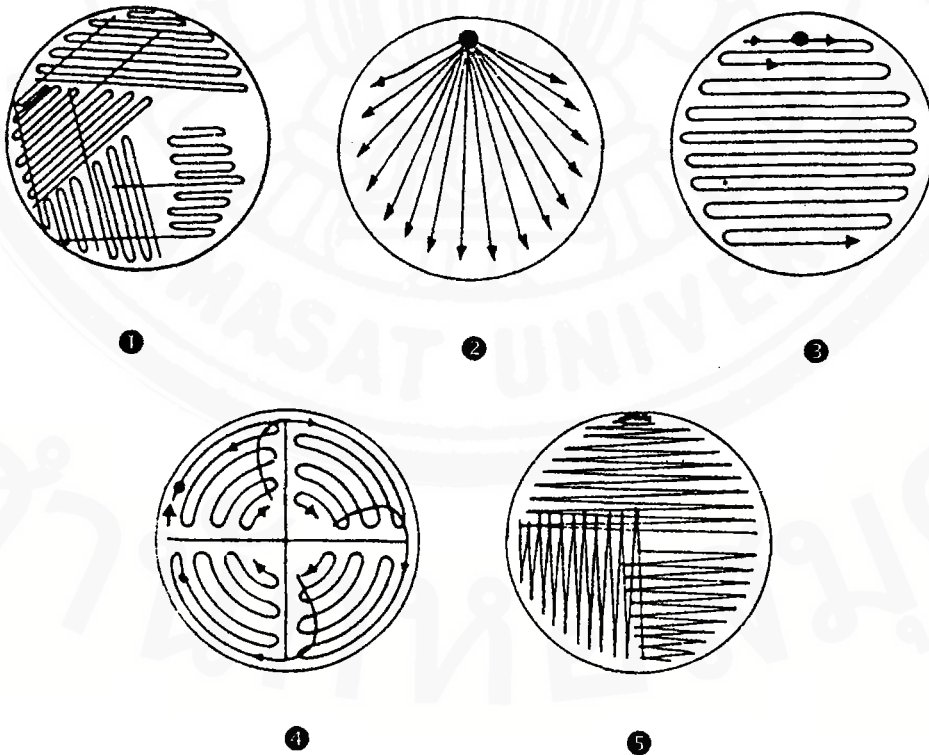


การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์และการนับจำนวนแบคทีเรีย

การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์

การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์เป็นขั้นตอนสำคัญที่จะทำให้ได้แบคทีเรียซึ่งเกิดจากแบคทีเรียเพียง 1 เซลล์หรือ 1 โคลน (clone) เพื่อนำไปศึกษารูปร่างลักษณะของโคโลนีและเซลล์แบคทีเรีย การติดสีแกรม การทดสอบคุณสมบัติทางชีวเคมี ปฏิกริยาต่อสารต้านจุลชีพต่าง ๆ ซึ่งจะใช้ในการจำแนกชนิด (identification) ของแบคทีเรานั้น วิธีที่ใช้ในการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์มีหลายวิธี ได้แก่ streak plate, spread plate, pour plate เป็นต้น โดยทั่วไปวิธีที่นิยมใช้ในการแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ คือ การ streak plate ซึ่งจะได้แบคทีเรียบริสุทธิ์ในรูปของโคโลนีเดี่ยว ๆ และในแต่ละโคโลนีจะมีแบคทีเรียประมาณ 10^6 - 10^9 เซลล์ รูปแบบ (patterns) ในการ streak plate เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ นั้นมีหลายรูปแบบ (รูปที่ 4-1) แต่หลักการนั้นจะเหมือนกัน คือ พยายามกระจายเซลล์แบคทีเรียแต่ละเซลล์ให้แยกห่างออกจากกัน เพื่อโคโลนีที่เจริญเติบโตมาจากแบคทีเรียเพียงเซลล์เดียวนั้นจะแยกอยู่อย่างเดี่ยว ๆ ไม่มาเชื่อมติดกัน



รูปที่ 4-1 รูปแบบในการ streak plate

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการเลี้ยงและแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์
2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกหัดเลี้ยงและแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์จนเกิดทักษะและความชำนาญ
3. เพื่อให้นักศึกษาสามารถแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ด้วยวิธี streak plate จนได้โคโลนีเดี่ยว ๆ และสามารถจำแนกรูปร่างลักษณะโคโลนีของแบคทีเรียนั้นได้

การทดลองที่ 2

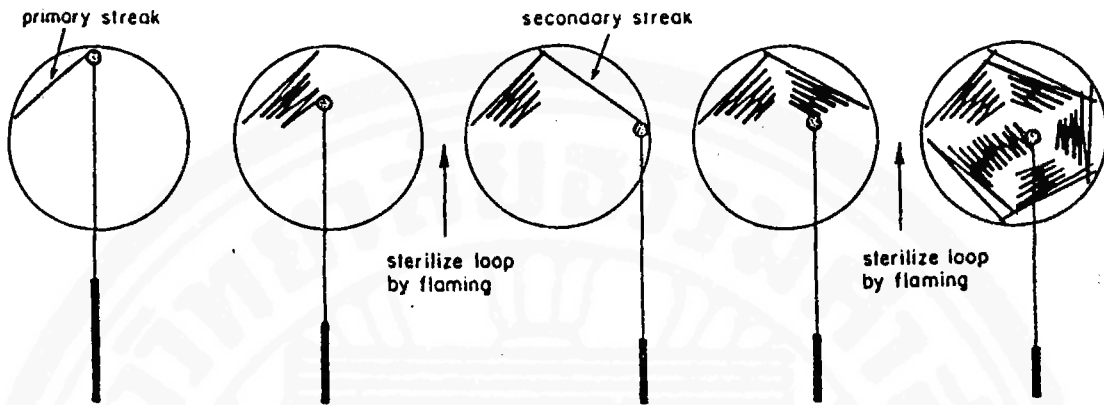
การแยกแบคทีเรียบริสุทธิ์ (streak plate)

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. Nutrient agar ใน petri-dishes จำนวน 6 plate (nutrient agar plate)
4. แบคทีเรีย 3 ชนิดในอาหารเหลวหลอดเดียวกัน คือ *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens* และ *Escherichia coli*

วิธีการ

1. ฆ่าเชื้อที่ลูปด้วยการลนเปลวไฟจากตะเกียงบุนเส้นจนร้อนแดง ปล่อยให้เย็นลง 10-15 วินาทีหรือแตะที่ผิวหน้าอาหารแข็ง
2. เขย่าหลอดอาหารเลี้ยงแบคทีเรีย แล้วใช้ลูปจุ่มแบคทีเรียในอาหารเหลวให้ได้ฟิล์มบาง ๆ ติดขึ้นมา นำมาขีด (streak) บนผิวของอาหารแข็งด้วยวิธี aseptic technique โดยขีดเป็น 4-5 แนว (ดังรูปที่ 4-2) เริ่มจากด้านหนึ่งของ plate และก่อนเริ่มแนวใหม่ต้องเผาสุบลูปฆ่าเชื้อก่อน แล้วให้แนวขีดใหม่ที่บรอยขีดเดิมเล็กน้อย เพื่อตั้งแบคทีเรียที่กระจายออกไปบ้างแล้วให้กระจายออกไปให้ดียิ่งขึ้น
3. นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยคว่ำผิวหน้าอาหารลง เมื่อครบเวลาให้บันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบนผิวหน้าของอาหารแข็งนี้เปรียบเทียบกับรูปที่ 3-7



รูปที่ 4-2 เทคนิคการขีด (streak) แบคทีเรียบนผิวหน้าอาหารแข็งเพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยว ๆ

ผลการทดลอง

ชนิดแบคทีเรีย	สีของโคโลนี	ลักษณะโคโลนี
<i>Sarcina lutea</i>	เหลือง	
<i>Serratia macescence</i>	ส้ม	
<i>Escherichia coli</i>	ครีม	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....

การนับจำนวนแบคทีเรีย

การเจริญเติบโตของแบคทีเรียเป็นการเพิ่มส่วนประกอบภายในและโครงสร้างของเซลล์แบคทีเรียโดยที่มีการแบ่งเซลล์หรือไม่มีการแบ่งเซลล์ก็ได้ ซึ่งถ้าไม่มีการแบ่งเซลล์ก็จะเป็นการเพิ่มของขนาดและมวล (น้ำหนัก) แต่ถ้ามีการแบ่งเซลล์ก็จะมีทั้งการเพิ่มทั้งจำนวนและมวลของเซลล์ โดยปกติแบคทีเรียจะมีวงจรชีวิต (life cycle) สั้น ดังนั้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงมีทั้งการเพิ่มมวลและจำนวนเซลล์ไปพร้อมกัน ในการวัดอัตราการเจริญเติบโต (growth rate) ของแบคทีเรียจึงสามารถวัดได้ทั้งการเพิ่มมวลและจำนวนเซลล์ของแบคทีเรีย อย่างไรก็ตามในการนับจำนวนแบคทีเรียจะได้ผลดีเพียงใดนั้น ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น การเก็บรักษาตัวอย่างแบคทีเรีย อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย อุณหภูมิและระยะเวลาในการบ่มแบคทีเรีย ความละเอียดรอบคอบของผู้ปฏิบัติงาน และปัจจัยแวดล้อมอื่น ๆ

การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

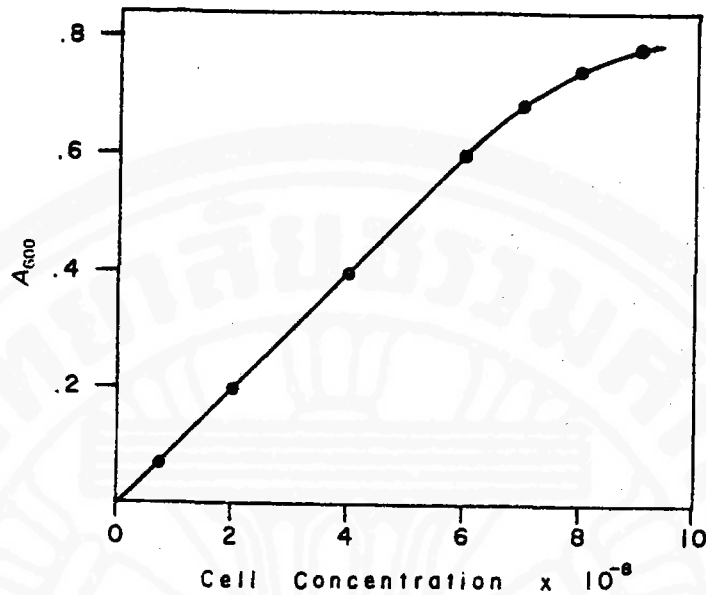
การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ได้แก่

1. การวัดมวลเซลล์ (cell mass)

การวัดมวลเซลล์จะวัดในรูปของน้ำหนักแห้งหรือน้ำหนักเปียก ซึ่งเป็นวิธีอ้างอิง (reference method) สำหรับเป็นมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธีอื่น ปัจจุบันวิธีวัดมวลเซลล์ที่นิยมที่สุด คือ การวัดความขุ่นของเซลล์ (cell density หรือ cell turbidity) โดยใช้เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) วัดความขุ่นของเซลล์แบคทีเรียในอาหารเหลว ซึ่งจะได้ค่า absorbance (A) หรือ transmittance (%T) วิธีนี้จะอาศัยหลักการหักเหของแสงเมื่อส่องถูกเซลล์แบคทีเรีย ความยาวคลื่นแสง (λ) ที่เหมาะสม คือ 600 nm หลังจากได้ค่า absorbance แล้วต้องนำไปอ่านจาก calibration curve หรือ standard curve ที่ plot ระหว่างค่า absorbance และจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่หาโดยวิธี total count หรือ viable count ซึ่ง calibration curve นี้จะแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรีย ตัวอย่าง calibration curve ระหว่างค่า absorbance (A_{600}) และปริมาณเซลล์ของแบคทีเรีย *Escherichia coli* ในการทดลองทั่วไปสามารถคาดคะเน (assume) จำนวนเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli* ได้จากค่า (A_{600}) $0.1 = 1.0 \times 10^8$ เซลล์/มิลลิลิตร (รูปที่ 4-3)

2. การนับจำนวนเซลล์ (cell number)

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทำได้โดยตรง คือ นับจำนวนเซลล์ทั้งหมด (total count)



รูปที่ 4-3 Calibration curve ระหว่าง absorbance (A_{600}) และปริมาณเซลล์แบคทีเรีย *Escherichia coli*

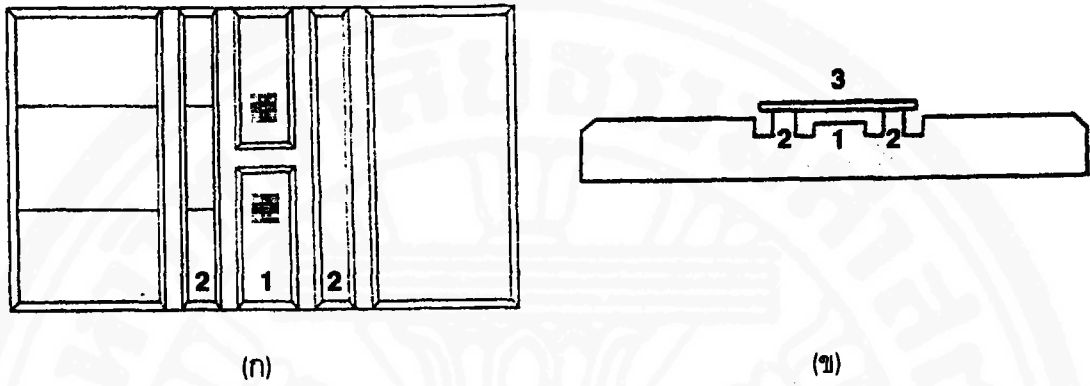
ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต หรือโดยทางอ้อม คือ นับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต (viable count) เท่านั้น ดังนี้

2.1 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี total count

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิตทำได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งจำเป็นต้องอาศัย counting chamber ที่เป็นแผ่นแก้วหนา ตรงกลางมีร่องแบ่งเนื้อแก้วออกเป็นส่วน ๆ และมีตารางอยู่ 2 ด้าน (รูปที่ 4-4) ความลึกของเนื้อแก้วบริเวณที่มีตารางถึงด้านล่างของ cover slip ขึ้นอยู่กับชนิดของ counting chamber คือ ถ้าเป็น Petroff-Hausser bacteria counter = 1/50 มิลลิเมตร เหมาะสำหรับใช้นับเซลล์แบคทีเรียหรือสิ่งที่มีขนาดใกล้เคียงกับแบคทีเรียเพราะตารางไม่ลึกมาก แต่ถ้าเป็น Bright-Line improved Neubauer haemocytometer = 1/10 มิลลิเมตร เหมาะสำหรับนับเซลล์ยีสต์ สปอร์ร่า หรือเซลล์เม็ดเลือด ซึ่งมีขนาดใหญ่กว่าเซลล์แบคทีเรีย แต่ก็สามารถใช้นับเซลล์แบคทีเรียได้เช่นเดียวกัน

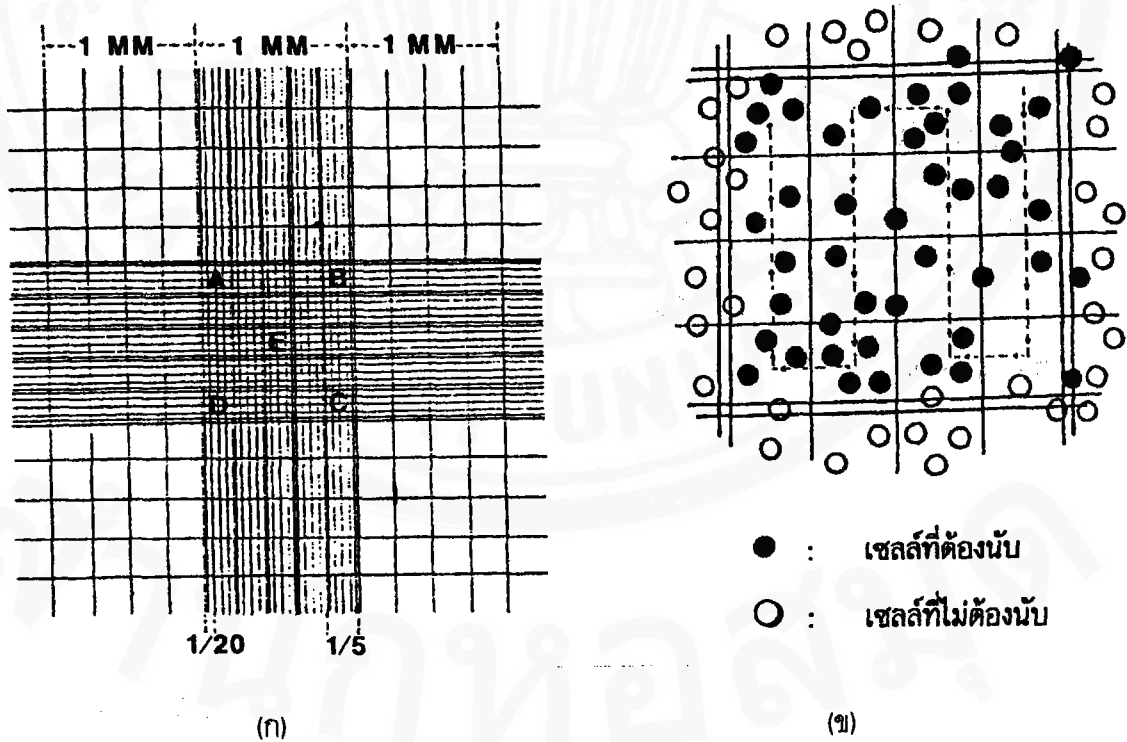
ตารางที่อยู่ใน counting chamber ทั้ง 2 ชนิดมีพื้นที่เป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสยาวด้านละ 3 มิลลิเมตร ภายในแบ่งเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสยาวด้านละ 1 มิลลิเมตรจำนวน 9 ช่อง ช่องตรงกลางใช้สำหรับนับเซลล์หรือสิ่งอื่นที่มีขนาดเล็ก ๆ จะแบ่งเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสย่อยยาวด้านละ 1/5 มิลลิเมตรจำนวน 25 ช่อง และในแต่ละช่องนี้ยังแบ่งเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัสย่อย ๆ ยาวด้านละ 1/20 มิลลิเมตร

อีกช่องละ 16 ช่อง ดังนั้นตารางที่อยู่ใน counting chamber นี้จึงประกอบด้วยสี่เหลี่ยมจัตุรัสเล็ก ๆ จำนวนทั้งสิ้น 400 ช่อง (รูปที่ 4-5)



รูปที่ 4-4 Counting chamber ด้านตรง (ก) และด้านข้าง (ข)

1 = ruling area, 2 = support for cover slip, 3 = cover slip



รูปที่ 4-5 ตารางของ counting chamber แสดงช่อง A, B, C, D และ E สำหรับนับจำนวน เซลล์แบคทีเรีย (ก) และวิธีการนับเซลล์แบคทีเรีย (ข)

2.2 การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี viable count

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียวิธีนี้อาศัยหลักการเช่นเดียวกับวิธีแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ คือ แบคทีเรีย 1 โคโลนีที่มองเห็นด้วยตาเปล่าเกิดจากแบคทีเรียเพียง 1 เซลล์ ดังนั้นจึงคำนวณหาแบคทีเรียในปริมาตรที่กำหนดได้ โดยถือว่าจำนวนโคโลนีที่นับได้ คือ จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตทั้งหมด และต้องกระจายเซลล์แบคทีเรียให้แยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ จึงจะมีความน่าเชื่อถือ ซึ่งทำได้โดยการ spread plate และ pour plate โดยทั้ง 2 วิธีต้องเจือจางแบคทีเรียแบบ serial dilution ก่อน จากนั้นจึงปิเปตต์แบคทีเรียที่เจือจางไปกระจายบนผิวหน้าอาหารหรือผสมกับอาหาร

การเจือจางแบคทีเรียแบบ serial dilution

การเจือจางแบคทีเรียแบบ serial dilution เป็นการเจือจางเพื่อให้ความเข้มข้นลดหลั่นลงไปเรื่อย ๆ ตามลำดับ โดยใช้อาหารเหลวที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียหรือ 0.85% NaCl เป็นตัวกลางในการเจือจาง วิธีที่นิยมในการเจือจางแบคทีเรียเพื่อนับจำนวนเซลล์ คือ วิธี 10-fold dilutions เป็นการเจือจางเพื่อให้ความเข้มข้นลดลงครั้งละ 10 เท่า

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้ให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการนับจำนวนแบคทีเรีย
2. เพื่อให้ให้นักศึกษาได้ฝึกหัดนับจำนวนแบคทีเรียจนเกิดทักษะและความชำนาญ
3. เพื่อให้ นักศึกษาสามารถเจือจางแบคทีเรียแบบ serial dilution และนับจำนวนแบคทีเรียโดยวิธี total count, spread plate และ pour plate

การทดลองที่ 2

การเจือจางแบคทีเรียแบบ 10-fold dilutions

อุปกรณ์

1. ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (steriled pipette) ขนาด 1 มิลลิลิตร จำนวน 10 อัน
2. ลูกยาง
3. ตะเกียงบุนเส้น
4. แบคทีเรีย *Escherichia coli* (broth culture) อายุ 18-24 ชั่วโมง

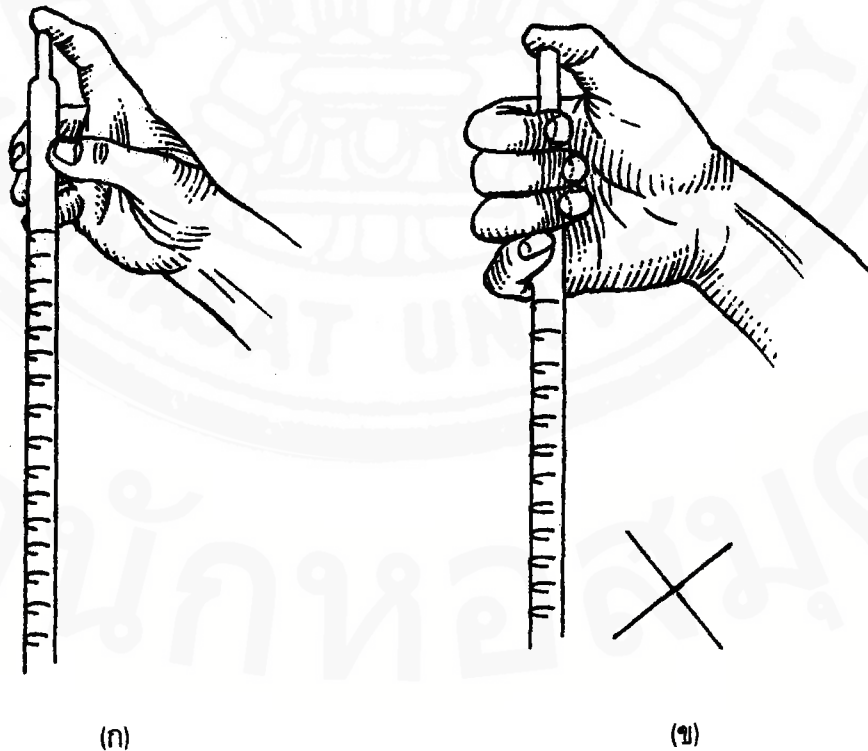
5. 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตรในหลอดทดลอง (test tube) ขนาด 16x150 มิลลิเมตร ซึ่งผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 10 หลอด

วิธีการ

1. ติดฉลากหลอดที่บรรจุ 0.85% NaCl ปริมาตร 9 มิลลิลิตร ทั้ง 10 หลอด เป็น ①, ②, ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧, ⑨ และ ⑩ ตามลำดับ

2. ใช้ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตร ดูดแบคทีเรีย *Escherichia coli* ที่เลี้ยงใน nutrient broth อายุ 18-24 ชั่วโมง โดยเขย่าหลอดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียให้เป็นเนื้อเดียวกันเบา ๆ แล้วเปิดจุกหลอดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและปล่อยให้ไหลลงด้วยเปลวไฟจากตะเกียงเบนสัน

3. จับปิเปตต์ด้วยมือข้างที่ถนัด แล้วใช้มืออีกข้างหนึ่งบีบไล่มออกจากลูกยาง นำปลายลูกยางไปจ่อติดกับปลายปิเปตต์และค่อย ๆ คลายมือที่บีบลูกยางให้ลมในปิเปตต์เข้าไปในลูกยาง ซึ่งขณะเดียวกันอาหารที่เลี้ยงแบคทีเรียจะถูกดูดเข้าไปภายในปิเปตต์ ดึงลูกยางออกจากปลายปิเปตต์ และใช้ปลายนิ้วชี้อุดปลายปิเปตต์ทันที (รูปที่ 4-6)



รูปที่ 4-6 วิธีใช้นิ้วปิดปลายปิเปตต์เพื่อปรับปริมาตรที่ถูกต้อง (ก) และวิธีที่ผิด (ข)

4. ค่อย ๆ คลายนิวซีที่อุคปลายปิเปตต์เพื่อปล่อยอาหารเลี้ยงแบคทีเรียบางส่วนออกจากปลายปิเปตต์จนได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ดึงปลายปิเปตต์ออกจากหลอดอาหารเลี้ยงแบคทีเรียและลนปลายหลอดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงบุนเส้นอีกครั้ง แล้วปิดจุกหลอดไว้เหมือนเดิม

5. เปิดจุกหลอดที่บรรจุ 0.85% NaCl ซึ่งติดติดฉลากเป็น ① ลนปลายหลอดด้วยเปลวไฟจากตะเกียงบุนเส้น แล้วเติมอาหารเลี้ยงแบคทีเรียที่อยู่ในปิเปตต์ลงไป ผสมให้เป็นเนื้อเดียวกัน โดยใช้ปิเปตต์อันเดิมดูดขึ้นลงเบา ๆ จะได้แบคทีเรียที่เจือจางอัตราส่วน $1:10$ (dilution 10^{-1})

6. ใช้ปิเปตต์อันใหม่ดูดแบคทีเรียในหลอด ① ขึ้นมาและปรับจนได้ปริมาตร 1.0 มิลลิลิตร ไปเติมลงในหลอดที่บรรจุ 0.85% NaCl ซึ่งติดติดฉลาก ② ผสมให้เข้ากัน จะได้แบคทีเรียที่เจือจางอัตราส่วน $1:100$ (dilution 10^{-2})

7. ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 5 และ 6 ในหลอดที่บรรจุ 0.85% NaCl ซึ่งติดติดฉลากเป็น ③, ④, ⑤, ⑥, ⑦, ⑧, ⑨ และ ⑩ ตามลำดับจนได้แบคทีเรียที่เจือจางในน้ำกลั่นครบทั้ง 9 หลอด

ผลการทดลอง

หลอดที่	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
อัตราส่วนในการเจือจาง										
dilution										

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 3

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี total count

อุปกรณ์

1. counting chamber ชนิด Bright-Line improved Neubauer haemocytometer
2. กล้องจุลทรรศน์
3. ตะเกียงเบนซีน
4. พาสเตอร์ปิเปตต์ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (steriled pasture pipette) และลูกยาง
5. แบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions (จากการทดลองที่ 2)

วิธีการ

1. ทำความสะอาด counting chamber และ cover slip ด้วยน้ำยาล้างจานโดยใช้ปลายนิ้วหัวแม่มือถูเบา ๆ ห้ามใช้ฟองน้ำหรือสก็อตไบรซ์ขัดเป็นอันตราย และระมัดระวังอย่าให้ปลายเล็บขูดบน counting chamber และ cover slip เพราะอาจทำให้ปริมาตรผิดไปเนื่องจากเล็บขูดแหว่งเป็นร่องแล้วล้างด้วยน้ำประปา เสร็จแล้วใช้ผ้ากรองซับ 95% ethanol เช็ด counting chamber และ cover slip ให้แห้ง (ถ้าต้องการให้แห้งเร็วยิ่งขึ้นอาจใช้ผ้ากรองซับ acetone เช็ดอีกครั้ง)

2. วาง cover slip ลงบน counting chamber ให้อยู่ตรงกลางพอดี

3. บรรจุแบคทีเรียที่เจือจางแล้วเข้าไปใน chamber โดยใช้พาสเตอร์ปิเปตต์ต่อกับลูกยาง แล้วบีบลูกยางไล่อากาศออก ดูดแบคทีเรียขึ้นมาประมาณ 1/3 ของปิเปตต์ นำปลายปิเปตต์ไปจ่อระหว่าง chamber และ cover slip โดยให้ปิเปตต์ทำมุมประมาณ 30 องศา แล้วค่อย ๆ ปล่อยให้แบคทีเรียที่เจือจางในปิเปตต์ไหลเข้าไปใน chamber ด้วยความเร็วสม่ำเสมอ จนแน่ใจว่าเต็มพอดีโดยไม่ขาดหรือเอ่อล้นไปในร่องข้าง ๆ หรือเกิดมีฟองอากาศ หากมีข้อผิดพลาดเกิดขึ้นให้แก้ไขให้เรียบร้อยหรือล้าง chamber และเริ่มต้นใหม่ (หากจำเป็น)

4. ตั้งทิ้งไว้ 2-3 นาที เพื่อให้เซลล์แบคทีเรียกระจายตัวสม่ำเสมอและนอนกัน chamber เรียบร้อย

5. นำ chamber ไปวางบน stage ของกล้องจุลทรรศน์ ใช้หัว objective lens กำลังขยายต่ำ (10x) หาดาวรางที่จะนับ จากนั้นจึงเริ่มนับด้วยหัว objective lens กำลังขยายสูง (40x) ห้ามใช้หัว

immersion power (100x) เป็นอันตรายเพราะจะทำให้ cover slip แตกได้

6. นับเซลล์แบคทีเรียใน 5 ช่องจาก 25 ช่อง (ช่อง A, B, C, D และ E ดังรูปที่ 4-5ข) ซึ่งใน 5 ช่องนั้นจะมีช่องย่อยเล็ก ๆ ทั้งสิ้น 80 (5x16) ช่องย่อย ตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ว่ามีปริมาณเซลล์แบคทีเรียในบริเวณที่จะนับพอเหมาะหรือไม่ ถ้าไม่เหมาะให้เลือกนับแบคทีเรียที่ dilution ใหม่ เมื่อพบว่าพอเหมาะแล้วจึงนับเซลล์แบคทีเรียในแต่ละช่อง และนำค่าที่ได้ในแต่ละช่องมารวมกัน

7. คำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อมิลลิลิตร ดังนี้

$$\text{สมมติว่านับเซลล์ใน 5 ช่องได้} = A \quad \text{cells}$$

$$\text{ปริมาตร 5 ช่องที่ใช้ นับ} = (1/5) \times (1/5) \times (1/10) \times 5 \quad \text{mm}^3$$

$$= 1/50 \quad \text{mm}^3$$

$$\text{จำนวนเซลล์ในปริมาตร } 1/50 \text{ mm}^3 = A \quad \text{cells}$$

$$\therefore \text{จำนวนเซลล์ตั้งต้นทั้งหมด} = 5A \times 10^4 \times \text{dilution factor} \quad \text{cells/ml}$$

(โดย dilution factor = 1/dilution)

ผลการทดลอง

หลอดที่	①	②	③	④	⑤	⑥	⑦	⑧	⑨	⑩
dilution factor										
จำนวนเซลล์ ใน 5 ช่อง										
จำนวน เซลล์ตั้งต้น										

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 4

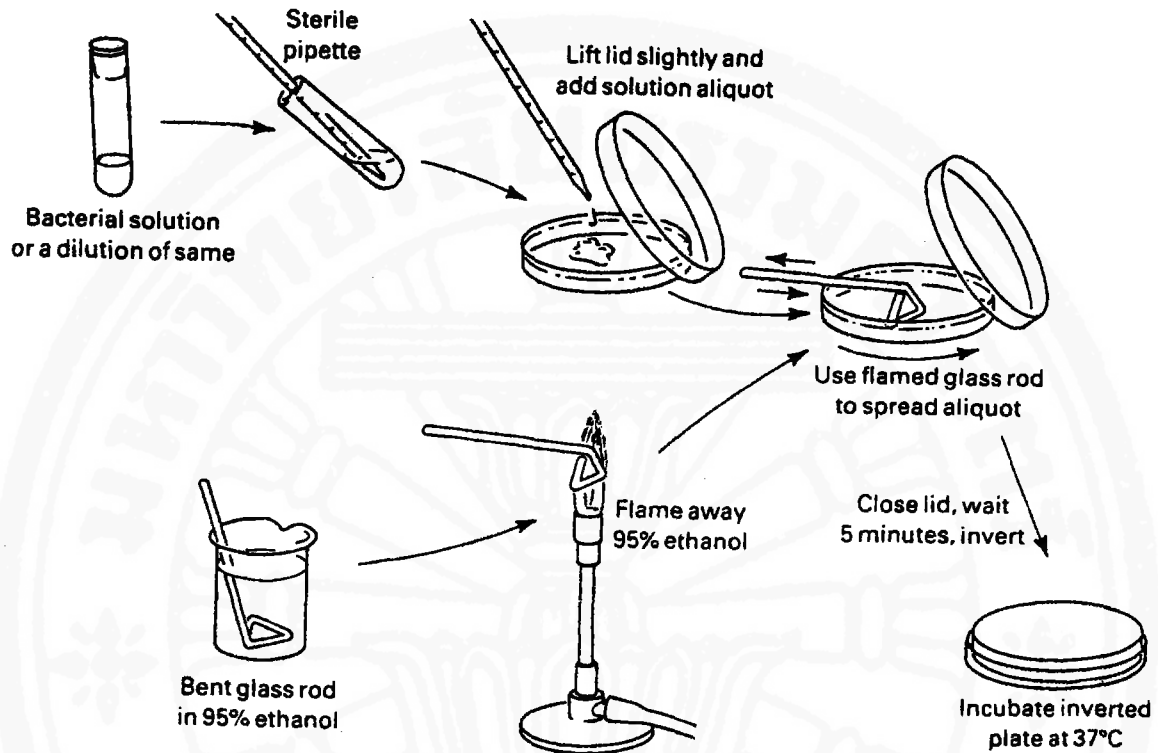
การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี spread plate

อุปกรณ์

1. glass spreader
2. ตะเกียงเบนเส้น
3. ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. 95% ethanol
5. Nutrient agar plate จำนวน 5 plate
6. แบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions (จากการทดลองที่ 2)

วิธีการ

1. ใช้ปิเปตต์ดูดแบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions ในหลอดที่ ⑥ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรด้วยวิธี aseptic technique ใส่ลงบนผิวหน้า nutrient agar
2. ฆ่าเชื้อบน glass spreader ด้วยวิธีจุ่มใน 95% ethanol แล้วนำไปลงบนตะเกียงเบนเส้น ปล่อยให้เย็นลงสักครู่ (ประมาณ 20-30 วินาที) หรือแตะบนผิวหน้า nutrient agar บริเวณที่ไม่มีแบคทีเรียอยู่
3. เกลี่ยแบคทีเรียให้กระจายทั่วทั้ง plate ด้วยการหมุน glass spreader เป็นวงกลมพร้อม ๆ กับหมุน plate ไปด้วย (รูปที่ 4-7) เมื่อหมุน plate จนแบคทีเรียกระจายทั่วทั้ง plate (ประมาณ 3-4 รอบ) แล้ว ปิดฝา plate และฆ่าเชื้อบน glass spreader
4. นำแบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions ในหลอดที่ ⑦, ⑧, ⑨ และ ⑩ ไป sprad plate เช่นเดียวกับข้อ 1-3



รูปที่ 4-7 การเกลี่ยแบคทีเรียบนผิวหน้าของ nutrient agar plate ด้วย glass spreader

5. นำ nutrient agar plate ทั้ง 5 plate ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยคว่ำผิวหน้าอาหารลง เมื่อครบเวลาให้นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียใน plate ที่มีโคโลนีประมาณ 30-300 โคโลนี คำนวณจำนวนแบคทีเรียในแต่ละ dilution โดยการคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วย 10 และค่า dilution factor ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็น Colony forming unit/ml (Cfu/ml)

ผลการทดลอง

หลอดที่	6	7	8	9	10
จำนวนโคโลนี					
Colony forming unit/ml (Cfu/ml)					

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 5

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธี pour plate

อุปกรณ์

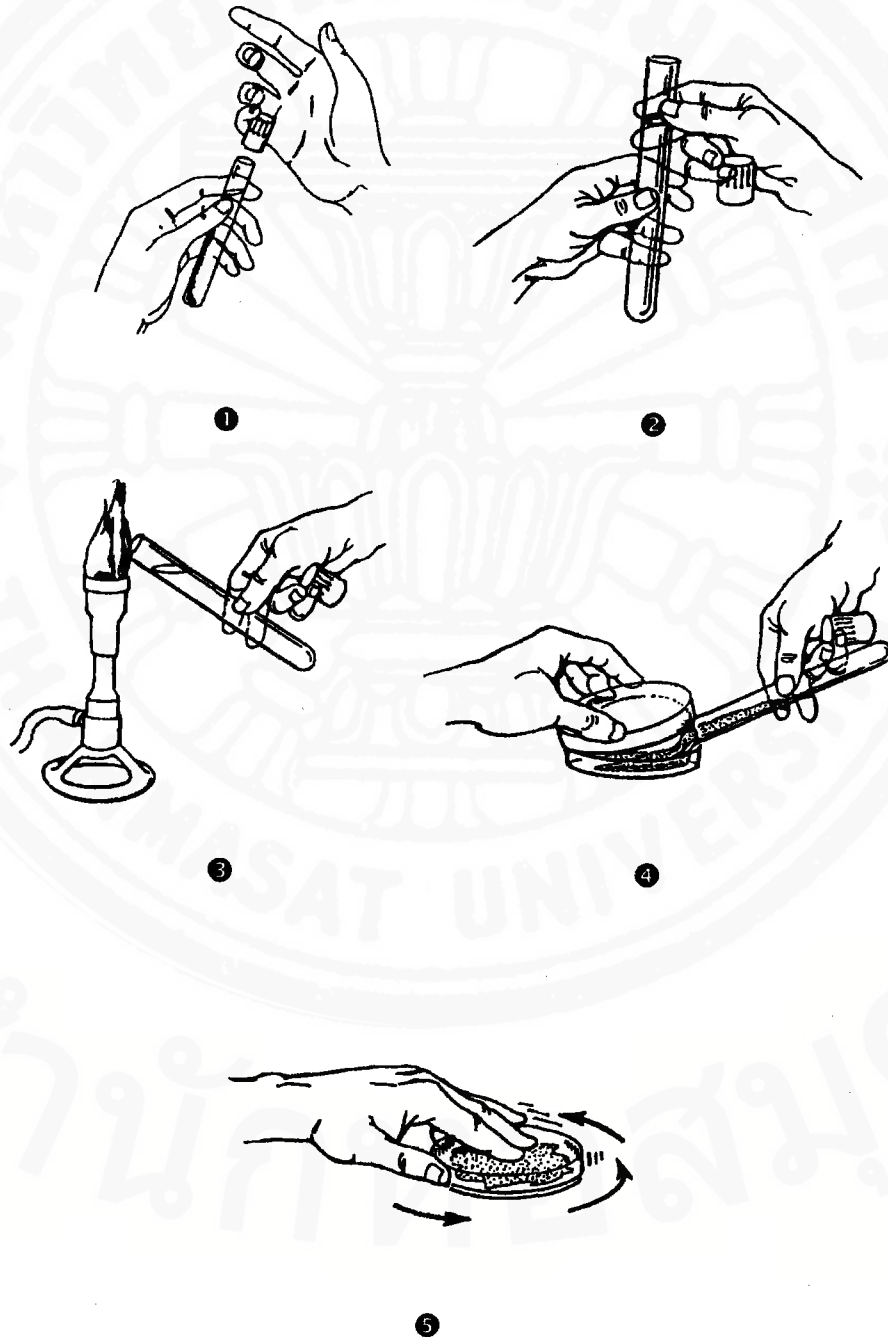
1. petri dishes ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว จำนวน 5 plate
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. ปิเปตต์ขนาด 1 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
4. nutrient agar เหลวปริมาณ 20 มิลลิลิตรในหลอดทดลองซึ่งตั้งในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (water bath) ที่อุณหภูมิ 50°C จำนวน 5 หลอด
6. แบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions (จากการทดลองที่ 2)

วิธีการ

1. ตัดฉลาก petri-dishes ทั้ง 5 plate เป็น ⑥, ⑦, ⑧, ⑨ และ ⑩ ตามลำดับ
2. ใช้ปิเปตต์ดูดแบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions ในหลอดที่ ⑥ ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรด้วยวิธี aseptic technique ใส่ลงใน petri dishes ที่ตัดฉลากเป็น ⑥
3. หยิบหลอดอาหาร nutrient agar เหลวออกมาจากอ่างน้ำ ใช้นิ้วกำของมือขวาเปิดจุกสำลีและลนปากหลอดทดลองด้วยเปลวไฟจากตะเกียงบุนเส้น เปิด petri dishes ที่ตัดฉลากเป็น ⑥ ซึ่งมีแบคทีเรียที่เจือจางอยู่ 0.1 มิลลิลิตรให้เปิดออกเพียงเล็กน้อย เท nutrient agar เหลวลงไป

เมื่อเสร็จปิดฝาทันที (รูปที่ 4-8)

4. ค่อย ๆ หมุน petri dishes เป็นวงกลมไปทางเดียวเบา ๆ เพื่อให้แบคทีเรียผสมให้เป็นเนื้อเดียวกับ nutrient agar ประมาณ 10-15 รอบ ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศหรืออาหารล้นออกนอก plate (รูปที่ 4-8)



รูปที่ 4-8 ขั้นตอนการเทอาหาร nutrient agar ลงใน petri dishes

5. ตั้งทิ้งไว้ที่โต๊ะปฏิบัติการโดยห้ามกระทบกระเทือน รอจนกระทั่ง nutrient agar แข็งตัวอย่างสมบูรณ์จึงจะสามารถคว่ำ plate

6. นำแบคทีเรียที่เจือจางแบบ 10-fold dilutions ในหลอดที่ 7, 8, 9 และ 10 ไป pour plate เช่นเดียวกับข้อ 2-5

7. นำ nutrient agar plate ทั้ง 5 plate ไปป้อนที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง โดยคว่ำผิวน้ำอาหารลง เมื่อครบเวลาให้นับจำนวนโคโลนีแบคทีเรียใน plate ที่มีโคโลนีประมาณ 30-300 โคโลนี

8. คำนวณจำนวนแบคทีเรียในแต่ละ dilution โดยการคูณจำนวนโคโลนีที่นับได้ด้วย 10 และค่า dilution factor ค่าที่ได้จะมีหน่วยเป็น Colony forming unit/ml (Cfu/ml) เช่นเดียวกับวิธี spread plate

ผลการทดลอง

หลอดที่	6	7	8	9	10
จำนวนโคโลนี					
Colony forming unit/ml (Cfu/ml)					

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....