สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาครั้งนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 2 การทดลอง คือ การทดลองที่ 1 ศึกษาหาระดับการเสริมกลูตามีนที่เหมาะสมในอาหารไก่เนื้อ และการทดลองที่ 2 การศึกษาผลของการเสริมกลูตามีนที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโตของไก่เนื้อ การพัฒนาการของระบบทางเดินอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน

3.1. การทดลองที่ 1: การศึกษาหาระดับการเสริมกลูตามีนที่เหมาะสมในอาหารไก่เนื้อ

เพื่อศึกษาผลของการเสริมกลูตามีนในอาหารไก่เนื้อที่ระดับต่างๆ ต่อการย่อยได้และใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ การพัฒนาการของระบบทางเดินอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ

3.1.1. สัตว์ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อเพศผู้สายพันธุ์ทางการค้าอาร์เบอร์ เอเคอร์ส (Arbor Acres) อายุ 1 วัน น้ำหนักเฉลี่ยเริ่มต้น 41.5 กรัม สุ่มไก่จำนวน 32 ตัวขึ้นกรง โดยแบ่งไก่ออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 8 ซ้ำๆ ละ 1 ตัว มีระยะเวลาทดลอง 21 วัน ใช้แผนงานทดลองแบบ Completely Randomized Design (CRD) โดยให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่

3.1.2. อาหารทดลอง

เป็นการทดสอบการใช้กลูตามีนเสริมในอาหารไก่เนื้อ โดยมีการเสริมกลูตามีนในอาหารที่ระดับต่างๆ อาหารทดลองทั้งหมดคำนวณให้มีระดับของโปรตีนและพลังงานเท่ากัน ตามคำแนะนำของ NRC (1994) ดังแสดงในตารางที่ 3.1 อาหารทดลองที่ใช้แบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม ประกอบด้วย

กลุ่มที่ 1 : สูตรควบคุม (Control)
กลุ่มที่ 2 : เสริมกลูตามีน 1%
กลุ่มที่ 3 : เสริมกลูตามีน 2%
กลุ่มที่ 4 : เสริมกลูตามีน 3%

ตารางที่ 3.1 ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (การทดลองที่ 1)

		Glutamine level		
Item	Control	1%	2%	3%
Ingredients, %				
Corn	49.18	47.80	47.06	46.17
Soybean meal	28.65	28.72	28.72	28.84
Fish meal	9.00	9.00	9.00	9.00
Rice bran	5.00	5.00	5.00	5.00
Cassava starch	3.00	2.00	1.00	0.00
Soybean oil	3.10	3.86	4.60	5.36
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.26	0.27	0.27	0.28
Glutamine	0.00	1.00	2.00	3.00
Calcium carbonate	0.06	0.60	0.60	0.60
Dicalcium phosphate	1.00	1.00	1.00	1.00
Premix[1]	0.50	0.50	0.50	0.50
Calculated composition, %				
AME, kcal/kg	3102	3102	3102	3102
Met + Cys	0.90	0.90	0.90	0.90
Lys	1.20	1.20	1.20	1.20
Ca	1.02	1.02	1.02	1.02
Available P	0.62	0.62	0.62	0.62
Analyzed composition, %				
DM	92.06	92.29	92.22	92.51
CP	21.43	22.36	22.37	24.13
CF	2.91	2.80	2.84	2.90
EE	6.39	7.21	7.31	8.75

[1]Premix (0.5%) provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 15,000 IU; vitamin D_3, 3,000 IU; vitamin E, 25 IU; vitamin K_3, 5 mg; vitamin B_1, 2.5 mg; vitamin B_2, 7 mg; vitamin B_6, 4.5 mg; vitamin B_{12}, 25 μg; pantothenic acid, 35 mg; folic acid, 0.5 mg; biotin, 25 μg; nicotinic acid, 35 mg; choline chloride, 250 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; Fe, 80 mg; Cu, 1.6 mg; I, 0.4 mg; Se, 0.15 mg.

3.1.3 การเก็บข้อมูล

3.1.3.1 การเก็บมูลเพื่อวัดการย่อยได้และการใช้ประโยชน์ได้ของโภชนะ

ทำการเก็บมูลทั้งหมดที่ไก่ขับถ่ายออกมาวันละ 1 ครั้ง ในเวลา 10.00 น. ในช่วง 4 วัน สุดท้ายของการทดลอง โดยเก็บมูลในถาดพลาสติกที่รองไว้ใต้กรง โดยรองเพื่อเก็บมูลเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สเปรย์มูลที่เก็บได้ในแต่ละวันด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 5% เพื่อป้องกันการสูญเสียไนโตรเจน และนำมูลของไก่แต่ละตัวที่ได้รับในแต่ละวัน ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 55^{o}C นำมาบดใส่ถุงพลาสติกและเก็บไว้เพื่อรอการวิเคราะห์ทางเคมีต่อไป

3.1.3.2 การเก็บข้อมูลเพื่อวัดการเจริญของวิลไล (villi) และน้ำหนักอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหารและสร้างภูมิคุ้มกัน

เมื่อสิ้นสุดการทดลอง สุ่มไก่กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว ทำให้สลบและฆ่า เปิดช่องท้องเพื่อเก็บม้าม (Spleen) เบอร์ซ่า (Bursa) และซีกัม (Ceca) ในส่วนของลำไส้เล็กทำการแยกออกเป็น 3 ส่วน (ดูโอดีนัม เจจูนัม และไอเลียม) ล้างลำไส้ส่วนดูโอดีนัมและเจจูนัมด้วยน้ำเกลือ ในส่วนของไอเลียมให้ล้างด้วยน้ำกลั่นจากนั้นนำลำไส้ส่วนต่างๆ มาชั่งน้ำหนัก ทำการเก็บลำไส้ส่วนดูโอดีนัมและเจจูนัม โดยเก็บแต่ละส่วนให้มีความยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ตรึงบนแผ่นโฟม นำไปใส่ลงในขวดพลาสติกที่มีสารละลายบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน 10% (สารละลาย 1 ลิตร ประกอบด้วย ฟอร์มัลดีไฮด์ที่มีความเข้มข้น 37-40% 100 มิลลิลิตร โซเดียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟตโมโนไฮเดรต 1.683 กรัม และไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟตแอนไฮดรัส 5.836 กรัม) เพื่อรักษาให้เนื้อเยื่อมีสภาพเซลล์เหมือนกับเมื่อมีชีวิตอยู่ และทำให้เนื้อเยื่อมีความแข็งสามารถตัดเป็นชิ้นบางๆ ได้ เมื่อต้องการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาค (Histology) นำไปผ่านกระบวนการโดยใช้เครื่อง Automatic tissue processer ตามวิธีการของสมชัย (2529) ซึ่งมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

เอทานอล 70% ครั้งละ 5 ชั่วโมง 1 ครั้ง
เอทานอล 70% ครั้งละ 2 ชั่วโมง 1 ครั้ง
เอทานอล 80% ครั้งละ 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง
เอทานอล 95% ครั้งละ 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง
เอทานอล 100% ครั้งละ 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง
ไซลีน 1 ชั่วโมง 2 ครั้ง
พาราฟินหลอมเหลว 1 ชั่วโมง 30 นาที 2 ครั้ง

นำเนื้อเยื่อเข้าเครื่องปรับความดันสุญญากาศ ตั้งความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 30 นาที

นำเนื้อเยื่อมาฝังในพาราฟิน (Embedding) โดยใช้เครื่องหยอดพาราฟิน ทิ้งไว้ให้พาราฟินแข็งตัว นำบล็อคพาราฟินที่มีชิ้นเนื้อฝังอยู่มาตัดหน้าบล็อค แล้วนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตมให้เนื้อเยื่อมีความหนาขนาด 5 ไมโครเมตร

นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้ว (Section) มาติดกับกระจกสไลด์ โดยนำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (Tissue floating bath) ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ภายในอ่างผสมเจลาตินในอัตราส่วนเจลาติน 0.5 กรัมต่อน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร แล้ววางกระจกสไลด์พร้อมเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ข้ามคืน

นำกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ไปย้อมสี โดยสีที่ใช้ คือ ฮีมาทอกซิลิน (Hematoxylin) และอีโอซิน (Eosin) มีขั้นตอนการย้อมดังนี้

การขจัดพาราฟิน (Deparaffinization) โดยจุ่มกระจกสไลด์ที่มีอยู่ลงไปในไซลิน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที

การเอาน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (Hydration) โดยเริ่มจาก

เอทิลแอลกอฮอล์ 100% 2 นาที

เอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 นาที

เอทิลแอลกอฮอล์ 70% 2 นาที

ล้างด้วยน้ำประปา โดยเปิดน้ำให้ไหลตลอดเวลา ประมาณ 2 นาที

การย้อมสีครั้งแรก (Primary stain) ย้อมด้วยฮีมาทอกซิลินนานประมาณ 4 นาที 30 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำประปาโดยเปิดให้น้ำไหลผ่านตลอดเวลา จนกระทั่งน้ำที่ล้างใสไม่มีสีม่วงออกมาอีก การล้างสีส่วนเกินโดยการจุ่มกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ลงในแอลกอฮอล์ 1 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด โดยเปิดให้น้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1-2 นาที

การปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (Neutralization) โดยการจุ่มกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ลงในลิเทียมคาร์บอเนต (Li_2CO_3) นานประมาณ 1 นาที แล้วล้างด้วยน้ำ โดยเปิดน้ำไหลผ่านเป็นเวลา 1-2 นาที

การย้อมสีซ้ำ (Counterstain) ย้อมด้วย Eosin นาน 2 นาที

การขจัดน้ำ (Dehydration) เริ่มจาก

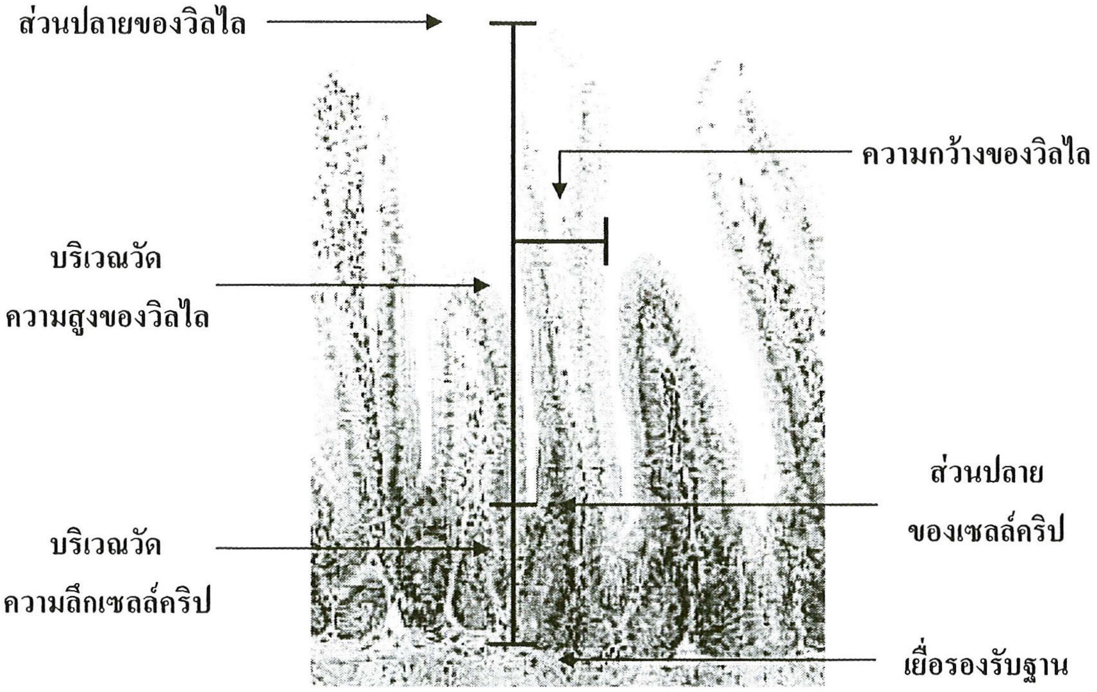
จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 70% 30 วินาที

จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 95% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

จุ่มในเอทิลแอลกอฮอล์ 100% 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที

การขจัดแอลกอฮอล์ และทำให้เนื้อเยื่อใส (Clearing) โดยการจุ่มกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่ออยู่ลงในไซลีน 3 ครั้งๆ ละ 5 นาที หยด Mounting median ลงบนกระจกสไลด์แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์

นำกระจกสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อที่ย้อมสีเสร็จแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 10 เท่า (Objective 10X) ตามวิธีการของ Hartke et al. (2005) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคของความสูงวิลไล โดยวัดจากปลายของวิลไลถึงฐานของวิลไล (Hedemann et al., 2006) และความกว้างของวิลไล (วัดที่ความสูงครึ่งหนึ่งของวิลไล) ดังแสดงในภาพที่ 3.1 สำหรับการวัดความลึกของเซลล์คริปวัดจากเยื่อรองรับฐาน (Basement membrane) ถึงส่วนปลายของเซลล์คริป (Crypt mouth) และคำนวณหาสัดส่วนของความยาววิลไลต่อความลึกของเซลล์คริป (กระสินธ์, 2551)



ภาพที่ 3.1 แสดงวิธีการวัดความสูงของวิลไลและความลึกของเซลล์คริป

3.1.4 การวิเคราะห์ทางเคมี

1. วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร (ความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน เยื่อใย แคลเซียม และฟอสฟอรัส) (AOAC, 1990)

2. วิเคราะห์หาโภชนะในมูล โดยวิเคราะห์หาค่าความชื้น เถ้า และปริมาณไนโตรเจน ตามวิธี AOAC (1990)

3.1.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติ ด้วยแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (completely randomized design, CRD) CRD (SAS Institute, 1996) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี DUNCAN

3.2. การทดลองที่ 2: การศึกษาผลของการเสริมกลูตามีนที่ระยะเวลาต่างๆ ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต การพัฒนาการของระบบทางเดินอาหาร และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกันของไก่เนื้อ

เพื่อศึกษาหาผลของการเสริมกลูตามีนในอาหารไก่เนื้อที่ระยะเวลาต่างๆ (7, 14, 21 และ 28 วัน) ต่อสมรรถนะการเจริญเติบโต พัฒนาการของลำไส้เล็ก และการตอบสนองต่อภูมิคุ้มกัน โดยคัดเลือกระดับกลูตามีนที่มีความเหมาะสมที่ผ่านการทดสอบเบื้องต้นในการทดลองที่ 1 มาใช้เสริมในสูตรอาหาร เพื่อดูว่าควรมีการเสริมกลูตามีนที่ระดับใด และนานเท่าใดถึงจะส่งผลดีที่สุด จากการค้นคว้าเอกสารพบว่า การพัฒนาของเซลล์ในระบบทางเดินอาหารและภูมิคุ้มกันจะมีการพัฒนาสมบูรณ์ที่อายุประมาณ 21 วัน จึงได้เลือกทำการเสริมกลูตามีนจนกระทั่งไก่อายุ 28 วัน เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่ครอบคลุมตลอดการพัฒนาของระบบทางเดินอาหาร

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้ไก่เนื้อคละเพศ อายุ 1 วัน จำนวน 300 ตัว โดยแบ่งไก่ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำๆ ละ 20 ตัว แต่ละซ้ำเลี้ยงในคอกแบบปล่อยพื้น ทำการชั่งน้ำหนักลูกไก่ทุกตัวก่อนสุ่มไก่เข้างานทดลอง ไก่ทุกตัวได้รับน้ำและอาหารอย่างเต็มที่

3.2.2 อาหารทดลอง

อาหารทดลองประกอบด้วย อาหารสูตรควบคุมและอาหารเสริมกลูตามีนที่ระดับ 1% โดยเสริมเป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน ทำการเลี้ยงไก่ทั้งหมดเป็นระยะเวลา 42 วัน อาหารทดลองทั้งหมด คำนวณให้มีระดับของโปรตีนและพลังงานเท่ากัน ตามคำแนะนำของ NRC (1994) ดังแสดงในตารางที่ 3.2

กลุ่มที่ 1 : สูตรควบคุม (Control)
กลุ่มที่ 2 : เสริมกลูตามีน เป็นเวลา 7 วัน
กลุ่มที่ 3 : เสริมกลูตามีน เป็นเวลา 14 วัน
กลุ่มที่ 4 : เสริมกลูตามีน เป็นเวลา 21 วัน
กลุ่มที่ 5 : เสริมกลูตามีน เป็นเวลา 28 วัน

3.2.3 การเก็บข้อมูล

ทำการบันทึกน้ำหนักตัว และปริมาณอาหารที่กินทุกสัปดาห์ ส่วนอัตราการตายบันทึกทุกครั้งที่มีไก่ตาย ทำการสุ่มไก่กลุ่มการทดลองละ 3 ตัว ที่อายุ 0, 7, 14, 21, 28, 35 และ 42 วัน เก็บเลือดบริเวณปีก (Wing vein) เพื่อวัดภูมิคุ้มกัน (ดังวิธีการข้างล่าง) หลังจากนั้นทำให้สลบและฆ่า เปิดช่องท้อง เพื่อเก็บน้ำหนักต่อมเบอร์ซ่าร์และม้าม ทำการเก็บลำไส้เล็กส่วนดูโอดีนัม เพื่อวัดการเจริญของวิลไลโดยมีวิธีการคล้ายคลึงกับข้อ 3.1.3.2 สำหรับลำไส้เล็กส่วนเจจูนัม ทำการเก็บให้มีความยาวประมาณ 10 เซนติเมตร นำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20^{0}C จนกระทั่งจะทำการวิเคราะห์ เมื่อจะวิเคราะห์ให้นำลำไส้ส่วนเจจูนัมมาปล่อยให้ละลายที่อุณหภูมิห้อง ทำการชั่งเจจูนัม 2 กรัม ผสมกับน้ำกลั่นอีก 20 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นสารละลาย (Homogenize) เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ 20,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ดูดสารละลายที่ลอยอยู่ส่วนบน (Supernatant) ไว้ในหลอดเก็บตัวอย่างขนาด 2 มิลลิลิตร แล้วเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0}C เพื่อรอการวิเคราะห์ตามวิธีการของ Bartell and Batal (2007) เพื่อวิเคราะห์หาระดับของอิมมูโนโกลบูลิน โดยใช้ชุดวัดอิมมูโนโกลบูลิน (Total immunoglobulin test kit) (Sigma-Aldrich Corp, St. Lousi, MO, USA)

สำหรับเลือด ทำการถ่ายเลือดจากกระบอกฉีดยาลงในหลอดเก็บตัวอย่างที่ไม่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดเพื่อเก็บตัวอย่างซีรัม จากนั้นเก็บตัวอย่างเลือดในกระติกน้ำแข็งที่มีอุณหภูมิ 4^{0}C ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ถึง 2 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 x g เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำซีรัมที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20^{0}C ตามวิธีการของ Engle et al. (1999) เพื่อนำไปใช้ในวิเคราะห์ค่าปริมาณอิมมูโนโกลบูลินในซีรัม โดยใช้ชุดวัดอิมมูโนโกลบูลินเช่นเดียวกับลำไส้

3.2.4 การวิเคราะห์ทางเคมี

วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในอาหาร ได้แก่ ความชื้น โปรตีน เถ้า ไขมัน เยื่อใย แคลเซียม และฟอสฟอรัส ตามวิธีการของ AOAC (1990)

3.2.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติด้วยแผนการทดลองแบบ CRD และวิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยในแต่ละกลุ่มการทดลองด้วยวิธี DUNCAN โดยโปรแกรม SAS (SAS Institute, 1996)

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบทางเคมีของอาหารทดลอง (การทดลองที่ 2)

	Dietary treatments			
	Starter (0 to 21 d)		Finisher (22 to 42 d)	
Item	Control	1% Gln	Control	1% Gln
Ingredients, %				
Corn	48.64	47.80	52.04	51.17
Soybean meal	28.65	28.72	28.72	28.84
Fish meal	9.00	9.00	5.00	5.00
Rice bran	5.00	5.00	5.00	5.00
Cassava starch	3.00	2.00	3.00	2.00
Soybean oil	3.10	3.86	3.24	3.99
Salt	0.25	0.25	0.25	0.25
DL-Methionine	0.26	0.27	0.20	0.20
Glutamine	0.00	1.00	0.00	1.00
Calcium carbomate	0.60	0.60	0.60	0.60
Dicalcium phosphate	1.00	1.00	1.45	1.45
Premix[1]	0.50	0.50	0.50	0.50
Calculated composition (%)				
ME, kcal/kg	3102	3102	3102	3102
Met + Cys	0.90	0.90	0.78	0.78
Lys	1.20	1.20	1.03	1.03
Ca	1.02	1.02	0.90	0.90
Available P	0.62	0.62	0.57	0.57
Analyzed composition (%)				
DM	93.34	93.55	93.52	93.29
CP	22.40	22.81	19.85	19.99
CF	2.70	2.95	2.57	3.47
EE	7.03	6.72	6.29	7.24

[1]Premix (0.5%) provided the following per kilogram of diet: vitamin A, 15,000 IU; vitamin D3, 3,000 IU; vitamin E, 25 IU; vitamin K3, 5 mg; vitamin B1, 2.5 mg; vitamin B2, 7 mg; vitamin B6, 4.5 mg; vitamin B12, 25 μg ; pantothenic acid, 35 mg; folic acid, 0.5 mg; biotin, 25 μg ; nicotinic acid, 35 mg; choline chloride, 250 mg; Mn, 60 mg; Zn, 45 mg; Fe, 80 mg; Cu, 1.6 mg; I, 0.4 mg; Se, 0.15 mg.