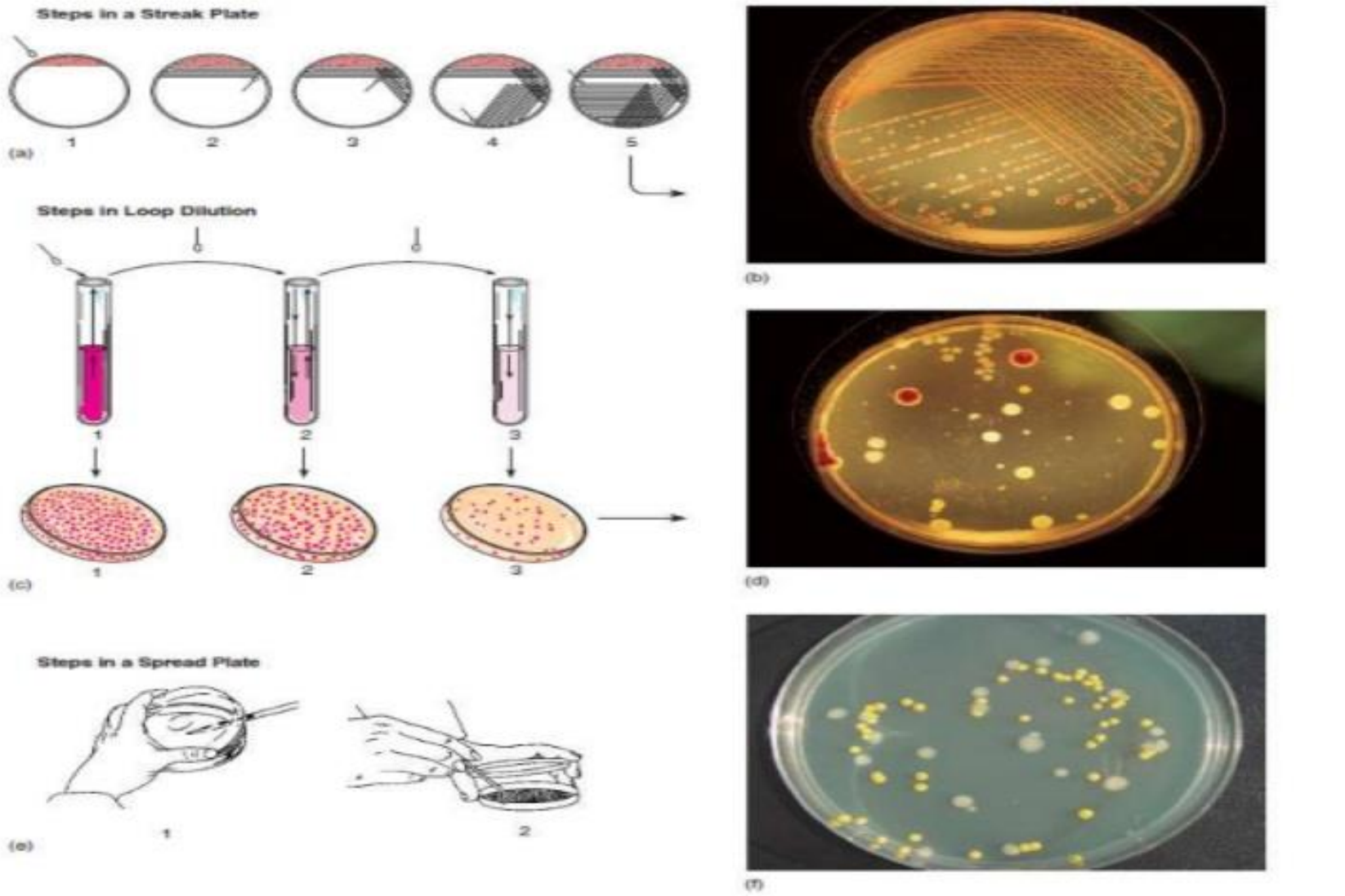
บทที่ 3
อาหารเลี้ยงเชื้อและการแยกเชื้อบริสุทธิ์ (Cultivation Media and Screening of Pure Culture)

- การนำจุลินทรีย์มาศึกษานั้นจำเป็นต้องนำจุลินทรีย์จากธรรมชาติมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ทำให้ต้องทราบถึงสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมและสารอาหารที่จุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ ต้องการ จึงมีการศึกษาความต้องการสารอาหารและมีผลให้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมาอย่างมากมาย ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์มีหลายประเภทขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์มีความต้องการสารอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกัน

- หลังจากนั้นจึงทำการแยกเชื้อจุลินทรีย์ด้วยเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยา และนำเชื้อจุลินทรีย์มาบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ชนิดนั้น ๆ เมื่อครบระยะเวลาการบ่ม สังเกตลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ คัดเลือกเฉพาะโคโลนีเดี่ยวมาทำการศึกษา เมื่อได้จุลินทรีย์ที่ต้องการแล้วทำการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งมีวิธีการเก็บรักษาหลายวิธี เพื่อให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการ เก็บรักษาได้เป็นระยะเวลานานโดยไม่ทำให้สมบัติของเชื้อจุลินทรีย์เปลี่ยนแปลงไป

Method of cultivating microorganism



Methods for isolating bacteria. **(a)** Steps in a quadrant streak plate and **(b)** resulting isolated colonies of bacteria. **(c)** Steps in the loop dilution method and **(d)** the appearance of plate 3. **(e)** Spread plate and **(f)** its result.

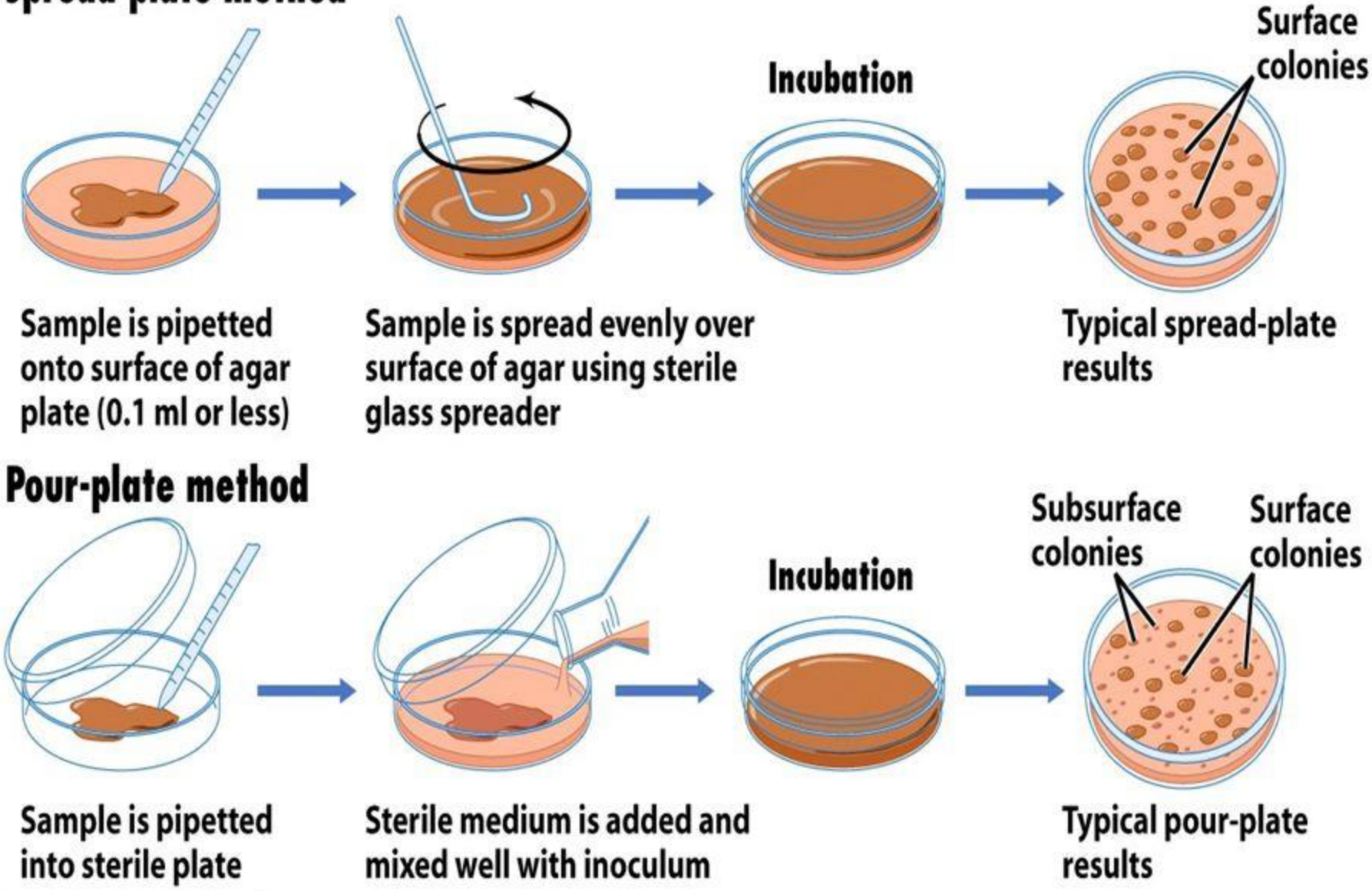
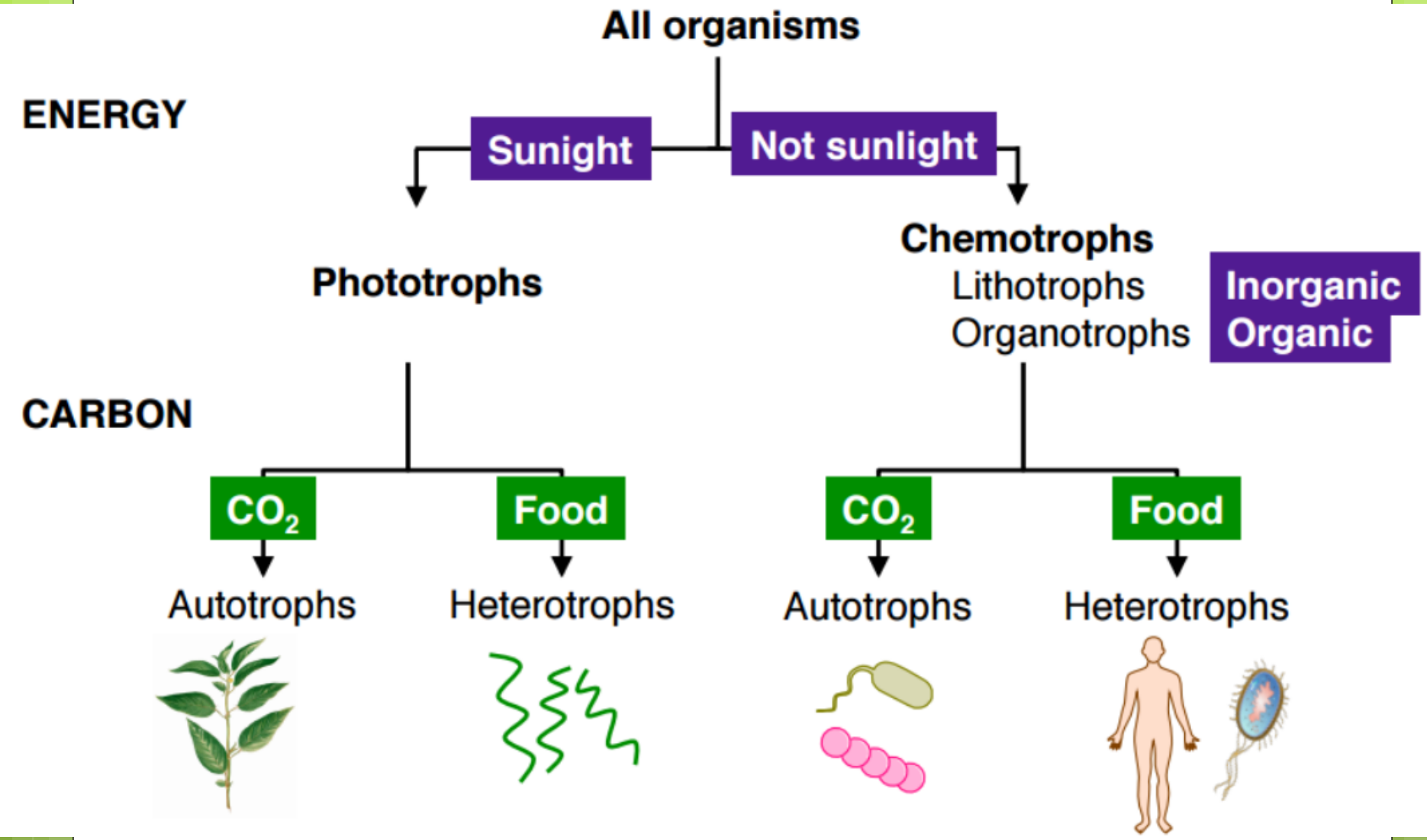
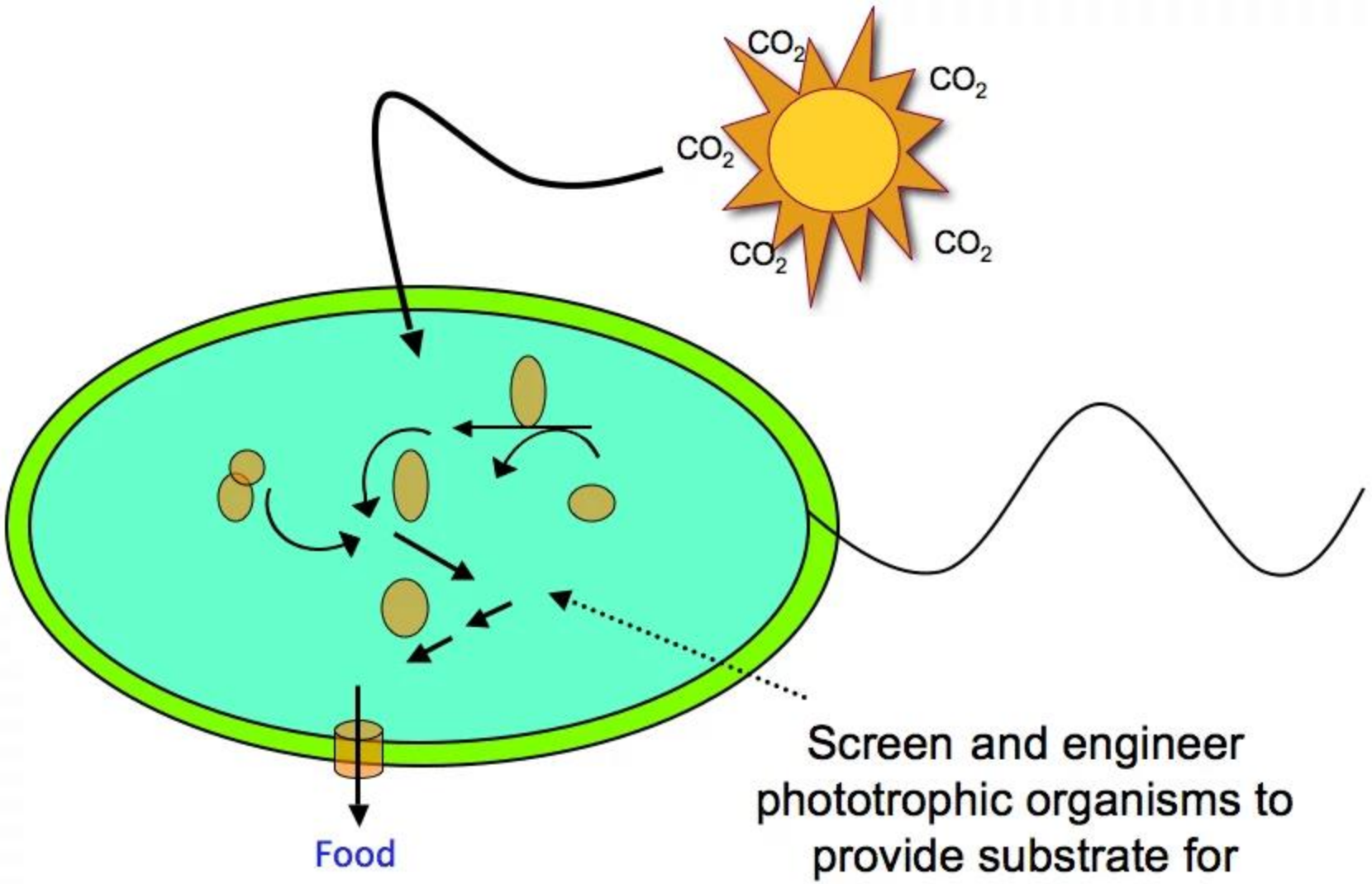


Figure 6-10 Brock Biology of Microorganisms 11/e

© 2006 Pearson Prentice Hall, Inc.

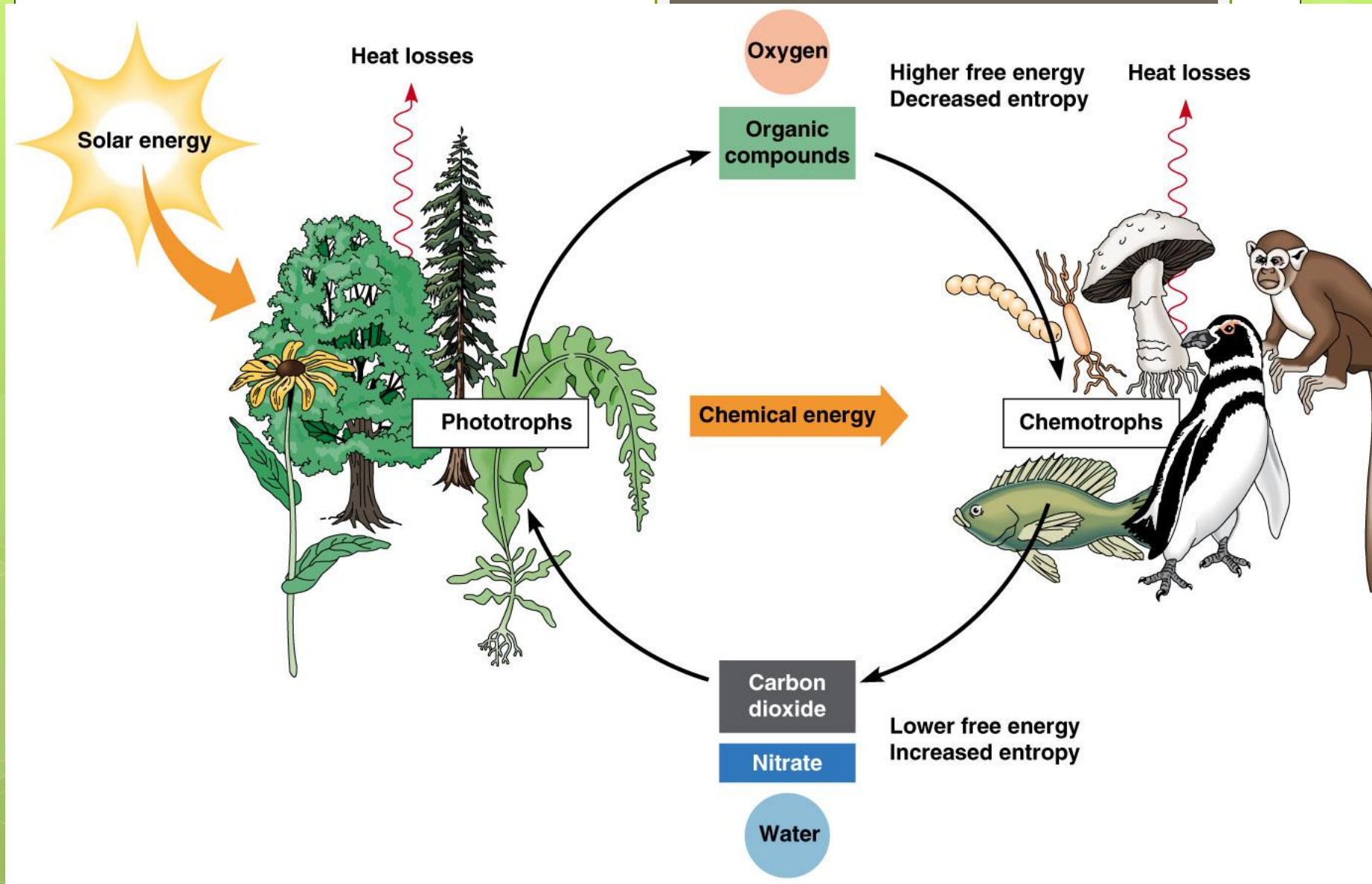
- **ความต้องการสารอาหารของสิ่งมีชีวิต**
- สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการสารอาหาร เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตดังต่อไปนี้ สามารถแบ่งเป็น 4 กลุ่ม **1.** โฟโตโทรฟ **(Phototroph)** ดำรงชีวิตโดยอาศัยแหล่งพลังงานจากแสงและอาศัยแหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ได้แก่ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน **(cyanobacteria)** และแบคทีเรียประเภทที่สามารถสังเคราะห์แสงได้
- **2.** เคโมออโตโทรฟ **(Chemoautotroph)** ดำรงชีวิตโดยอาศัยพลังงานจากการออกซิเดชั่นของสารอนินทรีย์ และอาศัยพลังงานจากแหล่งคาร์บอนจากก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ ตัวอย่างได้แก่ แบคทีเรียที่สามารถใช้ไนไตร์ทและกำมะถัน เป็นต้น


All organisms
ENERGY
Sunight
Not sunlight
Phototrophs
Chemotrophs
Lithotrophs
Organotrophs
Inorganic
Organic
CARBON
CO_2
Food
CO_2
Food
Autotrophs
Heterotrophs
Autotrophs
Heterotrophs


CO_2
CO_2
CO_2
CO_2
Food
Screen and engineer phototrophic organisms to provide substrate for heterotrophic bacteria

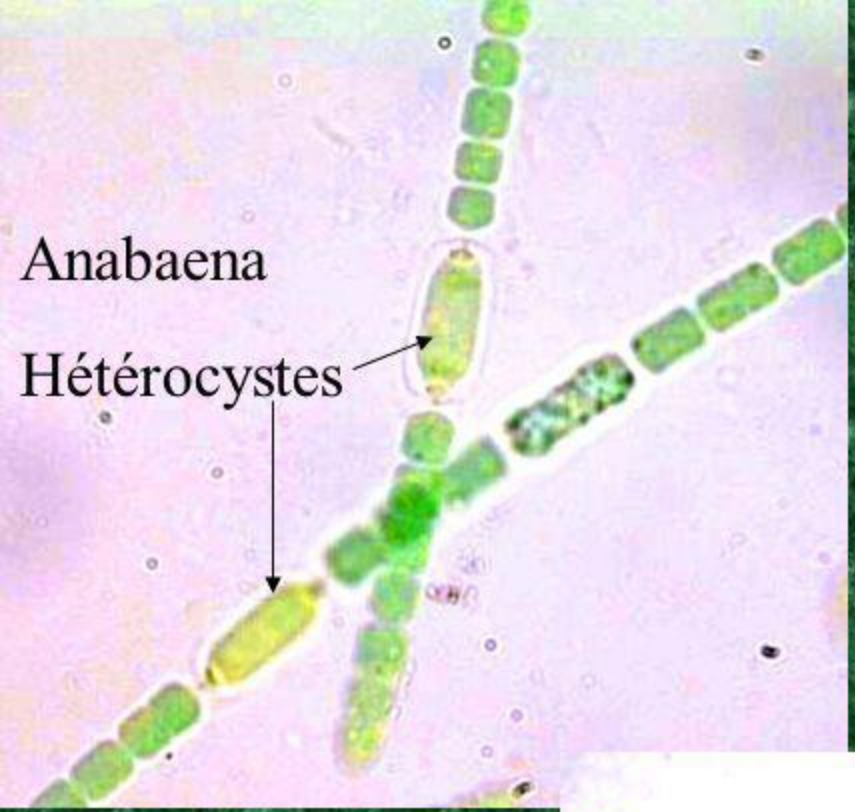
- **3.** โฟโตออร์แกโนโทรฟ **(Photoorganotroph)** ดำรงชีวิตโดยอาศัยแหล่งพลังงานจากแสง และอาศัยแหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ เช่น **Purple Non Sulfur Bacteria**

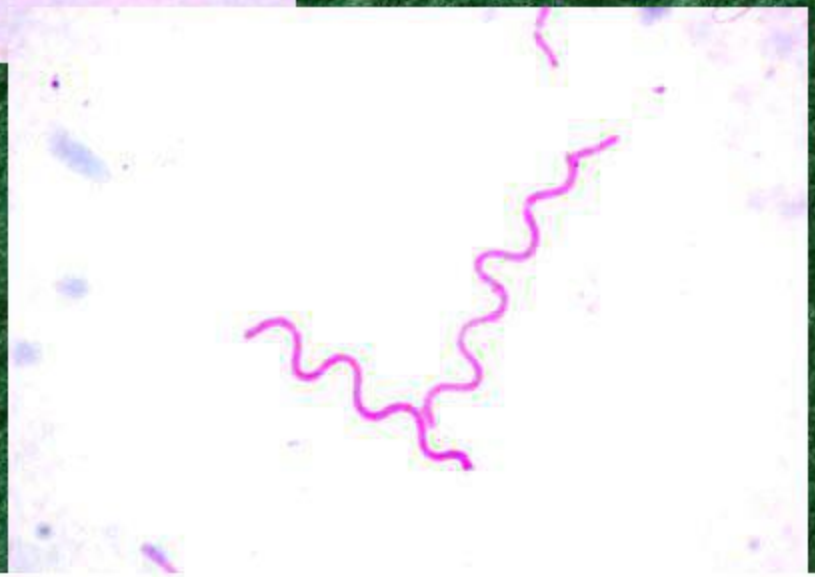
- **4.** เคโมออแกนโนโทรฟ **(Chemoorganotroph)** ดำรงชีวิตโดยอาศัยแหล่งพลังงานจากพลังงานแสง และอาศัยแหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ สิ่งมีชีวิตในกลุ่มนี้ได้แก่แบคทีเรียกลุ่มต่าง ๆ



© 2012 Pearson Education, Inc.

- **การแบ่งประเภทของแบคทีเรียตามความต้องการสารอาหาร**
- สามารถแบ่งแบคทีเรียออกได้ 4 ประเภทคือ
- 1. โฟโตลิโธโทรฟ **(Photolithotroph)** เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงสว่าง โดยอาศัยคลอโรฟิลล์พิเศษ และใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นแหล่งคาร์บอน ใช้สารอนินทรีย์เป็นตัวให้อิเล็กตรอนได้แก่ เพอเพิลซัลเฟอร์แบคทีเรีย **(Purple Sulfur Bacteria)** และกรีนซัลเฟอร์แบคทีเรีย **(Green Sulfur Bacteria)**
- **2.** โฟโตออร์แกนโนโทรฟ **(Photoorganotroph)** เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสง ได้แหล่งคาร์บอนจากสารอินทรีย์ และใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งให้อิเล็กตรอน เช่น แอลกอฮอล์ กรดไขมัน ได้แก่ เพอเพิล นอน ซัลเฟอร์แบคทีเรีย **(Purple Non Sulfur Bacteria)**
-





Eubactéries

Cyanobactéries

PHOTOLITHOTROPHES

Purple Non Sulfur Bacteria

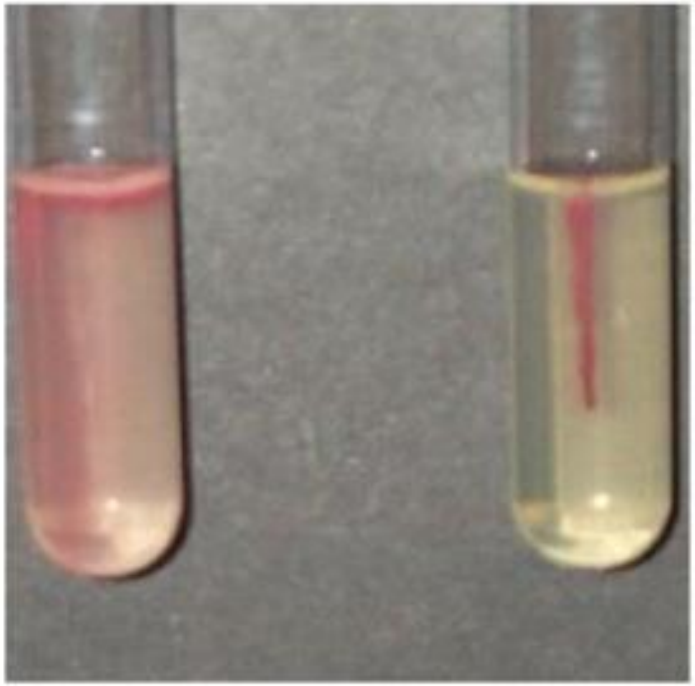
3. เคโมลิโธโทรฟ (**Chemolithotroph)** เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิเดชันของสารเคมี แหล่งของคาร์บอนและอิเล็กตรอนได้จากสารอนินทรีย์ ได้แก่ ซัลเฟอร์แบคทีเรีย (**Sulfur Bacteria)** ไฮโดรเจนแบคทีเรีย (**Hydrogen Bacteria)**

4. เคโมออร์แกนโนโทรฟ (**Chemoorganotroph)** เป็นแบคทีเรียที่ได้พลังงานจากการออกซิเดชันสารอินทรีย์และแหล่งคาร์บอนและอิเล็กตรอนได้จากสารอินทรีย์ได้แก่ แบคทีเรียส่วนใหญ่โดยทั่วไป

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- 1. การแบ่งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อตามลักษณะทางกายภาพ
  - 1.1 อาหารเหลว **(Liquid Media)** หรืออาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว **(Semisolid Media)** ปกติบรรจุในหลอดหรือขวด ไม่มีการเติมวุ้น เช่น อาหารเหลว **Nutrient Broth**
- 1.2 อาหารแข็ง **(Solid Media)** ปกติบรรจุในจานเพาะเชื้อ นอกจากนี้ยังสามารถบรรจุในหลอดหรือขวดให้อยู่ในสภาพเอียงหรือตั้งตรงอย่างธรรมดาได้ โดย “วุ้น” เป็นส่วนประกอบสำคัญที่ใส่ลงไปเพื่อทำให้อาหารแข็ง โดยมีการเติมลงไป 1.5 % - 2.0 % ของส่วนประกอบของอาหารแข็งทั้งหมด
- อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว **(Semisolid Media)** มีการเติมวุ้น 0.5% ตัวอย่างเช่นอาหารเลี้ยงเชื้อ **MRSV** ที่ใช้ทดสอบการเคลื่อนที่ของเชื้อ

Semisolid medium



The organism in the tube on the left in the figure is motile and the organism in the tube on the right is nonmotile.

- *การแบ่งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อตามลักษณะการเตรียม*
- 2.1 **Common Ingredient of Culture Media**

  สารทุกอย่างต้องชั่งตามสูตรแล้วนำมารวมกันตามวิธีที่อธิบายในการเตรียมแต่ละอาหารเลี้ยงเชื้อ มีข้อดีคือ ประหยัดค่าใช้จ่ายและสามารถเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อได้หลายชนิดตามต้องการ ส่วนข้อเสียคือต้องใช้เวลาในการเตรียมมากและการชั่งสารแต่ละชนิดต้องถูกต้องตามสูตร มิฉะนั้นจะไม่ได้ผลตามที่ต้องการ
- 2.2 **Dehydrated Media** เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมสารต่าง ๆ ตามสูตรมาเรียบร้อยแล้วเพียงแต่ต้องคำนวณว่าต้องชั่งสารต่าง ๆ มาเท่าใดและนำมาผสมกับน้ำจะได้ปริมาตรตามต้องการ ข้อดีคือประหยัดเวลาในการเตรียมเหมาะสำหรับแหล่งที่ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อนั้น ๆ เป็นประจำ เช่นห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา ห้องปฏิบัติการในโรงพยาบาล ส่วนข้อเสียคือมีราคาแพง

- 3. การแบ่งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อตามองค์ประกอบของอาหาร
- 3.1 อาหารไม่สังเคราะห์ **(Non-Synthetic Medium)** อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน ประกอบด้วยเนื้อเยื่อพืชหรือสัตว์ มีสารอินทรีย์อยู่มากมายช่วยในการเติบโตของเชื้อหลายชนิด ที่นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการเช่น **Nutrient Agar (NA)**

- **Potato Dextrose Agar (PDA)** โดย **Beef Extract** เป็นสารสกัดจากเนื้อที่ไม่มีไขมัน ประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนและวิตามินที่ละลายน้ำ ส่วนเปปโตน **(Peptone)** ได้มาจากการย่อยสลายของโปรตีน เช่นเนื้อสัตว์ เคซีน (โปรตีนในนม) ประกอบด้วยสารอินทรีย์ไนโตรเจน คาร์โบไฮเดรตและวิตามินและ อาการ์ **(Agar)** คือวุ้นที่เป็นสารประกอบคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน ได้จากสาหร่ายสีแดงใช้ทำให้อาหารแข็งตัว ไม่มีคุณค่าทางอาหาร

sonwu
Potato
Agar
Xi'an Sonwu Biotech Co.,Ltd.
Potato dextrose agar

What is agar?

- The gelling agent is an unbranched polysaccharide obtained from the cell walls of some species of red algae, primarily from the genera *Gelidium* and *Gracilaria*, or seaweed (*Sphaerococcus euchema*).

- 3.2 อาหารสังเคราะห์ **(Synthetic Media)** อาหารสังเคราะห์ที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีที่แน่นอน เช่น **MRS Agar** ใช้เลี้ยงเชื้อแบคทีเรียกลุ่ม ***Lactobacilli*** ซึ่งอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดนี้มีส่วนประกอบหลายชนิด แต่ละชนิดทราบปริมาณแน่นอน

PALE YELLOW COLOUR
(TRANSPARENT)
PINK COLOUR
(TRANSPARENT)
MAC CONKEY AGAR
DARK RED COLOUR
(OPAQUE)
NUTRIENT AGAR
BLOOD AGAR

- การแบ่งชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อตามประโยชน์ที่ใช้
- 4.1 เอ็นริชเมนท์ มีเดีย (Enrichment Media) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารพิเศษลงไปเพื่อเร่งการเติบโตของเชื้อตัวหนึ่งแต่ยับยั้งเชื้ออีกตัวหนึ่ง ใช้เลี้ยงเชื้อที่เจริญได้ยาก เช่น Blood Agar จะกระตุ้นการเจริญของ *Salmonella sp.* ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* สารพิเศษที่เติมลงไปเป็นเลือดคนหรือแกะ โดยเติมลงไปในปริมาณร้อยละ 5 เพื่อทำให้แบคทีเรียก่อโรคบางชนิดเจริญเติบโตได้

- 4.2 ซีเล็คทีฟมีเดีย (Selective Media) อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียบางชนิด แต่ส่งเสริมแบคทีเรียอีกชนิด ตัวอย่างเช่น MacConkey Agar มีการเติม Crystal Violet และ Bile Salt เพื่อยับยั้งแกรมบวกแต่แกรมลบสามารถเจริญได้ ถ้ามีการย่อยแลคโตสจะเปลี่ยนเป็นสีแดงคือ กลุ่มแบคทีเรียที่ไม่ก่อโรค ถ้าไม่มีการย่อยแลคโตสจะใส ไม่มีสีคือกลุ่มแบคทีเรียก่อโรค

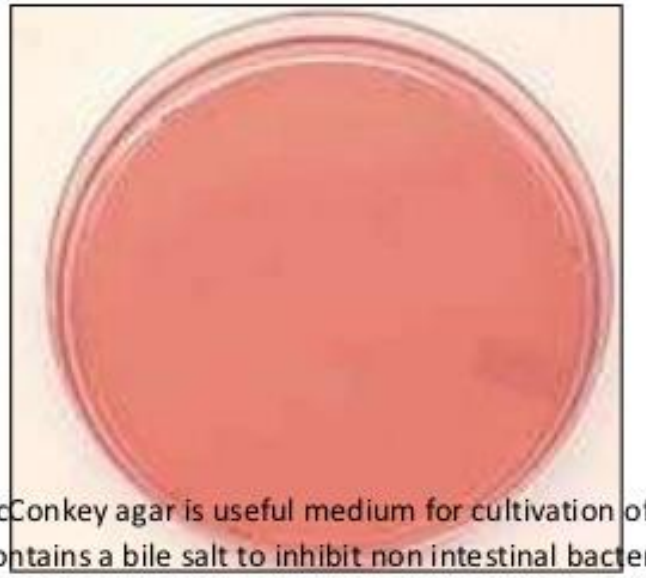
Enriched media

- Enriched with Blood,serum,extrapeptones,egg& vitamins
- Used for:

  cultivation of all fastidious organisms, (haemophilus influenza&*Streptococcus spp.)*
- Examples:
- Blood agar &chocolate agar

MacConkey agar (MAC)

- A **selective and differential media** used to differentiate between Gram negative bacteria while inhibiting the growth of Gram positive bacteria.
- The **addition of bile salts and crystal violet** to the agar inhibits the growth of most Gram positive bacteria, making MacConkey agar selective.
- **Lactose and neutral red** are added to differentiate the **lactose fermenters, which form pink colonies,** from lactose nonfermenters that form clear colonies.



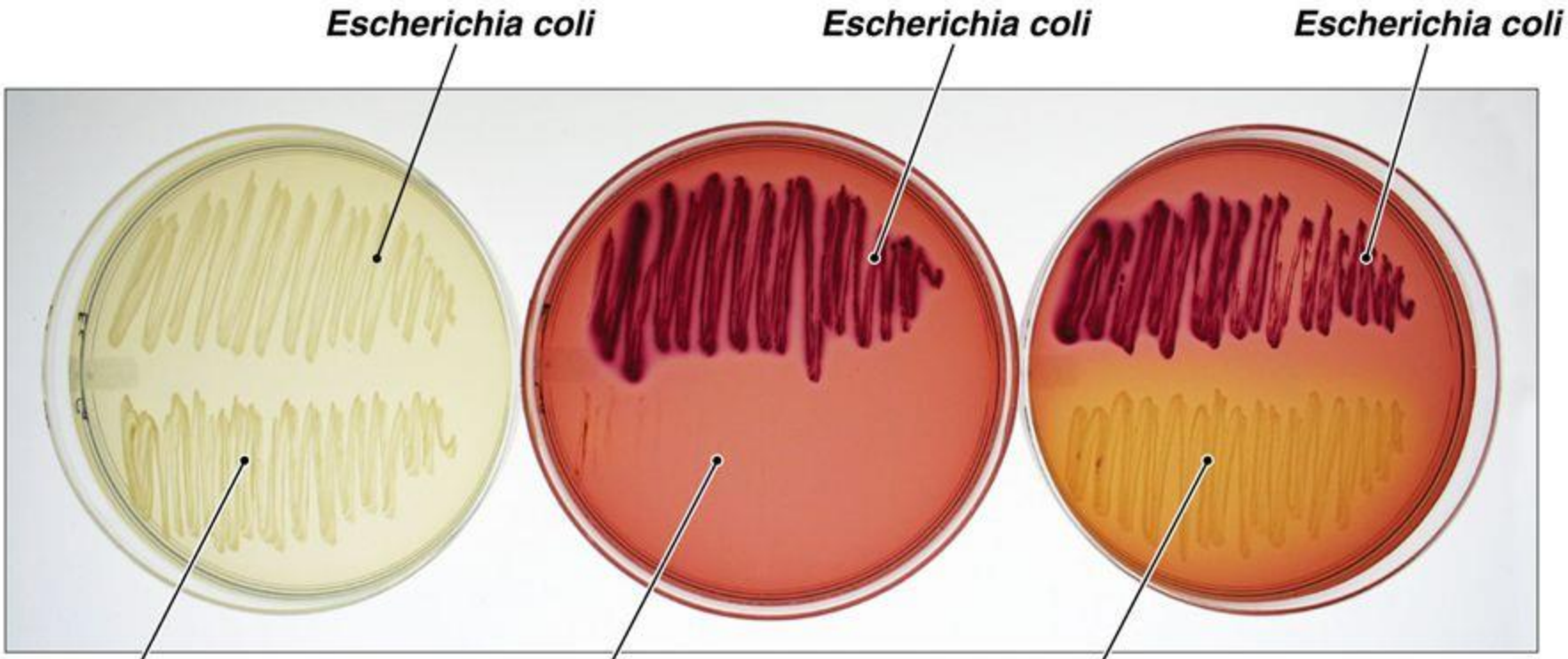
Composition:
Bile salts
Crystal voilet
Lactose
Neutral red

- MacConkey agar is useful medium for cultivation of enterobacteria
- It contains a bile salt to inhibit non intestinal bacteria
- Lactose in combination with Neutral red distinguish the lactose fermenting from the non lactose fermenting Salmonella and Dysentery group

- 4.3 ดิฟเฟอร์เรนเชียลมีเดีย **(Differential Media)** อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีการเติมสารบางอย่างเพื่อใช้แยกประเภทของเชื้อโดยอาศัยสมบัติที่แตกต่างกัน เช่น **Mac Conkey Agar**มีการเติมนิวตรัลเรด **(Neutral Red)** ใช้เป็นอินดิเคเตอร์ โดยดูว่าถ้าแบคทีเรียแกรมลบสามารถจะเจริญได้ก็จะมีการย่อยแลคโตสได้เป็นกรด ทำให้โคโลนีมีสีแดงเพราะสีอินดิเคเตอร์ของนิวทรัล เรดเปลี่ยนไป ส่วนพวกที่ไม่มีการย่อยแลคโตสซึ่งโคโลนีจะใสไม่มีสี เนื่องจากพวกที่ย่อยแลคโตส ไม่ได้มีการทำให้เกิดโรค อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้จึงมีประโยชน์ในการแยกแบคทีเรียจากลำไส้ว่าเป็นเชื้อที่ทำให้เกิดโรคและไม่ทำให้เกิดโรค อีกตัวอย่างเช่น **Blood Agar** ย่อยเม็ดเลือดแดงทำให้เกิดวงใสของการยับยั้ง **(Clear Zone)** รอบโคโลนี

- **4.4** แอสเซมีเดีย **(Assay Media)** อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีองค์ประกอบพิเศษใช้วิเคราะห์หาปริมาณวิตามิน กรดอะมิโน และสารปฏิชีวนะ และใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ในการยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์

Figure 6.15 Use of MacConkey agar as a selective and differential medium-overview



© 2012 Pearson Education, Inc.

- 4.5 อาหารที่ใช้ตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์ องค์ประกอบของอาหารต้องเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น เช่น การหาจุลินทรีย์ในน้ำหรือนม
- 4.6 อาหารที่ใช้ศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์ ใช้ในการตรวจสอบการเจริญของจุลินทรีย์และศึกษาสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี
- 4.7 อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ **(Maintenance Media)** ต้องใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ให้มีชีวิตนานที่สุด โดยที่เชื้อมีสมบัติคงเดิม และต้องทำการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโต และปล่อยของเสียน้อยลง เช่น น้ำตาลกลูโคสในอาหารเพิ่มขึ้นทำให้เชื้อมีการเจริญเติบโตโดยการสร้างกรดได้มาก จุลินทรีย์จะตายเร็วจึงต้องมีการลดปริมาณกลูโคสได้น้อยลง

Slant & Deep Agar

Slant agar:
-Used for maintenance and preservation of pure cultures for subculture purposes.

Deep agar:
-Used for storage.
-Also used for studying the gaseous requirements for MOs.

- ก่อนที่จะชั่งสารอาหารเพื่อเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อต้องมีการคำนวณให้เรียบร้อยก่อนทำการชั่ง โดยเฉพาะอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทดีไฮเดรท **(Dehydrate)** ซึ่งมักเขียนเขียนไว้ข้างขวดว่าชื้นมาก **(Very Hygroscopic)** ดังนั้นจะต้องไม่เปิดขวดไว้นานเมื่อต้องการตักสารที่จะตักสารมาชั่ง ต้องตักอย่างรวดเร็วและหากตักสารนั้นมาเกินห้ามใส่กลับคืน เพราะสารเหล่านี้ดูดความชื้นในอากาศแล้วจะเสียง่าย

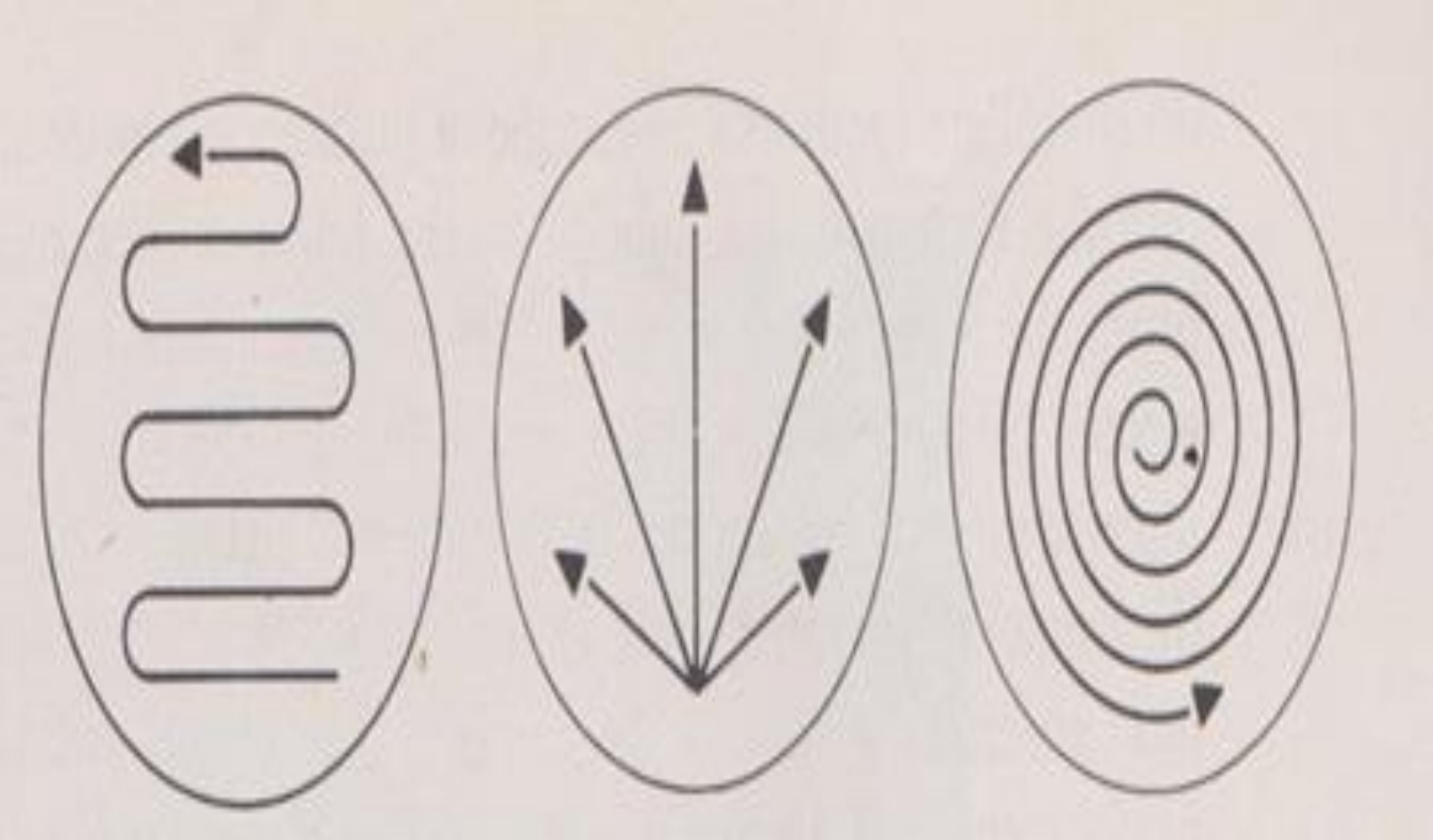
- การวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารที่ใช้เลี้ยงจุลินทรีย์นอกจากต้องคำนึงถึงองค์ประกอบของอาหารแล้ว ค่าความเป็นกรดด่างของอาหารย่อมมีผลต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ เนื่องจากจุลินทรีย์แต่ละชนิดเจริญได้ดีในค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแตกต่างกัน สำหรับการวัดค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดจะใช้กระดาษวัดค่าความเป็นกรดด่าง ถ้าจะให้ถูกต้องแน่นอนก็วัดด้วยเครื่องวัดความเป็นกรดด่าง ถ้าไม่ถูกต้องก็สามารถปรับด้วยการเติมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ **NaOH** หรือ **HCl** เมื่อเติมแล้วให้คนสารละลายให้ทั่วแล้ววัดค่าความเป็นกรดด่างใหม่จนกว่าจะได้ค่าความเป็นกรดด่างตามที่ต้องการ นอกจากนี้อาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีการใส่อินดิเคเตอร์ลงไป เพื่อบอกสภาพความเป็นกรดด่างที่เกิดจากการใช้สารต่าง ๆ ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อของเชื้อนั้น ๆ โดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหารเลี้ยงเชื้อตามปกติ

- การแยกเชื้อบริสุทธิ์และลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์
- เชื้อบริสุทธิ์ **(Pure Culture)** หมายถึงเชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันทุกเซลล์มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ การแยกเชื้อบริสุทธิ์ มีวิธีการดังต่อไปนี้

- การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ **(Streak Plate)** และทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ **(Spread Plate)**
- วิธีนี้ต้องการให้แบคทีเรียที่มีความเข้มข้นมาก ค่อย ๆ กระจายออกไป หรือมีความเจือจางจนพอที่จะทำให้เซลล์แต่ละเซลล์แยกออกจากกัน ดังนั้นการขีดในจานเพาะเชื้อที่ดีต้องให้รอยขีดมีระยะทางยาวมากที่สุด เพื่อเซลล์จะได้แยกจากกัน และแต่ละเซลล์จะเจริญแบ่งตัวมากขึ้นจนเป็นโคโลนีที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า จึงคาดหวังได้ว่าแต่ละโคโลนีน่าจะเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ถ้าไม่แน่ใจให้ทำการขีดเชื้อและกระจายเชื้อซ้ำอีกครั้งหนึ่ง โดยการขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อสามารถทำได้หลายแบบ คือ

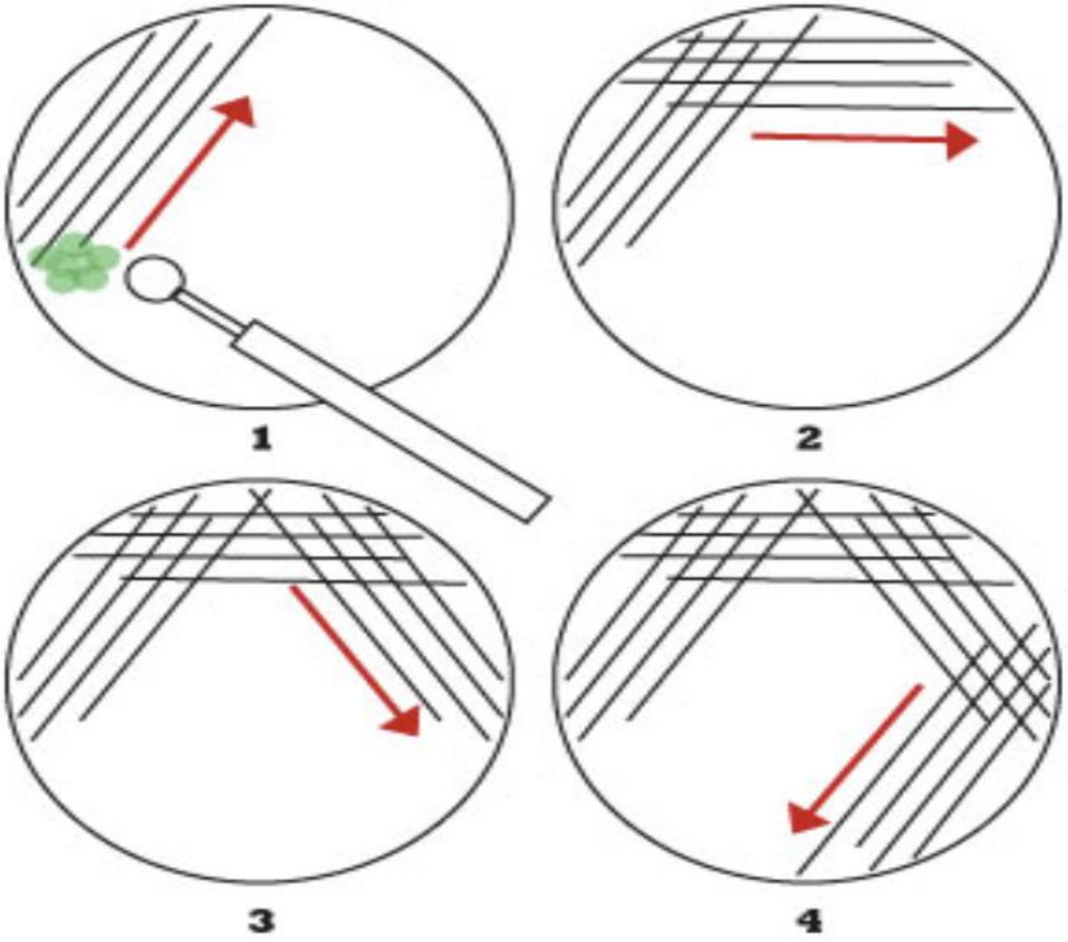
- 1.1 การขีดเชื้อแบบง่าย **(Simple Streak)**
- โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ **(Loop)** ลนไฟจนร้อนแดงและทิ้งให้เย็นลงซักครู่หนึ่ง แตะเชื้อที่ต้องการจะแยกบริสุทธิ์ มาขีดบนผิววุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในจานที่จุดเริ่มต้น เชื้อแบคทีเรียจะมีเป็นจำนวนมาก เมื่อขีดในจานเพาะเชื้อไปเรื่อย ๆ จำนวนแบคทีเรียจะลดลงเหลือน้อยลงจนอาจแยกออกเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ได้

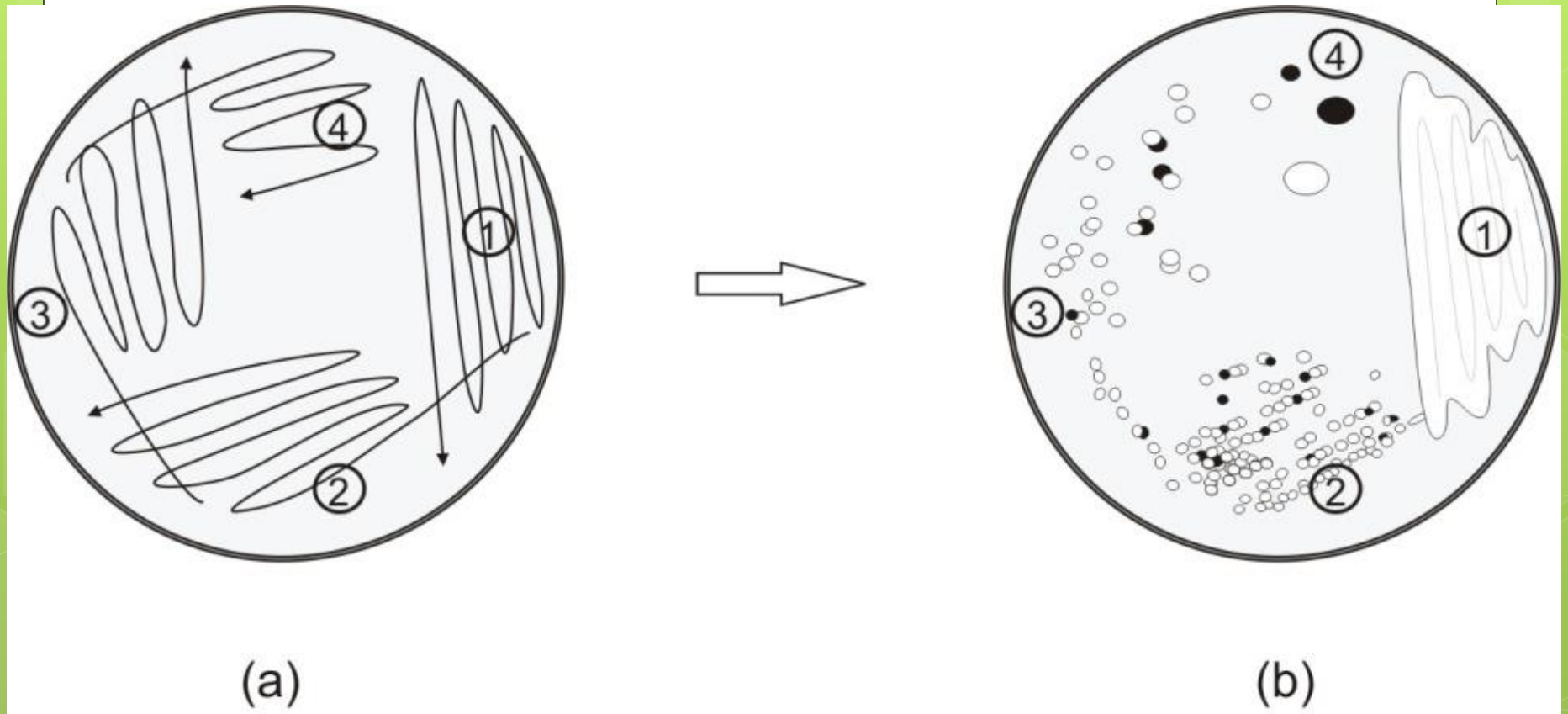
รูปแบบการขีดเชื้อแบบง่าย (Simple Streak) แบบต่าง ๆ ที่ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์



- การขีดเชื้อแบบตัดกัน (Cross Streak)
- เป็นวิธีที่นิยมในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟและรอให้เย็น แล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารวุ้นตามแนวที่ 1-2 ประมาณ 3-4 เส้น เผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่มีมากเกินไป และรอให้เย็น ขีดบนอาหารวุ้นตามแนวที่ 2-3 โดยให้รอยขีดตัดผ่านตอนปลายของแนว 1-2 เล็กน้อย ทำนองเดียวกัน เผ่าห่วงเขี่ยเชื้อ และขีดตามแนว 3-4 ดังนั้นเชื้อจะหนาแน่นมากตามแนวขีดในตอนแรก ๆ แต่ในตอนท้ายเชื้อจะเจือจางลงและแยกแต่ละเซลล์ออกจากกันได้ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่ละเซลล์จะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบจุลินทรีย์ได้ด้วยการย้อมสีแกรม

วิธีการขีดเชื้อแบบตัดกัน (Cross Streak)



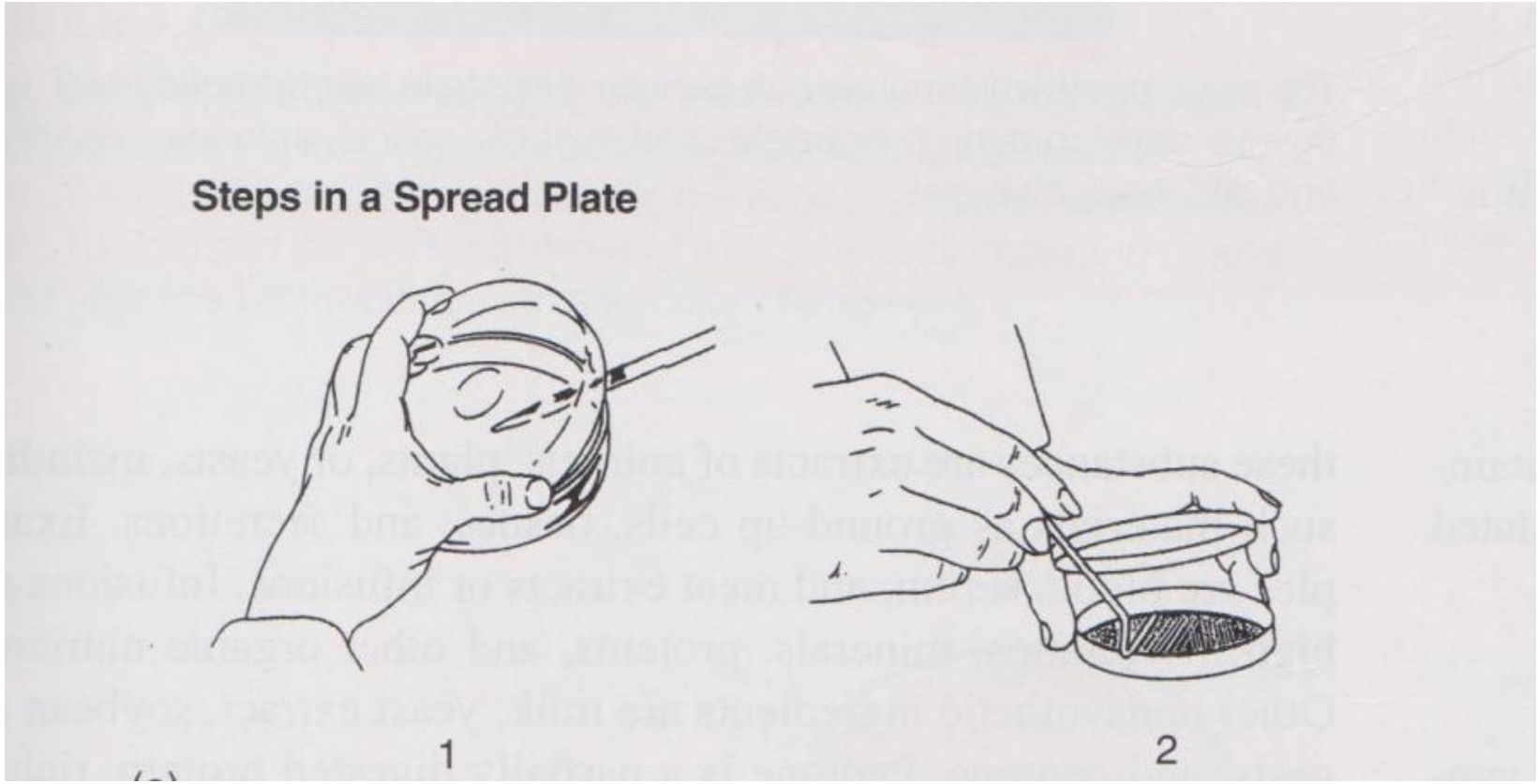


(a) (b)

- การทำให้เชื้อกระจาย **(Spread Plate)**

- มีหลักการเดียวกันโดยการใช้แท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยมและมีด้ามยื่นออกมาให้จับได้ ก่อนใช้ต้องทำให้แท่งแก้วปราศจากเชื้อใด ๆ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ร้อยละ 95 และลนไฟ หลังจากนี้ใช้แท่งแก้วนี้เกลี่ยเชื้อปริมาณเล็กน้อยให้ทั่วผิววุ้น เพื่อให้เซลล์ต่าง ๆ แยกและกระจายออกจากกัน เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมเป็นเวลา 24-48 ชั่วโมงการแยกเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้เครื่องมือน้อย สะดวก รวดเร็ว และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงนิยมใช้วิธีนี้ในห้องปฏิบัติการ

ขั้นตอนการทำให้เชื้อกระจาย (Spread Plate)



- การเทเพลท **(Pour-Plate Technique)**
- หลักการเทเพลท คือการทำให้ตัวอย่างเชื้ออยู่ในหลอดอาหารวุ้นที่หลอมเหลวแล้วและเทลงในจานเพาะเชื้อ อาหารวุ้นจะถูกหลอมเหลวและทิ้งไว้ให้อุ่นที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส ซึ่งจะผสมตัวอย่างเชื้อลงไปและทำให้กระจายอย่างสม่ำเสมอ ตัวอย่างเชื้ออาจจะถูกทำให้เจือจางด้วยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ **(Loop)** ถ่ายเชื้อไปยังอาหารวุ้นหลอดต่อไป ซึ่งมีผลให้จำนวนเซลล์แบคทีเรียในอาหารวุ้นหลอดหลัง ๆ มีความเจือจางมากพอจนสามารถแยกกระจายจากกันและเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ได้ ซึ่งโคโลนีจะเกิดทั้งบนผิววุ้นและใต้วุ้น หากเชื้อตั้งต้นมีเชื้อจุลินทรีย์ในปริมาณมากจำเป็นต้องทำการเจือจางก่อน ด้วยวิธีการเจือจางแบบ **10 serial dilutions** โดยปิเปตสารละลายของเชื้อตั้งต้น **1** มิลลิลิตรใส่หลอดที่มีน้ำเกลือ **(0.9 % NaCl)** ที่ฆ่าเชื้อแล้วปริมาตร **9** มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นสารละลายของเชื้อที่ 10^{-1} ต่อมาปิเปตสารละลายของเชื้อที่ได้ (10^{-1}) **1** มิลลิลิตร ใส่หลอดที่มีน้ำเกลือ **(0.9 % NaCl)** ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร **9** มิลลิลิตร ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อเขย่าให้เข้ากันจะได้เป็นสารละลายของเชื้อที่ 10^{-2} และทำไปเรื่อย ๆ จนได้ความเจือจางที่ต้องการ เมื่อได้ระดับการเจือจางที่ต้องการแล้วจึงเลือกมาทำเทคนิคการเพาะเชื้อแบบเทเพลท **(Pour Plate Technique)** ต่อไป

- เทคนิคการเพาะเชื้อแบบ **Pour Plate Technique** เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นหลาย ๆ ระดับด้วยเทคนิค **Serial Dilution** เพื่อทำให้เชื้อถูกเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยว ๆ บนจานเพาะเชื้อ โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วทำการเทอาหารวุ้น (**Agar Medium**) ลงไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ 48-50 องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านในของอาหาร และจะเกิดโคโลนีเดี่ยว ๆ ของเชื้อขึ้นมา

Pour Plate Method

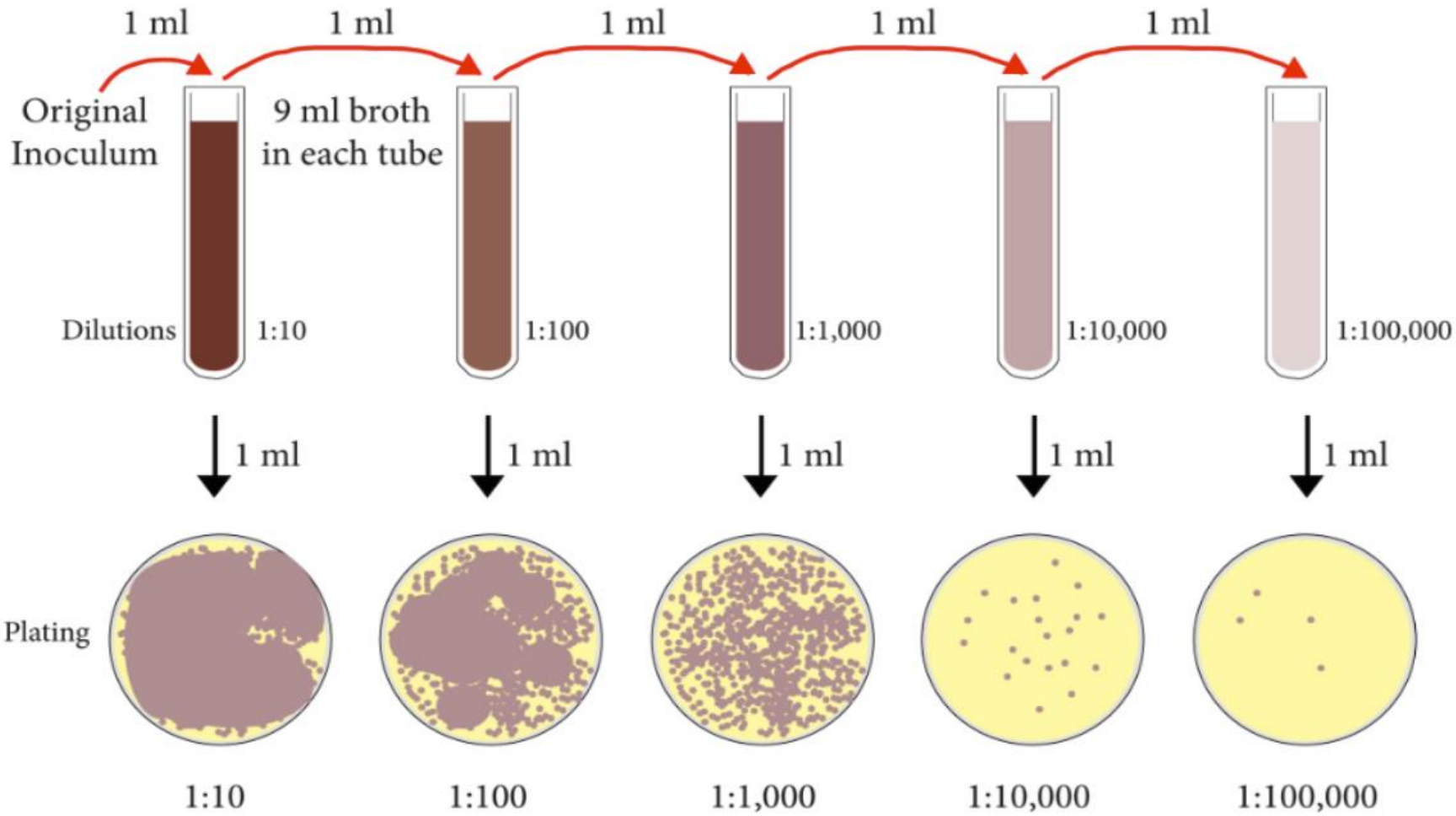
1. Bacterial sample mixed with warm agar (45–50 °C)

2. Sample poured onto sterile plate

3. Sample swirled to mix, allowed to solidify

4. Plate incubated until bacterial colonies grow

เทคนิคการเพาะเชื้อแบบเทเพลท



- การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

- ในการศึกษาเชื้อบริสุทธิ์ ต้องมีวิธีการเก็บรักษาเชื้อมีชีวิตให้คงอยู่ ซึ่งในห้องปฏิบัติการโดยส่วนใหญ่จะมีหน่วยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี การที่จะเลือกใช้วิธีการใดขึ้นกับแรงงาน ค่าใช้จ่ายของการเก็บรักษา คุณค่าและประโยชน์ของเชื้อ โดยวิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีดังต่อไปนี้

- การถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่
- เชื้อแบคทีเรียจะเก็บไว้ในอาหารระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการย้ายเชื้อไปอาหารใหม่นั้นขึ้นกับชนิดของเชื้อ โดยระยะเวลาอาจเก็บไว้ได้นานหลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้มักเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้เชื้องดการเจริญเติบโต ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และช่วงเวลาในการเปลี่ยนอาหารเพราะต้องการใช้อุณหภูมิและชนิดของอาหารที่ทำให้เชื้อบริสุทธิ์นั้นเจริญเติบโตอย่างช้า ๆ มากกว่าที่จะทำให้เจริญอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ระยะเวลาในการย้ายเชื้อยาวนานที่สุด วิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่ มีข้อเสียเปรียบที่ไม่อาจป้องกันการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้เพราะอาจเกิดการกลายพันธุ์หรือการผ่าเหล่า
- การปิดทับด้วยน้ำมันแร่
- แบคทีเรียที่เจริญอยู่บนผิววุ้นเอียง **(Agar Slant)** จะถูกปิดทับด้วยน้ำมันแร่ที่ปราศจากเชื้อหนาประมาณครึ่งนิ้ว โดยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อนี้ไว้ได้เป็นปี ๆ การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถเขี่ยเชื้อออกมาใช้ศึกษาหรือนำไปเลี้ยงต่อได้โดยใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อเขี่ยออกมา และยังเก็บเชื้อหลอดเดิมไว้ได้

Agar Slant Culture

- Agar slants or stabs- prepared after autoclaving the medium.
- placing them on slightly inclined positions- preparing slants- allow to soldify.
- Organism taken from master culture.
- Inoculated with individual culture and incubated for 24 hours.
- Stored at refrigerator(5℃) or freezer (-20℃).
- Cultures are periodically sub- cultured at an interval of one to six months.
- Time interval varies with the organisms and the condition of growth.

- ไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization)
- เป็นการทำให้เชื้อแห้งโดยเร็วในสภาพเย็นจนแข็ง (Freeze-Dry) วิธีนี้ทำได้โดยบรรจุเชื้อในหลอดแก้วขนาดเล็ก ทำให้เย็นจัดจนแข็งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียสถึง -78 องศาเซลเซียส โดยจุ่มหลอดลงในน้ำแข็งแห้งที่แช่อยู่ในแอลกอฮอล์และต่อเข้ากับท่อดูดอากาศ ทำให้เกิดสภาพสุญญากาศขึ้นภายในหลอด น้ำแข็งในหลอดจะระเหิดออกไปและจุลินทรีย์จะแห้งสนิท ปิดปากหลอดโดยใช้ไฟลนให้ปากหลอดหลอมติดกัน ข้อดีของวิธีการนี้คือ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ไว้ได้นานมากโดยที่เชื้อยังมีชีวิตอยู่และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะพันธุกรรมและยังใช้เนื้อที่ในการเก็บน้อย แต่วิธีการนี้เสียค่าใช้จ่ายในการทำสูงมากมักจะใช้ในห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่

- การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก
- เช่นการเก็บเชื้อไว้ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีเก็บรักษาเชื้อไว้ได้นาน โดยวิธีนี้เซลล์จะถูกเตรียมไว้เป็นสารละลายที่เข้มข้นอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายให้แก่เซลล์อันจะเกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น สารนั้นได้แก่ กลีเซอรอลหรือ ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ โดยสารละลายเซลล์ดังกล่าวจะเก็บไว้ในขวดเล็ก ๆ ที่ปิดผนึก และแช่แข็งที่อุณหภูมิ-150 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บขวดเหล่านี้ไว้ในไนโตรเจนเหลวซึ่งเป็นถังขนาดใหญ่มีสภาพเป็นสุญญากาศ วิธีใช้ไนโตรเจนเหลวนี้ใช้ได้ดีกับเชื้อที่ไม่สามารถใช้วิธีไลโอฟิไลเซชันได้ เชื้อส่วนใหญ่ยังมีชีวิตได้นานตั้งแต่ 10-30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงลักษณะ อย่างไรก็ตามวิธีนี้มีค่าใช้จ่ายแพงเพราะต้องคอยเติมไนโตรเจนเหลวเป็นครั้งคราว
-

(Lyophilization)

NCIMB Bacterial Reference Cultures. Photo Courtesy of NCIMB, Ltd.

Maintaining stock cultures

Agar slant

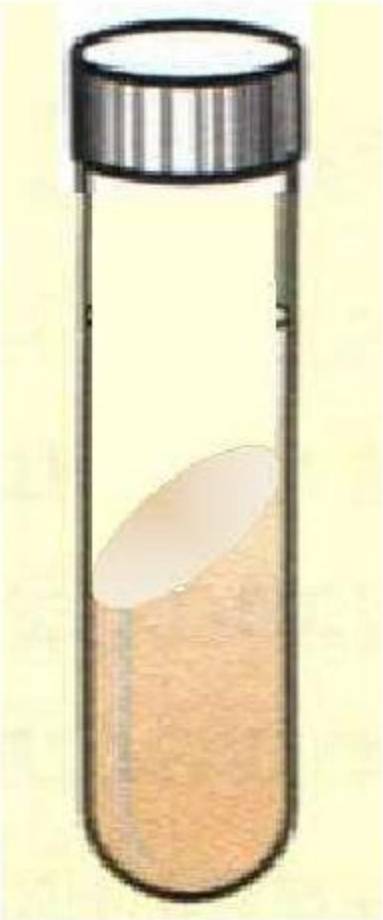
Store agar slant cultures in a refrigerator.

Stock at –70 to -80 °C

Store a pure culture in the presence of 17% glycerol.

Lyophilization (freeze drying)

Dry a pure culture with a lyophilizer. This can be stored at room temperature for years.

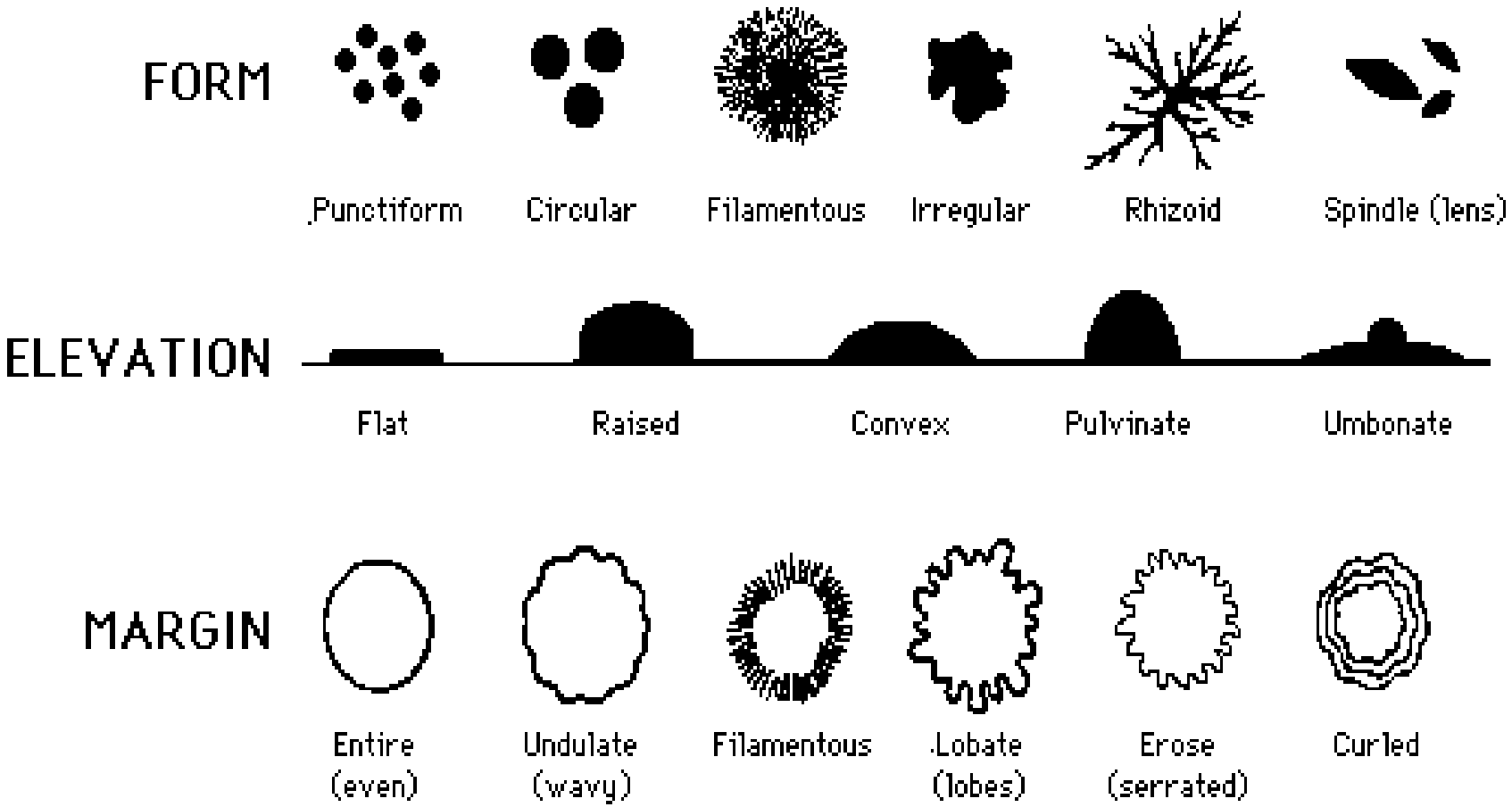


Liquid nitrogen

- ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียที่ปรากฏ เช่น ลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อ ชนิดต่าง ๆ สีที่เกิดขึ้น ความมากน้อยของการเจริญ กลิ่นของเชื้อ สามารถใช้เป็นเกณฑ์ในการจัดจำแนกชนิดของแบคทีเรียได้ เพราะลักษณะการเจริญบนอาหารชนิดต่าง ๆ จะเป็นลักษณะเฉพาะของเชื้อแต่ละชนิด โดยจะสังเกตลักษณะดังนี้
- 1. การเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง **(Agar Plate Colony)**
- **1.1** ขนาดของโคโลนี **(Size)** ศึกษาขนาดของโคโลนี จากเส้นผ่าศูนย์กลางไม่ถึง 1 มิลลิเมตร จนถึงโคโลนีขนาดใหญ่ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 5-10 มิลลิเมตร แบคทีเรียบางชนิดมีขนาดของโคโลนีจำกัดแม้บ่มไว้นาน หรือแม้แต่เชื้อบางชนิดโคโลนีมีลักษณะเป็นเมือกและลามไปยังโคโลนีอื่น
- 1.2 รูปร่างของโคโลนี **(Form)** โคโลนีมีรูปร่างแตกต่างกันดังนี้
- **Punctiform** โคโลนีมีขนาดเล็กมาก แต่มองด้วยตาเปล่าเห็น มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร **Circular** โคโลนีมีลักษณะกลม **Filamentous** โคโลนีประกอบด้วยเส้นสายพันกันแน่น **Irregular** รูปร่างไม่แน่นอน และ **Rhizoid** มีการเจริญแตกกิ่งก้านสาขาไม่แน่นอนและมีลักษณะคล้ายราก

- 1.3 ขอบหรือริมของโคโลนี **(Margin, Edge)**
- มีหลายรูปแบบขึ้นกับชนิดของแบคทีเรีย ลักษณะของขอบมีดังนี้ **Entire** ขอบเรียบ **Undulate** ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย **Lobate** ขอบเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก **Erose** ขอบหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ **Filamentous** ขอบเป็นเส้นสายยาวไม่แน่นอน
- 1.4 ความสูงของโคโลนี **(Elevation)**
- แตกต่างไปตามชนิดของแบคทีเรีย บางชนิดโคโลนีแบนบาง บางชนิดนูนมากเกือบเป็นรูปครึ่งวงกลมก็มี ความสูงของโคโลนีมีลักษณะ **Flat** โคโลนีแบนราบติดกับอาหาร **Raised** โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร **Convex** โคโลนีมีความโค้งนูนเล็กน้อยและ **Pulvinate** โคโลนีมีความนูนโค้งขึ้นมาจากผิวอาหารมาก

การเจริญเป็นโคโลนีบนอาหารแข็ง
(Agar Plate Colony)



- ลักษณะการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเหลว **(Broth Culture)**

- ลักษณะปริมาณการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เมื่อเจริญในอาหารเหลว อาจมีปริมาณ น้อย ปานกลาง หรือมาก นอกจากนี้ยังมีชนิดของการเจริญและการแพร่กระจาย โดยเชื้อจุลินทรีย์อาจเจริญกระจายทั่วอาหารอย่างสม่ำเสมอ ทำให้อาหารขุ่นทั่วทั้งหลอดหรือการเจริญอาจเกิดมากที่ผิวหน้าอาหารเป็นแผ่นบาง หรือมีการเจริญอย่างมากที่ก้นหลอด การเจริญในอาหารเหลวมีรายละเอียดดังนี้

- **2.1** การเจริญที่ผิวหน้าอาหารเหลว
- **None** คือ ไม่มีการเจริญที่ผิวหน้า
- **Ring** คือ มีการเจริญเป็นวงรอบติดอยู่ที่ขอบหลอดแก้ว
- **Pellicle** คือ การเจริญเป็นแผ่นลอยที่ผิวหน้าอาหาร
- **Flocculent** คือ การเจริญประกอบด้วยกลุ่มแบคทีเรียเกาะกันเป็นก้อนที่ผิวหน้าของอาหาร
- **2.2** การเจริญที่ผิวหน้าอาหาร
- **None** คือ ไม่มีการเจริญ
- **Turbid** คือ การเจริญมีลักษณะขุ่นและมีตะกอน
- **Granular** คือ การเจริญประกอบด้วยแกรนูลเล็ก ๆ เป็นอันมาก

- การตกตะกอนก้นหลอด
- None คือ ไม่มีการตกตะกอน

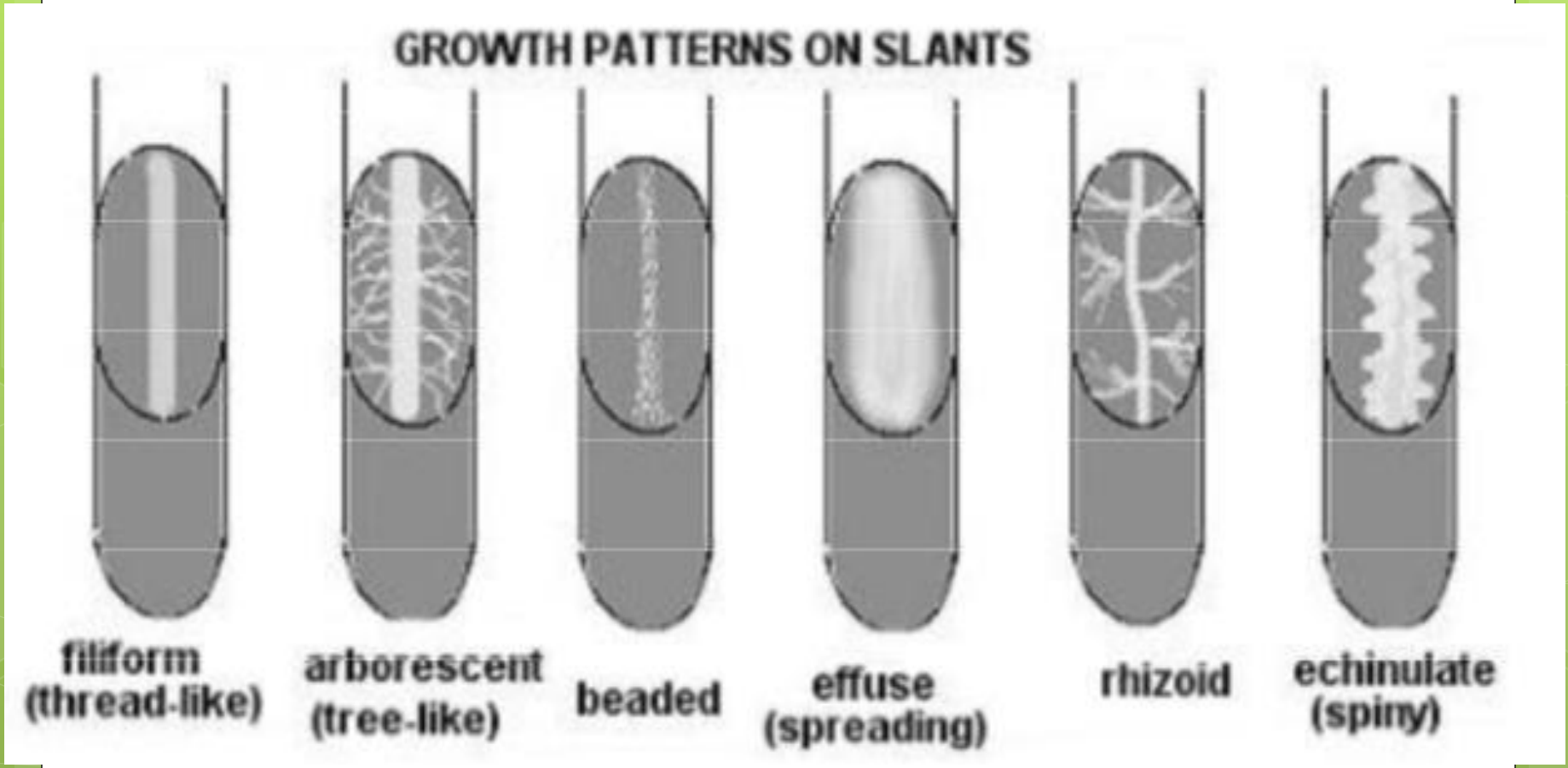
Granular คือ ตะกอนเป็นแกรนูลละเอียด

- Flocculent คือ ตะกอนเป็นกลุ่มก้อน
- Viscid คือ ตะกอนเป็นเยื่อเหนียว
- Flaky คือ ตะกอนเป็นแผ่นแยกออกจากกัน
- 3. ลักษณะการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารวุ้นเอียง (Slant)
- Slant คือ หลอดอาหารวุ้นที่วางเอียงลาด ลักษณะการเจริญมีดังนี้
- 3.1 ปริมาณเชื้อ มาก ปานกลาง หรือน้อย
- 3.2 รูปร่างการเจริญ) โดยแบ่งเป็น

Filiform ลักษณะการเจริญสม่ำเสมอตามแนวขีดเชื้อ

- Echinulate มีรอยหยักที่ขอบคล้ายฟันเลื่อย
- Beaded การเจริญไม่สม่ำเสมอ แยกกระจายตามแนวที่ขีดเชื้อ
- Arborescent การเจริญแตกกิ่งก้านคล้ายต้นไม้
- Rhizoid การเจริญแตกกิ่งคล้ายราก
- Effuse การเจริญมีน้อย บาง และกระจัดกระจาย
-

แบบแผนการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์บนอาหารเอียง (Growth Patterns on Slant)



- สรุปท้ายบท

- ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ในห้องปฏิบัติการทั่วไป มีปัจจัยต่าง ๆ ที่ต้องคำนึงถึง ได้แก่ ประเภทของความต้องการอาหารของแบคทีเรียซึ่งแบ่งเป็น 4 ชนิดคือ โฟโตโทรฟ (Phototroph)
- เคโมออโตโทรฟ (Chemoautotroph) โฟโตออร์แกโนโทรฟ (Photoorganotroph) และเคโมออแกนโนโทรฟ (Chemoorganotroph) นอกจากนี้ยังควรคำนึงถึงชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเลี้ยง เทคนิคการแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้แก่ การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate) และทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ (Spread Plate) ซึ่งเป็นเทคนิคขั้นพื้นฐานทางจุลชีววิทยา เมื่อเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์แล้ว จะต้องพิจารณาลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ ลักษณะการเจริญของเชื้อแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งมีการเจริญที่หลากหลาย เมื่อได้เชื้อจุลินทรีย์ที่ต้องการแล้วจึงทำการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ โดยมีวิธีการเก็บรักษาได้หลายวิธี ซึ่งแต่ละวิธีการเก็บรักษามีข้อดีและข้อเสียแตกต่างกัน วิธีการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ได้แก่ การถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่ การปิดทับด้วยน้ำมันแร่ และการทำไลโอฟิไลเซชัน (Lyophilization) เป็นต้น

- แบบฝึกหัดท้ายบท
- 1. สารอาหารเพื่อใช้ในการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตมี 4 กลุ่มมีอะไรบ้าง
- 2. อาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบ่งออกเป็นกี่ชนิด มีอะไรบ้าง
- 3. โคโลนีมีขนาดเล็กมาก แต่มองด้วยตาเปล่าเห็น มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตรเรียกว่ามีรูปร่างแบบใด
- 4. หากต้องการเก็บเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นเวลา 30 ปี จะต้องใช้วิธีการเก็บแบบใด
- 5. วิธีการแยกเชื้อจุลินทรีย์ให้บริสุทธิ์มีวิธีการใดบ้าง ยกตัวอย่างมา 2 วิธีการ
- 6. ข้อดีของการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการปิดทับด้วยน้ำมันแร่คืออะไร
- 7. วิธีการขีดเชื้อแบบใดเป็นวิธีการที่นิยมใช้มากในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยา
- 8. ลักษณะความสูงของโคโลนีมีลักษณะ Flat มีลักษณะอย่างไร
- 9. ข้อเสียของวิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยการถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่คืออะไร
- 10. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย สูตรอาหาร Nutrient Agar จัดเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อประเภทใด

The end