# บทที่ 8
# เชื้อบริสุทธิ์และลักษณะของเชื้อ

เมื่อแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์เจริญเติบโตในอาหารซึ่งจัดเตรียมขึ้นในห้องปฏิบัติการ จะถูกเรียกว่าเชื้อ (culture) สายพันธุ์ของแบคทีเรียที่แตกต่างกันซึ่งกำลังเจริญเติบโตบนอาหารชนิดเดียวกันอาจแสดงความแตกต่างกันเป็นอย่างมาก ความรู้เกี่ยวกับการปรากฏเช่นนี้หรือลักษณะต่าง ๆ ของเชื้อ (cultural characteristic) มีประโยชน์มากเพื่อการจดจำแบคทีเรียประเภทต่าง ๆ และอาจถูกใช้เป็นเครื่องมือในการชันสูตรสายพันธุ์ได้อีกด้วย อย่างไรก็ตาม ก่อนที่จะทำการตรวจสอบลักษณะของเชื้อหรือคุณสมบัติอื่น ๆ ของเชื้อสายพันธุ์แบคทีเรียหรือจุลินทรีย์จะต้องอยู่ในสภาพที่เป็นเชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เสียก่อน ในบทนี้จะได้บรรยายถึงการคัดแยก (isolation) แบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์และการเจริญเติบโตที่ปรากฏบนอาหารต่าง ๆ

**ธรรมชาติของประชากรจุลินทรีย์**

ประชากรของจุลินทรีย์ในสิ่งแวดล้อมของมนุษย์นั้นกว้างใหญ่และซับซ้อนมากสายพันธุ์ของจุลินทรีย์ซึ่งแตกต่างกันมากมายอาจมีอุปนิสัยปกติชอบอาศัยอยู่ในส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ในช่องปาก ในทางเดินอาหาร และบนผิวหนังด้วยจำนวนที่มากมายมหาศาล ตัวอย่าง เช่น การจามครั้งหนึ่งอาจกระจายแบคทีเรียออกมาได้ตั้งแต่ 10,000 ถึง 100,000 เซลล์ อุจจาระหนึ่งกรัมอาจมีแบคทีเรียหลายล้านเซลล์ ในสิ่งแวดล้อมของมนุษย์เช่น ดิน น้ำ และอากาศประกอบด้วยแบคทีเรียและจุลินทรีย์อื่นมากมาย ดินสวนที่อุดมสมบูรณ์หนึ่ง

กรัมอาจมีจุลินทรีย์อยู่หลายพันล้านและประกอบด้วยหลายสายพันธุ์ของแบคทีเรีย ฟังไจ (fungi) สาหร่าย และโปรโตซัว (protozoa) การศึกษาจุลินทรีย์ในแหล่งที่อยู่เช่นนี้จะต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับจุลินทรีย์ต่าง ๆ ที่ปรากฏโดยเฉพาะและต้องการกลวิธีต่าง ๆ เพื่อทำให้ประชากรซึ่งรวมกันอยู่อย่างหนาแน่นซับซ้อนหรือเป็นเชื้อผสม (mixed culture) แยกออกจากกันเป็นสายพันธุ์เดี่ยวเช่นเชื้อบริสุทธิ์ เชื้อบริสุทธิ์ประกอบด้วยประชากรเซลล์ทั้งหมดซึ่งเกิดขึ้นจากเซลล์พ่อแม่เซลล์เดียวกัน

## เชื้อบริสุทธิ์

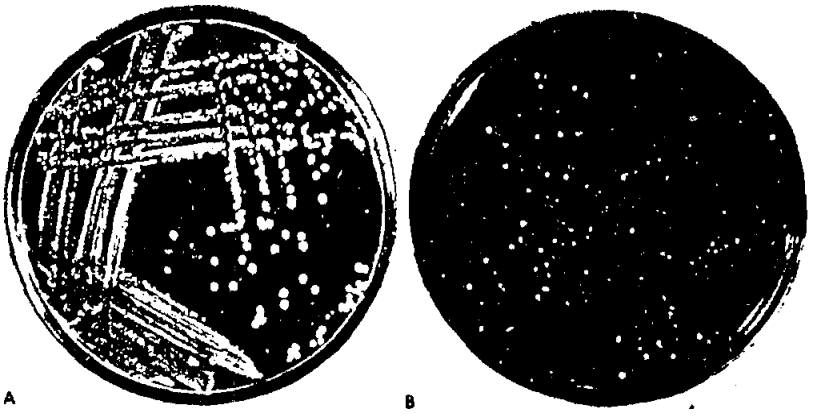
เชื้อบริสุทธิ์ (pure culture) เป็นภาวะซึ่งมนุษย์จัดทำขึ้นเพื่อการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์อื่นและเป็นภาวะซึ่งไม่แท้จริงสำหรับจุลินทรีย์โดยการจัดทำขึ้นในห้องปฏิบัติการ การตรวจสอบลักษณะของจุลินทรีย์เฉพาะสายพันธุ์แม้เพียงเล็กน้อยก็มีกฎข้อบังคับว่าจุลินทรีย์จะต้องถูกคัดแยกและเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์ มีกลวิธีหลายอย่างซึ่งใช้ในการคัดแยกเชื้อจุลินทรีย์สายพันธุ์ต่าง ๆ ในวัตถุตัวอย่างธรรมชาติและเพาะเลี้ยงเป็นเชื้อบริสุทธิ์

## วิธีการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์

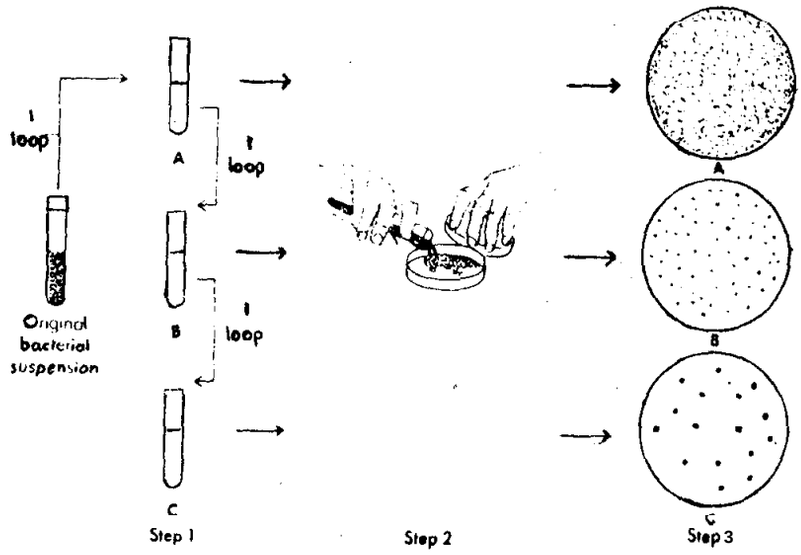
**กลวิธีการขีดและกระจายในจานเลี้ยงเชื้อ (Streak-plate and Spread-plate Techniques)** โดยการใช้ห่วงถ่ายเชื้อ (loop) ตัวอย่างส่วนหนึ่งซึ่งมีเชื้อแบคทีเรียจะถูกแต้มบนผิววุ้นอาหารแล้วขีดลากหรือกระจายไปบนผิววุ้น การกระจายในจานเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปมักใช้แท่งแก้วงอปราศจากเชื้อ การจัดการเช่นนี้ทำให้แบคทีเรียเจือจางออกไปบนผิววุ้นจนกระทั่งแบคทีเรียเดี่ยวแยกห่างออกจากกัน รูปที่ 8-1 แสดงถึงแผ่นวุ้นอาหารซึ่งถูกขีดด้วยกลวิธีต่างกันเพื่อทำให้เกิดโคโลนีแยกห่างกัน เมื่อทำการขีดเชื้ออย่างเหมาะสมแล้วเซลล์ของแบคทีเรียจะแยกห่างออกจากกันอย่างเพียงพอในบางพื้นที่ของจานเลี้ยงเชื้อจนแน่ใจได้ว่าโคโลนีที่เกิดขึ้นเป็นโคโลนีจากหนึ่งเซลล์โดยไม่รวมปนกับการเจริญเติบโตจากเซลล์ แต่ละโคโลนีที่อยู่แยกกันอาจถือได้ว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์ สำหรับสายพันธุ์ซึ่งมีเซลล์เกาะกลุ่มกันเป็นหมู่ เช่น staphylococci และ streptococci โคโลนีที่เกิดขึ้นมักเป็นโคโลนีซึ่งเกิดจากกลุ่มแต่ก็เป็นกลุ่มเซลล์ที่เกิดจากเซลล์เดียวกันจึงถือได้ว่าเป็นเชื้อบริสุทธิ์ ส่วนของโคโลนีหนึ่งเมื่อถูกถ่ายลงสู่หลอดอาหารก็จะกลายเป็นเชื้อบริสุทธิ์ หลังจากการบ่มอย่างเหมาะสมแล้วควรตรวจสอบการเจริญเติบโตจากแต่ละเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อพิสูจน์ความเป็นเชื้อบริสุทธิ์

กลวิธีการขีดเชื้อและการกระจายเชื้อในจานเพาะเลี้ยงเป็นกลวิธีซึ่งง่ายและสะดวก ใช้เครื่องมือน้อย จึงถูกใช้งานประจำในการคัดแยกแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ มีข้อจำกัดอยู่อย่างหนึ่งคือตัวอย่างที่นำมากระจายบนผิววุ้นอาหารจะต้องใช้ในปริมาณเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

**รูปที่ 8-1** . Isolated colonies on agar plates. (A) Streak-plate culture showing areas of isolated colonial growth. The lines of growth reflect how the plate was streaked (inoculated). (B) Colonies of two different bacterial species on the same plate. The large dark colonies are *Serratia marcescens*, which has a brick-red pigment, and the smaller light colonies are *Sarcina lutea*, which has a lemon-yellow pigment. *(Naval Biological Laboratory.)*




***กลวิธีการเทลงสู่จานเลี้ยงเชื้อ*** **(Pour-plate Technique)** *หลักการของกลวิธีนี้คือ* การทำให้เจือจางหรือบางลงของตัวอย่างในหลอดวุ้นอาหารเหลวซึ่งเย็นตัวแล้วแต่ยังไม่แข็ง การทำให้เจือจางลงจำเป็นต้องใช้หลอดวุ้นอาหารหลายหลอดเพื่อทำให้ได้โคโลนีซึ่งแยกห่างกันดี ทั้งนี้เนื่องจากขนาดของประชากรแบคทีเรียซึ่งมีอยู่ในวัตถุตัวอย่างเริ่มต้นนั้นยังไม่อาจทราบล่วงหน้าได้ วุ้นอาหารถูกรักษาให้มีสภาพเป็นของเหลวอยู่ตลอดเวลาที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เพื่อปล่อยให้แหล่งของเชื้อ (inoculum) กระจายไปทั่วในวุ้นอาหาร อาหารซึ่งมีเชื้อถูกเทลงสู่จานเลี้ยงเชื้อแล้วปล่อยให้แข็งตัวและบ่มจุลินทรีย์บางจำนวนก็ถูกขังอยู่ใต้ผิววุ้นในขณะที่แข็งตัว ดังนั้นจึงทำให้เกิดโคโลนีทั้งบนผิวและใต้ผิววุ้น ลำดับของแผ่นวุ้นในจานเลี้ยงเชื้อจะมีจำนวนโคโลนีลดลงเป็นลำดับทั้งนี้เนื่องจากมีการทำให้เจือจางก่อนการเทลงสู่จานเลี้ยงเชื้อ ดังในรูปที่ 8-2 กลวิธีการนี้อาจใช้ได้ทั้งในการตรวจสอบปริมาณและคุณภาพ ถ้าต้องการตรวจสอบปริมาณก็ถ่ายเชื้อโดยทราบปริมาณและอัตราส่วนความเจือจางที่แน่นอน จะทำให้สามารถนับจำนวนแบคทีเรียที่ปรากฏอยู่ในวัตถุตัวอย่างได้เช่นเดียวกันกับการคัดแยกเชื้อบริสุทธิ์

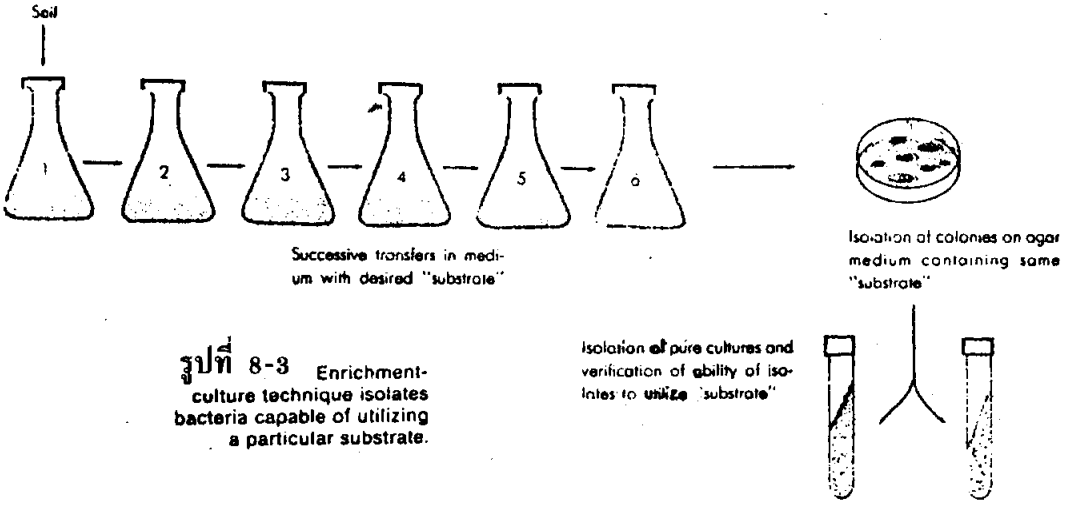



**รูปที่** 8-2 Pour-plate technique is used for pure-Culture isolation of bacteria Step 1: One loopful of original suspension is transferred to tube A (liquid cooled agar medium) Tube A is rolled between the *hands* to *effect* thorough mixing of inoculum Similar transfers are made from A to B and B to C. Step 2 Contents of each tube are poured into separate petri dishes. Step 3 After incubation, plates are examined for *the one* which contains isolated colonies From this plate, pure *Cultures* of bacteria can be isolated by transferring a portion of a colony to a tube of sterile medium

กลวิธีการขีดและการกระจายหรือเทลงสู่จานเลี้ยงเชื้ออาจทำให้มีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้นได้ในการคัดแยกเชื้อแบคทีเรียเฉพาะชนิดโดยใช้อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อพวก selective หรือ differential media นอกจากนี้ยังอาจจัดการเกี่ยวกับวัตถุตัวอย่างล่วงหน้าก่อนการใส่เชื้อลงสู่จานเพาะเลี้ยงเพื่อกำจัดแบคทีเรียพวกอื่นที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างเช่น ในกรณีที่ต้องการคัดแยกแบคทีเรียเฉพาะพวกที่สร้างสปอร์ได้ เนื่องจากสปอร์มีความทนทานต่อความร้อนได้ดี ดังนั้นจึงอาจนำวัตถุตัวอย่างไปทำให้มีอุณหภูมิสูงขึ้นถึง 85 องศาเซลเซียตเป็นเวลา 5 นาทีก่อนใส่ลงสู่จานเลี้ยงเชื้อได้ ความร้อนจะทำลายพวกที่ไม่สร้างสปอร์ได้เกือบหมดหรือทั้งหมด ดังนั้นโคโลนีที่เกิดขึ้นจึงเป็นของพวกที่สร้างสปอร์ได้

**กลวิธีการทำให้เชื้อบริบูรณ์ (Enrichment-cultre Technique)** เพื่อเพิ่มโอกาสในการคัดแยกแบคทีเรียที่มีลักษณะทางสรีรวิทยา (physiology) ซึ่งแปลกกว่าพวกอื่น อาจทำได้โดยการทำให้เชื้อบริบูรณ์ (enriohment oulture) ก่อนใส่ลงสู่จานเลี้ยงเชื้อ วิธีการนี้ถูกเสนอโดยผู้บุกเบิกทางจุลชีววิทยาที่ยิ่งใหญ่สองท่านคือ Beijerinck และ Winogradsky ในระหว่างปี ค.ศ. 1890 และ 1900 มีหลักการคือใช้อาหารซึ่งทราบส่วนประกอบและบมภายใต้ภาวะเฉพาะเพื่อจัดทำให้เกิดสภาพแวดล้อมแบบพิเศษตามกำหนดซึ่งช่วยส่งเสริมการเจริญเติบโตของแบคทีเรียเฉพาะชนิดที่ต้องการแต่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหรือจุลินทรีย์พวกอื่น การทำให้เชื้อบริบูรณ์ถูกใช้เมื่อชนิดของแบคทีเรียที่ต้องการคัดแยกมีอำนาจค่อนข้างน้อยและเจริญเติบโตช้ากว่าสายพันธุ์อื่น ๆ ซึ่งมีอยู่ในแหล่งของเชื้อนั้น

ตัวอย่างเช่น เมื่อต้องการคัดแยกแบคทีเรียจากดินที่สามารถใช้สารประกอบซับซ้อน เช่น $\alpha$ -conidendrin ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเนื้อไม้ได้ ถ้าใส่ดินตัวอย่างลงใน nutrient agar โดยตรงโอกาสที่จะพบแบคทีเรียซึ่งใช้ -conidendrin จึงมีน้อยมาก ทั้งนี้เนื่องจากมีแบคทีเรียพวกอื่นอีกมากมายซึ่งเจริญเติบโตได้รวดเร็วปิดบังแบคทีเรียที่ต้องการเสียหมด ดังนั้นจึงใช้กลวิธีการทำให้เชื้อบริบูรณ์และเตรียมอาหารเหลวที่ประกอบด้วยเกลืออนินทรีย์ต่าง ๆ แหล่งไนโตรเจนซึ่งเป็นสารอนินทรีย์และ$\alpha$-conidendrin เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียว แบคทีเรียซึ่งไม่สามารถใช้$\alpha$-conidendrin จะไม่เจริญเติบโต บ่มจุลินทรีย์ในอาหารนี้เป็นเวลาสองสามวันแล้วถ่ายเชื้อจำนวนเล็กน้อยลงสู่อาหารใหม่ซึ่งมีส่วนประกอบเดียวกันในฟลาสค์ เนื่องจาก$\alpha$-conidendrin เป็นแหล่งของธาตุคาร์บอนแต่เพียงอย่างเดียวในอาหารนี้ จุลินทรีย์ซึ่งสามารถใช้สารประกอบนี้ได้จึงจะเจริญเติบโต แสดงว่าจุลินทรีย์จะต้องสร้างพลังงานและใช้ธาตุคาร์บอนเพื่อการสังเคราะห์จากสารประกอบนี้ได้ ตัวอย่างจากอาหารดังกล่าวอาจนำมาขีดบนอาหารซึ่งมีส่วนผสมอย่างเดียวกันแต่ถูกทำให้แข็งด้วยวุ้น แบคทีเรียสามารถใช้ $\alpha$ -conidendrin จะเจริญเติบโตเป็นโคโลนี รูปที่ 8-3 แสดงถึงกลวิธีการทำให้เชื้อบริบูรณ์



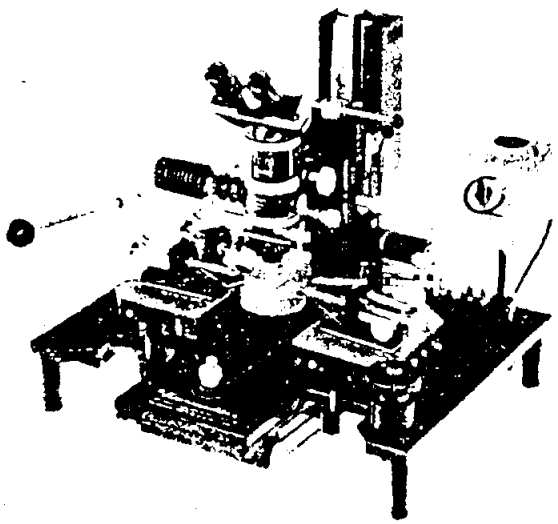

**รูปที่ 8-3** Enrichment-culture technique isolates bacteria capable of utilizing a particular substrate.

นอกจากนี้ยังมีกลวิธีการปรับปรุงอย่างอื่นก่อนการกระทำในจานเลี้ยงเชื้อ เช่นเมื่อต้องการค้นหาแบคทีเรียซึ่งทำให้เกิดโรคจากวัตถุตัวอย่าง ได้แก่เชื้อวัณโรคจากตัวอย่างเสมหะ ตัวอย่างอาจถูกนำมาใส่ในร่างกายของสัตว์ทดลองที่ยอมรับ หลังจากการติดเชื้อ (infection) แล้วเนื้อเยื่อบางอย่างของเจ้าบ้าน (bost) อาจมีจุลินทรีย์ดังกล่าวเป็นเชื้อบริสุทธิ์ซึ่งสามารถนำมาคัดแยกในจานเลี้ยงเชื้อได้

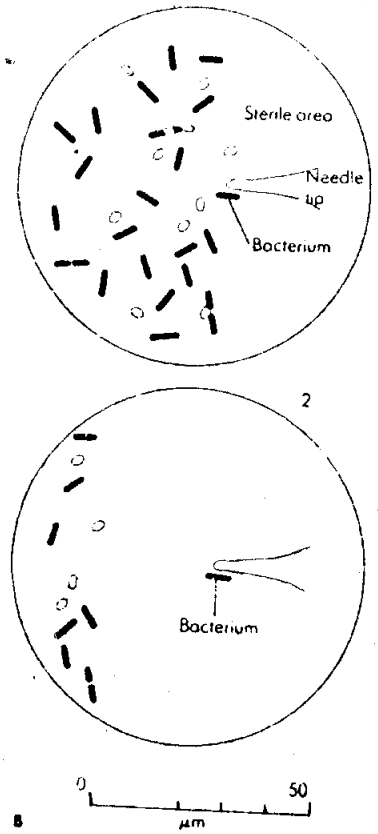
**กลวิธีการทำให้เจือจางตามลำดับ (Sertal-dilution Technique)** ถ้าจุลินทรีย์ที่ต้องการค้นหามีจำนวนมากกว่าจุลินทรีย์อื่น ๆ ในเชื้อผสม ดังนั้นจึงอาจทำให้ได้จุลินทรีย์ที่ต้องการเป็นเชื้อบริสุทธิ์ได้ โดยทำให้เจือจางเป็นลำดับในหลอดซึ่งมีอาหารที่เหมาะสม เมื่อความเจือจางถูกทำให้เพิ่มมากขึ้นในหลอดท้าย ๆ ตัวอย่างจะเหลือจุลินทรีย์เพียงสายพันธุ์เดียวที่ต้องการเท่านั้น อย่างไรก็ตามจำเป็นต้องตรวจสอบความบริสุทธิ์เพื่อให้แน่ใจอีกครั้งหนึ่งโดยวิธีการในจานเลี้ยงเชื้อ

**กลวิธีการคัดแยกแต่เฉพาะเซลล์เดียว (Single-cell Isolation Technique)** เครื่องมือพิเศษซึ่งเรียกว่า micromanipulator อาจนำมาใช้ติดกับกล้องจุลทรรศน์เพื่อหยิบจับจุลินทรีย์เพียงเซลล์เดียวจากหยดของเหลวห้อยแขวนในสไลด์ Micromanipulator เป็นเครื่องมือซึ่งใช้ควบคุมการเคลื่อนที่ของ micropipet หรือเข็มเขี่ยขนาดเล็กในหยดของเหลวห้อยแขวนซึ่งมีจุลินทรีย์อยู่จนกระทั่งสามารถนำเอาจุลินทรีย์เพียงเซลล์ถ่ายลงสู่หลอดอาหารเพื่อการเจริญเติบโต กลวิธีนี้ถูกใช้เพื่อการศึกษาในกรณีพิเศษเท่านั้นและต้องอาศัยความชำนาญ ดังรูปที่ 8-4

**รูปที่ 8-4** Isolation of single bacteria. (A) Micromanipulator equipment and microscope. The micromanipulator is equipped with probes that can position on objects a few microns in size. The manipulation of the probes is done while viewing the specimen through the microscope. *(Micromanipulator Company.)* (B) Schematic illustration of isolating a single bacterium from a mixture of cells. The microscopic field (1) shows the point of the microprobe touching a bacterium in a drop of fluid. The bacterial cell remains attached to the microprobe and can be transferred to a fresh sterile medium. *(From K. I. Johnstone, Manipulation of Bacteria. Churchill Livingstone. Edinburgh, 1973.)*



A




B

**การบำรุงรักษาและการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์**

การศึกษาเชื้อบริสุทธิ์มักต้องประสพกับปัญหาเกี่ยวกับการบำรุงรักษาเชื้อจุลินทรีย์ให้มีชีวิตระยะเวลานาน. ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาส่วนใหญ่มักมีการรวบรวมรักษาเชื้อดังกล่าวไว้เป็นจำนวนมากซึ่งก็หมายถึงการรวบรวมต้นตอของเชื้อ (stock-culture collection) จุลินทรีย์เหล่านี้ถูกใช้หรือเป็นที่ต้องการในงานการสอนปฏิบัติการและงานวิจัยหรือการทดสอบบางอย่างโดยเฉพาะ เพื่อสิ่งเหล่านี้และจุดประสงค์อื่นจึงมีความสำคัญอย่างยิ่งที่ต้องมีเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรียซึ่งชันสูตรแล้วไว้ให้พร้อมเพรียงเพื่อใช้งาน ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งมักรวบรวมเชื้อจุลินทรีย์ไว้ตามความจำเป็นและความสนใจทั้งในด้านการสอนและการวิจัย บริษัทอุตสาหกรรมทางชีววิทยาขนาดใหญ่มักรวบรวมรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้เป็นจำนวนมาก เชื้อต่าง ๆ เหล่านี้ถูกใช้เพื่อกลั่นกรองพิจารณาหาจุลินทรีย์ใหม่ในการผลิตสารเคมีซึ่งใช้เป็นยารักษาโรคภายในร่างกาย (chemothera peutic gent) หรือใช้เป็นเชื้อเปรียบเทียบเพื่อการศึกษาทางอนุกรมวิธานหรือใช้ในการทดสอบสารปฏิชีวนะ (antibiotic) และวิตามินต่าง ๆ และใช้เป็นเชื้ออ้างอิงในการจดทะเบียนลิขสิทธิ์ของบริษัท

**วิธีการเก็บรักษาเชื้อ**

มีงานวิจัยจำนวนมากที่ได้ศึกษาเพื่อปรับปรุงสภาวะและวิธีการในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย แบคทีเรียสายพันธุ์ต่าง ๆ ไม่ได้ตอบสนองต่อภาวะหรือขบวนการอย่างหนึ่งอย่างใดโดยเฉพาะในลักษณะที่เหมือน ๆ กันทั้งหมดดังนั้นจึงหมายความว่าเมื่อได้ศึกษาวิธีการสำหรับเชื้อหนึ่งแล้วจึงไม่อาจนำไปใช้กับเชื้ออื่น ๆ ได้ มีความจำเป็นอย่างยิ่งที่วิธีการเก็บและบำรุงรักษาจะต้องรักษาไว้ซึ่งลักษณะต่าง ๆ ทั้งหมดของสายพันธุ์ในช่วงระยะเวลาของการเก็บรักษา นอกจากนี้ยังมีอีกหลายประการที่ต้องพิจารณาเพื่อความเหมาะสม เช่น ปริมาณแรงงานที่ต้องใช้และปริมาณเนื้อที่ในการเก็บรักษา กลวิธีบางอย่างซึ่งช่วยในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียมีดังต่อไปนี้

1. **การถ่ายลงสู่อาหารใหม่เป็นระยะ** เชื้อแบคทีเรียอาจถูกเก็บรักษาไว้ในหลอดอาหารซึ่งใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยถ่ายลงสู่อาหารใหม่ชนิดเดียวกันเป็นระยะ ช่วงระยะเวลาที่ต้องถ่ายลงสู่อาหารใหม่นั้นแตกต่างกันตามชนิดของจุลินทรีย์ Heterotrophic bacteria สามัญทั่วไปส่วนใหญ่มักยังคงมีชีวิตอยู่ได้เป็นระยะเวลาหลายสัปดาห์หรือหลายเดือนบนอาหาร เช่น nutrient agar เมื่อวิธีการนี้ถูกใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ สิ่งที่ควรคิดล่วงหน้าคือ อาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งเหมาะสมต่อแต่ละสายพันธุ์ อุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเก็บรักษาเชื้อและช่วงระยะเวลาที่

ต้องมีการถ่ายเชื้อ ตารางที่ 8-1 แสดงตัวอย่างความต้องการในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียบางสายพันธุ์โดยวิธีการนี้

**ตารางที่ 8-1** Procedure for the Preservation of Some Bacteria by Periodic Transfer to Fresh Media

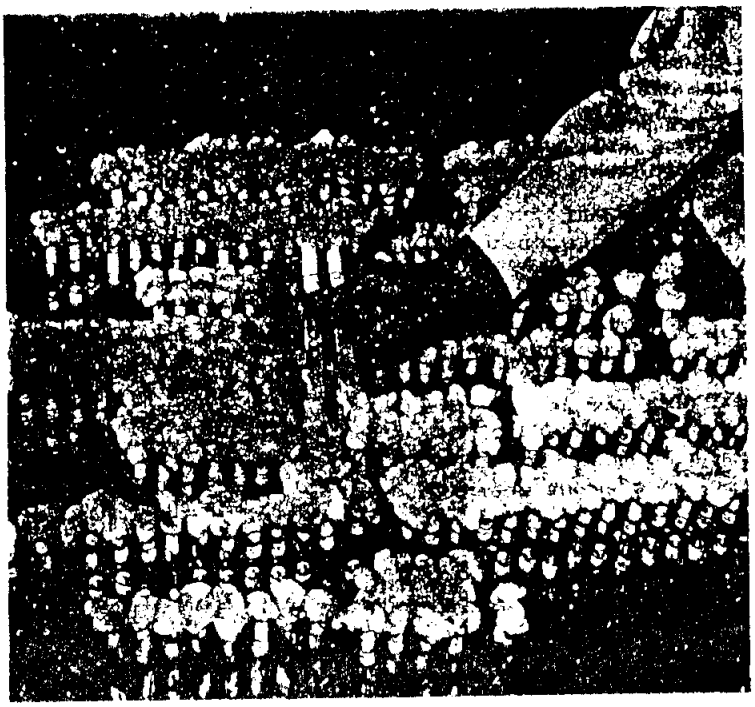
| BACTERIAL | MEDIUM | TRANSFER TIME | INCUBATION TEMP C | STORAGE TEMP C |
|---|---|---|---|---|
| *Neisseria* spp. (saprophytic) | Cystine trypticase agar | 1 month | 35 | 35 |
| *Bacillus* spp. | Nutrient agar | 12 months and longer | 28 | 10 |
| *Pseudomonas* spp. | Nutrient agar | 3 months | 28 | 10 |
| *Clostridium* spp. | Cooked meat medium | 6 months and longer | 28 | Room |
| *Mycobacterium* spp. (saprophytic) | Glycerol agar | 4 months | 30 | 10 |

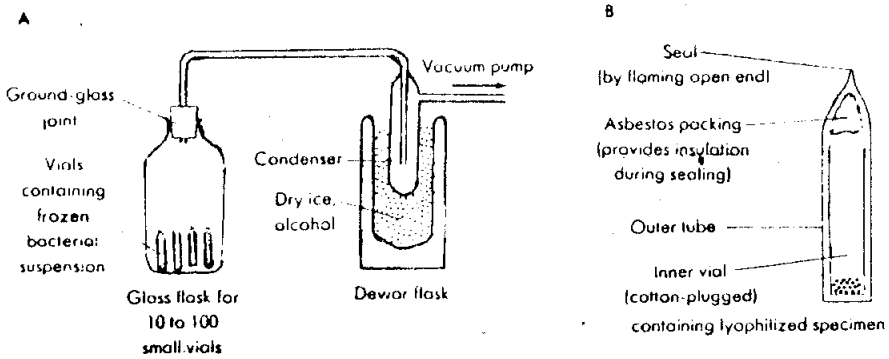
**2. การเก็บรักษาโดยการปิดทับเชื้อด้วยน้ำมันแร่** แบคทีเรียหลายชนิดสามารถเก็บรักษาไว้ได้โดยการปิดทับเชื้อซึ่งเจริญเติบโตบนผิววุ้นเอียง (agar slant) ด้วยน้ำมันแร่ปราศจากเชื้อ น้ำมันจะต้องปิดทับผิววุ้นอย่างสมบูรณ์และเพื่อความแน่ใจน้ำมันควรอยู่สูงจากปลายผิววุ้นเอียงประมาณครึ่งนิ้ว ระยะเวลาในการเก็บรักษาเชื้อด้วยวิธีการนี้เปลี่ยนแปลงได้ตามสายพันธุ์แต่โดยทั่วไปมักเก็บไว้ได้หลายปี บางสายพันธุ์อาจเก็บไว้ได้อย่างเป็นที่พอใจถึง 15 หรือ 20 ปี วิธีการเก็บรักษาเชื้อแบบนี้มีข้อได้เปรียบคือ สามารถถ่ายเอาบางส่วนของเชื้อซึ่งเจริญเติบโตอยู่ใต้น้ำมันด้วยเข็มถ่ายเชื้อแล้วถ่ายลงสู่อาหารซึ่งจัดเตรียมใหม่ได้ ส่วนเชื้อที่เหลือยังคงเก็บไว้ได้ในหลอดเดิม ด้วยวิธีการซึ่งง่ายแบบนี้จึงทำให้เป็นที่สนใจมาก รูปที่ 8-5 แสดงถึงเชื้อซึ่งเก็บไว้ได้โดยวิธีการนี้

**3. การเก็บรักษาเชื้อโดยทำให้แห้งอย่างรวดเร็วในขณะที่เย็นจนแข็ง (Lyophilization)** **Lyophilization** เป็นวิธีการซึ่งมีประสิทธิภาพมากในการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียหลายสายพันธุ์ เชื้อแบคทีเรียซึ่งถูกเก็บรักษาไว้ด้วยกลวิธีนี้อาจมีชีวิตอยู่ได้โดยไม่เปลี่ยนแปลงเป็นระยะเวลานานถึง 20 ปี ขบวนการนี้เซลล์ถูกทำให้แห้งอย่างรวดเร็วในขณะเย็นแข็งตัวโดยขั้นตอนต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ คือ เซลล์แขวนลอยถูกใส่ลงในหลอดแก้วขนาดเล็ก แล้วจุ่มในน้ำแข็งแห้งผสมแอลกอฮอล์ (-78ซ.) หลอดเล็กดังกล่าวถูกต่อเข้ากับท่อดูดสูญญากาศพลังสูงจนกระทั่งสิ่งที่

บรรจุอยู่ภายในแห้งสนิทแล้วหลอมปิดปากหลอดด้วยเปลวไฟในขณะที่ภายในหลอดยังคงเป็นสูญญากาศอยู่ การจัดการเกี่ยวกับเครื่องมือซึ่งใช้ในการ Lyophilize เชื้อต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8-6 ข้อได้เปรียบของกลวิธีการนี้ซึ่งเห็นได้ชัดคือ ทำให้จุลินทรีย์มีชีวิตรอดอยู่ได้นาน มีโอกาสน้อยมากที่จะทำให้ลักษณะของเชื้อเปลี่ยนแปลงและใช้ภาชนะในการเก็บรักษาเพียงขนาดเล็กไม่เปลืองเนื้อที่ เชื้อซึ่งถูก lyophilize จำนวนหลายร้อยอาจถูกเก็บรักษาไว้ได้ในเนื้อที่เพียงเล็กน้อย

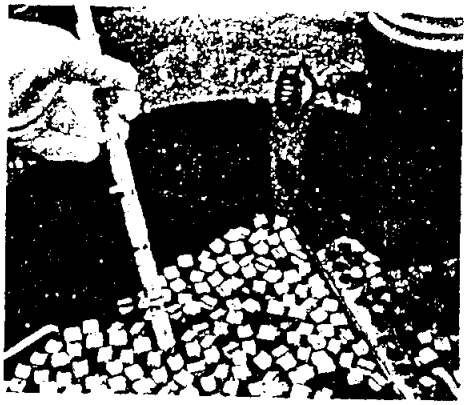
**รูปที่ 8-5** A culture collection maintained by overlaying cultures with mineral oil. *(U.S. Department of Agriculture)*






**รูปที่ 8-6** Lyophilization process for preservation of cultures. (A) Small cotton-plugged vials containing frozen suspensions of the organisms are placed in the glass flask, which is attached to a condenser. The condenser is connected to a high-vacuum pump, and this system brings about desiccation of the cultures. (B) After desiccation of the cultures as in (A), the vials are removed, placed individually in a larger tube, covered with asbestos packing, and sealed under vacuum. *(American Type Culture Collection.)*

**การเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำมาก** นักจุลชีววิทยาอาจเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ไว้ได้ โดยแช่ในไนโตรเจนเหลวซึ่งมีอุณหภูมิ -196 องศาเซลเซียส ในวิธีการนี้เซลล์ถูกทำให้เย็นแข็งตัวร่วมกันสารป้องกันเช่น กรีเซอรอล หรือ dimethyl sulfoxide โดยเติมสารป้องกันลงในหลอดเก็บเซลล์แขวนลอยแล้วแช่ไว้ในไนโตรเจนเหลว วิธีการเก็บเชื้อไว้ด้วยไนโตรเจนเหลวใช้ได้ผลดีกับจุลินทรีย์ทุกชนิดที่เก็บได้โดยวิธี lyophilimation นอกจากนี้การทำให้เย็นแข็งตัวด้วยไนโตรเจนเหลวยังใช้เก็บเชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่ไม่อาจเก็บได้โดยวิธี lyophilization การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียในถังไนโตรเจนเหลวได้แสดงไว้ในรูปที่ 8-7



**รูปที่ 8-7** Preservation of bacterial cultures in liquid-nitrogen (gas phase) refrigerated storage tanks. For preservation, an aliquot of the bacterial suspension is placed in a small screw-cap vial. This picture shows six vials, attached to a cane, being removed from storage. *(Courtesy Alma Dietz, The Upjohn Company.)*

**การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แห่งชาติ**

มีองค์การต่าง ๆ ทั่วโลกซึ่งทำหน้าที่หลักในการเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์ของแบคทีเรีย ยีสต์ รา สาหร่าย โปรโตซัว และเซลล์สัตว์ต่าง ๆ

หน่วยงานเพื่อการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แบบอย่าง (type-culture) ที่รู้จักเป็นแห่งแรก คือ Kral Collection ซึ่งถูกจัดตั้งขึ้นในกรุงปราก (Prague) เมื่อปี 1900 ต่อมาจึงได้มีสถาบันเพื่อการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ถูกตั้งขึ้นในประเทศต่าง ๆ เช่น The American Type Culture Collection (ATCC) ในสหรัฐอเมริกา สถาบันพาสเจอร์ (Institut Pasteur) ในปารีสประเทศฝรั่งเศสเพื่อการเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย The (British) National Collection of Type Cultures ในดอนลอนประเทศอังกฤษ และ The Japanese Type Culture Collection ที่ Nagao Institute กรุงโตเกียวแห่งประเทศญี่ปุ่น จากข้างต้นเป็นตัวอย่างของหน่วยงานหรือสถาบันขนาดใหญ่ แต่มีจำนวนน้อยเพื่อการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แห่งชาติซึ่งถูกจัดตั้งขึ้นในประเทศต่าง ๆ The American Type Culture Collection ได้รวบรวมแบคทีเรีย ฟังไจ สาหร่าย โปรโตซัว ไวรัส และ

เซลล์ของสัตว์ซึ่งเลี้ยงได้อย่างต่อเนื่องไว้มากกว่า 17,000 สายพันธุ์ (strain) มีหลอดขนาดเล็ก (ampoule) มากกว่าครึ่งล้านเก็บตัวอย่างซึ่งแห้งแข็งไว้ด้วยความเย็นหรือตัวอย่างซึ่งแช่เย็นแข็งไว้ในตู้เย็นที่ -60 องศาเซลเซียส ในห้องเย็นที่อุณหภูมิ 5 องศาเซลเซียสหรือในตู้เย็นไนโตรเจนเหลวที่ -196 องศาเซลเซียส ทุก ๆ ปีสถาบันแห่งนี้ได้ส่งเชื้อมากกว่า 20,000 เชื้อไปยังนักวิทยาศาสตร์และนักการศึกษาในสหรัฐอเมริกาและต่างประเทศ นอกจากนี้ยังมีสถาบันในบางส่วนของโลกเก็บรักษาเชื้อไว้เพื่อจุดประสงค์ใดประสงค์หนึ่งโดยเฉพาะอีกหลายแห่ง การเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์มีบทบาทสำคัญอย่างขาดเสียไม่ได้ต่อนักจุลชีววิทยาโดยทำให้มีสายพันธุ์ซึ่งแตกต่างกันในระดับต่าง ๆ จำนวนมาก คือ variety ของ species และ strains ของ species เพื่องานการทดลอง นักจุลชีววิทยาผู้เสนอ species ใหม่ก็คาดหวังว่าจะได้เก็บเชื้อแบบอย่างของตนไว้กับสถาบันการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์แห่งชาติแห่งใดแห่งหนึ่ง

**ลักษณะของเชื้อ** (CULTURAL CHARACTERISTIC)

ลักษณะสำคัญอย่างหนึ่งของแบคทีเรียคือ ลักษณะที่ปรากฏเมื่อเจริญเติบโตอยู่บนอาหารต่าง ๆ เรียกว่าลักษณะของการเจริญเติบโต ได้แก่ลักษณะสามัญทั่วไปเช่น สี (chromogenesis) ความอุดมสมบูรณ์ของการเจริญเติบโต และกลิ่นของเชื้อ สิ่งต่าง ๆ เหล่านี้ถูกใช้เป็นแนวทางเพื่อการชันสูตร

เพื่อตรวจสอบลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์หนึ่งมักสังเกตุดังแบบอย่างต่อไปนี้

1. โคโลนีบนวุ้นอาหาร
2. การเจริญเติบโตบนผิววุ้นลาดเอียง
3. การเจริญเติบโตในอาหารเหลว
4. การเจริญเติบโตในรูเจลาตินที่ถูกทิ่มแทง

การใส่เชื้อลงบนแผ่น nutrient agar ทำให้ได้โคโลนีเดี่ยวดังที่ได้กล่าวมาแล้ว เชื้อบนผิววุ้นเอียงอาจเตรียมได้โดยลากปลายเข็มถ่ายเชื้อให้เป็นเส้นตรงบนผิววุ้นเอียงโดยลากจากล่างขึ้นบน สำหรับเชื้อในรูซึ่งถูกทิ่มแทง (stab culture) อาจทำได้โดยแทงปลายเข็มซึ่งมีเชื้อติดอยู่เข้าไปในเนื้อวุ้นหรือเจลาตินจากปากหลอดถึงก้นหลอดแล้วชักขึ้นมาตามรอยเดิม หลอดอาหารเหลวอาจถูกใส่เชื้อได้ด้วยเข็มหรือห่วงถ่ายเชื้อ (loop) โดยทั่วไปห่วงถ่ายเชื้อมักถูกใช้เมื่อแหล่งเชื้อ (inoculum) เป็นของเหลว

หลังจากใส่เชื้อลงบนอาหารและบ่มแล้ว ลักษณะเชื้อของจุลินทรีย์อาจถูกตรวจสอบได้โดยลักษณะการเจริญเติบโตบนอาหารแต่ละอย่างดังต่อไปนี้

**โคโลนีบนแผ่นวุ้น**

1. ขนาด โคโลนีอาจมีขนาดตั้งแต่เล็กมากเท่าปลายเข็มมุดวัดเส้นผ่าศูนย์กลางได้เพียงส่วนหนึ่งของมิลลิเมตรจนกระทั่งขนาดใหญ่มากวัดได้ตั้งแต่ 5 ถึง 10 มิลลิเมตร แบคทีเรียหลายชนิดสร้างโคโลนีขนาดจำกัดตลอดระยะเวลาการบ่ม แต่บางชนิดเช่นสายพันธุ์ของ *Pseudomonas* และ *Proteus* มีโคโลนีแผ่ขยายออกไปจนปกคลุมทั่วผิววุ้น

2. ขอบของโคโลนี ขอบนอกของโคโลนีแบคทีเรียมีแบบฉบับแตกต่างกันตามสายพันธุ์ บางชนิดที่กลมเรียบคล้ายหยดของเหลว หรือบางชนิดก็แสดงรอยนูนเป็นปุ่ม เป็นเส้นขนหรือคล้ายรากรอบโคโลนี

3. การนูนสูง โคโลนีอาจบางเรียบมากจนถึงหนานูนสูง โคโลนีของแบคทีเรียอาจแสดงการนูนสูงได้หลายระดับ

4. การเกิดสี (chromogenesis or pigmentation) โคโลนีอาจมีสีหรือไม่มีสีเปลี่ยนแปลงได้ตามสายพันธุ์ตั้งแต่ แดง เหลือง น้ำตาล และม่วง

5. ความขุ่นใส โคโลนีอาจขุ่นทึบแสง โปร่งแสงหรือใสมัว ๆ

โคโลนีของแบคทีเรียแบบต่าง ๆ ได้แสดงไว้ในรูปที่ 8-8

**การเจริญเติบโตตามรอยขีดบนผิววุ้นเอียง**

1. ปริมาณการเจริญเติบโต อาจเจริญเติบโตได้เพียงเล็กน้อย เจริญเติบโตมาก หรือเจริญเติบโตปานกลาง

2. ขอบของเชื้อเมื่อเจริญเติบโต อาจเรียบหรือมีรอยหยักดังที่ได้อธิบายมาแล้วในเรื่องโคโลนี

3. ความข้นเหนียวของเชื้อ เช่น มีลักษณะข้นเหนียวคล้ายเนยเหลวง่ายต่อการแบ่งถ่ายด้วยเข็ม เหนียวหนืดยืดเป็นยาง หรือแห้งร่วนและแข็ง

4. สี ก็เช่นเดียวกันกับในเรื่องโคโลนี

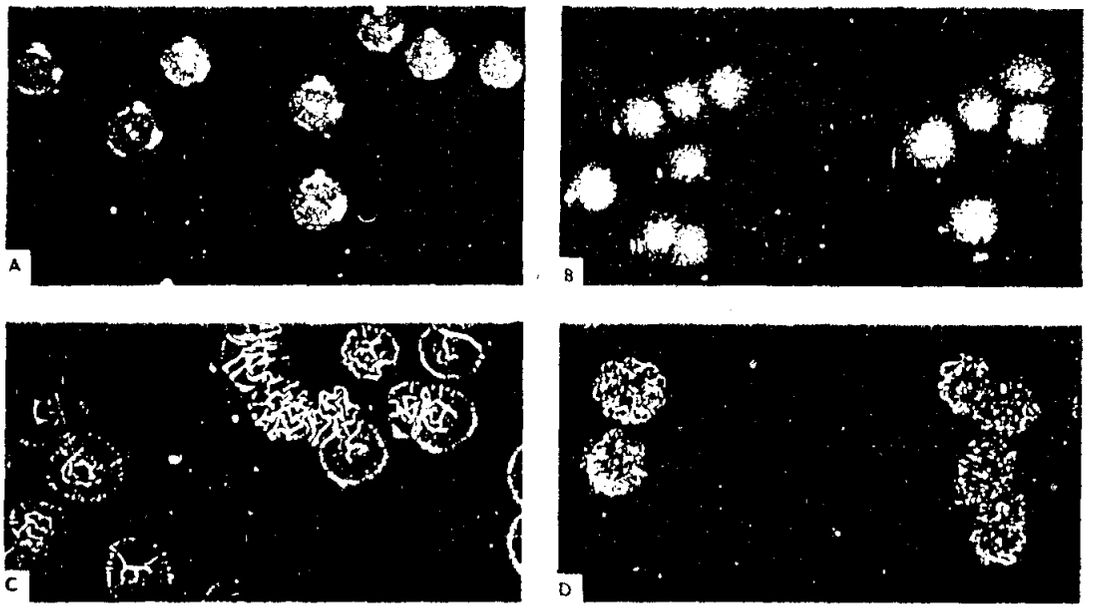
**การเจริญเติบโตใน nutrient broth**

1. ปริมาณการเจริญเติบโต อาจเบาบางเพียงเล็กน้อยหรือปานกลางหรือปริมาณมาก

2. การกระจายไปในอาหารเหลว อาจกระจายไปอย่างสม่ำเสมอหรือขุ่นขาวโดยตลอด

อาจเจริญเติบโตเฉพาะที่ผิวหน้าเป็นแผ่นหรือเกล็ด หรืออาจเจริญเติบโตเป็นตะกอนตกอยู่ที่ก้น มีลักษณะเป็นก้อนลูกหรือเหนียวหนืด

3. กลิ่น อาจมีกลิ่นเน่าเหม็น หรือกลิ่นหอมหรือมีกลิ่นผลไม้หรือไม่มีกลิ่น




**รูปที่ 8-8** Bacterial colonies illustrating differences in characteristics. (A) Circular, raised, smooth surface. (B) circular, raised, finely granular surface. (C) irregular edge, flat, elevated folds in surface; (D) undulate edge, raised, irregularly elevated surface. *(Naval Biological Laboratory.)*

**การเจริญเติบโตในวุ้นเจลาตินที่ถูกทิ่มแทง**

1. เจริญเติบโตตามแนวที่ใส่เชื้อโดยไม่ย่อยสลายเจลาตินและอาจเจริญเติบโตจำกัดอยู่เฉพาะในบริเวณที่ใส่เชื้อหรือแผ่ขยายออกไป

2. ย่อมสลายเจลาติน อาจเริ่มต้นจากข้างบนลงไปข้างล่างหรือทำให้เกิดกรวยของเหลวลึกลงไปในเจลาติน

ลักษณะของเชื้อซึ่งเด่นชัดที่สุดอย่างหนึ่งคือ การสี แบคทีเรียไม่ใช่ทุกสายพันธุ์ซึ่งทำให้เกิดสี บางสายพันธุ์อาจเก็บสีไว้ภายในเซลล์และเมื่อเซลล์รวมกันอยู่อย่างหนาแน่นจึงมองเห็นสีได้ ส่วนแบคทีเรียพวกอื่นอาจขับสีออกมานอกเซลล์ทำให้อาหารซึ่งแบคทีเรียอาศัยอยู่มีสี

เกิดขึ้น ความเข้มของสีขึ้นอยู่กับส่วนประกอบของอาหารและภาวะในการบ่ม การเกิดสีอาจตรวจสอบได้เมื่อแบคทีเรียเจริญเติบโตอยู่บนอาหารแข็ง

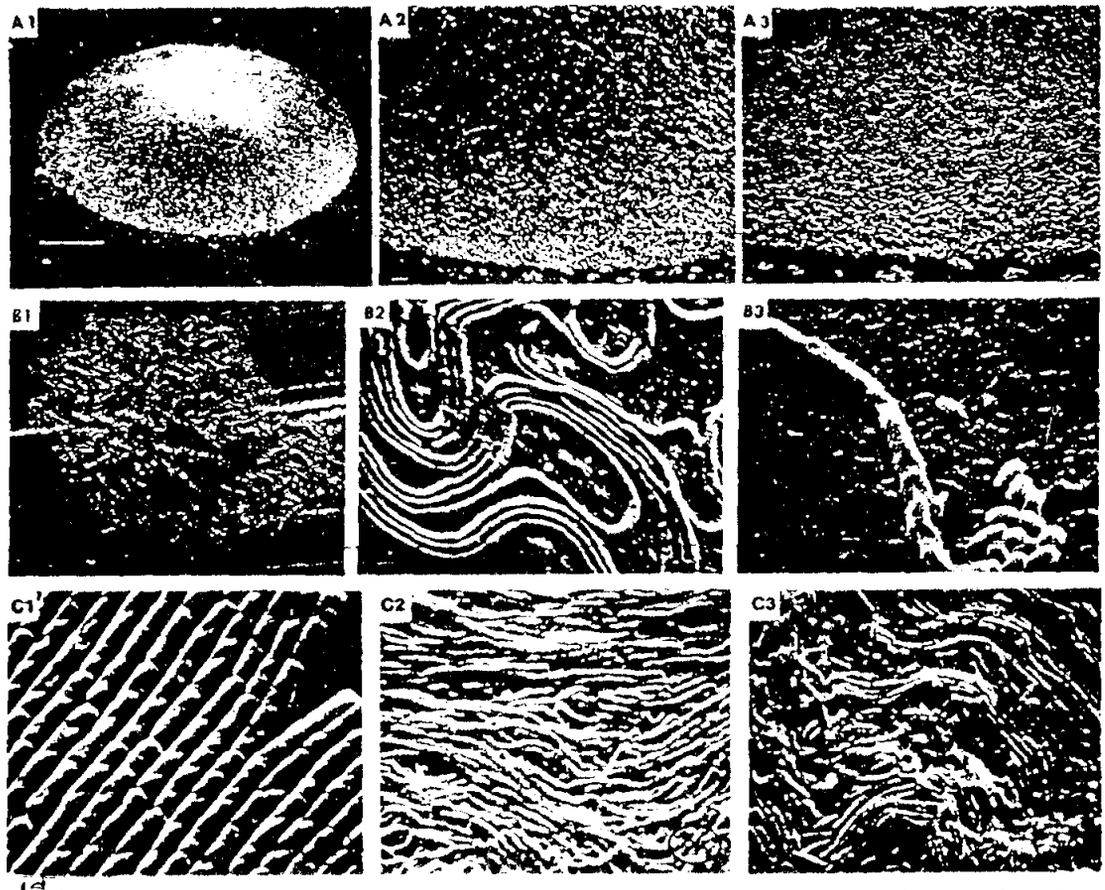
สายพันธุ์แบคทีเรียสามัญบางชนิดซึ่งมีสีและเก็บสีไว้ภายในเซลล์

| | |
|---|---|
| *Serratia marcescens* | แดง |
| *Chromobacterium violaceum* | ม่วง |
| *Staphylococcus aureus* | เหลืองทอง |
| *Sarcina lutea* | เหลืองมะนาว |
| *Micrococcus flavus* | เหลือง |
| *M. niger* | น้ำตาลดำ |

สายพันธุ์แบคทีเรียสามัญบางชนิดซึ่งทำให้เกิดสีและขับสีออกมาอยู่ในอาหารที่ใช้เพาะเลี้ยง

| | |
|---|---|
| *Pseudomonas chlororaphis* | เขียวออกเหลือง |
| *P. fluorescens* | เขียวออกน้ำตาลมะกอก |
| *P. aeruginosa* | เขียว น้ำเงิน ออกน้ำตาลดำ |

แผนภูมิเพื่อบรรยายลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้บ่งบอกถึงรายละเอียดบางอย่างเพื่อย้ำถึงความแตกต่างของแบคทีเรียในแง่มุมต่าง ๆ ที่ปรากฏ ด้วยความคุ้นเคยและความชำนาญเกี่ยวกับลักษณะเช่นนี้ช่วยนำทางไปสู่การนึกถึงแบคทีเรียหมู่ใหญ่ได้มีบ่อยครั้งทีเดียวที่เริ่มต้นการศึกษาโดยใช้ความสนใจเพียงเล็กน้อยเกี่ยวกับลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการก็ช่วยให้ได้รายละเอียดซึ่งมีประโยชน์ในการชันสูตรเป็นอย่างมาก




รูปที่ 8-9 Bacterial colonies as seen by scanning electron microscopy. Three magnifications of two colonies. (A) *Staphylococcus aureus*. (1) Marker equals 100 μm; (2) and (3). marker equals 10 μm. (B) *Bacillus anthracis*. (1) Typical "Medusa Heed" colony. Marker equals 100 μm. (2) Edge of colony showing individual rods in chains. Marker equals 5 μm. (3) Chain of cells growing out from colony showing progressive cell-wall collapse and finally cell-wall dissolution with release of free spores as seen in lower right portion. *(Courtesy of I. L. Roth, from Proceedings of the Fourth Annual Scanning Electron Microscope Symposium. IIT Research Institute, Chicago, April 1971.)* (C) Arrangement of bacterial cells in the center of a colony observed by scanning electron microscopy. The manner of arrangement is reflected in the gross appearance of the colony surface. (1) *Bacillus cereus* var. mycoides; (2) *B. cereus*; (3) B. *subtilis*. *(Courtesy L. A. Bulla, Jr.. in E. G. Afrikian et al., Appl Microbiol, 26.334. 1973.)*