บทที่ 7
การศึกษาการใช้อาหารข้นผสมก้านและใบมะขามป้อมต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและการหมักย่อยในกระเพาะหมักของโคนม

7.1 บทนำ

มะขามป้อมมีองค์ประกอบของสารประกอบสำคัญหลายชนิดที่เป็นประโยชน์ การศึกษาทางเภสัชวิทยาพบว่าสารจากส่วนต่างๆ ของมะขามป้อมมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อรา เชื้อแบคทีเรีย และไวรัส และยังพบว่าสารหลายชนิดจากส่วนต่างๆของมะขามป้อม สามารถนำมาใช้ควบคุมจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของโคนมได้ การนำใบและก้านของมะขามป้อมมาใช้ในการยับยั้งจุลินทรีย์ที่ไม่พึงประสงค์ในกระเพาะหมัก อาจทำให้จุลินทรีย์ที่เป็นประโยชน์เพิ่มจำนวนขึ้น การวิจัยครั้งนี้มีจุดประสงค์ใช้อาหารข้นผสมก้านและใบมะขามป้อมให้โคนมได้รับ และศึกษาระดับความเป็นกรด-ด่าง แอมโมเนียไนโตรเจน และกรดไขมันระเหยง่าย รวมทั้งชนิดและปริมาณของประชากรจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักของโคที่ได้รับอาหารดังกล่าว

7.2 วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการใช้อาหารข้นผสมก้านและใบมะขามป้อมต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและการหมักย่อยในกระเพาะหมักของโคนม

7.3 อุปกรณ์และวิธีการ

การศึกษาการใช้อาหารข้นผสมก้านและใบมะขามป้อมต่อชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักและการหมักย่อยในกระเพาะรูเมนของโคนม ในโคนมเจาะกระเพาะลูกผสมพันธุ์โฮสไตน์ฟรีเชียน (Crossbred Holstein Friesian)

7.3.1 สัตว์ทดลองและการจัดการ

ใช้โคเจาะกระเพาะลูกผสมโฮสไตน์ฟรีเชี่ยนจำนวน 4 ตัว โดยใช้แผนการทดลองแบบเปลี่ยนสลับ (Cross-over design or Simple change-over design) โดยแยกสัตว์คอกละ 1 ตัว ซึ่งโคทดลองนี้แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัวคือ กลุ่มที่ได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม และกลุ่มควบคุม (อาหารข้นปกติ)

7.3.2 อาหารและการให้อาหาร

โคเจาะกระเพาะจะถูกเลี้ยงขังคอกๆ ละ 1 ตัว ใช้เวลาในการปรับตัวโคให้เข้ากับอาหารเป็นระยะเวลา 5 วันจากนั้นก็ทำการให้อาหารทดลองต่อไปอีก 7 วัน ก่อนทำการบันทึกข้อมูลต่างๆ โดยโคกลุ่มควบคุมให้อาหารข้นโปรตีน 16% วันละ 3 กิโลกรัมต่อตัว โดยแบ่งให้เป็น 2 มื้อๆ ละ 1.5

กิโลกรัม (09.00 และ 16.00) เมื่อโคกินอาหารข้นหมดแล้ว ให้อาหารหยาบซึ่งเป็นพืชหมักอย่างเต็มที่ (*ad libitum*)

สำหรับโคเจาะกระเพาะกลุ่มทดลองจะได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม วันละ 3 กิโลกรัม โดยจะแบ่งให้อาหารออกเป็น 2 มื้อๆละ 1.5 กิโลกรัม โดยจะเริ่มปรับสัตว์ทดลองดังนี้

(1) วันที่ 1-3 ให้อาหารสูตรเสริมก้านและใบมะขามป้อม 0.75 กิโลกรัมร่วมกับสูตรอาหารข้นเดิมที่โคกิน 0.75 กิโลกรัม รวมเป็นมื้อละ 1.5 กิโลกรัมและวันละ 2 มื้อ หลังจากโคกินอาหารข้นหมดให้อาหารหยาบอย่างเต็มที่

(2) วันที่ 4-5 ให้อาหารสูตรเสริมก้านและใบมะขามป้อมมื้อละ 1.5 กิโลกรัมวันละ 2 มื้อ หลังจากโคกินอาหารข้นหมดให้อาหารหยาบอย่างเต็มที่

(3) ระยะทดลองให้อาหารสูตรเสริมก้านและใบมะขามป้อมวันละ 3 กิโลกรัม วันละ 2 มื้อ หลังจากโคกินอาหารหมดให้อาหารหยาบอย่างเต็มที่

ส่วนโคกลุ่มควบคุมจะได้รับอาหารสูตรปกติ (โปรตีน 16%) วันละ 2 มื้อๆละ 1.5 กิโลกรัม หลังจากที่โคกินอาหารข้นหมด ให้อาหารหยาบอย่างเต็มที่ โดยเมื่อทดลองในระยะแรกเสร็จแล้วนั้นจะทำการสลับกลุ่มโค โดยจะทำการพักโค 1 สัปดาห์แล้วทำการปรับสัตว์ใหม่ตามหัวข้อ 7.3.2

7.3.3 การเก็บข้อมูล

(1) ของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid)

โดยจะเก็บตัวอย่างในวันที่ 13 ของการทดลอง (ระยะเวลาในการปรับสัตว์ 5 วันและการทดลอง 7 วัน) ทำการเก็บของเหลวในกระเพาะหมักของโคเจาะกระเพาะทั้ง 4 ตัว หลังจากการให้อาหาร 6 ชั่วโมง โดยใช้ท่อทองเหลืองที่มีรูพรุนหุ้มด้วยถุงไนล่อน จุ่มแช่ในกระเพาะหมัก ก่อนที่จะใช้กระบอกฉีดยาทำการดูดน้ำย่อยในกระเพาะหมักออกมาประมาณ 50 มิลลิลิตร บรรจุลงในบีกเกอร์ขนาด 100 มิลลิลิตร

การวัดค่าความเป็นกรด –ด่าง จะทำการวัดระดับความเป็นกรด – ด่างของของเหลวในกระเพาะหมักทันทีหลังจากเก็บตัวอย่าง โดยใช้เครื่องวัดความเป็นกรดด่าง (pH meter) อย่างไรก็ตามการการวัดระดับความเป็นกรด – ด่าง เครื่องวัดจะต้องได้รับการปรับ (calibrate) ด้วยการใช้ buffers ที่ pH 7.0 และ pH 4.0 เสียก่อน

การเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในของเหลวจากกระเพาะหมัก (rumen ammonia; mg NH_3-N/litre) ใช้หลอดทดลองที่มีฝาปิด (test tube with cap) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอลิก (6 N) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วนของเหลวจากกระเพาะหมัก 10 ส่วนต่อ 6 N HCl 1 ส่วน) เพื่อเก็บรักษาและเป็นการหยุดชะงักกิจกรรมและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ จากนั้นนำหลอดทดลองไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที เป็นเวลา 15 นาที แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนของเหลวใส (supernatant) ลงในหลอดทดลองขนาด 25

มิลลิลิตร ปิดด้วยฝาเกลียวให้สนิท นำไปเก็บรักษาไว้ในอุณหภูมิ -18 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจนโดยวิธี Kjedahn ต่อไป

การเก็บตัวอย่างสำหรับวิเคราะห์หากรดไขมันระเหยได้ (volatile fatty acids) ใช้หลอดทดลองชนิดมีฝาจุก (test tube with cap) ขนาด 25 มิลลิลิตร เติมกรดไฮโดรคลอลิก (6 N) ปริมาตร 2.5 มิลลิลิตร (ในอัตราส่วนของเหลวจากกระเพาะหมัก 10 ส่วนต่อ 6 N HCl 1 ส่วน) เพื่อเก็บรักษาและเป็นการหยุดชะงักกิจหรรมและการเจริญเติบโตของจุลินทรีย์ ปิดฝาจุกให้แน่นก่อนนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบ/นาที จากนั้นดูดเอาเฉพาะส่วนของเหลวใส (supernatant) ลงในหลอด 25 มิลลิลิตร ปิดฝาให้แน่นแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ - 18 °C จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ volatile fatty acids ชนิดต่างๆด้วยเครื่อง Gas Chromatography ต่อไป

Gas Chromatography (GC) เป็นเทคนิคสำหรับแยกสารตัวอย่างที่เป็นสารผสม โดยเปลี่ยนสารผสมให้เป็นไอที่อุณหภูมิหนึ่ง แล้วให้ไอของสารเหล่านั้นผ่านเข้าไปยัง column ที่บรรจุด้วยเฟสคงที่ (stationary phase) โดยอาศัยการพาไปของเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) หรือ carrier gas องค์ประกอบของสารผสมที่มีความสามารถในการเคลื่อนที่และการกระจายตัวผ่านเฟสคงที่ต่างกันจะแยกออกจากกัน โดยองค์ประกอบภายในเครื่องในการวิเคราะห์ สารผสมตัวอย่างจะถูกฉีดเข้าที่ sample injection port แล้วสารผสมจะถูกให้ความร้อนจนกลายเป็นไอแล้วถูกพาเข้าไปใน column ด้วยเฟสเคลื่อนที่ องค์ประกอบของสารผสมจะแยกออกจากกันเมื่อเคลื่อนผ่าน column และถูกตรวจวัดโดย detector สัญญาณการตรวจวัดที่ได้จาก detector จะถูกบันทึกและแสดงออกมาในรูปของ chromatogram

(2) จุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

เก็บตัวอย่าง (Rumen digesta) หลังจากให้อาหาร 6 ชั่วโมง (ให้อาหารเช้าเวลา 9.00 และทำการเก็บตัวอย่างเวลา 15.00) โดยก่อนทำการเก็บต้องทำความสะอาดมือและใส่ถุงมือจากนั้นทำการเปิดจุกยางที่ปิดกระเพาะส่วนรูเมนของโคเจาะกระเพาะออก แล้วทำการเก็บเอาอาหารที่กำลังหมักย่อย (Rumen digesta) ในกระเพาะหมัก (Rumen) ซึ่งสุ่มเก็บเอาจากตำแหน่งต่างๆในกระเพาะรูเมนอย่างทั่วถึง ประมาณ 75 กรัมในโคทั้ง 4 ตัว (กลุ่มทดลอง 2 ตัวและกลุ่มควบคุม 2 ตัว) แล้วบรรจุลงในถุงพลาสติค รัดด้วยยางยืดให้มิดชิด จากนั้นนำเอาถุงพลาสติกที่บรรจุด้วย rumen digesta.ใส่ลงไปใน anaerobic jar จากนั้นใส่ anaeropack เพื่อที่จะดูดเอาอ๊อกซิเจนภายใน anaerobic jar ออก พร้อมกับสร้างคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อทำให้สภาพภายใน anaerobic jar เป็นสภาพไร้อ๊อกซิเจน แล้วรีบนำ digesta ที่บรรจุใน anaerobic jar ไปยังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการศึกษาจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

(3) โปรโตซัวในกระเพาะหมัก

จะเก็บตัวอย่างหลังจากการให้อาหารตอนเช้า 6 ชั่วโมงโดยก่อนเก็บต้องทำความสะอาดมือและใส่ถุงมือจากนั้นทำการเปิดจุกยางที่ปิดกระเพาะส่วนรูเมนของโคเจาะกระเพาะออก แล้วทำการเก็บเอาของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) ซึ่งสุ่มเก็บเอาจากตำแหน่งต่างๆในกระเพาะรูเมน

ปริมาณ 1 มิลลิลิตรแล้วนำมาผสมกับ normal saline (10% (V/V) formaldehyde solution ใน 0.85 % (W/V) sodium chloride 9 มิลลิลิตร เพื่อยับยั้งการแบ่งตัวของโปรโตซัวแล้วนำไปตรวจนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า

7.3.4 การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์

(1) การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ 4 ชนิด คือ PDA (Potato Dextrose Agar), MSA (Mitis salivarius Agar), SFP Agar (Streptococcus selective agar), MRS Agar (Man-Rogosa agar หรือ Lactobacillus selective agar) โดยชั่งผงอาหารเลี้ยงเชื้อใส่ลงในน้ำกลั่นที่ต้มจนเดือด คนเป็นระยะเพื่อให้ผงวุ้นอาหารเลี้ยงเชื้อละลาย เมื่ออาหารเลี้ยงเชื้อละลายเข้ากันกับน้ำกลั่นดีแล้วให้ตั้งทิ้งไว้ให้อุณหภูมิลดลง แล้วทำการปรับ pH ตามชนิดของอาหาร นำไปบรรจุลงในขวดแก้วทนความร้อนเพื่อนำไปนึ่งในหม้อความดัน (auto clave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที เพื่อฆ่าเชื้อโรคยกเว้นอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด MRS Agar ที่ไม่ต้องทำการฆ่าเชื้อโรค จากนั้นทิ้งไว้ให้อุ่น (ไม่ควรทิ้งอาหารเลี้ยงเชื้อไว้ให้เย็นเกินไปเพราะจะทำให้วุ้นแข็งตัว) นำไปเทในจานเลี้ยงเชื้อ (plate) ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (ฆ่าเชื้อด้วยการอบที่ 180 ° C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง) จำนวน 8 plate/ 1 ชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ อาหารเลี้ยงเชื้อแต่ละชนิดที่เตรียมไว้จะถูกนำไปใช้ในการเลี้ยงเชื้อที่ได้จากโค 4 ตัวๆละ 2 ซ้ำต่อชนิดอาหารเลี้ยงเชื้อ ดังนั้นในแต่ละวันจะต้องเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อทั้ง 4 ชนิดจำนวน 32 plate

(2) การเตรียม rumen digesta

เตรียม rumen digesta โดยการชั่ง rumen digesta น้ำหนัก 50 กรัม ใส่ลงไปในขวดรูปชมพู่แล้วนำน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรค (โดยการนึ่งในหม้อความดัน (auto clave) ที่ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที) ใส่ลงไปปริมาตร 50 มิลลิลิตร แล้วทำการผสม rumen digesta กับน้ำกลั่นให้เข้ากัน จากนั้นปิเปตของเหลวในขวดรูปชมพู่ (Erlenmeyer flask)ให้ได้ปริมาตร 1 มิลลิลิตร นำของเหลวที่ ปิเปตได้ไปใส่ลงในหลอดทดลองที่มีน้ำกลั่น 9 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วเมื่อของเหลวรวมกับน้ำกลั่นในหลอดทดลองจะได้ปริมาตรเป็น 10 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางต่อจนได้ความเข้มข้นเป็น 10^3 เท่า

(3) การเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์ด้วยวิธีการ Spread plate

นำของเหลวที่ได้จาก rumen digesta ที่ทำการเจือจางจนได้ความเข้มข้น 10^3 เท่าไปใส่ลงในจานเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้แล้ว ทำในตู้ดูดอากาศ (laminar flow) โดยปิเปตของเหลวปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรใส่ลงในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่เตรียมไว้ เกลี่ยของเหลวที่ใส่ลงไปให้ทั่วจานเลี้ยงเชื้อด้วยแท่งแก้วพิเศษที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (spreader) แล้วบรรจุจานเลี้ยงเชื้อที่ได้ลงในถุงพลาสติกโดยจะบรรจุด้วยการคว่ำจานเลี้ยงเชื้อลง เพื่อป้องกันหยดน้ำหยดใส่โคโลนี (colony) ของจุลินทรีย์ที่เพาะเชื้อ ซึ่งอาจจะทำให้ไม่สามารถตรวจนับ colony ของจุลินทรีย์ได้ ใส่แผ่น anaeropack 1 แผ่นลงในถุงพลาสติกเพื่อดูดออกซิเจนภายในถุงออกให้หมด ซึ่งจะทำให้ในถุงพลาสติกเป็นสภาพไร้ออกซิเจน

จากนั้นนำไปเก็บไว้ในตู้บ่ม (incubator) อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาตรวจนับ colony ของจุลินทรีย์โดยเครื่องตรวจนับ colony แล้วบันทึกผล

(3) การตรวจนับ colony ของจุลินทรีย์

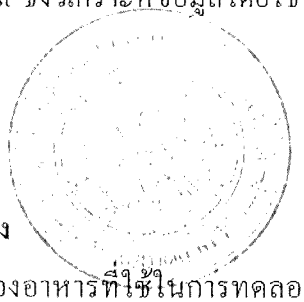
เมื่อทำการบ่มเชื้อที่ 37° C เป็นเวลา 48 ชั่วโมงครบแล้ว ก็นำเอาจานเพาะเลี้ยงเชื้อออกมาตรวจนับ colony ของจุลินทรีย์ โดยเครื่องตรวจนับ colony จุลินทรีย์ โดยเทคนิคในการตรวจนับนั้นจะใช้ปากกาจุดตรง colony ที่นับแล้วเพื่อป้องกันการนับซ้ำ และใช้ hand counter ช่วยในการบันทึกข้อมูล จากนั้นจดบันทึกข้อมูล

(4) การตรวจนับโปรโตซัว

นำของเหลวจากรูเมนที่ผสมอยู่ใน Normal saline (10% (V/V) มาตรวจนับโปรโตซัว โดยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งใช้วิธีการ hematocrit ในการช่วยนับ คือ หยดของเหลวลงบน hemacytometer จากนั้นนำไปส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า ตรวจนับปริมาณโปรโตซัว แล้วบันทึกผล

7.3.5 การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลชนิดและปริมาณจุลินทรีย์, ปริมาณโปรโตซัว, ระดับ pH, NH_3-N และปริมาณ Volatile fatty acids ที่ได้จากการทดลองไปวิเคราะห์ทางสถิติ โดยวิธี F-test ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป SAS (SAS, 1988)



7.4 ผลการทดลอง

7.4.1 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ใช้ในการทดลอง

ส่วนประกอบของวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารที่ใช้ในการทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 7.1 และ 7.2 องค์ประกอบทางเคมีของอาหารในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมใบและก้านมะขามป้อมมีค่าใกล้เคียงกัน และมีองค์ประกอบที่ใช้ในอาหารโคนมโดยทั่วๆ ไป (NRC, 2001)

7.4.2 การกินได้วัตถุแห้งและโปรตีนของโคนมทดลอง

โคนมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่เสริมใบและก้านมะขามป้อมมีการกินได้วัตถุแห้งและโปรตีนไม่แตกต่างกัน (ตารางที่ 7.3)

7.4.3 ผลต่อ pH ในกระเพาะหมัก

ผลของการเสริมก้านและใบมะขามป้อมต่อระดับของ pH ในกระเพาะหมักของโคแสดงไว้ในตารางที่ 7.4 โดยพบว่าหลังจากให้อาหารเป็นเวลา 1, 2, 3, 4, 5 และ 6 ชั่วโมง ค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่างไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยความเป็นกรด-ด่าง ของของเหลวจากกระเพาะหมักของโคกลุ่มที่ได้รับและไม่ได้รับอาหารที่เสริมมะขามป้อมนั้นเท่ากับ 6.60 และ 6.61 ตามลำดับ

7.4.4 ผลต่อปริมาณของโปรโตซัวและจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก

ผลของการเสริมก้านและใบมะขามป้อมต่อปริมาณโปรโตซัว รวมทั้งชนิดและปริมาณของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักแสดงไว้ในตารางที่ 7.5 จากการวิเคราะห์ทางสถิติไม่พบความแตกต่างทางสถิติของปริมาณโปรโตซัว ($P>0.05$) ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรโตซัวเท่ากับ 2.12×10^4 และ 2.06×10^4 ในกระเพาะหมักของกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อมตามลำดับ

ปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม *Lactobaccillus sp* นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) ค่าเฉลี่ยของปริมาณ *Lactobaccillus sp* เท่ากับ 36.31×10^5 และ 21.75×10^5 ของกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อมตามลำดับ

ปริมาณของจุลินทรีย์กลุ่ม *Clostridium sp.* นั้นพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณ *Clostridium sp.* เท่ากับ 11.37×10^5 และ 16.31×10^5 ซึ่งสอดคล้องกับผลของปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptococcus sp.* และ *Aspergillus sp.*ซึ่งพบว่าไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของปริมาณจุลินทรีย์กลุ่ม *Streptococcus sp.* เท่ากับ 80.44×10^5, 75.81×10^5 และกลุ่ม *Aspergillus sp.* เท่ากับ 28.93×10^5, 31.75×10^5 ในกระเพาะหมักระหว่างกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อมตามลำดับ

7.4.5 ผลต่อปริมาณแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) ในกระเพาะหมัก

ตารางที่ 7.6 แสดงระดับของแอมโมเนียไนโตรเจน ในของเหลวจากกระเพาะหมักของโคหลังจากให้อาหารเป็นเวลา 6 ชั่วโมง ผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าไม่มีความแตกต่างกันของระดับความเข้มข้นของแอมโมเนียไนโตรเจนในกระเพาะหมัก ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของระดับแอมโมเนียไนโตรเจนนั้นเท่ากับ 10.71 และ 12.66 mg NH_3-N/litre ในกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ตามลำดับ

7.4.6 ผลต่อปริมาณกรดไขมันระเหยได้ (Volatile fatty acids, VFAs) ในกระเพาะหมัก

ตารางที่ 7.7 แสดงค่าความเข้มข้นกรดไขมันระเหยได้ (VFAs) ของโคที่ได้รับสูตรอาหารข้นปรกติและสูตรอาหารข้นที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ค่าความเข้มข้นของกรดอะซิติค (acetic acid, C_2) หลังให้อาหารที่ 6 ชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติของโคทั้ง 2 กลุ่ม ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยความเข้มข้นกรดอะซิติคเท่ากับ 66.10 และ 67.82 mol/100 ml ในกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C_3) หลังให้อาหารที่ 6 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของกรดโพรพิโอนิกเท่ากับ 19.20 และ 18.96 mol/100 ml ในกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ตามลำดับ

ค่าความเข้มข้นของกรดบิวทีริค (butyric acid, C_4) หลังให้อาหารที่ 6 ชั่วโมง พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของกรดบิวทีริค เท่ากับ 15.43 และ 13.21 mol/100 ml ในกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ตามลำดับ

สัดส่วนกรดอะซีติคต่อกรดโพรพิโอนิค (C_2:C_3) หลังจากให้อาหาร 6 ชั่วโมงพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P>0.05$) โดยค่าเฉลี่ยของกรดอะซีติคต่อกรดโพรพิโอนิคเท่ากับ 3.4 และ 3.5 ในกลุ่มโคที่ไม่ได้รับและได้รับสูตรอาหารที่เสริมก้านและใบมะขามป้อม ตามลำดับ

Table 7.1 Ingredient composition of the diets

Ingredients	Control	Amla
Cassava pulp	33.4	33.4
Rice bran	16.0	16.0
Dried brewers' grain	12.0	12.0
Mung bean meal	8.0	8.0
Oil palm meal	18.0	0.0
Ground amla leaves/branches	0.0	18.0
Molasses	8.0	8.0
Urea	1.8	1.8
Mineral mix + Premix[1]	3.0	3.0

[1] (2.5 kg mineral mix + 0.5 kg premix) Provided per kg of concentrate: vitamin A, 5,000 IU; vitamin D_3, 2,200 IU; vitamin E, 15 IU; Ca 8.5 g; P 6 g; K 9.5 g; Mg 2.4 g; Na 2.1 g; Cl 3.4 g; S 3.2 g; Co 0.16 mg; Cu 100 mg; I 1.3 mg; Mn 64 mg; Zn 64 mg; Fe 64 mg; Se 0.45 mg.

Table 7.2 Chemical composition of the diets.

Item	Control[1]	Amla	Corn silage
	----------% of DM----------		
Dry matter	94.64 ± 0.45	95.67 ± 0.30	28.68 ± 0.00
Crude protein	17.33 ± 0.15	17.46 ± 0.14	7.20 ± 0.02
Ether extract	3.9 ± 0.12	3.1 ± 0.08	1.32 ± 0.14
Ash	7.01 ± 0.04	7.03 ± 0.01	17.89 ± 1.12
Crude fiber	16.10 ± 0.11	17.71 ± 0.02	27.60 ± 0.21
Neutral detergent fiber	45.55 ± 1.37	44.48 ± 0.80	61.32 ± 0.11
Acid detergent fiber	24.35 ± 0.17	27.70 ± 0.62	36.13 ± 0.15
Acid detergent lignin	6.33 ± 0.14	6.64 ± 0.08	2.58 ± 0.09

Table 7.3 Effect of amla leaves and branches supplementation on DM and CP intake of rumen fistulated non-lactating dairy cows.

Item	Control	Amla	SEM	P-value
DM intake (kg/d)				
Concentrate	2.84	2.87	-	-
Corn silage	3.18	3.24	0.10	0.7456
Total	6.02	6.11	0.11	0.7452
CP intake (g/d)				
Concentrate	492	501		
Corn silage	229	233	8.46	0.7427
Total	721	734	8.47	0.7424

Table 7.4 Levels of pH in the rumen of dairy cows

h	Control	Amla	SEM	P - value
1	6.83	6.73	0.15	0.49
2	6.72	6.64	0.12	0.32
3	6.63	6.64	0.12	0.40
4	6.47	6.55	0.11	0.24
5	6.49	6.51	0.09	0.59
6	6.56	6.55	0.15	0.59

SEM = standard error of the mean

Table 7.5 Microbes in the rumen of dairy cows

Item	Control	Amla	SEM	P - value
Lactobaccillus sp. (cfu/g digesta)	36.31×10^5	21.75×10^5	4.6×10^5	0.55
Clostridium sp. (cfu/g digesta)	11.37×10^5	16.31×10^5	2.3×10^5	0.20
Streptococcus sp. (cfu/g digesta)	80.44×10^5	75.81×10^5	17.1×10^5	0.93
Aspergillus sp. (cfu/g digesta)	28.93×10^5	31.75×10^5	4.6×10^5	0.59
Protozoa (/g digesta)	2.12×10^4	2.06×10^4	0.24×10^4	0.59

SEM = standard error of the mean

Table 7.6 NH_3-N ($mgNH_3$-N/litre) in the rumen of dairy cows

h	Control	Amla	SEM	P - value
6	10.71	12.66	0.98	0.51

SEM = standard error of the mean

Table 7.7 VFAs (mol/100 ml) in the rumen of dairy cows

Item	Control	Amla	SEM	P - value
Acetic acid	66.10	67.82	0.86	0.61
Propionic acid	19.20	18.96	0.81	0.89
Butyric acid	15.43	13.21	0.90	0.52
A:P	3.4	3.5	0.15	0.84

SEM = standard error of the mean

7.5 วิจารณ์ผลการทดลอง

งานวิจัยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาผลของการใช้ส่วนของพืช สารสกัดจากพืชและน้ำมันหอมระเหยจากพืช ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมัก โดยส่วนใหญ่จะเป็นการศึกษาในห้องปฏิบัติการ ในขณะที่การทดลองในตัวสัตว์นั้นมีน้อยมาก งานวิจัยครั้งนี้ระดับความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นของแอมโมเนีย และกรดไขมันระเหยง่ายในกระเพาะหมัก ไม่มีการเปลี่ยนแปลงเมื่อให้อาหารข้นที่เสริมใบและก้านมะขามป้อม ผลการทดลองเช่นเดียวกันได้รายงานการศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Benchaar et al., 2006) และในตัวสัตว์ (Cordozo et al., 2006) Cordozo et al. (2006) พบว่า anise oil (2 g/d), capsicum oil (1 g/d), และส่วนผสมของ cinnamaldehyde (0.6 g/d) และ eugenol (0.3 g/d) ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง ruminal pH, total VFA concentration, และ butyrate proportion อย่างไรก็ตาม การใช้ cinnamaldehyde (0.6 g/d) และ eugenol (0.3 g/d) สามารถลด ($P < 0.05$) ความเข้มข้นของ ammonia N และเพิ่ม ($P < 0.05$) สัดส่วนของ propionate นอกจากนี้ยังพบว่า การใช้ anise oil สามารถลด ($P < 0.05$) acetate to propionate ratio, branched-chain VFA และความเข้มข้นของ ammonia N ชนิดและประชากรของจุลินทรีย์ในงานวิจัยครั้งนี้ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในทางตรงกันข้ามกับงานวิจัยครั้งนี้ Cordozo et al. (2006) รายงานว่า ส่วนผสมของ cinnamaldehyde (0.18 g/d) และ eugenol (0.09 g/d) สามารถเพิ่ม ($P < 0.05$) ประชากรของ holotrichs ในขณะที่ anise oil ลด ($P < 0.05$) ประชากรของโปรโตซัว Lovett et al. (2006) รายงานว่า ความเข้มข้นของ total volatile fatty acid (VFA) ในของเหลวในกระเพาะหมักจะต่ำกว่า เมื่อใช้สารสกัด *Yucca schidigera* extract เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และจำนวนโปรโตซัวในกระเพาะหมักจะลดลงเป็นเส้นตรง ($P < 0.01$) ตามระดับของความเข้มข้นของสารสกัดที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ Busquet et al. (2006) ใช้สารสกัดจากพืช 12 ชนิด และสารเมแทบอไลส์ทุติยภูมิจากพืช 6 ชนิด ในระดับที่แตกต่างกัน ทำการบ่มเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ในของเหลวในกระเพาะหมักผสมกับอาหารที่มีสัดส่วนอาหารข้นต่ออาหารหยาบ 50: 50 กลุ่มการทดลองประกอบด้วย กลุ่มควบคุม (no additive), สารสกัดจากพืช (anise oil, cade oil, capsicum oil, cinnamon oil, clove bud oil, dill oil, fenugreek, garlic oil, ginger oil, oregano oil, tea tree oil, and yucca), และสารเมแทบอไลส์ทุติยภูมิจากพืช (anethol, benzyl salicylate, carvacrol, carvone, cinnamaldehyde, and eugenol) ในแต่ละกลุ่มการทดลองจะเสริม culture fluid ที่ระดับ 3, 30, 300, และ 3,000 mg/L ที่ระดับ 3,000 mg/L กลุ่มการทดลองส่วนใหญ่สามารถลดความเข้มข้นของ total volatile fatty acid (TVFA) แต่ cade oil, capsicum oil, dill oil, fenugreek, ginger oil, และ yucca ไม่มีผลทำให้ความเข้มข้นของ TVFA แตกต่างจากกลุ่มควบคุม Patra et al. (2006) ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากพืช 5 ชนิด (*Acacia concinna, Terminalia chebula, Terminalia belerica, Emblica officinalis* (amla) และ *Azadirachta indica* ในสารละลายชนิดต่างๆ (ethanol, methanol และ water) ต่อการหมักย่อยในกระเพาะหมัก Total volatile fatty acids (TVFA) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) เมื่อใช้สารสกัดจาก *T. chebula* และ *A. Indica* ในขณะที่ *Emblica officinalis* (amla) ไม่มีผล

ต่อ TVFA และ total protozoa counts ผลการทดลองที่มีรายงานมาข้างต้นนั้นผันแปร ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของพืช สารสกัดจากพืช และชนิดของน้ำมันหอมระเหย ดังนั้นยังต้องทำการวิจัยเพิ่มเติมก่อนที่จะสามารถสรุปผลได้ และควรทำการทดลองในตัวสัตว์โดยเฉพาะในโคนม

7.6 สรุปผลการทดลอง

การใช้ใบและก้านมะขามป้อมผสมในอาหารสำหรับโคนม ไม่ส่งผลต่อกระบวนการหมักย่อยในกระเพาะหมัก และไม่ส่งผลต่อชนิดและปริมาณของโปรโตซัวในกระเพาะหมัก