บทปฏิบัติการที่ 1
การวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

หลักการ

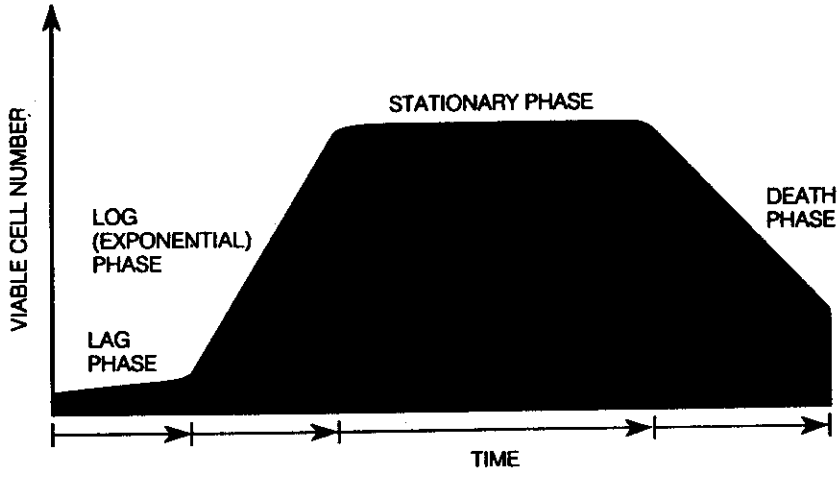
การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ต้องการสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมทั้งทางกายภาพและเคมี โดยสภาพแวดล้อมทางกายภาพได้แก่ อุณหภูมิ, pH, osmotic pressure, ก๊าซ สิ่งเหล่านี้มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์และเมตาบอลิสม นอกจากนี้สภาพแวดล้อมทางเคมี ซึ่งได้แก่ สารอาหารที่ประกอบด้วยแร่ธาตุคาร์บอน ไนโตรเจน ฟอสเฟต และแร่ธาตุชนิดต่างๆ ก็ต้องอยู่ในภาวะที่เหมาะสม เพื่อช่วยในการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของจุลินทรีย์นั้นๆ

การศึกษาการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์มีด้วยกันหลายวิธีได้แก่ การวัดน้ำหนักของเซลล์ (weighting), การนับจำนวนเซลล์ (counting), การวัดกิจกรรมของเซลล์ (activity) ในแต่ละวิธีมีหลักการและวิธีการแตกต่างกัน โดยขึ้นกับชนิดของจุลินทรีย์ เครื่องมือ ความถูกต้อง ความจำเพาะ และความสะดวก ในการนำมาพิจารณาเพื่อมาใช้วัดการเจริญเติบโต

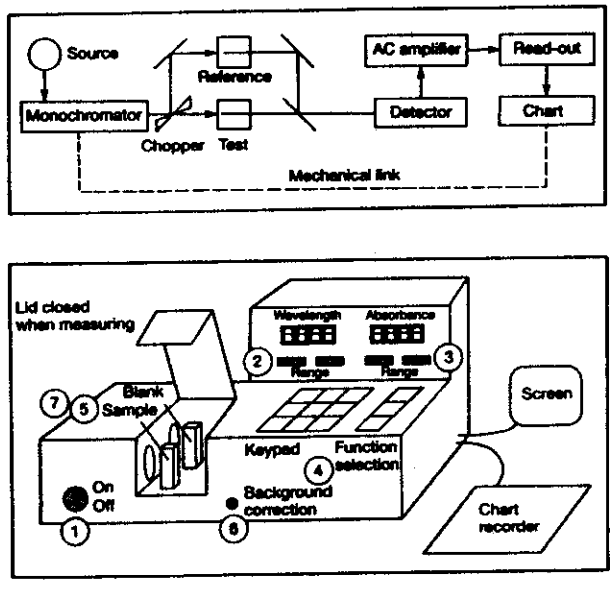
การวัดความขุ่นเป็นวิธีการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ในอาหารเหลว (broth) โดยที่จุลินทรีย์มีการเจริญเติบโตแล้วทำให้อาหารขุ่น หลังจากนั้นทำการวัดความขุ่นของการดูดกลืนแสง (optical density; OD) โดยใช้เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 400-600 นาโนเมตร วิธีนี้เป็นการวัดเซลล์เป็น (viable cell) และเซลล์ตาย (dead cell) ความหนาแน่นของเซลล์ควร $\geq 10^7$ cells/ml ซึ่งเป็นค่าที่ให้ค่าการอ่านที่เชื่อถือได้ การวัดความขุ่นเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว และใช้ตัวอย่างน้อย การวัดค่าการดูดกลืนแสงนิยมวัดที่ความยาวคลื่นที่ 600 นาโนเมตร มากกว่า 420 นาโนเมตร เนื่องจากที่ 600 นาโนเมตร ให้ค่าความสัมพันธ์ระหว่างน้ำหนักเซลล์และ OD เป็นกราฟเส้นตรงในช่วง OD ที่ 0-0.4 มากกว่าที่ 420 นาโนเมตร ที่ให้กราฟเส้นตรงในช่วง OD ที่ 0-0.25 ดังนั้นถ้าวัดความขุ่นแล้วได้ค่า OD ที่สูงกว่านี้ จะต้องเจือจางตัวอย่าง แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง

แบคทีเรียเป็นสิ่งมีชีวิตเซลล์เดี่ยว มีการเพิ่มจำนวนโดยการแบ่งเซลล์ อัตราการแบ่งเซลล์จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง ได้แก่ การปรับสภาวะเริ่มต้น อาหาร พื้นที่ และความซับซ้อนของรหัสพันธุกรรม เป็นต้น การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามารถกระทำได้โดยการเริ่มจากการถ่ายเชื้อที่เก็บไว้เป็น stock มาลงในอาหารใหม่ เชื้อเหล่านี้มีการหยุดการเจริญเติบโต ดังนั้นเมื่ออยู่ในอาหารชนิดใหม่เซลล์จะไม่เจริญเติบโตทันที แต่จะต้องอาศัยเวลาในการสร้างเอนไซม์และส่วนประกอบอื่นๆที่จำเป็นในการสร้างโปรตีน อาร์เอ็นเอและดีเอ็นเอ ในช่วงแรกนี้การเพิ่มจำนวนจึงเกิดขึ้นช้าๆ เป็นระยะเวลาที่เซลล์ไม่มีการเจริญเติบโตเรียกว่า เป็นช่วงปรับตัวหรือ Lag phase โดยปกติการเพาะเลี้ยง *Escherichia coli* ที่ 37°C จะมี Lag phase อยู่ในช่วง 10-60 นาที ซึ่งขึ้นกับปัจจัยอื่นๆ เช่น องค์ประกอบของอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง, ระยะเวลาที่เซลล์อยู่ใน stock, จีโนไทป์ (genotype) ของแบคทีเรีย และปริมาณของออกซิเจนซึ่งขึ้นอยู่กับความรวดเร็วของการเขย่า ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียปรับสภาวะได้ดีแล้วก็จะมีการเพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เนื่องจากมีอาหารมากเพียงพอและมีพื้นที่ในการเพิ่มประชากรได้มากมาย เซลล์จะแบ่งตัวเป็น 2 เซลล์ด้วยอัตราเร็วที่คงที่ ซึ่งจะเพิ่มเป็นทวีคูณแบบ Exponential จึงเรียกระยะนี้ว่า Exponential phase หรือ Log phase การเจริญเติบโตในระยะนี้จะเกิดขึ้นต่อไปจนกว่าองค์ประกอบของอาหารมีการเปลี่ยนแปลง เช่น อาหารมีปริมาณน้อยลง และมีปริมาณออกซิเจนจำกัดเนื่องจากเซลล์หนาแน่น พื้นที่แออัดไม่เพียงพอ อัตราการแบ่งตัวและการเจริญเติบโตจะช้าลงจนไม่สามารถเพิ่มขึ้นได้ ซึ่งปริมาณเซลล์ค่อนข้างจะคงที่ เนื่องจากอัตราการเจริญเติบโตเท่ากับอัตราการการตาย เรียกว่าเป็นช่วงคงที่ หรือ Stationary phase ถ้ายังคงเพาะเลี้ยงต่อไปปริมาณเซลล์จะลดลง เรียกว่าเป็นช่วงตายหรือ Death phase ในระยะนี้มีเซลล์ที่ตายมากกว่าเซลล์ที่แบ่งตัว

แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีลักษณะการเจริญเติบโตทั้ง 4 ระยะ แต่ลักษณะการเจริญเติบโตของช่วงเวลาในแต่ละระยะของแบคทีเรียต่างชนิดกันจะมีความแตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิด ความซับซ้อนของรหัสพันธุกรรม เช่น แบคทีเรียชนิดที่เป็นกรัมลบจะให้ผลการเติบโตที่ต่างจากชนิดกรัมบวก หรือแบคทีเรียที่มีพลาสมิด ก็จะให้ผลการเติบโตที่ต่างจากชนิดที่ไม่มีพลาสมิด หรือการมีความซับซ้อนทางพันธุกรรมที่แตกต่างกัน ในการเพาะเลี้ยง *E. coli* ในอาหารเหลวนิยมการเขย่าที่ความเร็วประมาณ 300 rpm และอุณหภูมิเพาะเลี้ยงที่ 37°C ปริมาณเซลล์ที่ได้ไม่เกิน 2-3 x 10^9 cells/ml



รูปที่ 1-1 ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์ (จาก Bloom และคณะ, 1996)



รูปที่ 1-2 เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)

การติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สามารถติดตามได้ง่ายๆโดยการวัดความขุ่นของเชื้อด้วยวิธีสเปคโตรโฟโตเมตรี (spectrophotometry) หรือการนับจำนวนแบคทีเรีย โดยการทำ plate count หรือ colony count ซึ่งวิธีการนับแบคทีเรียจะสามารถบอกถึงระยะ Death phase ได้ ในขณะที่การวัดความขุ่นจะบอกได้ถึงระยะ Stationary phase ทั้ง 2 วิธีนี้สามารถติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและหาความสัมพันธ์เป็นกราฟได้

วัตถุประสงค์

1. ให้เข้าใจลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย
2. สามารถอธิบายลักษณะและรู้จักวิธีการวัดการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

สารเคมีที่ใช้

1. อาหารเลี้ยงแบคทีเรีย

   LB-agar : 1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl, 1.5% Bacto agar

   LB-broth : 1% Bacto tryptone, 0.5% Yeast extract, 0.5% NaCl
2. แบคทีเรีย *E. coli*

อุปกรณ์

1. เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (spectrophotometer) และคิวเวต (cuvette)
2. ปิเปตที่ปราศจากเชื้อขนาด 1 ml, 5 ml และ 10 ml
3. Flask ขนาด 250 ml
4. หลอดทดลอง

วิธีการทดลอง

1. เลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง LB-agar (Luria-Bertani agar)
2. เลือกแบคทีเรียโคโลนีเดี่ยวจากอาหารเลี้ยงเชื้อในข้อ 1 มาเลี้ยงในอาหารชนิดเหลว LB-broth นำไปบ่มที่ 37°C ข้ามคืน (15-17 ชั่วโมง) เชื้อที่ได้เรียกว่าเป็น activated culture
3. นำ activated culture มา 0.5 ml เติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว LB-broth ปริมาตร 50 ml (เริ่มการเติมเชื้อที่ 1% inoculum size) เขย่าให้ผสมกัน

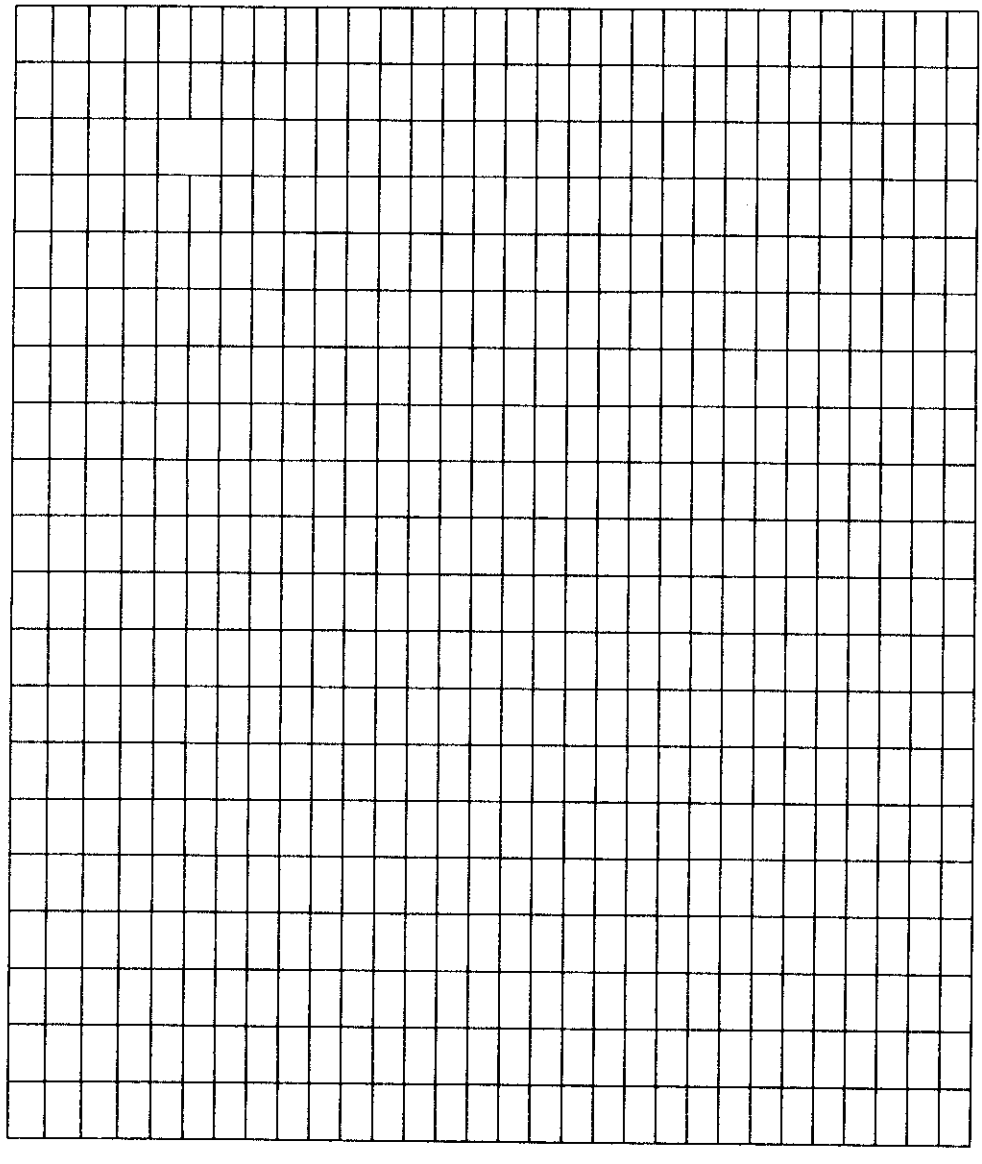
4. วัดค่าเริ่มต้นที่เวลา 0 ชั่วโมง โดยการดูดสารละลายแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อมา 3 ml ใส่ลงในคิวเวต
5. นำไปวัดการดูดกลืนแสง (absorbance; A หรือ optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ LB-broth เป็น blank ปรับค่า OD ให้เป็นศูนย์
6. ดูดสารละลายแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อมา 3 ml ในเวลาต่างๆกันที่ 1, 2, 4, 6 และ 18-24 ชั่วโมง ใส่ลงในคิวเวต
7. นำไปวัดการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร (nm) โดยใช้ LB-broth เป็น blank หรือปรับค่า OD ให้เป็นศูนย์
8. เขียนกราฟแสดงการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย โดยแกน X เป็นเวลา และแกน Y เป็น OD_{600}

ผลการทดลอง

เวลา (ชั่วโมง)	OD_{600}
0	
1	
2	
4	
6	
18-24	

เขียนกราฟแสดงความสัมพันธ์การเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

OD_{600}



เวลา (ชั่วโมง)

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

.....

แบบฝึกหัดบทปฏิบัติการที่ 1

1. ทำไมเชื้อแบคทีเรียใน Stationary phase จึงมีปริมาณเซลล์ค่อนข้างจะคงที่
2. ปัจจัยอะไรบ้างที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย
3. การวัดความขุ่นของเชื้อที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตร มีข้อดีกว่าการวัดที่ความยาวคลื่นอื่นอย่างไร