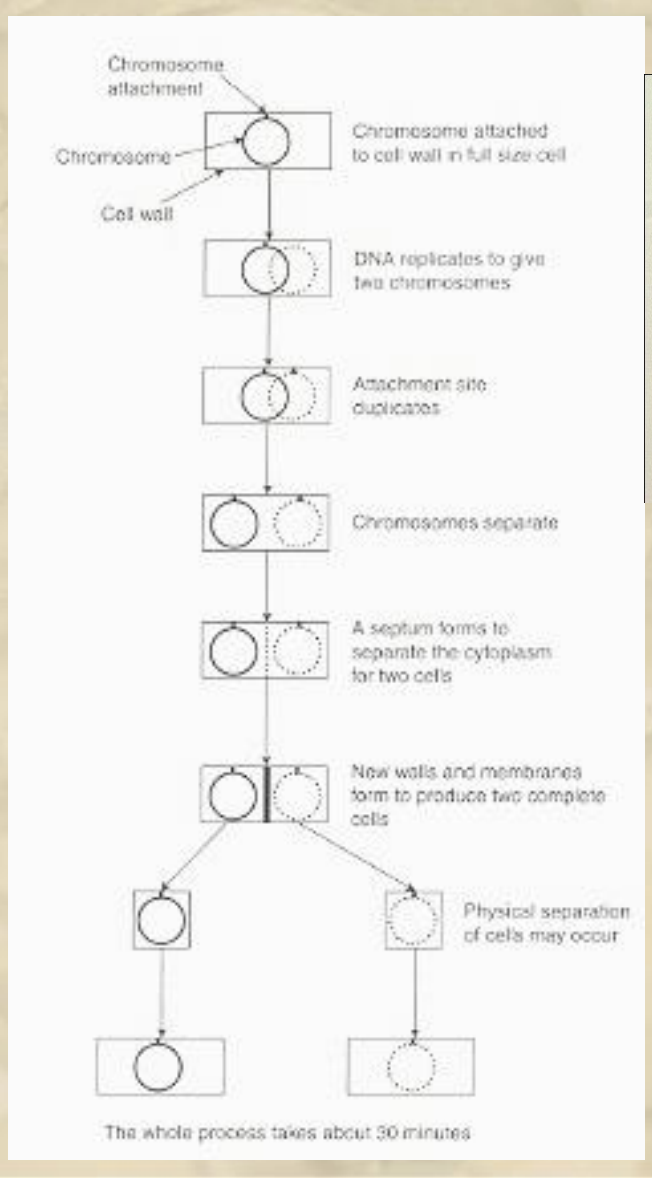
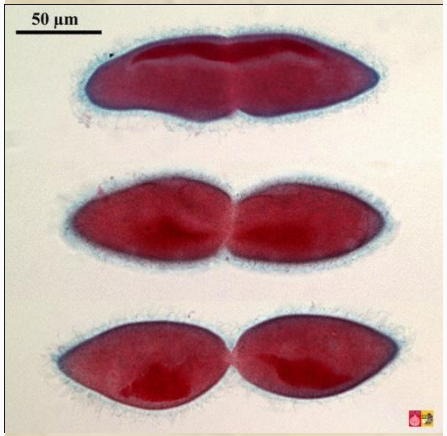
ปัจจัยที่ส่งผลต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

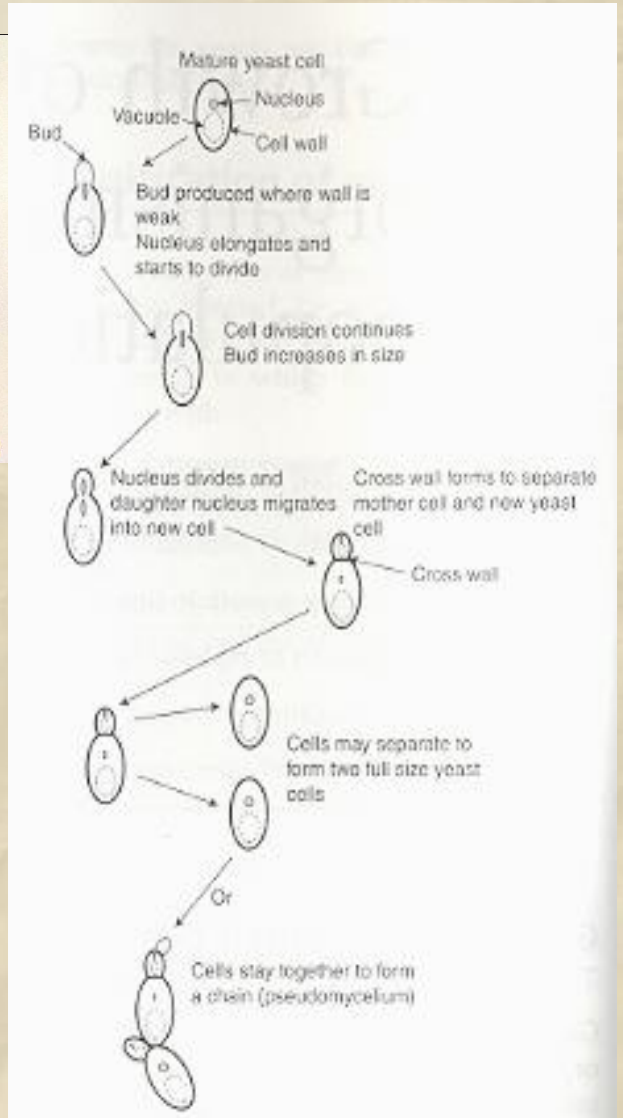
โดย

ดร.นฤมล มาแทน

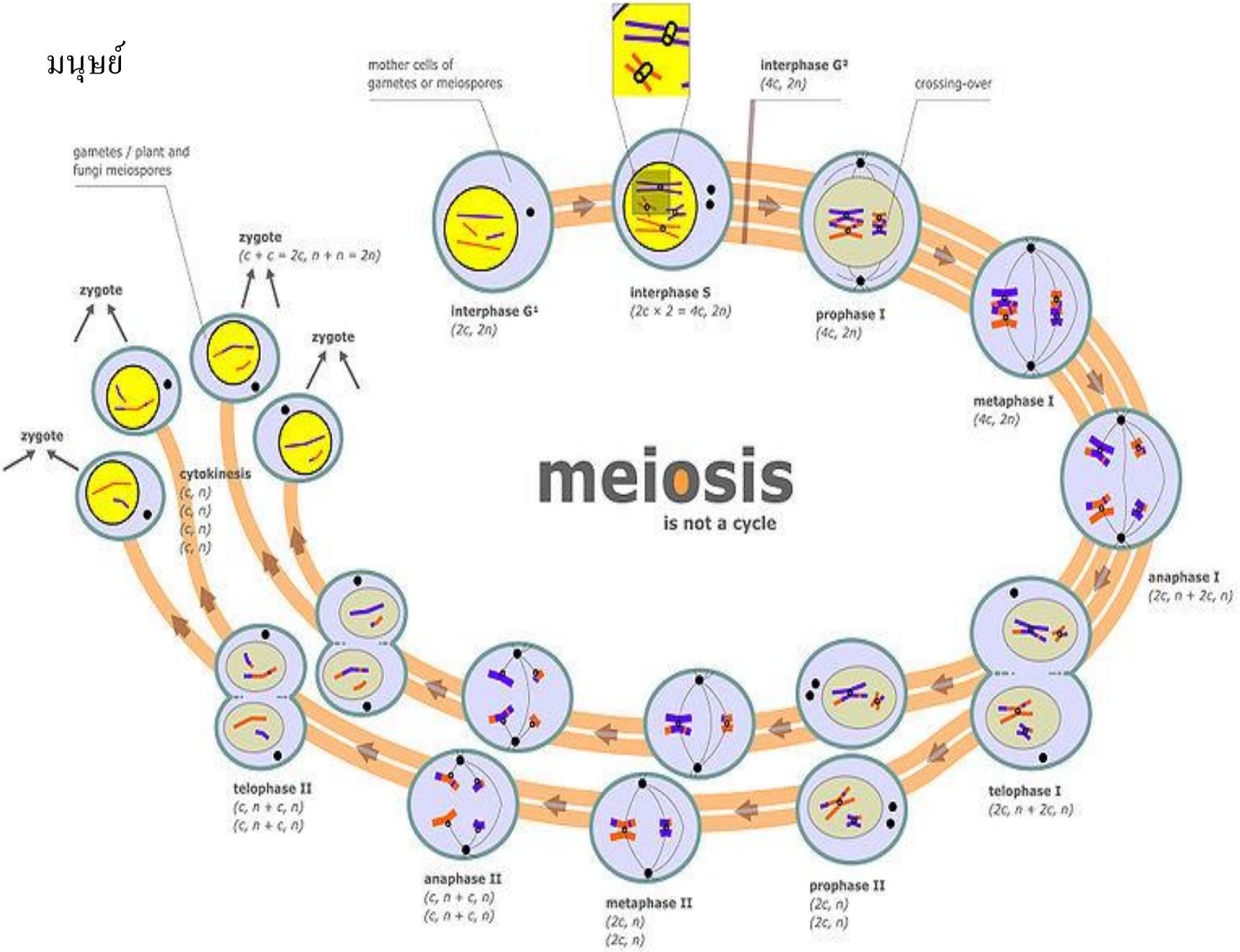
การเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์







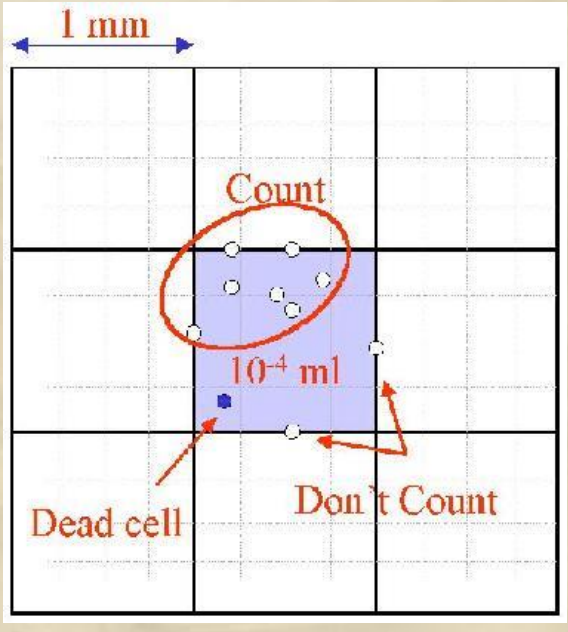
มนุษย์


mother cells of gametes or meiospores
interphase G²
(4c, 2n)
crossing-over
gametes / plant and fungi meiospores
zygote
(c + c = 2c, n + n = 2n)
zygote
zygote
zygote
interphase G¹
(2c, 2n)
interphase S
(2c × 2 = 4c, 2n)
prophase I
(4c, 2n)
metaphase I
(4c, 2n)
meiosis
is not a cycle
cytokinesis
(c, n)
(c, n)
(c, n)
(c, n)
anaphase I
(2c, n + 2c, n)
telophase I
(2c, n + 2c, n)
telophase II
(c, n + c, n)
(c, n + c, n)
anaphase II
(c, n + c, n)
(c, n + c, n)
metaphase II
(2c, n)
(2c, n)
prophase II
(2c, n)
(2c, n)

การวัดการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์

1 วัดน้ำหนักแห้ง

2 นับจำนวนเชื้อโดยใช้ direct microscopic count



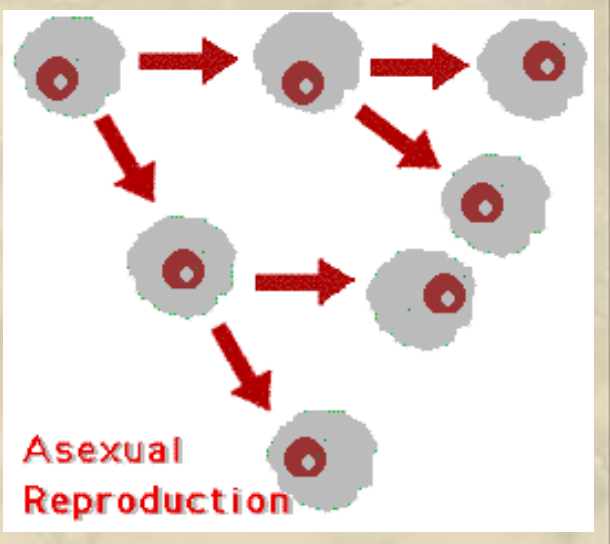
3 นับจำนวนของเชื้อจุลินทรีย์ที่มีชีวิต (a total viable count)

4 วัดส่วนประกอบของเซลล์ที่เกิดขึ้นเมื่อเชื้อมีการเจริญเติบโต เช่น ATP

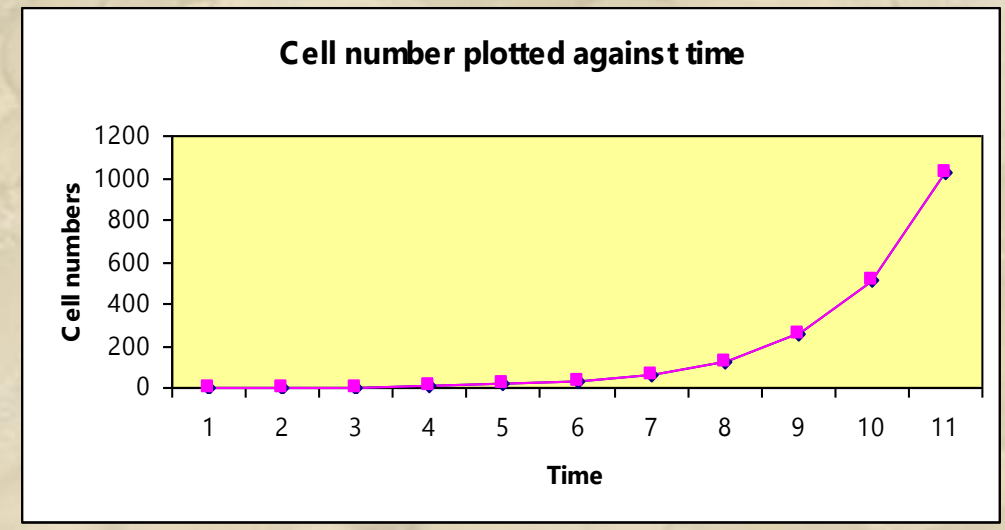
Portable luminometer

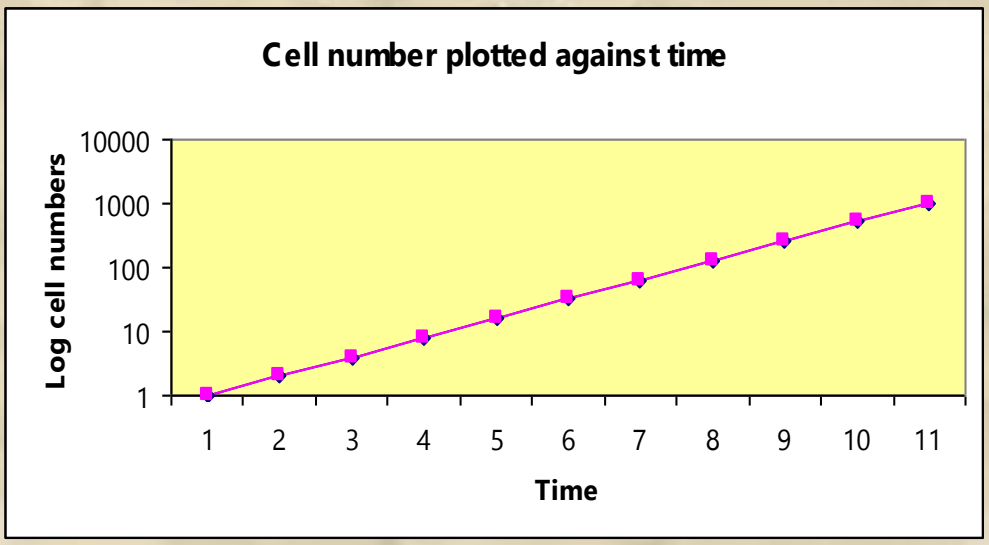
การเจริญเติบโตของเชื้อแบบ binary fission

Generation	Number of cell	Number of cell Exponential form
0	1	2^0
1	2	2^1
2	4	2^2
3	8	2^3
4	16	2^4
5	32	2^5
6	64	2^6
7	128	2^7
8	256	2^8
9	512	2^9
10	1024	2^{10}



การเจริญของเชื้อจุลินทรีย์





$$Nt = 2^n NO$$

$$n = \frac{\log Nt - \log No}{\log 2}$$

$$n = \frac{\log Nt - \log No}{0.3010}$$

Nt = จำนวนเชื้อทั้งหมด ณ เวลาต่างๆ
No= จำนวนเชื้อเริ่มต้น ณ เวลาเริ่มต้น
n= ประชากรของเชื้อ ณ เวลาต่างๆ

ตัวอย่างการคำนวณ

- เชื้อ *Escherichia coli* มี generation time ที่ 20 นาที เมื่อเจริญในสภาวะที่เหมาะสม ซึ่งเชื้อเริ่มต้นมี 10^3 เซลล์ ดังนั้นที่เวลา 24 ชั่วโมงจะมีจำนวนเชื้ออยู่เท่าใด?

$$n = \frac{\log Nt - \log No}{0.3010}$$

$$n=(24x60)/20 = 72$$

แทนค่า

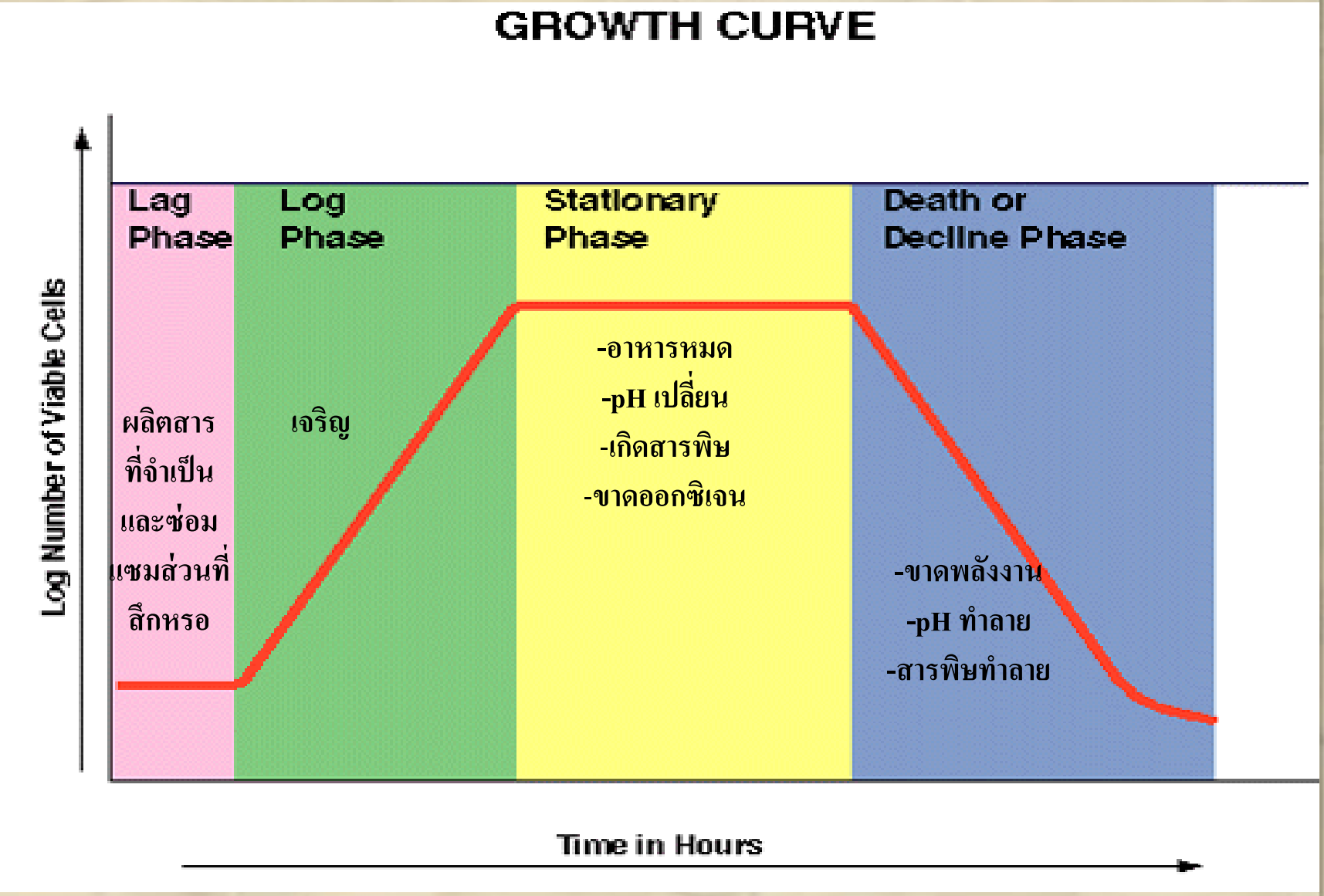
$$72 = \frac{\log Nt - \log 10^3}{0.3010}$$

$$(72x0.3010)+3 = \log Nt$$

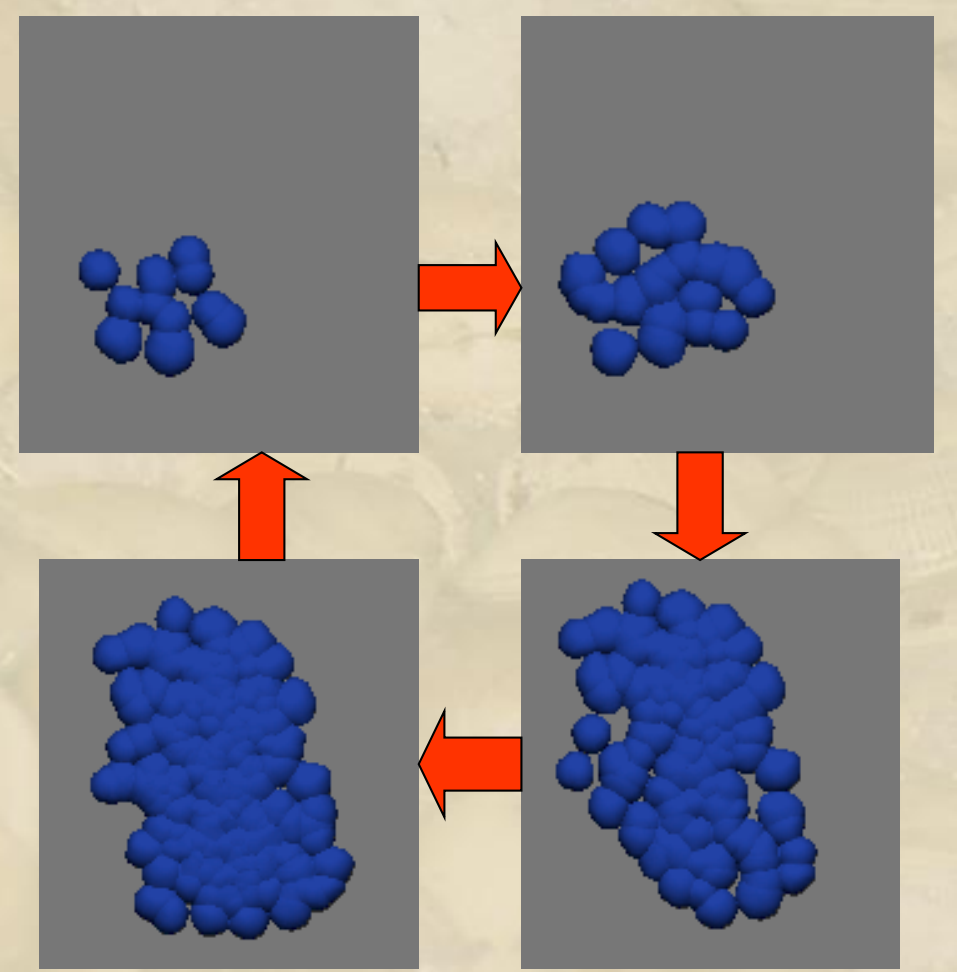
$$\log Nt = \text{antilog } 24.672$$

$$Nt = 4.7x10^{24}$$

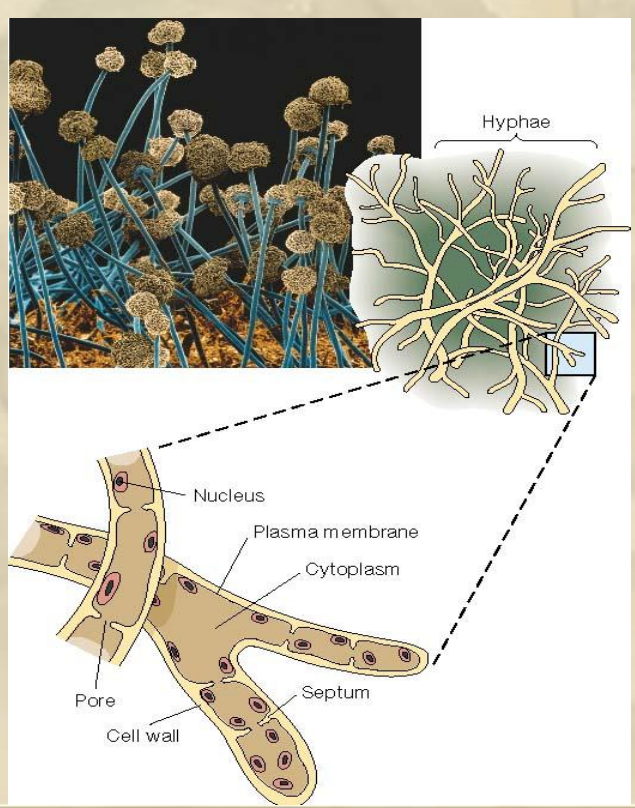
กราฟการเจริญเติบโตของเชื้อ



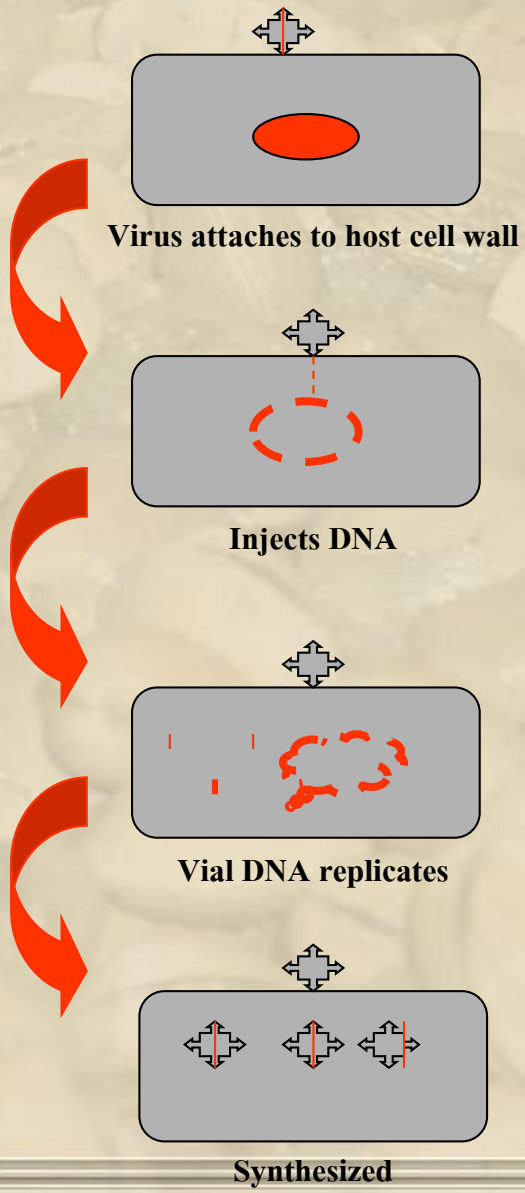
การเจริญของโคโลนี

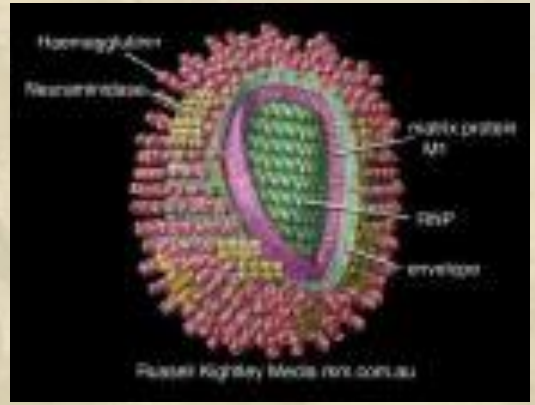


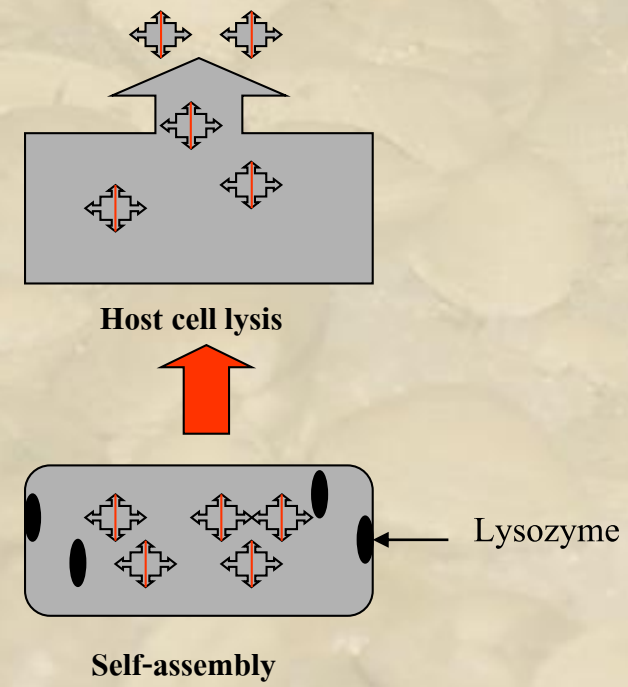
การเจริญของไมซีเรียส (mycelial)



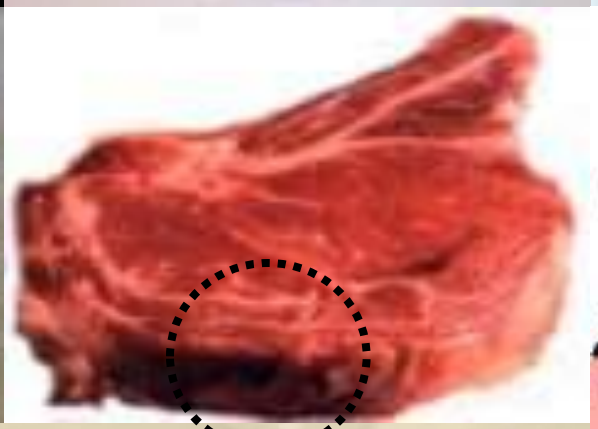
การ replication ของ viruses







การเจริญเติบโตของเชื้อในอาหาร



ชนิดของปัจจัย

1 ปัจจัยภายใน (intrinsic factors)

- 1.1 สารอาหาร
- 1.2 ค่า pH
- 1.3 ค่า Eh
- 1.4 สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์
- 1.5 ค่า a_w

2 ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors)

- 2.1 ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (%RH)
- 2.2 อุณหภูมิ (Temperature)

1.1 สารอาหารสำหรับการเจริญเติบโต

- สารอาหารเป็นสิ่งที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์เพราะอาหารเป็นแหล่งพลังงาน และเป็นแหล่งแร่ธาตุให้เชื้อจุลินทรีย์นำไปใช้ประโยชน์ในการสร้างหรือซ่อมแซมส่วนที่สึกหรอ

Element	%Dry weight
Carbon	50
Oxygen	20
Nitrogen	14
Hydrogen	8
Phosphorus	3
Sulphur	1
Potassium	1
Sodium	1
Calcium	0.5
Magnesium	0.5
Chlorine	0.5
Iron	0.2
Boron	0.3
Cobalt	
Manganese	

หน้าที่ของสารต่างๆต่อการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

Element	หน้าที่
Hydrogen	เป็นส่วนประกอบของน้ำซึ่งต้องใช้ภายในส่วนต่างๆของเซลล์
Oxygen	เป็นส่วนประกอบของน้ำ, ใช้ในการหายใจ, ใช้ในระดับโมเลกุลของเซลล์
Carbon	เป็นส่วนประกอบของโมเลกุลต่างๆของเซลล์
Nitrogen	เป็นส่วนประกอบของกรดอะมิโน, โปรตีน สร้าง ATP และ เอ็นไซม์
Sulphur	พบในกรดอะมิโนพวก cystine, methionine สร้าง co-enzyme
Phosphorus	พบในนิวคลีอิก DNA, RNA พบใน phospholipid, สร้าง co-enzyme
Potassium	เป็นส่วนสำคัญสำหรับใช้ osmotic pressurและสร้าง co-enzyme
Magnesium	ใช้สำหรับสร้างเนื้อเยื่อเซลล์ ไรโบโซม DNA, RNA สร้าง enzyme
Calcium	ใช้สร้างพนังเซลล์ เป็นส่วนประกอบหลักของ endospores
Iron	ใช้สร้าง cytochromes สำหรับการหายใจแบบใช้ออกซิเจนและสร้าง enzyme
Trace elements	ใช้สร้าง enzyme และ co-enzyme

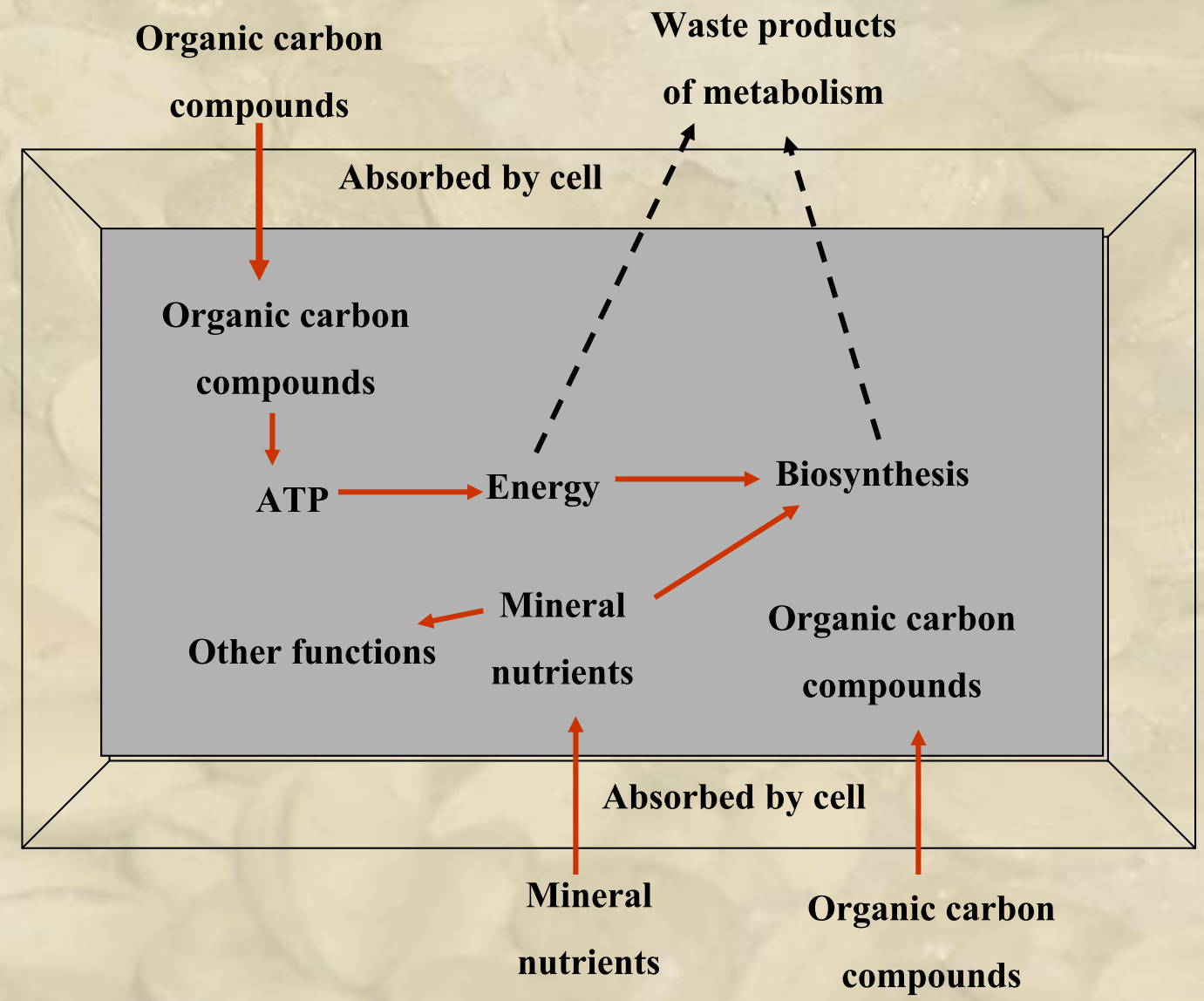
ประเภทของเชื้อจุลินทรีย์ตามสารอาหาร

1 Photoautotophs เป็นพวกที่สามารถสังเคราะห์แสงได้เองเช่น photosynthetic bacteria

2Photoheterotrophs คล้ายกับ Photoautotophs แต่เชื้อจุลินทรีย์กลุ่มนี้ไม่สามารถสังเคราะห์โมเลกุลได้จากคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ต้องการใช้สารอินทรีย์คาร์บอน เช่น Non-sulphur purple bacteria

3 Chemoheterotrophs เป็นเชื้อกลุ่มใหญ่ มีการดูดสารอาหารเข้าไปแล้วใช้ ATP เป็นแหล่งพลังงาน

แผนภาพแสดง Chemoheterotrophs



Growth factors

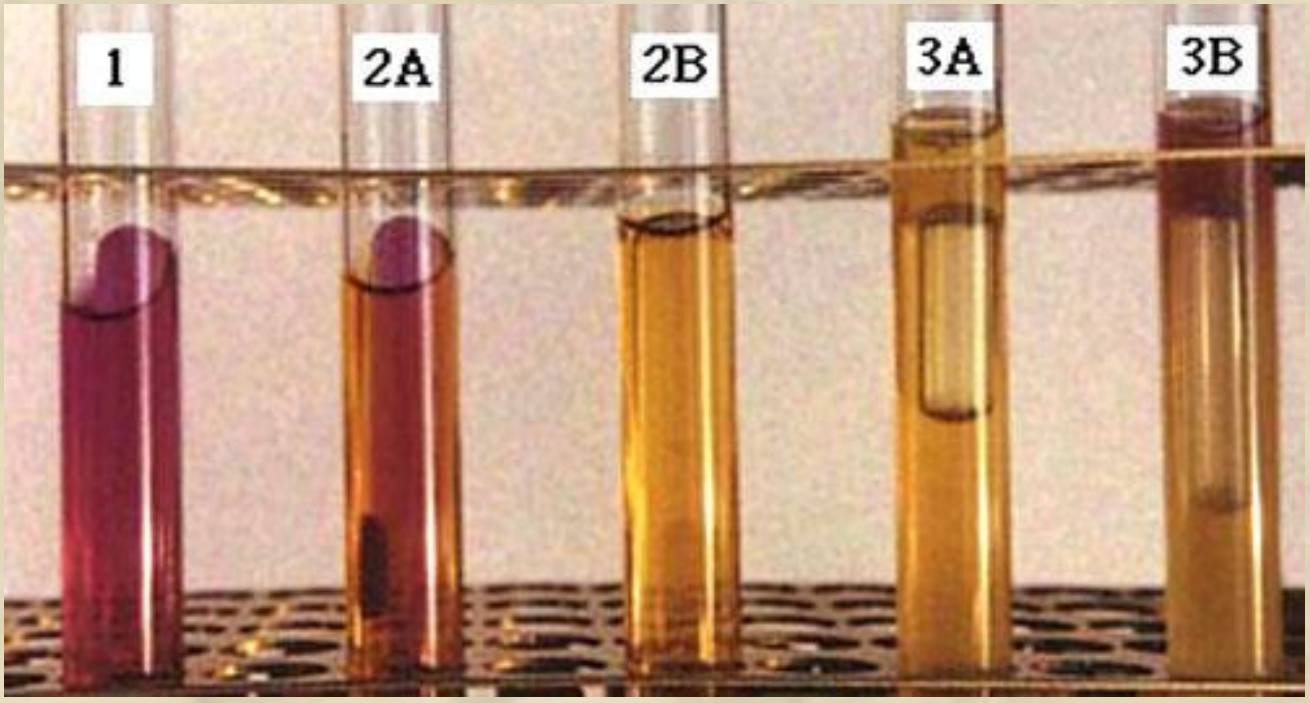
*เชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้กลูโคสเป็นแหล่งพลังงาน แต่สารอาหารอื่นๆในรูปอนินทรีย์ก็มีความสำคัญในการเจริญเติบโต สารที่ช่วยให้เชื้อจุลินทรีย์เจริญเติบโตได้ดีมีดังนี้

- water
- glucose
- ammonium chloride
- potassium phosphate
- magnesium sulphate
- ferrous sulphate
- calcium chloride
- trace elecments

อาหารเลี้ยงเชื้อ

อาหารแข็ง (agar)

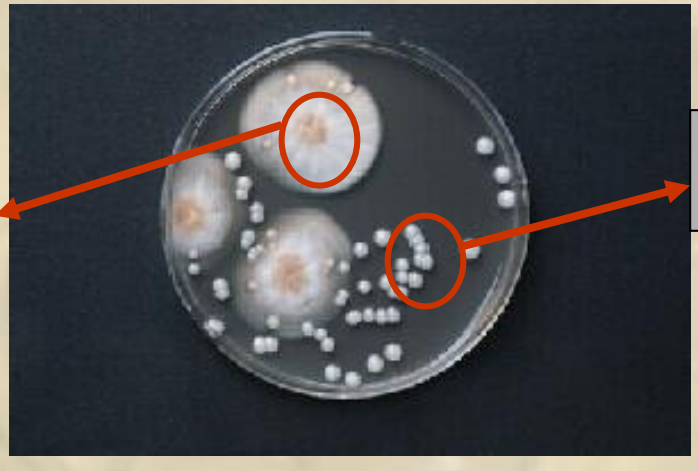
อาหารเหลว (broth)



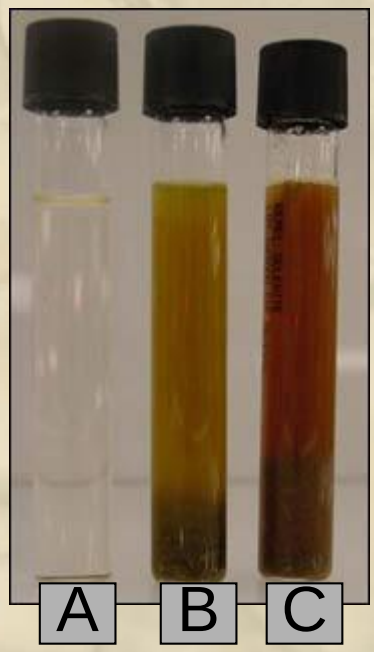
ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1 General purpose media (non-selective) มีสารอาหารที่สามารถทำให้เชื้อจุลินทรีย์หลายๆชนิดสามารถเจริญได้ เช่น Nutrient agar/broth (NA), plate count agar (PCA), malt extract agar (MEA)

2 Selective media สารอาหารที่ยับยั้งเชื้อชนิดหนึ่งแต่เชื้อที่ต้องการสามารถเจริญได้ เช่น เติมกรดเฉพาะ, มี Aw เฉพาะ, %nitrogen, และมีสาร antibiotic อยู่เป็นต้น เช่น oxytetracycline glucose yeast extract agar (OGYE)



3 Enrichment media เป็นอาหารเหลว (broth) ใช้สำหรับเพิ่มปริมาณเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ต้องการให้มากขึ้น เช่น Selenite broth เป็นอาหาร enrichment สำหรับเชื้อ *Salmonella* spp ซึ่งมีการเติม sodium biselenite ซึ่งเป็นพิษกับเชื้อชนิดอื่นๆแต่เป็นพิษเล็กน้อยต่อเชื้อ *Salmonella* spp จากนั้นจำนวนเชื้ออื่นๆจะค่อยๆตายไปและเหลือเชื้อ *Salmonella* spp เป็นเชื้อหลักในตัวอย่างชนิดนั้นในที่สุด



A=อาหาร Selenite broth

B=อาหาร Selenite broth+ ตัวอย่างอาหาร

C=อาหาร Selenite broth+ ตัวอย่างอาหารที่ผ่านการบ่ม 24 ชั่วโมง

4 Differential media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่สามารถเปลี่ยนแปลงไปเมื่อมีเชื้อจุลินทรีย์ชนิดใดชนิดหนึ่งเจริญขึ้นมา เช่นเกิดการขุ่นของอาหารแข็ง, เปลี่ยนสีอันเกิดจากการเปลี่ยนแปลง pH หรือการเปลี่ยนแปลงสีเริ่มต้นของอาหารโดยการปฏิกิริยาทางเคมี

Differential agents ที่นิยมเติมคือ

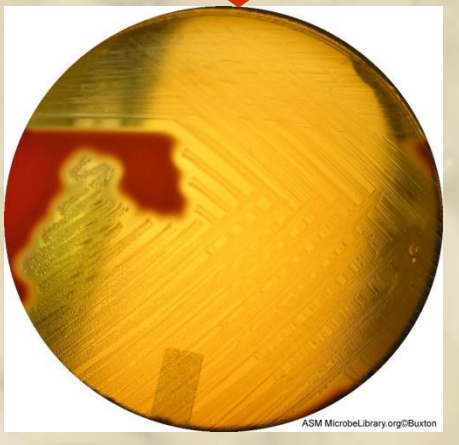
- สารที่สามารถถูกย่อยได้โดย extracellular enzymes จากเชื้อ เช่น lecithinase, proteinase, haemolysin

-น้ำตาลและกรดอะมิโน หากเชื้อมีการใช้น้ำตาลหรือกรดอะมิโนอาจสร้างสารชนิดอื่นๆเช่น กรด แล้วทำให้อาหารเลี้ยงเชื้อเปลี่ยนสี

- สารประกอบเคมี เช่น potassium tellurite ทำให้เกิดสีดำของ tellurium

- Iron salt เมื่อเชื้อใช้จะสร้างไฮโดรเจนออกมาแล้วทำให้เกิดสีดำของ iron sulphide

ตัวอย่าง



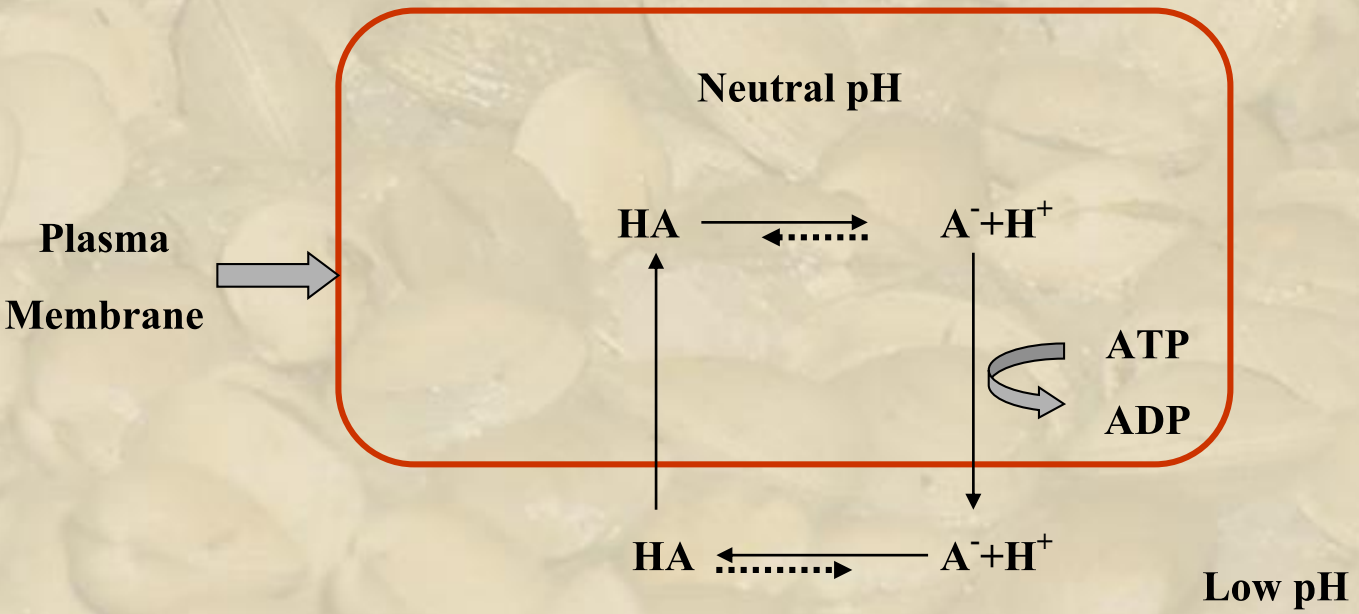
Blood agar

-มี defibrinated ของเลือดม้า ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์บางชนิดที่มีเอ็นไซม์ในการย่อย haemolysin จะทำให้เกิด clear zone รอบๆโคโลนี

Beta hemolytic Streptococcus species seen with transmitted light

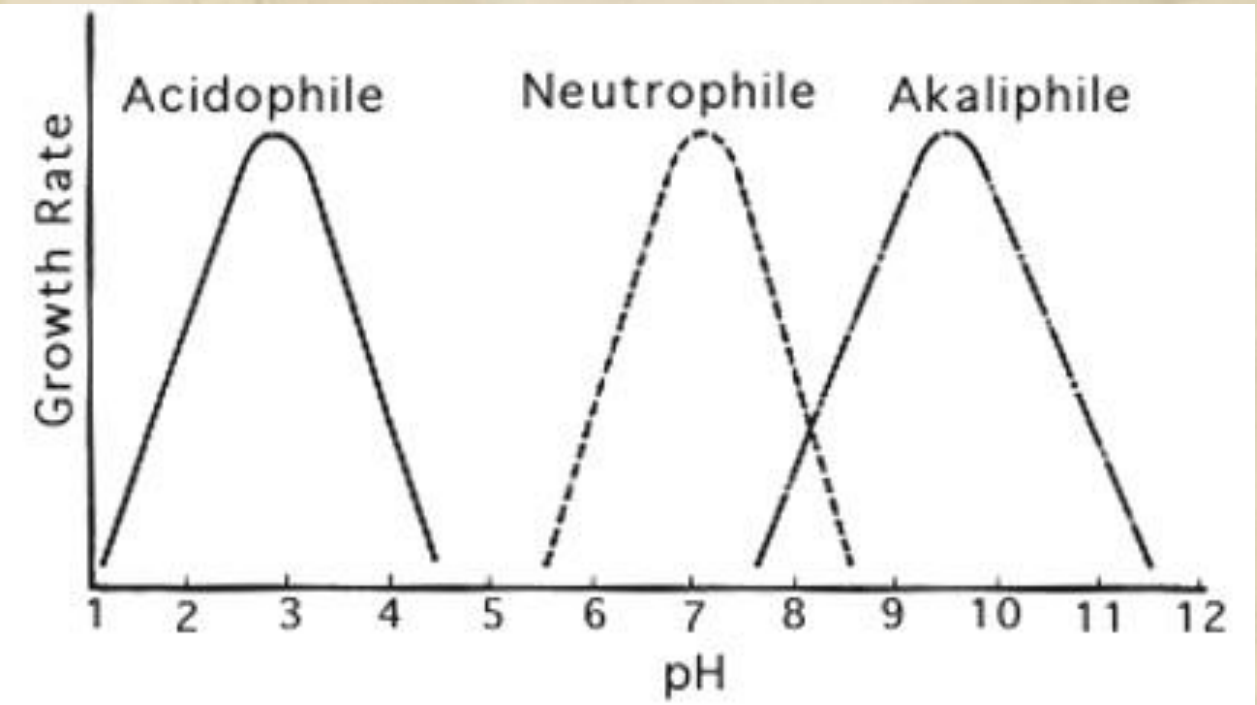
5 Selective/differential media ใช้ในการแยกเชื้อจุลินทรีย์ในกลุ่มที่ใกล้เคียงกันออกจากกัน และแยกชนิดของเชื้อในกลุ่มของเชื้อเดียวกันออกจากกัน เช่น MacConkey agar ซึ่งมี peptone เป็นองค์ประกอบ มีการเติม bile salt ซึ่งสามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกและทำให้เชื้อแบคทีเรียกลุ่ม Enterobacteriaceae (G-; *E. coli, Enterobacter* spp, *Salmonella* spp, *Proteus* spp) เจริญเติบโตได้และสารที่เป็น difference agent คือ lactose และ สีแดง (pH-indicator) ซึ่งเชื้อ *E.coil* นี้จะใช้น้ำตาล lactose และมีโคโลนีสีแดง แต่เชื้อ *Salmonella* spp. จะไม่ใช้ lactose และไม่มีสีแดง

1.2 ค่า pH



กรดอ่อนกับการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์

pH กับการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์



*แบคทีเรียสามารถเจริญในค่า pH ที่ต่ำสุด 4-4.5 สูงสุดคือ 8.0-9.0และเจริญได้ดีใน pH ประมาณ 6.8-7.2 แต่ยังมีแบคทีเรียทนกรดบางชนิด เช่น *Lactobacillus* spp สามารถเจริญในสภาวะ 3.8-7.2

*เชื้อยีสต์และรามีการเจริญในช่วง pH ที่กว้างกว่าเชื้อแบคทีเรียเช่นเชื้อรา *Fusarium* spp สามารถเจริญในช่วง 1.8-11.1 ยีสต์เจริญได้ดีที่ pH 4.0-4.5 และเชื้อราที่ 3-3.5

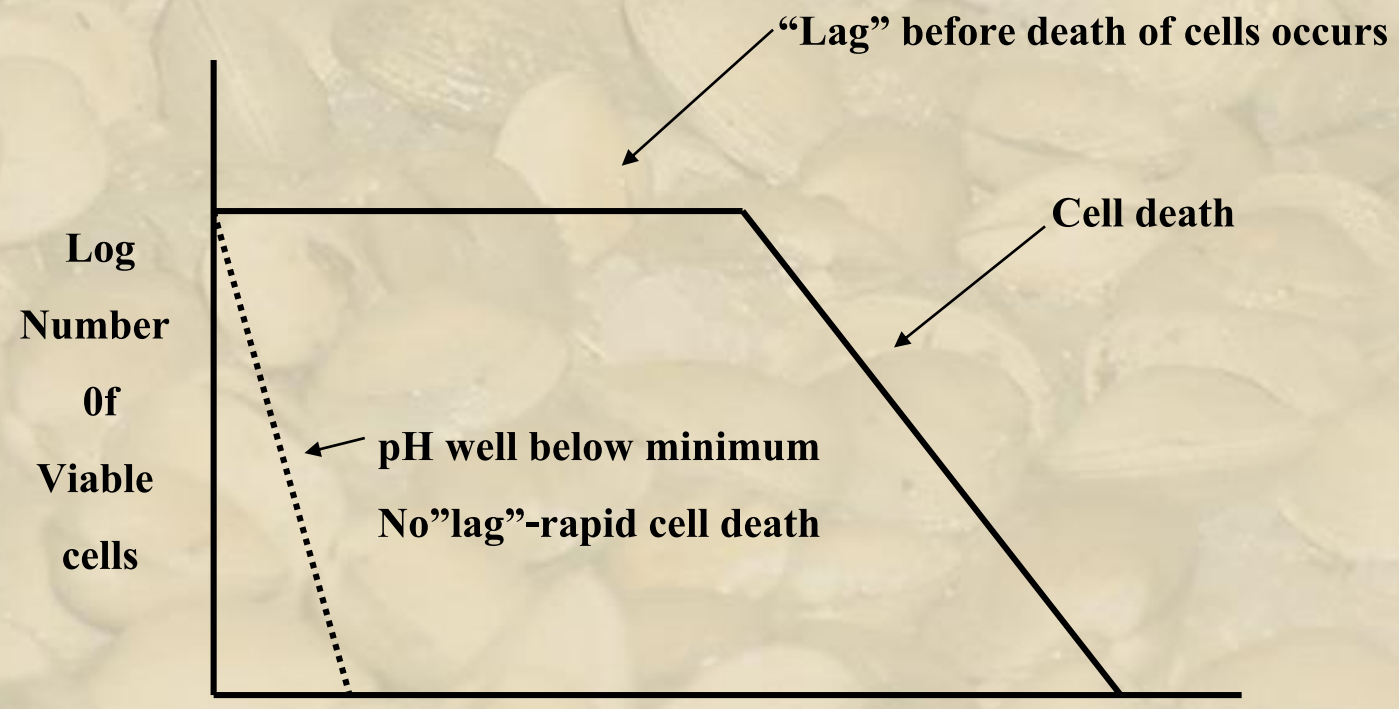
*pHมีผลต่อ

- อัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ (Growth rate)

-จำนวนเชื้อสูงสุด

- ระยะเวลาของ lag phase , stationary phase, death phase

อะไรจะเกิดขึ้นเมื่อเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ใน pH ที่ต่ำกว่า minimum?



pH และสารกันบูด

- Lactic acid และ Citric acid เป็นกรดอ่อนที่สามารถเติมลงไปในอาหารแล้วทำให้เชื้อจุลินทรีย์ที่ก่อโรคไม่สามารถเจริญเติบโตได้

1.3 ค่า redox potential (Eh)

- ค่า Eh บอกถึงการถ่ายเทอิเล็กตรอนระหว่างอะตอมและโมเลกุลโดยสมการพื้นฐานคือ

$$(\text{oxidant}) + H^{+} + ne \rightleftharpoons (\text{Reductant})$$

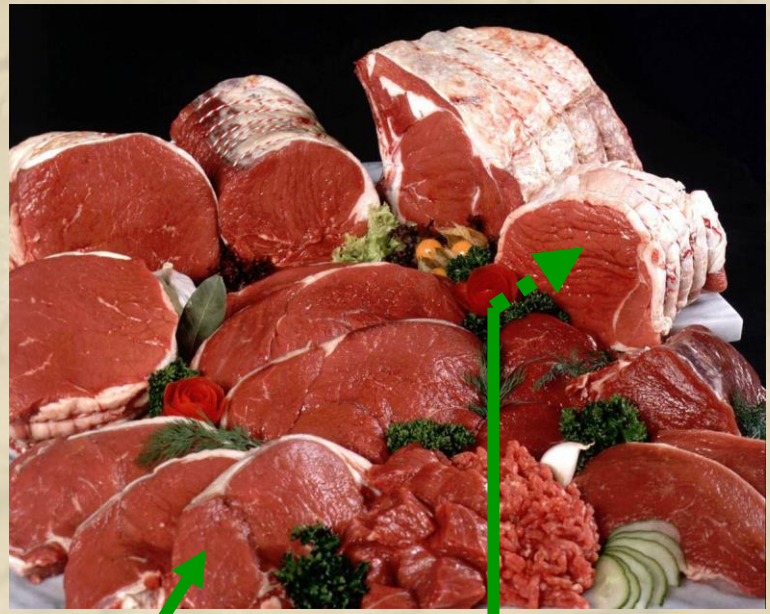
n=จำนวนอิเล็กตรอนที่เกิดการถ่ายเท

* ในเซลล์สิ่งมีชีวิตทั้งการถ่ายทอดไฮโดรเจนอะตอมและอิเล็กตรอนจำเป็นอย่างยิ่งสำหรับการทำ electron transport chain และการได้มาซึ่งพลังงานสำหรับการทำ oxidative phosphorylation

- ความแตกต่างระหว่างค่า Eh ในตัวเชื้อจุลินทรีย์และสิ่งแวดล้อมยากที่จะทำการวัดค่า แต่ถ้าหากเชื้อจุลินทรีย์อาศัยอยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มีค่า Eh ต่ำกว่า/สูงกว่า เซลล์ของมัน จะเกิดการแลกเปลี่ยนกันขึ้นและเชื้อชนิดหนึ่งอาจทำให้ค่า Eh ในสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลงไปจนไม่เหมาะสมต่อการเจริญของเชื้ออีกชนิดหนึ่งได้
- ปกติแล้ววัตถุดิบอาหารที่มีการหายใจจะมีค่า Eh เป็นบวกซึ่งทำให้เกิดการ reducing ในเซลล์ลงไปได้เช่น ascosbic acid ในผักและผลไม้

- ปัจจัยที่ทำให้เกิดค่า Eh ที่แตกต่างกันในอาหารคือ
  - ปริมาณความเข้มข้นของออกซิเจนในสิ่งแวดล้อมและที่สามารถซึมเข้าไปในอาหาร
  - ความหนาแน่นของโครงสร้างของอาหารซึ่งมีผลต่อการซึมผ่านของออกซิเจน
  - ความเข้มข้นของสาร reducing ในอาหารซึ่งจะต้านทานการเปลี่ยนแปลงค่า Eh ให้เป็นบวก หรือเรียกอีกอย่างว่า poising capacity
  - กระบวนการผลิตอาหาร
  - ค่า pH ในอาหารโดยทุกการเปลี่ยนแปลง pH 1 ค่าจะทำให้เกิด Eh เพิ่มขึ้น +58 mv

ค่า Eh ในอาหาร



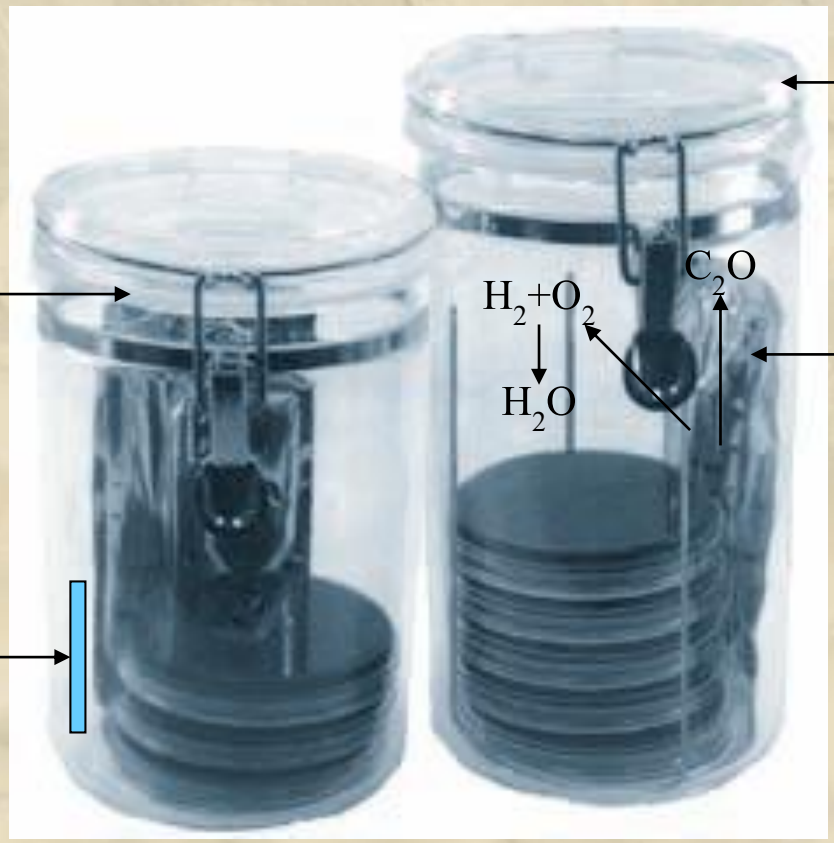
+200 mV

-150 mV

ปริมาณออกซิเจนในถุง

ชนิดของเชื้อจุลินทรีย์แบ่งตามการใช้ออกซิเจน

1 Obligate anaerobes



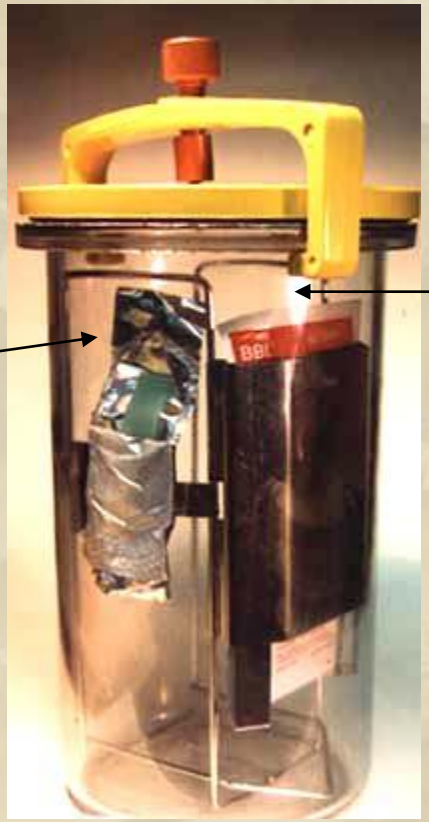
Lid clamp

Gasket

Redox indicator (methylene blue)

Gas-generating Envelope contain Sodium borohydride, Organic acid, sodium Bicabonate, Addition Water generates hydrogen And carbon dioxide

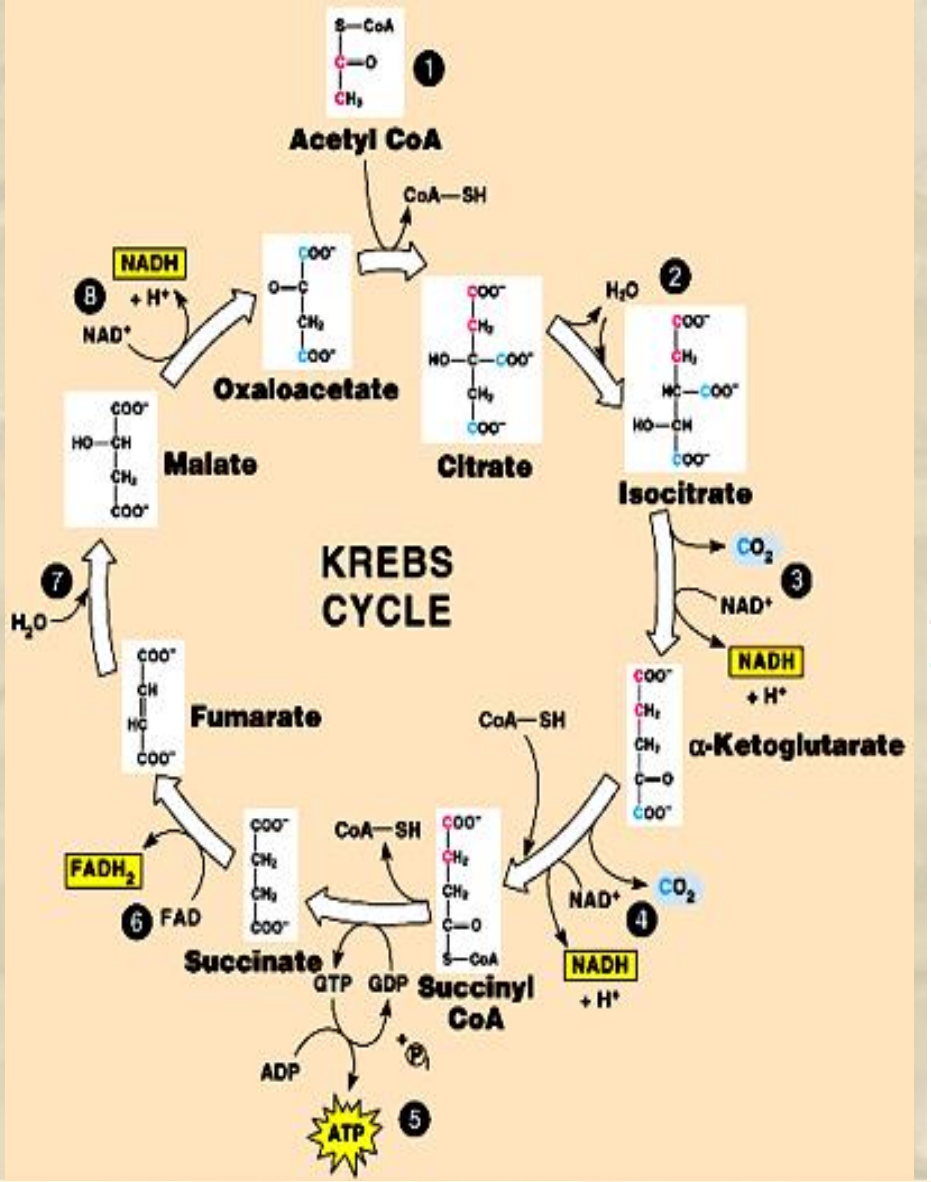
2 Microaerophiles

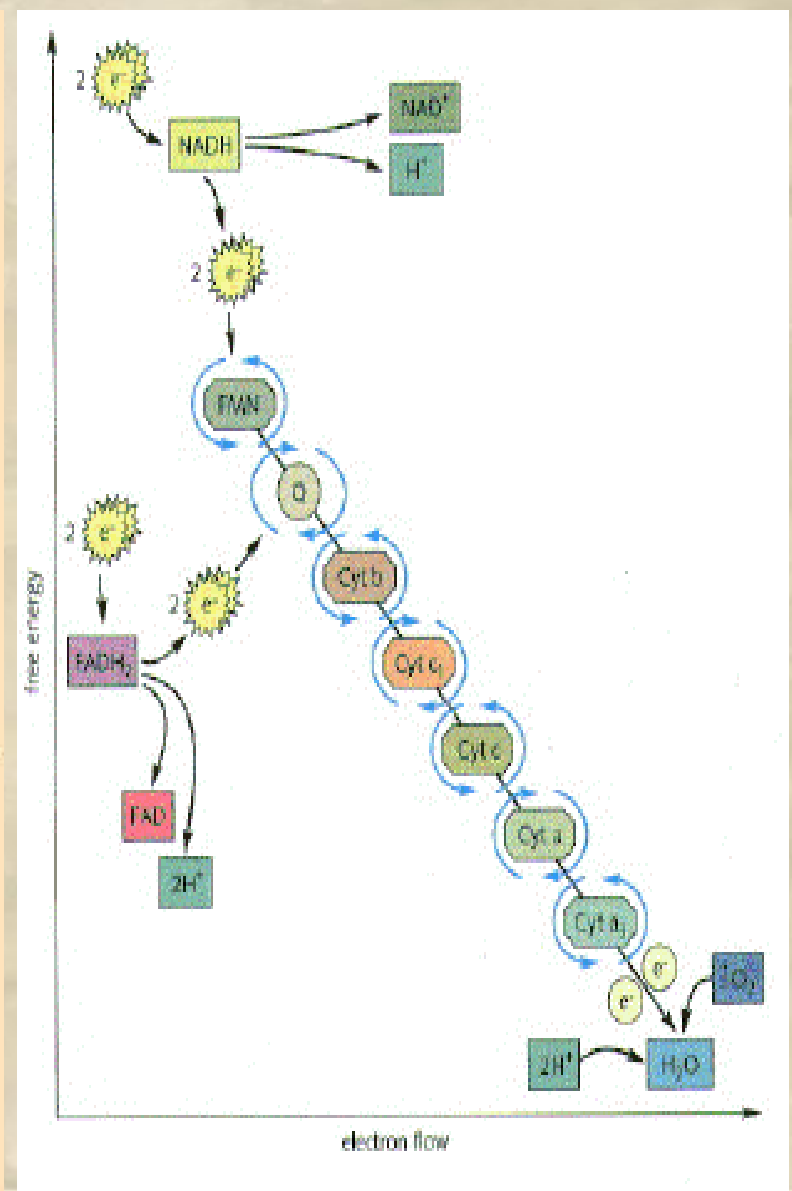


10%CO_2

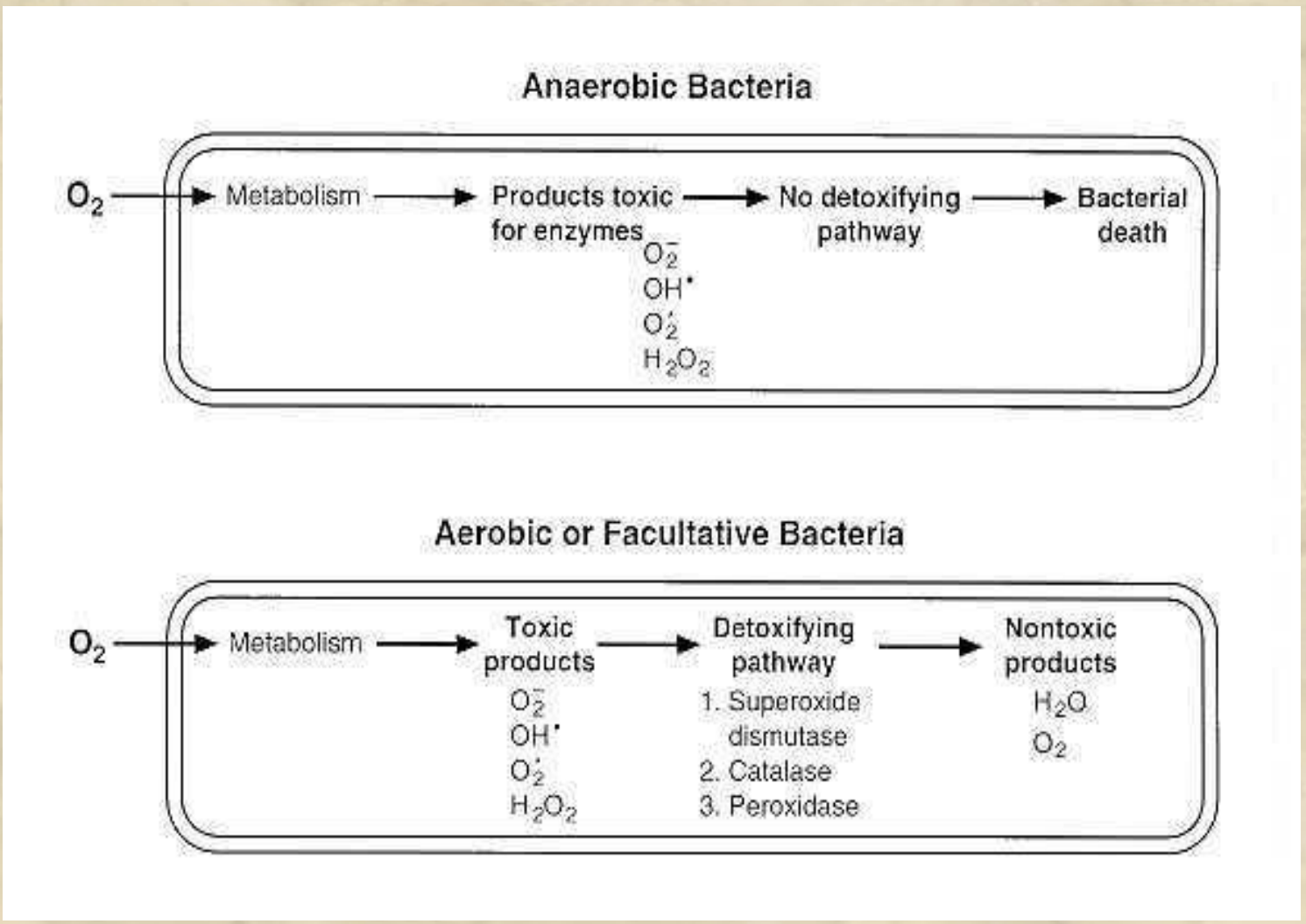
6 %oxygen

3 Obligate aerobes

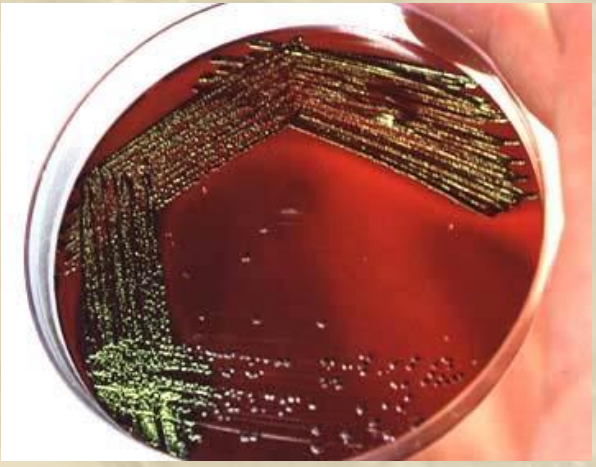




4 Facultative anerobes



Redox indicators

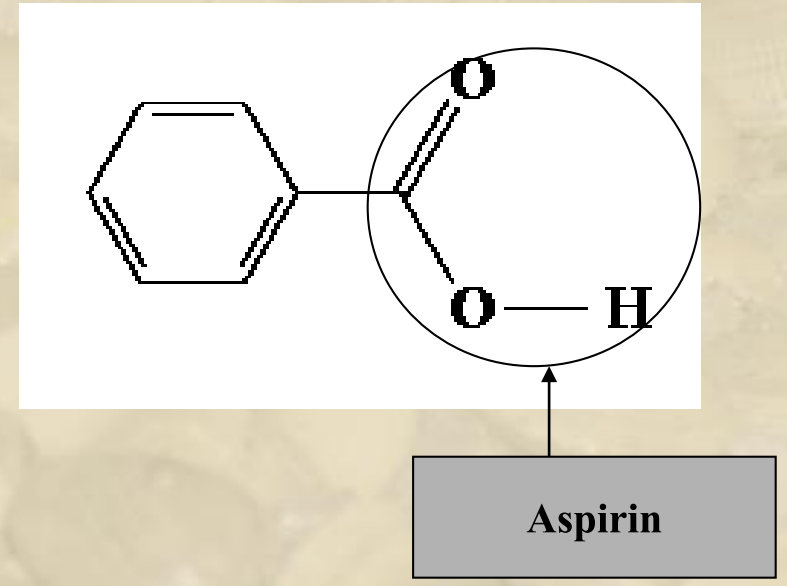


$MeB + 2H^+ + 2e^-$	⟶	$MeBH_2$
Oxidized (blue)		Reduced (Colourless)

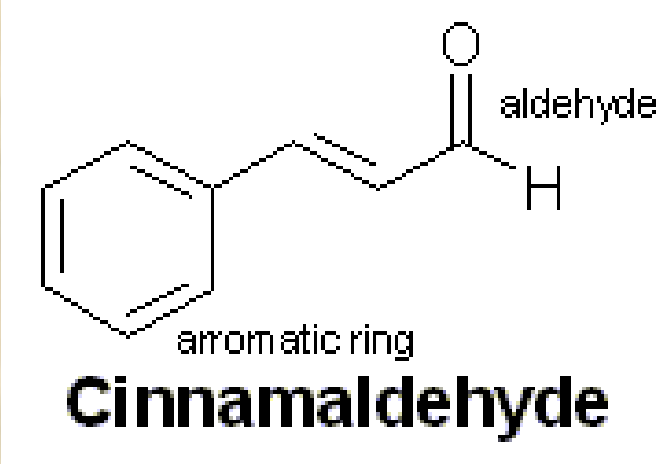
- หากมีค่า Eh ต่ำจะเหมาะกับการเจริญของพวก anaerobic
- สามารถใช้ dry reduction ในการทดสอบคุณภาพของนมได้

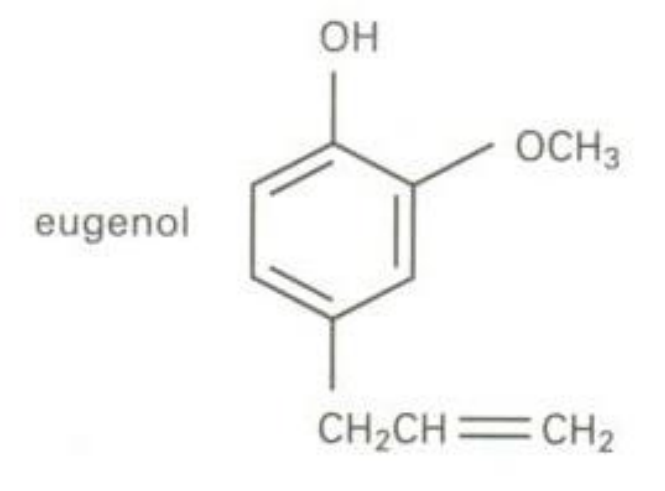
1.4 สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

- สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์สามารถพบได้ในเซลล์ของพืช เช่น pigments, alkaloides, resins
- Benzoic และ sorbic acid พบในต้น cranberries สามารถนำมาสกัดให้อยู่ในรูปบริสุทธิ์และใช้เป็นสารกันบูดได้



- น้ำมันหอมระเหยยังเป็นสารกันบูดทางธรรมชาติ เช่น cinnamic aldehyde, thymol, eugenol เป็นต้น





1.5 ค่า Aw

- **เป็นปริมาณน้ำที่มีอยู่ในอาหาร ซึ่งเชื้อจุลินทรีย์สามารถใช้น้ำเพื่อดูดซึมแร่ธาตุ**
- **สูตรการคำนวณ**

$$a_w = \frac{n}{(N+n)}$$

n= จำนวนโมลของสารละลาย,

N=จำนวนโมลของตัวทำละลาย

หรือเขียนสูตรใหม่คือ

$$a_w = \frac{w/m}{(w/m+w/m)}$$

w =น้ำหนัก

m=มวลโมเลกุล

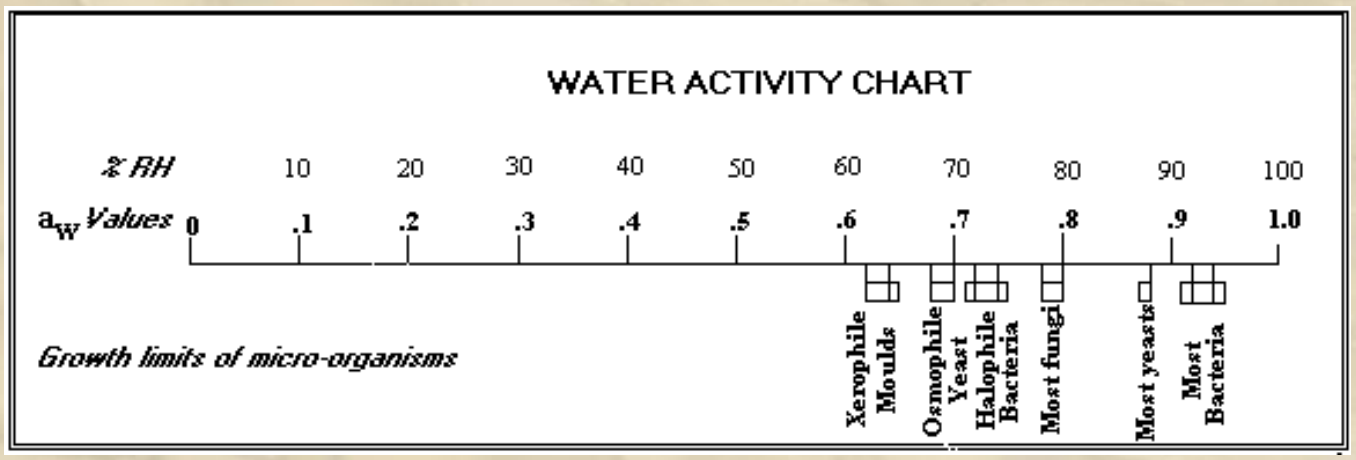
ตัวอย่างการคำนวณ

- สารละลายซูโครสที่มีน้ำตาล 5 กรัมละลายในน้ำ 100 มิลลิลิตรมีค่า a_w=?

*a_w = vapour pressure of a substance or solution (P)

vapour pressure of water at the same temperature

- ค่า a_w ในอาหารมีความสัมพันธ์กับสารที่เติมลงไปในอาหารด้วย เช่น การเติมเกลือ น้ำตาล กรดอะมิโนลงในอาหารทำให้ค่า a_w ในอาหารลดลง



สารที่ทำหน้าที่ในการลดปริมาณน้ำในอาหาร

1 เกลือ เกลืออิ่มตัว 27 %W/W ทำให้ได้ค่า a_w อย่างน้อย 0.74

2 น้ำตาลซูโคส น้ำตาลซูโคสอิ่มตัวที่ 67% W/W ทำให้ได้ค่า a_w อย่างน้อย 0.86

3 น้ำตาลกลูโคส น้ำตาลกลูโคสอิ่มตัวที่ 47% W/W ทำให้ได้ค่า a_w อย่างน้อย 0.92

หากเติมเกลือลงในอาหารเพื่อจุดประสงค์ในการทำเค็มหรือเติมน้ำตาลปริมาณมากในอาหารเพื่อทำของหวาน จึงเป็นการลดปริมาณน้ำในอาหาร ซึ่งการลดปริมาณน้ำในอาหารอาจใช้วิธีการทางกายภาพ การอบแห้ง ฯลฯ อีกด้วย

เชื้อจุลินทรีย์ที่อาจพบได้ในอาหารที่มีน้ำตาลและเกลือเป็นส่วนผสม

-กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในอาหารที่มีเกลือเป็นส่วนผสม

*พวก Moderate halophiles เป็นพวกที่ต้องการเกลือประมาณ 1-10 % เช่น *Vibrio parahaemolyticus*

* พวก Extreme halophiles เป็นพวกที่ทนเกลือได้สูงเช่น *Halobacterium* สามารถทนเกลือได้ถึง 12-36%

* Halotolerant (haloduric) organisms เช่น *Staphylococcus aureus* สามารถเจริญได้เกลือ 20% (a_w~0.83) แต่ค่า optimum ~ 0.5-4%

-กลุ่มเชื้อจุลินทรีย์ที่พบได้ในอาหารที่มีน้ำตาลเป็นส่วนผสม

***Osmophilic yeasts สามารถเจริญในน้ำตาลสูงๆแต่จะไม่เจริญหากมีค่า a_w ต่ำๆ เช่น *Zygosaccharomyces rouxii* ที่เจริญในน้ำตาล 70% แต่ไม่เจริญใน a_w ต่ำกว่า 0.62**

Osmotolerant organisms เป็นพวกที่เจริญได้ดีที่ค่า a_w สูง และมีน้ำตาลในปริมาณสูง เช่น *Saccharomyces cerevisiae

ความสัมพันธ์ระหว่างเชื้อจุลินทรีย์กับค่า a_w

Organism	aw limit
G- bacteria	
-Escherichia coli	0.95
-Klebsiella pneumoniae	0.95
-Pseudomonas aeruginosa	0.97
-Salmonella typhimurium	0.95
G+ bacteria	
-Bacillus subtilis	0.90
-Staphylococcus aureus	0.85
Yeasts	
-Saccharomyces cerevisiae	0.92
-Debaryomyces hansenii	0.65-0.75
Moulds	
-Mucor hiemalis	0.90-0.75
-Penicillium chrysogenum	0.80
-Xeromyces bisporus	0.61-0.75
-Aspergillus chevalieri	0.61-0.75

*เชื้อจุลินทรีย์ที่เจริญในช่วง a_w ที่ไม่เหมาะสมจะทำให้เกิดความผิดปกติในการแบ่งตัว, เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย, เอ็นไซม์ใน membranes และ cytoplasm ถูกทำลาย

ชนิดของอาหารแบ่งตามค่า a_w

1 High moisture food (a_w=0.99-0.90) อาหารสดที่มีสารที่เติมลงไปต่ำ เช่น ไก่สด, ผลไม้, นม, น้ำผลไม้ ส่วนมากจะเสื่อมเสียได้จากแบคทีเรียแกรมลบ, ราบางกลุ่ม

3 Intermediate moisture food (IMF) (a_w=0.89-0.61) เป็นอาหารที่มีการเติมเกลือหรือน้ำตาลลงไปเพื่อรักษาไม่ให้อาหารเสื่อมเสียได้เร็ว เช่นทุเรียนกวน, ปลาเค็ม, เค้ก การเสื่อมเสียส่วนมากเกิดจากเชื้อรา

4 Low moisture food ซึ่งมีค่า a_w ต่ำกว่า 0.61 เช่น บิสกิต, ช็อกโกแลต

ชนิดของปัจจัย

1 ปัจจัยภายใน (intrinsic factors)

1.1 สารอาหาร

1.2 ค่า pH

1.3 ค่า Eh

1.4 สารยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์

1.5 ค่า aw

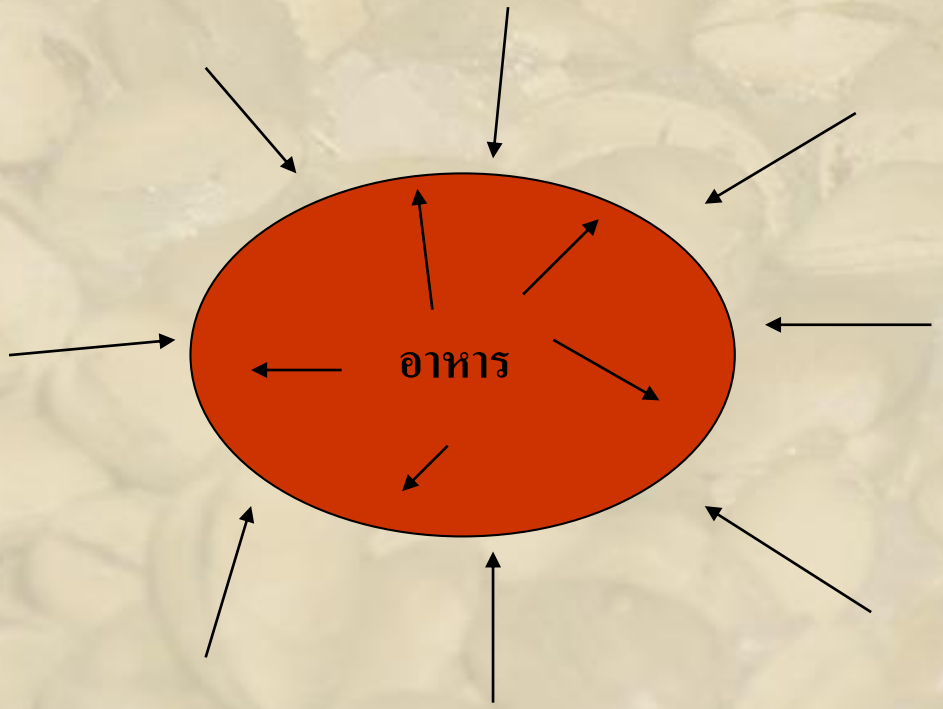
2 ปัจจัยภายนอก (Extrinsic factors)

2.1 ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (%RH)

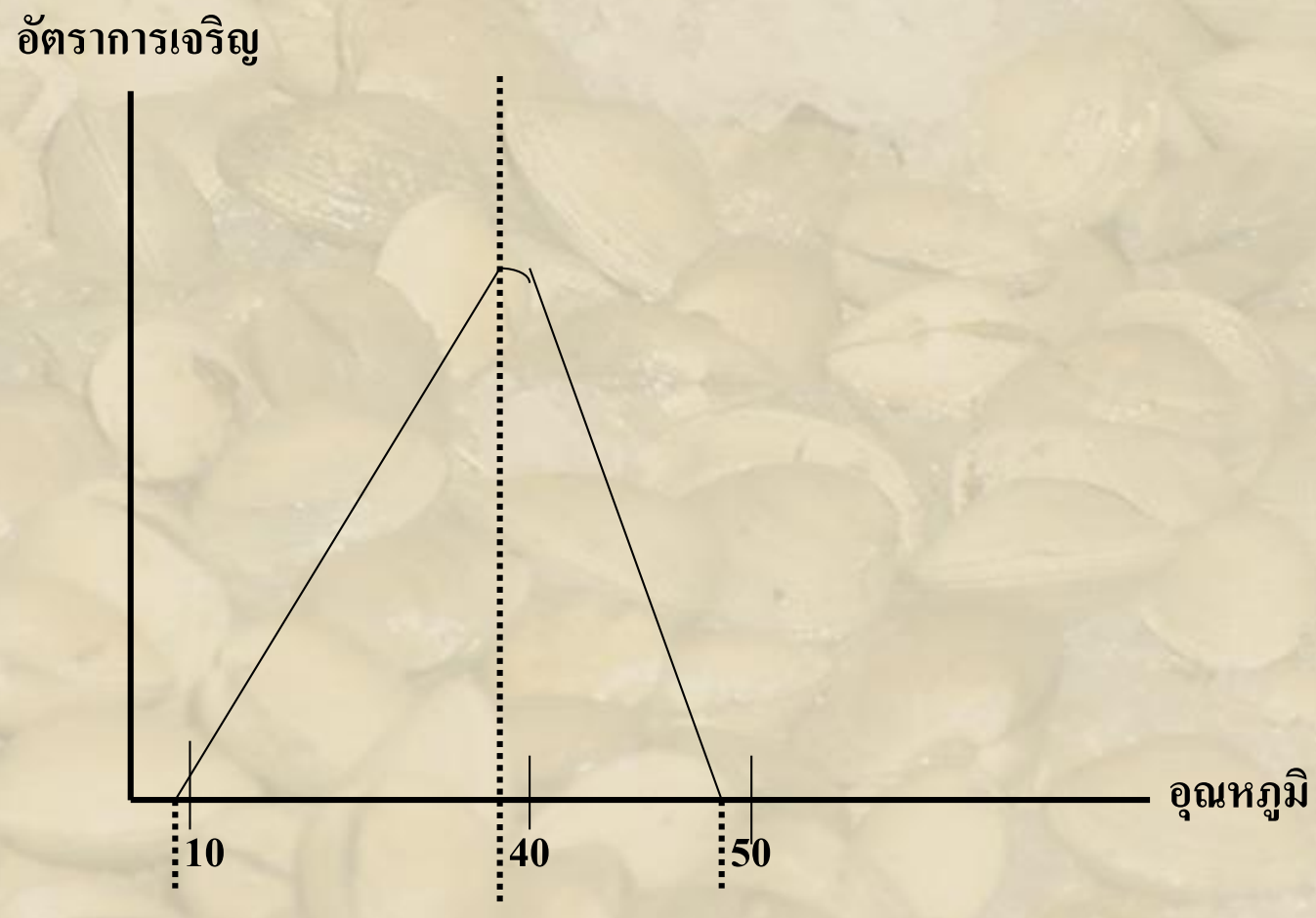
2.2 อุณหภูมิ (Temperature)

2.ปัจจัยภายนอก

2.1 ค่าความชื้นสัมพัทธ์ (%RH) เมื่อวางอาหารไว้ในบรรยากาศจะเกิดการถ่ายเทความชื้นระหว่างอาหารและอากาศจนเกิดความสมดุล (Equilibrium)



2.2 อุณหภูมิ



การแบ่งชนิดของเชื้อตามอุณหภูมิ

1 Mesophiles เป็นกลุ่มที่สามารถอาศัยในมนุษย์ สัตว์เลือดอุ่น โดยอุณหภูมิที่เหมาะสมคือ 37 องศาเซลเซียส เช่น *Staphylococcus aureus*

2 Obligate psychrophiles (cold loving) เป็นพวกที่อาศัยในมหาสมุทร arctic และ antarctic ซึ่งสามารถทนความเย็นระหว่าง 0, 1-5 องศาเซลเซียส

3 Psychrotrophs เป็นกลุ่มของเชื้อที่พบในน้ำและดิน เป็นพวกที่ทนอากาศเลวร้ายได้ เช่น *Pseudomonas fragil* ทนอุณหภูมิได้ -10 องศาเซลเซียสและเป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดการเสื่อมเสียกับอาหารที่แช่เย็น (-1 ถึง 5 องศาเซลเซียส) เช่น *Listeria monocytogenes*, *Clostridium botulinum* type E

4 Thermophiles พบเชื้อได้ในอุณหภูมิสูงประมาณ 70 องศาเซลเซียส หรือในน้ำร้อน พวกที่ทนความร้อนได้สูงและทำให้อาหารเน่าเสีย เช่น *Bacillus stearothermophilus, Clostridium thermosaccharolyticum*