

ภาคผนวก

### การเตรียมอาหาร Potato – Dextose Agar (PDA)

ประกอบด้วย

มันฝรั่ง                      200      กรัม

น้ำตาล Dextose 20            กรัม

วุ้น                                15      กรัม

ทำได้โดย นำมันฝรั่งมาปอกเปลือกล้างให้สะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็กๆ ต้มให้เดือดในน้ำกลั่น 20 นาที กรองเอากากออกเติมน้ำให้ครบปริมาตร 1,000 มิลลิลิตร ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7

### การวิเคราะห์ค่าอัตราการย่อยสลายของอาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้อง

อัตราการย่อยได้และการนำไปใช้ประโยชน์ของโภชนาที่ย่อยได้นับว่าเป็นสิ่งสำคัญที่จะประเมินถึงประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของอาหาร โดยการตรวจวัดอัตราการย่อยได้เป็นวิธีการที่นิยมมากที่สุดเพราะมีความสะดวก และง่าย ซึ่งสามารถทำได้โดยการนำโภชนาที่สูญเสียออกทางมูลบออกโภชนาที่สัตว์กิน แสดงค่าเป็นร้อยละของปริมาณวัตถุแห้งที่เรียกว่า ค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของวัตถุแห้ง (Digestibility coefficient of dry matter) วิธีการประเมินค่าการย่อยได้โดยทั่วไปมี 2 วิธี (พิชัย, 2534) คือ

1. การวิเคราะห์โดยตรงจากมูล (Total collection method) เป็นการหาการย่อยได้โดยการเก็บมูลทั้งหมดที่สัตว์ถ่ายในช่วงระยะทดลอง (collection period) ลบออกจากปริมาณอาหารทั้งหมดที่สัตว์กินการประเมินค่าการย่อยได้โดยวิธีนี้จะให้ค่าที่ใกล้เคียงความเป็นจริง แต่เป็นวิธีการที่ยุ่งยากในขั้นตอนของการจัดการเกี่ยวกับกรงทดสอบ สัตว์ทดลอง และการเก็บมูล (พิชัย, 2534)

2. การใช้ตัวบ่งชี้ (indicator method) เป็นการหาการย่อยได้จากการประเมินตัวบ่งชี้ที่เติมลงไปในการทดลอง เช่น chromic oxide ( $\text{Cr}_2\text{O}_3$ ), ferric oxide และ polyethylene glycol หรือตัวบ่งชี้ที่พบอยู่โดยธรรมชาติของอาหารทดลอง เช่น ลิกนิน และเส้นใยที่ไม่ละลายในกรด

(acid insoluble ash ; AIA) เป็นต้น การประเมินค่าการย่อยได้โดยวิธีนี้เป็นวิธีการที่สะดวก แต่ค่าที่ได้ออกมาจะต่ำกว่าความเป็นจริง (Thonney *et al.*, 1979)

### การวิเคราะห์การย่อยสลายในกระเพาะรูเมน

การประเมินประสิทธิภาพการใช้ประโยชน์ของอาหารในสัตว์เคี้ยวเอื้อง นอกจากจะใช้วิธีการอัตราการย่อยได้ของอาหารแล้วยังมีการประเมินคุณภาพของอาหารที่มีคุณภาพใกล้เคียงกัน คือ การประเมินค่าการย่อยสลายในกระเพาะรูเมน โดยการประเมินค่าการย่อยสลายของไนโตรเจนในกระเพาะรูเมน สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน เช่น การใช้สัตว์ทดลอง (*In vivo* method) การวิเคราะห์ทางเคมี (*In vitro* method) และการใช้ถุงไนล่อน (nylon bag technique, *In sacco*, *In situ* method)

### การวิเคราะห์ค่าการย่อยสลายของโปรตีนโดยการใช้สัตว์ทดลอง (*In vivo* Method)

การวัดค่าการย่อยสลายของโปรตีนโดยวิธีนี้ต้องใช้สัตว์ทดลองที่ได้รับการผ่าตัดและติดตั้ง re-entrant cannulae ในกระเพาะรูเมน และ/หรือ abomasum, duodenum (Miller, 1982 ; Lindberg, 1985) ปริมาณของโปรตีนที่ไม่ย่อยสลายในกระเพาะรูเมน (undegradable protein) สามารถคำนวณได้จากความแตกต่างระหว่างการกินได้ของโปรตีน และผลบวกของ endogenous และ microbial proteins ที่ผ่านเข้าไปยังกระเพาะส่วนโอม้าซึม (abomasums) หรือ กระเพาะส่วนดูโอดินัม (duodenum) โดยการประมาณค่า microbial protein สามารถทำได้โดยใช้ microbial markers เช่น nucleic acids, diaminopimelic acid (DAPA), amino-ethylenephosphoric acid (AEP) หรือ radioisotopes เช่น <sup>35</sup>N, <sup>32</sup>P หรือ <sup>15</sup>N ถึงแม้การหาค่าการย่อยสลายของโปรตีนด้วยวิธี *in vivo* จะมีความยุ่งยาก ต้องใช้สัตว์ที่ได้รับการผ่าตัด ต้องใช้แรงงานมาก ใช้เวลานานและเสียค่าใช้จ่ายสูง แต่ก็มีผลจำเป็นเพราะเหมาะที่จะได้ใช้เป็นมาตรฐานเปรียบเทียบกับวิธีการทางเคมี (Lindberg, 1985)

### การวิเคราะห์ค่าการย่อยสลายของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ทางเคมี (In vitro Method)

การวิเคราะห์โดยวิธีนี้สามารถทำได้ 3 วิธี คือ

#### 1. การหาค่าการละลายได้ของโปรตีน

หลักการหาค่าการย่อยสลายของโปรตีนในรูเมนโดยวิธีนี้คือ การสกัดไนโตรเจนที่ละลายได้จากอาหารด้วยสารละลายในระยะเวลาต่างๆ กัน สารละลายที่ใช้ เช่น McDougal's mineral buffer (Crooker *et al.*, 1978), Burroughs mineral buffer (Burroughs *et al.*, 1950 ; Wohlt *et al.*, 1973 and Crawford *et al.*, 1978), Durand's buffer (Lindberg *et al.*, 1982), sodium chloride (Smith *et al.*, 1959) และ distilled water (Little *et al.*, 1963) ผลของการหาค่าการละลายได้ของโปรตีนที่วิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับสารละลาย (เช่น pH, ionic strength) และวิธีการสกัด (เช่น อุณหภูมิ เวลาที่ใช้ในการสกัด ระดับของการกวนสารละลาย ขณะวิเคราะห์ และขนาดของตัวอย่างอาหารที่ใช้วิเคราะห์)

#### 2. การวัดปริมาณแอมโมเนีย

หลักการของวิธีการนี้คือ การวัดปริมาณของแอมโมเนียที่เกิดขึ้น จากการจุ่มอาหารลงใน rumen liquor แล้วทำการคำนวณหาค่า protein degradability จากปริมาณแอมโมเนีย (Chamberlain and Thomas, 1979)

#### 3. การใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีน

เป็นการใช้เอนไซม์จากแหล่งต่างๆ ที่มีคุณสมบัติสามารถย่อยสลายโปรตีน (proteolytic enzymes) ซึ่งจะย่อยโปรตีนได้แอมโมเนียแล้วทำการวัดปริมาณแอมโมเนียที่เกิดขึ้น ทำการคำนวณหาค่า protein degradability เช่นเดียวกับวิธีการข้างต้น

### การวิเคราะห์ค่าการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้เทคนิคถุงในลอน

การใช้เทคนิคถุงในลอน (*in situ*) เพื่อประเมินค่าการย่อยได้ของอาหารในกระเพาะหมัก ได้มีการใช้กันอย่างกว้างขวาง เพราะเป็นวิธีการที่ทำได้ง่าย และมีค่าใช้จ่ายที่ไม่สูงมากนัก วิธีการนี้ทำได้โดยการนำตัวอย่างอาหารที่ต้องการทดสอบมาบดผ่านตระแกรงขนาด 1 – 2 มิลลิเมตร ใส่ในถุงผ้าในลอน แล้วนำไปแช่ในกระเพาะรูเมนของสัตว์โดยสอดใส่ทาง cannulae ที่ต้องการทดสอบที่เวลาต่าง ๆ กันเพื่อหาค่าการย่อยสลายของอาหารที่ต้องการทดสอบ โดยวิธีการนี้สามารถนำไปใช้ในการอธิบายลักษณะการย่อยสลายของเชื้อใย และ โปรตีนในอาหารได้ วิธีการนี้สามารถวัดการย่อยสลายโดยตรง และยังไปกว่านั้นการ incubate อาหารในกระเพาะหมักที่ระยะเวลาแตกต่างกัน จะสามารถอธิบายถึงความสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความสามารถในการย่อยอาหารได้ (Hovell *et al.*, 1986) โดยค่าปริมาณการย่อยสลายของวัตถุแห้ง ในช่วงระยะเวลาต่างๆ จะสามารถมาคำนวณโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป NEWAY EXCEL (Ørskov and McDonald, 1979) โดยการประเมินการย่อยสลายในกระเพาะรูเมนโดยใช้เทคนิคถุงในลอนจะต้องมีการควบคุมปัจจัยต่างๆ ดังนี้

#### ลักษณะเฉพาะของถุง

ชนิดของวัสดุที่ใช้ทำถุง ขนาดของถุง ตลอดจนขนาดและความสม่ำเสมอของรูถุงจะมีผลต่อค่าที่ได้ โดยถุงควรทำมาจากโพลีเอสเตอร์ (Dacron หรือ nylon) (Madsen and Hvelplund, 1994) ถุงที่ทำจากผ้ากรองในลอน HSO13 ขนาดของรูจะมีผลต่อค่าที่ได้มาก โดยรูถุงควรมีขนาดกว้างพอที่จะให้ของเหลวและจุลินทรีย์ไหลผ่านเข้าออกได้สะดวก แต่ต้องไม่กว้างจนทำให้ชิ้นส่วนที่ไม่ถูกย่อยของอาหารที่ไม่ถูกย่อยผ่านออกจากถุงได้ โดยพบว่าถ้าใช้ถุงที่มีขนาดรูเล็กเกินไปจะทำให้จำนวนจุลินทรีย์ทั้งหมด จำนวนจุลินทรีย์ที่ย่อยเซลลูโลสและโปรโตซัว ตลอดจน pH ในถุงลดลง และถ้าใช้ถุงที่มีขนาดรูกว้างมากเกินไป ค่าการย่อยได้ของวัตถุแห้งจะเพิ่มขึ้น ขณะเดียวกันอนุภาคของอาหารที่หายไปเพราะการล้างจะมีค่าเพิ่มมากขึ้นด้วย (Ørskov *et al.*, 1983)

การใช้ถุงที่มีขนาดเล็กกว่า 10  $\mu\text{m}$  จะเป็นการจำกัดจำนวนของโปรโตซัวและแบคทีเรียที่จะเข้าไปในถุง ซึ่งถุงควรมีขนาดรูอย่างต่ำ 30  $\mu\text{m}$  (Meyer and Mackic, 1986) ขนาดของถุงไม่ค่อยมีผลต่อค่าที่วัดมากนัก แต่สัดส่วนของปริมาณตัวอย่างต่อพื้นที่ผิวของถุง มีผลต่อค่าดังกล่าวมากกว่า ดังนั้นถ้าเพิ่มปริมาณตัวอย่างขึ้นโดยไม่เพิ่มขนาดถุงให้ได้สัดส่วนกัน อัตราการย่อยได้จะลดลง ถุงที่มีขนาดเหมาะสมควรใช้ปริมาณตัวอย่าง 10 – 15 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตรของพื้นที่ทั้งหมดของถุง และอัตราส่วนของความกว้างต่อความยาวของถุงควรอยู่ระหว่าง 1:1 ถึง 1:2.5

และควรหลีกเลี่ยงการเย็บถุงที่ทำให้เกิดเป็นมุมแหลมที่ก้นถุง เพราะอาจทำให้อาหารบางส่วนไปอุดอยู่ที่มุมถุง (Madsen and Hvelplund.,1994)

### ลักษณะตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างอาหารที่จะใช้ในเทคนิคถุงไนลอน ควรจะทำให้แห้งที่อุณหภูมิต่ำกว่า 60 องศาเซลเซียส หรือใช้วิธีทำแห้งโดยวิธีการแช่แข็ง (freeze drying) (Madsen and Hvelplund, 1994) การรอบตัวอย่างที่จะวิเคราะห์ไม่ควรอบที่อุณหภูมิเกิน 60 องศาเซลเซียส เพราะจะทำให้องค์ประกอบทางเคมีในอาหารเปลี่ยนไป และตัวอย่างอาหารควรบดโดยผ่านตะแกรง 1 มิลลิเมตร หรือ 30 mesh (เมธา, 2533) มีการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่า การบดตัวอย่างผ่านตะแกรงตั้งแต่ 0.3 – 5 มิลลิเมตร ได้ค่าที่ไม่แตกต่างกันมากนัก แต่ถ้าชิ้นส่วนอาหารใหญ่เกินไปการย่อยได้จะลดลง และอาจใช้เวลาในการย่อยยาวนานขึ้น ดังนั้นอนุภาคของอาหารควรบดผ่านตะแกรงที่ขนาดเล็กกว่า 5 มิลลิเมตร ซึ่งบางตัวอย่างควรบดให้ละเอียดถึง 1.5 – 2.5 มิลลิเมตร และภายหลังจากบดอาหารแล้วควรร่อนผ่านตะแกรงอีกครั้ง เพื่อแยกเอาส่วนที่ละเอียดเกินไปออกเพราะส่วนที่ละเอียดเกินไปนี้จะทำให้เกิดการหมักอย่างรวดเร็ว หรือผ่านออกไปจากถุงไปก่อนที่จะเกิดการหมักย่อย ค่าที่ได้จึงเกิดการผิดพลาดได้ (Madsen and Hvelplund., 1994)

### การเตรียมตัวอย่างอาหาร

ตัวอย่างที่ใช้ในเทคนิคถุงไนลอน ถ้าเป็นอาหารหยาบใช้ประมาณ 3 กรัม ส่วนตัวอย่างอาหารโปรตีนหรือเมล็ดธัญพืชจะใช้ประมาณ 4 – 5 กรัม เมื่อชั่งตัวอย่างอาหารใส่ถุงแล้วใช้เชือกไนลอนยาวประมาณ 20 – 30 เซนติเมตร มัดให้เรียบร้อยทำเครื่องหมายแต่ละถุงจากนั้นรวมถุงเป็นพวงเพื่อนำไปแช่ในกระเพาะหมัก ซึ่งสามารถนำออกมาในแต่ละช่วงเวลาได้สะดวก (เมธา, 2533)

### การใส่ถุงในกระเพาะหมัก

เมธา (2533) ได้แนะนำว่าควรจัดอาหารในถุงให้กระจายอย่างสม่ำเสมอก่อนนำไปแช่ในกระเพาะหมัก จากนั้นค่อย ๆ ใส่ถุงทั้งหมดลงในกระเพาะหมัก และผูกเชือกไนลอนติดกับฝาปิดของท่อเก็บตัวอย่างอาหาร โดยปกติถุงควรจะถูกแช่ไว้ในกระเพาะหมักส่วนล่าง (ventral sac) โดยต้องให้ถุงทุกใบสัมผัสกับส่วนของของเหลวในกระเพาะหมักได้ดี เพราะถ้ามีการสัมผัสน้อยการย่อยได้ของอาหารในถุงจะลดลง

แบคทีเรียส่วนใหญ่จะอยู่ในส่วนของของเหลวในกระเพาะหมักส่วนล่าง ที่สามารถจะรวมกันเป็นกลุ่มและเข้าย่อยส่วนหน้าของอาหารได้ โดยการ incubate ณ ในอุณหภูมิของกระเพาะหมักส่วนล่างจะทำให้แบคทีเรียสามารถเข้าไปย่อยสลายอาหารได้อย่างเต็มที่ (Huntington, 1997)

ความยาวของเชือกในลอนกับฝาเก็บตัวอย่างควรจะมีความเหมาะสมโดย Stritzler *et al.* (1990) ได้อธิบายว่า ความยาวของเชือกในลอนที่ผูกกับฝาต่อเก็บตัวอย่างนั้น จะมีผลอย่างมากต่อการย่อยได้ของอาหารที่อยู่ในถุง โดยถ้าเชือกสั้นเกินไปจะทำให้ถุงทั้งหมดจมไม่ถึงส่วนของของเหลวในกระเพาะหมัก ซึ่ง Ørskov (1982) และ Lindberg (1983) ได้แนะนำว่าความยาวของเชือกอย่างน้อยควรจะเป็น 50 เซนติเมตรเพื่อให้เกิดความคล่องตัวในการเคลื่อนที่ของถุงในกระเพาะหมัก การใช้ตุ้มเหล็กถ่วงน้ำหนักผูกกับถุงไม่ให้ถุงลอย พบว่าการใช้ตุ้มเหล็กถ่วงน้ำหนักอาจช่วยลดความแตกต่างระหว่างถุงได้

วิธีการใส่ถุงในกระเพาะหมักในการศึกษาแบบ *in sacco* method สามารถทำได้โดย

1. วิธีมาตรฐาน (Standard method) คือใส่หลายถุงในกระเพาะหมักพร้อมกันแต่เอาออกมาวิเคราะห์ที่เวลาต่างกัน
2. วิธี Complex exchange method คือใส่ถุงในกระเพาะหมักที่ระยะเวลาต่างกัน แล้วเอาออกพร้อมกัน ซึ่งวิธีนี้มีข้อดีคือประหยัดเวลาและลดความแปรปรวนในการล้างถุงได้ดี และให้ผลดีกว่าวิธีมาตรฐาน

แต่การให้อาหารสัตว์ทดลองวันละครั้ง วิธีมาตรฐานจะให้ผลที่ดีกว่า เพราะสภาพในกระเพาะหมักมีความแปรปรวนมากในแต่ละช่วงของวัน คือ pH จะต่ำลงหลังจากให้อาหาร จากนั้นจะค่อย ๆ สูงขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้น ถ้าใส่ถุงลงในกระเพาะหมักพร้อมกันครั้งเดียว ถุงทุกใบจะได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงเท่ากัน แต่ถ้าใส่ถุงต่างเวลากัน ถุงแต่ละใบก็จะได้รับสภาพที่ต่างกัน ทางแก้ อาจทำได้โดยให้อาหารบ่อยครั้งต่อวัน หรือให้อาหารผสมครบสูตร (Total mixed ration) เพื่อป้องกันไม่ให้สัตว์เลือกกินอาหาร (บุญล้อม, 2539)

### การล้างดูง

การล้างดูงหลังจากการนำดูงออกจากกระเพาะรูเมนเป็นสิ่งสำคัญเช่นเดียวกัน เพราะมีผลต่อค่าที่ได้จากวิธีการนี้ Mehrez and Ørskov (1977) และ Dewhurst *et al.* (1995) แนะนำว่า ให้ใช้น้ำเย็นในการล้างดูง โดยให้ล้างทันทีหลังจากเอาออกจากกระเพาะหมักแล้ว เมธา (2533) เสนอว่า ควรล้างในน้ำก๊อจนใส โดยค่อยๆล้างเศษอาหารออกจากกระเพาะหมักที่ติดมากับดูงออกให้หมดแล้วค่อยๆบีบล้างดูงให้สะอาดจนน้ำใส โดยจะทำการล้าง 3 ถึง 4 ครั้งต่อ 1 ดูง

### การอบดูง

หลังจากล้างดูงตัวอย่างจนแน่ใจว่าสะอาดแล้ว ให้นำดูงไปอบในตู้อบแบบลมร้อน โดยใช้อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส นาน 48 ชั่วโมง หรือจนน้ำหนักคงที่ จากนั้นตัดเชือกแล้วนำดูงที่อบแล้วไปชั่งน้ำหนัก (Ørskov *et al.*, 1983) เพื่อหาค่าการย่อยได้ของอาหารต่อไป

### สัตว์ทดลองและการให้อาหาร

การให้อาหารสัตว์ทดลองควรให้ถึงระดับที่ใช้ในการดำรงชีพ หรืออาจมากกว่านั้นเล็กน้อย แต่การให้อาหารมากเกินไปจะทำให้ digesta ไหลออกมา ทำให้แผลเน่าเปื่อยและหายใจ (Madsen and Hvelplund., 1994) อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลองมีผลต่อค่าที่วัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งสัดส่วนของอาหารชั้นประเภทแป้งต่ออาหารหยาบคุณภาพต่ำ (บุญล้อม, 2539) ซึ่งถ้าโคได้รับอาหารชนิดเดียวกัน จำนวนประชากรของจุลินทรีย์ในกระเพาะหมักจะคล้ายคลึงกัน (Ørskov *et al.*, 1983)

อิทธิพลของอาหารที่ให้แก่สัตว์ทดลองจะมีผลต่ออัตราการย่อยสลายของอาหารที่ใช้ศึกษา ดังนั้นสิ่งสำคัญคือ อาหารที่ใช้เลี้ยงสัตว์เจาะกระเพาะนั้น จะต้องมีความคล้ายคลึงกับอาหารที่ใช้ทดสอบ จากการศึกษาพบว่าอัตราการย่อยสลายของโปรตีนมีความแตกต่างกัน เมื่อศึกษาในสัตว์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นหรือหญ้าแห้ง นอกจากนั้นยังพบว่าแหล่งอาหารเสริมโปรตีนที่มาจากพืชจะถูกย่อยสลายในกระเพาะหมักอย่างช้าๆ ในสัตว์ที่เลี้ยงด้วยอาหารชั้นในระดับสูง เมื่อเปรียบเทียบกับ การเลี้ยงด้วยอาหารหยาบระดับสูง ส่วนแหล่งโปรตีนที่มาจากสัตว์นั้นจะมีความแตกต่างกันเล็กน้อยเท่านั้น (เมธา, 2533)

### การเตรียม fix solution

1. เตรียม normal saline ให้มีความเข้มข้น 0.85%
2. เตรียม formalin ให้มีความเข้มข้น 10% โดยใช้ normal saline (0.85%) เป็นตัวทำให้ละลาย

เช่น ถ้าต้องการเตรียม fixing solution ปริมาตร 100 มิลลิลิตร

|                     |    |           |
|---------------------|----|-----------|
| จะใช้ normal saline | 90 | มิลลิลิตร |
| Formaline           | 10 | มิลลิลิตร |

### การตรวจนับจุลินทรีย์โดยวิธีการนับตรง

วิธีการนับตรง (direct count methods) เป็นการประมาณจำนวนเซลล์ โดยความเที่ยงตรงจะขึ้นอยู่กับปริมาณเซลล์ที่อยู่ในสารละลาย ซึ่งถ้าเซลล์มีจำนวนมากหรือน้อยเกินไปจะทำให้เกิดความผิดพลาดขึ้นได้ จึงต้องเจือจางสารละลายให้พอดี ส่วนมากจะเจือจางตั้งแต่ 1 : 10 ไปจนถึง 1 :  $10^5$  (อรอนงค์, 2543)

การนับโดยวิธีนี้ต้องใช้ counting chamber เช่น heamacytometer ซึ่งเป็นแผ่นแก้วที่มีรอยเว้าเป็นรูปสี่เหลี่ยมผืนผ้า รอยเว้านี้มีปริมาตรที่แน่นอน วิธีนับโดยหยดตัวอย่างที่จะนับลงไปบนรอยเว้าแล้วปิดด้วย cover slip แล้วนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยนับว่าในรอยเว้านี้มีเซลล์ทั้งหมด แล้วนำมาคำนวณกับปริมาตรของรอยเว้าเพื่อหาจำนวนของจุลินทรีย์