จากความก้าวหน้าของเทคโนโลยีสมัยใหม่ ทำให้มีการค้นพบคุณค่าของจุลินทรีย์ชนิดต่าง ๆ มากมาย รวมทั้งมีความต้องการใช้ประโยชน์จากจุลินทรีย์มากขึ้นเป็นลำดับด้วย จึงมีการเก็บรักษาจุลินทรีย์เหล่านั้นไว้ โดยจัดตั้งเป็นแหล่งเก็บรักษาจุลินทรีย์ที่ทำหน้าที่เก็บรักษา ดูแล และให้บริการ ดังนั้น จุลินทรีย์ทุกสายพันธุ์ที่เก็บรักษาไว้แล้วควรมีคุณภาพดี มีความถูกต้อง และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประสิทธิภาพมากที่สุด การดูแลรักษา และการตรวจสอบคุณภาพจึงเป็นสิ่งสำคัญและจำเป็นอย่างยิ่ง

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษา (1) การตรวจสอบคุณภาพด้านความมีชีวิตของแบคทีเรียที่เหลือ (viability) (2) การตรวจสอบความความบริสุทธิ์ (purity) และความคงคุณลักษณะด้าน phenotype (morphology และ biochemical test) และ (3) การตรวจสอบความคงคุณลักษณะด้วยวิธีทางพันธุกรรมในส่วนของยีน 16S rRNA

ได้ทำการทดลองคัดเลือกเชื้อแบคทีเรียที่มีความสำคัญทางการแพทย์และพบได้บ่อยในผู้ป่วยที่ได้จัดเก็บไว้แล้วโดยวิธีแช่แข็งที่อุณหภูมิ -70°ซ. ในช่วงระยะเวลา

2-12 ปี จำนวน 300 สายพันธุ์ ประกอบด้วย *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia* และ *Haemophilus influenzae* นำมาตรวจสอบคุณภาพในด้านต่าง ๆ พบว่า ค่าความมีชีวิตของแบคทีเรีย (viability) ส่วนใหญ่มีค่าอยู่ระหว่าง 5-11 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร และค่าที่ได้ไม่แตกต่างกันทั้งในสปีชีส์เดียวกันและต่างสปีชีส์กัน ยกเว้นเชื้อกลุ่มตายง่าย ได้แก่ *S. pneumoniae* และ *H. influenzae* ค่าความมีชีวิตอยู่ระหว่าง 5-7 $\log_{10}$CFU/มิลลิลิตร ผลการตรวจสอบความบริสุทธิ์ (purity) ด้วยตาเปล่า ความคงคุณลักษณะด้านสรีรวิทยาโดยวิธีทางชีวเคมี พบว่ายังคงความบริสุทธิ์และคงคุณสมบัติทางสรีรวิทยา ส่วนการตรวจสอบลักษณะทางพันธุกรรมด้วยเทคนิค PCR-RFLP โดยใช้ universal primers ขยายยีนส่วน 16S rRNA ได้ผลผลิตยีนขนาดประมาณ 996 bp เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Hae* III ส่วนใหญ่ให้แถบ DNA ต่างกัน ยกเว้นผลผลิตยีนของ *E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens* และ *E. cloacae* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Dde* I หรือ *Bst* BI จะให้แถบ DNA ต่างกัน ผลผลิตยีนของ *E. faecium* และ *E. faecalis* ให้แถบ DNA เหมือนกัน แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Alu* I จะให้แถบ DNA ต่างกัน สำหรับผลผลิตยีนของ *S. aureus* และ *S. epidermidis* ไม่สามารถตัดได้ด้วยเอนไซม์ *Hae* III ดังกล่าว แต่เมื่อตัดด้วยเอนไซม์ตัดจำเพาะ *Mnl* I จะให้แถบ DNA ต่างกัน ซึ่งใช้ยืนยันชนิดของเชื้อเดิมได้ จะเห็นได้ว่าแนวทางการศึกษาคุณภาพของจุลินทรีย์นี้เหมาะสมที่จะนำไปใช้ในการตรวจสอบคุณภาพของแบคทีเรียบางสายพันธุ์หลังการจัดเก็บ และเชื้อแบคทีเรียที่นำมาทำการศึกษาในครั้งนี้ ยังมีคุณสมบัติ และมีคุณภาพดีพอเหมาะสมที่จะนำไปใช้ประโยชน์ในงานด้านต่าง ๆ รวมทั้งการใช้ในงานด้านวิชาการได้

With the advent of new technologies microorganisms have found new uses in meeting human needs, thereby increasing their value. To be effective, however, the quality and stability of microbial strains must be assured, making quality control systems of utmost importance.

The objectives of this research study were to assess the viability of bacteria after freezing and to check on the purity, phenotype (both morphology and biochemistry) and genotype (determined by DNA analysis of the 16S rRNA gene) of the organisms collected.

Quality control is an extremely important feature in maintaining a culture collection. At the Department of Medical Sciences Thailand Culture

Collection (DMST-CC) most bacterial strains have been preserved by the freezing method. In this study, 300 strains of common pathogens including *Staphylococcus aureus, Staphylococcus epidermidis, Streptococcus pyogenes, Streptococcus agalactiae, Streptococcus pneumoniae, Enterococcus faecium, Enterococcus faecalis, Escherichia coli, Klebsiella pneumoniae, Serratia marcescens, Enterobacter cloacae, Pseudomonas aeruginosa, Acinetobacter baumannii, Burkholderia cepacia* and *Haemophilus influenzae* which have been preserved by freezing for between two and 12 years were investigated for their viability, purity, phenotype, and genotype. The findings indicated that the viability values of these bacteria were about 5-11 $\log_{10}$CFU/ml, and not significantly different among species, except for some fastidious bacteria such as *S. pneumonia* and *H. influenzae*, which exhibited viability values of about 5-7 $\log_{10}$CFU/ml. From these results, all cultures were deemed pure as examined by the eye, with phenotype, morphology and biochemical properties all within acceptable limits. Genotype studies were done using the PCR-RFLP technique with universal primers to amplify a portion of the 16S rRNA gene, followed by restriction analysis. The sizes of the amplified products from the bacteria were the same (996 bp), but the restriction patterns of PCR products generated by *Hae* III digestion were different. PCR products from *E. coli, K. pneumoniae, S. marcescens* and *E. cloacae* had the same *Hae* III digestion pattern but different pattern when digested with *Dde* I or *Bst* BI. PCR products from *E. faecium and E. faecalis* gave the same *Hae* III digestion pattern but had different patterns that could

be differentiated by *Alu* I digestion. PCR products from *S. aureus* and *S. epidermidis* could not be digested by *Hae* III but showed different patterns when digested with *Mnl* I. The results of the study showed the potential of these methods as tools for determining the quality of bacteriam strains after collection by the freezing method. It should be noted that the quality of all bacterial species in this study was acceptable for utilization and academic support.