

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์และอาหารทดลอง

ใช้โคนมลูกผสมโฮลสไตน์ฟรีเซียน (Holstein Friesian Crossbred) ระดับสายเลือด 85.9 ± 6.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 4 ตัว น้ำหนักตัวเริ่มต้น 430.0 ± 63.0 กิโลกรัม จำนวนวันที่ให้นม (day in milk, DIM) 131.0 ± 15.6 วัน ผลผลิตน้ำนมก่อนเข้างานทดลอง 12.5 ± 2.3 กิโลกรัมต่อวัน ทำการฉีด ไบโตามิน เอดี3อี ก่อนเข้าการทดลอง 1 สัปดาห์ จากนั้นสุมโคนมให้ได้รับอาหารทดลอง คือสูตรอาหารผสมสำเร็จ ที่มีสัดส่วนอาหารชั้นต่ออาหารหยาบเท่ากับ 60:40 โดยมีส่วนผสมของอาหารหยาบดังนี้

สูตรอาหารผสมสำเร็จ 1 (TMR1) ถั่วคาวาลเคดแห้ง:ฟางข้าว:ซังข้าวโพด 20 : 20 : 0

สูตรอาหารผสมสำเร็จ 2 (TMR2) ถั่วคาวาลเคดแห้ง:ฟางข้าว:ซังข้าวโพด 20 : 0 : 20

สูตรอาหารผสมสำเร็จ 3 (TMR3) ถั่วคาวาลเคดแห้ง:ฟางข้าว:ซังข้าวโพด 30 : 10 : 0

สูตรอาหารผสมสำเร็จ 4 (TMR4) ถั่วคาวาลเคดแห้ง:ฟางข้าว:ซังข้าวโพด 30 : 0 : 10

โคนมแต่ละตัวถูกแยกขังในคอกเดี่ยวขนาด 2x4 เมตร พื้นคอนกรีต มีที่ให้อาหารแยกแต่ละตัว โดยมีน้ำสะอาด และแร่ธาตุก้อนให้กินตลอดเวลา

สูตรอาหารผสมสำเร็จคำนวณให้มีโภชนะตามความต้องการของโคนมที่ให้น้ำนมเฉลี่ย 115 กิโลกรัมต่อวัน ไขมันนม 4 เปอร์เซ็นต์ โดยมีระดับโปรตีนหยาบ 14 เปอร์เซ็นต์ และพลังงาน 2.4 McalME/kgDM (NRC, 1988) สำหรับการเตรียมสูตรอาหารผสมสำเร็จ ทำการบดถั่วคาวาลเคดแห้ง ฟางข้าว และซังข้าวโพดผ่านตะแกรงขนาด 1 เซนติเมตร แล้วนำไปผสมกับส่วนผสมวัตถุดิบอาหารชั้น ตามสัดส่วนที่กำหนดไว้ (ตารางที่ 3.1)

3.2 แผนการทดลอง

สุมโคนมเข้าทดลองตามแผนการทดลอง 4x4 ลาตินสแควร์ (Latin square design) แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วงเวลาการทดลอง (period) แต่ละระยะทดลองใช้เวลา 21 วัน มีระยะพักระหว่างระยะการทดลอง 7 วัน และระยะปรับสัตว์โดยเลี้ยงในคอก และให้สูตรอาหารที่ใช้ในการทดลองก่อนเข้างานทดลอง 7 วัน ในแต่ละระยะการทดลองมีอาหารครบทั้ง 4 สูตร เมื่อทดลองครบหนึ่งระยะการทดลอง โคแต่ละตัวจะถูกเปลี่ยนไปรับทรีทเมนต์อื่นโดยไม่ซ้ำกัน จนครบทั้ง 4 สูตร มีการให้อาหารทดลองตามแผนผังการทดลอง (lay out) ดังต่อไปนี้

แผนผังช่วงเวลาการให้อาหารทดลอง

	สัตว์ตัวที่ 1	สัตว์ตัวที่ 2	สัตว์ตัวที่ 3	สัตว์ตัวที่ 4
ช่วงเวลาการทดลองที่ 1	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4
ช่วงเวลาการทดลองที่ 2	TMR2	TMR3	TMR4	TMR1
ช่วงเวลาการทดลองที่ 3	TMR4	TMR1	TMR2	TMR3
ช่วงเวลาการทดลองที่ 4	TMR3	TMR4	TMR1	TMR2

ตารางที่ 3.1 วัตถุดิบของสูตรอาหารผสมสำเร็จที่ใช้ในการทดลอง

วัตถุดิบ, %วัตถุดิบ	TMR1	TMR2	TMR3	TMR4
ถั่วคาวาลเคดแห้ง	20.0	20.0	30.0	30.0
ฟางข้าว	20.0	0.0	10.0	0.0
ซังข้าวโพด	0.0	20.0	0.0	10.0
มันเส้น	23.0	23.0	23.0	23.0
กากน้ำตาล	5.0	5.0	5.0	5.0
รำอ่อน	9.3	8.0	11.9	9.0
กากปาล์มน้ำมัน	12.6	13.2	13.0	15.5
ไขมันปาล์ม	0.5	0.2	0.5	0.4
กากถั่วเหลือง	6.5	7.5	3.5	4.0
ยูเรีย	1.3	1.3	1.3	1.3
ไดแคลเซียม-ฟอสเฟต	0.4	0.4	0.4	0.4
เกลือ	0.4	0.4	0.4	0.4
ซัลเฟอร์	0.3	0.3	0.3	0.3
แร่ธาตุ	0.7	0.7	0.7	0.7
รวม	100.0	100.0	100.0	100.0
ราคา ¹ , บาท/กิโลกรัม	4.67	4.37	4.69	4.54

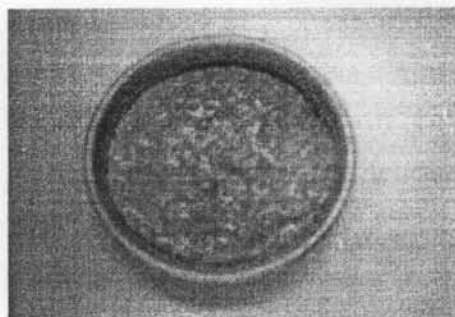
1 เดือนมิถุนายน พ.ศ. 2549

3.3 แผนการดำเนินงาน

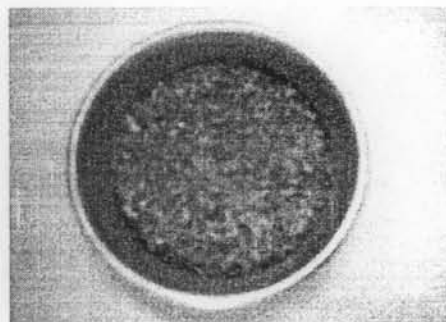
3.3.1 การให้อาหารสัตว์ทดลอง

จัดให้โคนมแต่ละตัวได้รับสูตรอาหารผสมสำเร็จ ที่มีสัดส่วนของถั่วคาวาลเคดแห้ง ฟางข้าว และซังข้าวโพดระดับต่างๆ แบบเต็มที่ (ad libitum) แบ่งให้วันละ 3 เวลา คือ ในเวลา

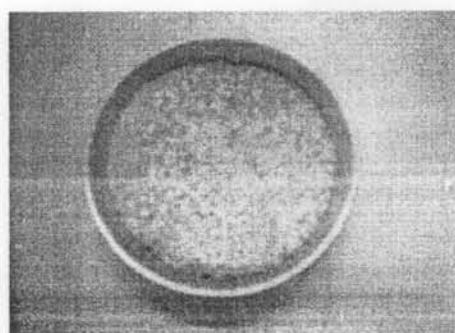
หลังรีดนมเช้า (6.30 น.) เทียง (11.30 น.) และหลังรีดนมเย็น (16.00 น.) ปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละครั้งจะชั่งน้ำหนักก่อน และอาหารที่เหลือจะชั่งออกทุกวันก่อนให้อาหารใหม่ในเวลาเช้าวันถัดไป เพิ่มปริมาณอาหารขึ้นหากอาหารเหลือในรางอาหารน้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ และมีน้ำสะอาดให้กินอย่างเพียงพอตลอดเวลา



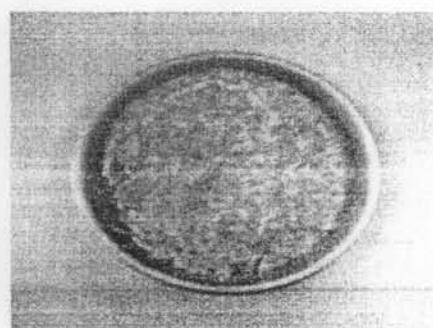
สูตรอาหารผสมสำเร็จ 1



สูตรอาหารผสมสำเร็จ 2



สูตรอาหารผสมสำเร็จ 3



สูตรอาหารผสมสำเร็จ 4

ภาพที่ 3.1 การใช้ถั่วคาวาลเคดแห้ง ร่วมกับฟางข้าวหรือซังข้าวโพดเป็นแหล่งอาหารหยابในสูตรอาหารผสมสำเร็จ สำหรับเลี้ยงโคนมในงานทดลอง

3.3.2 การเก็บข้อมูล

3.3.2.1 ชั่งน้ำหนักโค สองครั้ง คือ ครั้งแรกในช่วงเช้าภายหลังการรีดนม (6.30 น.) ในวันที่ 1 และครั้งที่สองในวันที่ 21 ที่เวลาเดียวกันของแต่ละระยะการทดลอง เพื่อคำนวณการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตัว และเพื่อนำค่าน้ำหนักตัวที่ได้มาคำนวณหาปริมาณการกินได้ในหน่วยเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว (%BW) และกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว^{0.75} (g/kg BW^{0.75})

3.3.2.2 การหาปริมาณการกินได้ บันทึกปริมาณการให้อาหารทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งตอนเช้าและตอนเย็น ด้วยการชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้และอาหารที่เหลือทุกครั้ง จดบันทึกปริมาณอาหารที่เหลือ และคำนวณปริมาณอาหารที่กินได้ในแต่ละวัน ซึ่งหาได้จากสมการ

ปริมาณการกินได้ต่อวัน (วัตถุแห้ง)

$$= [\text{อาหารให้ตอนเช้า (วัตถุแห้ง)} - \text{อาหารเหลือตอนเช้า (วัตถุแห้ง)}] \\ + [\text{อาหารให้ตอนเย็น (วัตถุแห้ง)} - \text{อาหารเหลือตอนเย็น (วัตถุแห้ง)}]$$

3.3.2.3 การหาผลผลิตน้ำนม บันทึกปริมาณผลผลิตน้ำนมที่ได้จากการรีดด้วยเครื่องรีดนมที่มีเครื่องชั่งน้ำหนักนํ้ามนทุกวันตลอดระยะเวลาการทดลองทั้งตอนเช้าและตอนเย็น เพื่อหาผลผลิตน้ำนมเฉลี่ยต่อวันของโคนม

3.3.2.4 การหาปริมาณการกินได้และและองค์ประกอบทางเคมีของโภชนะในอาหารผสมสำเร็จ ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างสูตรอาหารผสมสำเร็จทุกสูตร ติดต่อกัน 5 วันในช่วงวันที่ 17 ถึง 21 ของแต่ละระยะการทดลอง แบ่งเป็นสองส่วน ส่วนแรกนำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์วัตถุแห้ง (dry matter) นำค่าที่ได้ไปปรับปริมาณการกินได้โดยคิดต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง และอาหารอีกส่วนหนึ่งนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่างๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM) เถ้า (ash) โปรตีนหยาบ (crude protein, CP) และไขมัน (ether extract, EE) ตามวิธีของ AOAC (1985) วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลางหรือผนังเซลล์ (neutral detergent fiber, NDF) เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกรด (acid detergent fiber, ADF) และลิกนิน (acid detergent lignin, ADL) ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970) และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid insoluble ash, AIA) ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977)

3.3.2.5 การหาองค์ประกอบทางเคมีของโภชนะในมูล และสัมประสิทธิ์การย่อยได้ สุ่มเก็บมูลโคนมทุกตัว โดยสุ่มเก็บติดต่อกัน 5 วันในช่วงวันที่ 17 ถึง 21 ของแต่ละระยะการทดลอง สุ่มเก็บในช่วงเช้าและช่วงบ่าย โดยวิธีล้วงผ่านทวารหนัก (rectum collection) ป้องกันการปนเปื้อนของดิน และทำการคลุกเคล้ามูลให้เป็นเนื้อเดียวกัน และสุ่มเก็บมูลไว้ประมาณ 300 กรัมต่อครั้ง ใส่ถุงแยกเป็นรายตัว ทำเครื่องหมายให้ชัดเจน นำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสให้แห้งจนครบ 5 วัน นำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร แล้วนำมูลทั้งหมดในปริมาณที่เท่ากันมาคลุกกันทั้ง 5 วันของโคนมแต่ละตัว จากนั้นทำการสุ่มเก็บอีกครั้งประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ เพื่อนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบของโภชนะต่างๆ ได้แก่ DM, Ash, CP, เยื่อใย NDF, เยื่อใย ADF และ ADL เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ตัวอย่างอาหาร และวิเคราะห์หา AIA ตามวิธีของ Van Keulen and Young (1977) เพื่อนำมาคำนวณหาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ตามวิธีของ Schnieder and Flatt (1975) โดยสูตรที่ใช้ในการคำนวณคือ

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

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

3.3.2.6 การหาค่าประกอบน้ำนม สุ่มเก็บตัวอย่างน้ำนมในตอนเย็นวันที่ 20 และ ตอนเช้าวันที่ 21 ของแต่ละระยะการทดลอง โดยเก็บปริมาณครั้งละ 50 มิลลิลิตร จากนั้นจึง นำมาผสมกันในสัดส่วนที่เท่ากันในขวดสีชาจากนั้นเก็บที่อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส (ฉิรุมา และคณะ, 2546) เพื่อวิเคราะห์หาโปรตีน (protein) ไขมัน (fat) ของแข็งทั้งหมด (total solid) ของแข็งไม่รวมไขมัน (solid not fat) และน้ำตาลแลคโตส (lactose) โดยเครื่อง Lactostar (บริษัท FUNKE GERBER) และนำอีกส่วนหนึ่งไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที และเก็บส่วนที่เป็นของเหลวใสเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อ วิเคราะห์หาความเข้มข้นของยูเรียในน้ำนม (milk urea nitrogen, MUN) ตามวิธีการของ Roseler et al. (1993)

3.3.2.7 การศึกษากระบวนการหมักภายในกระเพาะรูเมน สุ่มเก็บของเหลวใน กระเพาะรูเมนในตอนเช้าของวันที่ 21 ของแต่ละระยะการทดลอง โดยเก็บตัวอย่างของของเหลว ในกระเพาะรูเมน 3 ครั้ง คือในชั่วโมงที่ 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากให้อาหารในตอนเช้า โดยการใส่ stomach tube สอดผ่านหลอดอาหารแล้วดูดของเหลวจากกระเพาะรูเมนโดยใช้ vacuum pump ประมาณ 300 มิลลิลิตร วัดค่าความเป็นกรด-ด่าง และอุณหภูมิ ด้วยเครื่อง pH/ temperature meter ทันที จดบันทึกข้อมูลที่วัดได้ จากนั้นกรองของเหลวผ่านผ้าขาวบาง 4 ชั้น แล้ว แบ่งเก็บไว้ประมาณ 90 มิลลิลิตร หยดด้วย 1 โมลของกรดซัลฟุริก (1 M H_2SO_4) 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของจุลินทรีย์ แล้วนำไปเหวี่ยงใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินเอาน้ำใสที่อยู่ส่วนด้านบน (supernatant) เก็บไว้ในตู้ แช่แข็งอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการ กลั่น ตามวิธีการของ Bromner and Keeney (1965) และวิเคราะห์กรดไขมันที่ระเหยได้ ได้แก่ กรดอะซิติก (acetic acid, C_2) กรดโพรพิโอนิก (propionic acid, C_3) และกรดบิวทีริก (butyric acid, C_4) โดยใช้เครื่อง High Performance Liquid Chromatography (HPLC) model Water 600 ; UV Detector (Millipore Corp) ปรับปรุงจากวิธีการของ Samuel et al. (1997)

3.3.2.8 การหาแอมโมเนีย-ไนโตรเจนในพลาสมา ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างเลือดจาก เส้นเลือดดำใหญ่ที่ลำคอ (jugular vein) ของโคนมแต่ละตัว ในวันที่ 21 ของทุกระยะ การทดลอง โดยเจาะ ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง ภายหลังจากให้อาหารในตอนเช้าประมาณ 20 มิลลิลิตร เก็บในหลอดที่มีเฮปาริน (heparin) เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และนำไปเหวี่ยง ใส (centrifuge) ที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาที นาน 15 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนที่เป็นพลาสมา

เก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อวิเคราะห์หายูเรียในพลาสมา (plasma urea nitrogen, PUN) ตามวิธีของ Crocker (1967)

3.3.2.9 ศึกษาการผลิตแก๊สของสูตรอาหารผสมสำเร็จ เก็บของเหลวจากกระเพาะรูเมนเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 39 องศาเซลเซียส นำมาศึกษาการผลิตแก๊สในห้องปฏิบัติการ ด้วยวิธี *in vitro* gas production technique ตามวิธีการของ Menke and Steingass (1988) เพื่ออธิบายผลผลิตแก๊ส รูปแบบ และจลนพลศาสตร์การผลิตแก๊ส และเพื่อศึกษาการย่อยได้ของวัตถุดิบ และอินทรีย์วัตถุในหลอดทดลอง รวมทั้งการประเมินค่าพลังงานที่ใช้ประโยชน์ได้ (ภาคผนวก ข)

3.3.2.10 เปรียบเทียบราคาสูตรอาหารผสมสำเร็จทั้ง 4 สูตร เพื่อคำนวณต้นทุนทางด้านอาหารต่อปริมาณผลผลิตน้ำนม 1 กิโลกรัม สำหรับราคาน้ำนมใช้การประเมินจากที่รับซื้อโดยสหกรณ์โคนมขอนแก่น

3.3.3 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากค่าสังเกตที่ไม่มีการวัดซ้ำ นำมาวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบ Analysis of Variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ 4x4 Latin square design โดยใช้ Proc GLM (SAS, 1985) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test และข้อมูลที่ได้ของค่าสังเกตที่มีการวัดซ้ำ ณ เวลา 0, 2 และ 4 ชั่วโมง วิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) แบบวัดซ้ำตามแผนการทดลองแบบจัดรัสสะติน (repeated measurements in latin square design) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's New Multiple Range Test โดยมีรูปแบบจำลองในการวิเคราะห์ดังนี้

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจัดรัสสะตินที่ไม่มีการวัดซ้ำ

$$Y_{ijk} = \mu + \rho_i + \gamma_j + \tau_k + \epsilon_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijk} = ค่าสังเกตจากแถวที่ i , คอลัมน์ที่ j , ทรีทเมนต์ที่ k

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

ρ_i = อิทธิพลเนื่องจากเวลา (period) เมื่อ $i = 1, 2, 3$ และ 4

γ_j = อิทธิพลเนื่องจากตัวสัตว์ (animal) เมื่อ $j = 1, 2, 3$ และ 4

τ_k = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ (treatment) เมื่อ $k = 1, 2, 3$ และ 4

ϵ_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

แบบจำลอง: สำหรับการวิเคราะห์แผนการทดลองแบบจัดสุ่มละดินที่มีการวัดซ้ำ

$$Y_{ijkl} = \mu + \rho_i + \gamma_l + \alpha_j + \delta_{jk} + \tau_k + \alpha\tau_k + \phi_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijkl} = ค่าสังเกตจากปัจจัยทดลองที่ระดับ j และเวลาที่ k แถวที่ i , คอลัมน์ที่ l เมื่อ $k = 1, \dots, r$

μ = ค่าเฉลี่ยรวมของค่าสังเกต

ρ_i = อิทธิพลเนื่องจากแถว เมื่อ $i = 1, 2, 3$ และ 4

γ_l = อิทธิพลเนื่องจากสดมภ์ เมื่อ $l = 1, 2, 3$ และ 4

α_j = อิทธิพลเนื่องจากทรีทเมนต์ที่ระดับ j เมื่อ $j = 1, 2, 3$ และ 4

δ_{jk} = อิทธิพลเนื่องมาจากตัวสัตว์ที่ระดับ k เมื่อ $k = 1, \dots, r$

τ_k = อิทธิพลเนื่องจากปัจจัยเวลา ที่ระดับ k เมื่อ $k = 1, \dots, r$

$\alpha\tau_k$ = อิทธิพลร่วมเนื่องจากปัจจัยทรีทเมนต์ที่ระดับ j และเวลาที่ระดับ k

ϕ_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนของงานทดลอง

3.4 ระยะเวลาทำการทดลอง

เริ่มทำงานทดลองวันที่ 19 มกราคม ถึง 4 พฤษภาคม พ.ศ. 2549 รวมระยะเวลา 112 วัน

3.5 สถานที่ทำการทดลอง / เก็บข้อมูล

3.5.1 หมอดโคนม ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.2 ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อาหารสัตว์เคี้ยวเอื้อง ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

3.5.3 ศูนย์วิจัยและพัฒนาทรัพยากรอาหารสัตว์เขตร้อน (Tropical Feed Resources Research and Development Center, TROFREC) คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น