บทคัดย่อ

T 159459

การวิจัยในครั้งนี้ได้ศึกษาวิธีการในการสกัดดีเอนเอและใช้เทคนิค polymerase chain reaction (PCR) เพื่อศึกษาแบคทีเรียในกระเพาะรูเมน โดยทำการทดลองในโคเนื้อที่ทำการเจาะกระเพาะรูเมนแบบถาวรจำนวน 4 ตัว โคเนื้อได้รับอาหารข้นที่มีมันสำปะหลังเป็นแหล่งพลังงานหลัก 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และฟางข้าวแบบเต็มที่ ในช่วงระยะทดลอง 14 วัน ในช่วงวันสุดท้ายของระยะทดลองทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนในช่วง 2 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหารและทำการวัดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิทันที หลังจากนั้นนำของเหลวไปตรวจนับจำนวนแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยโดยวิธี roll tube technique และทำการศึกษาขนาดของดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มนี้ในเบื้องต้นโดยใช้ 16s rRNA probes และใช้เทคนิค PCR ทำการเก็บโคโลนีแบคทีเรียที่ย่อยสลายเยื่อใยที่เพาะเลี้ยง เพื่อทำการสกัดดีเอ็นเอโดยใช้ QIAGEN Tissue extraction kit และทดสอบขนาดดีเอ็นเอโดยใช้ universal primer จากการทดลองพบว่า โคเนื้อมีปริมาณการกินได้ทั้งหมดเท่ากับ 7.3 กิโลกรัมต่อตัวต่อวัน หรือประมาณ 2.0 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว ค่าความเป็นกรด-ด่างในกระเพาะรูเมนเท่ากับ 6.6 และอุณหภูมิภายในกระเพาะรูเมนเท่ากับ 38.7 องศาเซลเซียส และพบว่าจำนวนประชากร cellulolytic bacteria เท่ากับ 5.7×10^8 CFU/ml เมื่อทำการศึกษาขนาดของดีเอ็นเอของแบคทีเรียกลุ่มนี้ พบว่า เป็นแบคทีเรียแกรมลบ และมีขนาดดีเอ็นเอประมาณ 650 bp นอกจากนี้ ยังได้ทำการศึกษาการสกัดดีเอนเอของแบคทีเรียจากของเหลวจากกระเพาะรูเมน พบว่า สามารถสกัดดีเอนเอของแบคทีเรียได้ผลเป็นที่น่าพอใจ แต่อย่างไรก็ตาม ควรมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องในเรื่องนี้ โดยใช้ specific primer ในการจำแนกแบคทีเรียเหล่านี้ เพื่อให้ทราบชนิดแบคทีเรียที่มีบทบาทที่สำคัญอันจะนำไปสู่การพัฒนาการผลิตสัตว์เคี้ยวเอื้องต่อไป

This experiment was using the Polymerase Chain Reaction Technique (PCR) to study DNA extraction method of rumen bacteria. Four fistulated castrated male crossbred cattle were used in this experiment. During 14 days, all animals were fed on concentrates which contained cassava chip as major energy source at 0.3% of body weight and rice straw on ad libitum basis. Rumen fluid samples were collected on the last day at 2 and 4 hour post-feeding, rumen pH and temperature were measured immediately after the fluid was sampled and then counted for cellulolytic bacteria by using roll tube technique. Colonies were individually picked and mixed with distilled water. Cells were lysed through microwave disruption and DNA was extracted using a GenElute Bacterial Genomic DNA kit. PCR was performed by using universal bacteria primers amplifying a fragment on the 16S rRNA gene. The results revealed that intake of rice straw was 7.3 kg/hd/d (2.0 %BW), ruminal pH and temperature were 6.6 and 38.7 $^{\circ}$C, respectively. Cellulolytic bacteria count was 5.7×10^8 CFU/ml, while DNA size of gram negative bacteria was circa 650 bp. In addition, other DNA extraction technique from fresh rumen fluid sample was performed and it was found that this technique was satisfactory. Further work should be carried out to sequence the above fragments and identify species-specific probes to be used as an integrated method to simultaneously detect different species in the rumen.