ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันในของเหลวจากกระเพาะรูเมน และพลาสมา

การวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันในของเหลวจากกระเพาะรูเมน และพลาสมา (Czauderna and Kowalczyk, 2001)

1. การเตรียม standard กรดไขมัน

1.1 นำกรดไขมันบริสุทธิ์ (HPLC grade) ได้แก่ กรดไขมันลัวริค (lauric acid, C12:0), กรดไขมันไมลิสติค (myristic acid, C14:0), กรดไขมันปาล์มิกติค (palmitic acid, C16:0), กรดไขมันสเตียริค (steric acid, C18:0) และกรดไขมันลิโนเลอิค (linoleic acid, C18:2) มาเติมด้วย dibromacetophenone (12 g/l ใน acetone) 0.5 มิลลิลิตร และ triethylamine (10 g/l ใน acetone) 0.5 มิลลิลิตร ในขวดสีชาขนาด 5 มิลลิลิตร โดยเตรียมให้มีความเข้มข้นดังนี้

- กรดไขมันลัวริคและกรดไขมันไมลิสติค ความเข้มข้น 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 และ 2.5 ไมโครโมลต่อลิตรสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในของเหลวจากกระเพาะรูเมน และความเข้มข้น 5, 10, 15, 20 และ 25 ไมโครโมลต่อลิตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในพลาสมา
- กรดไขมันปาล์มิติคและกรดไขมันสเตียริค ความเข้มข้น 1, 2, 3, 4 และ 5 ไมโครโมลต่อลิตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในของเหลวจากกระเพาะรูเมน และความเข้มข้น 60, 70, 80, 90 และ 100 ไมโครโมลต่อลิตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในพลาสมา
- กรดไขมันลิโนเลอิค ความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 นาโนโมลต่อลิตร สำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในของเหลวจากกระเพาะรูเมน และความเข้มข้น 10, 20, 30, 40 และ 50 ไมโครโมลต่อลิตรสำหรับวิเคราะห์ความเข้มข้นในพลาสมา

* ควรทำการตรวจเอกสารก่อนว่าในงานทดลองที่มีลักษณะที่คล้ายกันนี้มีความเข้มข้นของกรดไขมันแต่ละชนิดในช่วงเท่าไรในตัวอย่างที่ต้องการวิเคราะห์

1.2 นำเข้า water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พร้อม shaker ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง โดยป้องกันจากแสง

1.3 นำออกจาก water bath เติมด้วย acetic acid (2 g/l ใน acetone) 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยา

1.4 เก็บภายใต้อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส และป้องกันแสง เพื่อรอวิเคราะห์

2. การเตรียมตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์

2.1 กระบวนการไฮโรไลซิส (hydrolysis)

2.1.1 นำตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน 2 มิลลิลิตร หรือพลาสมา 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดสีชาขนาด 50 มิลลิลิตร เติม 2 *M* NaOH ปริมาตร 4 มิลลิลิตร ป้องกันไม่ให้โดนแสง

2.1.2 นำเข้าตู้อบอุณหภูมิ 85-95 องศาเซลเซียส เพื่อให้เกิดกระบวนการไฮโดรไลซิส เป็นเวลา 40 นาที ป้องกันไม่ให้โดนแสง

2.1.3 นำออกจากตู้อบแล้วทิ้งให้เย็น ปรับค่าความเป็นกรด-ด่างให้ได้ประมาณ 2 ด้วย 4 *M* HCl

2.1.4 สกัดกรดไขมันอิสระด้วย dichloromethane 3.5 มิลลิลิตร จำนวน 4 ครั้ง

2.1.5 แยกและนำชั้นของ dichloromethane ออกด้วยบิวเร็ต (burette) แล้วนำเข้าตู้อบอุณหภูมิห้องเพื่อให้ dichloromethane ระเหยออก ส่วนที่เหลือในขวด (residue) นำไปเข้าขั้นตอนต่อไป

2.1.6 ทุกขั้นตอนป้องกันไม่ให้โดนแสง

2.2 กระบวนการ derivatization

2.2.1 นำสิ่งที่เหลือ (residue) จากกระบวนการไฮโดรไลซิสมาเติมด้วย dibromacetophenone (12 g/l ใน acetone) 0.5 มิลลิลิตร และ triethylamine (10 g/l ใน acetone) 0.5 มิลลิลิตร

2.2.2 นำเข้า water bath อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส พร้อม shaker ทิ้งให้ทำปฏิกิริยา 2 ชั่วโมง โดยป้องกันจากแสง

2.2.3 นำออกจาก water bath เติมด้วย acetic acid (2 g/l ใน acetone) 50 ไมโครลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส

2.2.4 เก็บภายใต้อุณหภูมิ -25 องศาเซลเซียส และป้องกันแสง เพื่อรอวิเคราะห์

3. การวิเคราะห์ความเข้มข้นของกรดไขมันด้วยเครื่อง high pressure liquid chromatography (HPLC)

3.1 องค์ประกอบเครื่อง HPLC สารละลาย และระบบการวิเคราะห์

เครื่อง HPLC ประกอบด้วยเครื่องควบคุมส่วนกลางคือ Waters 600 controller เครื่องตรวจวัดความเข้มของสารคือ Waters 486 Tunable Absorbance Detector คอลัมน์คือ NOVA-PAK C18 3.9x300 mm Column และระบบวิเคราะห์และประมวลผลคือ Waters PC 800 integrator Version 2.0

Mobile phase คือสารละลาย acetonitrile-water (85:15, v/v) อัตราการฉีด 2.0 มิลลิลิตร/นาที ปริมาตรการฉีด 20 ไมโครลิตร อุณหภูมิคอลัมน์ประมาณ 45 องศาเซลเซียส อุณหภูมิภายนอกเครื่อง 25 องศาเซลเซียส ความดันสูงสุดภายในเครื่อง 2500 psi ความยาวคลื่น 254 นาโนเมตร ระยะเวลาวิเคราะห์ (run time) 50 นาทีต่อตัวอย่าง และเวลาพักระหว่างตัวอย่าง 10 นาที

3.2 วิธีคำนวณหาความเข้มข้นของกรดไขมันในตัวอย่าง

นำค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ standard ได้แก่ ความเข้มข้นของกรดไขมันที่เตรียม ความสูงของกราฟ ไปวิเคราะห์หาสมการเชิงถดถอย (regression equation) ในโปรแกรม SAS (1997)

เพื่อนำมาทำนายความเข้มข้นของกรดไขมันในตัวอย่าง โดยเลือกกราฟที่มีเวลา (run time) ของ peak ตรงหรือใกล้เคียงกับกราฟของ standard มากที่สุด โดยสมการที่ได้จากการวิเคราะห์ได้แก่

ความเข้มข้นของกรดไขมันลิวริค = 4.23×10^{-8} x ความสูงของกราฟ
ความเข้มข้นของกรดไขมันไมลิสติค = 5.26×10^{-8} x ความสูงของกราฟ
ความเข้มข้นของกรดไขมันปาล์มิติค = 5.37×10^{-8} x ความสูงของกราฟ
ความเข้มข้นของกรดไขมันสเตียริค = 6.75×10^{-8} x ความสูงของกราฟ
ความเข้มข้นของกรดไขมันลิโนเลอิค = 3.64×10^{-8} x ความสูงของกราฟ

ภาคผนวก ข
เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

1. การศึกษาเกี่ยวกับ Microscopic direct count (Galyean, 1989) ซึ่งได้แก่

Bacteria count

Protozoa count

Fungal zoospores count

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1.1 สารเคมี

- Normal saline (0.85% w/v)
- Formalin (10% v/v)
- น้ำกลั่น

1.1.2 อุปกรณ์

- Haemacytometer ขนาด กว้าง 1 มิลลิเมตร ยาว 1 มิลลิเมตร และลึก 0.1 มิลลิเมตร
- ขวดพลาสติกสำหรับเก็บตัวอย่าง ขนาด 30 มิลลิลิตร
- สไลด์พร้อม cover glass
- บีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร
- กระดาษทิชชู
- หลอดทดลองขนาด 20 มิลลิลิตร
- ปิเปต
- กล้องจุลทรรศน์ (Model Olympus BX50)

1.2 การเตรียม formalin 10% in normal saline (fixing solution)

1.2.1 เตรียม normal saline ให้มีความเข้มข้น 0.85% (w/v)

1.2.2 เตรียม formalin ให้มีความเข้มข้น 10% (v/v) โดยใช้ normal saline (0.85%) เป็นตัวทำละลาย

1.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

1.3.1 ทำการสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่กล่าวในบทที่ 3 (หัวข้อ 3.) โดยสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนมา 1 มิลลิลิตร แล้วเติม formalin 10% 9 มิลลิลิตร ทันที หลังจากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอการนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ต่อไป

1.3.2 นำตัวอย่างที่เก็บได้มาทำการนับจำนวนของแบคทีเรีย, โปรโตซัว และเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ดังรายละเอียดดังนี้

แบคทีเรีย (bacteria count)

1. ทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างอีกครั้ง จากเดิม 10 เท่า เป็น 100 เท่า โดยการดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ (autoclave 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที) 9 มิลลิลิตร

2. ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างจากหลอดหยดลงบน haematocytometer แล้วทำการนับโดยนับจำนวน 20 ช่องเล็ก ใช้กำลังขยาย 400 เท่า ในแนวทแยงมุม โดยนับจำนวน 2 ซ้ำ และคำนวณหาค่าเฉลี่ยจำนวนประชากรแบคทีเรีย โดยใช้สูตร

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรแบคทีเรีย

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4 x 106

โปรโตซัว (protozoa count)

ทำการนับจากตัวอย่างที่เก็บมาได้เลยโดยไม่ต้องทำการเจือจางอีก โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า โดยนับทั้งหมด 400 ช่องเล็ก (1 ช่องใหญ่) ทำการนับ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการคำนวณประชากรโปรโตซัวโดยใช้สูตร

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรโปรโตซัว

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1 x 104

เชื้อรา (fungal zoospores count)

ทำการนับเช่นเดียวกับโปรโตซัว แต่นับเพียง 25 ช่องกลาง ทำการนับ 2 ซ้ำ และคำนวณหาจำนวนประชากรเชื้อราดังนี้

$$Y + X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรเชื้อรา

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.5 x 105

2. การศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่สำคัญโดยวิธี Roll tube technique (Hungate, 1969)

กลุ่มของแบคทีเรียที่ศึกษามี 3 กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่

Total viable bacteria

Cellulolytic bacteria

Proteolytic bacteria

Amylolytic bacteria

2.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

2.1.1 อาหารเลี้ยงเชื้อและสารเคมี

1. Total viable medium
2. Cellulolytic medium
3. Proteolytic medium
4. Amylolytic medium
5. Anaerobic dilution solution
6. HCl 0.1 N
7. $NaHCO_3$ 0.1 N

2.1.2 เครื่องแก้ว

1. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างฝาเกลียวขนาด 60 มิลลิลิตร
2. ขวดปริมาตร 30 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง
3. ขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร พร้อมจุกยาง
4. บีกเกอร์ขนาด 30 และ 50 มิลลิลิตร
5. Erlenmeyer flask ปริมาตร 1 และ 2 ลิตร
6. จุกยางเจาะรู 2 รู ใช้ท่อแก้วต่อสายยางยาวให้มีขนาดพอกับรู

2.1.3 อุปกรณ์

1. เข็มฉีดยาปลอดเชื้อขนาด 0.55 x 25 มิลลิลิตร, 24G x 1 นิ้ว
2. กระบอกฉีดยาปลอดเชื้อ ปริมาตร 1 และ 100 มิลลิลิตร
3. ถาดสำหรับใส่น้ำและน้ำแข็ง
4. ถาดสำหรับน้ำร้อนอุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส
5. กระดาษฟอล์ย
6. ยางรัดของ
7. rack วางขวด
8. ฟองน้ำเช็ดโต๊ะ พร้อมน้ำยาฆ่าเชื้อ
9. ผ้าเช็ดมือ
10. ตะกร้าวางขวด

2.1.4 เครื่องมือ

1. Autoclave
2. Incubator
3. Hot air oven
4. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง
5. ถังก๊าซ CO_2 ขนาดบรรจุ 25 กิโลกรัม
6. Hot plate พร้อม magnetic stirrer และ magnetic bar
7. Colony counters พร้อม marking-counter pen
8. pH meter

2.2 อาหารเลี้ยงเชื้อและส่วนประกอบ

2.2.1 Anaerobic dilution solution

mineral solution A	54.0 ml
mineral solution B	45.0 ml
cysteine hydrochloride	0.05 g
Na_2CO3	0.30 g
resazurin	0.0001 g
distilled water	65.0 ml

2.2.2 Cellulose medium (Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.0 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1.0 g
cellulose powder	1.0 g
$NaHCO_3$	0.4 g
cysteine hydrochloride	0.05 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.3 Proteolytic medium (Casein medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml

agar	2.5 g
resazurin	0.0001 g
tryptose	0.3 g
casein	0.5 g
cystein hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.5 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.4 Amylolytic medium (Starch medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.5 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1.0 g
soluble starch	(0.5 g ละลายในน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตร)
cystein hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.5 g
distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

2.2.5 Total viable count medium (complete medium; Hobson, 1969)

mineral solution A	15.0 ml
mineral solution B	15.0 ml
clarified rumen fluid	20.0 ml
agar	2.0 g
resazurin	0.0001 g
bacto casitone	1 g
yeast extract	0.25 g
cellobiose	0.5 g
glucose	0.5 g
sodium lactate	0.2 g
cysteine hydrochloride	0.05 g
$NaHCO_3$	0.4 g

distilled water	to 100 ml
pH	6.8-7.0

การเตรียม mineral solution A

K_2HPO_4	3 g
distilled water	1000 ml

การเตรียม mineral solution B

KH_2PO_4	3.0 g
$(NH_4)_2SO_4$	6.0 g
NaCl	6.0 g
$MgSO_4.7H_2O$	0.6 g
$CaCl_2.2H_2O$	0.2 g
distilled water	1000 ml

การเตรียม clarified rumen fluid (CRF)

นำของเหลวจากกระเพาะรูเมนประมาณ 1 ลิตร ทำการกรองด้วยผ้ากรอส 4 ชั้น และนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ด้วยความเร็ว 30100 x g นาน 30 นาที เก็บเอาเฉพาะส่วนที่เป็นของใส นำไปเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ได้นาน 30 วัน เพื่อใช้ในการเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อแบคทีเรีย

หมายเหตุ: ควรมีการเตรียม CRF ของสัตว์ทุกตัวที่ได้รับอาหารแตกต่างกัน

2.3 การเตรียม anaerobic dilution solution

2.3.1 ต้มน้ำกลั่นจนเดือดเพื่อไล่อากาศ แล้วทิ้งไว้ให้เย็นจนมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง แล้วนำไปเตรียม mineral solution A และ B ดังที่กล่าวไปแล้ว

2.3.2 นำ erlenmeyer flask ขนาด 1000 มิลลิลิตร มาทำการตวงส่วนประกอบต่าง ๆ และเทลงใน flask ให้ครบตามหาปริมาตรที่เราต้องการเตรียม ยกเว้น cysteine HCl แล้วนำ flask ขึ้นตั้งบน hot plate ที่มี magnetic stirrer

2.3.3 ปิด flask ด้วยจุกยางที่มีท่อนำก๊าซ CO_2 เข้าและท่อนำสารละลายออก

2.3.4 เปิด hot plate ให้มีอุณหภูมิประมาณ 40-50 องศาเซลเซียส พร้อมทั้งเปิด สวิทช์ magnetic stirrer ให้มีความเร็วรอบปานกลาง

2.3.5 ปล่อยก๊าซ CO_2 เข้าไปใน flask ที่บรรจุสารละลาย จนกระทั่งสีของ resazurin เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเข้มเป็นสีชมพูอ่อน ๆ จึงเติม cysteine HCl ลงไป

2.3.6 ปิดท่อระบายอากาศที่อยู่บน flask เพื่อให้สารละลายออกมาโดยที่ขณะนั้นยังผ่านก๊าซ CO_2 อยู่ นำบีกเกอร์ขนาด 50 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายให้ได้ปริมาณ 30 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัด pH ด้วย pH meter เพื่อให้ได้ pH 6.8 โดยทำการปรับ pH ด้วย HCl 0.1 N และ/

หรือ $NaHCO_3$ 0.1 N จากนั้นทำการคำนวณปริมาตร HCl หรือ $NaHCO_3$ ที่ต้องใช้ในการปรับ pH สารละลายทั้งหมด

2.3.7 เมื่อปรับค่า pH ของสารละลายได้ตามที่ต้องการแล้ว จำขวดปริมาตร 10 มิลลิลิตร มารองรับสารละลายจาก flask ให้มีปริมาตรเท่ากับ 4.5 มิลลิลิตร โดยเทียบกับระดับของน้ำที่ตวงไว้ในขวดตัวอย่าง

2.3.8 นำขวดที่บรรจุสารละลายแล้วมาผ่านก๊าซ CO_2 อีกครั้งจนสังเกตได้ว่าไม่มีสี จึงปิดด้วยจุกยาง และใช้กระดาษฟอล์ยหุ้มอีกครั้งแล้วรัดด้วยยางรัดของให้แน่น

2.3.9 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที เพื่อนำไปใช้ในการ dilute ตัวอย่างต่อไป

2.4 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.4.1 ชั่ง agar ใส่ขวดที่มีปริมาตร 30 มิลลิลิตร ขวดละ 0.1 กรัม สำหรับ Cellulolytic และ Amylolytic medium และ 0.25 กรัม สำหรับ Total viable และ casein medium

2.4.2 ทำการชั่งสารและเตรียมสารละลายต่าง ๆ ตามสูตรอาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะของแต่ละกลุ่มแล้วทำเช่นเดียวกับการเตรียม anaerobic dilution solution

2.4.3 เมื่อทำการปรับ pH ได้แล้วให้นำขวนที่มี agar บรรจุอยู่ มารองรับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.4.4 ผ่านก๊าซ CO_2 เข้าไปในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละขวดนาน 1 นาที หลังจากนั้นปิดด้วยจุกยาง และใช้กระดาษฟอล์ยหุ้มอีกชั้นแล้วรัดด้วยยางรัดของให้แน่น

2.4.5 นำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที

2.4.6 นำขวดออกจาก autoclave ทำการเขย่าขวดเพื่อให้วุ้นที่ละลายกระจายไปทั่วขวด

2.4.7 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียส โดยให้ระดับน้ำใน water bath มีระดับสูงกว่าระดับอาหารเลี้ยงเชื้อในขวด เพื่อรอการ inoculate เชื้อต่อไป (กรณีมีการเตรียมไว้ก่อนล่วงหน้า ก็ไม่ต้องทำในข้อ 2.4.7 ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในที่ที่ปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปลอมปนของเชื้อจากภายนอก)

2.5 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)

2.5.1 ล้วงเก็บตัวอย่างผ่านท่อ fistular นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น และรีบบรรจุในขวดเก็บตัวอย่างฝาเกรียว ขนาด 60 มิลลิลิตร จนเต็ม

2.5.2 นำมาเก็บในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส เพื่อนำขึ้นมาที่ห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด เพื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไป

2.5.3 นำตัวอย่างมาผ่านก๊าซ CO_2 ทันที และทำการเจือจางด้วย tween 80 ในสัดส่วน tween 80 4 ส่วน ต่อ rumen fluid 1 ส่วน จากนั้นทำการเขย่าแรง ๆ ทั้งนี้เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะอยู่กับชิ้นอาหารหลุดออกมา

2.6 การเจือจาง rumen fluid

ทำการเจือจาง rumen fluid ให้มีความเจือจางลดลงระดับละ 10 ตามลำดับ ตั้งแต่ 100, 10^{-1}, 10^{-2} ไปจนถึง 10^{-7} โดยใช้เทคนิคของ Macy et al. (1972)

2.6.1 เขียนระดับความเจือจางลงบนขวด anaerobic dilution solution แต่ละขวด

2.6.2 ใช้เข็มฉีดยาพร้อมกระบอกฉีดยาปลอดเชื้อเสียบลงในขวด rumen fluid ที่ผสมกับ tween 80 ดูดสารละลายมา 0.5 มิลลิลิตร โดยทำการไล่อากาศและเช็ดทำความสะอาดเข็มด้วยสำลีปลอดเชื้อ

2.6.3 ในไปฉีดลงในขวด anaerobic dilution solution ที่ 1 ซึ่งเป็นระดับ dilution เป็น 10-1 จากนั้นคว่ำขวดลงในแนวดิ่งเพื่อดูดสารละลายล้างเข็ม 1 ครั้ง เป็นการล้างเอา rumen fluid ที่ติดอยู่กับผิวของกระบอกฉีดยา เขย่าขวดให้ rumen fluid กระจายให้ทั่วหลอด

2.6.4 นำกระบอกฉีดยาพร้อมเข็มอันใหม่มาดูดสารละลายจากขวด anaerobic dilution solution ที่ 1 มา 0.5 มิลลิลิตร แล้วนำไปฉีดลงขวด anaerobic dilution solution ที่ 2 ทำเช่นเดียวกันกับรายละเอียดในข้อ 2.6.3 จนกระทั่งถึงระดับการเจือจางที่ 10^{-7} หรือขวด anaerobic dilution solution ที่ 7 (หากพบว่าสีของสารละลายในขวดมีการเปลี่ยนแปลงจากไม่มีสีเป็นสีชมพูหรือม่วง แสดงว่าภายในขวดมีก๊าซออกซิเจน ซึ่งจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ภายในขวดนั้น ๆ ต้องทำการเตรียม anaerobic dilution solution ใหม่)

2.6.7 นำสารละลายไปทำการ inoculate ในอาหารเฉพาะ โดยใช้ roll-tube technique ตามวิธีการของ Hungate (1969)

2.7 การทำ roll tube technique (Hungate, 1969)

2.7.1 เลือกขวด dilution ที่เหมาะสมกับกลุ่มของแบคทีเรียที่ต้องการจะเลี้ยง เช่น total viable bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-5}, 10^{-6} และ 10^{-7} cellulolytic bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-6} และ 10^{-7} proteolytic และ amylolytic bacteria เลือกใช้ที่ระดับ 10^{-5} และ 10^{-6}

2.7.2 นำขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มต่าง ๆ มาเขียนระดับความเจือจาง และปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยทุกกลุ่มแบคทีเรียจะใช้ปริมาตร 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร (ในการเลี้ยงเชื้อควรมีการเลี้ยงเชื้อทุก dilution และหลายปริมาตรก่อน เพราะงานทดลองแต่ละงานจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะทำให้ประชากรของแบคทีเรียแตกต่างกันไปด้วย)

2.7.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารลี้ยงเชื้อ ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ดูดสารละลายจากขวด dilution ที่เลือกไว้ ในปริมาตรที่เลือกไว้เช่นเดียวกัน (0.2 หรือ 0.5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปฉีกลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละกลุ่ม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องต้มให้ละลายและรักษาอุณหภูมิที่ 50-55 องศาเซลเซียส ผสมตัวอย่างให้กระจายทั่วขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปกลิ้งขนถาดน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวกระจายรอบ ๆ ขวด ใช้ผ้าซับน้ำรอบ ๆ ขวดให้แห้ง แล้วนำไปวางไว้บนตะกร้า โดยคว่ำปากขวดลงด้านล่าง

จากนั้นนำไปบ่ม (incubate) ที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยแบคทีเรียกลุ่ม total viable และ Proteolytic bacteria ทำการบ่มเป็นเวลา 5 วัน กลุ่ม amylolytic bacteria บ่มเป็นเวลา 3 วัน และกลุ่ม cellulolytic bacteria บ่มเป็นเวลา 21 วัน

2.8 การตรวจนับจำนวนแบคทีเรีย (colony forming unit, CFU)

2.8.1 นำขวดอาหารเลี้ยงเชื้อไปวางในแนวนอนบน colony counter แล้วจึงนับจำนวนโคโลนีโดยมองผ่านแว่นขยาย เลือกนับเฉพาะระดับความเจือจางที่มีจำนวนโคโลนีระหว่าง 20-50 โคโลนี โดยให้นับทุกซ้ำที่สามารถนับได้ แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ย โดยให้นับเฉพาะโคโลนีที่มีลักษณะดังนี้

total viable bacteria ให้นับทุกโคโลนี

cellulolytic และ Proteolytic bacteria ให้นับเฉพาะโคโลนีที่มี clear zone รอบ ๆ

amylolytic bacteria ให้ปิเปต 3% iodine solution ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดเลี้ยงเชื้อ แล้วกลิ้งขวดไปมาบนโต๊ะจน iodine solution ซึมเข้าไปในเนื้อวุ้น ทิ้งไว้สักครู่ iodine จะทำปฏิกิริยากับแป้งที่เหลือในอาหารเลี้ยงเชื้อปรากฏเป็นสีน้ำเงิน ให้เลือกนับเฉพาะโคโลนีที่ไม่เกิดสีน้ำเงินรอบ ๆ โคโลนี

2.8.2 การคำนวณ colony forming unit (CFU) ต่อ rumen fluid 1 มิลลิลิตรทำได้จาก CFU/ml = (1 x จำนวนโคโลนีที่นับได้) / (ปริมาตร x dilution factor)

2.8.3 คำนวณหาค่า standard error of the means (SEM)

2.8.4 บันทึกจำนวนแบคทีเรียในรูปค่าเฉลี่ย ± SEM

2.8.5 ทำการคำนวณแบคทีเรียทุกกลุ่มตามรายละเอียดในข้อ 2.8.2