

หน่วยที่ 7 การเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์

หลังจากสามารถแยกได้เชื้อบริสุทธิ์ในหลอดแก้วแล้ว ต้องนำเชื้อนี้มาเก็บรักษาเพื่อใช้สำหรับการศึกษาด้านต่าง ๆ เชื้อที่เก็บนี้เรียกว่า stock culture collection ซึ่งมีวิธีเก็บรักษาได้หลายวิธี ดังนี้

1. เปลี่ยนอาหารใหม่ โดยเก็บเชื้อบริสุทธิ์ไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชั่วคราวระยะเวลาหนึ่ง ๆ แล้วเปลี่ยนหรือถ่ายเชื้อมาสู่อาหารชนิดเดียวกันใหม่ ซึ่งหลักสำคัญในการเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีนี้คือ

- ต้องใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมในการเจริญของเชื้อแต่ละชนิด
- อุณหภูมิที่ใช้ในการเก็บรักษา
- ช่วงระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหาร

สำหรับการเปลี่ยนหรือถ่ายเชื้อโดยวิธีเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อดังแสดงในตารางที่ 7.1

ตารางที่ 7.1 แสดงช่วงระยะเวลาการถ่ายเชื้อในอาหารที่เหมาะสม

แบคทีเรีย	อาหารเลี้ยงเชื้อ	ระยะเวลาการถ่ายเชื้อ	อุณหภูมิที่เจริญได้ดี (องศาเซลเซียส)	อุณหภูมิที่เก็บเชื้อ (องศาเซลเซียส)
Neisseria spp. (saprophytic)	Cystine trypticase agar	1 เดือน	35	35
Bacillus spp.	Nutrient agar	12 เดือน หรือมากกว่า	28	10
Pseudomonas spp.		3 เดือน	28	10
Clostridium spp.	Cooked meat medium	6 เดือน หรือมากกว่า	28	อุณหภูมิห้อง
Mycobacterium spp. (saprophytic)	Glycerol agar	1 เดือน	30	10

2. การใช้น้ำมันลาดบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์วิธีนี้ ใช้น้ำมันพวก mineral oil เทใส่ในแบคทีเรียที่เจริญบน agar slant หนาประมาณครึ่งนิ้ว เก็บเชื้อไว้ได้นาน 1-20 ปี ขึ้นอยู่กับอุณหภูมิที่เก็บรักษาและชนิดของเชื้อ

3. Lyophilization

หลักการเก็บรักษาเชื้อวิธีนี้ คือ เก็บเชื้อไว้ในสภาพที่เย็นจัด จะทำให้กิจกรรมของ จุลินทรีย์หยุดอย่างทันที แต่ไม่ตาย วิธีนี้นิยมใช้กันมาก เนื่องจากสามารถเก็บเชื้อไว้ได้นานและเชื้อไม่เปลี่ยนแปลงรูปร่าง

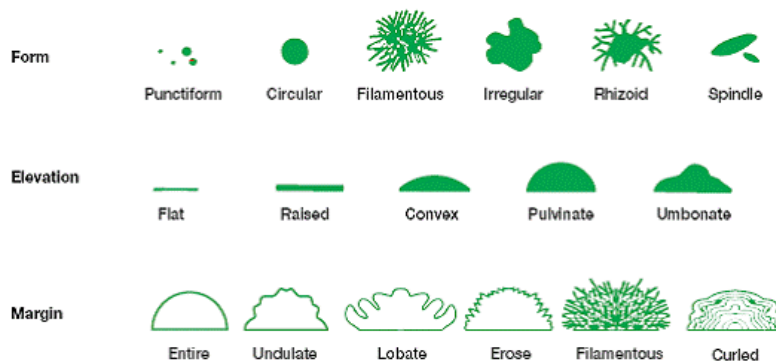
วิธีทำ lyophilization โดยนำแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์ที่ต้องการเก็บรักษาใส่ในหลอดแก้วเล็ก ๆ แช่ในน้ำแข็งแห้งผสมแอลกอฮอล์ ซึ่งมีอุณหภูมิ -78 องศาเซลเซียส แล้วนำไปใส่ flask ซึ่งมีส่วนหนึ่งเชื่อมต่อกับ condenser ที่บรรจุอยู่ใน dewer flask ภายใน dewer flask มีน้ำแข็งแห้งผสมแอลกอฮอล์อยู่ ส่วน condenser จะมีส่วนหนึ่งต่อกับ vacuum pump ซึ่งจะใช้ดึงน้ำออกจากเซลล์จุลินทรีย์ด้วยการใช้แรงดัน จากนั้นปิดผนึกปากหลอดโดยใช้ไฟลนจนปลายหลอดมอดติดกัน

สำหรับการเก็บเชื้อบริสุทธิ์ตามวิธีการดังกล่าวแล้วนี้ ในการทดลองในห้องปฏิบัติการ จุลชีววิทยาทั่ว ๆ ไปนั้น นิยมใช้วิธีเปลี่ยนอาหารใหม่และการใช้น้ำมันลาควินฟิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อกันมาก เพราะทำได้สะดวก รวดเร็วและไม่ต้องใช้เครื่องมือที่ยุ่งยากหรือมีราคาแพง ส่วนวิธี lyophilization นิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาขนาดใหญ่ ซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์มากมาย ไม่มีเวลาพอที่จะถ่ายเชื้อเปลี่ยนอาหารบ่อย ๆ ได้

ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

เมื่อนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจะมีการทวีจำนวนจนเป็นโคโลนีขึ้นมา ซึ่งลักษณะโคโลนีและลักษณะการเจริญของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป สามารถนำไปวิเคราะห์ได้ สำหรับการศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียมีดังนี้

1. แบคทีเรียที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อ มีลักษณะของโคโลนีรูปร่างต่าง ๆ ดังรูปที่ 7.1



รูปที่ 7.1 แสดงลักษณะการสร้างโคโลนีของแบคทีเรีย

สำหรับคำศัพท์ที่ใช้อธิบายโคโลนีที่เจริญบนผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังนี้

1.1 รูปร่างของโคโลนี (form)

- Punctiform : ขนาดของโคโลนีเล็กมาก แต่ยังสามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่า มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางไม่เกิน 1 มม
- Circular : โคโลนีมีรูปร่างกลม
- Irregular : โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
- Filamentous : โคโลนีเจริญออกไปในลักษณะคล้ายเส้นใยของรา ดังนั้นจึงมีรูปร่างไม่แน่นอน
- Rhizoid : โคโลนีเจริญเป็นเส้นหยาบกว่าพวก filamentous และแผ่ขยายคล้ายราก

1.2 ระดับความนูนของโคโลนี (elevation)

- Effuse : โคโลนีแผ่เป็นแผ่นบาง ๆ บนผิวหน้าของอาหาร
- Flat : โคโลนีที่เจริญกว่า effuse แต่แบนราบไปตามผิวหน้าของอาหาร
- Raised : โคโลนีค่อนข้างหนา เจริญสูงขึ้นจากผิวหน้าของอาหาร แต่ส่วนบนโคโลนีจะเรียบและด้านริมจะทำมุมกับผิววุ้น
- Convex : โคโลนีรูปกลมและนูน โค้งจากผิวหน้าของอาหารไม่มากนัก
- Pulvinate : โคโลนีรูปกลม นูน โค้งจากผิวหน้าของอาหารมากกว่า convex

1.3 ลักษณะของผิวหน้าของโคโลนี (surface)

- Smooth : เรียบ
- Rough : ขรุขระ
- Concentrically ringed : มีลักษณะเป็นวงแหวน ซ้อนกันหลาย ๆ ชั้น
- Contoured : ผิวหน้าเกลี้ยง แต่เป็นลูกคลื่น ซึ่งมีลักษณะของคลื่นไม่แน่นอน
- Rugose : ผิวหน้าเป็นรอยข่น

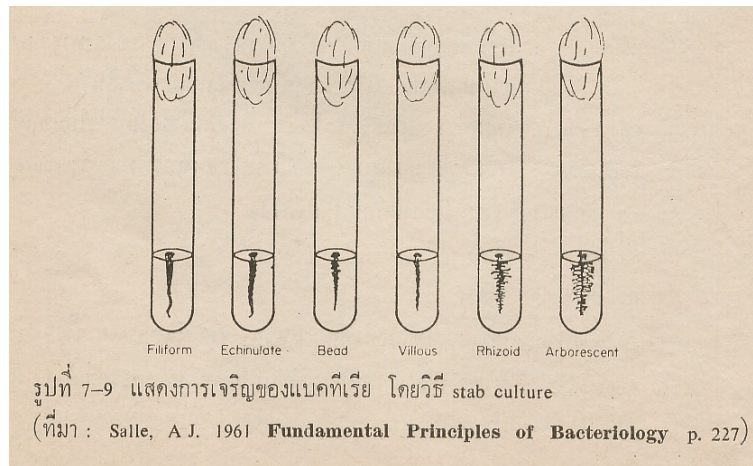
1.4 ริมหรือขอบโคโลนี (Edge)

- Entire : ขอบเกลี้ยง ไม่มีรอยหักเว้า
- Undulate : ขอบเป็นคลื่นที่โค้งหรือเว้าเพียงเล็กน้อย
- lobate : ขอบเป็นคลื่นที่เว้าแหว่งมาก
- Erose : ขอบหยักเป็นฟันที่ไม่สม่ำเสมอ
- Filamentous : ขอบเป็นเส้น ๆ แบบเส้นใยของเรา

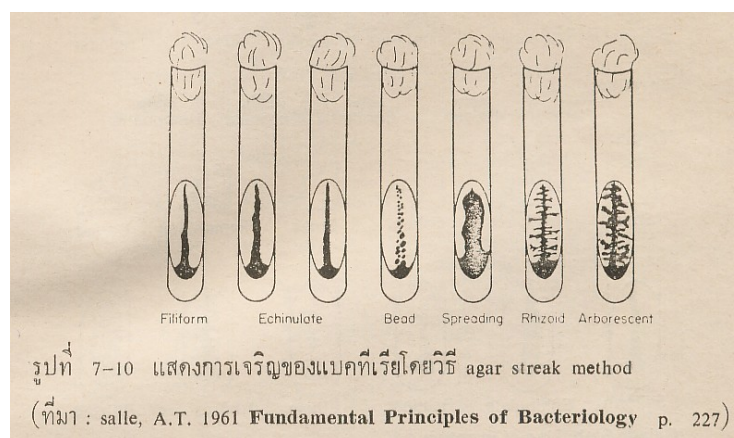
1.5 ลักษณะเกี่ยวข้องกับแสง (Optical Character)

- Opaque : ทึบ
- Translucent : โปร่งแสงเล็กน้อยคล้ายกระดาษกึ่งฝ้า
- Iridescent : สะท้อนแสงเป็นสีเหลือบคล้ายสีรุ้ง
- Dull : สีขุ่น ไม่ฉินเงา
- Photogenic : เรืองแสง
- Fluorescent : เปล่งแสงสีม่วง เมื่อได้รับแสงจากที่อื่น ๆ
- Glistening : สะท้อนแสงเป็นเงา ไม่ขุ่นมัว

2. การเจริญของแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยวิธี streak และ stab



รูปที่ 7.2 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี stab culture



รูปที่ 7.3 แสดงการเจริญของแบคทีเรีย โดยวิธี agar streak method

Fillform	:	การเจริญสม่ำเสมอตามแนวที่จัดเชื้อ
Beaded	:	โคโลนีขึ้นอย่างกระจุกกระจายตามแนวที่จัดเชื้อ
Spreading	:	โคโลนีเจริญแผ่ออกไปตามแนวที่จัดเชื้อมากกว่า filiform
Arborescent	:	โคโลนีเจริญแตกกิ่งก้านสาขาคลายต้นไม้
Rhizoid	:	โคโลนีเจริญแตกแขนงคล้ายราก
Echinulate	:	โคโลนีเจริญตามแนวที่จัดเชื้อ โดยมีรอยหยักที่ริมและรอบหยักนี้มีลักษณะคล้ายฟันเลื่อย

3. การเจริญเติบโตแบคทีเรียในอาหารเหลว

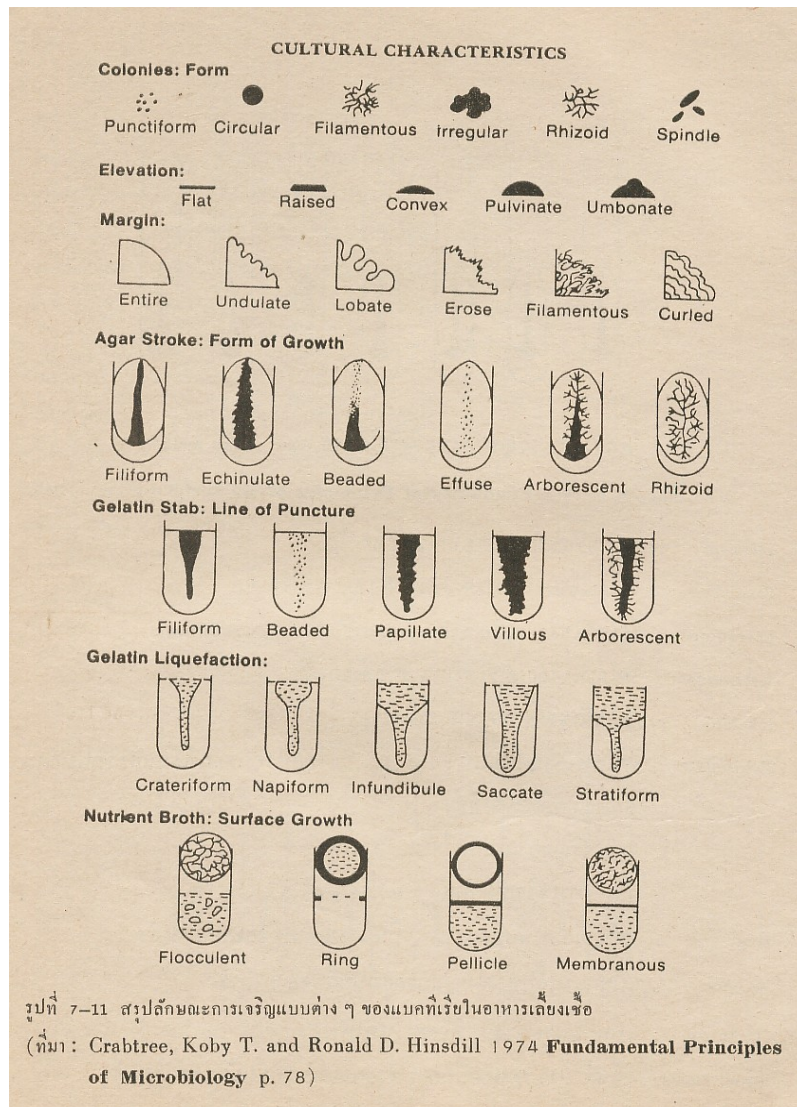
3.1 การเจริญที่ผิวหน้า (surface growth)

Ring	:	เจริญที่ส่วนบนของอาหารเป็นวงรอบคืดที่ขอบหลอดแก้ว
Pellicle	:	เป็นแผ่นเล็กหรือใหญ่ลอยอยู่ที่บนผิวของอาหาร
Flocculent	:	เป็นก้อนรูปต่าง ๆ ลอยอยู่ในอาหาร
Membranous	:	เป็นฝ้าบาง ๆ ลอยปิดอยู่ที่ผิวของอาหารค่อนข้างเหนียว

3.2 การเกิดตะกอนที่ก้นหลอด (sedimentation)

Compact	:	ตะกอนที่จับติดกันเหนียวแน่น เป็นก้อนเดียว
Flocculent	:	เป็นก้อนรูปร่างต่าง ๆ ลอยอยู่ในอาหารไม่ตกตะกอน
Granular	:	ตะกอนเป็นก้อนขนาดต่าง ๆ มากมาย
Flaky	:	ตะกอนเป็นก้อนเล็ก ๆ ตกอยู่ที่ก้นเมื่อเขย่าหลอดเบา ๆ จะฟุ้งกระจาย แต่จะตกตะกอนโดยเร็ว
Viscid	:	ตะกอนจับและ ๆ ที่ก้น เมื่อเขย่าจะลอยเป็นสายเมือก ๆ ขึ้นไปในอาหาร

สำหรับลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารชนิดต่าง ๆ ดังสรุปในรูปที่ 7.4



รูปที่ 7.4 สรุปลักษณะการเจริญแบบต่างๆ ของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ

คำถาม การเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์

1. วิธีการรักษาเชื้อมี 3 วิธี คือ

.....

2. Lyophilization คือ.....

3. วิธีการเก็บรักษาเชื้อที่นิยมที่สุดคือ.....

4. Ring คือ.....

5. sedimentation คือ.....

