ภาคผนวก

ภาคผนวก ก
อาหารอัดเม็ดแคส-แบน

อาหารอัดเม็ดแคส-แบน

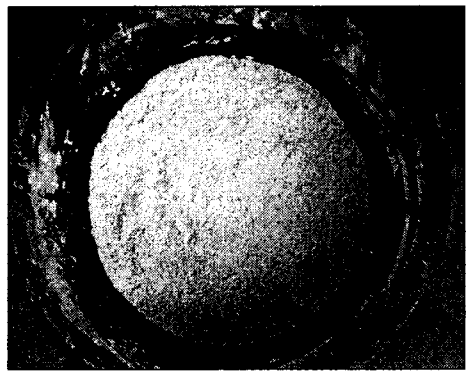
การเตรียมอาหารอัดเม็ดแคส-แบน

เลือกผลกล้วยดิบที่มีความแก่ประมาณ 7 0 เปอร์เซ็นต์ ผลมีเหลี่ยมชัดเจน นำมาหั่นแล้วตากแดดให้แห้งประมาณ 2-3 วัน จากนั้นนำมันเส้นและกล้วยดิบไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ทำการผสมให้เข้ากันตามสัดส่วนในแต่ละสูตร โดยแต่ละสูตรมีส่วนประกอบของกำมะถันในอัตราส่วนของ N:S เท่ากับ 10:1 และเกลือ 0.5 กิโลกรัม ก่อนนำไปอัดเม็ดเติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยเพิ่มความชื้นและการประสานตัว หลังจากอัดเม็ดนำไปตากแดดให้แห้งเป็นเวลา 2 วัน หรือให้มีความชื้นประมาณ 15 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงนำมาผสมในสูตรอาหารข้น

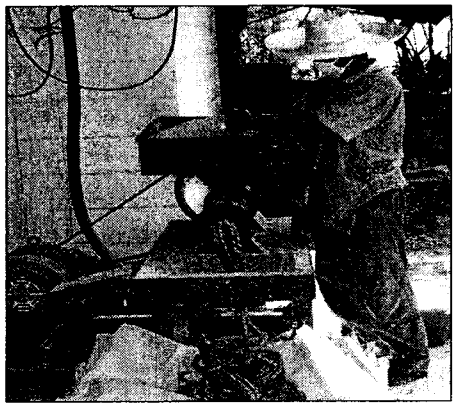
ตารางแสดงส่วนประกอบของอาหารอัดเม็ดแคส-แบนสูตรที่ 1 และ 2

องค์ประกอบ	แคส-แบน 1	แคส-แบน 2
	% วัตถุแห้ง	
มันเส้น	57.0	55.8
กล้วยดิบ	38.0	37.2
ยูเรีย	4.0	6.0
กำมะถัน	0.5	0.5
เกลือ	0.5	0.5
รวม	100	100
โปรตีนหยาบ, %	14.9	24.7
ราคา (บาท/กิโลกรัม)	11.4	11.6

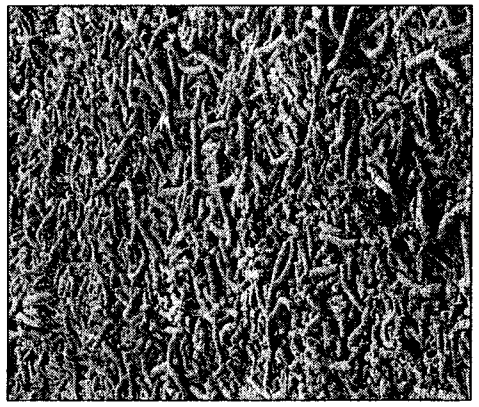
ภาพที่ 1 แสดงการผสมส่วนประกอบต่าง ๆ ของอาหารอัดเม็ดแคส-แบน



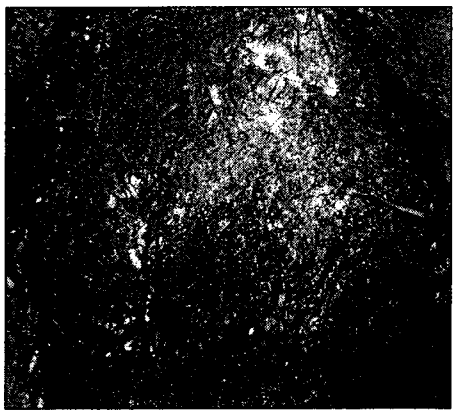
ภาพที่ 2 แสดงส่วนผสมที่เข้ากันดีแล้ว เตรียมเข้าเครื่องอัดเม็ด



ภาพที่ 3 แสดงการอัดเม็ดด้วยเครื่องอัดเม็ด



ภาพที่ 4 แสดงการตากอาหารอัดเม็ด แคส-แบน โดยตาก 2-3 วัน



ภาพที่ 5 แสดงการผสมอาหารอัดเม็ด แคส-แบนในสูตรอาหาร TMR สำหรับโคนม

ภาพที่ 6 แสดงการใช้อาหารอัดเม็ดแคส-แบนในสูตรอาหาร TMR เป็นอาหารโคนม

ภาคผนวก ข
วิธีการทำฟางหมักยูเรีย

วิธีการทำฟางหมักยูเรีย (เมธา, 2540)

อุปกรณ์และวัสดุ

1. ฟางข้าว
2. ปุ๋ยยูเรีย
3. น้ำ
4. ถังน้ำ และบัวรดน้ำ
5. ตาชั่ง
6. ที่ทำฟางหมัก เช่น บ่อซีเมนต์ หลุมดิน โอ่งดิน เป็นต้น

ขั้นตอนในการทำฟางหมักยูเรีย

1. เตรียมพื้นที่ที่จะทำฟางหมัก ปูผ้าพลาสติกรองที่พื้นโดยปล่อยให้มีส่วนของพลาสติกเหลือเพื่อที่จะคลุมกองฟางได้อย่างเพียงพอ

2. คำนวณว่าจะต้องใช้ฟางข้าวจำนวนเท่าใด เพื่อที่จะเตรียมผสมน้ำและยูเรียให้เพียงพอกับจำนวนฟางข้าวที่จะนำมาหมัก โดยใช้สัดส่วนของฟางข้าว 100 กิโลกรัม ต่อน้ำ 100 กิโลกรัม ต่อยูเรีย 5 กิโลกรัม

3. จัดเรียงฟางข้าวเป็นแถวๆ โดยเมื่อทำการเรียงฟางข้าวแถวแรกเสร็จ ทำการราดด้วยน้ำที่ผสมยูเรียให้ทั่วกองฟาง และสัดส่วนน้ำผสมยูเรียที่ใช้จะต้องผสมตามจำนวนของฟางในแถวแรกว่ามีจำนวนเท่าใด

4. เมื่อราดน้ำทั่วถึงทั้งแถวแรกแล้ว จึงจัดเรียงฟางแถวที่สอง ซึ่งทำเช่นเดียวกับแถวแรก ทำจนครบตามจำนวนที่ต้องการใช้

5. เมื่อได้ปริมาณตามต้องการแล้ว ทำการปิดกองฟางข้าวหมักด้วยผ้าพลาสติก โดยคลุมส่วนบน ส่วนหัว และส่วนท้ายของกองฟางหมักอย่างมิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้แอมโมเนียที่เกิดขึ้นในกองฟางหมักระเหยออกสู่ภายนอก

6. เมื่อครบ 10-14 วัน จึงสามารถเปิดกองฟางหมักยูเรียเพื่อนำไปเลี้ยงสัตว์ได้ เมื่อใช้เสร็จแล้วปิดให้สนิท เพราะจะทำให้เกิดราได้ถ้าปิดไม่สนิท

7. ถ้าปรากฏว่าเกิดราขึ้น ควรนำฟางหมักออกผึ่งแดดให้แห้งก่อนนำไปเลี้ยงสัตว์

ปฏิกิริยาในการหมักฟางข้าวด้วยยูเรีย

ปฏิกิริยาในการหมักฟางข้าวด้วยยูเรีย เริ่มจากยูเรียเมื่อละลายน้ำจะแตกตัวให้แอมโมเนียและคาร์บอนไดออกไซด์ ในสภาพที่มีเอนไซม์ยูเรียเอส (urease) ซึ่งเป็นน้ำย่อยจากจุลินทรีย์ที่เกาะอยู่ตามผิวฟางที่สามารถย่อยสลายยูเรียได้ เช่น แบคทีเรียกลุ่มยูรีโอไลติก (ureolytic bacteria) จากนั้นแอมโมเนียจะรวมกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH-group) ได้เป็นแอมโมเนียมไฮดรอกไซด์

(NH_4OH) ที่มีคุณสมบัติเป็นด่าง และทำให้การเกาะยึดกันของพันธะในฟางข้าวคลายตัวลง (ดังสมการ)

$$H_2N\text{-}CO\text{-}NH_2 \xrightarrow[\text{urease}]{H_2O} 2NH_3 + CO_2$$

$$NH_3 + OH^- \longrightarrow NH_4OH$$

ฟางข้าวหมักยูเรียที่ดีควรมีลักษณะดังนี้

1. มีสีน้ำตาลเข้มกว่าปกติ
2. มีกลิ่นแอมโมเนีย
3. มีความชื้นประมาณ 40-50 เปอร์เซ็นต์
4. มีลักษณะอ่อนนุ่มเมื่อจับดูไม่มีรา

การใช้ฟางข้าวหมักยูเรียเลี้ยงสัตว์

ในช่วงแรกต้องปรับสัตว์กินฟางข้าวหมักยูเรียที่ละน้อย สัตว์จะกินได้เพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ให้สัตว์กินฟางข้าวหมักยูเรียในช่วงตอนกลางคืนอย่างเต็มที่ นอกเหนือจากการให้กินตอนกลางวัน ปกติควรมีถังใส่น้ำให้สัตว์กิน ในช่วงกินฟางข้าวหมักยูเรีย อาจให้ร่วมกับหญ้าสด ให้ร่วมกับใบกระถินสดหรือแห้ง ให้ร่วมกับใบมันสำปะหลังแห้ง ใบปอแห้ง หรือใบพืชตระกูลถั่ว สามารถใช้ฟางข้าวหมักยูเรียเลี้ยงโคนมได้ โดยการให้ร่วมกับการเสริมด้วยอาหารข้น ซึ่งมีผลให้โคนมมีอัตราการเจริญเติบโต และมีการให้น้ำนมสูงขึ้น

ภาคผนวก ค

เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

เทคนิคทางจุลชีววิทยาในการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน

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

1. Bacteria count
2. Protozoa count
3. Fungal zoospores count

1.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษา

1.1.1.1 สารเคมี

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

1.1.1.2 อุปกรณ์

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

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

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

1.2.1.2 เตรียม formalin ให้มีความเข้มข้น 10% (v/v) โดยใช้ normal saline (0.85%) เป็นตัวทำละลาย เช่น ถ้าต้องการเตรียม fixing solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร จะต้องใช้ normal saline 90 มิลลิลิตร และ formalin 10 มิลลิลิตร

1.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อใช้ในการศึกษา

ทำการสุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนในช่วงเวลาต่าง ๆ ที่กล่าวใน บทที่ 3 (หัวข้อ 3.2.5.7) โดยนำของเหลวจากกระเพาะรูเมนปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ในขวดที่บรรจุ 10% formalin in normal saline ปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากัน จากนั้นเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศา

เซลเซียส เพื่อรอนับจำนวนประชากรจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย, โปรโตซัว และเชื้อรา ด้วยกล้องจุลทรรศน์ รายละเอียดดังนี้

1.3.1.1 การนับจำนวนแบคทีเรีย (Bacterial count) โดยทำการเจือจางความเข้มข้นของตัวอย่างของเหลวจากเดิม 10 เท่า เป็น 100 เท่า โดยการดูดตัวอย่างมา 1 มิลลิลิตร และเติมน้ำกลั่นปลอดเชื้อ 9 มิลลิลิตร ซึ่งทำให้ปลอดเชื้อโดยการนำไป autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 15 นาที ใช้ปิเปตดูดตัวอย่างที่เจือจางแล้วจากหลอด หยดลงบน haematocytometer วาง cover slip ปิดทับด้านบน ให้ตัวอย่างกระจายจนทั่ว แล้วทำการนับโดยนับจำนวน 20 ช่องเล็ก ใช้กำลังขยาย 400 เท่า ในแนวทแยงมุมและนับจำนวน 2 ซ้ำ แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยจำนวนประชากรแบคทีเรีย โดยใช้สูตร

$$Y = X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรแบคทีเรีย

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 4×10^6

1.3.1.2 การนับจำนวนโปรโตซัว (Protozoal count) ทำการนับจากตัวอย่างที่เก็บมาได้เลยโดยไม่ต้องทำการเจือจางอีก โดยใช้กำลังขยาย 100 เท่า นับทั้งหมดใน 1 ช่องใหญ่ ซึ่งประกอบด้วย 400 ช่องเล็ก ทำการนับ 2 ซ้ำ หลังจากนั้นทำการคำนวณประชากรโปรโตซัวโดยใช้สูตร

$$Y = X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรโปรโตซัว

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 1×10^4

1.3.1.3 การนับจำนวนเชื้อรา (Fungal zoospores count) ทำการนับประชากรเชื้อราเช่นเดียวกับโปรโตซัว แต่นับเพียง 25 ช่องกลาง ทำการนับ 2 ซ้ำ และคำนวณหาจำนวนประชากรเชื้อรา ดังนี้

$$Y = X \times F \times D$$

เมื่อ Y = จำนวนประชากรเชื้อรา

X = ค่าเฉลี่ยที่นับได้

D = dilution factor

F = square factor ซึ่งมีค่าเท่ากับ 2.5×10^5

2. การศึกษากลุ่มของแบคทีเรียที่สำคัญโดยวิธี Roll tube technique (Huggate, 1969)

กลุ่มของแบทีเรียที่ศึกษามี 4 กลุ่มที่สำคัญ ได้แก่

1. Total viable bacteria
2. Cellulolytic bacteria
3. Proteolytic bacteria
4. 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. ขวดพลาสติกเก็บตัวอย่างฝาเกลียว ขนาด 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. ถังแก๊ส 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_2CO_3	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	3.0 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 เก็บเฉพาะส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -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 ใช้ตวงส่วนประกอบต่างๆ และเทลงใน flask ให้ครบตามหาปริมาตรที่เราต้องการเตรียม ยกเว้น cysteine HCl แล้วนำ flask ขึ้นตั้งบน hot plate ที่มี magnetic stirrer

2.3.3 ปิด flask ด้วยจุกยางที่มีท่อนำแก๊ส CO_2 เข้า และท่อนำสารละลายออก

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

2.3.5 ปล่อยแก๊ส CO_2 เข้าไปใน flask ที่บรรจุสารละลาย จนกระทั่งสีของ resazurin เปลี่ยนสีจากน้ำเงินเข้มเป็นสีชมพูอ่อนๆ จึงเติม cysteine HCl ลงไป

2.3.6 ปิดท่อระบายอากาศที่อยู่บน flask เพื่อให้สารละลายออกมาโดยที่ขณะนั้นยังผ่านแก๊ส 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 เช่น สารละลาย 30 มิลลิลิตร ใช้ HCl 0.1 N 0.3 มิลลิลิตร ส่วนสารละลายที่เหลือใน flask 210 มิลลิลิตร จะต้องใช้กรดเท่ากับ (210 x 0.3)/30 = 2.7 มิลลิลิตร

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

2.3.8 นำขวดที่บรรจุสารละลายแล้วมาผ่านแก๊ส 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 ได้แล้วให้นำขวดที่มี agar บรรจุอยู่ มารองรับสารละลายอาหารเลี้ยงเชื้อให้ได้ปริมาตร 5 มิลลิลิตร

2.4.4 ผ่านแก๊ส 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 (กรณีมีที่การเตรียมไว้ก่อนล่วงหน้า ก็ไม่ต้องทำในข้อ 2.4.7 ควรเก็บอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ในที่ที่ปลอดเชื้อ เพื่อป้องกันการปลอมปนของเชื้อจากภายนอก)

2.5 การเก็บตัวอย่างเชื้อจุลินทรีย์จากกระเพาะรูเมน (Rumen fluid)

2.5.1 ใช้ stomach tube ร่วมกับ vacuum pump นำมากรองด้วยผ้าขาวบาง 4 ชั้น และรีบบรรจุในขวดเก็บตัวอย่างฝาเกรียว ขนาด 60 มิลลิลิตร จนเต็ม

2.5.2 นำมาเก็บในน้ำอุ่นอุณหภูมิประมาณ 39 องศาเซลเซียส เพื่อนำขึ้นมาที่ห้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด เพื่อทำการเลี้ยงเชื้อต่อไป

2.5.3 นำตัวอย่างมาผ่านแก๊ส CO_2 ทันที และทำการเจือจางด้วย tween 80 ในสัดส่วน tween 80 4 ส่วน ต่อ rumen fluid 1 ส่วน จากนั้นทำการเขย่าแรงๆ เพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะอยู่กับชิ้นอาหารหลุดออกมา

2.6 การเจือจาง Rumen fluid

ทำการเจือจาง rumen fluid ให้มีความเจือจางลดลงระดับละ 10 ตามลำดับ ตั้งแต่ 10^0, 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 แสดงว่าภายในขวดมีแก๊สออกซิเจน ซึ่งจะมีผลกระทบต่อจุลินทรีย์ภายในขวดนั้นๆ 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 นำขวดที่บรรจุอาหารเลี้ยงเชื้อกลุ่มต่างๆ มาเขียนระดับความเจือจางและปริมาตรตัวอย่างที่ใช้ในการเลี้ยงเชื้อ โดยทุกกลุ่มแบคทีเรียจะใช้ปริมาตร 0.2 และ 0.5 มิลลิลิตร (ในการเลี้ยงเชื้อควรมีการเลี้ยงเชื้อทุก dilution และหลายปริมาตรก่อน เพราะงาน

ทดลองแต่ละงานจะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับปัจจัยที่ใช้ในการทดลอง ซึ่งจะทำให้ประชากรของแบคทีเรียแตกต่างกันไปด้วย)

2.7.3 การเพาะเลี้ยงแบคทีเรียในอาหารลี้ยงเชื้อ ใช้กระบอกฉีดยาพร้อมเข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ดูดสารละลายจากขวด dilution ที่เลือกไว้ ในปริมาตรที่เลือกไว้เช่นเดียวกัน (0.2 หรือ 0.5 มิลลิลิตร) แล้วนำไปฉีดลงในขวดอาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละกลุ่ม โดยอาหารเลี้ยงเชื้อจะต้องต้มให้ละลายและรักษาอุณหภูมิที่ 50-55 องศาเซลเซียส ผสมตัวอย่างให้กระจายทั่วขวดอาหารเลี้ยงเชื้อ จากนั้นนำไปกลิ้งบนถาดน้ำแข็งอย่างรวดเร็ว เพื่อให้อาหารเลี้ยงเชื้อแข็งตัวกระจายรอบๆ ขวด ใช้ผ้าซับน้ำรอบๆ 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 รอบๆ

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

2.8.2 การคำนวณ colony forming unit (CFU) ต่อ rumen fluid 1 มิลลิลิตร คำนวณได้จาก 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