บทที่ 6
การเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย

ก่อนทำการศึกษาจุลินทรีย์ให้ได้ผลเป็นที่พอใจต้องนำมาเพาะเลี้ยงภายใต้ภาวะการทดลอง ในการเพาะเลี้ยงจำเป็นต้องทราบถึงความต้องการสารอาหารและภาวะทางกายภาพที่จุลินทรีย์ต้องการ ในการวิจัยที่กว้างขวางออกไปได้มีการตรวจสอบถึงความต้องการทางโภชนาการของแบคทีเรียทำให้สามารถปรับปรุงส่วนประกอบของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ (media, เอกพจน์ medium) ต่าง ๆ มากมาย เนื่องจากความต้องการทางอาหารของแบคทีเรียนั้นกว้างขวางมากทำให้ส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงมีความแตกต่างกันมาก แบคทีเรียยังมีความแตกต่างกันมากในด้านความต้องการสภาพแวดล้อมทางกายภาพสำหรับการเจริญเติบโต ตัวอย่างเช่น บางชนิดอาจเจริญเติบโตที่อุณหภูมิต่ำ 0 องศาเซลเซียต แต่พวกอื่นอาจต้องการอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียต หรือแม้แต่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียต บางพวกก็ต้องการอ๊อกซิเจนจากอากาศแต่บางพวกก็ไม่ต้องการหรือถูกยับยั้งโดยแก๊สอ๊อกซิเจน

ความต้องการทางโภชนาการของสิ่งมีชีวิต

สิ่งมีชีวิตทุกชนิดตั้งแต่จุลินทรีย์จนถึงมนุษย์มีความต้องการทางโภชนาการเหมือนกันในรูปของสารเคมีที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการทำงานตามปกติ เพื่อเป็นการพิสูจน์ข้อสังเกตุนี้และแสดงถึงความแตกต่างทางโภชนาการเป็นอย่างมากที่พบในแบคทีเรีย

1. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการแหล่งของพลังงาน สิ่งมีชีวิตบางพวกเช่น พืชสีเขียวสามาถใช้พลังงานจากแสงจึงถูกเรียกว่าพวก phototroph แต่สิ่งมีชีวิตพวกที่ไม่สามารถใช้

พลังงานจากแสงเช่น สัตว์ จะได้พลังงานจากการอ๊อกซิเดชั่นของสารประกอบเคมีจึงถูกเรียกว่าพวก chemotroph ประเภทของโภชนาการทั้งสองแบบคือ phototroph และ chemotroph จะพบได้ในแบคทีเรีย

2. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการธาตุคาร์บอนในบางรูปแบบ สิ่งมีชีวิตทั้งหมดต้องการคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ในปริมาณไม่มากก็น้อยแต่ส่วนใหญ่มักต้องการสารอินทรีย์คาร์บอนบางอย่างด้วย เช่น น้ำตาล และคาร์โบไฮเดรท เป็นต้น พืชใช้คาร์บอนไดอ๊อกไซด์เพื่อเปลี่ยนแปลงเป็นคาร์โบไฮเดรทโดยขบวนการสังเคราะห์แสง แบคทีเรียหลายชนิดก็ต้องการคาร์บอนไดอ๊อกไซด์เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียว ดังนั้นสิ่งมีชีวิตพวกนี้ทั้งหมดจึงมีชื่อเรียกทางโภชนาการว่า autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงจะเรียกว่า photoautotroph และถ้าได้พลังงานจากการอ๊อกซิไดซ์สารเคมีจะถูกเรียกว่า chemoautotroph แบคทีเรียพวกอื่นก็มีลักษณะทางโภชนาการคล้ายสัตว์คือไม่อาจใช้คาร์บอนไดอ๊อกไซด์เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียวได้จำเป็นต้องอาศัยคาร์โบไฮเดรตและสารประกอบอินทรีย์อื่นที่พวก autotroph ผลิตขึ้นเป็นอาหาร สิ่งมีชีวิตที่ต้องการธาตุคาร์บอนในรูปสารอินทรีย์ถูกเรียกว่าพวก heterotroph

3. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการธาตุไนโตรเจนในบางรูปลักษณะ พืชใช้ไนโตรเจนในรูปของเกลืออนินทรีย์ เช่น โปแตซเซี่ยมไนเตรต (KNO_3) เป็นต้น ส่วนสัตว์ต้องการสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น โปรตีน และสิ่งที่ได้จากการย่อยสลายของโปรตีน เช่น เพ็บไทด์ และกรดอะมิโน เป็นต้น ในกรณีนี้แบคทีเรียมีความเก่งกาจเป็นอย่างมาก บางพวกก็ใช้ไนโตรเจนจากอากาศ บางพวกก็ใช้สารประกอบอนินทรีย์ไนโตรเจน และบางพวกก็ใช้ไนโตรเจนจากโปรตีนหรือสารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจนอื่นที่ปรากฏอยู่ในธรรมชาติ

4. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการกำมะถันและฟอสฟอรัส สิ่งมีชีวิตพวกที่เป็นสัตว์อย่างแท้จริงต้องการกำมะถันในรูปของสารประกอบอินทรีย์กำมะถันแต่พวกพืชที่แท้จริงต้องการกำมะถันในรูปของสารประกอบอนินทรีย์ แบคทีเรียบางชนิดต้องการสารประกอบอินทรีย์กำมะถันแต่บางชนิดสามารถใช้สารประกอบอนินทรีย์กำมะถันได้และบางพวกยังสามารถใช้ธาตุกำมะถันได้โดยตรง สำหรับธาตุฟอสฟอรัสสิ่งมีชีวิตอาจได้รับในรูปของเกลือฟอตเฟต

5. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการโลหะธาตุต่าง ๆ เช่น โซเดี่ยม โปแตสเซี่ยม แม๊กนีเซี่ยม แมงกานีส เหล็ก สังกะสี ทองแดง ฟอสฟอรัส โคบอลต์ เพื่อการเจริญเติบโตตามปกติ แบคทีเรียก็เช่นเดียวกันไม่มีการยกเว้นแต่บางอย่างก็ต้องการในปริมาณเพียงเล็กน้อย

6. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องมีวิตามินหรือสารประกอบคล้ายวิตามิน สำหรับคนและสัตว์สารประกอบพวกนี้ต้องได้รับจากอาหารร่างกายไม่อาจสร้างขึ้นได้เอง แต่แบคทีเรียมีการเปลี่ยนแปลงไปได้หลายรูปแบบ ถึงแม้ว่าแบคทีเรียมีความต้องการวิตามินในขบวนการทางเมตาโบลิซึ่มหลายอย่าง แต่บางพวกก็สามารถสร้างหรือสังเคราะห์วิตามินที่ต้องการได้ทุกอย่างจากสารประกอบอื่นในอาหาร และบางพวกก็ไม่เจริญเติบโตจนกว่าจะเติมวิตามินหนึ่งหรือหลายอย่างลงในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยงด้วย การวิจัยเกี่ยวกับโภชนาการของแบคทีเรียนำไปสู่การค้นพบวิตามินต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อมนุษย์ การศึกษาเกี่ยวกับเมตาโบลิซึ่มของแบคทีเรียยังช่วยให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับการสังเคราะห์วิตามินและการทำงานของวิตามินอีกด้วย ตารางที่ 6-1 แสดงรายการของวิตามินที่มักจำเป็นต่อการเจริญเติบโตหรือกระตุ้นการเจริญเติบโตของแบคทีเรียโดยทั่วไปพร้อมทั้งตัวอย่างสายพันธุ์ที่แสดงความต้องการ

ตารางที่ 6-1
Vitamin Requirements for Some Bacteria

VITAMIN	SPECIES EXHIBITING REQUIREMENT (OR GROWTH STIMULATION)
Thiamine (B_1)	*Bacillus anthracis*
Riboflavin	*Clostridium tetani*
Niacin	*Brucella abortus*
Pyridoxin (B_5)	*Lactobacillus spp.*
Biotin	*Leuconostoc mesenteroides*
Pantothenic acid	*Proteus morganii*
Folic acid	*Leuconostoc dextranicum*
Cobalamin (B_{12})	*Lactobacillus spp.*
Vitamin K	*Bacteroides melaninogenicus*

7. สิ่งมีชีวิตทุกชนิดต้องการน้ำเพื่อการเจริญเติบโต สำหรับแบคทีเรียสารอาหารทุกอย่างจะต้องอยู่ในสภาพเป็นสารละลายเสียก่อนจึงจะสามารถเข้าไปในเซลล์ได้

ประเภทต่าง ๆ ทางโภชนาการของแบคทีเรีย

แบคทีเรียถูกแบ่งออกได้เป็นหลายหมู่บนพื้นฐานของความต้องการทางโภชนาการ แต่สองหมู่ใหญ่ที่สำคัญซึ่งได้กล่าวถึงมาแล้วคือ พวก phototroph และพวก chemotroph

แบคทีเรียในแต่ละหมู่ยังถูกย่อยออกไปบนพื้นฐานของแหล่งพลังงานใหญ่ที่ใช้เพื่อการเจริญเติบโต เช่น แสง หรือการอ๊อกซิเดชั่นของสารประกอบเคมีประเภทต่าง ๆ ทางโภชนาการอาจถูกจำแนกลักษณะออกได้ดังในตารางที่ 6-2

ตารางที่ 6-2
Major Nutritional Types of Bacteria

TYPE	SOURCE OF ENERGY FOR GROWTH	SOURCE OF CARBON FOR GROWTH	EXAMPLE OF GENUS
Phototroph			
Photolithothoroph (autotroph)	Ligh	CO_2	*Chromatium*
Photoorganotroph (heterotroph)	Ligh	Organic compound	*Rhodopseudomonas*
Chemotroph			
Chemolithotroph (autotroph)	Oxidation of inorganic compound	CO_2	*Thiobacillus*
Chemoorganotroph (heterotroph)	Oxidation of organic compound	Organic compound	*Escherichia*

PHOTOTROPHS

สำหรับ phototrophic bacteria สายพันธุ์ซึ่งใช้คาร์บอนไดอ๊อกไซด์เป็นแหล่งใหญ่ของธาตุคาร์บอนถูกเรียกว่าพวก photolithotroph ตัวอย่างเช่นสายพันธุ์ต่าง ๆ ของจีนัส *Chromatium* เป็นต้น แต่สายพันธุ์อื่นซึ่งต้องการสารประกอบอินทรีย์ถูกเรียกว่าพวก photoorganotroph ตัวอย่างเช่น *Rhodopseudomonas palustris* เป็น phototoorganotroph ซึ่งใช้แอลกอฮอล์ กรดไขมันและกรดอะมิโนรวมกับสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนต่าง ๆ

CHEMOTROPHS

แบคทีเรียในจีนัส *Nitrobacter* สามารถอ๊อกซิไดซ์ไนไตรต์ให้เป็นไนเตรด และจับยึดคาร์บอนไดอ๊อกไซด์เพื่อให้ได้พลังงานและธาตุคาร์บอนตามต้องการ แบคทีเรียสายพันธุ์

Thiobacillus thioparus ได้พลังงานจากการอ๊อกซิเดชั่นธาตุกำมะถันและสารประกอบอนินทรีย์กำมะถัน แบคทีเรียดังกล่าวถือว่าเป็นตัวอย่างของ chemolithotrophic species

Chemotroph พวกอื่นหลายชนิดต้องการสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนเพื่อใช้ในการสร้างพลังงานโดยการอ๊อกซิเดชั่น สารพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ถูกจัดเป็นพวก chemoorganotroph

พวก photolithotrophic และ chemolithotrophic bacteria โดยทั่วไปหมายถึงพวก autotroph ส่วนพวก photoorganotrophic และ chemoorganotrophic species หมายถึงพวก heterotroph

AUTOTROPHS AND HETEROTROPHS

ในแง่ความซับซ้อนทางเคมีของสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต พวก autotroph มีความต้องการอย่างง่ายที่สุด ตัวอย่างส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง autotrophic sulfur-oxidizing bacteria ได้แสดงไว้ในตารางที่ 6-3 ด้วยความจริงที่ว่าสิ่งมีชีวิตหนึ่งสามารถเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ในส่วนผสมของสารประกอบเคมีอย่างง่ายแสดงว่าสิ่งมีชีวิตนั้นมีความสามารถในการสังเคราะห์ได้อย่างละเอียด คือสามารถเปลี่ยนแปลงสารประกอบอย่างง่ายให้เป็นสารประกอบซับซ้อนพวกคาร์โบไฮเดรต ไขมัน โปรตีน กรดนิวคลีอิก วิตามิน และสารประกอบซับซ้อนอื่น ๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเซลล์มีชีวิต

ตารางที่ 6-3

An Autotrophic Type of Medium

Powdered sulfur	10 g
$(NH_4)_2SO_4$	0.4 g
KH_2PO_4	4.0 g
$CaCl_2$	0.25 g
$MgSO_4 7H_2O$	0.5 g
$FeSO_4$	0.01 g
Water	1,000 ml
CO_2	

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง autotrophic bacteria พวกอื่นก็มีสูตรส่วนประกอบคล้ายกับตัวอย่างข้างต้นแต่แตกต่างกันในด้านสารประกอบเคมีเฉพาะอย่างที่จำเป็นต้องเติมหรือทดแทนเพื่อให้ตรงกับความต้องการของสายพันธุ์ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ (medium) ซึ่งทราบส่วนประกอบของสารเคมีแน่นอนถูกเรียกว่า chemically defined หรือ synthetic medium

Heterotrophic bacteria ได้ถูกศึกษากว้างขวางกว่าพวก autotroph เนื่องจากพวก heterotroph มีความเกี่ยวข้องกับมนุษย์โดยตรงมากกว่า แบคทีเรียในหมู่นี้ที่พบทุกสายพันธุ์มักทำให้เกิดโรคแก่มนุษย์ พืช และสัตว์ หรือเป็นประชากรจุลินทรีย์ ส่วนใหญ่ในสภาพแวดล้อมโดยตรงของมนุษย์ แต่อย่างไรก็ตามไม่ได้หมายความว่าพวก autotroph มีความสำคัญน้อยกว่าพวก heterotroph ในทางตรงกันข้ามกลับมีความสำคัญยิ่งอย่างแฝงเร้นในธรรมชาติ เช่นทำให้เกิดการหมุนเวียนของแร่ธาตุผ่านระบบทางชีววิทยาซึ่งจะได้กล่าวถึงในเรื่องเกี่ยวกับกิจกรรมของจุลินทรีย์ในน้ำและในดิน

ถึงแม้ว่า heterotrophic bacteria เป็นเพียงหมู่หนึ่งทางโภชนาการของจุลินทรีย์เท่านั้น แต่ก็มีสารอาหาร (nutrient) เฉพาะซึ่งจำเป็นต่อการเจริญเติบโตของแต่ละสายพันธุ์ ดังในตารางที่ 6-4 Heterotrophic bacteria ทุกชนิดต้องการธาตุคาร์บอนในรูปของสารอินทรีย์แต่แตกต่างกันในด้านชนิดของสารประกอบอินทรีย์คาร์บอนที่สามารถใช้ได้ นอกจากนี้พวก heterotroph ทุกชนิดยังใช้คาร์บอนไดอ๊อกไซด์ได้แก่ธาตุคาร์บอนที่ได้จากคาร์บอนไดอ๊อกไซด์เพียงอย่างเดียวไม่เพียงพอแก่ความต้องการเหมือนดังในพวก autotroph ข้อซึ่งแตกต่างกันอย่างมากคือความต้องการไนโตรเจน บางพวกก็ใช้ไนโตรเจนจากอากาศ บางพวกก็ใช้ไนโตรเจนจากสารประกอบอนินทรีย์ และบางพวกก็ต้องการไนโตรเจนจากสารประกอบอินทรีย์หนึ่งหรือหลายชนิด Heteritroph บางชนิดเจริญเติบโตได้ในอาหารที่ปราศจากวิตามิน แต่บางพวกก็ต้องการวิตามินหรือสารประกอบคล้ายวิตามินหนึ่งหรือมากกว่าหนึ่งชนิด

ในตารางที่ 6-4 แสดงให้เห็นว่า heterotrophic bacteria อาจมีความต้องการทางโภชนากรอย่างง่ายหรือซับซ้อนขึ้นอยู่กับสายพันธุ์/ ในตารางที่ 6-5 ชี้แสดงเฉพาะถึงอาหารเพื่อการเจริญเติบโตของ *Escherichia coli* และ lactobacilli เปรียบเทียบกัน ทุกสายพันธ์ของทั้ง *E. coli* และ *Lactobacillus* spp เป็นพวก heterotroph แต่มีความแตกต่างกันอย่างมากในจำนวนและความซับซ้อนของสารเคมีอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของ species ต่าง ๆ ในแต่ละจีนัส เมื่อเปรียบเทียบส่วนประกอบของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง **E.coli** กับอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงพวก autotrophic sulfuroxidizing bacterium ในตารางที่ 6-3 จะพบว่ามีข้อแตกต่างกันอย่างเห็นได้ชัดคือ น้ำตาลกลูโคส พวก autotroph ได้คาร์บอนทั้งหมดจากคาร์-บอนไดอ๊อกไซด์และได้พลังงานในกรณีนี้จากการอ๊อกซิไดซ์กำมะถัน ส่วน *E. coli* ได้คาร์บอนส่วนใหญ่จากน้ำตาลกลูโคสและได้พลังงานจากอ๊อกซิไดซ์หรือการหมัก (fermentation) ของน้ำตาลกลูโคส

ตารางที่ 6-4

Minimal Nutritional Requirements of Some Heterotrophic Bacteria.

BACTERIA	INORGANIC SALTS	ORGANIC CARBON	INORGANIC NITROGEN	ONE AMINO ACID	TWO OR MORE AMINO ACIDS	ONE VITAMIN	TWO OR MORE VITAMINS
Escherichia coli	X	X	X				
Salmonella typhi	X	X	X	X			
Proteus vulgaris	X	X	X	X		X	
Staphylococcus aureus	X	X	X		X	X	
Lactobacillus acidophilus	X	X	X		X		X

ตารางที่ 6-5

Composition of Media Supporting Growth of Lactobacilli and *Escherichia coli* (Heterotrophic Bacteria)

MEDIUM FOR CULTIVATION OF LACTOBACILLI*	
Casein hydrolyzate	5 g
Glucose	10 g
Solution A	10 ml
Solution B	5 ml
L-Asparagine	250 ml
L-Tryptophan	50 mg
L-Cystine	100 mg
DL-Methionine	100 mg
Cysteine	100 mg
Ammonium citrate	2 g
Sodium acetate (anhydrous)	6 g
Adenine; guanine; xanthine; uracil; each	10 mg
Riboflavin; thiamin; pantothenate; niacin; each	500 μg
Pyridoxamine	200 μg
Pyridoxal	100 μg
Pyridoxin	200 μg
Inositol and choline, each	10 mg
p-Aminobenzoic acid	200 μg
Biotin	5 μg
Folic acid (synthetic)	3 μg

Make up to 1 with distilled water

Solution A. K_2HPO_4 and KH_2PO_4, each 25 g, into distilled water to a volume of 250 ml.

Solution B. $FeSO_4 7H_2O$, 0.5 g; $MnSO_4 2H_2O$, 2.0 g; NaCl, 0.5 g; and $MgSO_4 7H_2O$, 10 g. Dissolve in distilled water to a volume of 250 ml.

ตารางที่ 6-5 (ต่อ)

MEDIUM FOR CULTIVATION OF *E. coli*	
$NH_4H_2PO_4$	1 g
Glucose	5 g
NaCl	5 g
$MgSO_4 7H_2O$	0.2 g
K_2HPO_4	1 g
H_2O	1,000 ml

* SOURCE: M. Rogosa et al., J Bacteriol, 54:13. 1947.

อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

ตัวอย่างของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียดังกล่าวข้างต้นเป็นอาหารซึ่งรู้ส่วนประกอบทางเคมีเรียกว่า synthetic หรือ chemically defined media และใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเฉพาะประเภทที่รู้จักแล้วเท่านั้น สารเคมีบริสุทธิ์หลายชนิดจำเป็นต้องใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งมีความต้องการหลายอย่างทางโภชนาการ เช่น lactobacilli แต่สำหรับการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียพวก heterotroph ในห้องปฏิบัติการตามปกติถึงแม้จะคล้ายกับสายพันธุ์ของ *Escherichia* หรือ *Lactobacillus* ก็ตามมักไม่ใช้อาหารสังเคราะห์ (synthetic medium) โดยทั่วไปจะใช้อาหารซึ่งประกอบด้วยสารซับซ้อนเป็นวัตถุดิบ เช่น peptone และสิ่งสกัดจากเนื้อหรือยีสต์เป็นต้น ดังในตารางที่ 6-6 จึงทำให้สามารถใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นได้อย่างกว้างขวาง เมื่อต้องการทำให้เป็นอาหารแข็งก็มีการเติมสารทำให้แข็ง เช่น วุ้น (Agar) ลงไป รายละเอียดของสารซึ่งใช้เป็นวัตถุดิบผสมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียได้แสดงไว้ในตารางที่ 6-7 จากส่วนผสมต่าง ๆ ดังกล่าวสามารถนำมาประกอบกันเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยให้จุลินทรีย์พวก heterotroph เจริญเติบโตได้หลายชนิด ตัวอย่างของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลวและแข็งอย่างง่ายซึ่งช่วยให้จุลินทรีย์พวก heterotroph เจริญเติบโตคือ nutrient broth และ nutrient agar การเติมสิ่งสกัดจากยีสต์ (ประมาณ 5 กรัม) ต่อลิตร) ลงไปในอาหารแต่ละสูตรช่วยให้อาหารมีคุณค่าทางโภชนาการเพิ่มขึ้น เนื่องจากสิ่งสกัดจากยีสต์มีวิตามินบีต่าง ๆ และมีสารช่วยในการเจริญเติบโตอื่นอีกหลายอย่าง

ประเภทของอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อ

ถึงแม้ว่าจุลินทรีย์พวก heterotroph หลายชนิดเจริญเติบโตได้ดีบน nutrient agar หรือ nutrient broth แต่ heterotroph อื่นอาจเจริญเติบโตได้ไม่ดีหรือบางพวกอาจไม่เจริญเติบโต Heterotroph บางชนิดดังแสดงในตารางที่ 6-4 ยังมีความต้องการที่ละเอียดลงไปถึง

ตารางที่ 6-6

Composition of Nutrient Broth and Nutrient Agar

Nutrient broth	
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Water	1,000 ml
Nutrient agar	
Beef extract	3 g
Peptone	5 g
Agar	15 g
Water	1,000 ml

ตารางที่ 6-7

Characteristics of Several Complex Materials Used as Ingredients of Media

RAW MATERIAL	CHARACTERISTIC	NUTRITIONAL VALUE
Beef extract	An aqueous extract of lean beef tissue concentrated to a paste	Contains the water-soluble substances of animal tissue which include carbohydrates, organic nitrogen conpounds, water-soluble vitamins and salts
Peptone	The product resulting from the digestion of proteinaceous materials, e.g., meat, casein, and gelatin digestion of the protein material is accomplished with acids or enzymes: many different peptones (depending upon the protein used and the method of digestion) are available for use in bacteriological media; peptones differ in their ability to support growth of bacteria	Principal source of organic nitrogen may also contain some vitamins and sometimes carbohydrates, depending upon the kind of proteinaceous material digested
Agar	A complex carbohydrate obtained from certain marine algae processed to remove extraneous substances	Used as a solidification agent for media: agar, dissolved in aqueous solutions, gels when the temperature is reduced below 45°C; agar not considered a source of nutrient to the bacteria
Yeast extract	An aqueous extract of yeast cells, commercially available as a powder	A very rich source of the B vitamins; also contains organic nitrogen and carbon compounds

สารอาหารเฉพาะอย่าง เช่น วิตามิน และสารช่วยในการเจริญเติบโตอย่างอื่น สิ่งมีชีวิตเหล่านี้จึงถูกจัดเป็นพวก heterotroph ที่จู้จี้ (fastidious heterotroph) นอกจากนี้ยังมีอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อจุดประสงค์พิเศษอีกหลายอย่างซึ่งมีความจำเป็นเพื่อช่วยในการคัดแยก การนับจำนวน และการบ่งชี้ถึงประเภทของแบคทีเรีย เพื่อให้เป็นไปตามต้องการนักจุลชีววิทยาจึงได้จัดเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อไว้หลาย ๆ อย่างซึ่งตั้งอยู่บนพื้นฐานของการใช้งานหรือการทำงานและอาจจัดแบ่งเป็นหมวดหมู่ได้ดังนี้

ENRICHED MEDIA คืออาหารเลี้ยงเชื้อเช่น nutrient broth หรือ nutrient agar ซึ่งมีการเติมเลือดหรือน้ำเหลืองและสิ่งสกัดจากเนื้อเยื่อของพืชและสัตว์ทำให้มีสารอาหารเพิ่มขึ้นจนจุลินทรีย์พวก heterotroph ซึ่งจู้จี้ในเรื่องอาหารเจริญเติบโตได้

SELECTIVE MEDIA การเติมสารเคมีเฉพาะบางอย่างลงใน nutrient agar ซึ่งช่วยป้องกันการเจริญของจุลินทรีย์หมู่หนึ่งแต่ไม่ยับยั้งจุลินทรีย์หมู่อื่น ตัวอย่าง เช่น crystal violet ที่ความเข้มข้นหนึ่งจะป้องกันการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวกโดยไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ ในทำนองเดียวกันเช่นอาหารที่มีน้ำตาลมอลโตสเป็นสารประกอบซึ่งมีธาตุคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียวจะเลือกให้แบคทีเรียซึ่งใช้น้ำตาลมอลโตสได้เท่านั้นเจริญเติบโต โดยหลักการแล้วสามารถคัดเลือกแบคทีเรียซึ่งสามารถเจริญเติบโตด้วยสารอินทรีย์พิเศษผิดปกติได้โดยเติมสารอินทรีย์เหล่านั้นลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อซึ่งปราศจากสารประกอบคาร์บอนอื่นปะปน

DIFFERENTIAL MEDIA การเติมน้ำยาหรือสารเคมีบางอย่างลงในอาหาร อาจมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบอย่างของการเจริญเติบโตขึ้นภายหลังจากการใส่เชื้อ (inoculation) และการบ่มเชื้อ (incubation) ซึ่งทำให้สังเกตความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ ได้ ตัวอย่างเช่น ถ้าแบคทีเรียจำนวนหลายชนิดถูกใส่ลงบนอาหารวุ้นเลือด (blood-agar medium) แบคทีเรียบางชนิดอาจทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก (hemolyzsis) เกิดเป็นบริเวณใส (clear zone) รอบโคโลนีแตกต่างจากแบคทีเรียอื่น จึงทำให้สามารถบอกความแตกต่างระหว่าง hemolytic และ nonhemolytic bacteria ได้จากการเพาะเลี้ยงบนอาหารชนิดเดียวกัน และในเวลาเดียวกันอาหารวุ้นเลือดยังเป็นทั้ง enriched และ differential medium พร้อมกันด้วย

ASSAY MEDIA คืออาหารเลี้ยงเชื้อที่กำหนดส่วนประกอบเพื่อการวิเคราะห์สารเคมี เช่น วิตามิน กรดอะมิโน และสารปฏิชีวนะ อาหารซึ่งมีส่วนประกอบพิเศษยังอาจใช้ในการทดสอบสารยับยั้งหรือฆ่าทำลายเชื้อ (disinfectant) ได้

MEDIA FOR CHARACTERIZATION OF BACTERIA อาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิดซึ่งเหมาะสมในการใช้เพื่อตรวจสอบประเภทของการเจริญเติบโตโดยจุลินทรีย์และความสามารถในการทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงทางเคมี

MEDIA FOR ENUMERATION OF BACTERIA คืออาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะชนิด ซึ่งใช้ในการตรวจสอบจำนวนของแบคทีเรียในสิ่งต่าง ๆ เช่น น้ำนม และน้ำ เป็นต้น ส่วนประกอบของอาหารเหล่านี้จะต้องเป็นไปตามกำหนดเพื่อให้เหมาะสมกับการตรวจสอบ

MAINTENANCE MEDIA ในการรักษาชีวิตและลักษณะทางสรีรวิทยา (physiological characteristic) ของเชื้อจุลินทรีย์ให้ได้ผลเป็นที่พอใจอาจจำเป็นต้องใช้อาหารซึ่งแตกต่างจากที่ใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงให้เจริญเติบโตอย่างปกติธรรมดา อาหารซึ่งทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วก็อาจทำให้จุลินทรีย์ตายได้อย่างรวดเร็วเช่นเดียวกัน ตัวอย่างเช่น น้ำตาลกลูโคสที่เติมลงในอาหารมักทำให้มีการเจริญเติบโตเพิ่มขึ้นแต่ก็ทำให้มีกรดเกิดขึ้นด้วย ดังนั้นในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อรักษาชีวิตของจุลินทรีย์จึงมักไม่ใส่น้ำตาลกลูโคส

นอกจากนี้การแบ่งประเภทของอาหารเลี้ยงเชื้ออาจทำได้โดยรากฐานของสถานะภาพทางกายภาพ เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อแบบแข็ง (Solid medium) ได้แก่แผ่นหัวมันฝรั่งซึ่งในบางครั้งอาจนำมาใช้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียเป็นกรณีพิเศษ อาหารแข็งซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจากอาหารเหลว (Solid-reversible-to-liquid medium) ตัวอย่างเช่น nutrient agar อาหารกึ่งแข็ง (Semisolid medium) คืออาหารซึ่งมีวุ้นผสมอยู่เป็นจำนวนเล็กน้อย (0.5 เปอร์เซนต์หรือน้อยกว่า) ทำให้มีลักษณะในการจับตัวกันคล้ายก้อนขนมสังขยาอย่างอ่อน อาหารเหลว (Liquid medium) ตัวอย่างเช่น nutrient broth และหางนม (skimmed milk) เป็นต้น

การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

สารซึ่งมีอยู่ในธรรมชาติบางอย่างอาจถูกใช้เพื่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เช่น น้ำนม ซึ่งโดยปกติมักใช้หางนมมากกว่านมทั้งหมด สารตามธรรมชาติเมื่อนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อมักไม่ก่อให้เกิดปัญหายุ่งยาก เพียงแต่นำมาละลายใส่ภาชนะที่เหมาะสม เช่น หลอดทดสอบ หลอดทดสอบหรือฟลาสค์และทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilze) ก่อนใช้อาหารเลี้ยงเชื้อพวก nutrient-broth หรือ agar อาจเตรียมโดยผสมส่วนประกอบต่างให้เหมาะสมตามต้องการแล้วเติมน้ำ หรือเติมน้ำลงในส่วนผสมเข้มข้นซึ่งทำไว้สำเร็จแล้ว โดยทั่วไปอาหารเลี้ยงเชื้อทุกอย่างมักมีขายในลักษณะเป็นผงเมื่อต้องการใช้ก็นำมาละลายน้ำ

ในการเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีขั้นตอนต่าง ๆ ต่อไปนี้

1. ส่วนประกอบต่าง ๆ หรืออาหารแห้งสำเร็จถูกนำมาละลายในน้ำด้วยปริมาตรที่เหมาะสม

2. ตรวจสอบพีเอชของอาหารเหลวและปรับพีเอชเมื่อจำเป็น พีเอชอาจถูกตรวจสอบโดยใช้ pH indicator (ดังในตารางที่ 6-8) หรือใช้ pH meter

3. อาหารเลี้ยงเชื้อถูกใส่บรรจุลงในภาชนะที่เหมาะสม เช่น หลอดทดสอบ ฟลาสค์หรือขวด ปิดปากภาชนะด้วยจุกสำลีหรือฝาพลาสติกหรือโลหะ

4. อาหารถูกทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilize) โดยทั่วไปด้วยหม้อนึ่งไอน้ำภายใต้ความดัน (ดูในบทที่ 22)

ตารางที่ 6-8

Characteristics of Some pH Indicators Used in Microbiology

INDICATOR (COMMON NAME)	pH RANGE OF INDICATOR (← ACID ↑ NEUTRAL ↑ ALKALINE →) 0 1 2 3 4 5 6 7 8 9 10	COLOR CHANGE ACID→ALKALINE
Thymol blue		Red→yellow
Bromphenol blue		Yellow→blue
Methyl red		Red→yellow
Bromthymol blue		Yellow→blue
Phenol red		Yellow→red
Cresol red		Yellow→red
Phenolphthalein		Colorless→pink

ภาวะทางกายภาพที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต

ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียนอกจากจะต้องทราบถึงสารอาหาร (nutrient) ที่เหมาะสมแล้วยังจำเป็นต้องทราบถึงสภาพแวดล้อมทางกายภาพซึ่งทำให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตดีที่สุดอีกด้วย นอกจากแบคทีเรียมีความต้องการทางโภชนาการแตกต่างกันมากแล้วยังแสดงความแตกต่างกันมากในด้านการตอบสนองต่อสภาวะทางกายภาพของสิ่งแวดล้อมอีกด้วย อาจกล่าวได้ว่าในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้ได้เป็นผลสำเร็จนั้นต้องการโภชนาการที่เหมาะสมร่วมกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพที่เหมาะสม

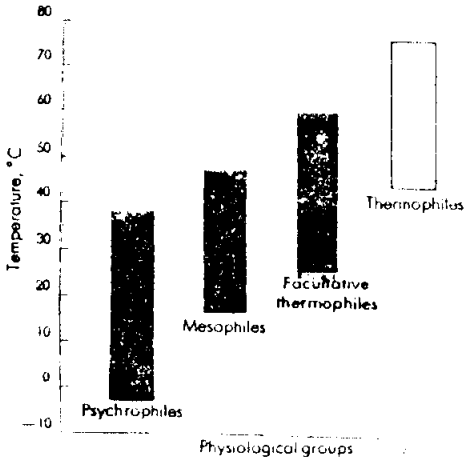
อุณหภูมิ เนื่องจากขบวนการเจริญเติบโตทุกอย่างขึ้นอยู่กับปฏิกิริยาเคมีต่าง ๆ และเนื่องจากอัตราความเร็วของปฏิกริยาตกอยู่ภายใต้อิทธิพลของอุณหภูมิ ดังนั้นแบบฉบับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียจึงตกอยู่ภายใต้อิทธิพลของอุณหภูมิอย่างลึกซึ้ง อุณหภูมิเป็นสิ่งกำหนดอัตราการเจริญเติบโตและปริมาณการเจริญเติบโตทั้งหมดของสิ่งมีชีวิต การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิอาจมีผลต่อขบวนการต่าง ๆ ทางเมตาโบลิซึ่มและลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์

แบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์มีการเจริญเติบโตในช่วงอุณหภูมิที่จำกัดอันหนึ่งเสมอ (ดูในรูปที่ 6-1) บนราฐานเช่นนี้อาจแบ่งแบคทีเรียออกได้เป็น 3 หมู่ คือ

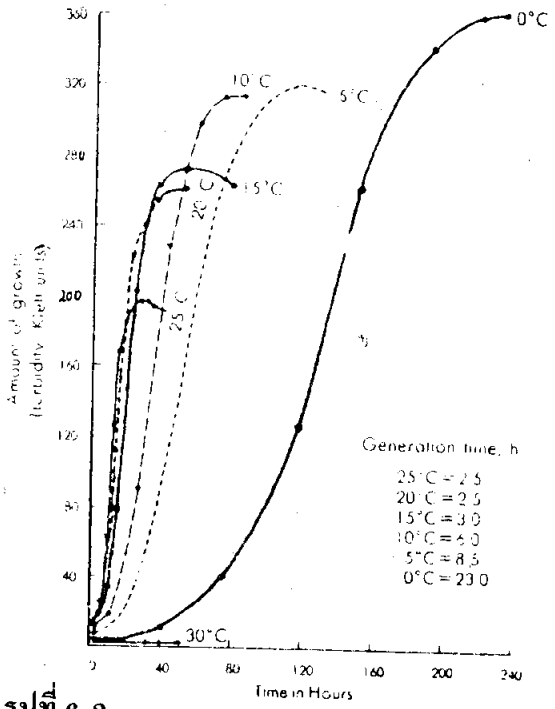
1. Psychrophile คือพวกที่สามารถเจริญเติบโตได้ที่อุณหภูมิศูนย์องศาเซลเซียตหรือต่ำกว่า ทั้งที่จุลินทรีย์เหล่านี้เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิสูงกว่าคือใกล้ 15 หรือ 20 องศาเซลเซียต หลายสายพันธุ์ของแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากแอนตาร์กติกาอาจเจริญเติบโตได้ที่ −7 องศาเซลเซียตแต่เจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิระหว่าง 20 และ 30 องศาเซลเซียต ผลของอุณหภูมิต่อการเจริญเติบโตของพวก psychrophilic *Bacillus* sp. ได้แสดงไว้ในรูปที่ 6-2

2. Mesophile เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 25 ถึง 40 องศาเซลเซียต

3. Thermophile เจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิในช่วงระหว่าง 45 ถึง 60 องศาเซลเซียต ช่วงอุณหภูมิที่พวก thermophilic bacteria บางชนิดเจริญเติบโตอาจมีขอบเขตขยายไปถึงในช่วงอุณหภูมิที่พวก mesophile เจริญเติบโต สายพันธุ์ต่าง ๆ เหล่านี้ถูกจัดเป็นพวก facultative thermophile หรือ eurithermophile ส่วน thermophile พวกอื่นเจริญเติบโตได้ดีที่อุณหภูมิสูงกว่า 60 องศาเซลเซียต และไม่เจริญเติบโตที่อุณหภูมิในช่วงของพวก mesophile จึงถูกจัดเป็นพวก thermophile ที่แท้จริงและเรียกว่าพวก obligate thermophile หรือ stenothermophile



รูปที่ 6-1 Approximate temperature range for growth of various bacteria.



รูปที่ 6-2 Effect of temperature on the growth of a psychrophilic *Bacillus* sp. Note that rate of growth (measured in Klett units) is more rapid at 25°C than at 0°C, although the total quantity of cells at the termination of growth is greater at the lower temperature. *(From J. L. Stokes in Low Temperature Biology of Food Stuffs, Pergamon, New York, 1968.)*

อุณหภูมิที่ใช้ในการบ่ม (incubation) เพื่อทำให้มีการเจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วที่สุดในช่วงระยะเวลาอันสั้น (12 ถึง 24 ชั่วโมง) ถูกเรียกว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (optimum growth temperature) อย่างไรก็ตามเป็นที่น่าสังเกตว่าอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตอาจไม่ใช่เป็นอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อกิจกรรมอื่น ๆ ของเซลล์

ตารางที่ 6-9 และ 6-10 แสดงถึงช่วงอุณหภูมิที่แบคทีเรียต่าง ๆ เจริญเติบโตจะสังเกตได้ว่าแบคทีเรียบางสายพันธุ์ไม่ได้แสดงลักษณะต่าง ๆ เหมือนกันเมื่อเจริญเติบโตที่อุณหภูมิแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่นแบคทีเรียบางชนิดทำให้เกิดสีที่อุณหภูมิต่ำแต่ไม่มีสีที่อุณหภูมิสูงหรือทำให้เกิดสีเพียงเล็กน้อย

ตารางที่ 6-9

Characteristics of Several Species of Bacteria with Respect to Temperatures at Which They Grow

BACTERIA	TEMPERATURE OF GROWTH. C.		
	Minimum	Optimum	Maximum
Pseudomonas fluorescens	4	25-30	40
Staphylococcus aureus	6.5	30-37	46
Thiobacillus thiooxidans	10	28-30	37
Micrococcus luteus	10	30	45
Lactobacillus plantarum	15	30-35	45
Corynebacterium diphtheriae	15	37	40
Streptococcus thermophilus	20	40-45	50
Thermoactinomyces vulgaris	27-30	60	65-70
Neisseria gonorrhoeae	30	35-36	38.5
Thermus aquaticus	40	70-72	79

SOURCE: Data from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams & Wilkins, Baltimore. 1974.

ตารางที่ 6-10

Growth Themperatures of Several Species of Aerobic Sporeforming Bacteria *(Bacillus spp.)*

BACILLUS SPECIES	NUMBER OF STRAINS	NUMBER OF STRAINS GROWING AT								
		28°C	33°C	37°C	45°C	50°C	55°C	60°C	65°C	70°C
B. stearothermophilus	87	0	10	73	81	87	87	87	87	45
B. coagulans	73	53	73	73	73	72	66	23	0	
B. subtilis	154	154	154	154	150	105	17	0		
B. brevis	57	57	57	57	38	16	7	0		
B. circulans	55	55	55	51	18	6	1	0		
B. pumilus	65	65	65	65	64	43	0			
B. macerans	13	13	13	13	13	9	0			
B. cereus	50	50	50	50	23	0				
B. sphaericus	42	42	42	42	15	0				

SOURCE: Courtesy of N. R. Smith et. al., "Aerobic Spore-forming Bacteria." U.S. Department of Agriculture Monograph 16. p. 36. 1952.

ความต้องการแกส แกสพื้นฐานซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียคือ อ๊อกซิเจน และคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ แบคทีเรียแสดงการตอบสนองต่ออ๊อกซิเจนอิสระอย่างกว้างขวาง ดังนั้นจึงอาจจัดแบ่งออกได้เป็น 4 พวก คือ

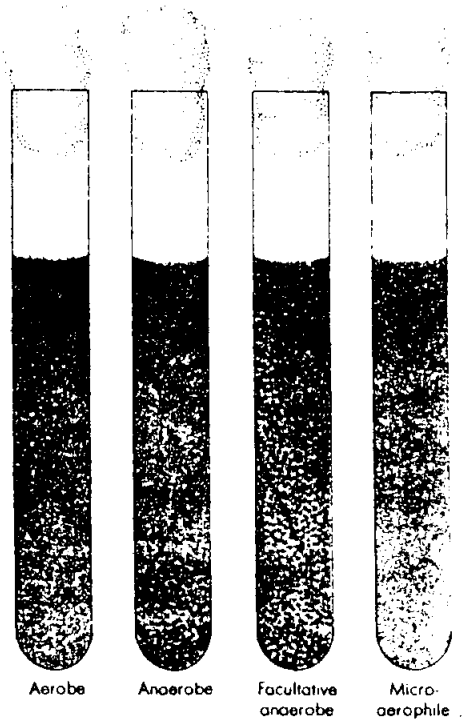
1. Aerobic bacteria คือพวกที่เจริญเติบโตในสภาพซึ่งมีอ๊อกซิเจนอิสระ

2. Anaerobic bacteria คือ พวกที่เจริญเติบโตในสภาพซึ่งปราศจากอ๊อกซิเจนอิสระ

3. Facultatively anaerobic bacteria คือพวกที่เจริญเติบโตได้ทั้งในสภาพซึ่งมีและไม่มีอ๊อกซิเจนอิสระ

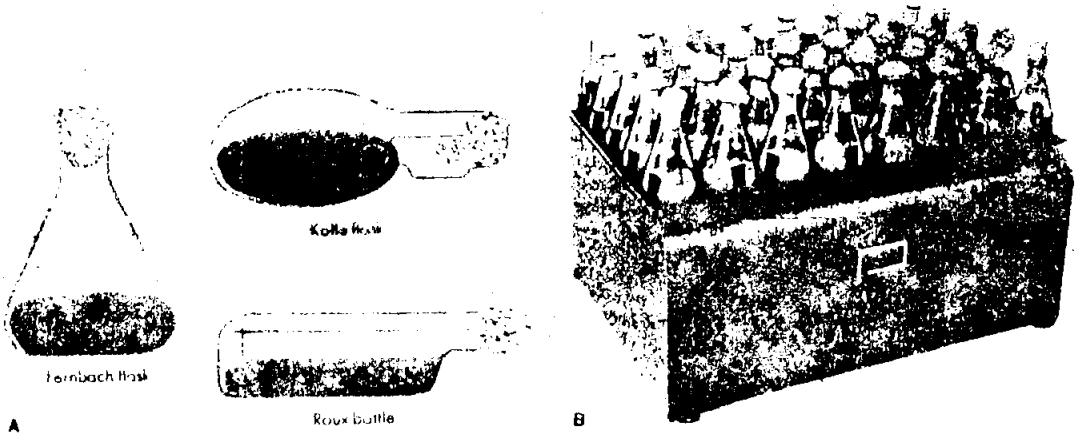
4. Microaerophilic bacteria คือพวกที่เจริญเติบโตได้ในสภาพซึ่งมีอ๊อกซิเจนอิสระปริมาณเพียงเล็กน้อย

รูปที่ 6-3 แสดงแบบฉบับการเจริญเติบโตของแบคทีเรียทั้งสี่พวก



รูปที่ 6-3 Schematic illustration of the growth of bacteria in deep agar tubes, showing differences in response to atmospheric oxygen.

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียพวก aerobic หรือ facultative ในหลอดหรือฟลาสค์แล้วบ่มภายใต้สภาวะบรรยากาศตามปกติก็เพียงพอต่อการเจริญเติบโต อย่างไรก็ตามเมื่อพวก aerobic organism ถูกเพาะเลี้ยงในปริมาณก็จำเป็นต้องทำให้อาหารได้สัมผัสกับอากาศมากขึ้นซึ่งสามารถทำได้โดยใส่อาหารเป็นชั้นบางในภาชนะที่เหมาะสม เช่น Fernbach flask, Kolle flask และ Roux bottle การให้อากาศอาจทำให้เพิ่มขึ้นได้โดยการเขย่าอาหารเหลวซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์ผสมอยู่อย่างสม่ำเสมอ ดังรูปที่ 6-4 หรือโดยการเป่าอากาศลงในอาหารเหลว



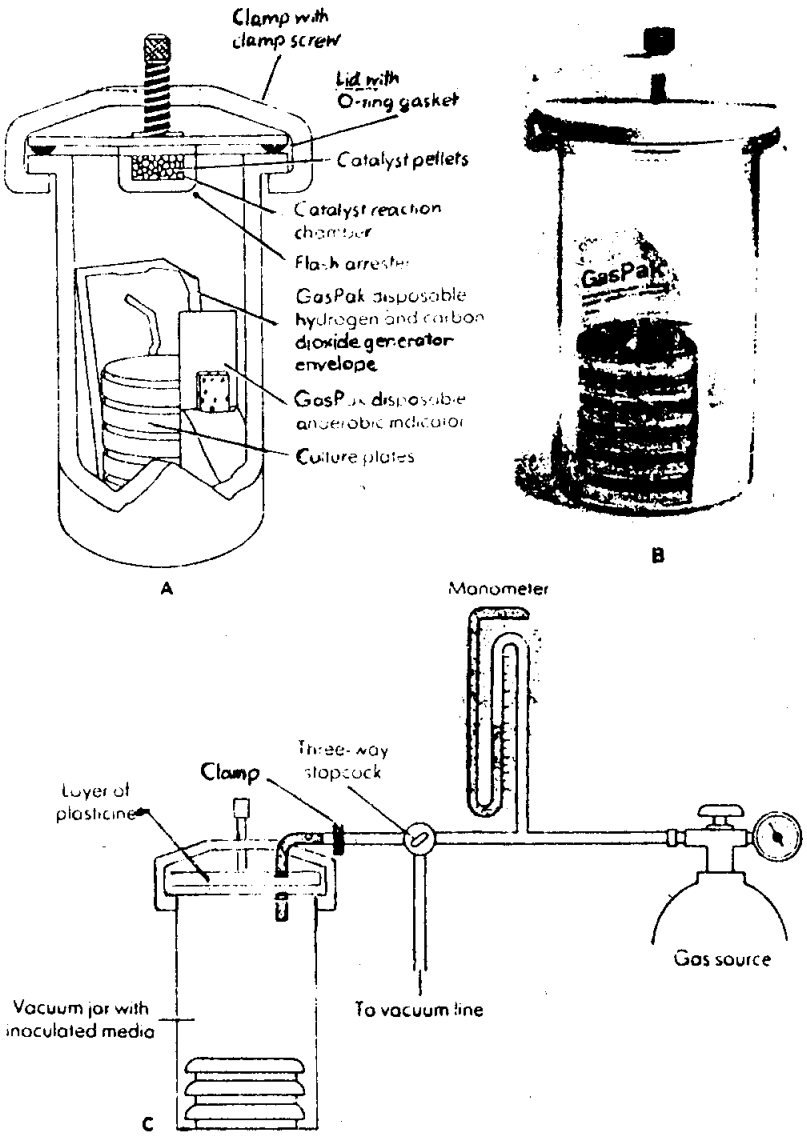
รูปที่ 6-4 Methods for providing increased aeration during incubation. (A) Culture vessels of several designs that provide a large surface area for a shallow layer of medium. (B) Rotary-type shaker. The flasks are fixed firmly on the platform, which rotates in a circular manner, thus agitating the fluid medium constantly during incubation and thereby exposing more culture surface to the gas phase. *(New Brunswick Scientific Company.)*

พวก anaerobic bacteria ซึ่งเข้มงวดสามารถเจริญเติบโตได้เฉพาะในอาหารที่ถูกกำจัดแกสอ๊อกซิเจนจากอากาศหมดแล้วเท่านั้น และสภาพแวดล้อมซึ่งปราศจากอ๊อกซิเจนอิสระอาจกระทำได้โดยใช้วิธีการต่าง ๆ ดังต่อไปนี้

1. เติม reducing compound เช่น sodium thioglycolate ลงในอาหารเพื่อลดปริมาณอ๊อกซิเจน

2. กำจัดอ๊อกซิเจนออกจากภาชนะปิดซึ่งบรรจุหลอดอาหารหรือจานเลี้ยงเชื้อโดยวิธีกล เช่น ดูดอากาศออกจากภาชนะแล้วแทนที่ด้วยแกสไนโตนเจน, ฮีเลี่ยม หรือส่วนผสมของแกสไนโตรเจนและคาร์บอนไดอ๊อกไซด์

รูปที่ 6-5 (A) The GasPak Anaerobic System. The two basic components of the GasPak Anaerobic System are the GasPak hydrogen + carbon dioxide generator envelope and a room-temperature palladium catalyst. Water is added to the GasPak envelope and hydrogen is produced. The hydrogen reacts with oxygen on the surface of the catalyst to form water and, subsequently, an anaerobic condition. Carbon dioxide is also generated by the GasPak envelope in sufficient volume to support growth of fastidious anaerobic microorganisms which sometimes fail to grow or grow poorly in the absence of this gas. An anaerobic indicator strip (a pad saturated with methylene blue solution) changes from blue to colorless in the absence of oxygen. *(Bioquest, Division of Becton, Dickinson and Company).* (B) The GasPak Anaerobic System with inoculated petri dishes, the GasPak generator envelope, and the anaerobic indicator strip. *(Bioquest, Division of Becton, Dickinson and Company).* (C) Mechanical evacuation and replacement method. Air is evacuated from the jar by a vacuum pump. The jar is flushed with nitrogen gas several times and finally filled with nitrogen gas or a mixture of carbon dioxide and nitrogen. Measurement of gas removal and replacement can be determined from the manometer in the system.



3. ทำให้เกิดปฏิกริยาเคมีภายในภาชนะปิดซึ่งบรรจุอาหารใส่เชื้อ เพื่อรวมตัวกับอ๊อกซิเจนอิสระกลายเป็นสารประกอบเช่น การจุดเทียนเพื่อเปลี่ยนอ๊อกซิเจนให้กลายเป็นแกสคาร์บอนไดอ๊อกไซด์

ความเป็นกรดหรือด่าง (พีเอช) แบคทีเรียส่วนใหญ่มีพีเอชเหมาะสม (optimum, pH) ต่อการเจริญเติบโตอยู่ในช่วงระหว่าง 6.5 ถึง 7.5 ถึงแม้ว่ามีแบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญเติบโตได้ที่พีเอชสูงกว่าหรือต่ำกว่าช่วงนี้มากแต่สายพันธุ์ส่วนใหญ่ก็มีขอบเขตจำกัดต่ำสุดและสูงสุดไม่เกินพีเอช 4 และพีเอช 9 ดังในตารางที่ 6-11

ตารางที่ 6-11

Minimum,Optimum, and Maximum pH for the Growth of Several Species of Bacteria

	pH RANGE FOR GROWTH		
BACTERIA	**Lower Limit**	**Optimum**	**Upper Limit**
Thiobacillus thiooxidans	0.5	2.0-3.5	6.0
Acetobacter aceti	4.0-4.5	5.4-6.3	7.0-8.0
Staphylococcus aureus	4.2	7.0-7.5	9.3
Azotobacter spp.	5.5	7.0-7.5	8.5
Chlorobium limicola	6.0	6.8	7.0
Thermus aquaticus	6.0	7.5-7.8	9.5

SOURCE: Data from Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed., Williams & Wilkins, Baltimore, 1974.

เมื่อแบคทีเรียถูกเพาะเลี้ยงในอาหารซึ่งปรับให้มีพีเอชหนึ่งเมื่อตอนเริ่มต้น เช่น พีเอช 7 แต่ต่อมาพีเอชอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารซึ่งเป็นผลผลิตของแบคทีเรีย สารเหล่านี้อาจมีคุณสมบัติเป็นกรดหรือด่างเมื่อเพาะเลี้ยงแบคทีเรียต่อไปพีเอชอาจถูกทำให้เปลี่ยนแปลงมากขึ้นจนยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย การเปลี่ยนแปลงของพีเอชเช่นนี้อาจสามารถป้องกันได้โดยเติมบัฟเฟอร์ (buffer) ลงไปในอาหาร บัฟเฟอร์คือ สารประกอบหรือคู่ของสารประกอบซึ่งช่วยป้องกันไม่ให้มีการเปลี่ยนแปลงของพีเอชโดยทั่วไปมักใช้ส่วนผสมของ KH_2PO_4 และ K_2HPO_4 เป็นบัฟเฟอร์เติมลงในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย ส่วนประกอบบางชนิดของอาหารเช่น peptone ก็มีคุณสมบัติในการเป็นบัฟเฟอร์อยู่ด้วย การพิจารณาเติมบัฟเฟอร์ลงในอาหารก็ขึ้นอยู่กับจุดประสงค์ของการใช้และถูกจำกัดโดยความจุ

ในการเป็นบัฟเฟอร์ของส่วนประกอบอาหาร เครื่องมือการหมักขนาดใหญ่อาจมีการควบคุมพีเอชให้คงที่โดยอัตโนมัติ

ความต้องการทางกายภาพปลีกย่อยอื่น ๆ อุณหภูมิ แกส และพีเอช เป็นปัจจัยทางกายภาพที่สำคัญซึ่งจำเป็นต้องจัดเตรียมให้เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ส่วนใหญ่ แต่แบคทีเรียบางหมู่ก็มีความต้องการอย่างอื่นเพิ่มเติมอีก ตัวอย่างเช่น พวก photosynthetic autotrophic organism จะต้องได้รับแสงเพื่อเป็นแหล่งของพลังงาน การเจริญเติบโตของแบคทีเรียอาจได้รับอิทธิพลจากสภาวะความดันออสโมซิสหรือความดันของน้ำ แบคทีเรียบางชนิดซึ่งคัดแยกได้จากน้ำเกลือ ห่อเกลือ หรืออาหารบางชนิด และน้ำทะเลอาจเจริญเติบโตได้เฉพาะในอาหารซึ่งมีความเข้มข้นของเกลือสูงกว่าปกติ (10 ถึง 15%) จึงถูกเรียกว่าพวก obligate halophilic bacteria แบคทีเรียเหล่านี้เป็นตัวอย่างในการตอบสนองต่อแรงดันออสโมซิส สำหรับแบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้จากก้นมหาสมุทรลึกมากมีสภาวะความดันนับเป็นหลายตันต่อตารางนิ้ว สภาพเช่นนี้จัดเป็นการตอบสนองต่อสภาวะความดันของน้ำ

การเลือกอาหารและสภาวะต่าง ๆ ในการบ่มเชื้อ

การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้ได้เป็นผลสำเร็จในห้องปฏิบัติการจะต้อง (1) ปลูกหรือใส่เชื้อแบคทีเรียลงในอาหารซึ่งมีเนื้อหาทางโภชนาการเหมาะสม และ (2) บ่มอาหารซึ่งปลูกเชื้อแล้วภายใต้สภาวะทางกายภาพที่เหมาะสม

เพื่อช่วยให้สามารถเลือกใช้อาหารและสภาวะทางกายภาพได้อย่างเหมาะสม อนึ่งจะต้องสามารถตอบปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ได้

1. แบคทีเรียซึ่งคัดแยกได้เป็นพวก aerobe หรือ anaerobe?

2. ในวัตถุตัวอย่างซึ่งนำมาคัดแยกเชื้อมีทั้งพวก autotrophic และ heterotrophic bacteria ใช่หรือไม่? และถ้าเป็นดังนั้นแบคทีเรียทั้งสองพวกนี้ถูกนำมาเพาะเลี้ยงใช่หรือไม่?

3. ในวัตถุตัวอย่างมีพวก thermophilic organism ไหม? หรือมีแต่พวก mesophilic อย่างเดียว

บางท่านอาจมีปัญหาว่าสิ่งต่าง ๆ เหล่านี้สามารถทราบล่วงหน้าได้อย่างไร? ความรู้บางอย่างเกี่ยวกับหมู่ของแบคทีเรีย ความคุ้นเคย และหลักความจริงเล็กน้อยอาจช่วยให้สามารถตอบปัญหาดังกล่าวข้างต้นได้ ตัวอย่างเช่น พวก autotrophic bacteria ยากที่จะปรากฏอยู่ในตัวอย่างซึ่งได้จากร่างกายของคนหรือสัตว์ ด้วยความจริงที่ว่าไม่มีแบคทีเรีย

ซึ่งทำให้เกิดโรคชนิดใดเป็นพวก obligate thermophile ดังนั้นจึงกำจัดการบ่มแบบนี้ออกจากการวิจัยแบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดโรคได้โดยอัตโนมัติ เมื่อต้องการตรวจสอบตัวอย่างสำหรับแบคทีเรียเฉพาะสายพันธุ์ เช่น แบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดโรคไทฟอยด์ ความรู้เกี่ยวกับลักษณะของแบคทีเรียทำให้สามารถคัดเลือกอาหารและภาวะต่าง ๆ ในการบ่มเพื่อการเพาะเลี้ยงได้อย่างเหมาะสม เช่น แบคทีเรียในกรณีนี้มีลักษณะเป็นพวก heterotrophic, nonfastidious, aerobic และ mesophilic เป็นต้น หรือถ้าสำหรับตัวอย่างปัญหาการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียซึ่งพบอยู่ในน้ำนม หมู่ของจุลินทรีย์ทางโภชนาการชนิดเดียวที่อาจไม่ต้องคำนึงถึงได้ล่วงหน้าโดยอัตโนมัติคือ พวก obligate autotroph ดังนั้นภาวะต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจึงต้องจัดเตรียมไว้สำหรับพวก aerobe, anaerobe, psychrophile, mesophile และ thermophile เช่นเดียวกันกับพวก heterotroph ที่จู้จี้ในเรื่องอาหาร การตรวจสอบเช่นนี้จึงจำเป็นต้องใส่เชื้อลงในอาหารหลายอย่างและบ่มภายใต้ภาวะต่าง ๆ กัน