

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการทดลอง

การทดลองมี 5 ปัจจัยการทดลอง (treatments) สลับให้กระบือทุกตัวได้รับทุก treatment ในระยะ 5 ช่วงการทดลอง โดยใช้แผนการทดลองแบบ 5 x 5 latin square design (จรัญ, 2527) ดังแผนการทดลอง

treatment ก. = การเติมน้ำเปล่าเข้ารูเมนปริมาณ 4 ลิตรต่อวัน

ข. = การเพิ่มสารละลาย $\text{NH}_4\text{-HCO}_3$ ระดับ 150 g/d

ค. = การเพิ่มสารละลาย $\text{NH}_4\text{-HCO}_3$ ระดับ 300 g/d

ง. = การเพิ่มสารละลาย $\text{NH}_4\text{-HCO}_3$ ระดับ 450 g/d

จ. = การเพิ่มสารละลาย $\text{NH}_4\text{-HCO}_3$ ระดับ 600 g/d

ช่วงเวลา ทดลองที่	เบอร์ของกระบือตัวที่				
	1	2	3	4	5
1	ก	ข	ค	ง	จ
2	ข	ค	ง	จ	ก
3	ค	ง	จ	ก	ข
4	ง	จ	ก	ข	ค
5	จ	ก	ข	ค	ง

*ใช้เวลาในการทดลองช่วงละ 13 วัน

3.2 สัตว์ทดลอง

1. ใช้กระบือปลักเพศผู้ (*Bubalus bubalis*) อายุในท้อง 3-4 ปี ที่ได้รับการเจาะกระเพาะรูเมน (fistulated rumen) จำนวน 5 ตัว ซึ่งมีน้ำหนักตัวโดยเฉลี่ย 325 ± 24.9 กก.

2. ทำการเตรียมและปรับสัตว์ทุกตัวให้มีสภาพร่างกายที่สมบูรณ์ก่อนนำขึ้นทรง โดยสัตว์จะถูกเลี้ยงในคอกขังเดี่ยว มีน้ำสะอาดให้กินตลอดเวลา สัตว์ได้ผ่านการฉีดวัคซีนเพื่อป้องกันโรคคอตีบและปากเท้าเปื่อย ฉีดยาถ่ายพยาธิโรคมาน้ำในคอกและพยาธิในทางเดินอาหาร พร้อมฉีดวัคซีนเอ บี อี ทางกล้ามเนื้อ จนสัตว์มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน

3. ทำเครื่องหมายสัตว์ทุกตัวโดยการติดเบอร์หู

3.3 อาหารและการเตรียมอาหารทดลอง

1. อาหารหยาบ ใช้ฟางข้าวเหนียวที่ได้จากฟางข้าวนาปี นวดด้วยมือ มีลักษณะเป็นเส้นยาว มักเก็บรวบรวมไว้ในโรงเก็บก่อนนำออกมาให้เลี้ยงสัตว์

2. อาหารข้น ใช้มันสำปะหลังอัดเม็ด ข้าวโพดบด และปลายข้าว เป็นแหล่งพลังงานหลัก ใช้แหล่งโปรตีนจากปลาป่น กากเมล็ดฝ้าย กากถั่วเหลือง และไขมันเร็นเป็นแหล่งของไนโตรเจนที่ย่อยสลายในรูเมนได้ง่าย มีส่วนประกอบทางเคมีคือ โปรตีนหยาบ (CP) 17% โดยมีพลังงานประมาณ 79% TDN

โดยสัตว์ทุกตัวจะได้รับอาหารสูตรเดียวกันตลอดทุกช่วงการทดลอง

3.4 การเตรียมสารละลายแอมโมเนียมโบรไมด์

ทำการชั่งสารแอมโมเนียมโบรไมด์ที่มีลักษณะผงสีขาว โดยใช้เครื่องชั่งทศนิยม 1,000 กรัม ซึ่ง 150, 300, 450 และ 600 กรัม ใส่ในขวดรูปชมภูขนาดจุ 4 ลิตร เติมน้ำประปาจนได้ปริมาตร 4 ลิตร จะได้สารละลายที่มีปริมาตร 150, 300, 450 และ 600 กรัม/4 ลิตร ซึ่งต้องทำการฉีด (infusion) เข้าในรูเมนให้หมดในท้อง 24 ชั่วโมง โดยเครื่อง Gilson Autoanalyzer Miniplus 2 proportioning pump

3.5 อุปกรณ์และการเตรียมการทดลอง

1. ใช้กรงสัตว์ทดลองจำนวน 5 กรง
2. เครื่องชั่งขนาด 15 กิโลกรัม และขนาด 50 กิโลกรัม
3. เครื่อง infusion pump (Gilson Autoanalyzer Miniplus 2 proportioning pump)
4. สายยางขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 2 มม. ยาว 30 เมตร

3.6 การให้อาหารสัตว์และการทดลอง

1. ระยะปรับสัตว์ทดลอง (preliminary period) ให้สัตว์ทุกตัวได้รับฟางอย่างเต็มที่ (ad lib.) ร่วมกับอาหารชั้น 17% CP ระดับ 0.8% ของน้ำหนักตัว เป็นเวลา 2 สัปดาห์ บนกรงเพื่อให้สัตว์ได้ปรับตัวกับกรงและวิธีการ พร้อมมีการ infuse น้ำประปาเข้าไปในรูเมนปริมาณ 4 ลิตรต่อวัน

2. ระยะทดลอง (experimental period) แบ่งเป็น 5 ช่วงการทดลอง แต่ละช่วงใช้เวลา 13 วัน โดยใน 5 วันสุดท้ายของแต่ละช่วงจะเป็นช่วงการเก็บตัวอย่าง (collection period) คือ วันที่ 9 และ 10 จะทำการสุ่มเลือดและน้ำรูเมน (rumen fluid) และในวันที่ 11 ถึง 13 จะทำการสุ่มเก็บมูลและใส่ส่วระ พร้อมทำการชั่งน้ำหนักกระบือเมื่อสิ้นสุดแต่ละช่วงเวลาการทดลอง (period)

3. การให้อาหาร สัตว์ทุกตัวจะได้รับอาหารทั้งสูตรเดียวกันทุกช่วงเวลาการทดลอง ในระดับ 0.8% ของน้ำหนักตัวสัตว์ ส่วนอาหารหมักจะให้ฟางอย่างเต็มที่ (ad lib) ในเวลาเช้า 7.30 น. และในตอนเย็น 16.30 น. พร้อมเก็บบันทึกปริมาณที่กินได้ทุกวัน

4. การเพิ่มสารละลาย (infusion) แอมโมเนียมไบคาร์บอเนต จะทำการละลายในปริมาณ 0, 150, 300, 450 และ 600 กรัมต่อ 4 ลิตร ตามทรีทเมนต์ที่สัตว์แต่ละตัวจะได้รับตามแผนการทดลองทางสถิติ

3.7 การเก็บข้อมูลและการเก็บตัวอย่าง

1. บันทึกการกินได้อย่างอิสระของอาหารหมายก่อนให้อาหารเช้าทุกวัน โดยการชั่งฟางที่เหลือออก ซึ่งและบันทึกปริมาณอาหารชั้นที่ให้อีกเข้าเย็น เพื่อนำไปคำนวณหาปริมาณการกินได้โดยอิสระ

2. ทำการชั่งและบันทึกน้ำหนักของมูลและปัสสาวะทั้งหมดในวันที่ 11, 12 และ 13 ของแต่ละช่วงการทดลอง โดยแยกเป็นแต่ละตัว เพื่อนำไปใช้คำนวณกลับถึงผลสัมประสิทธิ์การย่อยได้จากมูล และปริมาณผลผลิตจากจุลินทรีย์โปรตีนในปัสสาวะ

3. เก็บตัวอย่างอาหารข้น อาหารหมาย และมูล ในแต่ละช่วงการทดลอง (period) 500 g โดยทำการสุ่มเก็บมูล 1,000 g ในวันที่ 11, 12 และ 13 ของช่วงการทดลอง แบ่งออกเป็นสองส่วนเพื่อนำไปอบหาวัตถุแห้ง(%DM) และอีกส่วนเก็บรวบรวมแล้วสุ่มนำไปต้มเพื่อเตรียมการวิเคราะห์หาส่วนประกอบทางเคมี วัตถุแห้ง(%DM) เถ้า (ash) โปรตีนหมาย(CP) ตามวิธีมาตรฐาน AOAC (1985) และหา neutral detergent fiber (NDF), acid detergent fiber (ADF) ตามวิธีการของ Georing and Van Soest (1970) และศึกษาความสามารถในการย่อยได้ของโคเคน (digestibility) ตามวิธีการ total collection method โดยการหา DM, CP, NDF, ADF ตามกรรมวิธีที่อ้างโดย เมธา (2533)

4. เก็บตัวอย่างปัสสาวะในวันที่ 11, 12 และ 13 ของการทดลองทุกช่วงการทดลอง โดยการเติมกรดซัลฟูริก(H_2SO_4) เข้มข้น 97% ในถังเก็บปัสสาวะ เพื่อปรับให้ pH ต่ำกว่า 3 เพื่อป้องกันการสูญเสียของแอมโมเนีย ทำการสุ่ม 400 ml จากถังที่รองไว้ทั้งหมด ของแต่ละตัวในแต่ละวันของช่วงการทดลองนำเข้าแช่เย็นที่ $5^{\circ}C$ เพื่อรอการวิเคราะห์หา purine derivative เพื่อเปรียบเทียบหา microbial protein synthesis ตามกรรมวิธีของ Chen and Gomes (1992) และใช้เครื่อง HPLC ตามวิธีของ Balcells et al. (1992) อ้างถึงโดย Parker (1995)

5. ทำการเจาะเก็บตัวอย่างเลือดจากเส้นเลือด jugular vein เพื่อนำมาวิเคราะห์หา blood urea nitrogen (BUN) ตามกรรมวิธีของ Crocker (1967) ในชั่วโมงที่ 0, 1, 1.5, 2, 3, 4 และ 5 หลังการให้อาหารเช้า ในวันที่ 9 และ 10 ของแต่ละช่วงการทดลอง

6. ทำการสุ่มตัวอย่างเหลวจากกระเพาะรูเมน (rumen fluid) โดยเปิด rumen fistula ในช่วงเวลาที่ 0, 1, 1.5, 2, 3, 4 และ 5 หลังการให้อาหารเข้า ในวันที่ 9 และ 10 ของแต่ละช่วงการทดลองทำการวัด pH ทันทีด้วยเครื่องวัด pH สุ่ม จากนั้นควงให้ได้ปริมาณ 50 ml เติมกรด HCl ความเข้มข้น 6N ปริมาณ 5 ml เพื่อป้องกันการหมักของจุลินทรีย์ นำไปแช่แข็งไว้รอการวิเคราะห์หา volatile fatty acid (VFA) และแอมโมเนียไนโตรเจน ($\text{NH}_3\text{-N}$) ตามกรรมวิธีของ Zinn and Owens (1986) นำจากรูเมนส่วนที่เหลือจะทำการสุ่มปริมาณ 1 ml เติม formaline (10% v/v) 9 ml เพื่อรอการนับโปรโตซัว (protozoal counts) โดยทำการเจือจางเป็น 2 เท่าด้วย 10% formaldehyde พร้อมกับใช้ไปแปดปากกว้างดูดน้ำรูเมนที่เจือจางใส่ในภาชนะ โดยให้ตาราง (grid) $0.5 \times 0.5 \text{ mm}$. ในเลนส์ใกล้ตา ใช้กำลังขยาย 100 เท่า ทำการนับใน 20 ตารางด้านละแบบมุม ทำจำนวน 10 ซ้ำ พร้อมหาค่าเฉลี่ยต่อมิลลิลิตร ตามวิธีการของ Dehority (1984) และจำนวนแบคทีเรีย (bacterial counts) โดยใช้กล้องกำลังขยายตามกรรมวิธีของ Galyean (1989)

3.8 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

หาสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโกขนะโดยวิธีการวิเคราะห์ทางเคมีในอาหารและมูลจากการเก็บข้อมูลปริมาณที่ขับถ่ายออกทั้งหมด (total collection method) และคำนวณตามวิธีการของ Schnieder and Platt (1975) อ้างถึงโดย เมธา (2533)

$$\begin{aligned} \text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของสิ่งแห้ง (\%)} &= 100 - 100 \left(\frac{\text{น้ำหนักมูลปัสสาวะแห้ง}}{\text{น้ำหนักของอาหารที่กินปัสสาวะแห้ง}} \right) \\ &\quad (\text{วิธีชั่งน้ำหนักทั้งหมด}) \\ \text{สัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโกขนะ (\%)} &= 100 - 100 \left(\frac{\text{น้ำหนักของโกขนะในมูลปัสสาวะแห้ง}}{\text{น้ำหนักของโกขนะในอาหารปัสสาวะแห้ง}} \right) \end{aligned}$$

3.9 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองใช้การวิเคราะห์หาความแปรปรวนแบบ analysis of variance (ANOVA) ตามแผนการทดลองแบบ 5 x 5 Latin square design โดยให้ Proc GLM (SAS, 1985)

ศึกษาความแตกต่างของปัจจัยโดยใช้ F test ของ type III partial sums of squares เปรียบเทียบกับค่า Mean โดยใช้ Orthogonal polynomial contrasts ตามความสัมพันธ์ linear และ quadratic ระหว่างผลของทรีทเมนต์ ใช้ค่าระดับความแตกต่างที่ $P < 0.1$