The Thai Journal of Veterinary Medicine

Volume 19
Issue 3 *September, 1989*

Article 1

9-1-1989

การเจริญเติบโตของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ

อารีรัตน์ ลออปักษา

สารี วิรุฬหผล

เกรียงศักดิ์ สายธนู

นวรัตน์ จารุจินดา

สันติ ถุงสุวรรณ

Follow this and additional works at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm

Part of the Veterinary Medicine Commons

Recommended Citation

ลออปักษา, อารีรัตน์; วิรุฬหผล, สารี; สายธนู, เกรียงศักดิ์; จารุจินดา, นวรัตน์; and ถุงสุวรรณ, สันติ (1989) "การเจริญเติบโตของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า ในอาหารเหลวชนิดต่าง ๆ," *The Thai Journal of Veterinary Medicine*: Vol. 19: Iss. 3, Article 1.
DOI: https://doi.org/10.56808/2985-1130.1526
Available at: https://digital.car.chula.ac.th/tjvm/vol19/iss3/1

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in The Thai Journal of Veterinary Medicine by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การเจริญเติบโตของเชื้อ *พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า* ในอาหารเหลวชนิดต่างๆ

อารีรัตน์ ลออปักษา[1]
สารี วิรุฬหผล[1]
เกรียงศักดิ์ สายธนู[2]
นวรัตน์ จารุจินดา[2]
สันติ ถุงสุวรรณ[1]

บทย่อ

เชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า ซีโรทัยป์ 8 : A เมื่อนำมาทดลองเพาะเลี้ยงให้เจริญในอาหารเลี้ยงเชื้อ 8 ชนิด พบว่า เชื้อเจริญได้ดีที่สุดตามลำดับใน Brain heart infusion broth, Tryptic broth + 0.3% yeast extract และ Modified tryptic soy broth รองลงไป ได้แก่ Tryptose broth, Tryptic soy broth และ Tryptose-thiamine broth ส่วน Nutrient broth และ Nutrient broth + 0.3% yeast extract จะให้จำนวนเชื้อต่ำสุด สภาวะที่เหมาะสม พบว่า บ่มที่อุณหภูมิ 37 ^{o}ซ เป็นเวลา 18 ชม. การใช้ Fermentor หรือการเขย่าจะให้ผลดีกว่าแบบอยู่นิ่ง จำนวนเชื้อที่มีชีวิตที่ได้มีค่าสูงสุดจาก Brain heart infusion broth มีค่า 2.25 X 10^{9} CFU/มล. ค่าความขุ่นเท่ากับ 1.8 ใช้ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

---

[1]ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ และ
[2]หน่วยจุลชีววิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ประสิทธิภาพของวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ในไก่, ไก่งวงและเป็ดจะขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อ (อารีรัตน์ และคณะ 2530; Layton, 1984; Coates *et al.*, 1977; Derieux, 1984) มาตรฐานของวัคซีนนี้จะต้องมีปริมาณของเชื้อไม่ต่ำกว่า 10^{10} เซลล์ ต่อโด๊ส (Anon, 1985) การเตรียมวัคซีนอหิวาต์เป็ด-ไก่ ชนิดเชื้อตาย อาจเตรียมจากอาหารที่ผสมวุ้น เช่น Yeast-proteose L-cystein agar (Alexander and Saltys, 1973; Bhasin and Biberstein, 1968) Tryptose agar (Nathanson *et al.*, 1980: Michael *et al.*, 1980) Dextrose starch agar (Olson *et al.*, 1968); Okerman and Spanoghe, 1981; Rebers and Heddleston, 1978; Chute *et al.*, 1962; Heddleston, 1962) จากไข่ Dougherty, 1965) และจากอาหารเหลว เช่น Tryptic soy broth, modified tryptose broth และ Brain heart infusion broth เป็นต้น (Coates *et al.*, 1977; Kodama *et al.*, 1981; Layton, 1984) ในปัจจุบันการเพาะเชื้อเพื่อเตรียมวัคซีนของกรม-ปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์ใช้ Fermentor มี Tryptose broth + 0.3% yeast extract เป็นอาหารเลี้ยงเชื้อ

ดังที่ได้กล่าวมาแล้วว่าการเพาะเชื้ออาจใช้อาหารเลี้ยงเชื้อชนิดต่าง ๆ ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ จึงมีจุดประสงค์เพื่อจะเปรียบเทียบว่าการเจริญเติบโตของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิดเหลวต่าง ๆ จะแตกต่างกันอย่างไร และอิทธิพลของอุณหภูมิ 37°ซ และ 41.5°ซ และสภาพการเพาะเชื้อคือสภาพนิ่ง การเขย่า และการใช้ Fermentor จะมีผลต่อการเจริญเติบโตหรือไม่

อุปกรณ์และวิธีการ

เชื้อที่ใช้ในการทดลอง เป็นเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า ซีโรทัยป์ 8 : A ได้รับจากกองผลิตชีวภัณฑ์ กรม-ปศุสัตว์ กระทรวงเกษตรและสหกรณ์

อาหารเลี้ยงเชื้อที่ใช้เพาะเชื้อเพื่อเปรียบเทียบอัตราการเจริญเติบโตมีทั้งหมด 8 ชนิด เป็นผลิตภัณฑ์ของ Difco ประกอบด้วย 1. Nutrient broth (NB) 2. Nutrient broth + 0.3% Yeast extract (NBY) 3. Brain heart infusion broth (BHI). 4. Tryptic soy broth (TSB) 5. Modified trypic soy broth (MTSB) เตรียมจาก TSB (เจือจาง $\frac{1}{2}$) เติม tryptose 0.52%, Sodium chloride 0.25%, Dextrose 0.055% และ Yeast extract 0.3% 6. Tryptose broth (TB) 7. Tryptose-thiamine broth (TTB) และ 8. Tryptose broth +

0.3% yeast extract (TBY) อาหารเลี้ยงเชื้อทุกชนิดปรับให้มี pH 7.2 ก่อนนำไปนึ่งฆ่าเชื้อ

การเตรียมเชื้อก่อนการทดลอง (Seed) เพาะเชื้อบน Tryptose blood agar ที่ 37°ซ. นานประมาณ 20 ชม. นำมาเพาะต่อใน Tryptose broth นาน 6-8 ชม. ที่ 37°ซ. ปรับให้มีความขุ่น O.D. ประมาณ 0.7 โดยวัดด้วยเครื่อง Spectronic 210 (Bausch & Lomb) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนมิเตอร์ จะมีเชื้อประมาณ 10^8 colony forming units (CFU) ต่อมล. หลังจากนั้นจึงถ่ายลงอาหารชนิดต่าง ๆ ที่จะทดลอบ โดยเติม Seed ลงไปให้มีปริมาณเชื้อต่าง ๆ กัน ซึ่งจะกล่าวไว้ในแต่ละการทดลอง

การทดลอง

<u>การทดลองครั้งที่ 1</u> ถ่าย Seed ซึ่งมีปริมาณเชื้อ 2.6 X 10^7 CFU/ มล. ลงไปในอาหารเหลวทั้ง 8 ชนิด (สำหรับ TBY ในการทดลองครั้งนี้เติม yeast extract 3%) โดยใช้ seed 1 มล. ต่ออาหาร 200 มล. ใน flask ขนาด 500 มล. นำไปอบที่ 37°ซ. ในเครื่องเขย่าชนิด Orbital ปรับเครื่องให้เขย่า 200 รอบ/นาที หลังจากเพาะเชื้อนาน 0, 3, 6, 9, 24, 30 และ 48 ชม. นำมาวัดความขุ่น (O.D) ด้วยเครื่อง Spectronic 210 ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

<u>การทดลองครั้งที่ 2</u> หลังจากเลือจาง Seed ให้มีปริมาณเชื้อ 10^8 CFU/มล. ถ่าย Seed ลงในอาหารเหลวทั้ง 8 ชนิด โดยใช้ 1 มล. ลงในอาหาร 200 มล. อาหารเลี้ยงเชื้อที่มี Seed แล้วนำไปทดลองดังต่อไปนี้ คือ

ชุดที่ 1 นำไปบ่มที่ 37°ซ. ส่ภาพนิ่งในตู้อบเชื้อ

ชุดที่ 2 นำไปบ่มที่ 37°ซ. ในตู้อบเชื้อชนิดเขย่า ปรับเครื่องให้เขย่า 200 รอบ/นาที

ชุดที่ 3 นำไปบ่มที่ 41.5°ซ. ส่ภาพนิ่งในตู้อบเชื้อ

ชุดที่ 4 นำไปบ่มที่ 41.5°ซ. ในตู้อบเชื้อชนิดเขย่าปรับเครื่องให้เขย่า 200 รอบ/นาที

หลังจากเพาะเชื้อนาน 18, 24, และ 48 ชั่วโมง นำมานับหาปริมาณเชื้อโดยใช้ Blood agar และวัดความขุ่น

<u>การทดลองครั้งที่ 3</u> ถ่าย Seed ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อ BHI, MTSB และ TSY โดยเตรียมเหมือนกับการทดลองครั้งที่ 2 ถ่ายลงในเครื่อง Fermentor (Bioflo model C 30) ขนาด 1 ลิตร โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อ 350 มล. บ่มที่ 37°ซ. มีการหมุนวน (agitation) 200 รอบ/นาที ให้อากาศ (aerated) 0.4 ลิตร/นาที สุ่มตัวอย่าง เพื่อนำมาวัดความขุ่นและปริมาณเชื้อ ในช่วงเวลาต่าง ๆ กันดังที่ได้กล่าวไว้ในการทดลองครั้งที่ 2

การทดลองครั้งที่ 4 ศึกษาหาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ (growth curve) ใน BHI ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพเขย่าและสภาพนิ่ง โดยปริมาณเริ่มต้นของเชื้อ 10^3 CFU/มล. ปฏิบัติดังนี้ หลังจากเตรียม seed และถ่าย seed ลงใน BHI ซึ่งบรรจุใน flask ขนาด 500 มล. จำนวน 2 ใบ ๆ ละ 200 มล. แล้วนำ flask ที่หนึ่งไปบ่มที่ 37°ซ. ในเครื่องเขย่าปรับให้มีความเร็ว 200 รอบ/นาที และ flask ที่สองนำไปอบในตู้เพาะเชื้อธรรมดา 37°ซ. หลังจากอบ 0, 3, 6, 9, 24, 27, 30, 33, 48 และ 72 ชม. นำมาวัด O.D ด้วยเครื่อง Spectronic 21 ตามวิธีข้างต้น และนับหาปริมาณและของเชื้อเฉพาะการทดลองในสภาพเขย่าเท่านั้น

การทดลองครั้งที่ 5 ศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อ (Growth curve) ใน BHI ที่อุณหภูมิ 37°ซ. ในสภาพเขย่าในและสภาพนิ่ง โดยปริมาณเริ่มต้นของเชื้อ 2.8×10^6 CFU/ มล. วิธีการศึกษาปฏิบัติเช่นเดียวกับการทดลองครั้งที่ 4

ผล

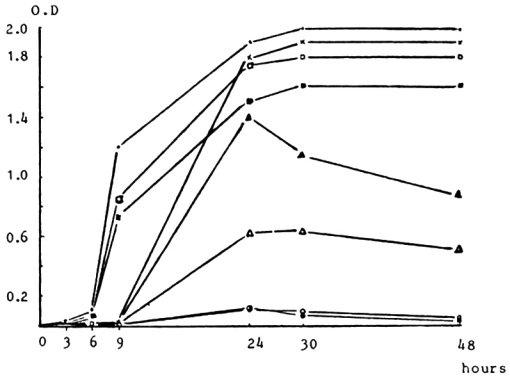
รูปที่ 1 แสดงความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 8 ชนิด หลังจากเพาะเชื้อที่ 37°ซ. และเขย่า 200 รอบ/นาที โดยปริมาณของเชื้อเริ่มต้น 1.3×10^5 CFU/มล. พบว่าความขุ่นของอาหาร BHI จะสูงสุด คือมี O.D เท่ากับ 1.99 ในชั่วโมงที่ 30 รองลงไปคือ TB + 3% yeast extract (O.D = 1.8 ในชั่วโมงที่ 30), TB (O.D = 1.8 ชั่วโมงที่ 30), TTB (O.D = 1.6 ชั่วโมงที่ 30), MTSB (O.D = 1.4 ชั่วโมงที่ 24), TSB (O.D = 0.63 ชั่วโมงที่ 30), NBY (O.D = 0.121 ชั่วโมงที่ 24) และ NB (O.D = 0.119 ชั่วโมงที่ 24) หลังจากที่อาหาร BHI, TB, TB + 3% yeast extract และ TTB มีความขุ่นสูงสุดแล้ว จะยังคงมีความขุ่นระดับนี้ จนถึงชั่วโมงที่ 48 สำหรับอาหารอีก 4 ชนิด เมื่อมีความขุ่นสูงสุดแล้ว ก็จะลดลงในชั่วโมงต่อมา โดย MTSB จะมีความขุ่นลดลงมากที่สุด

รูปที่ 2,3 และตารางที่ 1 แสดงความขุ่นและปริมาณของเชื้อในอาหารทั้ง 8 ชนิด หลังจากเพาะเชื้อที่ 37°ซ. และ 41.5°ซ. ในสภาพนิ่ง โดยปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ 5×10^5 CFU/มล. ปรากฏว่าความขุ่นและปริมาณของเชื้อใน BHI จะสูงกว่าอาหารชนิดอื่น ในขณะที่ NB จะให้ความขุ่นและปริมาณเชื้อต่ำสุด โดยการบ่มเชื้อที่ 37°ซ. จะมีปริมาณเชื้อมากกว่าการเพาะเชื้อที่ 41.5°ซ.

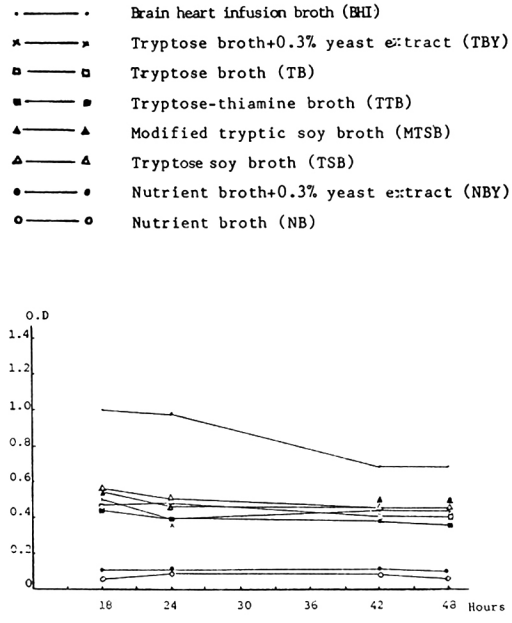
รูปที่ 4, 5 และตารางที่ 2 แสดงความขุ่น และปริมาณของเชื้อในอาหารทั้ง 8 ชนิด หลังจากเพาะเชื้อที่ 37°ซ. และ 41.5°ซ. ในตู้บ่มเชื้อแบบเขย่าความเร็ว 200 รอบ/นาที ปรากฏว่า BHI จะให้ปริมาณเชื้อและความขุ่นสูงกว่าอาหารชนิดอื่น NB จะให้ความขุ่นและปริมาณเชื้อ-

ตารางที่ 1 ปริมาณของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ในอาหารเหลว 8 ชนิด เพาะเชื้อในสภาพนิ่ง (CFU/มล.)

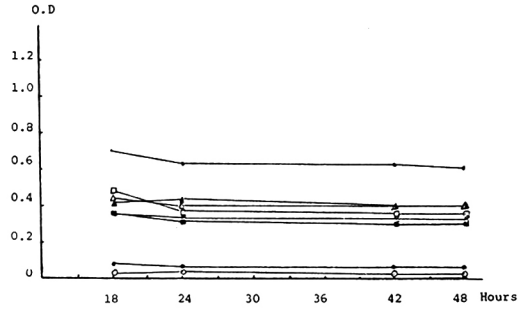
Media	37°C		41.5°C	
	18 hr.	24 hr.	18 hr.	24 hr.
1. Nutrient broth	6.20×10^{6}	6.90×10^{6}	1.85×10^{6}	2.55×10^{6}
2. Nutrient broth plus 0.3% yeast extract	2.80×10^{7}	3.60×10^{7}	3.45×10^{6}	5.80×10^{6}
3. Brain heart infusion broth	4.60×10^{7}	2.0×10^{7}	7.50×10^{6}	2.50×10^{6}
4. Tryptic soy broth	4.50×10^{7}	7.60×10^{7}	1.85×10^{7}	2.75×10^{6}
5. Modified tryptic soy broth	2.35×10^{7}	1.80×10^{7}	5.55×10^{6}	2.95×10^{6}
6. Tryptose broth	3.00×10^{7}	4.50×10^{7}	5.00×10^{6}	3.65×10^{6}
7. Tryptose-thiamine broth	2.10×10^{7}	6.25×10^{6}	7.50×10^{6}	4.00×10^{6}
8. Tryptose broth plus 0.3% yeast extract	3.50×10^{7}	7.55×10^{6}	6.10×10^{6}	2.15×10^{6}



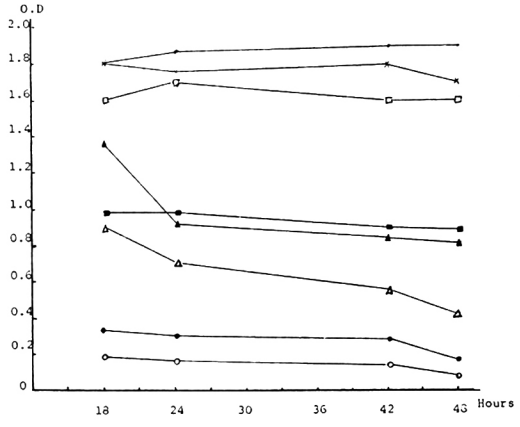
รูปที่ 1 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อหลังเพาะเชื้อ พาส่เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $13X10^5$ CFU/มล. ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ ในส่ภาพเขย่า 200 รอบ/นาที



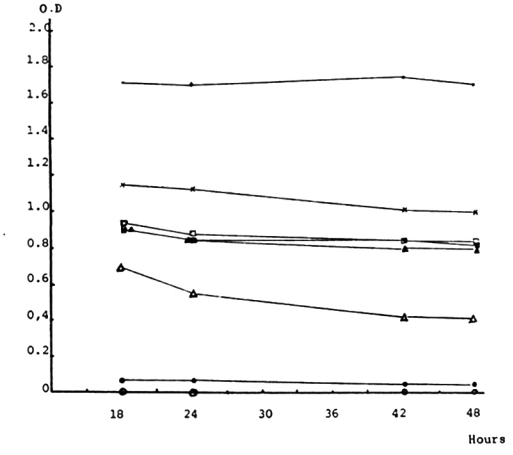
รูปที่ 2 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (8 ชนิด) หลังเพาะเชื้อ พาส่เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5X10^5$ CFU/มล. ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ ในส่ภาพนิ่ง



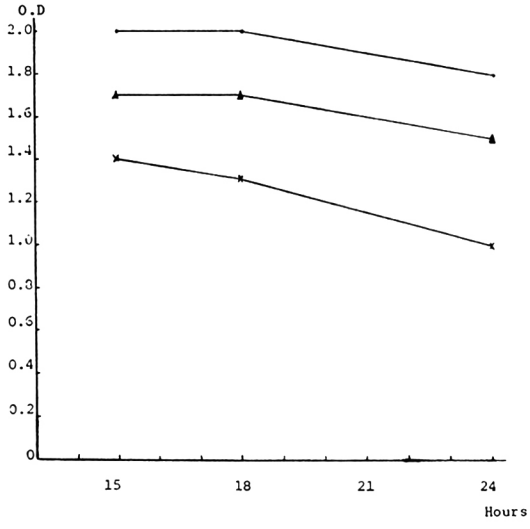
รูปที่ 3 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (8 ชนิด) หลังเพาะเชื้อ พาส่เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ประมาณ $5X10^5$ CFU/มล. ที่อุณหภูมิ 41.5^{o}ซ. ในส่ภาพนิ่ง



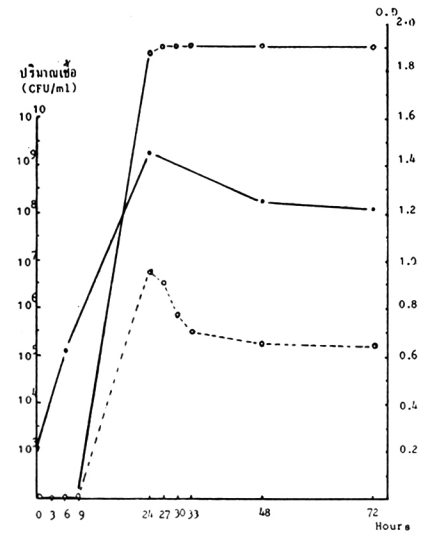
รูปที่ 4 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (8 ชนิด) หลังเพาะเชื้อ พาส่เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ประมาณ $5X10^5$ CFU/มล. ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ ในส่ภาพเขย่า 200 รอบ/นาที



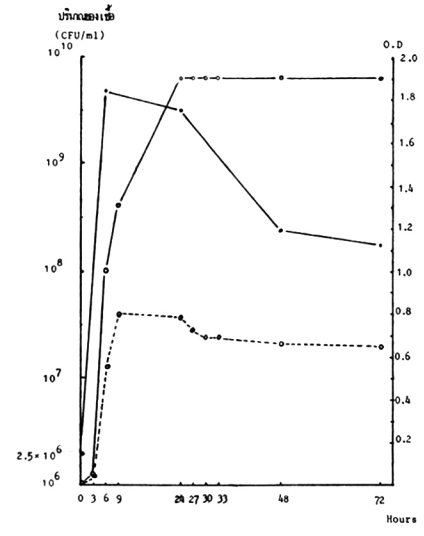
รูปที่ 5 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ (8 ชนิด) หลังจากเพาะเชื้อ พาส์เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้นประมาณ $5X10^5$ CFU/มล. ที่อุณหภูมิ $41^{\circ}.5$ ซ ในส่ภาพเขย่า 200 รอบ/นาที



รูปที่ 6 ความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ 3 ชนิด หลังจากเพาะเชื้อ พาส์เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ปริมาณเชื้อเริ่มต้น ประมาณ $5X10^5$ CFU/มล. ใน Fermentor อุณหภูมิ 37°ซ ให้อากาศ 0.4 ลิตร/นาที และหมุนวน 200 รอบ/นาที (สัญญลักษณ์โปรดดูรูปที่ 1)



รูปที่ 7 ความขุ่นและปริมาณของเชื้อหลังเพาะเชื้อ พาส์เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ใน BHI ที่อุณหภูมิ 37°ซ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $1X10^3$ CFU/มล.*



รูปที่ 8 ความขุ่นและปริมาณของเชื้อหลังเพาะเชื้อ พาส์เตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ใน BHI ที่อุณหภูมิ 37°ซ ปริมาณเชื้อเริ่มต้น $2.5X10^6$ CFU/มล. (สัญญลักษณ์โปรดดูรูปที่ 7)

●——● ปริมาณของเชื้อ (CFU/มล.) ในส่ภาพเขย่า 200 รอบ/นาที

o——o ความขุ่นของ BHI เพาะเชื้อ ในส่ภาพเขย่า 200 รอบ/นาที

o----o ความขุ่นของ BHI เพาะเชื้อในส่ภาพนิ่ง

ตารางที่ 2 ปริมาณของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A ในอาหารเหลว 8 ชนิด เพาะเชื้อในสภาพเขย่า 200 รอบ/นาที (CFU/มล.)

Media	37°C		41.5°C	
	18 hr.	24 hr.	18 hr.	24 hr.
1. Nutrient broth	4.00×10^{7}	3.00×10^{7}	0	0
2. Nutrient broth plus 0.3% yeast extract	6.20×10^{7}	5.75×10^{7}	1.50×10^{7}	1.90×10^{5}
3. Brain heart infusion broth	2.25×10^{9}	2.25×10^{9}	1.31×10^{9}	1.9×10^{8}
4. Tryptic soy broth	8.00×10^{8}	4.65×10^{6}	2.70×10^{8}	3.10×10^{6}
5. Modified tryptic soy broth	9.40×10^{8}	6.70×10^{7}	4.00×10^{6}	4.00×10^{2}
6. Tryptose broth	8.00×10^{8}	4.80×10^{8}	5.10×10^{7}	1.30×10^{7}
7. Tryptose-thiamine broth	2.50×10^{8}	1.15×10^{8}	6.00×10^{6}	1.10×10^{4}
8. Tryptose broth plus yeast extract	1.40×10^{9}	6.75×10^{8}	4.15×10^{7}	1.30×10^{2}

ตารางที่ 3 ปริมาณของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า 8:A เพาะเชื้อใน Fermentor อุณหภูมิ 37°ซ. ให้อากาศ 0.4 ลิตร/นาที และหมุนวน 200 รอบ/นาที

Media	15 hr.	18 hr.	24 hr.
1. Brain heart infusion broth	1.8×10^{9}	1.5×10^{9}	3.2×10^{8}
2. Modified tryptic soy broth	8.5×10^{8}	2.2×10^{8}	2.2×10^{7}
3. Tryptose broth plus 0.3% yeast extract	1.8×10^{8}	2.0×10^{8}	$<10^{7}$

ต่ำสุดและเชื้อตายเมื่อเพาะที่ 41.5°ซ ในชั่วโมง 18 และ 24 การบ่มเชื้อที่ 37°ซ. จะให้ปริมาณของเชื้อและความขุ่นดีกว่าการบ่มที่ 41.5°ซ. เช่นเดียวกับการเพาะเชื้อแบบอยู่นิ่ง

รูปที่ 6 และตารางที่ 3 แสดงความขุ่นและปริมาณของเชื้อใน BHI, TBY และ MTSB หลังจากเพาะเชื้อใน Fermentor พบว่าอาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ความขุ่นและปริมาณเชื้อสูงสุดคือ BHI รองลงไปคือ MTSB และ TBY ตามลำดับ โดยปริมาณเชื้อสูงสุดใน BHI ($1.8X10^9$ CFU/มล) และ MTSB ($8.5X10^8$ CFU/มล) พบในชั่วโมงที่ 15 ส่วน TBY ที่ชั่วโมง 18 ($2.0X10^8$ CFU/มล)

รูปที่ 7 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อใน BHI ที่ 37°ซ. ในสภาพเขย่า โดยมีปริมาณของเชื้อเริ่มต้น 10^3 CFU/มล. นับหาปริมาณของเชื้อและวัดความขุ่น สำหรับอัตราการเจริญเติบโตในสภาพนิ่งจะวัดหาเฉพาะความขุ่นเท่านั้น ผลปรากฏว่าในสภาพเขย่าเชื้อจะเจริญเติบโตสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 โดยมีปริมาณเชื้อ 2.6×10^9 CFU/มล. หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อจะลดลงจนเหลือ 2×10^8 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 72 ส่วนความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 27 มีค่า O.D เท่ากับ 1.9 และจะคงที่ตลอดการทดลอง สำหรับความขุ่นในอาหารเลี้ยงเชื้อ ที่อบเชื้อในสภาพนิ่ง ปรากฏว่าจะมีความขุ่นสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 มีค่า O.D เท่ากับ 0.94 หลังจากนั้นความขุ่นจะลดลงจนเหลือ 0.62 ในชั่วโมงที่ 72

รูปที่ 8 แสดงอัตราการเจริญเติบโตของเชื้อใน BHI โดยมีปริมาณของเชื้อเริ่มต้น 2.5×10^6 CFU/มล. ในสภาพเขย่า พบว่าปริมาณเชื้อสูงสุดเกิดขึ้นในชั่วโมงที่ 6 หลังจากนั้นปริมาณของเชื้อจะลดลงเหลือ 2.4×10^8 CFU/มล. ในชั่วโมงที่ 72 สำหรับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อจะสูงสุดในชั่วโมงที่ 24 มีค่า O.D เท่ากับ 1.9 และความขุ่นนี้จะยังคงที่ตลอดการทดลอง

วิจารณ์

จากการศึกษา growth curve ของเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซีด้า ใน BHI ในสภาพเขย่า บ่มเชื้อที่ 37°ซ. จะเห็นว่าได้เด่นชัดว่า logarithmic phase จะขึ้นอยู่กับปริมาณของเชื้อที่ใช้ ถ้าปริมาณเชื้อเริ่มต้นน้อย (รูปที่ 7) ระยะ logarithmic phase จะนาน 24 ชม. แต่ถ้าปริมาณเชื้อเริ่มต้นมาก (รูปที่ 8) ก็จะพบว่าค่านี้จะสั้นเพียง 6 ชม. ซึ่งจะสอดคล้องกับรายงานของสุภาพร และคณะ (2530) ที่พบว่าเชื้อจะเจริญสูงสุดในเวลา 7-$9\frac{1}{2}$ ชม. และรายงานของ Heddleston and Rhoades (1978) ที่กล่าวว่าเชื้อจะเจริญสูงสุดในระยะเวลา 16-24 ชม. การศึกษาครั้งนี้พบว่าปริมาณของเชื้อที่มีชีวิตจะไม่สัมพันธ์กับความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อ กล่าวคือ หลังจากที่ปริมาณเชื้อสูงสุด ก็จะพบว่าเชื้อจะเริ่มตาย ปริมาณของเชื้อจะลดลง แต่ความขุ่นหลังจากที่สูงสุดก็จะมีความขุ่นระดับนี้ต่อไปอีก ซึ่งตรงกันข้ามกับการทดลองในสภาพนิ่ง (รูปที่ 7, และ 8) ซึ่ง

ความขุ่นจะลดลงหลังจากที่อาหารเลี้ยงเชื้อขุ่นมากที่สุด เหตุผลที่เป็นเช่นนี้ เพราะว่าในการเพาะเชื้อในสภาพเขย่า เมื่อการเจริญเติบโตถึง Stationary phase แล้วเชื้อจะเริ่มตาย จึงทำให้ปริมาณเชื้อลดลง แต่เนื่องจากเชื้อที่ตายนี้ไม่เกิดการละลายตัวหรือเซลล์แตก (Autolysis) ดังนั้นความขุ่นของอาหารเลี้ยงเชื้อก็ยังเท่าเดิมตลอด ในขณะที่การบ่มเชื้อในสภาพนิ่งความขุ่นจะลดลง ทั้งนี้เพราะเชื้อเกิดการสลาย เนื่องจากสภาพของอาหารเลี้ยงเชื้อเสื่อมลง

เนื่องจากว่าในการเตรียมวัคซีนมักจะใช้ระยะเวลาเพาะเชื้อประมาณ 15-18 ชม. และประกอบกับระยะ Stationary phase จะเริ่มประมาณชั่วโมงที่ 6-24 (รูปที่ 8) การศึกษาเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเชื้อนี้ในอาหารทั้ง 8 ชนิด จึงเน้นการหาปริมาณของเชื้อระหว่าง ชั่วโมงที่ 18-48 หลังจากบ่มเชื้อซึ่งปรากฏว่าการเพาะเลี้ยงที่ 37^{o}ซ. จะดีกว่า 41.5^{o}ซ. เหตุผลที่เปรียบเทียบ 2 อุณหภูมินี้เพราะว่าเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า ที่ใช้ศึกษาครั้งนี้เป็นสายพันธุ์ที่แยกได้จากเป็ดเป็นโรค ซึ่งอุณหภูมิปกติของสัตว์คือ 41.5^{o}ซ. การเพาะเชื้อในสภาพเขย่าจะดีกว่าสภาพนิ่ง ทั้งนี้เพราะการเขย่าเป็นการเพิ่มอากาศทำให้เชื้อเจริญเติบโตได้ดี อาหารเลี้ยงเชื้อที่ให้ปริมาณเชื้อดีที่สุดคือ BHI รองลงไปคือ TBY, MTSB, TB และ TTB สำหรับ TSB, NBY และ NB จะให้ปริมาณเชื้อต่ำสุดตามลำดับ การเติม yeast extract ลงในอาหารเลี้ยงเชื้อจะทำให้การเจริญและจำนวนเชื้อมากขึ้น ซึ่งสนับสนุนการทดลองของ Layton (1984) ที่พบว่าการเพาะเลี้ยงเชื้อใน Tryptic soy broth และ Modified tryptose broth ที่มี 0.3% yeast extract, 0.1% saccharose, 0.1% starch และ 0.05% sodium carbonate จะให้การเจริญของเชื้อมากกว่าใน Nutrient broth การให้อากาศ จะทำให้มีการเจริญดีกว่าแบบอยู่นิ่ง นอกจากนี้ การเจริญของเชื้อ เมื่อใช้ Modified tryptose broth เพาะเลี้ยงใน aerated carboys ขนาด 20 ลิตร โดยบรรจุอาหาร 15 ลิตร ใช้ inoculum 1% บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 37^{o}ซ. นาน 24 ชั่วโมง พบว่าได้จำนวนเชื้อ 1×10^{10} CFU/มล. โดยค่าความขุ่น 0.9-1.0 ที่ 525 นาโนเมตร และในการทดลองของ Layton และ Sandhu (1984) ในการเพาะเลี้ยงเชื้อ *Pasteurella anatipestifer* แต่พบว่า ให้ค่าความขุ่นใน aerated carboys มากกว่า 3 เท่า โดยมีจำนวนเชื้อที่มีชีวิตมากกว่า 1 เท่าใน Tryptose broth

สำหรับการเพาะเชื้อใน Fermentor ครั้งนี้ปรากฏว่าปริมาณเชื้อไม่สูงกว่าการเพาะเชื้อแบบเขย่า และเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาของ สุภาพร และคณะ (2530) ซึ่งใช้ MTSB ปรากฏว่าปริมาณเชื้อที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เมื่อใช้ BHI จะได้ปริมาณเชื้อต่ำกว่า ประมาณ 10 เท่า

และเมื่อใช้ MTSB และ TBY จะได้ผลต่ำกว่าประมาณ 100 เท่า เหตุผลที่เป็นเช่นนี้เข้าใจว่าปริมาณอากาศที่ให้คือ 0.4 ลิตร/นาที นั้นน้อยเกินไป

ผลจากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่าในการเตรียมเชื้อเพื่อให้ได้ปริมาณมากสำหรับนำไปเตรียมเป็นวัคซีนควรใช้ Brain heart infusion broth ซึ่งวัคซีนที่เตรียมจากอาหารชนิดนี้ จะต้องทดสอบหาประสิทธิภาพความคุ้มโรคว่า จะได้ผลดีเท่ากับวัคซีนที่มีอยู่ในปัจจุบันหรือไม่ ซึ่งถ้าได้ผลดีควรใช้อาหารนี้ในการเตรียมวัคซีนระดับอุตสาหกรรมต่อไป

เอกสารอ้างอิง

สุภาพร จ่องพานิช, นิเทศ เลิศลิมชลาลัย และ องอาจ พรหมศร 2530. การศึกษาอัตราเจริญเติบโตของเชื้อ *Pasteurella multocida* serotype 8:A สัตวแพทยสาร 38 (3):23-27.

อารีรัตน์ ลออปักษา, สันติ ถุงสุวรรณ เกรียงศักดิ์ ล่ายธนู, โสมพัต วงศ์ล่วาง, เกรียงศักดิ์ พูนสุข, นิคม ชัยคิริ. 2530. วัคซีนอหิวาต์เป็ด - ไก่ และภาพิโรคเป็ด. ภูมิคุ้มกันโรคในเป็ดหลังจากฉีดแบคทีรินเตรียมด้วยวิธีต่าง ๆ กันจากเชื้อ พาสเตอเรลล่า มัลโตซิด้า. เวชชสารสัตวแพทย์ 17(4):315-324.

Alexander, A.M. and Saltys, M.A. 1973. Relationship of serum agglutinins to protective immunity produced in turkeys immunized against fowl cholera. J. Comp. Path. 83:191-198.

Anon. 1985. Fowl cholera vaccine. In: British Veterinary Codex. 1965. Suppl. 1976. Pharmaceutical Society, London. 162-164.

Bhasin, J.L. and Liberstein, E. 1988. Fowl cholera in turkeys: The efficacy of adjuvant bacterins. Avian Dis: 139-169.

Chute, M.L., 'Meara, D.C. and Gershman, M. 1962, Bacterian and drugs for the control of experimental fowl cholera. Avian Dis. 6:7-13.

Coates, S.R., Jensen, H.N. and Brown, E.D. 1977. The response of turkeys to varying dose of live oral *Pasteurella multocida* vaccine. Poultry Sci. 51:273-276.

Derieus, W.T. of 1984. Response broiler-type chickens to live *Pasteurella multocida* -Duration of immunity and minimum dose. Avian. Dis. 28(1):281-284.

Dougherty, E. 1965. The efficacy of several immunizing agents for the control of fowl cholera in the white pekin duck. Cor. Vet. 13:421-427.

Heddleston, K.L. 1962. Studies on *Pasteurellosis*. V. The immunogenic types of *Pasteurella multocida* associated with fowl cholera. Avian Dis. 6:315-321.

Heddleston, K.L. and Rhoades, K.R. 1978. Avian pasteurellosis. In:Diseases of Poultry. 7 edition Hofstad M.S. (ed.). The Iowa State University Press, Ames. pp. 181-185.

Kodama, K., Matsumoto, M. and Snow, L.M. 1981. Immunogenicity of capsular antigens of *Pasteurella multocida* in turkeys. Am. J. Vet. Res. 42 (11):1838-1841.

Layton, H.W. 1984. Efficacy of Broth-Grown *Pasteurella multodica* Bacterins in Ducklings. Avian Dis. 28(4):1086-1095.

Layton, H.W. and Sandhu, T.S. 1984. Protection of Duckling with a

Broth-Grown *Pasteurella anatipestifer* Bacterin. Avian Dis. 28 (3):718-726.

Michael, A., Geier, E. and Konshtok, R. 1980. Attenuated Live Fowl cholera Vaccine III. Laboratory and Field Vaccination Trials in Turkeys and Chickens. Avian Dis. 24(4): 878-885.

Nathanson, R.M., Hofstad, M.S. and Jeska, E.L. 1980. *Pasteurella multocida:* Antibody - Mediated Resistance to Virulent Challenge Exposure in Vaccinated Turkeys. Am. J. Vet. Res. 41(8):1285-1287.

Okerman, L. and Spanoghe, L. 1981. Protective Effects of Inactivated Pasteurella Vaccines in Specific Pathogen Free Rabbits. Comp. Immun. Microbiol. Infect. Dis. 2:223-228.

Olson, L.D., McCune, E.L. and Bond, R.E. 1968. Comparison of commercial and autogenous bacterins for control of the cranial form of fowl cholera in turkey. Avian. Dis. 12:252-260.

Rebers, P.A. and Heddleston, K.L. 1978. Folw Cholera: Induction of Cross-Protection in Turkeys with Bacterins Prepared from Host-Passaged *Pasteurella Multocida*. Avian Dis. 21(1):50-56.

Summary
The Growth of *Pasteurella multocida* in Different Liquid Media

Areerat Laorpaksa[1]
Saree Virunhaphol[1]
Kriengsag Saitanu[2]
Navarat Charujinda[2]
Santi Thoongsuwan[2]

Thai J. Vet. Med. 19(3);1989:109-121.

The growth of *Pasteurella multocida* serotype 8:A, a duck strain, in eight types of culture media was studied. It was found that the highest growths were in brain heart infusion broth, tryptic broth plus 0.3% yeast extract, and modified tryptic soy broth, respectively, followed by Tryptose broth, Tryptic soy broth and Tryptose-thiamine broth. Nutrient broth and Nutrient broth plus 0.3% yeast extract provided the lowest number of cells. The optimal condition for growth was incubation at 37°C for 18 hours. Use of a fermentor or shaking gave better results than stationary incubation. The maximum growth in brain heart infusion broth, under shaken conditions, exceeded 2.25×10^9 colony-forming units per ml with an optical density of 1.8 at a wavelength of 540 nm.

---

[1]Department of Microbiology, Faculty of Pharmaceutical Science,
[2]Division of Microbiology, Department of Pathology, Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok 10330