บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การทดลอง

1. ในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบหาเชื้อรา *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอะฟลาทอกซิน และหา media ที่เหมาะสมในการผลิต แล้วศึกษาประสิทธิภาพของสารดูดซับ 2 ชนิด คือ พัมมิซเทียบกับอะโซไมท์®ในการดูดซับสารพิษ

2. ในฟาร์มเลี้ยงสัตว์ โดยทดสอบผลการใช้สารดูดซับที่มีต่อสมรรถภาพและต้นทุนการผลิตในไก่ไข่และไก่เนื้อที่ไม่ได้รับและได้รับอะฟลาทอกซิน ตลอดจนประสิทธิภาพของสารดูดซับในการลดระดับแอมโมเนียในคอกสัตว์

สารดูดซับทั้ง 2 ชนิด มีองค์ประกอบทางเคมีและสมบัติทางกายภาพ ดังแสดงไว้ในตารางที่ 16

ตารางที่ 16 องค์ประกอบทางเคมีและคุณสมบัติทางกายภาพของพัมมิซและอะโซไมท์®

	พัมมิซ[1/]	อะโซไมท์®[2/]
SiO_2	71.00	65.85
Al_2O_3	13.20	11.43
Fe_2O_3	1.33	1.37
Na_2O	1.65	2.07
MgO	0.36	0.78
K_2O	5.66	5.23
CaO	0.77	3.67
TiO_2	0.28	0.20
P_2O_5	0.01	0.15
MnO	0.05	0.02
H_2O[3/]	3.84	5.35
Loss on incineration[3/]	6.22	6.52
Surface area (m^2/g)	0.52	1.15
pH	7.3	8.0
Size (μm)	21.49	15.66
Cation exchange capacity (NH_4^+, meq/ 100 g)[4/]	12.63	19.69

[1/] บริษัท ที ดี เอส จำกัด, กรุงเทพฯ, ฉลากติดถุงบรรจุ.

[2/] PEAK MINERAL-AZOMITE, INC., http://www.azomite.com/main/typical-analysis.htm.

[3/] Organic matter

[4/] นิคมและคณะ (2546)

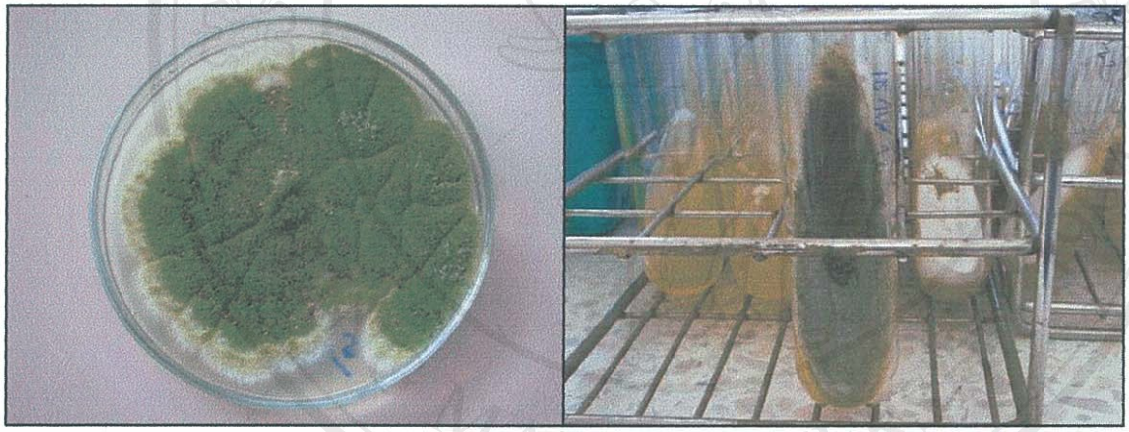
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

❑ การศึกษาในห้องปฏิบัติการ

การผลิตอะฟลาทอกซิน มีขั้นตอนดังนี้

❑ การเพาะเชื้อราจากธรรมชาติ

นำตัวอย่างวัตถุดิบอาหาร เช่น ข้าวโพดป่น ถั่วลิสงคั่วป่น หรืออาหารสัตว์ มาทำการเพาะ (culture) ในอาหารเลี้ยงเชื้อ SDA[1/] รอให้เชื้อราเจริญเติบโต (ที่อุณหภูมิห้อง) ประมาณ 3-5 วัน สังเกตดูลักษณะ colony ที่เกิดขึ้นในแต่ละ plate ด้วยตาและกล้องจุลทรรศน์ และตรวจสอบ colony ที่เกิดขึ้นในส่วนที่เป็นเชื้อรา *Aspergillus flavus** โดยการนำมาย้อมสีทำสไลด์[2/] จากนั้นทำการแยก (isolate) *A. flavus* ที่พบจาก plate ดังกล่าวโดยการ subculture ลงใน culture slant ต่อไป ทำการรวบรวม *A. flavus* จากตัวอย่างต่างๆ ประมาณ 8-10 isolates เพื่อทดสอบว่า *A. flavus* สายพันธุ์ไหนผลิตอะฟลาทอกซินได้



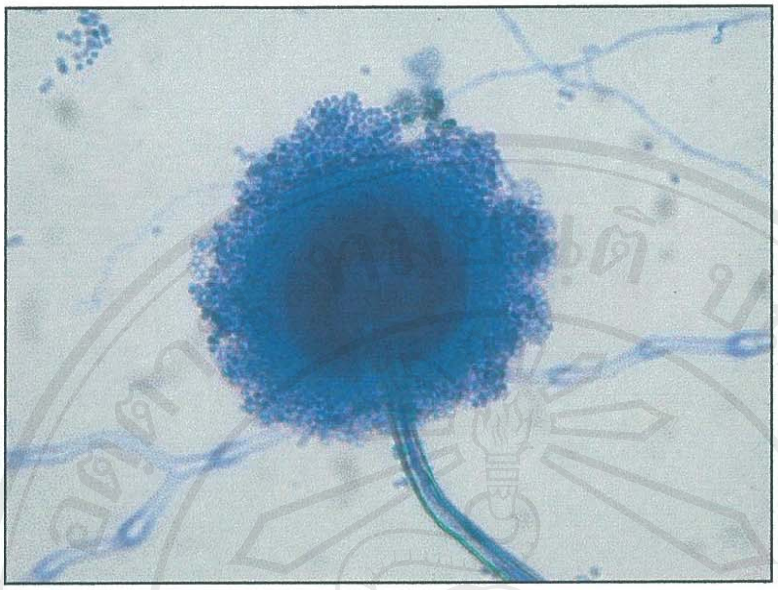
ภาพที่ 14 เชื้อรา *Aspergillus flavus*

1/ อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบ Sabouraud dextrose agar (SDA) เตรียมโดยนำผง SDA 65 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 3 ลิตร เติมด้วยน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าแล้วนำไปตุ๋นบนเตาไฟให้ละลายเข้ากัน จากนั้นนำไปฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121°ซ ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 เป็นเวลา 15 นาที เมื่อเสร็จนำมาเทใส่ plateๆ ละประมาณ 20 มิลลิลิตร รอให้เย็น (เก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°ซ)

2/ กระทำโดยหยด lactophenol blue solution ลงบนสไลด์ ประมาณ 1 หยด เขี่ยสปอร์ที่ต้องการศึกษามาวางลงบนสีดังกล่าว ปิดทับด้วย cover สไลด์ แล้วนำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์

* Colonies เจริญเติบโตได้อย่างรวดเร็วภายใน 1-5 วัน โดยเริ่มแรกมีสีเหลือง และจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวเข้มขึ้นเมื่ออายุมากขึ้น โดยท้ายสุดจะมีสีเขียวอมเหลือง เชื้อนี้เจริญเติบโตมีความสูงจาก substrate ประมาณ 1 มม., หัว (vesicles) มีรูปเหมือน flask หรือ dome, phialides โดยทั่วไปมีขนาด 7-10 x 2.5-3 µm, conidia มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3.5-5 µm รูปทรงหรือเหมือนลูกแพร์ (pear) (Smith, 1968; Forbes *et al.*, 2002)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved



ภาพที่ 15 เชื้อรา *Aspergillus flavus* จากการส่องกล้องจุลทรรศน์

- **การทดสอบ *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่มีประสิทธิภาพในการผลิตอะฟลาทอกซิน** ตามวิธีการของ Punpisootchai (1976)

เตรียม spore suspension โดยเติมน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร ลงใน culture slant ที่มีเชื้อรา *A. flavus* อายุประมาณ 1-2 สัปดาห์ข้างต้น ใช้ loop ขูดให้สปอร์แขวนลอย แล้วปรับให้มีความขุ่นเทียบเท่ากับ McFarland No.2 (จำนวนของสปอร์ที่ปรับแล้วจะมีประมาณ 10^6 สปอร์/มิลลิลิตร)

ใส่ spore suspension ดังกล่าว 1 มิลลิลิตร ลงใน potato dextrose broth[1/] (PBD) ปริมาตร 100 มิลลิลิตร pH 4.0 (ปรับด้วย 0.1 N HCl) ใน flask ขนาด 500 มิลลิลิตร ปิดด้วยสำลี แล้วนำไปบ่มด้วยเครื่องบ่ม (incubator) ที่เขย่าได้ 200 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25°ซ ในที่มืดเป็นเวลา 7 วัน เมื่อบ่มครบ 7 วัน นำ PDB มากรองผ่านกระดาษกรองเบอร์ 2 และสกัดด้วยคลอโรฟอร์ม 30 มิลลิลิตร (3 ครั้ง) เก็บชั้นคลอโรฟอร์มรวมกัน แล้วระเหยออกด้วยเครื่องระเหยความดันต่ำอุณหภูมิ 70°ซ ให้แห้ง จากนั้นเติมคลอโรฟอร์ม 0.5 มิลลิลิตร ถ่ายลงในขวดสีชาขนาดเล็ก เพื่อทำการตรวจหาอะฟลาทอกซินด้วยวิธี Thin-layer chromatography (TLC)

[1/] อาหารเลี้ยงเชื้อเป็นแบบ Potato dextrose broth (PDB, Difco) เตรียมโดยนำผง PDB 42 กรัม ใส่ขวดรูปชมพู่ขนาด 3 ลิตร เติมน้ำกลั่น 1 ลิตร เขย่าให้ละลายเข้ากันแล้วฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ ความดัน และเวลาดังกล่าว รอให้เย็น (เก็บในห้องเย็นอุณหภูมิ 4°ซ)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

การตรวจสอบด้วย TLC ทำโดยนำ plate กระจก (20 x 20 ซม.) ที่เคลือบด้วยซิลิก้าเจลหนา 0.2-0.25 มิลลิเมตร[1/] มา spot ด้วยสารมาตรฐานอะฟลาทอกซิน รวมทั้งสารที่สกัดได้ข้างต้น แล้วนำไป developed ในถัง (tank) แก้วที่มีไดเอทิลอีเธอร์ (กรณีมีไขมันหรือสารอื่นๆ) หลังจากนั้น developed ด้วยตัวทำละลาย (chloroform - trichloroethylene - n-amylalcohol - formic acid, 80:15:4:1) ในถังแก้ว เก็บไว้ในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 45 นาที ให้มี solvent front ประมาณ 15 ซม. จากจุดเริ่มต้น จากนั้นนำไปส่องหาอะฟลาทอกซินที่เรืองแสงสีน้ำเงินด้วย fluorescence UV lamp (365 nm) ทำการวงส่วนที่เรืองแสง คำนวณหาค่า R_f[2/] เปรียบเทียบค่า R_f ที่ได้กับ R_f ของสารมาตรฐาน แล้วคัดเลือก *Aspergillus flavus* สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซินได้ โดยดูจากค่า R_f ที่เทียบเท่ากับสารมาตรฐาน และความเข้มของส่วนที่เรืองแสง ไปทำการผลิตอะฟลาทอกซินบน media (วัตถุดิบอาหาร) ต่อไป

การเพาะเลี้ยงเชื้อราใน media ที่เหมาะสม

ใช้เชื้อรา *Aspergillus flavus* (สายพันธุ์ที่ผลิตอะฟลาทอกซิน B_1 ได้สูงที่สุด) ที่ได้ทำการคัดเลือกตามวิธีดังกล่าวข้างต้น นำมาเพาะใน media มี 3 ชนิด คือ ข้าวโพดป่น กากมะพร้าวสด[3/] ถั่วลิสงบด[4/] โดยใส่ media 100 กรัม ในถุงร้อนใส (polypropylene) ขนาด 5x8 นิ้ว 2 ชั้น ใส่ปอกคอแล้วปิดด้วยสำลีและกระดาษ จากนั้นฆ่าเชื้อที่ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^2 อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น แล้ว inoculated เชื้อปริมาตร 1 มิลลิลิตร (10^6 สปอร์/มิลลิลิตร) นำไปบ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 7 วัน (ดัดแปลงจาก จิตรวิมล, 2537) สังเกตการเจริญของเชื้อราในแต่ละ media และดูลักษณะของ media ต่างๆ แล้วรายงานผล จากนั้นนำมาฆ่าเชื้อที่ความดัน อุณหภูมิ และเวลาดังกล่าวข้างต้น แล้วนำไปอบให้แห้งที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส ในตู้อบลมร้อนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง บดผ่านตะแกรงขนาด 1-2 มิลลิเมตร (Miazzo *et al.*, 2000) แล้ววิเคราะห์หาปริมาณอะฟลาทอกซินด้วย Immuno affinity column (Aflatest) ตามวิธีการของ AOAC (1995) วิธีวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

เมื่อทราบค่าแล้ว ทำการผลิตอะฟลาทอกซินบน media ชนิดที่เหมาะสมให้ได้ปริมาณสารพิษเพียงพอสำหรับใช้ในการทดลอง

[1/] เตรียมโดยใช้ซิลิก้าเจล 60 H (Merck) ผสมน้ำกลั่นในอัตราส่วน 2:1 แล้วเคลือบบนแผ่นกระจกให้มีความหนา 0.20-0.25 มม. เมื่อแห้งนำไปอบที่อุณหภูมิ 120°ซ เป็นเวลา 30 นาที รอให้เย็น เก็บไว้ในโถดูดความชื้น

[2/] R_f = ค่าการเคลื่อนที่ของสารบน TLC plate คำนวณโดยใช้สูตร คือ $\frac{\text{ระยะของ sample ที่เคลื่อนที่ (ซม.)}}{\text{ระยะของ solvent front (ซม.)}}$

[3/] กากมะพร้าว (เศษเหลือเนื้อมะพร้าวจากการคั้นกะทิใหม่ๆ ด้วยเครื่อง ซื้อจาก ตลาดต้นพยอม จ.เชียงใหม่)

[4/] เมล็ดถั่วลิสงดิบ นำมาบดด้วยโกร่งให้ละเอียด

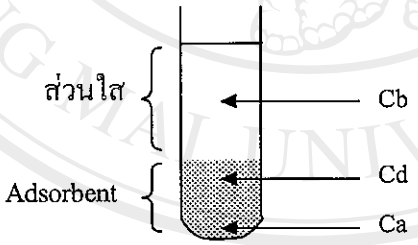
ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

□ **ศึกษาการดูดซับอะฟลาทอกซิน B_1 ในหลอดทดลอง (พัมมิซ vs. อะโซไมท์®)**[1/]

ทำโดยนำสารดูดซับแต่ละชนิดๆ ละ 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร (ทำการวิเคราะห์ 3 ซ้ำ) เติมสารละลายมาตรฐานอะฟลาทอกซิน B_1 (AFB_1, SIGMA) 1.0 ไมโครกรัม ใน 1 มิลลิลิตร (ของ 90% เมทานอล) พร้อมทั้งทำหลอดควบคุมซึ่งไม่ใส่สารดูดซับ เขย่าให้เข้ากันด้วย vortex mixture แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (เขย่า 30 วินาที ทุกๆ 15 นาที) เมื่อเสร็จนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำสารละลายส่วนใสใส่หลอดทดลองใหม่ ทำการสกัด AFB_1 ด้วยคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร แล้วแยกเก็บชั้นคลอโรฟอร์มซึ่งอยู่ข้างล่างนำไประเหยออกด้วย rotary vacuum evaporator เติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFB_1 ด้วย HPLC[2/] (ส่วนนี้เป็น AFB_1 ที่ไม่ถูกดูดซับ, Cb)

ส่วนการสกัด AFB_1 จากเม็ดสารดูดซับใช้เมทานอล 1 มิลลิลิตร และคลอโรฟอร์ม 1 มิลลิลิตร โดยในแต่ละตัวทำละลาย เขย่าเป็นเวลา 5 นาที นำไปเหวี่ยง แล้วนำสารละลายส่วนใสของคลอโรฟอร์มและเมทานอลที่สกัดได้มารวมกัน นำไประเหยออก แล้วเติมเมทานอล 1 มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์หาปริมาณ AFB_1 (ส่วนนี้เป็น AFB_1 ที่ถูกดูดซับไม่จริง, Cd)

คำนวณประสิทธิภาพในการดูดซับอย่างแท้จริง (C_α) จากความแตกต่างระหว่าง AFB_1 ในหลอดควบคุม (Ci) กับ AFB_1 ที่ไม่ถูกดูดซับทั้ง 2 ส่วน คือ Cb และ Cd โดยใช้สูตรที่ดัดแปลงจาก Lemke *et al.*, (2001) $\left[C_\alpha = \frac{(Ci - Cb - Cd)}{Ci} \times 100\right]$



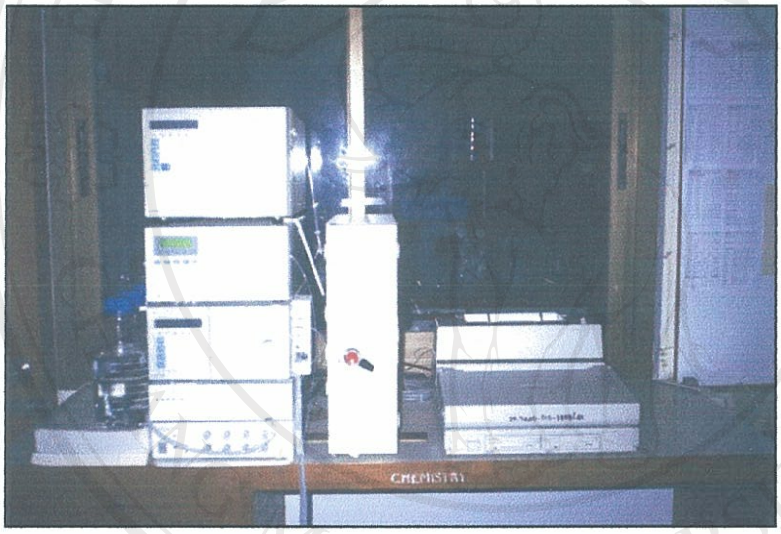
ภาพที่ 16 การจำลอง AFB_1 ส่วนที่ไม่ถูกดูดซับ (Cb) ส่วนที่ถูกดูดซับไม่จริง (Cd) และส่วนที่ถูกดูดซับจริงในโมเลกุลของ adsorbent (Ca) ในหลอดทดลอง

[1/] วิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติด้วย *t*-test

[2/] HPLC ประกอบด้วย Liquid chromatography, SHIMADZU, Model SPD-10Avp; Degasser, SHIMADZU, Model DGU-14Avp; Spectrofluorometric detector, SHIMADZU, Model RF-10Avp; Column oven, SHIMADZU, Model CTO-10ASvp; Chromatopac, SHIMADZU, Model C-R7Ae plus, Japan; Column Inertsil™ ODS (3), ขนาด 4.6x150 ม.ม.; อัตราไหล 1.0 มล./นาที; Mobile phase ที่ใช้คือ เมทานอล : น้ำ ในอัตราส่วน 60 : 40 (v/v) และความยาวคลื่นแสงในการตรวจวัด เท่ากับ 365 และ 425 nm

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบความเสถียร (stability) ในการดูดซับ AFB_1 ที่ pH 3, 7 และ 10 โดยนำสารดูดซับแต่ละชนิด 20 มิลลิกรัม ใส่ในหลอดทดลองขนาด 10 x 75 มิลลิเมตร เติมสารละลาย AFB_1 100 นาโนกรัม เป่าให้แห้งด้วยแก๊สไนโตรเจน แล้วเติม 0.1 *M* phosphate buffer ที่มี pH ดังกล่าว จำนวน 200 ไมโครลิตร เขย่าแล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 °ซ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง (ทำการเขย่าทุกๆ 15 นาที) จากนั้นนำไปเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้สารละลายและสารดูดซับแยกชั้น นำสารละลายส่วนใสมา 100 ไมโครลิตร สกัดด้วยเมทานอล 900 ไมโครลิตร วิเคราะห์ปริมาณ AFB_1 ด้วย HPLC พร้อมทั้งทำหลอดควบคุมด้วย (ดัดแปลงจาก Ledoux *et al.*, 1999) วิเคราะห์ 2 ซ้ำ



ภาพที่ 17 เครื่อง High-performance liquid chromatography (HPLC)

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

❑ การศึกษาในส่วนฟาร์มเลี้ยงสัตว์

1. ศึกษาผลของพัมมิซต่อสมรรถภาพการผลิต คุณภาพไข่และปริมาณแอมโมเนียในไก่ไข่

❑ อุปกรณ์

1. ไก่ไข่สายพันธุ์ Lohmann tierzucht brown classic อายุเริ่มทดลอง 59 สัปดาห์ จำนวน 180 ตัว
2. กรงตับขนาด 48 x 45 x 40 ซม. จำนวน 90 ช่อง ใช้จุไก่ 2 ตัว/ช่อง ทั้งหมดอยู่ในโรงเรือนเดียวกัน
3. รางอาหารเป็นรางแบบยาวตลอดแถวอยู่ด้านหน้า มีแผงกั้นระหว่างซ้ำเพื่อป้องกันไม่ให้ไก่ข้ามมากินอาหารของกลุ่มอื่น และถังบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด จำนวน 15 ใบ
4. ที่ให้น้ำแบบหัวนิปเปิล (nipple) พร้อมถาดรองน้ำ ให้ไก่จิกกิน
5. เครื่องผสมอาหารแบบเกลียวนอน ความจุ 60 กก./การผสม 1 ครั้ง
6. เครื่องชั่งแบบไฮโดรลิก ขนาดชั่งได้สูงสุด 150 กก. ความละเอียดที่อ่านได้ 50 ก. สำหรับชั่งอาหารทดลอง
7. เครื่องชั่งแบบไฟฟ้า ขนาดชั่งได้สูงสุด 3,110 ก. ความละเอียดที่อ่านได้ 0.01 ก. สำหรับชั่งสารผสมล่วงหน้า ซึ่งได้แก่ วิตามิน แร่ธาตุ เกลือ DCP กรดอะมิโนดีแอล-เมไธโอนีน และแอล-ไลซีน รวมทั้งชั่งน้ำหนักไข่
8. เครื่องชั่งแบบคานกระดก โดยแขนของคานมีถาดไว้สำหรับวางไข่เพื่อชั่งน้ำหนัก ได้ดัดแปลงให้อยู่ในน้ำและปรับน้ำหนัก เพื่อชั่งน้ำหนักไข่ที่จมอยู่ในน้ำ ซึ่งจะนำไปหาค่าความถ่วงจำเพาะ (ถ.พ.) ของฟองไข่ โดยใช้สูตร

$$\text{ถ.พ.} = \frac{\text{น้ำหนักไข่ในอากาศ}}{\text{น้ำหนักไข่ในอากาศ} - \text{น้ำหนักไข่ในน้ำ}}$$

9. เครื่องคัดขนาดไข่
10. เครื่องวัดความสูงไข่ขาว ยี่ห้อ TSS และตาราง Haugh unit
11. เครื่องวัดความหนาเปลือกไข่ชนิดดิจิตอล ความละเอียด 0.001 ม.ม.
12. พัดเทียบสีไข่แดงของบริษัทโรช (Roche yolk color fan)
13. เทอร์โมมิเตอร์แบบอ่านได้ต่ำสุด-สูงสุด
14. เทอร์โมมิเตอร์แบบมีตุ้มแห้ง-ตุ้มเปียก เพื่อบันทึกความชื้นสัมพัทธ์

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

15. เครื่องวัดแก๊สแอมโมเนีย digital sensor ยี่ห้อ CROWCON GASMAN II วัดแอมโมเนียได้ในช่วง 0-50 ppm

□ วิธีการทดลอง

ใช้ไก่ไข่เพศเมียสายพันธุ์ Lohmann tierzucht brown classic อายุ 59 สัปดาห์ จำนวน 180 ตัว แบ่งออกโดยสุ่มเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ (12 ตัว/ซ้ำ) เลี้ยงในโรงเรือนเปิด ใส่ในกรงตับช่องละ 2 ตัว มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า มีที่ให้น้ำแบบหัวนิปเปิล (nipple) พร้อมถาดรองและมีร่องสำหรับรองรับมูลอยู่ด้านล่างสูงจากพื้น 60 เซนติเมตร ไก่ทุกตัวได้กินน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ และได้รับแสงสว่างวันละ 16 ชั่วโมง อาหารทดลองเป็นแบบผงผสมเอง กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (มีข้าวโพดและกากถั่วเหลืองเป็นหลัก) กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 เสริมด้วยพัมมิซระดับ 2, 4 และ 6% ตามลำดับ กลุ่มที่ 5 เสริมด้วยอะโซไมท์®ระดับ 2% อาหารทดลองทุกกลุ่มมีโปรตีน (CP) และมีพลังงานใช้ประโยชน์ได้ (ME) เท่ากับ 16.0% และ 2.80 กิโลแคลอรี/ก. เท่ากัน ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลองแสดงไว้ในตารางที่ 17

ทำการทดลองเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม 2546 โดยบันทึกและคำนวณผลผลิตไข่ ปริมาณอาหารที่กิน ประสิทธิภาพการใช้อาหาร อัตราการตายและผ่าซากไก่ที่ตายเพื่อตรวจหาสาเหตุ (ถ้ามี) บันทึกคุณภาพไข่ทั้งน้ำหนักไข่และจำนวนไข่แต่ละเบอร์[1/] จากจำนวนไข่ทุกฟองใน 3 วันสุดท้าย ส่วนคุณภาพไข่ ด้านค่า Haugh unit[2/] ความถ่วงจำเพาะ ความหนาเปลือกไข่[3/] และสีไข่แดง[4/] วัดจากไข่ 3 ฟอง ของแต่ละซ้ำใน 3 วันสุดท้าย (รวม 9 ฟอง/กลุ่ม) นอกจากนี้ทำการวัดปริมาณแก๊สแอมโมเนียด้วยเครื่อง CROWCON GASMAN II ของมูลไก่ที่สะสมใต้คอกเป็นเวลา 2, 4, และ 6 วัน โดยวัดที่เวลา 12:00 น. จำนวน 2 จุด ของแต่ละซ้ำ โดยกำหนดให้ตัวเครื่องวัดอยู่สูงจากมูล 10 ซ.ม. แล้วปล่อยให้เครื่องอ่านปริมาณแก๊สเป็นเวลา 2 นาที/จุด จากนั้นสุ่มเก็บมูล[7/]ที่อายุต่างๆ ดังกล่าว มาหาค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)[5/] ความชื้นในมูล[6/] รวมทั้ง

[1/] ใช้เครื่องคัดขนาดไข่ มี 5 เบอร์: เบอร์ 0 มี น.น. > 70 ก., เบอร์ 1 = 70-66 ก., เบอร์ 2 = 65-61 ก., เบอร์ 3 = 60-56 ก. และต่ำกว่าเบอร์ 3 (น.น. < 55 ก.)

[2/] ใช้เครื่องวัดความสูงไข่ขาว โดยวัดบริเวณกึ่งกลางระหว่างขั้วไข่ทั้งสอง ห่างจากไข่แดงประมาณ 1 ซม. (วัด 2 จุด) นำค่าที่ได้มาเทียบกับตาราง Haugh unit ซึ่งได้ปรับด้วยขนาดของน้ำหนักไข่แล้ว

[3/] ใช้เครื่องวัดความหนาเปลือกไข่ชนิดดิจิตอล ความละเอียดที่อ่านได้ 0.001 ม.ม. วัดเปลือกตรงกลางฟองไข่ 2 ตำแหน่ง (ลอกเยื่อหุ้มเปลือกไข่ด้านในออกแล้ว) จากนั้นนำมาเฉลี่ย

[4/] ใช้พัดเทียบสีไข่แดงของบริษัทโรช ซึ่งมีระดับความเข้มสีตั้งแต่ เบอร์ 1 ถึง 15

[5/] ใช้เครื่องวัด pH แบบ Electrode, Microprocessor pH meter, Model pH 196 ความละเอียดที่อ่านได้ 0.01

[6/] อบที่อุณหภูมิ 100°ซ เป็นเวลา 2 วัน [7/] มูลในการศึกษาทั้งหมด หมายถึง สิ่งขับถ่าย (excreta) ที่รวมทั้งปัสสาวะ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ค่า NH_3 ในห้องปฏิบัติการโดยวิธีกลั่นด้วยไอน้ำ (APHA-AWWA-WPCE, 1981) วิธีวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก. บันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ในโรงเรือนเวลา 12:00 น. เช่นเดียวกัน

นอกจากนี้ในวันที่ 28 ของการทดลอง ทำการเก็บมูลจากไก่ 6 ตัว/ซ้ำ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้แผ่นพลาสติกรองด้านล่าง แล้ววัดปริมาณแก๊สแอมโมเนียที่เกิดขึ้น จากนั้นบันทึกปริมาณมูล นำไปหาน้ำหนักแห้ง น้ำหนักเถ้า และคำนวณค่าประมาณสารดูดซับที่ถูกขับออก[1/] รวมทั้งหาค่า pH ความชื้น และ NH_3 ในห้องปฏิบัติการด้วย

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan' s new multiple range test

2. ศึกษาผลการเสริมพัมมิซในอาหารที่มีอะฟลาทอกซินในไก่ไข่

□ อุปกรณ์

1. ไก่ไข่สายพันธุ์ Lohmann tierzucht brown classic อายุเริ่มทดลอง 65 สัปดาห์ จำนวน 162 ตัว
2. กรงตับแบบขังเดี่ยวขนาด 24 x 40 x 36 ซม. จำนวน 162 ช่อง ทั้งหมดอยู่ในโรงเรือนเดียวกัน
3. รางน้ำและรางอาหารเป็นรางแบบยาวตลอดแถว โดยรางน้ำอยู่ด้านบน ส่วนรางอาหารอยู่ด้านหน้า มีแผงกั้นระหว่างซ้ำเพื่อป้องกันไม่ให้ไก่ข้ามมากินอาหารของกลุ่มอื่น และถังบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด จำนวน 27 ใบ
4. เครื่องผสมอาหารแบบเกลียวนอน ความจุ 60 กก./การผสม 1 ครั้ง
5. เครื่องชั่งแบบไฮโดรลิก ขนาดชั่งได้สูงสุด 150 กก. ความละเอียดที่อ่านได้ 50 ก. สำหรับชั่งอาหารทดลอง
6. เครื่องชั่งแบบสปริง ซึ่งปรับจานรองรับให้เป็นรูปกรวยสำหรับใช้ชั่งไก่รายตัว ขนาดชั่งได้สูงสุด 3 กก. ความละเอียดที่อ่านได้ 10 ก.
7. เครื่องชั่งแบบไฟฟ้า ขนาดชั่งได้สูงสุด 3,110 ก. ความละเอียดที่อ่านได้ 0.01 ก. สำหรับชั่งสารผสมล่วงหน้า รวมทั้งชั่งน้ำหนักไข่ ลูกไก่ที่เกิด และอวัยวะภายในของไก่ไข่

---

* ตัวอย่างที่ใช้ในการวัดค่า pH และหาแอมโมเนียในห้องปฏิบัติการ เป็นมูลที่เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:1

[1/] ค่าประมาณสารดูดซับที่ถูกขับออก = $\frac{\text{ปริมาณเถ้าในมูลของกลุ่มที่ได้รับสารดูดซับ–ปริมาณเถ้าในมูลกลุ่มควบคุม}}{\text{\% เถ้าของสารดูดซับ}}$

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

8. เครื่องคัดขนาดไข่
9. เครื่องวัดความสูงไข่ขาว ยี่ห้อ TSS และตาราง Haugh unit
10. เครื่องวัดความหนาเปลือกไข่ชนิดดิจิตอล ความละเอียด 0.001 ม.ม.
11. พัดเทียบสีไข่แดงของบริษัทโรช (Roche yolk color fan)
12. เทอร์โมมิเตอร์แบบอ่านได้ต่ำสุด-สูงสุด
13. เทอร์โมมิเตอร์แบบมีตุ้มแห้ง-ตุ้มเปียก เพื่อบันทึกความชื้นสัมพัทธ์ตู้ฟักและตู้เกิด
14. ชุดผสมเทียม ประกอบด้วย บีกเกอร์ขนาด 50 มล. (สำหรับรองรับน้ำเชื้อไก่เพศผู้) ไซลิงค์พลาสติกขนาด 1.0 มล. และน้ำเกลือ (ความเข้มข้น 0.9%) รวมทั้งผ้าสะอาด
15. ห้องปรับอากาศ สำหรับเก็บไข่ก่อนเข้าฟักเป็นเวลา 7 วัน/ชุด
16. ตู้ฟักไข่ ขนาดบรรจุ 2,400 ฟอง มี 16 ถาดๆ ละ 150 ฟอง (อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ช่วงฟักแสดงไว้ในตารางภาคผนวก ข. ที่ 5)
17. ตู้เกิดทรงสูง ขนาดบรรจุ 480 ฟอง มี 8 ถาด (อุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ช่วงฟักแสดงไว้ในตารางภาคผนวก ข. ที่ 5)
18. คอกทดลองขนาด 1.0 ตารางเมตร จำนวน 27 คอก อยู่ภายในโรงเรือนเดียวกัน สำหรับกกลูกไก่ที่เกิด
19. เครื่องกกและหลอดไฟขนาด 100 วัตต์ สำหรับให้ความอบอุ่นแก่ลูกไก่ที่ได้จากการฟัก ใช้ในช่วงอายุ 4 สัปดาห์แรก
20. ขวดน้ำขนาด 8 ลิตร จำนวน 27 ใบ
21. ภาชนะใส่อาหารแบบแขวน และถังบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด คอกละ 1 ใบ
22. วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบติดต่อ (Newcastle disease plus Infectious bronchitis) และวัคซีนป้องกันโรคกัมโบโร (Infectious bursal disease)

□ **วิธีการทดลอง**

2.1 ศึกษาผลต่อสมรรถภาพการผลิตและคุณภาพไข่

ใช้ไก่ไข่เพศเมียสายพันธุ์ Lohmann tierzucht brown classic อายุ 65 สัปดาห์ จำนวน 162 ตัว แบ่งออกโดยสุ่มเป็น 9 กลุ่มๆ ละ 3 ซ้ำ (6 ตัว/ซ้ำ) เลี้ยงในโรงเรือนเปิดที่มีการระบายอากาศดี กรงตับละ 1 ตัว มีรางอาหารอยู่ด้านหน้า มีที่ให้น้ำแบบรางด้านบน ไก่ทุกตัวได้กินน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ และได้รับแสงสว่างวันละ 16 ชั่วโมง อาหารทดลองเป็นแบบผงผสมเอง กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

(มีข้าวโพดและกากถั่วเหลืองเป็นหลัก) กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 มีอะฟลาทอกซินระดับ 50, 100 และ 150 ppb ตามลำดับ กลุ่มที่ 5, 6 และ 7 ใช้อาหารกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 แต่เสริมด้วยพัมมิซระดับ 2% กลุ่มที่ 8 และ 9 ใช้อาหารกลุ่ม 3 และ 4 แต่เสริมด้วยพัมมิซระดับ 4% อาหารทดลองทุกกลุ่มมี CP และ ME เท่ากับ 16.0% และ 2.80 กิโลแคลอรี/ก. เหมือนกัน ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลอง รวมทั้งระดับของอะฟลาทอกซินในอาหารผสมเสร็จที่ทำการตรวจด้วย ELISA test kit (RIDASCREEN®FAST Aflatoxin, Germany) แสดงไว้ในตารางที่ 18

ใช้เวลาทดลองทั้งสิ้น 84 วัน ระหว่างเดือนมิถุนายน-กันยายน 2546 โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วงๆ ละ 28 วัน บันทึกและคำนวณผลผลิตไข่ ปริมาณอาหารที่กิน และประสิทธิภาพการใช้อาหารในวันสุดท้ายของแต่ละช่วง รวมทั้งบันทึกจำนวนไก่ตายทันที (ถ้ามี) และผ่าซากไก่ที่ตายเพื่อตรวจหาสาเหตุ ทำการวัดคุณภาพไข่ ทั้งน้ำหนักไข่ จำนวนไข่แต่ละเบอร์ สีไข่แดง ค่า Haugh unit และความหนาเปลือกไข่ จากไข่ทุกฟองใน 3 วันสุดท้ายของแต่ละช่วง บันทึกการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวของไก่เมื่อเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง รวมทั้งบันทึกการผลัดขนของไก่ (ถ้ามี) แล้วรายงานผลเมื่อสิ้นสุดการทดลอง

ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan' s new multiple range test

2.2 ศึกษาผลต่อความสมบูรณ์พันธุ์ สมรรถภาพการผลิตของลูกไก่ และคุณภาพซากของแม่ไก่

ทำการเลี้ยงไก่ไข่ต่อจากการทดลอง 2.1 โดยแบ่งกลุ่มและให้อาหารตามเดิมต่อไปอีก 28 วัน ซึ่งไก่แต่ละตัวจะได้รับการผสมเทียมจากน้ำเชื้อของพ่อพันธุ์ (โรดไอร์แลนด์แดง) จำนวน 27 ตัว ที่มีอายุระหว่าง 6-18 เดือน 2 ครั้ง/สัปดาห์ (ปริมาณน้ำเชื้อที่ได้ นำมารวมกันแล้วเจือจางกับน้ำเกลือ 0.9% ในอัตราส่วน 1:1 ฉีดตัวละ 0.3 มิลลิลิตร วิธีการผสมเทียมแสดงไว้ในภาคผนวก ก.) ทำการเก็บไข่วันละ 2 ครั้ง ยกเว้น 7 วันแรก นำมาไว้ในห้องปรับอากาศ (อุณหภูมิ 22.0-25.4^{o}ซ) จากนั้นนำไข่เข้าฟักในวันที่ 14, 21 และ 28 ของการทดลอง โดยใช้เวลาในการฟัก 21 วัน (ย้ายเข้าตู้เกิดในวันที่ 18) โดยกลับไข่วันละ 4 ครั้งที่เวลา 07.00, 10.00, 13.00 และ 16.00 น. พร้อมบันทึกอุณหภูมิและความชื้นสัมพัทธ์ของตู้ฟักและตู้เกิดด้วย ระหว่างการฟักทำการส่องไข่ที่อายุฟัก 14 วัน เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ไข่ที่มีเชื้อ รวมทั้งหาอัตราการฟักออกเป็นตัวเมื่อฟักครบ 21 วัน

นอกจากนี้ได้ทำการเลี้ยงและกกลูกไก่ที่เกิดของแต่ละกลุ่ม (ชั่งน้ำหนักแรกเกิด) ให้ได้รับอาหารสูตรเดียวกัน (ตารางที่ 19) เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลด้านสมรรถภาพการผลิตและ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

อัตราการตาย โดยบันทึกน้ำหนักตัวเพิ่มและอาหารที่กินเมื่อสิ้นสุดการทดลอง (อายุไก่ 4 สัปดาห์) รวมทั้งบันทึกจำนวนไก่ตายทันที (ถ้ามี) และทำการผ่าซากไก่ที่ตายเพื่อตรวจหาสาเหตุ

สำหรับแม่ไก่เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำใต้ปีกจำนวน 1 ตัว/ซ้ำ นำมาวิเคราะห์หาค่าฮีมาโตคริต ด้วยเครื่อง Microhematocrit centrifuge โดยเหวี่ยง 9,000-12,000 rpm วิเคราะห์ฮีโมโกลบินด้วยเครื่อง Sahil Haemometer (Western Germany) และวิเคราะห์พลาสมาโปรตีนด้วยเครื่อง Refractometer (Japan) นอกจากนี้ได้สุ่มไก่มาอดอาหารเป็นเวลา 1 คืน แล้วฆ่าด้วยการตัดเส้นเลือดดำที่คอ จำนวน 1 ตัว/ซ้ำ (รวม 3 ตัว/กลุ่ม) เพื่อศึกษาผลด้านคุณภาพซากและน้ำหนักอวัยวะภายใน ส่วนตับที่ได้นำมาอบแล้ววิเคราะห์หาไขมัน นอกจากนี้ได้สุ่มไก่มาฆ่าเพิ่มอีกจำนวน 1 ตัว/ซ้ำ โดยตัดเอาเฉพาะส่วนตับ เพื่อตรวจพยาธิสภาพ (Histopathology)[1/] ข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์หาความแตกต่างทางสถิติโดยใช้แผนการทดลองแบบ Completely randomized design และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan' s new multiple range test

3. ศึกษาผลของการเสริมพัมมิซในอาหารที่มีอะฟลาทอกซินในไก่เนื้อ

□ **อุปกรณ์**

1. ไก่เนื้อสายพันธุ์อาร์เบอร์เอเคอร์ (Arbor Acre) คละเพศ อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 140 ตัว
2. คอกทดลองขนาด 1.0 ตารางเมตร จำนวน 14 คอก อยู่ภายในโรงเรือนเดียวกัน
3. เครื่องกกและหลอดไฟขนาด 100 วัตต์ สำหรับให้ความอบอุ่นแก่ลูกไก่ช่วงอายุ 4 สัปดาห์แรก
4. ขวดน้ำขนาด 8 ลิตร จำนวน 14 ใบ
5. ภาชนะใส่อาหารแบบแขวน และถังบรรจุอาหารพร้อมฝาปิด คอกละ 1 ใบ
6. เครื่องผสมอาหารแบบเกลียวนอน ความจุ 60 กก./การผสม 1 ครั้ง
7. เครื่องชั่งแบบไฮโดรลิก ขนาดชั่งได้สูงสุด 150 กก. ความละเอียดที่อ่านได้ 50 ก.
8. เครื่องชั่งแบบสปริง ซึ่งปรับจานรองรับให้เป็นรูปกรวยสำหรับใช้ชั่งไก่เป็นรายตัว ขนาดชั่งได้สูงสุด 3 กก. ความละเอียดที่อ่านได้ 10 ก.

[1/] การตรวจพยาธิสภาพของตับ (Histopathology) กระทำที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ โดยแยกตับออกมาตัดและแต่ง แล้วตรึงเนื้อเยื่อใน 10% ฟอร์มาลิน ผ่านกระบวนการทำให้เนื้อเยื่อแห้งแล้วทำ Paraffin block ตัดเนื้อเยื่อออกมาตรวจพยาธิสภาพด้วยการย้อมสี hematoxylin และ eosin รวมทั้งสี periodic acid – Schiff's reagent จากนั้นนำมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อตรวจดู cellular injury

* เกณฑ์การให้คะแนนการเกิด fatty changes ในเซลล์ตับแบ่งออกเป็น 5 ระดับ รายละเอียดแสดงไว้ในตารางที่ 20

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

9. เครื่องชั่งแบบไฟฟ้า ขนาดชั่งได้สูงสุด 3,110 ก. ความละเอียดที่อ่านได้ 0.01 ก. สำหรับชั่งสารผสมล่วงหน้า รวมทั้งชั่งอวัยวะภายในของไก่เนื้อ
10. วัคซีนป้องกันโรคนิวคาสเซิลกับหลอดลมอักเสบติดต่อ (Newcastle disease plus Infectious bronchitis) และวัคซีนป้องกันโรคกัมโบโร (Infectious bursal disease)
11. เทอร์โมมิเตอร์แบบต่ำสุด-สูงสุด

□ วิธีการทดลอง

ใช้ไก่เนื้อสายพันธุ์ Arbor Acre 707 (High meat yield) คละเพศ อายุ 3 สัปดาห์ จำนวน 140 ตัว ในช่วงอายุไก่ 1-21 วัน นำมาเลี้ยงและกกรวมกัน ให้ได้รับอาหารผสมที่มี CP 21% และ ME 3.20 กิโลแคลอรี/ก. เหมือนกัน จากนั้นแบ่งไก่ออกโดยสุ่มเป็น 7 กลุ่มๆ ละ 2 ซ้ำ (10 ตัว/ซ้ำ) แต่ละซ้ำเลี้ยงในคอกปล่อยพื้นขนาด 1.0 ตารางเมตร (10 ตัว/ตร.ม.) ให้ไก่ทุกตัวได้กินน้ำและอาหารอย่างเต็มที่ อาหารทดลองเป็นแบบผงผสมเอง กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ 2, 3 และ 4 มีอะฟลาทอกซินระดับ 100, 200 และ 300 ppb ตามลำดับ กลุ่มที่ 5, 6 และ 7 ใช้อาหารกลุ่มที่ 2, 3 และ 4 แต่เสริมด้วยพัมมิซระดับ 4% อาหารทดลองทุกกลุ่ม แบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ ระยะไก่อายุ 4-6 และ 7 สัปดาห์ โดยแต่ละระยะมี CP เท่ากับ 19 และ 17% และมี ME เท่ากับ 3.20 กิโลแคลอรี/ก. เท่ากันทุกกลุ่ม ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารทดลอง รวมทั้งระดับของอะฟลาทอกซินในอาหารผสมเสร็จที่ทำการตรวจด้วย ELISA test kit (RIDASCREEN®FAST Aflatoxin, Germany) แสดงไว้ในตารางที่ 21 และ 22

ใช้เวลาทดลอง 4 สัปดาห์ ระหว่างเดือนมิถุนายน-กรกฎาคม 2546 บันทึกน้ำหนักตัวเพิ่มและอาหารที่กินเมื่อมีการเปลี่ยนอาหารที่อายุไก่ 6 และ 7 สัปดาห์ บันทึกจำนวนไก่ตายทันที (ถ้ามี) และทำการผ่าซากไก่ที่ตายเพื่อตรวจหาสาเหตุ เมื่อสิ้นสุดการทดลองเจาะเลือดจากเส้นเลือดดำใต้ปีกจำนวนเพศละ 2 ตัว/ซ้ำ นำมาวิเคราะห์หาค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบิน และพลาสมาโปรตีน ด้วยวิธีการเดียวกับการทดลองที่ 2.2 วิธีวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

นอกจากนี้ได้สุ่มไก่มาอดอาหารเป็นเวลา 1 คืน แล้วฆ่าด้วยการตัดเส้นเลือดดำที่คอ จำนวนเพศละ 2 ตัว/ซ้ำ (รวม 8 ตัว/กลุ่ม) เพื่อศึกษาผลด้านคุณภาพซากและน้ำหนักอวัยวะภายใน วิเคราะห์หาไขมันในตับจากตับไก่เพศละตัว/ซ้ำ ส่วนตับที่เหลือ (เพศละตัว/ซ้ำ) นำไปตรวจพยาธิสภาพ (Histopathology) นำข้อมูลที่ได้นำมาวิเคราะห์ค่าความแปรปรวนด้วยแผน Completely randomized design ยกเว้นข้อมูลด้านคุณภาพซาก ค่าโลหิตวิทยา ไขมันในตับและพยาธิสภาพตับวิเคราะห์ด้วย Randomized block design โดยนำเพศมาเป็น block และหาลำดับความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยวิธี Duncan's new multiple range test

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 17 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารไก่ไข่ช่วงอายุ 59-62 สัปดาห์

ชนิดสารดูดซับ	-	พัมมิซ			อะโซไมท์®
ระดับในอาหาร (%)	-	2	4	6	2
ชนิดวัตถุดิบ:					
ข้าวโพด	57.11	52.87	48.63	44.38	52.87
กากถั่วเหลือง (44% CP)	18.43	19.29	20.15	21.00	19.29
น้ำมันรำ	0.54	1.94	3.33	4.73	1.94
ไดแคลเซียมฟอสเฟต (18% P)	0.88	0.89	0.90	0.90	0.89
หินเกล็ด	7.91	7.91	7.90	7.89	7.91
พัมมิซ	-	2.00	4.00	6.00	-
อะโซไมท์®	-	-	-	-	2.00
ดีแอล-เมไธโอนีน	0.11	0.11	0.11	0.12	0.11
แอล-ไลซีน	0.12	0.10	0.09	0.07	0.10
ส่วนผสมคงที่ [1/]	14.90	14.90	14.90	14.90	14.90
รวม (กก.)	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**
ราคา (บาท/กก.) *	6.63	6.83	7.02	7.22	7.57
โภชนะจากการคำนวณ (% สภาพที่ใช้เลี้ยง)					
โปรตีน	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
ME (กิโลแคลอรี/ก.)	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80
เยื่อใย	4.89	4.81	4.73	4.65	4.81
ไขมัน	4.45	5.71	6.96	8.22	5.71
เถ้า	4.35	6.25	8.14	10.04	6.27
แคลเซียม	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
ไลซีน	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
เมไธโอนีน	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35

[1/] รำละเอียด 12.00, ปลาป่น (57% CP) 2.40, เกลือ 0.25 และพรีมิกซ์ (Roche)[2/] 0.25.

[2/] วิตามินและแร่ธาตุมีหน่วยเป็น ก (ยกเว้นที่ระบุ): วิตามินเอ 1.2 MIU; วิตามินดี$_3$ 0.24 MIU; วิตามินอี 0.8; วิตามินเค$_3$ 0.2; วิตามินบี$_1$ 0.1; วิตามินบี$_2$ 0.4; วิตามินบี$_6$ 0.1; วิตามินบี$_{12}$ 0.001; ไบโอติน 0.003; กรดแพนโทธีนิก 0.5; กรดโฟลิก 0.05; ไนอาซิน 1.5; เหล็ก 4.0; ทองแดง 0.6; แมงกานีส 6.0; สังกะสี 3.75; ไอโอดีน 0.035; ซีลีเนียม 0.007; โคลีน 6.25; สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ 2.5; สารถนอมคุณภาพอาหารสัตว์ 0.05

* ดูตารางที่ 28

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 18 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารไก่ไข่ช่วงอายุ 65-76 สัปดาห์

ระดับอะฟลาทอกซินในอาหาร (ppb)	-	50	100	150	50	100	150	100	150
ระดับพัมมิซในอาหาร (%)	-	-	-	-	2	2	2	4	4
ชนิดวัตถุดิบ:									
ข้าวโพด	57.11	56.61	56.12	55.62	52.36	51.87	51.37	47.61	47.12
กากถั่วเหลือง (44% CP)	18.43	18.19	17.95	17.71	19.05	18.81	18.57	19.67	19.42
น้ำมันรำ	0.54	0.56	0.59	0.61	1.96	1.98	2.00	3.38	3.40
กากมะพร้าวแห้ง[3/]	0.00	0.714	1.429	2.143	0.714	1.429	2.143	1.429	2.143
ไดแคลเซียมฟอสเฟต (18% P)	0.88	0.88	0.88	0.88	0.89	0.89	0.88	0.89	0.89
หินเกล็ด	7.91	7.91	7.91	7.91	7.91	7.91	7.90	7.90	7.90
พัมมิซ	-	-	-	-	2.00	2.00	2.00	4.00	4.00
ส่วนผสมคงที่[1/]	15.13	15.13	15.13	15.13	15.13	15.13	15.13	15.13	15.13
รวม (กก.)	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**
ราคา (บาท/กก.) *	6.80	6.79	6.77	6.76	6.98	6.97	6.95	7.16	7.15
โภชนะจากการคำนวณ (% สภาพที่ใช้เลี้ยง)									
โปรตีน	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00	16.00
ME (กิโลแคลอรี/ก.)	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80	2.80
เยื่อใย	4.89	4.94	4.99	5.04	4.86	4.91	4.96	4.83	4.88
ไขมัน	4.45	4.50	4.54	4.59	5.75	5.80	5.85	7.06	7.10
แคลเซียม	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40	3.40
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
ไลซีน	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
เมไธโอนีน	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
อะฟลาทอกซินจากการวิเคราะห์ (ppb)[4/]	22.48	76.70	128.73	144.01	67.34	129.71	159.48	115.05	162.36

[1/] รำละเอียด 12.00, ปลาป่น (57% CP) 2.40, ดีแอล-เมไธโอนีน 0.11, แอล-ไลซีน 0.12, เกลือ 0.25 และพรีมิกซ์ (Roche) [2/] 0.25. * ดูตารางที่ 30

[2/] เช่นเดียวกับตารางที่ 17 [3/] เช่นเดียวกับตารางที่ 21 [4/] ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารผสมเสร็จวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA (RIDASCREEN®FAST Aflatoxin, Germany) วิธีวิเคราะห์แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 19 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารลูกไก่ไข่ช่วงอายุ 1-4 สัปดาห์

วัตถุดิบอาหาร		โภชนะจากการวิเคราะห์ (% สภาพที่ใช้เลี้ยง)	
ข้าวโพด	62.50	โปรตีน	18.98
กากถั่วเหลือง	20.00	ไขมัน	4.11
รำละเอียด	10.00	เยื่อใย	5.05
ปลาป่น	6.00	ความชื้น	11.78
หินเกล็ด	1.00	เถ้า	5.25
เกลือ	0.25		
พรีมิกซ์ (Roche)[1/]	0.25		
รวม (กก.)	**100.00**		

[1/] เช่นเดียวกับตารางที่ 17

ตารางที่ 20 เกณฑ์การให้คะแนนการสะสมไขมันในตับ (fatty changes) จากการตรวจพยาธิสภาพ

Score	**Observation**
0	Normal hepatocytes : no visible fat globules
1	Minimal : fine vacuoles, seen on high power magnification and scattered, in less than 25% of cells
2	Mild : small and medium-sized fat vacuoles, seen on high power magnification and scattered, 25-50% of cells
3	Moderate : large vacuoles, easily seen on medium power magnification and diffusely distribute, > 50% of cells
4	Severe : large vacuoles, easily seen on low power and medium power magnification and displaced nuclei or formation fatty change, > 50% of cells

* ภาพถ่ายเซลล์ตับ score ต่างๆ แสดงไว้ในภาคผนวก ก.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 21 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารไก่เนื้อช่วงอายุ 1-3 และ 4-6 สัปดาห์

ช่วงอายุไก่ (สัปดาห์)	1-3	4-6					
อะฟลาทอกซิน (ppb)	-	-	100	200	300	100	200	300
ระดับพัมมิซในอาหาร (%)	-	-	-	-	-	4	4	4
ชนิดวัตถุดิบ:								
ข้าวโพด	52.57	56.21	55.22	54.21	53.21	46.73	45.73	44.74
กากถั่วเหลือง (44% CP)	28.88	21.32	20.83	20.35	19.87	22.55	22.07	21.59
กากมะพร้าวแห้ง[3/]	-	-	1.43	2.86	4.29	1.43	2.86	4.29
พัมมิซ	-	-	-	-	-	4.00	4.00	4.00
น้ำมันรำ	5.82	4.17	4.22	4.26	4.31	7.01	7.06	7.10
แอล-ไลซีน	0.17	0.12	0.12	0.13	0.13	0.09	0.10	0.10
ส่วนผสมคงที่	10.50[1/]	18.19[2/]	18.19[2/]	18.19[2/]	18.19[2/]	18.19[2/]	18.19[2/]	18.19[2/]
รวม (กก.)	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**
ราคา (บาท/กก.) *	-	8.25	8.22	8.19	8.16	8.61	8.58	8.56
โภชนะจากการคำนวณ (% สภาพที่ใช้เลี้ยง)								
โปรตีน	21.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00	19.00
ME (กิโลแคลอรี/ก.)	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
เยื่อใย	3.90	4.93	5.03	5.13	5.23	4.87	4.97	5.07
ไขมัน	9.05	8.07	8.16	8.26	8.35	10.68	10.77	10.86
แคลเซียม	1.00	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.45	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40	0.40
ไลซีน	1.20	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00	1.00
เมไธโอนีน	0.50	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38	0.38
อะฟลาทอกซิน (ppb)[4/]	42.22	43.20	144.75	237.44	314.35	148.12	220.50	325.77

[1/] รำละเอียด 4.00, ปลาป่น (57% CP) 6.00, ไดแคลเซียมฟอสเฟต (18% P) 0.79, เปลือกหอย 1.10, ดีแอล-เมไธโอนีน 0.17, เกลือ 0.25 และพรีมิกซ์ (Roche)[5/] 0.30.

[2/] รำละเอียด 10.00, ปลาป่น (57% CP) 6.00, ไดแคลเซียมฟอสเฟต (18% P) 0.57, เปลือกหอย 1.00, ดีแอล-เมไธโอนีน 0.07, เกลือ 0.25 และพรีมิกซ์ (Roche)[5/] 0.30.

[3/] โปรตีน, ไขมัน, เยื่อใย, แคลเซียม, ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้, ไลซีน และเมไธโอนีน เท่ากับ 21.0, 6.0, 12.0, 0.2, 0.2, 0.59 และ 0.37 %. ME 2.80 กิโลแคลอรี/ก. (อุทัย, 2529)

[4/] วิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารผสมเสร็จด้วยวิธี ELISA (RIDASCREEN®FAST Aflatoxin, Germany)

[5/] วิตามินและแร่ธาตุมีหน่วยเป็น ก (ยกเว้นที่ระบุ): วิตามินเอ 1.44 MIU; วิตามินดี$_3$ 0.29 MIU; วิตามินอี 0.96; วิตามินเค$_3$ 0.24; วิตามินบี$_1$ 0.12; วิตามินบี$_2$ 0.48; วิตามินบี$_6$ 0.12; วิตามินบี$_{12}$ 0.0012; ไบโอติน 0.0036; กรดแพนโทธีนิก 0.6; กรดโฟลิก 0.06; ไนอาซีน 1.8; เหล็ก 4.8; ทองแดง 0.72; แมงกานีส 7.2; สังกะสี 4.5; ไอโอดีน 0.042; ซีลีเนียม 0.0084; โคลีน 7.5; สารปรุงแต่งอาหารสัตว์ 3.0; สารฉนอมคุณภาพอาหารสัตว์ 0.06 * ดูตารางที่ 38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ตารางที่ 22 ส่วนผสมและคุณค่าทางโภชนะของอาหารไก่เนื้อที่อายุ 7 สัปดาห์

ระดับอะฟลาทอกซินในอาหาร (ppb)	-	100	200	300	100	200	300
ระดับพัมมิซในอาหาร (%)	-	-	-	-	4	4	4
ชนิดวัตถุดิบ:							
ข้าวโพด	64.20	63.21	62.20	61.21	54.72	53.72	52.73
กากถั่วเหลือง (44% CP)	15.15	14.67	14.19	13.71	16.38	15.90	15.42
กากมะพร้าวแห้ง[3/]	-	1.43	2.86	4.29	1.43	2.86	4.29
พัมมิซ	-	-	-	-	4.00	4.00	4.00
น้ำมันรำ	2.69	2.73	2.78	2.82	5.53	5.57	5.61
แอล-ไลซีน	0.11	0.11	0.12	0.12	0.09	0.09	0.10
ส่วนผสมคงที่[1/]	17.86	17.86	17.86	17.86	17.86	17.86	17.86
รวม (กก.)	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**	**100.00**
ราคา (บาท/กก.) *	7.68	7.65	7.62	7.59	8.04	8.01	7.98
โภชนะจากการคำนวณ (% สภาพที่ใช้เลี้ยง)							
โปรตีน	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00	17.00
ME (กิโลแคลอรี/ก.)	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20	3.20
เยื่อใย	4.72	4.82	4.92	5.01	4.66	4.76	4.85
ไขมัน	6.80	6.90	6.99	7.08	9.41	9.50	9.59
แคลเซียม	0.80	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90	0.90
ฟอสฟอรัสใช้ประโยชน์ได้	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35	0.35
ไลซีน	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85	0.85
เมไธโอนีน	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
อะฟลาทอกซิน (ppb)[4/]	44.54	123.26	218.26	304.87	153.10	215.51	320.83

[1/] รำละเอียด 10.00, ปลาป่น (57% CP) 6.00, ไดแคลเซียมฟอสเฟต (18% P) 0.35, เปลือกหอย 0.93, ดีแอล-เมไธโอนีน 0.03, เกลือ 0.25 และพรีมิกซ์ (Roche)[5/] 0.30.

[3/4/5/] เช่นเดียวกับตารางที่ 21

* ดูตารางที่ 38

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved