

# ศึกษาการมีชีวิตรอดของเชื้อจุลินทรีย์ดิน หลังจากการเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็งแห้ง

## Study on the Survival of Soil-Microorganisms after Maintenance by Freeze-Drying

สมใจ ปฎิยuth<sup>1</sup>  
Somchai Patiyuth<sup>1</sup>

### ABSTRACT

Soil Microorganisms;  $N_2$  - fixing bacteria, Bradyrhizobium and Azospirillum were maintained by freeze-drying or lyophilization method. The viability and stability of bacteria were checked. The results showed that number of rhizobia maintained constant after stored 6 months and 1 year and 2 years. For the stability of cultures, the results showed no significant difference of cultures maintained in ampoules or in agar tubes for 6 months and also no significant difference of 2 cultures stored 1 year.

**Key words:** soil microorganisms, freeze-drying, lyophilization

### บทคัดย่อ

ได้ดำเนินการจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์ดิน คือ เชื้อไรโซเบียมและอโซสไปริลลัม (จุลินทรีย์ตรึงไนโตรเจน) โดยวิธีแช่แข็ง (freeze-drying หรือ lyophilization) และได้ตรวจสอบการมีชีวิตของเชื้อไรโซเบียม และประสิทธิภาพ (stability) ของเชื้อโดยการใส่เชื้อกับต้นพืชในกระถาง ผลการดำเนินการนับปริมาณเชื้อไรโซเบียม 5 สายพันธุ์ที่ระยะ 6 เดือน 1 ปี และ 2 ปี พบว่าเชื้อมีปริมาณค่อนข้างคงที่ตลอดระยะเวลาการดำเนินการสำหรับประสิทธิภาพของเชื้อไรโซเบียมที่ระยะ 6 เดือน ของเชื้อไรโซเบียม 4 สายพันธุ์ พบว่า การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีแช่แข็งแห้ง ไม่มีความแตกต่างกับที่รักษาในหลอดอาหารวุ้น (ในตู้เย็น) และที่ระยะ 1 ปี สำหรับเชื้อ 2 สายพันธุ์ ก็ไม่พบความแตกต่างเช่นเดียวกัน

คำหลัก : เชื้อจุลินทรีย์ดิน การแช่แข็งแห้ง

### คำนำ

การจัดเก็บเชื้อจุลินทรีย์โดยทั่วไปกระทำโดยการจัดเก็บในหลอดอาหาร แล้วเก็บหลอดอาหารไว้ในตู้เย็น วิธีการนี้ทำให้ต้องถ่ายแยกเชื้อจากหลอดหนึ่งไปยังอีกหลอดหนึ่งอยู่เป็นประจำ แต่วิธีการเก็บเชื้อจุลินทรีย์โดยวิธีแช่แข็งแห้งนั้น (freeze-drying) สามารถเก็บรักษาไว้ได้เป็นเวลานานหลายปี ทั้งยังเหมาะสมกับจุลินทรีย์หลายชนิด ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย ยีสต์ และรา นอกจากนี้ยังเหมาะสมกับจุลินทรีย์ซึ่งเก็บรักษาได้ยากหลายชนิด อาทิเช่น nitrogen-fixing bacteria ซึ่งได้แก่ Azospirillum Azotobacter และ Rhizobium เป็นต้น (Malik, 1992)

วิธีการนี้เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับงานด้านการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ เพราะสามารถรักษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมของเชื้อพันธุ์ไว้ได้คงเดิม แม้ว่าจะเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลาเวลานาน (วันเชิญ, 2530) จึงได้ดำเนินการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์

<sup>1</sup>กองปรุทธิวิทยา กรมวิชาการเกษตร จตุจักร กรุงเทพฯ 10900  
Soil Science Division, Department of Agriculture, Chatuchak, Bangkok 10900

จุลินทรีย์ดินโดยวิธีแช่แข็งเพื่อประโยชน์ในการเก็บรักษาเชื้อพันธุ์ไว้ สำหรับการผลิตเชื้อ และการศึกษาวิจัยต่อไป

## อุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมหลอด ampoules สำหรับใส่เชื้อ ล้างทำความสะอาด อบแห้ง และใช้กระดาษกรอง ฟิมพ์ห่อเชื้อใส่ลงในหลอดปิดด้วยจุกสำลีหุ้มด้วยแผ่นอลูมิเนียมหนึ่งฆ่าเชื้อ

2. เตรียม suspending medium ในที่นี้ใช้ skim milk 10% เตรียม skim milk 10% หนึ่งฆ่าเชื้อที่ 110 °ซ. 10 นาที นาน 2 วันติดต่อกัน เก็บไว้ในตู้เย็น

3. บรรจุเชื้อลงในหลอด ampoules ที่เลี้ยงไว้ในหลอดอาหารวัน ละลายเชื้อด้วย skim milk แล้วถ่ายลงหลอด ampoules จำนวนหลอดละ 0.2 มิลลิลิตร เชื้อละ 12 หลอด จากนั้นนำไปเข้าเครื่อง spin-dry ปั่นนาน 15 นาที จึงหยุดเครื่องหมุนเหวี่ยงแต่ยังคงเปิด vacuum ดูดอากาศออกนาน 2-3 ชั่วโมง

4. การทำ constriction และ vacuum นำหลอด ampoules ที่ทำ freeze-dry เสร็จแล้วมายึดหลอดแล้วเสียบเข้ากับแป้น amnifold ให้แน่น ทำการดูดอากาศออกนานประมาณ 1 ชั่วโมง จึงใช้ไฟลนปิดหลอด

5. การทดสอบสภาพสุญญากาศของหลอด ampoules นำ ampoules ที่ซีลแล้วมาทดสอบสภาพสุญญากาศ โดยใช้เครื่อง vacuum tester หลอดที่อยู่ในสภาพสุญญากาศจะเกิดประกายสีม่วงกับเครื่องทดสอบ ส่วนหลอดที่ไม่เกิดประกายแสดงว่าไม่อยู่ในสภาพสุญญากาศ ต้องคัดทิ้ง

ampoules ที่ผ่านการทดสอบแล้วนำไปเก็บรักษาในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 4°ซ. เพื่อนำไปผลิตเชื้อหรือศึกษาวิจัยในเวลาต่อไป

6. การตรวจ Viability และ Stability (Malik, 1992) ทำการตรวจสอบการมีชีวิตของจุลินทรีย์ 3 ระยะ คือ ก่อนและหลังการทำ freeze-dry และหลังจากเก็บรักษา ตรวจสอบโดยนำ ampoules ออกมาเลี้ยงตรงปลายออกแล้วละลายด้วยอาหารเหลว (0.8 มล.) incubate ไว้ที่อุณหภูมิ 24 ชั่วโมง แล้วจึงทำ

dilution series (ใช้อาหาร YMB แทนน้ำกลั่น) จากนั้นใช้ 0.1 มิลลิลิตร จากแต่ละ dilution มา spread บนเพลทอาหาร นับปริมาณโคโลนีที่ปรากฏ พร้อมทั้งจดบันทึกลักษณะโคโลนี หรือสิ่งเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น

หลังจากเก็บรักษาไว้เป็นระยะเวลาสมควรจะนำ freeze-dried ampoules ออกมาตรวจสอบ viability และ stability ทุกระยะ 1 ปี 5 ปี และ 10 ปี โดยวิธีการที่กล่าวแล้วข้างต้น

สำหรับ stability นั้น กระทำโดยวิธี plant infection count (MPN) หรือปลูกพืชใน Leonard jar ในน้ำยา แล้วตรวจสอบการเกิดปม และการเจริญเติบโตของพืช โดย inoculate เชื้อ 1 มิลลิลิตร ลงบน host แต่ละขวดในอัตรา 10 ขวด/เชื้อ และวิเคราะห์ข้อมูลโดย Pair-comparison

## ผลการทดลองและวิจารณ์

ผลการดำเนินการ Table 1 แสดงสายพันธุ์และจำนวนเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ดินที่ได้ทำการเก็บรักษาโดยวิธีการแช่แข็งแห้ง (freeze-drying) โดยวิธีการนี้สามารถคงรักษาคุณสมบัติต่างๆ ของจุลินทรีย์ไว้ได้ (Malik, 1992) แม้แต่เชื้อที่เก็บรักษาจาก Table 1 แสดงเชื้อไรโซเบียมที่เก็บรักษาไว้โดยวิธีแช่แข็งแห้งจำนวน 10 สายพันธุ์ รวม 120 หลอด และ Azospirillum และ Azotobacter อย่างละ 2 สายพันธุ์ และกำหนดจะต้องมีการเก็บรักษาเชื้อไรโซเบียมและเชื้อพันธุ์จุลินทรีย์ดินชนิดอื่นๆ อีก เช่น Azotobacter Azospirillum สาหร่าย และอื่นๆ

ผลการตรวจสอบ viability ของเชื้อไรโซเบียมที่เก็บรักษาไว้ในหลอด ampoules ในตู้เย็นนาน 6 เดือน และ 1 ปี (Table 3) ข้อมูลจากตารางแสดงว่าปริมาณเชื้อไรโซเบียม ทั้ง 4 สายพันธุ์ที่นับได้ที่ระยะ 6 เดือนนี้ยังคงมีค่าสูงคือประมาณ  $10^7 - 10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร

ปริมาณเชื้อที่ระยะ 1 ปีของสายพันธุ์ USDA 110 และ USDA 122 มีค่าเท่ากับ  $1.67 \times 10^7$  และ  $1.0 \times 10^7$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ที่ระยะนี้ปริมาณลดลงไปจากที่ระยะ 6 เดือน ( $10^8$ ) การลดลง

**Table 1. Stock culture of N<sub>2</sub>-fixing bacteria (12 ampoules) maintenance by freeze-drying or lyophilization.**

Culture	Strain	Month/year freeze-dried
Bradyrhizobium	USDA 110	8/94
Bradyrhizobium	USDA 122	8/94
Bradyrhizobium	THA 6	4/95
Bradyrhizobium	THA 301	5/95
Bradyrhizobium	THA 2	5/95
Bradyrhizobium	THA 305	6/95
Bradyrhizobium	CJ1 pGC91.14	7/95
Bradyrhizobium	8-0	12/95
Bradyrhizobium	8-T	12/95
Bradyrhizobium	TAL 377	3/96
Azospirillum	Ac.-1	7/95
Azospirillum	Av.-1	7/95
Azospirillum	Ab.-1	7/95
Azospirillum	Ab.-2	7/95

**Table 2. Survival of rhizobia after storage by freeze-drying.**

Culture	Number of cells/ml			
	1 day	6 months	1 year	2 years
USDA 110	-	3.3 x 10 <sup>8</sup>	1.67 x 10 <sup>7</sup>	2.32 x 10 <sup>8</sup>
USDA 122	-	1.0 x 10 <sup>8</sup>	1.0 x 10 <sup>7</sup>	4.5 x 10 <sup>8</sup>
THA 6	2.7 x 10 <sup>8</sup>	2.0 x 10 <sup>7</sup>	-	1.6 x 10 <sup>8</sup>
THA 301	4.1 x 10 <sup>8</sup>	1.34 x 10 <sup>7</sup>	-	2.8 x 10 <sup>8</sup>
THA 2	7.2 x 10 <sup>8</sup>	4.2 x 10 <sup>8</sup>	-	1.7 x 10 <sup>8</sup>

**Table 3. Growth and nodulation of culture after maintenance by freeze-drying**

	Culture	Nodules/bottle*	Nodule dry wt. g/bottle	Plant dry wt. g/bottle
6 months	USDA 110 (ampoule)	40.7	0.14	1.72
	(agar)	34.2	0.11	1.55
	t-test	-	-	0.95 <sup>ns</sup>
	USDA 122 (ampoule)	37.9	0.15	1.59
	(agar)	40.9	0.16	1.62
	t-test	-	-	1.04 <sup>ns</sup>
	THA-6 (ampoule)	37.0	0.29	3.13
	(agar)	41.2	0.27	2.94
	t-test	-	-	1.06 <sup>ns</sup>
	THA-301 (ampoule)	86.1	0.08	1.40
	(agar)	75.7	0.06	1.22
	t-test	-	-	0.78 <sup>ns</sup>
1 year	USDA 110	64.2	0.17	2.58
	USDA 122	76.4	0.24	2.71
	Check	1.0	0.001	-

\* average of 10 replicates

ของปริมาณเชื้อเนื่องจากขบวนการทำ freezing และ drying ทำให้เกิดการสูญเสียน้ำภายในเซลล์ (molecular water) การ rapid freezing ทำให้เซลล์หดตัวและน้ำภายในเซลล์แข็งตัวทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง ซึ่งมักจะเกิดกับ aerobic microbes มากกว่า nonaerobic microbes (Souza, 1992) และขบวนการ drying ทำให้เกิดการสูญเสีย viability เพราะ over drying ซึ่งสามารถป้องกันได้โดย 1) เตรียมตัวอย่างเชื้อให้บางที่สุดเพื่อให้พื้นที่ผิวมากและ 2) drying ที่ระดับ vacuum ปานกลางและอุณหภูมิสูงพอสมควร (ทั้งนี้จะต้องไม่เกิด melting)

ปริมาณเชื้อของทั้ง 5 สายพันธุ์ที่ระยะ 2 ปี มีปริมาณเท่ากับระยะเริ่มต้นคือประมาณ  $10^8$  เซลล์ต่อมิลลิลิตร แสดงว่าเชื้อไรโซเบียมยังคงสามารถมีชีวิตรอดจนถึงระยะ 2 ปี ปริมาณเชื้อไม่ลดลง ปริมาณเชื้อที่ลดลงที่ระยะ 1 ปี เป็นเพราะเทคนิคดำเนินการมากกว่าไม่ใช่เพราะ viability ของเชื้อไรโซเบียมลดลง

Malik (1992) ได้ทดลองใช้เครื่องมืออย่างง่าย ๆ ในการทำ freeze-drying โดยไม่ต้องใช้เครื่องมือราคาแพง และได้อธิบายถึงขั้นตอนต่างๆ ในการทำ

และรายงานว่าการเก็บจุลินทรีย์ยังคงมีชีวิตอยู่ได้นาน 4-5 ปี ในหลอดเปิด ที่เก็บรักษาไว้ที่  $-30^{\circ}\text{C}$ .

Lapage *et al.* (1970) ได้อธิบายถึงความสำคัญของขั้นตอนต่างๆ ในการทำ freeze-drying อย่างละเอียดและกล่าวถึงการเก็บรักษาหลอด ampoule ว่าควรที่จะเก็บรักษาไว้ที่  $4^{\circ}\text{C}$ . ในที่มีด การดำเนินการครั้งนี้ได้เก็บรักษาเชื้อไว้ในหลอดปิดในช่องแช่แข็ง ( $4^{\circ}\text{C}$ .) เช่นเดียวกัน

### สรุปผลการทดลอง

ได้ทำการเลี้ยงเชื้อไรโซเบียม และจุลินทรีย์ดินชนิดอื่น และทำการเก็บรักษาไว้โดยวิธีแช่แข็ง (freeze-dry หรือ lyophilization) ไว้แล้วจำนวน 14 สายพันธุ์ (สำหรับปี พ.ศ. 2539) การตรวจสอบ viability พบว่าปริมาณเชื้อไรโซเบียม 5 สายพันธุ์มีค่าค่อนข้างคงที่สำหรับประสิทธิภาพของเชื้อ (stability) ที่ได้ตรวจสอบที่ระยะ 6 เดือน จำนวน 4 สายพันธุ์ และที่ระยะ 1 ปี จำนวน 2 สายพันธุ์ พบว่า ไม่มีความแตกต่างจากเชื้อที่เก็บรักษาไว้ในหลอดอาหาร

### เอกสารอ้างอิง

วันเชิญ แดงสุภา. 2530. การจัดเก็บจุลินทรีย์ โดยวิธี Lyophilization. ใน เอกสารเผยแพร่ของศูนย์เก็บรักษาและรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แห่งภาคพื้นเอเชียอาคเนย์ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย กรุงเทพฯ. 10 หน้า.

Lapage, S.P. J.E. Shelton, T.G. Mitchell and A.R. Mackenzie 1970. Freeze-Drying in Method in Microbiology. Aca-

demic Press, London and New York. 170-195.

Malik, K.A. 1992. Freeze - drying of microorganisms using a simple apparatus. World Journal of Microbiology and Biotechnology. 8: 76-79.

Souza, H. 1992. Freeze-Drying of Microorganisms in Encyclopedia of Microbiology. Vol. 2:231 - 243.