability facter คือ

2.8.2.3 การขนส่งมวล (mass transport)

เป็นการเคลื่อนที่มวลจากที่หนึ่งไปยังที่หนึ่ง ในการทำแห้งแบบเยือกแข็งเป็นการเคลื่อนที่ของน้ำจากตัวอย่างไปยังเรื่องควบแน่น แรงขับเคลื่อน (driving force) ของการขนส่งมวล คือ ความแตกต่างของความกดดัน ขณะที่ความต้านทาน (resistance) เกิดจาก flow friction ในเครื่องระหว่างการเคลื่อนของโมเลกุลของน้ำ และโมเลกุลของน้ำอื่นๆ รวมทั้งโมเลกุลของอากาศ และผนังท่อ และที่ปิดเปิด (valve) ของเครื่องได้กล่าวแล้วว่าน้ำที่อุณหภูมิต่างกันจะมีความกดดันต่างกัน เช่น น้ำแข็งที่ -40 ซ มีความกดดันต่ำกว่าน้ำแข็งที่ -20 ซ เมื่อต่อถึงกันจะเกิดการเคลื่อนที่ของโมเลกุลของน้ำตัวอย่าง ที่ความกดดันสูงไปยังเครื่องควบแน่น อัตราการเคลื่อนที่ของมวลจึงเป็นสัดส่วนของ driving force กับ resistance

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

21091

ตารางที่ 2 แสดงการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ทำแห้งแบบเยือกแข็งที่ NCTC เก็บรักษาไว้

Genus	*No. of Species*	*No. of Strains*	*Mean logarithmic count before drying (BD), after drying (AD) and after storage for various periods (in years)*								
			BD	AD	1	5	10	15	20	25	30
Achromobacter	6	9	7.0	7.0	6.9	6.8	(5.5)	+			
Acetobacter	2	10	7.0	7.0	6.9	6.8	6.7	(6.5)	+		
Artimobacillus	3	19	6.3	6.1	3.6	4.9	4.2	(2.9)			
Artimomodura	3	8	4.6	4.3	4.4	4.3	(3.8)	(3.0)			
Achmomyces	4	13	5.2	4.9	4.5	4.2	3.8	(3.0)	(3.0)	(3.0)	(3.0)
Amococcus	1	11	3.8	5.6	5.6	5.6	5.5	5.5	(5.1)		
Amomonas	4	9	2.0	6.7	6.7	6.2	(6.5)				
Alcaligenes	3	7	2.0	6.9	6.6	6.6	(6.3)	+			
Alteromonas	3	8	6.9	6.8	6.6	6.0	(3.3)				
Alysiella	1	1	3.0	3.0	5.0	3.0					
Anaerobic coccus	-	11	6.2	3.7	3.2	4.8	4.3	3.8	(3.5)		
Bacillus	27	20	3.8	3.5	3.4	5.2	3.0	4.8	4.3	(3.0)	+
Bacterioncma	1	3	5.3	5.0	3.0	4.0	3.0				
*Bacteroides**	5	12	6.4	6.0	3.2	4.4	(3.4)	(3.3)	(3.3)		
Beneckia	4	4	6.3	3.8	4.8						
Bifidobacterium	1	2	6.3	6.5	6.5						
Bordetella	3	26	7.0	6.9	6.7	6.6	6.4	(6.3)	(6.6)		
Brevibacterium	-	2	7.0	7.0	7.0	7.0					
Brucella	3	32	6.8	6.8	6.8	6.3	6.2	5.8	(3.2)		
Butyribacterium	1	1	6.9	6.0	6.0	6.0					
Campylobacter	3	7	6.3	5.4	5.1	5.1	(4.0)	(4.0)			
Capnocytophage	2	2	3.0	4.0	3.5						
Cardiobacterium	1	3	7.0	6.3	5.7	(4.0)					
Cellulomonas	2	2	6.3	6.3	6.5	6.3	6.0	3.0	3.0		
Chromobacterium	3	19	6.7	6.1	3.5	5.2	4.8	4.2	(4.0)		
Citrobacter	2	11	7.0	6.0	6.8	6.6	6.3	6.0	(6.0)		
Clostridium	18	73	3.0	4.6	4.3	4.2	5.9	3.8	(3.2)	+	+
Camamonas	1	3	7.0	6.7	6.7	6.3	5.7	(6.0)			
Corenybacterium	14	72	6.4	6.1	5.9	3.8	5.4	5.1	4.6	4.1	3.2
Cytophaga	1	1	7.0	6.0	6.0	6.0	6.0				
Dermatophilus	1	1	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0				
Eduardsiella	1	3	6.7	6.3	6.0	6.0	6.0	(6.0)			
Eikenella	1	2	6.0	6.0	5.5	4.3					
Enterobacter	2	14	6.6	6.6	6.6	6.4	6.3	6.1	(5.6)	(5.0)	(5.0)
Erwinia	1	4	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0				
Erysipelothrix	1	8	6.3	6.1	6.0	5.9	5.6	5.4	(5.5)		
Escherichia	3	36	6.9	6.3	6.3	5.9	5.8	5.6	5.3	(4.0)	(3.7)
Flavobacterium	3	13	7.0	7.0	6.9	6.9	(6.3)	(6.0)	(6.0)		
Francisella	1	1	6.0	6.0	6.0		5.0				
Fusobacterium	2	2	7.0	7.0	6.3	6.0					
Gardnerella	1	2	6.0	5.5	5.0	4.5					
Gemella	1	3	6.0	6.0	6.0	6.0	3.0				
Harmophius	7	19	6.3	5.8	5.1	4.6	3.8	+	+		
Hafnia	1	8	7.0	6.4	6.0	5.6	3.3	4.9	4.6	4.6	+
Kingella	3	8	5.3	5.3	5.0	5.0	(4.5)				
Klebsiella	6	37	6.8	6.8	6.7	6.6	6.5	6.1	(5.9)	(5.8)	
Kluycero	2	2	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0			
Kurthia	2	3	6.3	5.7	5.3	5.0	4.3				

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้
ห้องสมุดคณะเทคโนโลยีการเกษตร
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าฯ ลาดกระบัง

Genus	*No. of Species*	*No. of Strains*	*Mean logarithmic count before drying (BD), after drying (AD) and after storage for various periods (in years)*								
			BD	AD	1	5	10	15	20	25	30
Lactobacillus	3	6	5.7	5.3	5.2	5.0	4.5	(4.6)	(4.6)		
Legionella	4	11	6.1	5.8	5.5	6.8					
*Leptotrichia**	1	1	6.0	5.0	4.0	3.0	0.0				
Leuconostoc	1	1	6.0	6.0	6.0	6.0					
Levinea	1	2	7.0	7.0	7.0	7.0					
Listeria	4	15	6.3	6.3	6.1	5.9	5.8	(5.7)	(5.0)		
Micrococcus	3	23	6.1	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0	(5.6)	(5.5)	(5.3)
Moraxella	12	25	6.0	6.0	5.8	5.4	(5.1)	(3.7)			
Morococcus	1	1	5.0	4.0							
*Mycrobacterium**	12	49	5.6	5.4	5.2	5.0	1.6	4.5	(4.0)	(3.7)	(4.0)
Mycrococcus	2	2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5				
Neisseria	9	41	6.6	6.1	5.6	4.9	4.1	(3.0)	(2.3)	+	+
Nocardia	5	10	6.1	6.0	5.9	5.9	5.7	+	+		
Pasteurella	5	23	6.9	6.8	6.2	5.8	5.6	5.1	(5.5)	+	
Pediococcus	1	2	6.0	6.0	6.0	6.0	6.0				
*Peptococcus**	2	2	6.0	6.0	+	+					
Plesiomonas	1	3	7.0	6.0	6.0	5.7	5.7	(5.0)			
Propionibacterium	2	2	6.5	6.5	6.5	6.5	6.5				
Proteus	4	22	6.7	6.6	6.6	6.6	6.5	6.5	(6.3)		
Providencia	-	10	7.0	6.8	6.7	6.3	6.2	6.0	(5.6)	+	+
Pseudomonas	12	31	6.8	6.4	6.1	5.5	3.0	4.5	(4.1)	+	+
Ramibacterium	1	1	6.0	6.0	6.0	5.0	3.0				
Rhodococcus	5	14	6.5	6.5	6.4	6.3	6.1	6.0	(5.8)	(5.0)	(5.0)
Rothia	2	3	6.0	6.0	6.0	5.7					
Salmonella	-	131	7.0	6.5	6.2	5.8	5.4	5.1	4.9	4.7	4.4
Sarcina	1	1	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0	7.0			
Serratia	1	12	6.9	6.8	6.8	6.8	6.3	6.4	6.0		
Shigella	4	63	6.9	6.7	6.5	6.1	5.8	5.6	5.5	5.1	+
Simonsiella	1	1	4.0	4.0	3.0	3.0	3.0				
Sphaerophorus	2	4	6.8	6.8	6.3	6.0					
*Sprillum**	1	1	7.0	4.0	3.0	2.0					
Staphylococcus	3	18	6.3	6.1	6.1	6.0	5.9	5.8	5.6	5.3	(4.0)
Streptobacillus	1	2	4.5	4.5	4.0						
Streptococcus	12	75	6.0	5.8	5.7	5.5	5.1	5.0	4.7	4.5	(3.4)
Streptomyces	5	9	4.1	3.7	3.7	3.6	3.5	(3.8)	(3.5)		
Thermoactinomyces	1	1	4.0	4.0	1.0	4.0					
Vibrio	5	23	7.0	6.6	6.0	3.4	5.0	4.6	(3.8)	+	
Yersinia	2	20	6.6	6.6	6.4	6.4	6.2	5.9	+		
Zooglea	1	1	7.0	7.0	7.0	6.0	5.0				

Count figures in parenthesis are based on fewer than the indicated number of strians tested

+ Indicates culture still viable , though an insuficient number of strains tested to provide a representative log count.

* Some species in these genera may prove difficult of freeze-dry and result in a relatively poor survival rate.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.1.1 อุปกรณ์

ชุดอุปกรณ์ในการตรวจวิเคราะห์หาเชื้อจุลินทรีย์

หลอด (ampoule)

เครื่องไลโอฟิไลซ์ (Lyophilize)

ไมโครปิเปต (micropipet)

พาสเจอร์ปิเปต (pasturepipet)

3.1.2 สารเคมี

skim milk

alcohol 95%

NaCl

อาหารเลี้ยงเชื้อ PCA

อาหารเลี้ยงเชื้อ NB broth

น้ำแข็งแห้ง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2 ชนิดของเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทำการศึกษา

ลำดับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL
1	*Acetobacter .aceti TISTR 102*	1001
2	*Acetobacter .acetiTISTR 103*	1002
3	*Acetobacter acetiTISTR 354*	1003
4	*Alcaligenes faecalis*	1004
5	*Bacillus coagulant*	1006
6	*Bacillus Megaterium*	1007
7	*Bacilus Sterotermophilus*	1008
8	*Bacilus subtilis*	1009
9	*Bacillus subtilis ATCC6633*	1010
10	*Bacillus thuringiensis*	1011
11	*Corynebecterium glutamicum*	1013
12	*Escherichia coli*	1014
13	*Escherichia coli JCM*	1015
14	*Enterococcus faecalis JCM*	1017
15	*Salmonella hadar*	1018
16	*Proteus vulgalis TISTR100*	1019
17	*Pseudomonas sp.*	1020
18	*Salmonella agona SH3463*	1021
19	*Salmonella anatum SO86105*	1022
20	*Salmonella cerro*	1023
21	*Salmonella derby SH3407*	1024
22	*Salmonella enteridis*	1025

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ลำดับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL
23	*Micrococus faecalis JCM*	1026
23	*Salmonella lexington*	1027
24	*Salmonella newport*	1028
25	*Salmonella tychina*	1029
26	*Salmonella typhi*	1030
27	*Samonella wandawort*	1031
28	*Samonella watterreden*	1032
29	*Samonella luteus*	1033
30	*Staphylococcus aureus*	1034
31	*Samonella canosus*	1036
32	*Staphylococcus aureus LTH*	1037
33	*Samonella derby*	1038
34	*Staphylococcus aureus ATCC 126000*	1039

3.2.1 การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย

3.2.1.1 นำเชื้อจากห้องปฏิบัติการมาทำการ streak ลงใน slant ที่เตรียมจากอาหาร PCA แล้วนำไปบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.2.1.2 นำเชื้อใน slant ที่เตรียมได้ มาทำการ cross streak ในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อยู่เพื่อทำการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ นำไปบ่มเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

3.2.1.3 นำโคโลนีเดี่ยว จากจานเพาะเชื้อ มา streak ใน slant ที่เตรียมจากอาหาร PCA บ่ม 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 24 ชั่วโมง นำไปใช้ในการทำเชื้อไลโอฟิไลซ์(lyophilize)

หมายเหตุ

กรณีเป็นที่เชื้อจำพวก A.aceti จะใช้อาหาร GYE agar

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.2.2 การเตรียมสคิมมิลค์ (skim milk 10%)

3.2.2.1 ชั่ง สคิมมิลค์ ผง 10 กรัม ผสมน้ำกรอง 100 ml คนให้เข้ากัน

3.2.2.2 นำไปใส่หลอดฝาเกลียว หลอดละ 5 ml ปิดฝาหลวมๆ แล้วหุ้มหลอดด้วยกระดาษฟอล์ยอีกครั้ง

3.2.2.3 นำไปเข้า หม้อนึ่งความดันไอน้ำ (autoclave) ครั้งที่ 1 ที่ อุณหภูมิ 110 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที (เมื่อได้เวลา ให้นำ สคิมมิลค์ ออกจากเครื่องหม้อนึ่งความดันไอน้ำทันทีโดยค่อยๆ เปิดไล่ให้ความดันค่อยๆลดลงจนใกล้ 0 แล้วจึงค่อยเปิดฝาเครื่อง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ เอา สคิมมิลค์ ออกมาโดยไม่ต้องรอให้อุณหภูมิลดลงเอง ไม่เช่นนั้น สคิมมิลค์ จะเกิดการเปลี่ยนเป็นสีน้ำตาลได้) หลังจากนั้นตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็นเป็นเวลา 1 คืน

3.2.2.5 นำไปเข้าเครื่อง หม้อนึ่งความดันไอน้ำ อีกครั้งที่อุณหภูมิและเวลาเท่าเดิม ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น ก่อนนำไปแช่ในตู้เย็นเพื่อเก็บรักษาไว้รอการนำไปใช้งานต่อไป

3.2.3 การเตรียมหลอด (ampoule)

3.2.3.1 ตัดกระดาษที่ พิมพ์ชื่อเชื้อ และวันที่ไว้แล้ว ให้มีขนาดเล็กพอที่จะใส่ลงไปในหลอดได้

3.2.3.2 นำกระดาษที่ตัดเสร็จแล้วใส่ลงในหลอด จากนั้นปิดปลายหลอดด้วยสำลี แล้วห่อทับด้วยกระดาษฟอล์ย

3.2.3.3 นำไปทำการฆ่าเชื้อด้วย หม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นให้นำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่ค้างอยู่ให้หมดก่อนนำไปใช้งาน

3.2.4 การเตรียมพาสเจอร์ปิเปต(pasture pipet)

นำ พาสเจอร์ปิเปตมาอุดปลายด้วยสำลี จากนั้นจึงห่อทับด้วยกระดาษฟอล์ยอีกครั้งหนึ่ง จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อโดยใช้ หม้อนึ่งความดันไอน้ำ จากนั้นนำไปอบเพื่อไล่ความชื้นที่ค้างอยู่ให้หมดก่อนนำไปใช้งาน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.3 การทำไลโอฟิไลซ์ (Lyophilize)

3.3.1 การเตรียมเครื่องไลโอฟิไลซ์ (Lyophilize)

3.3.1.1 เสียบปลั๊กรอ 5 นาที จากนั้นเปิดสวิทส์

3.3.1.2 นำหลอด(ampoule เปล่ามาเสียบเข้ากับแท่นเสียบ (มีทั้งหมด 48 ช่อง)

3.3.1.3 กดปุ่ม MAN รอจนกราฟแสดงอุณหภูมิแสดงไหสีเขียวขึ้นมาจนครบทุกช่อง (อุณหภูมิจะต้องมีค่าต่ำกว่า -40 องศาเซลเซียส) จากนั้นกดปุ่ม Vaccum เครื่องจึงจะเริ่มทำงาน รอจนค่าความดันลดลงจนทำให้กราฟของเครื่องแสดงค่าครบทุกช่อง จึงเริ่มทำการบรรจุตัวอย่างลงเครื่องได้ (ความดันมากที่สุดที่กราฟจะแสดงผลครบทุกช่องคือ $133x10^{-3}$ mBar)

3.3.2 การเตรียมตัวอย่างลงหลอด (ampoule)

3.3.2.1 นำสคิมมิลค์ มาใส่ลงใน slant ที่มีเชื้ออายุ 24-36 ชั่วโมง ใช้ loop เขี่ยเชื้อ ตีเชื้อบนผิว slant ให้กระจายลงใน สคิมมิลค์ ให้ผสมเข้ากันอย่างสม่ำเสมอ

3.3.2.2 ดูดเชื้อที่ผสมกับ สคิมมิลค์ ปริมาตร 0.15 ml ลงในหลอด โดยใช้ pasturc pipct จากนั้นปิดหลอดด้วยจุกสำลี

3.3.2.3 นำไปทำให้แข็งโดยใช้น้ำแข็งแห้งผสมกับแอลกอฮอร์ 95% (ที่อุณหภูมิ -70 องศาเซลเซียส) แช่เชื้อไว้ประมาณ 2 นาที

3.3.2.4 นำหลอดเชื้อที่แข็งแล้วใส่เครื่องไลโอฟิไลซ์ (ใส่แทนหลอดเปล่า) ก่อนใส่แต่ละหลอดต้องรอให้vacuum $\leq$ ขนาด $133x\ 10^{-3}$ มิลลิบาร์

3.3.2.5 รอให้เชื้อแห้งทิ้งไว้ประมาณ 4 ชั่วโมง (สังเกตโดยดู vacuum คงที่และมีค่าใกล้เคียงกับตอนที่ใส่หลอด เปล่า)

3.3.2.6 ดึงหลอดออกมา 2-3 หลอด แล้วกด vacuum ออกแล้วดึงหลอดทั้งหมดออกมาคอดนำหลอดที่คอดแล้ว มาใส่แท่นเสียบทุกรู กดให้ vacuum ทำงานรอจน vacuum $\leq$ ขนาด $133x\ 10^{-3}$ มิลลิบาร์ แล้วจับเวลาประมาณ ½-1 ชั่วโมง

3.3.2.7 ทำการปิดหลอดด้วยเปลวไฟในสภาพสุญญากาศ

3.3.2.8 เก็บที่อุณหภูมิห้อง (33 ±3 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น(4 ± 2องศาเซลเซียส) ไว้ทำการศึกษาต่อไป

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.4 การตรวจหาจำนวนเชื้อที่รอดชีวิต

3.4.1 นำหลอด ampoule ที่บรรจุเชื้อแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์จากที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องและอุณหภูมิ ตู้เย็น มาตัดหลอดเพื่อนำเชื้อมาตรวจวิเคราะห์

3.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียไลโอฟิไลซ์ ใส่ลงใน NB Broth 9.85 ml แล้วนำไปผสมกันด้วยเครื่องผสม (vortex)

3.4.3 นำมาเจือจางให้มีระดับความเข้มข้นที่ 10^{-4} , 10^{-5} , และ10^{-6} และนำไป spread plate ในจานอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA อย่างละ 2 plate

3.4.4 นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

3.4.5 นับจำนวนโคโลนีที่พบและนำมาคำนวณเป็น ค่า cfu/ml

3.5 วิธีการทดลอง

3.5.1 การศึกษาการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียโดยวิธีไลโอฟิไลซ์ (Lyophilize)

3.5.1.1 ทำการนำเชื้อแบคทีเรียที่ต้องการทำ ไลโอฟิไลซ์ มาทำตามวิธี การทำไลโอฟิไลซ์ที่ได้กล่าวไว้แล้วข้างต้น (3.3)

3.5.1.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ แล้วมาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิตด้วยวิธีการ spread plate โดยเปรียบเทียบกับปริมาณเชื้อเริ่มต้นก่อนทำการไลโอฟิไลซ์ ว่ามีจำนวนอัตราการรอดชีวิตแตกต่างกันอย่างไร

3.5.1.3 นำเชื้อที่ทำการ spread plate แล้ว มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.1.4 นับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่เจริญขึ้น เปรียบเทียบจำนวนของเชื้อที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ กับเชื้อเริ่มต้นที่ไม่ได้ทำการไลโอฟิไลซ์ จากนั้นบันทึกผลการทดลองที่ได้

3.5.2 การเปรียบเทียบผลของอุณหภูมิที่มีผลต่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ที่อุณหภูมิห้อง (33 ±3 องศาเซลเซียส) และอุณหภูมิตู้เย็น(4 ± 2องศาเซลเซียส)

3.5.2.1 นำเชื้อที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ แล้วมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ ที่ต่างกันสองอุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิห้อง กับที่อุณหภูมิตู้เย็น

3.5.2.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ มาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิต ด้วยวิธีการ spread plate แล้ว มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3.5.2.3 เปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิต่างกันนั้นว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

3.5.3 การศึกษาระยะเวลาที่สามารถเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์

3.5.3.1 นำเชื้อที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ แล้วมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ ที่ต่างกันสองอุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิห้อง กับอุณหภูมิตู้เย็นและในเวลาที่แตกต่างกัน ที่ระยะเวลา 0, 4 และ 8 เดือน

3.5.3.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ มาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิต ด้วยวิธีการ spread plate โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกันนั้นว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

3.5.3.3 นำเชื้อที่ทำการ spread plateแล้ว มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.3.4 เปรียบเทียบและบันทึกผลการทดลอง

3.5.4 การศึกษาเปรียบเทียบการมีชีวิตรอดระหว่างเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรีย แกรมลบหลังจากผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลาและอุณหภูมิต่างกัน

3.5.4.1 นำเชื้อที่ผ่านการทำไลโอฟิไลซ์ แล้วมาเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ ที่ต่างกันสองอุณหภูมิ คือ ที่อุณหภูมิห้อง กับที่อุณหภูมิตู้เย็น และในเวลาที่แตกต่างกันด้วย ที่ระยะเวลา 0, 4 และ 8 เดือน

3.5.4.2 นำเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาไว้ มาทำการทดสอบอัตราการรอดชีวิต ด้วยวิธีการ pour plate โดยเปรียบเทียบปริมาณเชื้อแบคทีเรียที่เจริญ จากการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาที่ต่างกันนั้นว่ามีความแตกต่างกันอย่างไร

3.5.4.3 นำเชื้อที่ทำการ spread plateแล้ว มาบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

3.5.4.4 เปรียบเทียบผลการทดลองทั้งหมดเพื่อหาดูว่าเชื้อแบคทีเรียชนิดในที่สามารถทนและเหมาะสมกับการเก็บรักษาด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ได้ดี โดยการเปรียบเทียบจำนวนโคโลนีที่ได้และการย้อมแกรมเชื้อแบคทีเรีย

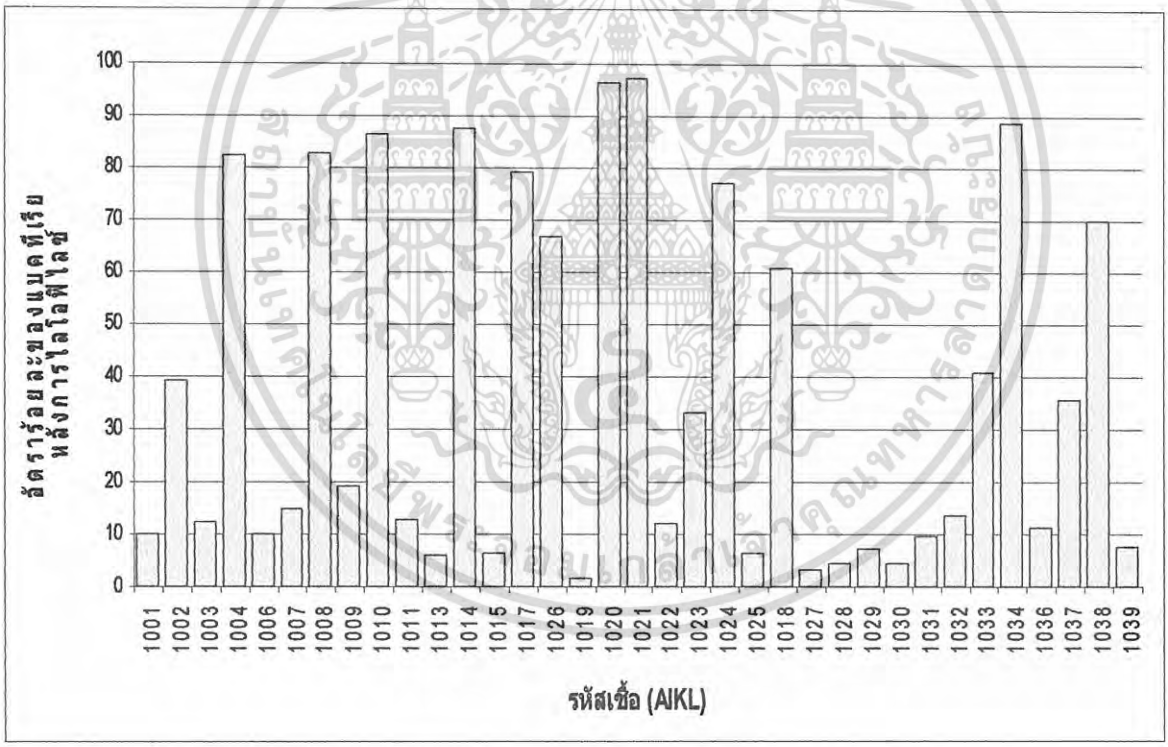
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่4

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

4.1 ผลการตรวจนับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์

อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียหลังจากผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ จะได้ผลการทดลองที่แสดงให้เห็นว่าเมื่อนำเชื้อไปผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้วปริมาณเชื้อจะมีอัตราการอดชีวิตลดลง ซึ่งจะลดลงมากหรือน้อยไม่เท่ากัน โดยเชื้อแบคมีเรียที่มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดคือ AIKL 1021 ส่วนเชื้อแบคทีเรียที่มีอัตราการรอดชีวิตน้อยที่สุดคือ AIKL 1019 ดังภาพที่ 5



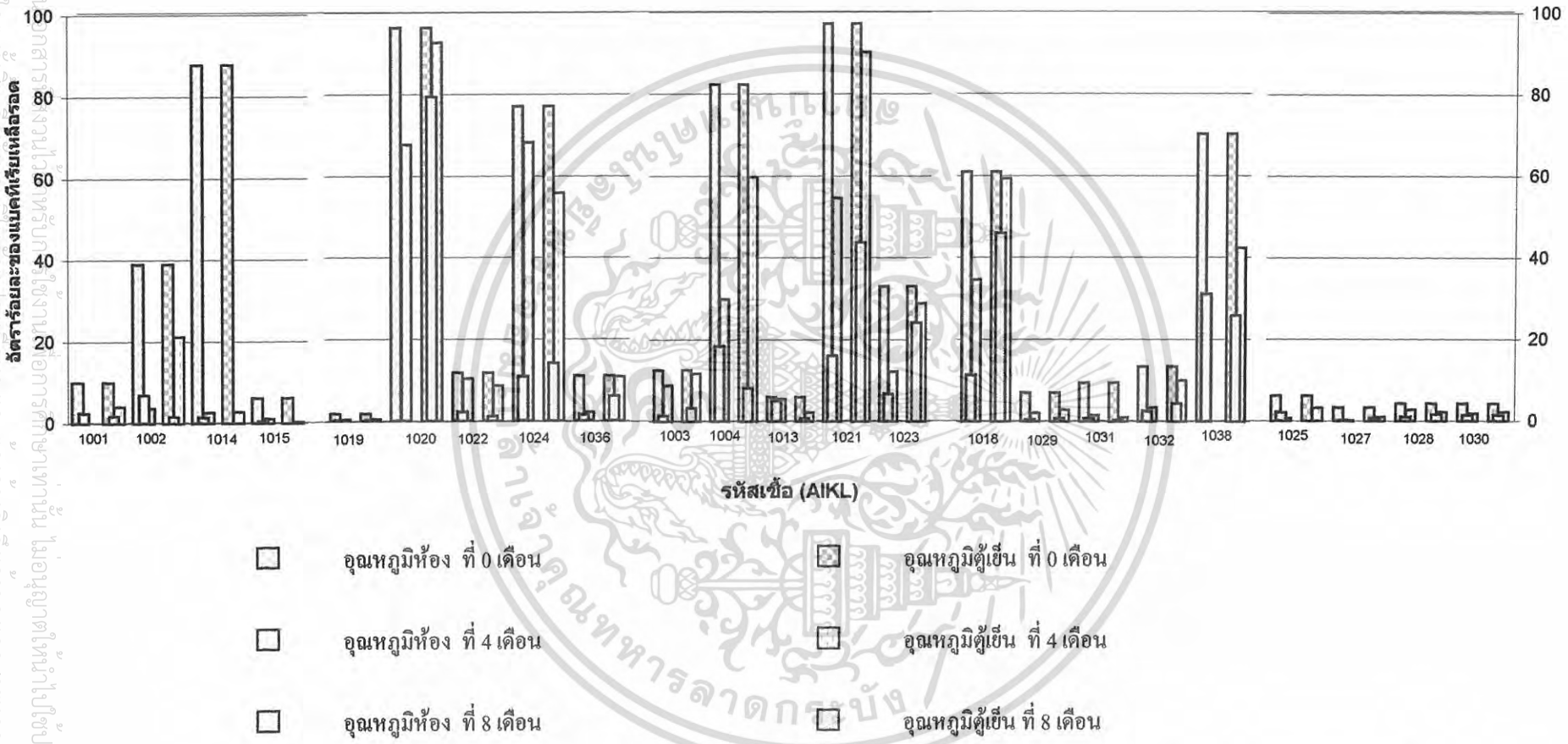
ภาพที่ 5 แสดงอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียหลังผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

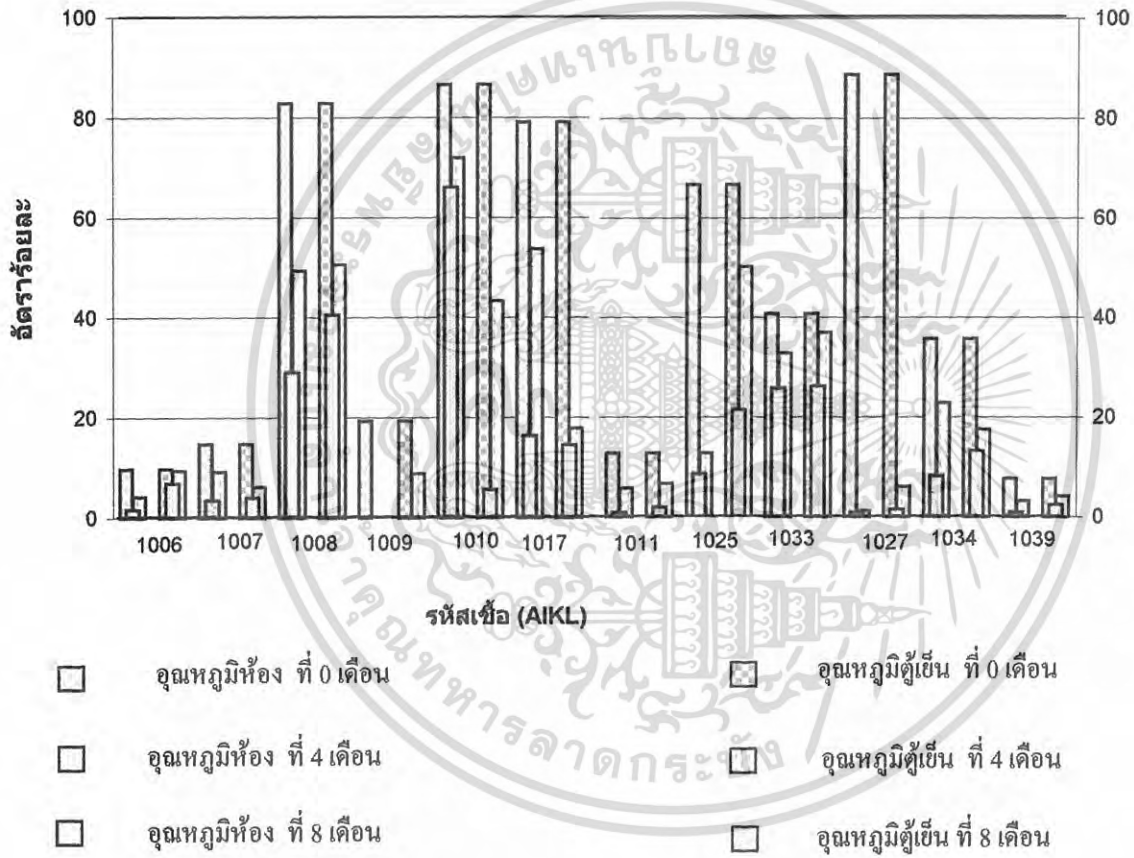
เมื่อนำเชื้อแบคทีเรียที่ผ่านการไลโอฟิไลซ์ไปทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง(33±3 องศาเซลเซียส) และที่อุณหภูมิตู้เย็น(4 ± 2 องศาเซลเซียส) เป็นระยะเวลา 0 , 4 และ 8 เดือน ซึ่งที่ระยะเวลา 0 เดือนนั้น เป็นระยะเวลาการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียหลังการไลโอฟิไลซ์ทันที ซึ่งพบว่าเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่ที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 และ 8 เดือนนั้น มีการรอดชีวิตลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับการเก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 เดือน โดยการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นนั้นเชื้อแบคทีเรียส่วนใหญ่จะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง ซึ่งจากภาพจะเห็นว่ากราฟ แท่งสีเหลืองที่ 2 และ 3 ของเชื้อส่วนใหญ่นั้นจะสั้นกว่า กราฟแท่งชมพู ของแบคทีเรียแกรมลบ ดังภาพที่ 6 และแบคทีเรียแกรมบวก ดังภาพที่ 7

เมื่อให้อัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียหลังจากผ่านการไลโอฟิไลซ์ที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 0 เดือนเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ จะพบว่าเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาเป็นระยะเวลา 8 เดือนนั้นจะมีอัตราการรอดชีวิตลดลงจากการเก็บที่ระยะเวลา 4 เดือน เพียงเล็กน้อย ซึ่งแสดงว่าเชื้อแบคทีเรียที่ได้ทำการเก็บรักษาไว้นั้นมีอัตราการรอดชีวิตที่สามารถจะนำมาทำการเก็บได้เป็นระยะเวลานาน แบคทีเรียแกรมลบ ดังภาพที่ 8 และแบคทีเรียแกรมบวก ดังภาพที่ 9

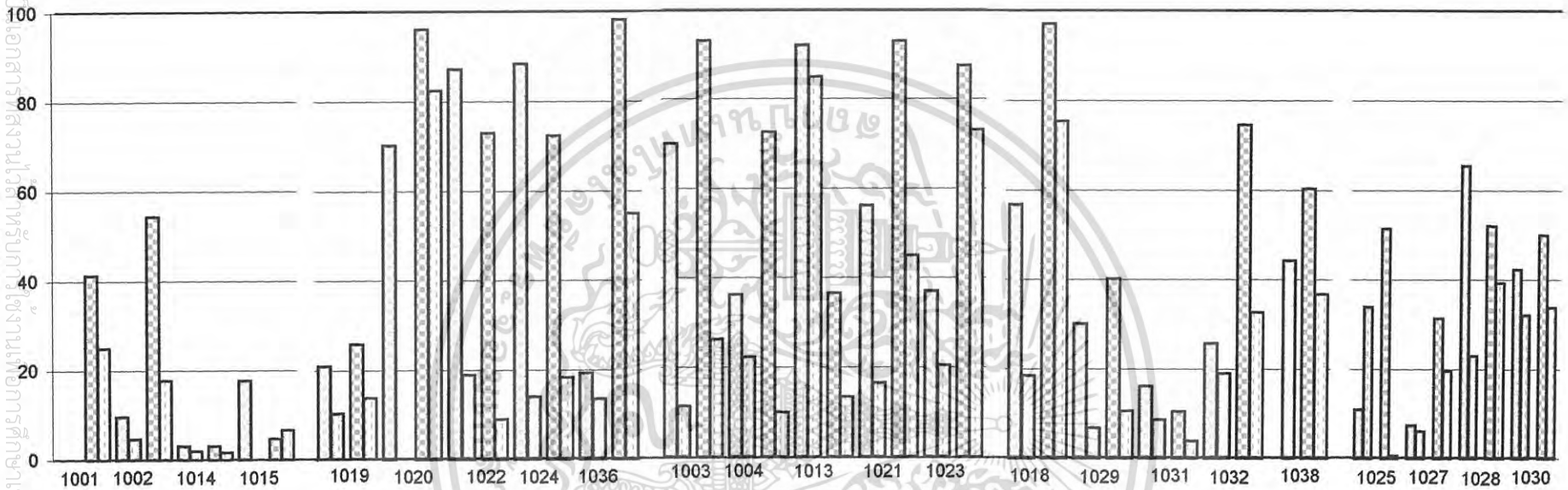
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



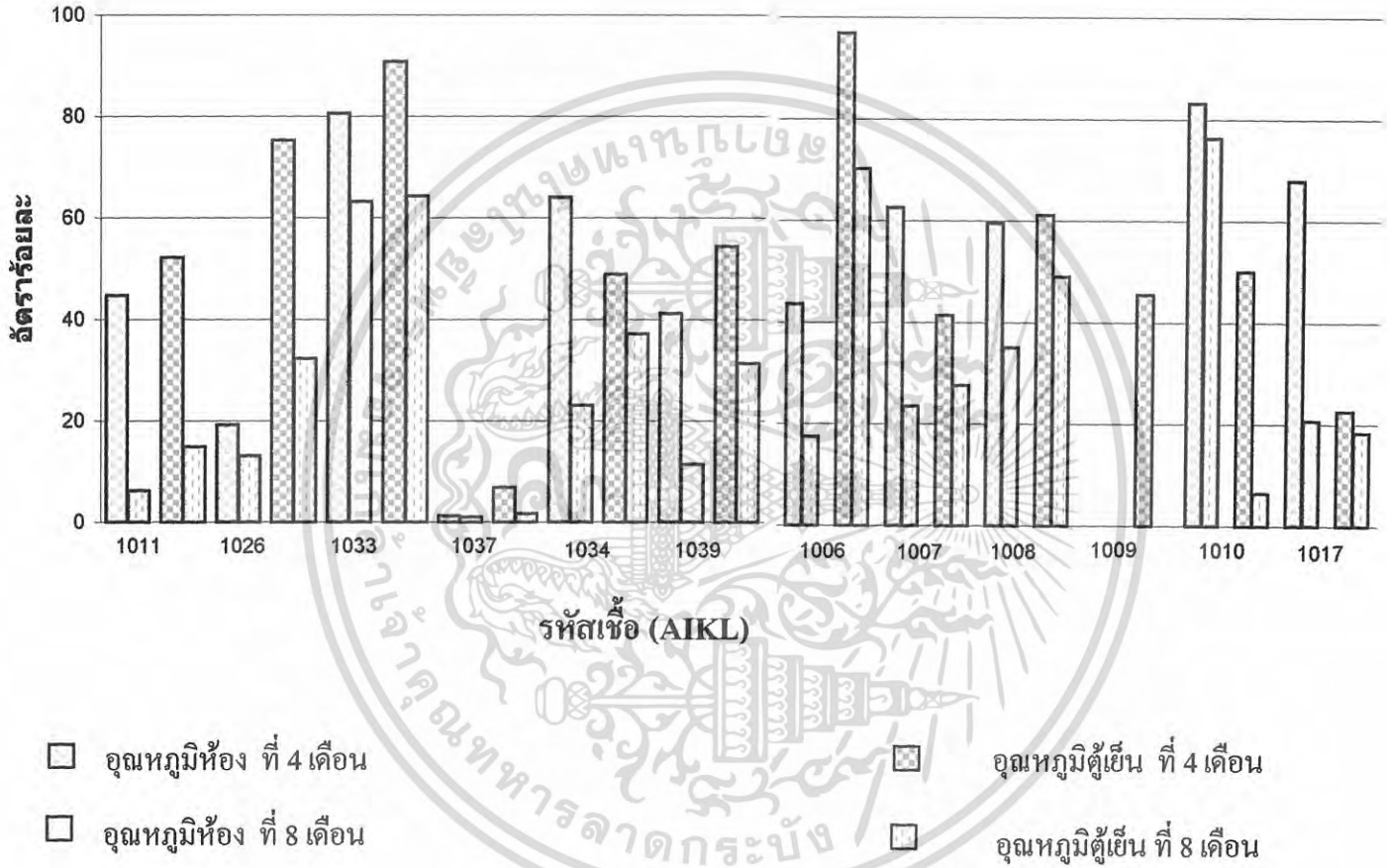
ภาพที่ 6 แสดงอัตราร้อยละของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแกรมลบที่เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน



ภาพที่ 7 แสดงอัตราร้อยละของจำนวนเซลล์แบคทีเรียแกรมบวกที่เหลือรอดในระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและระยะเวลาต่างกัน



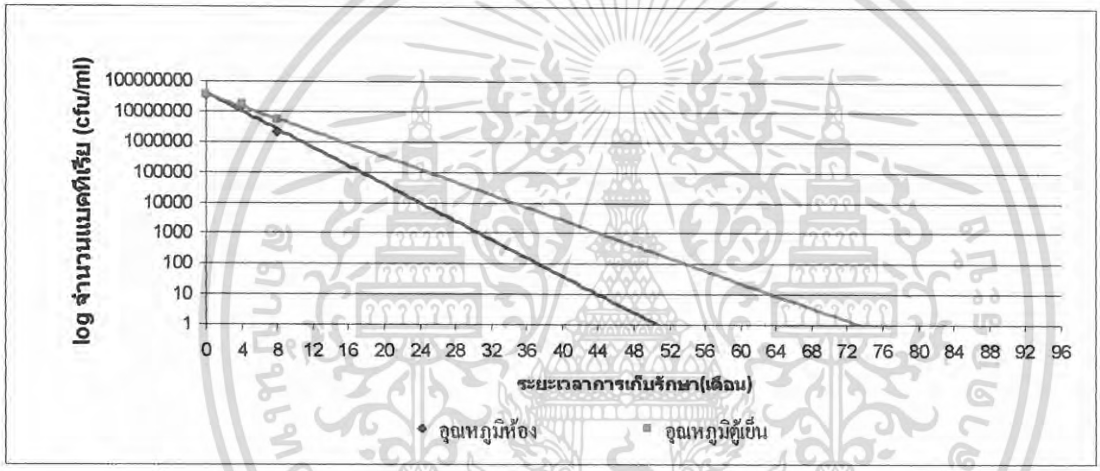
ภาพที่ 8 แสดงร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่ที่ระยะเวลา 0 เดือน



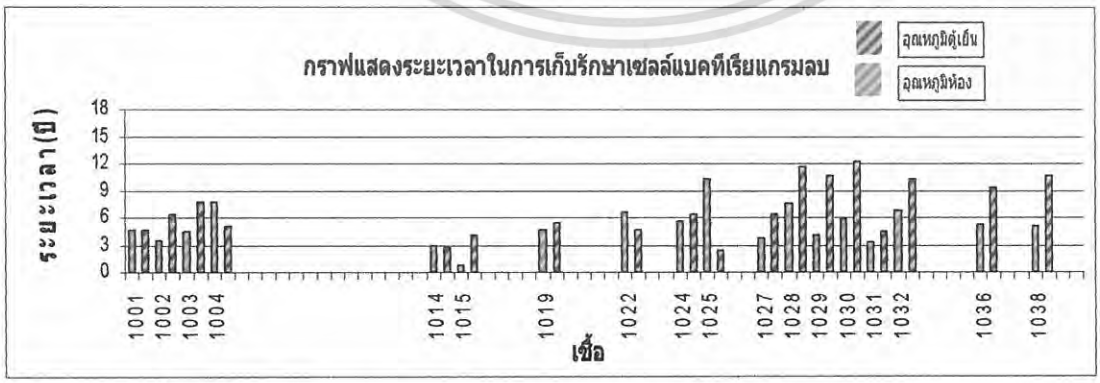
ภาพที่ 9 แสดงร้อยละอัตราการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เก็บรักษาที่ระยะเวลา 4 และ 8 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เหลือรอดอยู่ที่ระยะเวลา 0 เดือน

4.2 การศึกษาเปรียบเทียบการรอดชีวิตของแบคทีเรียแกรมบวกและแกรมลบ

จากการทดลองเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดนั้น ได้ทำการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียที่ได้นำมาทดลองว่าสามารถเก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานเท่าไรนั้น ซึ่งจากภาพที่ 10 นั้นแสดงการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของเชื้อแบคทีเรียระหว่างการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง และอุณหภูมิตู้เย็นซึ่งจะเห็นว่าเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็นสามารถเก็บรักษาได้นานกว่า โดยได้ทำการเปรียบเทียบอายุการเก็บรักษาของเชื้อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ ระหว่างอุณหภูมิห้องและอุณหภูมิตู้เย็น ของแบคทีเรียแกรมลบ ดังภาพที่ 11 และแบคทีเรียแกรมบวก ดังภาพที่ 12



ภาพที่ 10 แสดงการคาดคะเนอายุการเก็บรักษาของแบคทีเรีย AIKL 1011



ภาพที่ 11 แสดงระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียแกรมลบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพที่ 12 แสดงระยะเวลาในการเก็บรักษาเซลล์แบคทีเรียแกรมบวก

จากกราฟที่ได้จากการทดลอง จะได้ว่าเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและแบคทีเรียแกรมลบที่นำมาศึกษานั้นมีอายุการเก็บรักษาใกล้เคียงกัน โดยเชื้อแบคทีเรียแกรมลบที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็นได้นานที่สุดคือ เชื้อ AIKL 1025 และ AIKL 1030 ตามลำดับ ส่วนเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องและตู้เย็นได้นานที่สุดคือ เชื้อ AIKL 1008

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

1. การรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย หลังจากผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ พบว่า อัตราร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรียจะมีค่าลดลงลดลง และการลดลงของอัตราร้อยละการรอดชีวิตของเชื้อแบคทีเรีย แต่ละชนิดนั้นจะมีค่าไม่เท่ากัน โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิด

2. เชื้อแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมบวก และแบคทีเรียที่ย้อมติดสีแกรมลบนั้น เมื่อผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์แล้วทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิและเวลาที่ต่างกันนั้น จะพบว่าเชื้อแบคทีเรียทั้งสองแกรมนั้นมีอัตราการรอดชีวิตที่แตกต่างกันออกไป โดยจะขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียที่ได้นำมาทำการทดลอง

3. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียหลังจาผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลา 0,4 และ 8 เดือน และเก็บในอุณหภูมิห้อง (33 ± 3 องศาเซลเซียส) กับอุณหภูมิตู้เย็น (4 ± 2 องศาเซลเซียส) พบว่า โดยส่วนมากการรอดชีวิตของแบคทีเรียที่ผ่านกระบวนการไลโอฟิไลซ์นั้นจะมีค่าลดลงมากเมื่อทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง(33 ± 3 องศาเซลเซียส) ส่วนอัตราร้อยละการรอดชีวิต ของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น(4 ± 2 องศาเซลเซียส)นั้นจะมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่าที่ระยะเวลา 0,4 และ 8 เดือน ตามลำดับ ทั้งนี้ก็ขึ้นอยู่กับชนิดและสายพันธุ์ของเชื้อแบคทีเรียด้วย

5.2 ข้อเสนอแนะ

ในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย ด้วยวิธีไลโอฟิไลซ์ ควรจะต้องระวังเรื่องการปนเปื้อนของเชื้อจุลินทรีย์ชนิดอื่นด้วย และเชื้อแบคทีเรียที่จะนำมาใช้ในการเก็บรักษาโดยวิธีนี้ควรจะมีการเจริญอยู่ในระยะ Stationary phase เนื่องจากในช่วงการเจริญระยะนี้จะมีความทนทานต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมในการเจริญมากที่สุด ทำให้มีอัตราการรอดชีวิตมากที่สุดด้วย ซึ่งเราอาจจะสังเกตได้จากการเจริญของเชื้อที่เจริญบนผิวหน้าของ slant ถ้าเราบ่ม 24 ชั่วโมงแล้วพบว่ามีเชื้อเจริญได้น้อยก็ควรทำการบ่มต่อไปอีก 12-24 ชม. แต่ไม่ควรเกิน 36 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

บัญญัติ สุขศรีงาม. 2534. **จุลชีววิทยาทั่วไป**. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์. 507 หน้า.

สมบูรณ์ ธนาศุภวัฒน์ . 2544. **เทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ (Preservative technique of microorganisms)**. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิไล รังสาดทอง .2546 . **เทคโนโลยีการแปรรูปอาหาร (food processing technology)**, กรุงเทพมหานคร : สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าพระนครเหนือ

Hubálek, Z., 2003. "Protectant used in the cryopreservation of microorganisms." **Cryobiology**. 46:205-299.

Oetjen ,Grore – Wilhelm ,1999, **Freeze – drying** : Wiley-VCH, 276p.

Terence W. G. Rowe F Inst P and John W snowman of Edwards High Vacuum Cramley. 1978 **Edwards Freeze - Drying Handbook**

Snowman, John W. ,1988 . **Downstream Processes: Equipment and Techniques** , [online]. Freeze drying : http://www.rpi.edu/dept/chem-eng/Biotech-Environ/LYO

กระบวนการ Freeze-drying .[online] .Freeze drying . http://www.theballball.com

Lyophilization The equipment and process . [online] .Lyophilization :http://www.devicelink.com/ivdt/archive/00/05/004.html

Freeze Dryers & Freeze Drying . [online] . Freeze drying : http://www.niroinc.com/html/chemical/freezedryers.html

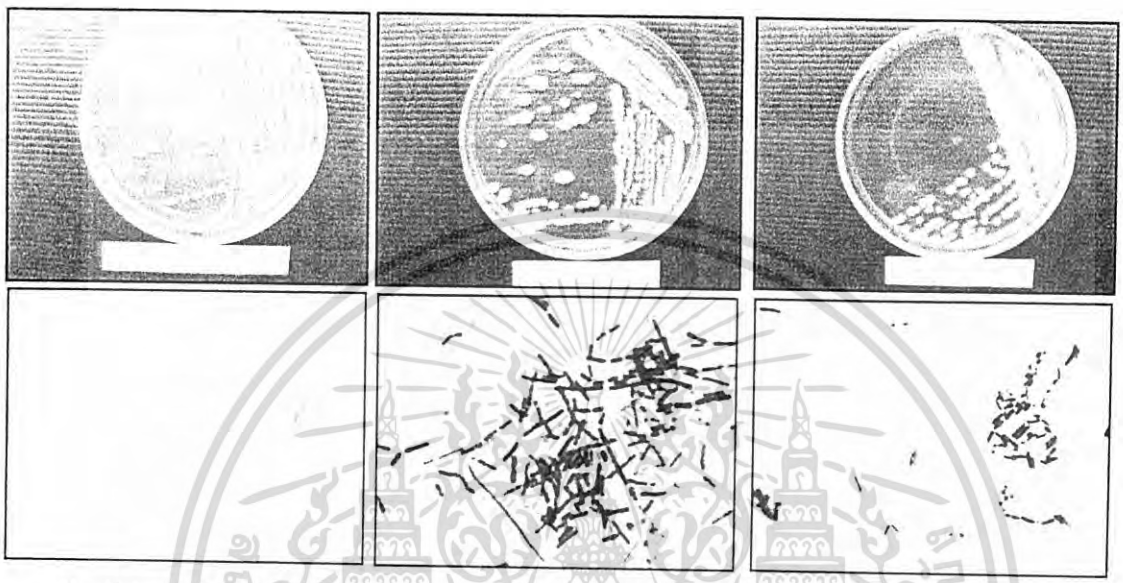
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก

ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

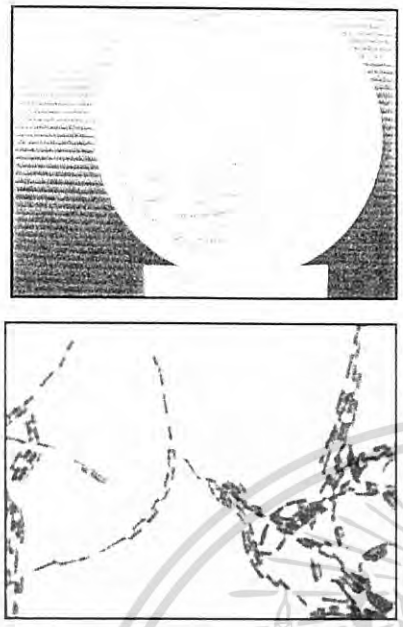
ตัวอย่างลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียที่ศึกษาบนอาหารเลี้ยงเชื้อ PCA และลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเชื้อแบคทีเรียที่ทำการศึกษา



Alcaligenes flacalis JCM AIKL1004 | *Bacillus coagulant* AIKL1006 | *Bacillus megaterium* AIKL1007

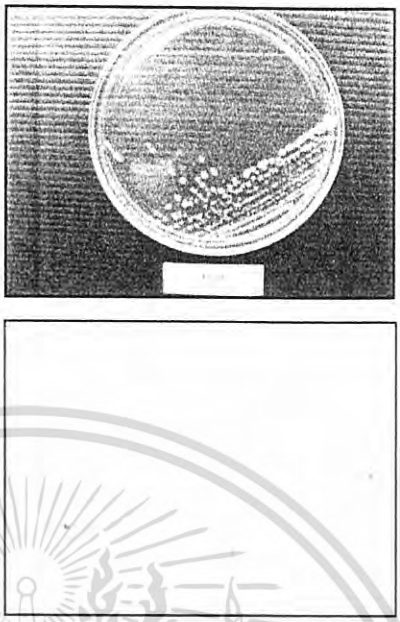
Bacillus sterothemophilus AIKL 1008 | *Bacillus subtilis* AIKL 1009 | *Bacillus subtilis* ATCC 6633 AIKL 1010

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



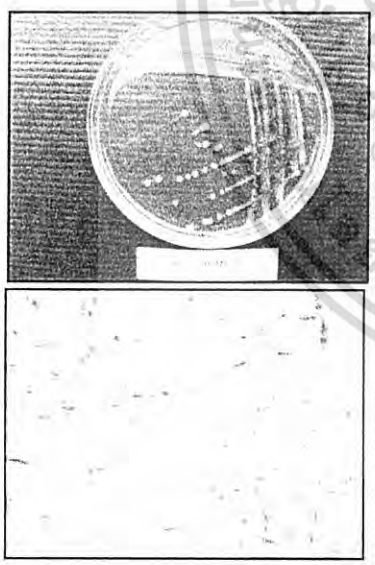
Bacillus thuringiensis

AIKL 1011



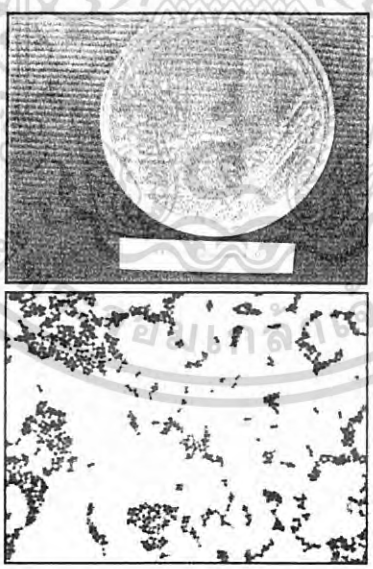
Escherichia coli AIKL

1014



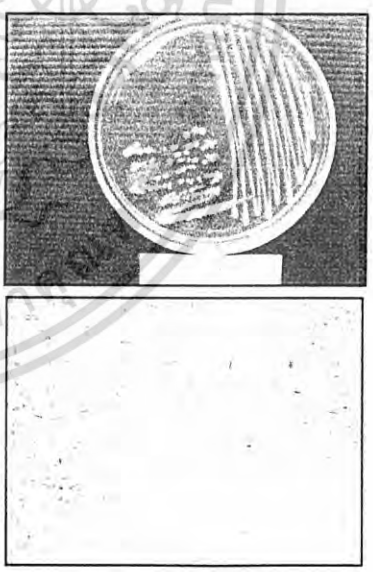
Escherichia coli JCM

AIKL1015



Enterobacter faecalis JCM

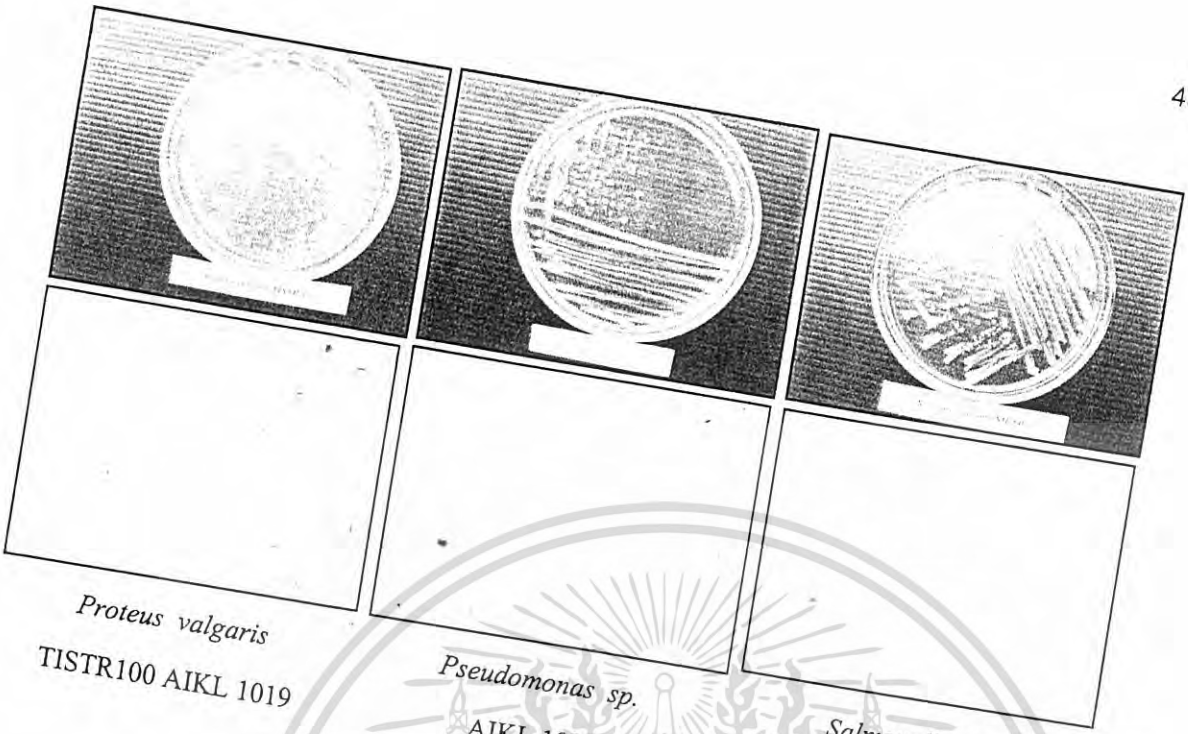
AIKL1017



Salmonella hadar

AIKL1018

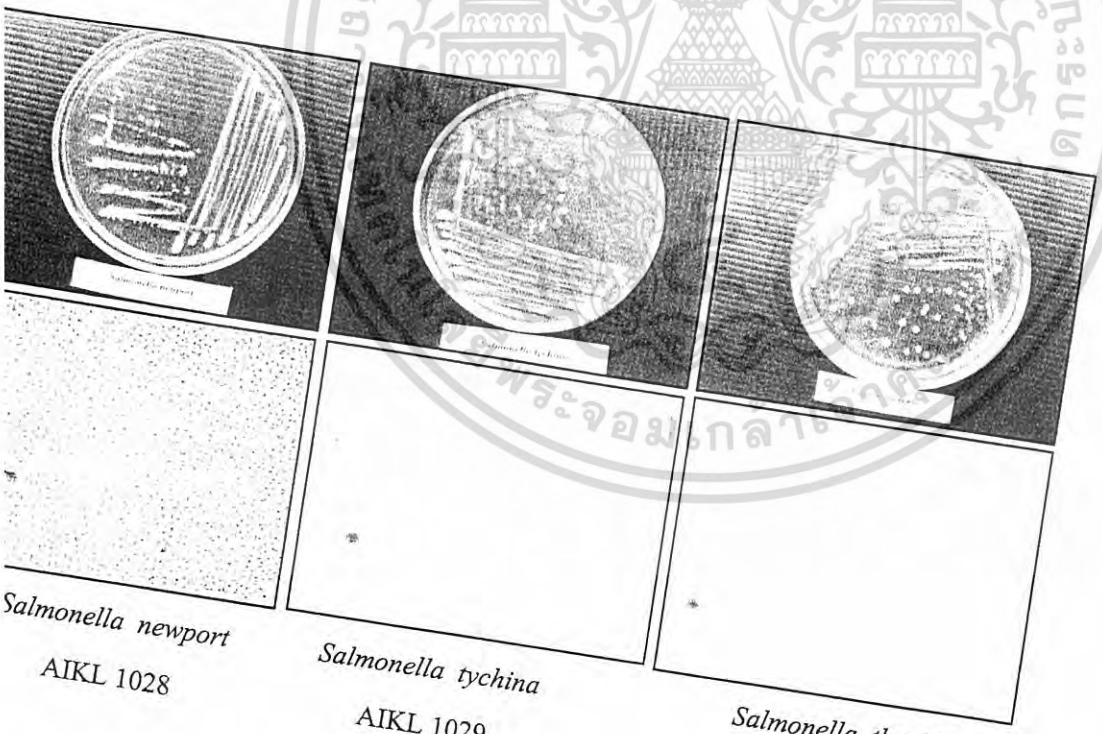
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Proteus valgaris
TISTR100 AIKL 1019

Pseudomonas sp.
AIKL 1020

Salmonella agona
AIKL 1021

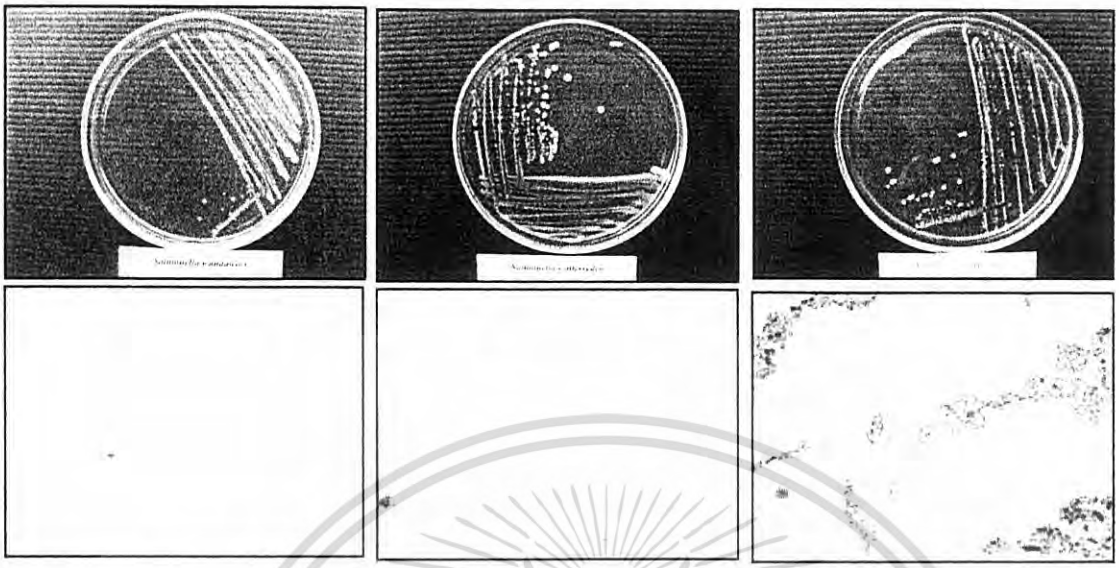


Salmonella newport
AIKL 1028

Salmonella tychina
AIKL 1029

Salmonella thyphi
AIKL1030

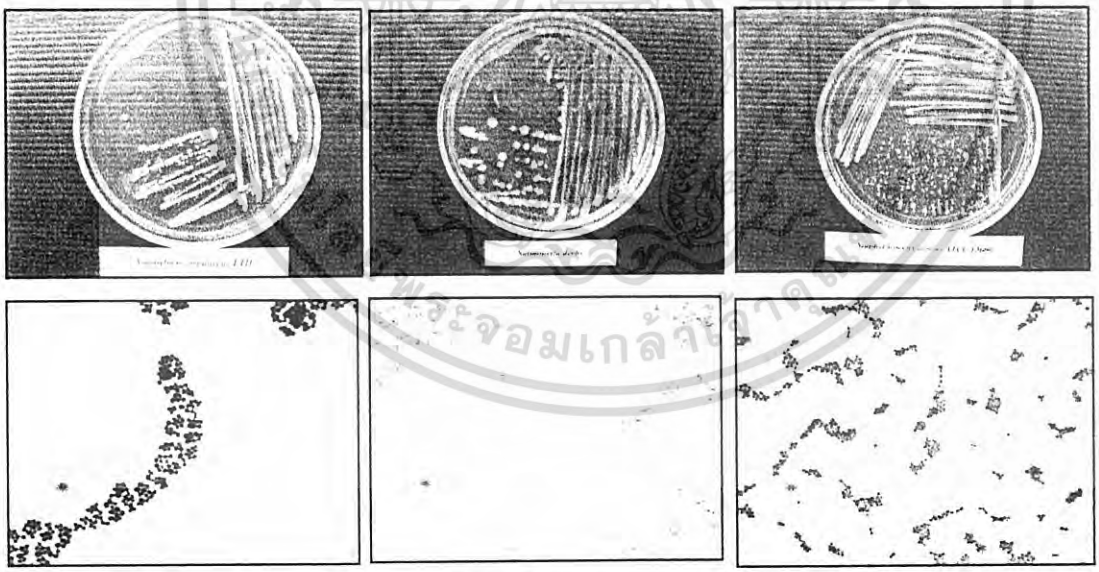
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



Salmonella wandaworth AIKL 1031

Salmonella watterreren AIKL1032

Salmonella carnosus AIKL 1036



Staphylococcus aureus LTH AIKL 1037

Salmonella derby AIKL 1038

Staphylococcus aureus ATCC 12600 AIKL 1039

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในระหว่างการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 1 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้ในขั้นตอนการทำไลโอฟิไลซ์

ระดับความเจือจาง	*Escherichia coli JCM*		*B.thuringenesis*		*Stphylococcus aureus*		*Slmonella tychina*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	>300	130 127	>300 207	93 105	>300 >300	>300 293	>300 266	110 103
$1:10^6$	190 223	37 26	151 132	51 63	124 142	109 128	128 175	58 49
$1:10^7$	24 24	1 0	44 32	19 11	10 14	56 93	15 23	10 7
$1:10^8$	17 21	0	8 4	0 1	1 0	7 9	4 3	6 2
$1:10^9$	1 2	0	2 1	0	0	0	0 1	0 1

ระดับความเจือจาง	*Acetobacter aceti* 103		*Acetobacter aceti* 102		*Acetobacter aceti* 354		*Sarcina luteus*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	286 298	91 137	287 191	17 31	322 285	53 33	>300	>300 246
$1:10^6$	66 53	49 25	12 18	5 3	65 10	12 8	290 189	115 81
$1:10^7$	5 1	3 1	2 2	4 5	6 6	0	52 21	23 42
$1:10^8$								
$1:10^9$								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Acaligenes faecalis*		*Bacillus coaculant*		*Corynebacterium glutamicum*		*Bacillus stearothermophilus*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	>300	>300	237 218	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	276 334	321 246	145 173	39 55	>300	113 111	>300 240	>300 202
$1:10^6$	61 32	48 22	45 73	13 24	300 76	82 52	25 39	23 30
$1:10^7$	7 12	3 2	12 44	1 3	12 15	14 2	13 11	0 6
$1:10^8$	0 3	0 1	0 1	0	3 1	11	7 2	0
$1:10^9$								

ระดับความเจือจาง	*Escherichia coli*		*Micrococcus luteus*		*Salmonella derby*		*Salmonella hadar*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	301 289	89 85	198 191	86 88	110 129	89 96	148 153	93 90
$1:10^6$	84 29	45 41	76 79	42 49	58 54	45 51	46 55	29 36
$1:10^7$	10 13	8 12	28 29	17 13	19 23	11 8	16 14	10 9
$1:10^8$	0 1	0	8 3	1 0	2 1	0	0	0
$1:10^9$								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus subtilis*		*Proteus vulgalis*		*Salmonella wandaworth*		*Salmonella watterreden*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	277 158	60 49	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	30 40	1 1	>300	59 65	>300	168 189	>300	>300
$1:10^6$	4 4	0 0	>300	2 8	313 65	10 13	>300 369	36 27
$1:10^7$	0 2	0	41 28	1 0	10 45	1 0	21 26	2 0
$1:10^8$	0	0 1	6 2	0 4	1 0	0	6 3	0
$1:10^9$								

ระดับความเจือจาง	*Salmonella newport*		*Salmonella cerro*		*Salmonella carnosus*		*Bacillus subtilis* ATCC	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	>300	187 91	>300	279 321	>300	77 47	>300	>300
$1:10^6$	>300	5 17	>300	37 36	75 37	20 22	52 45	31 53
$1:10^7$	39 26	7 1	46 55	2 5	11 10	10 3	45 15	14 9
$1:10^8$	1 3	0	8 5	0	3 0	0 3	2 3	9 4
$1:10^9$								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus megaterium*		*Salmonella anatum*		*Salmonella lexington*		*Staphylococcus sureus* LTH	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	101 145	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	63 103	3 6	>300	159 93	>300 291	120 -	>300	>300
$1:10^6$	10 15	2 1	211 -	12 15	260 312	9 0	241 273	113 79
$1:10^7$	1 1	2 0	24 23	1 8	43 46	0 1	28 29	8 16
$1:10^8$	0	0	3 -	0	0 1	0	0 4	0
$1:10^9$								

ระดับความเจือจาง	*Enterococcus faecalis* JCM		*Psuedomonas sp.*		*Salmonella agona*		*Salmonella derby*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$								
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	149 119	104 107	120 151	137 124	1330 158	130 150	149 153	103 109
$1:10^6$	21 2	22 11	89 54	17 8	68 59	51 45	48 57	30 25
$1:10^7$	0 1	1 0	17 8	8 6	12 12	0 1	2 2	4 3
$1:10^8$	0	0	0	4 0	0	0	0	0
$1:10^9$								

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Staphylococcus aureus* ATCC		*Salmonella enteridis*		*Salmonella typhi*	
	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize	ก่อน lyophilize	หลัง lyophilize
$1:10^3$						
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	>300	127 135	>300	165 176	>300	79 77
$1:10^6$	196 144	50 41	290 276	16 15	194 163	5 7
$1:10^7$	11 12	1 1	24 24	2 0	25 26	1 0
$1:10^8$						
$1:10^9$						

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 2 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้หลังผ่านกระบวนการทำไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 4 เดือน

ระดับความเจือจาง	*Escherichiacoli JCM*		*Bacillus thuringenesis*		*Staphylococcus aureus*		*Salmonella tychina*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	69 50	322 135	>300	>300	>300	153 142	>300	>300
$1:10^5$	9 8	106 82	227 123	156 141	65 98	52 42	56 30	31 34
$1:10^6$	0 6	26 9	30 41	29 41	15 23	1 1	11 9	0 1

ระดับความเจือจาง	*Acetobacter aeti* 103		*Acetobacter* 102		*Acetobacter* 354		*Sarcina luteus*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	195 20	>300	2 3	>300 252	43 19	>300	>300
$1:10^5$	37 86	16 2	56 64	2 11	41 39	12 9	>300	>300
$1:10^6$	4 9	2 8	2 3	10 13	4 4	1 0	142 36	56 102

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Alcaligenes faecalis*		*Bacillus coagulant*		*Corynebacterium glutamicum*		*Bacillus sterotermophilus*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	>300	302	156	>300	>300	>300	>300
			168	43				
$1:10^5$	146	92	65	22	46	133	180	230
	168	139	49	11	36	73	144	85
$1:10^6$	12	42	0	12	14	9	11	0
	50	11	1	1	0	4	21	4

ระดับความเจือจาง	*Escherichia coli*		*Micrococcus luteus*		*Salmonella derby*		*Salmonella hadar*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	149	128	>300	261	>300	>300	>300	>300
	11	29		245				
$1:10^5$	29	0	107	8	76	122	100	48
	30	9	89	8	58	34	78	56
$1:10^6$	4	0	0	1	16	27	15	5
	4	1		6	11	22	25	3

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus subtilis*		*Proteus vulgalis*		*Salmonella wandaworth*		*Salmonella watterreden*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	37	12	120	163	247	202	>300	>300
	12	17	204	97	128	238		
$1:10^5$	6	2	25	12	18	39	310	94
	10	1	13	8	30	31	239	67
$1:10^6$	0	1	0	0	2	3	33	18
		0	1	3	0	5	26	16

ระดับความเจือจาง	*Salmonellla newport*		*Salmonella cerro*		*Salmonella carnosus*		*Bacillus subtilis* ATCC	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	103	>300	>300
						136		
$1:10^5$	167	74	123	71	52	7	296	>300
	113	108	169	53	70	11	120	
$1:10^6$	11	8	22	7	1	2	29	32
	6	16	11	1	3	0	22	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus megaterium*		*Salmonella anatum*		*Salmonellla lexington*		*Staphylococcus sureus* LTH	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	43 59	58 37	>300	>300	>300	32 58	>300	>300
$1:10^5$	23 28	47 42	150 34	114 100	47 98	17 9	>300	>300
$1:10^6$	4 2	4 3	22 15	17 11	0	0	32 58	47 71

ระดับความเจือจาง	*Enterococcus faecalis* JCM		*Psuedomonas sp.*		*Salmonella agona*		*Salmonella derby*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	202 187	269 153	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	10 19	22 24	133 119	96 88	140 120	100 56	99 29	66 27
$1:10^6$	4 2	10 1	12 14	2 0	29 15	15 18	8 10	2 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Staphylococcus aureus* ATCC		*Salmonella enteridis*		*Salmonella typhi*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	156	>300	261	264	290
		141		186	284	374
$1:10^5$	59	14	102	99	45	64
	84	12	80	37	57	127
$1:10^6$	7	2	7	3	2	8
	6	2	10	4	4	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 3 แสดงจำนวนโคโลนีของเชื้อแบคทีเรียที่ตรวจนับได้หลังผ่านกระบวนการทำไลโอฟิไลซ์ที่ระยะเวลาการเก็บรักษา 8 เดือน

ระดับความเจือจาง	*Eacherichia coli* JCM		*Bacillus thuringenesis*		*Staphylococcus aureus*		*Salmonella tychina*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	91	25	>300	236	263	100	189	122
	81	21		187	166	141	77	24
$1:10^5$	5	4	37	64	30	23	19	5
	14	2	63	42	5	13	31	3
$1:10^6$	1	0	14	3	2	2	1	1
	1		2	6	3	2	0	1

ระดับความเจือจาง	*Acetobecter aeti* 103		*Acetobecte aceti* 102		*Acetobecte aceti* 354		*Sarcina luteus*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	308	59	29	10	187	45	>300	>300
	101	47	15	0	38	33		
$1:10^5$	130	9	4	1	45	12	>300	>300
	34	14	0	0	80	9		
$1:10^6$	13	1	1	2	3	1	99	68
	10	0	0	0	1	0	27	56

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Alcaligenes faecalis*		*Bacillus coagulant*		*Corynebacterium glutamicum*		*Bacillus sterotermophilus*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	>300	282 315	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	96 88	110 32	66 44	>300	193 104	83 106	122 137	75 111
$1:10^6$	13 0	0 20	5 9	15 194	28 6	11 16	14 8	2 9

ระดับความเจือจาง	*Escherichia coli*		*Micrococcus luteus*		*Salmonella derby*		*Salmonella hadar*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	41 42	65 32	159 156	32 48	230 100	127 138	>300 352	172 168
$1:10^5$	23 15	0 1	56 45	12 11	82 41	13 15	79 59	0 1
$1:10^6$	1 0	20 0	0 9	0	10 11	2 0	41 52	0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus subtilis*		*Proteus vulgalis*		*Salmonella wandaworth*		*Salmonella watterreden*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	37	12	120	163	247	202	>300	>300
	12	17	204	97	128	238		
$1:10^5$	6	2	25	12	18	39	310	94
	10	1	13	8	30	31	239	67
$1:10^6$	0	1	0	0	2	3	33	18
		0	1	3	0	5	26	16

ระดับความเจือจาง	*Salmonellla newport*		*Salmonella cerro*		*Salmonella carnosus*		*Bacillus subtilis* ATCC	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	>300	>300	>300	>300	103	>300	>300
						136		
$1:10^5$	167	74	123	71	52	7	296	>300
	113	108	169	53	70	11	120	
$1:10^6$	11	8	22	7	1	2	29	32
	6	16	11	1	3	0	22	38

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Bacillus megaterium*		*Salmonella anatum*		*Salmonellla lexington*		*Staphylococcus sureus* LTH	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	43 59	58 37	>300	>300	>300	32 58	>300	>300
$1:10^5$	23 28	47 42	150 34	114 100	47 98	17 9	>300	>300
$1:10^6$	4 2	4 3	22 15	17 11	0	0	32 58	47 71

ระดับความเจือจาง	*Enterococcus faecalis* JCM		*Psuedomonas sp.*		*Salmonella agona*		*Salmonella derby*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	202 187	269 153	>300	>300	>300	>300	>300	>300
$1:10^5$	10 19	22 24	133 119	96 88	140 120	100 56	99 29	66 27
$1:10^6$	4 2	10 1	12 14	2 0	29 15	15 18	8 10	2 0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ระดับความเจือจาง	*Staphylococcus aureus* ATCC		*Salmonella enteridis*		*Salmonella typhi*	
	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ	อุณหภูมิตู้เย็น	อุณหภูมิปรกติ
$1:10^4$	>300	156	>300	261	264	290
		141		186	284	374
$1:10^5$	59	14	102	99	45	64
	84	12	80	37	57	127
$1:10^6$	7	2	7	3	2	8
	6	2	10	4	4	7

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

การรายงานผลการตรวจนับด้วยวิธี Viable plate count

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การรายงานผลการตรวจนับด้วยวิธี Viable plate count

รายงานผลการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ต่อกรัมหรือต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างอาหารโดยคูณจำนวนที่นับได้ด้วยระดับความเจือจางที่ตรวจนับตามหลักที่จะกล่าวถึง ในกรณีที่จำนวนที่นับได้ในระดับการเจือจางนั้นเป็นตัวเลข สามหลัก ให้ปัดเลขหลักหน่วยขึ้นเป็นหลักสิบ ดดยอาศัยดดยใหลักการปัดเลขคณิตดังนี้

ตัวอย่างการรายงานผลการตรวนับจุลินทรีย์ในอาหาร

ตัวอย่างที่	จำนวนโคโลนีที่นับได้ ระดับความมเจือจาง			อัตราส่วนจำนวนโคโลนีจำนวนสูง/จำนวนต่ำ	ผลการตรวจนับโคโลนีต่อกรัม
	1:10	1:100	1:1000		
1	>300	175	16	-	19,000($1.9x10^4$)
		208	17		
		เฉลี่ย = 191.5			
2	>300	322	23	-	30,000($3.0x10^4$)
		278	29		
		เฉลี่ย = 300			
3	>300	291	32	1.3	32,000($3.2x10^4$)
		250	40		
		เฉลี่ย = 207.5	เฉลี่ย = 36		
		เฉลี่ย = 31525			
4	>300	281	40	1.1	33,000($3.3x10^4$)
		378	24		
		เฉลี่ย = 329.5	เฉลี่ย = 32		
		เฉลี่ย = 32475			
5	>300	138	42	2.4	15,000($1.5x10^4$)
		162	30		
		เฉลี่ย = 191.5	เฉลี่ย = 191.5		
		15000			
6	0	0	0	-	>10
7	18	2	0	-	>30x10

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลักการรายงานผลการตรวจนับโดยวิธี Viable plate count

1. การตรวจนับที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง30-300 โคโลนี ทุกซ้ำหรือไม่น้อยกว่าครึ่งหนึ่งของจำนวนซ้ำที่ระดับความเจือจางเท่ากัน ให้หาค่าเฉลี่ยของจำนวนที่ตรวจนับๆได้ของทุกซ้ำที่ระดับความเจือจางนั้น (ตัวอย่างที่ 1 และ 2)
2. การตรวจนับซึ่งมีโคโลนีเกิดขึ้นระหว่าง 30-300 โคโลนีที่ระดับความเจือจาง 2 ระดับติดกันโดยที่ในแต่ละระดับมีเพียงบางซ้ำหรือทุกซ้ำที่นับจำนวนได้ในช่วงดังกล่าว และจำนวนเฉลี่ยของทุกซ้ำในระดับการเจือจางที่ให้การตรวจนับได้ค่าต่ำ ให้หาค่าเฉลี่ยของจำนวนทั่บได้ของทุกซ้ำ ทั้งสองระดับความเจือจาง (ตัวอย่างที่ 3 และ 4)
3. การตรวจนับที่มีโคโลนีเกิดขึ้นระหว่าง 30-300 โคโลนีที่ระดับความเจือจาง 2ระดับติดกัน และในแต่ละระดับนับจำนวนได้ในช่งดักล่าวทุกซ์ แต่แตกต่างกันไม่เกิน 2 เท่า [อัตราส่วนจำนวนโคโลนี(จำนวนสูง/จำนวนต่ำ)มีค่าน้อยกว่า 2] ให้หาค่าเฉลี่ยทั้ง 4 ซ้ำ (ตัวอย่างที่ 3)
4. ในการตรวจนับครั้งใดก็ตามที่ไม่มีโคโลนีเกิดขึ้นในจานใดจานหนึ่งโดยที่ได้ใช้ตัวอย่างระดับความเจือจางต่ำที่สุดแล้ว(ตัวอย่างที่เป็นอาหารแข็ง)หรือใช้ตัวอย่างที่ไม่ได้เจือจาง(ตัวอย่างที่เป็นอาหารเหลว) ให้รายงานผลว่าอาหารนั้นมีจุลินทรีย์อยู่น้อยกว่าตัวเลขของระดับความเจือจางต่ำที่สุดที่ตรวจนับหรือต่ำกว่า 1 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (ตัวอย่าที่ 6)
5. การตรวจนับที่มีโคโลนีเกิดขึ้นระหว่าง 1-20 โคโลนี ในตัวอย่างที่ระดับความเจือจางต่ำสุด ให้รายงานผลว่ามีจำนวนจุลินทรีย์น้อยกว่า 30 x ระดับความเจือจงตุ่ด (ตัวอย่างที่7)
6. ในกรณีที่มีโคโลนีแผ่ลาม (spreader) เกิดขึ้นถ้าการแผ่ลามนั้นไม่ถึงครึ่งหนึ่งของจานเพาะเชื้อ ให้นับโคโลนีที่แผ่ลาม เป็น 1 และนับจำนวนโคโลนีที่เกิดขึ้นทั้งในและนอกบริเวณการแผ่ลาม

- มี 1 ซ้ำของ 1 ระดับการเจือางอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ให้ใช้ค่าเฉลี่ยของทั้ง 2 ซ้ำที่ระดับการเจือจางอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีนั้น
- มี 1 ซ้ำของ 2 ระดับการเจือางอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนี ให้ใช้ค่าเฉลี่ยของทั้ง 4 ซ้ำ ผตัวอย่างที่ 5)
- กรณีที่จำนวนโคโลนีของทั้ง 2 ระดับการเจือจางอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีทั้งคู่ แต่แตกต่างกันไม่เกิน 2 เท่า [อัตราส่วนจำนวนโคโลนี(จำนวนสูง/จำนวนต่ำ)มีค่าน้อยกว่า 2] ให้ใช้ค่าเฉลี่ยทั้ง 4 ซ้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กรณีที่จำนวนโคโลนีของทั้ง 2 ระดับการเจือจางอยู่ในช่วง 30-300 โคโลนีทั้งคู่ แต่แตกต่างกันตั้งแต่ 2 เท่าขึ้นไป [อัตราส่วนจำนวนโคโลนี(จำนวนสูง/จำนวนต่ำ)มีค่าเท่ากับหรือมากกว่า 2] ให้ใช้ค่าเฉลี่ยของ 2 ซ้ำ ของระดับการเจือจางที่เมื่อคูณด้วย dilution facter แล้วมีค่าน้อยกว่า (ตัวอย่างที่ 5)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 4 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิปรกติ (33 ±3 องศาเซลเซียส)

ลำดับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL	จำนวนเซลล์ (CFU/ml) × 10^7 ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์ 0 เดือน	หลังไลโอฟิไลซ์ 4 เดือน	หลังไลโอฟิไลซ์ 8 เดือน	% การรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์ 0 เดือน	% การรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์ 4 เดือน	% การรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์ 8 เดือน
1	*A . aceti 102*	1001	2.390	0.240	0.030	0.030	10.042	-	-
2	*A . aceti 103*	1002	2.920	1.140	0.110	0.053	39.041	3.767	1.815
3	*A . aceti 354*	1003	3.420	0.430	0.031	0.049	12.573	8.801	1.433
4	*Al .faecalis*	1004	3.850	3.170	1.150	0.710	82.338	29.870	18.442
5	*B . coagulant*	1006	2.320	0.228	0.100	0.040	9.828	4.289	1.724
6	*B . megaterium*	1007	0.830	0.123	0.077	0.029	14.819	9.277	3.494
7	*B . sterotermophilus*	1008	3.200	2.650	1.580	0.930	82.813	49.375	29.063
8	*B . subtilis*	1009	0.284	0.055	0.030	0.030	19.366	-	-
9	*B . subtilis 6633*	1010	4.850	4.200	3.500	3.204	86.598	72.000	66.062
10	*B . thuringiensis*	1011	26.000	3.350	1.500	0.210	12.885	5.769	0.808
11	*C . glutamicum*	1013	18.800	1.120	1.030	0.950	5.957	5.479	5.053
12	*E . coli*	1014	2.950	2.590	0.079	0.049	87.797	2.678	1.661
13	*E . coli JCM*	1015	20.700	1.290	0.229	0.030	6.232	1.106	-
14	*En . faecalis JCM*	1017	1.340	1.060	0.720	0.220	79.104	53.731	16.418
15	*M . luteus 884*	1026	1.950	1.300	0.250	0.170	66.667	12.821	8.718
16	*P . vulgalis 100*	1019	34.500	0.620	0.130	0.064	1.797	0.377	0.186
17	*Pseudomonas sp.*	1020	1.360	1.310	0.920	0.030	96.324	67.650	-
18	*S . agona SH3463*	1021	1.440	1.400	0.780	0.232	97.222	54.670	16.111
19	*S . anatum SO8605*	1022	10.600	1.260	1.100	0.239	11.887	10.377	2.255
20	*S . cerro*	1023	5.050	1.670	0.620	0.342	33.069	12.277	6.772
21	*S . derby SH3407*	1024	1.200	0.925	0.820	0.130	77.083	68.230	10.833
22	*S . enteridis*	1025	28.300	1.770	0.194	0.600	6.254	0.686	2.120
23	*S . hadar*	1018	1.500	0.915	0.520	0.170	61.000	34.667	11.333

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

าดับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL	จำนวนเซลล์ (CFU/ml) × 10^7				% การรอดชีวิตหลัง ไลโอฟิไลซ์		
			ก่อน ไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์ 0 เดือน	4 เดือน	8 เดือน	0 เดือน	4 เดือน	8เดือน
24	*S . lexington*	1027	18.300	0.605	0.045	0.037	3.306	0.246	0.202
25	*S .newport*	1028	32.500	1.390	0.910	0.320	4.277	2.800	0.985
26	*S . tychina*	1029	15.200	1.070	0.322	0.073	7.039	2.118	0.480
27	*S . typhi*	1030	17.900	0.780	0.330	0.250	4.358	1.844	1.397
28	*S . wandawort*	1031	18.900	1.790	0.290	0.155	9.471	1.534	0.820
29	*S . watterreden*	1032	23.500	3.150	0.810	0.600	13.404	3.447	2.553
30	*S . luteus*	1033	24.000	9.800	7.900	6.200	40.833	32.910	25.830
31	*St . aureus*	1034	13.300	11.800	0.150	0.120	88.722	1.128	0.902
32	*S . canosus*	1036	5.600	0.620	0.120	0.084	11.071	2.143	1.500
33	*St . aureus LTH*	1037	25.700	9.200	5.900	2.130	35.798	22.957	8.288
34	*S . derby*	1038	1.510	1.060	0.030	0.470	70.199	-	31.126
35	*St . aureus*	1039	17.000	1.310	0.150	0.540	7.706	3.176	0.882

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางภาคผนวกที่ 5 แสดงจำนวนเชื้อแบคทีเรียที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิตู้เย็น (4 ±2 องศาเซลเซียส)

ลำดับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL	จำนวนเซลล์ (CFU/ml) × 10^7				% การรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์		
			ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์					
				0 เดือน	4 เดือน	8 เดือน	0 เดือน	4 เดือน	8 เดือน
1	*A . aceti 102*	1001	2.390	0.240	0.060	0.030	10.042	4.142	2.510
2	*A . aceti 103*	1002	2.920	1.140	0.620	0.202	39.041	21.233	6.918
3	*A . aceti 354*	1003	3.420	0.430	0.400	0.113	12.573	11.696	3.304
4	*Al .faecalis*	1004	3.850	3.170	2.300	0.315	82.338	59.740	8.182
5	*B . coagulant*	1006	2.320	0.228	0.221	0.160	9.828	9.526	6.897
6	*B . megaterium*	1007	0.830	0.123	0.051	0.034	14.819	6.145	4.096
7	*B .sterotermophilus*	1008	3.200	2.650	1.620	1.300	82.813	50.625	40.625
8	*B . subtilis*	1009	0.284	0.055	0.025	0.030	19.366	8.803	-
9	*B . subtilis 6633*	1010	4.850	4.200	2.100	0.272	86.598	43.300	5.608
10	*B . thuringiensis*	1011	26.000	3.350	1.750	0.500	12.885	6.731	1.923
11	*C . glutamicum*	1013	18.800	1.120	0.410	0.150	5.957	2.181	0.798
12	*E . coli*	1014	2.950	2.590	0.080	0.042	87.797	2.712	1.424
13	*E . coli JCM*	1015	20.700	1.290	0.060	0.086	6.232	0.290	0.415
14	*En . faecalis JCM*	1017	1.340	1.060	0.240	0.195	79.104	17.910	14.552
15	*M . luteus 884*	1026	1.950	1.300	0.980	0.420	66.667	50.256	21.538
16	*P . vulgalis 100*	1019	34.500	0.620	0.160	0.086	1.797	0.464	0.249
17	*Pseudomonas sp.*	1020	1.360	1.310	1.260	1.080	96.324	92.650	79.410
18	*S . agona SH3463*	1021	1.440	1.300	1.300	0.630	97.222	90.280	43.750
19	*S . anatum SO8605*	1022	10.600	1.260	0.920	0.113	11.887	8.679	1.066
20	*S . cerro*	1023	5.050	1.670	1.460	1.220	33.069	28.911	24.158
21	*S . derby SH3407*	1024	1.200	0.925	0.670	0.170	77.083	55.830	14.167

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

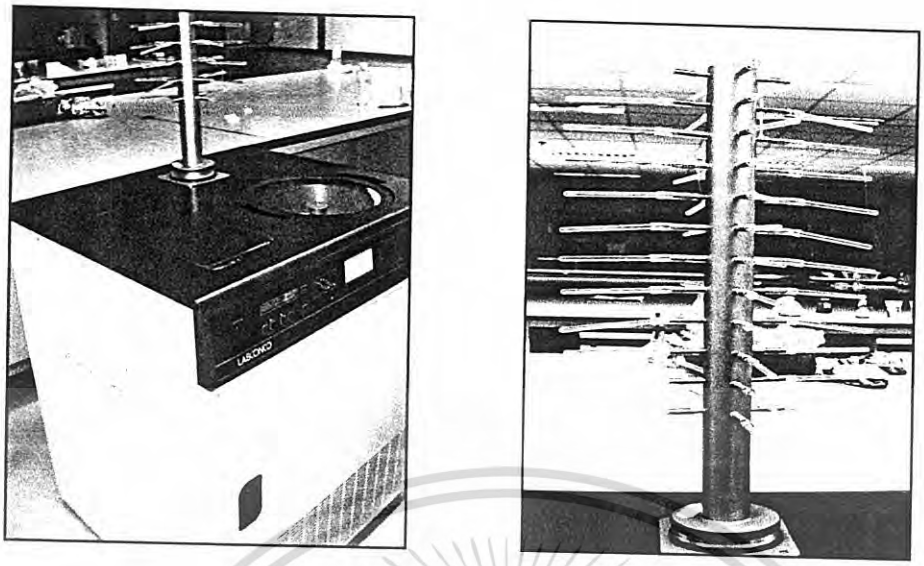
จับ	แบคทีเรีย	รหัส AIKL	จำนวนเซลล์ (CFU/ml) × 10^7				% การรอดชีวิตหลังไลโอฟิไลซ์		
			ก่อนไลโอฟิไลซ์	หลังไลโอฟิไลซ์					
				0 เดือน	4 เดือน	8 เดือน	0 เดือน	4 เดือน	8เดือน
2	*S . enteridis*	1025	28.300	1.770	0.910	0.010	6.254	3.216	0.036
3	*S . hadar*	1018	1.500	0.915	0.890	0.690	61.000	59.330	46.000
4	*S . lexington*	1027	18.300	0.605	0.190	0.118	3.306	1.038	0.645
5	*S .newport*	1028	32.500	1.390	0.724	0.546	4.277	2.228	1.680
6	*S . tychina*	1029	15.200	1.070	0.430	0.113	7.039	2.829	0.743
7	*S . typhi*	1030	17.900	0.780	0.390	0.264	4.358	2.179	1.475
8	*S . wandawort*	1031	18.900	1.790	0.188	0.070	9.471	0.995	0.370
9	*S . watterreden*	1032	23.500	3.150	2.350	1.030	13.404	10.000	4.383
0	*S . luteus*	1033	24.000	9.800	8.900	6.300	40.833	37.083	26.250
1	*St . aureus*	1034	13.300	11.800	0.815	0.194	88.722	6.128	1.459
2	*S . canosus*	1036	5.600	0.620	0.610	0.341	11.071	10.893	6.089
3	*St . aureus LTH*	1037	25.700	9.200	4.500	3.420	35.798	17.510	13.307
4	*S . derby*	1038	1.510	1.060	0.640	0.390	70.199	42.384	25.828
5	*St . aureus*	1039	17.000	1.310	0.713	0.410	7.706	4.194	2.412

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

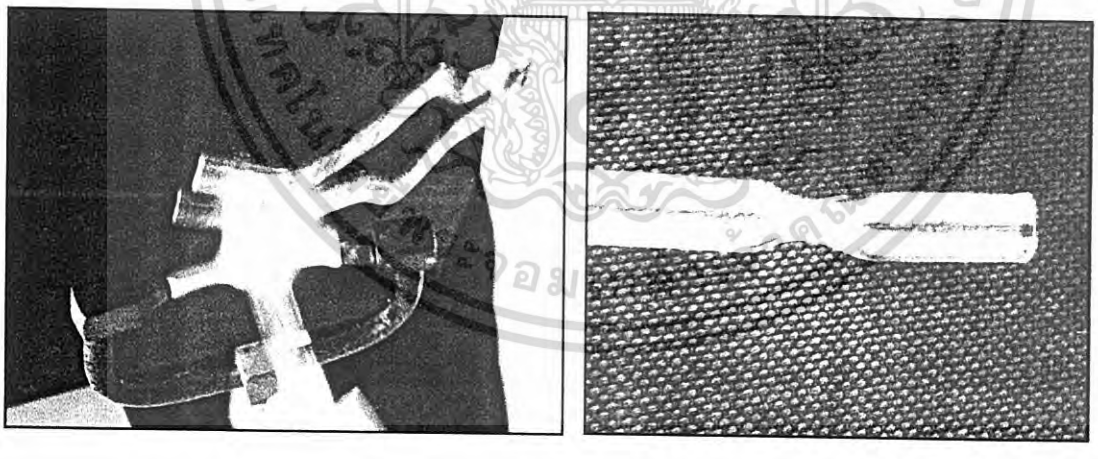
ภาคผนวก ง

ภาพแสดงการทำไลโอฟิไลซ์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

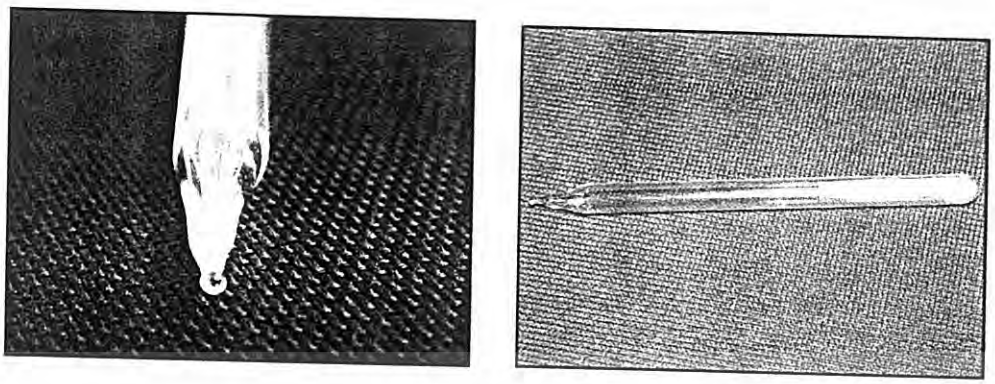


ภาพผนวกที่ 1 แสดงเครื่องไลโอฟิไลซ์

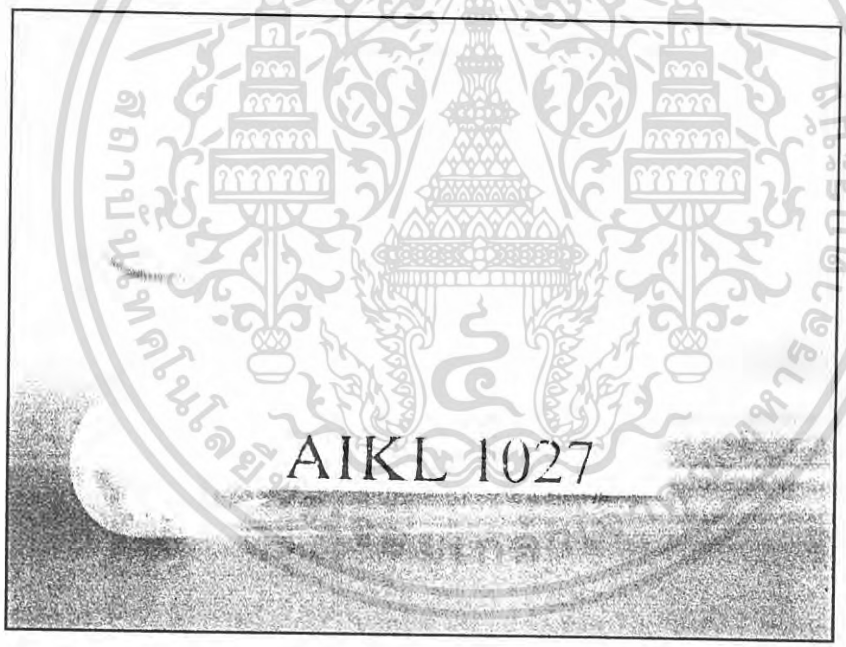


ภาพผนวกที่ 2 แสดงการคอดหลอด และหลอด ampoule ที่คอดเสร็จแล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

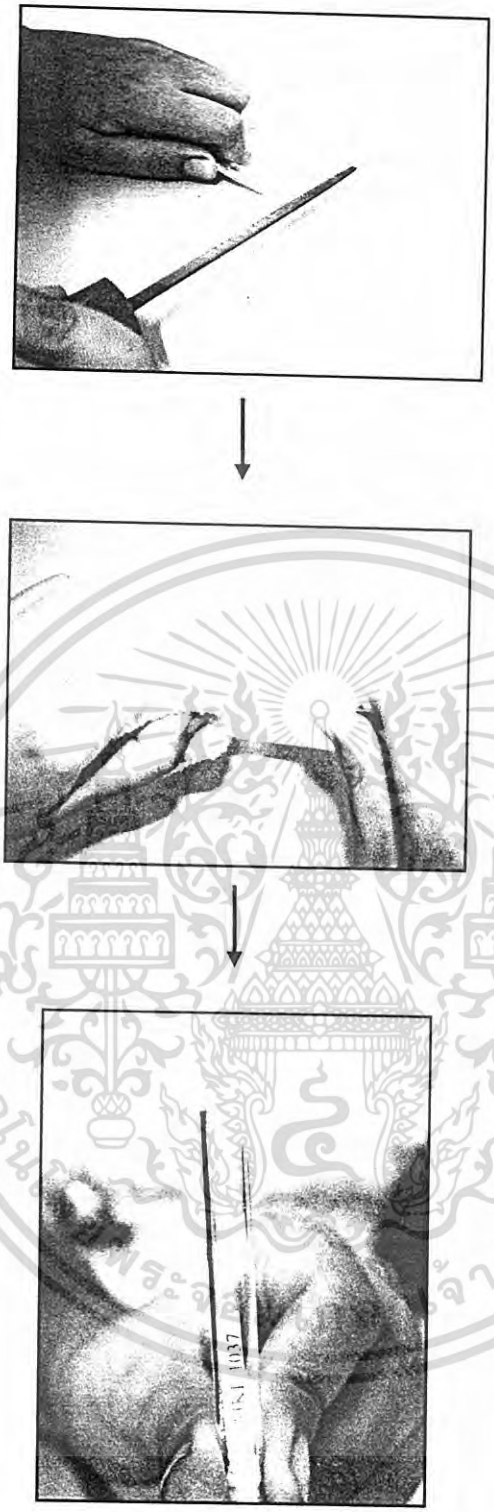


ภาพผนวกที่ 3 แสดงหลอด (ampoule) ที่ทำการปิดปลายหลอดแล้ว



ภาพผนวกที่ 4 แสดงลักษณะของเชื้อแบคทีเรียที่บรรจุอยู่ในหลอด (ampoule) หลังผ่านการไลโอฟิไลซ์แล้ว

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพผนวกที่ 5 แสดงการตัดหลอด (ampoule) เมื่อต้องการนำเชื้อแบคทีเรียออกมาทำการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ประวัติผู้เขียน

นายเกรียงไกร ทองก้อน เกิดวันที่ 7 กันยายน พ.ศ. 2526 จังหวัดเชียงใหม่ สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนยุพราชวิทยาลัย จังหวัดเชียงใหม่ พ.ศ. 2545 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

นางสาวจุฑามาศ สุขเหมือน เกิดวันที่ 3 มกราคม พ.ศ. 2527 กรุงเทพฯ สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนนวมินทราชูทิศ กรุงเทพมหานคร พ.ศ. 2545 ปัจจุบันศึกษาอยู่ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

นาย นายวีระพงศ์ วิรุฬห์ธนกฤษณ์ เกิดวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ. 2526 จังหวัดกาญจนบุรี สำเร็จการศึกษามัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนท่าม่วงราษฎร์บำรุง จังหวัดกาญจนบุรี พ.ศ. 2545 ปัจจุบันศึกษาอยู่ ภาควิชาอุตสาหกรรมเกษตร โครงการคณะอุตสาหกรรมเกษตร สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง ระดับปริญญาตรีหลักสูตรวิทยาศาสตร์ (สาขาวิชาเทคโนโลยีการหมัก)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้