

อาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium chauvoei* สำหรับใช้ในการหาปริมาณเชื้อมีชีวิต

วัตถุประสงค์

เพื่อปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อ *Clostridium chauvoei* สำหรับใช้ในการหาปริมาณเชื้อมีชีวิตที่ใช้ฉีดเชื้อพิษในหนูขาวในการทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนแบลคเลก

ที่มาของปัญหา

การทดสอบความคุ้มโรคของวัคซีนแบลคเลก ใช้วิธีการทดสอบในหนูขาวโดยการฉีดวัคซีน แล้วฉีดเชื้อพิษทับด้วยสปอร์มีชีวิตของเชื้อ *Clostridium chauvoei* ตามระยะเวลาและจำนวนสปอร์ที่กำหนดซึ่งการนับจำนวนสปอร์มีชีวิตที่ใช้ฉีดพิษทับ เดิมใช้วิธีการนับโคโลนีเชื้อที่เพาะเลี้ยงในอาหารแข็งสำเร็จรูปด้วยวิธี pour plate และเทคนิคเฉพาะสำหรับแบคทีเรียชนิดไม่ใช้ออกซิเจน ซึ่งพบปัญหาเชื้อไม่ขึ้นหรือขึ้นน้อยจนไม่สามารถนับจำนวนได้ ทำให้การแปลผลขาดความแม่นยำและเกิดความสูญเสียที่ต้องทำการทดสอบซ้ำ จึงต้องหาสาเหตุและแก้ไขวิธีการ โดยคาดว่ามาจากอาหารเลี้ยงเชื้อ จึงดำเนินการปรับปรุงอาหารเลี้ยงเชื้อจากอาหารสำเร็จรูปเป็นอาหารที่เตรียมโดยผสมส่วนประกอบต่างๆกับ Liver infusion broth ที่เตรียมจากตับโคสด

กระบวนการงาน

การนับจำนวนเชื้อ *Clostridium chauvoei* มีชีวิตจากสปอร์ที่เก็บในสภาพดุดแห้งด้วยวิธีเทเพลต (pour plate) ประกอบด้วย

1. เตรียมเชื้อ

1.1 ละลายสปอร์ *Clostridium chauvoei* (ดุดแห้ง) ด้วยอาหารสำเร็จรูป Reinforced Clostridium medium (RCM)

1.2 เจือจางแบบ 10 เท่า ด้วย RCM ให้เจือจางตั้งแต่ 10^{-1} ถึง 10^{-5}



2. เทเพลต

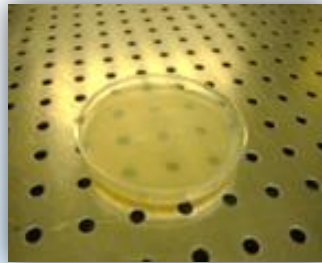
2.1 ใส่เชื้อแต่ละความเจือจาง 1 มล. ในส่วนของฝาเพลต (ความเจือจางละ 3 เพลต)



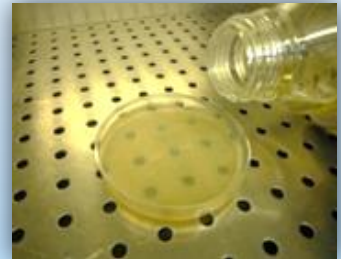
2.2 เติม RCM + agar 2% (15 มล.) และเอียงเพลตไปมาเบาๆให้ผสมกันดี



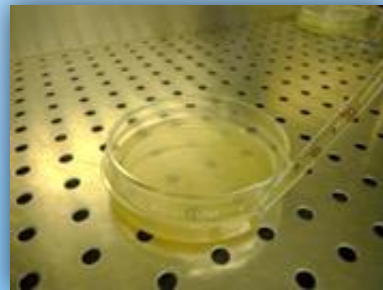
2.3 ปหล่อยให้อาหารแข็งตัว



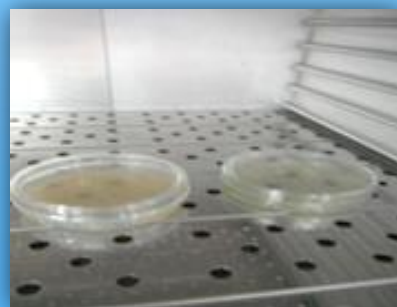
2.4 เติม RCM+agar 5 มล. ทับแล้วยปหล่อยใหแข็งตัว



2.5 วางส่วนของตัวเพลต (body) ทับลงไป แล้ยเติม RCM+agar ลงในช่องว่างระหว่างฝาและตัวเพลต



2.6 ปิดทับด้วยฝาเพลต และอบใน incubator ที่ 37°C นาน 24 ชั่วโมง (ไม่ต้องใช้ Anaerobic jar)



2.7 นับจำนวนโคโลนี

การปรับปรุงกระบวนการ

ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ Cysteine liver infusion broth (CLB) แทน RCM

ขั้นตอนการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ CLB

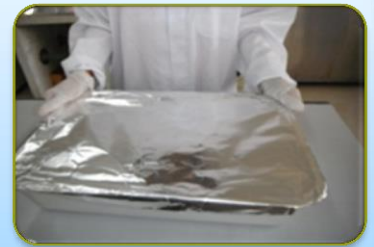
1. เตรียม Liver infusion broth



1. หั่นตับโคเป็นชิ้นลูกเต๋า
ขนาด 5x5 ซม.



2. เติมน้ำกลั่น 10 ส่วนต่อ
ตับ 3 ส่วน



3. นำไปแช่เย็นที่ 4 °C
ข้ามคืน



4. ต้มที่ 100 °C
2 ชั่วโมง



5. กรองและเก็บน้ำไป
autoclave



Liver infusion
broth
เก็บที่ 4°C

2. เตรียม CLB โดยผสมสารตามสูตร ดังนี้

Liver infusion broth 100 มล., Peptone 3 กรัม, Dextrose 0.5 กรัม
NaCl 0.5 กรัม และ L-cysteine monohydrochloride 0.5 กรัม
ปรับค่า pH เป็น 7.2 และฆ่าเชื้อด้วยการ autoclave

สรุป

การใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ CLB แทน RCM ให้ผลดีกว่า ปัจจุบันได้เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อเป็น CLB ในการหาปริมาณเชื้อมีชีวิตจากสปอร์ของเชื้อ *Clostridium chauvoei* ที่เก็บในสภาพดุดแห้ง