

الفصل الثالث

استخدام ميكروفلورا الكرش في تقييم مواد العلف

يستخدم في التقديرات العملية لتجارب الهضم *In vitro Rumen* أو الكرش الصناعي لتقدير العديد من العينات العلفية من حيث معاملات هضمها ، وإنتاجها للأحماض الدهنية ، وفيها يؤخذ دورق طويل العنق سعة ٥٠٠ مل (أو أنبوبة سعة ٥٠ مل) يوضع بها ٦ مجم عينة جافة + ١٦٠ مل ماء + ١٥٠ مل سائل كرش + ٥٠ مل لعاب صناعي على أن تجهز الدوارق قبل استحضر سائل الكرش ، حيث يستحضر سائل الكرش في ترمس تحت تيار (ك أ٢) بسرعة ، ويرشح على شاش قبل وضعه في الترمس ، وينقل بسرعة للمعمل لإضافته على الدوارق (الكروش الصناعية) ، حيث تعمل ٣ دوارق لكل عينة ، علاوة على دوارق لعينة مختبرة ومعلومة ، ودوارق بدون عينات كبلانك ، وتزود الدوارق بغاز (ك أ٢) ، وتحفظ في حمام مائي على 39 ± 1 م في ظلام مع الرج كل ٦ ساعات حتى ٤٨ ساعة ، بعدها يقدر في الكرش الصناعي الأحماض الدهنية (بالكروماتوجرافي الغازي) المخلقة من العينات المدروسة . وإذا استكمل هضم العينات الإنزيمي (بيسين ٢٤ جم : ١٠٠,٠٠٠ في ١٢٠ مل حمض هيدروكلوريك ١٠ عياري ويكمل إلى ١٢ لتر) لمدة ٤٨ ساعة أخرى ، فإن المتبقي في الكرش الصناعي (بترشيحه على شاش) يمائل الخارج في روث الحيوان فتحليل العينة وتحليل ما تخلف في الكرش بعد الهضم باللعاب وسائل الكرش والحامض والبيسين يمكن حساب معامل الهضم معمليا - *In Vitro Digesti-bility* كالتالي :

% معامل هضم المادة الجافة = $100 \times$ [المادة الجافة للعينة - (المادة الجافة المتبقية - (المادة الجافة للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

المادة العضوية المهضومة / ١٠٠ جم مادة جافة = $100 \times$ [المادة العضوية للعينة - (المادة العضوية المتبقية - (المادة العضوية للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

% معامل هضم المادة العضوية = $100 \times$ [المادة العضوية للعينة - (المادة العضوية المتبقية - (المادة العضوية للبلانك)] / المادة العضوية للعينة .

ويتكون اللعاب الصناعي من الأملاح والمعادن اللازمة لعمل الكائنات الحية الدقيقة في سائل الكرش ، وأبسط تركيب له من ٣٧ جم $Na_2 HPO_4$ لامائي ، ٩٨ جم $NaHCO_3$ تذاب في ١٠ لتر ماء مقطر على ٤٠ م. ومحلول آخر من ٤٧ جم $NaCl$ ، ٥٧ جم KCl ، ٤ جم

CaCl₂ ، ٦ جم MgCl₂ مذابة في لتر ماء . ويضاف ١٠٠ مل من المحلول الثاني إلى ١٠ لتر من المحلول الأول ويقلب كهربيا Electric Stirrer لمدة ربع ساعة تحت غاز (ك أ٢) .

الهضم المعملّي بطريقة إنتاج الغاز :

In Vitro Digestibility by gas Production System

تستخدم هذه الطريقة في تقدير معامل الهضم للمادة العضوية معمليا ، وكذلك المحتوى من الطاقة القابلة للتمثيل الغذائي في مادة علف معمليا للمجترات . وتعتمد هذه الطريقة على معدل إنتاج غازات الكرش (ك أ٢ ، ك يد٤) من تخضين مادة علف مع سائل الكرش معمليا ، إذ يختلف هذا المعدل باختلاف معاملات الهضم .

المحاليل :

- ١ - محلول (أ) معادن نادرة :
 - كلوريد كالسيوم ثنائي الماء ١٣,٢ جم
 - كلوريد منجنيز رباعي الماء ١٠,٠ جم
 - كلوريد كوبلت سداسي الماء ١,٠ جم
 - كلوريد حديدك سداسي الماء ٨,٠ جم
 - ماء مقطر حتى ١٠٠ مل
- ٢ - محلول (ب) منظم الكرش :
 - بيكربونات أمونيوم ٤,٠ جم
 - بيكربونات صوديوم ٣٥,٠ جم
 - ماء مقطر حتى لتر
- ٣ - محلول (ج) معادن كبيرة :
 - فوسفات صوديوم أحادية الهيدروجين جافة ٥,٧ جم
 - فوسفات بوتاسيوم ثنائية الهيدروجين جافة ٦,٢ جم
 - كربونات ماغنسيوم سباعية الماء ٠,٦ جم
 - ماء مقطر حتى لتر
- ٤ - محلول ريسازيورين Resazurine %٠,١
- ٥ - محلول اختزال :
 - هيدروكسيد صوديوم (١ ع) ٤ مل
 - كبريتيد صوديوم تساعي الماء ٦٢٥ مجم

٦ - نشا أذرة تجاري .

٧ - مسحوق دريس قياسي مضبوط لإنتاج ١٦, ٤٤ مل غاز على ارتفاع ٤٠٠ م فوق سطح البحر ، يحصل عليه من معهد تغذية الحيوان بجامعة هوننهيم بمدينة شتوتجارت الألمانية (P. O. Box 700562, 7000 Stuttgart 70) .

٨ - سائل الكرش من حيوانات تأكل ٦٠٪ من العليقة أعلاف خشنة .

الأجهزة :

- ١ - أنابيب وخرطوم لجمع سائل الكرش ، شاش ، مصدر لغاز ثاني أكسيد الكربون .
- ٢ - فرن كهربائي للتحضين مضبوط على $39 \pm 0,5$ م مزود بمروحة ، ويتسع لبكرة بقطر ٥٠ سم داخل الفرن الذي سعته في حدود ٢٤٠ لترًا .
- ٣ - بكرة الفرن من قرصين من الخزف أو الخشب قطر ٥٠ سم وسمك ١,٥ سم بينهما مسافة ١٢ سم ، ومثقبان حوالي ٦٠ ثقباً سعة كل منها ٣,٨ سم لحمل السرنجات .
- ٤ - موتور يحرك بكرة الفرن بمعدل ١-٢ لفة / دقيقة .
- ٥ - سرنجات زجاجية قطر كل منها من الخارج ٣,٦ سم وطولها تقريباً ٢٠ سم ذات حجم مدرج ١٠٠ مل ، تزود السرنجات بأطراف سيليكون وعلى هذه الخرطوم السيليكون كلبسات لحجز الغازات .
- ٦ - سرنجات أوتوماتيك ، ومقلب مغناطيسي ، وميزان .

خطوات التقدير :

- ١ - تطحن العينة لتمر من منخل سعة فتحاته ١ م ، وتؤخذ عينة جافة ٢٠٠ مجم في السرنجة الزجاج سعة ١٠٠ مل (من كل عينة يجرى تقدير ٣ مكررات لمدة يومين مختلفين على الأقل ، أي تكون أقل عدد من المكررات ٦ مكررات من كل عينة) ، وفي حالة انخفاض تركيز طاقة العلف تزداد العينة المأخوذة إلى ٥٠٠ مجم مادة جافة ، على ألا يزيد إنتاج الغاز عن ٩٠ مل .
- ٢ - تعد بيئة التحضين بأخذ ٤٠٠ مل ماء ثم ٠,١ مل محلول (أ) ثم ٢٠٠ مل محلول (ب) ثم ٢٠٠ مل محلول (ج) ثم ١,٠ مل محلول ريسازيورين ثم ٤٠ مل محلول اختزال (على الترتيب) ، وتحضر هذه البيئة مباشرة قبل جمع سائل الكرش ، ويحفظ تحت ثاني أكسيد الكربون في حمام مائي على ٣٩ م مع تقليبه بمقلب مغناطيسي .
- ٣ - يسحب سائل الكرش من الفتحة المستديرة المثبتة في كرش حيوان مجتر (بقرة ، عجل ، خراف) ، ويصفى خلال طبقتين من الشاش إلى دورق دافئ سعة ٢ لتر ملء

بشاني أكسيد الكربون ، على أن يتم جمع السائل قبل التغذية . يُخلط حجم من سائل الكرش مع حجمين من بيئة التحضين في دورق عليه مضخة أوتوماتيك وموضوع في حمام مائي على ٣٩ م ويقلب مغناطيسيا . يسحب ٣٠ مل من مخلوط سائل الكرش وبيئة التحضين بواسطة المضخة الأوتوماتيك إلى كل سرنجة سبق تدفقتها على ٣٩ م ، مع إزالة أي فقاعات غازية من السرنجة ، ويفلق الكلبس لسد الخرطوم السيليكون على طرف السرنجة ، ويقرأ الحجم المشغول من حيز السرنجة ويسجل ، ثم تخضن السرنجات في الحضان على أن تبدأ فترة التحضين في الصباح ليتم قراءة حجم الغاز بعد ٦-٨ ساعات من التحضين ، فإذا زادحجم الغاز والبيئة عن ٦٠ مل يفتح الكلبس ويطرد الغاز ويضغط المكبس إلى ٣٠ مل ، وتقرأ القراءة الأخيرة بعد مضي ٢٤ ساعة من التحضين . وتسجل كل القراءات بسرعة لتجنب التغيرات في درجة الحرارة .

٤ - يجرى نفس الخطوات لعمل عينات خاوية من العينة للمقارنة (سائل كرش + بيئة تحضين بدون عينات) (Gb o) ، وكذلك تخضن ٢٠٠ مجم عينة من مسحوق الدريس القياسي التي تعطي ٤٤,١٦ مل غاز / ساعة (Gb H) ، وتخضن كذلك عينة من الدريس القياسي (١٤٠ مجم مادة جافة) ونشا ذرة (٦٠ مجم مادة جافة) والتي يجب أن تعطي معدل إنتاج غاز ٥٩,٨ مل / ساعة (Gb H_g) وذلك للتصحيح لمختلف مواد العلف المدروسة ، أي أن معامل التصحيح للدريس (F_H) عبارة عن ٤٤,١٦ / Gb_H - Gb_o ومعامل التصحيح للمركبات (F_{H2}) عبارة عن ٥٩,٨ / Gb_{H2} - Gb_o ويستخدم متوسط هذين المعاملين لتصحيح قياسات العينات . وفي حالة زيادة معامل تصحيح الدريس عن ١,١ فينبغي زيادة الأعلاف الخشنة للحيوان المأخوذ منه سائل الكرش ، بينما لو زاد معامل تصحيح المركبات عن ١,١ فينبغي زيادة المركبات و / أو مستوى التغذية .

٥ - حساب النتائج يتوقف على تصحيح لوزن العينة (W_t) المختلف عن ٢٠٠ مجم مادة جافة ولنشاط سائل الكرش . ويكون معدل إنتاج الغاز (Gb) عبارة عن إجمالي الزيادة في الحجم (V₂₄ - V₀) مطروحاً منها إنتاج غاز المقارنة الخاوية (Gb_o) وتضرب في معامل تصحيح الوزن (٢٠٠ / الوزن) وفي متوسط معامل التصحيح F_H ، F_{Hs} .

$$Gb = (V_{24} - V_0 - Gb_o) \frac{200}{W_t} \cdot \frac{F_H + F_{Hs}}{2}$$

$$= (V_{24} - V_0 - Gb_o) \frac{F_H + F_{Hs}}{W_t} \cdot 100$$

ومنه تستنتج معامل هضم المادة العضوية (do%) على أساس إنتاج الغاز ، ومحتوى المادة من البروتين الخام (P × %) على أساس المادة الجافة :

$$do \% = 0.76 Gb + 0.637 \% P + 22.5$$

كذلك يقدر المحتوى من الطاقة المهضومة (DE) والقابلة للتمثيل الغذائي (ME)

بالميجا جول / كجم مادة جافة من إنتاج الغاز ، والمحتوى من البروتين (p %) ، الدهن (L × %) على النحو التالي :

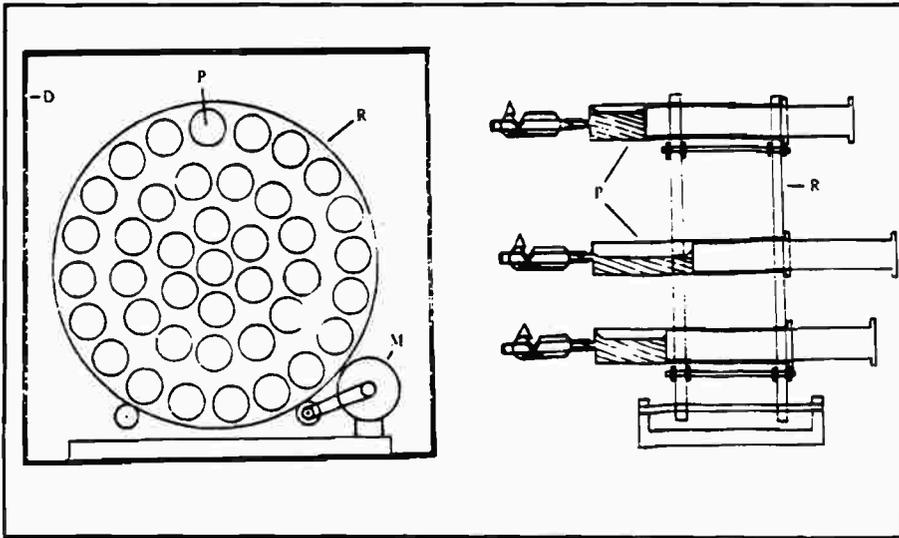
$$DE = 0.1384 Gb + 0.142 \% \times P + 0.111 \% \times L + 2.86$$

$$ME = 0.1456 Gb + 0.0767 \% \times P + 0.164 \% \times L + 1.2$$

وبين هذه القيم العملية (ME ، DE ، do) والنتائج البيولوجية على الأغنام في تجارب هضم عديدة بينها ارتباط شديد حوالي 7.97 .
وبنفس الأسلوب تحسب الطاقة الصافية لإنتاج اللبن (NEL) :

$$NEL = 0.1010 Gb + 0.0051 \times P + 0.011 \times L$$

$$= 0.24 ME^2 / GE + 0.463$$



(شكل ٣٦)

قطاع في حضان السرنجات المستخدم في تقدير معامل الهضم معملياً بإنتاج الغاز يوضع السرنجات (P) في البكرة الدوارة (R) بالموتور (M) في فرن تجفيف (D) على ٣٩ ± ٠,٥ م .

ومن إنتاج الغاز يمكن الاستدلال على أزوت الأمونيا المتحررة في الكرش الصناعي لوجود علاقة قوية بينهما ، إذ تستغل الأمونيا جزئياً في تخليق البروتين الميكروبي ، وإنتاج الغازات (ثاني أكسيد الكربون والميثان) فتعتبر مقياس لوفرة الطاقة لتخليق البروتين . فمن العلاقات الخطية لارتداد إنتاج الغاز على إنتاج الأمونيا يمكن حساب الأمونيا الناتجة

من العينة ، ويطرح منها الأمونيا الناتجة من مقارنة بدون عينة لحساب الأمونيا المتحررة من البروتين والمكونات الأزوتية الأخرى في مادة العلف المحضنة في الكرش الصناعي لحساب تكسير النيتروجين معملياً (IVDN - Degradable N In Vitro) من المعادلة :

النيتروجين المهضوم معملياً = (نيتروجين الأمونيا عند عدم توفر كربوهيدرات أي عند عدم تخليق بروتين ميكروبي . نيتروجين أمونيا المقارنة بدون عينة) / النيتروجين الكلي في العينة المحضنة .

علمًا بأن التحضين معملياً يكون مع ٣٠ مل سائل كرش في سرنجات سعة ١٠٠ مل لمدة ٢٤ ساعة على 39 ± 0.5 م° في حضان يشتمل حامل (بكرة) سرنجات دوار .

كما يمكن من التحليل المعملي للمركبات الغذائية في أي مادة علف التنبؤ بمعاملات هضم والقيمة الغذائية لهذه المادة العلفية بموجب التطبيق في معادلات ارتداد خاصة للعلاقة بين التركيب الكيماوي ومعاملات الهضم ، أو التركيب الكيماوي والقيمة الغذائية دون إجراء دراسات مطولة لا على الحيوان ولا معملياً.

تقييم البروتين بالتحضين في كرش المجترات :

لقد طورت طريقة لتقييم مواد العلف بتحضينها In situ في الكرش الطبيعي لتقدير اختفاء Disappearance أو تكسير Degradability بروتين العلف .

وفيما يلي خطوات هذه الطريقة :

١ - استخدام أكياس من ألياف صناعية بولي استر Polyester ، وهذا النسيج قطر مسامه ٤٠ - ٥٠ ميكرون ، وفتحة الكيس حوالي ٢٦٪ من مساحة الكيس الذي أبعاده ١٠×٢١ سم ، وذو قاعدة مستديرة ، ويحاك بعدد غرز ١٠ غرز / سم (يمكن شراؤها جاهزة من Sericol Group LTD, Industrial Fabrics Division, 24 Parsons Green Lane, London (SW6 4HT) مع سد ثقوب الحياكة بمادة أساسها السيليكون (مثل Hylosil) لمنع فقد العلف خلال هذه الثقوب ، والحياكة أيضاً بخيط صناعي بولي استر على أن تكون الحياكة غرزة رجل غراب . ويجب التأكد باستمرار من متانة الكيس وانسداد ثقوبه وإلا استبعدت الأكياس التالفة إن لم يمكن ترميمها بخيط بولي استر ومادة ملء الثقوب .

٢ - العينة تكون جافة هوائياً مطحونة لتمر من ثقب منخل ٢,٥ م ، وتستبعد الجزيئات الناعمة بنخل العينة بمنخل ٤٥ ميكرومتر . العينات الغنية بالزيت صعبة التداول يتم طحنها مع ثلج جاف . الأعلاف الخشنة تطحن لتمر من منخل ٤ م ويستبعد كذلك الناعم منها . الأعلاف الخضراء تقطع يدوياً لطول حوالي ١ سم في حالة طازجة أو مجمدة . الجذور الدرنية يؤخذ منها مكعبات ١ سم تقريباً . وفي كل الحالات يجب الحذر من فقد عصير العينات . يؤخذ في كل كيس حوالي ٥ جم مادة جافة بغض النظر عن نوع العلف .

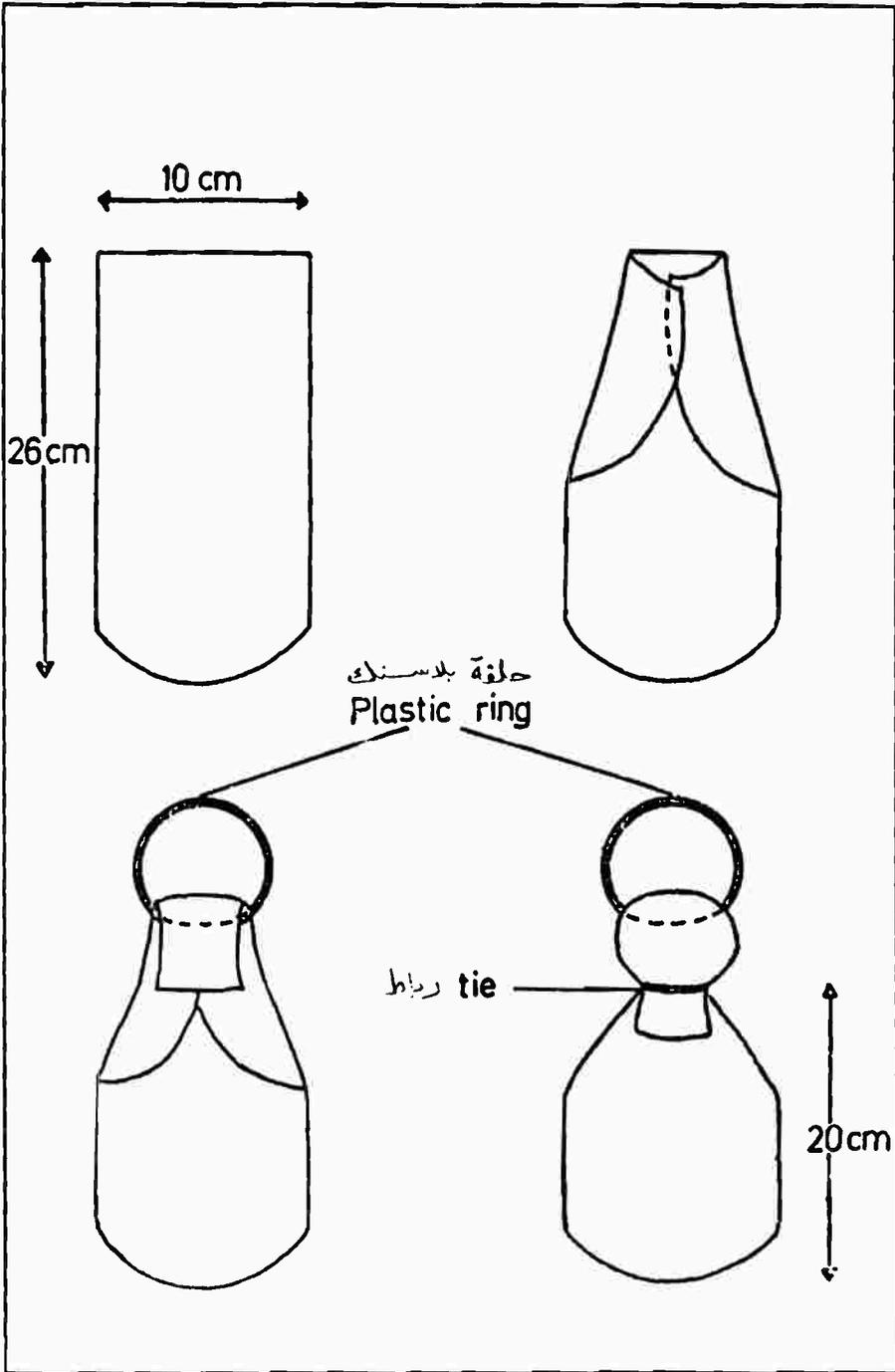
٣ - تعتبر الماشية أفضل الحيوانات لتحضين الأكياس لاستيعابها كما أكبر من العينات والأكياس كمكررات . وينبغي ذكر نوع الحيوان المستخدم كرشه في التحضين . كما ينبغي أن يتحصل الحيوان على احتياجاته الحافظة من الغذاء على أن تكون نسبة الأعلاف الخشنة إلى المركبات المكمبة ٤٠/٦٠ (مادة جافة) . كما ينبغي أن يحتوي بروتين العلف المركز على مصادر نباتية وأخرى حيوانية (لا تزيد عن ١٥ كبروتين حيواني) ، وأن يحتوي ١٧,٥ ٪ بروتين خام ، ٥-١٨ ألياف ، ٤-٤,٥ ٪ زيت ، ٢٣-٢٨ ٪ نشا . وأن تكون الأعلاف الخشنة المقدمة في غذاء الحيوان متوسطة إلى جيدة الجودة من الدريس أو السيلاج . ينبغي تقديم غذاء الحيوان على مدار اليوم ، على الأقل على ٤ وجبات . وبالنسبة للبقر الحلاب يقدم له عليقة أعلاف خشنة / مركبات بنسبة ١/١ . وينبغي العلم بأن اختلاف نسبة الأعلاف الخشنة إلى المركبات يؤثر على نظام احتفاء النيتروجين من الأكياس الداكرون ، لذلك فأي تغييرات عن هذا النظام المقترح ينبغي ذكرها . وضع وإزالة الأكياس ينبغي أن يتم قبل التغذية .

٤ - تحضن الأكياس في سائل الكرش بحيث يسمح بحرية حركتها (ما عدا الأكياس عند نقطة الصفر أو زمن الابتداء والتي تؤخذ وتفصل مباشرة دون تحضين) ، لمدة حتى ٧٢ ساعة للأعلاف الخشنة ، ٤٨ ساعة للمركبات ، أي أن فترات التحضين للمواد الخشنة تكون ٨ ، ١٢ ، ٢٤ ، ٤٨ ، ٧٢ ساعة ، بينما للمركبات ٢ ، ٦ ، ٨ ، ٢٤ ، ٤٨ ساعة . على أن يكون التحضين بمعدل كيس لكل فترة تحضين في ثلاث حيوانات أو أكثر ، أو في حيوانين على أن تعاد فترات التحضين مرة أخرى .

٥ - الأكياس عند زمن والابتداء والأكياس المستخرجة من الكرش بعد التحضين يتم غسلها في ماكينة غسل بماء بارد لمدة ٥٠ - ٦٠ دقيقة ، ثم تجفف في نفس الماكينة بلف حلتها ٥٠٠ - ٦٠٠ لفة / دقيقة .

إذا لم تتوفر ماكينة الغسيل ، فإنه يمكن غسل الأكياس يدويا بماء جار حتى يصير الماء رائقاً . تحفظ الأكياس بالتجميد لحين تجميعها للغسيل معاً وبعد تجفيف الأكياس تحفظ في مجفف على خامس أكسيد الفوسفور أو سيليكاجيل لحين وزنها . وبعد الوزن يجب طحن العينة حتى التجانس للتحليل للنيتروجين .

٦ - يعبر عن النتيجة كنسبة مئوية للنيتروجين المفقود من الكيس في زمن التحضين فقط للأزوت = $(١ - \frac{\text{النيتروجين المتبقي في الكيس}}{\text{النيتروجين الأصلي في الكيس قبل التحضين}}) \times ١٠٠$.



(شكل ٣٧) أكياس بولي إستر تستخدم في تقدير معامل هضم الأعلاف بحفظها في الكرش

هضم المادة الجافة في الكرش :

يقدر معدل اختفاء (هضم) المادة الجافة في الكرش باستخدام أكياس (١٩ × ٧ سم) داكرون، على يومين ولفترات مختلفة ، فيوضع (يحضن) ٣ أكياس موزونة (لكل يوم) بكل منها كمية معلومة (حوالي ٥ جم) من المادة الجافة للعلف محل الدراسة ، وتعلق في سائل الكرش لحيوانين على الأقل ، بكل منها فتحة مستديمة في الكرش Cannula ، مباشرة قبل تقديم عليقة الصباح ، يزال كيس من كل حيوان كل يوم (من اليومين) بعد ٨ ، ١٦ ، ٢٤ ساعة . تغسل الأكياس وتجفف حتى ثبات الوزن على ١٠٠ م ، ثم يوضع بها الوزن المعلوم من مادة العلف ، ويربط كل كيس بخيط نيلون ، ويثبت طرف الخيط الآخر بسدادة الفتحة المستديمة للكرش ، بحيث يكون طول الخيط ما بين سدادة الفتحة المستديمة وطرف الأكياس حوالي ٣٥ سم . تنقع الأكياس في ماء لمدة دقيقة قبل تمليقها في الكرش .

بعد انتهاء فترات التحضين تزال الأكياس من الكرش ، وتغسل تحت ماء صنوبر جار حتى يزول لون ماء الغسيل ، ثم تجفف الأكياس حتى ثبات وزنها على ١٠٠ م ، وتحسب عند ذلك نسبة المادة الجافة المختفية بالفرق بين الكمية المحضنة والكمية المتبقية في الكيس بعد التحضين .

ويمكن الرجوع للمراجع التالية لمزيد من الدراسة :

- Cottrill , B.r & Evans, P.J. (1984) ARC Technical Review (Wp/Ra 7/0178/SH) .
- De Boever, J.L. et al (1986 & 1988) Anim . FeeD Sci . Technol ., 14 : 203 & 19 : 247 .
- Dowman , M.G. & Collins , F.C. (1982) J . Sci. Food Agric., 33 : 689 .
- Mehrez , A.Z & Qrskov , E.R. (1977) J. Agric., Sci, Camb ., 88 : 645 .
- Menke , K.H. et al . (1979) J. Agric Sci , Camb ., 93 : 217 .
- Menke , K.H. & Steingass, H . (1987) Ubers. Tierernahrg ., 15: 59.
- Menke , K.H. & Steingass , H. (1988) Anim Res Develop., 28 : 7 .

- Minson , D.J. & Mc Leod , M.N . (1972) Technical Paper No . 8
Commonwealth Scientific & Industrial Research Organizatio Aus-
tralia .
- Reab , L . (1979) Übers. Tierernahrg .,7 : 162 .
- Reab , L . et al (1980) 31. Jahrestagung der Europäischen Vereni-
gung Fur Tierzucht .
- Raab. L. et al . (1983) Br . J. Nut . , 50 : 569 .
- Steingass , H . & Menke, K.H. (1980) Kraftfutter , 63 :534.
- Steingass , H . & Menke , K.H. (1981) Anim . Res Develop.,15 :31.
- Steingass , H . & Menke , K.H. (1986) Übers Tierernahrg ., 14 :
251 .