

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

Cultivation media

&

Cultivation of microorganism

ความสำคัญ

- การศึกษาจุลินทรีย์ต้องนำจุลินทรีย์มาจากธรรมชาติ
- ทำให้เจริญเติบโตในห้องปฏิบัติการ
- ต้องทราบถึงสถานะที่เหมาะสม และสารอาหารที่จุลินทรีย์ต้องการ

ความต้องการสารอาหารของสิ่งมีชีวิต

1. แหล่งพลังงาน

- พลังงานจากดวงอาทิตย์ --- phototroph
- oxidation ของสารเคมี -- chemotroph

2. แหล่งคาร์บอน

- ใช้ CO_2 --- Autotroph
- ใช้สารอินทรีย์ --- Heterotroph

3. แหล่งของอิเล็กตรอน

- สารอนินทรีย์ -- lithotroph
- สารอินทรีย์ -- organotroph

4. แหล่งของไนโตรเจน

- N_2
- Inorganic nitrogen เช่น เกลือไนไตรต์, ไนเตรท

ดร.ทรงอำนาจ พงษ์สมบูรณ์ Organic nitrogen เช่น กรดอะมิโน, โปรตีน

ความต้องการสารอาหารของสิ่งมีชีวิต

5. แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัสแหล่งพลังงาน

- O_2 ได้จากน้ำ สารอาหาร
- S ได้จาก organic sulfur, inorganic sulfur, sulfur

6. ไอออนของโลหะ

- ใช้มาก = K^+ Ca, Mg, Fe
- ใช้น้อย = Zn, Cu, Mn, Mo, Ni, B, Co,

7. วิตามิน

- ต้องการในปริมาณน้อย แต่สำคัญต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโต
- Co-enzyme

ลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ตามแหล่งพลังงาน

Table 27.1 Major Nutritional Modes

Mode of Nutrition	Energy Source	Carbon Source	Types of Organisms
Autotroph			
Photo-autotroph	Light	CO ₂	Photosynthetic prokaryotes, including cyanobacteria; plants; certain protists (algae)
Chemo-autotroph	Inorganic chemicals	CO ₂	Certain prokaryotes (for example, <i>Sulfolobus</i>)
Heterotroph			
Photo-heterotroph	Light	Organic compounds	Certain prokaryotes
Chemo-heterotroph	Organic compounds	Organic compounds	Many prokaryotes and protists; fungi; animals; some parasitic plants

ลักษณะการดำรงชีวิตของจุลินทรีย์ตามความสามารถในการสังเคราะห์อาหาร

1. **Autotrophic organism** หมายถึงจุลินทรีย์ที่สร้างอาหารเองได้ โดยใช้สารอนินทรีย์เป็นวัตถุดิบ พลังงานอาจได้มาจากการสังเคราะห์แสง หรือ oxidation-reduction ของสารเคมีก็ได้ ได้แก่ photolithotrophic type และ chemolithotrophic type
2. **Heterotrophic organism** หมายถึงจุลินทรีย์ที่ไม่สามารถสังเคราะห์อาหารเองได้ต้องใช้อาหารจากการสร้างของสิ่งมีชีวิตอื่น พลังงานอาจได้มาจากการสังเคราะห์แสง หรือ oxidation-reduction ของสารเคมีก็ได้ photoorganotrophic type และ chemoorganotrophic type

Mode of nutrition		Energy Source	Carbon Source	Electron donor	organism
Autotroph	Photolithotroph	แสง	CO ₂	สารอินทรีย์	Purple bact, green purple bact
heterotroph	Photoorganotroph	แสง	สารอินทรีย์ ex. Alcohol, กรด ไขมัน	สารอินทรีย์	Purple non sulfur bact
Autotroph	Chemolithotroph	Oxidation ของสารเคมี	CO ₂	สารอินทรีย์	Sulfur bact, iron bact, hydrogen bact
heterotroph	Chemoorganotroph	Oxidation ของสารเคมี	สารอินทรีย์	สารอินทรีย์ ex glucose	แบคทีเรียส่วนใหญ่

ศัพท์ที่เกี่ยวข้อง

- Culture medium อาหารเลี้ยงเชื้อ
- A *culture* (นาม) is the microorganisms that grow in a culture medium.
- To *culture* (กริยา) means to grow microorganisms in a culture medium.
- Inoculum จุลินทรีย์ที่จะนำไปเพาะในอาหารเลี้ยงเชื้อ
- Axenic culture เชื้อบริสุทธิ์ที่เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์เริ่มต้นเซลล์เดียวกันมีลักษณะทางพันธุกรรมเหมือนกัน
- Pure culture เชื้อบริสุทธิ์ที่ปราศจากเชื้อจุลินทรีย์อื่นเจือปน
- Mixed culture เชื้อผสม

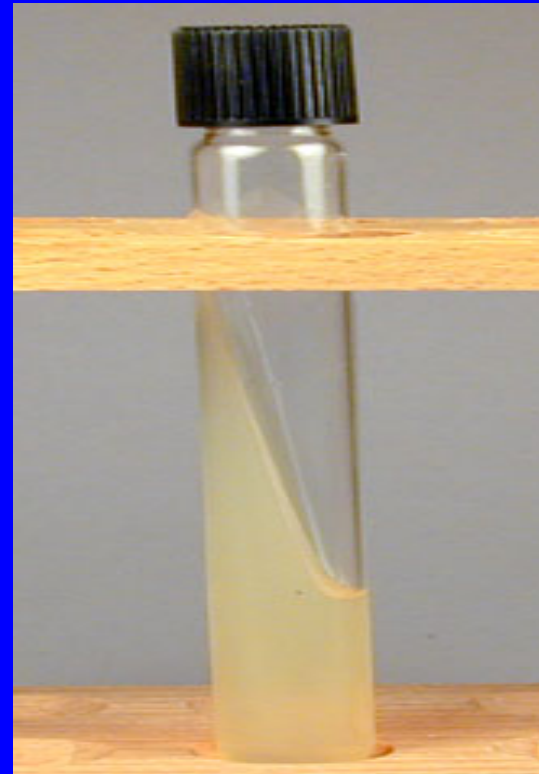
Culture medium อาหารเลี้ยงเชื้อ

- อาจเรียกสั้นๆ ว่า media
- หมายถึงสารที่เตรียมขึ้นมาเพื่อเลี้ยงจุลินทรีย์ มีแหล่งอาหารสำหรับการเจริญ และ ทวีจำนวนของจุลินทรีย์
- มีสารอาหารเหมาะสมสำหรับจุลินทรีย์แต่ละชนิด
- pH เหมาะสม มีความชื้นเพียงพอไม่มีสารพิษปราศจากจุลินทรีย์ชนิดอื่น ราคาถูก หาง่าย
- อาหารเลี้ยงเชื้อมีความจำเป็นต่อการศึกษาทางด้านจุลชีววิทยาเป็นอย่างมาก อาหารแต่ละชนิดมีจุดประสงค์ในการใช้ต่างกัน จุลินทรีย์แต่ละชนิดมีความ ต้องการสารอาหารต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่ต้องจัดเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อให้เหมาะสมเพื่อการศึกษาที่จุลินทรีย์ที่ต้องการ และสมบูรณ์

ชนิดของอาหาร

Media can be liquid or solid

1. อาหารเหลว (liquid media หรือ broth) : เตรียมง่าย ใช้สะดวก เหมาะสำหรับการเลี้ยงจุลินทรีย์เพื่อเพิ่มจำนวน แต่ไม่สามารถใช้เพื่อแยกเชื้อบริสุทธิ์ได้
2. อาหารแข็ง (solid media): เติมวุ้น (agar) ซึ่งเป็นสารที่ทำอาหารแข็งตัว โดยทั่วไป มักเติมวุ้นในอาหารเหลว 1.5%
 - วุ้นหลอมเหลวที่ 80-90 °C เมื่ออุณหภูมิลดต่ำลง วุ้นคงสภาพเหลว จนถึง 40-42 °C. วุ้นจะแข็งตัว จุลินทรีย์น้อยชนิดที่ย่อยวุ้นได้
 - Slant
 - Deep
 - Petri dish
3. อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid media) เติมวุ้น 0.5 %



ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 1. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนผสมหรือองค์ประกอบของอาหาร
 - 1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีที่แน่นอน (artificial media หรือ non-synthetic media) เช่น NB, NA, PDA
 - มีเนื้อเยื่อพืช หรือสัตว์ ซึ่งเป็นสารอินทรีย์
 - peptone ได้จากการย่อยสลายโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ ด้วยกรด หรือ เอนไซม์
 - beef extract แห่ล่งคาร์โบไฮเดรต, organic -N, วิตามินที่ละลายน้ำ
 - yeast extract แห่ล่งวิตามิน B, organic-C and N
 - Agar คาร์โบไฮเดรตขนาดใหญ่ ได้จากสาหร่ายสีแดง
 - 1.2 อาหารสังเคราะห์ (synthetic media หรือ chemically defined media) ทราบองค์ประกอบและทราบปริมาณขององค์กัทางเคมีที่แน่นอน
 - เช่น อาหารเลี้ยง *Lactobacillus*
 - อาหารเลี้ยง cyanobacteria ที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้

อาหารเลี้ยงเชื้อ	ส่วนประกอบ	ปริมาณ	ประโยชน์
<u>Nutrient agar</u>	Beef extract	3 g	วิตามิน เกลือแร่
	peptone	5 g	ไนโตรเจน
	agar	15 g	ทำให้อาหารแข็ง
	water	1000 ml	ตัวทำละลาย
	<u>Trypticase soy broth</u>	Trypticase	17 g
	Soy peptone	3 g	N, CHO และวิตามิน
	NaCl	5 g	เกลือแร่
	K_2HPO_4	2.5 g	buffer
	Glucose	2.5 g	คาร์บอน+พลังงาน
	water	1000 ml	ตัวทำละลาย

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

- 2. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามประโยชน์ที่ใช้
 - 2.1 enriched media ใช้กับแบคทีเรียที่เลี้ยงยาก มีการเติมสารบางอย่างเพื่อเร่งการเจริญเติบโต เช่น blood agar, chocolate agar, Loeffler medium, sial-water enriched media
 - 2.2 selective media ใช้แยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากตัวที่ไม่ต้องการ
 - mannitol salts agar (selects against non-skin flora)
 - MacConkey agar (selects against gram-positives)
 - eosin-methylene blue agar (selects against gram-positives)
 - phenylethyl alcohol agar (selects against gram-negatives)



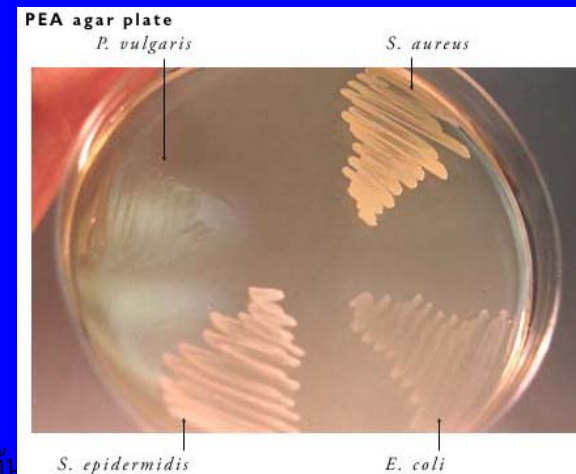
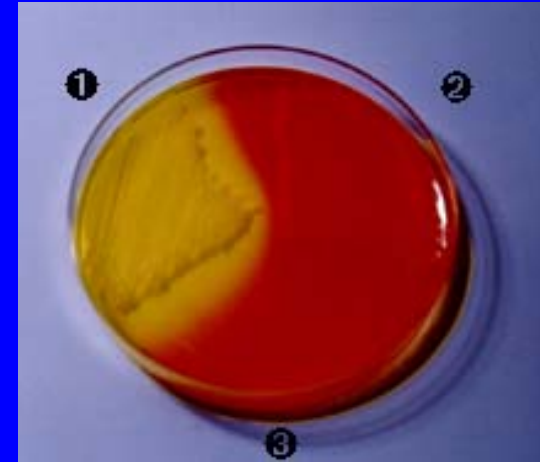
Selective media

- Mannitol salt agar

- เกลือ 7.5 % จุลินทรีย์ที่ทนเกลือ (salt tolerant) เท่านั้นที่ขึ้นได้

- Phenylethyl Alcohol Agar (PEA)

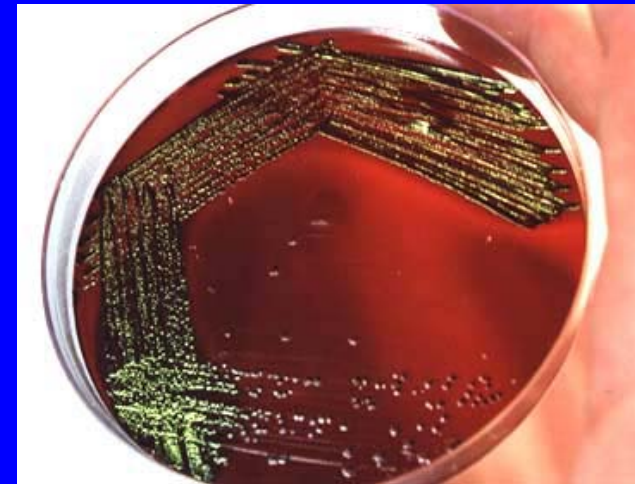
- ใช้แยก G + ออกจาก G -
- มี phenylethly alcohol



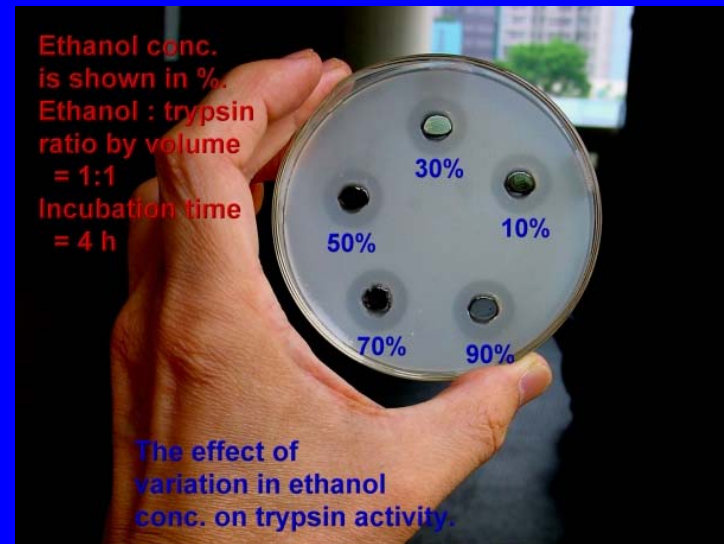
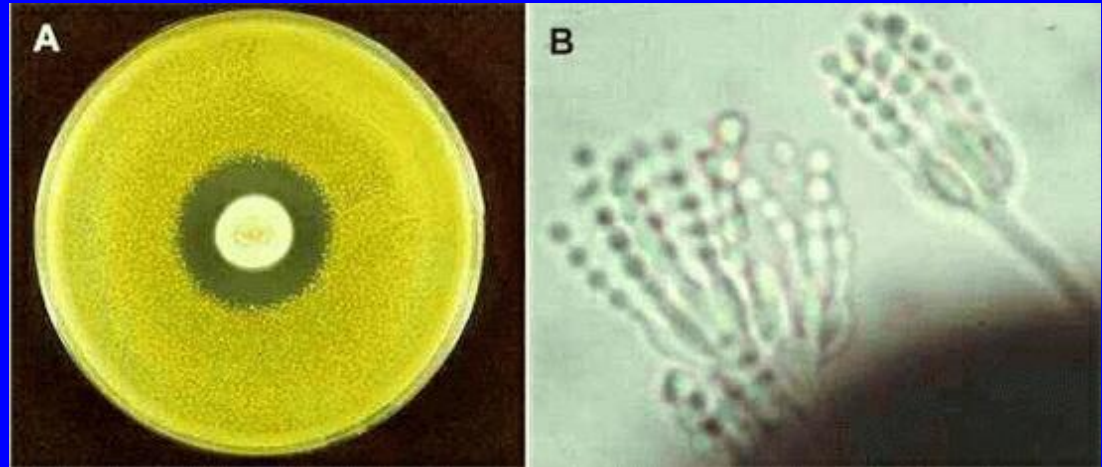
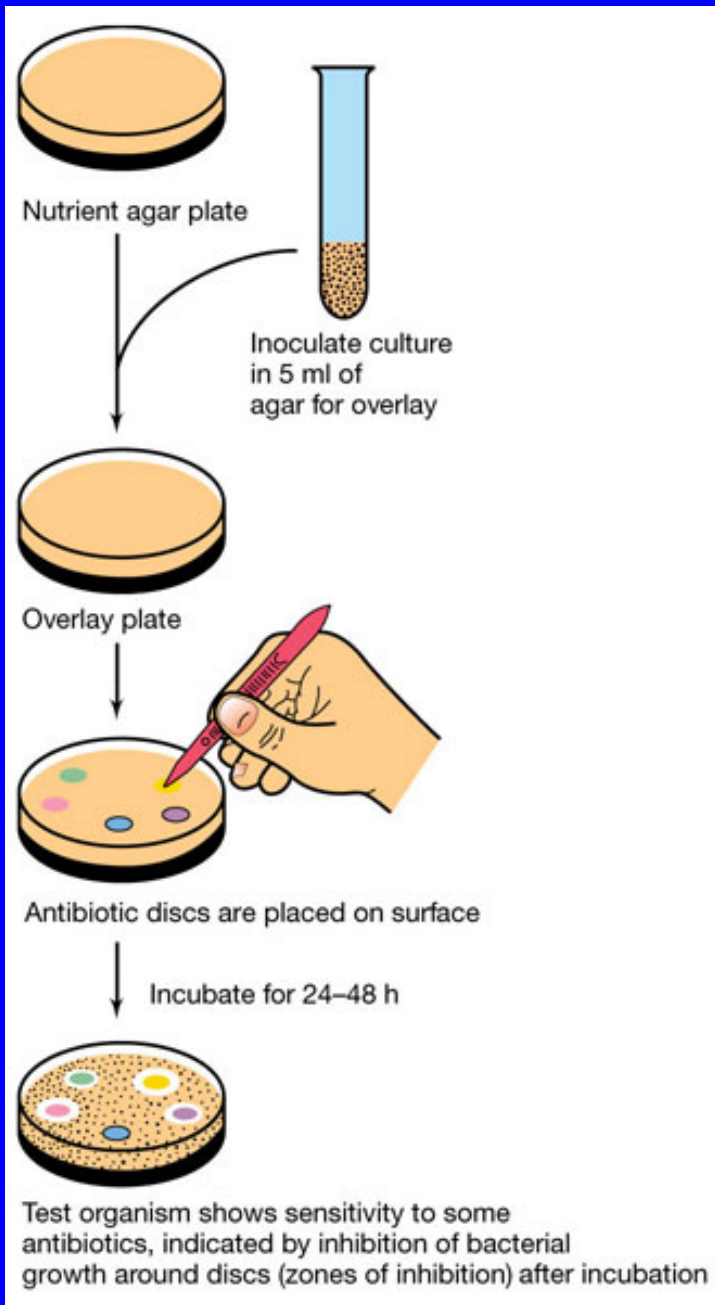
- **2.3 differential media** ใช้แยกแบคทีเรียที่ปะปนกันอยู่ โดยใช้ความแตกต่างของโคโลนี
 - **mannitol salts agar (mannitol fermentation = yellow)**
 - **blood agar (various kinds of hemolysis)**
 - **MacConkey agar (lactose fermentation = yellow)**
 - **eosin-methylene blue agar (various kinds of differentiation)**
- **อาหารหลายชนิดมีคุณสมบัติเป็นทั้ง selective media and differential media**



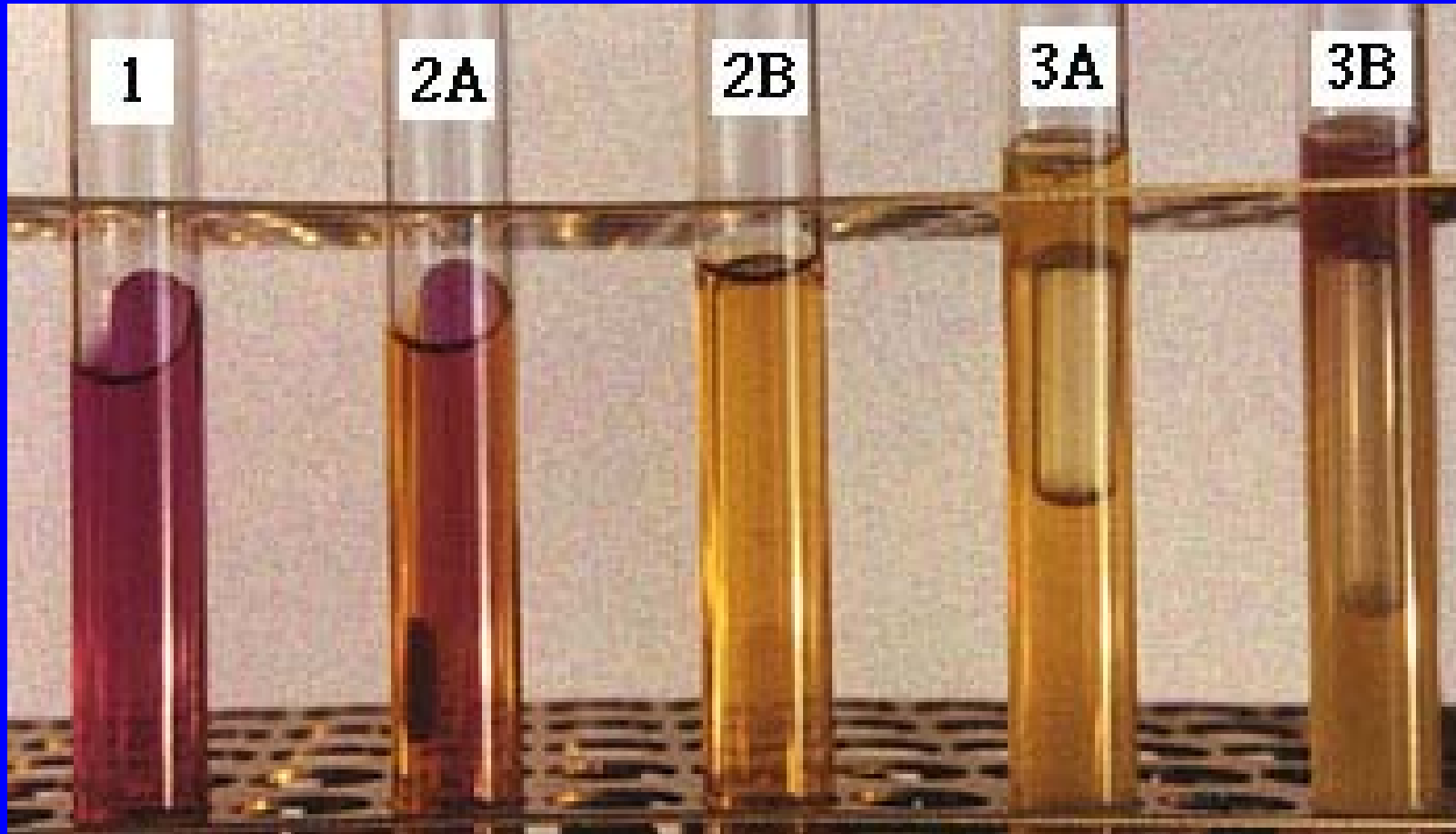
- **Eosin Methylene Blue Agar (EMB)**
- **ในแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae โดยอาหารจะมี Eosin methylene blue agar ซึ่งจะยับยั้ง G – และจะทำให้เห็นความแตกต่างระหว่างแบคทีเรียที่ and differentiates those which ferment lactose (the coliforms) from the coliforms which do not ferment lactose.**



- 2.4 assay media มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารต่างๆ เช่น วิตามิน กรดอะมิโน สารปฏิชีวนะ
- 2.5 media for enumeration of microorganism ใช้สำหรับตรวจนับจุลินทรีย์บางชนิด เนื่องจากองค์ประกอบของอาหารเหมาะกับการเจริญ เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือน้ำนม
- 2.6 media for characterization of microorganism เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร รวมทั้งสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี
- 2.7 maintenance media เป็นอาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อได้นานที่สุดโดยที่เชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม มีการลดองค์ประกอบบางอย่างลง เพื่อให้เชื้อเจริญช้าลง ปลอดภัยของเสียน้อยลง



การศึกษาลักษณะการผลิตกรดและก๊าซ



No fermentation is seen in Tube 1. The pH indicator remains purple. Fermentation with the production of acid (yellow color) but no gas is seen in Tubes 2A and 2B. Tube 2A shows a weakly-positive reaction.

Fermentation with the production of acid (yellow color) and insoluble gas (bubble in Durham tube) is seen in Tubes 3A and 3B.

สภาพแวดล้อมที่มีผลต่อการเจริญของจุลินทรีย์

- จุลินทรีย์เหมือนสิ่งมีชีวิตอื่นที่ต้องการเพิ่มจำนวนเพื่อความอยู่รอด
- การเจริญหรือทวีจำนวนขึ้นกับปัจจัยหลายประการ
 - สารอาหาร
 - อุณหภูมิ
 - อากาศ
 - ความเป็นกรดต่าง (pH)
 - ความชื้น
 - แร่ธาตุ
 - รังสี

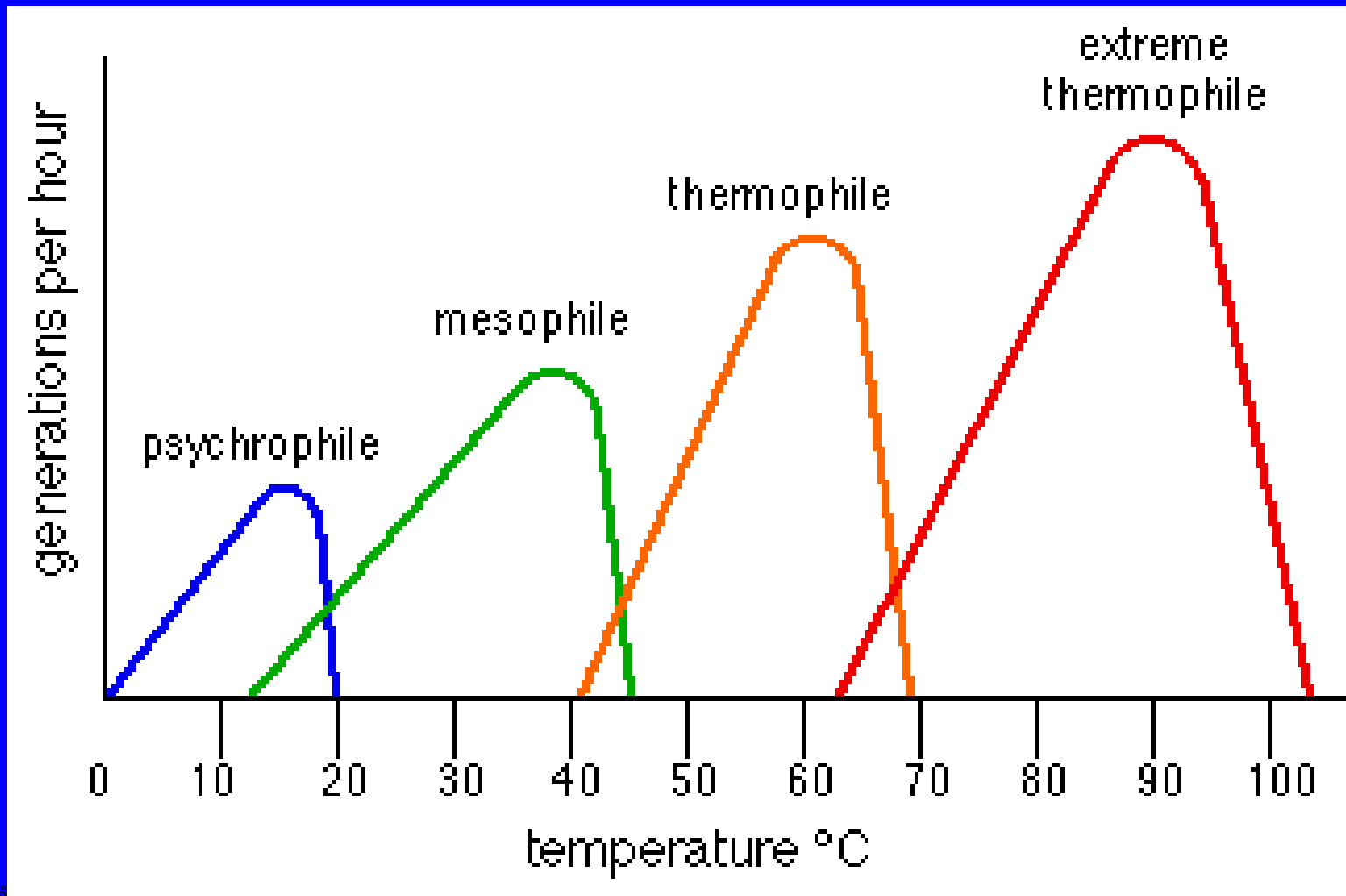
อุณหภูมิ (temperature)

- จุลินทรีย์แต่ละชนิดต้องการช่วงอุณหภูมิในการเจริญแตกต่างกันไป เช่น
 - Minimum temperature: อุณหภูมิต่ำสุดที่จุลินทรีย์เจริญได้ มีการแบ่งตัวน้อยมาก
 - Optimum temperature: อุณหภูมิเหมาะสมที่สุดสำหรับการเจริญแบ่งตัวได้เร็วที่สุด
 - Maximum temperature: อุณหภูมิสูงสุดที่แบคทีเรียเจริญได้

อุณหภูมิที่เหมาะสม (optimum temperature) ต่อการเจริญ ของจุลินทรีย์แต่ละชนิดต่างกัน

- ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มจุลินทรีย์ตามอุณหภูมิที่เหมาะสมได้ 3 กลุ่ม คือ
 - 1. Psychophilic microbe
 - 2. Mesophilic microbe
 - 3. Thermophilic microbe
 - 4. extremophile microbe
 - Phile, philic = ชอบ

อุณหภูมิ



นอกจากนี้มีจุลินทรีย์บางกลุ่มที่เป็นพวก mesophile แต่สามารถปรับตัวให้เจริญได้ในสภาพอุณหภูมิที่ต่ำกว่า หรือสูงกว่าที่เคยดำรงชีวิตตามปกติ

- Psychrotolerant: เป็น mesophile ที่สามารถปรับตัวให้ทนกับสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิต่ำได้
- Thermotolerant: สามารถปรับตัวให้ทนกับสภาพแวดล้อมที่อุณหภูมิสูงได้ แต่ไม่ใช่พวก thermophile

อากาศ

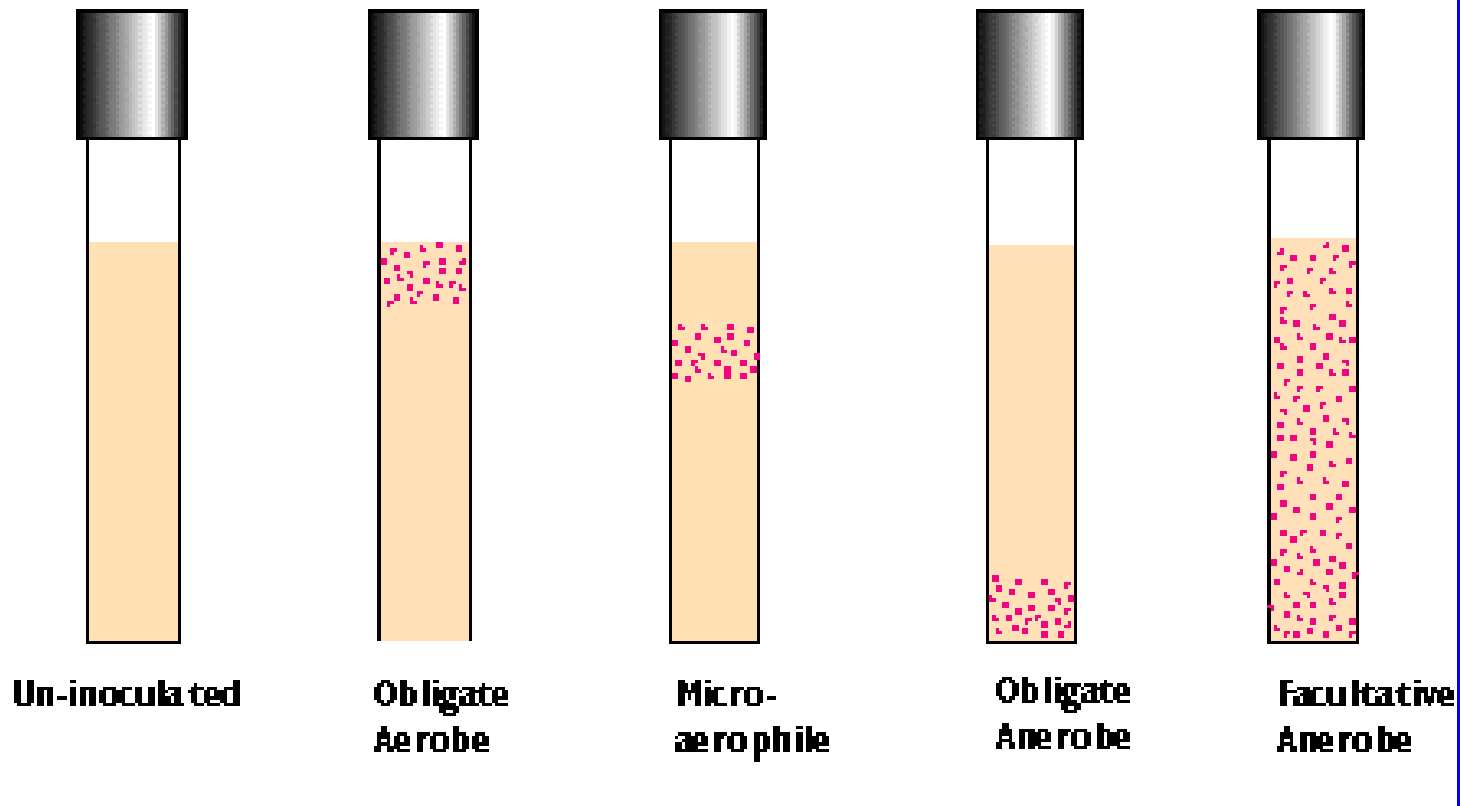
- ก๊าซไนโตรเจน 78 %
- ก๊าซออกซิเจน 20 %
- ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 0.03 %
- ก๊าซทั้ง 3 ชนิดจำเป็นต่อการเจริญของจุลินทรีย์อย่างยิ่ง

แบ่งกลุ่มจุลินทรีย์และแบคทีเรียตามความต้องการออกซิเจน

- Aerobic type เจริญได้เฉพาะบริเวณที่มีออกซิเจนเท่านั้น
- Microaerophile type เจริญได้ดีในบริเวณที่มีออกซิเจนเล็กน้อย ถ้ามีออกซิเจนมากจะเจริญช้าๆ
- Anaerobic type เจริญได้ดีในที่ที่ไม่มีออกซิเจน
- Facultative anaerobic type เจริญได้ทั้งสภาพที่มี และ ไม่มีออกซิเจน เนื่องจากสามารถเปลี่ยนแปลงระบบเมตาบอลิซึมของตนเองได้

ความต้องการอากาศ

GROWTH LOCATION BASED ON GASEOUS REQUIREMENT

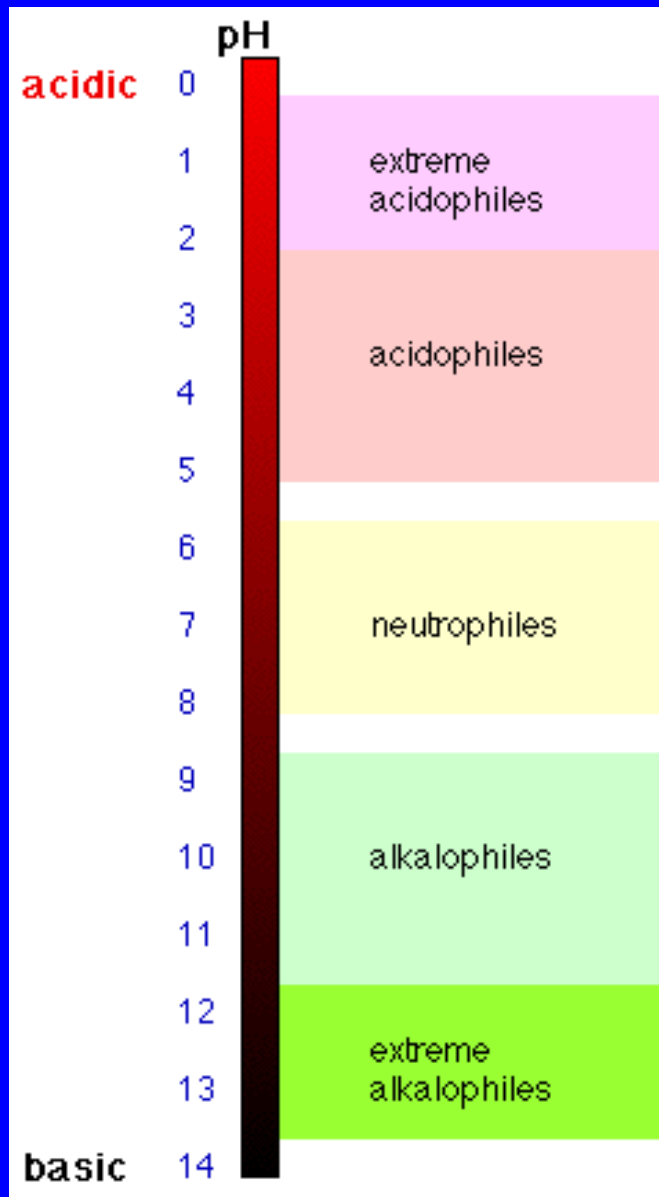


ความชื้น

- น้ำเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับการมีชีวิต
- แบคทีเรียเจริญได้ดีในอาหารที่มีน้ำผสมอยู่มากกว่าในที่มีน้ำผสมอยู่น้อย
- ในอาหารเลี้ยงเชื้อ nutrient broth มีน้ำอยู่ 98.7 %
- ความต้องการน้ำของจุลินทรีย์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันไป
- แบคทีเรียและยีสต์ต้องการน้ำมาก แต่เราต้องการน้ำน้อยในการเจริญ

pH

- pH เหมาะสมในการเจริญของจุลินทรีย์แตกต่างกันไป
- ส่วนมากเจริญได้ที่ pH 6-8
- ยีสต์และราเจริญส่วนใหญ่ได้ดีในสภาวะเป็นกรด
- acidophile
- แบคทีเรียเจริญส่วนใหญ่ได้ดีในสภาวะเบส
- alkaliphile
- ในกระบวนการหมักมีการเปลี่ยนแปลงของ pH ในช่วง death phase



Acidophiles = acid pH optimal (1 to 5.5)

Neutrophiles = pH 5.5 to 8 optimal

Alkaliphiles = pH 8.5 to 11.5

Extreme alkaliphiles = optimum pH 10 or greater

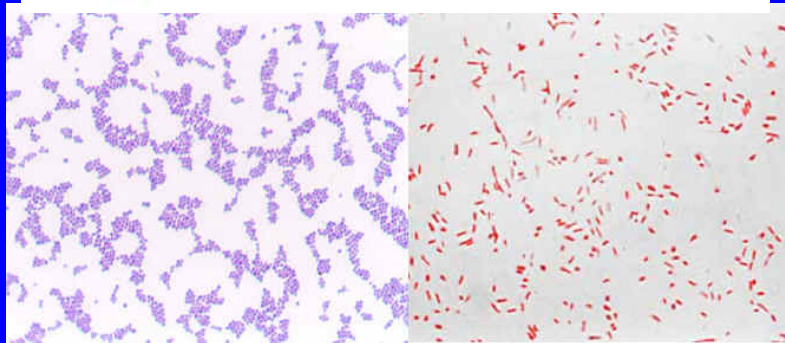
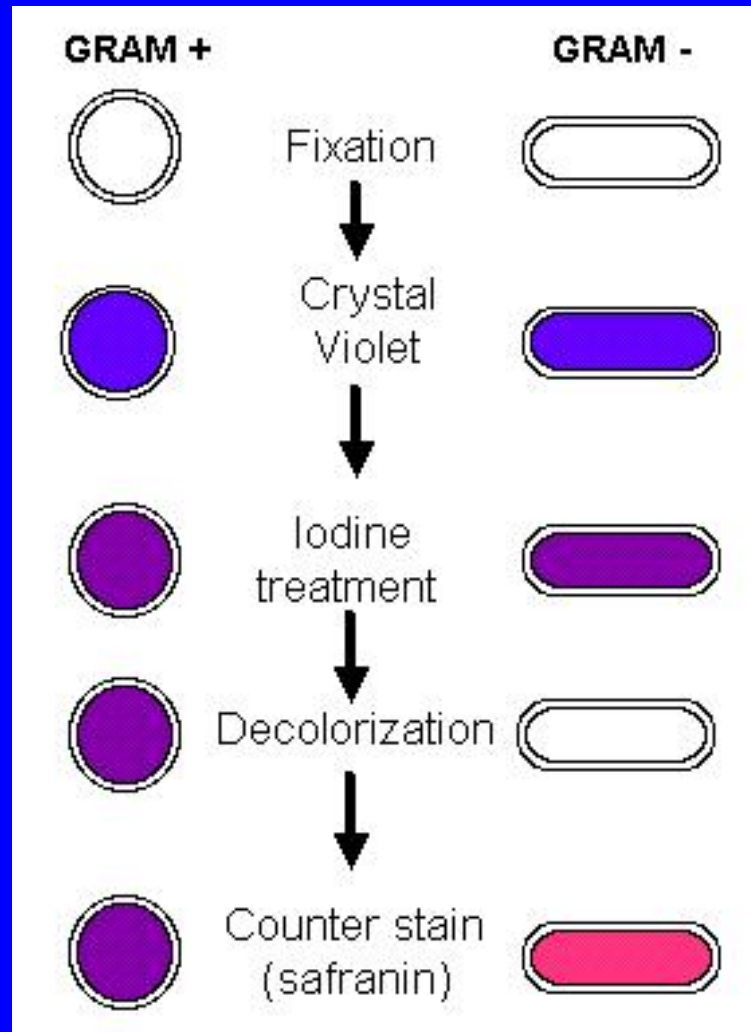
Note: most bacteria are neutrophiles

(Exceptions: some bact in hot springs have optimum of 1-3)

But most fungi prefer slight acid (pH 4 to 6)

เทคนิคในการศึกษาแบคทีเรีย

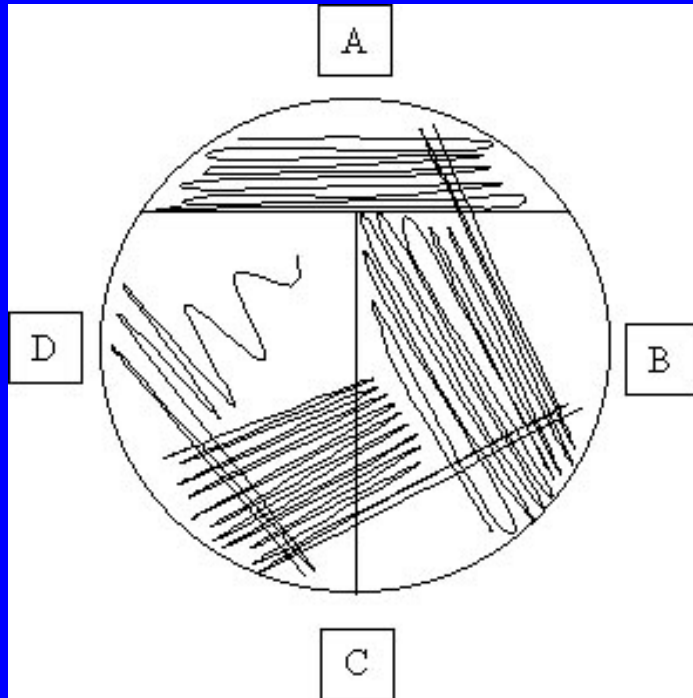
- การย้อมสีแบคทีเรีย เป็นการแลกเปลี่ยน ion ของเซลล์กับสี สีจะเข้าไปแทน ion บนส่วนประกอบของเซลล์
 - Acid dye เช่น สี eosin
 - Basic dye เช่น methylene blue
- การแยกเชื้อบริสุทธิ์
 - Streak plate technique
 - Pour plate technique
 - Spread plate technique
- การเพาะเชื้อแบคทีเรีย
- การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย

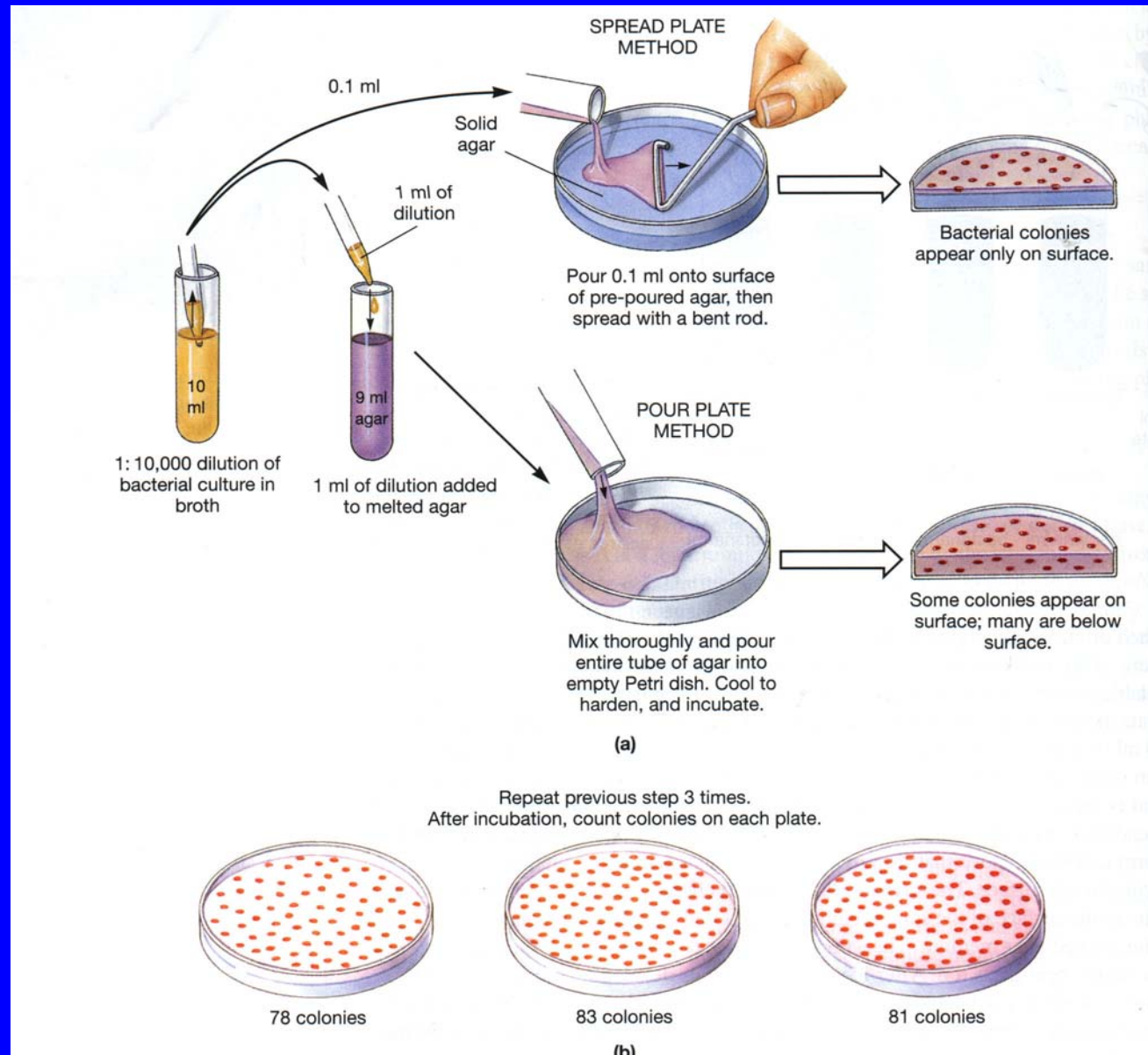


Gram Stains

แยกชนิดแบคทีเรียโดยใช้องค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกันของ cell wall

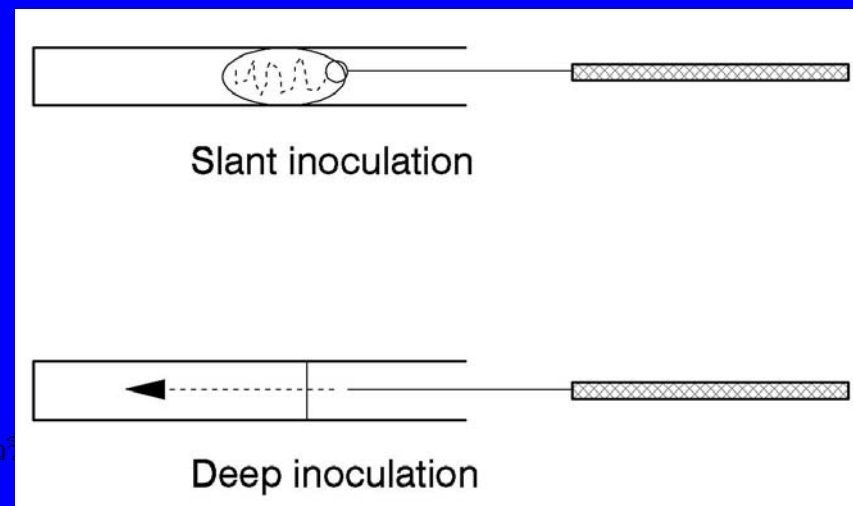
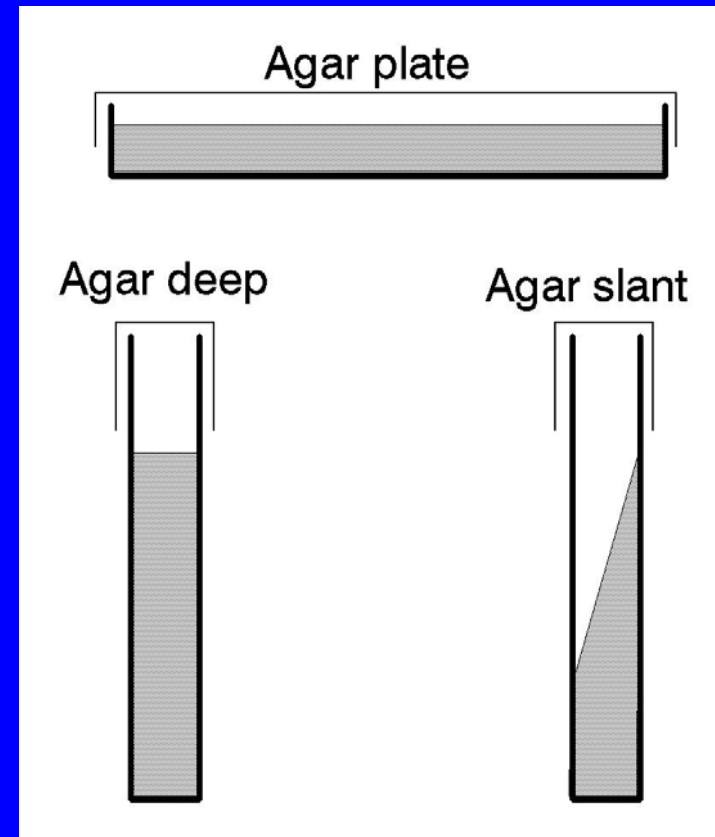
การแยกเชอบริสุทธิ์





การเพาะเชื้อแบคทีเรีย

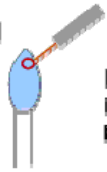
- Agar plate culture
- Agar slant culture
- Agar deep culture
- Broth culture



INOCULATION

If using a broth culture or other liquid source

Stage 1



Heat wire loop to red hot in a non-luminous Bunsen flame ... then leave loop to cool

Stage 2

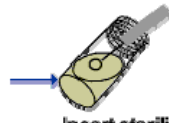
Universal screw-capped bottles are held at an angle



Loosen lid carefully, then remove lid and pass mouth of bottle through flame

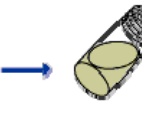


Do not put lid down on bench!

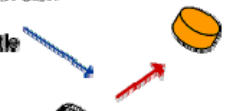


Insert sterilised loop and pick up a drop of liquid

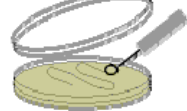
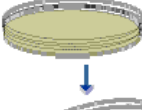
Pass mouth of bottle through flame again before applying lid



Drop of liquid may be transferred to agar in Petri dish or broth in a universal bottle

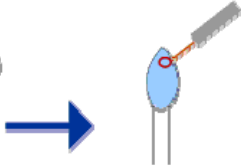


Lid of Petri dish is opened as little as possible and liquid is spread over the agar surface



ESSENTIAL!

Used wire loop must be heated again to red hot - in order to kill the remaining bacteria



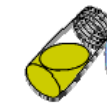
Mouth of second bottle is flamed



Drop of liquid is transferred



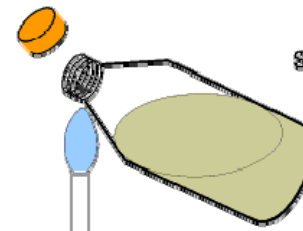
Bottle is flamed again and sealed



© R.G. Steane

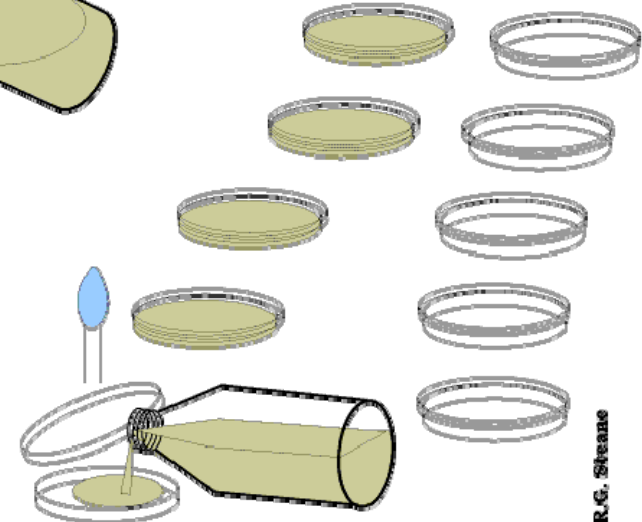
"Pouring a Plate"

Sterilised molten agar is poured in and left to set.



Neck of agar bottle is passed through flame

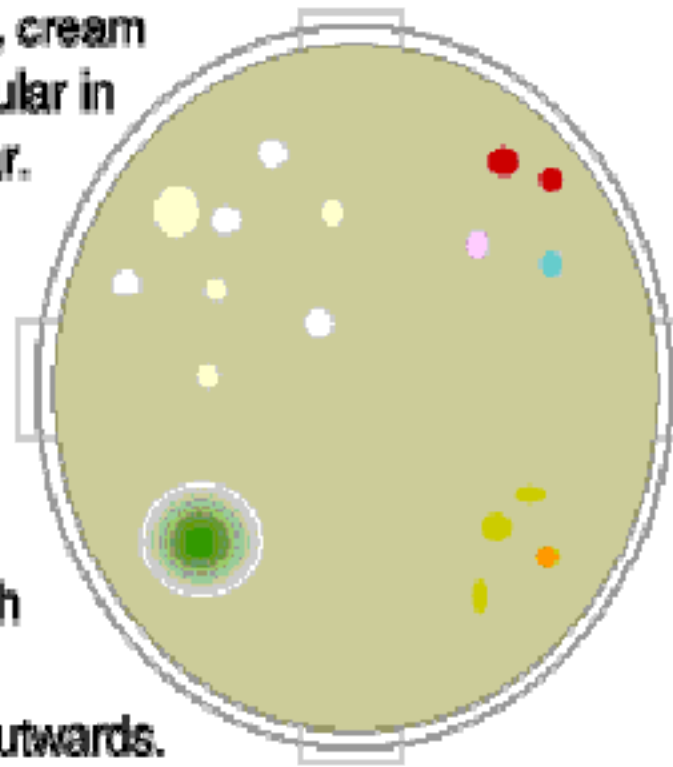
Petri dish lid is opened as little as possible, angled and kept over the base.



Each Petri dish holds about 20 ml, so 200ml will do for 10.

© R.G. Steane

Most bacterial colonies are white, cream or yellow in colour, and fairly circular in shape. Yeast colonies look similar.



Occasionally bacterial colonies may be found which are red/brown, or blue/green.

Moulds are often whitish grey, with fuzzy edges. They often turn to a different colour, from the centre outwards.

© R.G. Steane