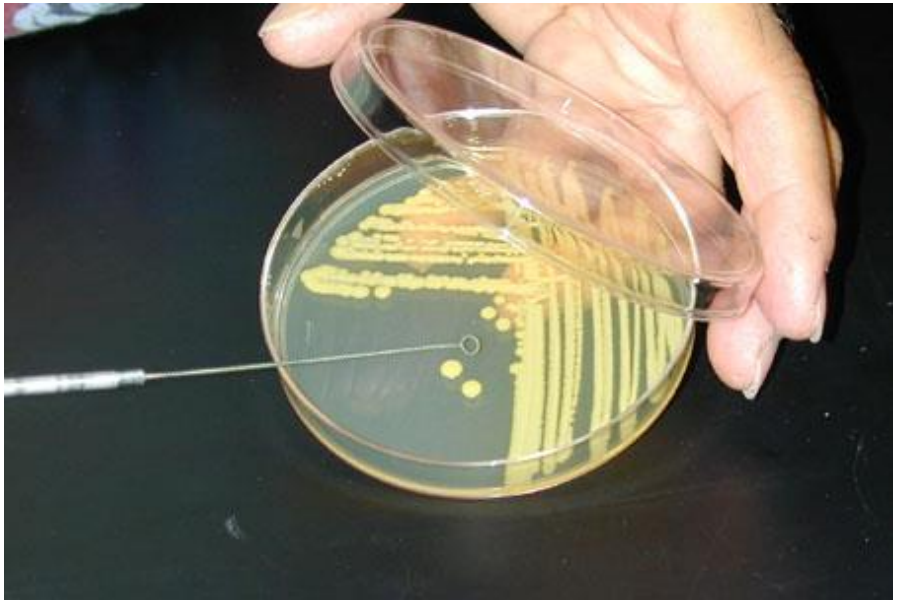
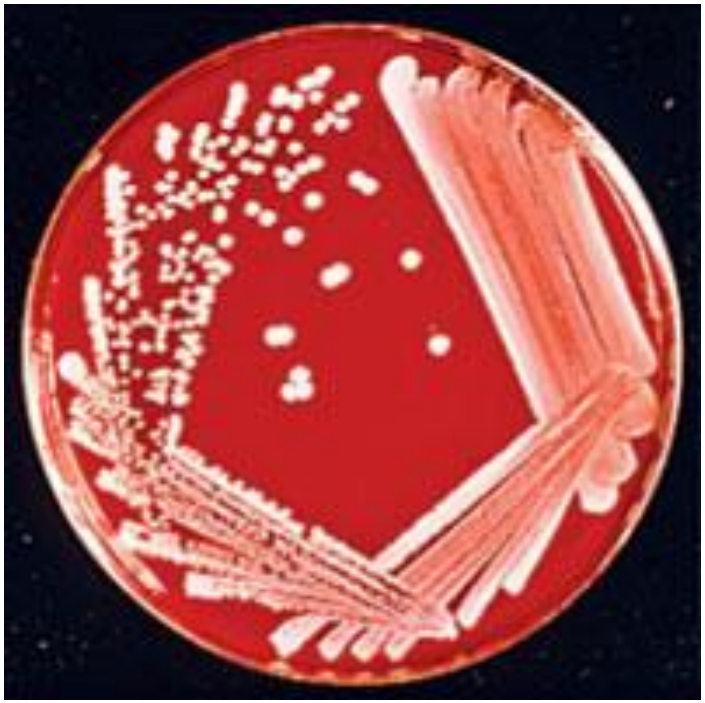
บทที่ 6

การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์



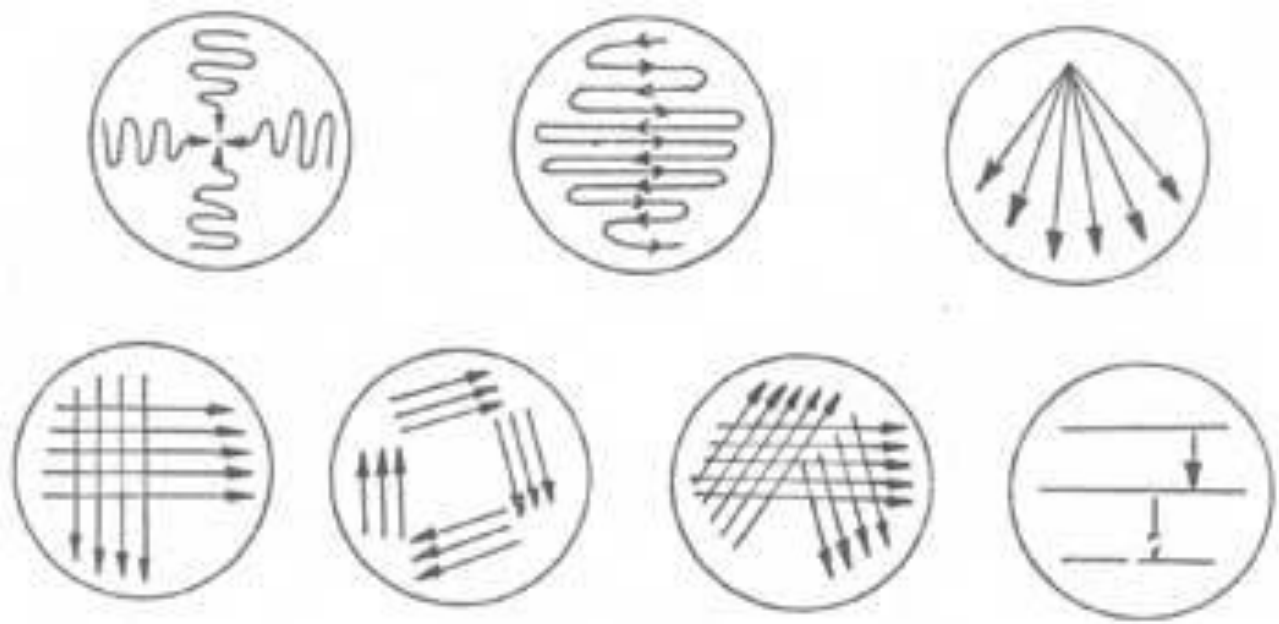
เชื้อบริสุทธิ์(pure culture)

- หมายถึง เชื้อจุลินทรีย์ที่ประกอบด้วยสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกัน ทุกเซลล์มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ



การแยกเชื้อบริสุทธิ์ มีวิธีการดังต่อไปนี้

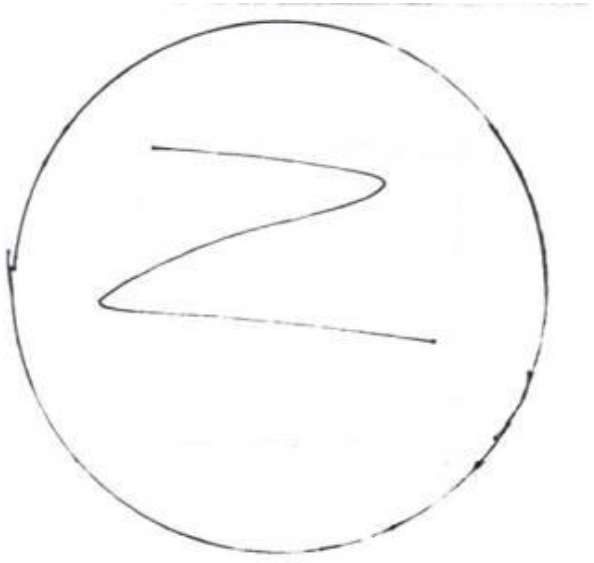
- 1. การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ(streak plate) และการทำให้เชื้อกระจายในจานเพาะเชื้อ(spread plate)
- วิธีนี้ต้องการให้เชื้อแบคทีเรียมีความเจือจางมากพอที่จะทำให้แต่ละเซลล์แยกออกจากกัน ดังนั้นการขีดในจานเพาะเชื้อที่ดีจะต้องให้มีรอยขีดระยะทางยาวมากที่สุด เพื่อเซลล์จะได้แยกออกจากกัน



การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ กระทำได้หลายแบบ ดังนี้

ก. การขีดเชื้อแบบง่าย (simple streak)

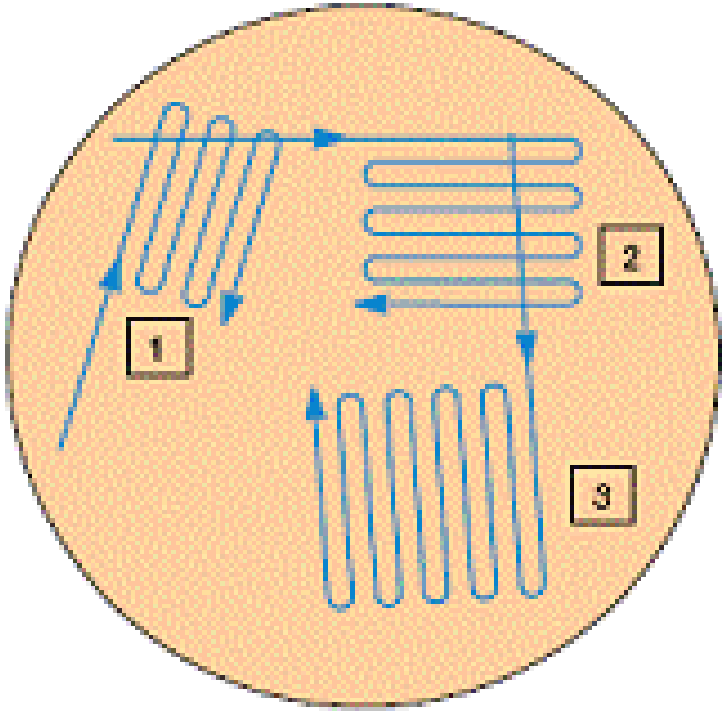
โดยการใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ(loop) ลนไฟจนร้อนแดง และทิ้งไว้ให้เย็นสักครู่ แตะเชื้อที่ต้องการแยกให้บริสุทธิ์ มาขีดบนผิววุ้นของอาหารเลี้ยงเชื้อในจานที่จุดเริ่มต้น เชื้อแบคทีเรียจะมีจำนวนมาก เมื่อขีดในจานเพาะเชื้อไปเรื่อยๆ จำนวนแบคทีเรียจะเหลือน้อยลงจนอาจแยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆได้



การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ กระทำได้หลายแบบ ดังนี้

ข. การขีดเชื้อแบบตัดกัน(cross streak)

เป็นวิธีที่นิยมมากในห้องปฏิบัติการ โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อที่เผาไฟและรอให้เย็น แล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารวุ้นตามแนว 1-2 ประมาณ 3-4 เส้น แล้วเผาห่วงเขี่ยเชื้อจนร้อนแดง เพื่อฆ่าเชื้อที่มีมากเกินไป และรอเย็น ขีดบนอาหารวุ้นตามแนว 2-3 โดยให้รอยขีดตัดผ่าน ตอนปลายของแนว 1-2 เล็กน้อย ทำนองเดียวกัน เผาห่วงเขี่ยเชื้อ และขีดตามแนว 3-4 และแนว 4-5

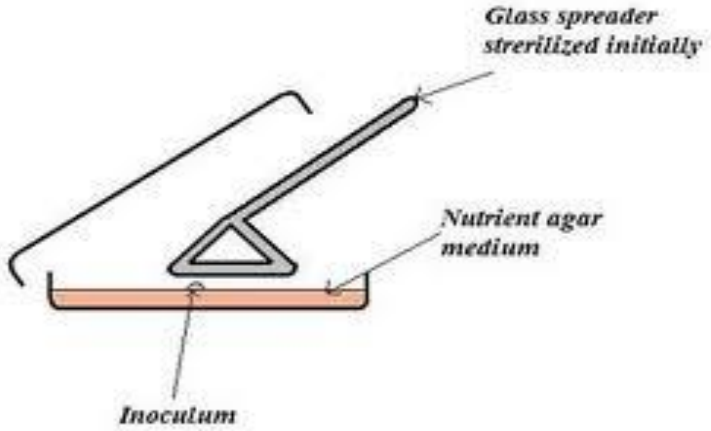


การขีดเชื้อแบบตัดกัน(CROSS STREAK)

- ดังนั้นเชื้อจะหนาแน่นมากตามแนวขีดในตอนแรกๆ แต่ในตอนท้ายๆเชื้อจะเจือจางลง และแยกเซลล์แต่ละเซลล์ออกจากกันได้ เมื่อนำไปบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง แต่ละเซลล์นั้นจะเจริญเป็นโคโลนีเดี่ยวๆได้ ซึ่งสามารถตรวจสอบด้วยการย้อมแกรม

ค. การทำให้เชื้อกระจาย(spread plate)

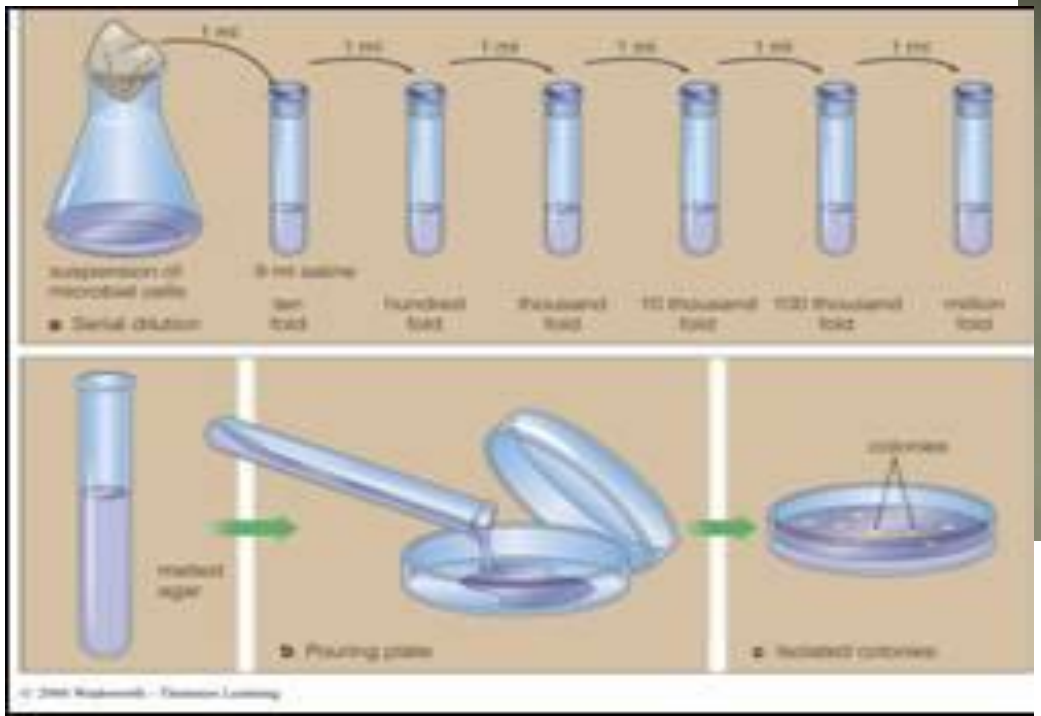
- มีหลักการเดียวกันโดยใช้แท่งแก้วงอรูปสามเหลี่ยม และมีด้ามยื่นออกมาให้จับได้ ก่อนใช้ต้องทำให้แท่งแก้วปราศจากเชื้อใดๆ โดยจุ่มในแอลกอฮอล์ 95% และลนไฟ ทิ้งให้แท่งแก้วเย็น
- ใช้แท่งแก้วนี้เกลี่ยเชื้อปริมาณเล็กน้อยให้กระจายทั่วๆ เพื่อเป็นการให้เซลล์ต่างๆแยกและกระจายออกจากกัน

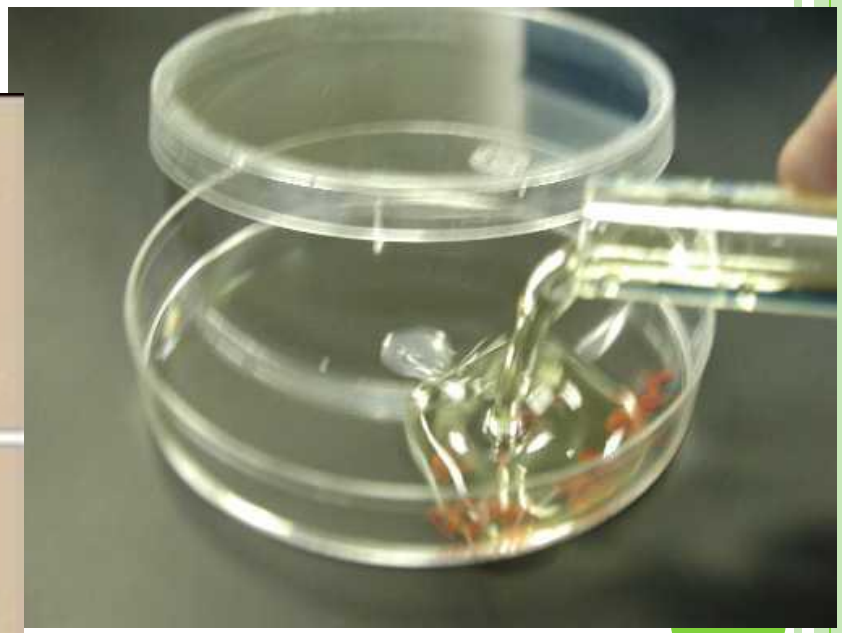


วิธีนี้มีข้อดีคือ ใช้เครื่องมือน้อย สะดวก รวดเร็ว และใช้ตัวอย่างเพียงเล็กน้อยเท่านั้นคือ 0.1 มิลลิลิตร จึงนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการ

2. การเทเพลท(pour plate technique)

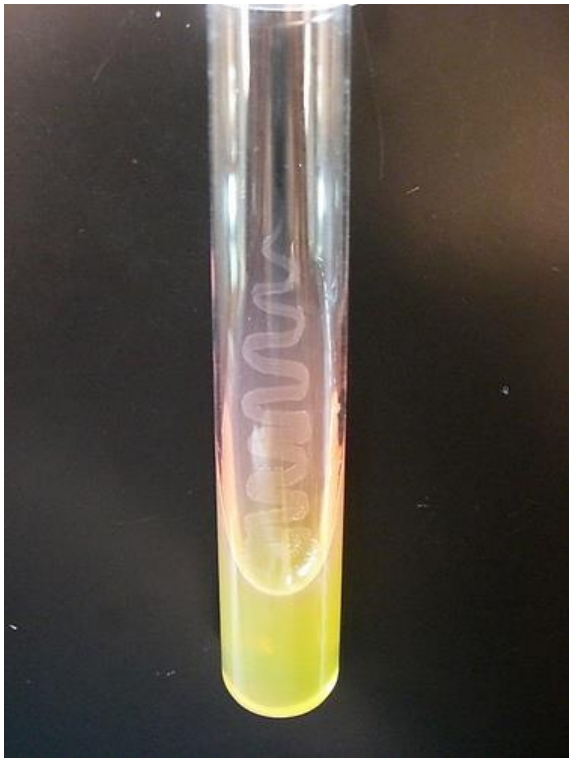
- หลักการเทเพลทคือ การทำให้ตัวอย่างเชื้อที่ทำให้เจือจางแล้ว 1 มิลลิลิตรรออยู่ในเพลท แล้วนำอาหารวุ้นที่อุ่นไว้ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียสเทลงในเพลท แล้วหมุนเพลทเป็นวงกลมหลายๆครั้ง เพื่อให้เชื้อกระจายตัวอย่างสม่ำเสมอ รอให้วุ้นแข็งตัว แล้วบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสม





การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์

- ในการศึกษาเชื้อบริสุทธิ์ จะต้องมีวิธีเก็บรักษาเชื้อให้มีชีวิตรอด ซึ่งในห้องปฏิบัติการส่วนใหญ่จะมีหน่วยเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ซึ่งเลือกวิธีใด ก็ขึ้นอยู่กับแรงงาน ค่าใช้จ่ายเครื่องมือ คุณค่าและประโยชน์ของเชื้อ



วิธีการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธี ดังนี้

1. **การถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่**

   เชื้อแบคทีเรียจะเก็บไว้ในอาหารระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการย้ายเชื้อขึ้นกับชนิดของเชื้อ อาจเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้มักเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำ เพื่อให้เชื้องดการเจริญเติบโต ดังตารางที่ 6.1

ตารางที่ 6.1 แสดงช่วงเวลาการถ่ายเชื้อ เมื่อเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อต่างๆ

แบคทีเรีย	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ช่วงเวลาการถ่ายเชื้อ	อุณหภูมิในการเจริญ(°C)	อุณหภูมิที่เก็บเชื้อ (°C)
Neisseria spp.	Cystine trypticase agar	1 เดือน	35	35
Bacillus spp.	Nutrient agar	12 เดือนหรือมากกว่า	28	10
Pseudomonas spp.	Nutrient agar	3 เดือน	28	10
Clostridium spp.	Cook meat medium	6 เดือนหรือมากกว่า	28	อุณหภูมิห้อง
Mycobacterium spp.	Glycerol agar	4 เดือน	30	10

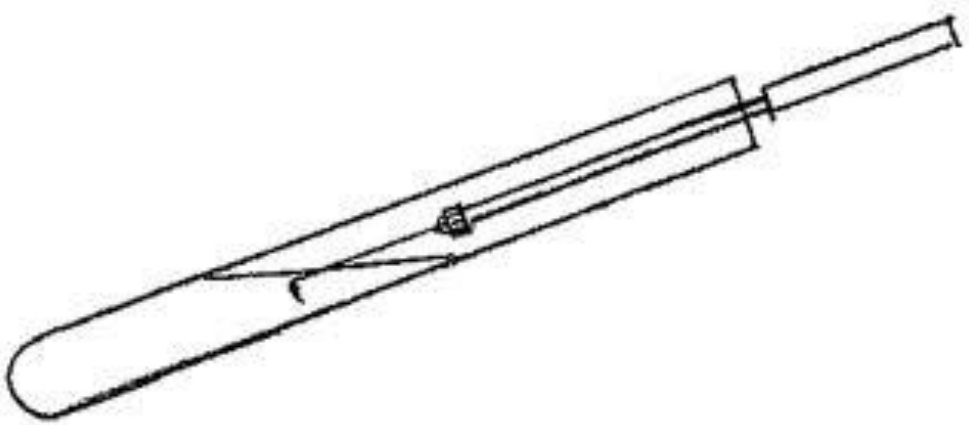
การถ่ายเชื้อไปสู่อาหารใหม่

- ดังนั้นการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์โดยวิธีนี้ ต้องคำนึงถึงอุณหภูมิที่เหมาะสมในการเก็บชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ และช่วงเวลาในการเปลี่ยนอาหาร เพราะต้องการใช้อุณหภูมิและชนิดของอาหารที่ทำให้เชื้อบริสุทธิ์เติบโตอย่างช้าๆมากกว่าจะทำให้เจริญอย่างรวดเร็ว เพื่อให้ระยะเวลาในการย้ายเชื้อยาวนานที่สุด

- ข้อเสียของวิธีนี้คือ อาจเกิดการกลายพันธุ์หรือผ่าเหล่าได้

2.ปิดทับด้วยน้ำมันแร่

- แบคทีเรียที่เจริญอยู่บนอาหารวุ้นผิวเอียง(agar slant) จะถูกปิดทับด้วยน้ำมันแร่ที่ปราศจากเชื้อ มีความหนาประมาณครึ่งนิ้ว โดยวิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ได้เป็นปีปี การเก็บรักษาวิธีนี้มีข้อดีคือ สามารถเขี่ยเชื้อออกมาใช้ศึกษาหรือนำไปเลี้ยงต่อได้ โยใช้เข็มที่ปราศจากเชื้อเขี่ยออกมา และยังเก็บหลอดเชื้อเดิมไว้ได้



3. ไลโอฟิไลเซชั่น(Lyophilization)

- เป็นการทำให้เชื้อแห้งโดยเร็วในสภาพเย็นจนแข็ง(freeze- dry) วิธีนี้ทำโดยบรรจุเชื้อในหลอดแก้วขนาดเล็ก ทำให้เย็นจัดจนแข็งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิ -60 องศาเซลเซียส ถึง -78 องศาเซลเซียส โดยจุ่มหลอดลงในน้ำแข็งแห้งที่แช่อยู่ในแอลกอฮอล์และต่อเข้ากับท่อดูดอากาศ ทำให้เกิดสภาพสุญญากาศในหลอด น้ำแข็งในหลอดจะระเหิดออกไปและเชื้อจุลินทรีย์จะแห้งสนิท ปิดปากหลอดโยใช้ไฟลนให้ปากหลอดหลอมติดกัน

- ข้อดีของวิธีนี้คือ เก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ได้นานมากโดยที่เชื้อมีชีวิตอยู่และไม่เปลี่ยนแปลงลักษณะทางพันธุกรรม และใช้เนื้อที่ในการเก็บน้อย แต่วิธีนี้เสียค่าใช้จ่ายสูงมาก เหมาะสำหรับห้องปฏิบัติการขนาดใหญ่

Lyophilizer

เชื้อจุลินทรีย์ที่ผ่านการทำแห้งแบบเยือกแข็ง

4. การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก

- เก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก เช่นเก็บที่ไนโตรเจนเหลวที่มีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส เป็นวิธีที่เก็บรักษาเชื้อไว้ได้นาน วิธีนี้เซลล์จะถูกเตรียมเก็บไว้ในสารละลายที่เข้มข้นอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารป้องกันอันตรายให้เซลล์อันเกิดจากผลึกน้ำแข็งที่เกิดขึ้น สารป้องกันดังกล่าวคือ กลีเซอรอล หรือ DMSO(dimethyl sulfoxide) สารละลายเซลล์ดังกล่าวจะถูกเก็บในขวดเล็กๆที่ปิดสนิท และแช่แข็งที่อุณหภูมิ -150 องศาเซลเซียส แล้วจึงเก็บขวดดังกล่าวในถังบรรจุไนโตรเจนเหลว ซึ่งเป็นถังขนาดใหญ่มีสภาพเป็นสุญญากาศ

การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก

- วิธีใช้ไนโตรเจนเหลวได้ผลดี โดยจะรักษาเซลล์ให้มีชีวิตได้นานตั้งแต่ 10 - 30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนลักษณะ แต่มีการเก็บรักษาที่แพง เนื่องจากต้องเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะๆ

The end