

บทที่ 5

เมตาบอลิซึมในแบคทีเรีย

ในการศึกษาเมตาบอลิซึม (metabolism) ในเซลล์แบคทีเรียนั้น เป็นการศึกษาเพื่อดูว่าแบคทีเรียแต่ละชนิดมีความสามารถในการย่อยสลายอาหารและสังเคราะห์ชีวโมเลกุลชนิดใดบ้าง วิธีที่นิยมใช้ในการศึกษาเมตาบอลิซึม คือ การศึกษากระบวนการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีที่เกิดขึ้นในอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย โดยเติมสารบางอย่างลงไปให้อาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ แล้วสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น เช่น การเปลี่ยนสีของอาหารที่ใช้เลี้ยงแบคทีเรีย การเกิดกรด เกิดแก๊ส และการเกิดสารบางชนิด เป็นต้น ซึ่งจะทำให้ทราบปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นภายในและนอกเซลล์ของแบคทีเรียในแต่ละขั้นตอนได้ ในการศึกษาเมตาบอลิซึมนอกจากจะใช้ดูว่าแบคทีเรียนั้นให้ประโยชน์หรือโทษอย่างไรแล้ว ยังสามารถใช้ประกอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ด้วย เนื่องจากแบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีเมตาบอลิซึมที่แตกต่างกัน ซึ่งเกิดจากยีน (gene) ที่แตกต่างกัน คอยควบคุมการทำงานของเซลล์แบคทีเรียนั้น

เมตาบอลิซึมของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism)

แบคทีเรียส่วนใหญ่จะใช้คาร์โบไฮเดรตเป็นแหล่งพลังงาน (energy source) ซึ่งคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียสามารถย่อยสลายได้มีหลายประเภท ได้แก่ monosaccharides, disaccharides, polysaccharides และ complex carbohydrate (ตารางที่ 5-1)

ตารางที่ 5-1 ประเภทและชนิดของคาร์โบไฮเดรตที่แบคทีเรียสามารถใช้เป็นแหล่งพลังงาน

ประเภทของคาร์โบไฮเดรต	ชนิดของคาร์โบไฮเดรต
1. Monosaccharides - Hexose ($C_6H_{12}O_6$) - Pentoses ($C_5H_{10}O_5$) - Polyhydric alcohols	glucose, fructose, galactose, mannose, sorbose arabinose, xylose, rhamnose mannitol, glycerol, adonitol, dulcitol, sorbitol
2. Disaccharides ($C_{12}H_{22}O_{11}$)	maltose, sucrose, lactose, cellobiose, melibiose
3. Trisaccharides ($C_{18}H_{32}O_{16}$)	raffinose, melizitose
4. Polysaccharides - Hexosans ($C_6H_{10}O_5$) _n - Pentosans ($C_5H_8O_4$) _n - Glucosides	starch, inulin, dextrin, glycogen, galactan, cellulose araban, xylan salicin, amygdalin, esculin

เมื่อแบคทีเรียสลายคาร์โบไฮเดรตเพื่อให้ได้พลังงานจะเกิดผลผลิต (product) หลายชนิด ได้แก่ กรดแลคติก (lactic acid) กรดน้ำส้ม (acetic acid) กรดโปรปิโอนิก (propionic acid) อะซีโตน (acetone) บิวทิลแอลกอฮอล์ (butyl alcohol) เอทิลแอลกอฮอล์ (ethyl alcohol) เป็นต้น นอกจากนี้ อาจเกิดแก๊ส เช่น มีเทน ไฮโดรเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ เป็นต้น

เมตาบอลิซึมของโปรตีนและกรดอะมิโน (protein and amino acid metabolism)

แบคทีเรียหลายชนิดสามารถย่อยสลายโปรตีนแล้วได้โพลีเปปไทด์ (polypeptides) และกรดอะมิโน ซึ่งจะถูกนำไปสังเคราะห์เป็นโปรตีนของเซลล์แบคทีเรียและเป็นแหล่งพลังงาน เมื่อแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงโปรตีนหรือกรดอะมิโนเป็นแหล่งพลังงาน จะให้ผลผลิตสุดท้ายหลายชนิด ได้แก่ แอมโมเนีย (ammonia) อินโดล (indole) และน้ำ เป็นต้น

เมตาบอลิซึมของไขมัน (lipid metabolism)

แบคทีเรียบางชนิดสามารถย่อยสลายไขมันได้เป็นกลีเซอรอล (glycerol) และกรดไขมัน (fatty acid) แต่ค่อนข้างยากลำบาก ปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นเป็นแบบ hydrolysis โดยแบคทีเรียจะนำกลีเซอรอลและกรดไขมันไปใช้เป็นไขมันภายในเซลล์และส่วนประกอบที่สำคัญ นอกจากนี้ บางครั้งอาจนำไปออกซิไดซ์ (oxidize) ให้เป็นแหล่งพลังงานเพื่อใช้ในกิจกรรมต่าง ๆ ของเซลล์

การหายใจ (respiration)

สิ่งมีชีวิตแทบทุกชนิดจะได้พลังงานในเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากด้วยปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) ซึ่งเกิดจากการลำเลียงอิเล็กตรอน (electron transport) ไปยังตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้าย โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการหายใจหลายชนิด ถ้าตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเป็นออกซิเจนเรียกว่า "aerobic respiration" และถ้าตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเป็นสารอินทรีย์ เช่น ไนเตรทหรือซัลเฟต เรียกว่า "anaerobic respiration" ส่วนปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดเมื่อมีการย่อยคาร์โบไฮเดรตแล้วได้ผลผลิตเป็นสารอินทรีย์ซึ่งจะไปทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายเรียกว่า "fermentation"

การทดสอบเมตาบอลิซึมในแบคทีเรีย

การทดสอบเมตาบอลิซึมในแบคทีเรียที่สนใจนั้น สามารถทำได้โดยการเลี้ยงแบคทีเรียใน

อาหารพิเศษชนิดต่าง ๆ ที่สามารถบ่งชี้ได้ว่าแบคทีเรียที่เจริญเติบโตในอาหารนั้นมีการย่อยสลายหรือสังเคราะห์สารชนิดใด ซึ่งผลที่ได้สามารถนำไปใช้ประกอบการจำแนกชนิดของแบคทีเรีย

วัตถุประสงค์

1. เพื่อให้นักศึกษาได้เรียนรู้วิธีการและขั้นตอนในการทดสอบเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย
2. เพื่อให้นักศึกษาได้ฝึกหัดทดสอบเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียแบคทีเรียจนเกิดทักษะและความชำนาญ
3. เพื่อให้นักศึกษาสามารถทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต การย่อยแป้ง การย่อยเคซีน การย่อยซีเตรท การย่อยเจลาติน การสังเคราะห์ไฮโดรเจนซัลไฟด์ การเคลื่อนที่และการสังเคราะห์อินโดล การสังเคราะห์เอนไซม์แคตาเลส การสังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอส และการสังเคราะห์เอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจของแบคทีเรีย

การทดลองที่ 1

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate fermentation test)

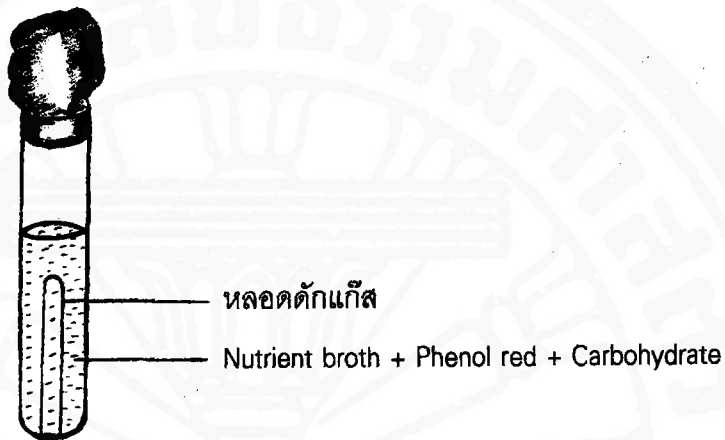
หลักการ

หลอด fermentation broth ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรตที่ต้องการทดสอบเพียง 1 ชนิดเพื่อใช้ตรวจสอบกระบวนการหมักของแบคทีเรียเมื่อมีคาร์โบไฮเดรตนั้นอยู่ นอกจากนั้นยังประกอบด้วย nutrient broth ที่เป็นแหล่งกรดอะมิโนและโปรตีน และ phenol red ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) โดยถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นกลางจะมีสีส้ม แต่ถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นกรด ค่าพีเอช (pH) จะลดลงและเปลี่ยนเป็นสีเหลือง และถ้าอยู่ในสภาวะที่เป็นด่าง ค่าพีเอชจะเพิ่มขึ้นและเปลี่ยนเป็นสีแดง ภายในหลอด fermentation broth จะมีหลอดดักแก๊ส (durham tube) ค้ำอยู่ที่ก้นหลอดเพื่อคอยดักฟองแก๊สที่เกิดจากกระบวนการหมัก (รูปที่ 5-1)

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. แบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus*

4. Sucrose fermentation broth 4 หลอด
5. Glucose fermentation broth 4 หลอด
6. Lactose fermentation broth 4 หลอด



รูปที่ 5-1 แสดงหลอด fermentation broth

วิธีการ

1. ตีตรวจลาก fermentation broth หลอดที่ 1 ของน้ำตาลแต่ละชนิดว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะให้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย

2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Staphylococcus aureus* ใส่ลงใน fermentation broth หลอดที่ 2, 3 และ 4 ของน้ำตาลแต่ละชนิดตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique แล้วตีตรวจลากหลอดอาหารทั้ง 3 หลอด

3. นำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 12 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหาร fermentation broth

การอ่านผล

ถ้าอาหารในหลอด fermentation broth เปลี่ยนเป็นสีเหลืองแสดงว่าแบคทีเรียสามารถหมักน้ำตาลและเกิดกรดขึ้น แต่ถ้าอาหารเปลี่ยนเป็นสีแดงหรือมีสีเข้มขึ้นกว่าหลอด control แสดงว่า

แบคทีเรียไม่สามารถหมักน้ำตาล แต่สามารถใช้สารอื่นใน nutrient broth เป็นแหล่งพลังงาน เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เป็นต้น ทำให้มีด่างเกิดขึ้น

ถ้ามีแก๊สในหลอดดักแก๊สแสดงว่าแบคทีเรียสามารถเจริญใน fermentation broth และเกิดแก๊สจากการเมตาบอลิซึม

ผลการทดลอง

หลอดที่	แบคทีเรีย	sucrose	glucose	lactose
1	control			
2	<i>Escherichia coli</i>			
3	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>			
4	<i>Staphylococcus aureus</i>			

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 2

การทดสอบการย่อยแป้ง (starch hydrolysis test)

หลักการ

แป้ง (starch) เป็นคาร์โบไฮเดรตพอลิแซ็กคาไรด์ เมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีนจะเกิดสารประกอบที่มีสีน้ำเงิน แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ amylase หรือ diastase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียจะปล่อยออกนอกเซลล์ (exoenzyme) เพื่อไปย่อยแป้งให้มีขนาดโมเลกุลเล็กลง

โดยจะเปลี่ยนแบ่งไปเป็น dextrins, maltose และกลูโคส (glucose) ซึ่งสามารถจะผ่านเข้าสู่เซลล์แบคทีเรียได้ สารประกอบพวก dextrins, maltose และกลูโคสนี้ จะไม่ให้สารประกอบสีน้ำตาลเงินเมื่อทำปฏิกิริยากับไอโอดีน

อุปกรณ์

1. ลู๊ป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis*
4. starch agar 1 plate และ Gram iodine solution

วิธีการ

1. แบ่ง starch agar ออกเป็น 2 ส่วน ติดฉลากชนิดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดใน แต่ละส่วนของ starch agar
2. ใช้ลู๊ปแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* มาขีด (streak) ให้เป็นแนวเส้นตรงบน starch agar เพียง 1 รอยด้วยวิธี aseptic technique ระวังอย่าให้รอยขีดของแบคทีเรียทั้งสองอยู่ชิดกันเกินไป
3. นำ starch agar ไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาและพบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียดีแล้ว เท Gram iodine solution ราวลงบนผิวหน้าอาหารให้ทั่ว petri-dishes บันทึกผลการทดสอบที่ได้

การอ่านผล

สังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่ไม่มีสีน้ำตาลเงินเกิดขึ้นรอบ ๆ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยแป้งได้

ผลการทดลอง

ส่วนที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
1	<i>Escherichia coli</i>	
2	<i>Bacillus subtilis</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 3

การทดสอบการย่อยเคซีน (casein hydrolysis test)

หลักการ

แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ caseinase ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยเคซีน (casein) ซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำนม โดยสามารถเปลี่ยนน้ำนมที่มีลักษณะเป็น colloidal suspension ที่ทึบแสงและมีสีขาว ให้มีลักษณะเป็น crystalloid suspension คือ ทำให้น้ำนมตกตะกอนนั่นเอง

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น
3. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis*
4. skim milk agar 1 plate

วิธีการ

1. แบ่ง skim milk agar ออกเป็น 2 ส่วน ติดฉลากชนิดของแบคทีเรียทั้งสองชนิดในแต่ละส่วน
2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Bacillus subtilis* มาขีด (streak) ให้เป็นแนวเส้นตรงบน skim milk agar เพียง 1 รอยด้วยวิธี aseptic technique ระวังอย่าให้รอยขีดทั้งสองอยู่ชิด

กันเกินไป

3. นำ skim milk agar ไปปรมที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา บันทึกผลการทดสอบที่ได้

การอ่านผล

สังเกตบริเวณใส (clear zone) ที่เกิดขึ้นรอบ ๆ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ย่อยเคซีนได้

ผลการทดลอง

ส่วนที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
1	<i>Escherichia coli</i>	
2	<i>Bacillus subtilis</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 4

การทดสอบการใช้ซิเตรท (citrate utilization test)

หลักการ

ซิเตรท (citrate) เป็นแหล่งคาร์บอนที่สำคัญ แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์เอนไซม์ citrate lyase, citritase, citrase, citrate aldolase หรือ citridesmolase ซึ่งจะสามารถเปลี่ยนซิเตรทไปเป็น

ออกซาโลอะซีเตท (oxaloacetate) และอะซีเตรท (acetate) และสังเคราะห์เอนไซม์ oxaloacetate decarboxylase มาเปลี่ยนออกซาโลอะซีเตทไปเป็นไพรูเวท (pyruvate) และคาร์บอนไดออกไซด์ โดยมี Mn^{2+} หรือ Mg^{2+} เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (cofactor) ที่จำเป็นสำหรับปฏิกิริยานี้ ในแบคทีเรียบางชนิด ถึงแม้จะมีเอนไซม์เหล่านี้ แต่ถ้าขาดเอนไซม์ permease ซึ่งทำหน้าที่นำซีเตรทจากภายนอกเข้าสู่เซลล์แบคทีเรีย ก็จะไม่สามารถใช้ซีเตรทเป็นแหล่งคาร์บอนได้

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเสน
3. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter cloacae*
4. Simmons's citrate agar 3 หลอด

วิธีการ

1. ตีฉลากอาหาร Simmons's citrate agar หลอดที่ 1 ว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุก หลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะให้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย

2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter cloacae* มาขีด (streak) บนผิวเฉียง (slant) ของอาหาร Simmons's citrate agar หลอดที่ 2 และ 3 แต่ละชนิดตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique แล้วตีฉลากหลอดอาหารทั้ง 2 หลอด

3. นำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 3 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง ($30^{\circ}C$) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหาร Simmons's citrate agar

การอ่านผล

สังเกตการเจริญเติบโตของแบคทีเรียซึ่งจะเปลี่ยนสีของอาหาร Simmons's citrate agar จากสีเขียวเป็นสีน้ำเงิน ถ้าสีของอาหาร Simmons's citrate agar ไม่เปลี่ยนแปลงแสดงว่าไม่มีแบคทีเรียเจริญเติบโตบนอาหารนี้

ผลการทดลอง

หลอดที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
1	control	
2	<i>Escherichia coli</i>	
3	<i>Enterobacter cloacae</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

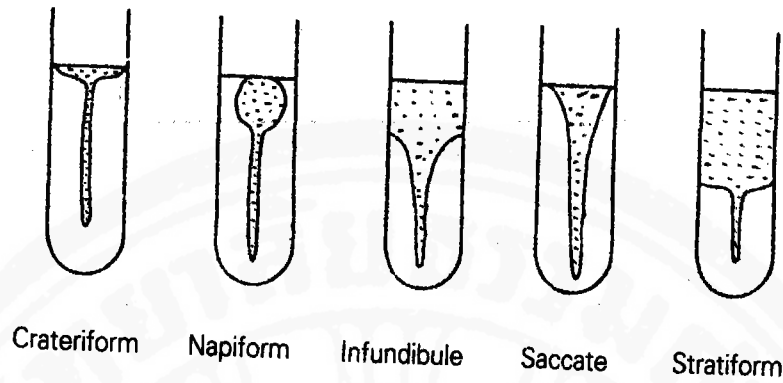
.....

การทดลองที่ 5

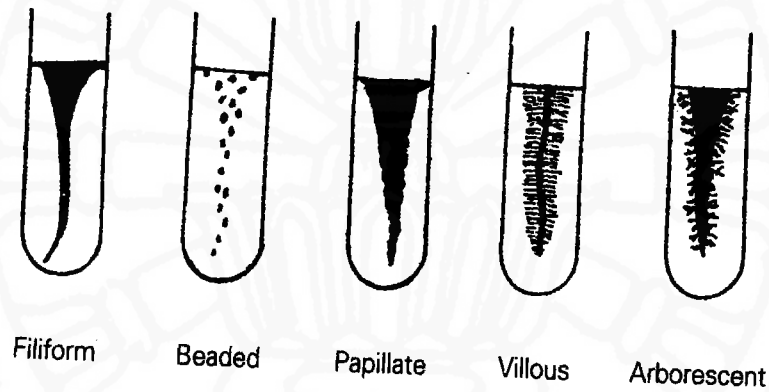
การทดสอบการย่อยเจลาติน (gelatin liquefaction test)

หลักการ

เจลาติน (gelatin) เป็นโปรตีนที่ได้จากการสลายสารพวกคอลลาเจน (collagen) ซึ่งเป็นส่วนประกอบในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) และเอ็นของสัตว์ชั้นสูง แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์เอนไซม์ gelatinase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีคุณสมบัติย่อยสลาย (proteolytic) เจลาติน โดยสามารถเปลี่ยนเจลาตินจากสภาพแข็ง (gel) ไปเป็นสภาพเหลว (solution) เรียกว่า "liquefaction" ในบริเวณที่แทง (stab) เข็มเขี่ยเขี่ยลงไป ใน nutrient gelatin จะเหลวเป็นรูปร่างลักษณะแตกต่างกัน (รูปที่ 5-2) แต่แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตใน nutrient gelatin ได้โดยไม่ทำให้เกิด liquefaction ซึ่งจะมีรูปแบบ (pattern) การเจริญเติบโตแตกต่างกัน (รูปที่ 5-3) ทำให้สามารถนำไปจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้



รูปที่ 5-2 รูปร่างลักษณะของ liquefaction ใน nutrient gelatin



รูปที่ 5-3 รูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน nutrient gelatin โดยไม่ทำให้เกิด liquefaction

อุปกรณ์

1. เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle)
2. ตะเกียงบนเส้น
3. แบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Proteus vulgaris*
4. Nutrient gelatin 4 หลอด

วิธีการ

1. ตัดฉลากอาหาร nutrient gelatin หลอดที่ 1 ว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารเหลวที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยง

แบคทีเรีย

2. ใช้เข็มเย็บเชื้อแต่ละแบคทีเรีย *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* และ *Proteus vulgaris* มาแทง (stab) ลงไปในอาหาร nutrient gelatin (butt) ในแนวตรงบริเวณกึ่งกลางจนเกือบสุดหลอดด้วยวิธี aseptic technique เพียง 1 รอย แล้วติดฉลากหลอดอาหารทั้ง 3 หลอด

3. นำอาหาร nutrient gelatin ทั้ง 4 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิ 20-22°C เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบันทึกผลการทดสอบที่ได้

การอ่านผล

สังเกตรูปร่างลักษณะของ liquefaction ใน nutrient gelatin หรือรูปแบบการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในอาหาร nutrient gelatin โดยไม่ทำให้เกิด liquefaction

ผลการทดลอง

หลอดที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
1	control	
2	<i>Escherichia coli</i>	
3	<i>Bacillus subtilis</i>	
4	<i>Proteus vulgaris</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 6

การทดสอบการหมักคาร์โบไฮเดรต การเกิดก๊าซ และการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ (carbohydrate fermentation, gas production and hydrogen sulfide production test)

หลักการ

ทดสอบโดยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร TSI (triple sugar iron agar) ซึ่งมี ส่วนประกอบของน้ำตาล 3 ชนิด คือ กลูโคส 1 ส่วน แลคโตส 10 ส่วน ซูโครส 10 ส่วน และมี phenol red เป็นอินดิเคเตอร์ ดังนั้นถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการเฟอร์เมนเตชันได้ จะเจริญเติบโตที่ก้นหลอด และถ้าแบคทีเรียสามารถใช้น้ำตาลในกระบวนการออกซิเดชันจะมีการเจริญเติบโตบนผิวเอียงของอาหาร แบคทีเรียที่สามารถใช้กลูโคสในกระบวนการเฟอร์เมนเตชันได้ เพียงชนิดเดียวจะทำให้เกิดกรดปริมาณน้อย จึงมีสีเหลืองเฉพาะที่ก้นหลอดเท่านั้น ส่วนบริเวณ ผิวเอียงของอาหารจะมีสีน้ำตาลแดง แต่ถ้าแบคทีเรียใช้แลคโตสและซูโครสได้ด้วยจะมีสีเหลืองที่ ผิวเอียงของอาหารด้วย เพราะมีการเกิดขึ้นปริมาณมาก หากไม่มีการเปลี่ยนสีเลยแสดงว่าไม่มีการหมักเกิดขึ้น และถ้ามีก๊าซเกิดขึ้นจากการใช้น้ำตาล ฟองก๊าซจะอยู่แทรกอยู่ในอาหารทำให้ อาหารแตกและมีช่องว่างเกิดขึ้นในอาหาร

นอกจากนั้นอาหาร TSI ยังสามารถทดสอบการเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ ซึ่งเป็นก๊าซที่ไม่มีสี แต่ในอาหาร TSI จะมีเฟอร์รัสซัลเฟตซึ่งจะสามารถทำปฏิกิริยากับไฮโดรเจนซัลไฟด์ และเกิดเป็นเฟอร์รัสซัลไฟด์ (ferrous sulfite) ซึ่งเป็นสารประกอบที่มีลักษณะเป็นตะกอนสีดำ แบคทีเรียที่สร้างไฮโดรเจนซัลไฟด์ได้จะทำให้เกิดตะกอนสีดำของเฟอร์รัสซัลไฟด์ตามรอยที่เข็มเขี่ยเชื้อแทงลงไป ในอาหาร

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle)
3. ตะเกียงบุนเส้น
4. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris*
5. TSI (triple sugar iron agar) 3 หลอด

วิธีการ

1. ตีฉลากอาหาร TSI หลอดที่ 1 ว่า “control” หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย
2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris* มาขีด (streak) บนผิวเอียง (slant) ของอาหาร TSI หลอดที่ 2 และ 3 แต่ละชนิดตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique แล้วตีฉลากหลอดอาหารทั้ง 2 หลอด
3. ใช้เข็มเย็บเชื้อแตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Proteus vulgaris* มาแทง (stab) ลงไปในอาหาร TSI (butt) หลอดที่ 2 และ 3 แต่ละชนิดตามลำดับในแนวตรงบริเวณกึ่งกลางจนเกือบสุด หลอดด้วยวิธี aseptic technique เพียง 1 รอย
4. นำหลอดบรรจุอาหาร TSI ทั้ง 3 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

การอ่านผล

1. การหมักคาร์โบไฮเดรต
 - 1.1 ถ้าแบคทีเรียสามารถหมักกลูโคสอย่างเดียว บนผิวเอียงของอาหารที่เดิมมีสีแดงอมส้มซึ่งเป็นสีของอาหารจะเปลี่ยนไปเป็นสีแดงเข้ม (alkaline หรือ K) ส่วนที่ก้นหลอดจะเปลี่ยนไปเป็นสีเหลือง (acid หรือ A) หรืออ่านผลว่า K/A
 - 1.2 ถ้าแบคทีเรียสามารถเกิดกระบวนการหมักทั้งกลูโคสและแลคโตส หรือสามารถหมักทั้งกลูโคสและซูโครส หรือสามารถหมักน้ำตาลทั้ง 3 ชนิด ทั้งบนผิวและที่ก้นหลอดของอาหารจะเปลี่ยนจากสีแดงอมส้มไปเป็นสีเหลืองทั้งหลอด หรืออ่านผลว่า A/A
 - 1.3 หากแบคทีเรียไม่สามารถใช้น้ำตาลชนิดใดเลย มี 3 แบบ คือ N/N, K/N และ K/K (N=ไม่เกิดการเปลี่ยนสีของอาหาร)
2. การเกิดก๊าซ จะเห็นเป็นรอยแตกหรือสังเกตเห็นฟองก๊าซที่แทรกอยู่ในเนื้ออาหาร TSI
3. การเกิดก๊าซไฮโดรเจนซัลไฟด์ จะเห็นสีดำของตะกอนเฟอร์รัสซัลไฟด์อยู่ที่ก้นหลอดหรือบริเวณรอบ ๆ รอยที่เข็มเย็บเชื้อแทงลงไปในการอาหาร TSI

ผลการทดลอง

หลอดที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
1	control	
2	<i>Escherichia coli</i>	
3	<i>Proteus vulgaris</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 7

การทดสอบการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (motility test)

และการสังเคราะห์อินโดล (indole test)

หลักการ

แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อินโดลจากทริปโตเฟน อินโดลจะทำปฏิกิริยากับอัลดีไฮด์จาก p-dimethyl aminobenzaldehyde ใน Kovac's reagent ให้ผลผลิตเป็นสีแดงในชั้นของแอลกอฮอล์ ในการทดสอบการสังเคราะห์อินโดลนิยมใช้ SIM medium ซึ่งสามารถตรวจดูการเคลื่อนที่ของแบคทีเรียได้ด้วย

อุปกรณ์

1. เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle)
2. ตะเกียงบุนเส้น

3. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes*
4. SIM medium 3 หลอด
5. Kovac's reagent

วิธีการ

1. ตัดฉลากหลอดบรรจุ SIM medium หลอดที่ 1 ว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะใช้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย
2. ใช้เข็มเย็บเชื้อตะแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* มาแทง (stab) ลงไปใน SIM medium (butt) หลอดที่ 2 และ 3 แต่ละชนิดตามลำดับในแนวตรงบริเวณกึ่งกลางจนเกือบสุดหลอดด้วยวิธี aseptic technique เพียง 1 รอย แล้วตัดฉลากหลอดอาหารทั้ง 2 หลอด
3. นำหลอดบรรจุ SIM medium ทั้ง 3 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วอ่านผลการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย
4. เติม Kovac's reagent ลงไป 5-10 หยด เขย่าแล้วทิ้งไว้สักครู่ แล้วอ่านผลการทดสอบการสังเคราะห์อินโดล

การอ่านผล

1. การเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย
ผลบวก : จะมองเห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียออกมาจนรอยที่เข็มเย็บเชื้อแทงลงไปในอาหาร หรือ SIM medium ที่เลี้ยงแบคทีเรียขุ่นทั้งหลอด
ผลลบ : จะมองเห็นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอย่างชัดเจนที่บริเวณรอบ ๆ รอยที่เข็มเย็บเชื้อแทงลงไปในอาหาร
2. การสังเคราะห์อินโดล
ผลบวก : สีของ Kovac's reagent เปลี่ยนไปเป็นสีแดง
ผลลบ : สีของ Kovac's reagent ไม่เปลี่ยนแปลง

ผลการทดลอง

หลอดที่	แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ motility test	ผลการทดสอบ indole test
1	control		
2	<i>Escherichia coli</i>		
3	<i>Enterobacter aerogenes</i>		

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 8

การทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์แคตาเลส (catalase test)

หลักการ

แคตาเลส (catalase) เป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งที่พบได้ในแบคทีเรีย ส่วนใหญ่ทำหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H_2O_2) ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายของปฏิกิริยาในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ที่เป็นพืชต่อเซลล์ โดยแคตาเลสจะเปลี่ยนไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ไปเป็นน้ำและก๊าซออกซิเจน

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบุนเส้น

3. สไลด์
4. กล้องจุลทรรศน์
5. แบคทีเรีย *Streptococcus faecalis* และ *Streptococcus aureus* บน nutrient agar slant
6. 3% hydrogen peroxide

วิธีการ

1. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Streptococcus faecalis* และ *Streptococcus aureus* มาป้ายบนสไลด์ แต่ละชนิดตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique
2. หยด 3% hydrogen peroxide ลงไปบนรอยแบคทีเรียที่ป้ายบนสไลด์ 1-2 หยด แล้วนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10x แล้วอ่านผลการทดสอบ

การอ่านผล

ผลบวก : จะเห็นฟองแก๊สเกิดขึ้น

ผลลบ : ไม่มีการเปลี่ยนแปลง

ผลการทดลอง

แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
<i>Streptococcus faecalis</i>	
<i>Streptococcus aureus</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 9

ทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอส (urease test)

หลักการ

แบคทีเรียที่สังเคราะห์เอนไซม์ยูรีเอสจะเปลี่ยนยูเรียไปเป็นแอมโมเนีย ทำให้มีค่าพีเอช (pH) เพิ่มขึ้น และเปลี่ยนสีฟีนอลเรด (phenol red) ซึ่งเป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) จากสีเหลืองไปเป็นสีแดง

อุปกรณ์

1. ลูป (inoculating loop)
2. ตะเกียงบนเส้น
3. แบคทีเรีย *Klebsiella spp.* และ *Proteus vulgaris*
4. Urea agar 3 หลอด

วิธีการ

1. ติดฉลากหลอดบรรจุ urea agar หลอดที่ 1 ว่า "control" หลอดนี้ห้ามเปิดจุกหลอดโดยเด็ดขาด เป็นอาหารที่ยังไม่ได้เลี้ยงแบคทีเรีย ซึ่งจะให้เป็นตัวเปรียบเทียบกับหลอดอื่นที่เลี้ยงแบคทีเรีย
2. ใช้ลูปแตะแบคทีเรีย *Klebsiella spp.* และ *Proteus vulgaris* มาขีด (streak) บนผิวเอียง (slant) ของ urea agar หลอดที่ 2 และ 3 แต่ละชนิดตามลำดับด้วยวิธี aseptic technique แล้วติดฉลากหลอดอาหารทั้ง 2 หลอด
3. นำหลอดบรรจุอาหารทั้ง 3 หลอดไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง (30°C) เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แล้วบันทึกผลการเจริญเติบโตของแบคทีเรียใน urea agar

การอ่านผล

ผลบวก : อาหาร urea agar เปลี่ยนเป็นสีชมพู

ผลลบ : อาหาร urea agar ไม่มีการเปลี่ยนสี

ผลการทดลอง

แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ
<i>Klebsiella spp.</i>	
<i>Proteus vulgaris</i>	

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

การทดลองที่ 10

การทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจของแบคทีเรีย (MR-VP test)

หลักการ

MR-VP test เป็นการทดสอบการสังเคราะห์เอนไซม์เกี่ยวกับการหายใจของแบคทีเรีย ประกอบด้วย การทดสอบ 2 ชนิดที่แตกต่างกัน แต่ใช้เพื่อจุดประสงค์เดียวกัน โดย MR คือ methyl red เป็นอินดิเคเตอร์ (indicator) ซึ่งจะมีสีแดงเมื่อพีเอช (pH) 4.4 หรือต่ำกว่า และมีสีเหลืองเมื่อพีเอช 6.0 หรือสูงกว่า ใช้ทดสอบว่ามีกรดเกิดขึ้นหรือไม่ ส่วน VP คือ Voges-Proskaur ใช้ทดสอบว่ามี acetoin เกิดขึ้นหรือไม่

อุปกรณ์

1. ตะเกียงบุนเส้น
2. หลอดทดลอง (test tube) ขนาด 13x100 mm จำนวน 2 หลอด
3. methyl red, α -naphthol solution และ KOH solution

4. แบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ใน nutrient broth

วิธีการ

1. แบ่งแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ใน nutrient broth เป็น
อย่างละ 2 หลอดเท่า ๆ กันด้วยวิธี aseptic technique

2. นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ใน nutrient broth อย่างละ
1 หลอดมาทดสอบ MR test โดยหยด methyl red ลงไป 2-3 หยด เขย่าให้เข้ากันแล้วอ่านผลการ
ทดสอบ

3. นำแบคทีเรีย *Escherichia coli* และ *Enterobacter aerogenes* ใน nutrient broth อย่างละ
1 หลอดมาทดสอบ VP test โดยเติม α -naphthol solution ลงไป 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน
แล้วเติม KOH solution ลงไปอีก 0.5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5-10 นาที จึงอ่านผลการ
ทดสอบ

การอ่านผล

1. MR test : ถ้ามีกรดจะมีสีแดง ถ้าไม่มีกรดจะมีสีเหลือง

2. VP test : ถ้ามี acetoin จะมีสีชมพูและแดง

ผลการทดลอง

แบคทีเรีย	ผลการทดสอบ MR test	ผลการทดสอบ VP test
<i>Escherichia coli</i>		
<i>Enterobacter aerogenes</i>		

วิจารณ์และสรุป

.....

.....

.....

.....

.....

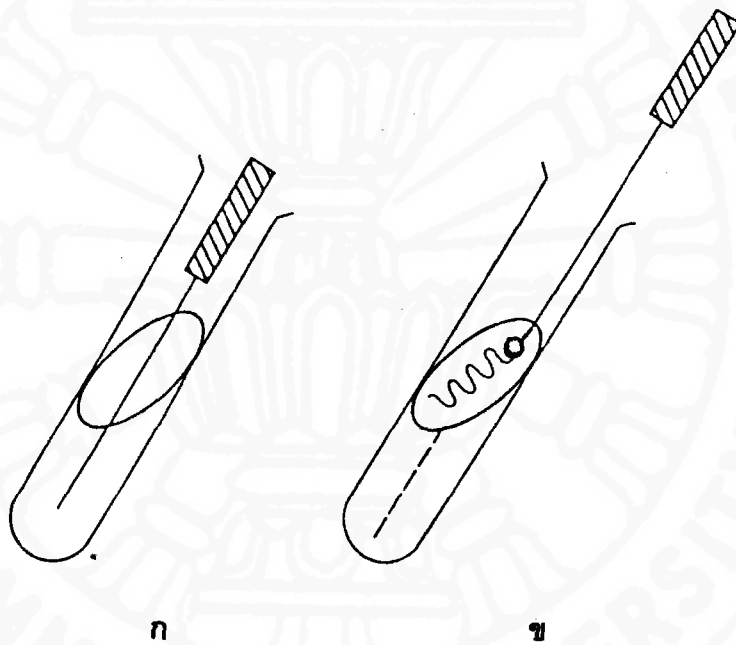
ข้อเสนอแนะ

.....

.....

.....

.....



รูปที่ 5-4 ก. วิธีการใช้ลูป (inoculating loop) ชีด (streak) บนผิวเฉียง (slant) ของอาหาร
ข. วิธีการใช้เข็มเขี่ยเชื้อ (inoculating needle) แทง (stab) ลงไปในอาหาร (butt)

สำนักหอสมุด