8 ส.ค. 2542

รายงานโครงการฉบับสมบูรณ์

การจัดตั้งศูนย์เก็บจุลินทรีย์เฉพาะชนิด ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

(Establishment of Specialized Microbial Culture Collection at BIOTEC)

วันเชิญ โพธาเจริญ
นายทรงพล ผดุงพัฒน์
นางสาวสุวนีย์ ชุณหเมธา
นางสาวทิพย์ทิวา บุญเรือง
นายนธี แซ่ลี้

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช.
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ธันวาคม 2541

BRT 640005

รายงานโครงการฉบับสมบูรณ์

การจัดตั้งศูนย์เก็บจุลินทรีย์เฉพาะชนิด ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

(Establishment of Specialized Microbial Culture Collection at BIOTEC)

วันเชิญ โพธาเจริญ
นายทรงพล ผดุงพัฒน์
นางสาวสุวนีย์ ชุณหเมธา
นางสาวทิพย์ทิวา บุญเรือง
นายนธี แซ่ลี้

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช.
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

ธันวาคม 2541

คณะทำงาน

ที่ปรึษาโครงการ	ดร. มาลี สุวรรณอัตถ์
	ดร. สุทัศน์ ศรีวัฒนพงศ์
ผู้อำนวยการโครงการ	ดร. มรกต ตันติเจริญ
ผู้จัดการโครงการ	นางวันเชิญ โพธาเจริญ
ผู้เชี่ยวชาญการจำแนก	ดร. เลขา มาโนช (soil fungi)
	Dr. Nigel-Hywel Jones (insect pathogenic fungi)
ผู้ดำเนินงาน	นายทรงพล ผดุงพัฒน์
	นางสาวสุวนีย์ ชุณหเมธา
	นางสาวทิพย์ทิวา บุญเรือง
	นายนธี แซ่ลี้

กิตติกรรมประกาศ

คณะทำงานขอขอบคุณ หัวหน้าโครงการสำรวจชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ในประเทศ ที่ให้ความร่วมมือทั้งในด้านการนำสายพันธุ์มาฝากเก็บ การประสานงาน และข้อมูลจุลินทรีย์ ซึ่งจะเป็นประโยชน์ทั้งในงานวิจัย และการศึกษาของประเทศต่อไป และขอขอบคุณโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ที่ได้ให้การสนับสนุนด้านงบประมาณดำเนินการ

สารบัญเรื่อง

	หน้า
คณะทำงาน	ii
กิติกรรมประกาศ	iii
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
วัตถุประสงค์	2
เป้าหมาย	2
ตารางแผนงาน	3
ผลการดำเนินงาน	
1. การจัดเตรียมโครงสร้างพื้นฐาน	4
2. การรวบรวมและจัด เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์	6
3. การรวบรวมข้อมูล	6
4. การให้บริการ	7
5. การพัฒนาบุคลากร	7
6. งานวิจัย	7
7. การเสนอผลงานทางวิชาการ	7
8. อื่นๆ	7
9. สรุปผล / ข้อสังเกตุอื่นๆ	8
10. เอกสารอ้างอิง	8
11. ภาคผนวก	9

ภาคผนวก

		หน้า
ภาคผนวกที่ 1	หน้าที่และความรับผิดชอบของพนักงานประจำห้องปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์	9
ภาคผนวกที่ 2	ใบอนุญาตผลิตเชื้อโรคและพิษจากสัตว์	11
ภาคผนวกที่ 3	ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่รวบรวม	12
ภาคผนวกที่ 4	แผนผังระบบงาน เก็บรักษา จุลินทรีย์	15
ภาคผนวกที่ 5	คู่มือวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี Lyophilization	16
ภาคผนวกที่ 5-1	คู่มือวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี แช่แข็ง	23
ภาคผนวกที่ 6	แบบฟอร์มบันทึกชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ในคลังเก็บเชื้อ	28
ภาคผนวกที่ 7	ชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตหลังการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ –80°ซ	29
ภาคผนวกที่ 8	แบบฟอร์มการรับฝากเก็บ จุลินทรีย์	30
ภาคผนวกที่ 9	บัญชีรายชื่อ จุลินทรีย์ สำหรับใช้ภายในหน่วยปฏิบัติการวิจัย ศช.	31
ภาคผนวกที่ 10	BIOTEC Culture Collection Homepage	32
ภาคผนวกที่ 11	การจัดฝึกอบรม	37
ภาคผนวกที่ 12	การเสนอผลงานทางวิชาการ	39

บทคัดย่อ

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะชนิด (BIOTEC Culture Collection) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ได้ก่อตั้งอย่างเป็นทางการในปีพ.ศ.2539 วัตถุประสงค์หลักของโครงการคือ ให้บริการนักวิจัยที่ต้องการเก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างปลอดภัย, เก็บรักษาและดูแลจุลินทรีย์ที่แยกได้ในประเทศเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน, และการจัดการข้อมูลจุลินทรีย์ตามมาตรฐานสากลเพื่อจัดทำแคตตาลอก และฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไทย ปัจจุบันจำนวนจุลินทรีย์มีมากเกือบ 4,000 สายพันธุ์ ประกอบด้วยราที่ก่อโรคแมลง(831) ราที่ขึ้นบนไม้ผุตระกูล Xylariaceae (355) ราน้ำจืด(317) ราน้ำเค็ม(217) ราที่ขึ้นบนเมล็ดพืช(94) ราที่แยกจากไลเคน (248) และราที่พบตามแหล่งดิน น้ำและเศษซากวัตถุทั่วไป(763) แบคทีเรียรวมทั้งแอคติโนมัยสีต(602) สาหร่าย(65) และราชนิดอื่น (143) วิธีการเก็บรักษาส่วนใหญ่ใช้วิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°ซ, -150 °ซ และในน้ำมันพาราฟินซึ่งเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 5°ซ สำหรับงานบริการจุลินทรีย์ในระยะแรกนี้จะเน้นเฉพาะงานวิจัยภายในหน่วยปฏิบัติการวิจัยศช.ในโปรแกรมการศึกษาและใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มค่าและการจัดลำดับความสำคัญของสายพันธุ์ ข้อมูลที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่มีได้นำมาจัดทำเป็นแคตตาลอกและฐานข้อมูล และเผยแพร่ผ่าน ระบบ internet ที่ ***URL: http://bcc.bioinfo.biotec.or.th/***

Establishment of specialized microbial culture collection at BIOTEC

The specialized microbial culture collection (BIOTEC Culture Collection) was formally established at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) in 1996. The principle objectives of the program are to provide safe deposition of cultures for researchers; to preserve and maintain microorganisms isolated from Thailand for sustainable use; and to manage strain data using a standard format for a catalogue and Thai microbial database creation. Current collections is almost 4,000 isolates which comprising of insect pathogenic fungi (831) wood-decayed fungi of Xylariaceae (355), aquatic fungi (317), marine fungi(217), seed fungi (94), fungi from lichen (248), soil fungi (763), bacteria including actinomycetes (602), microalgae (65) and other fungi (143). The preservation methods mainly used are freezing at -80 °C and -150 °C and under liquid paraffin oil storage at 5 °C cold room.The provision of cultures is initially provided within BIOTEC research laboratories for the microbial utilization programs. These are for value added and ranking of potential strains. The essential strain data of cultures being maintained are used to create a required database and produce the catalogue of cultures. The on-line database is now available at ***URL: http://bcc.bioinfo.biotec.or.th/***

โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย

ชื่อโครงการ (ไทย) การจัดตั้งศูนย์เก็บจุลินทรีย์เฉพาะชนิด ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

(อังกฤษ) Establishment of Specialized Microbial Culture Collection at BIOTEC

บทนำ

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ได้ให้การสนับสนุนงานวิจัยในด้านงบประมาณแก่หน่วยงานต่างๆ ในสาขาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพ โดยมุ่งเน้นการสำรวจและแยกสายพันธุ์จุลินทรีย์จากแหล่งต่างๆ ในธรรมชาติและการเก็บรักษาไว้นอกถิ่นกำเนิดในลักษณะสายพันธุ์บริสุทธิ์ เพื่อหาแนวทางการนำมาใช้ประโยชน์ต่อไปในภายหน้า และเพื่อรองรับนโยบายด้านความหลากหลายทางชีวภาพของประเทศ จุลินทรีย์เหล่านี้มีความหลากหลายตามชนิดพันธุ์และถิ่นกำเนิดอันประกอบด้วย แบคทีเรีย, รา, สาหร่าย, ไลเคนเป็นต้น จุลินทรีย์จากแต่ละโครงการที่ได้ผ่านการศึกษาวิเคราะห์คุณสมบัติโดยละเอียดนี้มีกระจายอยู่ตามหน่วยงานต่างๆ โดยมีผู้ดำเนินงานโครงการเป็นผู้ดูแล บางชนิดจะมีมูลค่าในเชิงเศรษฐกิจที่จำเป็นต้องมีการเก็บรักษาอย่างถูกวิธีเพื่อให้มีเสถียรภาพทางพันธุกรรม โดยทั่ว ๆไป**หลักสากลของการเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่นิยมปฏิบัติ คือ สายพันธุ์จุลินทรีย์ควรมีเก็บไว้ในที่ที่ปลอดภัยอย่างน้อย 2 แห่ง เพื่อป้องกันความเสียหายในกรณีเกิดอุบัติภัยทางธรรมชาติ** ประกอบกับการได้มาซึ่งสายพันธุ์บริสุทธุ์ที่มีคุณค่าทางเศรฐกิจเป็นกระบวนการที่ต้องลงทุนทั้งในด้านงบประมาณ บุคลากรและเวลา ซึ่งเมื่อมีการสูญหายเกิดขึ้นอาจหามาทดแทนให้เหมือนเดิมไม่ได้อีกเมื่อเวลาผ่าน และสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนไป

เมื่อ พ.ศ. 2531 ในประเทศไทยมีหน่วยงานที่เก็บรักษาจุลินทรีย์ 51 แห่ง (พูนศุข และ คณะ, 2537) ต่อมา ในปี พ.ศ 2537 หน่วยงานเหล่านี้ลดจำนวนลงเหลือเพียง 23 แห่งเท่านั้น (พูนศุข และวัลลภา, 2537) การลดจำนวนของหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ยังไม่มีการศึกษา หรือติดตามหาสาเหตุที่แท้จริง แต่มีข้อสันนิษฐานว่าหน่วยงานเหล่านี้ได้หยุดดำเนินการ ซึ่งอาจเป็นการถาวรหรือชั่วคราว ดังนั้น การมีหน่วยงานกลาง ทำหน้าที่ประสานงาน ด้านข่าวสารข้อมูลระหว่างหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ จะเป็นหนทางหนึ่งที่จะช่วยแก้ไขหรือบรรเทาปัญหาด้านการสูญหายของทรัพยากรพันธุกรรมจุลินทรีย์

ปัจจุบันมีโครงการหลายโครงการ ที่สิ้นสุดสัญญาว่าด้วยการวิจัย แต่การดูแลรักษาจุลินทรีย์ยังมีความจำเป็นต้องดำเนินต่อไป ซึ่งเป็นปัญหาที่หัวหน้าโครงการต้องรับผิดชอบในการหางบประมาณดำเนินการ ทางเลือกที่หัวหน้าโครงการสามารถทำได้คือ**นำจุลินทรีย์ชุดหนึ่งมาเก็บที่ ศช. ซึ่งจะเป็นเสมือนหน่วยเก็บสำรอง (Duplicate Collection and Safe Deposit)** โดยที่เจ้าของโครงการยังเป็นผู้รับผิดชอบร่วมอยู่ ในขณะเดียวกันข้อมูลประกอบของแต่ละสายพันธุ์ จะถูกบันทึกไว้และพัฒนาเป็นฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ที่จะนำเผยแพร่ผ่าน internet (BIOTEC Homepage) ดังนั้นจึงเป็นความจำเป็นเร่งด่วนที่ **ศช. จะต้องสร้างระบบการเก็บรักษาและการจัดการข้อมูลจุลินทรีย์ เพื่อรองรับงานดังกล่าว ซึ่ง ศช. ไม่เพียงทำหน้าที่เป็นหน่วยเก็บสำรองเท่านั้นแต่ยังเป็นศูนย์กลางข้อมูลทรัพยากรพันธุกรรมจุลินทรีย์แห่งชาติ** ประสานงานเครือข่ายระหว่างศูนย์เก็บจุลินทรีย์ทั้งในประเทศและต่างประเทศ

โครงการฯได้รับงบประมาณสนับสนุนจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย ซึ่งบริหารและจัดการโครงการโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยแห่งชาติ (สกว.) มีรหัสโครงการเลขที่ 640005 ระยะเวลาดำเนินการ 2 ปี (1 ธันวาคม 2541) ณ ห้องปฏิบัติการฝ่ายวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพ-โยธี ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อจัดระบบการจัดการข้อมูล และการเก็บรักษาจุลินทรีย์ให้เป็นไปตามมาตรฐานสากล
2. เพื่อส่งเสริมและรองรับการดำเนินงานวิจัยเกี่ยวกับการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์
3. เพื่อเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ในการศึกษาและมีมูลค่าทางเศรษฐกิจของประเทศ
4. เพื่อศึกษาและวิจัยวิธีที่เหมาะสมสำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์เฉพาะทาง
5. เพื่อทำหน้าที่ในการเป็นศูนย์กลางความร่วมมือด้านการเก็บรักษาจุลินทรีย์ระหว่างนักวิจัยทั่วประเทศ

เป้าหมาย (2ปี)

1. มีห้องปฏิบัติการ อุปกรณ์ เครื่องมือ และ บุคลากร สำหรับงานเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่มีมาตรฐานตามระบบสากล ที่สามารถรองรับ จุลินทรีย์จากนักวิจัย และ ประชาชนที่สนใจ
2. มีบุคลากรที่สามารถทำหน้าที่เก็บจุลินทรีย์โดยวิธีต่างๆ อย่างน้อย 2 คน และดูแลข้อมูล 1 คน
3. มีรายชื่อผู้เชี่ยวชาญด้านการจำแนกสายพันธุ์จุลินทรีย์อย่างน้อย 4 ชนิด คือ Insect pathogenic fungi, soil fungi, actinomycetes, microalgae และ ราในตระกูล Xylariaceae
4. มีสายพันธุ์จุลินทรีย์เก็บรักษา โดยวิธีมาตรฐานสากล(Freezing at -80C, -150C และ Freeze-drying) จำนวน 2,000 สายพันธุ์
5. มีบัญชีรายชื่อจุลินทรีย์ (List of Cultures) จัดพิมพ์ ครั้งที่ 1 มีฐานข้อมูลจุลินทรีย์ในโปรแกรม ฐานข้อมูล และ มีHomepage ใน internet
6. มีผลงานวิจัยด้านการเก็บรักษาจุลินทรีย์ และการจัดจำแนกสายพันธุ์

ตารางแผนงาน (เริ่ม 1 ธันวาคม 2539)

กิจกรรม	ปีที่ 1 (ธ.ค.39 - พ.ย.40)				ปีที่ 2 (ธ.ค.40 - พ.ย.41)			
	1-3	4-6	7-9	10-12	1-3	4-6	7-9	10-12
1. สำรวจข้อมูลจุลินทรีย์	<------	--------	--------	------>	<------	------>		
2. บันทึกและสร้างฐานข้อมูล		<------	--------	------>	<------	--------	--------	------>
2. เก็บรักษาจุลินทรีย์	<-	--------	--------	------>	<----	--------	--------	------>
3. ตรวจสอบการรอดชีวิต		<------	--------	------>			<------	------>
5. จัดพิมพ์ Catalogue					<------	------>		
6. สร้าง Homepage ใน internet			<---->			<---->		
7. ส่งรายงาน		--		--		--		--

วิธีดำเนินการ

1. สำรวจข้อมูลชนิดและจำนวนสายพันธุ์จุลินทรีย์ ที่จำเป็นต้องเก็บรักษา
   1.1. Soil fungi (ประสานงานกับ ดร. เลขา มาโนช, ภาควิชาโรคพืช, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
   1.2. Actinomycetes (ประสานงานกับ ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์)
   1.3. Microalgae (ประสานงานกับ ดร. อาภารัตน์ มหาขันท์, สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์ ฯ)
   1.4. Insect pathogenic fungi (ประสานงานกับ Dr. Hywel Jones Nigel, ศช.)
   1.5. Xylariaceae (ประสานงานกับ ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ , กรมป่าไม้)

2. รวบรวมข้อมูลจากการสำรวจบันทึกในคอมพิวเตอร์ โดยใช้ข้อมูลที่กำหนดตามสากล (Survey of Culture Collection Form-4 หรือ SCC-4 Form)
3. สร้างทะเบียนประวัติจุลินทรีย์
   3.1. ข้อมูลทั่วไป (passport data) ประกอบด้วยชื่อวิทยาศาสตร์, แหล่งที่มา, วัน-เดือน-ปี (ที่แยก และที่ เก็บ)
   3.2. อาหาร, อุณหภูมิ (ที่เหมาะสมต่อการเจริญ) ,คุณสมบัติพิเศษ หรือการนำไปประยุกต์ ,วิธีการเก็บรักษาที่เหมาะสม
   3.3. ข้อมูลสายพันธุ์ (strain data) ประกอบด้วย ลักษณะ ทางฟีสิกส์, เคมี, ชีวเคมี, พันธุศาสตร์ เป็นต้น
4. สร้างฐานข้อมูลจุลินทรีย์ในคอมพิวเตอร์
   4.1. สร้างโปรแกรมฐานข้อมูลจุลินทรีย์ทั่วไป โดยประสานงานกับเจ้าหน้าที่ฝ่ายคอมพิวเตอร์
   4.2. จัดพิมพ์ BCC List of Cultures (BIOTEC Culture Collection)
5. เก็บรักษาจุลินทรีย์ 3 วิธี
   5.1 โดยแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80° ซ (5 หลอด/ สายพันธุ์)
   5.2 ในถังไนโตรเจนเหลว ที่อุณหภูมิ - 196° ซ หรือตู้ Ultra Low Temperature Freezer , -152 ° ซ (2 หลอด/สายพันธุ์)
   5.3 และวิธี freeze-drying (6 หลอด/ สายพันธุ์)
6. ตรวจสอบการรอดชีวิต ความบริสุทธุ์และความจริงแท้(authentity) ของสายพันธุ์
   6.1 ตรวจสอบการรอดชีวิตหลังการเก็บรักษาทันที (ประสานงานกับเจ้าของโครงการ ตามชนิดจุลินทรีย์)
   6.2 ตรวจสอบการรอดชีวิตหลังการเก็บรักษา 1 ปี (ประสานงานกับเจ้าของโครงการ ตามชนิดจุลินทรีย์)
7. รายงานผลการดำเนินงาน ทุก 6 เดือน

ผลการดำเนินงาน

1. การจัดเตรียมโครงสร้างพื้นฐาน

1.1 ห้องปฏิบัติการเตรียมงานเก็บรักษาจุลินทรีย์

- มีพื้นที่ปฏิบัติงานประกอบด้วย ห้องปฏิบัติการ (50 ตารางเมตร) พร้อมโต๊ะปฏิบัติการสำหรับนักวิจัย 4-6 คน
- ที่สำหรับเก็บตัวอย่างจุลินทรีย์ (ห้องเย็น, 5 องศาเซลเซียส 5 ตารางเมตร) สำหรับงาน culture collection เพื่อเก็บตัวอย่าง ประมาณ 0.6 ตารางเมตร หรือ ประมาณ 5,000 หลอด (vial 4 dram) / ตัวอย่าง

1.2 อุปกรณ์และเครื่องมือ

➢ **สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์**

- Larminar Airflow (Labgard Class II Biological Safety Carbinet) จำนวน 2 ชุด สำหรับงานเตรียมจุลินทรีย์เพื่อเก็บรักษา และงานตรวจสอบคุณภาพภายหลังการเก็บ
- Freezer (Up-right -85°C) ความจุประมาณ 500 ลิตร หรือจุหลอดเชื้อขนาด 2 มิลลิลิตร (cryotube)ได้ประมาณ 18,000 หลอด หรือ 3,600 เชื้อ (5หลอด/เชื้อ) พร้อมถังบรรจุคาร์บอนไดออกไซด์เหลว(ระบบสำรองในการควบคุมอุณหภูมิขณะไฟฟ้าขัดข้อง) สำหรับเก็บจุลินทรีย์ในสภาพเยือกแข็งแบบกึ่งถาวร และจุลินทรีย์ระหว่างใช้งานทดลอง
- Ultra-Low Temperature Freezer (-150°C) ขนาดความจุ 128 ลิตร หรือบรรจุหลอดเชื้อขนาด 2 มิลลิลิตร (cryotube) ได้ประมาณ 3,800 หลอด พร้อมถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (ระบบสำรองในการควบคุมอุณหภูมิขณะไฟฟ้าขัดข้อง) สำหรับเก็บจุลินทรีย์ในสภาพเยือกแข็งแบบถาวร ชนิดไม่ใช้ไนโตรเจนเหลวแต่ใช้ไฟฟ้า

- Ultra-Low Temperature Freezer (-150°C) ขนาดความจุ 128 ลิตร หรือบรรจุหลอดเชื้อขนาด 2 มิลลิลิตร (cryotube) ได้ประมาณ 3,800 หลอด พร้อมถังบรรจุไนโตรเจนเหลว (ระบบสำรองในการควบคุมอุณหภูมิขณะไฟฟ้าขัดข้อง) สำหรับเก็บจุลินทรีย์ในสภาพเยือกแข็งแบบถาวร ชนิดไม่ใช้ไนโตรเจนเหลวแต่ใช้ไฟฟ้า
- Cryobiological Storage Vessel (Thermolyne LOCATOR -Type CY50900) พร้อมทั้งติดตั้ง อุปกรณ์ชี้วัดระดับไนโตรเจนเหลวภายในถัง (Liquid Nitrogen Level Monitor) ขนาดความจุ 90 ลิตร หรือบรรจุหลอดเชื้อ (cryotube)ขนาด 2 มิลลิลิตร ได้ประมาณ 2,900 หลอด จำนวน 1 ถัง สำหรับเก็บจุลินทรีย์ในสภาพเยือกแข็งแบบถาวร ชนิดไม่ใช้ไฟฟ้า
- Freeze Dryer (Modulyo 4K) ที่มีระบบการทำให้ตัวอย่างแข็งตัวและแห้งพร้อมกัน สำหรับเก็บจุลินทรีย์แบบถาวรในลักษณะแห้งแข็งภายใต้สุญญากาศ พร้อมด้วยอุปกรณ์ที่จำเป็น คือ 1) Sealing torch พร้อมถังแกสขนาดเล็ก เป็นไฟลนหลอด ใช้สำหรับปิดหลอดเชื้อในสภาพสุญญากาศ

➢ **สำหรับตรวจสอบลักษณะเชื้อ**

- กล้องจุลทัศน์ (ZEIZZ Axiolab microscope for transmitted light and incident-light fluorescence) พร้อมอุปกรณ์ถ่ายภาพ 1 ชุด
- กล้องสองตา (ZEIZZ Stemi 2000 Stereomicroscope) 1 ชุด
- กล้องถ่ายรูป CANNON T50 สำหรับบันทึกภาพลักษณะโคโลนีจุลินทรีย์ ก่อนเก็บรักษาเพื่อเป็นหลักฐานการยืนยันลักษณะจุลินทรีย์ โดยสังเขป ในการตรวจสอบคุณภาพเชื้อภายหลังการเก็บรักษา

➢ **สำหรับบันทึกข้อมูล / รายงาน /ทำแคตาลอก /ฐานข้อมูล**

- เครื่องคอมพิวเตอร์ 1 เครื่อง คือ Personal Computer รุ่น Pentium 166, Hard disk 2.5 GB Memory 32 bit with CD_ROM 16x สำหรับ บันทึกข้อมูลในโปรแกรมฐานข้อมูล MIM (Microbial Information Management) จัดระบบเก็บหลอดเชื้อในคลังจุลินทรีย์ การจัดทำรายงาน เตรียมข้อมูลเพื่อเผยแพร่ผ่าน internet และ การทำแคตาลอก
- เครื่องพิมพ์ (Laser printer6p) *
- Scanner* สำหรับการนำภาพถ่ายเข้าสู่โปรแกรม ฐานข้อมูล MIM (Microbial Information Management)

[* ใช้ร่วมกันกับส่วนกลางโดยผ่านระบบ LAN]

1.3 **บุคลากร**

➢ **ด้านบริหาร**

- **ผู้อำนวยการโครงการ** เพื่อกำหนดนโยบาย ทิศทางการดำเนินงาน เสนอแนะ และแก้ไขปัญหาที่นอกเหนือจากงานด้านเทคนิค (ดร. มรกต ตันติเจริญ)
- **ผู้จัดการงานเก็บรักษาจุลินทรีย์** สำหรับวางแผนงาน, การดำเนินงาน, วางระบบการตรวจสอบ, ระบบการเก็บรักษา, กำกับดูแล, ติดตามงาน, ติดต่อประสานงาน และรายงานผล การปฏิบัติงาน (นางวันเชิญ โพธาเจริญ)

➢ **ด้านเทคนิค**

- **พนักงานด้านเทคนิคแบ่งตามหน้าที่รับผิดชอบ จำนวน 4 คน ดังนี้** (ภาคผนวกที่ 1)
  - น.ส. ทิพทิวา บุญเรือง เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการ คุณวุฒิ มัธยม 6 มีประสบการณ์ทำงานด้านจุลินทรีย์ 2 ปี
  - น.ส. สุวนีย์ ชุณหเมธา ลูกจ้างโครงการ คุณวุฒิ ปริญญาตรี , จุลชีววิทยา
  - นายทรงพล ผดุงพัฒน์ ลูกจ้างโครงการ คุณวุฒิ ปริญญาตรี, เทคโนโลยีชีวภาพ

- นายนธี แซ่ลี้ ลูกจ้างโครงการ คุณวุฒิ ปริญญาตรี จุลชีววิทยา

- **ผู้เชี่ยวชาญการจำแนกจุลินทรีย์เฉพาะชนิด**

จากหน่วยงานภายใน ศช.

- Dr. Nigel Hywel-Jones (insect pathogenic fungi)

จากหน่วยงานภายนอก ศช.

- ดร. เลขา มาโนช (soil fungi) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนตร (actinomycetes) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
- ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ (Xylariaceae) กรมป่าไม้
- ดร. อาภารัตน์ มหาขันท์ (Microalgae) สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

จากต่างประเทศ

- Dr. Yoko Takahashi (Actinomycetes) Kitasato Research Institute, Japan
- Dr. Yuzo Yamada (acetic acid bacteria) Tokyo University of Agriculture, Japan
- Dr. Kazuo Komagata (Bacterial chemotaxonomy) Tokyo University of Agriculture, Japan
- Dr. Shung-Chang Jong (Industrial fungi) American Type Culture Collection, USA

2. การรวบรวมและจัด เก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์

- การขออนุญาตครอบครองเชื้อ ตามมาตรา 5 พระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. 2525 สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติได้รับใบอนุญาตครอบครองจุลินทรีย์ เลขที่ 179-3/2540 วันที่ 27 มิถุนายน 2540 ซึ่งต่ออายุ ถึง วันที่26 มิถุนายน 2542 ให้มีห้องปฏิบัติการเก็บรักษา จุลินทรีย์ ศช. (ภาคผนวกที่ 2)
- การรวบรวมสายพันธุ์จุลินทรีย์

มีสายพันธุ์จุลินทรีย์เก็บรักษาจำนวนทั้งสิ้น 3895 สายพันธุ์ (ถึง 30 พฤศจิกายน 2541) ประกอบด้วย รา (3006) ยีสต์ (25) แบคทีเรีย (602), สาหร่าย (65) และ จุลินทรีย์อื่นๆ (143) (ภาคผนวกที่ 3)

- การเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์
  - มีระบบการดำเนินงานด้านการเก็บรักษาจุลินทรีย์ (ภาคผนวกที่ 4)
  - มีคู่มือเก็บรักษาจุลินทรีย์แต่ละวิธี (ภาคผนวก ที่5)
  - มีแบบฟอร์มบันทึกชนิดและจำนวนหลอดเก็บจุลินทรีย์ ที่เก็บรักษาโดยวิธีต่างๆ (Stock sheet) (ภาคผนวกที่ 6)
- .การตรวจสอบคุณภาพจุลินทรีย์หลังการเก็บรักษา

มีรายชื่อและชนิดจุลินทรีย์ที่สามารถเก็บรักษาโดยวิธีแช่แข็ง (ภาคผนวกที่ 7)

3. การรวบรวมข้อมูล

- มีแบบฟอร์มการรับฝากเก็บจุลินทรีย์ (Accession form) (ภาคผนวกที่ 8)
- มีฐานข้อมูลจุลินทรีย์ ในโปรแกรม MIM (Microbial Information Management)
- มีบัญชีรายชื่อจุลินทรีย์ (List of Cultures, BIOTEC Culture Collection, 1997) ในรูปแบบต้นฉบับที่พร้อมจัดพิมพ์เพื่อเผยแพร่ (ภาคผนวกที่ 9)
- มี homepage BIOTEC Culture Collection (ภาคผนวกที่ 10) URL : http://bioinfo.biotec.or.th

4 **การให้บริการ**

- ให้บริการสายพันธุ์จุลินทรีย์ แก่นักวิจัยของศูนย์ฯ จำนวนทั้งสิ้น 600 สายพันธุ์ หรือโดยเฉลี่ย 100-120 สายพันธุ์ / เดือน
- ให้คำปรึกษา วิธีการเก็บรักษาจุลินทรีย์ และการหาข้อมูลแหล่งเก็บจุลินทรีย์ตัวอย่างในต่างประเทศ จำนวน 24 ราย จาก มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (6), จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (1), มหาวิทยาลัยศิลปากร (5), สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี (3), มหาวิทยาลัยมหิดล (8), โรงเรียนบ้านกาดวิทยาคม เชียงราย (1)

5 **การพัฒนาบุคลากร** (ระดับผู้ปฏิบัติการและระดับนักศึกษา)

- ***จัดฝึกอบรม ระดับในประเทศ 2 เรื่อง***

☐ เรื่อง :Classification and utilization of acetic and lactic acid bacteria (โดยร่วมกับ Food Technology Lab) 10-11 March 1998
ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัย โยธี
มีเอกสารประกอบการฝึกอบรม 1 เล่ม (ภาคผนวกที่ 11)
มีผู้ได้รับการอบรมจากหน่วยงานต่าง ๆ ทั้งภาคปฏิบัติ และ ภาคบรรยาย 20คน และ 30 คน ตามลำดับ

☐ **เรื่อง: Isolation and identification of actinomycetes** 16-19 March 1998
ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัย โยธี
มีเอกสารประกอบการฝึกอบรม 1 เล่ม (ภาคผนวกที่ 11)
มีผู้ได้รับการอบรมจากหน่วยงานต่าง ๆ 20คน ทั้งภาคปฏิบัติ และ ภาคบรรยาย 20คน และ 25 คน ตามลำดับ

- **ฝึกงานนักศึกษาช่วงปิดภาคฤดูร้อน**

☐ ฝึกงานนักศึกษาจากมหาวิทยาลัยต่าง ๆช่วงปิดภาคปลาย เกี่ยวกับเทคนิคการเก็บรักษาจุลินทรีย์ จำนวน 10 คน ดังนี้ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (1), ศิลปากร(1), สงขลา (1), สถาบันราชภัฏสวนสุนันทา (6) และสถาบันราชภัฏสวนดุสิต (1)

6. **งานวิจัย**

- มีผลการทดลองการเก็บรักษาสาหร่ายโดยวิธีถาวร (อยู่ระหว่างการรวบรวมข้อมูลเพื่อจัดทำบทความทางวิชาการ)
- มีข้อมูลการศึกษาและจำแนกแบคทีเรียผลิตกรดน้ำส้มสายชู (อยู่ระหว่างการรวบรวมข้อมูลเพื่อจัดทำบทความทางวิชาการ)

7. **การเสนอผลงานทางวิชาการ** (ภาคผนวกที่ 12)

ในประเทศ: เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ 3 ครั้ง
ต่างประเทศ: เสนอผลงานภาคโปสเตอร์ 1 ครั้ง

8. **อื่นๆ**

- เป็นสมาชิกศูนย์ข้อมูลจุลินทรีย์โลก (World Data Center of Microorgaisms) เลขที่ 783

สรุปผล / ข้อสังเกตุอื่นๆ

1. โครงการได้ดำเนินงานและได้รับผลตามแผนงานและเป้าหมาย
2. ชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ที่ เก็บรักษามีเพิ่มจากแผนงานที่วางไว้ 10 ชนิด, จำนวน 1431 สายพันธุ์ ทำให้ต้องชะลองานด้านบันทึกข้อมูลไว้ก่อน(เฉพาะกลุ่มที่เข้ามาใหม่) เพราะงานเก็บรักษาจุลินทรีย์ เป็นงานที่เร่งด่วนกว่า
3. ขณะรายงาน สถานที่ เก็บรักษาจุลินทรีย์มีเพียง หนึ่ง แห่งคือ ศช. ในด้านความปลอดภัย จำเป็นต้องจัดหา สถานที่อีกแห่งหนึ่ง สำหรับ เก็บรักษา จุลินทรีย์ 2 แห่ง คาดว่าภายในปี 2543 จะสามารถนำ จุลินทรีย์ อีกหนึ่งชุดไปเก็บไว้ที่ อุทยานวิทยาศาสตร์ สวทช. รังสิต ซึ่งกำลังอยู่ในระหว่างการก่อสร้าง
4. ผู้ทำหน้าที่เก็บรักษาจุลินทรีย์ ควรได้รับแจ้ง หรือรับรู้ข้อมูลของเชื้อที่จะนำมา เก็บรักษาล่วงหน้าเพื่อจะได้เตรียมการด้านวัสดุ อุปกรณ์ และบุคลากรให้พร้อมสำหรับการรองรับจำนวนจุลินทรีย์

เอกสารอ้างอิง

1. Atthasampunna, P., Daengsubha,W., And Budhaka, P. 1988. Thailand Directory of Collections of of Cultures of Microorganisms. Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand.
2. Atthasampunna, P., and Arunpairojana, V. 1994. Thailand Directory of Collections of of Cultures of Microorganisms. Second edition. Thailand Institute of Scientific and Technological Research, Bangkok, Thailand.
3. Hawksworth, D.L. 1993. Guideline for the establishment and operation of collections of cultures of microorganisms. WFCC Document, World Federation for Culture Collection. ISBN 92-91029-041-8
4. Hawksworth, D.L. and M.AA Schipper. 1989. Technical Communication: Criteria for consideration in the accreditation of culture collections participating in MINE, the Micobial Information Network Europe. *MIRCEN Journal* 5:277-281.

ภาคผนวก

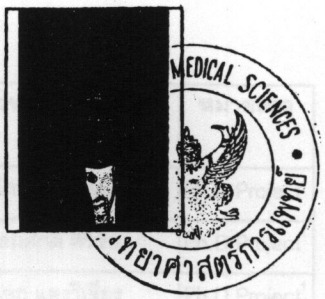
ภาคผนวกที่ 1 หน้าที่และความรับผิดชอบของพนักงานประจำห้องปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ชื่อ	หน้าที่ / รับผิดชอบ
ทิพทิวา บุญเรือง	• **งานเก็บรักษาจุลินทรีย์**
	1. เก็บรักษาเชื้อรา โดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ –80°ซ และ –150°ซ และภายใต้น้ำมัน 2. ดูแล และ เก็บรักษา สาหร่าย โดย วิธีถ่ายเชื้อ (ทุก 1- 3 เดือน)
	• **งานบริการ**
	เตรียมจุลินทรีย์พร้อมใช้ สำหรับนักวิจัยภายในศูนย์ฯ โดยการเตรียมเชื้อสดเจริญบนอาหารวุ้น ส่ง Fermentation Lab, Enzyme Technology Lab (100 - 120 เชื้อ / เดือน)
	• **งานทดสอบคุณภาพเชื้อที่ เก็บรักษา**
	ตรวจสอบ การรอดชีวิต ความบริสุทธ์ และลักษณะ(เทียบกับภาพถ่ายเชื้อก่อนนำไปเก็บ) ของเชื้อที่เก็บรักษา (20 - 30 เชื้อ / อาทิตย์)
	• **งานอื่นๆ :** - งานธุรการ / งานเอกสาร (อนุมัติหลักการ), สั่งซื้อวัสดุ / สารเคมี - เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ วัสดุอุปกรณ์เก็บเชื้อ, ล้างอุปกรณ์, เครื่องแก้ว
สุวนีย์ ชุณหเมธา	• **งานเก็บรักษาจุลินทรีย์**
	1. เก็บเชื้อแบบ freeze dry โดยการคัดเลือกเชื้อที่สามารถเก็บโดยวิธีนี้ได้เช่น แบคทีเรีย, ราที่สร้างสปอร์ และยีสต์ (50– 100 เชื้อ ต่อเดือน) 2. เตรียมอุปกรณ์, วัสดุ , อาหารและสารเคมี ที่จำเป็นสำหรับงานเก็บเชื้อ 3. ทดสอบการอยู่รอดของเชื้อหลังการเก็บรักษา
	• **งานบันทึกข้อมูลคลัง จุลินทรีย์**
	1. บันทึกข้อมูลเชื้อ / ตำแหน่ง 2. update stock ทั้งจำนวนและตำแหน่งเชื้อเมื่อมีการเคลื่อนไหวของข้อมูล เช่น การนำเชื้อเข้าเก็บ หรือการนำออกมาเพาะเตรียมให้นักวิจัย หรือตรวจสอบคุณภาพ 3. จัดพิมพ์รายชื่อจุลินทรีย์ที่ต้องนำมาตรวจสอบคุณภาพในแต่ละเดือน พร้อมทั้งบันทึกผลการตรวจสอบ 4. คัดเลือกจุลินทรีย์ที่ไม่ผ่านการตรวจสอบ เช่น มีเชื้ออื่นปนเปื้อน, ไม่เจริญ หรือลักษณะไม่ตรงสายพันธุ์ เพื่อคัดทิ้ง หรือแจ้งผู้นำมาฝาก
	• **งานอื่นๆ**
	1. ตรวจเช็ค จุลินทรีย์ที่นักวิจัยส่งมาเก็บ (เช็คลักษณะและระหัส) 2. จัดเก็บเอกสาร ข้อมูล จุลินทรีย์ในแฟ้ม
ทรงพล ผดุงพัฒน์	• **รับผิดชอบและดูแล การเก็บรักษาและข้อมูลเชื้อ actinomycetes**
	1. เก็บรักษา actinomycetes โดยวิธีแช่แข็งที่ –80 ซ , -152 ซ และภายใต้น้ำมันพาราฟิน 2. ตรวจสอบ viability ของ actinomycetes จากตู้ -80 ซ 3. ศึกษาลักษณะทางสัณฐานวิทยา /เคมีของ actinomycetes เพื่อการจำแนก

ชื่อ	หน้าที่ / รับผิดชอบ
ทรงพล ผดุงพัฒน์	• **งานอื่นๆ**
	1. ดูแล และจัดซื้อไนโตรเจนเหลว / เติมไนโตรเจนเหลวในถัง
	2. ดูแลการใช้เครื่องมือ / อุปกรณ์ในห้องปฏิบัติการ และส่งรายงาน
นธี แซ่ลี้	• **งานข้อมูล (ฐานข้อมูล)**
	1. รวบรวมข้อมูล จุลินทรีย์จากรายงาน หรือ แบบฟอร์มการนำเชื้อมาฝาก 2. บันทึกข้อมูลในโปรแกรม MIM (Microbial Information Management) 3. ค้นหาข้อมูลที่จำเป็นจากเอกสาร สิ่งตีพิมพ์ เพิ่มเติมในฐานข้อมูล เช่น author's name, media, usage และ reference 4. เตรียมข้อมูลและรูปแบบสำหรับจัดพิมพ์ แคตาลอก
	• **งานบันทึกภาพ จุลินทรีย์**
	1. ถ่ายรูปเชื้อที่เจริญบน จานอาหาร, 2. ถ่ายรูปลักษณะเส้นใย และสปอร์ของราจากกล้องจุลทัศน์. 3. เก็บภาพถ่ายให้เป็นระบบเพื่อสะดวกต่อการนำมาใช้ บันทึกข้อมูลการถ่ายภาพเก็บเป็นหลักฐาน และประกอบเป็นฐานข้อมูล
	• **งานอื่นๆ**
	1. ทดลองเก็บสาหร่ายที่อุณหภูมิ -150°ซ (3 เดือน) และ แบบ freeze-drying

ภาคผนวกที่ 2 ใบอนุญาตผลิตเชื้อโรคและพิษจากสัตว์

แบบ ศ.ช. ๒



ใบอนุญาตผลิต
เชื้อโรคและพิษจากสัตว์

ใบอนุญาต ที่ 179-3/ 2540

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ไว้แก่

สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

โดยมี นางวันเชิญ ไพราเจริญ เป็นผู้ดำเนินกิจการ เพื่อแสดงว่าเป็นผู้ได้รับอนุญาตผลิตเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ (ระบุชื่อ)_____ ตามรายชื่อใน List of Culture of Microorganisms BIOTEC Culture Collection 1997 ตามมาตรา ๕ แห่งพระราชบัญญัติเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ พ.ศ. ๒๕๒๕ ณ สถานที่ผลิต ชื่อ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์, เทคโนโลยีการอาหาร และเทคโนโลยีการหมัก อยู่เลขที่ 73/1 ตรอก/ซอย - ถนน พระราม 6 หมู่ที่ - ตำบล/แขวง ทุ่งพญาไท อำเภอ/เขต ราชเทวี จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400 เลขหมายโทรศัพท์ 644-8150-4 มีสถานที่ครอบครองหรือสถานที่เก็บเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ชื่อ ห้องปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ศช. อยู่เลขที่ 73/1 ตรอก/ซอย - ถนน พระราม 6 หมู่ที่ - ตำบล/แขวง ทุ่งพญาไท อำเภอ/เขต ราชเทวี จังหวัด กรุงเทพฯ รหัสไปรษณีย์ 10400 เลขหมายโทรศัพท์ 644-8150-4 และมีสถานที่จำหน่ายเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ ชื่อ_____ อยู่เลขที่_____ ตรอก/ซอย_____ ถนน_____ หมู่ที่_____ ตำบล/แขวง_____ อำเภอ/เขต_____ จังหวัด_____ รหัสไปรษณีย์_____ เลขหมายโทรศัพท์_____

ใบอนุญาตฉบับนี้ให้ใช้ได้จนถึงวันที่ 26 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2541 และให้ใช้ได้เฉพาะสถานที่ผลิตเชื้อโรคและพิษจากสัตว์ซึ่งระบุไว้ในใบอนุญาตฉบับนี้เท่านั้น

ออกให้ ณ วันที่ 27 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2540

(ลายมือชื่อ) _____
(นายจักรี ธรรมศักดิ์)
รองอธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์
ปฏิบัติราชการแทน
อธิบดีกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์

รายการต่ออายุใบอนุญาต

การต่ออายุใบอนุญาตครั้งที่ ๑
ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง
วันที่ 26 เดือน มิถุนายน พ.ศ. 2542
(ลายมือชื่อ) _____
ตำแหน่ง _____
ผู้อนุญาต
____/____/____

การต่ออายุใบอนุญาตครั้งที่ ๒
ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง
วันที่____ เดือน_____ พ.ศ.____
(ลายมือชื่อ)_____
ตำแหน่ง_____
ผู้อนุญาต
____/____/____

การต่ออายุใบอนุญาตครั้งที่ ๓
ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง
วันที่____ เดือน_____ พ.ศ.____
(ลายมือชื่อ) _____
ตำแหน่ง_____
ผู้อนุญาต
____/____/____

การต่ออายุใบอนุญาตครั้งที่ ๔
ให้ต่ออายุใบอนุญาตฉบับนี้จนถึง
วันที่____ เดือน_____ พ.ศ.____
(ลายมือชื่อ)_____
ตำแหน่ง_____
ผู้อนุญาต
____/____/____

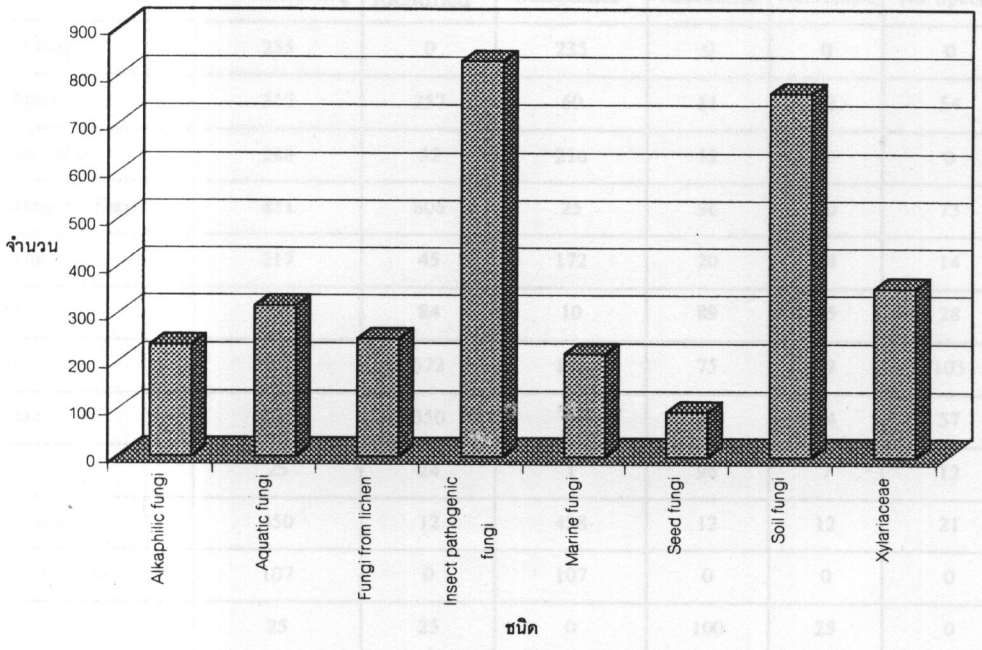
ภาคผนวกที่ 3 ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่รวบรวม

ตารางที่ 1 ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่รวบรวมมา เก็บรักษาจากโครงการต่างๆ

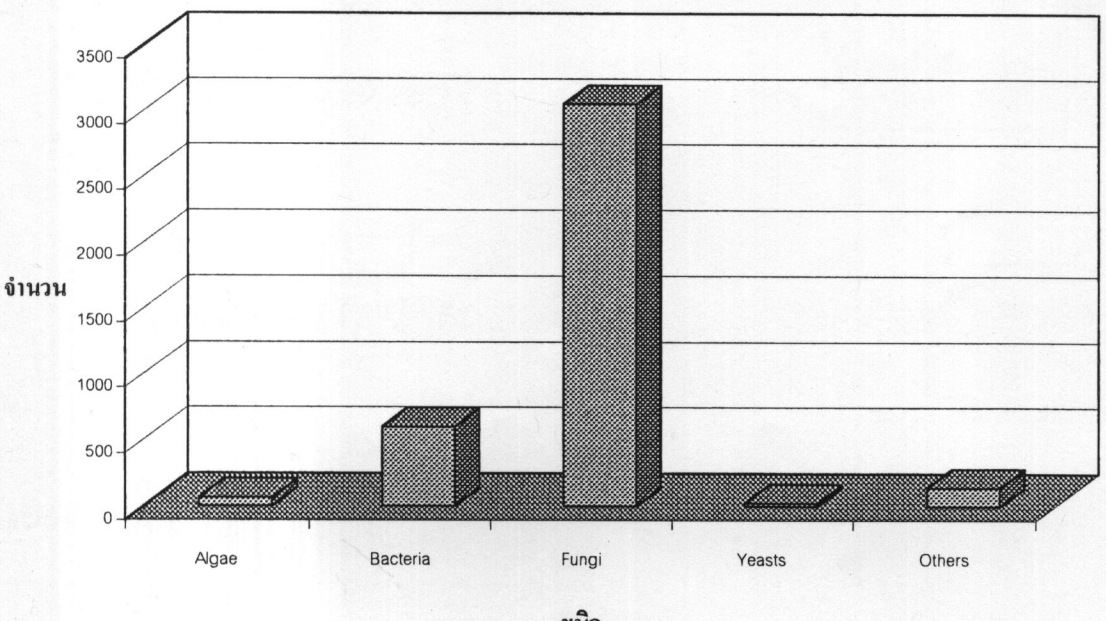
ชนิด	จำนวนสายพันธุ์	ชื่อโครงการ /ห้องปฏิบัติการ	หัวหน้าโครงการ / นักวิจัย	หมายเหตุ
Alkaphilic fungi	235	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	น.ส.วิภาภัทร กลัดวงค์	Ph.D Project[1]
Aquatic fungi	317	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	นาย สมศักดิ์ ศิวิชัย	Ph.D Project[1]
Fungi from lichen	248	การแยก สายพันธุ์ราจากตัวอย่างไลเคนที่รวบรวมได้จากป่าภูตีนสวนทราย อำเภอนาแห้ว จังหวัดเลย	นาย เอก แสงวิเชียร	Ph.D Project[1]
Insect pathogenic fungi	831	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	Dr. Nigel Hywel-Jones	
Marine fungi	217	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	น.ส. อภิรดี ปิลันธนภาคย์	Ph.D Project[1]
Seed fungi	94	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	นาย สายัณห์ สมฤทธิ์ผล	Ph.D Project[1]
Soil fungi	763	การเก็บรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์ราในดินและน้ำ	ดร. เลขา มาโนช	
Xylariaceae	355	1. การศึกษาความหลากหลายทางชีวภาพของเชื้อรา ในกลุ่มXylariaceae ในเขตป่าไม้ของประเทศไทย 2. Endophytic fungi of teak leaves	ดร. สุรางค์ เธียรหิรัญ น.ส. สุรีวัลย์ เมฆกมล	Ph.D Project
Yeasts	25	ห้องปฏิบัติการศึกษาและจำแนกสายพันธุ์รา	Dr. Nigel Hywel-Jones	
Actinomycetes	450	การเก็บรวบรวมและเก็บรักษาสายพันธุ์ actinomycetes ในดิน	ดร. อรินทิพย์ ธรรมชัยพิเนตร	
Acetic acid bacteria	107	การคัดแยกและจำแนกจุลินทรีย์ผลิตกรดน้ำส้มในประเทศไทย	นางวันเชิญ โพธาเจริญ	BIOTEC-JBA Project[2]
Bacillus	25	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแบคซิลัสที่มีประสิทธิภาพในการผลิตเอนไซม์เพคติเนส	ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ	Master Project[1]
Lactic acid bacteria	20	การแยกและคัดเลือกแบคทีเรียแลคติคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการหมักไซเลจ	ดร. สุนีย์ นิธิสินประเสริฐ	Master Project[1]
Microalgae	65	การสำรวจและเก็บรวบรวมสายพันธุ์สาหร่ายจากแหล่งต่างๆในธรรมชาติ	ดร. อาภารัตน์ มหาขันท์	
Others (fungi & bacteria)	143			
Total	3895			

1. ไม่ได้กำหนดไว้ในแผนงาน
2. โครงการวิจัยร่วมระหว่างนักวิจัยไทย และ ญี่ปุ่น ภายใต้โครงการ JBA

จำนวนรากลุ่มต่าง ๆ ที่เก็บรักษา



ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่เก็บรักษาจากโครงการต่างๆ



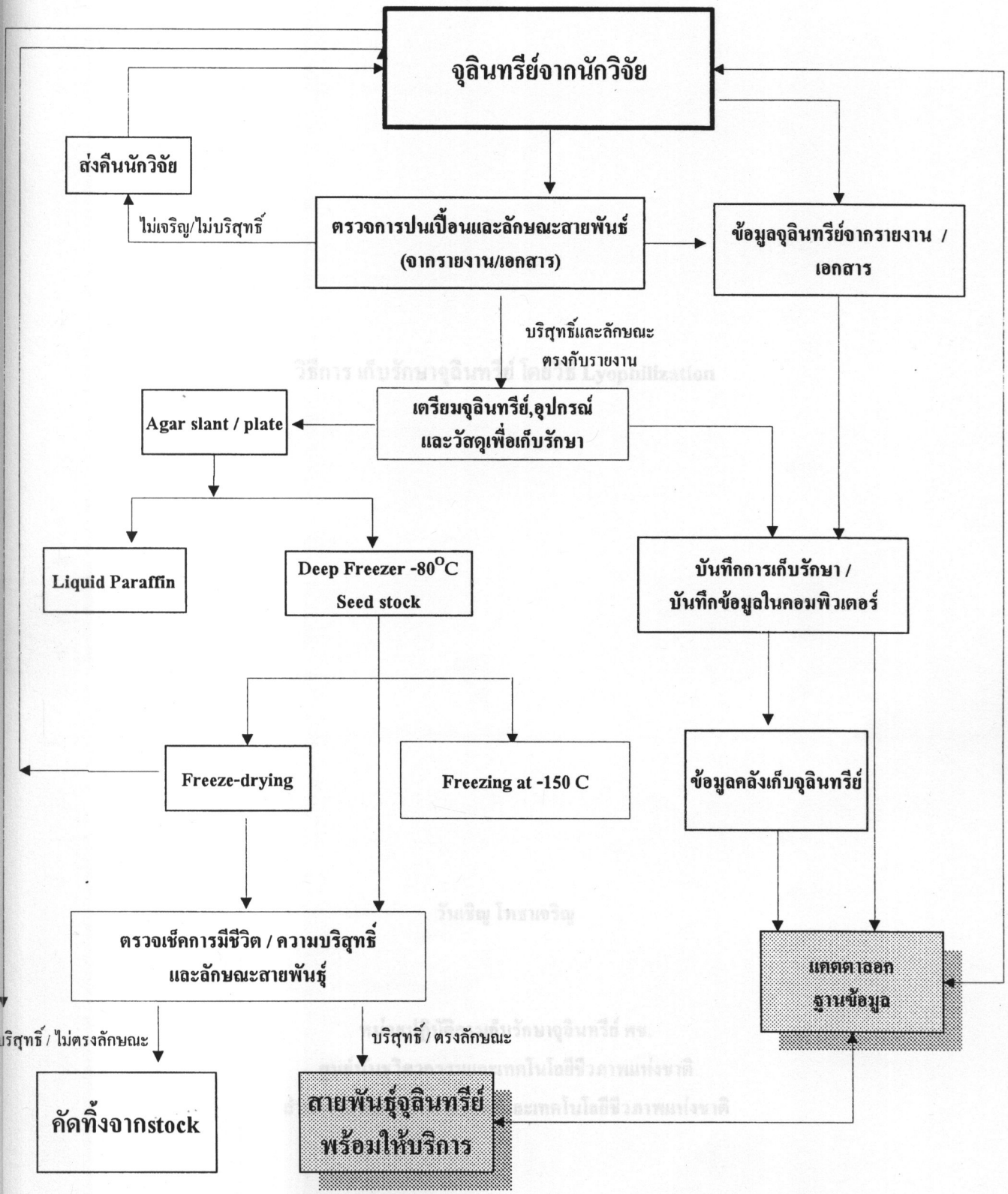
ตารางที่ 2 ชนิดและจำนวนจุลินทรีย์ที่จำแนกและยังไม่ได้จำแนก

	จำนวนสายพันธุ์	Identified [1]	Unidentified [2]	%Identified	No. Genera	No. Species
Alkaphilic fungi	235	0	235	0	0	0
Aquatic fungi	317	257	60	81	78	54
Fungi from lichen	248	32	216	12	9	0
Insect pathogenic fungi	831	806	25	96	30	73
Marine fungi	217	45	172	20	14	14
Seed fungi	94	84	10	89	45	28
Soil fungi	763	572	191	75	79	103
Xylariaceae	355	350	5	98	14	57
Yeasts	25	24	1	96	7	12
Actinomycetes	450	12	438	12	12	21
Acetic acid bacteria	107	0	107	0	0	0
Bacillus	25	25	0	100	25	0
Lactic acid bacteria	20	20	0	100	20	0
Microalgae	65	65	0	100	21	25
Others (fungi & bacteria)	143	47	96	32	25	18
Total	3895	2339	1556	60	379	405

หมายเหตุ 1) จำแนกถึงระดับสกุล

2) ยังไม่ได้จำแนกถึงระดับสกุล

ภาคผนวกที่ 4 แผนผังระบบงานเก็บรักษาจุลินทรีย์



ภาคผนวกที่ 5 คู่มือวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี Lyophilization

วิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี Lyophilization

วันเชิญ โพธาเจริญ

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ศช.
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

มกราคม 2540

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	18
ทฤษฎี	18
ขั้นตอนวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี lyophilization	19
เตรียมวัสดุ และสารอาหาร	19
Ampoules	19
ถุงผ้าครอบหลอด ampoule	19
ป้ายรหัส (labels)	19
สารแขวนลอย (Suspending medium)	19
จุลินทรีย์	20
วิธีการ เก็บรักษา	20
บรรจุเชื้อลง ampoule	20
การนำ ampoule เชื้อใส่เครื่อง freeze dryer	20
Ampoule constriction	20
การปิดหลอด	20
การทดสอบสภาพสุญญากาศ	20
การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อ	20
การเก็บหลอดเชื้อในคลัง (Storage)	21
ข้อมูลคลังจุลินทรีย์	21
หมายเหตุ:	21
คู่มือ การใช้งานเครื่อง Freeze-Dryer model Modulyo	21
การเปิดเครื่อง	21
Primary dry	21
Secondary dry	21
การปิดเครื่อง	21
ข้อควรระมัดระวังในการใช้เครื่อง freeze dry	22
ความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน	22
ขั้นตอนการเตรียมเครื่องมือ Freeze dryer Modulyo	22

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี Lyophilization

คำนำ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์วิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย คือ Lyophilization หรือ Freeze-drying เนื่องจากเป็นวิธีที่ใช้ได้เหมาะสมกับจุลินทรีย์หลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งแบคทีเรีย, ยีสต์ และราที่สร้างสปอร์ วิธีการนี้เหมาะสมอย่างยิ่งสำหรับงานด้านการเก็บรักษาจุลินทรีย์เพื่อให้บริการ เพราะเก็บได้นานมาก บางชนิดอยู่ได้ถึงสิบปีขึ้นไป ทำให้ลดภาระเรื่องการดูแล การเตรียมอาหาร และ ถ่ายเชื้อ และที่สำคัญคือสามารถรักษาคุณสมบัติทางพันธุกรรมไว้ได้คงเดิม นอกจากนี้ยังประหยัดพื้นที่ในการเก็บ และจัดวางหลอดเชื้อ สะดวกในการขนส่ง รวมทั้งประหยัดราคาค่าขนส่งด้วยเพราะหลอดเชื้อมีน้ำหนักเบา การศึกษาหลักการและทฤษฎีของขบวนการ lyophilization จึงเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อนำมาปรับปรุงใช้ในการเก็บรักษาจุลินทรีย์

ทฤษฎี

โดยทั่วไปขบวนการ แช่แข็ง (freezing) จะทำให้เซลของสิ่งมีชีวิตแตกสลาย เนื่องจากน้ำในเซลถูกเปลี่ยนสถานะเป็นน้ำแข็งและขยายปริมาตร จนดันผนังเซลแตกออก ส่วนการ ทำให้แห้ง (drying) โดยการดึงน้ำออกจากเซลของจุลินทรีย์จะมีผลทำให้ความเข้มข้นของสารจำพวก เกลือแร่ (electrolytes) ในเซล สูงขึ้น จนสามารถทำลายโปรตีนและ DNA ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลของสิ่งมีชีวิตอย่างยิ่ง เพราะเมื่อโปรตีนถูกทำลายไปแล้ว จะไม่กลับคืนสู่สภาพเดิมได้อีก

หลักการของ freeze-drying หรือ lyophilization ก็คือการทำให้จุลินทรีย์อยู่ในสภาพแข็งตัวโดยการลดอุณหภูมิ, ลดความดัน และปรับสภาพแวดล้อมให้เป็นสุญญากาศ และขณะเดียวกันน้ำจะถูกดึงออกจากเซลด้วยขบวนการระเหิด (sublimation) ขบวนการนี้ทำให้จุลินทรีย์คงรูปร่างในสภาพเดิม เพราะเซลถูกตรึงอยู่ในสภาพแข็งตัว และการดึงน้ำออกจากเซล ในสภาพของแข็งเช่นนี้จะช่วยป้องกันไม่ให้เซลเกิดความเสียหาย อันเนื่องมาจากการเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นของสารจำพวก เกลือแร่ (electrolytes) อีกด้วย แม้วิธีนี้จะได้ผลในการรักษาชีวิตของจุลินทรีย์ แต่อัตราการตายก็ยังคงเกิดขึ้นมากโดยเฉพาะในระหว่างขบวนการ ดังนั้นการใช้สารป้องกันเซลแตกสลาย (protective) ระหว่างขบวนการจะช่วยลดอัตราการตายของจุลินทรีย์

ในเซลของสิ่งมีชีวิตมีน้ำเป็นส่วนประกอบเกือบ 80% ในขณะที่อุณหภูมิลดลงน้ำที่อยู่รอบๆ เซลจะกลายเป็นน้ำแข็งทำให้น้ำในเซลซึมผ่านเซลออกมาเพื่อปรับสภาวะความสมดุลย์ระหว่างในและนอกเซล และจะซึมออกมาเรื่อยๆ ตราบเท่าที่มีความไม่สมดุลย์ระหว่างข้างในและนอก หากปล่อยไปเช่นนี้เรื่อยๆ ย่อมจะเกิดอันตรายต่อเซล เมื่อความเข้มข้นของเกลือแร่ในเซลจะมีระดับสูงขึ้น

วิธีการที่มีผู้ศึกษาและแนะนำให้ปฏิบัติเพื่อความปลอดภัยของ จุลินทรีย์ที่ต้องการนำมา เก็บรักษาโดยขั้นตอนดังนี้คือ

1. ลดอุณหภูมิของสารแขวนลอย เซล (cell suspension) ลง นาทีละ 1° C จนถึงระดับ ที่ -20° C
2. ลดอุณหภูมิของสารแขวนลอย เซล (cell suspension) ลง นาทีละ 10° C จนลงถึงระดับ ที่ -60° C
3. ลดอุณหภูมิของสารแขวนลอย เซล (cell suspension) ลงอย่างรวดเร็ว ที่ –196 °ซ

ขั้นตอนวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี lyophilization

1. **เตรียมวัสดุ และสารอาหาร**

1.1. **Ampoules** เป็นหลอดแก้วขนาดเล็กชนิด เนื้อแก้วเป็นแบบ neutral หรือ soft galss ไม่นิยมใช้ pyrex เพราะเนื้อแก้วที่ทนไฟจะทำให้ยุ่งยากตอนใช้ไฟลนปิดหลอด (sealing) ต้องใช้เปลวไฟที่ร้อนจัดจึงจะทำให้แก้วอ่อนตัวได้ หลอด ampoule จะมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางโดยรอบด้านใน(inner diameter) ประมาณ 6 มิลลิเมตร ยาว 100 มิลลิเมตร และตรงขอบปากจะสอบแคบเข้ามาเล็กน้อย ส่วนท้ายของหลอดจะโค้งมน ปากหลอดต้องเรียบและไม่มีรอยร้าว ampoule ทุกหลอดที่จะนำไปใช้จะต้องล้างให้สะอาดโดยแช่ไว้ใน 2% HCl หนึ่งคืน แล้วล้างด้วยน้ำประปา 3 ครั้ง และน้ำกลั่นอีก 1 ครั้ง แล้วจึงนำไปอบให้แห้ง พร้อมที่จะนำไปใช้ต่อไป

1.2. **ถุงผ้าครอบหลอด ampoule** เป็นถุงผ้าลินินขนาด 2 x 3 ซม.^{2} เย็บ ติดกัน 3 ด้าน ใช้เปลี่ยนสำลีที่จุกหลอดก่อนนำเข้าเครื่อง freeze-dryer (ใช้ 1 ถุงต่อ หลอด) นำถุงผ้าเรียงในจานแก้ว (petridish) ห่อด้วยกระดาษน้ำตาล นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121°ซ นาน 20 นาที

1.3. **ป้ายรหัส (labels)** ป้ายรหัสจุลินทรีย์ ที่จะติดลงบน ampoule ไม่นิยมใช้ปากกาเขียนหมึกลงบนหลอดเพราะอาจจะลบเลือนไป เมื่อเก็บไว้เป็นเวลานานๆ จะทำให้เกิดการสับสนส่วนมากนิยมพิมพ์รหัสจุลินทรีย์ลงบนกระดาษกรอง (Whatman no. 1)โดยพิมพ์รหัสไว้ด้านบน,พิมพ์วันที่ไว้ด้านล่างแล้วตัดให้มีขนาด 4 มิลลิเมตร x 25 มิลลิเมตร สอดเข้าในหลอด ampoule (เตรียมไว้ตามข้อ 1.1) โดยหันด้านตัวเลขรหัสขึ้นข้างบน สอดป้ายรหัสลงใน ampoule อุดจุกสำลี ห่อหลอดแก้วด้วยกระดาษสีน้ำตาล นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121° C นาน 20 นาที แล้วจึงนำไปอบจนแห้งที่อุณหภูมิ 80° C

1.4. **สารแขวนลอย** (Suspending medium) หมายถึงของเหลวที่ใช้ผสมกับเซลจุลินทรีย์ เพื่อนำเข้าขบวนการ lyophilization สารนี้มีคุณสมบัติที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลแตกสลาย (protective agent) มีคุณสมบัติที่สามารถละลายกลับคืนสู่สภาพเดิมได้ง่าย โดยทั่วไปสารแขวนลอย (suspending medium)ที่ใช้ ควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. เป็นสารซึ่งสามารถดึงปริมาณน้ำในเซลจุลินทรีย์ให้คงเหลือไว้อย่างน้อย 1% เนื่องจากปริมาณน้ำที่เหลือนี้จะมีความสำคัญต่ออายุการเก็บรักษาจุลินทรีย์เป็นอย่างมาก ถ้าหากน้ำที่เหลือมีมากไปหรือไม่เหลือเลย จุลินทรีย์จะมีอายุการเก็บ (longivity) สั้น ตัวอย่างสารเช่น คาร์โบไฮเดรท, กลูโคสในปริมาณความเข้มข้น 5-10%
2. มีคุณสมบัติในการสลาย (neutralize) พิษจากอนุภาคของ Carbonyl ทั้งที่มีอยู่ในเซลของจุลินทรีย์และในสารละลายรอบๆ เซล เช่น สารผสมจำพวก amino-group glutamic acid
3. ไม่เป็นสารจำพวกเกลือแร่ (electrolytes) ที่อาจเป็นอันตรายต่อโปรตีน หรือ DNA ของเซล
4. มีคุณสมบัติที่เมื่อทำให้แห้งแล้วจะเป็นก้อนแข็งแบบร่วนง่าย (cake) ที่เมื่อนำมาละลายในน้ำ และอาหารเหลวจะคืนสภาพผสมกลมกลืนกันได้ง่าย
5. สามารถปกป้องเซลของจุลินทรีย์ไม่ให้แตกสลายจากขบวนการทำแห้ง (drying) ช่วยการระเหิดของของเหลวได้เร็วขึ้น และไม่ฟุ้งกระจายเมื่อนำหลอด ampoule ที่เป็นสุญญากาศมาเปิด ตัวอย่างสารที่นิยมใช้ เช่น horse serum, skim milk

สารแขวนลอย (Suspending medium) ที่เตรียมใช้ในห้องปฏิบัติการ คือ skim milk (Difco) 10% ดังนี้

ชั่ง skim milk 10 กรัม ผสม ผงชูรส (monosodium glutamate) 1 กรัม เติมน้ำกลั่น(อุ่นประมาณ 50°ซ) 100 มิลลิลิตร คนให้ละลายเข้ากันดี แล้วกรองด้วยผ้าขาวบาง แบ่งใส่ขวดแก้วฝาเกลียวขนาดเล็ก (4dram) ขวดละ 3-5

มิลลิลิตร แล้วนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 110°C นาน 10 นาที การนึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิต่ำเวลาสั้นจะทำ 2ครั้ง ติดต่อวันละครั้ง แล้วจึงนำไปเข้าตู้บ่ม เพื่อตรวจสอบสภาวะการปราศจากเชื้อ (sterility check)

1.5. **จุลินทรีย์** เพาะจุลินทรีย์ให้เจริญบนอาหารที่เหมาะสม (agar slant) บ่มให้เจริญเต็มที่ อายุของจุลินทรีย์จะมีผลต่ออายุของการเก็บรักษา กล่าวคือ ถ้าจุลินทรีย์อายุน้อยเกินไปหรืออายุมากเกินไป อัตราการตายในระหว่างขบวนการ lyophilization จะสูงมาก มีผู้ทดลองพบว่า อายุที่พอเหมาะคือ ระยะที่ผ่าน logarithmic phase ไปแล้ว หรือระยะที่เริ่มต้นของ stationary phase

โดยทั่วไป ระยะเวลาที่ใช้บ่มเชื้อคือ 1-2 วัน สำหรับแบคทีเรีย

3-5 วัน สำหรับ ยีสต์

5-7 วัน สำหรับ ราทั่วไปที่สร้างสปอร์

2. **วิธีการ เก็บรักษา**

2.1. **บรรจุเชื้อลง ampoule** ใช้ skim milk 10% ที่เตรียมไว้ ผสมจุลินทรีย์ในหลอดเชื้อให้เซลกระจายให้สม่ำเสมอ แล้วใช้ pasteur pipette ดูดสารผสมเซลใส่หลอด ampoule หลอดละ 0.1-0.2 มิลลิลิตร โดยประมาณ ดึงสำลีออกทิ้ง แล้วใช้ถุงผ้า(ข้อ1.2) ครอบปากหลอดแทนสำลี การบรรจุเชื้อลงหลอด ampoule นี้ควรทำอย่างรวดเร็ว และไม่ควรใช้เวลาเกิน 1 ชั่วโมง เพื่อจุลินทรีย์จะได้ไม่มีโอกาสแบ่งตัวในสารแขวนลอย

2.2. **นำ ampoule เชื้อใส่เครื่อง freeze dryer** เดินเครื่องในระยะ primary dry การเตรียมเครื่องมือและอุปกรณ์ ดูในหมายเหตุท้ายบท

2.3. **Ampoule constriction**

1. เช็ดโต๊ะให้สะอาดด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ
2. ใช้สำลีจุ่มแอลกอฮอล์ เช็ดกรรไกร, แท่งแก้ว
3. เปลี่ยนถุงผ้าครอบหลอดเป็นจุกสำลีที่ฆ่าเชื้อเตรียมไว้ก่อน
3. ใช้กรรไกรตัดจุกสำลี โดยให้สำลีอยู่ในหลอด 10 มิลลิเมตร
4. ใช้แท่งแก้วดันจุกสำลีเข้าไปในหลอด ลึกประมาณ 25-30 มิลลิเมตร
5. ใช้ไฟลนหลอดตรงจุดที่อยู่ห่างจากสำลี 10-12 มิลลิเมตร จนหลอดแก้วร้อนแดง และอ่อนตัว จึงดึงออกให้คอด

2.4. **การปิดหลอด**(sealing) นำหลอดที่คอดแล้วใส่ในเครื่อง(sealing head) ระยะ secondary dry เพื่อปิดหลอดในสภาพสุญญากาศโดยใช้ไฟลน(flame master hand torch) (ดูหมายเหตุ)

2.5. **การทดสอบสภาพสุญญากาศ** (Vacuum test) นำ ampoule เชื้อมาทดสอบสภาพสุญญากาศโดยใช้เครื่อง vacuum tester หลอดที่อยู่ในสภาพสุญญากาศจะเกิดประกายสีม่วงกับเครื่องทดสอบ ส่วนหลอดที่ไม่มีประกายสีม่วงเกิดขึ้นแสดงว่าไม่อยู่ในสภาพสุญญากาศ ต้องคัดทิ้ง

3. **การทดสอบการรอดชีวิตของเชื้อ** หลังจากเก็บไปประมาณ 2-4 วัน จึงนำ ampoule มาเปิดหลอดโดยการใช้ตะไบเลื่อยหลอดตรงกึ่งกลางสำลี หักปลายหลอดออกใส่น้ำยาฆ่าเชื้อ โดยให้เหลือสำลีค้างในหลอดเติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 3-4 หยดโดยใช้พาสเจอร์ปิเปต ทิ้งไว้ประมาณ 15-20 นาทีเพื่อให้สปอร์ดูดซับความชื้น จากนั้น streak ลงบนอาหารที่เหมาะสมเพื่อดูการเจริญและการสร้างสปอร์

4. **การเก็บหลอดเชื้อในคลัง** (Storage) เก็บ ampoule เชื้อใส่ถุงพลาสติก พิมพ์รหัสเชื้อและวันที่เก็บ และจำนวนหลอด ใส่กระดาษ สอดในถุง เก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4° C

5. **ข้อมูลคลังจุลินทรีย์** บันทึกข้อมูลคลังจุลินทรีย์ เช่น รหัส จำนวน ตำแหน่งที่เก็บหลอด และวันที่ ในแฟ้มข้อมูล และแฟ้มคอมพิวเตอร์

หมายเหตุ: คู่มือ การใช้งานเครื่อง Freeze-Dryer model Modulyo

1. การเปิดเครื่อง

1.1. เสียบปลั๊ก

1.2. ปิด drain valve(เบอร์ 9) ให้สนิท

1.3. เปิดสวิตซ์ Fridge (เบอร์ 1) รอจนกระทั่งอุณหภูมิบนหน้าปัด (เบอร์ 4) ลดลงถึง -45°C แล้วรอต่อไปอีก 10 นาที

2. Primary dry

2.1. นำ ampoule บรรจุเชื้อใส่ centrifuge tray

2.2. ตั้งเวลาการ centrifuge ประมาณ 20 นาที แล้วเปิดสวิตซ์มอเตอร์เครื่อง centrifuge

2.3. เปิดฝาครอบน้ำมันออกก่อนแล้วจึงเปิดสวิตซ์ vacuum pump

2.4. เดินเครื่องประมาณ 3 ชั่วโมง (สำหรับ Primary dry)

2.5. หลังจาก primary dry เสร็จแล้ว ปิดสวิตซ์ vacuum pump และ Fridge ตามลำดับ

2.6. ค่อยๆ เปิดปุ่ม drain valve เพื่อให้อากาศผ่านเข้า chamber อย่างช้าๆ (สังเกตเข็มบนหน้าปัทม์ vacuum gauge จะค่อยๆลดลงจนถึง 0)

2.7. เปิดล็อคฝาครอบ แล้วยกฝาครอบออก นำ ampoule ไปทำให้คอดตรงปลายหลอด (constrict) (ข้อ 2.3)

3. Secondary dry

3.1. ถอดตัวมอเตอร์ centrifuge ออก

3.2. นำ sealing head (manifold) วางบนฐาน ล็อคให้แน่น นำampoule ที่ทำให้คอดแล้วเสียบบน sealing head ให้แน่น

3.3. เปิดสวิตซ์ Fridge(เบอร์ 1)

3.4. เปิดสวิตซ์ vacuum pump

3.5. เดินเครื่องต่อไปอีก 2 ชั่วโมง (Secondary dry)

3.6. ใช้ไฟลนตรงคอคอด เพื่อปิดหลอด ภายใต้สูญญากาศ

4. การปิดเครื่อง

4.1. ปิดสวิตซ์ vacuum pump

4.2. ค่อยๆ เปิดปุ่ม drain valve เพื่อให้อากาศผ่านเข้า chamber อย่างช้าๆ (สังเกต vacuum chamberจะค่อยๆลดลงจนถึงศูนย์)

4.3. ปิดสวิตซ์ Fridge (เบอร์ 1)

4.4. ถอดปากหลอด ampoule ส่วนที่เหลือออกทิ้งในถังใส่เศษแก้ว

4.5. เช็ดและทำความสะอาด chamber

ข้อควรระมัดระวังในการใช้เครื่อง freeze dry

- **ความปลอดภัยในการปฏิบัติงาน**

1. ถ้าต้องการ freeze dry ตัวอย่างที่มี sodium azide ผสมอยู่ ควรตรวจสอบความเหมาะสม ของ vacuum pump และ pipeline สำหรับสารชนิดนี้ มิฉะนั้นอาจเกิดการระเบิดได้
2. sodium azideในบางครั้งใช้เป็น stabilizing agent ซึ่งสารนี้เป็นพิษและเมื่อแห้งจะกลายเป็นวัตถุระเบิดที่ร้ายแรง
3. ถ้า freeze dryตัวอย่างที่มี sodium azide ผสมอยู่จะเกิดปฏิกิริยาเคมีขึ้นได้ถ้ามีโลหะหนักเช่น ทองแดง, ตะกั่ว, สังกะสีและแคดเมียม ผลจากปฏิกิริยาจะทำให้เกิด metalic azide ซึ่งไม่อยู่ตัวและเกิดระเบิดได้ง่าย
4. เครื่อง Modulyo ไม่มีโลหะหนัก และเหมาะสำหรับการ freeze dry ตัวอย่างที่มี sodium azide และปั๊มยี่ห้อ Edwards รุ่น RV5 และ RV8 ก็เหมาะสำหรับการใช้งานนี้เช่นเดียวกัน
5. อย่างไรก็ตามถ้าไม่ได้ใช้ Edwards pump ควรตรวจสอบว่าปั๊มที่ใช้อยู่เหมาะสมสำหรับการ freeze dry ตัวอย่างที่มี sodium azide อยู่หรือไม่

- **ขั้นตอนการเตรียมเครื่องมือ Freeze dryer Modulyo**

(หมายเหตุ: ให้ใช้น้ำสบู่ล้างๆ ในการล้าง condenser chamber , connecting pipeline และอุปกรณ์อื่นๆ เพราะอุปกรณ์บางส่วนทำมาจาก acrylic ซึ่งล้างด้วย organic sovent ไม่ได้)

1. หมุน drain valve ทวนเข็มนาฬิกาจนสุดเพื่อเปิดวาล์วและเพื่อไล่น้ำที่อยู่ในส่วนก้นของ condenser chamber ออก เมื่อเสร็จแล้วปิดวาล์วโดยหมุนตามเข็มนาฬิกา
2. ถ้าตัวอย่างเป็นสารจำพวกกรดหรือสารอันตรายอื่นๆ ควรล้าง condenser chamber ด้วยน้ำสะอาด
3. ก่อนใช้ควรตรวจดูก่อนว่า condenser chamber แห้งหรือไม่
4. ควรทำความสะอาดเครื่อง Modulyo ให้สะอาดก่อนใช้
5. ตรวจ vacuum connection ตรงส่วนหน้าเครื่อง Modulyo และข้อต่อที่ vacuum pump
6. ถ้ามีน้ำแข็งเกาะที่ condenser chamber มากกว่า 2 ลิตร แก้ไขโดยการต่อ condenser extention tube เข้าไปใน condenser chamber โดยต่อปลายท่อด้านสั้นเข้ากับ vacuum pumping pipe และให้ปลายท่อตรงกับจุดกึ่งกลางของ condenser chamber ถ้าไม่ต่อ extention tube น้ำแข็งจะไปอุด vacuum pump connection ทำให้ภายในเครื่องไม่เป็นสุญญากาศและตัวอย่างจะละลาย
7. เลือกใช้เครื่องทำแห้งให้เหมาะสมกับตัวอย่าง และควรมีการทำความสะอาดและตรวจความเสียหายของ sealing ring ถ้า sealing ring ขาดหรือชำรุดให้เปลี่ยนใหม่

วิธีเก็บรักษา จุลินทรีย์แบบแช่แข็ง

(Cryopreservation Techniques for Microbial Cultures)

วันเชิญ โพธาเจริญ

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์ ศช.
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

มกราคม 2540

สารบัญ

	หน้า
คำนำ	25
ขั้นตอนวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี แช่แข็ง –196 °ซ	25
1. เตรียมวัสดุ และสารเคมี	25
2. การเตรียมจุลินทรีย์	25
3. อุปกรณ์	26
4. การย้ายจุลินทรีย์ใส่ cryotube	26
5. การนำหลอดเชื้อใส่ ถังไนโตรเจนเหลว / ตู้แช่แข็ง	26
6. วิธีการเพาะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อที่ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว	26
7. ข้อควรระวัง	26

การ เก็บรักษา จุลินทรีย์แบบแช่แข็ง

คำนำ

การเก็บรักษาจุลินทรีย์ในไนโตรเจนเหลว (Liquid nitrogen) เป็นอีกวิธีหนึ่งที่มีผู้นิยมกันแพร่หลาย เนื่องจากเป็นวิธีที่ทำได้ง่าย และสามารถเก็บรักษาจุลินทรีย์ได้หลายชนิด เช่น แบคทีเรีย รา ยีสต์ ไวรัส สาหร่าย และโปรตัวซัว เป็นต้น และในบางครั้งจุลินทรีย์บางชนิดที่เก็บรักษาโดยวิธี lyophilization ไม่ได้จะนำมาเก็บในไนโตรเจนเหลว เช่น *Neisseria, Haemophilus,* พวกโปรตัวซัวและสาหร่ายบางชนิด เป็นต้น การเก็บรักษา
จุลินทรีย์โดยวิธีนี้นอกจากจะทำได้ง่ายไม่เสียเวลาแล้ว ยังสามารถเก็บจุลินทรีย์ไว้ได้นาน โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติทางพันธุกรรม ข้อเสียของวิธีนี้คือไม่สะดวกในการใช้บริการจุลินทรีย์เพราะต้องอยู่ในสภาพเยือกแข็ง การขนส่งจึงไม่สะดวก และค่าใช้จ่ายในการดูแลสูงกว่าวิธีอื่น แต่วิธีนี้ก็ใช้ได้ผลเสมอสำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาโดยวิธีอื่นได้อีกแล้ว เช่น เห็ด เป็นต้น

หลักการในการเก็บรักษาจุลินทรีย์โดยวิธีนี้ คือการนำเซลของจุลินทรีย์ไปเก็บในที่อุณหภูมิต่ำกว่าจุดเยือกแข็งที่ -196 °C ในสภาพเช่นนี้อัตราการ metabolism ของจุลินทรีย์จะอยู่ในระดับต่ำมาก จึงเป็นเหตุผลที่
จุลินทรีย์ยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้นานๆ โดยทั่วๆ ไปการลดอุณหภูมิในระยะแรกจะดำเนินไปอย่างช้าๆ คือ ลดลง 1°C ทุกๆ นาที จนถึง -20 °C หลังจากนั้นจึงลดอุณหภูมิลงอย่างรวดเร็วจนถึง -196 °C

ขั้นตอนวิธีการ เก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยวิธี แช่แข็ง –196 °ซ

2. เตรียมวัสดุ และสารเคมี

2.1. Cryogenic vial หรือ cryotube เป็นหลอดพลาสติค ฝาเกลียว ขนาด 2 มิลลิลิตร (plastic screw-cap, 2 ml) ซึ่ง ฆ่าเชื้อแล้วโดยบริษัทผู้ผลิต

2.2. Cryoprotectant คือสารที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลถูกทำลายขณะอยู่ในสภาพแช่แข็ง ในที่นี้ใช้ 5% Dimethylsulfoxide (DMSO) หรือ 10% Glycerol ชนิด reagent gradeโดยผสมกันน้ำกลั่น นึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 °ซ นาน 15 นาที

2.3. ใช้ ปิเปต ดูด cryoprotectant ใส่ในcryotube (ข้อ 1) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร เตรียม 2 หลอด ต่อ 1 เชื้อ สำหรับวิธีแช่แข็ง –196 °ซ และ –150°ซ และ 5 หลอด ต่อเชื้อ สำหรับการเก็บที่ –80°ซ

2.4. เขียนรหัสจุลินทรีย์ลงบนหลอด โดยใช้ปากกา marker ที่เป็นหมึกสีดำ (permanent ink) เขียนข้างหลอด เนื่องจากหมึกสีอื่นมักจะหลุดง่าย

2. การเตรียมจุลินทรีย์

2.1. เพาะ จุลินทรีย์บนอาหารที่เหมาะสม
สำหรับยีสต์และแบคทีเรีย ให้เพาะเชื้อลงบน agar slant ที่เหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์แต่ละชนิด เช่น รา และ ยีสต์ ใช้อาหาร potato dextrose agar ส่วน แบคทีเรียแลคติคใช้อาหาร MRS agar หรือ GYP (glucose yeast extract agar) เป็นต้น และนำไปบ่มให้เจริญประมาณอายุให้อยู่ในระหว่างระยะแรกของ stationary phase หรือ ระยะสุดท้ายของ log phase ของ growth curve โดยทั่วไป ระยะเวลาที่ใช้บ่มเชื้อคือ 1-2 วันสำหรับแบคทีเรีย, 3-5 วันสำหรับ ยีสต์, และ 5-7 วัน สำหรับ ราทั่วไปที่สร้างสปอร์

2.2. ตรวจเช็ค จุลินทรีย์โดยดูการปนเปื้อน การเจริญ และลักษณะ ตรงตามชื่อ หรือ ตรงกับภาพที่ถ่ายไว้

3. **อุปกรณ์**

ถังบรรจุไนโตรเจนเหลว ตัวถังทำด้วยอลูมิเนียมอย่างดี 2 ชั้น ระหว่างชั้นจะเป็นสุญญากาศซึ่งจะทำหน้าที่เป็นฉนวนกั้นไม่ให้ความร้อนผ่านเข้ามา ในตัวถังมี canister 6 อัน สำหรับบรรจุ ampoule ตรงปากถังจะมีฝาปิดทำด้วยโฟม ซึ่งนอกจากจะทำหน้าที่เป็นฉนวนกั้นความร้อนแล้วยังเป็นช่องทางให้ไอไนโตรเจนระบายผ่านออกไปได้ ขนาดความจุของถัง 90 ลิตร แต่ควรเติมไนโตรเจนเพียงครึ่งความจุของถัง และควรหมั่นตรวจสอบระดับทุกเดือน โดยใช้ไม้วัด

4. **การย้ายจุลินทรีย์ใส่ cryotube**

4.1. *แบคทีเรีย หรือ ยีสต์* ใช้อาหารเหลวที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์แต่ละชนิด และ suspending medium (10% glycerol หรือ 5% Dimethyl sulphoxide) โดยใช้ pipet ดูดมา 5 ml ใส่ใน slant cultureผสมเซลให้เข้ากันโดยใช้ pasteur pipet ดูดเข้าและฉีดออกอย่างแรงจนเซลผสมกันดีกับ suspending medium ใช้ pasteur pipet ดูดสารละลายผสมในหลอดเชื้อใส่ใน ampoule หลอดละ 0.5 ml (10 หยด) โดยทำอย่างระมัดระวัง เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการ contamination

4.2. *รา* <u>ราที่สร้างสปอร์</u> ใช้วิธีการเดียวกับแบคทีเรียหรือยีสต์

<u>ราที่มีแต่เส้นใย</u>ใช้มีดผ่าตัดปลอดเชื้อ ตัดวุ้นอาหารตรงส่วนที่มีเชื้อเจริญตรงขอบโคโลนี ขนาด 0.5 x 0.5 มิลลิเมตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเกี่ยวชิ้นวุ้นใส่ในหลอด cryotube ที่เตรียมไว้(ข้อ 1) หลอดละประมาณ 5-6 ชิ้น ปิดฝา

5. **การนำหลอดเชื้อใส่ ถังไนโตรเจนเหลว / ตู้แช่แข็ง**

5.1. *ถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้แช่ (Ultra Low Temperature Freezer –150°ซ)* นำ cryotube ใส่ในกล่องเก็บเชื้อสำหรับถังไนโตรเจนเหลว นำกล่องเชื้อใส่ในช่องแข็งของตู้เย็นธรรมดา นาน 30 นาที ซึ่งประมาณว่า อุณหภูมิในหลอดจะลดลงถึง –20 °ซ จากนั้นจึงย้ายกล่องไปใส่ในตู้แช่แข็ง –80°ซ อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงย้ายลงถังไนโตรเจนเหลว หรือ ตู้แช่ แข็ง–150°ซอย่างรวดเร็ว ทำเครื่องหมายกล่อง และcanister บันทึก รหัสเชื้อ ตำแหน่งในตู้ จำนวนหลอด และวันที่ เก็บรักษา

5.2. *ตู้แช่แข็ง –80°ซ* (Low Temperature Freezer) นำหลอดเชื้อใส่ในช่องตู้แช่แข็ง –80°ซ โดยตรง พร้อมทั้งบันทึก รหัสเชื้อ ตำแหน่งในตู้ จำนวนหลอด และวันที่ เก็บรักษา

6. **วิธีการเพาะจุลินทรีย์จากหลอดเชื้อที่ เก็บรักษาในไนโตรเจนเหลว**

6.1. ใส่ถุงมือและหน้ากากให้เรียบร้อย

6.2. เปิดถังไนโตรเจนเหลว ดึง ampoule ออกมาใส่ในน้ำอุ่น 37 °ซ ใน breaker เพื่อให้มีการละลายอย่างรวดเร็ว การทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจะละลายช้ากว่าและเป็นอันตรายต่อเซล

6.3. เช็ดให้แห้ง และเช็ดรอบๆ บริเวณหลอดด้วยแอลกอฮอล 70% จึงเปิดหลอดฝาเกลียว

6.4. ใช้ sterile pasteur pipet ดูดเชื้อจาก ampoule ถ่ายลงบน agar plate แล้ว streak สำหรับส่วนที่เหลือในหลอดถ่ายลงใน medium broth

6.5. นำไปบ่ม, ตรวจดูการเจริญ และการ ปนเปื้อนก่อนนำไปใช้

6.6. บันทึกผล

7. **ข้อควรระวัง**

7.1. ระมัดระวังความปลอดภัยของผู้ใช้ เนื่องจากไนโตรเจนเหลวมีอุณหภูมิต่ำมากคือ -196°C ดังนั้นเมื่อไนโตรเจนเหลวหกหรือกระเด็นถูกผิดหนัง จะเกิดการชาและเจ็บปวด อันเนื่องมาจากความเย็นจัด (frostbite) และเมื่อกระเด็นเข้าตาจะเป็นอันตรายมาก ดังนั้นจึงควรสวมหน้ากากและใส่ถุงมือทุกครั้งที่จะเปิดถังไนโตรเจนเหลว

7.2. อย่าปิดฝาให้สนิท เนื่องจากไนโตรเจนเหลวระเหยออกมาทุกวัน ถ้าปิดฝาสนิท จะทำให้ไอระเหยสะสมอยู่ และเกิดความดันทำให้ถังชำรุดได้ จึงควรใช้ฝาที่ให้มากับถัง และควรเปิดฝาตรวจดูเสมอ เพื่อดูผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้นตามคอถัง ซึ่งอาจปิดกั้นทางระบายไอระเหยไนโตรเจนเหลวได้

7.3. เก็บถังไว้ในที่มีการถ่ายเทอากาศดี ถึงแม้ว่าไนโตรเจนเหลวไม่ใช่แกสพิษ และไม่ใช่แกสไวไฟ แต่ไนโตรเจนเหลวระเหยออกมาทุกขณะ ถ้าอยู่ในห้องที่อากาศถ่ายเทไม่ดี ระดับไนโตรเจนในอากาศจะสูงขึ้นเพราะไม่มีการระบาย ขณะเดียวกันออกซิเจนจะลดปริมาณลงเพื่อให้สมดุลย์กับระดับไนโตรเจน เนื่องจากไนโตรเจนเป็นแกสที่ปราศจากกลิ่นและรส การสูดอากาศอยู่ในห้องที่ระดับออกซิเจนต่ำกว่าปกติ อาจจะทำให้อ่อนเพลียและขาดออกซิเจน

ภาคผนวกที่ 6 แบบฟอร์มบันทึกชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ในคลังเก็บเชื้อ

BIOTEC Culture Collection

STOCK SHEET

Genus, species				BCC
Growth medium :			Growth temp :	
Freeze-dried ampoule (4 C) :			Liquid N(-196 C) :	
suspending medium :			suspending medium :	
วันที่เก็บเชื้อ		ตำแหน่งในตู้	วันที่เก็บเชื้อ	ตำแหน่งในตู้
จำนวนหลอด.	วันที่เช็ค stock	เหตุผลที่เอาเชื้อไป	จำนวนหลอด.	วันที่เช็ค stock	เหตุผลที่เอาเชื้อไป
12			2		
11			1		
10			Freezing (-152 C)		
9			suspending medium :		
8			วันที่เก็บเชื้อ		ตำแหน่งในตู้
7			จำนวนหลอด.	วันที่เช็ค stock	เหตุผลที่เอาเชื้อไป
6			2		
5			1		
4			Liquid paraffin(RT):		หลอด.
3			วันที่เก็บเชื้อ	ตำแหน่งในกล่อง	
2			Slant agar		หลอด.
1			วันที่เก็บเชื้อ	ตำแหน่งในกล่อง	
Freezing (-80 C)			Dist.water		หลอด.
suspending medium :			วันที่เก็บเชื้อ	ตำแหน่งในกล่อง	
วันที่เก็บเชื้อ		ตำแหน่งในตู้	Comment :		
จำนวนหลอด.	วันที่เช็ค stock	เหตุผลที่เอาเชื้อไป			
5					
4					
3					
2					
1					

ภาคผนวกที่ 7 ชนิดและจำนวน จุลินทรีย์ที่รอดชีวิตหลังการ เก็บรักษาที่ อุณหภูมิ –80°ซ

Viability test of fungi preserved at -80 C for 8-12 months				
Type of cultures	Number of isolates			
	Preserved	Tested	Viable	% Viable
Aquatic fungi	324	288	245	85
Insect pathogenic fungi	811	634	620	97.7
Fungi from lichen	247	247	246	99.6
Marine fungi	217	217	201	92.6
Soil fungi	632	84	84	100
Fungi from plant seed	94	84	84	100
Wood decayed fungi	355	355	195	86
Actinomycetes	451	172	169	98
Total	3131	2081	1844	88.6

ภาคผนวกที่ 8 แบบฟอร์มการรับฝากเก็บ จุลินทรีย์

BIOTEC Culture Collection (BCC)
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
National Science and Technology Development Agency
73/1 Rama VI Road, Rajdhevee, Bangkok 10400 Thailand
Telephone: 66-2-6448150-4 Fax: 66-2-6448107

ACCESSION FORM

(to be completed by the deposior)

1. Scientific name of organisms and author (s):	Type:	BCC number:
2. Source of isolation/locality/country:	Date of isolation:	Original code number:
3. Isolation by (name): Organization:	Identified by (name): Other collection number (if deposited):	
4. Description of strain:	Type strain: O Yes O No	Reference:

5. Received from (if you did not isolate this culture, please indicate name and address of person collection which maintained it befor you received the strain):

BIOTEC <---------- <---------- <----------

6. Application of the strain (production, assay, education, etc.):

7. References (Please attach reprints, if available):

8. Recommended medium and growth condition:

medium (please attach formula):

temperature: _____C incubation time:_____d interval of transfer:_____d

other (specified growth condition):

9. Recommended method (s) for long-term preservation:

- ☐ freezing ____C suspending medium:_____
- ☐ freeze-drying ____C suspending medium:_____
- ☐ other_____

10. Depositor Name:_____ Signature:_____

Institution:_____ Date:____/____/____

Address:_____

Telephone:_____ Fax:_____ Received by:_____

E-mail:_____ Date:____/____/____

ภาคผนวกที่ 9 บัญชีรายชื่อ จุลินทรีย์ สำหรับใช้ภายในหน่วยปฏิบัติการวิจัย ศช.

BIOTEC Culture Collection

List of Cultures, 1998

(For Internal Use Only)

(เอกสารแนบ-1)

ภาคผนวกที่ 10 **BIOTEC Culture Collection Homepage**

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทาง ศช.

➢ ภูมิหลัง

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ ศช. เป็นหน่วยงานที่ทำหน้าที่เก็บรักษาจุลินทรีย์เฉพาะชนิด ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย สายพันธุ์ราชนิดต่างๆที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติในประเทศไทย หน่วยปฏิบัติการแห่งนี้ได้จัดตั้งขึ้นอย่างเป็นทางการในปี พ.ศ. 2539 ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ เป้าหมายหลักของหน่วยฯ คือการเตรียมความพร้อมสำหรับการให้บริการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์ การรวบรวมข้อมูลจุลินทรีย์แต่ละสายพันธุ์เพื่อนำมาจัดระบบตามมาตรฐานสากล การสร้างเสริมความร่วมมือกับหน่วยงานอื่นๆทั้งในประเทศและต่างประเทศที่มีกิจกรรมการเก็บรักษาจุลินทรีย์ โดยเฉพาะด้านการแลกเปลี่ยนข้อมูล การรับฝากเก็บสำรองจุลินทรีย์ สำหรับหน่วยงานที่ขาดแคลนงบประมาณ เครื่องมือ และบุคลากรที่ชำนาญงาน เพื่อป้องกันการสูญหายของทรัพยากร จุลินทรีย์ของประเทศ

หน่วยฯ ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณจากโครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทยซึ่งบริหารและจัดการโดยศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

➢ วัตถุประสงค์

1. เพื่อรวบรวมและ เก็บรักษา สายพันธุ์ จุลินทรีย์ / วัสดุพันธุกรรม ที่คัดแยกจากแหล่งธรรมชาติของประเทศ
2. เพื่อให้บริการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์อย่างมีคุณภาพตามมาตรฐานสากล
3. เพื่อส่งเสริมและรองรับการดำเนินงานวิจัยเกี่ยวกับการอนุรักษ์ การทำอนุกรมวิธาน และการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์
4. เพื่อให้บริการจัดเตรียมและจัดหา สายพันธุ์ จุลินทรีย์สำหรับใช้ในงานวิจัยและการศึกษา
5. เพื่อรวบรวมและจัดการด้านข้อมูลจุลินทรีย์ให้เป็นระบบตามสากล
6. เพื่อเป็นศูนย์กลางความร่วมมือระหว่างหน่วยเก็บรักษาจุลินทรีย์ทั้งในประเทศ และต่างประเทศ โดยเน้นด้านการจัดการข้อมูล และงานวิจัยร่วม

➢ กิจกรรม

- **เก็บรักษาสายพันธุ์จุลิทรีย์**

  จุลินทรีย์ที่เก็บรักษาไว้มีจำนวนมากกว่า 3500 สายพันธุ์ ประกอบด้วย รา (3000) ที่แยกจากแมลง ดิน ซาก ใบไม้ น้ำจืด น้ำเค็ม ไลเคน และไม้ผุ , แบคทีเรีย (600) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นแอคติโนมัยสีท และสาหร่าย(65)

- **วิธีการเก็บรักษา**

  การเก็บรักษาจุลินทรีย์ ใช้เทคนิคต่างๆกัน ตามความเหมาะสมของจุลินทรีย์แต่ละชนิด และตามมาตรฐานสากล คือ

  - **วิธีถ่ายอาหาร (Subculturing)** เป็นวิธีที่ใช้สำหรับจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาด้วยวิธีแช่แข็งหรือแห้ง-แข็งได้

- **วิธีแช่แข็ง (Freezing at –150°C to –196°C)** ที่อุณหภูมิ –196 องศาเซลเซียส ในถังไนโตรเจนเหลวหรือ –150 องศาเซลเซียสในตู้แช่เยือกแข็งวิธีนี้ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ถาวร โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่ไม่สามารถเก็บรักษาโดยวิธี แห้ง-แข็งได้
- **วิธีแช่แข็ง(Freezing at –80°C)** ที่อุณหภูมิ –80 องศาเซลเซียส วิธีนี้ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์กึ่งถาวร โดยเฉพาะสายพันธุ์ที่อยู่ระหว่างการศึกษาทดลองภายในหน่วยงานวิจัยของศูนย์ ฯ และใช้เก็บกล้าเชื้อ (seed stock) ของสายพันธุ์ที่เก็บรักษาโดยวิธีแห้ง-แข็ง
- **วิธีแห้ง-แข็ง (freeze-drying)** ใช้สำหรับเก็บรักษาจุลินทรีย์ถาวร โดยเฉพาะจุลินทรีย์จำพวกแบคทีเรีย รา ที่สร้างสปอร์และยีสต์
- **วิธีเก็บภายใต้น้ำมันแร่** (Under paraffin oil) วิธีนี้ใช้สำหรับเก็บสายพันธุ์ระหว่างรอการทดสอบวิธีการเก็บถาวรแบบแช่แข็งหรือแห้ง-แข็ง

❑ **การจัดเตรียมและจัดหาสายพันธุ์จุลินทรีย์สำหรับให้บริการนักวิจัย**

เพื่อศึกษาหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เช่น สารที่มีฤทธิ์ ต้านโรคเริม เอดส์ มาลาเรีย วัณโรค เป็นต้น โดยเฉลี่ยแล้วหน่วยฯสามารถให้บริการจุลินทรีย์ เดือนละ 100-120สายพันธุ์

❑ **งานวิจัย**

- ทดลองวิธีการเก็บสาหร่ายถาวร งานเก็บรักษาสาหร่ายส่วนใหญ่ใช้วิธีการถ่ายอาหารซึ่งเป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองเวลา และอาจทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ จึงได้ทำการวิจัยหาวิธีการที่เหมาะสมเพื่อเก็บสาหร่ายอย่างถาวร
- งานวิจัยด้านการจัดจำแนกจุลินทรีย์โดยเฉพาะกลุ่มที่ยังไม่ได้จำแนกเพื่อให้มีชื่อวิทยาศาสตร์ หรือข้อมูลเพิ่มเติมในแต่ละสายพันธุ์เพื่อนำไปจัดพิมพ์แคตาลอก

➢ **ความร่วมมือกับสถาบันอื่น**

- **ในประเทศ**

มหาวิทยาลัยบูรพา (Marine Bacteria และ Marine Fungi)

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (Streptomycetes และ Soil Fungi)

กรมป่าไม้ (Xylariaceae)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (Microalgae)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (Lactic Acid Bacteria)

มหาวิทยาลัยรามคำแหง (ราจากไลเคนส์)

- **ต่างประเทศ**

Japanbioindustry Association (JBA), Japan

Kitasato Research Institute, Japan

Japan Collection of Microorganisms, Japan

Tokyo University of Agriculture, Japan

➢ **สถานที่ติดต่อ**

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาจุลินทรีย์เฉพาะทาง

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ

อาคารสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

73/1 ถนนพระราม 6 เขตราชเทวี กรุงเทพ ฯ 10400 โทรศัพท์ : 6448150 - 5 ต่อ 543 โทรสาร :6448107

E - mail : wanchern@ biotec. or.th URL : http://bcc.biotec.or.th/

➢ **ฐานข้อมูลจุลินทรีย์**

ข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ ที่บันทึกไว้ที่ประกอบด้วย

ชื่อวิทยาศาสตร์ ของเชื้อ , วัสดุ ถิ่นอาศัย และสถานที่ ที่คัดแยกมา, ชื่อคนที่แยกและจำแนก

วันที่ ที่แยก จำแนก และเก็บรักษา, วิธีการเก็บรักษา, อาหารและอุณหภูมิที่เหมาะสม สำหรับเพาะขยายจำนวน, คุณสมบัติของเชื้อที่สำคัญ, เอกสารอ้างอิงประกอบ

ข้อมูลนี้ได้บันทึกไว้ในโปรแกรม Microbial Information Management ซึ่งพัฒนาขึ้นสำหรับจัดทำฐานข้อมูลความหลากหลายของจุลินทรีย์ในประเทศ และส่วนหนึ่งของข้อมูลเหล่านี้ สามารถสืบค้นดูได้จาก URL : htpp://bcc.biotec.or.th/ จากโปรแกรมฐานข้อมูลนี้ จะสามารถเรียกดูข้อมูลความหลากหลายด้านชนิดพันธุ์, ด้านถิ่นกำเนิดตามภูมิภาคต่างๆของประเทศ และตามรายชื่อนักวิจัยผู้ทำการคัดแยกและจำแนก เป็นต้น

BIOTEC Culture Collection (BCC)

➢ **Background**

BIOTEC Culture Collection is a specialized collection of microorganisms, majority of fungi, isolated from Thailand. It is formally established in 1996 at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC), National Science and Technology Agency (NSTDA). The principle objectives of the collection are to provide safe deposition of microbial cultures isolated from Thailand, to manage strain data and relevant information of preserved cultures in a standard format system, and to collaborate, in term of information, with other collections in Thailand and foreign countries. The common problems in maintenance of cultures are the lack of fund, well-trained staff and properly technical management, BCC also encourages individual researchers with specialized 'personal ' collections to use it's facilities for safe duplicate conservation of their own.

The collection is financially supported by the Biodiversity Research and Training Program which managed by the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC).

➢ **Objectives**

The main objectives of the collection are:

- To collect and preserve microorganisms / microbial genetic resources (MGRs) isolated from the natural environment of Thailand
- To provide safe deposition of microbial cultures
- To stimulate and support the study and research work related to microbial diversity in Thailand
- To provide cultures for research and education
- To develop, manage and maintain the information system on strain data recording within a standard format
- To collaborate with other collections in Thailand in terms of strain data management and cooperative research

➢ Activities

▫ Culture Collection

The total number of cultures held at present is more than 3,500 strains which comprises of approximately 3,000 fungi isolated from insect, soil, leave litter, fresh water, marine, lichen and decayed-wood; 600 bacteria mainly actinomycetes , and 65 microalgae.

▫ Preservation of cultures

All cultures are maintained by the following methods:

- **Solid media.** This method is used for strains that cannot be freeze-dried or for which freezing has not yet proved to be reliable for prolonged period.

- **Frozen at -196 ° C** in liquid nitrogen storage tank or at -150 ° C in Ultra-Low Temperature Freezer. This method is used for a long term preservation purpose and for cultures that cannot be freeze-dried.
- **Frozen at -80 ° C** in deep freezer. This method is used to maintain working cultures for in-house research at BIOTEC and stock cultures to be freeze-dried as well.
- **Freeze-drying.** This method is used for a long-term preservation purpose for some bacteria and sporulating fungi and yeast.
- **Under liquid paraffin** This method is used only for a security method.

▫ Provision of Cultures

Cultures are supplied, 100-120 cultures monthly by average, to research laboratories within BIOTEC for research and screening purposes i.e. bioactive compounds, enzymes etc.

▫ Research

Since maintenance of cultures by subculturing is time consuming and caused instability of their genetic properties. Preservation of microalgae is investigated to develop the methods of freezing and freeze drying techniques for long term preservation of algae.
Taxonomic study of cultures, unidentified isolates in particular, is also carried out to obtain more information for identification purpose and additional of strain data as well.

➢ Cooperatives

In Thailand

Burapha University (Marine Bacteria and Marine Fungi)
Kasetsart University (Streptomycetes and Soil Fungi)
The Royal Forest Department (Xylariaceae)
Thailand Institute of Scientific and Technological Research (Microalgae)
Chulalongkorn University (Lactic Acid Bacteria)
Ramkamhaeng University (Fungi from Lichen)

Foreign countries

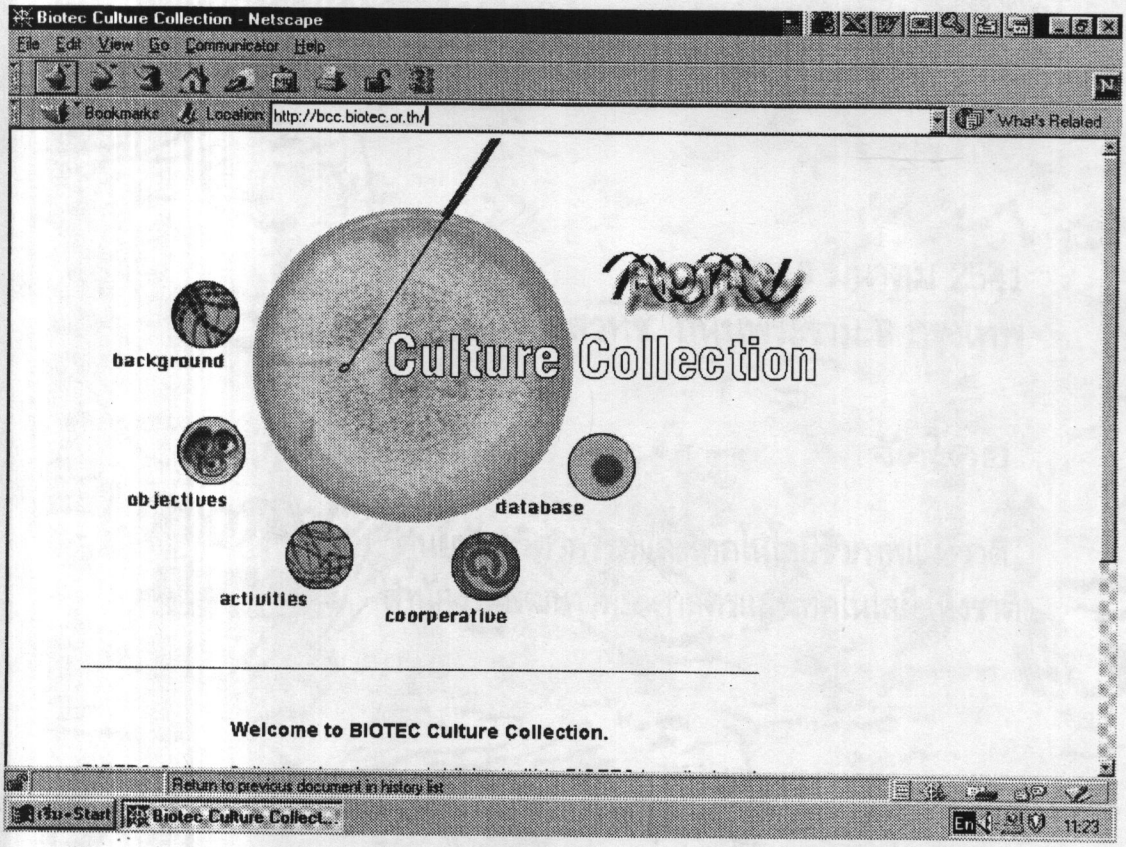
Japanbioindustry Association (JBA),Japan
Kitasato Research Institute,Japan
Japan Collection of Microorganisms,Japan
Tokyo University of agriculture,Japan

- **Contact address:**

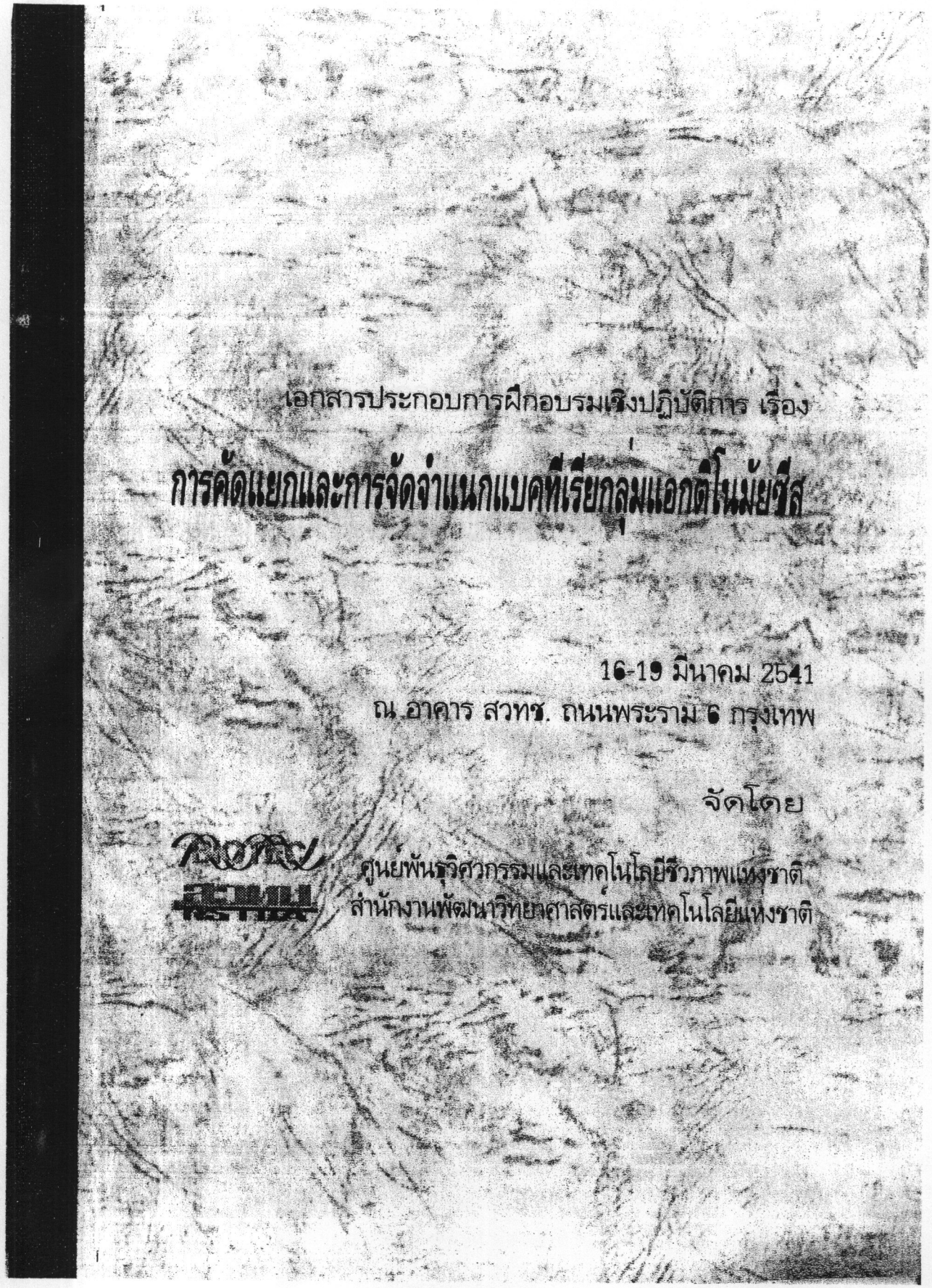
Office of The Director
BIOTEC Culture Collection
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
National Science and Technology Development Agency (NSTDA)
73/1 Rama VI Road, Bangkok 10400, Thailand
Tel. : 66-2-6448150-5 ext. 543,520 Fax : 66-2-6448107
E-mail: wanchern@biotec.or.th
URL : http//:bcc.biotec.or.th/

➢ Database

Data and information of cultures include name, code number, origin or source, habitat, location, date, maintenance method, stock number, growth medium and relevant information are recorded using database program developed by BIOTEC staff. Database on-line can be access at URL : http//:bcc.biotec.or.th/



ภาคผนวกที่ 11 การจัดฝึกอบรม



เอกสารประกอบการฝึกอบรมเชิงปฏิบัติการ เรื่อง

การจำแนกและการใช้ประโยชน์จากแบคทีเรียผลิตกรดอะซิติกและกรดแลคติก

10-11 มีนาคม 2541

ณ อาคาร สวทช. ถนนพระราม 6 กรุงเทพ

จัดโดย

ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

ภาคผนวกที่ 12 การเสนอผลงานทางวิชาการ

ปี 2540 (1 เรื่อง): เสนอผลงานภาคโปสเตอร์

เรื่อง: การจัดตั้งหน่วยเก็บจุลินทรีย์เฉพาะทาง ณ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช)

โดย: นางวันเชิญ โพธาเจริญ นายสายัณห์ สมฤทธิ์ผล และดร. มรกต ตันติเจริญ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สถานที่: งานประชุมประจำปี โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
ณ โรงแรมโลตัส ปางสวนแก้ว จังหวัดเชียงใหม่

วันที่: 17 -19 ตุลาคม 2540

บทคัดย่อ

จุลินทรีย์เป็นสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่มองไม่เห็นด้วยตาเปล่า มีทั้งให้ประโยชน์และเกิดโทษ ในธรรมชาติจุลินทรีย์อยู่ร่วมกับสิ่งมีชีวิตอื่นๆ หลากหลายชนิด เพื่อการมีชีวิตรอด จุลินทรีย์สามารถสร้างสารออกมา เพื่อย่อยสลายอาหาร หรือสร้างสารพิษเพื่อป้องกันตนเองจากการถูกรุกรานจากสิ่งมีชีวิตอื่น จากการศึกษาและค้นคว้าวิจัยอย่างต่อเนื่อง ประกอบกับเครื่องมือและอุปกรณ์ที่พัฒนาในรูปแบบใหม่ ๆ และทันสมัย ทำให้มนุษย์พบว่าสารที่จุลินทรีย์สร้างขึ้นนั้นสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้มากมาย จึงเป็นเหตุผล ที่มีการแยกจุลินทรีย์เพื่อศึกษาและค้นหาสายพันธุ์ที่ต้องการ จุลินทรีย์ที่ผ่านการคัดเลือกและมีคุณสมบัติที่น่าสนใจจึงมีจำนวนมากและควรได้รับการจัดเก็บที่ดี การดูแลและเก็บรักษาจุลินทรีย์เป็นภาระที่ต้องทำอย่างต่อเนื่องและรับผิดชอบสูง ในประเทศไทยมีหลายหน่วยงานที่มีการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับจุลินทรีย์ แต่จะมีปัญหาในเรื่องการดูแลและเก็บรักษาอันเนื่องมาจากงบประมาณและบุคลากรที่มีจำนวนจำกัด การจัดตั้งหน่วยงานทำหน้าที่เก็บรักษาจุลินทรีย์ จึงสำคัญและจำเป็นเพื่อความต่อเนื่องของงานวิจัย และการอนุรักษ์ทรัพยากรจุลินทรีย์ของประเทศโดยเฉพาะในสภาวะที่สภาพแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็ว นอกจากนี้หน่วยงานเก็บรักษาจุลินทรีย์ยังมีความสำคัญต่อการศึกษาวิจัย และอุตสาหกรรมที่เกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ในการเป็นแหล่งป้อนทรัพยากรชีวภาพเพื่อการผลิตที่รวดเร็วและได้มาตรฐาน

ปี 2541 (3 เรื่อง): เสนอผลงานภาคโปสเตอร์

เรื่อง: หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะทาง ศช.

โดย: นางวันเชิญ โพธาเจริญ นายทรงพล ผดุงพัฒน์ น.ส.สุวนีย์ ชุณหเมธา และดร. มรกต ตันติเจริญ
ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ

สถานที่: งานประชุมประจำปี โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรชีวภาพในประเทศไทย
ณ โรงแรมเจริญธานี จังหวัดขอนแก่น

วันที่: 12 -15 ตุลาคม 2541

บทคัดย่อ

หน่วยปฏิบัติการเก็บรักษาสายพันธุ์จุลินทรีย์เฉพาะชนิด (BIOTEC Culture Collection) ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ (ศช.) ได้ก่อตั้งอย่างเป็นทางการในปีพ.ศ.2539 วัตถุประสงค์หลักของโครงการคือ ให้บริการนักวิจัยที่ต้องการเก็บรักษาจุลินทรีย์อย่างปลอดภัย, เก็บรักษาและดูแลจุลินทรีย์ที่แยกได้ในประเทศเพื่อการใช้ประโยชน์ที่ยั่งยืน, และการจัดการข้อมูลจุลินทรีย์ตามมาตรฐานสากลเพื่อจัดทำแคตตาลอก และฐานข้อมูลจุลินทรีย์ไทย ปัจจุบันจำนวนจุลินทรีย์มี

มากกว่า 3,000 สายพันธุ์ ประกอบด้วยราที่ก่อโรคแมลง(1000) ราที่ขึ้นบนไม้ผุตระกูล Xylariaceae (350) ราน้ำจืด(360) รา น้ำเค็ม(160) ราที่ขึ้นบนเมล็ดพืช(80) ราที่แยกจากไลเคน (250) และราที่พบตามแหล่งดิน น้ำและเศษซากวัตถุทั่วไป(500) แบคทีเรียรวมทั้งแอคติโนมัยสีต(500) และสาหร่าย(70) วิธีการเก็บรักษาส่วนใหญ่ใช้วิธีแช่เข็งที่อุณหภูมิ -80°ซ, -150 °ซ และในน้ำมันพาราฟินซึ่งเก็บไว้ในห้องเย็นอุณหภูมิ 5°ซ สำหรับงานบริการจุลินทรีย์ในระยะแรกนี้จะเน้นเฉพาะงานวิจัย ภายในหน่วยปฏิบัติการวิจัยศช.ในโปรแกรมการศึกษาและใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์ เพื่อเป็นข้อมูลเพิ่มค่าและการจัดลำดับ ความสำคัญของสายพันธุ์ ข้อมูลที่สำคัญของจุลินทรีย์ที่มีได้นำมาจัดทำเป็นแคตตาลอก และฐานข้อมูล และเผยแพร่ผ่าน ระบบ internet ที่ ***URL: http://bioinfo.biotec.or.th/***

The specialized microbial culture collection (BIOTEC Culture Collection) was formally established at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) in 1996. The principle objectives of the program are to provide safe deposition of cultures for researchers; to preserve and maintain microorganisms isolated from Thailand for sustainable use; and to manage strain data using a standard format for a catalogue and Thai microbial database creation. Current collections includes insect pathogenic fungi (1,000) wood-decayed fungi of Xylariaceae (350), aquatic fungi (360), marine fungi(160), seed fungi (80), fungi from lichen (250), soil fungi (500), bacteria including actinomycetes (500), and microalgae (70). The preservation methods mainly used are freezing at -80 °C and -150 °C and under liquid paraffin oil storage at 5 °C cold room.The provision of cultures is initially provided within BIOTEC research laboratories for the microbial utilization programs. These are for value added and ranking of potential strains. The essential strain data of cultures being maintained are used to create a required database and produce the catalogue of cultures. The on-line database is now available at ***URL: http://bioinfo.biotec.or.th/***

เรื่อง: **Specialized Microbial Culture Collection at BIOTEC**

โดย: Wanchern Potacharoen, Morakot Tanticharoen and Malee Suwana-adth

National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)

National Science and Technology Development Agency (NSTDA)

Bangkok, Thailand

สถานที่: International Conference on Asian Network on Microbial Researches

Auditorium Graha Saabha Pramana

Gadjah Mada University, Yogyakarta, Indonesia

วันที่: 23 - 25 February 1997

บทคัดย่อ

The specialized microbial culture collection (BIOTEC Culture Collection) was established at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) in late 1996. The objectives of the program are to provide safe deposition of special types of microbial cultures isolated from Thailand; to develop, manage and maintain strain data using a standard format; to give support to research work related to microbial diversity in Thailand; and to collaborate with other collections in Thailand. Current collections include microorganisms of specific characteristics such as insect pathogenic fungi, xylariaceae, and actinomycetes. The total number of strains at present is more than 2,000 comprising insect fungi (1,000), wood-decayed fungi (xylariaceae) (170) aquatic fungi (66), lichen fungi (120), soil fungi (400), streptomycetes (400). and microalgae (70). These are normally preserved by a freezing method i.e. at -80 C in deep freezer and -196 C in a liquid nitrogen tank. Some strains of microalgae which do not survive freezing temperature are preserved on agar slants with interval subculturing. The liquid paraffin method is also used as a basic technique. The BIOTEC Culture Collection is part of the national (microbial) biodiversity program.

เรื่อง: **Microbial Culture Collection at BIOTEC**

โดย: Wanchern Potacharoen, Kasemsant Khupanumat, Boonchuay Srithammasak
and Morakot Tanticharoen
National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC)
National Science and Technology Development Agency (NSTDA)
Bangkok, Thailand

สถานที่: Asia-Pasific Mycologiccal Conference on Biodiversity and Biotechnology
Hua-Hin, Thailand

วันที่: 6-9 July 1998

บทคัดย่อ

The microbial culture collection (BIOTEC Culture Collection) was established, as a specialized collection, at the National Center for Genetic Engineering and Biotechnology (BIOTEC) in 1996. The objectives of the program are to provide safe deposition of special types of microbial cultures isolated from Thailand; to develop, manage and maintain strain data using a standard format; to give support to research work related to microbial diversity in Thailand; and to collaborate with other collections in both Thailand and foreign. Current collection includes microorganisms of specific characteristics such as insect pathogenic fungi, tropical Xylariaceae, and actinomycetes. The total number of strains at present is more than 3,000 comprising of insect pathogenic fungi (1,000), wood-decayed fungi (xylariaceae) (350) aquatic fungi (360), fungi from lichen (250), soil (450), marine (160), seeds (80), bacteria (500), and microalgae (70). These are normally preserved by a freezing method i.e. at -80 C in deep freezer and -196 C in a liquid nitrogen tank. Some strains of microalgae which do not survive freezing temperature are preserved on agar slants with interval subculturing. The liquid paraffin method is also used as a basic technique. The BIOTEC Culture Collection is part of the Thai (microbial) biodiversity program.