

# EST2002 จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ปฏิบัติการที่ 2

### การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแหล่งที่อยู่ตามธรรมชาติ

---

#### วัตถุประสงค์:

- เพื่อศึกษาแหล่งที่อยู่ของแบคทีเรีย ด้วยการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแหล่งที่พบได้เสมอ
- เพื่อศึกษาลักษณะการเจริญของแบคทีเรียบนอาหารแข็ง (Agar) และอาหารเหลว (Broth)
- เพื่อฝึกการทำงานด้วยวิธีที่หลีกเลี่ยงการปนเปื้อนจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการ (Sterile technique)

#### หลักการ

แบคทีเรียมีอยู่มากมายในธรรมชาติ เช่น ในดิน น้ำ อากาศ และยังคงอยู่เป็นประจำหรือชั่วคราวในบางระบบอวัยวะของร่างกายคนและสัตว์ แบคทีเรียเหล่านี้บางชนิดไม่ทำให้โรค แต่บางชนิดสามารถก่อโรคได้

เมื่อทำการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Culture media) และสภาวะแวดล้อมที่เหมาะสม แบคทีเรียจะเจริญเติบโต โดยแบ่งตัวแบบ Binary fission ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ เซลล์ใหม่แต่ละเซลล์จะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนต่อไป ทำให้เพิ่มจำนวนทับถมกันจนกลายเป็นกลุ่มใหญ่พอที่จะมองเห็นด้วยตาเปล่าได้ เรียกว่า Colony ในทางตรงข้ามหากใช้อาหารและสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมกับการเจริญของแบคทีเรียที่ต้องการเพาะเลี้ยง จะทำให้แบคทีเรียเหล่านี้เจริญช้าหรือบางชนิดอาจจะตายไป ดังนั้นการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในห้องปฏิบัติการจะต้องเลือกใช้อาหารเลี้ยงเชื้อและปัจจัยในการเจริญเติบโต เช่น อุณหภูมิ ความเป็นกรด-ด่าง ปริมาณออกซิเจน เป็นต้น ให้ตรงกับความต้องการของแบคทีเรียที่ต้องการเพาะเลี้ยง

อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียมีหลายประเภท แต่ละประเภทมีส่วนประกอบแตกต่างกัน จึงมีความจำเป็นที่จะต้องเลือกใช้ให้ตรงตามวัตถุประสงค์ เช่น

1. ใช้เพื่อการเพิ่มจำนวนแบคทีเรีย เช่น Nutrient agar
2. ใช้เพื่อแยกเฉพาะแบคทีเรียชนิดที่ต้องการ (Selective media)
3. ใช้เพื่อศึกษาความแตกต่างของแบคทีเรียแต่ละชนิด (Differential media) เช่น Lactose fermentation medium ซึ่งใช้สำหรับตรวจหา Coliform ในตัวอย่างน้ำ Coliform เป็นแบคทีเรียที่อยู่เป็นประจำในทางเดินอาหารของคนและสัตว์ จึงพบได้ในอุจจาระ และมักปนเปื้อนในดิน น้ำ ผักและผลไม้ได้ ซึ่งถ้ามี Coliform ปะปนอยู่ในน้ำทดลอง แบคทีเรียจะแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจนทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่น ถ้าแบคทีเรียนั้นสามารถ Ferment lactose ได้ จะสร้างกรด ทำให้สีของ Phenol red เปลี่ยนจากสีแดงเป็นสีเหลือง

นอกจากนี้แบคทีเรียบางชนิดยังสร้าง Gas จากการ Ferment lactose ทำให้เห็นฟองอากาศเกิดขึ้นที่ก้นของ Durham tube ที่คว่ำอยู่ก้นหลอดใส่อาหารเลี้ยงเชื้อ

### วัสดุอุปกรณ์

1. Nutrient agar (NA)	7	จาน
2. Lactose fermentation medium	3	หลอด
3. Pipette ขนาด 1 ml	6	อัน
4. Spreader (แท่งแก้วสามเหลี่ยม)	1	อัน
5. กระจกยทึบที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว	1	ห่อ
6. 95% Alcohol	1	บีกเกอร์
7. ตะเกียงแอลกอฮอล์และไฟแช็ก	1	ชุด
8. ถังพลาสติกและหมัวยางสำหรับใส่จานเพาะเชื้อ	1	ชุด
9. ตัวอย่างน้ำทดลอง: น้ำแข็ง น้ำดื่ม น้ำประปา		

### วิธีการทดลอง

#### **1. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแหล่งที่อยู่ต่างๆ ตามธรรมชาติ**

1.1 อากาศ: เปิดฝา NA 1 plate แล้ววางไว้บนโต๊ะประมาณ 15 นาที เพื่อให้แบคทีเรียในอากาศปลิวตกลงบนผิวของอาหารเลี้ยงเชื้อ ปิดฝาเมื่อครบกำหนดเวลา

1.2 ของใช้ประจำวัน: วางของใช้ เช่น เหรียญ กุญแจ หรือปากกานบน NA 1 plate ปิดฝาจานแล้ววางทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลาให้คว่ำจานและเคาะสิ่งของออก

1.3 มือ: ใช้ปากกาลากเส้นแบ่ง NA 1 plate โดยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน พร้อมทั้งเขียนที่ก้นจานแต่ละซีกว่า “ก่อน” และ “หลัง” ใช้ปลายนิ้วแตะลงบนผิวหน้าของ NA หลายๆ แห่งในซีก “ก่อน” จากนั้นล้างมือด้วยสบู่ให้สะอาดและเช็ดด้วยกระจกยทึบที่ฆ่าเชื้อแล้ว ใช้ปลายนิ้วแตะบนผิวหน้าของ NA หลายๆ แห่งในซีก “หลัง”

1.4 น้ำ: ใช้ Pipette ดูดน้ำ 0.1 ml ใส่ลงไปใน NA ชนิดละ 1 plate ใช้ Spreader เกลีส (Spread) นำให้ทั่วผิวหน้าอาหาร Spread ไปรอบๆ หลายๆ ครั้งจนน้ำซึมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.5 Control: NA 1 plate ที่ไม่มีการเปิดฝาหรือเพาะเชื้อใดๆ

นำ Plate ทั้งหมดวางในถังพลาสติก โดยคว่ำ Plate ลงให้ฝายู่ทางด้านล่าง รัดยางที่ปากถังกววมๆ วางในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการอ่านผล

## 2. การตรวจหา Coliform ในตัวอย่างน้ำทดลอง

ใช้ Pipette ดูดน้ำ 1 ml ใส่ลงไปในหลอด Lactose fermentation medium ชนิดละ 1 หลอด วางในตะแกรง (Rack) ที่จัดไว้ให้ วางในตู้บ่มเชื้อ (Incubator) ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 18-24 ชั่วโมง ทำการอ่านผล

### การอ่านผล

#### 1. การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียจากแหล่งที่อยู่ต่างๆ ตามธรรมชาติ

เมื่อครบกำหนดเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง สังเกตจำนวนและลักษณะ Colony แบคทีเรียที่เจริญบน Nutrient agar แต่ละ plate บันทึกผลในตาราง

ตัวอย่างลักษณะ Colony เช่น

**ขนาด (Size):** เล็ก, ปานกลาง, ใหญ่

**สี (Pigment):** ขาว, ครีมน้ำตาล, เหลือง, ส้ม, แดง, ชมพู

**รูปร่าง (Form):** กลม (Circular), ไม่แน่นอน (Irregular), เป็นเส้นใย (Filamentous),

ลักษณะคล้ายราก (Rhizoid)

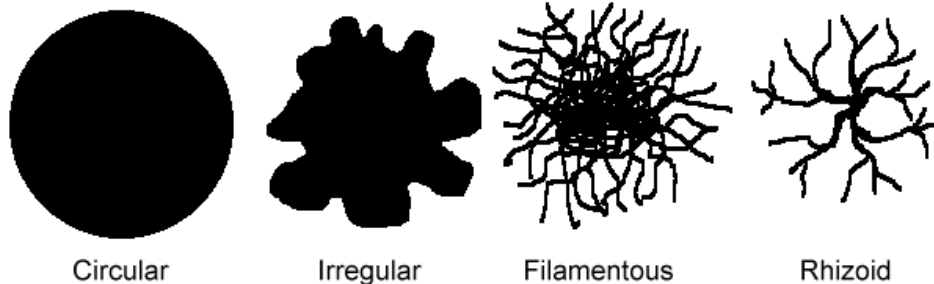
**การยกตัว (Elevation):** นูน (Raised), นูนคล้ายหยดน้ำ (Convex), แบน (Flat), นูนตรงกลาง

(Umbonate), นูนตรงกลาง (Carteriform)

**ขอบ (Margin):** เรียบ (Entire), เป็นคลื่น (Undulate), เป็นเส้นใย (Filiform), เป็นวง (Curled),

เหมือนนิ้วมือ (Lobate)

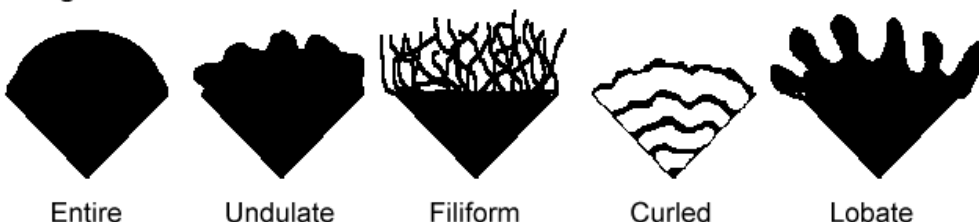
### Form



### Elevation



### Margin



ตารางบันทึกผล

	จำนวน Colony	ขนาด	สี	รูปร่าง	การยกตัว	ขอบ
Control						
อากาศ						
ของใช้ ประจำวัน						
มือ (ก่อนล้าง)						
มือ (หลังล้าง)						
น้ำแข็ง						
น้ำดื่ม						
น้ำประปา						

## 2. การตรวจหา Coliform ในตัวอย่างน้ำทดลอง

เมื่อครบกำหนดเวลาที่ใช้เพาะเลี้ยง สังเกตการเจริญของแบคทีเรียจากความขุ่น การ Ferment lactose โดยดูจากการเปลี่ยนสีของอาหาร และการสร้าง Gas ใน Durham tube บันทึกผลในตาราง

ตัวอย่าง Coliform เช่น

- พวกที่สร้างกรดและ Gas: *Enterobacter aerogenes, Escherichia coli, Klebsiella pneumonia*
- พวกที่ไม่สร้างกรดและ Gas: *Proteus vulgaris, Salmonella typhi, Shigella flexneri*

ตารางบันทึกผล

	ระดับความขุ่น	สี	การสร้าง Gas
Control			
น้ำแข็ง			
น้ำดื่ม			
น้ำประปา			

เอกสารอ้างอิง:

1. จุลชีววิทยา: หลักเบื้องต้นและวิธีปฏิบัติ (2543) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
2. คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาพื้นฐาน (2555) ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
3. คู่มือปฏิบัติการวิชาจุลชีววิทยาและปรสิตวิทยาเบื้องต้น (2548) คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยรังสิต