บทที่ 3
วิธีดำเนินการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

3.1.1 ใช้โครีดนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเชี่ยน ระดับสายเลือด 75 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัวเฉลี่ย 413 ± 25 กิโลกรัม อยู่ในช่วงการให้นมเฉลี่ย 120 ± 21 วัน และปริมาณน้ำนมเฉลี่ย 12 ± 2 กิโลกรัมต่อวัน

3.1.2 สัตว์ทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอกก่อนเข้าการทดลอง

3.1.3 สัตว์ทุกตัวได้รับการฉีดวิตามินเอ ดี3 และ อี (AD_3E) ก่อนเข้าการทดลอง

3.2 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial in a 4x4 Latin square design โดยให้ช่วงเวลาการทดลอง (period) เป็นแถว (row) และใช้สัตว์ทดลองคือโคนมเป็นคอลัมน์ (column) ซึ่งมีทรีทเมนต์ (treatment) ที่ต้องการศึกษาจำนวน 4 ทรีทเมนต์ คือ

ทรีทเมนต์ที่ 1 สูตรอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16% + ไม่เสริม (Mago-pel)

ทรีทเมนต์ที่ 2 สูตรอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 16% + เสริม (Mago-pel 300 กรัม/ตัว/ วัน)

ทรีทเมนต์ที่ 3 สูตรอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 19% + ไม่เสริม (Mago-pel)

ทรีทเมนต์ที่ 4 สูตรอาหารข้นที่มีระดับโปรตีน 19% + เสริม (Mago-pel 300 กรัม/ตัว/ วัน)

โดยมีแผนผังการทดลองดังนี้

ตารางที่ 3.1 แผนผังการทดลอง

ระยะการทดลอง	สัตว์ทดลอง			
	1	2	3	4
1	T1	T2	T3	T4
2	T2	T3	T4	T1
3	T4	T1	T2	T3
4	T3	T4	T1	T2

สำนักหอสมุดกลาง มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

3.3 การเตรียมอาหารทดลอง

3.3.1 การเตรียมฟางหมักยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการนวดด้วยเครื่องนวดข้าวและอัดเป็นฟ่อน นำมาเรียงเป็นชั้นลงในบ่อซีเมนต์ที่ปูรองพื้นด้วยพลาสติกสีดำ ละลายยูเรีย (46 %N) ในน้ำโดยใช้ยูเรีย 5 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 ลิตร หลังจากนั้นราดลงบนฟาง 100 กิโลกรัมให้ทั่ว ทำอย่างนี้เป็นชั้นๆ ตามปริมาณที่ต้องการหมัก หลังจากนั้นใช้พลาสติกสีดำคลุมบนกองฟางอย่างมิดชิด ใช้เวลาในการหมักอย่างน้อย 10 วัน จึงเปิดเพื่อนำมาให้โคกิน และปิดให้สนิททุกครั้งเพื่อรักษาคุณภาพของฟางหมัก

3.3.2 การเตรียม Mago-pel โดยใช้เปลือกมังคุดที่ปราศจากเมล็ดและจุกสีเขียว นำไปตากแดดให้แห้งประมาณ 2-3 วัน หลังจากนั้นนำไปอบที่อุณหภูมิ 60°C เป็นเวลา 2-3 วัน บดให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 0.1 มิลลิเมตร และหลังจากนั้นนำไปผสมคุกเคล้ากับแป้งมันสำปะหลังในอัตราส่วน 99.5:0.5 ตามลำดับ นำส่วนผสมที่คลุกเคล้ากันดีมา 5 กิโลกรัม ผสมกับน้ำประมาณ 800 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันแล้วอัดเม็ด หลังจากอัดเป็นเม็ดแล้วตากแดดประมาณ 1-2 วัน เพื่อง่ายต่อการเก็บรักษาและพร้อมที่จะนำไปใช้ต่อไป

ตารางที่ 3.2 ส่วนประกอบและองค์ประกอบทางเคมีของ Mago-pel ที่ใช้ในงานทดลอง

รายการ	DM	TDN	CP	CT	SP	EE	จำนวนที่ใช้
แป้งมัน	0.45	0.35	0.001	0	0	0.0002	0.5
MSP	94.82	69.65	21.39	17.72	11.75	0	99.5
รวม	95.27	70.00	21.39	17.72	11.75	0.0002	100
ราคา (บาท /กิโลกรัม)							1.5

3.4 อาหารและการให้อาหาร

การให้อาหารสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ระยะดังนี้

3.4.1 ระยะปรับสัตว์ทดลอง (preliminary period) โคทุกตัวจะได้รับอาหารหยาบคือฟางหมัก ยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์โดยได้รับแบบเต็มที่ตลอดระยะการทดลอง และมีน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้โคกินตลอดเวลาเป็นเวลา 14 วัน ก่อนเริ่มงานทดลอง เพื่อปรับสัตว์และจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมนให้คุ้นเคยกับอาหารและคอก และชั่งน้ำหนักก่อนทำการทดลอง

3.4.2 ระยะทดลอง (experimental period) แบ่งเป็น 4 ระยะการทดลอง แต่ละระยะการทดลองใช้เวลา 21วัน โดย 16 วันแรก เป็นช่วงทดลอง และ 5 วันสุดท้าย สุ่มเก็บมูลและปัสสาวะตามทรีทเมนต์

ตารางที่ 3.3 ส่วนประกอบของวัตถุดิบและองค์ประกอบทางเคมีของอาหารข้นจากการคำนวณ

รายการ	T1	T2	T3	T4
วัตถุดิบอาหาร				
มันเส้น	50.0	50.0	48.0	48.0
รำอ่อน	15.0	15.0	15.0	15.0
กากมะพร้าว	12.5	12.5	14.9	14.9
กากปาล์ม	10.0	10.0	8.7	8.7
น้ำมันทานตะวัน	6.0	6.0	6.0	6.0
ยูเรีย	2.5	2.5	3.4	3.4
กากน้ำตาล	2.0	2.0	2.0	2.0
เกลือ	0.5	0.5	0.5	0.5
ซัลเฟอร์	0.5	0.5	0.5	0.5
ไดแคลเซียม	0.5	0.5	0.5	0.5
แร่ธาตุรวม	0.5	0.5	0.5	0.5
รวม	100.0	100.0	100.0	100.0
ราคา (บาท /กิโลกรัม)[1]	9.73	9.73	9.88	9.88
องค์ประกอบทางเคมี (การคำนวณ)	.....% วัตถุแห้ง			
โปรตีนหยาบ	16.06	16.06	19.01	19.01
โภชนะที่ย่อยได้ทั้งหมด	83.01	83.01	82.42	82.42
ไขมัน	10.91	10.91	10.98	10.98

[1] เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2552

3.5 วิธีการดำเนินการทดลอง

3.5.1 ก่อนเข้าการทดลอง ถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอก และฉีดวิตามินเอ ดี3 และ อี ให้สัตว์ทุกตัว

3.5.2 ระยะปรับสัตว์ก่อนเข้าทดลอง ให้สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับฟางหมักยูเรีย 5% แบบเต็มที่ และให้อาหารข้นตามทรีทเมนต์ที่สัตว์ได้รับในคอกทดลองเป็นเวลา 14 วัน เพื่อเป็นการปรับสัตว์ให้คุ้นเคยกับอาหารและคอกทดลอง

3.5.3 สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ 2 x 2 factorial in a 4X4 Latin square design โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับอาหารข้นตามทรีทเมนต์ที่กำหนดในแต่ละระยะของการทดลอง ซึ่งแต่ละระยะการทดลองใช้เวลา 21 วัน และสัตว์ทุกตัวจะได้รับฟางหมักยูเรียแบบเต็มที่ตลอดการทดลอง

3.6 วิธีการเก็บรวบรวมข้อมูล

3.6.1 บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของสัตว์โดยชั่งน้ำหนักก่อนเข้าระยะการทดลอง (period) และในวันสุดท้ายของการทดลองในทุกระยะการทดลอง เพื่อใช้ในการคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนัก (weight change) ของสัตว์ทดลองในแต่ละช่วงการทดลอง

3.6.2 บันทึกปริมาณการให้อาหารข้น และอาหารหยาบ เพื่อใช้คำนวณหาปริมาณการกินได้ในแต่ละวันโดยทำการจดบันทึกปริมาณอาหารที่ให้กินและอาหารที่เหลือทั้งเช้าและเย็นทุกวัน

3.6.3 สุ่มเก็บตัวอย่างอาหาร และอาหารที่เหลือ โดยเก็บในปริมาณอย่างละ 500 กรัม ในแต่ละทรีทเมนต์ ในช่วง 5 วันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลอง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (DM) เถ้า (ash) โปรตีนหยาบ (crude protein) และ ไขมัน (EE) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1985) วิเคราะห์หา neutral detergent fiber (NDF) และ acid detergent fiber (ADF) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977)

3.6.4 สุ่มเก็บตัวอย่างมูลโคทุกตัว โดยสุ่มเก็บติดต่อกัน 5 วันในช่วงวันที่ 17 ถึงวันที่ 21 ของแต่ละช่วงเวลาการทดลอง สุ่มเก็บในช่วงเช้าและช่วงบ่าย โดยวิธีล้วงผ่านทวารหนัก (rectum collection) และคลุกเคล้ามูลให้เป็นเนื้อเดียวกัน และแบ่งเก็บมูลไว้ประมาณ 300 กรัมต่อครั้ง ใส่ถุงแยกเป็นรายตัว ทำเครื่องหมายให้ชัดเจน นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสให้แห้ง จนครบ 5 วัน นำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร และนำมูลทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันมาคลุกกันทั้ง 5 วันของโคแต่ละตัว จากนั้นสุ่มเก็บมูลอีกครั้งประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบของโภชนะต่างๆ ได้แก่ DM, Ash, CP, NDF, ADF และไขมัน เช่นเดียวกับการวิเคราะห์อาหาร และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) คำนวณหาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975)

3.6.5 เก็บตัวอย่างปัสสาวะในช่วง 5 วัน สุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง โดยใช้ขวดเก็บปัสสาวะซึ่งในขวดนั้นเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อปัสสาวะในสัดส่วน 1 : 10 เพื่อเป็นการตรึงไนโตรเจนในปัสสาวะก่อนที่จะนำไปเก็บที่อุณหภูมิประมาณ –5 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์หาอนุพันธ์ของพิวรีน (Purine derivertive) และครีเอตินีน (creatinine) เพื่อใช้ในการประเมินการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีน โดยการใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) ดัดแปลงตามวิธีของ Resines et al. (1992)

3.6.6 เก็บตัวอย่างเลือด ที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหาร ในวันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลอง โดยเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) ใส่สารกันเลือดแข็งตัว (EDTA) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) เพื่อเก็บพลาสม่ามาวิเคราะห์หายูเรียไนโตรเจน

3.6.7 ในวันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลองสุ่มเก็บตัวอย่างของเหลวในกระเพาะหมัก (rumen fluid) ที่เวลา 0 และ 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหารช่วงเช้า โดยใช้ stomach tube ดูดด้วย vacuum pump และวัดความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิของของเหลวในกระเพาะรูเมนทันทีโดยใช้ pH meter และแบ่ง rumen fluid เป็น 4 ส่วน

ส่วนที่ 1 ปริมาตร 45 มิลลิลิตรปรับให้มีค่า pH ประมาณ 3 ด้วยการเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อของเหลวจากกระเพาะหมักในสัดส่วน 1 : 10 เพื่อหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง ที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เก็บส่วนใสนำไปเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส จากนั้นวิเคราะห์หาแอมโมเนียไนโตรเจน (NH_3-N) โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 1030 Analyzer ตามวิธีของ Bremner and Keeney (1965) และนำมาวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ง่าย (volatile fatty acid, VFA) โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp.) โดยดัดแปลงตามวิธีของ Samuel et al. (1997)

ส่วนที่ 2 ใช้ในการศึกษาชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมัก ดังนี้

ส่วนที่ 2.1 ส่วน rumen content ที่ทราบน้ำหนักประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุในถุงพลาสติกใส นำมาเติม anaerobic dilution ที่ผสม tween 80 ให้ได้สัดส่วน rumen content : anaerobic dilution เท่ากับ 1:4 (w/v) นำมาแทนที่ก๊าซ O_2 โดยผ่านด้วยก๊าซ CO_2 เป็นเวลา 3 นาที จับถุงเขย่าอย่างแรงเพื่อให้จุลินทรีย์ที่เกาะกับเศษอาหารหลุดออกมากระจายใน solution แล้วเจือจาง rumen content เพื่อเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ roll tube technique ตามวิธีของ Hungate (1969) โดยการใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย ได้แก่ amylolytic bacteria, cellulolytic bacteria, proteolytic bacteria และ total variable count ตามรายละเอียดของ Hobson (1969)

ส่วนที่ 2.2 นำ rumen content ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formaline in normal saline with methyl green ในปริมาตร 9 มิลลิลิตร เขย่าขวดเพื่อผสมให้เข้ากัน จากนั้นจึงนำไปนับโดยใช้ counting chamber ต่อไป

ส่วนที่ 3 เก็บตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมนมาชั่วโมงละ 10 มิลลิลิตร ใส่ในขวดพลาสติกและเก็บที่อุณหภูมิ –20 องศาเซลเซียส เพื่อศึกษาชนิดของจุลินทรีย์ในกระเพาะรูเมน ด้วย Real-time PCR Technique

3.6.8 การเก็บตัวอย่างน้ำนม สุ่มเก็บ 2 วันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลองติดต่อกัน โดยเก็บในตอนเช้า และตอนเย็น แล้วนำมารวมเข้าด้วยกันตามสัดส่วนของน้ำนมที่ได้ เก็บไว้ในขวดสีชาที่มี potassium dichromate 250 มิลลิกรัม เพื่อรักษาสภาพของน้ำนมและเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเพื่อรอวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ โปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมดและของแข็งที่ไม่รวมไขมันด้วยเครื่อง Milkoscan (Model 133 V3 7 GB) และหา milk urea nitrogen (MUN) (Roseler et al., 1993)

3.7 วิเคราะห์ผลข้อมูลทางสถิติ

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติโดย analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลอง 2 x 2 แฟกทอเรียลจัดปัจจัยแบบ 4 x 4 จตุรัสลาติน โดยใช้ Proc GLM (SAS, 1996) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของแต่ละทรีทเมนต์ด้วยวิธี Orthogonal contrast ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

$$Y_{ijkl} = \mu + R_i + C_j + A_k + B_l + C_{kl} + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijk} = ค่าสังเกตจากแถวที่ i คอลัมน์ที่ j ระดับโปรตีนที่ k และเสริม Mago-pel ที่ l

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมด

R_i = อิทธิพลเนื่องจากแถวที่ i เมื่อ i = 1 ถึง 4

C_j = อิทธิพลเนื่องจากคอลัมน์ที่ j เมื่อ j = 1 ถึง 4

A_k = อิทธิพลเนื่องจากระดับโปรตีนที่ k เมื่อ k = 16 และ 19

B_l = อิทธิพลเนื่องจากการเสริม Mago-pel ที่ l เมื่อ l = 0 และ 300 g/h/d

C = อิทธิพลร่วมระหว่างระดับโปรตีนที่ k และการเสริม Mago-pel ที่ l

ε_{ijk} = Error

3.8 สถานที่ทำการวิจัย

3.8.1 หมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.2 ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.8.3 องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.) เขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

3.8.4 ศูนย์เมแทบอลิซึม ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น