

บทที่ 3

การเลี้ยงแบคทีเรีย

แบคทีเรียพบแพร่กระจายทั่วไปตามธรรมชาติ เช่น ในดิน ในน้ำ ในอากาศ ตามร่างกายของคนและสัตว์ บนผิวและภายในต้นพืช ในอาหารและวัสดุต่าง ๆ ตั้งแต่สภาวะแวดล้อมที่สมบูรณ์ไปจนถึงสภาวะแวดล้อมที่วิกฤต โดยบางแหล่งที่พบแบคทีเรียนั้นไม่ใช่แหล่งอาศัยตามธรรมชาติของแบคทีเรีย - แต่ไม่ว่าแบคทีเรียจะเจริญเติบโตอยู่ในสภาวะใดก็ตาม ย่อมต้องการปัจจัยที่เหมาะสมเพื่อการดำรงชีพของแต่ละชนิดซึ่งแตกต่างกัน เช่น แบคทีเรียบางชนิดต้องการสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน แต่แบคทีเรียบางชนิดต้องการสภาวะที่มีออกซิเจน เป็นต้น ปัจจัยที่สำคัญที่สุด คือ สารอาหารที่เป็นแหล่งพลังงาน แหล่งคาร์บอน แหล่งไนโตรเจน แหล่งเกลือแร่และวิตามิน และสารที่ส่งเสริมการเจริญอื่น ๆ แบคทีเรียต้องการสารเหล่านี้ในการเจริญเติบโต ซึ่งสารอาหารเหล่านี้มักมีส่วนประกอบแตกต่างกันไปตามความต้องการของแบคทีเรียแต่ละชนิด แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ในสารอาหารง่าย ๆ ที่มีเพียงเกลืออนินทรีย์และน้ำตาล ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนเท่านั้น แต่บางชนิดต้องการสารอาหารที่สลับซับซ้อนเป็นพิเศษ

อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียต้องประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ซึ่งต้องเลือกอันววยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ นอกจากนั้นต้องมีความชื้น ความเป็นกรด-ด่าง (pH) และอุณหภูมิเหมาะสม โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงแบคทีเรียแบ่งเป็น 2 ชนิดตามลักษณะของอาหาร คือ อาหารเหลว (liquid medium หรือ broth) ที่มีน้ำเป็นตัวทำละลายสารต่าง ๆ และอาหารแข็ง (solid medium หรือ agar) ซึ่งมีสารที่ช่วยให้อาหารแข็งตัว

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่นิยมเตรียมในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยาโดยทั่วไปจะมีส่วนประกอบ ดังนี้

1. **น้ำ** น้ำเป็นตัวทำละลาย ช่วยส่งเสริมปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ ในเซลล์แบคทีเรีย
2. **สารสกัด (extracts)** สารสกัด เช่น peptone, tryptone, yeast extract, soil extract และ meat extract เป็นต้น สารเหล่านี้สกัดโดยวิธีใช้เอนไซม์ย่อยและเคี้ยวจนเข้มข้น ทำให้มีแร่ธาตุต่าง ๆ ประกอบอยู่มากมาย

3. **สารช่วยให้อาหารแข็งตัว (solidifying agent)** สารช่วยให้อาหารแข็งตัวที่นิยม คือ วุ้น (agar) ซึ่งสกัดจากสาหร่ายสีแดง (red algae) เป็นสารประกอบของโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharide) ที่เรียกว่า D-galactopyranose ปริมาณที่ใช้ขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ในการเตรียมอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น ถ้าเป็นการเตรียมอาหารที่มีผิวเอียง (slant) หรืออาหารในจานเลี้ยงแบคทีเรีย (petri-dishes) ต้องเติมวุ้น 1.5-2.0% ถ้าต้องการเตรียมอาหารกึ่งแข็ง (semisolid) ต้องเติมวุ้นประมาณ 0.3-0.4% แต่เดิมเคยใช้เจลาติน (gelatin) เป็นสารช่วยให้อาหารแข็งตัว แต่มีข้อเสียคือ แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยเจลาตินได้ ทำให้อาหารที่เคยแข็งกลับเหลวและไม่เหมาะสมกับการใช้งาน ดังนั้นปัจจุบันจึงไม่นิยมใช้เป็นสารทำให้อาหารแข็งตัว แต่ใช้ในการจำแนกแบคทีเรียบางชนิดโดยอาศัยคุณสมบัติการย่อยเจลาตินนี้ เรียกว่า gelatin liquefaction test นอกจากนี้ยังมีการใช้ซิลิกาเจล (silica gel) เป็นสารทำให้อาหารแข็งตัว แต่เนื่องจากมีราคาค่อนข้างแพงจึงใช้ในปฏิบัติการพิเศษเท่านั้น เช่น การหาปริมาณสารอาหารที่ต่ำที่สุดที่แบคทีเรียต้องการ (minimum nutritional requirements)

4. **อินดิเคเตอร์ (indicators)** อินดิเคเตอร์เป็นสารเคมีที่เติมลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะเปลี่ยนสีไปตามสภาวะความเป็นกรด-ด่าง (pH) ของอาหาร ใช้บ่งชี้การใช้สารอาหารหรือการสร้างสารโดยแบคทีเรีย อินดิเคเตอร์ที่นิยมใช้ ได้แก่ metacresol purple, thymol blue, bromphenol blue, methyl red, phenol red, cresol red เป็นต้น

5. **สารคัดเลือก (selective agents)** สารคัดเลือกเป็นสารเคมีที่เติมลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด ในขณะที่เดียวกันเท่ากับเป็นการช่วยให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญเติบโตได้ดี เช่น 6.5% NaCl จะยับยั้งแบคทีเรีย Streptococci สายพันธุ์อื่น ๆ ยกเว้น *Streptococcus faecalis* ส่วน crystal violet จะยับยั้งแบคทีเรียแกรมลบ เป็นต้น

6. **สารเพิ่มเติมและเพิ่มพูน (additives and enrichment)** สารเพิ่มเติมและเพิ่มพูนเป็นสารที่เติมลงไปเพื่อเพิ่มความสมบูรณ์ให้แก่อาหาร ได้แก่ เลือด (blood) ซีรัม (serum) เป็นต้น สารนี้จะช่วยให้แบคทีเรียที่ไม่เจริญเติบโตในอาหารธรรมดาสามารถเจริญเติบโตในอาหารที่เติมสารเหล่านี้ได้

7. **สารอื่น ๆ (miscellaneous)** สารอื่น ๆ ที่เติมลงในอาหารเลี้ยงแบคทีเรียนอกจากที่กล่าวมาแล้วข้างต้น ตัวอย่าง เช่น สารจับออกซิเจน (reducing agent) ใช้ในกรณีที่ต้องการเลี้ยง

แบคทีเรียพวกแอนแอโรบส์ (anaerobe) เป็นต้น

สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

สารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่

1. แหล่งพลังงาน (energy source) เป็นสารอาหารที่แบคทีเรียนำไปสร้างพลังงานเพื่อการเจริญเติบโตและกิจกรรมต่าง ๆ ได้แก่ กลูโคส ไขมัน กลีเซอรอล โมเนีย เป็นต้น

2. แหล่งคาร์บอน (carbon source) เป็นสารอาหารที่แบคทีเรียนำไปสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่มีธาตุคาร์บอนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กลูโคส ซูโครส ฟรุคโตส ซิเตรต คาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

3. แหล่งไนโตรเจน (nitrogen source) เป็นสารอาหารที่แบคทีเรียนำไปสร้างเป็นส่วนประกอบของเซลล์ที่มีธาตุไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ได้แก่ กรดอะมิโน กลีเซอรอล โมเนีย กลีเซอรอล ไนเตรต เป็นต้น

4. แหล่งเกลือแร่ (mineral source) เป็นสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่ ฟอสฟอรัส โปแตสเซียม แมกนีเซียม แคลเซียม และเหล็ก แบคทีเรียต้องการแร่ธาตุเหล่านี้ในปริมาณที่สูงกว่าเกลือแร่อื่น ๆ ซึ่งมักจะอยู่ในรูปของเกลือ นอกจากนี้ยังมีแร่ธาตุที่แบคทีเรียต้องการในปริมาณน้อย ๆ เรียกว่า trace element ได้แก่ โคบอลต์ ทองแดง สังกะสี โมลิบดีนัม แมงกานีส เป็นต้น

5. วิตามินและ growth factor เป็นสารอินทรีย์ที่แบคทีเรียนำไปใช้เป็นสารตั้งต้นในการสังเคราะห์สารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

ประเภทของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงแบคทีเรียสามารถแบ่งตามองค์ประกอบได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. Minimal medium หรือ chemically defined medium หรือ synthetic medium ประกอบด้วยสารอินทรีย์ที่จำเป็นที่ทราบชนิดและมีปริมาณเท่าที่จำเป็นในการเจริญเติบโต มีสารอินทรีย์เป็นแหล่งพลังงานและคาร์บอน ซึ่งชนิดของสารอินทรีย์นั้นจะขึ้นอยู่กับความต้องการสารอาหารของแบคทีเรียในแต่ละชนิด

2. Complete medium หรือ Rich medium หรือ Chemically undefined medium อาหารชนิดนี้มีสารอาหารครบถ้วน ซึ่งได้จากสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น สกัดจากยีสต์ (yeast extract) ย่อยนมด้วยเอนไซม์ (tryptone) ย่อยเนื้อเยื่อสัตว์ด้วยเอนไซม์ (peptone) เป็นต้น

ชนิดของอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์ของการใช้อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย คือ เพื่อแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ เก็บรักษาสายพันธุ์แบคทีเรีย ศึกษาลักษณะการเจริญเพื่อการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย และเพาะเลี้ยงเซลล์และผลิตภัณฑ์จากแบคทีเรีย ดังนั้นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียจึงแบ่งตามลักษณะการใช้งานได้หลายชนิด ได้แก่

1. Enriched medium เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้เพื่อวัตถุประสงค์ในการเพิ่มปริมาณเซลล์ของแบคทีเรียชนิดที่ต้องการ แบคทีเรียเหล่านี้อาจอยู่ในธรรมชาติหรือในตัวอย่างที่นำมาเลี้ยง โดยการเติมสารอาหารที่เอื้ออำนวยต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ ซึ่งส่วนใหญ่จะเป็นอาหารเหลว

2. Selective medium เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่ใช้ในการคัดเลือกแบคทีเรีย ซึ่งแบคทีเรียที่ต้องการคัดเลือกเท่านั้นจึงจะสามารถเจริญเติบโตในอาหารชนิดนี้ได้ โดยการเติมสารอาหารที่แบคทีเรียที่ต้องการคัดเลือกสามารถใช้ได้ดี แต่แบคทีเรียชนิดอื่นไม่สามารถใช้ได้ หรือเติมสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ อาหารชนิดนี้ส่วนใหญ่มักเป็นอาหารแข็ง

3. Differential medium เป็นอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่เมื่อแบคทีเรียเฉพาะชนิดเจริญเติบโตแล้วสามารถเห็นความแตกต่างของลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียชนิดนั้น ๆ ได้ชัดเจน

ปัจจุบันอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียมีขายในรูปแบบผงอาหารสำเร็จ (dehydrate powder) ซึ่งมีหลายบริษัทที่ผลิตจำหน่าย หลักการในการเลือกใช้นั้นขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์และวิธีการใช้ โดยมีข้อควรระวัง ดังนี้

1. อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียนั้น ควรเป็นเนื้อเดียวกัน (homogeneous) ไม่จับกันเป็นก้อน
2. การเตรียมอาหารไม่ควรใช้ความร้อนสูงจนเกินไป เพราะอาจทำให้สารอาหารเสื่อมสภาพได้

3. ขณะเตรียมอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ควรเติมน้ำส่วนหนึ่งลงไปก่อน เมื่อจนอาหารละลายหมดแล้วจึงค่อยเติมน้ำส่วนที่เหลือจนครบปริมาตร

4. การทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ต้องทำให้ถูกวิธีกับอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียในแต่ละชนิด เพื่อให้อาหารนั้นคงคุณภาพที่ดี

การเลี้ยงแบคทีเรีย

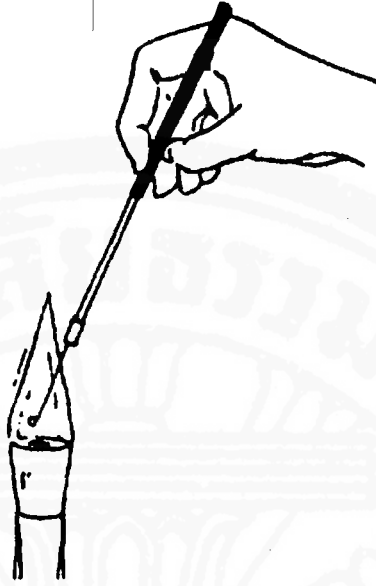
เทคนิคการนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหาร

เทคนิคการนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเหลวหรืออาหารแข็งเรียกว่า inoculation โดยการใส่ลูป (inoculating loop) เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle) หรือปิเปตต์ (pipette) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยวิธี aseptic technique

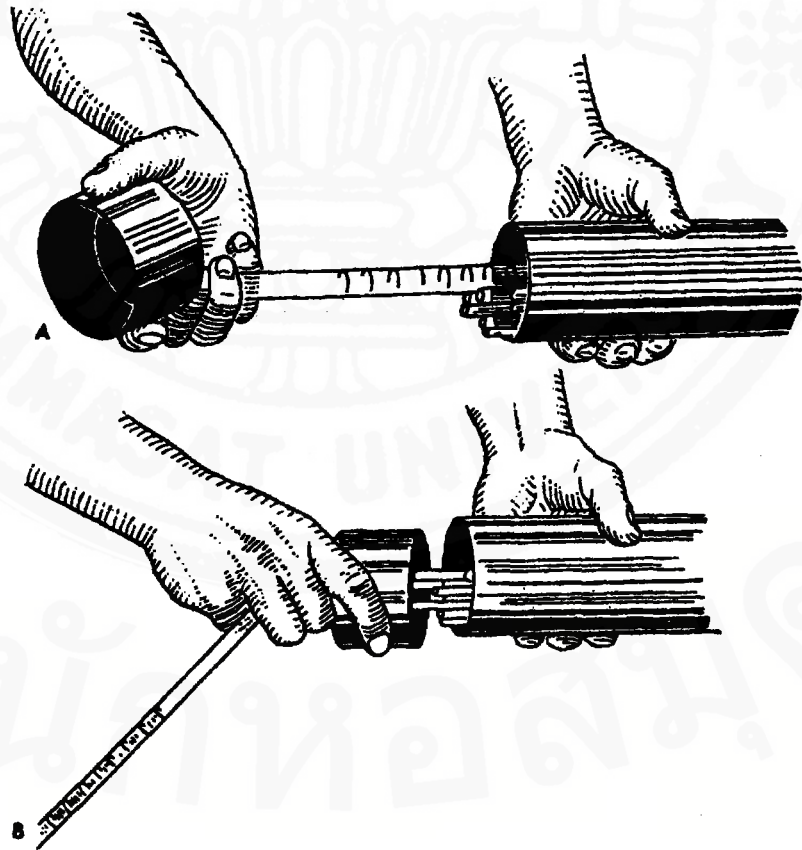
1. การใช้ลูป ลูปที่จะนำมาใช้ต้องผ่านการฆ่าเชื้อด้วยการลนเปลวไฟจากตะเกียงเบนซีนจนลวดร้อนแดง (รูปที่ 3-1) แล้วลนไฟฆ่าเชื้อบริเวณที่อยู่ถัดมาทางด้านมือจับ ซึ่งจะต้องเข้าไปภายในหลอดหรือภาชนะที่บรรจุแบคทีเรียหรืออาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ปลดลูปให้ลูปเย็นลง แล้วนำไปจุ่มในอาหารเหลวหรือตะแบคทีเรียจากอาหารแข็ง ถ้าเป็นอาหารเหลวแบคทีเรียจะติดมาเป็นแผ่นฟิล์มบาง ๆ ที่ลูป ส่วนอาหารแข็งแบคทีเรียจะติดปลายลูปเป็นสีเดียวกับโคโลนิของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง ระวังอย่าให้ลูปแตะข้างภาชนะในระหว่างที่ยกสูงขึ้น หลังจากตะแบคทีเรียที่ปลายลูปแล้ว ต้องคำนึงอยู่เสมอว่ามีแบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ที่ปลายลูป ดังนั้นเมื่อนำแบคทีเรียจากลูปไปใส่ลงในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียแล้ว จะต้องลนไฟฆ่าเชื้อที่ปลายลูปทันที โดยควรจะฝึกให้เป็นนิสัย

2. การใช้เข็มเขี่ยเชื้อ การใช้เข็มเขี่ยเชื้อมีวิธีการใช้เช่นเดียวกับลูป

3. การใช้ปิเปตต์ ก่อนนำปิเปตต์มาใช้ต้องนึ่งฆ่าเชื้อก่อน โดยจุดปลายด้านที่ใช้ลูกยางดูด-เป่าด้วยสำลี แล้วใส่ลงในกระป๋องโลหะไร้สนิม (stainless) หรือห่อด้วยกระดาษ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อด้วยหม้อนึ่งความดันไอน้ำอัดโนมิติ (autoclave) ที่อุณหภูมิ 121°C ความดัน 15 ปอนด์/ตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที เมื่อครบเวลานำไปอบในตู้อบลมร้อน (hot air oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 60°C จนกว่าจะแห้ง แล้วจึงนำมาวางไว้ที่อุณหภูมิห้องให้เย็น เมื่อจะใช้ต้องวางกระป๋องโลหะไร้สนิมให้อยู่ในแนวราบ เปิดฝากระป๋องและใช้มือหยิบปลายปิเปตต์ด้านที่ใช้ลูกยางดูด-เป่า และดึงปิเปตต์ออกมา แล้วรีบปิดฝาทันที ระวังอย่าให้ปลายด้านล่างของปิเปตต์สัมผัสกับสิ่งอื่นใด



รูปที่ 3-1 วิธีการเผาจุดจนหลอดร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อ



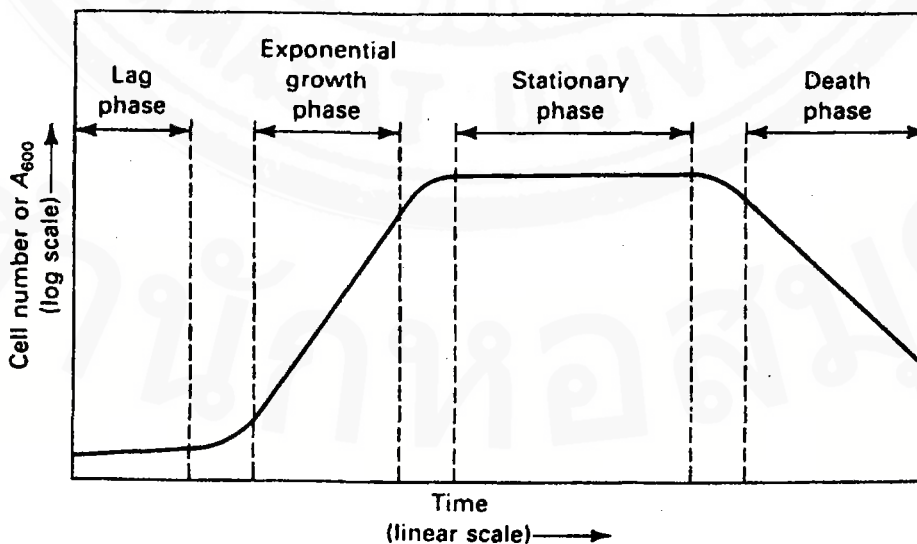
รูปที่ 3-2 วิธีการนำปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วออกจากกระป๋องโลหะไร้สนิม

เพราะอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนได้ (รูปที่ 3-2) เนื่องจากเป็นส่วนที่จะใช้สัมผัสกับอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย หลังจากใช้เสร็จแล้วห้ามวางปิเปตไว้บนโต๊ะปฏิบัติการโดยเด็ดขาด ให้นำไปแช่ในถังน้ำยาฆ่าเชื้อทันที

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเหลว

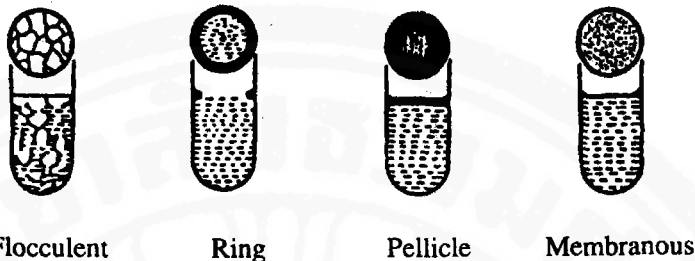
การนำแบคทีเรียไปใส่ในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียชนิดเหล่านั้น เราจะเรียกแบคทีเรียว่า inoculum ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่หยุดพักการเจริญเติบโตชั่วคราว ฉะนั้นเมื่อใส่แบคทีเรียลงไปใหม่ ๆ จะไม่มีการเจริญเติบโตในทันที เพราะแบคทีเรียจะต้องอาศัยระยะเวลาในการสร้างเอนไซม์และส่วนประกอบต่าง ๆ ที่จำเป็นในการสังเคราะห์ชีวโมเลกุล ระยะเวลาที่ไม่มีการเจริญเติบโตนี้ เรียกว่า lag phase ซึ่งระยะนี้จะใช้เวลานานเท่าใดนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย ระยะเวลาที่แบคทีเรียหยุดพักการเจริญเติบโต ชนิดของแบคทีเรีย และปริมาณออกซิเจน

เมื่อแบคทีเรียเริ่มมีการเจริญเติบโต จะมีการแบ่งตัวจาก 1 เซลล์เป็น 2 เซลล์ด้วยอัตราที่คงที่ และจำนวนเซลล์แบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นแบบทวีคูณ ระยะนี้จึง เรียกว่า exponential phase หลังจากแบคทีเรียเจริญเติบโตไปได้ระยะเวลาหนึ่ง พบว่าปริมาณสารอาหารและออกซิเจนจะลดลงเนื่องจากมีเซลล์แบคทีเรียหนาแน่นมากขึ้น เมื่อถึงจุดนี้แล้วการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจะคงที่ เพราะอัตราการเจริญเติบโตจะเท่ากับอัตราการตาย เรียกระยะนี้ว่า stationary phase และเมื่อยังคงเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปจะพบว่าปริมาณเซลล์แบคทีเรียจะลดลง เนื่องจากอัตราการตายสูงกว่าอัตราการเจริญเติบโต ซึ่งเรียกว่า death phase (รูปที่ 3-3)



รูปที่ 3-3 กราฟการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารเหลว

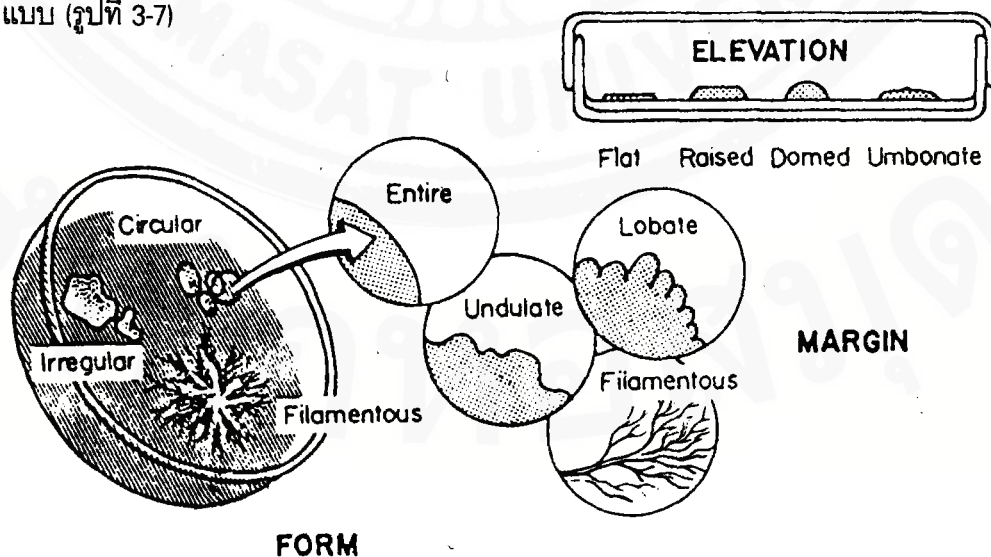
การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเมื่อตั้งหลอดทดลองที่บรรจุอาหารเหลวไว้นิ่ง ๆ สามารถจะจำแนกลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารเหลวนั้นได้ดังรูปที่ 3-4



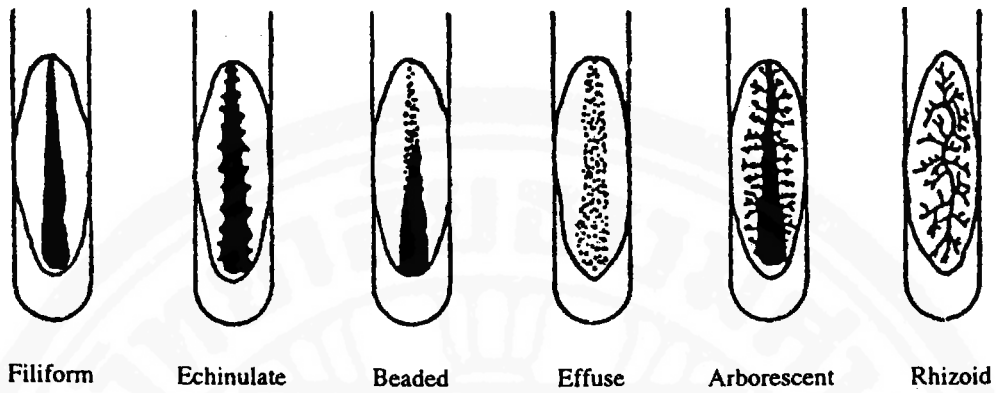
รูปที่ 3-4 ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารเหลวที่บรรจุในหลอดทดลองเมื่อตั้งไว้นิ่ง ๆ

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหารแข็ง

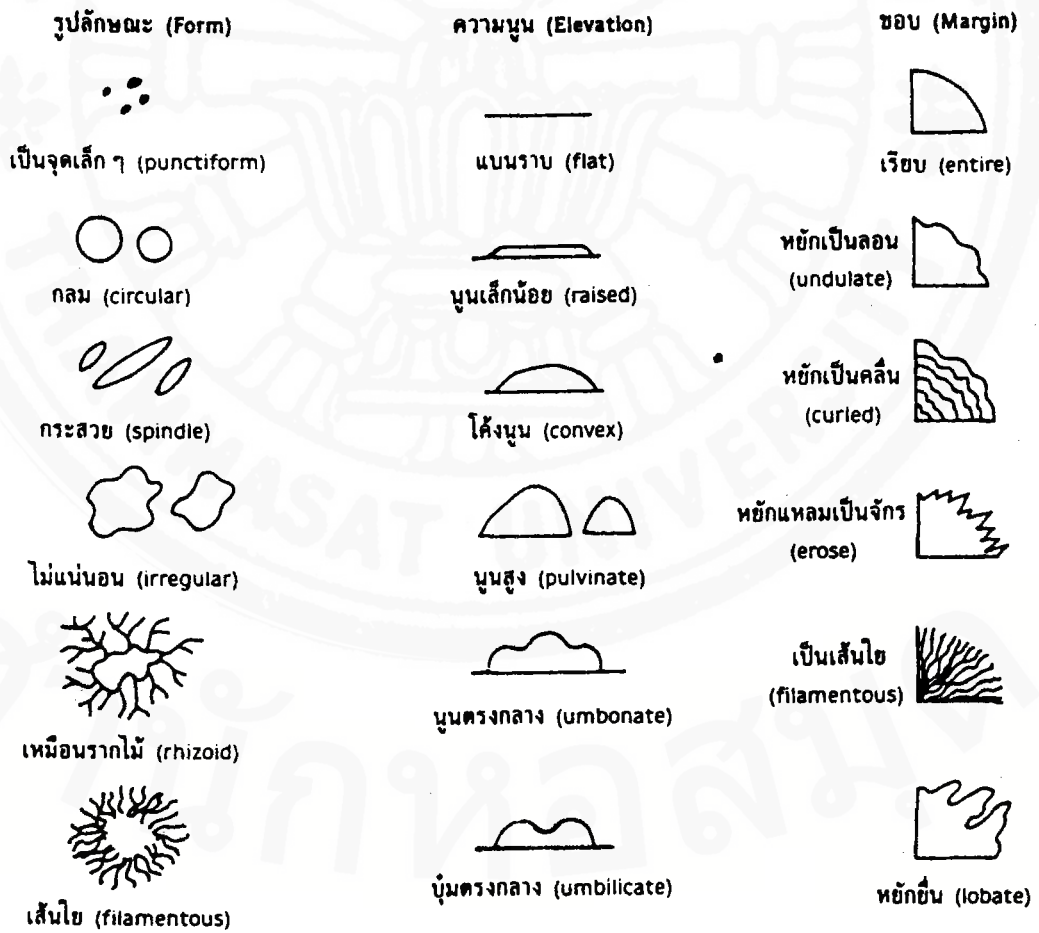
เมื่อนำแบคทีเรียไปเลี้ยงบนอาหารแข็ง แบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตอยู่บนผิวหน้าของอาหารแข็ง เพราะต้องการออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอน (electron) ในกระบวนการหายใจเพื่อสังเคราะห์พลังงานไปใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์ แบคทีเรียพวกนี้เรียกว่า aerobes แต่แบคทีเรียบางชนิดจะเจริญเติบโตภายในวุ้น ซึ่งเป็นพวกที่ไม่ต้องการออกซิเจน (anaerobes) ในกระบวนการสังเคราะห์พลังงาน หรือต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย (facultatives) การเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนอาหารแข็งนั้น สามารถมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ในลักษณะโคโลนีเดียว ๆ (รูปที่ 3-5) หรือกลุ่มของโคโลนี (รูปที่ 3-56) ซึ่งรูปร่างลักษณะของแบคทีเรียสามารถจำแนกได้หลายแบบ (รูปที่ 3-7)



รูปที่ 3-5 รูปร่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรีย (colonial morphology) บนอาหารแข็ง



รูปที่ 3-6 รูปร่างลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวแข็งของอาหารเมื่อใช้รูปขีดตามแนวความยาวของผิวหน้าอาหารแข็งในหลอดทดลองเพียง 1 ครั้ง



รูปที่ 3-7 การจำแนกรูปร่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง

ปัจจัยที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

ในห้องปฏิบัติการแบคทีเรียวิทยานั้น ต้องคำนึงถึงปัจจัยต่าง ๆ ทั้งทางเคมีและกายภาพที่มีผลต่อกิจกรรม (activities) ของแบคทีเรียในการเจริญเติบโต ปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมที่สำคัญและมีอิทธิพลต่อแบคทีเรีย ได้แก่

1. **อุณหภูมิ** มีผลต่อการดำรงชีพของแบคทีเรีย คือ ที่อุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ (maximum temperature) ปฏิกริยาเคมีและเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรียจะเกิดในอัตราที่เร็วขึ้น แต่โปรตีน กรดนิวคลีอิก และส่วนประกอบของเซลล์ซึ่งไวต่ออุณหภูมิอาจถูกทำลาย ส่วนอุณหภูมิต่ำสุดที่แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ (minimum temperature) ปฏิกริยาเอนไซม์ในเซลล์แบคทีเรียหลายชนิดจะลดลง อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) จะช่วยให้แบคทีเรียเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วและเพิ่มจำนวนได้มากที่สุด

2. **ความเป็นกรด-ด่าง (pH)** ค่าความเป็นกรด-ด่างจะมีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ โดยแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีช่วง pH ของการเจริญเติบโตแตกต่างกัน ซึ่งแบคทีเรียส่วนใหญ่จะเจริญเติบโตได้ดีในช่วง pH 5-9

3. **ออกซิเจน** แบคทีเรียมีการใช้หรือทนต่อออกซิเจนได้แตกต่างกัน ซึ่งสามารถแบ่งแบคทีเรียออกเป็นกลุ่ม ๆ ได้ ดังนี้

3.1 **แอนแอโรบส์ (anaerobes)** คือ แบคทีเรียที่มีระบบหายใจที่ไม่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย (terminal electron acceptor) แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

3.1.1 facultative anaerobe แบคทีเรียกลุ่มนี้จะทนต่อออกซิเจน แม้ว่าจะไม่สามารถใช้พลังงานจากการหมัก (fermentation)

3.1.2 obligate anaerobes แบคทีเรียกลุ่มนี้จะถูกทำลายโดยออกซิเจน

3.2 **แอโรบส์ (aerobes)** เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการหายใจโดยใช้ออกซิเจนไปรับอิเล็กตรอนในกระบวนการ oxidative phosphorylation แบ่งเป็น 3 ชนิด คือ

3.2.1 obligate aerobes แบคทีเรียกลุ่มนี้จะเจริญเติบโตได้ในบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น

3.2.2 facultative aerobes เป็นแบคทีเรียที่ต้องการหรือไม่ต้องการออกซิเจน แต่เจริญเติบโตได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจน

3.2.3 microaerophile เป็นแบคทีเรียที่ต้องการออกซิเจนในระดับต่ำกว่าบรรยากาศ

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการเลี้ยงแบคทีเรีย
2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกหัดเลี้ยงแบคทีเรียจนเกิดทักษะและความชำนาญ
3. เพื่อให้นักศึกษาสามารถจำแนกรูปร่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียได้

การทดลองที่ 1

การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเหลว (broth culture)

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. spatular ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
3. ตะเกียงบุนเส้น
4. พลาสติกปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (steriled plastic pipette) และลูกยาง
5. Nutrient broth จำนวน 8 หลอด
6. แบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* (slant culture), *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Bacillus megaterium* บน slant agar culture
7. ตัวอย่างดินและตัวอย่างน้ำ

วิธีการ

1. ติดฉลาก (label) nutrient broth หลอดที่ 1 ว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด ซึ่งเป็นอาหารเหลวที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย จะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย

2. nutrient broth หลอดที่ 2 เติมตัวอย่างดินขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟลงไปด้วยวิธี aseptic technique ตัดฉลากว่า “ตัวอย่างดิน” โดยถือหลอดอาหารเหลวในมือซ้าย แล้วใช้นิ้วก้อยของมือขวาคลายฝาเกลียวหรือดึงจุกสำล่ออก นำปากหลอดไปลงเปลวไฟจากตะเกียงเบนเส้นสักครู่ หลังจากนั้นจึงใช้ spatula ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตักตัวอย่างดินขนาดเท่าหัวไม้ขีดไฟลงในหลอดอาหาร นำปากหลอดไปลงเปลวไฟจากตะเกียงเบนเส้นอีกครั้ง แล้วปิดฝาหลอดอาหารให้สนิท

3. nutrient broth หลอดที่ 3 ใช้พลาสติกเทอริเทดท์ที่ฆ่าเชื้อแล้วเติมตัวอย่างน้ำ 2-3 หยดลงไป ด้วยวิธี aseptic technique ตัดฉลากว่า “ตัวอย่างน้ำ”

4. ใช้ลูปและแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Sarcina lutea*, *Staphylococcus aureus* และ *Bacillus megaterium* ใส่ลงใน nutrient broth หลอดที่ 4, 5, 6, 7 และ 8 ตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique แล้วตัดฉลากหลอดอาหารทั้ง 4 หลอด

5. นำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 8 หลอดไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิห้อง (30°C) โดยห้ามทำให้หลอดกระเทือนโดยเด็ดขาด

6. เมื่อครบ 3-7 วัน ให้บันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารเหลวนี้ เปรียบเทียบกับรูปที่ 3-4

ผลการทดลอง

หลอดที่	ชนิด inoculum	ลักษณะที่ปรากฏ
1	control	
2	ตัวอย่างดิน	
3	ตัวอย่างน้ำ	
4	<i>Escherichia coli</i>	
5	<i>Sarcina lutea</i>	
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	
7	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
8	<i>Bacillus megaterium</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 2

การเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารแข็ง (agar slant culture)

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. Nutrient agar ในหลอดทดลองจำนวน 7 หลอด
4. แบคทีเรีย 7 ชนิด คือ *Serratia macescence*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Enterobacter cloacae*, *Bacillus subtilis*, *Staphylococcus aureus* และ *Proteus vulgaris* บน slant agar culture

วิธีการ

1. ตัดฉลากชนิดของแบคทีเรียที่หลอดบรรจุอาหารแข็งแต่ละหลอด
2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรียมาขีดตามแนวความยาวผิวเอียงของอาหารแข็งในหลอด โดยขีดเพียง 1 ครั้งด้วยวิธี aseptic technique
3. นำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 7 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลา ให้บันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวเอียงของอาหารแข็งนี้เปรียบเทียบกับรูปที่ 3-5

ผลการทดลอง

หลอดที่	ชนิดแบคทีเรีย	ลักษณะที่ปรากฏ
1	<i>Serratia marcescens</i>	
2	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	
3	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
4	<i>Enterobacter cloacae</i>	
5	<i>Bacillus subtilis</i>	
6	<i>Staphylococcus aureus</i>	
7	<i>Proteus vulgaris</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....
.....
.....

ข้อเสนอแนะ

.....
.....
.....

การทดลองที่ 3

ความสัมพันธ์ระหว่างออกซิเจนอิสระกับการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงเบนซีน
3. Serological pipette ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. Nutrient agar tall เหลวในหลอดทดลองจำนวน 3 หลอด ซึ่งแช่ไว้ในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) 50°C

5. แบคทีเรีย 3 ชนิด คือ *Escherichia coli*, *Sarcina lutea* และ *Clostridium perfringens* ใน broth culture

วิธีการ

1. ตัดฉลากชนิดของแบคทีเรียที่หลอดบรรจุอาหารแต่ละหลอด
2. ใช้ปิเปตต์ดูดแบคทีเรีย 0.5 มิลลิลิตร มาใส่ลงในหลอดบรรจุ Nutrient agar tall แต่ละหลอดด้วยวิธี aseptic technique
3. ค่อย ๆ หมุนหลอดให้แบคทีเรียและ Nutrient agar tall ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน ระวังอย่าให้ออกซิเจนจากอากาศละลายเข้าไป โดยอย่าทำให้เกิดฟองอากาศเป็นอันขาด (รูปที่ 3-8)

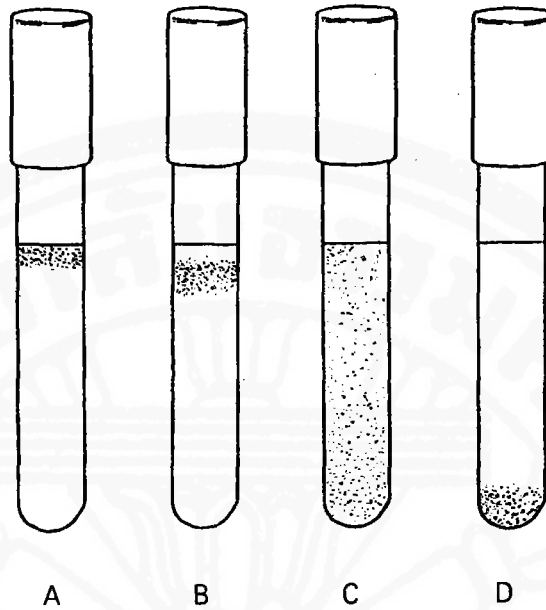


รูปที่ 3-8 การหมุนหลอดให้แบคทีเรียและ Nutrient agar tall ผสมเข้าเป็นเนื้อเดียวกัน

3. ตั้งทิ้งไว้ให้อาหารแข็งตัว แล้วนำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 3 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
4. เมื่อครบเวลา ให้บันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียภายในเนื้อของอาหารนี้ เปรียบเทียบกับรูปที่ 3-9

ผลการทดลอง

หลอดที่	ชนิดแบคทีเรีย	ลักษณะที่ปรากฏ
1	<i>Escherichia coli</i>	
2	<i>Sarcina lutea</i>	
3	<i>Clostridium perfringens</i>	



รูปที่ 3-9 การเจริญเติบโตของแบคทีเรียแบบต่างๆ ใน agar tall

- A : Aerobe
- B : Microaerophile
- C : Facultative
- D : Strick anaerobe

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....