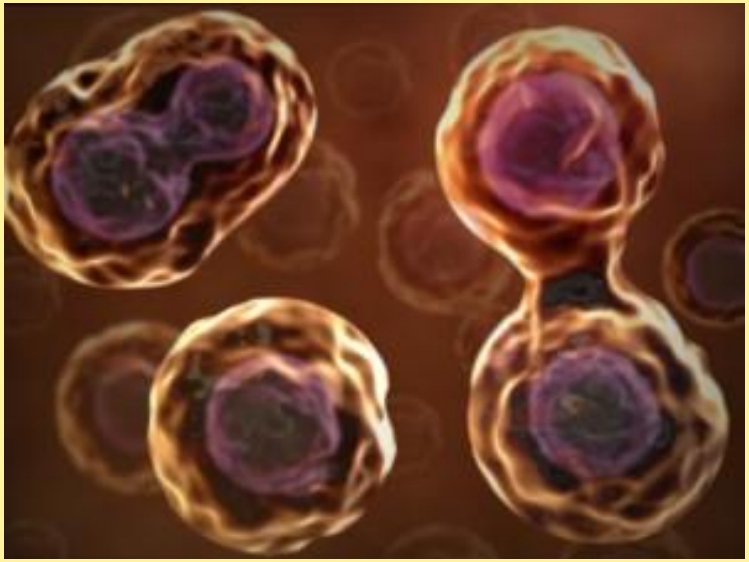
บทที่ 5

การสืบพันธุ์และการเจริญเติบโต



การสืบพันธุ์ของแบคทีเรีย

- ใช้วิธีแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสอง(binary fission) ซึ่งแต่ละเซลล์จะแบ่งตัวจากหนึ่งไปสองเซลล์ เป็นวิธีสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศ ซึ่งพบในแบคทีเรียส่วนใหญ่
- อาหารเลี้ยงเชื้อจะถูกนำเข้าสู่เซลล์และถูกเอนไซม์ภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงให้เป็นสารประกอบของเซลล์ มีผลทำให้เซลล์ยืดยาวออกและสร้างสารพันธุกรรมของเซลล์เพิ่มขึ้น เมื่อผนังเซลล์คอดจะแบ่งเซลล์ออกเป็นสองเซลล์เท่าๆกัน

การสร้างเซลล์ใหม่

- ในการแบ่งเซลล์จากหนึ่งเป็นสองนั้น ผนังกั้นระหว่างเซลล์นั้น จะยังไม่เกิดขึ้นจนกว่าจะมีการเพิ่มจำนวนโครโมโซม(ซึ่งคือการจำลองโครโมโซม)

- ขั้นแรกเกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เจริญเข้าข้างในเซลล์บริเวณศูนย์กลางเซลล์ หลังจากนั้นผนังเซลล์จึงเจริญเข้าข้างในเพื่อกลายเป็นผนังกั้นแต่ละเซลล์ แล้วแยกตัวเป็นเซลล์ใหม่ 2 เซลล์

การสืบพันธุ์ของแบคทีเรียแบบ **binary fission**

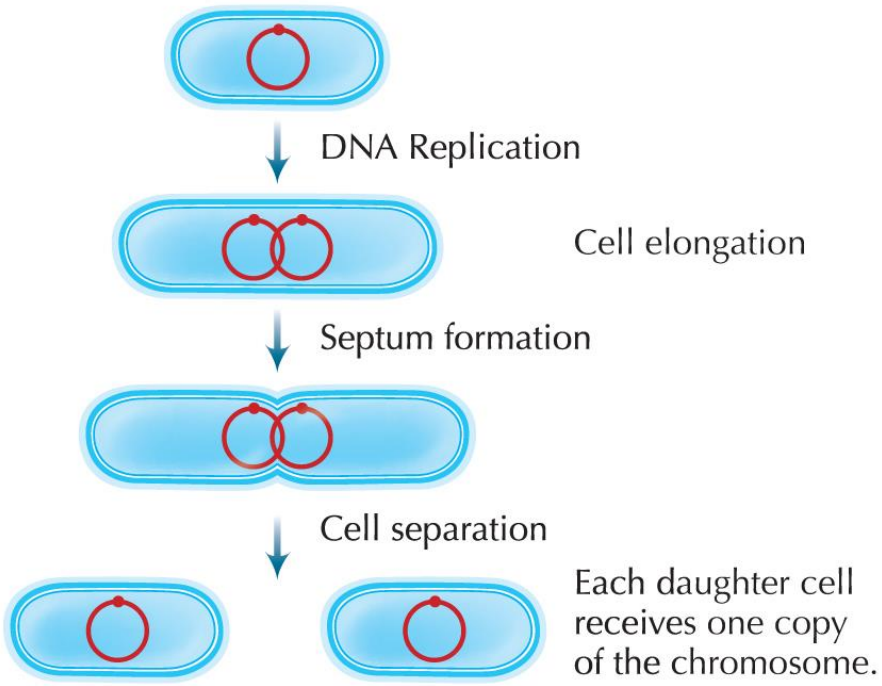
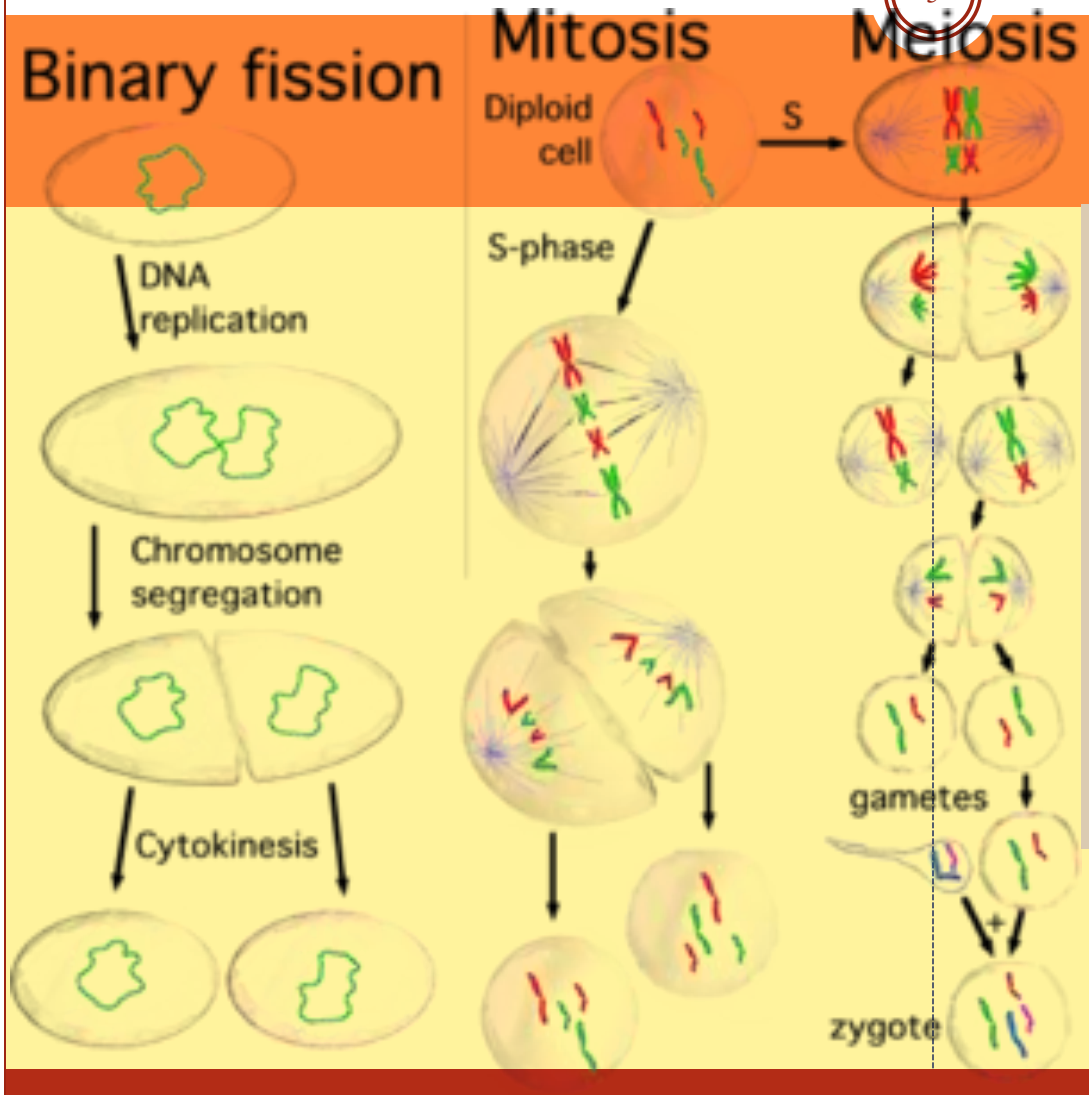


FIGURE 6.5. Binary fission in bacteria.

Evolution © 2007 Cold Spring Harbor Laboratory Press

รูปแสดงการแบ่งตัวของแบคทีเรีย

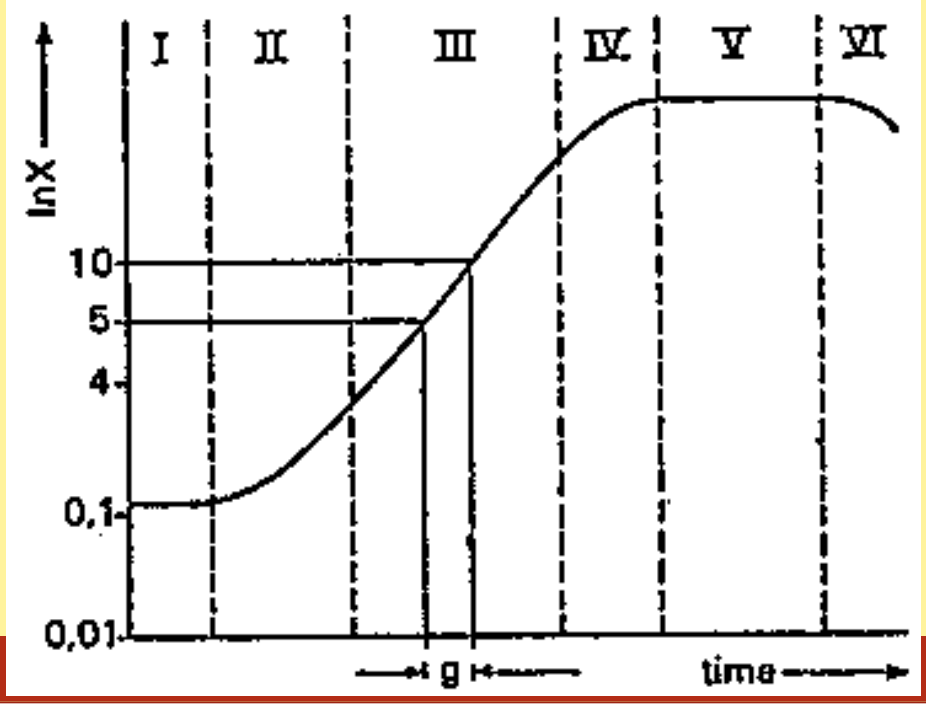


แบคทีเรีย

จากการศึกษาการทวีจำนวนของแบคทีเรียโดยทั่วไป ใช้วิธีแบ่งตัวจากหนึ่งเป็นสองนั้น พบว่า แบคทีเรียจะเพิ่มจำนวนแบบอนุกรมเรขาคณิต คือ จาก

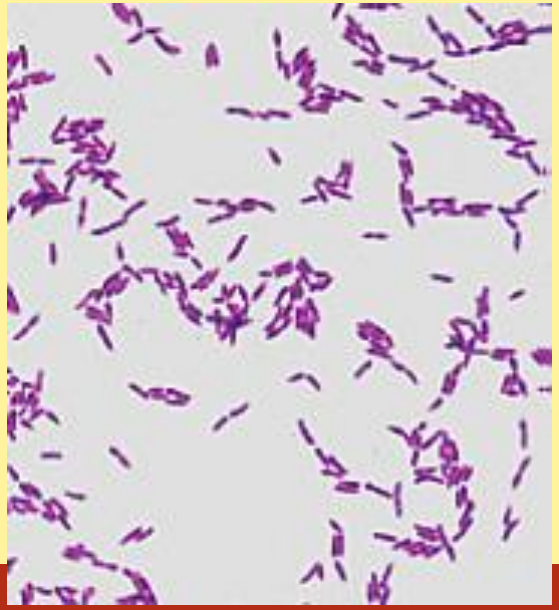
$1 \rightarrow 2 \rightarrow 4 \rightarrow 8 \rightarrow 16 \rightarrow 32$ หรือเขียนเป็น **$1 \rightarrow 2^1 \rightarrow 2^2 \rightarrow 2^3$**

$2^4 \rightarrow 2^5$ จำนวนครั้งที่แบ่งเซลล์ได้เรียก **generation** ช่วงเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งเพื่อทำให้จำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นเป็นสองเท่านั้น เรียกว่า **generation time**



Generation time

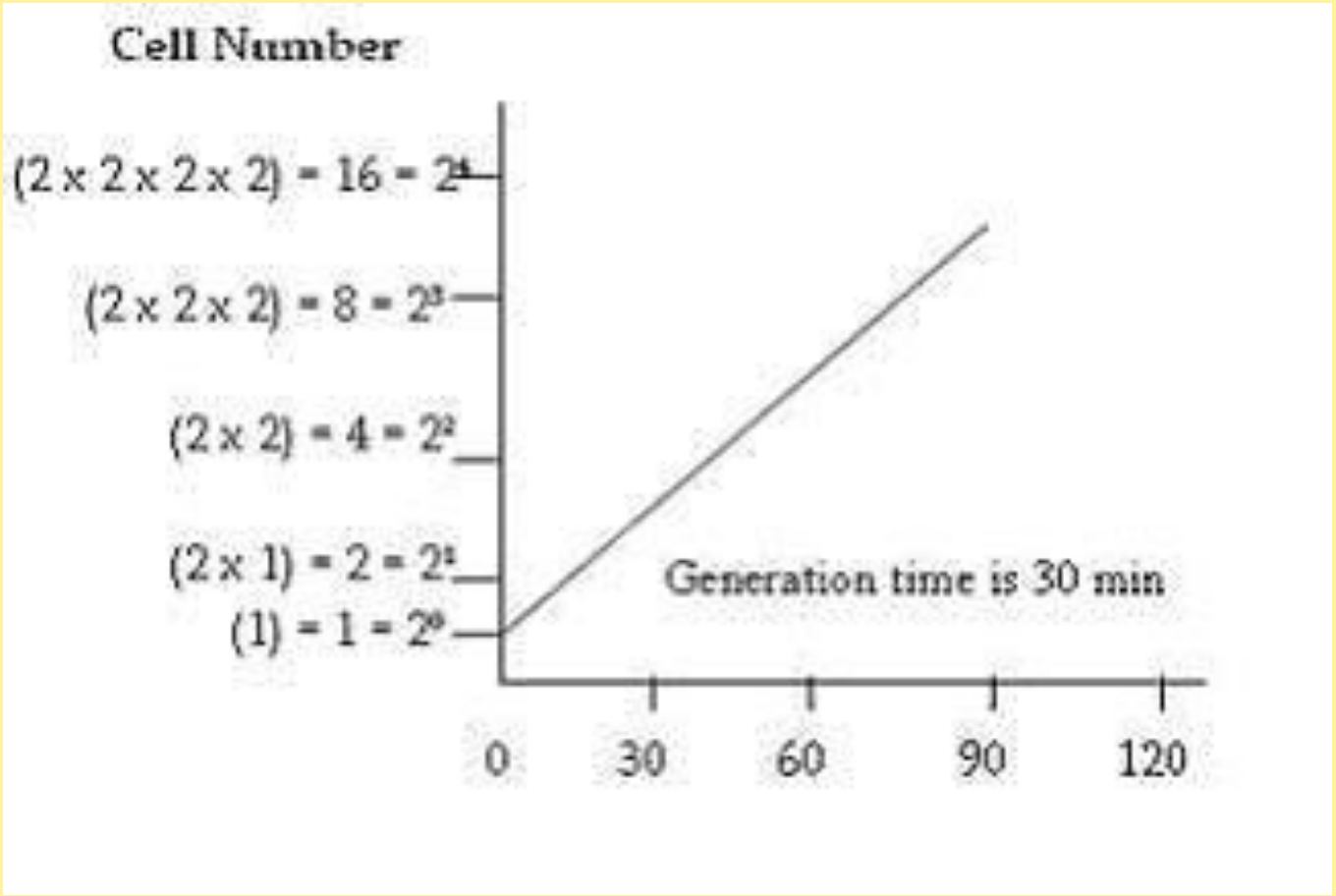
- แบคทีเรียแต่ละชนิดมี **generation time** ไม่เท่ากัน เช่น ***E.coli*** ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้งประมาณ **15 – 20** นาที ***Lactobacillus acidophilus*** ใช้เวลาในการแบ่งเซลล์ครั้งละ **66 – 87** นาที นอกจากนี้ ระยะเวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์ในแต่ละครั้งยังแตกต่างไปตามสภาพแวดล้อมต่างๆด้วย เช่น ชนิดของอาหาร อุณหภูมิที่บ่มเชื้อ และอื่นๆ



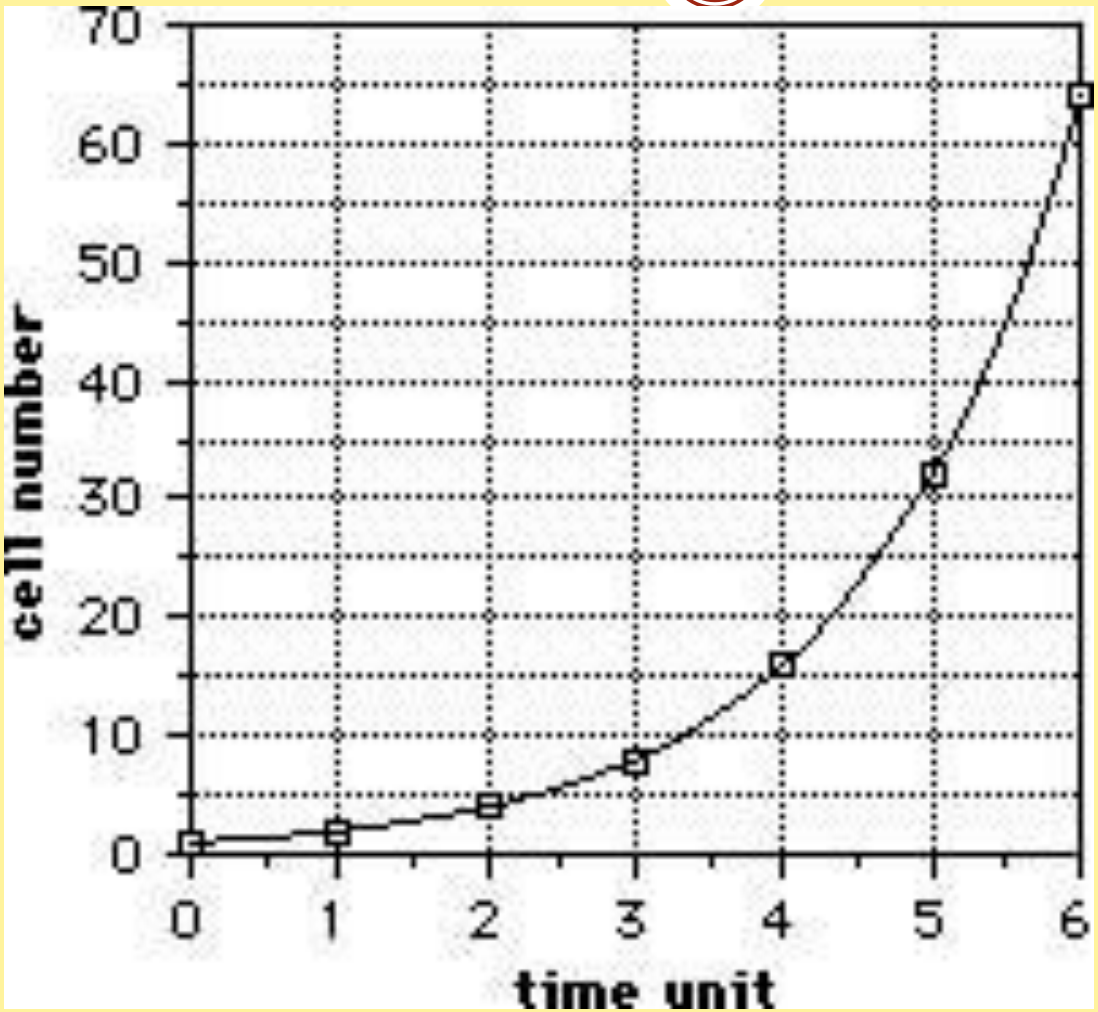
ในการศึกษา เพื่อหาระยะเวลาที่แบคทีเรียใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง อาจทำได้โดย การนับจำนวนด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยการใส่แบคทีเรียที่ทราบจำนวนลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แล้วทิ้งไว้ให้แบคทีเรียเจริญในสภาพที่เหมาะสม แล้วนับจำนวนอีกครั้ง ในการคำนวณหา **generation time** จะต้องทราบแบคทีเรียเมื่อเริ่มต้น จำนวนแบคทีเรียในครั้งสุดท้าย เมื่อสิ้นสุดการทดลอง และระยะเวลาที่แบคทีเรียเจริญ

ดังนั้นถ้าเริ่มต้นจาก **1** เซลล์ เมื่อผ่าน **generation time** แต่ละครั้ง จะได้จำนวนแบคทีเรียเป็น **2** เซลล์ **4** เซลล์ **8** เซลล์ **16** เซลล์ **....2^n** ตามลำดับ ซึ่งจะเห็นได้ว่า ในแต่ละ **generation** จำนวนประชากรของแบคทีเรียจะเพิ่มเป็น **2** เท่าเสมอ

คำถาม 1 ระยะเวลาที่จำนวนแบคทีเรียเพิ่มขึ้นจาก 8 ไปเป็น 16 เท่ากับกี่นาที



คำถาม 2 ระยะเวลาที่แบคทีเรียเพิ่มจาก 16 ไปเป็น 32 เท่ากับกี่ยูนิต



ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับ **generation** แสดงในรูปของสมการ โดยกำหนดให้

B = จำนวนแบคทีเรียที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลาเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ

b = จำนวนแบคทีเรีย เมื่อสิ้นสุดการทดลองเลี้ยงเชื้อ

t = ระยะเวลาที่ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ

G = เวลาที่ใช้ในการแบ่งเซลล์แต่ละครั้ง**(generation time)**

n = จำนวน **generation**

log = **log** ฐาน **10**

- เมื่อเริ่มจาก **1** เซลล์ เมื่อสิ้นสุดระยะเวลาที่ทำการทดลอง
- จำนวนแบคทีเรียคือ
- $b = 1 \times 2^n$

เมื่อเริ่มต้นใส่แบคทีเรียลงในอาหารด้วยจำนวน **B** เซลล์

$$b = B \times 2^n$$

$$\log b = \log B + n\log 2$$

$$n=(\log b - \log B)/\log 2$$

แทนค่า $\log 2 = 0.30103$

$$n = 3.3\log (b/B)$$

generation time(G) = ระยะเวลาที่ทำการทดลอง/จำนวน **generation**

$$= t/n = t/ 3.3\log (b/B)$$

คำถาม 3

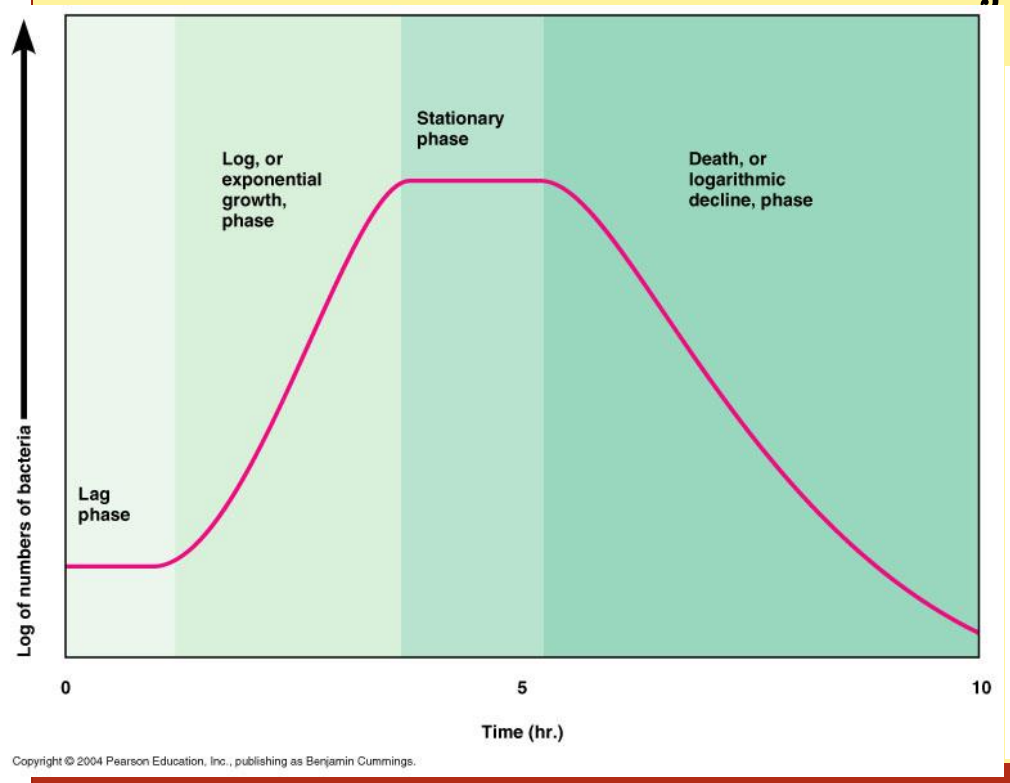
- แบคทีเรียมี generation time เท่าใด เมื่อมีระยะเวลาในการทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ 180 นาที และมีจำนวน generation เท่ากับ 3

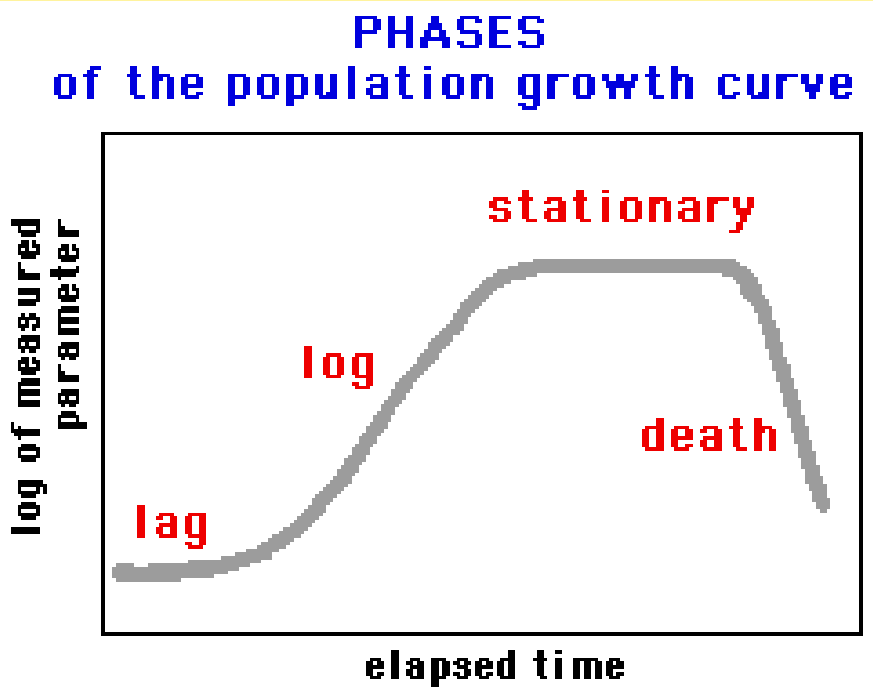
คำถาม 4

- จงหา generation time ของเชื้อ *Aspergillus niger* เมื่อ
- **จำนวนแบคทีเรียที่ใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อเมื่อเวลาเริ่มต้นเลี้ยงเชื้อ = 50 เซลล์**
  จำนวนแบคทีเรีย เมื่อสิ้นสุดการทดลองเลี้ยงเชื้อ = 500 เซลล์
  ระยะเวลาที่ทำการทดลองเลี้ยงเชื้อ = 330 นาที

ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- เมื่อนำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารใหม่ และนับจำนวนแบคทีเรียเป็นระยะๆ ภายในเวลาประมาณ **24** ชั่วโมง และนำมาพลอตกราฟระหว่างจำนวนล็อก**(log)** ของแบคทีเรียกับระยะเวลา จะได้กราฟการเจริญ ซึ่งแบ่งเป็นระยะต่างๆได้ **4** ระยะคือ





ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

- 1. **lag phase** เป็นระยะที่ใส่แบคทีเรีย ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ แบคทีเรียจะพยายามปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ จำนวนแบคทีเรียยังไม่เพิ่มขึ้น เพราะยังไม่แบ่งเซลล์ แต่เซลล์จะว่องไว และสังเคราะห์โปรโตพลาสซึมใหม่ เพื่อให้เพียงพอต่อกระบวนการทางชีวเคมีของเซลล์

- แบคทีเรียมีกิจกรรมทางสรีรวิทยาสูง ขนาดของเซลล์เพิ่มขึ้น ส่วนใหญ่เพิ่มความยาว ในตอนปลายของระยะนี้ แบคทีเรียจะแบ่งตัว แต่เนื่องจากแบคทีเรียทุกตัวไม่ได้แบ่งตัวพร้อมกัน ดังนั้นจำนวนประชากรจึงค่อยๆ เพิ่มขึ้น

Lag phase

- ความยาวของระยะ **log phase** จะยาวนานเพียงใดขึ้นกับสภาพแวดล้อมและชนิดของแบคทีเรีย

  - เช่น ถ้านำแบคทีเรียไปเลี้ยงในอาหารชนิด **A** แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในอาหารชนิด

    A อีก ระยะ **lag phase** จะสั้น

  - ถ้าใส่เชื้อที่พร้อมแบ่งตัวลงในอาหารใหม่ๆ ระยะ **lag phase** จะสั้นลง

  - ถ้าเชื้อมีความผิดปกติ หรือเป็นเชื้อที่เก็บไว้เป็นเวลานาน ต้องใช้เวลาในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่ ระยะ **lag phase** จะยาวนาน

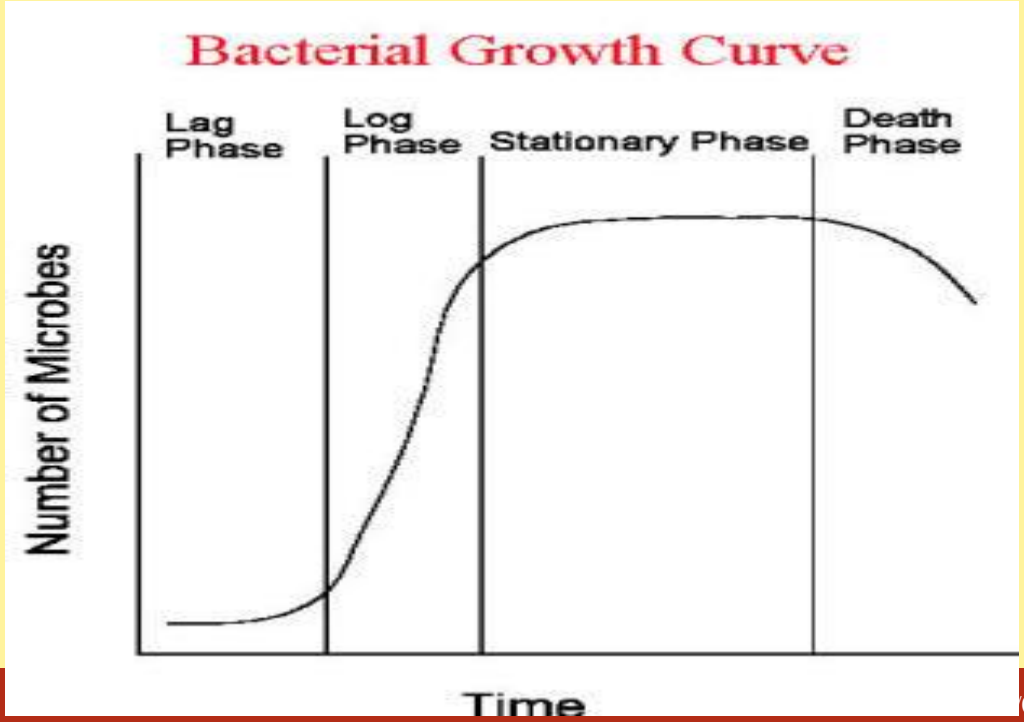
ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

2. Logarithmic phase หรือ exponential phase หรือระยะ log phase

เป็นระยะที่แบคทีเรียแบ่งตัวอย่างรวดเร็วในอัตราคงที่ คือแบ่งเซลล์แต่ละครั้งในอัตราที่เท่าๆกัน ระยะนี้อัตราการเจริญจะมากที่สุด เซลล์จะว่องไวมากที่สุด สารอาหารถูกนำไปใช้มากและรวดเร็ว จำนวนแบคทีเรียจะเพิ่มเป็นสองเท่า จึงทำให้ลักษณะของกราฟเป็นแบบ **exponential**

ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

3. Stationary phase ระยะนี้แบคทีเรียมีจำนวนสูงสุดและคงที่ ไม่มีการเพิ่มจำนวนอีก คือถึงแม้มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แต่จะเท่ากับอัตราการตาย ทั้งนี้เนื่องจากสารอาหารในอาหารเลี้ยงเชื้อถูกใช้ไปเกือบหมด และอาจมีการขับถ่ายของเสียที่เป็นพิษออกจากกกระบวนการเมตาโบลิซึม

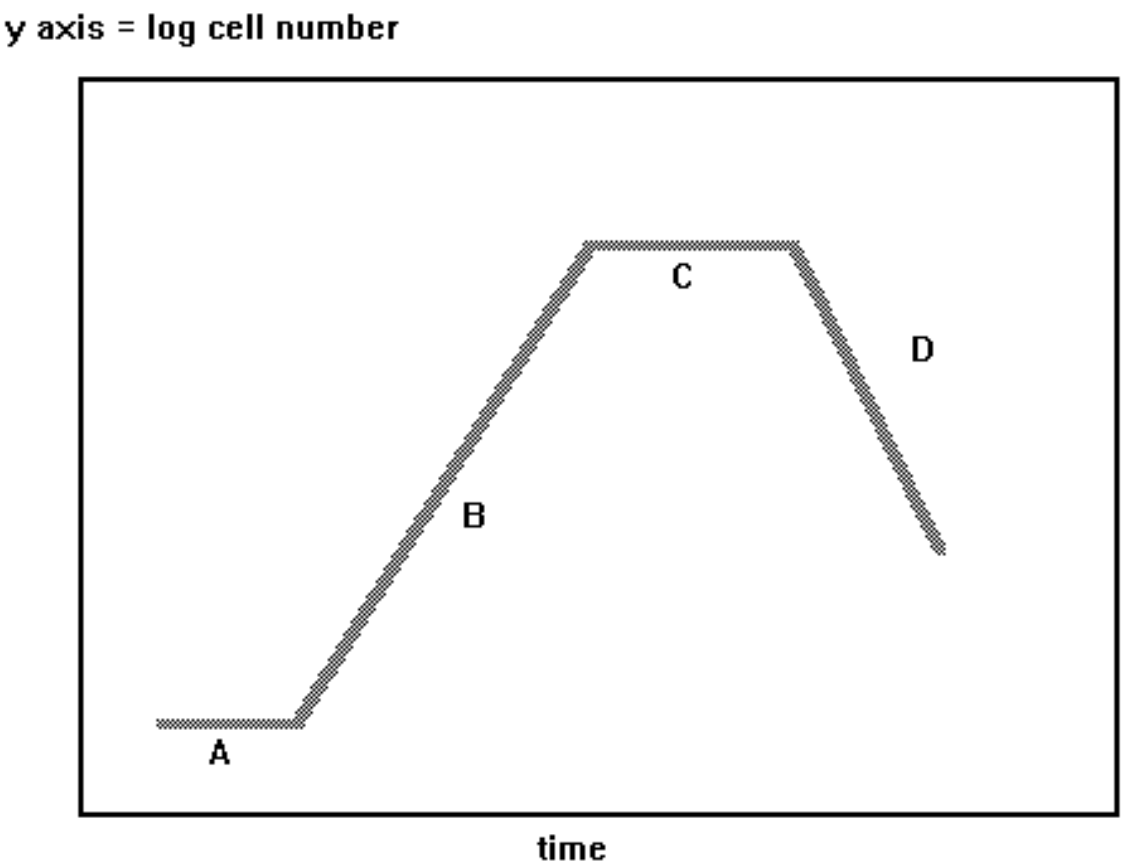


ลักษณะการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย

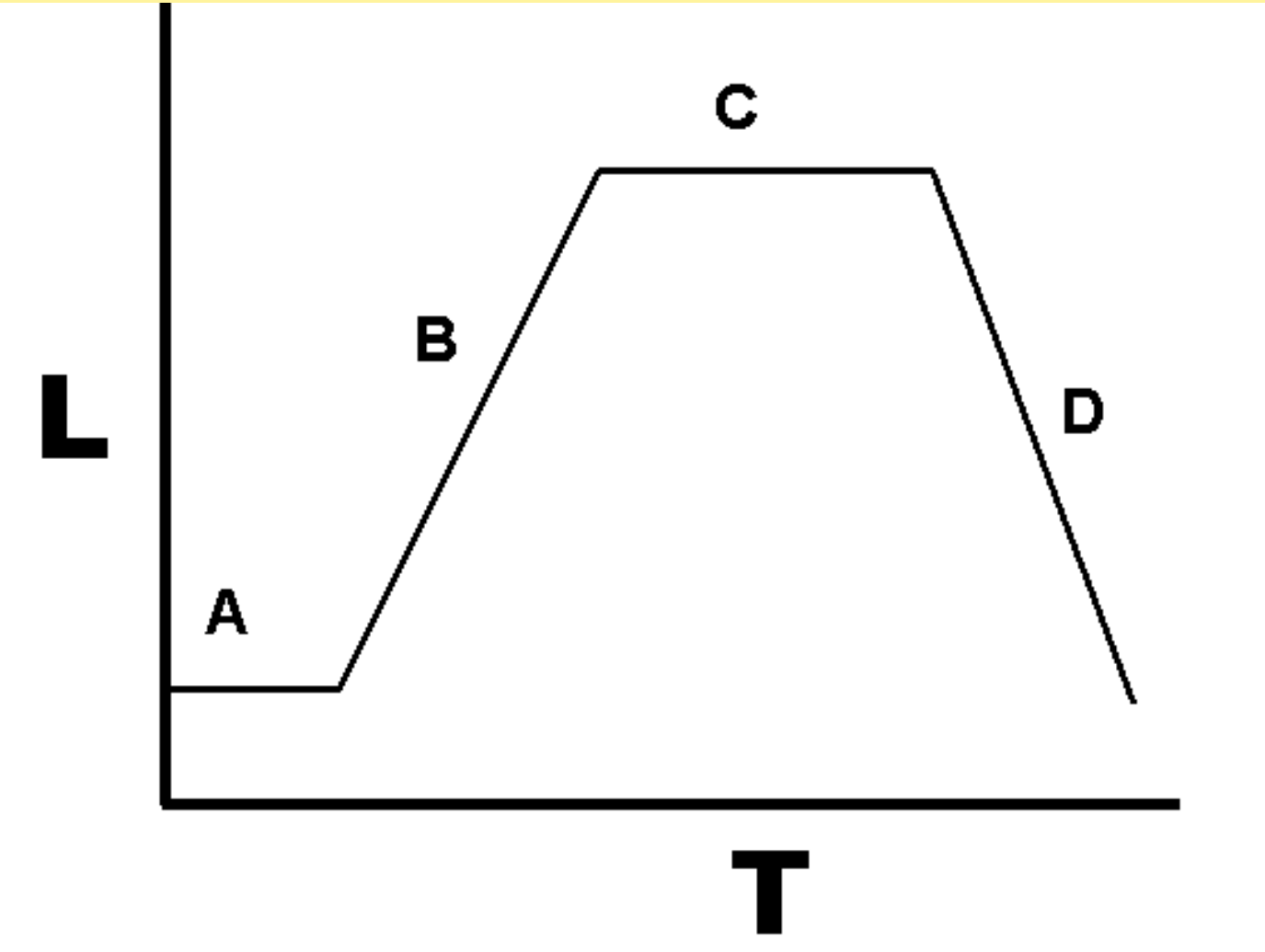
4. Death phase หรือ decline phase

เป็นระยะที่แบคทีเรียจะตายลงอย่างรวดเร็วและตายมากขึ้นสม่ำเสมอเป็น **exponential** สาเหตุการตายอาจเนื่องมาจากสารอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์หมดไป และเกิดการสะสมของเสียและสารพิษที่เกิดจากกระบวนการเมแทบอลึซึม แบคทีเรียแต่ละชนิดจะมีอัตราการตายที่แตกต่างกัน เช่น พวกทรงกลม แกรมลบจะตายอย่างรวดเร็วมากภายใน **2-3** วันและเหลือเซลล์ที่มีชีวิตน้อยมาก เชื้อแบคทีเรียบางชนิดตายช้าทำให้มีแบคทีเรียมีชีวิตเหลืออยู่เป็นเวลาหลายเดือน

คำถาม 5 ระยะ C คือระยะใด



คำถาม 6 ระยะที่จุลินทรีย์ต้องเริ่มปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมใหม่คือ



การเจริญเติบโตพร้อมกัน

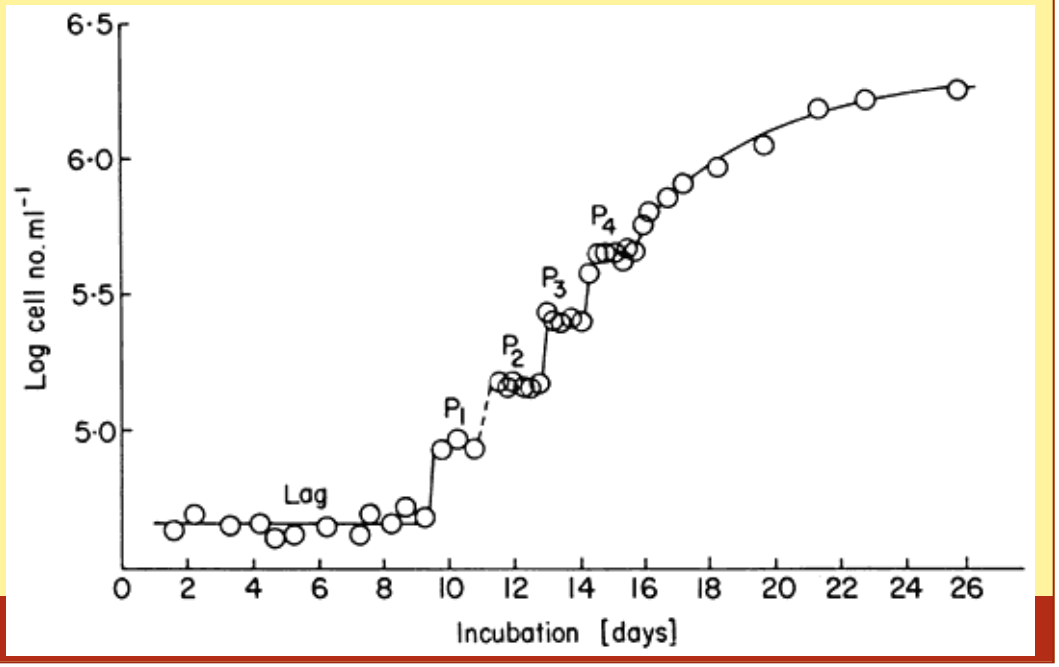
เมื่อเราเลี้ยงเซลล์แบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อนั้น เซลล์ทุกเซลล์จะไม่เกิดการแบ่งตัวพร้อมๆกันอย่างสม่ำเสมอ แต่ในการทำการทดลองเพื่อศึกษาการเติบโตของเซลล์ หรือการสังเคราะห์องค์ประกอบของเซลล์นั้น เราต้องการเซลล์ที่อยู่ในระยะการเจริญเติบโตระยะเดียวกัน เพื่อให้เซลล์สังเคราะห์สารต่างๆพร้อมกัน

การทำให้เซลล์อยู่ในระยะการเจริญเติบโตพร้อมกันและแบ่งตัวพร้อมกัน ลักษณะการเจริญเติบโตนี้เรียกว่า การเจริญเติบโตพร้อมกัน **(synchronous growth)**

การเจริญเติบโตพร้อมกัน (synchronous growth)

- ทำได้โดยการกำหนดสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิ ความชื้น และส่วนประกอบทางเคมีของอาหาร

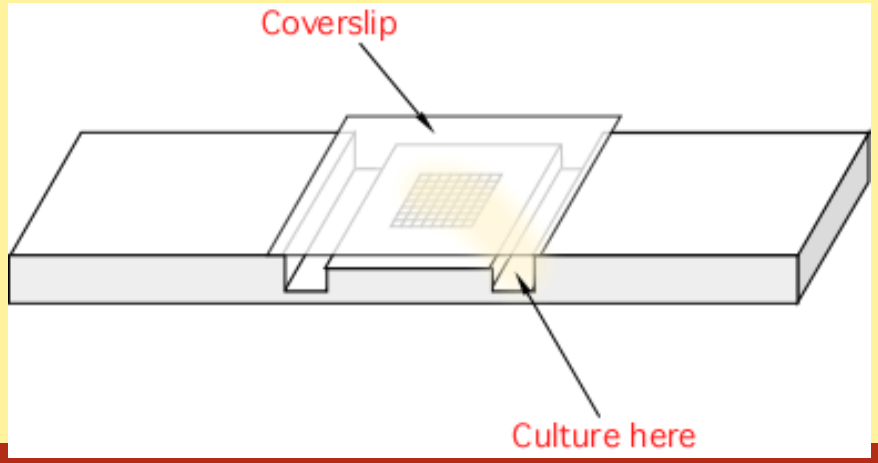
เช่น การเลี้ยงแบคทีเรียในสภาพที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าอุณหภูมิที่เหมาะแก่การเจริญของแบคทีเรียนั้นๆ เป็นระยะเวลาหนึ่ง แบคทีเรียจะมีขบวนการเมตาโบลิซึม แต่ยังไม่แบ่งตัว เมื่อเพิ่มอุณหภูมิให้เหมาะสม เซลล์ทุกเซลล์จะแบ่งตัวพร้อมกัน อยู่ในระยะการเจริญเดียวกัน ซึ่งการเจริญเติบโตพร้อมกันนี้มีประโยชน์ในการศึกษากระบวนการต่างๆ เช่น การแบ่งเซลล์ การสังเคราะห์โปรตีน



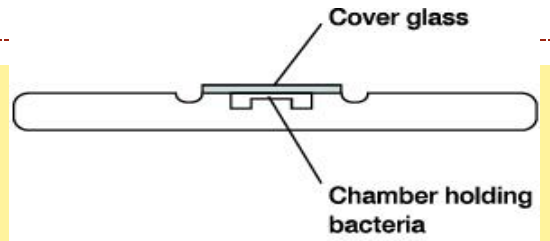
วิธีวัดการเจริญของแบคทีเรีย

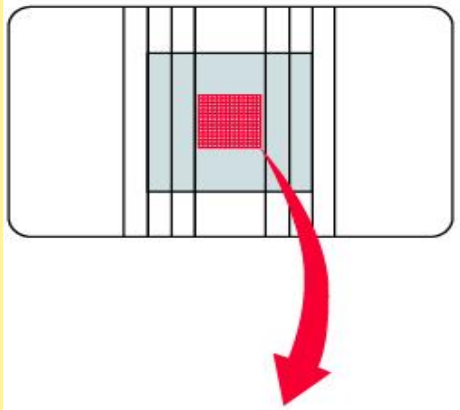
1. การนับจำนวนเซลล์แบคทีเรีย**(cell count)**

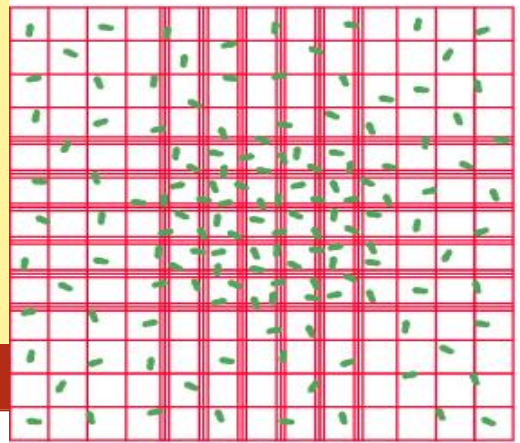
ทำได้หลายวิธี เช่น การนับจำนวนเซลล์โดยตรงจากกล้องจุลทรรศน์ **(direct microscopic count)** วิธีที่นิยมใช้คือ การใช้สไลด์แบบ **Petroff-Hausser counting chamber** ซึ่งเป็นสไลด์ชนิดพิเศษที่ทราบพื้นที่เท่ากับ 1/400 ตารางมิลลิเมตร และมีความลึก 1/50 มิลลิเมตร เมื่อวางกระจกปิดสไลด์ชนิดพิเศษปิดทับ

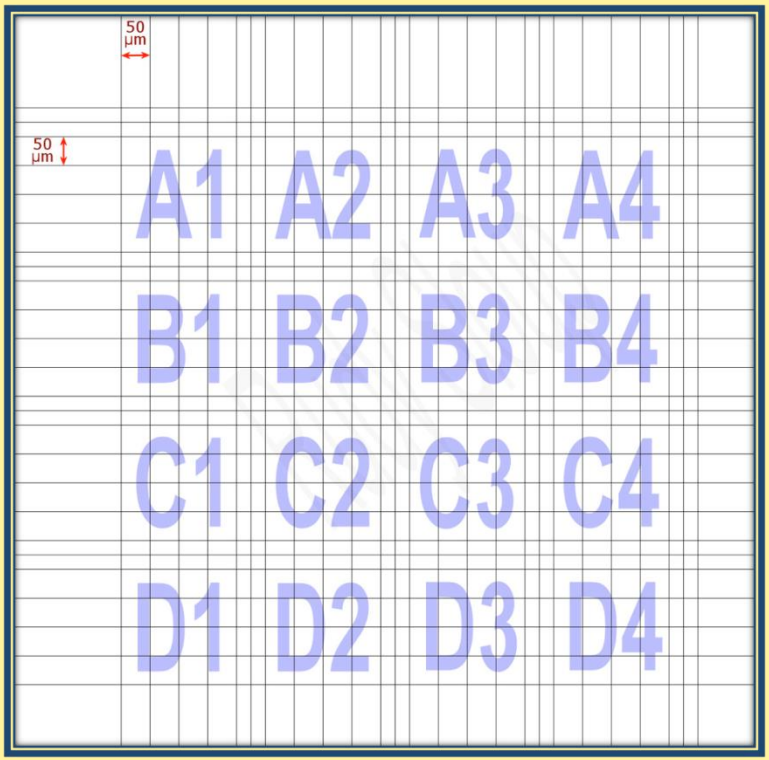


Petroff-Hausser counting chamber









Petroff-Hausser counting chamber

- ดังนั้นปริมาตรแต่ละช่องภายใต้กระจกปิดสไลด์

- ปริมาตร = พื้นที่ × ความลึก
- = 1/50 ×1/400 = 1/20,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร
- 1 มิลลิเมตร = 10^{-1} เซนติเมตร

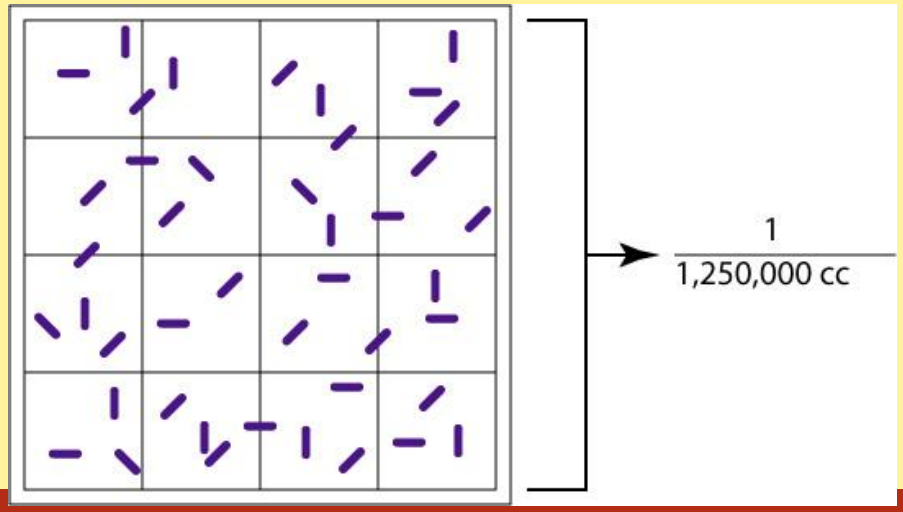
(1 ×1 ×1) ลูกบาศก์มิลลิเมตร = (0.1 ×0.1 ×0.1) ลูกบาศก์เซนติเมตร

ดังนั้น 1/20,000 ลูกบาศก์มิลลิเมตร = (1/20,000) ×(0.1 ×0.1 ×0.1) ลูกบาศก์เซนติเมตร

ปริมาตรแต่ละช่อง = 1/20,000,000 (ลูกบาศก์เซนติเมตร หรือ มิลลิลิตร)

Petroff-Hausser counting chamber

- กลับเศษเป็นส่วน = 20,000,000 (1/มิลลิลิตร)
- สมมุตินับแบคทีเรียได้ 5 เซลล์ในแต่ละช่อง
- ดังนั้นจะมีแบคทีเรีย = $5 \times 20{,}000{,}000$ เซลล์/มิลลิลิตร
- = 100,000,000 เซลล์/มิลลิลิตร
- = 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

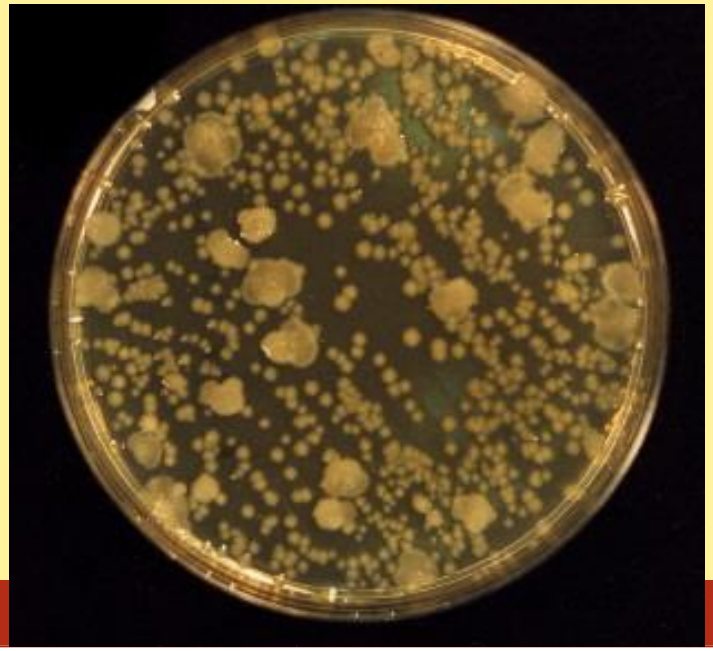


คำถาม 7

- เมื่อนับจำนวนแบคทีเรียด้วย **Petroff-Hausser counting chamber** ถ้าในแต่ละช่องนับจำนวนแบคทีเรียได้ 20 เซลล์ ดังนั้นจะมีแบคทีเรียทั้งหมดเท่าใด

2. การนับจำนวนแบคทีเรียในจานเพาะเชื้อ(plate count)

- การนับจากจานเพาะเชื้อนี้ อาศัยหลักการที่ว่า แต่ละเซลล์จะเจริญเป็นแต่ละโคโลนี ดังนั้นโคโลนีต้องไม่ยึดติดแน่นเป็นก้อน เพราะหากเป็นกลุ่มก้อน มีผลให้การนับได้จำนวนน้อยกว่าจำนวนเซลล์จริงๆ ในการนับอาจรายงานผลเป็นจำนวนโคโลนีต่อมิลิลิตร **(CFU/ml)** แทนที่จะเป็นจำนวนแบคทีเรียต่อมิลลิลิตร



คำถาม 8

- ทำการทดลอง 3 ซ้ำในการนับจำนวนแบคทีเรีย โดยใช้การเจือจางเท่ากับ 10^{-8}

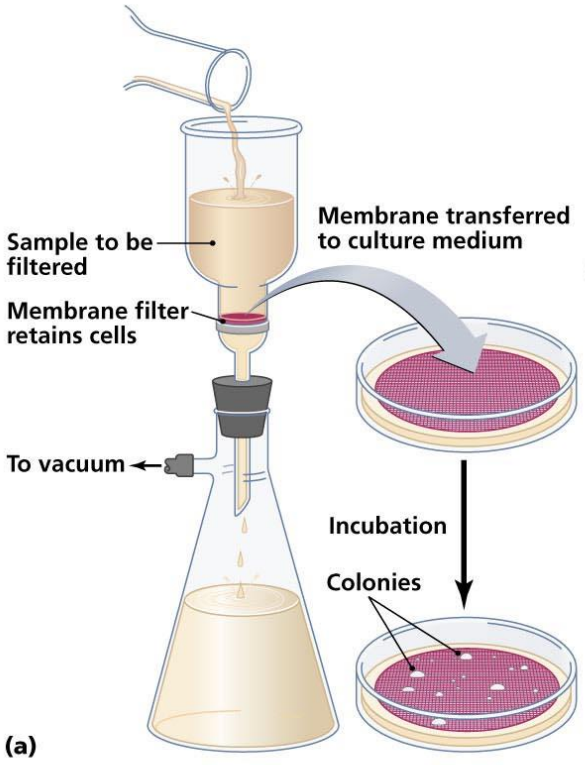
- จานที่ 1 = 22 จานที่ 2 = 222 จานที่ 3 = 228

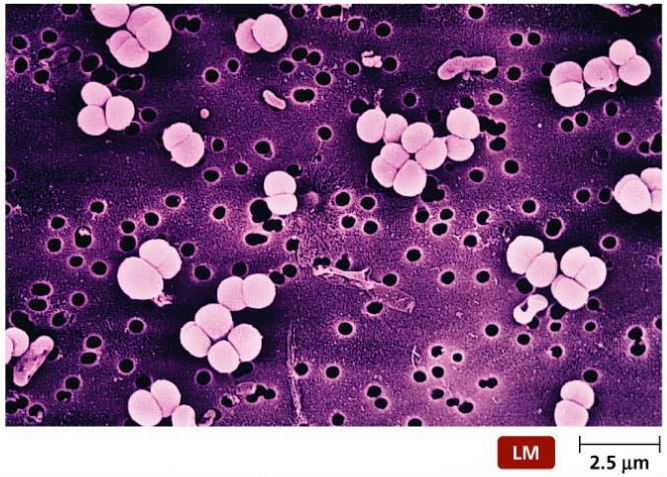
- จงคำนวณหาจำนวนโคโลนีต่อมิลลิลิตร

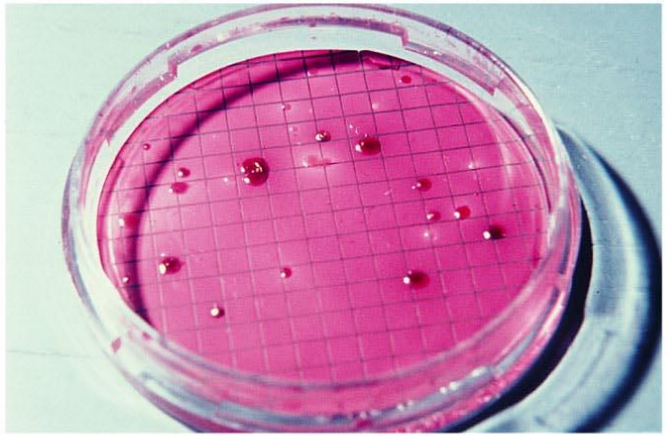
3. การนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรอง(membrane – filter count)

- ทำได้โดยใช้เยื่อกรองที่ทราบขนาดของรู ซึ่งรูนี้เล็กพอที่จะดักจุลินทรีย์ไว้ได้ แล้วเทสารละลายที่มีแบคทีเรียผ่านเยื่อกรอง เมื่อกรองตัวอย่างแล้ว จึงนำแผ่นเยื่อกรองที่มีแบคทีเรียอยู่วางบนกระดาษซับที่ชุบอาหารเลี้ยงเชื้อที่เหมาะสม หลังจากบ่มเชื้อไว้ในอุณหภูมิที่เหมาะสม จุลินทรีย์จะเจริญเป็นโคโลนีบนผิวของเยื่อกรอง แล้วจึงนับโคโลนีที่ต้องการได้

การนับจำนวนแบคทีเรียบนเยื่อกรอง

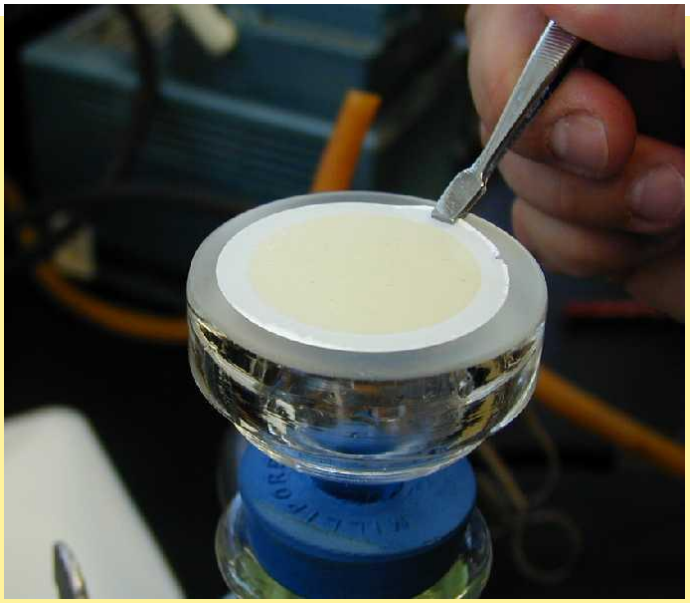


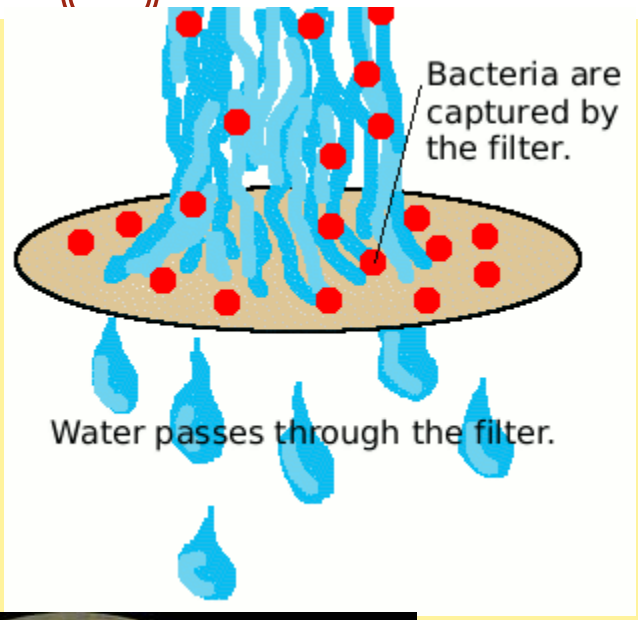


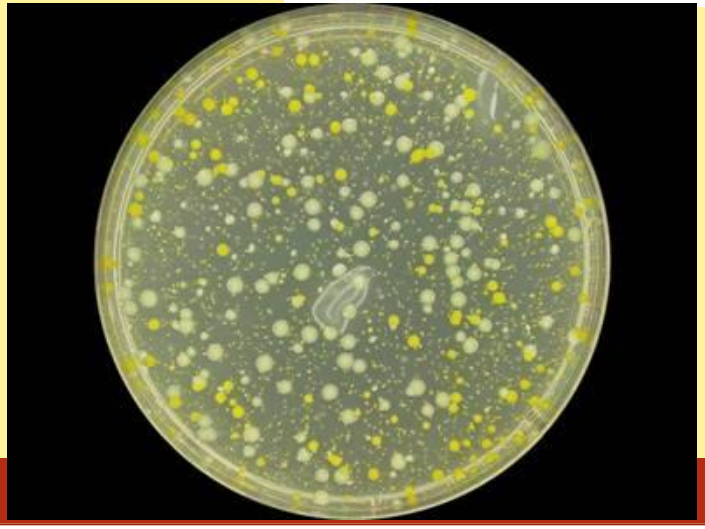


Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

(membrane – filter count)

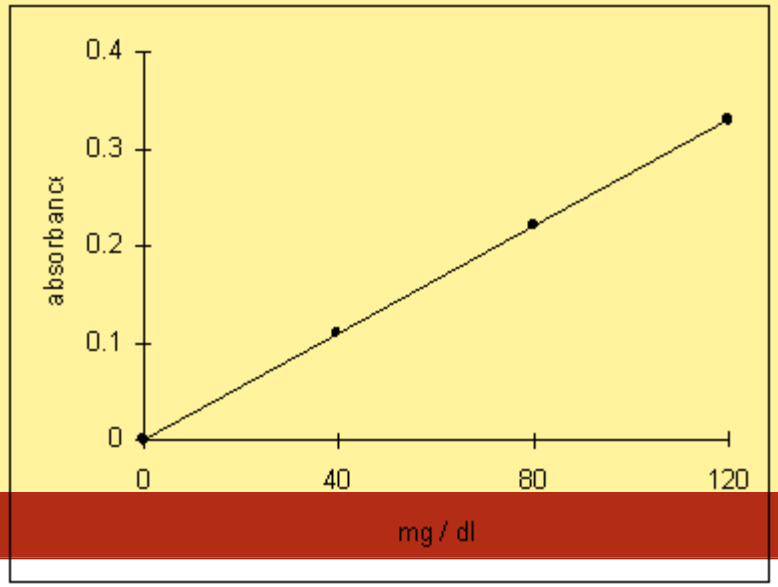






4. การหาความหนาแน่นของเซลล์โดยการวัดความขุ่น (Turbidimetric methods)

- อาศัยหลักการที่ว่า แบคทีเรียที่อยู่ในสารละลายแบคทีเรียสามารถดูดกลืนแสง และกระจายแสงที่ผ่านตัวมัน ดังนั้นเชื้อแบคทีเรียที่มากกว่า 10^7 — 10^8 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จะมีความขุ่นมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ ปริมาณแสงที่ดูดกลืนไว้และกระจายออกไปจะเป็นสัดส่วนกับความหนาแน่นของเซลล์ และเซลล์ขนาดใหญ่จะขัดขวางทางเดินของแสงมากกว่าเซลล์ขนาดเล็ก



สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer)

- เครื่องมือที่ใช้วัดความขุ่นได้แก่ สเปกโทรโฟโตมิเตอร์ **(spectrophotometer)** วิธีการคือ นำซัสเพนชันของเซลล์ใส่ในหลอดวัด และอ่านค่าที่เปอร์เซ็นต์ที่แสงผ่านออกมา**(% transmittance)** ดังนั้น ถ้าซัสเพนชันของเซลล์ขุ่นมาก %ที่แสงผ่านออกมาได้จะน้อย โดยทั่วไปจะอ่านค่าความขุ่น**(optical density** หรือ **OD)** ซึ่งเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความหนาแน่นหรือจำนวนเซลล์

สเปกโทรโฟโตมิเตอร์(spectrophotometer)

ข้อดี

- ทำได้สะดวกรวดเร็ว
- หาความสัมพันธ์ระหว่างความขุ่นกับจำนวนเซลล์หรือน้ำหนักของเซลล์ได้

ข้อเสีย

- เชื้อที่วัดต้องมากพอที่จะเกิดความขุ่น
- ไม่สามารถตรวจวัดเชื้อที่มีสีเข้มหรือมีสารอื่นนอกจากแบคทีเรียปะปนอยู่
- วัดทั้งเซลล์มีชีวิตและไม่มีชีวิตด้วยเพราะทำให้เกิดความขุ่นเหมือนกัน

5. การวัดความเข้มข้นของเซลล์โดยวัดจากปริมาณไนโตรเจน

- องค์ประกอบที่สำคัญของเซลล์คือโปรตีน ซึ่งมีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบ ดังนั้น สามารถวัดประชากรของแบคทีเรียได้จากปริมาณไนโตรเจน วิธีนี้เราวัดการเจริญวิธีนี้ต้องล้างเซลล์ให้สะอาดปราศจากอาหารที่ติดมากับเซลล์ แล้ววิเคราะห์หาปริมาณไนโตรเจนโดยวิธีทางเคมี วิธีนี้เหมาะกับการวิจัยทางจุลชีววิทยาเท่านั้น เพราะใช้แรงงานมากไม่เหมาะกับปฏิบัติการทางจุลชีววิทยาทั่วไป

6. การหาน้ำหนักแห้งของเซลล์

- วิธีนี้หามวลของเซลล์ ซึ่งแปรผันตามจำนวนเซลล์ วิธีนี้ต้องทำให้เซลล์แห้งจนน้ำหนักคงที่ และต้องไม่มีสารอื่นปะปนมาด้วย และต้องใช้เซลล์แบคทีเรียจำนวนมาก วิธีนี้เสียเวลามากจึงเหมาะสมสำหรับในงานวิจัยเท่านั้น

7. การวัดกิจกรรมการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในด้านต่าง ๆ

- เมื่อนำแบคทีเรียเลี้ยงในอาหาร มันจะใช้สารอาหารไปและสร้างสารใหม่เกิดขึ้น ปริมาณการใช้สารและสร้างผลผลิตใหม่ จะเป็นสัดส่วนกับปริมาณของเซลล์ คือ ถ้ามีการใช้สารไปมาก และสร้างผลผลิตใหม่มาก แสดงว่ามีปริมาณของเซลล์มาก เช่นการสร้างกรดหรือก๊าซจากกระบวนการหมัก วิธีนี้แม้ไม่ได้นับจำนวนเซลล์โดยตรง แต่เป็นวิธีวัดการเจริญทางอ้อมว่ามีการเจริญของจุลินทรีย์มากหรือน้อยเพียงใด

The end