

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองจะดำเนินการเป็นไปตามที่วางแผนเอาไว้ดังนี้

3.1 สัตว์ทดลอง

1. ใช้โคนมพันธุ์โฮลสไตน์ฟริเซียน (Holstein Friesian) มีระดับสายเลือดโฮลสไตน์ฟริเซียน 75 เปอร์เซ็นต์ เพศเมียจำนวน 16 ตัว ให้นมอยู่ในช่วงการให้นมที่ (lactation number) 2 และ 3 ตามลำดับ เมื่อเริ่มทำการทดลองมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย 395 ± 51 กิโลกรัมและให้น้ำนมมาแล้ว (day in milk, DIM) เฉลี่ย 60 ± 15 วัน

2. โคนมทุกตัวได้รับการถ่ายพยาธิภายใน โดยการฉีด nitroxylny injection 34% ขนาด 1.5 มิลลิลิตร ต่อน้ำหนักตัว 50 กิโลกรัม ก่อนเข้าทดลองอย่างน้อย 1 สัปดาห์

3. โคนมทุกตัวได้รับวิตามิน AD₃E ประกอบด้วยวิตามินเอ 50,000 อนุภาคต่อมิลลิลิตร วิตามิน D₃ 10,000 อนุภาคต่อมิลลิลิตร และวิตามิน E 10 อนุภาคต่อมิลลิลิตร โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ 3 มิลลิลิตรต่อตัว ก่อนเข้าทดลอง 1 สัปดาห์

4. โคนมถูกเลี้ยงในคอกเดี่ยวขนาด 2.5 x 3 เมตร มีรางอาหาร และรางน้ำสะอาดแยกเฉพาะตัวและ มีน้ำให้กินตลอดเวลาในแต่ละคอก

3.2 การเตรียมข้าวโพดหมัก

วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

1. บ่อหมัก
2. ฝูยูเรีย
3. ฝาพลาสติก
4. ดันข้าวโพด

กระบวนการผลิตข้าวโพดหมัก

1. ทำการตัดต้นข้าวโพดที่หลังจากเก็บฝักแล้วมาสับให้ชิ้นเล็กประมาณ 3-4 เซนติเมตร ด้วยเครื่องสับหรือใช้มีดสับด้วยมือ
2. นำต้นข้าวโพดที่สับแล้วมาชั่งน้ำหนักและนำมาหมักในบ่อหมักที่เตรียมเอาไว้

3. ผสมปุ๋ยยูเรียและน้ำตามทริทเมนต์ที่ทดสอบ โดยการผสมปุ๋ยยูเรียที่ระดับ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์ (โดยสูตรที่ 1 ทำการผสมยูเรีย 2 กิโลกรัม + น้ำ 100 ลิตร และสูตรที่ 2 โดยการผสมยูเรีย 5 กิโลกรัม + น้ำ 100 ลิตร)
4. ทำการรดน้ำยูเรียลงบนกองต้นข้าวโพดหมักที่เตรียมไว้ในบ่อ
5. นำผ้าพลาสติกที่เตรียมเอาไว้มาปิดอย่างมิดชิด เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศสามารถเข้าได้
6. ทำการหมักต้นข้าวโพดเป็นเวลาอย่างน้อย 2 สัปดาห์แล้วนำมาให้สัตว์กิน และทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของข้าวโพดหมัก

3.3 แผนการทดลองและกลุ่มการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบ 2x2 Factorial arrangement in Randomizing complete block design (RCBD) โดยมีปัจจัยหลักที่ทดสอบได้แก่ ปัจจัยของระดับแหล่งโปรตีนในอาหารชั้น และปัจจัยจากระดับยูเรียที่หมักในต้นข้าวโพดหมัก ซึ่งมีทริทเมนต์ (Treatment) ที่ต้องการศึกษาจำนวน 4 ทริทเมนต์คือ

ปัจจัยหลัก 2 ปัจจัยได้แก่

ปัจจัยที่ 1 ระดับของโปรตีนในสูตรอาหารชั้น 2 ระดับ ได้แก่ 14 และ 18 เปอร์เซ็นต์

ปัจจัยที่ 2 ระดับการเสริมยูเรียในข้าวโพดหมัก 2 ระดับ ได้แก่ 2 และ 5 เปอร์เซ็นต์

ทริทเมนต์ที่ทดสอบ 4 ทริทเมนต์ดังนี้

ทริทเมนต์ที่ 1: อาหารชั้นที่มีโปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ +

ข้าวโพดหมักทริทยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์

ทริทเมนต์ที่ 2: อาหารชั้นที่มีโปรตีน 14 เปอร์เซ็นต์ +

ข้าวโพดหมักทริทยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์

ทริทเมนต์ที่ 3: อาหารชั้นที่มีโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ +

ข้าวโพดหมักทริทยูเรีย 2 เปอร์เซ็นต์

ทริทเมนต์ที่ 4: อาหารชั้นที่มีโปรตีน 18 เปอร์เซ็นต์ +

ข้าวโพดหมักทริทยูเรีย 5 เปอร์เซ็นต์

หมายเหตุ :

- สัตว์ทุกตัวจะได้รับอาหารหยาบข้าวโพดหมักทริทยูเรียอย่างเต็มที่ (ad lib)

- สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับอาหารชั้นตามสัดส่วนน้ำนมดังนี้

อาหารชั้น : น้ำนม = 1:2

แผนผังการทดลอง

Block I	Block II	Block III	Block IV
T1	T1	T1	T1
T2	T2	T2	T2
T3	T3	T3	T3
T4	T4	T4	T4

3.3 วิธีการดำเนินการทดลอง

1. สุ่มสัตว์ทดลองตามแผนการทดลองแบบ Randomizing block design (RCBD) โดยสัตว์แต่ละตัวจะได้รับ ทริทเมนต์ตามที่กำหนด โดยช่วงตลอดเวลาการทดลองมีระยะเวลา 60 วัน

2. การให้อาหารสัตว์ทดลอง แบ่งออกเป็น 2 ระยะดังนี้

2.1 ระยะปรับสัตว์ทดลอง (preliminary period) โดยให้อาหารหยาบคือ ข้าวโพดหมักยูเรีย แก่โคนมทุกตัวแบบเต็มที่ ร่วมกับการให้อาหารข้นที่มีอาหารทดลอง ประกอบ โดยให้ตามสัดส่วนของอาหารข้นต่อน้ำนม 1: 2 เป็นเวลา 30 วัน

2.2 ระยะทดลอง (experimental period) ระยะการทดลองใช้เวลาในการเก็บ ตัวอย่างข้อมูลติดต่อกันเป็นเวลา 30 วัน และ 7 วันสุดท้ายทำการวัดปริมาณการกิน ได้อิสระของอาหารหยาบ และทำการสุ่มตัวอย่างของเหลวในกระเพาะรูเมนและสุ่มเจาะเก็บเลือดในวันสุดท้ายของการทดลอง

3. ให้สัตว์ทดลองได้รับการเสริมแร่ธาตุก่อนเพื่อป้องกันการขาดแร่ธาตุด้วยวิธีการให้ สัตว์ได้เลียแบบอิสระ

4. มีน้ำสะอาดให้โคกินตลอดเวลา

5. ก่อนเข้าการทดลอง ทำการถ่ายพยาธิทั้งภายในและภายนอก และทำการฉีดวิตามินเอ ดี และอี พร้อมทั้งฉีดวัคซีนป้องกัน โรคปากเท้าเปื่อยและ โรคคอบวมให้สัตว์ทุกตัว

3.4 การเก็บข้อมูลและสุ่มเก็บตัวอย่าง

1. บันทึกปริมาณการกิน ได้อิสระของอาหารข้นและอาหารหยาบ ทำการบันทึกปริมาณ การให้อาหารหยาบทุกครั้งที่ได้รับ โดยชั่งน้ำหนักก่อนให้ และอาหารหยาบที่เหลือจะชั่งออกมา ในตอนเช้าของวันถัดไปก่อนให้อาหารตอนเช้า และคำนวณปริมาณการกินได้ในแต่ละวัน

2. บันทึกปริมาณน้ำนมที่ได้จากโคนมแต่ละตัวในตอนเช้า และตอนเย็นทุกวันตลอดการทดลองและใช้เป็นค่าปรับปริมาณการให้อาหารขึ้นในวันถัดไป

3. เก็บตัวอย่างอาหาร และวิเคราะห์หาเถ้าที่ไม่ละลายในกรด (acid-insoluble ash, AIA) โดยใช้ 2N HCl ตามวิธีการของ Van Keulen and Young (1977)

การคำนวณข้อมูล

การคำนวณค่าสัมประสิทธิ์การย่อยได้ของโภชนะโดยใช้เถ้าที่ไม่ละลายในกรด (AIA) เป็นตัวบ่งชี้ ภายในตามวิธีการของ Schnieder and Flatt (1975) ดัดแปลงตามวิธีการของเมธา (2533) ดังนี้

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

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

4. เก็บตัวอย่างมูลทุกตัวในแต่ละระยะการทดลองในช่วง 7 วันสุดท้ายติดต่อกันโดยสุ่มเก็บในช่วงเช้าและบ่าย โดยวิธีล้วงผ่านทางทวารหนัก (rectal sampling) แล้วนำมารวมกันในปริมาณที่เท่ากันก่อนนำตัวอย่างมูลอบในตูบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสนาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาบดผ่านตะแกรงขนาด 1 มม. เก็บไว้ในภาชนะที่มีฉนวนเพื่อรอนำไปวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีต่าง ๆ

5. เก็บตัวอย่างเลือด ที่เวลา 0, 2, 4 ชั่วโมงหลังการให้อาหาร ในวันแรกที่เริ่มต้นทดลองและวันสุดท้ายของการทดลอง ซึ่งสุ่มเก็บจากเส้นเลือดดำใหญ่บริเวณคอ (jugular vein) นำมาปั่นเหวี่ยง (centrifuge) และเก็บส่วน plasma เพื่อนำมาวิเคราะห์หายูเรียในเลือด (blood urea nitrogen, BUN)

6. การเก็บตัวอย่างน้ำนม สุ่มเก็บ 7 วันสุดท้ายของการทดลองติดต่อกัน โดยเก็บในตอนเช้า และตอนเย็น แล้วนำมารวมเข้าด้วยกันตามสัดส่วนของน้ำนมที่ได้ เก็บไว้ในขวดที่มี potassium dichromate 250 มิลลิกรัม เพื่อรักษาสภาพของน้ำนมและเก็บในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อรอวิเคราะห์หาองค์ประกอบที่สำคัญได้แก่ โปรตีน ไขมัน แลคโตส ของแข็งทั้งหมด, และของแข็งที่ไม่รวมไขมันด้วยเครื่อง Milkoscan (Model 133 V3 7 GB) และหา milk urea nitrogen (MUN) (Roseler et al., 1993) และวิเคราะห์หาปริมาณสาร allantoin ในองค์ประกอบน้ำนมเพื่อประเมินการสังเคราะห์จุลินทรีย์โปรตีนตามวิธีการของ (Shingfield and Offer, 1998)

3.7 ระยะเวลาที่ทำการวิจัย สถานที่ทำการทดลองและเก็บข้อมูล

- โครงการวิจัยนี้จะทำการศึกษาระยะเวลา 1 ปี ตั้งแต่ ปี 2550-2551 ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

กิจกรรมต่างๆ ที่ปฏิบัติ	เดือนที่												
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
1.เตรียมวัตถุดิบอาหาร และอุปกรณ์เครื่องมือ	↔												
2. ระยะเวลาปรับตัวทดลอง			↔										
3. ระยะเวลาทดลอง					↔	↔							
4. วิเคราะห์ตัวอย่าง							↔			↔			
5.สรุปผลและเขียนรายงานผล											↔	↔	