

## หน่วยที่ 5. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

การจัดแบ่งลักษณะการดำรงชีวิตนี้ ถูแบ่งโดยยึดหลักความสามารถในการสังเคราะห์อาหารแล้วมี 2 ชนิด คือ

1. Autotrophic bacteria (Autos = ตัวเอง, trophs = อาหาร) หมายถึง แบคทีเรียที่สามารถสังเคราะห์อาหารขึ้นได้โดยใช้อนินทรีย์สารเป็นวัตถุดิบ ส่วนพลังงานที่ใช้อาจได้มาจากแสงสว่างหรือพลังงานจากปฏิกิริยาทางเคมี ในขบวนการ oxidation – reduction แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ Photolithotrophic bacteria และ Chemolithotrophic bacteria

2. Heterotrophic bacteria หมายถึงแบคทีเรียที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารขึ้นเองได้ ต้องใช้อาหารที่ได้จากการสร้างของสิ่งมีชีวิตอื่น ส่วนพลังงานที่ใช้อาจได้มาจากแสงสว่างหรือพลังงานจากปฏิกิริยาเคมีในขบวนการ oxidation – reduction แบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ Photoorganotrophic bacteria และ Chemoorganotrophic bacteria

ตารางที่ 5-1 แสดงการจำแนกจุลินทรีย์ตามแหล่งของพลังงานและวิธีการสังเคราะห์อาหาร

		Food		
		Manufactured from inorganic source	Absorbed from prefabricated organic source	
Primary energy ↑ From chemical source ↓ From light source	<b>Photolithotrophs</b> - purple sulfur bacteria - green sulfur bacteria - blue green algae - algae (except colorless)	<b>Photoorganotrophs</b> - purple nonsulphur bacteria	Photosynthetic type	
	<b>Chemolithotrophs</b> - sulfur bacteria - iron bacteria - hydrogen bacteria	<b>Chemoorganotrophs</b> - saprophytic bacteria - symbiotic bacteria - fungi	Chemosynthetic type	
	- nitrifying bacteria	- slime molds - protozoa - colorless algae		
		Autotrophic types	Heterotrophic types	

## อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อ หมายถึง สารที่ใช้เป็นแหล่งอาหารสำหรับการเจริญและการทวีจำนวนของจุลินทรีย์

คุณสมบัติของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ดีควรมีคุณสมบัติดังต่อไปนี้

1. มีธาตุอาหารเหมาะสมแก่ชนิดของจุลินทรีย์และมีความเข้มข้นพอสมควร
2. มีความเป็นกรดและด่างที่เหมาะสมกับจุลินทรีย์ที่ใช้เลี้ยง ซึ่งโดยทั่วไปมี pH ประมาณ 6.5-7.5
3. มีความชื้นพอสมควร
4. ปราศจากสารมีพิษและจุลินทรีย์อื่น ๆ

## ความต้องการอาหารของจุลินทรีย์

แหล่งของอาหารต่าง ๆ ที่จุลินทรีย์มีความต้องการได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ ได้แก่ nitrogen sources, carbon sources วิตามินและ growth factor ต่าง ๆ

ก. nitrogen sources หมายถึง สารประกอบที่มีไนโตรเจนอยู่ด้วย เช่น โปรตีน กรดอะมิโน เกลือของแอมโมเนียต่าง ๆ ฯลฯ ซึ่งจุลินทรีย์มีความต้องการและสามารถใช้ในรูปต่าง ๆ กันแล้วแต่ลักษณะของจุลินทรีย์ แบคทีเรียพวก autotrophs สามารถใช้เกลือของแอมโมเนียหรือไนเตรตเพื่อการเจริญได้ ส่วนพวก heterotrophs ใช้ไนโตรเจนในรูปกรดอะมิโนต่าง ๆ แบคทีเรียแต่ละชนิดมีความต้องการกรดอะมิโนต่างชนิดกัน

ข. carbon sources หมายถึง สารประกอบที่มีคาร์บอนอยู่ด้วย ความต้องการคาร์บอนของจุลินทรีย์มีในรูปต่าง ๆ กัน แบคทีเรียพวก autotrophs ได้รับคาร์บอนจากคาร์บอนไดออกไซด์หรือเกลือคาร์บอนเนตต่าง ๆ ส่วนพวก heterotrophs ได้ คาร์บอนจากสารประกอบอินทรีย์ เช่น โปรตีน ไขมันและคาร์โบไฮเดรต ฯลฯ เพื่อให้พลังงานและการสังเคราะห์ของเซลล์

ค. วิตามินและ growth factors

Hopkins เป็นบุคคลแรกที่ได้แสดงให้เห็นว่านอกเหนือไปจากไขมัน โปรตีน คาร์โบไฮเดรต แร่ธาตุ น้ำและออกซิเจนแล้ว ยังมีสารประกอบบางอย่างที่มีความจำเป็นต่อร่างกายของมนุษย์ ต่อมา C. Funk ซึ่งได้เป็นผู้พบวิตามินซึ่งเป็นสารประกอบที่มนุษย์ต้องการเพียงเล็กน้อย แต่มีความสำคัญอย่างยิ่งที่จะทำให้ร่างกายสามารถดำรงชีวิตและเจริญเติบโตตามปกติอยู่ได้ ถ้าหากขาดวิตามินจะทำให้มีอาการผิดปกติเกิดขึ้น

ง. growth factors แรกเริ่มที่เดิยวหมายถึงสารประกอบใดก็ตามที่ช่วยส่งเสริมหรือเร่งอัตราการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ให้ดีขึ้น จะเห็นได้ว่าทั้งวิตามินและ growth factor ก็มีความหมายคล้ายคลึงกัน

จุลินทรีย์บางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้อย่างดีในอาหารที่ไม่มี growth factors เพราะจุลินทรีย์สามารถสังเคราะห์สารบางอย่างได้เอง เช่น *Mycobacterium smegmatis* สามารถสังเคราะห์ riboflavin ใน synthetic medium ได้ *Ashbya gossypii* ที่เลี้ยงในอาหาร organic media ก็สังเคราะห์ได้เช่นกัน เป็นต้น

ในปัจจุบันนี้ คำว่า growth factor แบ่งได้ 3 ชนิด ตามโครงสร้างทางเคมีและหน้าที่ในขบวนการเมตาบอลิซึม (metabolic function)

1. กรดอมิโน นำไปใช้ในการสังเคราะห์โปรตีน
2. purines และ pyrimidines นำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดนิวคลีอิก
3. วิตามิน นำไปใช้เป็น prosthetic group ของน้ำย่อย

ได้มีการทดลองหาวิตามิน และ growth factor จากแหล่งของอาหารเลี้ยงเชื้อต่าง ๆ ที่เหมาะสมต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ปรากฏว่า yeast extract มีวิตามินบีรวมอย่างสมบูรณ์ดีกว่า meat extract, brain infusion, heart infusion และ peptone ต่าง ๆ ซึ่งใช้ผสมในอาหารเลี้ยงเชื้อเข้มข้น 1-2 เปอร์เซ็นต์ เนื่องจากวิตามินมีความสำคัญต่อแบคทีเรียและจุลินทรีย์ต่าง ๆ จึงได้มีการวิเคราะห์หาปริมาณวิตามินในแบคทีเรีย ดังแสดงในตารางที่ 5-2

ตารางที่ 5-2 แสดงความเข้มข้นของวิตามินที่ละลายน้ำ (water soluble vitamins) ในเซลล์แบคทีเรีย เป็น ppm ของน้ำหนักแห้ง

วิตามิน	<i>Aerobacter aerogenes</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	<i>Clostridium butyricum</i>
Nicotinic acid	240	210	250
Riboflavin	44	67	55
Thiamin	11	26	9
Pyridoxine	7	6	6
Panthothenic acid	140	91	93
Folic acid	14	9	3
Biotin	4	7	Required for growth

สำหรับความต้องการ growth factor ของแบคทีเรียและจุลินทรีย์ชนิดต่าง จะแตกต่างกันไป ดังตารางที่ 5-3

ตารางที่ 5-3 แสดงตัวอย่าง growth factor สำหรับแบคทีเรียบางชนิด

แบคทีเรีย	growth factor
Lactobacillus	guanine
Mycoplasma	cholesterol
Lactic acid bacteria	biotin
Hemophilus	hemin + coenzyme I หรือ DPN
Corynebacterium diphtheriae	pimelic และ p-Aminobenzoic acid
Lactobacillus casei	biotin

### ความสำคัญของวิตามินต่อจุลินทรีย์

วิตามินที่มีความสำคัญต่อการเจริญของจุลินทรีย์ ได้แก่ วิตามินที่สามารถละลายน้ำได้ โดยเป็น growth factor ที่ทำหน้าที่เป็น coenzyme ดังตารางที่ 5-4

ตารางที่ 5-4 แสดงความสำคัญของวิตามินต่อจุลินทรีย์

วิตามิน	coenzyme	ปฏิกิริยาของน้ำย่อยที่ต้องใช้ coenzyme
nicotinic acid	Pyridine nucleotide coenzymes (NAD และ NADP)	dehydrogenations
riboflavin (vitamin B <sub>2</sub> )	Flavin nucleotide (FAD และ FMN)	dehydrogenations บางชนิด และ electron transport
thiamin (vitamin B <sub>1</sub> )	Thiamin pyrosphosphate (cocarboxylase)	decarboxylations และ group transfer reactions บางชนิด
pyridoxine (vitamin B <sub>6</sub> )	Pyridoxal phosphate	amino acid metabolism, transamination, deamination และ decarboxylation

pantothenic acid	Coenzyme A	keto – acid oxidation, fatty acid metabolism
folic acid	Tetrahydrofolic acid	transfer of one carbon units
biotin	Prosthetic group of biotin enzymes	CO <sub>2</sub> fixation carboxyl transfer
cobamide (vitamin B <sub>12</sub> )	Codamide conenzymes	Molecular rearrangement reaction

### ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งออกเป็น 2 ชนิดใหญ่ ๆ ดังนี้

ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนประกอบของอาหาร มี 2 ชนิด คือ

ก. 1 non synthetic media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอนว่าประกอบด้วยสารใดอย่างละเท่าไร เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ประกอบด้วยเนื้อเชื้อพืชและสัตว์ ซึ่งมีสารประกอบอินทรีย์อยู่มากมายหลายชนิด เช่น nutrient broth, nutrient agar และ potato dextrose agar

potato dextrose agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็งเนื่องจากมี agar อยู่ด้วย มีสูตรดังนี้

มันฝรั่ง	200	กรัม
dextrose	20	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่นเติมจนครบ	1000	มิลลิลิตร
pH 5-5.5		



ภาพที่ 5.1 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมอาหารว่าง พิธีเอ





ภาพที่ 5.2-5.7 แสดงวิธีการทำอาหารวุ้น ฟิตีเอ เพื่อใช้ในการเลี้ยงเชื้อเห็ด



ภาพที่ 5.8 ตัวอย่างอาหารวุ้น พีดีเอ ที่บรรจุลงขวดหนึ่งแล้ว

nutrient agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของแข็ง มีสูตรดังนี้

beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
agar	15	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม
pH	7	กรัม

nutrient broth เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เป็นของเหลวมีสูตร ดังนี้

beef extract	3	กรัม
peptone	5	กรัม
น้ำกลั่น	1000	กรัม
pH	7	

ทั้ง nutrient broth และ nutrient agar บางครั้งต้องเพิ่ม yeast extract ลงไปอีก 5 กรัม เพราะใน yeast extract มีวิตามินบี และแร่ธาตุต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการเจริญอยู่ด้วย

สำหรับสารแต่ละชนิดมีประโยชน์ต่อการเจริญของแบคทีเรีย ดังตารางที่ 5-5 แสดงคุณค่าของสารที่ใช้ ใน nutrient และ nutrient broth



ตารางที่ 5-5 แสดงคุณค่าของสารที่ใช้ใน nutrient agar และ nutrient broth

วัตถุดิบ	แหล่งที่มา	คุณค่าทางอาหารต่อแบคทีเรีย
beef extract	สกัดได้จากเนื้อที่ไม่มีไขมัน (lean beef) นำมาทำให้เป็นของเหลว	ประกอบด้วยสารที่ละลายน้ำได้ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต สารประกอบ พวกไนโตรเจน เกลือแร่และวิตามินที่ละลายน้ำ
peptone	ได้จากการย่อยสลายของโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ casein (โปรตีนในนม) และ gelatin การย่อยสลายนี้อาจใช้กรดหรือน้ำย่อยก็ได้ peptone มีหลายชนิดแล้วแต่ลักษณะของโปรตีนและวิธีการย่อย ดังนั้นจึงให้ประโยชน์ต่อการเจริญของแบคทีเรียได้ต่างกัน	เป็นแหล่งของไนโตรเจนและวิตามินตลอดจน คาร์โบไฮเดรตบางชนิดด้วย
ager	เป็นคาร์โบไฮเดรตที่มีความซับซ้อนมากได้จากสาหร่ายทะเลสีแดงบางชนิด	ทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งโดยเฉพาะ
yeast extract	ลักษณะจากเซลล์ของยีสต์ ทำให้อยู่ในลักษณะเป็นผง	มีวิตามินบีรวมมาก และมีสารประกอบไนโตรเจน และสารประกอบคาร์บอนอีกหลายชนิด

ก. 2 synthetic media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยา โดยนำจุลินทรีย์มาเลี้ยงในอาหารชนิดนี้เพื่อดูการใช้สารเคมีต่าง ๆ ที่ทราบปริมาณอยู่แล้วสำหรับเปรียบเทียบการเจริญ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียพวก autotrophic sulfur – oxidizing มีสูตรดังนี้

powdered sulfur	10	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0.4	กรัม
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0	กรัม
CaCl <sub>2</sub>	0.25	กรัม
MgSO <sub>4</sub> H <sub>2</sub> O	0.5	กรัม
FeSO <sub>4</sub>	0.01	กรัม
H <sub>2</sub> O	1000	กรัม

Synthetic medium สำหรับเลี้ยงเชื้อ E. coli มีสูตรดังนี้

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7.0	กรัม
Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	3.0	กรัม
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1.0	กรัม
MgSO <sub>4</sub>	0.1	กรัม

glucose	2.0	กรัม
Na citrate	0.5	กรัม
distilled water	1000	กรัม

### ข. อาหารเลี้ยงเชื้อจำแนกตามประโยชน์ที่ใช้

#### อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียจำแนกตามประโยชน์ที่สำคัญมีดังนี้

ข. 1 enrichment media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อใช้แยกแบคทีเรียชนิดใดชนิดหนึ่งที่ผสมกันอยู่กับแบคทีเรียอื่น ๆ อาหารเลี้ยงเชื่อนี้จะมีสารบางอย่างที่เร่งการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการและยับยั้งแบคทีเรียพวกอื่น เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ tetrathionate media กระตุ้นการเจริญของ *Salmonella typhosa* แต่ยับยั้งการเจริญของ *E. coli* ดังนั้นถ้าต้องการตรวจเชื้อ *E. coli* และ *S. typhosa* ที่ติดมากับอุจจาระ ก็นำสารละลายที่มีเชื้อทั้งสองชนิดนี้มาเลี้ยง tetrathionate media จะได้ *S. typhosa* ซึ่งแยกไปทำเชื้อบริสุทธิ์ต่อไปได้

ข. 2 selective media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกแบคทีเรียที่ปะปนกันหลายชนิดออกจากกัน ดังนั้นจึงเติมสารเคมีบางอย่างลงไปเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพวกที่ไม่ต้องการแต่ไม่ยับยั้งแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น ไลสตี crystal violet ในอาหารเลี้ยงเชื้อ จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก ดังนั้นแบคทีเรียที่เจริญได้จึงเป็นแบคทีเรียแกรมลบเท่านั้น

ข. 3 differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญในอาหารโดยอาศัยลักษณะความแตกต่างของโคโลนีและการสร้างน้ำย่อย ฯลฯ สำหรับอาหารที่ใช้เป็น differential media มี

#### ข. 3.1 blood agar มีวิธีเตรียมดังนี้

peptone	10	กรัม
beef extract	3	กรัม
NaCl	5	กรัม
agar	18	กรัม
น้ำกลั่น	1000	ม.ล.

ละลายส่วนผสมทั้งหมดให้เข้ากันโดยนำไปต้มแล้วฆ่าเชื้อในหม้อนึ่งความดัน (autoclave) ที่ 121 องศาเซลเซียส จึงเติม sterile defibrinated blood ลงไปเขย่าเบา ๆ ให้เลือดกับอาหารเข้ากัน แล้วเทลงในจานเพาะเชื้อ สำหรับเลือดที่ใช้มีเลือดแกะ แพะ วัว ควาย กระต่าย หรือคน อย่างใดอย่างหนึ่ง

วิธีการใช้ นำแบคทีเรียที่ผสมกันหลายชนิดไปเลี้ยงใน blood agar ที่ไว้ระยะหนึ่งพบว่า แบคทีเรียบางพวกทำลายเม็ดเลือดแดง (hemolysis) โดยเกิด clear zone ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีนั้น

ส่วนแบคทีเรียบางพวกไม่ทำลายเม็ดเลือดแดง จึงสามารถแยกแบคทีเรียเหล่านี้มาทำเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้

ข. 3.2 egg-yolk agar เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้สำหรับวิเคราะห์หาเชื้อ Clostridium และ Bacillus ที่ทำให้เกิดโรค โดยอาหารเลี้ยงเชื่อนี้จะเติมไข่แดงของไก่หรือเป็ดด้วย แล้วดูการสัร้งน้ำย่อย lecithinase ย่อย lecithin ในไข่แดง ถ้าไข่แดงถูกย่อยสลายแสดงว่าเป็นเชื้อ Clostridium และ Bacillus ซึ่งแยกว่าเป็นเชื้อไหนได้ โดย Bacillus เจริญในที่ที่มีอากาศและ Clostridium เจริญในที่ไม่มีอากาศ

ข. 4 assay media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นสำหรับใช้ในการทดลองโดยเฉพาะเพื่อใช้ตรวจสอบสารบางอย่างที่เกิดจากแบคทีเรีย เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และยาปฏิชีวนะ ฯลฯ

สำหรับตัวอย่าง assay media ของเชื้อ Lactobacillus Leichmannii มีสูตรดังนี้

ตารางที่ 5-6 แสดงสูตรอาหารสำหรับวิเคราะห์หาวิตามินบีสองจากเชื้อ

สารอาหาร	ปริมาณ
	Gm
Vitamin – free casein hydrolysate	1.50
Tomato juice	10.0
Glucose	40.0
Asparagine	0.2
Sodium acetate	20.0
Ascorbic acid	4.0
Monopotassium phosphate	1.0
Dipotassium phosphate	1.0
Sorbitan monooleate	2.0
MgSO <sub>4</sub>	0.4
NaCl	0.02
FeSO <sub>4</sub>	0.02
MnSO <sub>4</sub>	0.02
L-Cystine	0.4
DL-Tryptophan	0.4
Adenine sulfite	0.02
Guanine hydrochloride	00.2

Xanthie	00.2
Uracil	00.2
	Mg
Riboflavin	1.0
Thiamine	1.0
Niacin	2.0
p-Aminobeazoate	2.0
Ca-pantothenate	1.0
Pyridoxine	4.0
Folic acid	0.2
Biotin	0.008

อาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นสำหรับวิเคราะห์หายาปฏิชีวนะจากแบคทีเรีย และเราเรียกว่า antibiotic assay agar มีสูตรดังนี้

peptone	5	กรัม
tryptone	5	กรัม
yeast extract	3	กรัม
beef extract	1	กรัม
glucose	2	กรัม
agar	15	กรัม
H <sub>2</sub> O	1000	มิลลิลิตร

ข. 5 media for enumeration of bacteria เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นเพื่อนับจำนวนของแบคทีเรีย เช่น นับจำนวนแบคทีเรียในอาหาร ในน้ำมัน ในน้ำ ฯลฯ

ข.6 media for characterization of bacteria เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้นโดยมีวัตถุประสงค์ให้แบคทีเรียเจริญได้ดีและมากชนิดที่สุด อาหารเลี้ยงเชื้อเหล่านี้ส่วนใหญ่ได้แก่ nutrient และ nutrient agar

## คำถามท้ายบท 5 อาหารเลี้ยงเชื้อ

1. ความต้องการอาหารของจุลินทรีย์ มีองค์ประกอบหลัก 3 ส่วน คือ

1.1

1.2

1.3

2. ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ มี 2 ชนิด คือ

2.1

2.2