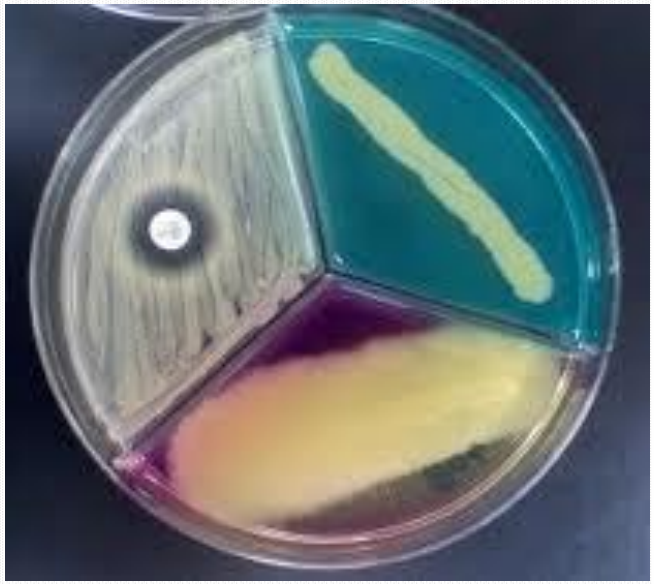
บทที่ 4

อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์

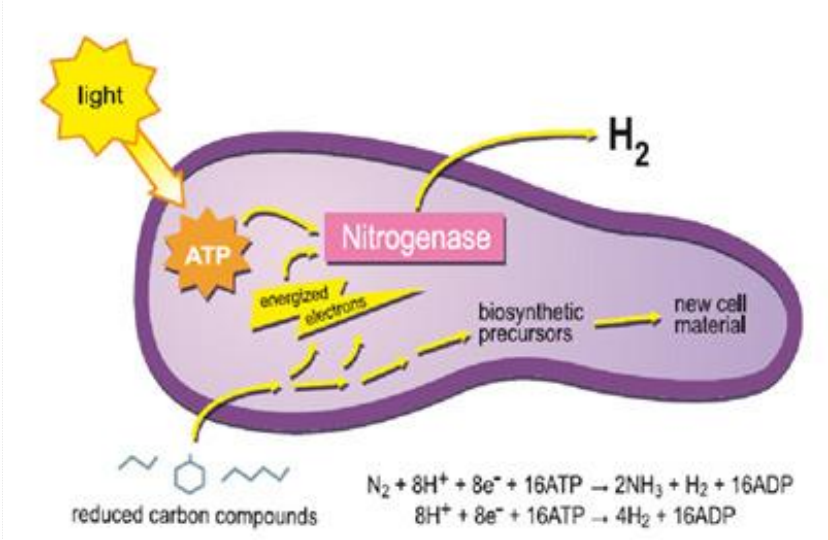


ในการศึกษาจุลินทรีย์นั้นจำเป็นต้องนำจุลินทรีย์มาจากธรรมชาติมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ จำเป็นต้องทราบถึงสภาพการเลี้ยงที่เหมาะสมและสารอาหารที่ต้องการ

- จึงมีการศึกษาความต้องการสารอาหารและมีผลให้ผลิตอาหารเลี้ยงเชื้อขึ้นมาเป็นจำนวนมาก เพราะจุลินทรีย์มีความต้องการสารอาหารที่มีองค์ประกอบแตกต่างกันมากด้วย

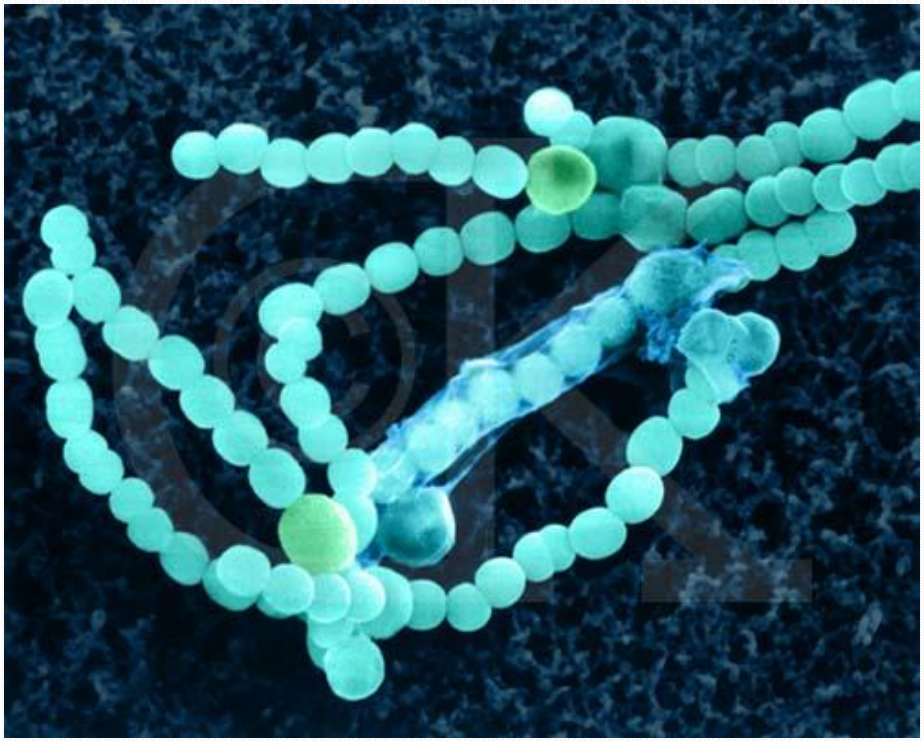
ความต้องการสารอาหารของสิ่งมีชีวิต

- สิ่งมีชีวิตทุกชนิดมีความต้องการสารอาหาร เพื่อใช้ในการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตตามปกติ ดังต่อไปนี้
- 1. แหล่งพลังงาน **(energy source)**
- พืชสีเขียวต้องการพลังงานจากแสงอาทิตย์ เรียกว่า โฟโตโทรฟ**(phototroph)** ส่วนสัตว์ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิดชันของสารเคมี เรียกว่า เคโมโทรฟ **(chemotroph)**
- จุลินทรีย์ก็สามารถได้พลังงานมาจากแหล่งดังกล่าว



2. แหล่งคาร์บอน(Carbon source)

- อาจอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์ หรือในรูปสารอินทรีย์ พืชและแบคทีเรียหลายชนิดสามารถใช้คาร์บอนไดออกไซด์ และเปลี่ยนเป็นคาร์โบไฮเดรต พวกนี้เรียก ออโตโทรฟ(autotroph) แต่ถ้าได้พลังงานจากแสงด้วยเรียกว่า โฟโตออโตโทรฟ(photoautotroph)



3. แหล่งของอิเล็คตรอน(Electron source)

- สมช.ทุกชนิดต้องการแหล่งอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม

4. แหล่งของไนโตรเจน(nitrogen)

พืชใช้ไนโตรเจนในรูปของเกลืออนินทรีย์ เช่น KNO_3 ในขณะที่สัตว์ใช้สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น โปรตีน เพปไทด์ กรดอะมิโน แบคทีเรียมีความสามารถใช้ไนโตรเจนได้กว้าง บางชนิดใช้ก๊าซไนโตรเจน, สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น แอมโมเนียม บางชนิดใช้สารอินทรีย์ไนโตรเจน เช่น กรดอะมิโน โปรตีน เพปไทด์

5. แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ ฟอสฟอรัส

ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น จากน้ำ จากสารอาหาร ส่วนซัลเฟอร์จำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด แบคทีเรียบางชนิดต้องการสารอินทรีย์ซัลเฟอร์, ธาตุซัลเฟอร์ ส่วนฟอสฟอรัสอาจอยู่ในรูปฟอสเฟต

- 6. สมช.ทุกชนิดต้องการไอออนของโลหะ
- ไอออนของโลหะบางชนิด เช่น K^+ , Ca^{2+}, Mg^{2+}, Fe^{2+} จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ สมช.บางชนิดต้องการไอออนน้อยมาก เช่น Zn^{2+} , Cu^{2+}, Mn^{2+} ,Mo^{6+} ,Ni^{2+} เรียกว่า **trace element** ซึ่งมักมีอยู่มากพอในอาหารเลี้ยงเชื้อ

7.วิตามิน

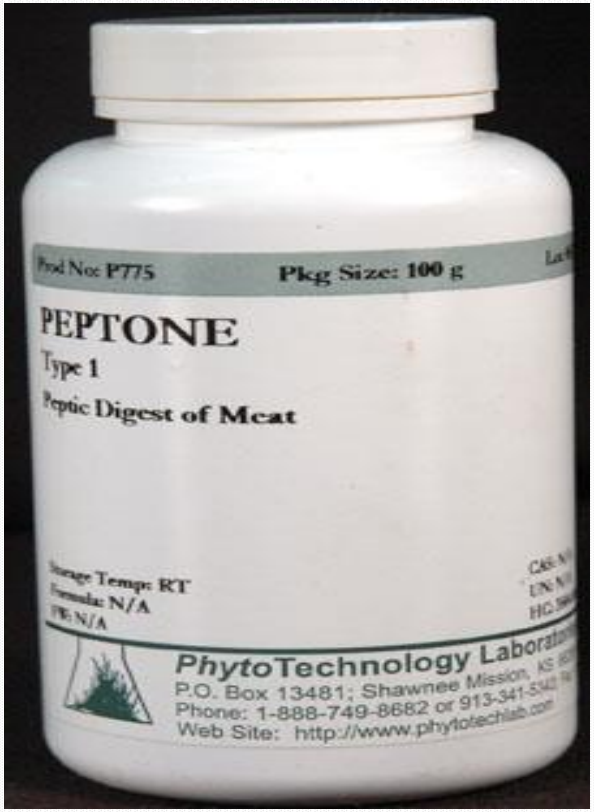
เป็นสารประกอบในสิ่งมีชีวิตที่ต้องการในปริมาณน้อย แต่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโต ถ้าขาดทำให้เกิดความผิดปกติต่างๆ ตัวอย่างวิตามินคือ ไทอามีน(B1) ไรโบฟลาวิน(B2) วิตามินเค

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งเป็น 2 ชนิดใหญ่ๆคือ

- ก. อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามส่วนผสม หรือองค์ประกอบของอาหารได้แก่
- 1. อาหารเลี้ยงเชื้อที่ไม่ทราบส่วนประกอบทางเคมีแน่นอน(artificial media หรือ non-synthetic media) อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ประกอบด้วยเนื้อเยื่อพืชและสัตว์ ซึ่งมีสารอินทรีย์มากมาย เช่น ประกอบด้วยเพปโทน(peptone) สารสกัดจากเนื้อ(meat extract) สารสกัดจากยีสต์(yeast extract) เป็นต้น

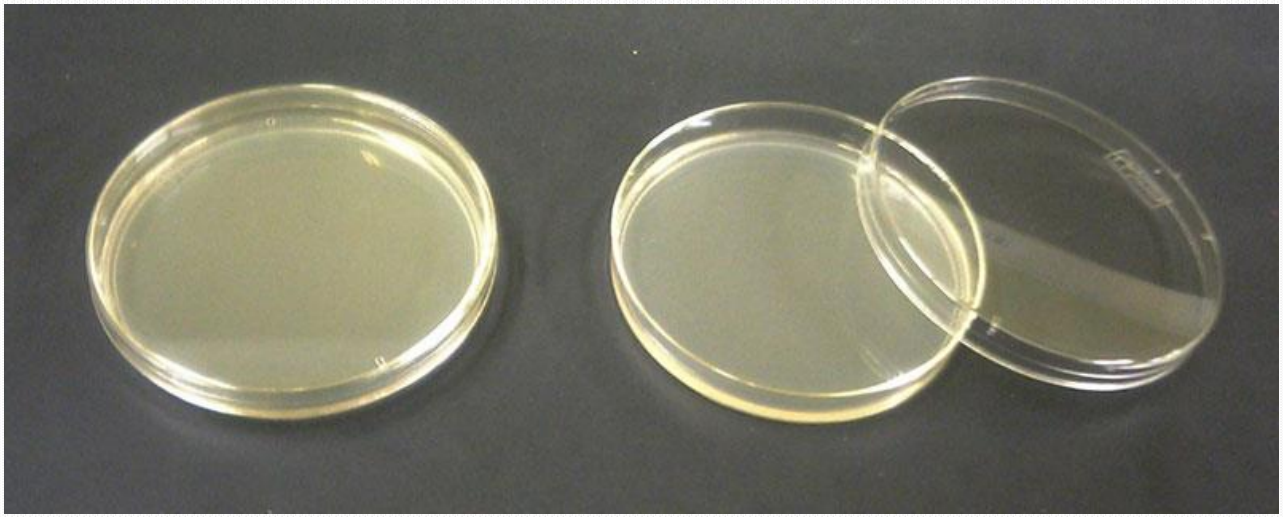
คุณค่าทางอาหารของบีฟเอกซ์แทรกซ์ ซึ่งเป็นสัดส่วนที่สกัดจากเนื้อที่ไม่มีไขมันนั้นจะประกอบไปด้วยคาร์โบไฮเดรต สารประกอบอินทรีย์ไนโตรเจน วิตามินที่ละลายน้ำ

- ส่วนเพปโทน ได้มาจากการย่อยสลายโปรตีน เช่น เนื้อสัตว์ เคซีน(โปรตีนในนม) เจลาติน ด้วยการใช้กรดหรือเอนไซม์นั้นประกอบด้วยสารอินทรีย์ไนโตรเจน วิตามิน คาร์โบไฮเดรต เพปโตนมีหลายชนิด แล้วแต่แหล่งของโปรตีนและวิธีย่อย จึงให้ประโยชน์ต่อแบคทีเรียต่างกัน

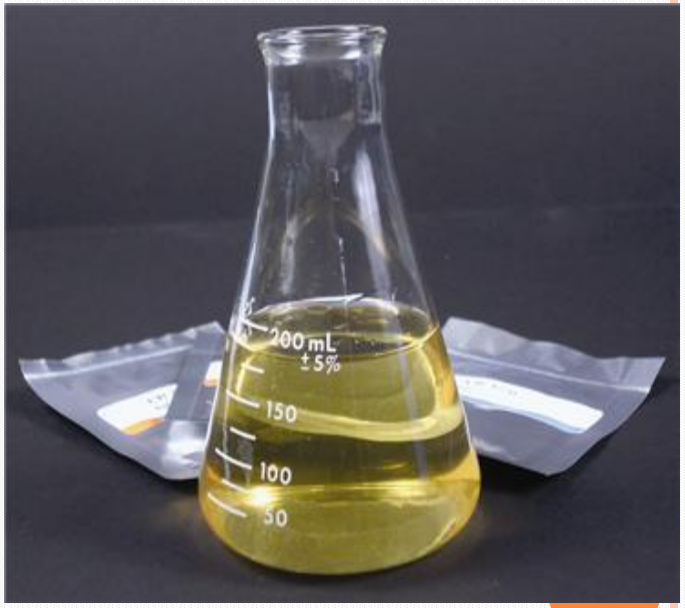


วุ้น เป็นสารคาร์โบไฮเดรตที่ซับซ้อน ได้จากสาหร่ายสีแดงบางชนิด ใช้ทำให้อาหารแข็งตัว ไม่มีคุณค่าทางอาหารแก่แบคทีเรีย

ยีสต์เอกซ์แทรกซ์(YEAST EXTRACT) สารสกัดจากเซลล์ยีสต์ มีวิตามินบีมาก และยังมีสารประกอบอินทรีย์ของคาร์บอนและไนโตรเจนด้วย



อาหารเลี้ยงเชื้อนี้ช่วยในการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด ตัวอย่างอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้กันมากในห้องปฏิบัติการ คือ อาหารเหลวเอ็นบี(N.B. หรือ Nutrient broth)



อาหารแข็งเอนเอ(N.A. หรือ Nutrient agar) ซึ่งใช้เลี้ยงแบคทีเรีย

อาหารเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

- ส่วนประกอบของอาหารเหลวเอ็นบี ประกอบด้วย
- บีฟเอกซ์แทรกซ์(beef extract) 3 กรัม
- เพปโทน(peptone) 5 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร
- ปรับ pHให้อยู่ระหว่าง 6.8 –7.2

- ส่วนประกอบของอาหารแข็งเอ็นเอ คล้ายกับของเอ็นบี แต่เติมวุ้น(agar) ลงไปเพื่อทำให้อาหารแข็งตัวด้วยอีก 15 กรัมต่อลิตร

ส่วนอาหารที่นิยมเลี้ยงเชื้อราในห้องปฏิบัติการ คือ อาหารพีดีเอ(PDA หรือ potato dextrose agar) ซึ่งมีส่วนประกอบดังนี้

- มันฝรั่ง 200 กรัม
- เดกซโทรส 20 กรัม
- วุ้น 15 กรัม
- น้ำกลั่น 1 ลิตร
- ปรับpHหรือค่าความเป็นกรด–ด่างให้ได้เท่ากับ 5.0 –5.5

2. อาหารสังเคราะห์ (Synthetic media หรือ chemically defined media) เป็นอาหารที่ทราบองค์ประกอบทางเคมีอย่างแน่นอน เช่น อาหารเลี้ยงเชื้อ *E.Coli* ที่เราทราบปริมาณแน่นอน

- อาหารเลี้ยงเชื้อ *E.Coli*

$NH_4\ H_2\ PO_4$	1 กรัม
Glucose	5 กรัม
NaCl	5 กรัม
$MgSO_4 7H_2O$	0.2 กรัม
K_2HPO_4	1 กรัม
H_2O	1000 มิลลิลิตร

chemically defined media

TABLE I

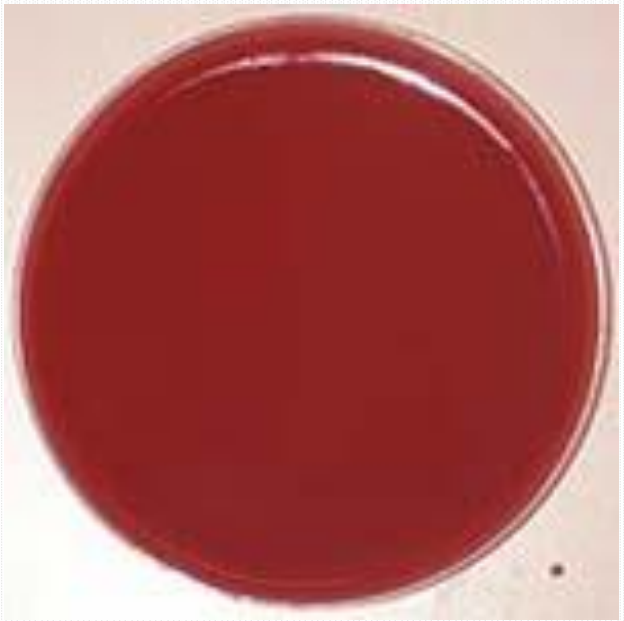
Chemically defined medium for *Phytomonas serpens* (Silva & Roitman 1989)

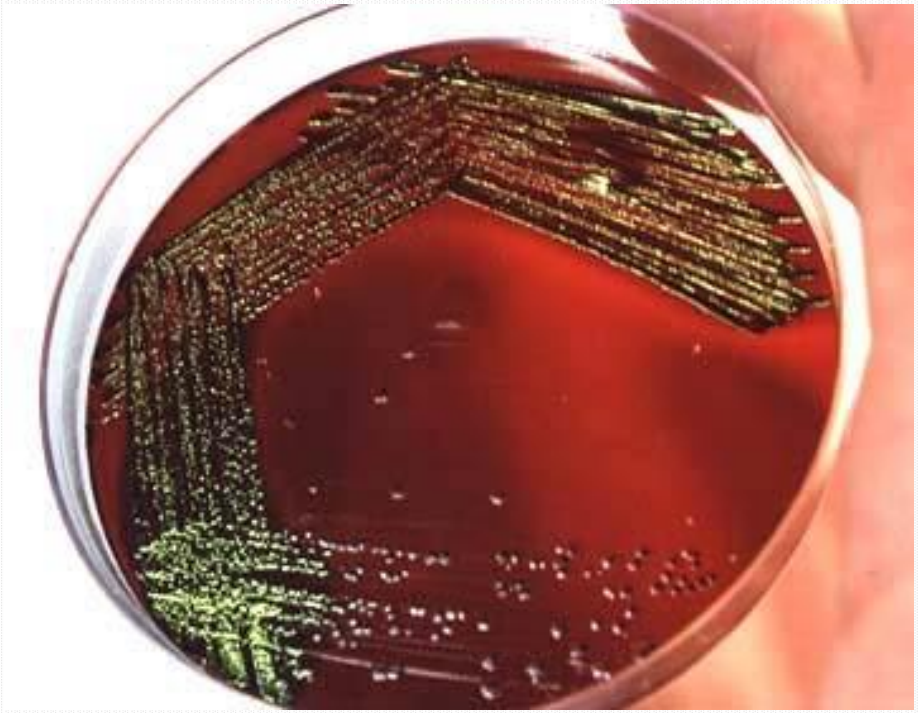
Compound	g/l	Compound	mg/l
β-Na glycerophosphate	10	Nicotinamide	2
Glucose	20	Ca pantothenate	2
Inositol	0.04	Na Riboflavine $PO_4.2H_2O$	1
Glutamic acid	0.1	Pyridoxamine.2HCl	0.6
L-Serine	0.2	Thiamine HCl	0.6
$MgSO_4$	0.05	Biotin	0.008
KCl	10	Folic acid	2
K_2HPO_4	1		
K_3Citrate.H_2O	1		
Citric acid.H_2O	0.5		
Malic acid	0.2		
Succinic acid	1		
$MgCO_3$	1		
$CaCO_3$	0.02		
$Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$	0.01		
L-arginine HCl	0.4		
L-histidine (free base)	0.3		
L-isoleucine	0.2		
L-leucine	0.2		
L-lysine HCl	0.2		
L-methionine	0.1		
L-phenylalanine	0.2		
L-threonine	0.2		
L-tryptophan	0.1		
L-tyrosine ethyl ester	0.2		
L-valine	0.2		
Adenine	0.02		
Trace elements[a]	0.2		
Hemin[b]	0.01		

pH: 7.0 adjusted HCl; *a*: to yield the following final concentration (mg/ml) - Fe 6.0 as $Fe(NH_4)_2(SO_4)_2.6H_2O$, Mn 5.0 as $MnSO_4$, Cu 0.4 as $CuSO_4$ (anhyd.), Zn 5.0 as $ZnSO_4.7H_2O$, Mo 2.0 as $(NH_4)_6.Mo_7.4H_2O$, V 4.0 as NH_4VO_3, B 0.1 as H_3BO_3, Co 0.1 as $CoSO_4.7H_2O$; *b*: supplied from a 10 mg/ml solution in 25% aqueous Quadrol (ethylene-di-nitrolotetra-2-isopropanol).

ข.อาหารเลี้ยงเชื้อแบ่งตามประโยชน์ที่ใช้ ได้แก่

- 1. เอ็นริชมีเดีย(enriched media) เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียบางชนิดที่เลี้ยงยาก เพราะเลี้ยงในอาหารธรรมดาได้ยากหรือไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลย อาหารชนิดนี้ต้องเติมสารบางอย่าง เช่น เลือด(blood) ซีรัม(serum) หรือสารที่สกัดจากเนื้อเยื่อหรือสัตว์ เพื่อเร่งการเจริญของแบคทีเรีย

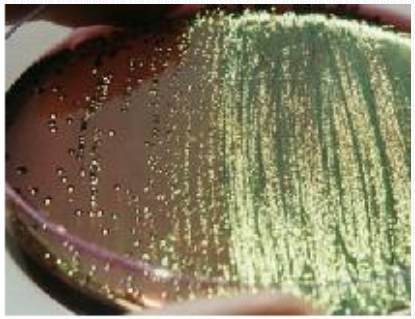




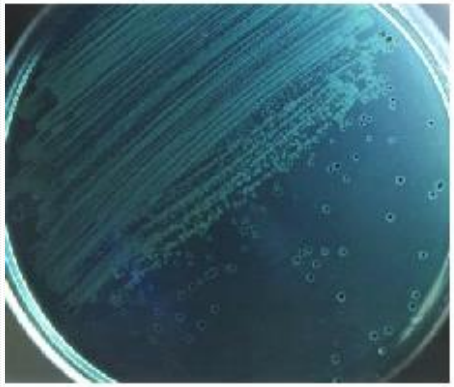
2. อาหารคัดเลือก(Selective media) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์อื่นที่ปะปนอยู่ โดยการเติมสารเคมีบางอย่างหรือเพื่อยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ โดยไม่มีผลต่อจุลินทรีย์อีกกลุ่มหนึ่ง เช่นการเติมสีคริสตัลไวโอเลต (crystal violet) เพื่อยังยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก โดยไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ

3. อาหารเลี้ยงเชื้อที่บอกความแตกต่าง(differential media) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้แยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญปะปนอยู่ในอาหารนั้น โดยอาศัยความแตกต่างของโคโลนี เช่น บลัดอาการ์มีเดีย (blood agar media) เป็นอาหารวุ้นที่เติมเลือด

Shigella on XLD



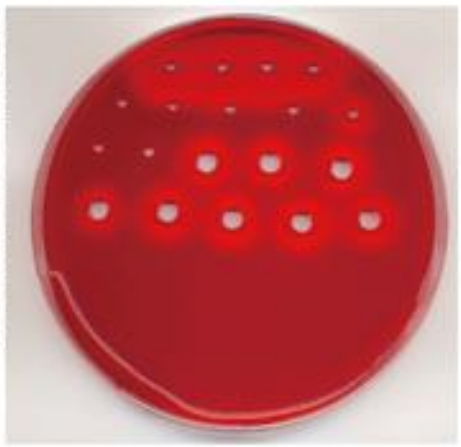
E. coli on EMB



Salmonella on HEK

Enterobacter aerogenes on EMB

ถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้จะเกิดบริเวณใส ๆ (CLEAR ZONE) ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย ซึ่งแสดงว่าได้เกิดการย่อยสลายเม็ดเลือดแดง (HEMOLYSIS) ส่วนแบคทีเรียที่ไม่ทำลายเม็ดเลือดแดงจะไม่เกิดบริเวณใส ๆ รอบโคโลนี จึงใช้แยกแบคทีเรียเหล่านี้ได้



4.อาหารที่ใช้วิเคราะห์(Assay media) เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของวิตามิน กรดอะมิโน และสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ด้วย

5. อาหารที่ใช้ในการตรวจนับจำนวนจุลินทรีย์(Media for enumeration of microorganism) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจนับจุลินทรีย์บางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือนม องค์ประกอบของอาหารจะต้องเหมาะสมกับการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านั้น

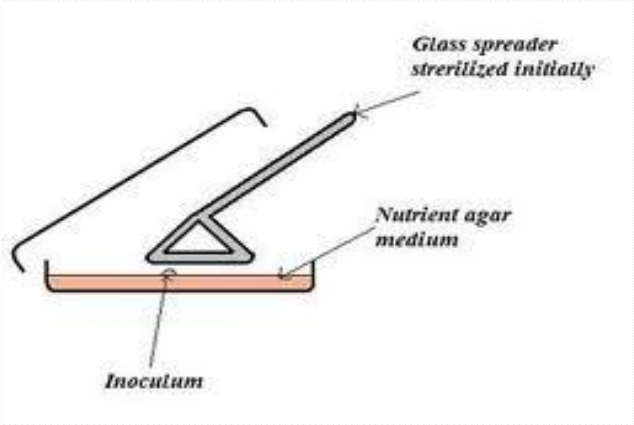
6. อาหารที่ใช้ศึกษาสมบัติของจุลินทรีย์(media for characterization of microorganism) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้ตรวจสอบสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหาร รวมทั้งสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีระวิทยาและชีวเคมี

7.อาหารที่ใช้ในการเก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์(maintenance media) เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เก็บรักษาเชื้อที่มีชีวิตให้นานที่สุด โดยเชื้อยังมีสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลง และปลดปล่อยของเสียน้อยลง เช่นน้ำตาลกลูโคสในอาหารจะเพิ่มการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็ว ดังนั้นจึงต้องลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลง

2. เทคนิคที่ใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์

- **2.1 Spread-Plate Technique**

ในแหล่งธรรมชาตินั้นปกติเชื้อแบคทีเรียจะเติบโตอยู่รวมกันหลาย ๆสายพันธุ์ เพื่อการคัดแยกและจำแนกชนิดของแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์จะต้องมีขั้นตอนการทำให้เชื้อบริสุทธิ์ **(pure culture)** โดยเทคนิคที่ทำได้ง่ายคือ **spread plate technique**



- เทคนิคนี้แบคทีเรียที่ถูกทำให้เจือจางให้มีจำนวนประมาณ **100-200** เซลล์ หรือน้อยกว่าจะถูกนำไปวางตำแหน่งตรงกลางของจานเพาะเชื้อ **(petri dish/plate)** แล้วทำการเกลี่ยให้เชื้อกระจายทั่วด้วยแท่งแก้วรูปตัว **L**

Spread-Plate Technique

- หลังจากบ่มที่อุณหภูมิที่เหมาะสมและมีระยะเวลาเพียงพอ จะปรากฏโคโลนี (colony) ของเชื้อแบคทีเรียขึ้น โดยแต่ละโคโลนีจะมีจำนวนแบคทีเรียอยู่จำนวนมาก และแต่ละโคโลนีจะถือว่ามาจากแบคทีเรียสายพันธุ์เดียว
- ดังนั้นจะทำให้เกิดการแยกจุลินทรีย์ออกมาเป็นเชื้อบริสุทธิ์ขึ้น เมื่อมองด้วยตาเปล่าแบคทีเรียแต่ละสายพันธุ์โคโลนีจะมีลักษณะแตกต่างกันนอกจากนั้นยังสามารถทำให้เชื้อมีความบริสุทธิ์มากขึ้นโดยการนำโคโลนีที่ต้องการไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเชื้อที่มีอาหารใหม่ด้วยเทคนิคที่เรียกว่า **Streak-Plate Technique**

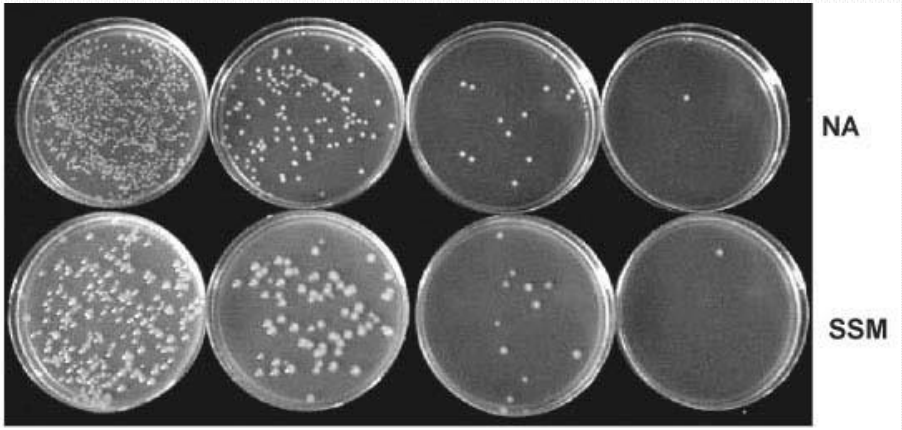


FIG. 1 - Comparison of colony forming units of *Xanthomonas axonopodis* pv. *malvacearum* in dilution plating (from left to right - 10^{-4},10^{-5},10^{-6},10^{-7}) between Difco nutrient agar (upper plates) and on semi-selective agar medium (lower plates), three days after incubation.

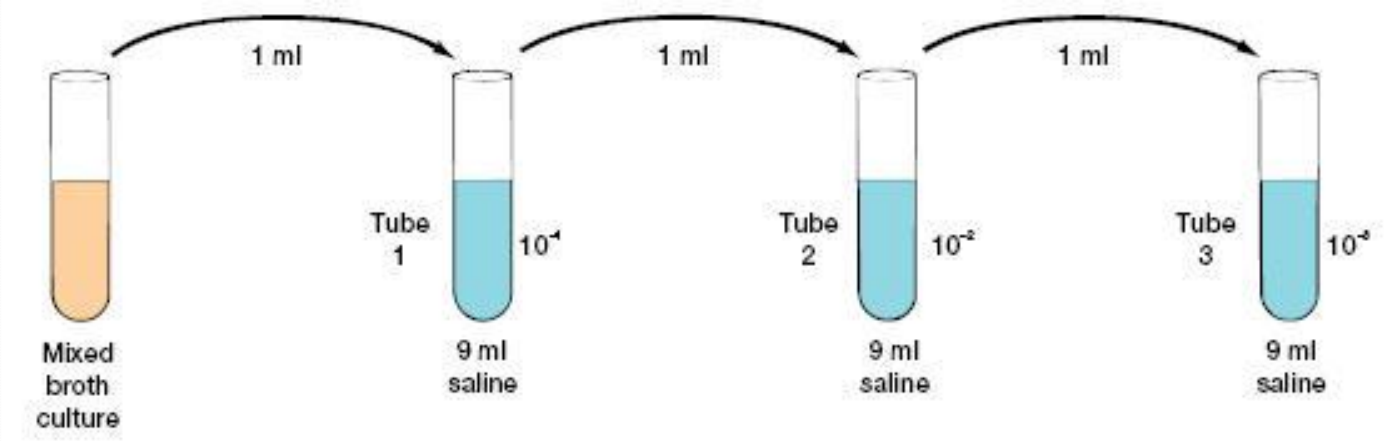
การเพาะเชื้อแบบ SPREAD PLATE

การเจือจางแบบ 10 serial dilutions

- ปิเปต 1 ml ซัสเพนชันของเชื้อตั้งต้น (100) มาใส่หลอดที่มีน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 ml ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นซัสเพนชันของเชื้อที่ 10^{-1}

- ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ 10^{-1} 1 ml ใส่หลอดที่มีน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 ml ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นซัสเพนชันของเชื้อที่ 10^{-2}

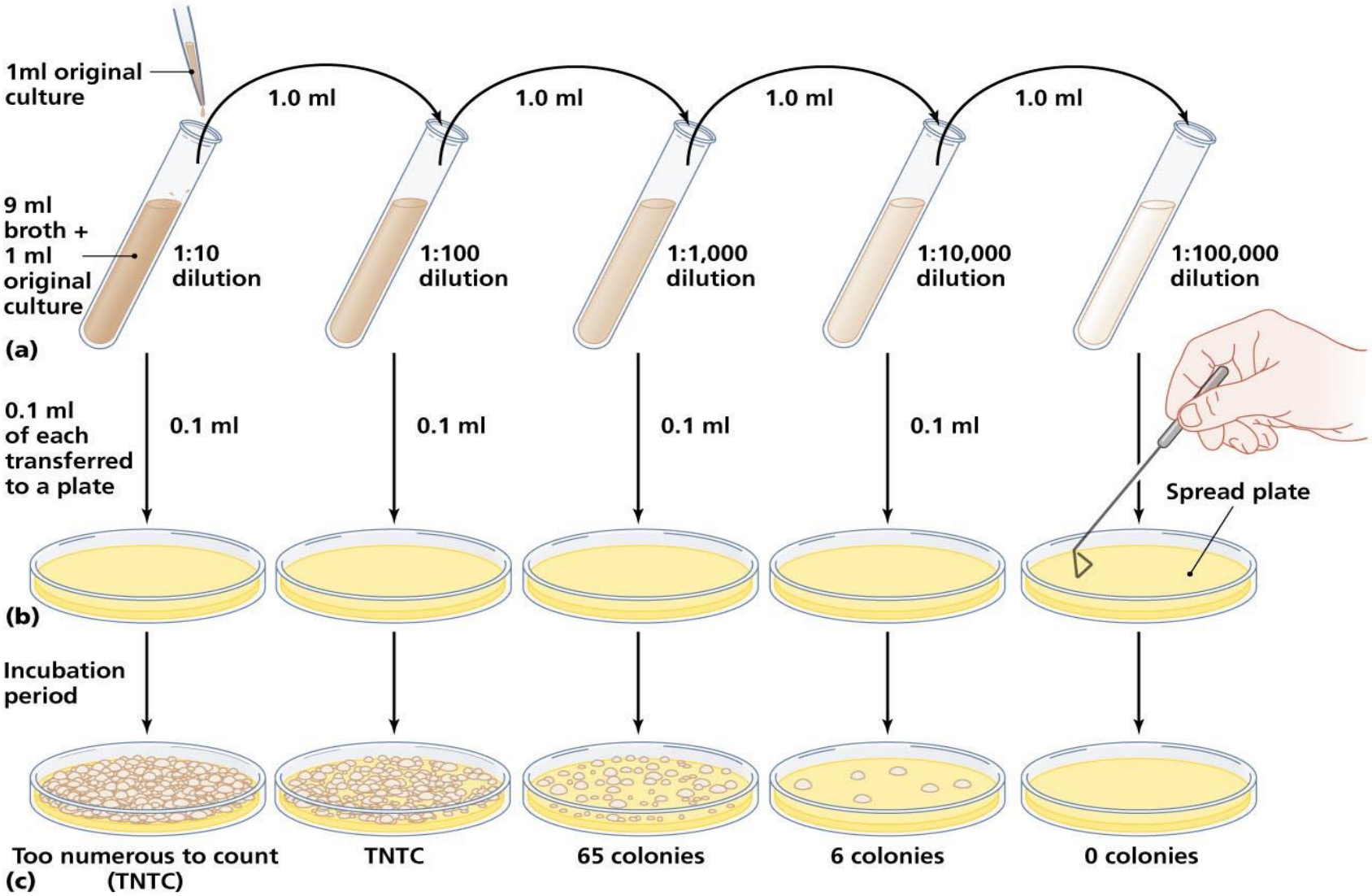
- ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อที่ได้ (10^{-2}) 1 ml ใส่หลอดที่มีน้ำเกลือ (0.9 % NaCl) ที่ฆ่าเชื้อแล้ว ปริมาตร 9 ml ด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ เขย่าให้เข้ากัน จะได้เป็นซัสเพนชันของเชื้อที่ 10^{-3}
- นำไปทดลองต่อในขั้นต่อไป : การเพาะเชื้อแบบ Spread Plate และ Pour Plate



ขั้นตอนการ SPREAD PLATE

1. ระบุชื่อ–สกุล ผู้ทำการทดลองและวันที่ทำการทดลองที่ด้านล่างของจานเพาะเชื้อ
2. ปิเปตตัวอย่างปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ลงที่ตำแหน่งตรงกลางจานเพาะเชื้อ
3. จุ่มแท่งแก้วรูปตัวแอล (spreader) ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 แล้วเอียง spreader ที่ขอบของบีกเกอร์เพื่อแยกแอลกอฮอล์ส่วนเกินออก
4. นำแท่งแก้วเกลี่ย spreader ที่ผ่านการจุ่มแอลกอฮอล์ไปเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด และปล่อยให้ spreader เย็น
5. นำ spreader เกลี่ยเชื้อให้ทั่วจานจานเพาะเชื้อ และระมัดระวังไม่ให้มือสัมผัสกับขอบด้านในของจานเพาะเชื้อ
6. จุ่ม spreader ในแอลกอฮอล์เข้มข้นร้อยละ 95 และกำจัดแอลกอฮอล์ส่วนเกินโดยให้แท่งแก้วสัมผัสกับของบีกเกอร์ นำเผาไฟจนแอลกอฮอล์ไหม้หมด ปล่อยให้เย็น และนำไปเกลี่ยเชื้อแบคทีเรียจานในจานเพาะเชื้อที่เหลือ โดยขั้นตอนการ Spread plate แสดงไว้ในภาพ
7. กลับจานเพาะเชื้อให้ด้านที่มีอาหารเพาะเชื้ออยู่ด้านบน แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 24-48 ชั่วโมง
8. สังเกตลักษณะของโคโลนีที่ปรากฏ

Spread plate technique



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

2.2 Streak-Plate Technique

- การแยกเชื้อให้บริสุทธิ์เป็นเทคนิคพื้นฐานทางจุลชีววิทยาที่มีความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากสิ่งแวดล้อมต่างๆ เช่น น้ำ อากาศ พื้นห้องเรียน หรือแม้แต่ร่างกายของคนก็มีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หลายชนิดที่อาจปนเปื้อนในหลอดเพาะเชื้อได้

- หลักการของการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์บนอาหารเลี้ยงเชื้อ (culture medium) คือ จะต้องแยกเชื้อให้ได้โคโลนีเดี่ยวๆ (single colony) จำนวนมาก จากนั้นจึงนำเชื้อที่เป็นโคโลนีเดี่ยวไปศึกษารูปร่างลักษณะ และคุณสมบัติต่างๆ เพื่อให้ทราบว่าเป็นเชื้อชนิดใด เทคนิคที่นิยมใช้ในการแยกเชื้อบริสุทธิ์คือ วิธี cross streak plate

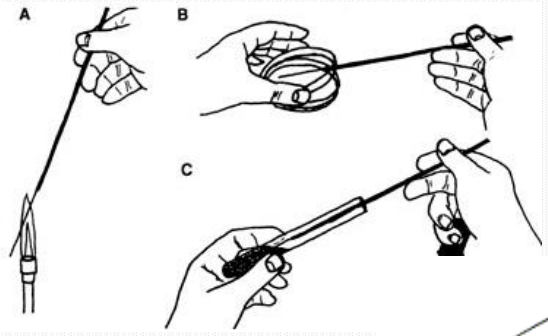
CROSS STREAK

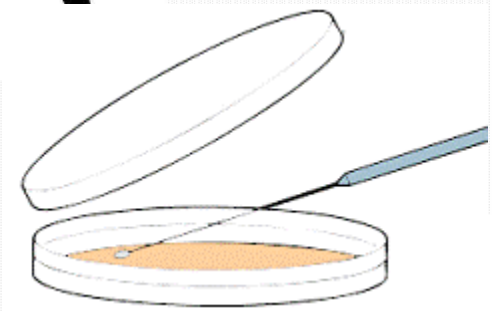
- ซึ่งทำได้โดยใช้ห่วงเขี่ยเชื้อ (loop) แตะตัวอย่างหรือสิ่งส่งตรวจแล้วลากหรือขีด (streak) ลงบนจานเพาะเชื้อที่มีอาหารแข็ง (agar plate) อยู่ให้ได้แนวระนาบติดต่อกัน 4-5 เส้น

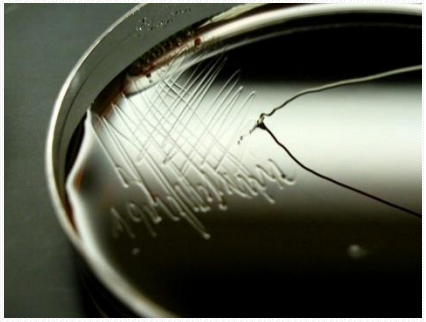
- หลังจากเสร็จในระนาบแรกซึ่งมีเชื้อจุลินทรีย์อยู่หนาแน่นที่สุด ให้นำห่วงเขี่ยเชื้อมาเผาไฟให้ลวดที่ปลายร้อนแดงเพื่อฆ่าเชื้อที่ติดให้หมด

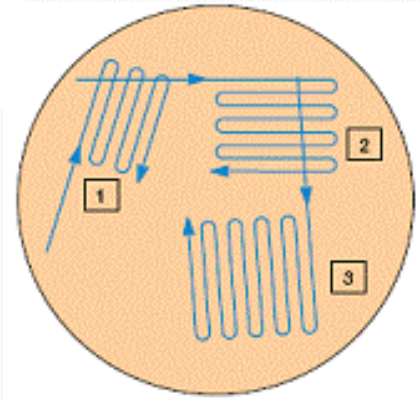
- จากนั้นจึงขีดเชื้อจากส่วนของรอยลากในระนาบแรกออกมาเพียงหนึ่งครั้งแล้วลากเป็นระนาบที่สอง 4-5 เส้นติดกันโดยรอยขีดของเชื้อจะไม่ทับกับระนาบแรกอีก หลังจากนั้นก็ทำเช่นเดียวกันกับระนาบที่สองจนครบทั่วทั้งจานเพาะเชื้อซึ่งมีประมาณสี่ระนาบ เมื่อได้เชื้อบริสุทธิ์แล้วจะมีการศึกษาเชื้อต่อไปในด้านต่าง ๆ

Streak plate technique







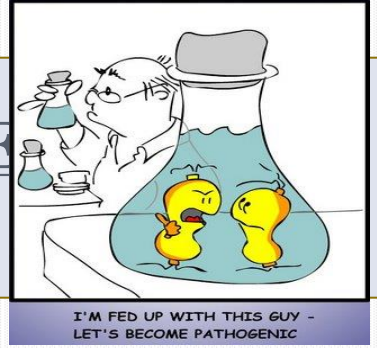


2.3 Pour Plate Technique

- เทคนิคการเพาะเชื้อแบบ **pour-plate technique** ก็เป็นอีกวิธีการหนึ่งที่ใช้ในการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ได้เช่นกัน โดยตัวอย่างเริ่มต้นจะถูกเจือจางให้มีความเข้มข้นหลายๆ ระดับด้วยเทคนิค **serial dilution** เพื่อทำให้เชื้อถูกเจือจางมากพอที่จะทำให้เกิดโคโลนีเดี่ยวๆ บนจานเพาะเชื้อ

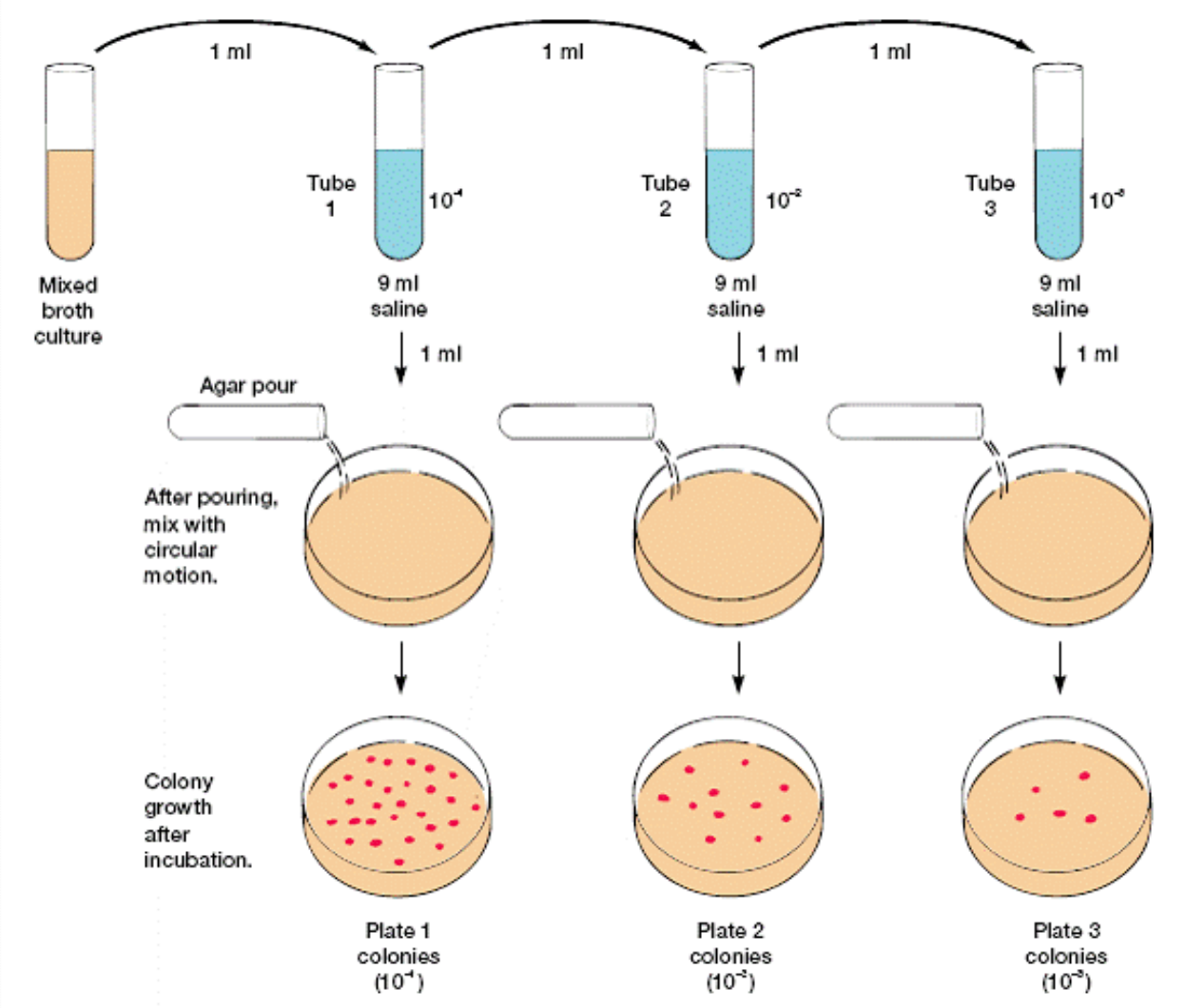
- โดยนำตัวอย่างที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมเติมลงในจานเพาะเชื้อเปล่าที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว แล้วทำการเทอาหารวุ้นลง (**Agar Medium**) ไปในจานเพาะเชื้อ (โดยอุณหภูมิของอาหารเพาะเชื้อประมาณ **48-50** องศาเซลเซียส ซึ่งจะไม่ทำให้เชื้อแบคทีเรียและยีสต์ตายได้) ผสมอาหารและเชื้อให้เข้ากันและให้เกิดการกระจายอย่างสม่ำเสมอด้วยการหมุนจานเพาะเชื้อ เมื่อวุ้นเกิดการแข็งตัว เซลล์จุลินทรีย์จะถูกตรึงให้อยู่ด้านในของอาหาร และจะเกิดโคโลนีเดี่ยวๆ ของเชื้อขึ้นมา

การเพาะเชื้อแบบ POUR PLATE

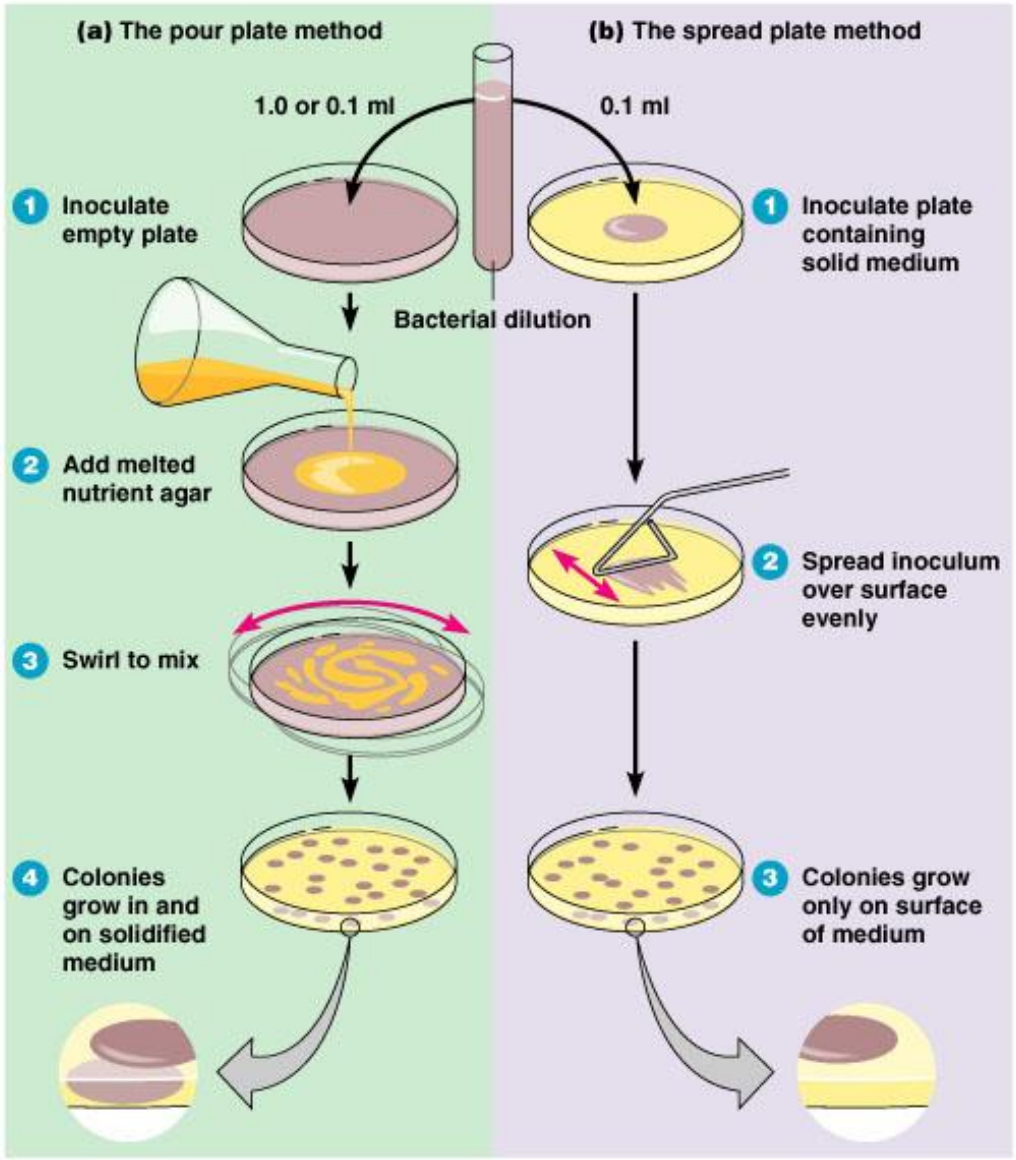


- เตรียมจานเพาะเชื้อ (เปล่า) เขียนชื่อ–สกุล วันที่ทำการทดลองที่ด้านล่างของจานเพาะเชื้อ
- เตรียมหลอดอาหาร **NA** ปริมาตร **15 ml** ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- เตรียมปิเปตขนาด **1 ml** ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว
- ปิเปตซัสเพนชันของเชื้อที่อัตราการเจือจาง 10^{-1} ปริมาตร **1.0 ml** ปล่อยลงในจานเพาะเชื้อด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ
- เทอาหารจากหลอดอาหาร **NA 15 ml** ลงในจานเพาะเชื้อที่มีเชื้ออยู่แล้ว
- หมุนจานเพาะเชื้อเพื่อให้เชื้อและอาหารผสมเข้ากันดี รอจนอาหารกลายเป็นวุ้นแข็งดีแล้วจึงคว่ำจานเพาะเชื้อ แล้วนำไปบ่มที่ **37 °C 24-48** ชั่วโมง ทำซ้ำโดยใช้ซัสเพนชันของเชื้อที่ **10-2** แทน โดยขั้นตอนการ **pour plate** แสดงไว้ในภาพ

Pour plate technique



ความแตกต่างระหว่าง Spread plate และ Pour plate



Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

การเจริญของโคโลนีบนอาหารแข็ง

รูปร่างของโคโลนี (form) มีรูปร่างที่แตกต่างกันดังนี้

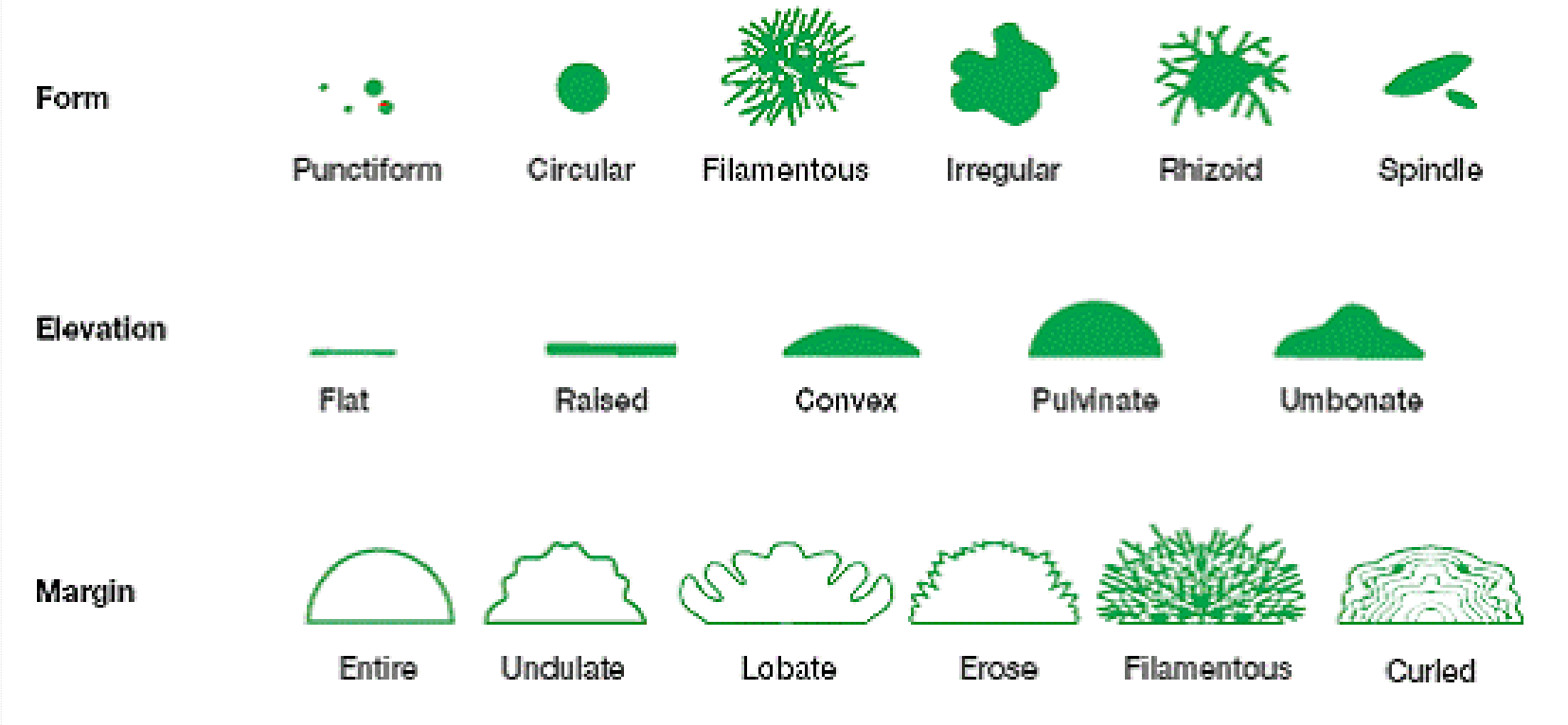
- **Punctifirm** มีขนาดเล็กมาก แต่มองเห็นด้วยตาเปล่า เส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
- **Circular** มีลักษณะกลม
- **Filamentius** ประกอบด้วยสายพันกันแน่น
- **Irregular** รูปร่างโคโลนีไม่แน่นอน
- **Rhizoid** แตกกิ่งก้านไม่แน่นอน มีลักษณะคล้ายรา

ขอบ(margin)

- **Entire** เรียบ
- **Undulate** ขอบโค้งเว้าลึกน้อย
- **Lobate** ขอบโค้งเว้าและยื่นมาก
- **Erose** ขอบเป็นหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ

ความสูงของโคโลนี(Elevation)

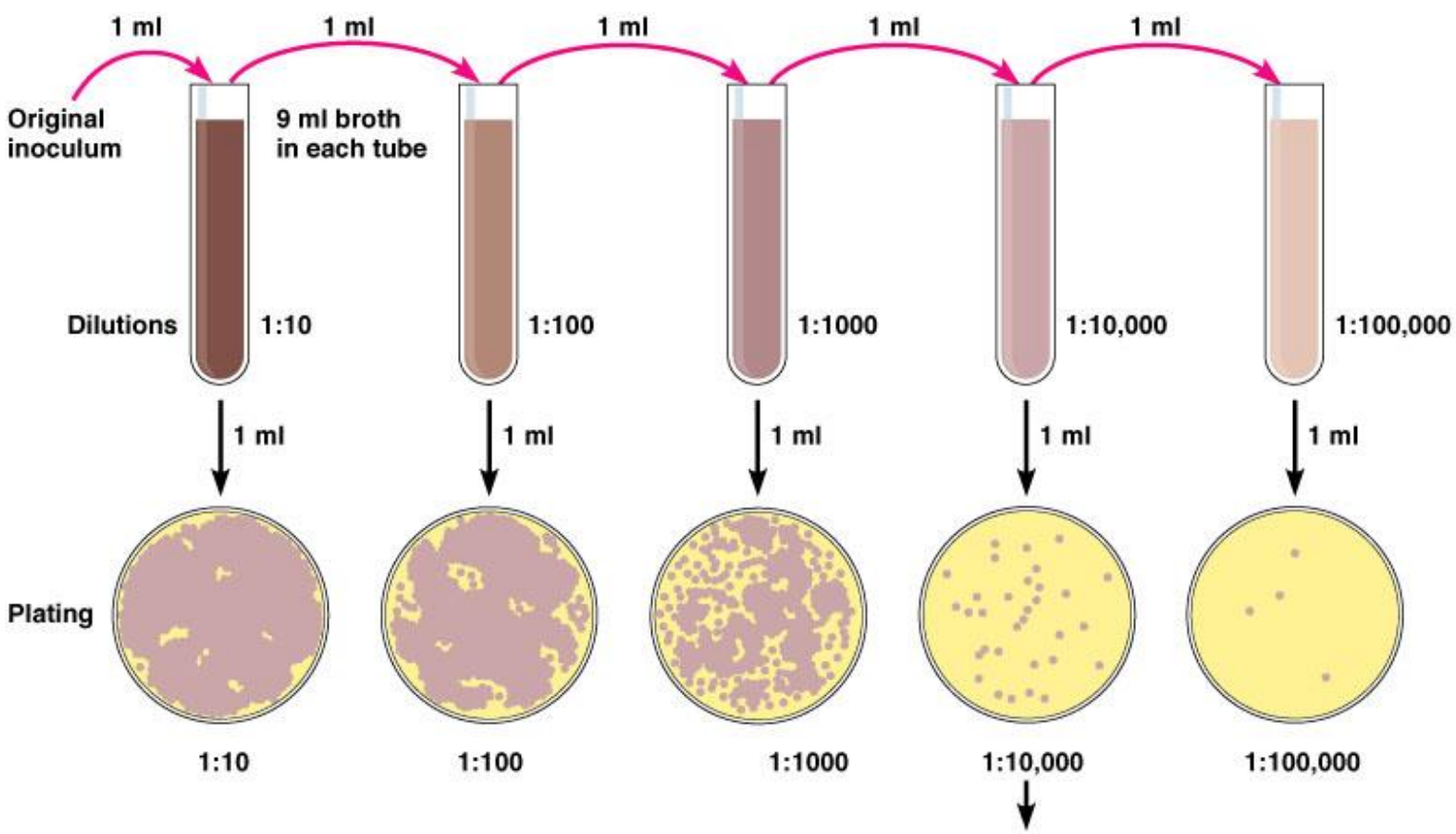
- **Flat** แบนราบ
- **Convex** มีความนูนโค้งเล็กน้อย
- **Raised** มีความหนาสูงขึ้น
- **Pulvinate** มีความนูนมากโค้งขึ้นจากผิวอาหารมาก เหนืออาหาร



การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ(Plate count)

- การนับอาจรายงานเป็น **CFU/ml(CFU, colony -forming unit)**
- จำนวนเชื้อ = จำนวนเชื้อต่อมิลลิลิตร×ส่วนกลับของการเจือจาง
- ดังนั้น
- วิธี **Spread plate**
- จำนวนเชื้อ = จำนวนเชื้อ × 10×ส่วนกลับของการเจือจาง **CFU/ml**
- วิธี **Pour plate**
- จำนวนเชื้อ = จำนวนเชื้อ×ส่วนกลับของการเจือจาง **CFU/ml**

Plate count



Calculation: Number of colonies on plate × reciprocal of dilution of sample = number of bacteria/ml
(For example, if 32 colonies are on a plate of $^{1}/_{10,000}$ dilution, then the count is 32 × 10,000 = 320,000/ml in sample.)

Copyright © 2004 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

THE END