การเพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

(Bacterial Culture Bacterial culture media)

I. ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย
II. วิธีการในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรีย
III. ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cultural Characteristics)
IV. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Culture Media)
V. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ(Preparation of the Culture Media)
VI. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)

ในการศึกษาเรื่องแบคทีเรียทางห้องปฏิบัติการมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่จะต้องมีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมขึ้น โดยมีการควบคุมสภาวะของการเพาะเลี้ยงให้เป็นไปตามธรรมชาติของแบคทีเรียแต่ละชนิดให้มากที่สุด ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการเรียนรู้ความต้องการต่าง ๆ ของแบคทีเรียตามธรรมชาติ และนำมาศึกษาถึงวิธีการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียภายในห้องปฏิบัติการ

I. ความต้องการสารอาหารของแบคทีเรีย

แบคทีเรียต้องการสารอาหารเพื่อให้ในการเจริญเติบโตดังต่อไปนี้

1. พลังงาน (Energy)

- แหล่งพลังงานจากแสง แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากแสงเรียกว่า Phototroph
- แหล่งพลังงานจากกระบวนการออกซิเดชั่น (Oxidation) ของสารเคมี แบคทีเรียที่ได้พลังงานจากกระบวนการออกซิเดชั่นเรียก Chemotroph

2. แหล่งคาร์บอน (Carbon Sources)

แหล่งคาร์บอนอยู่ในรูปของคาร์บอนไดออกไซด์และสารอินทรีย์ แบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอนินทรีย์ สามารถเปลี่ยนคาร์บอนไดออกไซด์เป็นคาร์โบไฮเดรต เรียกว่า Autotroph ถ้าได้พลังงานจากแสงอาทตย์ด้วยเรียกว่า Photoautotroph ถ้าได้พลังงานจากการออกซิเดชั่นของสารเคมีด้วยเรียก Chemoautotroph ส่วนแบคทีเรียที่ต้องการสารอาหารในรูปของสารอินทรีย์ เรียก Heterotroph

3. แหล่งของอิเล็กตรอน (Electron Sources)

แบคทีเรียต้องการอิเล็กตรอนเพื่อใช้ในกระบวนการเมตาบอลิซึม พวกที่ใช้สารอนินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเรียก Lithotroph ส่วนพวกที่ใช้สารอินทรีย์เป็นแหล่งอิเล็กตรอนเรียก Organotroph

3. แหล่งไนโตรเจน (Nitrogen sources)

แหล่งของไนโตรเจนมีทั้งสารอินทรีย์และอนินทรีย์ แหล่งที่เป็นสารอินทรีย์ เช่น กรดอะมิโน เพปไทด์ โปรตีน แหล่งที่เป็นสารอนินทรีย์ เช่น เกลือไนไตรท์ ไนเตรต หรือแอมโมเนียม

4. แหล่งของออกซิเจน ซัลเฟอร์ และฟอสฟอรัส

ออกซิเจนได้มาจากหลายแหล่ง เช่น น้ำ และสารอาหาร

แหล่งของซัลเฟอร์อาจอยู่ในรูปของสารอินทรีย์ หรือสารอนินทรีย์ ซัลเฟอร์มีความจำเป็นในการสังเคราะห์กรดอะมิโนบางชนิด

แหล่งของฟอสเฟตอาจอยู่ในรูปของ ฟอสเฟตที่เป็นองค์ประกอบของกรดนิวคลีอิค นิวคลีโอไทด์ ฟอสโฟลิปิด กรดไทโคอิก และสารอื่น ๆ

5. ไอออนของโลหะหนัก

ไอออนของโลหะหนักมีความจำเป็นต่อการเจริญตามปรกติของแบคทีเรีย เช่น K^{+}, Mg^{2+}, Ca^{2+}, Fe^{2+} เป็นต้น ซึ่งบางชนิดจัดเป็น Co facter ที่สำคัญของเอนไซม์ต่าง ๆ

6. วิตามิน

แบคทีเรียต้องการวิตามินในปริมาณน้อย แต่วิตามินมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและการเจริญเติบโตมาก โดยทำหน้าที่เป็นโคเอนไซม์ในปฏิกิริยาต่าง ๆ แบคทีเรียบางชนิดสามารถสังเคราะห์วิตามินได้จากอาหารเลี้ยงเชื้อ

II. วิธีการในการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียบนอาหารเลี้ยงเชื้อ

การเพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อส่วนใหญ่ทำเพื่อการแยกเชื้อให้บริสุทธิ์ ที่เรียกว่า Pure Culture ซึ่งหมายถึงกลุ่มของแบคทีเรียที่มีลักษณะเหมือนกันทุกประการ หรืออาจทำเพื่อการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย (Colony count) การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียสามารถทำได้หลายวิธีดังนี้

1. การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อ (Streak Plate)

การขีดเชื้อในจานเพาะเชื้อคือ การทำให้เชื้อที่มีปริมาณมากค่อย ๆ กระจายออกจนแยกเป็นโคโลนี (Colony) เดี่ยว ๆ ซึ่งแต่ละโคโลนีจะเจริญมาจากเซลล์เดี่ยวจึงถือเป็นเชื้อที่บริสุทธิ์โดยใช้

วิธีการในการขีดเชื้อแบบ Four - way cross Streak

ใช้ Loop เผาไฟแล้วรอให้เย็นแล้วแตะเชื้อมาขีดบนอาหารแข็ง (Solid Media) ตามแนว **ดังรูปที่ 1** โดยในการขีดทุกแนวควรเปลี่ยน Loop ที่ใช้ หรือมีการเผาไฟทุกครั้งเพื่อฆ่าเชื้อที่มากเกินไป เชื้อจะหนาแน่นมากที่รอยขีดแรกแล้วค่อย ๆ หนาแน่นน้อยลงในรอยขีดท้าย ๆ จนแต่ละเซลล์ออกจากกันได้ หลังจากที่นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสมกับเชื้อ แต่ละเซลล์นั้นจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ ขั้นตอนในการขีดเชื้อแสดงในรูปที่ 2

รูปที่ 1 แสดงขั้นตอนในการ Streak Plate (Quinn et al., 1994)

รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนในการ Streak Plate (นงลักษณ์ และปรีชา, 2541)

2. การทำให้เชื้อกระจายบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Spread Plate)

ทำได้โดยการใช้แท่งแก้วงอที่ทำการฆ่าเชื้อด้วยวิธีเผาไฟแล้ว เกลี่ยเชื้อที่ทำเป็นสารละลายไว้ใส่ลงบนอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อเป็นการทำให้เซลล์แยกออกจากกัน หลังจากนำไปบ่มเชื้อจะแยกเป็นโคโลนีเดี่ยว ๆ วิธีการนี้ส่วนใหญ่เป็นวิธีการทำให้เชื้อแยกเป็นโคโลนีที่บริสุทธิ์เพื่อการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรีย การทำ spread plate แสดงในรูปที่ 3 การเกลี่ยเชื้ออาจใช้วิธีหมุนเกลี่ยเชื้อบนพื้น หรือใช้เครื่องมือในการหมุนเพลท (petri dish turnable) (รูปที่ 4)

รูปที่ 3 แสดงขั้นตอนในการ Spread Plate (นงลักษณ์ และปรีชา , 2541)

รูปที่ 4 แสดง Petri dish turnable (Cappuccino & Sherman , 1992)

การทำให้เชื้อแบคทีเรียบริสุทธิ์โดยวิธีเทเพลท (Pour-plate Technique)

คือ การเทอาหารวุ้นที่หลอมเหลวแล้วผสมเข้ากับเชื้อในจานเพาะเชื้อ (รูปที่ 5) แล้วทิ้งไว้ให้อาหารแข็งที่อุณหภูมิประมาณ 45 °C เชื้อที่จะนำมาผสมจะต้องทำการละลายในสารละลายแล้วทำให้เจือจางลงตามลำดับ (Serial dilution) ส่วนใหญ่จะใช้วิธีการเจือจางที่เรียกว่า Ten fold Dilution (รูปที่ 6) จากนั้นนำเชื้อที่ละลายแล้วจากแต่ละหลอดมาเทผสมเข้ากับอาหารเลี้ยงเชื้อในจานเพาะเชื้อ แก่วงจานเพาะเชื้อเบา ๆ เพื่อให้เชื้อกระจายตัว แล้วรอจนอาหารเลี้ยงเชื้อแข็งดีแล้วจึงนำไปบ่ม (Incubate ที่อุณหภูมิและเวลาที่เหมาะสม วิธีนี้ส่วนใหญ่ทำเพื่อต้องการนับจำนวนโคโลนีของแบคทีเรียเช่นเดียวกันกับวิธี Spread plate

รูปที่ 5 แสดงเทคนิคการเทเพลท (Pour-Plate) (Cappuccino & Sherman , 1992)

รูปที่ 6 แสดงวิธีการในการเจือจางเชื้อ (Serial Dilution) (Cappuccino & Sherman, 1992)

III. ลักษณะการเจริญของแบคทีเรียในอาหารเลี้ยงเชื้อ (cultural characteristics)

ลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (รูปที่ 7) สามารถใช้เป็นหลักในการจำแนกแบคทีเรียได้ เพราะลักษณะการเจริญบนอาหารเลี้ยงเชื้อจะเป็นลักษณะเฉพาะของแบคทีเรียแต่ละชนิด ลักษณะการเจริญของเชื้อในอาหารแบ่งเป็น การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง การเจริญของเชื้อในอาหารเหลว และการเจริญของเชื้อในอาหารวุ้นเอียง

1. การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็ง (solid media)

การเจริญของเชื้อบนอาหารแข็งต้องดูลักษณะดังต่อไปนี้

1.1 ขนาดของโคโลนี (Colony Size)

1.2 รูปร่างของโคโลนี (Colony form)

- Punctiform โคโลนีมีขนาดเล็กมาก เส้นผ่านศูนย์กลางน้อยกว่า 1 มิลลิเมตร
- Circular โคโลนีกลม
- Filamentous โคโลนีประกอบด้วยเส้นสายพันกันแน่น
- Irregular โคโลนีรูปร่างไม่แน่นอน
- Rhizoid โคโลนีมีการแตกกิ่งก้านไม่แน่นอนและมีลักษณะคล้ายราก

1.3 ขอบหรือริมของโคโลนี (Colony margin or Colony edge)

- Entire ขอบโคโลนีเรียบ
- Undulate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าเล็กน้อย
- Lobate ขอบโคโลนีเป็นคลื่นโค้งเว้าและยื่นมาก
- Erose ขอบโคโลนีเป็นหยักเป็นซี่ไม่สม่ำเสมอ
- Filamentous ขอบของโคโลนีเป็นเส้นสายยาวไม่แน่นอน
- Curled ขอบของโคโลนีเป็นเส้นซ้อนกันเป็นคลื่นและหยักในลักษณะที่ขนานกัน

1.4 พื้นผิวของโคโลนี (Surface Texture)

- Smooth พื้นผิวของโคโลนีเรียบ
- Rough พื้นผิวของโคโลนีขรุขระ
- Mucoid พื้นผิวของโคโลนีเป็นเมือกเยิ้ม

1.5 ความสูงของโคโลนี (Elevation)

- Flat โคโลนีแบนราบ
- Raised โคโลนีมีความหนาสูงขึ้นมาจากผิวหน้าของอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Convex โคโลนีนูนโค้งจากผวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อเล็กน้อย
- Pulvinate โคโลนีนูนโค้งขึ้นมาจากผิวหน้าอาหารเลี้ยงเชื้อมาก

1.6 ความหนืดของโคโลนี (Consistency)

- Butyrous ความหนืดคล้ายเนยเหลว
- Stringy โคโลนีมีความหนืดมากจนเป็นเส้นสายขณะใช้เข็มเขี่ยแตะขึ้นมา
- Rubbery โคโลนีจะเหนียวจนหลุดออกจากผิวหน้าอาหารเมื่อใช้เข็มเขี่ยแตะขึ้นมา

1.7 ความขุ่น (Optical Feathures)

- Transparency โคโลนีใส
- Translucent โคโลนีใสโปร่งแสง
- Opaque โคโลนีขุ่น

1.8 การสร้างสารสีหรือรงควัตถุ (Chromogenesis or Pigmentation) เช่น Pyoverdin ที่เรืองแสงได้จาก *Pseudomonas aeruginosa*

2. การเจริญของเชื้อในอาหารเหลว (Broth Media)

2.1 ปริมาณการเจริญเติบโต

2.2 ชนิดของการเจริญและการกระจาย

- การเจริญใต้ผิวหน้าอาหาร

  Turbid ขุ่นและเป็นตะกอน Granular ประกอบด้วยแกรนูลเล็กๆ จำนวนมาก

- เจริญเฉพาะที่ผิวหน้าของอาหาร

  Ring เจริญเป็นวงรอบติดอยู่ที่ขอบหลอดทดลอง

  Pellicle เจริญเป็นแผ่นลอยอยู่ที่ผิวหน้าอาหาร

  Flocculent แบคทีเรียเจริญเกาะกันเป็นก้อนอยู่ที่ผิวหน้าอาหาร

- เจริญมากที่ก้นหลอดทดลองหรือตกตะกอนที่ก้นหลอดทดลอง

  Granular ตะกอนเป็นแกรนูลละเอียด Flocculent ตะกอนเป็นกลุ่มก้อน

  Viscid ตะกอนเป็นเยื่อเหนียว Flaky ตะกอนเป็นแผ่นแยกจากกัน

3. การเจริญของเชื้อในอาหารวุ้นเอียง (Agar Slant)

3.1 ปริมาณเชื้อที่ขึ้น

3.2 รูปร่างการเจริญ

- Filiform การเจริญสม่ำเสมอตามรอยขีดเชื้อ
- Echinulate การเจริญมีรอยหยักที่ขอบคล้ายฟันเลื่อย
- Beaded การเจริญไม่สม่ำเสมอและแยกจากแนวที่ขีดเชื้อ
- Arborescent การเจริญแตกกิ่งก้านคล้ายต้นไม้
- Rhizoid การเจริญแตกกิ่งก้านคล้ายราก
- Effuse เจริญน้อยและกระจัดกระจาย

รูปที่ 7 แสดงลักษณะการเจริญของเชื้อบนอาหารเลี้ยงเชื้อ (Cappuccino & Sherman , 1992)

IV. อาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย (Bacterial Culture Media)

ในการศึกษาแบคทีเรียสิ่งที่ขาดมิได้คือ อาหารเลี้ยงเชื้อ ซึ่งมีประโยชน์ในการใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียเพื่อนำมาศึกษาในด้านต่างๆได้แก่

1. การแยกและวินิจฉัยแบคทีเรีย
2. การทดสอบความปลอดเชื้อ (Sterility test)
3. การวิเคราะห์น้ำและอาหาร
4. การควบคุมสภาวะแวดล้อม
5. การผลิตชีวภัณฑ์ต่าง ๆ เช่น toxoid และวัคซีนเป็นต้น
6. การวิเคราะห์ยาปฏิชีวนะและวิตามิน

แบคทีเรียชนิดก่อโรค (Pathogen) ส่วนมากสามารถเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลองได้โดยใช้อาหารที่มนุษย์ปรุงขึ้น (Artificial Media) ยกเว้นแบคทีเรียที่เจริญยาก (Fastidious Bacteria)บางชนิดเท่านั้นที่ไม่สามารถเลี้ยงในหลอดทดลองได้ เช่น *Mycobacterium laprae* อาหารเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปต้องประกอบด้วยสารอาหารที่จำเป็น ได้แก่ แหล่งของไนโตรเจน คาร์บอน เกลือแร่ และวิตามิน รวมทั้งน้ำ และ Growth factor ต่าง ๆ ในปริมาณที่เหมาะสม นอกจากนั้นความเป็นกรด - ด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อต้องเหมาะสมต่อ Metabolism ของแบคทีเรียที่ต้องการเพาะเลี้ยงด้วย อีกประการหนึ่งที่สำคัญคือ อาหารเลี้ยงเชื้อนั้นต้องปราศจากเชื้อ (Sterilized) ก่อนที่จะทำการเพาะเลี้ยงเชื้อ

แบคทีเรียชนิดก่อโรคเป็นพวก heterotrophic microorganism ซึ่งมีความสารถในการสังเคราะห์อาหารจำกัดจึงต้องการอาหารซึ่งซับซ้อนขึ้น เช่น complex nitrogen compound ดังนั้นจึงมักใช้อาหารซึ่งเป็นแหล่งของโปรตีนในธรรมชาติ (crude natural protein source) แต่ว่าแบคทีเรียไม่สามารถใช้โปรตีนนี้ได้โดยตรงแต่ต้องทำให้อยู่ในรูปซึ่งสามารถนำไปใช้ได้เสียก่อน โดยการย่อยโปรตีนเหล่านี้ด้วยกรด ด่าง หรือ เอ็นไซม์ต่างๆ โปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้วนี้ (protein hydrolysates) โดยส่วนใหญ่เรียกว่า peptones ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ง่ายและประกอบด้วย Polypeptidase ตลอดจน amino acids ในปริมาณต่างๆ กันซึ่งสารเหล่านี้แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ทันที แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณ Polypeptidase และ amino acids ใน peptones แต่ละชนิดและจากแต่ละบริษัทจะไม่เหมือนกัน

ความต้องการอาหารชนิดต่างๆ ของพวก heterotrophic bacteria จะแตกต่างกันไป ดังนั้นจึงต้องมี peptones หลายชนิดเพื่อใช้งานต่าง ๆ กัน และมีสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อมากมาย ทั้งนี้เพื่อให้เหมาะสมในการเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียแต่ละชนิดหรือแต่ละกลุ่ม ปัจจุบันมีอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (dehydrated media) มากมายหลายชนิดซึ่งสามารถเก็บไว้ได้นานพอสมควรอีกทั้งยังสะดวกในการเตรียมอีกด้วย

ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้อแบบธรรมดา (Basic nutrient Media)

1. Peptones : ดังได้กล่าวในตอนต้นแล้ว Peptone คือโปรตีนซึ่งถูกย่อยแล้ว เป็น Amino acid และ Simple Nitrogenous conpounds อาจโดยใช้กรด ด่าง หรือ เอ็นไซม์ คุณสมบัติของ peptones จะขึ้นอยู่กับความบริสุทธิ์ของคุณภาพโปรตีนที่ใช้และวิธีการย่อยโปรตีน (ด้วยกรด ด่าง หรือ เอ็นไซม์) การย่อยด้วยกรดหรือด่าง จะทำลายวิตามินและ Amino acids บางส่วนในโปรตีนไป ซึ่งผิดกับการย่อยด้วยเอ็นไซม์ โปรตีนซึ่งใช้ในการผลิต Peptones มีหลายชนิด เช่น Casein (โปรตีนในน้ำนม) Gelatin เนื้อ ถั่วเหลือง และ Yeast cells เป็นต้น Peptones เป็นส่วนประกอบหลักใหญ่ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่แบคทีเรียต้องการมากสำหรับการเจริญเติบโต

2. Infusion และ Extracts : เป็นสารสะกัดจากเซลล์ต่างๆ ทั้งจากจุลชีพ (เช่น Yeast Extract ซึ่งความเป็นจริงถือว่าเป็น Peptone ชนิดหนึ่ง) เนื้อเยื่อจากพืช (เช่น Malt Extract) และจากสัตว์ (เช่น Beef Extract Brain- Heart infusion) เป็นสิ่งที่ใช้แทน Peptones ก่อนที่จะมีการคิดค้นการผลิต Peptones ขึ้นมาใช้งาน ซึ่งในปัจจุบันก็ยังคงใช้อยู่ ในอาหารเลี้ยงเชื้อหลายชนิด Infusion และ extract นี้เป็นสารสกัดซึ่งมีส่วนประกอบไม่แน่นอนและไม่ชัดเจน โดยเป็นสารผสมระหว่างโปรตีน Polypeptides, aminoacids คาร์โบไฮเดรต รวมถึงวิตามิน และ Growth factors หลายชนิด

3. Solidifying agents : เป็นสารซึ่งใส่ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้อาหรชนิดนั้นๆ แข็งตัวและกลายเป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดแข็ง สารพวกนี้ได้แก่ วุ้น (Agar) , Gelatin , Silica gel และ Polyacrylic gels แต่ที่นิยมใช้มากที่สุดคือ วุ้น ซึ่งเป็น Polysacharides ที่ได้จากการสกัดสาหร่ายสีแดง (Rhodophyceae) วุ้นที่ดีควรสะอาดปราศจากฝุ่นผงต่างๆ ละลายที่ 80 °C เมื่อเตรียมวุ้นความเข้มข้น 2% ในน้ำ (น้ำหนัก / ปริมาตร) แล้วทิ้งให้แข็งตัว สิ่งที่ได้ควรจะใสหรือหากขุ่นก็เพียงเล็กน้อย ส่วน Solidifying Agents อื่นๆ นั้นไม่ค่อยมีผู้นิยม

4. Indicators : ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมักจะมี Indicators 2 ประเภทคือ

4.1 Indicators เพื่อบอกสภาวะความเป็นกรดด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งได้แก่ Phenol red, Bromothymol Blue, Bromocresol Purple, Neutral red, litmus, andrade's indicator เป็นต้น

4.2 Indicators เพื่อบอกสภาวะ Oxidation- reduction potential (Eh) ของอาหารเลี้ยงเชื้อ เช่น Methylene Blue และ Resazurin เป็นต้น

5. เกลือ (Salt ;NaCl) ใช้เติมลงไปเพื่อปรับปริมาณ Osmotic pressure ของอาหารเลี้ยงเชื้อให้เป็น Isotonic สำหรับเซลล์แบคทีเรีย หรือเพื่อปรับความเข้มข้นของเกลือของอาหารเลี้ยงเชื่อให้เป็นไปตามที่แบคทีเรียต้องการ

6. Dextrose ใช้เพื่อเป็นแหล่งของ Carbon และพลังงานแก่แบคทีเรีย

7. น้ำ ใช้เพื่อทำให้ส่วนประกอบของอาหารเลี้ยงเชื้ออยู่ในรูปของสารละลายที่แบคทีเรียสามารถนำไปใช้ได้ ส่วนใหญ่จะใช้น้ำกลั่น (distilled water)

8. Selective agent : เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้เท่านั้น โดยแบคทีเรียชนิดอื่นๆ จะถูกยับยั้งไม่ให้เจริญ การใส่ selective agent ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อนี้ จะมีประโยชน์ในการแยกเชื้อซึ่งเป็นตัวก่อโรคออกจากเชื้อที่ไม่ก่อโรค selective agents ที่ใช้กันมีหลายชนิดได้แก่ สีย้อมบางชนิด เช่น crystal violet และ brilliant green (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียพวกแกรมบวก) sodium chloride (ใช้ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียชนิดอื่นๆ นอกเหนือจาก *Staphylococcus spp.* เนื่องจากไม่สามารถทนเกลือได้ในปริมาณสูงๆ เหมือน *Staphylococcus spp.*), sodium azide, sodium citrate , sodium tellurite, sodium lauryl sulfate, sodium Selenite, iodine, phenylethanol และยาปฏิชีวนะต่างๆ เป็นต้น นอกจากนั้นการปรับความเป็นกรดหรือด่างของอาหารเลี้ยงเชื้อให้ต่ำกว่าปรกติ (เช่น pH 5.6 ใน abouraud dextrose agar) หรือสูงกว่าปรกติ (เช่น pH 8.8-9.0 ใน alkaline peptone water สำหรับแยกเชื้อ *Vibrio cholerae*) ก็สามารถใช้เป็น Selective Character ของอาหารเลี้ยงเชื้อได้

9. Reducing agent ; เป็นสารเคมีซึ่งเติมลงในอาหารเลี้ยงเชื้อเพื่อช่วยส่งเสริมให้เกิดภาวะไร้ออกซิเจนในอาหารเลี้ยงเชื้อได้ดีขึ้น สารเหล่านี้ได้แก่ ascobic acid , sodium thioglycolate , sodium formaldehyde sulfoxylate , thiomalic acid , sodium hydrosulfite , และ cysteine เป็นต้น

10. **เลือด** ; ใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อพวก Enriched Media เลือดที่ใช้โดยมากมี 4 ชนิด คือ

- เลือดแกะ ซึ่งเอา Fibrin ออกแล้ว (defibrinated sheep blood) ; เป็นเลือดที่ดีที่สุดเพราะให้ hemolysis ได้ถูกต้องชัดเจน โดยเฉพาะ hemolysis ที่เกิดจาก *Streptococci spp.*
- เลือดกระต่ายซึ่งเอา Fibrin ออกแล้ว คุณภาพรองจากเลือดแกะ และให้ hemolysis ได้ถูกต้องเช่นกัน
- เลือดม้าซึ่งเอา fibrin ออกแล้ว ให้ hemolysis ไม่ถูกต้องโดยเฉพาะจาก Streptococci แต่มีประโยชน์ในการใช้ใส่ใน Mueller Hinton media เพื่อการทดสอบความไวของแบคทีเรียต่อยาต้านจุลชีพโดยใส่ในรูปของเลือดม้าที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก (lysed horse blood)
- เลือดคนซึ่งหมดอายุแล้วจากคลังเลือด ; เป็นเลือดที่ใช้มากที่สุดเพราะหาง่าย ราคาถูก แต่อาจมีผลเสียจาก citrate , antimicrobial agents และสารอื่น ๆ ที่อยู่ในเลือด ซึ่งอาจทำให้แบคทีเรียบางชนิดไม่สามารถเจริญได้หรือให้ปฏิกิริยา hemolysis ที่ผิดจากความเป็นจริง

ชนิดของอาหารเลี้ยงเชื้อ

1. แบ่งตามลักษณะทางกายภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อ แบ่งได้เป็น

1.1 อาหารแข็ง (Solid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุ้น (Agar) 1.5 – 2 %ขึ้นไป

1.2 อาหารเหลว (Liquid Media or Broth) คืออาหารที่ไม่มีการเติมวุ้นลงไป หรือหากมีจะน้อยมาก คือน้อยกว่า 0.1 %

1.3 อาหารกึ่งแข็งกึ่งเหลว (Semisolid Media) คืออาหารที่มีการเติมวุ้นปริมาณน้อยลงไปประมาณ 0.5 % เพื่อประโยชน์บางอย่าง เช่น ประโยชน์ในการทดสอบคุณสมบัติในการเคลื่อนที่ของแบคทีเรีย (Motility test)

2. แบ่งตามคุณสมบัติของคุณค่าทางอาหารและ Selective Agents ที่เติมลงไป แบ่งได้เป็น

2.1 Chemical Defined Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อซึ่งทราบชนิดและปริมาณที่แน่นอนของสารเคมีที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนั้น ๆ อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดนี้ไม่เป็นที่นิยมใช้ในงานทั่วไปนัก แต่มักใช้ในงานวิจัยที่ต้องการความละเอียดและแน่นอนมากเป็นพิเศษ

2.2 Plain Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีสารอาหารมาพอสมควร สามารถใช้เพาะเลี้ยงแบคทีเรียส่วนมากได้ ซึ่งรวมถึงแบคทีเรียก่อโรคบางชนิด อาหารเลี้ยงเชื้อประเภทนี้ได้แก่ Nutrient Broth , Nutrient agar เป็นต้น

2.3 Enriched Media เป็นอาหารที่ใช้เฉพาะกับแบคทีเรียที่เพาะเลี้ยงยาก (Fastidious bacteria) เนื่องจากไม่เจริญในอาหารธรรมดาเลยหรือเจริญยาก อาหารชนิดนี้ต้องเติมสารอาหารพิเศษหรือ Growth Facter บางอย่างลงไป เช่น เลือด ซีรั่ม ไข่ น้ำจากช่องท้อง (Ascitic Fluid) หรือสารที่สกัดจากเนื้อเนื่อของสัตว์ เป็นต้น เพื่อเร่งการเจริญเติบโตของเชื้อ เช่น Blood Agar และ Chocolate Agar เป็นต้น

2.4 Enrichment Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลว ใช้ช่วยในการเจริญของแบคทีเรียชนิดหนึ่งชนิดใดโดยเฉพาะ (ซึ่งมักจะเป็นแบคทีเรียที่ก่อให้เกิดโรค) ให้เจริญได้ดีกว่าแบคทีเรียชนิดอื่น ๆ ที่ปะปนมาในตัวอย่าง เช่น Selenite broth , tetrathionate broth เป็นต้น

2.5 Selective Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพื่อแยกจุลินทรีย์ที่ต้องการออกจากจุลินทรีย์ที่ไม่ต้องการและปะปนอยู่ โดยการเติมสารเคมีบางอย่าง ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ โดยไม่มีผลเสียต่อแบคทีเรียที่ต้องการ เช่น การเติมสี Crystal Violet Brilliant Green และ เกลือน้ำดี (bile salt) เพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมบวก และไม่ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียแกรมลบ หรือการเติมยาปฏิชีวนะบางชนิดเพื่อยับยั้งการเจริญของแบคทีเรียที่ไม่ต้องการ ตัวอย่างของ Selective Media เช่น Brilliant green agar, Salmonella – Shigella agar (SS Agar) Bismuth sulfite agar และ MacConkey agar เป็นต้น

2.6 Differential Media เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้บอกความแตกต่างของเชื้อแต่ละชนิดโดยดูจากความแตกต่างของลักษณะโคโลนีหรือปฏิกิริยาทางชีวเคมี (Biochemical Reaction) เช่น Blood agar media เป็นอาหารวุ้นที่เติมเลือด ถ้าแบคทีเรียนั้นย่อยสลายเม็ดเลือดแดงได้ (Hemolysis) จะเกิดบริเวณใส (Clear Zone) ขึ้นรอบ ๆ โคโลนีของแบคทีเรีย Lactose broth ใช้แยก

2.7 Differential และ Selective media มีอาหารเลี้ยงเชื้อบางชนิดมีคุณสมบัติเป็นทั้ง Differential media และ Selective Media คือยอมให้แบคทีเรียบางชนิดเจริญได้แต่ไม่ยอมให้แบคทีเรียชนิดอื่น ๆ เจริญ และในขณะเดียวกันก็ยังสามารถแยกชนิดของแบคทีเรียที่เจริญอยู่นั้นได้ด้วย เช่น Thiosulfate Citrate Bile salt Sucrose (TCBS) agar ซึ่งยอมให้แบคทีเรียพวก Vibrio เท่านั้นที่เจริญได้และยังสามารถแยก Vibrio ชนิดที่ใช้ Sucrose และไม่ใช้ Sucrose ออกจากกันได้โดยดูจากสีของโคโลนี หรือ Xylose lysine Dexoxycholate Agar (XLD) ที่ใช้แยกแบคทีเรียแกรมลบที่สามารถใช้และไม่ใช้แลคโตสออกจากกันได้ โดยถ้าแบคทีเรียใช้แลคโตสได้โคโลนีจะมีสีเหลือง ถ้าใช้แลคโตสไม่ได้โคโลนีจะมีสีชมพู และถ้าเป็นแบคทีเรียบางชนิด เช่น Salmonella จะมีลักษณะเฉพาะบน XLD คือ โคโลนีจะมีสีชมพูใสและมีจุดสีดำของไฮโดรเจนซัลไฟด์ (H_2S) อยู่ตรงกลาง เป็นต้น

2.8 อาหารที่ใช้วิเคราะห์ (Assay Media) เป็นอาหารที่มีองค์ประกอบพิเศษเพื่อใช้วิเคราะห์หาปริมาณของ วิตามิน กรดอะมิโนและสารปฏิชีวนะ นอกจากนี้ยังใช้ในการตรวจสอบประสิทธิภาพของสารเคมีที่ใช้ยับยั้งหรือทำลายจุลินทรีย์ (Disinfectant) ด้วย

2.9 อาหารที่ใช้ตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (Media for enumeration of bacteria) เป็นอาหารที่ใช้ในการตรวจนับแบคทีเรียบางชนิด เช่น จุลินทรีย์ในน้ำหรือน้ำนม ซึ่งองค์ประกอบของอาหารจะเหมาะสมต่อการเจริญของแบคทีเรียเหล่านั้น ตัวอย่างเช่น Plate count agar และ Marine agar เป็นต้น

2.10 อาหารที่ใช้ศึกษาคุณสมบัติของแบคทีเรีย (Media for characterization of bacteria) ใช้ตรวจสอบคุณสมบัติในการเจริญของจุลินทรีย์ในอาหารเลี้ยงเชื้อรวมทั้งคุณสมบัติที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาและชีวเคมี (Physical and Biochemical test) เช่น Triple sugar iron agar , Urease test medium , citrate agar , lysine decarboxylase test medium เป็นต้น

2.11 อาหารที่ใช้เก็บรักษาเชื้อจุลินทรีย์ (Maintenance Media) ใช้เพื่อเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรียไว้ให้นานที่สุดโดยเชื้อยังมีคุณสมบัติเหมือนเดิม จึงมีการลดองค์ประกอบบางอย่างในอาหารเพื่อให้เชื้อมีการเจริญเติบโตน้อยลงและปลดปล่อยของเสียออกมาน้อยลง เช่น ลดปริมาณน้ำตาลกลูโคสให้น้อยลงเนื่องจากน้ำตาลกลูโคสจะเพิ่มการเจริญเติบโตของแบคทีเรีย ทำให้สร้างกรดได้มากและทำให้เชื้อตายเร็ว ไม่มีคาร์โบไฮเดรต หรือโปรตีน แต่จะประกอบด้วยเกลือแร่ต่าง ๆ หลายชนิดเพื่อรักษาความเป็นกรด – ด่าง ตลอดจน Oxidation Reduction Potential และความชื้นให้คงที่ เช่น Stuart's transport medium , Cary – Blair transport medium เป็นต้น Transport Media นิยมใช้ในกรณีที่ไม่สามารถนำสิ่งส่งตรวจจากสัตว์ป่วยมาเพาะเลี้ยงเพื่อแยกเชื้อได้ทันที

V. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ(Preparation of the Culture Media)

ปัจจุบันมีบริษัทที่เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อสำเร็จรูป (Dehydrated Media) ออกมาจำหน่าย เช่น BBL ,Difco , Gibco และ Oxoid ทำให้สะดวกในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมากขึ้น ถ้าต้องการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อจาก Dehydrated Media ที่เป็นผงหรือเกล็ด (Granules) ควรจะเตรียมตามคำแนะนำของบริษัทผู้ผลิตจะดีที่สุด ขั้นตอนในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อมีดังนี้

1. ใช้เครื่องแก้ว (Glassware) ที่สะอาด ผ่านการล้างมาเป็นอย่างดีโดยไม่ใช้สารซักฟอก (Detergent) หรือสารเคมีอื่น ๆ

2. ชั่งน้ำหนัก Dehydrated media ตามสูตรของอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิด นำไปใส่ใน Flask หลังจากนั้นเติมน้ำกลั่น (Distilled Water) ลงไปตามปริมาณที่กำหนดไว้ในสูตร ควรใช้น้ำกลั่นเนื่องจากเป็นน้ำที่ปราศจากคลอรีน (Chlorine) สารเคมีและไอออนของโลหะหนักต่าง ๆ (Heavy metal ions) ที่อาจยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียได้

3. การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อควรเตรียมในภาชนะที่มีปริมาตรมากกว่าปริมาตรของอาหารเลี้ยงเชื้อที่ต้องการเตรียมประมาณ 2 เท่า เพื่อความสะดวกในการผสมและป้องกันฟองที่เกิดจากการต้มอาหารเลี้ยงเชื้อ

4. ทำให้ Dehydrated media ละลายถ้าเป็น Dehydrated media ที่ผสมวุ้นมาด้วยทำให้ละลายได้โดยการนำไปต้ม และคนด้วยแท่งแก้วตลอดเวลา หรืออาจใช้วิธีวางไว้บน Hot plate ที่เป็นระบบแม่เหล็ก (Magnetic stirrer system) โดยใส่แท่งแม่เหล็กลงไปใน Flask ด้วย แต่ถ้าเป็น Dehydrated media ที่ไม่ผสมวุ้นลงไปอาจทำให้ละลายได้ด้วยการคนเบาก็เพียงพอ

5. หลังจากทำให้ละลายเสร็จ นำไปนึ่งฆ่าเชื้อ (Sterilized) ใน Autoclave หรือ Pressure cooker ที่ 121 °C ความดัน 15 ปอนด์ 15 นาที อย่างไรก็ตามมีอาหารเลี้ยงเชื้อบางประเภทที่ไม่สามารถทนความร้อนสูงเช่นนี้ได้ บริษัทผู้ผลิตอาจแนะนำให้นำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 118 °C หรือ 115 °C ที่เวลา 15 นาทีหรือนานกว่านี้เล็กน้อย Selective Media บางชนิด เช่น Brilliant green agar , TCBS และ XLD สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการนำไปต้ม

6. หลังจากฆ่าเชื้อเสร็จเรียบร้อยนำอาหารเลี้ยงเชื้อมาทำให้เย็นลงที่อุณหภูมิ 50 – 56°C ใน Water bath ก่อนนำไปเทลง Plate หรือ Tube อาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสม Agar จะแข็งตัวที่ 42°C อาหารเลี้ยงเชื้อ 1 ลิตร สามารถนำไปเทลง Plate ได้ประมาณ 70 – 100 Plates

7. สารบางชนิดที่จะต้องเติมลงไปในอาหารเลี้ยงเชื้อจะไม่สามารถทนความร้อนในการต้มหรือการ Autoclave ได้ ดังนั้นจะต้องเติมสารเหล่านั้นในขั้นตอนหลังจากนี้ โดยให้อาหารเลี้ยงเชื้อเย็นลงประมาณ 50–56 °C ก่อน แต่สารเหล่านี้จะต้องเป็นสารที่ปราศจากเชื้อ เช่น ถ้าเป็นเลือด ก็ต้องเป็นเลือดที่เก็บมาโดยวิธีปราศจากเชื้อ (Aseptic technique) ถ้าเป็นน้ำตาล สี หรือ กรดอะมิโนก็

8. ตรวจสอบความเป็นกรด – ด่าง (pH) ของอาหารเลี้ยงเชื้อที่เย็นแล้ว (50 - 56 °C) อาจโดยการใช้ pH meter หรือ pH strips ถ้า ความเป็นกรด –ด่าง ของอาหารเลี้ยงเชื้อไม่เป็นไปตามที่กำหนดในสูตร (ปรกติจะกำหนดให้อยู่ในช่วง 6.8 – 7.2) ให้เติม 1-N หรืด 0.1 –N NaoH หรือ HCl ทีละหยดและปรับจนกว่าจะได้ pH ตามที่กำหนด

9. นำไปเทลงใน Plate หรือ Tube

10. หลังจากเทลง Plate หรือ Tube แล้วรอให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวและปล่อยให้แห้งที่อุณหภูมิห้องหรือ 37 °C ประมาณ 2 – 3 ชั่วโมง ต้องแน่ใจว่าไม่มีไอน้ำเกาะอยู่ที่ฝา Plate เพราะอาจทำให้เกิด Contamination ได้ หลังจากนั้นนำ Plate ที่ยังไม่ใช้เก็บใส่ถุงพลาสติก มัดมากถุงให้เรียบร้อย แล้วนำไปเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C อาจนำไปทดสอบการปราศจากเชื้อโดยการนำไปบ่ม (Incubation) ที่อุณหภูมิ 37 °C นาน 12 – 14 ชั่วโมง

VI. การเก็บรักษาเชื้อแบคทีเรีย (Maintenance of Bacteria)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์มักมีการเก็บรักษาไว้เพื่อให้มีชีวิตอยู่นาน ๆ เพื่อนำไปใช้ในการศึกษา วิจัย การเก็บรักษาเชื้อบริสุทธิ์มีหลายวิธีได้แก่

1. การถ่ายเชื้อสู่อาหารใหม่ (Subculturing Method)

เชื้อแบคทีเรียที่บริสุทธิ์จะเก็บไว้ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด Maintenance media ระยะเวลาหนึ่ง แล้วเปลี่ยนอาหารใหม่ ระยะเวลาในการเปลี่ยนอาหารขึ้นอยู่กับ ชนิดของเชื้อ ซึ่งอาจเก็บไว้ได้หลายสัปดาห์หรือหลายเดือน นอกจากนี้ยังเก็บไว้ที่อุณหภูมิต่ำเพื่อให้เชื้อหยุดการเจริญเติบโต การเก็บรักษาเชื้อโดยวิธีการถ่ายเชื้อใส่ในอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่เรื่อย ๆนี้มีข้อเสียคือ อาจทำให้เชื้อเกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของสายพันธุ์ได้ คือเกิดการกลายพันธุ์ หรือการผ่าเหล่า

2. การปิดทับด้วยน้ำมัน

คือการเก็บรักษาแบคทีเรียที่ขึ้นอยู่บนอาหารวุ้นเอียง (Agar slant Media) โดยการเทน้ำมัน น้ำมัน เช่น ฟาราฟีน ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วหนาประมาณครึ่งนิ้วทับลงไป สามารถเก็บรักษาเชื้อได้เป็นปี

1. การทำให้แห้งและเย็นเยือกแข็ง (Lyophilization)

คือการทำให้เชื้อในอาหารเลี้ยงเชื้อ (ส่วนใหญ่ใช้ Skim milk) แห้งโดยเร็วในสภาพที่เย็นจัดจนแข็ง (Freeze - dry) อุณหภูมิประมาณ – 60 ถึง –78 ° C ในหลอดแก้วขนาดเล็ก และทำให้เกิดสภาพสูญญากาศภายในหลอด แล้วปิดปากหลอดโดยการลนไฟ วิธีการนี้สามารถเก็บเชื้อแบคทีเรียไว้ได้นานมากโดยคุณสมบัติของเชื้อไม่เปลี่ยนแปลง แต่เสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างสูง

2. การเก็บรักษาเชื้อไว้ที่อุณหภูมิต่ำ

คือการเก็บเชื้อไว้ในที่ที่อุณหภูมิต่ำ เช่น ในไนโตรเจนเหลว ซึ่งมีอุณหภูมิ –196 ° C โดยนำเชื้อที่ใส่ในสารละลายที่สามารถปกป้องเชื้อจากการเปลี่ยนแปลงเมื่อเก็บด้วยวิธีนี้ (จากผลึกน้ำแข็ง) เช่น กลีเซอรอล หรือ Dimethyl sulfoxide , DMSO แล้วนำไปแช่ในไนโตรเจนเหลว

วิธีนี้สามารถเก็บรักษาเชื้อไว้ด้นานมาก ประมาณ 10 – 30 ปี โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติ และยังสามารถเก็บรักษาเชื้อที่ไม่สามารถทำการเก็บด้วยวิธี Lyophilization ได้ด้วยแต่เสียค่าใช้จ่ายมาก เนื่องจากต้องมีการเติมไนโตรเจนเหลวเป็นระยะ ๆ

เอกสารประกอบการเรียบเรียง

1. ฉัตรชัย ศรชัย และ พิมพ์พันธุ์ เลียงพิบูลย์ 2529 คู่มือปฏิบัติการ วิชา Medical Bacteriology (MTMI 301) ภาควิชาจุลชีววิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยมหิดล พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 17 - 27

2. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 อาหารเลี้ยงเชื้อและการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์ จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 74 – 96

3. นงลักษณ์ สุวรรณพินิจ และ ปรีชา สุวรรณพินิจ 2541 การแยกเชื้อบริสุทธิ์ และลักษณะการเจริญเติบโตของเชื้อบริสุทธิ์ จุลชีววิทยาทั่วไป พิมพ์ครั้งที่ 2 สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย หน้า 116 – 134

4. Baron, E.J., Pererson, L.R., Finegold, S.M.1998.Bailey and Scott's Diagnostic Microbiology. 10th ed. CV Mosby, St. Louis,

5. Cappucino,J.G. ,Sherman,N. 1992 . Microbiology a Laboratory Manual 3rd ed. The Benjamin / Cummings Publishing Company, Inc. P. 63 - 81.

6. Koneman, E.W., Allen, S.D., Schreckenberg, P.C., Winn, W.C.1992.Atlas and Textbook of Diagnostic Microbiology. 4th ed. JBLippincott, Philadelphia,

7. Murray, P.R., Baron, E.J., Pfaller, M.A., Tenover, P.C., Yolken, R.H. 1995.Manual of Clinical Microbiology. 6th ed. American Society for Microbiology, Washington, DC.

8. Pratt, P.W. 1997. Diagnostic Microbiology. In: Laboratory Proceedures For Veterinary Technicians. 3rd. ed. Mosby – Year Book ,Inc. P.119 - 258.

9. Quinn, P.J. Carter, M.E., Markey, B.K. and Carter, G.R. 1994. Clinical Veterinary Microbiology.1st ed. Wolfe Publising, Mosby-Year Europe Limited, London, England, p. 6-345.