บทที่ 4
การเจริญ
(Growth)

นักจุลชีววิทยาได้ให้คำจำกัดความเซลล์ที่มีชีวิตและการเจริญว่า เซลล์ที่มีชีวิตหมายถึงเซลล์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้และการเจริญหมายถึงการที่เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้น สำหรับเซลล์ที่มีจำนวนคงที่จัดเป็นเซลล์ที่ดำรงชีวิตอยู่ได้แต่ไม่มีการเจริญ ส่วนเซลล์ที่มีจำนวนลดลงจัดเป็นเซลล์ที่มีการตาย

ภายในเซลล์แบคทีเรียที่มีการเจริญจะมีกระบวนการต่าง ๆ ที่ซับซ้อนเกิดขึ้นอย่างมีระเบียบ เช่น การขนส่งอาหารจากสภาวะแวดล้อมเข้าสู่ภายในเซลล์ การเปลี่ยนแปลงอาหารให้เป็นแหล่งพลังงานและพรีเคอร์เซอร์ การสังเคราะห์สารที่เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ การเพิ่มขนาดของเซลล์และการแบ่งเซลล์ ปัจจัยซึ่งมีอิทธิพลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ อายุของแบคทีเรียและสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียหรือสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอาศัยอยู่

กฎเกณฑ์ของการเจริญ (regulation of growth)

ปัจจุบัน ยังไม่ทราบแน่ชัดถึงรายละเอียดในการสังเคราะห์สารที่เป็นส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และการแบ่งเซลล์ แต่ทราบว่าการสังเคราะห์เส้นสาย DNA ใหม่แล้วแยกออกเป็นสองโครโมโซมจะเกิดขึ้นก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์เสมอ และเมื่อการสังเคราะห์เส้นสาย DNA ใหม่ถูกยับยั้งจะไม่พบการแบ่งเซลล์ ส่วนเซลล์ที่มีการสังเคราะห์เส้นสาย DNA ใหม่เรียบร้อยแล้ว จะไม่มีการแบ่งเซลล์เมื่อสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีสารเคมีบางชนิดยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนหรือ RNA และโปรตีน เช่น คลอแรมฟินิคอล และอะซาไซติดีน (azacytidine) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีน แอคติโนมัยซิน (actinomycin) และไรแฟมพิซิน (rifampicin) ยับยั้งการสังเคราะห์ RNA และโปรตีน เป็นต้น เซลล์ที่อยู่ในสภาวะดังกล่าวมานี้จะมีลักษณะยาวเป็นเส้นสาย (filament) มีผนังเซลล์หนากว่าปกติและ DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นมาจะยาวไปตามความยาวของเซลล์

การสังเคราะห์โครโมโซม การสังเคราะห์โครโมโซมของแบคทีเรียจะเกิดขึ้นแบบซีมิคอนเซอเวตีบ เมคคานิซึ่ม และจะต้องเกิดขึ้นก่อนที่จะเกิดการแบ่งเซลล์เสมอ (ดูรายละเอียดในบทที่ 2 หัวข้อนิวเคลียส) ขณะที่มีการสังเคราะห์โครโมโซมหรือ DNA จะมีเอ็นไซม์มาทำหน้าที่เร่งให้ดีออกซีไรโบสจับกับออแกนิกเบสแล้วกลายเป็นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ ต่อมาดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์จับกับฟอสเฟตแล้วกลายเป็นดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์และดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ โมเลกุลจับกันแล้วกลายโพลิดีออกซีไรโบนิวคลีไทด์ (polydeoxyribonucleotide) หรือ DNA ตามลำดับ

ดีออกซีไรโบนิวคลีโอไซด์ที่มีใน DNA ได้แก่ ดีออกซีอะดีโนซีน (deoxyadenosine) ดีออกซีไธมิดีน (deoxythymidine) ดีออกซีกัวโนซีน (deoxyguanosine) และดีออกซีไซติดีน (deoxycytidine) ส่วนดีออกซีไรโบนิวคลีโอไทด์ที่มีใน DNA ได้แก่ กรดดีออกซีไรโบอะดีนายลิก (deoxyriboadenylic acid) กรดดีออกซีไรโบไธมิดายลิก (deoxyribothymidylic acid) กรดดีออกซีไรโบกัวนายลิก (deoxyriboguanylic acid) และกรดดีออกซีไรโบไซติดายลิก (deoxyribocytidylic acid)

การสังเคราะห์ไรโบโซม ไรโบโซมของแบคทีเรียประกอบด้วย rRNA (ribosomal RNA) และโปรตีน ปริมาณของ rRNA ที่เป็นส่วนประกอบนี้สูงกว่าปริมาณโปรตีน rRNA ประกอบด้วย ไรโบนิวคลีโอไทด์หลาย ๆ โมเลกุล ซึ่งจับกันอยู่ด้วยฟอสโฟไดเอสเตอร์บอนด์ แบ่ง rRNA ออกได้เป็น 3 ขนาดตามค่าของการเซดิเมนต์ (sedimentation) คือ 23S, 16S และ 5S

ในกระบวนการสังเคราะห์ RNA เอ็นไซม์ RNA โพลิเมอเรส (RNA polymerase) ซึ่งประกอบด้วยคอร์เอ็นไซม์ (core enzyme) และปัจจัยซิกม่า (sigma factor) ใช้ส่วนคอร์เอ็นไซม์จับกับ DNA แบบสุ่ม แล้วเกิดการสังเคราะห์ RNA โดยใช้ DNA เพียงเส้นเดียวเป็นแม่พิมพ์ (template) ดังนั้นจะเห็นว่าบริเวณของ DNA ที่มี RNA โพลิเมอเรสจับอยู่มีการคลายเกลียวคู่และแยกออกเป็นสองเส้น ในการสังเคราะห์ RNA ปัจจัยซิกม่าจะมีบทบาทสำคัญในการเริ่มถอดลำดับของเบสจาก DNA และกระตุ้นให้เกิดฟอสโฟไดเอสเตอร์บอนด์ของ RNA

หลังจากกระตุ้นให้เกิดฟอสโฟไดเอสเตอร์บอนด์ของ RNAแล้วปัจจัยซิกม่าจะหลุดออกจากคอร์เอ็นไซม์ ส่วนคอร์เอ็นไซม์จะทำหน้าที่เป็นตัวเร่งไปเรื่อย ๆ จนกระทั่งการสังเคราะห์ RNA เรียบร้อย ขณะที่มีการสังเคราะห์ RNA นี้ปัจจัยโร (rho factor) ซึ่งเป็นสารพวกโปรตีนจะมาช่วยทำให้การถอดลำดับของเบสจาก DNA สิ้นสุดลง ต่อมาปัจจัยเค็พปา (keppa factor) จะมาช่วยทำให้ DNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์และ RNA ที่สังเคราะห์ขึ้นมาแยกออกจากกัน หลังจากนั้นปัจจัยซิกม่าจะมาจับกับคอร์เอ็นไซม์แล้วทำหน้าที่ใหม่ต่อไป ส่วน RNA ซึ่งหลุดออกจาก DNA ที่ใช้เป็นแม่พิมพ์จะถูกขนส่งไปยังไซโตพลาสซึม RNA ซึ่งเป็น rRNA ที่มีขนาด 16S และ 23S จะมีโปรตีนมาจับอย่างมีระเบียบทำให้มีขนาดโมเลกุลใหญ่ขึ้นแล้วได้หน่วยย่อย 30S และ 50Sตามลำดับ ดังรูปที่ 4-1 การเกิดหน่วยย่อย 50S นี้จะมีการจับระหว่างrRNA ขนาด 23S และ5S ด้วย เมื่อมีการสังเคราะห์โปรตีนหน่วยย่อย 30S และ 50S จะมาจับกันเป็นไรโบโซม 70S

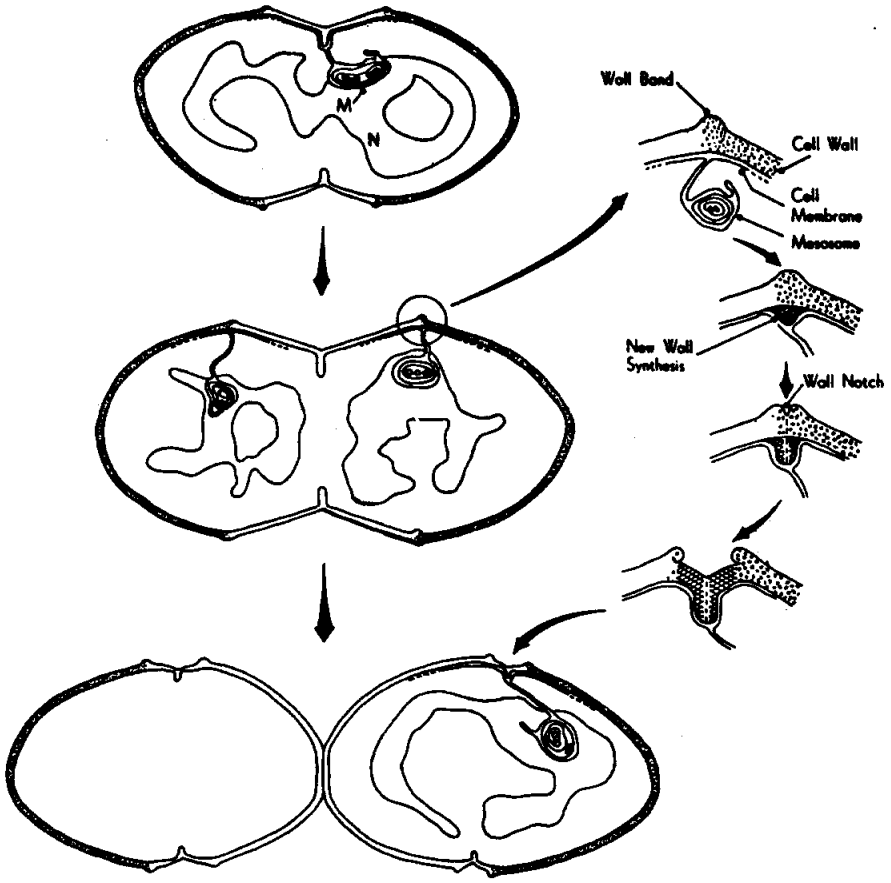
nascent 16S RNA ⟶ 21S ⟶ 26S ⟶ 30S subunit
nascent 23S RNA ⟶ 32S ⟶ 43S ⟶ 50S subunit

รูปที่ 4-1 ลักษณะการเกิดหน่วยย่อย 30S และ 50S ของไรโบโซม

การสังเคราะห์ rRNA และโปรตีนจะเกิดขึ้นเมื่อภายในเซลล์แบคทีเรียที่มีกรดอะมิโนอย่างเพียงพอ และเมื่อภายในเซลล์ไม่มีกรดอะมิโนการสังเคราะห์โปรตีนจะหยุดส่วนการสังเคราะห์ rRNAจะลดลง rRNAที่สังเคราะห์ในขณะที่ไม่มีกรดอะมิโนภายในเซลล์นี้จะมีขนาด 23S, 16S และ 5Sเท่านั้น ซึ่งจะเหมือนกับ rRNA ที่แบคทีเรียสังเคราะห์ขึ้นเมื่อสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียมีสารปฏิชีวนะบางชนิด เช่น คลอแรมฟินิคอล เพียวโรมัยซิน (puromycin) เตตระไซคลีน (tetracycline) และสเตรปโตมัยซิน

การสังเคราะห์โครแมทโตฟอร์ จากการศึกษาแบคทีเรียซึ่งอยู่ในแฟมมิลี่เอไซโอไร-ดาซิอี เช่น *Rhodopseudomonas* sp. และ *Rhodospirillum* sp. พบว่า เมื่อนำแบคทีเรียซึ่งเจริญในสภาวะแอโรบและไม่มีแสงสว่างไปทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะแอนแอโรบและมีแสงสว่าง เยื่อเซลล์ของแบคทีเรียจะเว้าเข้าไปแล้วเกิดเป็นโครงสร้างมีลักษณะเป็นถุงกลมหรือท่อยาวซึ่งเรียกว่า โครแมทโตฟอร์ ขณะที่เกิดโครแมทโตฟอร์แบคทีเรียจะสังเคราะห์รงควัตถุที่ใช้ในการรับพลังงานจากแสง ลิปิด เอ็นไซม์ ตัวนำอิเล็กตรอนที่เกี่ยวข้องกับลูกโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนและโปรตีนซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อโครแมทโตฟอร์

การสังเคราะห์เยื่อเซลล์ ผนังเซลล์และการแบ่งเซลล์ ในระหว่างที่แบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์จะมีการสังเคราะห์ผนังเซลล์และเยื่อเซลล์ซึ่งปัจจุบันยังมีความรู้น้อยมากเกี่ยวกับการสังเคราะห์เยื่อเซลล์ ส่วนการสังเคราะห์ผนังเซลล์นั้นจะเริ่มจากส่วนไซโตพลาสซึมและเยื่อมีโซโซมโดยมีเอ็นไซม์ที่ละลายได้ (soluble enzyme)ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งให้เกิดการสังเคราะห์เอ็นอะเซ็ท-ทิลกลูโคซามีน กรดเอ็นอะเซ็ททิลมิวรามิกและส่วนประกอบอื่น ๆ ของผนังเซลล์ขึ้นพร้อม ๆ กัน ต่อมาสารต่าง ๆ ที่สังเคราะห์ขึ้นมานี้จะถูกขนส่งไปยังเยื่อเซลล์แล้วถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์ให้เป็นโพลิเมอร์ของผนังเซลล์ต่อไป ผนังเซลล์ใหม่ที่สังเคราะห์ขึ้นมาจะเกิดแทรกอยู่ระหว่างผนังเซลล์เดิมเพียงสองแห่งหรือหลาย ๆ แห่งก็ได้ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรีย เช่น *Bacillus* sp. มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่ที่ปลายเซลล์ทั้งสองข้าง หลังจากนั้นมีตำแหน่งที่สังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่เพิ่มขึ้นอีกหลายแห่งถัดจากตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่ครั้งแรกเข้าไปข้างใน ต่อมาผนังเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะยาวออกแล้วมีการแบ่งเซลล์ การแบ่งเซลล์ใน *Bacillus* sp. นี้อาจจะเกิดตรงบริเวณผนังเซลล์ใหม่หรือผนังเซลล์เก่าก็ได้ *Streptococcus* sp. มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่ตรงส่วนกลางเซลล์ ต่อมาผนังเซลล์ใหม่ที่เกิดขึ้นจะมีความยาวเพิ่มขึ้นเรื่อย ๆ แล้วแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ ดังรูปที่ 4-2



รูปที่ 4-2 กระบวนการแบ่งเซลล์ของ *Streptococcus faecalis*

(M = mesosome, N = nuclear material)

สำหรับรายละเอียดกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียรูปท่อนแกรมบวก เช่น *Bacillus* sp. และแบคทีเรียรูปท่อนแกรมลบ เช่น *Salmonella typhosa* และ *Escherichia coli* นั้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่ทราบถึงรายละเอียดกระบวนการแบ่งเซลล์ของแบคทีเรียรูปทรงกลมแกรมบวก เช่น *Streptococcus faecalis* (รูปที่ 4-2) ในการแบ่งเซลล์มีโซโซมซึ่งมีสารนิวเคลียร์ (nuclear material) ติดอยู่จะยึดติดกับเยื่อเซลล์แบคทีเรียด้วยเยื่อบาง ๆ ตรงบริเวณที่ผนังเซลล์ใหม่มีรอยเจาะเข้าไป บริเวณนี้จะเป็นตำแหน่งที่มีการสังเคราะห์ผนังเซลล์ใหม่และเกิดการแบ่งเซลล์หลังจากที่ผนังเซลล์ใหม่มีความยาวเพิ่มขึ้น สารนิวเคลียร์หรือนิวเคลียสที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นและแยกออกเป็นสองนิวเคลียสแล้วติดอยู่กับมีโซโซมซึ่งยึดติดกับเยื่อเซลล์แบคทีเรียด้วยเยื่อบาง ๆ ตรงบริเวณที่ผนังเซลล์มีลักษณะโป่งออก บริเวณนี้เป็นตำแหน่งรอยต่อของผนังเซลล์เดิมและผนังเซลล์ใหม่ มีโซโซมเดิมจะหายไป ต่อมาผนังเซลล์ใหม่ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นจะยาวออกไปเพื่อแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์ ขณะที่มีการแบ่งเซลล์นี้เอ็นไซม์อะมิเดส (amidase) จะทำหน้าที่เร่งให้บอนด์ที่เชื่อมโพลิแซคคาไรด์และเปปไทด์ตรงส่วนโมเลกุลกรดเอ็นอะเซ็ททิลมิวรามิกและแอลอะลานีนแตกออก ทำให้โพลิแซคคาไรด์แยกออกจากเปปไทด์แล้วได้เซลล์สองเซลล์แยกออกจากกันเมื่อเกิดผนังกั้นแบ่งเซลล์สมบูรณ์

วิธีตรวจสอบการเจริญ

วิธีตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทำได้ด้วยการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมด (total count) โดยตรง นับเฉพาะจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ (viable count) ตรวจสอบค่าความขุ่น (turbidity) ของสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่ ตรวจสอบผลิตผลของกระบวนการเมตาบอลิซึม ตรวจสอบน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรีย (bacterial population) ตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึมและตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีของประชากรแบคทีเรีย เช่น ปริมาณ DNA และปริมาณไนโตรเจนเป็นต้น วิธีการตรวจสอบดังกล่าวมาแล้วนี้มักตรวจสอบในระยะเวลาต่าง ๆ กัน สำหรับผลที่ได้จากการ

ตรวจสอบจะแตกต่างกันคือ บางวิธีจะบอกถึงปริมาณการเจริญของแบคทีเรียแต่ไม่เกี่ยวข้องกับจำนวนเซลล์ ส่วนบางวิธีจะบอกถึงปริมาณการเจริญของแบคทีเรียและจำนวนเซลล์

ผลของการตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียที่บอกถึงจำนวนเซลล์สามารถนำมาศึกษาวัฏจักรการเจริญ (growth cycle) การเจริญทั้งหมด (total growth) และระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์เพื่อเพิ่มจำนวนขึ้นเป็น 2 เท่า ซึ่งนิยมพูดกันในรูปของเจนเนอเรชั่นไทม์ (generation time) การเจริญทั้งหมด (G) มีค่าเท่ากับผลต่างของจำนวนแบคทีเรียในตอนเริ่มต้น (x_o) กับจำนวนแบคทีเรียที่ได้สูงสุด (x_{max}) ดังสมการที่ 4-1 ส่วนเจนเนอเรชั่นไทม์ (g) ซึ่งเป็นนาทีสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4-2 เมื่อให้ a เท่ากับจำนวนแบคทีเรียตอนเริ่มต้น b เท่ากับจำนวนแบคทีเรียหลังจาก n เจนเนอเรชั่น n เท่ากับจำนวนเจนเนอเรชั่นและ t เท่ากับเวลาเป็นนาทีสำหรับ n เจนเนอเรชั่น

$$G = x_{max} - x_o \qquad (4\text{-}1)$$

$$g = \frac{t \log 2}{\log b - \log a} \qquad (4\text{-}2)$$

วิธีนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดโดยตรง เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตอยู่และตายแล้วซึ่งทำได้โดยใช้วิธีดังต่อไปนี้

1. วิธีของ Breed ทำโดยการนำสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียซึ่งทราบปริมาตรแน่นอนมาสเมียร์ (smear) ลงในเนื้อที่จำกัดบนสไลด์ ย้อมสีเซลล์แบคทีเรียแล้วนำมานับจำนวนเซลล์แบคทีเรียในแต่ละฟิลด์ (field) หลาย ๆ ฟิลด์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ คำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งฟิลด์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่จากสมการที่ 4-3

no.of bact./ml.of suspension

$$= \text{avg.no.of bact./field} \times \frac{1\text{ml}}{\text{vol.of susp.}} \times \frac{\text{area of smear}}{\text{area of field}} \qquad (4\text{-}3)$$

2. วิธีใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์สไลด์ (haemacytometer slide) ทำโดยการนำสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียหยดลงที่ขอบฮีมาไซโตมิเตอร์สไลด์ตรงบริเวณที่มีโคเวอร์สลิป (cover slip) ปิดอยู่ แล้วนำไปนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียให้ทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในแต่ละช่องของฮีมาไซโตมิเตอร์หลาย ๆ ช่อง ช่องแต่ละช่องของฮีมาไซโตมิเตอร์ที่นับจำนวนเซลล์แบคทีเรียนี้มีลักษณะเป็นรูปสี่เหลี่ยมจัตุรัสซึ่งมีเส้น 3 เส้น ที่ขนานกันล้อมรอบและภายในมีช่องเล็ก ๆ อีก 16 ช่อง ต่อมาคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบคทีเรียในหนึ่งช่อง แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่จากสมการที่ 4-4 (1 ลูกบาศก์เซนติเมตรหรือ 1 มิลลิลิตร มีค่าเท่ากับ 1,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร)

no.of.bact./ml.of suspension

$$= \frac{\text{avg.no.of bact./squar}}{\text{vol.of squar (cu.mm.)}} \times 1{,}000 \text{ cu.mm.} \qquad (4\text{-}4)$$

การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยวิธีนี้ใช้ได้ผลดีกับสารละลายที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียเหมาะสม ดังนั้นถ้าสารละลายมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่สูงควรทำให้จำนวนเซลล์เจือจางลงแล้วจึงทำการนับจำนวน ในกรณีนี้การคำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่จะต้องนำค่าปัจจัยการเจือจางลง (dilution factor) มาคูณด้วย เช่น ถ้าฮีมาไซโตมิเตอร์สไลด์ 1 ช่อง มีปริมาตร $= \frac{1}{250}$ ลูกบาศก์มิลลิเมตร และความเจือจางในอัตราส่วน $1 : 10^3 (10^{-3})$ มีค่าเฉลี่ยจำนวนแบคทีเรียในหนึ่งช่องเท่ากับ 60 เซลล์ ดังนั้นจำนวนเซลล์แบคทีเรียในสารละลายซึ่งไม่ได้ทำให้เจือจางลงมีค่าเท่ากับ $60 \times 250 \times 1{,}000 \times 10^3$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร

วิธีนับเฉพาะจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ การนับเฉพาะจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ทำได้โดยวิธีตรง (direct method) และวิธีอ้อม (indirect method) ดังต่อไปนี้

1. วิธี MPN (most probable number) เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียวิธีอ้อมและจำนวนเซลล์ที่นับได้จะเป็นจำนวนอย่างประมาณ วิธีนี้เหมาะสมกับสารตัวอย่าง (specimen) หรือสารละลายที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่น้อยและเป็นประชากรแบคทีเรียที่มีกิจกรรมทางชีวเคมีบางอย่างโดยเฉพาะ เช่น การสร้างอินโดล (indole) การเฟอร์เมนต์ (ferment) แล็คโตส เป็นต้น สารตัวอย่างที่นิยมนำมาตรวจสอบจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ได้แก่ น้ำดื่ม น้ำโสโครก น้ำนม และอาหารเหลวต่าง ๆ

ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย นำสารตัวอย่างมาทำให้มีความเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ เช่น 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$, และ $1:10^4$ เป็นต้น ต่อมานำสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้เจือจางและสารตัวอย่างที่ทำให้มีความเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ มาใส่ลงในหลอดแก้วซึ่งมีอาหารเพาะเชื้อที่เหมาะสมจำนวน 10 มิลลิลิตรบรรจุอยู่ โดยทำการใส่ลงไปหลอดละ 1 มิลลิลิตร ทำอัตราส่วนละ 5 หลอดหรือ 3 หลอด สำหรับสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้เจือจางทำการใส่ลงไปหลอดละ 10 มิลลิลิตร และ 1 มิลลิลิตร ทำปริมาตรละ 5 หลอดหรือ 3 หลอด ในกรณีที่ใส่ลงไป 10 มิลลิลิตร อาหารเพาะเชื้อที่อยู่ในหลอดแก้วต้องมีความเข้มข้นเป็น 2 เท่าของอาหารเพาะเชื้อปกติ นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม ประมาณ 3 วัน นับจำนวนหลอดที่มีการเจริญของแบคทีเรียแต่ละปริมาตรและแต่ละอัตราส่วน นำค่าการเจริญของแบคทีเรีย 3 อัตราส่วนมาเป็นจำนวนซิกนิฟิแคนต์ (significant number) ซึ่งได้มาด้วยการอ่านค่าจากความเจือจางน้อยที่สุดที่มีจำนวนหลอดแสดงการเจริญของแบคทีเรียมากที่สุดกับการอ่านค่าจากความเจือจางมากที่สุดที่มีจำนวนหลอดแสดงการเจริญของแบคทีเรียน้อยที่สุด เช่น หลอดอาหารซึ่งใส่สารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้เจือจาง 10 มิลลิลิตรและ 1 มิลลิลิตรมีการเจริญของแบคทีเรียปริมาตรละ 5 หลอด หลอดอาหารซึ่งใส่สารตัวอย่างที่ทำให้มีความเจือจางในอัตราส่วน 1:10, $1:10^2$, $1:10^3$ และ $1:10^4$ มีการเจริญของแบคทีเรีย 5, 5, 3 และ 1 หลอดตามลำดับ ค่าการเจริญของแบคทีเรีย 3 อัตราส่วนที่เป็นจำนวนซิกนิฟิแคนต์เท่ากับ

531 นำจำนวนซิกนิฟิแคนต์ 531 นี้ไปอ่านหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียจากตาราง MPN สำหรับอัตราส่วนละ 5 หลอด (กรณีทำ 3 หลอดใช้ตาราง MPN สำหรับอัตราส่วนละ 3 หลอด) แล้วนำจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่อ่านได้จากตาราง MPN ไปคำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่

2. วิธีของ Harris และ Sommers เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียวิธีอ้อมซึ่งทำได้สะดวก ประหยัดทั้งเวลา อาหารเพาะเชื้อและจานเพาะเชื้อ วิธีนี้สามารถนำมาใช้ประมาณจำนวนแบคทีเรียซึ่งมีอยู่ในสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียอยู่ตั้งแต่จำนวน 58 เซลล์ต่อมิลลิลิตรจนถึงจำนวนสูงมาก ๆ ได้

ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทำโดยเทอาหารลงบนจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็ง ขีดใต้จานเพาะเชื้อเพื่อแบ่งอาหารเพาะเชื้อออกเป็น 4 ส่วนเท่า ๆ กัน ต่อมาทำการเจาะอาหารเพาะเชื้อแต่ละส่วนให้มีวงกลม 4 วง หลังจากนั้นใช้ปิเปตต์ (pipette) ขนาด 0.1 มิลลิลิตรดูดสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้เจือจางและสารตัวอย่างที่ทำให้มีความเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ มาใส่ลงอาหารเพาะเชื้อวงกลมละ 0.01 มิลลิลิตร ทำอัตราส่วนละ 8 วงกลม นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม ประมาณ 3 วัน นับจำนวนวงกลมของแต่ละอัตราส่วนที่มีการเจริญของแบคทีเรีย แล้วนำค่าที่นับได้ไปอ่านหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่จากตาราง

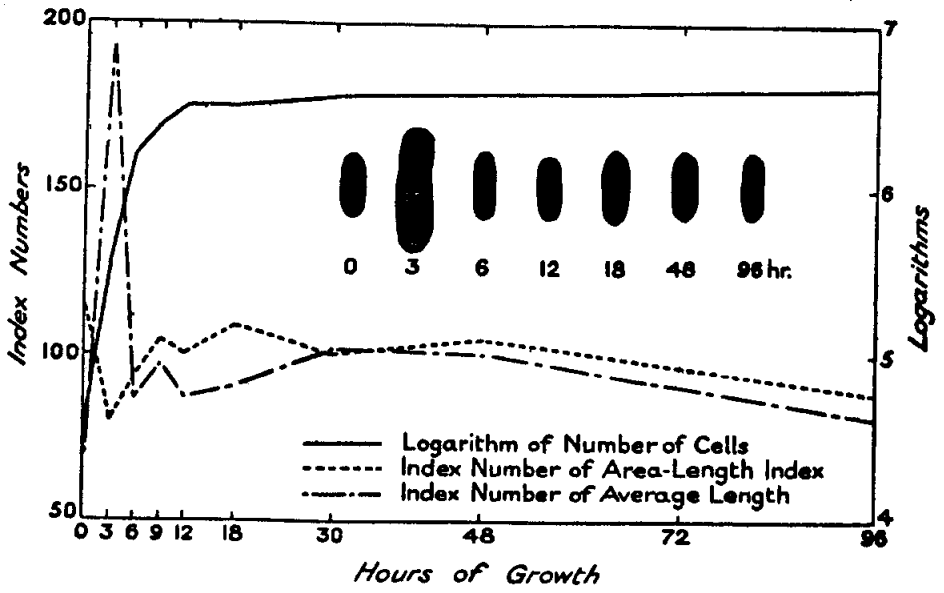
3. วิธีพอร์เพลต (pour plate) หรือวิธีเพลตเคาต์ (plate count) เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียวิธีตรงซึ่งนิยมใช้กันทั่วไป วิธีนี้อาศัยหลักที่ว่า แบคทีเรียหนึ่งเซลล์เมื่ออยู่ในอาหารแข็งที่เหมาะสมจะเจริญเป็นหนึ่งโคโลนี ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ทำโดยใช้ปิเปตต์ดูดสารตัวอย่างที่ไม่ได้ทำให้เจือจางและสารตัวอย่างที่ทำให้มีความเจือจางในอัตราส่วนต่าง ๆ อัตราส่วนละ 1 มิลลิลิตร ใส่จานเพาะเชื้อทำอัตราส่วนละ 3 จาน เทอาหารเพาะเชื้อที่หลอมเหลวและยังอุ่นอยู่ลงไปเขย่าจานเพาะเชื้อ ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนอาหารเพาะเชื้อแข็ง

นำไปบ่มที่อุณหภูมิเหมาะสม ประมาณ 3 วัน นับจำนวนแบคทีเรียเฉพาะจานที่มีโคโลนีอยู่ระหว่าง 30-300 โคโลนี ซึ่งถือว่านับได้ง่ายและค่าที่ได้ผิดพลาดน้อย หลังจากนั้นนำค่าที่นับได้ไปหาผลเฉลี่ย แล้วคำนวณหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อมิลลิลิตรของสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่

วิธีตรวจสอบค่าความขุ่น เป็นวิธีนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดคือทั้งที่มีชีวิตอยู่และตายแล้วโดยอ้อม ด้วยการอาศัยหลักที่ว่า เมื่อแสงส่องไปในสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่ก็จะหักเหออกไปทำให้มีความขุ่น และเมื่อสารละลายมีจำนวนเซลล์แบคทีเรียมากขึ้นแสงก็จะหักเหออกไปเพิ่มขึ้นทำให้มีความขุ่นมากขึ้น

ในการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย ทำโดยนำสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่มาวัดความขุ่นหรือความทึบแสง (optical density) ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน โดยใช้สเปคโตร-โฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) แล้วหาปริมาณการเจริญของแบคทีเรียจากการเพิ่มค่าความขุ่นหรือค่าความทึบแสง และหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดที่เพิ่มขึ้นได้ด้วยการนำค่าความขุ่นหรือค่าความทึบแสงที่วัดได้นี้ไปอ่านหาจำนวนเซลล์แบคทีเรียต่อหนึ่งหน่วยปริมาตรของสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่จากกราฟอ้างอิงมาตรฐาน (standard reference curve) วิธีการนี้สามารถทำได้สะดวกรวดเร็วและเหมาะสมกับสารตัวอย่างหรือสารละลายที่มีจำนวนเซลล์แบคทีเรียปานกลางหรือค่อนข้างมาก จัดเป็นวิธีการที่ประมาณปริมาณการเจริญและจำนวนเซลล์ของแบคทีเรียเท่านั้น ทั้งนี้เนื่องจากว่าขนาดของเซลล์แบคทีเรียแต่ละชนิดเปลี่ยนแปลงไปตามอายุดังรูปที่ 4-3 และแบคทีเรียชนิดเดียวกันเมื่อเจริญในสภาวะแวดล้อมต่างกันก็จะมีขนาดไม่เท่ากัน ดังรูปที่ 4-4 ซึ่งทำให้ค่าความขุ่นหรือค่าความทึบแสงต่างกันด้วย

วิธีตรวจสอบน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรีย เป็นการประมาณการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยอ้อม ทำได้โดยตรวจสอบการเพิ่มน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรีย ซึ่งต้องใช้เวลาในการทำมากและผลที่ได้จะบอกเฉพาะปริมาณการเจริญของแบคทีเรียอย่างประมาณ ทั้งนี้เนื่องจากว่าขนาดของแบคทีเรียแต่ละชนิดจะเปลี่ยนแปลงไปตามอายุ และแบคทีเรียชนิด



รูปที่ 4-3 ขนาดของเซลล์ *Escherichia coli* เมื่อมีอายุต่างกัน

เดียวกัน เมื่อเจริญในสภาวะแวดล้อมต่างกันก็จะมีขนาดไม่เท่ากัน (รูปที่ 4-3 และ 4-4) ซึ่งทำให้ค่าน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรียเปลี่ยนแปลงไปด้วย

วิธีตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ การตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม เหมาะสมกับแบคทีเรียพวกแอโรบและแฟคคัลเตติบแอนแอโรบ วิธีการนี้อาศัยหลักที่ว่า การเจริญของแบคทีเรียมีความสัมพันธ์กับการนำออกซิเจนไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม คือ ในการเจริญต้องมีการนำออกซิเจนไปใช้และเมื่อมีการเจริญมากขึ้นปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ก็จะเพิ่มมากขึ้นด้วย เครื่องมือที่นิยมนำมาใช้ตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้หรือตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียวิธีนี้ ได้แก่ เรสพิโรมิเตอร์ของ Gilson (Gilson respirometer)

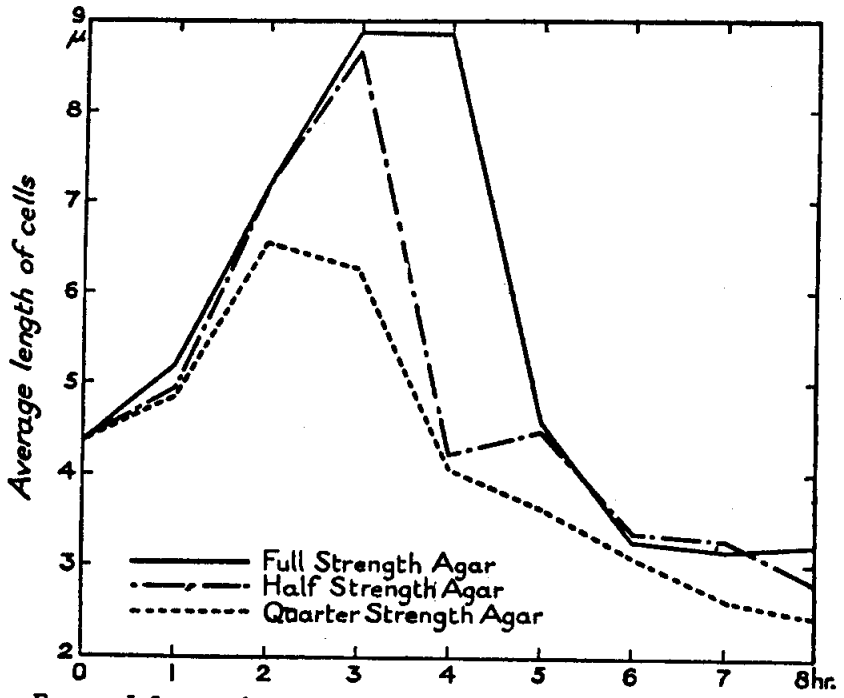


FIG. 3.—Influence of concentration of nutrients on average size of cells of *B. megatherium*[1]

รูปที่ 4-4 ขนาดเฉลี่ยของเซลล์ *Bacillus megatherium* เมื่อเจริญบนอาหารเพาะเชื้อที่มีความเข้มข้นต่างกัน

วิธีตรวจสอบส่วนประกอบทางเคมีของประชากรแบคทีเรีย เป็นวิธีตรวจสอบการเจริญโดยทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารซึ่งเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของเซลล์ เช่น ปริมาณไนโตรเจนและปริมาณ DNA วิธีนี้ต้องใช้เวลาในการทำมากและเป็นการประมาณการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยอ้อม ด้วยเหตุผลเช่นเดียวกับวิธีตรวจสอบน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรีย

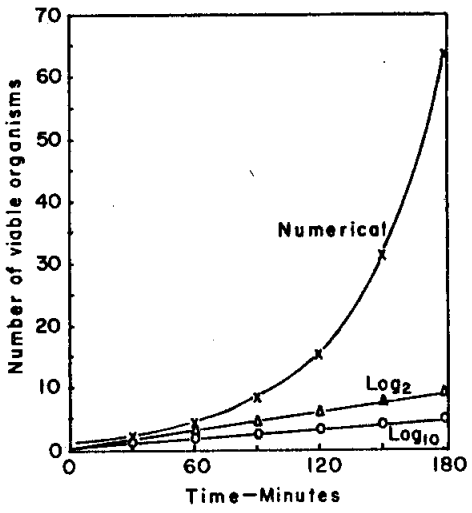
วิธีตรวจสอบผลิตผลของกระบวนการเมตาบอลิซึม วิธีนี้จะทำการตรวจสอบเฉพาะผลิตผลที่สำคัญของกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรียซึ่งต้องการประมาณปริมาณการเจริญ โดยอาศัยหลักที่ว่า เมื่อแบคทีเรียเจริญจะได้ผลิตผลของกระบวนการเมตาบอลิซึมและผลิตผลจะเพิ่มขึ้นเมื่อแบคทีเรียมีการเจริญมากขึ้น

วัฏจักรการเจริญ (growth cycle)

แบคทีเรียที่เจริญอยู่ในอาหารซึ่งทำการเพาะเลี้ยงแบบคงที่ (batch culture) จะมีการแบ่งเซลล์ดังต่อไปนี้คือ 1 2 4 8 การเจริญดังกล่าวสามารถแสดงในเทอมของ 2 ยกกำลัง ดังต่อไปนี้ คือ 1x2 = 2, 1x2x2 หรือ 2^2 = 4 และ 1x2x2x2 หรือ 2^3 = 8 เป็นต้น ซึ่งจะเห็นว่าจำนวนเซลล์ทั้งหมดจะขึ้นอยู่กับจำนวนเซลล์เริ่มต้นและจำนวนเจนเนอเรชั่น ดังนั้นถ้า a เท่ากับจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มีอยู่ในอาหาร n เท่ากับจำนวนเจนเนอเรชั่นและ b เท่ากับจำนวนเซลล์ทั้งหมด b จะมีค่าดังสมการที่ 4-5, จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียพบว่า ค่าของ b ตามสมการที่ 4-5 นี้จะเป็นไปได้ในระยะเวลาที่กำหนดซึ่งแบคทีเรียมีการแบ่งเซลล์พร้อม ๆ กันทุกเซลล์

$$b = a \times 2^n \qquad (4-5)$$

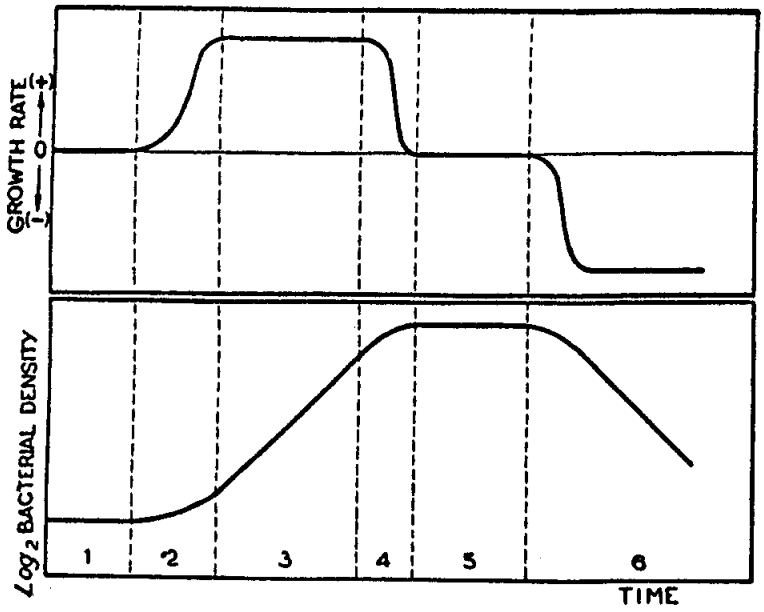
การศึกษาการเจริญของแบคทีเรียนิยมใช้อาหารเหลวมาทำการเพาะเลี้ยงแบบคงที่และนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ในระยะเวลาต่าง ๆ กัน ต่อมานำจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้ในระยะเวลาต่าง ๆ ไปเขียนกราฟแสดงการเจริญของแบคทีเรีย โดยเปลี่ยนจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้ให้อยู่ในเทอมของล็อกด้วยการคำนวณ หรือใช้กระดาษซีมิล็อก (semilog paper) เปลี่ยนจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้ ให้อยู่ในเทอมของล็อกโดยตรง เพื่อทำให้ได้กราฟเป็นเส้นตรง ดังรูปที่ 4-5



รูปที่ 4-5 การเจริญของแบคทีเรีย เมื่อใช้จำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้โดยตรงและเมื่อเปลี่ยนจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่นับได้ ให้อยู่ในเทอมของล็อก

การเจริญของแบคทีเรียในรูปที่ 4-5 นี้ แบคทีเรียทุกเซลล์มีเจนเนอเรชั่นไทม์หรืออัตราการเจริญคงที่ แต่จากการศึกษาการเจริญของแบคทีเรียพบว่าแบคทีเรียทุกเซลล์มีเจนเนอ-เรชั่นไทม์หรืออัตราการเจริญคงที่ชั่วระยะเวลาหนึ่งเท่านั้น หลังจากนั้นก็จะเปลี่ยนแปลงไปดังรูปที่ 4-6 จากวัฏจักรการเจริญแบ่งการเจริญของแบคทีเรียออกได้เป็น 6 เฟซด้วยกันคือ แล็กเฟซ (lag phase) แอคซีลีเรชั่นเฟซ (acceleration phase) ล็อกเฟซหรือเอ็กโพเน็น-

เทียลเฟซ รีตาร์เดชั่นเฟซ (retardation phase) หรือดีซีลีเรชั่นเฟซ (deceleration) phase) สเตชั่นนารี่เฟซและเด็ธเฟซ (death phase)

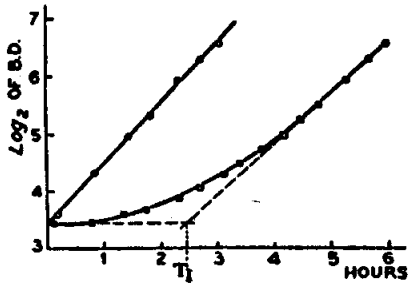


รูปที่ 4-6 (ก) อัตราการเจริญของแบคทีเรีย

(ข) วัฏจักรการเจริญของแบคทีเรีย

แล็กเฟซเป็นระยะแรกสุดของการเจริญของแบคทีเรีย ซึ่งในวัฏจักรการเจริญอาจจะมีหรือไม่มีหรือมีในระยะเวลาอันสั้นหรือมีในระยะเวลานานพอควร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับจำนวนและอายุของแบคทีเรียที่อินอคคูเลต (inoculate) ลงไป และสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย เมื่อจำนวนเซลล์ที่อินอคคูเลตลงไปเพิ่มขึ้นจะทำให้ระยะแล็กเฟซสั้นลง การอินอคคูเลตแบคทีเรียที่มีอายุมากลงไปในอาหารใหม่จะทำให้มีระยะแล็กเฟซยาวมากกว่าการอินอคคูเลตแบคทีเรียที่มีอายุน้อย สำหรับสภาวะแวดล้อม การมีโลหะที่เป็นพิษ เช่น เงินอยู่เล็กน้อยในอาหารที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย และการที่แบคทีเรียไม่สามารถนำอาหารใหม่ไปใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม

ได้ทันทีจะทำให้มีระยะแล็ก เฟซ แต่ในทางตรงกันข้ามแบคทีเรียจะไม่มีระยะแล็ก เฟซ เมื่อสภาวะ-แวดล้อมที่ทำการ เพาะ เลี้ยงนั้นไม่มีไลทะที่ เป็นพิษปนอยู่และแบคทีเรียสามารถนำอาหารใหม่ไปใช้ในกระบวนการ เมตาบอลิซึมได้ทันที (รูปที่ 4-7) ในระยะแล็ก เฟซนี้แบคทีเรียจะปรับตัวให้ เข้ากับสภาวะแวดล้อม โดยทำให้ เอ็นไซม์ที่อยู่ในสภาพไม่ว่องไว เปลี่ยนไปอยู่ในสภาพว่องไว หรือสร้าง อินดิวซิ เบิ้ล เอ็นไซม์ (inducible enzyme) ขึ้น เพื่อทำให้สามารถนำอาหารไปใช้ในกระบวนการ เมตาบอลิซึมได้ นอกจากนี้การมีระยะแล็ก เฟซของแบคทีเรียอาจจะ เนื่องมาจาก เซลล์ได้รับความ เสียหาย จากสภาวะแวดล้อม เดิมซึ่งมีการสะสมผลิตผลของกระบวนการ เมตาบอลิซึม หลังจากที่แบคทีเรียปรับตัว เข้ากับสภาวะแวดล้อมได้แล้ว เซลล์ซึ่งไม่มีการแบ่ง เซลล์หรือไม่มีอัตราการ เจริญก็ เข้าสู่ระยะที่ 2 ของวัฏจักรการ เจริญซึ่ง เรียกว่า แอคซีลี เรชั่น เฟซ ระยะนี้แบคทีเรียมีการแบ่ง เซลล์หรือมีอัตราการ เจริญ เพิ่มขึ้น ในวัฏจักรการ เจริญของแบคทีเรียไม่มีระยะดังกล่าว ถ้าแบคทีเรียที่ถูกอินอคคู เลตลงไปในอาหารใหม่สามารถนำอาหารไปใช้ในกระบวนการ เมตาบอลิซึมได้ทันที ต่อมาแบคทีเรียที่อยู่ในระยะแอคซีลี เรชั่น เฟซก็จะ เข้าสู่ระยะล็อก เฟซ (รูปที่ 4-6)



รูปที่ 4-7 การ เจริญของ *Escherichia coli* ในอาหารใหม่

(B.D. = bacterial density, o—o = glucose,

□—□ = xylose)

ล็อก เฟซนับ เป็นระยะที่ 3 ของวัฏจักรการ เจริญ ระยะนี้แบคที เรียจะมีอัตราการ เจริญสูงสุดและคงที่ ซึ่งจากการศึกษาพบว่าอัตราการแบ่ง เซลล์หรืออัตราการ เจริญจะแตกต่างกันในแบคที เรียแต่ละชนิด เช่น *Escherichia coli* มี เจน เนอ เรชั่นไทม์ 20 นาที *Mycobacterium tuberculosis* มี เจน เนอ เรชั่นไทม์หลาย ๆ ชั่วโมง เป็นต้น ค่า เจน เนอ เรชั่นไทม์ดังกล่าว เป็นค่าโดย เฉลี่ยของประชากรแบคที เรีย ทั้งนี้ เพราะว่าแบคที เรียแต่ละ เซลล์ไม่ได้ใช้ เวลาในการแบ่ง เซลล์ เท่า ๆ กัน แต่จะใช้ เวลาในการแบ่งมากกว่าหรือน้อยกว่ากัน เล็กน้อย สำหรับขนาดของแบคที เรียซึ่งใหญ่กว่าปกติในระยะแล็ก เฟซจะ เปลี่ยนกลับมามีขนาดตามปกติ

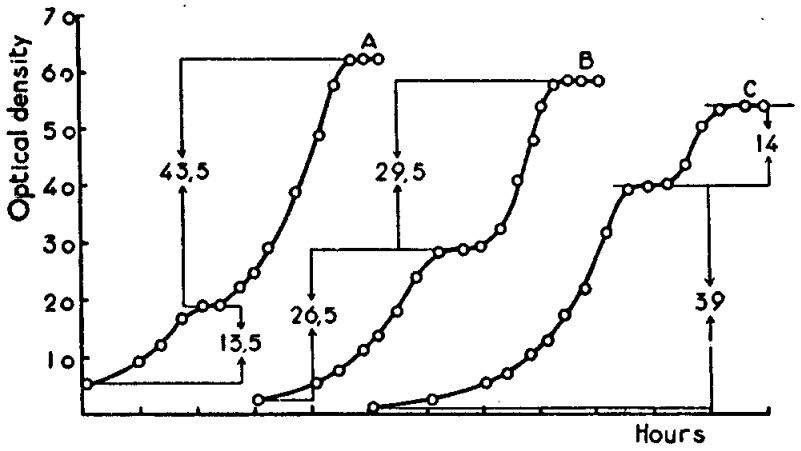
หลังจากที่แบคที เรีย เจริญอยู่ในระยะล็อก เฟซชั่วระยะ เวลาหนึ่งแล้วการ เจริญของแบคที เรียก็จะ เข้าสู่ระยะที่ 4 ของวัฏจักรการ เจริญซึ่ง เรียกว่า รีดาร์ เดชั่น เฟซหรือดีซีลี เรชั่น เฟซ ในระยะนี้แบคที เรียจะมีอัตราการ เจริญลดลง คือ ต้องใช้ เวลาในการแบ่ง เซลล์แต่ละครั้งมากขึ้น ทำให้จำนวน เซลล์ที่ เพิ่มขึ้น เรื่อย ๆ นั้น มีการ เพิ่มช้ากว่าระยะล็อก เฟซ สำหรับสา เหตุที่ทำให้แบคที เรียมีอัตราการ เจริญลดลง เนื่องจากว่า มีการสะสมผลิตผลของกระบวนการ เมตาบอลิซึมที่ เป็นอันตรายต่อ เซลล์ เพิ่มขึ้น รวมทั้งอาหารและปัจจัยสำหรับการ เจริญที่ เซลล์สามารถนำไปใช้ในกระบวนการ เมตาบอลิซึมลดลง ต่อมาแบคที เรียที่ เจริญในระยะรีดาร์ เดชั่น เฟซก็ เข้าสู่ระยะที่ 5 และ 6 ของวัฏจักรการ เจริญที่ เรียกว่า ส เตชั่นนารี่ เฟซและ เด็ธ เฟซตามลำดับ (รูปที่ 4-6)

ส เตชั่นนารี่ เฟซ เป็นระยะที่แบคที เรียมีจำนวน เซลล์สูงสุดและมีอัตราการ เจริญ เท่ากับอัตราการตาย ดังนั้นจำนวน เซลล์แบคที เรียในระยะนี้คงที่ซึ่งทำให้ได้กราฟ เป็น เส้นตรงขนานกับแกน เอ็กซ์ (x) สำหรับสา เหตุที่ทำให้แบคที เรียมีอัตราการตาย ได้แก่ อาหารและปัจจัยที่สำคัญสำหรับการ เจริญบางชนิดหมด รวมทั้งมีการสะสมผลิตผลของกระบวนการ เมตาบอลิซึมที่ เป็นอันตรายต่อ เซลล์ เช่น streptococci และ lactobacilli สร้างกรด แบคที เรียบางชนิดสร้าง เพอรอกไซด์ (peroxide) ซึ่ง เป็นอันตรายต่อ เซลล์แต่ไม่สามารถสร้าง เอ็นไซม์คะตา เลส เป็นต้น

เด็ธ เฟช เป็นระยะที่อัตราการ เจริญของแบคที เรียมีค่า เป็นลบ ดังนั้นจำนวน เซลล์แบคที เรียที่มีชีวิตจึงลดลง สำหรับสา เหตุที่ทำให้แบคที เรียมีวัฏจักรการ เจริญในระยะนี้ ได้แก่ มีการสะสมผลิตผลของกระบวนการ เมตาบอลิซึมที่ เป็นอันตรายต่อ เซลล์มาก อาหารและปัจจัยที่สำคัญสำหรับการ เจริญบางชนิดหมดและมีความร้อน เกิดขึ้น เนื่องจากพลังงานที่ได้ในกระบวนการ เมตาบอลิซึม เปลี่ยนไป เป็นความร้อนแล้วมีผลฆ่า เซลล์แบคที เรีย

ไดออกซี่ (Diauxie)

ไดออกซี่ เป็นปรากฏการณ์ซึ่ง เกิดขึ้น เมื่อทำการ เพาะ เลี้ยงแบคที เรียในสภาวะแวดล้อมที่มีสารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด โดยมีแต่ละชนิดอยู่ในปริมาณที่จำกัดแบคที เรียจะมีวัฏจักรการ เจริญ 2 วัฏจักร ซึ่งมีการ เจริญทั้งหมด อัตราการ เจริญในระยะล็อก เฟช และระยะ เวลาของแล็ก เฟชแตกต่างกันดังรูปที่ 4-8



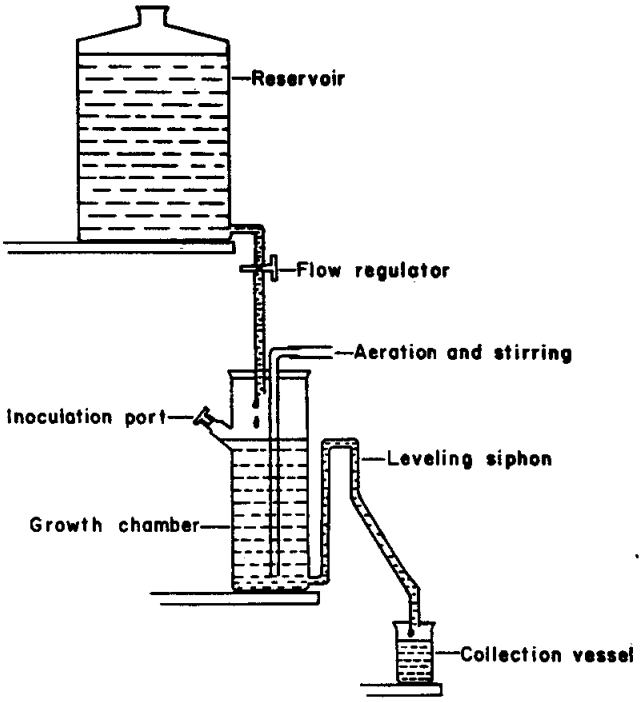
รูปที่ 4-8 การ เจริญของ *Escherichia coli* ในอาหาร เพาะ เชื้อที่มีกลูโคสและซอบิตอล เป็นแหล่งคาร์บอน

Escherichia coli ซึ่งทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีกลูโคสและซอบิตอล (sorbitol) จำกัดในปริมาณต่าง ๆ จะมีวัฏจักรการเจริญแตกต่างกัน (รูปที่ 4-8) รูประหว่างปลายลูกศรแสดงการเจริญทั้งหมดของแต่ละวัฏจักร โดยเริ่มด้วยวัฏจักรการเจริญเมื่อใช้กลูโคสเป็นแหล่งคาร์บอน แล้วตามด้วยวัฏจักรการเจริญเมื่อใช้ซอบิตอลเป็นแหล่งคาร์บอน

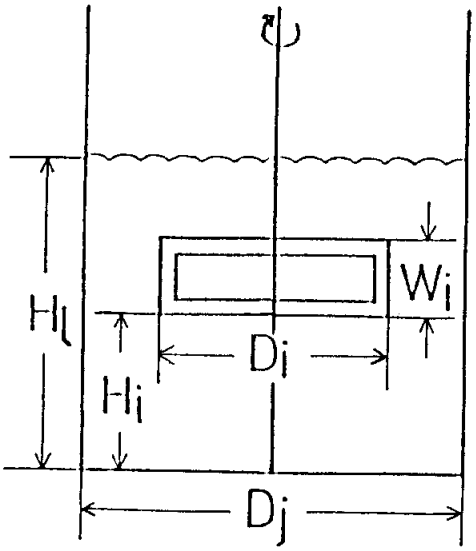
การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous culture)

การเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องเป็นการเพาะเลี้ยงเพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในระยะล็อกเฟสตลอดเวลา ทั้งนี้เนื่องจากว่า ระยะนี้เป็นระยะที่แบคทีเรียมีอัตราการเจริญและกิจกรรมของเมตาบอลิซึ่มสูงสุด หลักในการทำก็คือ ป้องกันมิให้เกิดสาเหตุต่าง ๆ ที่เป็นตัวการทำให้แบคทีเรียเข้าสู่สเตชั่นนารี่เฟส โดยการใส่อาหารเหลวใหม่เข้าไปในอาหารเหลวที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ และในขณะเดียวกันทำการนำอาหารเหลวที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียอยู่ออกไปในปริมาตรที่เท่ากัน เพื่อทำให้ความหนาแน่นของประชากรแบคทีเรียและปริมาณอาหารที่มีอยู่ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียคงที่ รวมทั้งลดปริมาณผลิตผลของกระบวนการเมตาบอลิซึ่มซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบต่อเนื่อง ต้องนำแบคทีเรียมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเหลวแบบคงที่จนกระทั่งแบคทีเรียเจริญอยู่ในระยะล็อกเฟส แล้วจึงนำอาหารเหลวที่มีแบคทีเรียเจริญอยู่ในระยะล็อกเฟสนี้มาทำการเพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่องต่อไป

นักจุลชีววิทยามีความสนใจการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบต่อเนื่องมากและได้คิดค้นเครื่องมือต่าง ๆ เพื่อนำมาทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบนี้ เช่น เทอร์บิโดสแตต (turdidostat) เค็มโมสแตต (chemostat) และเครื่องหมัก (fermentor) ดังรูปที่ 4-9 แล้วนำมาใช้ในการศึกษาคุณสมบัติทางสรีระวิทยาของแบคทีเรียและอุตสาหกรรมการหมักสารต่าง ๆ



รูปที่ 4-9 แผนผังของเคีโมสแตต



รูปที่ 4-10 แผนผังของเครื่องหมัก D_j = เส้นผ่าศูนย์กลางของเครื่องหมัก D_i = เส้นผ่าศูนย์กลางของใบพัด H_l = ความลึกของอาหารเหลว H_i = ระยะห่างระหว่างใบพัดกับก้นเครื่องหมักและ W_i = ความกว้างของใบพัด

สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญ

สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมีหลายชนิดซึ่งแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ สิ่งแวดล้อมทางด้านเคมีและสิ่งแวดล้อมทางด้านฟิสิกส์ การเปลี่ยนแปลงการเจริญของแบคทีเรียอาจจะเกิดจากสิ่งแวดล้อมชนิดใดชนิดหนึ่งหรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมทั้ง 2 ชนิดปนกัน และเมื่อสิ่งแวดล้อมชนิดใดชนิดหนึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงก็จะมีผลต่อสิ่งแวดล้อมชนิดอื่น ๆ ด้วย

สิ่งแวดล้อมทางด้านเคมี สิ่งแวดล้อมทางด้านเคมี ได้แก่ สารเคมีต่าง ๆ ซึ่งแบ่งออกได้เป็น 3 พวก พวกแรกเป็นสารเคมีทั่ว ๆ ไป ได้แก่ น้ำ อาหารอินทรีย์ อาหารอนินทรีย์ ปัจจัยสำหรับการเจริญ ออกซิเจน และไฮโดรเจนอิออน การเปลี่ยนแปลงปริมาณของสารต่าง ๆ เหล่านี้ในสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียอาจจะทำให้แบคทีเรียเจริญดีขึ้นหรือเสื่อมลง พวกที่สองเป็นสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือฆ่าแบคทีเรีย (antibacterial compound) ได้แก่ โลหะหนัก เฮโลเจน (halogen) ดิสอินเฟ็กแตนต์ (disinfectant) และสารเคมีที่ใช้ในการบำบัดโรค (chemotherapeutic agent) ส่วนพวกที่สามเป็นสารเคมีที่ไม่มีผลใด ๆ ต่อการเจริญ เช่น อะการ์และซิลิกาเจล (selica gel) ซึ่งเป็นตัวการทำให้อาหารเพาะเชื้อแข็งเท่านั้น

สารเคมีแต่ละชนิดมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียต่างกัน และสารเคมีที่เป็นอาหารของแบคทีเรียบางชนิดอาจจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เช่น ฟีนอล (phenol) ซึ่งปกติเป็นสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียบางชนิดสามารถนำไปใช้เป็นอาหารได้ นอกจากนี้สารเคมีชนิดเดียวกันเมื่อมีอยู่ในสภาวะแวดล้อมปริมาณต่าง ๆ กันก็จะมีหน้าที่ไม่เหมือนกัน เช่น น้ำตาลซึ่งมีอยู่ในสับสเตรตระหว่าง 0.5 - 2% จะเป็นอาหารแต่ถ้ามีอยู่ระหว่าง 20 - 40% จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด เป็นต้น ในหัวข้อนี้จะกล่าวถึงสิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียเป็นอย่าง ๆ ไป

1. น้ำ น้ำเป็นสิ่งสำคัญที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากว่าแบคทีเรียต้องการน้ำเพื่อนำไปทำหน้าที่เป็นตัวทำละลาย ทำให้ปฏิกริยาทางชีวเคมีของเซลล์เกิดขึ้น เข้าไปช่วยหรือเข้าไปร่วมในการทำงานของเอ็นไซม์หลายชนิดและทำให้เซลล์คงรูปร่างเดิมอยู่ได้ไม่ว่าจะอยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นของเกลือหรือสารอื่น ๆ ต่ำกว่าหรือสูงกว่าภายในเซลล์ ปริมาณน้ำที่แบคทีเรียต้องการสำหรับการเจริญมักพูดกันในเทอมวอเตอร์แอคติวิตี (water activity) ของสับสเตรต ซึ่งสามารถคำนวณได้จากสมการที่ 4-6 เมื่อ a_w เท่ากับวอเตอร์แอคติวิตี P เท่ากับความดันไอของสารละลายและ Po เท่ากับความดันไอของน้ำ

$$a_w = \frac{P}{Po} \qquad (4\text{-}6)$$

สารละลายที่มีความเข้มข้นไม่เท่ากันจะมีค่าของ a_w แตกต่างกัน เช่น น้ำบริสุทธิ์มีค่า a_w เท่ากับ 1 สารละลายที่มีความเข้มข้น 1.0 โมล่าร์ (molar) มีค่า a_w เท่ากับ 0.9823 และเมื่อสารละลายมีความเข้มข้นสูงขึ้นมากกว่า 1.0 โมล่าร์ a_w จะมีค่าลดน้อยลง

แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีค่ามินิมั่ม a_w (minimum a_w) อ็อพติมั่ม a_w (optimum a_w) และแมกซิมั่ม a_w (maximum a_w) สำหรับการเจริญแตกต่างกัน และต้องการสับสเตรตที่มีค่า a_w สูงกว่ายีสต์และรา สับสเตรตที่จุลินทรีย์สามารถเจริญได้จะมีค่า a_w ระหว่าง 0.63 - 0.99 แต่สับสเตรตที่แบคทีเรียส่วนใหญ่เจริญได้จะมีค่า a_w ระหว่าง 0.93 - 0.99 ยกเว้นแบคทีเรียบางชนิด เช่น *Micrococcus* sp. และ *Staphylococcus* sp. สามารถเจริญในที่ซึ่งมีค่า a_w ต่ำกว่านี้ได้ เมื่อสับสเตรตที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีค่า a_w ต่ำกว่าอ็อพติมั่มจะทำให้ระยะแล็กเฟซยาวขึ้น คุณสมบัติทางสรีระวิทยาเปลี่ยนไป อัตราการเจริญและการเจริญทั้งหมดลดลง จากการเพาะเลี้ยง *Salmonella oranienburg* ในสับสเตรตที่มีค่า a_w ต่ำกว่าอ็อพติมั่ม คือ 0.97 พบว่าแบคทีเรียนี้ต้องการโปรลีนสำหรับการเจริญ

น้ำที่หนัก (heavy water) ซึ่งอาจจะเรียกว่าดิวเตอเรียมออกไซด์ (D_2O) เป็นน้ำที่ไฮโดรเจนอะตอมในโมเลกุลถูกแทนที่โดยไฮโดรเจนอะตอมที่หนักหรือดิวเตอเรียม น้ำชนิดนี้เมื่อมีอยู่ในสับสเตรตประมาณ 30% จะมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมและการเจริญของแบคทีเรียบางชนิด โดยทำให้เอ็นไซม์ทำงานช้าลงและมีผลต่อการเคลื่อนย้ายไฮโดรเจนของปฏิกริยาทางชีวเคมีต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

การที่สปอร์ของแบคทีเรียทนต่อความร้อน ความแห้งแล้งและสารเคมี เนื่องจากน้ำภายในเซลล์ถูกยึดกับสารต่าง ๆ และในการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อนน้ำจะเป็นปัจจัยสำคัญ ดังจะเห็นว่าการฆ่าแบคทีเรียโดยใช้ความร้อนแห้งต้องใช้อุณหภูมิสูงกว่าและเวลานานมากกว่าการใช้ความร้อนชื้นฆ่าแบคทีเรียชนิดเดียวกัน ส่วนการเก็บแบคทีเรียให้มีชีวิตคงอยู่ได้นานนั้น นิยมใช้วิธีซึ่งเรียกว่า ไลโอฟิไลเซชั่น (lyophilization) ทำได้โดยใส่สารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบ เช่น นมหรือซีรั่ม ลงไปในสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรียอยู่ แล้วนำไปทำให้เซลล์แห้งอย่างรวดเร็วที่อุณหภูมิต่ำกว่า-35^{o}ซ. ภายใต้ความดัน หลังจากนั้นทำการเก็บในหลอดแก้วที่ปิดสนิทซึ่งภายในมีความดันอยู่เล็กน้อย ในการทำไลโอฟิไลเซชั่นนี้ สารที่มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบซึ่งใส่ลงไปจะทำหน้าที่ป้องกันมิให้เซลล์เกิดการตายในขณะที่ทำให้แห้ง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า การทำให้เซลล์แห้งอย่างช้า ๆ ในที่มีอากาศจะเป็นอันตรายต่อเซลล์มากที่สุด

2. อาหารและปัจจัยสำหรับการเจริญ แบคทีเรียต้องการอาหารเพื่อนำไปใช้เป็นแหล่งพลังงานและแหล่งพรีเคอเซอร์สำหรับสังเคราะห์ส่วนประกอบของเซลล์ อาหารที่แบคทีเรียแต่ละชนิดสามารถนำใช้ได้นั้นจะแตกต่างกัน ส่วนปัจจัยสำหรับการเจริญแบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้เองจากสารชนิดอื่นแต่บางชนิดไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาได้เองต้องได้รับจากสภาวะแวดล้อมที่เจริญอยู่ ด้วยเหตุนี้นักจุลชีววิทยาจึงได้พยายามศึกษาถึงความต้องการอาหารและปัจจัยสำหรับการเจริญของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ แล้วนำความรู้ที่ได้จากการศึกษามาทำการผลิตอาหารสังเคราะห์สำหรับเพาะเชื้อ เพื่อนำมาใช้แยกแบคทีเรียให้เป็นเชื้อบริสุทธิ์ ทำการ

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการและศึกษาคุณสมบัติทางสรีระวิทยาของแบคทีเรีย

โดยทั่วไปอาหารสังเคราะห์ที่แบคทีเรียสามารถเจริญ มีสารประกอบเคมีซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอน ไฮโดรเจน ออกซิเจน ไนโตรเจน ฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์และปัจจัยสำหรับการเจริญ สารประกอบเคมีที่แบคทีเรียส่วนใหญ่สามารถใช้เป็นแหล่งคาร์บอนได้ดีและในขณะเดียวกันก็เป็นแหล่งไฮโดรเจนและออกซิเจนด้วย ได้แก่ เฮ็กโซส (hexose) ไซโลส (xylose) แมนนิตอล (mannitol) และกลีเซอรอล สารต่าง ๆ ดังกล่าวมานี้ต้องมีอยู่ในอาหารสังเคราะห์ประมาณ 0.2-1% จึงจะพบการเจริญของแบคทีเรีย ทั้งนี้เนื่องจากเซลล์ต้องการในปริมาณมาก สำหรับสารประกอบเคมีที่แบคทีเรียส่วนใหญ่ใช้เป็นแหล่งไนโตรเจนได้ดี ได้แก่ เกลือแอมโมเนียม ไนเตรต กรดอะมิโน ยูเรียและเปปโตน ส่วนธาตุฟอสฟอรัส ซัลเฟอร์และปัจจัยสำหรับการเจริญ แบคทีเรียที่ต้องการสำหรับการเจริญมักต้องการในรูปซัลเฟตอิออน ฟอสเฟตอิออนและวิตะมินบีตามลำดับ

คาร์บอนไดออกไซด์ซึ่งเป็นแหล่งคาร์บอนของแบคทีเรียพวกเค็มโมไลโธโทรฟนั้น แบคทีเรียพวกเค็มโมออแกโนโทรฟบางชนิดต้องการให้มีอยู่ในสภาวะแวดล้อม เพื่อการเจริญหรือการสร้างท้อกซิน เช่น *Haemophilus* sp., *Neisseria gonorrhoeae*, *Brucella abortus* และ *Streptococcus sanguis* ต้องการให้มี CO_2 ในสภาวะแวดล้อมที่ทำการเพาะเชื้อประมาณ 5-10% เพื่อทำให้การเจริญดีขึ้น จากการทดลองเพาะเชื้อ *Neisseria gonorrhoeae* ในที่ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ 10% ในที่ซึ่งมีการไหลเวียนของอากาศแบบการพา ในที่ซึ่งมีสภาวะเป็นแอนแอโรบและไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ผลปรากฏว่าในที่ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์ 10% แบคทีเรียมีจำนวนโคโลนีมากกว่าและขนาดโคโลนีใหญ่กว่าในที่ซึ่งมีการไหลเวียนของอากาศแบบการพา ส่วนในที่ซึ่งมีสภาวะเป็นแอนแอโรบและไม่มีคาร์บอนไดออกไซด์นั้นจะไม่พบการเจริญของแบคทีเรีย จากการทดลองเพาะเชื้อ *Streptococcus sanguis* ในที่ซึ่งมีคาร์บอนไดออกไซด์และไม่มี ผลปรากฏว่าเมื่อมีคาร์บอนไดออกไซด์ในสภาวะแวดล้อมที่เจริญอยู่ทำให้ระยะแล็กเฟซสั้นลง และถ้าปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์มีอยู่ในอัตราส่วนที่เหมาะสมจะไม่มีระยะแล็กเฟซ สำหรับ *Bacillus anthracis* จะสร้างท้อกซินได้ดีเมื่อบรรยากาศในสภาวะแวดล้อมที่เจริญ

อยู่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์สูงกว่าปกติ

3. ออกซิเจน ออกซิเจนมีบทบาทต่อการเจริญของแบคทีเรียพวกอ็อพลิเกตแอโรบและแฟคคัลเตตีบแอนแอโรบ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนหายใจแล้วกลายเป็นน้ำ ผลของกระบวนการนี้จะได้พลังงานซึ่งแบคทีเรียจะเก็บไว้ในรูป ATP ดังนั้นในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียแบบคงที่ จึงต้องมีการเขย่าหรืออัดอากาศที่ปราศจากเชื้อเข้าไปในสารละลายที่มีเซลล์แบคทีเรีย เพื่อทำให้แบคทีเรียเจริญดีขึ้น นอกจากนี้ในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียให้มีการเจริญทั้งหมดสูงควรทำการบ่มเชื้อที่อุณหภูมิต่ำ ทั้งนี้เพราะว่าเมื่ออุณหภูมิลดลงออกซิเจนจากอากาศจะเข้าไปอยู่ในส่วนที่เป็นน้ำของสับสเตรตได้มากขึ้น ปริมาณออกซิเจนที่มากขึ้นจะทำให้การเจริญที่อุณหภูมิต่ำ ซึ่งมีอัตราการเจริญต่ำกว่าอุณหภูมิสูงนั้นมีการเจริญทั้งหมดมากกว่าที่อุณหภูมิสูง

สำหรับบทบาทของออกซิเจนที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียพวกอ็อพพลิเกตแอนแอโรบเกิดจากออกซิเจนเข้าไปร่วมในปฏิกริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่นภายในเซลล์แบคทีเรียโดยมีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง แล้วได้ซูเพอร์ออกไซด์ (superoxide, O_2^-) ดังสมการที่ 4-7 และไฮโดรเจน-เพอรอกไซด์ (hydrogen peroxide, H_2O_2) สารเหล่านี้เป็นอันตรายต่อเซลล์มาก ดังนั้นแบคทีเรียพวกอ็อพลิเกตแอโรบและแฟคคัลเตตีบแอนแอโรบจึงสังเคราะห์เอ็นไซม์ซูเพอร์ออกไซด์ดิสมิวเตส (superoxide dismutase) และคะตาเลสขึ้นมาแล้วทำให้ซูเพอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเพอรอกไซด์สลายตัวไปตามลำดับ (สมการที่ 4-8 และ 4-9) แต่แบคทีเรียพวกอ็อพ-พลิเกตแอนแอโรบไม่สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์ทั้งสองชนิดนี้ ซูเพอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ที่เกิดขึ้นจึงเป็นอันตรายต่อเซลล์แล้วทำให้เกิดการตายขึ้น

$$O_2 + e^- \longrightarrow O_2^- \qquad (4\text{-}7)$$

$$2O_2^- + 2H^+ \longrightarrow H_2O_2 + O_2 \qquad (4\text{-}8)$$

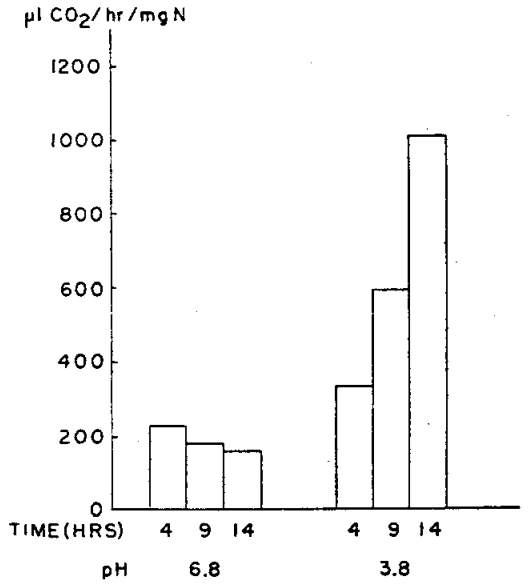
$$2H_2O_2 \longrightarrow 2H_2O + O_2 \qquad (4\text{-}9)$$

แบคทีเรียพวกไมโครแอโรไฟล์ ไม่สามารถสังเคราะห์เอ็นไซม์ซูเพอร์ออกไซด์ดิส-มิวเตสและคะตาเลส แต่สามารถทนต่อออกซิเจนที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมได้ เพราะว่าเซลล์ไม่ได้นำออกซิเจนเข้าไปร่วมในปฏิกริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่น และเมื่อสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอยู่มีออกซิเจนมากก็จะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย สาเหตุที่เป็นดังนี้ เข้าใจว่าออกซิเจนมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์

4. ไฮโดรเจนอิออน แบคทีเรียต้องการปริมาณไฮโดรเจนอิออนสำหรับการเจริญน้อย และถ้าสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีปริมาณไฮโดรเจนอิออนสูงจะเป็นอันตรายต่อเซลล์หรือทำให้เซลล์ตายได้ โดยทั่วไปความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนในสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดจะมี pH ค่อนข้างเป็นกลางคือระหว่าง pH 6.5 - 7.5 ส่วน pH 3 - 5 และ pH 8 - 10 จะเป็นมินิมั่ม pH และแม็กซิมั่ม pH สำหรับการเจริญตามลำดับ แบคทีเรียบางชนิดสามารถเจริญได้ดีในสภาวะแวดล้อมที่มี pH แตกต่างไปจากนี้ได้ เช่น แบคทีเรียที่ออกซิไดส์แอลกอฮอล์ให้กลายเป็นกรดอะซิติกและแบคทีเรียที่ออกซิไดส์กำมะถันให้กลายเป็นกรดซัลฟุริก การออกซิไดส์แอลกอฮอล์ให้กลายเป็นกรดอะซิติกนี้นำมาใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตน้ำส้มสายชู (vinegar) หมักและน้ำส้มสายชูกลั่น ส่วนการออกซิไดส์กำมะถันให้กลายเป็นกรดซัลฟุริก โดย *Thiobacillus* sp. ซึ่งอยู่ในดินจะทำให้ pH ของดินลดลง แล้วทำให้แบคทีเรียในออร์เดอร์แอคติโนมายซิตาเลส (order Actinomycetales) ซึ่งชอบ pH เป็นด่างเล็กน้อยและเป็นตัวการทำให้มันฝรั่งเกิดสะเก็ดแผลนั้นตายไป

pH ในสภาวะแวดล้อมมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย เนื่องจากไฮโดร-เจนอิออนเข้าไปทำปฏิกริยากับเอ็นไซม์ต่าง ๆ โดยเฉพาะเอ็นไซม์ตรงส่วนเยื่อเซลล์ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ แล้วทำให้เอ็นไซม์นั้นทำงานลดลงหรือหยุดการทำงาน นอกจากนี้ pH ในสภาวะแวดล้อมยังมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ตรงส่วนผนังเซลล์ มีผลต่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ชนิดต่าง ๆ ของเซลล์และมีผลปริมาณของเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์ขึ้น การหมักกรดแลกติก (lactic acid) โดยแบคทีเรียที่สร้างกรดแลกติก ในสภาวะแวดล้อมซึ่งมี pH ต่ำกว่า 7

ผลิตผลส่วนใหญ่ที่ได้เป็นกรดแลกติก แต่เมื่อสภาวะแวดล้อมในการหมักมี pH เท่ากับ 7 หรือมากกว่า 7 ผลิตผลที่ได้จะมีปริมาณของกรดชนิดอื่น ๆ และแอลกอฮอล์เพิ่มขึ้น และจากการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus arabinosus* ในอาหารเพาะเชื้อซึ่งมี pH แตกต่างกัน พบว่า pH มีผลต่อความสามารถในการสังเคราะห์เอ็นไซม์ของเซลล์ แล้วทำให้ได้ปริมาณอะซิโตอิน (acetoin) ซึ่งเป็นผลิตผลของกระบวนการเมตาบอลิซึมไม่เท่ากัน ดังรูปที่ 4-11



รูปที่ 4-11 ปริมาณของอะซิโตอินที่ได้จากการเพาะเลี้ยง *Lactobacillus arabinosus* ที่ pH ต่าง ๆ

5. โลหะหนักและเฮโลเจน โลหะหนัก ได้แก่ เงิน ปรอท และยูเรเนียม (uranium) เป็นต้น ส่วนเฮโลเจนเป็นชื่อหมู่ธาตุซึ่งประกอบด้วยธาตุต่าง ๆ ดังนี้ ฟลูออรีน (fluorine) คลอรีน (chlorine) โบรมีน (bromine) ไอโอดีน (iodine) และแอสตาตีน (astatine) ธาตุที่เป็นองค์ประกอบนี้มีแอสตาตีนเพียงธาตุเดียวที่เป็นโลหะส่วนธาตุอื่น ๆ เป็นอโลหะ

อิออนของโลหะหนักและเฮโลเจนที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมอาจจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือทำให้แบคทีเรียตายได้ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับปริมาณของสารเหล่านี้ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมและชนิดของแบคทีเรีย โดยทั่วไปยูเรนิลอิออน (uranyl ion) จะเข้าไปจับกับหมู่ฟอสเฟตของฟอสโฟลิปิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์ แล้วทำให้อาหารไม่สามารถผ่านเข้าไปภายในเซลล์ได้ เงินอิออนทำให้เยื่อเซลล์ได้รับความเสียหาย และโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพธรรมชาติ (denature) เนื่องจากเข้าไปจับกับโปรตีนโดยตรง ส่วนเฮโลเจนสามารถฆ่าเวเจ็ทเตตีบเซลล์ของแบคทีเรียได้มากกว่าสปอร์ และระหว่างเวเจ็ทเตตีบเซลล์ของแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ *Mycobacterium tuberculosis* จะทนต่อเฮโลเจนมากกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ

6. ดิสอินเฟ็กแตนต์ เป็นสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์บนสิ่งของต่าง ๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่มีชีวิต ได้แก่ ฟีนอล ครีซอล (cresol) แอลกอฮอล์ความเข้มข้นประมาณ 70% ไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ กรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) เฮ็กซะคลอโรฟีน (hexachlorophene) และฟอร์มาลดีไฮด์ (formaldehyde) เป็นต้น ในกรณีที่ใช้ยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์ตรงบริเวณผิวของสิ่งมีชีวิตเรียกว่า แอนติเซ็พติก (antiseptic)

ดิสอินเฟ็กแตนต์ที่ดีควรมีคุณสมบัติดังนี้ คือ สามารถฆ่าจุลินทรีย์ได้ดี มีลักษณะเป็นเนื้อเดียวกันตลอด ละลายได้ดี ไม่เป็นพิษต่อคนและสัตว์ ไม่ทำให้เกิดสนิม มีความคงตัว ราคาไม่แพง และสามารถพีนีเตรต (penetrate) ได้ดี ในปัจจุบันยังไม่มีดิสอินเฟ็กแตนต์ที่มีคุณสมบัติเหล่านี้ครบ

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของดิสอินเฟ็กแตนต์มีหลายอย่าง ดังต่อไปนี้

6.1 ความเข้มข้นของดิสอินเฟ็กแตนต์ ดิสอินเฟ็กแตนต์ที่มีความเข้มข้นต่ำจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแต่เมื่อมีความเข้มข้นสูงจะฆ่าแบคทีเรีย การเพิ่มประสิทธิภาพของดิสอินเฟ็กแตนต์นี้ไม่ได้เพิ่มเป็นสัดส่วนโดยตรงอย่างง่าย ๆ กับความเข้มข้น เช่น ใช้ฟีนอลความเข้มข้นหนึ่งกับ *Salmonella paratyphi* จำนวนหนึ่ง พบว่าแบคทีเรียนี้ตายหมดในเวลา 240 นาที แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฟีนอลให้มากกว่าเดิมหนึ่งเท่า พบว่าแบคทีเรียนี้ตายหมดในเวลาเพียง $3\frac{1}{2}$ นาที เท่านั้น

๖.๒ อุณหภูมิ เมื่ออุณหภูมิของสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอยู่สูงขึ้น ดิสอินเฟ็กแตนต์จะฆ่าแบคทีเรียได้มากขึ้น

๖.๓ pH ดิสอินเฟ็กแตนต์จะมีประสิทธิภาพในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียได้ดีขึ้น ถ้าสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียอยู่มี pH ลดลง

๖.๔ สารอินทรีย์ สารอินทรีย์ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมจะทำให้ประสิทธิภาพของดิสอินเฟ็กแตนต์ในการฆ่าหรือยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียลดลง ประสิทธิภาพของดิสอินเฟ็กแตนต์ที่ลดลงนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของสารอินทรีย์และชนิดของดิสอินเฟ็กแตนต์

๖.๕ ชนิดและสภาพของแบคทีเรีย ดิสอินเฟ็กแตนต์มีผลต่อเวเจ็ทเตตีบเซลล์มากกว่าสปอร์และมีผลต่อแบคทีเรียที่เจริญในระยะล็อกเฟซมากกว่าเฟซอื่น ๆ

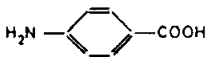
ดิสอินเฟ็กแตนต์ที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยเข้าไปทำปฏิกริยากับโปรตีน ลิปิด และสารอื่น ๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อเซลล์และภายในเซลล์ แล้วยับยั้งการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ ยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการทำงานของไรโบโซมและเอ็นไซม์ มีผลต่อการสังเคราะห์ DNA และ RNA จากการศึกษา ฟินอลและไฮโดรเจนเพอรอกไซด์มีผลต่อการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ ด้วยการไปทำปฏิกริยากับหมู่ -SH (thiol group) ของโปรตีนตรงบริเวณเยื่อเซลล์ เฮ็กซะคลอโรฟินซึ่งเป็นส่วนประกอบในดีเดอเจ้นต์มีผลฆ่าแบคทีเรียได้ดี ด้วยการเข้าไปทำปฏิกริยากับโปรตีนของเซลล์ สารชนิดนี้มีผลต่อแบคทีเรียแกรมบวกมากกว่าแบคทีเรียแกรมลบ

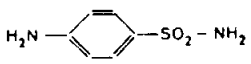
เนื่องจากเฮ็กซะคลอโรฟินเป็นสารที่มีอันตรายต่อมนุษย์โดยเฉพาะเด็กมาก ดังนั้นในปัจจุบันมักนำมาใช้ฟอกก่อนทำการผ่าตัด ส่วนการนำไปใช้ผสมเพื่อทำดีเดอเจ้นต์ต่าง ๆ เช่น สบู่นั้นต้องทำด้วยความระมัดระวัง สำหรับฟอร์มาลดีไฮด์ซึ่งสามารถฆ่าแบคทีเรียต่าง ๆ ได้ดีเป็นสารเคมีที่ทำให้จมูกและตามีอาการอักเสบ ในการใช้ควรป้องกันอันตรายดังกล่าวด้วยการนำฟอร์มาลดีไฮด์มาผสมกับสารอินทรีย์ เช่น กลีเซอรอล โพรไพลีนไกลคอล (propylene glycol) และอิธิลีนไกลคอล (ethylene glycol)

7. สารเคมีที่ใช้ในการบำบัดโรค สารเคมีที่ใช้ในการบำบัดโรคเป็นสารเคมีสังเคราะห์หรือเป็นสารปฏิชีวนะซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้น มีบทบาทต่อแบคทีเรีย คือ ถ้าในสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีปริมาณน้อยจะยับยั้งการเจริญแต่ถ้าในสภาวะที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีปริมาณมากจะฆ่าแบคทีเรีย การใช้สารปฏิชีวนะนี้จะต้องระมัดระวัง เนื่องจากแบคทีเรียอาจจะปรับตัวแล้วสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อสารปฏิชีวนะได้

สารปฏิชีวนะมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำให้เยื่อเซลล์เสียหายและยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ จากการศึกษา โพลิมัยซิน (polymyxin) และไทโรซิดิน (tyrocidin) จะทำให้โครงสร้างของเยื่อเซลล์เสียไป สเตรปโตมัยซินและไรแฟมพิซินยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ RNA โพลิเมอเรสซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการถอดรหัส (transcription) จาก DNA ไปยัง mRNA พินิซิลลิน (penicillin) ยับยั้งการสังเคราะห์ผนังเซลล์และเยื่อเซลล์ อะซาซีรีน (azaserine) ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนและซัลฟานิลามีด (sulphanilamide) ยับยั้งการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ของเซลล์

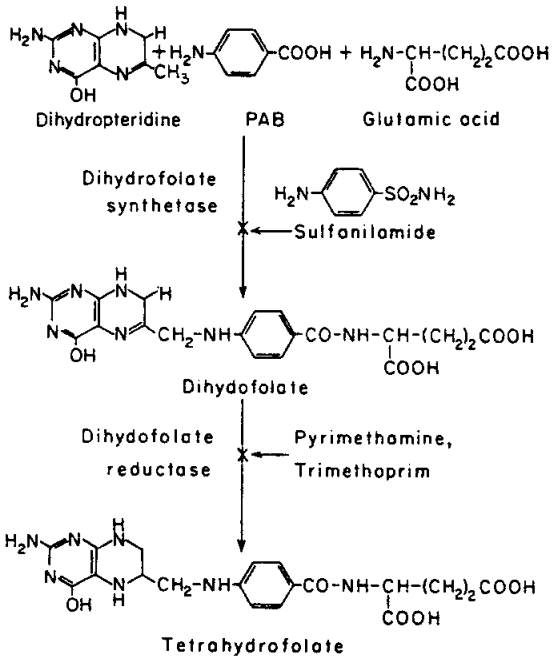
ซัลฟานิลามีดซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้ายคลึงกับกรด พารา-อะมิโนเบ็นโซอิก (p-amino-benzoic acid = PAB) มาก ทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินธิเตส (dihydrofolate synthetase) แบบแข่งขัน ด้วยการเข้าจับกับเอ็นไซม์ไดไฮโดรโฟเลตซินธิเตสตรงบริเวณแอคตีบไซต์ (active site) แล้วทำให้เอ็นไซม์นี้ไม่สามารถจับกับกรดพารา-อะมิโนเบ็น-โซอิกซึ่งเป็นสับสเตรตได้อีก และปฏิกริยาก็ไม่สามารถดำเนินต่อไปได้ ดังนั้นจึงไม่มีการสังเคราะห์เตตระไฮโดรโฟเลต (tetrahydrofolate) ซึ่งทำหน้าที่ในการเคลื่อนย้ายคาร์บอนที่เป็นสิ่งจำเป็นในการสังเคราะห์สารต่าง ๆ ของเซลล์ การใช้ซัลฟานิลามีดนิยมใช้ร่วมกับไพริมีธามีน (pyrime-thamine) และไทรมีโธพริม (trimethoprim) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไดไฮโดร-โฟเลตรีดักเตส (dihydrofolate reductase) เพื่อทำให้มีผลยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียมากขึ้นและป้องกันไม่ให้แบคทีเรียสร้างสายพันธุ์ใหม่ที่มีความต้านทานต่อสารนี้ ดังรูปที่ 4-12





p-aminobenzoic acid sulphanilamide

(ก)



(ข)

รูปที่ 4-12 (ก) สูตรโครงสร้างของซัลฟานิลามีดและกรดพารา-อะมิโน เบ็นโซอิก

(ข) การยับยั้งแบบแข่งขันในกระบวนการสัง เคราะห์เตตระไฮโดรโฟเลต

สิ่งแวดล้อมทางด้านฟิสิกส์ สิ่งแวดล้อมทางด้านฟิสิกส์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมีดังนี้

1. อุณหภูมิ แบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 3 พวก โดยอาศัยอุณหภูมิมินิมั่ม อ็อพติมั่ม และเม็กซิมั่มสำหรับการเจริญเป็นหลัก คือ ไซโครไฟล์ มีโซไฟล์และเทอร์โมไฟล์ (ตารางที่ 4-1) ที่อุณหภูมิอ็อพติมั่ม แบคทีเรียทั้ง 3 พวกมีอัตราการเจริญสูงสุด เพราะว่าเอ็นไซม์มีประสิทธิภาพในการทำงานได้ดีที่สุด แต่เมื่ออุณหภูมิต่ำกว่าหรือสูงกว่าอุณหภูมิอ็อพติมั่ม เอ็นไซม์จะมีประสิทธิภาพในการทำงานจะลดลง จนกระทั่งอุณหภูมิสูงกว่าอุณหภูมิเม็กซิมั่ม เอ็นไซม์ของแบคทีเรียเกิดการเสียสภาพธรรมชาติไปแล้วทำให้แบคทีเรียไม่สามารถเจริญได้

ตารางที่ 4-1 อุณหภูมิสำหรับการเจริญของแบคทีเรีย

พวกของแบคทีเรีย	อุณหภูมิ ^{o}ซ.		
	มินิมั่ม	อ็อพติมั่ม	เม็กซิมั่ม
ไซโครไฟล์	-5-0	5-15	15-30
มีโซไฟล์	10-20	20-40	40-52
เทอร์โมไฟล์	37-45	45-60	60-80

เอ็นไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 3 พวก มีส่วนประกอบทางเคมีแตกต่างกัน ดังนั้นจึงมีประสิทธิภาพในการทำงานที่อุณหภูมิต่าง ๆ และการทนต่ออุณหภูมิสูงหรืออุณหภูมิต่ำได้แตกต่างกัน นอกจากนี้เอ็นไซม์ของแบคทีเรียพวกเทอร์โมไฟล์ยังเกาะติดกับอิออนบางชนิดแล้วทำให้ทนต่ออุณหภูมิสูงได้ดีขึ้น อุณหภูมิสูงมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียคือ มีผลต่อการแบ่งเซลล์และการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ ส่วนอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย คือ มีผลต่อการสังเคราะห์ ATP และการนำ ATP ไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ มีผลต่อโครงสร้างของเยื่อเซลล์ และมีผลต่อ

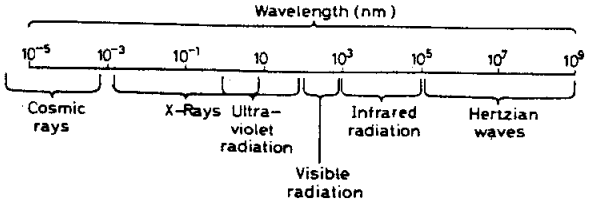
การขนส่งอาหาร เข้าสู่ภายใน เซลล์ โดยทำให้โปรตีนตรงส่วน เยื่อ เซลล์ซึ่งทำหน้าที่ขนส่งอาหาร เข้าสู่ภายใน เซลล์แบบแอ็คตีบหยุดทำงาน ดังนั้นการขนส่งอาหารจึงไม่ เกิดขึ้น

2. ความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำ (hydrostatic pressure) แบคที เรีย ซึ่งอาศัยอยู่ในทะ เลหรือในน้ำต่าง ๆ มีความต้านทานต่อแรงกดของน้ำต่างกัน โดยทั่วไปความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำประมาณ $1-5x10^7$ และมากกว่า 10^8 นิวตันต่อตาราง เมตรยับยั้งการ เจริญ ของแบคที เรียและฆ่า เว เจ็ท เตตีบ เซลล์ของแบคที เรียตามลำดับ สำหรับสปอร์ของแบคที เรียทนต่อ ความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำได้สูงมาก คือ เมื่อได้รับความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำประมาณ 12×10^8 นิวตันต่อตาราง เมตรก็ยังคงมีชีวิตอยู่ได้

ความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำมีผลต่อกระบวนการ เมตาบอลิซึมของ เซลล์ด้วยการไป ยับยั้งการสัง เคราะห์ เอ็นไซม์บางชนิด การสัง เคราะห์โปรตีนและการขนส่งสารพลังงานสูงซึ่งได้ จากกระบวนการคะตาบอลิซึมภายใน เซลล์ แล้วทำให้แบคที เรียมีระยะแล็ก เฟซยาวขึ้น สำหรับ ความดัน เนื่องจากแรงกดของน้ำที่สูงถึงระดับที่ฆ่า เว เจ็ท เตตีบ เซลล์นั้นนอกจากจะมีผลต่าง ๆ ดังกล่าว มาแล้ว ยังทำให้ เอ็นไซม์ต่าง ๆ ภายใน เซลล์ เกิดการ เสียสภาพธรรมชาติไปด้วย

3. รังสี รังสีจากดวงอาทิตย์ที่ส่องมายังผิวโลกมีหลายชนิด แต่ละชนิดมีความยาว คลื่นและพลังงานแตกต่างกัน (รูปที่ 4-13) รังสีที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่ารังสีที่มอง เห็นได้จะมี พลังงานสูง ส่วนรังสีที่มีความยาวคลื่นมากกว่ารังสีที่มอง เห็นได้มีพลังงานต่ำและ เมื่อไปกระทบกับ แบคที เรียหรือโม เลกุลของสารต่าง ๆ จะ เปลี่ยนไป เป็นความร้อน ปัจจุบันนักจุลชีววิทยาสนใจรังสี ที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่ารังสีที่มอง เห็นได้มาก ด้วยการทำให้ เกิดรังสีนี้ขึ้นแล้วนำมาศึกษาถึงผลที่มีต่อ การ เจริญของแบคที เรีย

3.1 รังสีคอสมิกและรังสี เอ็กซ์ (cosmic ray and x - ray) รังสีทั้ง 2 ชนิดนี้ มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 10 นาโนมิ เตอร์ และ เป็นรังสีที่มีพลังงานสูงมาก เมื่อโม เลกุลของสารภายใน เซลล์แบคที เรียดูดจะทำให้ เกิดปฏิกริยาอิออนไน เซชั่น (ionization) ขึ้นในอะตอมของธาตุใน โม เลกุลของสาร คือ อิ เล็กตรอนซึ่งมีประจุไฟฟ้าลบจะถูกปล่อยออกมาจากอะตอม ทำให้อะตอม



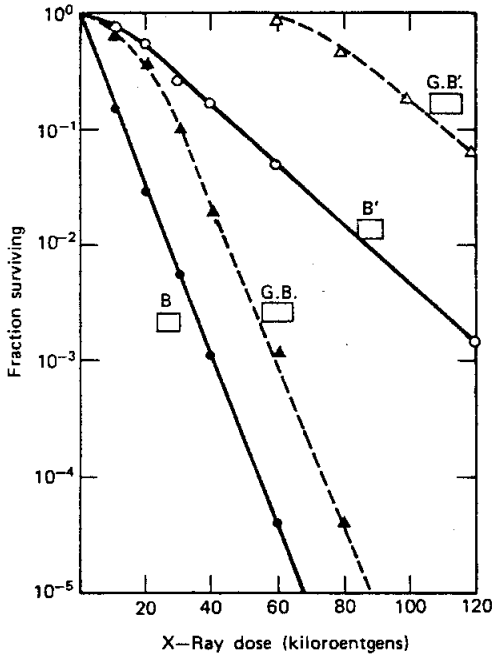
รูปที่ 4-13 ความยาวคลื่นของรังสีชนิดต่าง ๆ

มีประจุไฟฟ้าบวก ในขณะเดียวกันอิเล็กตรอนที่หลุดออกจากอะตอมก็มีพลังงานเพียงพอที่จะทำให้อะตอมอื่นเกิดประจุไฟฟ้าขึ้นได้อีก

จากการที่อะตอมของธาตุในโมเลกุลของสารเกิดการสูญเสียอิเล็กตรอนไปทำให้ลักษณะโมเลกุลของสารเปลี่ยนไป เช่น โปรตีนเสียสภาพธรรมชาติและ DNA มีโครงสร้างผิดปกติ ซึ่งมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิซึมของแบคทีเรีย มีผลทางกรรมพันธุ์ทำให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์และมีผลทำให้แบคทีเรียตายได้

ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของรังสีมีหลายอย่างคือ ชนิดของแบคทีเรีย สภาพของแบคทีเรีย ปริมาณของรังสีและสภาวะแวดล้อมของสับสเตรตที่แบคทีเรียอยู่ในขณะโดนรังสี เวเจ็ท-เตตีบเซลล์ของแบคทีเรียและสปอร์ที่มีความต้านทานต่อรังสีทั้ง 2 ชนิดนี้ได้ดี คือ *Micrococcus radiodurans* และสปอร์ของ *Clostridium bolulinum* ตามลำดับ แบคทีเรียที่อยู่ในระยะล็อกเฟซมีความต้านทานต่อรังสีน้อยกว่าแบคทีเรียชนิดเดียวกันที่อยู่ในระยะเล็กเฟซและระยะสเตชั่นนารี่เฟซ รังสีที่มีปริมาณน้อยยับยั้งการแบ่งเซลล์แต่รังสีปริมาณสูงกว่านั้นจะทำให้แบคทีเรียตาย สำหรับสภาวะแวดล้อมนั้น พบว่า เมื่อสับสเตรตที่แบคทีเรียอยู่มีคุณค่าทางอาหารน้อยและสภาวะที่เจริญมีอุณหภูมิต่ำ แบคทีเรียมีความต้านทานต่อรังสีได้ดีกว่าเมื่อสับสเตรตมีคุณค่าทางอาหารมากและสภาวะที่เจริญมีอุณหภูมิสูง นอกจากปัจจัยต่าง ๆ ดังกล่าวมาแล้ว ความต้านทานรังสีของแบคทีเรียยัง

ขึ้นอยู่กับสภาพของแบคทีเรียก่อนและหลังรับรังสีด้วย แบคทีเรียที่เคยได้รับรังสีมาก่อนจะมีความต้านทานสูงขึ้น เซลล์แบคทีเรียพวกแฟคคัล เตตีบแอนแอโรบที่ได้มาจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะแอโรบ มีความต้านทานต่อรังสีน้อยกว่าเซลล์แบคทีเรียชนิดเดียวกันที่ได้จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะแอนแอโรบ และจากการที่สภาวะแวดล้อมเป็นแอนแอโรบในขณะได้รับรังสีทำให้แบคทีเรียมีความต้านทานต่อรังสีเพิ่มขึ้น ดังรูปที่ 4-14



รูปที่ 4-14 ความต้านทานต่อรังสีของ *Escherichia coli* B = เพาะเลี้ยงและได้รับรังสีในสภาวะแอโรบ B' = เพาะเลี้ยงในสภาวะแอโรบแต่ได้รับรังสีในสภาวะแอนแอโรบ G.B. = เพาะเลี้ยงในสภาวะแอนแอโรบแต่ได้รับรังสีในสภาวะแอโรบ G.B.' = เพาะเลี้ยงและได้รับรังสีในสภาวะแอนแอโรบ

3.2 รังสีอุลตราไวโอเล็ต รังสีชนิดนี้มีความยาวคลื่นระหว่าง 10-300 นาโนมิเตอร์ เมื่อโมเลกุลของสารภายในเซลล์แบคทีเรียดูดจะไปกระตุ้นอิเล็กตรอนของอะตอมของธาตุในโมเลกุลของสาร ทำให้เกิดอิเล็กตรอนที่มีพลังงานสูงขึ้น ดังนั้นเมื่อแบคทีเรียเจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีรังสีนี้อาจจะเกิดการกลายพันธุ์หรือตายได้ ผลของรังสีที่มีต่อแบคทีเรียขึ้นอยู่กับชนิดของแบคทีเรียสภาพของแบคทีเรีย ปริมาณรังสีและความยาวคลื่นของรังสี แบคทีเรียที่มีความต้านทานต่อรังสีนี้ได้ดี คือ *Micrococcus radiodurans* แบคทีเรียที่เจริญอยู่ตอนกลางและปลายของล็อกเฟซมีความต้านทานต่อรังสีนี้ได้ดีมากกว่าแบคทีเรียที่เจริญอยู่ในระยะต้นของล็อกเฟซและระยะสเตชั่นนารี่เฟซ รังสีที่มีปริมาณมากมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียมากกว่ารังสีที่มีปริมาณน้อย และรังสีที่มีความยาวคลื่นต่ำกว่า 280 นาโนมิเตอร์เล็กน้อยฆ่าแบคทีเรียได้ดี ทั้งนี้เนื่องจากเพียวรีนและพิริมิดีนดูดรังสีได้ดีในช่วงความยาวคลื่นนี้

การเปลี่ยนแปลงการเจริญของแบคทีเรีย เนื่องจากรังสีอุลตราไวโอเล็ตยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการหายใจ ยับยั้งการขนส่งอาหารบางชนิดเข้าสู่ภายในเซลล์และทำให้เส้นสาย DNA ขาดออก ความเสียหายของเซลล์ที่เกิดขึ้นนี้ แบคทีเรียบางชนิดสามารถซ่อมแซมให้กลับเป็นปกติได้ หลังจากถูกนำไปอยู่ในสภาวะแวดล้อมซึ่งมีรังสีที่มองเห็นได้หรืออยู่ในที่มืดชั่วระยะเวลาหนึ่ง

3.3 รังสีที่มองเห็นได้ รังสีที่มองเห็นได้มีความยาวคลื่นระหว่าง 300-1,000 นาโนมิเตอร์ โฟโตโทรฟิคแบคทีเรียมีแบคเทอริโอคลอโรฟิลและคาโรตีนอยด์ดูดพลังงานจากรังสีนี้ แล้วนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP ความยาวคลื่นที่แบคทีเรียนี้ดูดพลังงานได้ดีจะแตกต่างกันในแบคทีเรียแต่ละชนิด เช่น *Rhodospirillum rubrum* ดูดพลังงานได้ดีเมื่อรังสีมีความคลื่นประมาณ 800-900, 590 และ 470-530 นาโนมิเตอร์ *Chromatium* sp. ดูดพลังงานได้ดีเมื่อรังสีมีความยาวคลื่นประมาณ 375-590 และ 800-890 นาโนมิเตอร์ เป็นต้น

3.4 รังสีอินฟราเร็ด รังสีนี้มีความยาวคลื่นมากกว่ารังสีที่มองเห็นได้ คือ มีความยาวคลื่น 1,000-100,000 นาโนมิเตอร์ ปัจจุบันยังมีความรู้เกี่ยวกับผลของรังสีนี้ที่มีต่อการเจริญของแบคทีเรียน้อย ทั้งนี้เนื่องจากพลังงานของรังสีนี้เปลี่ยนไปเป็นความร้อนได้เร็วมาก

4. คลื่นเสียง คลื่นเสียงที่มีความถี่ต่ำกว่า 10,000 ครั้งต่อวินาทีไม่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ส่วนคลื่นเสียงที่มีความถี่สูงประมาณ 100,000 ครั้งต่อวินาทีหรือสูงกว่านี้มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก ซึ่งมีประโยชน์ในการศึกษาส่วนประกอบทางเคมีของโครงสร้างต่าง ๆ และศึกษาปฏิกริยาทางชีวเคมีต่าง ๆ ของเซลล์ ความต้านทานต่อคลื่นเสียงหรือความง่ายต่อการถูกทำลายด้วยคลื่นเสียงแตกต่างกันไปตามชนิดของแบคทีเรียและสภาวะของแบคทีเรีย เช่น *Neisseria gonorrhoeae* ถูกทำลายง่ายในขณะที่สปอร์มีความต้านทานสูงกว่าเวเจ็ทเตตีบเซลล์ที่เกิดสปอร์นั้น สำหรับผลที่คลื่นเสียงมีต่อการเจริญของแบคทีเรียนั้น เนื่องจากคลื่นเสียงทำให้ความดันของสับสเตรตเปลี่ยนแปลงและมีฟองอากาศเล็ก ๆ เกิดขึ้นในสับสเตรตแล้วไปกระแทกเซลล์

สรุปเนื้อหาสำคัญ

1. นักจุลชีววิทยาได้ให้คำจำกัดความว่า เซลล์ที่มีชีวิตหมายถึง เซลล์ที่สามารถเพิ่มจำนวนได้ การเจริญหมายถึง การที่เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นและการตายหมายถึง การที่เซลล์มีจำนวนลดลง

2. ในการเจริญ แบคทีเรียจะมีการขนส่งอาหารจากสภาวะแวดล้อมเข้าสู่ภายในเซลล์ แล้วทำให้อาหารนั้นเกิดการเปลี่ยนแปลงเพื่อให้ได้พลังงานและพรีเคอร์เซอร์ ต่อมาแบคทีเรียจะนำพลังงานและพรีเคอร์เซอร์ที่ได้ไปใช้ในการสังเคราะห์ส่วนประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ เช่น โครโมโซม ไรโบโซม โครแมทโตฟอร์ เยื่อเซลล์ ผนังเซลล์ เป็นต้น สำหรับการเติดผนังกั้นแบ่งเซลล์ จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการสังเคราะห์เส้นสาย DNA ใหม่และแยกออกเป็น 2 โครโมโซมเรียบร้อยแล้ว (ดูหัวข้อ กฎเกณฑ์ของการเจริญ)

3. วิธีตรวจสอบการเจริญของแบคทีเรียทำได้หลายวิธี ดังต่อไปนี้

   3.1 วิธีนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งหมดโดยตรง เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตอยู่และตายแล้ว โดยใช้วิธีของ Breed และวิธีใช้ฮีมาไซโตมิเตอร์สไลด์

   3.2 วิธีนับเฉพาะจำนวนเซลล์แบคทีเรียที่มีชีวิตอยู่ ทำได้โดยวิธีอ้อมและวิธีตรง วิธีอ้อมเป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียด้วยการอาศัยค่าจากตาราง ได้แก่ วิธี MPN และวิธีของ Harris และ Sommers ส่วนวิธีตรงเป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียโดยตรง ได้แก่ วิธีพอเพลตหรือวิธีเพลตเคาต์

   3.3 วิธีตรวจสอบค่าความขุ่น เป็นการนับจำนวนเซลล์แบคทีเรียทั้งที่มีชีวิตอยู่และตายแล้วโดยอ้อม

   3.4 วิธีตรวจสอบน้ำหนักแห้งของประชากรแบคทีเรีย เป็นการประมาณการเจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยอ้อม

   3.5 วิธีตรวจสอบปริมาณออกซิเจนที่ถูกนำไปใช้ เป็นการประมาณปริมาณการเจริญของแบคทีเรียพวกแอโรบและแฟคคัลเตดีบแอนแอโรบ

3.6 วิธีตรวจสอบส่วนประกอบทาง เคมีของประชากรแบคทีเรีย เป็นการประมาณการ เจริญของแบคทีเรียทั้งหมดโดยอ้อม

3.7 วิธีตรวจสอบผลิตผลของกระบวนการ เมตาบอลิซึม เป็นการประมาณปริมาณการ เจริญของแบคทีเรีย

4. วัฏจักรการ เจริญของแบคทีเรียซึ่งทำการ เพาะ เลี้ยงแบบคงที่มีการ เจริญเป็น 6 เฟส แบคทีเรียแต่ละชนิดไม่จำ เป็นต้องมีครบทุก เฟสและในแต่ละ เฟสแบคทีเรียมีอัตราการ เจริญดังต่อไปนี้ (ดูหัวข้อ วัฏจักรการ เจริญ)

4.1 แล็ก เฟส แบคทีเรียไม่มีอัตราการ เจริญ

4.2 แอคซีลี เรชั่น เฟส แบคทีเรียมีอัตราการ เจริญ เพิ่มขึ้น

4.3 ล็อก เฟสหรือ เอ็กโพ เน็น เทียล เฟส แบคทีเรียมีอัตราการ เจริญสูงสุดและคงที่

4.4 รีตาร์ เดชั่น เฟสหรือดีซีลี เรชั่น เฟส แบคทีเรียมีอัตราการ เจริญลดลง

4.5 ส เตชั่นนารี่ เฟส แบคทีเรียมีอัตราการ เจริญ เท่ากับอัตราการตาย

4.6 เด็ธ เฟส แบคทีเรียมีอัตราการ เจริญ เป็นลบ

5. ไดออกซี่ เป็นปรากฏการณ์ที่ เกิดขึ้น เนื่องจากแบคทีเรีย เจริญในสภาวะแวดล้อมที่มีสารประกอบอินทรีย์ เป็นแหล่งคาร์บอน 2 ชนิด และแต่ละชนิดมีอยู่ในปริมาณจำกัด ทำให้มีวัฏจักรการ เจริญ 2 วัฏจักรซึ่งมีการ เจริญทั้งหมด อัตราการ เจริญในระยะล็อก เฟสและระยะ เวลาของ เล็ก เฟสแตกต่างกัน

6. การ เพาะ เลี้ยงแบบต่อ เนื่อง เป็นการ เพาะ เลี้ยง เพื่อให้แบคทีเรียอยู่ในระยะล็อก เฟสตลอด เวลา ทำได้โดยการ เพาะ เลี้ยงแบคทีเรียในอาหาร เหลวแบบคงที่จนกระทั่งแบคทีเรีย เจริญอยู่ในระยะล็อก เฟส หลังจากนั้นนำมาทำการ เพาะ เลี้ยงโดยใช้ เทอร์บิโดสแตต เค็มโมสแตต หรือ เครื่องหมัก ด้วยการใส่อาหาร เหลวใหม่ เข้าไปในอาหาร เหลวที่ทำการ เพาะ เลี้ยงแบคทีเรียอยู่ และในขณะ เดียวกันทำการนำอาหาร เหลวที่ทำการ เพาะ เลี้ยงแบคทีเรียอยู่ออกไปในปริมาตร เท่ากัน การ เพาะ เลี้ยงแบบนี้มีประโยชน์ในการศึกษาคุณสมบัติทางสรีระวิทยาของแบคทีเรีย

และอุตสาหกรรมการหมักสารต่าง ๆ

7. สิ่งแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 2 พวกใหญ่ ๆ คือ สิ่งแวดล้อมทางด้านเคมีและสิ่งแวดล้อมทางด้านฟิสิกส์ สิ่งแวดล้อมทางด้านเคมีที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย ได้แก่ สารเคมีซึ่งการเปลี่ยนแปลงปริมาณในสภาวะแวดล้อมทำให้แบคทีเรียเจริญดีขึ้นหรือเลวลง และสารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือฆ่าแบคทีเรีย

8. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพของสิ่งแวดล้อมมีหลายอย่าง คือ ชนิดของแบคทีเรีย สภาพของแบคทีเรีย และปริมาณของสิ่งแวดล้อมทางด้านเคมีและฟิสิกส์

9. สารเคมีซึ่งการเปลี่ยนแปลงปริมาณในสภาวะแวดล้อมทำให้แบคทีเรียเจริญดีขึ้นหรือเลวลง มีดังต่อไปนี้

9.1 น้ำ ถ้าสับสเตรตที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีค่า a_w เท่ากับ อ็อพติมั่ม a_w สำหรับการเจริญของแบคทีเรียนั้น แบคทีเรียเจริญได้ดี แต่ถ้าสับสเตรตที่แบคทีเรียเจริญอยู่มีค่า a_w ต่ำกว่าอ็อพติมั่ม a_w ทำให้ระยะแล็กเฟซยาวขึ้น คุณสมบัติทางสรีระวิทยาเปลี่ยนไป อัตราการเจริญและการเจริญทั้งหมดลดลง นอกจากนี้น้ำยังเป็นปัจจัยสำคัญในการฆ่าแบคทีเรียด้วยความร้อน ดังจะเห็นว่าความร้อนชื้นฆ่าแบคทีเรียได้ดีกว่าความร้อนแห้ง

9.2 อาหารและปัจจัยสำหรับการเจริญ สับสเตรตที่แบคทีเรียเจริญได้ต้องมีอาหารซึ่งเป็นแหล่งธาตุต่าง ๆ เพียงพอกับความต้องการของเซลล์ ในกรณีที่แบคทีเรียไม่สามารถสังเคราะห์ปัจจัยสำหรับการเจริญขึ้นได้เอง สับสเตรตต้องมีปัจจัยสำหรับการเจริญอยู่ด้วย สำหรับคาร์บอนไดออกไซด์เค็มไมออแกโนโทรฟิคแบคทีเรียบางชนิดต้องการเพื่อการเจริญ

9.3 ออกซิเจน แบคทีเรียพวกอ็อพลิเกตแอโรบและแฟคคัลเตตีบแอนแอโรบ ต้องการออกซิเจนไปทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนขั้นสุดท้ายในกระบวนการหายใจ ผลของ

กระบวนการนี้ได้น้ำและพลังงานซึ่งแบคทีเรียเก็บไว้ในรูป ATP ดังนั้นถ้าสภาวะแวดล้อมมีปริมาณออกซิเจนอย่างเพียงพอ แบคทีเรียเจริญได้ดีขึ้น ในทางตรงกันข้ามออกซิเจนที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมทำให้แบคทีเรียพวกอ็อพลิเกตแอนแอโรบเกิดการตาย เนื่องจากเข้าไปร่วมในปฏิกริยาออกซิเดชั่น-รีดักชั่นภายในเซลล์ แล้วได้ซูเพอร์ออกไซด์และไฮโดรเจนเพอรอกไซด์ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์

9.4 ไฮโดรเจนอิออน โดยทั่วไปความเข้มข้นของไฮโดรเจนอิออนในสภาวะแวดล้อมที่แบคทีเรียเจริญได้ดีที่สุดจะมี pH ระหว่าง 6.5-7.5 ส่วน pH 3-5 และ pH 8-10 จะเป็นมินิมั่ม pH และแม็กซิมั่ม pH สำหรับการเจริญตามลำดับ pH ในสภาวะแวดล้อมมีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์และมีผลต่อการสังเคราะห์เอ็นไซม์ของเซลล์

10. สารเคมีที่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือฆ่าแบคทีเรีย มีดังต่อไปนี้

10.1 โลหะหนักและเฮโลเจน อิออนของโลหะหนักและเฮโลเจนที่มีอยู่ในสภาวะแวดล้อมอาจจะยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียหรือทำให้แบคทีเรียตายได้ โดยยับยั้งการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ ทำให้เยื่อเซลล์ได้รับความเสียหายและโปรตีนภายในเซลล์เสียสภาพธรรมชาติไป

10.2 ดิสอินเฟ็กแตนต์ เป็นสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือฆ่าจุลินทรีย์บนสิ่งของต่าง ๆ ซึ่งเป็นสิ่งที่ไม่มีชีวิต โดยยับยั้งการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์ ยับยั้งการแบ่งเซลล์ ยับยั้งการทำงานของไรโบโซมและเอ็นไซม์ มีผลต่อการสังเคราะห์ DNA และ RNA

10.3 สารเคมีที่ใช้ในการบำบัดโรค เป็นสารเคมีสังเคราะห์หรือเป็นสารปฏิชีวนะ ซึ่งจุลินทรีย์สร้างขึ้น มีบทบาทต่อการเจริญของแบคทีเรีย โดยทำให้เยื่อเซลล์เสียหายและยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์

11. สิ่งแวดล้อมทางด้านฟิสิกส์ที่มีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย มีดังต่อไปนี้

11.1 อุณหภูมิ แบคทีเรียแบ่งออกได้เป็น 3 พวก โดยอาศัยอุณหภูมิมินิมั่ม อ็อพติมั่ม และ

เม็กซิมั่มสำหรับการเจริญเป็นหลัก คือ ไซโครไฟล์ มีโซไฟล์และเทอร์โมไฟล์ เอ็นไซม์ของแบคทีเรียทั้ง 3 พวกนี้มีประสิทธิภาพในการทำงานและการทนต่ออุณหภูมิสูงหรืออุณหภูมิต่ำได้แตกต่างกัน อุณหภูมิสูงมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย คือ มีผลต่อการขนส่งอาหารเข้าสู่ภายในเซลล์และการแบ่งเซลล์ ส่วนอุณหภูมิต่ำมีผลต่อการเจริญของแบคทีเรีย คือ มีผลต่อโครงสร้าง และการทำงานของเยื่อเซลล์ มีผลต่อการสังเคราะห์ ATP และการนำ ATP ไปใช้ในกระบวนการต่าง ๆ

11.2 ความดันเนื่องจากแรงกดของน้ำ โดยทั่วไปความดันนี้ประมาณ $1 - 5 \times 10^7$ และมากกว่า 10^8 นิวตันต่อตารางเมตรยับยั้งการเจริญและฆ่าเวเจ็ตเตตีฟเซลล์ของแบคทีเรียตามลำดับ โดยไปยับยั้งการสังเคราะห์เอ็นไซม์ การสังเคราะห์โปรตีน การขนส่ง ATP และทำให้เอ็นไซม์เกิดการเสียสภาพธรรมชาติ

11.3 รังสี รังสีคอสมิก รังสีเอ็กซ์ และรังสีอุลตราไวโอเล็ตเป็นรังสีที่มีความยาวคลื่นสั้นกว่ารังสีที่มองเห็นได้และมีพลังงานสูง สามารถทำให้แบคทีเรียเกิดการกลายพันธุ์หรือตายได้ ส่วนรังสีที่มองเห็นได้ไฟโตโทรฟิคแบคทีเรียมีรงควัตถุดูดพลังงานจากรังสีนี้แล้วนำไปใช้ในการสังเคราะห์ ATP

11.4 คลื่นเสียง คลื่นเสียงที่มีความถี่สูงประมาณ 100,000 ครั้งต่อวินาที หรือมากกว่าจะทำให้เซลล์แบคทีเรียแตก