บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

ใช้โคนมพันธุ์ผสม (Holstein Friesian crossbred) เพศผู้ตอน (steer) สายเลือดโฮลสไตน์ฟรีเซียน 75-80 เปอร์เซ็นต์ อายุประมาณ 3 ปี ที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมน (fistulated rumen) จำนวน 4 ตัว มีน้ำหนัก เริ่มต้นการทดลองเฉลี่ย 350±9.9 กิโลกรัม โคทุกตัวมีสุขภาพสมบูรณ์ ก่อนเริ่มต้นการทดลอง ทำการถ่ายพยาธิ (Trodax ในปริมาณ 1.5 มิลลิลิตรต่อน้ำหนักโค 50 กิโลกรัม) และไวตามิน AD_3E ([1]Rovisol ในปริมาณ 10 มิลลิลิตรต่อตัว) ให้กับโคทุกตัว ขังโคแต่ละตัวไว้ในคอกขังเดี่ยว มีที่ให้น้ำและอาหารแยกเฉพาะแต่ละตัว

3.2 อาหารทดลอง

3.2.1 อาหารหยาบหรืออาหารเยื่อใย ใช้ต้นข้าวโพดที่เก็บฝักออกจากต้นหมดแล้ว (ต้นข้าวโพดพันธุ์ข้าวโพดเหนียวหวานขอนแก่น ซึ่งเป็นพันธุ์ที่เกิดจากการผสมข้ามข้าวโพด 4 ชนิดคือ ข้าวโพดเหนียว ข้าวโพดเทียน ข้าวโพดหวาน และซูเปอร์สวีต เป็นข้าวโพดที่ปลูกเพื่อผลิตเมล็ดพันธุ์ ฝักจะตากแดดให้แห้งบนต้นข้าวโพดในแปลงที่ปลูก เมื่อเก็บฝักออกแล้วต้นข้าวโพดจะเหลือความชื้นประมาณ 20-30 เปอร์เซ็นต์) นำมาตากแดดให้แห้งจนเหลือความชื้นประมาณ 8-10 เปอร์เซ็นต์ เก็บรวบรวมไว้ในโรงเก็บที่มีหลังคาป้องกันแดดและฝนจนกว่าจะนำออกมาใช้ วิธีการใช้นำต้นข้าวโพดมาสับด้วยเครื่องสับอาหารหยาบให้มีขาดความยาวตามที่กำหนด สำหรับต้นข้าวโพดสับที่มีขนาด 1 ซม. ส่วนหนึ่งจะนำไปบดเพื่อให้ได้ขนาด 0.5 ซม. ด้วยเครื่องบดอาหารผ่านตะแกรงที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 ซม.

3.2.2 อาหารข้นที่ใช้ในการทดลอง มีชนิดของวัตถุดิบอาหาร และปริมาณที่ใช้ ดังแสดงใน Table 1

---

[1]Rovisol ประกอบด้วยไวตามิน A เท่ากั 5,00,00 IU, ไวตามิน D_3 เท่ากับ 7,500,00 IU และไวตามิน E เท่ากับ 5,000 IU

หอสมุดกลาง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วพ
SF
7865

Table 1 Ingredient of concentrate used in the experiments.

Ingredient	Proportion, % dry weight
Cassava chip	21.54
Corn meal	9.42
Rice bran	4.01
Capok meal	41.70
Sunflower seed meal	3.46
Cotton seed meal	11.37
Molasses	2.74
Limestone	1.42
Mineral mixed	3.82

3.3 แผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 4 x 4 ลาตินสแคว์ (Latin square) เพื่อศึกษาเกี่ยวกับขนาดของเยื่อใย 4 ขนาด คือ

Fiber A = ต้นข้าวโพดที่บดผ่านตะแกรงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร

Fiber B = ต้นข้าวโพดที่สับให้มีขนาด 1 เซนติเมตร

Fiber C = ต้นข้าวโพดที่สับให้มีขนาด 3-4 เซนติเมตร

Fiber D = ต้นข้าวโพดที่ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (ขนาดยาวมากว่า 15 เซนติเมตร)

Table 2 Lay out of 4 x 4 Latin square design used in the experiment.

Period	Cow			
	1	2	3	4
1	Fiber A	Fiber B	Fiber C	Fiber D
2	Fiber B	Fber C	Fiber D	Fiber A
3	Fiber C	Fiber D	Fiber A	Fiber B
4	Fiber D	Fiber A	Fiber B	Fiber C

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 ก่อนเริ่มทำการทดลอง คัดเลือกโคให้มีขนาดน้ำหนักตัวใกล้เคียงกัน นำมาเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา โคทุกตัวจะได้รับฟางข้าวอย่างเต็มที่ และเสริมด้วยอาหารข้นในปริมาณ 0.5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 20 วัน ทำการกำจัดพยาธิและฉีดไวตามิน ตามรายละเอียดในข้อ 3.1

3.4.2 สุ่มสัตว์เข้าทดลองตามแผนการทดลอง 4 x 4 ลาตินสแคว์ แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ช่วงเวลาการทดลอง (period) ในแต่ละช่วงการทดลองจะมีอาหารครบทั้ง 4 ทรีทเมนต์ เมื่อทดลองไปครบ 1 ช่วงเวลาการทดลองโคแต่ละตัวจะถูกเปลี่ยนไปรับทรีทเมนต์อื่นโดยไม่ซ้ำกันจนครบทั้ง 4 ทรีทเมนต์

3.4.3 ในแต่ละช่วงการทดลองใช้เวลา 28 วัน โดยแบ่งออกเป็น 3 ระยะ คือ

ระยะที่ 1. เริ่มตั้งแต่วันที่ 1-18 ทำการปรับและวัดปริมาณการกินได้อย่างอิสระ (voluntary feed intake)

ระยะที่ 2. ตั้งแต่วันที่ 19-26 ย้ายโคขึ้นกรงเมแทบอลิซึม (metabolic crate) เพื่อเก็บตัวอย่างมูลและปัสสาวะ

ระยะที่ 3. วันที่ 27-28 ทำการสุ่มเก็บมูลเพื่อนำไปวิเคราะห์หาโครเมี่ยม (Cr) เพื่อวัดอัตราการไหลผ่านของของแข็ง (solid passage rate)

3.5 การให้อาหารสัตว์ทดลอง

3.5.1 การให้อาหารสัตว์ทดลองในระยะปรับ (preliminary period) จัดให้โคทดลองแต่ละตัวได้รับอาหารเยื่อใยขนาดต่าง ๆ ตามแผนการทดลอง โดยให้กินอย่างเต็มที่ (ad libitum) เพื่อวัดปริมาณการกินได้อย่างอิสระ (voluntary feed intake, VFI) และเสริมอาหารข้นในปริมาณ 0.3 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักตัว เพื่อให้โคได้รับโภชนะชนิดต่างๆ ครบตามความต้องการสำหรับใช้ในการดำรงชีพ (maintenance) ตามที่แนะนำไว้ใน Kearl (1982) มีการแบ่งให้อาหารเป็น 2 เวลา คือในตอนเช้าเวลา 07.00 น. และตอนบ่ายเวลา 17.00 น. ปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละครั้งจะชั่งน้ำหนักก่อน และอาหารที่เหลือจะชั่งออกทุกวันก่อนให้อาหารใหม่ในเช้าวันถัดไป อาหารเหลือที่ชั่งออกในแต่ละครั้งต้องมีปริมาณไม่น้อยกว่า 10 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณอาหารที่ให้ในแต่ละครั้ง มีน้ำสะอาดให้กินอย่างเพียงพอตลอดเวลา เป็นเวลา 14 วัน

3.5.2 การให้อาหารในระยะเก็บข้อมูล (measurement period) ทำเช่นเดียวกันกับการให้อาหารทดลองในระยะปรับ

3.5.3 การให้อาหารในช่วงขึ้นกรงเมแทบอลิซึม (metabolism crate)

3.5.3.1 ก่อนการทดลองในกรงเมแทบอลิซึม ต้องทำการปรับโคให้มีความคุ้นเคยกับสภาพกรงเมแทบอลิซึมก่อนเป็นระยะเวลา 2 วัน เพื่อเป็นการลดความเครียด (stress) และทำให้สัตว์มีความเคยชินกับระบบการให้น้ำและอาหารก่อนทำการเก็บข้อมูล

3.5.3.2 การให้อาหารโคในช่วงขึ้นกรงเมแทบอลิซึม โคจะได้รับอาหารในปริมาณ 90 เปอร์เซ็นต์ของปริมาณการกินได้อย่างอิสระ (ทราบได้จากการวัดปริมาณการกินได้อย่างอิสระในระยะเก็บข้อมูล) ทั้งนี้เพื่อป้องกันการเลือกกิน (sorting out) อาหารของโค โคสามารถที่จะกินอาหารได้หมด และในขณะเดียวกันโคจะต้องรักษาน้ำหนักตัวให้คงที่ได้ด้วยในช่วงนี้ ใช้เวลาในการทดลอง 6 วัน

3.6 การเก็บข้อมูล

3.7.1 การเก็บตัวอย่างอาหาร ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างอาหารคือ ต้นข้าวโพด และอาหารข้นที่ใช้เลี้ยงโค ทุก ๆ วันเป็นเวลา 7 วัน นำไปอบที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นต์ของวัตถุแห้ง (dry matter) นำค่าที่ได้ไปปรับปริมาณการกินได้ของอาหารหยาบโดยคิดต่อหน่วยน้ำหนักแห้ง และอาหารอีกส่วนหนึ่งนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส เสร็จแล้วนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมีของโภชนะต่าง ๆ ได้แก่ วัตถุแห้ง (dry matter, DM), เถ้า (ash) และโปรตีนหยาบ (crude protein, CP) ตามวิธีของ AOAC (1984) วิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของเยื่อใย ได้แก่ เยื่อใยที่ไม่ละลายในสารฟอกที่เป็นกลางหรือผนังเซลล์ (neutral-detergent fiber, NDF), acid-detergent fiber (ADF) และลิกนิน (acid-detergent lignin, ADL) ตามวิธีของ Goering and Van Soest (1970)

3.7.2 บันทึกการให้อาหารทุกวัน ทั้งเช้าและเย็น ด้วยการชั่งน้ำหนักอาหารก่อนให้ทุกครั้ง สำหรับอาหารที่เหลือจะชั่งออกก่อนการให้อาหารใหม่ในเช้าของวันถัดไป จดบันทึกปริมาณอาหารที่เหลือและคำนวณปริมาณอาหารที่กินในแต่ละวัน

3.7 การเก็บของเหลวในกระเพาะรูเมน

ในตอนเช้าของวันที่ 19 ของแต่ละช่วงการทดลองหลังจากวัดปริมาณการกินได้เสร็จแล้ว ทำการสุ่มเก็บตัวอย่างของของเหลวในกระเพาะรูเมน 4 ครั้งคือในชั่วโมงที่ 0 (ก่อนให้อาหาร), 2, 4 และ 6 ชั่วโมงหลังจากให้อาหาร โดยใช้ stomach tube สอดผ่านทางช่องเปิดของกระเพาะรูเมน แล้วดูดของเหลวโดยใช้ vaccuum pump ประมาณ 200-300 มิลลิลิตร เพื่อนำของเหลวจากกระเพาะรูเมนไปวัดค่าความเป็นกรด-ด่าง ด้วยเครื่อง pH/temperature meter (model 671 ของบริษัท Extech) จดบันทึกข้อมูลที่วัดได้ ตัวอย่างของเหลวจากกระเพาะรูเมน ที่วัด pH เสร็จแล้วหยดด้วยกรดเกลือ (HCl) เข้มข้น 6N จำนวน 1 มิลลิลิตรต่อของเหลวจากกระเพาะรูเมน 10 มิลลิลิตร เพื่อหยุดปฏิกิริยาการหมักของจุลินทรีย์ นำไปหมุนเหวี่ยง (centrifuge) ที่ความเร็ว 3,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 15 นาที รินเอาน้ำใส (supernatant) เก็บไว้ในตู้แช่แข็งอุณภูมิ -20 องศาเซลเซียส เพื่อนำไปวิเคราะห์หาแอมโมเนีย-ไนโตรเจน ด้วยวิธีการกลั่น (Bremner and Keeney, 1965) และของเหลวอีกส่วนหนึ่งนำไปวิเคราะห์หากรดไขมันที่ระเหยได้โดยใช้ Gas Chromatography (GC) ต่อไป

3.8 การเก็บมูลและปัสสาวะ

3.8.1 การเก็บมูล

ทำการเก็บมูลในตอนเช้า เวลา 06.30 นาฬิกา บันทึกปริมาณน้ำหนักมูลที่ชั่งได้ และทำการคลุกเคล้ามูลให้เป็นเนื้อเดียวกันและสุ่มเก็บมูลไว้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ ของมูลทั้งหมดในแต่ละวัน แยกเป็นรายตัว เก็บใส่ถุงทำเครื่องหมายให้ชัดเจน ในแต่ละถุงต้องเติมสาร thymol ประมาณ 1 ช้อนโต๊ะ (3-5 กรัม) เพื่อป้องกันการเกิดการหมัก นำไปแช่แข็ง มูลที่ได้จากถาดเก็บมูลไม่ควรมีสิ่งอื่นเจือปน เช่น ไม่มีปัสสาวะ เศษอาหาร เป็นต้น หลังจากนั้นนำมูลที่ได้จากการสุ่มเก็บทุกวันของแต่ละช่วงการทดลองมาคลุกเคล้าให้ทั่วถึงกัน สุ่มเก็บไว้ประมาณ 20 เปอร์เซ็นต์ นำตัวอย่างเก็บไว้ในตู้แช่แข็ง เพื่อนำไปวิเคราะห์หาส่วนประกอบของโภชนะต่าง ๆ ได้แก่ DM, ash, CP, NDF, ADF และ ADL ตามวิธีการทางเคมี เช่นเดียวกับการวิเคราะห์ในตัวอย่างอาหารสัตว์เพื่อนำไปคำนวณค่าการย่อยได้ของโภชนะ (digestibility) ดังรายละเอียดใน เมธา (2533)

3.8.2 การเก็บปัสสาวะ

เก็บปัสสาวะโดยใช้ถังพลาสติกทนกรดความจุ 20 ลิตร รองรับปัสสาวะที่โคถ่ายออกมาในถังพลาสติกเติมกรดกำมะถันเข้มข้น (H_2SO_4) จำนวน 80 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการระเหยของไนโตรเจน ทำการเก็บปัสสาวะในตอนเช้า เวลา 06.30 น. บันทึกปริมาณน้ำหนักปัสสาวะที่ชั่งได้ ทำการสุ่มเก็บปัสสาวะประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ แช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำปัสสาวะที่ได้จากการสุ่มเก็บทุกวันของแต่ละช่วงการทดลองมาผสมกันและสุ่มไว้ประมาณ 10 เปอร์เซ็นต์ นำไปวิเคราะห์ไนโตรเจน เพื่อคำนวณความสมดุลของไนโตรเจน

3.9 การคำนวณการย่อยได้

คำนวณการย่อยได้ของวัตถุแห้ง และโภชนะต่าง ๆ จากวิธีชั่งน้ำหนักทั้งหมด (total collection) ตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975)

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง} = 100 - 100 \times \frac{\text{น้ำหนักของมูลปรับแห้งทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักของอาหารที่กินปรับแห้งทั้งหมด}}$$

$$\text{เปอร์เซ็นต์การย่อยได้ของโภชนะ} = 100 - 100 \times \frac{\text{น้ำหนักของโภชนะที่ขับออกในมูลปรับแห้งทั้งหมด}}{\text{น้ำหนักของโภชนะในอาหารที่กินปรับแห้งทั้งหมด}}$$

3.10 การวัดอัตราการไหลผ่านของของแข็ง

การวัดอัตราการไหลผ่านของของแข็ง (solid passage rate) โดยใช้ chromium mordanted fiber ตามวิธีการของ Hart and Wanapat (1992) และการเตรียม chromium mordanted fiber ใช้วิธีการของ Uden et al. (1980) ดังนี้

3.10.1 การเตรียมเยื่อใย คัดอาหารหยาบ (ใช้ฟางข้าว) ที่มีปริมาณของผนังเซลล์อยู่สูง นำไปบดให้มีขนาดเล็ก และนำไปร่อนผ่านตะแกรงสองชั้น (ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 และ 2 มิลลิเมตร) เพื่อคัดส่วนที่ละเอียดและหยาบเกินไปทิ้ง นำส่วนที่คัดเลือกไว้ไปทรีทด้วยสารละลาย sodium laurly sulphate เช่นเดียวกับการวิเคราะห์หา NDF ถ้าทำในปริมาณมากการใช้สาร laurly detergent เช่น ผงซักฟอก ก็ให้ผลดีเช่นกันและยังประหยัดค่าใช้จ่ายได้มาก หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำให้สะอาด เสร็จแล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส

3.10.2 นำเยื่อใยที่เตรียมเสร็จแล้วในข้อ 3.10.1 มาใส่ในบีกเกอร์เติมด้วยสารละลาย $Na_2Cr_3O_7$ ที่คำนวณให้มีปริมาณโครเมียม 12-14 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักของเยื่อใย (ปริมาตรไม่ควรเกิน 3/4 ของบีกเกอร์) เสร็จแล้วปิดด้วย aluminium foil นำไปเข้าตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างน้ำให้สะอาด แล้วแช่ด้วยกรด ascorbic ในปริมาณกรด ascorbic 50 เปอร์เซ็นต์ต่อน้ำหนักแห้งของเยื่อใย ทิ้งไว้อย่างน้อย 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปล้างด้วยน้ำให้สะอาด และนำไปอบที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส จนแห้งดีแล้วเก็บใส่ภาชนะให้มิดชิดเพื่อเตรียมนำไปใช้ต่อไป

3.10.3 การสุ่มเก็บมูลเพื่อนำมาวิเคราะห์หาโครเมียม ในวันที่ 2 หลังจากนำสัตว์ขึ้นกรง โคทุกตัวจะได้รับ chromium mordanted fiber ในปริมาณ 60 กรัม ผ่านทางช่องเปิดของกระเพาะรูเมนในเวลาเดียวกับการให้อาหารอาหารในตอนเช้า เป็นเวลาติดต่อกัน 6 วัน เพื่อปรับให้สัตว์อยู่ในสภาวะ steady state และในวันที่ 27 และ 28 ทำการสุ่มเก็บมูลโคทุก ๆ 2 ชั่วโมง ผ่านทางทวารหนัก (grab sampling) เป็นเวลา 2 วันติดต่อกัน การเก็บมูลเริ่มครั้งแรกเวลา 09.00, 11.00, 13.00, 15.00, 17.00, 19.00, 21.00, 23.00, 01.00, 03.00, 05.00, 07.00, 08.00, 10.00, 12.00, 14.00, 16.00, 18.00, 20.00, 22.00, 24.00, 02.00, 04.00, และ 06.00 น. จำนวน 24 ครั้ง นำมูลที่ได้ไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส และนำไปบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มิลลิเมตร เพื่อนำไปวิเคราะห์หาโครเมียมโดยใช้เครื่อง Spectrophotometer (เยาวมาลย์, 2523)

3.10.4 การวิเคราะห์อัตราการไหลผ่านใช้วิธีการคำนวณตาม Grovum and William (1973) (ดูในภาคผนวก)

3.11 การชั่งน้ำหนักสัตว์

ทำการชั่งน้ำหนักโคในระยะปรับและระยะทดลองทุกครั้ง การชั่งน้ำหนักโคในระยะทดลอง ชั่งในวันที่ 1 ของการเริ่มทดลอง และวันที่ 19 เมื่อสิ้นสุดการวัดปริมาณการกินได้อย่างอิสระ จะทำการชั่งน้ำหนักในตอน

เช้าเวลา 06.30 น. ก่อนการให้อาหารในตอนเช้า เพื่อนำน้ำหนักไปคำนวณปริมาณการกินได้เมื่อคิดต่อหน่วยน้ำหนักของโค และเมื่อสิ้นสุดการทดลองก็ทำการชั่งน้ำหนักอีกครั้งหนึ่ง เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักของโคในช่วงการทดลองในกรงเมแทบอลิซึม

3.12 การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลอง ใช้การวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบ analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลอง 4 x 4 ลาตินสแคว์ โดยใช้ Proc GLM (SAS, 1985) และการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของคู่ต่าง ๆ ใช้วิธี Duncan's New Multiple Range Test (Steel and Torries, 1960) ซึ่งมีสมการในการวิเคราะห์ทางสถิติ ดังนี้

$$Y_{ijk} = \mu + R_i + C_j + T_k + \varepsilon_{ijk}$$

เมื่อ Y_{ijk} = ข้อมูลที่ได้จาก Row ที่ i Column ที่ j และทรีตเมนต์ที่ k

μ = ค่าเฉลี่ยทั้งหมดในการทดลอง

R_i = อิทธิพลของ Row ที่ i

C_j = อิทธิพลของ Column ที่ j

T_k = อิทธิพลของทรีตเมนต์ที่ k

ε_{ijk} = ความคลาดเคลื่อนสุ่ม

3.13 ระยะเวลาในการทดลอง

ทำการทดลองที่หมวดโคเนื้อ ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ตั้งแต่วันที่ 15 กรกฎาคม ถึงวันที่ 25 พฤศจิกายน 2539 เป็นเวลา 133 วัน