บทที่ 7
การสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต

เมื่อแบคทีเรียถูกใส่ลงในอาหารที่เหมาะสมและบ่มภายใต้สภาวะที่เหมาะสม จำนวนเซลล์แบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นอย่างมากภายในระยะเวลาอันสั้น แบคทีเรียบางสายพันธุ์อาจมีจำนวนประชากรถึงจุดสูงสุดได้ภายในระยะเวลาเพียง 24 ชั่วโมง แต่บางพวกก็ต้องการระยะเวลาการบ่มนานกว่านี้จึงจะถึงจุดซึ่งมีการเจริญเติบโตสูงสุด คำว่า การเจริญเติบโต (growth) ซึ่งมักใช้กับแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นโดยปกติหมายถึงการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์มากกว่าขนาดของเซลล์ โดยทั่วไปสิ่งที่ใช้เป็นต้นตอของเชื้อ (inoculum) มักมีจุลินทรีย์เป็นจำนวนหลายพันการเจริญเติบโตก็คือการเพิ่มจำนวนให้สูงขึ้นเกินกว่าที่มีอยู่ในต้นตอเริ่มต้น ดังนั้นการตรวจสอบการเจริญเติบโตจึงจำเป็นต้องวัดปริมาณของประชากรเซลล์หรือเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้เมื่อตอนเริ่มต้นและอีกครั้งหนึ่งภายหลังจากการบ่มแล้ว ในบทนี้จะได้อภิปรายถึงการเจริญเติบโตอาจถูกวัดได้อย่างไร และแบคทีเรียทำให้เกิดเซลล์ใหม่ได้อย่างไร

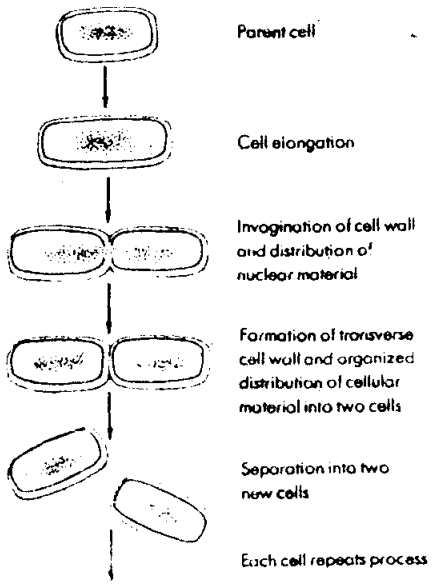
การสืบพันธุ์

การแบ่งเซลล์ (BINARY FISSION) ขบวนการสามัญที่สุดและสำคัญที่สุดในวงจรการเจริญเติบโตของประชากรแบคทีเรียคือ การแตกตัวออกเป็นสองตามขวาง (transverse binary fission) ซึ่งเซลล์ ๆ หนึ่งจะถูกแบ่งออกเป็นสองหลังจากได้เกิดผนังเซลล์มากั้นแบ่งตามขวาง ดังรูปที่ 7-1 การแตกตัวออกเป็นสองตามขวางจัดเป็นขบวนการสืบพันธุ์แบบไม่ใช้

เพศในแบคทีเรียบางสายพันธุ์แต่ไม่บ่อยนักซึ่งขบวนการแตกตัวเป็นสองอาจเกิดขึ้นหลังจากการผสมพันธุ์หรือการเชื่อมต่อกัน (conjugation) ของเซลล์ หลักฐานการทดลองเกี่ยวกับการเชื่อมต่อกันของแบคทีเรียจะได้เสนอในบทต่อไป

แบคทีเรียทั้งหลายไม่ได้มีการสืบพันธุ์โดยการแตกเป็นสองวิธีเดียว สายพันธุ์ต่าง ๆ ของจีนัส *Streptomyces* มีการสืบพันธุ์โดยสร้างสปอร์เป็นจำนวนมากซึ่งแต่ละสปอร์จะทำให้เกิดเป็นจุลินทรีย์ขึ้นมาใหม่ และแบคทีเรียในสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกันคือจีนัส *Nocardia* มีการเจริญเติบโตเป็นเส้นสายซึ่งต่อมามีการแตกหักเป็นเซลล์รูปร่างเป็นท่อนหรือกลมและแต่ละเซลล์ก็จะเจริญเติบโตเป็นเส้นสายใหม่

แบคทีเรียพวกอื่นเช่น จีนัส *Hyphomicrobium* สามารถสืบพันธุ์โดยการแตกหน่อหรือตา (bud) ตาหรือหน่อเกิดจากก้านซึ่งยื่นออกจากเซลล์พ่อหรือแม่และหลังจากที่มีขนาดโตขึ้นก็จะแยกตัวออกจากเซลล์พ่อหรือแม่กลายเป็นเซลล์ใหม่ต่อไป



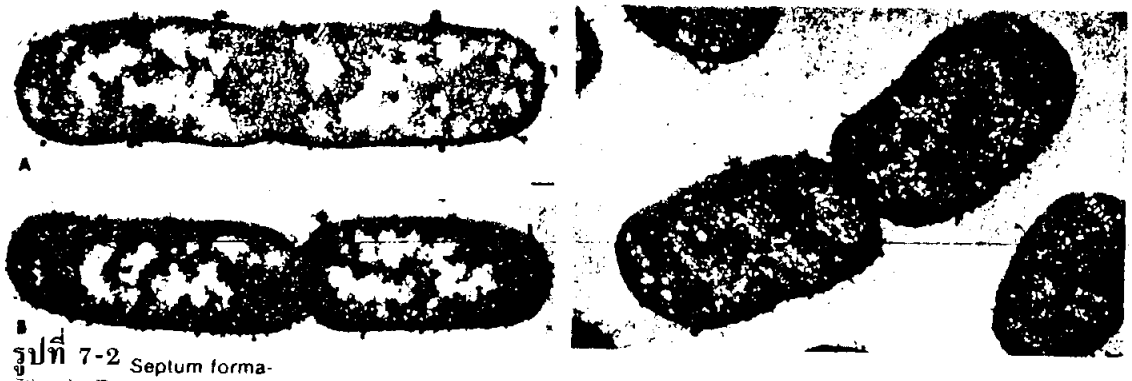
รูปที่ 7-1 Bacterial multiplication by transverse binary fission (schematic illustration).

การเกิดเซลล์ใหม่ สิ่งมีชีวิตซึ่งมีขนาดเล็กเช่น แบคทีเรียจะต้องอาศัยวิธีที่ยุ่งยากหลายอย่างเพื่อสังเกตและอ่านผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ซึ่งละเอียดอ่อนในระหว่างขบวนการสืบพันธุ์ อย่างไรก็ตามวิธีการพิเศษสำหรับการวิเคราะห์ทางเคมีและกลวิธีเกี่ยวกับกล้อง

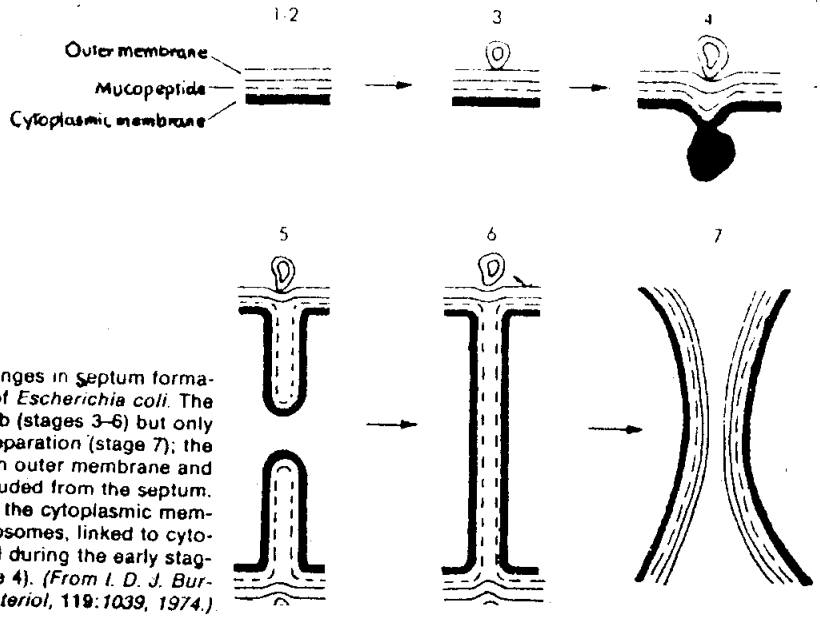
จุลทรรศน์แบบใหม่โดยเฉพาะกล้องจุลทรรศน์อีเล็กตรอนซึ่งใช้ในการตรวจสอบชิ้นส่วนบางของเซลล์ได้ช่วยแสดงให้เห็นถึงเหตุการณ์ที่ปรากฏขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้การปรับปรุงกลวิธีการทำให้ประชากรเซลล์ทั้งหมดอยู่ในระยะเดียวกันของวงจรการเจริญเติบโต ดังนั้นเซลล์ทุกเซลล์จึงมีการแบ่งตัวในเวลาเดียวกัน ทำให้สามารถวิเคราะห์เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ร่วมกันเพื่อการค้นหาสารเคมีต่าง ๆ ที่ระยะใดระยะหนึ่งของการเจริญเติบโตได้โดยเฉพาะ ผลของการวิเคราะห์เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ร่วมกัน ทำให้สามารถแปลความหมายถึงเซลล์เดี่ยวที่ระยะของการเจริญเติบโตนั้นได้ กลวิธีการเพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แบบนี้ถูกเรียกว่าการเพาะเลี้ยงโดยพร้อมเพรียงกัน (synchronous culture) เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมดจากประชากรเซลล์ที่พร้อมเพรียงกันสามารถตรวจสอบและอ่านผลเป็นเซลล์เดียวกันได้ที่ระยะใดระยะหนึ่งของการเจริญเติบโตโดยเฉพาะ

เซลล์แบคทีเรียที่ใส่ลงในอาหารซึ่งจัดเตรียมใหม่จะมีการเลือกดูดสารอาหารเข้าไปในเซลล์แล้วทำการสังเคราะห์ทางชีวเคมีให้ได้เป็นสิ่งหรือสารที่เซลล์ต้องการสารอาหารซึ่งเข้าไปในเซลล์จะถูกเปลี่ยนแปลงเป็นสารของเซลล์ใหม่ เช่น RNA, DNA, โปรตีน, เอนไซม์ และสารประกอบโมเลกุลใหญ่อื่น ๆ เซลล์มีมวลและขนาดเพิ่มขึ้น สารประกอบของผนังเซลล์ใหม่จะถูกสังเคราะห์ขึ้น ต่อจากนั้นขบวนการแตกตัวเป็นสองก็จะเริ่มขึ้นแล้วได้เป็นสองเซลล์ใหม่ในขั้นสุดท้าย รูปที่ 7-2 แสดงถึงเซลล์ของ *Escherichia coli* ที่ระยะต่าง ๆ ของการแบ่งตัว แผนภูมิแสดงการเกิดผนังกั้นแบ่งเซลล์ (septum) ในแบคทีเรียเดียวกันได้แสดงไว้ในรูปที่ 7-3

ปัญหาสำคัญบางอย่างเกี่ยวกับการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียซึ่งยังไม่ได้รับคำตอบคือ อะไรเป็นสิ่งกระตุ้นให้ขบวนการแบ่งเซลล์เริ่มขึ้น? อะไรเป็นสาเหตุทำให้ผนังเซลล์เกิดการคอดตัวที่บริเวณประมาณตรงกลางของเซลล์เดิม? อะไรเป็นตัวควบคุมการจัดระเบียบของสารเซลล์ภายในแต่ละเซลล์ใหม่สองเซลล์ที่เกิดขึ้น? ปัญหาต่าง ๆ เหล่านี้ไม่แต่เฉพาะการเจริญเติบโตและสืบพันธุ์ของแบคทีเรียเท่านั้น การแบ่งเซลล์ของพืชและสัตว์ชั้นสูงก็มีปัญหาคล้ายคลึงกันซึ่งยังไม่ได้รับคำตอบ เนื่องจากระบบทางชีววิทยาทุกอย่างมีความคล้ายคลึงกันมาก ดังนั้นการเข้าใจถึงขบวนการต่าง ๆ ของแบคทีเรียจึงช่อให้เห็นถึงเซลล์ต่าง ๆ ได้ทั้งหมด ด้วยความจริงที่ว่าแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นอาจนำมาใช้เป็นแบบอย่างในการศึกษาหลักการเกี่ยวกับความแตกต่างและการจัดระบบของเซลล์ได้อย่างดีเลิศ



รูปที่ 7-2 Septum formation in *Escherichia coli* as seen by electron microscopy of thin sections. Sections of *E. coli* strain B/r during synchronous growth at (A) 30 min and (B) 45 min and *E. coli* strain B at (C) 40 min. Note blebs of outer membrane in A and B and the nuclear material (white area) partitioned to each half of the cell. (B) and (C) show complete septum formation. *(From I. D. J. Burdett and R. G. E. Murray, J Bacteriol,* **119**: *1039, 1974.)*



รูปที่ 7-3 Sequence of changes in septum formation in synchronous culture of *Escherichia coli*. The outer membrane forms a bleb (stages 3–6) but only enters the septum at cell separation (stage 7); the intermediate layer between outer membrane and mucopeptide may also be excluded from the septum. The septum is composed of the cytoplasmic membrane and mucopeptide; mesosomes, linked to cytoplasmic membrane, are found during the early stages of septum formation (stage 4). *(From I. D. J. Burdett and R. G. E. Murray, J Bacteriol,* **119**:*1039, 1974.)*

การเจริญเติบโต

อัตราการเจริญเติบโตและระยะเวลาของชั่วอายุ ดังที่ได้กล่าวถึงมาแล้วว่า แบคทีเรียสืบพันธุ์โดยการแตกตัวแบ่งหนึ่งเซลล์ให้กลายเป็นสองเซลล์ ดังนั้นถ้าเริ่มต้นด้วยแบคทีเรียหนึ่งเซลล์ประชากรของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นเป็นแบบเลขอนุกรมเรขาคณิต คือ

$$1 \longrightarrow 2 \longrightarrow 2^2 \longrightarrow 2^3 \longrightarrow 2^4 \longrightarrow 2^5 \longrightarrow 2^6 \ldots\ldots\ldots 2^n$$

ช่วงระยะเวลาที่ใช้เพื่อการแบ่งตัวของเซลล์หรือเพื่อทำให้ประชากรเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าจะเรียกว่าระยะเวลาของชั่วอายุ (generation time) หรือระยะเวลาในการทวีคูณ (doubling time) แบคทีเรียแต่ละชนิดมีระยะเวลาในการทวีคูณแตกต่างกัน เช่น *Escherichia coli* อาจเป็น 15 ถึง 20 นาที ส่วนแบคทีเรียอื่นอาจใช้เวลาหลายชั่วโมงดังในตารางที่ 7-1 อย่างไรก็ตามแบคทีเรียชนิดเดียวกันก็ไม่ได้มีระยะเวลาในการทวีคูณเท่ากันในทุก ๆ สภาวะหรือเมื่ออยู่ในภาวะที่แตกต่างกัน ระยะเวลาในการทวีคูณจะสั้นหรือยาวเพียงใดก็ขึ้นอยู่กับสารอาหารในตัวกลางที่แบคทีเรียอาศัยอยู่และสภาวะแวดล้อมทางกายภาพเป็นอย่างมาก ดังได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 6 แบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตในสภาวะแวดล้อมต่าง ๆ ทางกายภาพได้อย่างกว้างขวาง และสามารถใช้สารอาหารต่าง ๆ ได้หลายชนิด แต่ภาวะที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตเฉพาะสายพันธุ์นั้นแตกต่างกัน

ตารางที่ 7-1

Generation Times of Several Species of Bacteria

BACTERIUM	MEDIUM	TEMPERATURE C	GENERATION TIME, min
Bacillus mycoides	Broth	37	28
B. thermophilus	Broth	55	18.3
Escherichia coli	Broth	37	17
	Milk	37	12.5
Lactobacillus acidophilus	Milk	37	66-87
Mycobacterium tuberculosis	Synthetic	37	792-932
Rhizobium japonicum	Mineral salts + yeast extract + mannitol	25	344-461
Staphylococcus aureus	Broth	37	27-30
Streptococcus lactis	Lactose broth	37	48
	Milk	37	26
Treponema pallidum	Rabbit testes	37	1,980

SOURCE: Data from W. B. Spector (ed.), Handbook of Biological Data, table 75, Saunders, Philadelphia, 1956.

การตรวจสอบระยะเวลาในการทวีคูณของแบคทีเรียภายใต้ภาวะที่เหมาะสมนั้นง่ายมากและสามารถนำมาวิเคราะห์การเจริญเติบโตแบบคณิตศาสตร์ได้อย่างง่าย ระยะเวลาในการทวีคูณของแบคทีเรียอาจตรวจสอบได้โดยการส่องดูเซลล์แบคทีเรียซึ่งมีชีวิตอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสมด้วยกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดาหรือแบบ phase contrast และเพื่อให้ง่ายขึ้นอาจติดด้วยกล้องถ่ายภาพยนตร์แล้วบันทึกระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง แต่เพื่อให้สะดวกยิ่งขึ้นก็อาจใส่เซลล์ที่ทราบจำนวนแน่นอนลงในอาหารแล้วปล่อยให้เจริญเติบโตภายใต้ภาวะที่เหมาะสมและตรวจสอบจำนวนเซลล์ในขั้นสุด ข้อมูลการทดลองที่จำเป็นต่อการคำนวนหาระยะเวลาในการทวีคูณมีดังต่อไปนี้ (1) จำนวนแบคทีเรียเมื่อตอนเริ่มต้น (2) จำนวนแบคทีเรียที่ปรากฏภายหลังจากการเพาะเลี้ยงและ (3) ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

ดังจะได้แสดงด้วยสมมุติฐานต่อไปนี้ ถ้าใส่แบคทีเรียจำนวนหนึ่งเซลล์ลงในอาหารและหลังจากช่วงระยะเวลาในการทวีคูณหรือหนึ่งชั่วอายุแบคทีเรียจะมีสองเซลล์ เมื่อหลังชั่วอายุที่สองจะมีสี่เซลล์และหลังชั่วอายุที่สามจะมีแปดเซลล์โดยถือว่าในแต่ละชั่วอายุซึ่งต่อเนื่องกันไม่มีเซลล์หนึ่งเซลล์ใดตายลงไป ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และชั่วอายุของแบคทีเรียอาจแสดงเป็นลำดับสมการได้ดังต่อไปนี้

ถ้าให้ B = จำนวนเซลล์แบคทีเรียเริ่มต้นที่เวลาศูนย์

b = จำนวนเซลล์แบคทีเรียท้ายเมื่อสิ้นสุดการเพาะเลี้ยง

t = ระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยง

G = ระยะเวลาในการทวีคูณหรือชั่วอายุ

n = จำนวนครั้งในการทวีคูณหรือการแบ่งตัว หรือจำนวนชั่วอายุ

log = ล็อกสามัญมีฐาน 10

(ค่าล็อกมักใช้ในการเขียนกราฟหรือบอกจำนวนของประชากรแบคทีเรีย)

จากลักษณะการเพิ่มจำนวนประชากรของแบคทีเรียถ้าเริ่มต้นจากหนึ่งเซลล์อาจเขียนเป็นเลขอนุกรมเรขาคณิตได้ คือ

$$1 \times 2^0 \longrightarrow 1 \times 2^1 \longrightarrow 1 \times 2^2 \longrightarrow 1 \times 2^3 \longrightarrow 1 \times 2^4 \ldots\ldots\ldots\ldots 1 \times 2^n$$

$$\therefore \quad b = 1 \times 2^n \qquad (1)$$

2^n คือ ประชากรแบคทีเรียที่ชั่วอายุที่ n หรือเมื่อแบคทีเรียมีการแบ่ง n ครั้งอย่างไรก็ตาม ในการปฏิบัติการทดลองโดยทั่วไปมักไม่เริ่มต้นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียด้วยเซลล์เดียวแต่จะใช้จำนวนหลายเซลล์ เช่น B เซลล์ ดังนั้นจึงอาจเขียนเป็นสูตรได้ว่า

$$b = B \times 2^n \qquad (2)$$

หรือ $$\log b = \log B + n \log 2$$

$$\therefore n = \frac{\log b - \log B}{\log 2} \qquad (3)$$

ถ้าแทนค่าของ log 2 ซึ่งเท่ากับ 0.301 ในสมการ (3) จะได้

$$n = 3.3 \log \frac{b}{B} \qquad (4)$$

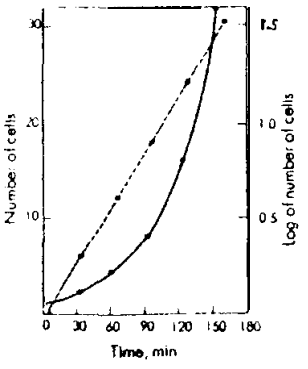
จากสมการ (4) ทำให้สามารถคำนวนหาจำนวนครั้งในการแบ่งตัว (n) ของแบคทีเรียได้จากการทราบจำนวนแบคทีเรียเริ่มต้น B และจำนวนแบคทีเรีย b ภายหลังจากเวลา t แล้ว

ระยะเวลาในการทวีคูณหรือชั่วอายุเท่ากับเวลา (t) ซึ่งใช้ในการทำให้แบคทีเรียจำนวน B เพิ่มขึ้นเป็นจำนวน b หารด้วยจำนวนครั้งในการแบ่งตัว (n) คือ

$$G = \frac{t}{n} = \frac{t}{3.3 \log (b/B)} \qquad (5)$$

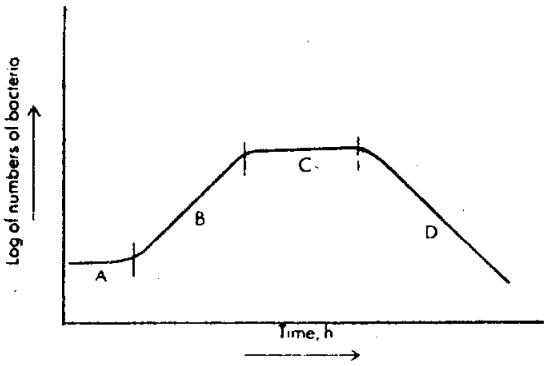
วงจรหรือเส้นกราฟสามัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย สมมุติว่าถ้าใส่เชื้อแบคทีเรียเพียงเซลล์เดียวลงในอาหารและมีการเพิ่มจำนวนขึ้นด้วยอัตราคงที่ โดยทางทฤษฎีจำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นตามเวลา เมื่อนำจำนวนแบคทีเรียที่เพิ่มขึ้นตามเวลามาใช้ในการลากเส้นกราฟด้วยสองวิธีคือ ใช้ค่าล้อก (log) จำนวนของแบคทีเรียและใช้จำนวนแบคทีเรียที่แท้จริงกับเวลาจะได้กราฟดังรูปที่ 7-4 อย่างไรก็ตามที่กล่าวถึงมานี้ยังไม่ใช่แบบฉบับสามัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียอย่างแท้จริงเป็นแต่เพียงส่วนหนึ่งของเส้นกราฟสามัญในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเท่านั้นคือ ในช่วงที่เรียกว่า log phase หรือ exponential phase ในช่วงนี้ประชากรของแบคทีเรียจะเพิ่มขึ้นอย่างปกติและมีระยะเวลาในการทวีคูณหรือชั่วอายุคงที่เป็นปกติตลอดระยะเวลาการบ่ม

รูปที่ 7-4 Hypothetical bacterial growth curve, assuming that one bacterial cell is inoculated into a medium and divisions occur regularly at 30-min intervals (generation time). - - - - = logarithm of number of bacteria versus time. —— = arithmetic number of bacteria versus time.



ด้วยความเป็นจริงแล้วเมื่อใส่เซลล์แบคทีเรียจำนวนหนึ่งลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งจัดเตรียมใหม่แล้วตรวจสอบประชากรแบคทีเรียเป็นระยะตลอดเวลาการบ่ม 24 ชั่วโมง (อาจมากหรือน้อยกว่านี้) และใช้ค่าล๊อกจำนวนแบคทีเรียกับเวลาลากเส้นกราฟจะได้รูปแบบของกราฟดังในรูปที่ 7-5 จากนี้จะเห็นได้ว่าในช่วงระยะแรกของเส้นกราฟไม่ปรากฏการเจริญเติบโต ต่อมาจึงมีการเจริญเติบโตอย่างรวดเร็วแล้วรักษาระดับจำนวนประชากรไว้ชั่วขณะหนึ่งและท้ายที่สุดประชากรซึ่งมีชีวิตก็จะลดลง ในช่วงระหว่างระยะต่าง ๆ เป็นช่วงของการเปลี่ยนแปลงเรียกว่า transitional period (curved portion) ซึ่งหมายถึงระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะใหม่ ลักษณะของกราฟชีวิตเช่นนี้เป็นแบบอย่างของจุลินทรีย์ทุกชนิดที่ถ่ายออกมาจากเชื้อเก่าแล้วใส่ลงไปในอาหารที่จัดเตรียมขึ้นใหม่

LAG PHASE การเติมเชื้อลงไปในอาหารใหม่ประชากรของจุลินทรีย์ไม่อาจเพิ่มขึ้นเป็นสองเท่าได้ทันทีเมื่อครบกำหนดเวลาในการทวีคูณหรือชั่วอายุ ประชากรของจุลินทรีย์จะคงไว้ชั่วระยะเวลาหนึ่งดังแสดงในกราฟสามัญของการเจริญเติบโต แต่ไม่ได้หมายความว่าเซลล์สงบนิ่งหรือพักตัว ในระหว่างช่วงระยะเวลานี้แต่ละเซลล์จะมีการเพิ่มขนาดมากขึ้น มีกิจกรรมทางสรีรวิทยา (physiology) ที่ว่องไวและมีการสังเคราะห์โปรโตพลาสซึ่ม (protoplasm) ใหม่ แบคทีเรียในสภาพแวดล้อมใหม่นี้อาจขาดแคลนเอนไซม์หรือโคเอนไซม์ซึ่งจะต้องสังเคราะห์ขึ้นมาเป็นอันดับแรกเพื่อให้ได้ปริมาณที่เพียงพอต่อการทำงานของจักรกลทางเคมีของเซลล์อย่างเหมาะสม ระยะเวลาเพื่อการปรับตัวในสภาพแวดล้อมใหม่นี้อาจจำเป็นสำหรับแต่ละเซลล์ จุลินทรีย์มีการเมตาโบลิซึ่ม แต่ขาด (lag) การแบ่งเซลล์



รูปที่ 7-5 Typical bacterial growth curve; (A) lag phase; (B) log (logarithmic), or exponential, phase; (C) stationary phase; (D) death or decline phase.

เมื่อสิ้นสุดระยะ lag phase จุลินทรีย์แต่ละเซลล์จะมีการแบ่งตัว อย่างไรก็ตามจุลินทรีย์แต่ละเซลล์ไม่ได้เสร็จสิ้นระยะ lag period พร้อมกัน ดังนั้นประชากรจุลินทรีย์จึงค่อย ๆ เพิ่มขึ้นจนกระทั่งทุกเซลล์สามารถแบ่งตัวได้ด้วยช่วงเวลาตามปกติ ซึ่งก็ถือว่าเป็นการสิ้นสุดของระยะนี้

LOGARITMMIC หรือ EXPONENTIAL PHASE: ในช่วงระยะเวลานี้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างสม่ำเสมอด้วยอัตราคงที่ จำนวนเซลล์ซึ่งมีชีวิตจะเพิ่มขึ้นแบบอนุกรมเรขาคณิต และเมื่อใช้ล็อกจำนวนของเซลล์กับเวลาลากเส้นกราฟจึงจะได้เส้นตรงดังรูปที่ 7-4 และ 7-5 ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมอัตราการเจริญเติบโตสูงสุดจะพบได้ในระหว่างช่วงนี้ ประชากรเซลล์ทั้งหลายมักมีลักษณะคล้ายคลึงกันเกือบทั้งหมดในแง่ของส่วนประกอบทางเคมี กิจกรรมทางเมตาโบลิซึ่มและทางสรีรวิทยาอื่น ๆ

STATIONARY PHASE: ช่วงระยะ logarithmic phase ของการเจริญเติบโตจะเริ่มเปลี่ยนแปลงหลังจากระยะเวลาหลายชั่วโมง อีกครั้งหนึ่งที่กราฟแสดงการเปลี่ยนแปลงจากเส้นตรงแล้วโค้งงอเข้าสู่เส้นตรงของ stationary phase ดังแสดงในรูปที่ 7-5 การเปลี่ยนแปลงเช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจากจุลินทรีย์มีแนวโน้มที่จะหยุดการเจริญเติบโตอันเนื่องมาจากหลายกรณี ที่สำคัญคือ สารอาหารหมดไปและการเกิดสารพิษในระหว่างการเจริญเติบโตประชากรของจุลินทรีย์จะคงที่ไปชั่วระยะเวลาหนึ่งซึ่งอาจเนื่องจากจุลินทรีย์หยุดการแบ่งตัวอย่างสมบูรณ์หรือเนื่องจากมีอัตราการเกิดเท่ากับอัตราการตาย

PHASE OF DECLINE หรือ DEATH PHASE: ต่อจากช่วงระยะของ stationary period แบคทีเรียอาจตายเร็วกว่าการทำให้เกิดเซลล์ใหม่ ในกรณีเช่นนี้บางเซลล์ก็ยังคงมีการสืบพันธุ์ได้ มีภาวะต่าง ๆ หลายอย่างซึ่งทำให้แบคทีเรียตาย แต่ที่สำคัญที่สุดคือ การ

หมดไปของสารอาหารที่จำเป็นและการสะสมของสารพิษเช่น กรดต่าง ๆ ในช่วงระยะเวลาของ death phase จำนวนเซลล์ซึ่งมีชีวิตจะลดลงแบบอนุกรมเลขาคณิตกลับกันกับในช่วงระยะเวลาของ log phase ซึ่งมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น ดังนั้นเมื่อใช้ล็อกจำนวนเซลล์กับเวลาลากเส้นกราฟจึงจะได้เส้นตรง แบคทีเรียมีอัตราการตายที่แตกต่างกันเช่นเดียวกันกับอัตราการเกิดซึ่งแตกต่างกัน บางสายพันธุ์ของค๊อกไซแกรมลบตายเร็วมากจนกระทั่งอาจเหลืออยู่เพียงไม่กี่เซลล์ ภายหลังจาก 72 ชั่วโมงหรือน้อยกว่านี้ สายพันธุ์อื่นอาจตายอย่างช้า ๆ จนกระทั่งเหลือเซลล์ซึ่งมีชีวิตเป็นเวลาหลายเดือนหรือหลายปี

TRANSITIONAL PERIODS: ระหว่างช่วงระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ เป็นที่น่าสังเกตว่าเชื้อจะค่อย ๆ เปลี่ยนจากช่วงระยะการเจริญเติบโตหนึ่งไปสู่อีกระยะหนึ่ง ดังรูปที่ 7-5 จึงหมายความว่าเซลล์ทั้งหมดไม่ได้มีความเหมือนกันทุกประการทางสรีรวิทยาแม้ในขณะใดขณะหนึ่งโดยเฉพาะในตอนท้ายของช่วงระยะการเจริญเติบโตต่าง ๆ ดังนั้นเวลาจึงมีความจำเป็นสำหรับการรอและการไล่ให้ทันซึ่งกันและกัน

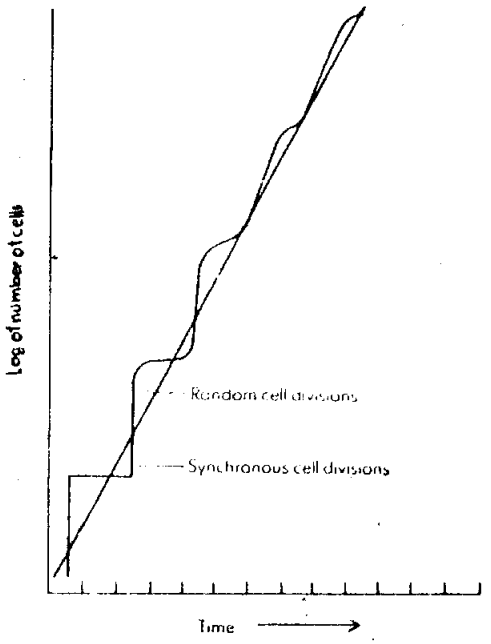
บุคคลซึ่งทำงานเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์จะต้องสามารถคำนวนอัตราการเจริญเติบโตและช่วงระยะเวลาในการทวีคูณหรือชั่วอายุได้ ตัวอย่างเช่น การทำนายระยะเวลาซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ให้มีประชากรถึงระดับที่ต้องการเป็นต้น การใช้ประโยชน์จากความหมายของเส้นกราฟสามัญการเจริญเติบโตจะต้องเข้าใจด้วยว่าในบางระยะของการเจริญเติบโตเซลล์ยังแข็งแรงและมีการเมตาโบลิซึ่มที่ว่องไวแต่ในระยะอื่นเซลล์อาจกำลังจะตาย ดังนั้นจึงอาจมีความแตกต่างกันเป็นอย่างมากในด้านโครงสร้างและสรีรวิทยาระหว่างเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ในระยะต่าง ๆ เมื่ออยู่ในระยะของการเจริญเติบโตแตกต่างกับสภาพแวดล้อมทางกายภาพและสารเคมีอาจมีผลต่อจุลินทรีย์แตกต่างกัน โดยทั่วไปเซลล์ซึ่งอยู่ในระยะ logarithemic phase ของการเจริญเติบโตจะมีความสม่ำเสมอเหมือนกันมากที่สุดและมีความเด่นชัดมากกว่าในระยะอื่น ดังนั้นจึงมักนำมาใช้ในการศึกษาทางเมตาโบลิซึ่มโดยทั่วไป

การเจริญเติบโตที่พร้อมกัน (SYNCHRONOUS GROWTH)

ในงานประจำของการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย คือ การนำเซลล์จากเชื้อเก่าใส่ลงไปในอาหารใหม่แล้วบ่ม ขบวนการเช่นนี้ไม่ได้ทำให้เซลล์มีการแบ่งตัวอย่างสม่ำเสมอหรือพร้อมกัน (synchrony) ทั้งประชากร มีหลาย ๆ กรณีในงานวิจัยที่จำเป็นต้องใช้ประชากรเซลล์ทั้งหมดซึ่งอยู่ในระยะของวงจรการเจริญเติบโตเดียวกัน เช่น การศึกษากิจกรรมทางชีวเคมีของเซลล์ได้แก่ การสังเคราะห์สารประกอบโมเลกุลใหญ่ก่อนขบวนการแบ่งเซลล์ซึ่งไม่อาจนำเซลล์เพียงเซลล์เดียวมาทำการวิเคราะห์ได้ดังที่กล่าวมาแล้วในเรื่องการเกิดเซลล์ใหม่ อย่างไร

ก็ตามถ้าเซลล์ทั้งหมดที่เก็บเกี่ยวมาได้อยู่ในระยะของการเจริญเติบโตเดียวกัน ผลการวิเคราะห์เซลล์ทั้งหมดร่วมกันก็อาจถือว่าเป็นของเซลล์เดียวกันได้ มีกลวิธีการหลายอย่างในห้องปฏิบัติการซึ่งสามารถจัดทำให้เซลล์ต่าง ๆ เจริญเติบโตอยู่ในระยะของวงจรการเจริญเติบโตเดียวกัน ซึ่งเซลล์ทั้งหมดจะแบ่งตัวที่เวลาเดียวกันและพร้อมกัน แบบฉบับการเจริญเติบโตเช่นนี้ถูกเรียกว่า synchronous growth

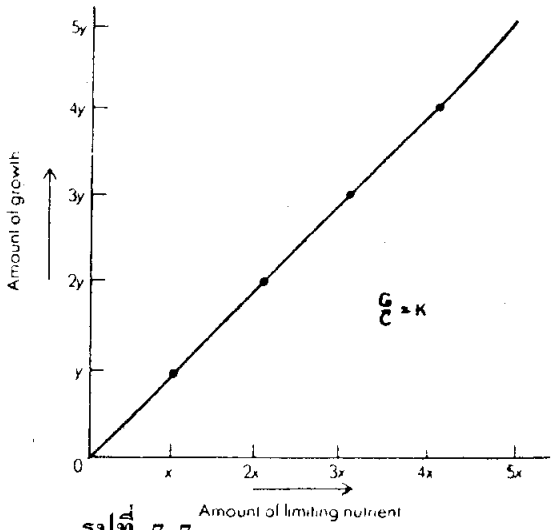
การพร้อมกัน (synchrony) โดยปกติจะเกิดขึ้นได้เพียงไม่กี่ชั่วอายุ ทั้งนี้เนื่องจากในไม่ช้าลูกหลานซึ่งเป็นเซลล์เดี่ยวต่าง ๆ จะเจริญเติบโตอยู่คนละระยะกัน ประชากรเซลล์แบคทีเรียสามารถถูกทำให้พร้อมเพรียงกันได้โดยจัดการสภาพแวดล้อมทางกายภาพหรือส่วนประกอบทางเคมีของอาหาร ตัวอย่างเช่น เซลล์อาจถูกนำมาใส่ในอาหารที่อุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิเหมาะสม (suboptimal temperature) แล้วรักษาสภาพเช่นนี้ไว้ชั่วระยะเวลาหนึ่ง เซลล์จะมีการเมตาโบลิซึ่มอย่างช้า ๆ แต่ไม่แบ่งตัว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้สูงขึ้นเซลล์จะมีการแบ่งตัวพร้อมกัน วิธีการทำให้พร้อมกันอย่างสามัญที่สุดคือ การใช้ประโยชน์จากความจริงที่ว่าเซลล์ซึ่งมีขนาดเล็กที่สุดในระยะ log-phase เป็นเซลล์ซึ่งเพิ่งจะถูกแบ่งออกมาใหม่หรือเกิดใหม่ เมื่อเซลล์เหล่านี้ถูกแยกออกมาโดยการกรองหรือการเหวี่ยงตามความแตกต่างของน้ำหนัก (differential centrifugation) เซลล์เหล่านี้ก็ถือได้ว่าอยู่ในระยะเดียวกันของการเจริญเติบโตและมีการเจริญเติบโตพร้อมกัน แบบฉบับการเจริญเติบโตของประชากรเซลล์ซึ่งพร้อมกันได้แสดงไว้ในรูปที่ 7-6



รูปที่ 7-6 Synchronous growth of bacteria. The steplike growth pattern indicates that all the cells of the population divide at about the same time.

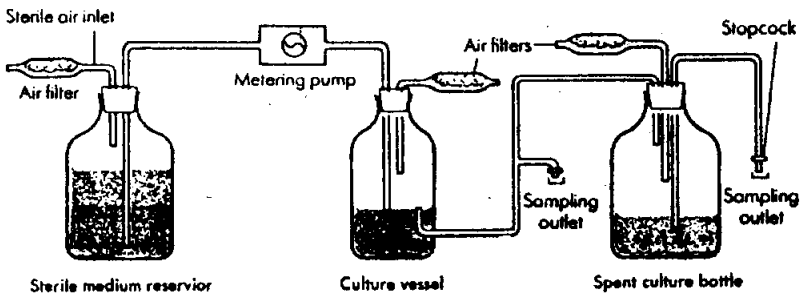
การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (CONTINUOUS CULTURE)

ด้วยเหตุผลหลายอย่างทั้งในด้านการทดลองวิจัยและการอุตสาหกรรมซึ่งจำเป็นต้องรักษาประชากรของแบคทีเรียให้อยู่ในระยะ exponential หรือ log phase ของการเจริญเติบโตตลอดเวลา ภาวะเช่นนี้ถูกเรียกว่าภาวะการเจริญเติบโตที่มั่นคงหรือการเจริญเติบโตอย่างสมดุลย์ (steady-state or balanced growth) เครื่องมือซึ่งใช้ทำให้มีการเจริญเติบโตอย่างสมดุลย์คือ turbidostat และ chemostat หลักการของเครื่องมือทั้งสองคือทำให้ปริมาตรของเชื้อคงที่โดยปล่อยให้อาหารใหม่เข้าไปในภาชนะ ซึ่งใช้การเพาะเลี้ยงด้วยอัตราเดียวกันกับอาหารที่ไขออกจากภาชนะนี้ ระดับการเจริญเติบโตจะถูกควบคุมโดยการรักษาความเข้มข้นของสารอาหารให้คงที่ ปริมาณสารอาหารที่จำเป็นจะถูกปรับให้มีความเข้มข้นต่ำกว่าในอาหารที่ใช้เลี้ยงเพื่อให้มีการเจริญเติบโตสูงสุดในการเพาะเลี้ยงเป็นครั้งคราว (batch culture) เช่นในภาชนะปิดหรือในหลอดเป็นต้น รูปที่ 7-7 แสดงถึงผลของปริมาณสารอาหารซึ่งจำกัดต่อปริมาณเซลล์แบคทีเรียที่เก็บเกี่ยวได้ทั้งหมดในขั้นสุดท้าย จะเห็นได้ว่าสามารถทำให้มีหรือควบคุมปริมาณประชากรเซลล์ได้ในหลายระดับโดยการควบคุมปริมาณความเข้มข้นของสารอาหาร



รูปที่ 7-7 Growth yield, or cell crop, as influenced by a single limiting nutrient. The ratio of growth G to amount or concentration C of limiting nutrient yields a constant *K*.

Turbidostat ถูกควบคุมโดยตาอีเล็กโทรนิค (photoelectric eye) ซึ่งควบคุมความขุ่นของเชื้อและเพิ่มหรือลดอัตราการแลกเปลี่ยนของสารอาหารเพื่อทำให้มีความขุ่นคงที่ รูปที่ 7-8 แสดงส่วนประกอบที่จำเป็นสำหรับเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้ออย่างต่อเนื่อง



รูปที่ 7-8 Apparatus for continuous cultivation of bacteria. The system can be regulated for continuous additions of fresh sterile medium to and removal of spent medium (and culture) from the culture vessel.

การวัดปริมาณการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

คำว่าการเจริญซึ่งมักใช้กันในวิชาแบคทีเรียหมายถึงขนาดของประชากรทั้งหมด การเจริญเติบโตในความหมายนี้อาจตรวจสอบได้ด้วยกลวิธีการหลายอย่างซึ่งตั้งอยู่บนพื้นฐานของการวัดปริมาณอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้

1. จำนวนเซลล์ นับได้โดยตรงด้วยกล้องจุลทรรศน์หรือใช้เครื่องอิเลคโทรนิคนับจำนวนผงธุลีหรือนับทางอ้อมโดยนับจำนวนโคโลนี

2. มวลของเซลล์ ตรวจสอบได้โดยชั่งน้ำหนักโดยตรงหรือการวัดปริมาณหาเซลล์ไนโตรเจนหรือตรวจสอบทางอ้อมโดยวัดความขุ่น

3. กิจกรรมของเซลล์ ตรวจสอบทางอ้อมโดยเชื่อมโยงความสัมพันธ์ของระดับกิจกรรมทางชีวเคมีกับขนาดของประชากรเซลล์

การตรวจสอบจำนวนเซลล์โดยนับด้วยกล้องจุลทรรศน์โดยตรง เซลล์อาจถูกนับได้ในรอยเปื้อน (smear) ที่ย้อมสีไว้บนสไลด์ เช่นวิธีการของ Breed ซึ่งใช้ตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียในน้ำนม โดยการกระจายของเหลวซึ่งมีเซลล์แขวนลอยอยู่ด้วยปริมาณที่ทราบลงในพื้นที่ซึ่งทราบแน่นอนบนกระจกสไลด์ หลังจากทำให้ยึดติดแน่นกับสไลด์และย้อมสีแล้ว จำนวนแบคทีเรียอาจถูกนับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ตัวอย่างเช่น ของเหลวปริมาตร 0.01

มิลลิเมตรสามารถกระจายได้บนพื้นที่ 1.0 ตารางเซ็นติเมตร เนื่องจากพื้นที่ 1 ตารางเซ็นติเมตรไม่อาจถูกส่องให้มองเห็นได้ทั้งหมดในเวลาเดียวกัน ดังนั้นจึงต้องนับจำนวนเซลล์เฉพาะในพื้นที่ซึ่งมองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ไปในเนื้อที่ 1 ตารางเซ็นติเมตรนั้นโดยเลือกสักสองสามพื้นที่อย่างสะเปะสะปะ ถ้าทราบเส้นผ่าศูนย์กลางของพื้นที่ซึ่งมองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์โดยการวัดด้วย stage micrometer ก็จะทำให้สามารถคำนวนหาเนื้อที่ได้จากสูตร $A = \pi r^2$ ซึ่ง r คือรัศมีของวงกลม ดังนั้นเมื่อนำจำนวนพื้นที่ซึ่งมองเห็นได้จากกล้องจุลทรรศน์ในเนื้อที่ 1 ตารางเซ็นติเมตรคูณด้วยจำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อหนึ่งพื้นที่ซึ่งมองเห็นและคูณด้วย 100 (เนื่องจากใช้ของเหลวปริมาตรเพียง 0.01 มิลลิลิตร) ก็จะเท่ากับจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร วิธีการนี้มีข้อวิพากษ์วิจารณ์คือ การกระจายเชื้ออาจไม่สม่ำเสมอและมีวิธีการที่ดีกว่า

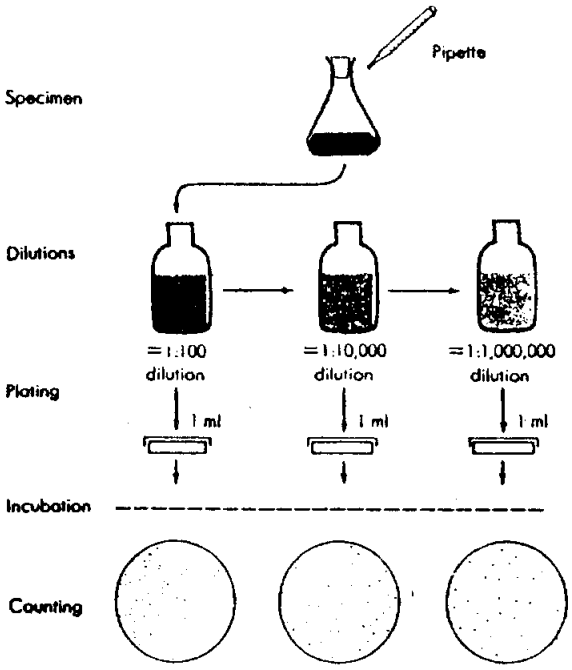
แบคทีเรียอาจถูกนับได้ง่ายและแน่นอนด้วย Petroff-Mausser counting chamber ซึ่งเป็นกระจกสไลด์พิเศษมีตารางสี่เหลี่ยมจตุรัสพื้นที่ 1/400 ตารางมิลลิเมตร ปิดทับด้วยกระจกบาง (cover slip) ทำให้มีช่องเหนือพื้นที่หนา 1/50 มิลลิเมตร ดังนั้นปริมาตรบนพื้นที่สี่เหลี่ยมจตุรัสจึงเท่ากับ 1/20,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร หรือ 1/20,000,000 ลูกบาศก์เซ็นติเมตร แบคทีเรียแขวนลอยซึ่งไม่ได้ย้อมสีในช่องตารางบนสไลด์อาจถูกนับได้ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ phase-contrast ตัวอย่างเช่น ถ้านับเซลล์แบคทีเรียในแต่ละช่องพื้นที่ตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสได้ 5 เซลล์โดยเฉลี่ยจะได้เซลล์แบคทีเรียทั้งหมด 10^8 เซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร

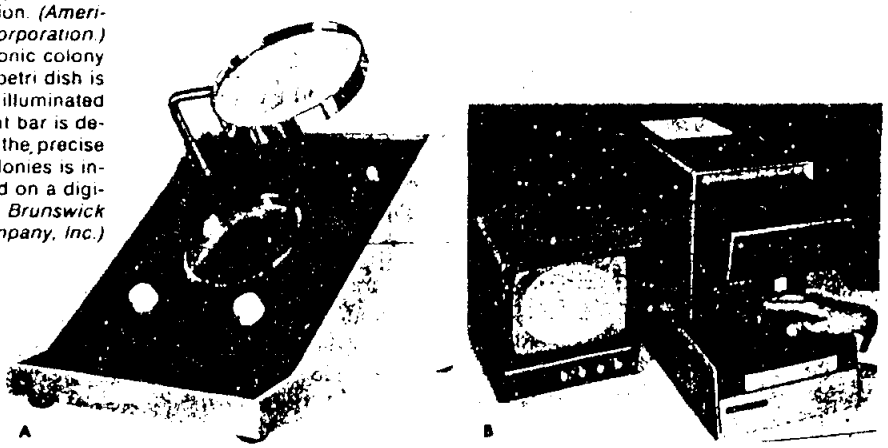
วิธีการนับโดยตรงทำได้ง่ายและรวดเร็ว ใช้เครื่องมือน้อยและสามารถสังเกตเห็นสัณฐานวิทยาของแบคทีเรียได้ในขณะนับ ของเหลวซึ่งมีเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยอยู่อย่างหนาแน่นอาจถูกทำให้เจือจางอย่างเหมาะสมแล้วนับจำนวนเซลล์ แต่ของเหลวซึ่งมีเซลล์แบคทีเรียแขวนลอยอยู่อย่างเจือจางมากไม่อาจถูกนับได้ด้วยวิธีการนี้ ข้อเสียของของวิธีการนี้ที่เด่นชัดคือไม่อาจตรวจสอบได้ว่าเซลล์ซึ่งถูกนับนั้นยังมีชีวิตอยู่หรือไม่ การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตจะต้องใช้กลวิธีซึ่งทำให้เซลล์ขยายพันธุ์

การตรวจสอบจำนวนเซลล์ซึ่งมีชีวิตโดยนับในจานเลี้ยงเชื้อ (PLATE COUNT) วิธีการนี้แหล่งของเชื้อ (inoculum) ซึ่งวัดปริมาณแน่นอนถูกใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อ (petri dish or plate) แล้วเติมวุ้นอาหารและผสมให้เข้ากันดีโดยแกว่งจานเลี้ยงเชื้อ เมื่ออาหารแข็งตัวแล้วจุลินทรีย์จะถูกขังอยู่ในวุ้น จุลินทรีย์ซึ่งมีชีวิตแต่ละเซลล์จะเจริญเติบโตเป็นกลุ่มเซลล์เรียกว่า

โคโลนี (colony) เห็นได้ด้วยตา จุลินทรีย์เซลล์หนึ่งจะเจริญเติบโตเป็นหนึ่งโอโลนี ดังนั้น จำนวนโคโลนีที่นับได้ในจานเลี้ยงเชื้อจึงหมายถึงจำนวนจุลินทรีย์ในแหล่งของเชื้อ โดยทั่วไป ตัวอย่างเริ่มต้นมักถูกทำให้เจือจางจนกระทั่งมีจำนวนโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้ออยู่ระหว่าง 30 ถึง 300 โคโลนีซึ่งจำนวนในช่วงนี้สามารถนับได้อย่างแม่นยำและมีการเจริญเติบโตรบกวนกันน้อยมาก (รูปที่ 7-9) โคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปมักถูกนับบนจอส่องแสงด้วยแว่นขยายขนาดใหญ่ กลวิธีทางอีเล็กโทรนิคต่าง ๆ ได้ถูกปรับปรุงเพื่อใช้ในการนับโคโลนี (รูปที่ 7-9)

รูปที่ 7-9 The plate-count technique in which the sample is diluted quantitatively and measured quantities of the dilutions are cultured in petri dishes.



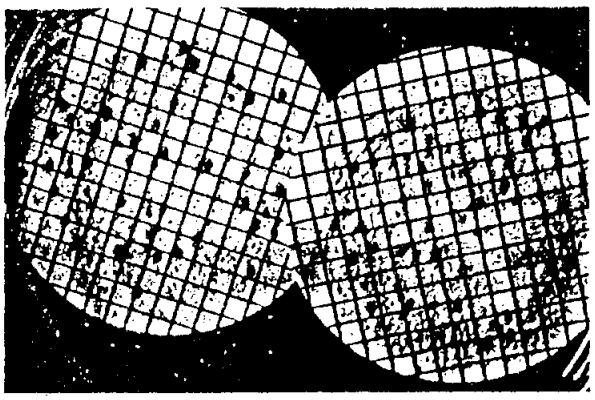


รูปที่ 7-10 Bacterial colony counters. (A) Quebec colony counter. A petri dish fits into the recess in the platform. The petri dish is illuminated from beneath while the lens provides × 1.5 magnification. *(American Optical Corporation.)* (B) An electronic colony counter. The petri dish is placed on the illuminated stage, the count bar is depressed, and the precise number of colonies is instantly displayed on a digital readout. *(New Brunswick Scientific Company, Inc.)*

กลวิธีการนับจำนวนด้วยจานเลี้ยงเชื้อตั้งอยู่บนรากฐานที่ว่าแต่ละจุลินทรีย์ซึ่งมีชีวิตจะเจริญเติบโตเป็นหนึ่งโคโลนี นอกจากนี้ยังถือว่าแบคทีเรียซึ่งแขวนลอยในของเหลวมีความเป็นเนื้อเดียวกันโดยตลอดไม่มีการจับรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน แต่ที่เด่นชัดคือเฉพาะแบคทีเรียซึ่งสามารถเจริญเติบโตในอาหารและภายใต้สภาพการบ่มที่ใช้เท่านั้นจึงจะถูกนับได้ สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้มีความสำคัญซึ่งจะต้องคำนึงถึงในการนับจำนวนแบคทีเรียด้วยจานเลี้ยงเชื้อ ถ้าเซลล์มีแนวโน้มที่จะรวมตัวกันเป็นกลุ่มก้อน เช่น พวกค็อกไซที่รวมกันอยู่เป็นกลุ่ม (staphylococci) หรือค็อกไซที่ต่อกันเป็นลูกโซ่ (streptococci) จำนวนโคโลนีที่นับได้อาจน้อยกว่าจำนวนเซลล์ที่แท้จริงทั้งนี้เนื่องจากแต่ละกลุ่มก้อนของเซลล์จะเจริญเติบโตเป็นเพียงหนึ่งโคโลนีเท่านั้น ด้วยเหตุผลนี้จำนวนที่นับได้อาจรายงานเป็นจำนวนหน่วยซึ่งทำให้เกิดโคโลนี (cfu; colony-forming units) ต่อหนึ่งมิลลิลิตรมากกว่าจำนวนเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตร กลวิธีการนับจำนวนด้วยจานเลี้ยงเชื้อถูกใช้ในงานประจำและให้ผลเป็นที่พอใจการประเมินประชากรแบคทีเรียในน้ำนม น้ำ อาหาร และในวัตถุต่าง ๆ กลวิธีการนี้จัดทำได้ง่ายและนำมาใช้วัดประชากรแบคทีเรียได้หลายขนาด มีความได้เปรียบในแง่ของความละเอียดอ่อนซึ่งจำนวนจุลินทรีย์เพียงเล็กน้อยก็อาจถูกนับได้โดยทางทฤษฎีถ้าวัตถุตัวอย่างมีแบคทีเรียจำนวนน้อยเพียงแค่หนึ่งเซลล์ต่อหนึ่งมิลลิลิตรก็ควรมีโคโลนีเกิดขึ้นหนึ่งโคโลนีในจานเลี้ยงเชื้อซึ่งมีวัตถุตัวอย่างหนึ่งมิลลิลิตร

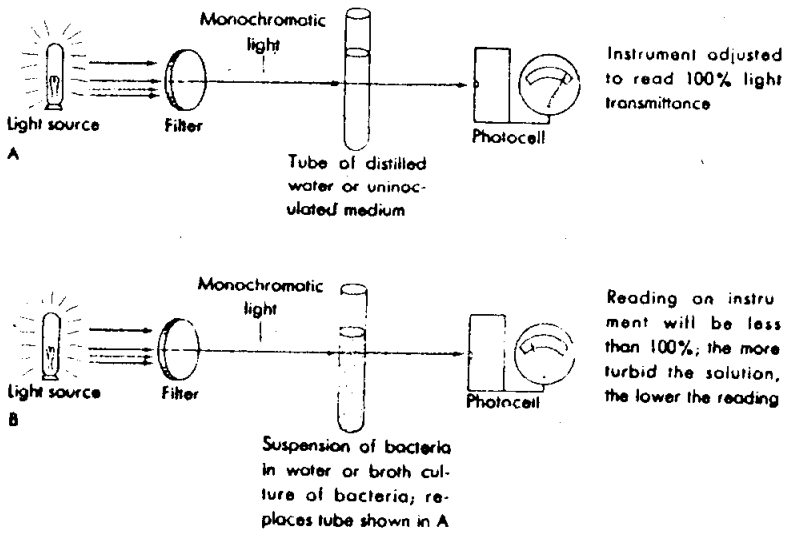
การนับจำนวนโดยใช้แผ่นกรอง (MEMBRANE-FILTER COUNT) กลวิธีการซึ่งมีประโยชน์นี้ถูกปรับปรุงขึ้นโดยใช้แผ่นกรอง แผ่นกรองซึ่งทราบขนาดของรูโตโดยสม่ำเสมอและสามารถดักจับจุลินทรีย์ได้นอกจากนำมาใช้ในการกำจัดจุลินทรีย์ออกจากของเหลวแล้ว ยังนำมาใช้ในการนับจำนวนจุลินทรีย์ได้อีกด้วย กลวิธีการนี้มีประโยชน์อย่างยิ่งโดยเฉพาะในการตรวจสอบจำนวนแบคทีเรียในตัวอย่างปริมาณมากซึ่งมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เพียงเล็กน้อย เช่น ในน้ำหรือในอากาศโดยรวบรวมผ่านแผ่นกรอง แผ่นกรองซึ่งมีแบคทีเรียตกค้างอยู่จะถูกนำไปวางทาบบนแผ่นซับอาหารหรือวุ้นอาหารในจานเลี้ยงเชื้อ อาหารพิเศษและสีย้อมอาจถูกใช้เพื่อทำให้สามารถตรวจสอบชนิดของจุลินทรีย์ได้ง่ายกว่าการนับจำนวนในจานเลี้ยงเชื้ออย่างธรรมดา หลังจากการบ่มจุลินทรีย์จะเจริญเติบโตเป็นโคโลนีอยู่บนผิวของแผ่นกรอง ดังรูปที่ 7-11

รูปที่ 7-11 Bacterial colonies as they appear on the surface of the Millipore filter membrane. *(Millipore Filter Corporation.)*



การตรวจสอบความหนาแน่นของเซลล์โดยวัดความขุ่น แบคทีเรียซึ่งแขวนลอยอยู่ในของเหลวจะมีการดูดซับและกระจายแสงที่ผ่านไปได้เช่นเดียวกันกับหมอกในอากาศ ถ้าเชื้อแบคทีเรียในของเหลวมีความหนาแน่นมากกว่า 10^7 ถึง 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจะทำให้มองเห็นความขุ่นได้ด้วยตา ด้วยความจริงที่ว่าปริมาณแสงที่ถูกดูดซับและกระจายออกไปเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์และระยะทางที่แสงผ่านไป เซลล์ขนาดใหญ่รบกวนแสงได้ดีกว่าเซลล์ขนาดเล็ก เครื่องมือที่ละเอียดอ่อนเช่น spectrophotometer หรือ colorimeter สามารถนำมาใช้ในการวัดความขุ่นของเซลล์ในของเหลวได้ดังรูปที่ 7-12 ของเหลวซึ่งมีเซลล์แขวนลอยอยู่ถูกใส่ลงในช่องหรือหลอดใส (cuvette) ที่ทราบขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง

แล้ววัดอัตราส่วนความเข้มของแสงที่ผ่านออกมา (I) กับความเข้มของแสงที่ผ่านออกจากของเหลวชนิดเดียวกันแต่ไม่มีเซลล์อยู่ (Io) ความทึบหรือหนาแน่นทางสายตา (optical density) ของเชื้อคือ log (Io/I) ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นของเซลล์ วิธีการเช่นนี้เป็นวิธีการที่ง่ายและรวดเร็วเหมาะสำหรับใช้ติดตามการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ด้วยเครื่องมืออย่างดีเกี่ยวกับแสงและสายตาในปัจจุบันอาจเป็นวิธีการวัดการเจริญเติบโตเพื่อการศึกษาทางสรีรวิทยาได้อย่างแม่นยำที่สุด อย่างไรก็ตามเชื้อที่นำมาวัดจะต้องมีความหนาแน่นพอสมควร เพื่อทำให้เกิดความขุ่น และในบางครั้งอาจไม่สามารถวัดเชื้อซึ่งมีสีเข้มหรือมีสารอื่นซึ่งไม่ใช่แบคทีเรียปนอยู่อย่างหนาแน่นได้ อย่างไรก็ตามจะต้องนึกไว้เสมอว่าเซลล์ทั้งที่ตายแล้วและมีชีวิตอยู่สามารถทำให้เกิดความขุ่นขึ้นได้



รูปที่ 7-12 Photoelectric colorimeter is used for measuring bacterial populations. Schematic illustration of (A) adjustment of instrument; (B) determination of turbidity (or growth) of bacterial suspension.

การตรวจสอบความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดปริมาณไนโตรเจน องค์ประกอบส่วนใหญ่ของเซลล์คือโปรตีนและเนื่องจากไนโตรเจนเป็นลักษณะประจำส่วนหนึ่งของโปรตีน ดังนั้นจึงสามารถวัดประชากรแบคทีเรียหรือเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ในรูปของไนโตรเจน แบคทีเรียมีไนโตรเจนอยู่ประมาณโดยเฉลี่ย 14 เปอร์เซนต์โดยน้ำหนักแห้ง แต่ตัวเลขนี้อาจเปลี่ยนแปลงได้เนื่องจากภาวะในการเพาะเลี้ยงหรือความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ การวัดความเจริญเติบโตด้วยกลวิธีนี้ในขั้นแรกเซลล์จะต้องถูกเก็บเกี่ยวและล้างให้สะอาด ปราศจากอาหาร

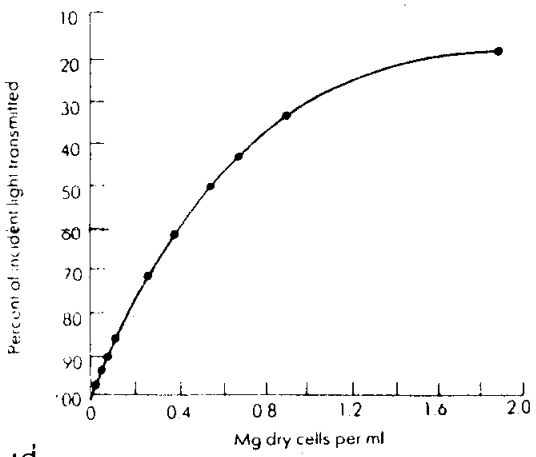
แล้วทำการวิเคราะห์ทางเคมีหาปริมาณธาตุไนโตรเจน การตรวจสอบหาปริมาณธาตุไนโตรเจนของแบคทีเรียต้องใช้แรงงานมากและใช้ได้กับตัวอย่างซึ่งปราศจากแหล่งของธาตุไนโตรเจนอื่น นอกจากนี้วิธีการยังใช้ได้กับประชากรซึ่งมีความเข้มข้นมากเท่านั้น ดังนั้นวิธีการนี้จึงมักใช้ในงานวิจัยโดยเฉพาะ

การตรวจสอบหาน้ำหนักแห้งของเซลล์ เป็นวิธีการซึ่งใกล้เข้าหาการตรวจสอบมวลของเซลล์โดยตรงและในบางครั้งอาจเป็นวิธีการซึ่งให้ผลดีและไว้ใจได้มากที่สุดอย่างไรก็ตาม วิธีการนี้สามารถใช้ได้กับเซลล์แขวนลอยซึ่งหนาแน่นมากเท่านั้น และเซลล์จะต้องถูกล้างให้สะอาดปราศจากสารอื่น กลวิธีการนี้มักใช้ในงานวิจัยเป็นหลักไม่นิยมใช้เพื่องานอื่น

การตรวจสอบมวลของเซลล์โดยวัดปริมาณการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีที่เกิดขึ้นหรือมีอยู่ในอาหาร เพื่อเป็นตัวอย่างของกลวิธีนี้ได้แก่แบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดกรดจากการหมักน้ำตาลกลูโคสโดยเหมาเอาว่าปริมาณของกรดที่เกิดขึ้นภายใต้ภาวะอันหนึ่งตลอดระยะเวลาที่กำหนดให้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงต่อประชากรของแบคทีเรีย เป็นที่ยอมรับกันว่า การวัดปริมาณกรดหรือผลิตผลขั้นสุดท้ายอื่นใดเป็นวิธีการวัดการเจริญเติบโตอย่างอ้อมมากและใช้ได้เฉพาะในกรณีพิเศษเท่านั้น

การวัดความขุ่นแล้วแสดงออกเป็นความเจริญเติบโตโดยตรง มีหลายกรณีที่จำเป็นต้องเชื่อมโยงความสัมพันธ์ในการวัดความเจริญเติบโตซึ่งกระทำโดยวิธีอ้อม เช่น การวัดความขุ่นกับวิธีการวัดโดยตรง เช่น น้ำหนักของเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ ในกรณีนี้อาจทำได้ง่ายโดยวัดแบคทีเรียแขวนลอยในของเหลวทั้งสองวิธีพร้อมกันแล้วจัดตั้งความสัมพันธ์ระหว่างค่าที่ได้ ดังตัวอย่างต่อไปนี้ นำของเหลวตัวอย่างจำนวนเล็กน้อยซึ่งมีเซลล์แขวนลอยอยู่มาทำให้แห้งแล้วชั่งน้ำหนักเซลล์ต่อมิลลิลิตรของของเหลวที่นำมาตรวจสอบ และนำเซลล์แขวนลอยในของเหลวตัวอย่างเดียวกันที่ความเจือจางต่าง ๆ มาวัดค่าความขุ่น เนื่องจากน้ำหนักเซลล์ต่อมิลลิลิตรของตัวอย่างเริ่มต้นถูกตรวจสอบจนทราบค่าแล้วทำให้สามารถคำนวนหาน้ำหนักของเซลล์ที่ความเจือจางต่าง ๆ ซึ่งนำมาวัดค่าความขุ่นได้ ดังนั้นจึงทำให้ได้ข้อมูลเป็นตัวเลขสองชุดซึ่งสามารถนำมาเขียนเป็นเส้นกราฟระหว่างน้ำหนักเซลล์กับค่าความขุ่นได้ ดังในรูปที่ 7-13 ซึ่งเรียกว่าเส้นกราฟมาตรฐาน (standard curver) เพื่อจุดประสงค์ที่เหมาะสมเฉพาะในช่วงที่ความเข้มต่ำเท่านั้นจึงถูกใช้ในการเปรียบเทียบ เนื่องจากมีความสัมพันธ์กันอย่างตรงไปตรงมาจึงได้กราฟเป็นเส้นตรง เมื่อได้จัดทำกราฟมาตรฐานแล้วเมื่อใดที่วัดความขุ่นของแบคทีเรียแขวนลอยก็อาจเปลี่ยนให้เป็นน้ำหนักของแบคทีเรียได้

ทำนองเดียวกันเมื่อได้จัดเตรียมกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ในการวัดโดยตรงแบบอื่นเช่น จำนวนแบคทีเรียหรือไนโตรเจนของแบคทีเรียกับความขุ่นก็อาจเปลี่ยนค่าความขุ่นเพื่อแสดงถึงการเจริญเติบโตโดยตรงนั้นได้ อย่างไรก็ตามวิธีการวัดค่าความขุ่นอาจใช้ได้อย่างมีขอบเขตจำกัดดังที่กล่าวมาแล้ว



รูปที่ 7-13 Turbidity of a culture serves as an indirect measure of the dry weight of bacterial cells in the culture, as shown in this typical curve.

การเลือกใช้วิธีการวัดความเจริญเติบโต

ตารางที่ 7-2 ได้สรุปการวัดความเจริญเติบโตของแบคทีเรียด้วยวิธีการต่าง ๆ ดังกล่าวข้างต้น แต่ละวิธีก็มีข้อดีและข้อจำกัดต่าง ๆ ไม่มีวิธีการใดเลยซึ่งอาจใช้ได้ในทุกกรณี การเลือกใช้วิธีการใดอาจเลือกได้ภายหลังจากได้คำนึงถึงปัญหาต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องแล้วเท่านั้น การนับจำนวนด้วยจานเลี้ยงเชื้อมักใช้กันอย่างกว้างขวางในงานประจำทางแบคทีเรียวิทยา ซึ่งเหมาะสมทั้งในด้านหลักการและการปฏิบัติ อย่างไรก็ตามต้องนึกไว้เสมอว่าการนับจำนวนด้วยจานเลี้ยงเชื้อหรือการนับโคโลนีคือการนับเฉพาะประชากรที่มีชีวิตเท่านั้น นอกจากนี้ยังมีความคลาดเคลื่อนในระหว่างวิธีการวัดซึ่งแตกต่างกัน ตัวอย่างเช่น การนับจำนวนจุลินทรีย์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ในระยะ stationary phase เป็นการนับจำนวนทุกเซลล์ทั้งที่มีชีวิตและไม่มีชีวิต ส่วนการนับจำนวนด้วยจานเลี้ยงเชื้อเป็นการนับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น

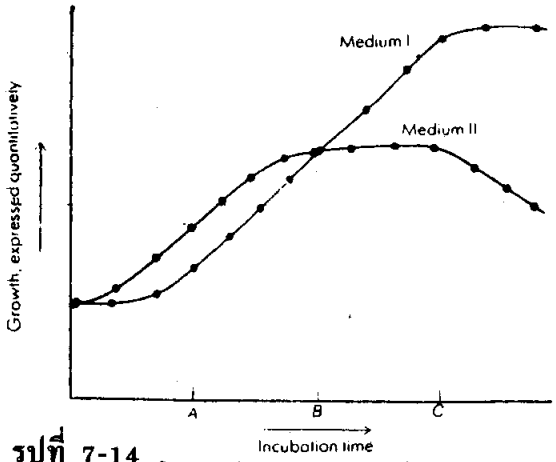
ตารางที่ 7-2

Summary of Methods for Measuring Bacterial Growth

METHOD	SOME APPLICATIONS
Microscopic count	Enumeration of bacteria in milk and vaccines
Plate count	Enumeration of bacteria in milk, water, foods, soil, cultures, etc.
Memberane or molecular filter	Same as plate count
Turbidimetric measurement	Microbiological assays, estimation of cell crop in broth, cultures, or aqueous suspensions
Nitrogen determination	Measurement of cell crop from heavy culture suspensions to be used for research in metabolism
Weight determination	Same as for nitrogen determination
Measurement of biochemical activity	Microbiological assays

ความสำคัญของการวัดปริมาณการเจริญเติบโต

ก่อนที่จะสามารถประเมินค่าหรือตีราคาการเจริญเติบโตของแบคทีเรียซึ่งสนองตอบต่ออาหารหรือสภาวะแวดล้อมที่แตกต่างกันจะต้องแสดงความหมายของการเจริญเติบโตในลักษณะของปริมาณ คำว่าการเจริญเติบโตในวิชาจุลชีววิทยาถูกใช้ได้หลายวิถีทางตัวอย่าง เช่น ที่ภาวะอันหนึ่งอาจถูกจัดว่าดีเนื่องจากแบคทีเรียเจริญเติบโตอย่างรวดเร็ว แต่เซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้ในขั้นสุดท้ายทั้งหมดอาจไม่มากเท่ากับที่อีกภาวะหนึ่งซึ่งการเจริญเติบโตค่อยดำเนินไปอย่างช้า ๆ แต่ต่อเนื่องเป็นระยะเวลาที่ยาวนานมาก สภาพเช่นนี้ได้แสดงไว้ในรูปที่ 7-14 ซึ่งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียสายพันธุ์เดียวกันได้ถูกเปรียบเทียบในอาหารสองชนิดที่แตกต่างกันและแบคทีเรียสามารถเจริญเติบโตได้ในอาหารทั้งสองชนิด ถ้าวัดการเจริญเติบโตที่ระยะเวลา A ก็อาจสรุปได้ว่าการเจริญเติบโตในอาหารชนิดที่สองนั้นดีที่สุด แต่ถ้าวัดที่ระยะเวลา B การเจริญเติบโตจะเท่ากันในอาหารทั้งสองชนิดและที่ระยะเวลา C การเจริญเติบโตในอาหารชนิดที่หนึ่งจะดีกว่า ดังนั้นถ้าสนใจต้องการให้จุลินทรีย์เจริญเติบโตอย่างรวดเร็วในระยะแรกจึงควรเลือกใช้อาหารชนิดที่สองแต่ถ้าต้องการเซลล์ที่เก็บเกี่ยวได้เป็นจำนวนมากก็ควรเลือกใช้อาหารชนิดที่หนึ่งไม่ว่าในกรณีใดก็ตามจะต้องทราบการเจริญเติบโตในแง่ของปริมาณเพื่อทำให้เลือกได้อย่างถูกต้อง



รูปที่ 7-14 Quantitative measurement of growth is significant for interpretation of various growth responses. Hypothetical growth response of same bacterium in media of two different compositions. Compare the cell crops, or amount of growth, at times *A*, *B*, and *C*.