บทที่ 3
วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของมันเส้นและกล้วยดิบอัดเม็ด ร่วมกับยูเรีย (แคส-แบน) ต่อกระบวนการหมักในกระเพาะรูเมน โดยวิธี *in vitro* gas production technique

3.1.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โคเนื้อพันธุ์ผสมพื้นเมือง-อเมริกันบาร์หมันที่เจาะกระเพาะรูเมน (fistulated animal) น้ำหนักเฉลี่ย 380±10 กิโลกรัม จำนวน 2 ตัว ที่เลี้ยงด้วยอาหารข้นวันละ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว และให้ฟางหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) แบบเต็มที่ (ab libitum) เป็นอาหารหยาบหลัก ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนผ่านทางรูเจาะกระเพาะรูเมน (rumen fistula) ในช่วงเช้าก่อนให้อาหาร นำมาผสมรวมกัน จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง ตามวิธีของ Menke et al. (1979)

3.1.2 อาหารทดลอง

อาหารทดลองเป็นอาหารอัดเม็ดที่ผลิตจากมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรียในสัดส่วนที่แตกต่างกัน เรียกว่า แคส-แบน (cass-bann, CB) เพื่อใช้เป็นซับสเตรท (substrate) ที่จะนำมาศึกษาจลนพลศาสตร์การผลิตแก๊ส และมีปัจจัยการทดลอง ดังนี้

ปัจจัยที่ 1 ได้แก่ ระดับของมันเส้นร่วมกับกล้วยดิบ 3 ระดับ คือ 100:0, 80:20 และ 60:40

ปัจจัยที่ 2 ได้แก่ ระดับของยูเรีย 4 ระดับ คือ 0, 4, 6 และ 8 เปอร์เซ็นต์

จากปัจจัยการทดลอง คิดเป็นสิ่งทดลองทั้งหมดเท่ากับ 3 x 4 = 1 2 สิ่งทดลอง (12 ทรีทเมนต์) วางแผนการทดลองแบบ 3x4 factorial arrangement in Completely Randomized Design และมีจำนวนซ้ำ (replicate) 3 ซ้ำต่อทรีทเมนต์ ทรีทเมนต์ทั้งหมดมีดังนี้

อาหารทดลองที่ 1 (T 1) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 100:0:0

อาหารทดลองที่ 2 (T 2) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 100:0:4

อาหารทดลองที่ 3 (T 3) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 100:0:6

อาหารทดลองที่ 4 (T 4) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 100:0:8

อาหารทดลองที่ 5 (T5) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 80:20:0

อาหารทดลองที่ 6 (T6) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 80:20:4

อาหารทดลองที่ 7 (T7) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 80:20:6

อาหารทดลองที่ 8 (T8) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 80:20:8

อาหารทดลองที่ 9 (T9) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 60:40:0

อาหารทดลองที่ 10 (T10) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 60:40:4

อาหารทดลองที่ 11 (T11) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 60:40:6

อาหารทดลองที่ 12 (T12) อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ที่มีสัดส่วนของมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรีย = 60:40:8

3.1.3 การเตรียมตัวอย่างอาหารทดลอง

เตรียมตัวอย่างอาหารทดลอง โดยใช้กล้วยดิบทั้งผล สับให้ละเอียด แล้วตากแดดให้แห้งหรืออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นำมันเส้นและกล้วยดิบตากแห้งมาบดให้ละเอียด และทำการอัดเม็ดในสัดส่วนต่าง ๆกันตามทรีทเมนต์ โดยแต่ละทรีทเมนต์มีส่วนประกอบของกำมะถันในอัตราส่วนของ N:S เท่ากับ 10:1 และเกลือ 0.5 กิโลกรัม ก่อนนำเข้าเครื่องอัดเม็ดเติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มความชื้นและช่วยให้เกิดการประสานตัว แล้วนำไปอัดเม็ดโดยใช้เครื่องอัดเม็ด จะได้อาหารอัดเม็ดแคส-แบน นำไปตากแดดให้แห้งประมาณ 2 วัน หรืออบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำอาหารอัดเม็ดแคส-แบนมาบดให้ละเอียดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

3.1.4 การเตรียมของเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid)

ทำการเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนของโคนมทดลองที่ได้รับสูตรอาหารผสม โดยเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนผ่านทางรูเจาะกระเพาะรูเมน ในช่วงเช้าก่อนให้อาหาร นำมาผสมรวมกัน จากนั้นกรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส พร้อมต่อกับท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ เพื่อรอนำมาผสมกับน้ำลายเทียม

3.1.5 การเตรียมสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม (rumen inoculum)

ทำการเตรียมสารละลายโดยใช้ของเหลวในกระเพาะรูเมน และสารละลาย ดังนี้

3.1.5.1 สารละลายแร่ธาตุหลัก (macromineral solution)

Na_2HPO_4	5.7	กรัม
KH_2PO_4	6.2	กรัม
$MgSO_4$	0.6	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

3.1.5.2 สารละลายแร่ธาตุรอง (micromineral solution)

$CaCl_2.2H_2O$	13.2	กรัม
$MnCl_2.4H_2O$	10.0	กรัม
$CoCl_2.6H_2O$	1.0	กรัม
$FeCl_2.6H_2O$	8.0	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

3.2.5.3 สารละลายบัฟเฟอร์ (buffer solution)

$NaHCO_3$	35	กรัม
NH_4HCO_3	4	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	1	ลิตร

3.1.5.4 สารละลาย รีซาซูริน (resazurin aqueous)

Resazurin	0.1	กรัม
เติมน้ำกลั่นให้ครบ	100	มิลลิลิตร

3.1.5.5 สารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน (เตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้)

น้ำกลั่น	71.3	มิลลิลิตร
1 M NaOH	3.0	มิลลิลิตร
$Na_2S_9.H_2O$	504	มิลลิกรัม

3.1.5.6 สารละลายน้ำลายเทียม (artificial saliva) 1,500 มิลลิลิตร

น้ำกลั่น	712.5	มิลลิลิตร
สารละลายแร่ธาตุหลัก	360.0	มิลลิลิตร
สารละลายแร่ธาตุรอง	0.12	มิลลิลิตร
สารละลายบัฟเฟอร์	360.0	มิลลิลิตร
รีซาซูริน	1.83	มิลลิลิตร
สารละลายไล่ออกซิเจน		

3.1.6 การเตรียมสารละลายน้ำลายเทียม

เตรียมสารละลายโดยเติมน้ำกลั่น สารละลายแร่ธาตุหลัก แร่ธาตุรอง สารละลายบัฟเฟอร์ และรีซาซูริน ตามสัดส่วนข้างต้นใส่ลงในขวดรูปชมพู่ขนาด 2,000 มิลลิลิตร ที่ต่อกับท่อแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์เพื่อไล่ออกซิเจน แล้วนำไปอุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส โดยใช้ magnetic stirrer กวนอยู่ตลอดเวลา เป็นเวลาประมาณ 2-3 นาที จากนั้นเติมสารละลายสำหรับไล่ออกซิเจน อุ่นที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส ต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง สังเกตเห็นว่าสารละลายเปลี่ยนจากสีน้ำเงินเป็นสีชมพูแสดงว่าสารละลายดังกล่าวอยู่ในสภาวะไร้ออกซิเจน จากนั้นเติมของเหลวจากกระเพาะรูเมนในสัดส่วนของสารละลายน้ำลายเทียมต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมน 2 ต่อ 1 จะได้สารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสม

3.1.7 การบรรจุสารละลายของเหลวจากกระเพาะรูเมนผสมและการบ่ม

ชั่งตัวอย่างอาหารทดลองปริมาณ 200 มิลลิกรัม ใส่ในกระบอกฉีดยาพลาสติก (plastic syringes) ขนาด 60 มิลลิลิตร นำตัวอย่างสารละลายของของเหลวจากกระเพาะรูเมนที่ผสมกับสารอาหารและน้ำลายเทียมเรียบร้อยแล้ว (rumen inoculum) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร ใส่ในกระบอกฉีดยาพลาสติกที่มีอาหารทดลองบรรจุอยู่ และใช้ three way clips ปิดให้สนิทเพื่อให้สะดวกในการวัดปริมาณแก๊สที่เกิดขึ้น แล้วนำไปอบร้อนในตู้อบร้อนที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส

3.1.8 การเก็บข้อมูล

3.1.8.1 ผลผลิตแก๊ส

จดบันทึกปริมาตรของแก๊ส โดยอ่านค่าแก๊สที่เกิดขึ้นครั้งแรกชั่วโมงที่ 2 หลังจากการอบร้อนในตู้อบร้อนที่มีอุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส จากกระบอกฉีดยาพลาสติกและปล่อยแก๊สออก แล้วนำเข้าอบในตู้อบเช่นเดิม หลังจากนั้นทำการอ่านค่าและจดบันทึกปริมาตรแก๊สที่เกิดขึ้นในชั่วโมงต่อไป คือ ชั่วโมงที่ 6, 12, 18, 24, 48 และสุดท้ายทำการบันทึกชั่วโมงที่ 72 แล้วนำค่าผลผลิตแก๊สที่ได้มาหาค่าคงที่ a, b และ c โดยการใช้โปรแกรมสำเร็จรูป fit curve เพื่ออธิบายจลนพลศาสตร์ของการผลิตแก๊สตามโมเดล หรือแบบจำลองสมการของ Ørskov and McDonald (1979) ดังนี้

$$y = a + b\,[1-e^{(-ct)}]$$

เมื่อ

y = ผลผลิตแก๊สที่เกิดขึ้น ณ เวลา t

a = จุดตัดแกน y

b = ค่าปริมาณแก๊ส ณ จุดที่เส้นกราฟราบเรียบ (asymptote)

c = ค่าอัตราการผลิตแก๊ส

3.1.8.2 กรดไขมันระเหยได้ง่าย

นำตัวอย่างของของเหลวจากกระบอกฉีดยาพลาสติกหลังการอบร้อนที่เวลา 2, 4, 6 และ 72 ชั่วโมง นำมาวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ง่าย (volatile fatty acid; VFA) โดยใช้ตัวอย่างปริมาตร 3 มิลลิลิตร เติมสารละลายกรดซัลฟูริกเข้มข้น (H_2SO_4 1 M) ปริมาตร 30 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 1000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เก็บเฉพาะส่วนใสไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้ง่ายโดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600; UV Detector (Millipore Corp.) ตามวิธีของ Samuel et al. (1997)

3.1.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลจากการทดลองนำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนของข้อมูลแบบ Analysis of Variance (ANOVA) ตามการทดลองที่มีการจัดทรีทเมนต์แบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์ (factorial experiments in CRD) และเปรียบความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของปัจจัยการทดลองโดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้โปรแกรม SAS (SAS, 1998)

แบบจำลอง:สำหรับการวิเคราะห์การทดลองที่มีการจัดทรีทเมนต์แบบแฟคทอเรียลในแผนการทดลองแบบสุ่มสมบูรณ์

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_{i+} \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ikj}$$

เมื่อ

Y_{ijk} = ค่าสังเกตจาก treatment combination ที่ ij และซ้ำที่ k เมื่อ k = 1,...,r

μ = overall mean

α_i = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย A ที่ i เมื่อ i = 1,...,3

β_j = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัย B ที่ j เมื่อ j = 1,...,4

$\alpha\beta_{ij}$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัย A และ B ที่ระดับ ij

ε_{ij} = Error

3.2 การทดลองที่ 2 การศึกษาการใช้อาหารอัดเม็ดแคส-แบน ต่อนิเวศวิทยาในกระเพาะรูเมน ผลผลิตน้ำนมและองค์ประกอบน้ำนมในโครีดนม

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โครีดนมลูกผสมพันธุ์โฮลสไตน์ฟรีเซียน จำนวน 6 ตัว น้ำหนักเฉลี่ย 399±55 กิโลกรัม มีจำนวนวันให้นมเฉลี่ย 36±10 วัน และปริมาณน้ำนมเฉลี่ย 12±3 กิโลกรัมต่อวัน

3.2.2 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ Switch back design ชนิด 2 สลับ (Lucas, 1956) ซึ่งมีความไวและมีความคลาดเคลื่อนต่ำ สามารถตรวจสอบความแตกต่างระหว่างทรีทเมนต์ได้ดี (จรัญ, 2549) โดยใช้โคนมระยะให้นม 6 ตัว แบ่งเป็น 3 กลุ่มทดลอง ๆ ละ 2 ตัว ดังนี้

กลุ่มทดลองที่ 1 (T1) สูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยฟางข้าวหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับสูตรอาหารข้นที่ไม่มีอาหารอัดเม็ดแคส-แบนในสูตร (กลุ่มควบคุม)

กลุ่มทดลองที่ 2 (T2) สูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยฟางข้าวหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับสูตรอาหารข้นที่มีอาหารอัดเม็ดแคส-แบน 1 (แคส-แบน 1) ประกอบด้วยมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรียในสัดส่วน 60:40:4

กลุ่มทดลองที่ 3 (T3) สูตรอาหารผสมสำเร็จรูปที่ประกอบด้วยฟางข้าวหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) ร่วมกับสูตรอาหารข้นที่มีอาหารอัดเม็ดแคส-แบน 2 (แคส-แบน 2) ประกอบด้วยมันเส้น กล้วยดิบ และยูเรียในสัดส่วน 60:40:6

โคนมแต่ละกลุ่มจะได้รับการเปลี่ยนไปรับทรีทเมนต์อื่นตามระยะของการทดลอง และมีแผนผังงานทดลอง (Lay out) ดังนี้

ระยะการทดลอง	สัตว์ทดลอง					
	1	2	3	4	5	6
1	T1	T2	T3	T1	T2	T3
2	T2	T3	T1	T3	T1	T2
3	T1	T2	T3	T1	T2	T3

3.2.3 วิธีการทดลอง

3.2.3.1 ระยะปรับสัตว์ (preliminary period) ก่อนเข้าการทดลอง ทำการถ่ายพยาธิภายนอกและภายใน และฉีดวิตามินเอดี$_3$อี ให้โคนมทุกตัวได้รับอาหารตามทรีทเมนต์ เป็นเวลา 14 วัน ก่อนเริ่มงานทดลอง โคนมแต่ละตัวถูกเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว มีน้ำสะอาดและแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

3.2.3.2 ระยะทดลอง (experimental period) ระยะการทดลองแบ่งเป็น 3 ระยะการทดลอง แต่ละระยะการทดลองใช้เวลา 21 วัน ในช่วงการทดลองโคนมจะได้รับอาหารตามทรีทเมนต์จนครบระยะการทดลอง และจะถูกเปลี่ยนไปรับทรีทเมนต์อื่นจนครบทุกทรีทเมนต์ตามระยะการทดลอง

3.2.4 อาหารและการเตรียมอาหารทดลอง

อาหารที่ใช้ในการทดลองเป็นอาหารในรูปแบบสูตรอาหารผสมสำเร็จรูป (total mixed ration; TMR) ที่มีสัดส่วนระหว่างข้น และอาหารอาหารหยาบ 60:40 โดยใช้ฟางข้าวหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) เป็นแหล่งอาหารหยาบ สูตรอาหารข้นทำการผสมตามทรีทเมนต์ (ตารางที่ 3.1) และคำนวณโปรตีนหยาบให้ได้ 18 เปอร์เซ็นต์ และพลังงานในรูป TDN 80 เปอร์เซ็นต์ ฟางข้าวหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) ที่ใช้เป็นแหล่งอาหารหยาบ จะทำการสับให้มีขนาดความยาวประมาณ 10-20 เซนติเมตร แล้วชั่งอาหารหยาบและอาหารข้นในสัดส่วน 40:60 นำมาผสมคลุกเคล้าให้เข้ากัน โดยอาหารผสมสำเร็จรูปที่ให้สัตว์ในแต่ละวันจะชั่งและผสมตามสัดส่วน ตามปริมาณการกินได้ของโคนมแต่ละตัว ในช่วงเช้าของทุกวัน แล้วแบ่งให้ 3 เวลา คือ 06.00, 12.00 และ 16.00 น. ตามลำดับ

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบของอาหารแต่ละสูตรที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ, %วัตถุแห้ง	T1	T2	T3
มันเส้น	49.5	16.5	30.5
รำละเอียด	5.0	5.0	5.0
กากถั่วเหลือง	25.5	14.0	14.0
กากเบียร์แห้ง	15.5	16.5	15.5
แคส-แบน 1	-	43.5	-
แคส-แบน 2	-	-	30.5
กากน้ำตาล	2.0	2.0	2.0
น้ำมันมะพร้าว	1.0	1.0	1.0
เกลือ	0.5	0.5	0.5
แร่ธาตุ	1.0	1.0	1.0
รวม	100.0	100.0	100.0
ราคา[1], บาท/กิโลกรัม	7.22	8.51	8.25

แคส-แบน 1 ราคา 11.44 บาท/กิโลกรัม

แคส-แบน 2 ราคา 11.63 บาท/กิโลกรัม

[1] เดือนตุลาคม พ.ศ. 2548

การเตรียมฟางหมักยูเรีย (5 เปอร์เซ็นต์) เตรียมโดยใช้ฟางข้าวที่ผ่านการนวดด้วยเครื่องนวดข้าวและอัดเป็นฟ่อน นำมาเรียงเป็นชั้นลงในบ่อซีเมนต์ที่ปูรองพื้นด้วยพลาสติกสีดำละลายยูเรีย (46 % N) ในน้ำ ในอัตราส่วน ยูเรีย 5 กิโลกรัมต่อน้ำ 100 กิโลกรัมต่อฟาง 100 กิโลกรัม หลังจากนั้นราดลงบนฟางให้ทั่ว ทำอย่างนี้เป็นชั้น ๆ ตามปริมาณที่ต้องการหมัก หลังจากนั้นใช้พลาสติกสีดำคลุมบนกองฟางและปิดอย่างมิดชิด ใช้เวลาในการหมักอย่างน้อย 10 วัน จึงทำการเปิดเพื่อนำมาให้สัตว์กิน และปิดให้สนิททุกครั้งเพื่อรักษาคุณภาพของฟางหมักยูเรีย (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ข)

การเตรียมอาหารอัดเม็ดแคส-แบน เพื่อนำมาประกอบในสูตรอาหารข้น เตรียมโดยเลือกกล้วยดิบที่มีความแก่ประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ ผลมีเหลี่ยมชัดเจน นำมาหั่นแล้วตากแดดให้แห้งประมาณ 2-3 วัน จากนั้นนำมันเส้นและกล้วยดิบไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร ทำการผสมตามสัดส่วน โดยแต่ละทรีทเมนต์มีส่วนประกอบของกำมะถันในอัตราส่วนของ N:S เท่ากับ 10:1 และเกลือ 0.5 กิโลกรัมโดยก่อนนำไปอัดเม็ด เติมน้ำ 2 เปอร์เซ็นต์ เพื่อช่วยเพิ่มความชื้นและช่วยในการประสานตัว หลังจากอัดเม็ดนำไปตากแดดให้แห้ง แล้วจึงนำมาผสมในสูตรอาหารข้น (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ก)

3.2.5 การเก็บข้อมูล

3.2.5.1 บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของโคนม โดยทำการชั่งน้ำหนักก่อนเริ่มการทดลองและในวันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัวและใช้ในการคำนวณปริมาณการกินได้ในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (%BW) และหน่วยกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักเมทธาบอลิก ($g/kgW^{0.75}$)

3.2.5.2 บันทึกปริมาณการกินได้อิสระของอาหาร โดยชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้และอาหารที่เหลือจะชั่งออกในตอนเช้าของวันถัดไปก่อนให้อาหารตอนเช้า และคำนวณปริมาณการกินได้ในแต่ละวัน โดยชั่งอาหารที่เหลือในช่วงเช้านำมาลบออกจากอาหารที่ให้

3.2.5.3 บันทึกปริมาณน้ำนมที่ได้จากโคนมแต่ละตัวในตอนเช้า และตอนเย็นทุกวันตลอดการทดลอง

3.2.5.4 การเก็บตัวอย่างอาหาร โดยทำการสุ่มตัวอย่างอาหารทดลองและอาหารที่เหลือติดต่อกัน 5 วันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง แล้วนำมารวมกันและแบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณวัตถุแห้ง (dry matter, DM) และส่วนที่สองนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash), โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) และไขมัน (Ether extract, EE) ตามวิธีมาตรฐานของ AOAC (1985) วิเคราะห์หาเยื่อใยที่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลาง (neutral detergent fiber, NDF) และเยื่อใยที่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid

detergent fiber, ADF) ตามวิธีการของ Goering and Van Soest (1970) และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash , AIA) โดยใช้กรดเกลือ (HCl) 2N ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977)

3.2.5.5 การเก็บตัวอย่างมูล ทำการสุ่มเก็บมูลจากโคนมทุกตัวในแต่ละระยะการทดลอง ในช่วง 5 วันสุดท้ายติดต่อกันโดยสุ่มเก็บในช่วงเช้าและบ่าย ด้วยวิธีล้วงผ่านทางทวารหนัก (grap or rectal sampling) แล้วนำมารวมกันในปริมาณที่เท่ากัน ก่อนนำตัวอย่างมูลไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีเช่นเดียวกับการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีในตัวอย่างอาหารสัตว์ และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash , AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) เพื่อคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975) โดยใช้สูตรในการคำนวณ ดังนี้

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (\%)} = 100 - \frac{[100 \times (\%\text{AIA ในอาหาร})]}{\%\text{AIA ในมูล}}$$

$$\text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะ (\%)} = 100 - \frac{[100 \times (\%\text{AIA ในอาหาร} \times \%\text{โภชนะในมูล})]}{\%\text{AIA ในมูล} \times \%\text{โภชนะในอาหาร}}$$

3.2.5.6 การเก็บตัวอย่างเลือด ทำการเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำที่บริเวณต้นคอ (jugular vein) ของโคนมแต่ละตัว ในวันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลองในชั่วโมงที่ 0 และ 4 หลังการให้อาหารตอนเช้า ประมาณ 10 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (EDTA) แล้วนำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และเก็บส่วนของพลาสมา ไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรีย-ไนโตรเจนในกระแสเลือด (blood urea nitrogen, BUN)

3.2.5.7 สุ่มเก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมน ในวันสุดท้ายของแต่ละระยะการทดลอง โดยใช้ stomach tube สอดผ่านหลอดอาหารแล้วดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนด้วย vacuum pump ในชั่วโมงที่ 0 และ 4 ภายหลังจากการให้อาหารในตอนเช้า แล้ววัดค่าความเป็นกรด-ด่างและอุณหภูมิของของเหลวในกระเพาะรูเมนทันทีโดยใช้ pH / temperature meter ซึ่งของเหลวจากกระเพาะรูเมนที่สุ่มเก็บจะนำมากรองผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้วแบ่งเป็น 2 ส่วน โดยส่วนที่ 1 ของเหลวในกระเพาะรูเมน ประมาณ 90 มิลลิลิตร ทำการปรับให้มี pH ประมาณ 3 ด้วยการเติม 1M H_2SO_4 ในสัดส่วน 1M H_2SO_4 ต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมน 1:10 เพื่อหยุดการเจริญของจุลินทรีย์ นำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หาความเข้มข้นของแอมโมเนีย-ไนโตรเจน โดยใช้เครื่อง KJELTEC Auto 2100 Analyzer ตามวิธี Bromner and Keeney (1965) และวิเคราะห์หาความเข้มข้นของกรดไขมันระเหยได้ง่าย โดยใช้เครื่อง high performance liquid chromatography (HPLC) model Water 600; UV Detector (Millipore Corp.)

ตามวิธีของ Samuel et al. (1997) และส่วนที่ 2 ใช้ในการศึกษาชนิดและจำนวนของจุลินทรีย์ภายในกระเพาะรูเมน โดยนำ rumen content ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ใส่ลงในขวดที่บรรจุ 10% formaline in normal saline with methyl green ปริมาตร 9 มิลลิลิตร จากนั้นนำไปนับโดยใช้ counting chamber เพื่อศึกษาประชากรของจุลินทรีย์ ได้แก่ แบคทีเรีย โปรโตซัว และเชื้อรา โดยวิธีการนับตรง (direct count method) ตามวิธีของ Galyean (1989) และส่วน rumen content อีกส่วนหนึ่งที่ทราบน้ำหนัก ประมาณ 10 มิลลิลิตร บรรจุในถุงพลาสติกใส นำมาเติม anaerobic dilution ที่ผสม tween 80 ในสัดส่วน rumen content : anaerobic dilution เท่ากับ 1:4 (w/v) จากนั้นนำมาแทนที่ก๊าซออกซิเจน โดยผ่านด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เป็นเวลา 3 นาที และจับถุงเขย่าอย่างแรง เพื่อให้จุลินทรีย์ที่ยึดเกาะกับเศษอาหารหลุดออกมากระจายใน solution แล้วทำการเจือจาง rumen content นำมาเพาะเลี้ยงเชื้อโดยใช้ roll tube technique ตามวิธีของ Hungate (1969) ซึ่งกลุ่มแบคทีเรียที่ทำการศึกษา ได้แก่ แบคทีเรียที่ย่อยสลายเซลยูโลส (cellulolytic bacteria) แบคทีเรียที่ย่อยสลายโปรตีน (proteolytic bacteria) แบคทีเรียที่ย่อยสลายแป้ง (amylolytic bacteria) และแบคทีเรียมีชีวิตทั้งหมด (total viable count) โดยใช้อาหารเลี้ยงเชื้อเฉพาะกลุ่มแบคทีเรีย ตามรายละเอียดของ Hobson (1969) (รายละเอียดแสดงในภาคผนวก ค)

3.2.5.8 การเก็บตัวอย่างน้ำนม สุ่มเก็บ 2 วันสุดท้ายของแต่ละช่วงการทดลองติดต่อกัน โดยเก็บในตอนเช้าและตอนเย็น แล้วนำมารวมเข้าด้วยกันตามสัดส่วนของน้ำนมที่ได้เก็บไว้ในขวดที่มี potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) 250 มิลลิกรัม เพื่อรักษาสภาพของน้ำนม และเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญ ได้แก่ โปรตีน ไขมัน น้ำตาลแลคโตส ของแข็งทั้งหมด และของแข็งที่ไม่รวมไขมันด้วยเครื่อง Milkoscan (Model 133 V3 7 GB) และนำอีกส่วนหนึ่งมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อแยกไขมันออกและเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรีย-ไนโตรเจนในน้ำนม (milk urea nitrogen, MUN) (Roseler et al., 1993)

3.2.5.9 การวิเคราะห์ทางเศรษฐกิจ โดยใช้ราคาอาหารทั้งหมด เพื่อคำนวณหาต้นทุนการผลิตของค่าอาหารต่อผลผลิตน้ำนมต่อตัวต่อวัน สำหรับราคาน้ำนมใช้การประเมินจากราคาน้ำนมดิบที่รับซื้อโดยองค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อสค.)

3.2.6 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้ทั้งหมดจากการทดลองทำการวิเคราะห์หาความแปรปรวนทางสถิติแบบ Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบสลับ (switch back design) โดยใช้โปรแกรมทางสถิติ SAS (1998) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test ตามวิธีของ Steel and Torrie (1980) โดยมีรูปแบบจำลองในการวิเคราะห์ ดังนี้

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบสลับ

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_j + \delta_{k(i)} + \beta_j + \alpha\beta_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อ

Y_{ijkl} = ค่าสังเกตจาก treatment combination ที่ระดับ j ซ้ำที่ k เมื่อ k = 1,..,r

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดของค่าสังเกต

αi = อิทธิพลเนื่องจากการจัดเรียงทรีทเมนต์ (sequence) ที่ระดับ i เมื่อ i = 1,..,3

β_j = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยช่วงเวลา (period) ที่ระดับ k เมื่อ k = 1,..,3

$\alpha\beta_{ij}$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัย sequence และ period ที่ระดับ ij

$\delta_{k(i)}$ = Main plot error หรือ animal within sequence error

ε_{ijk} = Sup-plot error

3.2.7 ระยะเวลาทำการทดลอง

3.2.7.1 เตรียมอุปกรณ์และทำการทดลอง เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2548 ถึง ธันวาคม พ.ศ. 2548

3.2.7.2 วิเคราะห์ตัวอย่าง วิเคราะห์ข้อมูล และเขียนรายงาน เดือนมกราคม พ.ศ. 2548 ถึง มิถุนายน พ.ศ. 2549

3.2.8 สถานที่ทำการทดลอง

3.2.8.1 หมวดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.8.2 ห้องปฏิบัติการอาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.8.3 ห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.8.4 ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน และฟาร์มเมทธาบอลิซึม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.2.8.5 องค์การส่งเสริมกิจการโคนมแห่งประเทศไทย (อ.ส.ค.) ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จังหวัดขอนแก่น