الفصل الثالث

استخدام ميكروفلورا الكرش فى تقييم مواد العلف

يستخدم في التقديرات المعملية 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 استحضار 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 ٣٩ ± ١م 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 (بيبسين ٢٤جم ١ :١٠,٠٠٠ في ١٢٠مل حمض هيدروكلوريك ١٠ عياري ويكمل إلى ١٢ لتراً) لمدة ٤٨ ساعة أخرى ، فإن المتبقي في الكرش الصناعي (بترشيحه على شاش) يماثل الخارج في روث الحيوان فتحليل العينة وتحليل ما تخلف في الكرش بعد الهضم باللعاب وسائل الكرش والحامض والبيبسين يمكن حساب معامل الهضم معمليا In Vitro Digestibility كالتالي :

٪ معامل هضم المادة الجافة = ١٠٠ [المادة الجافة للعينة – (المادة الجافة المتبقية – (المادة الجافة للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

المادة العضوية المهضومة/١٠٠جم مادة جافة = ١٠٠ [المادة العضوية للعينة – (المادة العضوية المتبقية – المادة العضوية للبلانك)] / المادة الجافة للعينة .

٪ معامل هضم المادة العضوية = ١٠٠ [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_2HPO_4 لامائي ، ٩٨جم $NaHCO_3$ تذاب في ١٠ لتر ماء مقطر على ٤٠م. ومحلول آخر من ٤٧ جم NaCl، ٥٧ جم KCl ، ٤ جم

$CaCl_2$ ، ٦ جم $MgCl_2$ 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 المعملي بطريقة انتاج 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 ـ 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 حديديك سداسي الماء	٨,٠ جم
ماء مقطر حتى	١٠٠ مل
٢ ـ محلول (ب) منظم الكرش :	
بيكربونات أمونيوم	٤,٠ جم
بيكربونات صوديوم	٣٥,٠ جم
ماء مقطر حتى	لتر
٣ ـ محلول (ج) معادن كبيرة :	
فوسفات صوديوم أحادية الهيدروچين جافة	٥,٧ جم
فوسفات بوتاسيوم ثنائية الهيدروچين جافة	٦,٢ جم
كربونات ماغنسيوم سباعية الماء	٠,٦ جم
ماء مقطر حتى	لتر
٤ ـ محلول ريسازيورين Resazurine	٠,١ ٪
٥ ـ محلول اختزال :	
هيدروكسيد صوديوم (١ ع)	٤ مل
كبريتيد صوديوم تساعي الماء	٦٢٥ مجم

٦ ـ نشا أذرة تجاري .

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

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

الأجهزة :

١ ـ أنابيب وخراطيم لجمع سائل الكرش ، شاش ، مصدر لغاز ثاني أوكسيد الكربون .

٢ ـ فرن كهربائي للتحضين مضبوط على ٣٩ ± ٠,٥°م مزود بمروحة ، ويتسع لبكرة بقطر ٥٠سم داخل الفرن الذي سعته في حدود ٢٤٠ لتراً .

٣ ـ بكرة الفرن من قرصين من الخزف أو الخشب قطر ٥٠سم وسمك ١,٥سم بينهما مسافة ١٢سم ، ومثقبان حوالي ٦٠ ثقباً سعة كل منها ٣,٨سم لحمل السرنجات .

٤ ـ موتور يحرك بكرة الفرن بمعدل ١–٢ لفة / دقيقة .

٥ ـ سرنجات زجاجية قطر كل منها من الخارج ٣,٦سم وطولها تقريباً ٢٠سم ذات حجم مدرج ١٠٠ مل ، تزود السرنجات بأطراف سيليكون وعلى هذه الخراطيم السيليكون كلبسات لحجز الغازات .

٦ ـ سرنجات أوتوماتيك ، ومقلب مغناطيسي ، وميزان .

خطوات التقدير :

١ ـ تطحن العينة لتمر من منخل سعة فتحاته ١ مم ، 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 تزاد العينة المأخوذة إلى ٥٠٠ مجم مادة جافة ، على ألا يزيد إنتاج الغاز عن ٩٠ مل .

٢ ـ 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 ـ يسحب سائل الكرش من الفتحة المستديمة المثبتة في كرش حيوان مجتر (بقرة ، عجل ، خراف) ، ويصفى خلال طبقتين من الشاش إلى دورق دافئ سعة ٢ لتر ملىء

بثاني 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 ٣٩م ويقلب مغناطيسيا . يسحب ٣٠ مل من مخلوط سائل الكرش وبيئة التحضين بواسطة المضخة الأوتوماتيك إلى كل سرنجة سبق تدفئتها على ٣٩م ، مع إزالة أي فقاعات غازية من السرنجة ، ويغلق الكلبس لسد الخرطوم السيليكون على طرف السرنجة ، ويقرأ الحجم المشغول من حيز السرنجة ويسجل ، ثم تحضن 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 ـ يجرى نفس الخطوات لعمل عينات خاوية من العينة للمقارنة (سائل كرش + بيئة تحضين بدون عينات) (Gb_o) ، وكذلك تحضن ٢٠٠ مجم عينة من مسحوق الدريس القياسي التي تعطي ٤٤,١٦ مل غاز / ٢٤ ساعة (Gb_H) ، وتحضن كذلك عينة من الدريس القياسي (١٤٠ مجم مادة جافة) ونشا ذرة (٦٠ مجم مادة جافة) والتي يجب أن تعطى معدل إنتاج غاز ٥٩,٨ مل / ٢٤ ساعة (Gb_{Hs}) وذلك للتصحيح لمختلف مواد العلف المدروسة ، أي أن معامل التصحيح للدريس (F_H) عبارة عن ٤٤,١٦ / $Gb_H - Gb_O$ ومعامل التصحيح للمركزات (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 المركزات عن ١,١ فينبغي زيادة المركزات و / أو مستوى التغذية .

٥ ـ حساب النتائج يتوقف على تصحيح لوزن العينة (Wt) المختلف عن ٢٠٠ مجم مادة جافة ولنشاط سائل الكرش . ويكون معدل إنتاج الغاز (Gb) عبارة عن إجمالي الزيادة في الحجم ($V_{24} - Vo$) مطروحاً منها إنتاج غاز المقارنة الخاوية (Gb_o) وتضرب في معامل تصحيح الوزن (٢٠٠ / الوزن) وفي متوسط معامل التصحيح F_H ، F_{Hs} .

$$Gb = (V_{24} - Vo - Gbo) \frac{200}{Wt} \cdot \frac{F_H + F_{HS}}{2}$$

$$= (V_{24} - Vo - Gbo) \frac{F_H + F_{HS}}{Wt} \cdot 100$$

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)

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

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

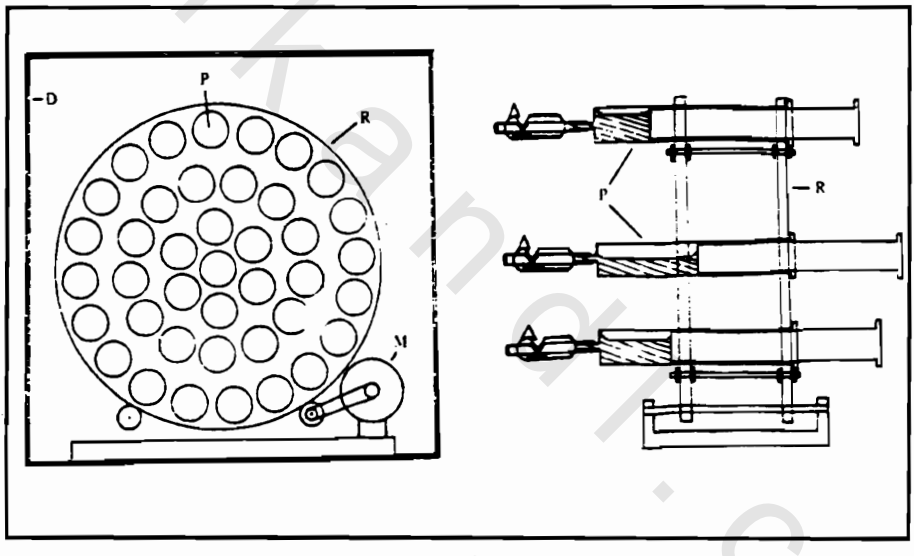
$$ME = 0.1456\ Gb + 0.0767\ \% \times P + 0.164\ \% \times L + 1.2$$

وبين هذه القيم المعملية (do ، DE ، ME) والنتائج البيولوجية على الأغنام في تجارب هضم عديدة بينها ارتباط شديد حوالي ٩٧ ٪ .

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)

قطـاع في حضـان السـرنجات المستخـدم في تقـدير معامـل الهـضم معمليًا بإنتـاج الغاز يوضح السـرنجات (P) في البكرة الدوارة (R) بالموتور (M) في فرن تجفيف (D) على ٣٩ ± ٠,٥ م .

ومن إنتـاج الغـاز يمكن الاسـتدلال على أزوت الأمونيـا المتحررة في الكرش الصناعي لوجود علاقة قوية بينهـما ، إذ تستغل الأمونيا جزئيًا في تخليق البروتين الميكروبي ، وإنتاج الغازات (ثاني أوكسيد 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 النيتروچين معملياً In Vitro - Degradable N (IVDN) من المعادلة :

النيتروچين المهضوم معمليا = (نيتروچين الأمونيا عند عدم توفر كربوهيدرات أي عند عدم تخليق بروتين ميكروبي . نيتروچين أمونيا المقارنة بدون عينة) / النيتروچين الكلي في العينة المحضنة .

علماً بأن التحضين معمليا يكون مع ٣٠ مل سائل كرش في سرنجات سعة ١٠٠ مل لمدة ٢٤ ساعة على ٣٩ ± ٠,٥م 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 الكيماوى ومعاملات الهضم ، أو التركيب الكيماوي والقيمة الغذائية دون إجراء دراسات مطولة لا على الحيوان ولا معمليا.

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 ـ استخدام أكياس من ألياف صناعية بولي استر Palyester ، 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 ـ العينة تكون جافة هوائيا مطحونة لتمر من ثقوب 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 يدويا 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 ـ تعتبر الماشية أفضل الحيوانات لتحضين الأكياس لاستيعابها كماً 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 المركزات المكعبة ٤٠/٦٠ (مادة جافة) . كما ينبغي أن يحتوي بروتين العلف المركز على مصادر نباتية وأخرى حيوانية (لا تزيدعن٥٪ كبروتين حيواني) ، وأن يحتوي ١٧,٥٪ بروتين خام ، ٥–٨٪ أليـاف ، ٤–٤,٥٪ زيت ، ٢٣–٢٨٪ نشـا . 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 / مركزات بنسبة ١/١ . وينبغي العلم بأن اختلاف نسبة الأعلاف الخشنة إلى المركزات يؤثر على نظام اختفاء النيتروجين من الأكياس الداكرون ، لذلك فأي تغييرات عن هذا النظام المقترح ينبغي ذكرها . وضع وإزالة الأكياس ينبغي أن يتم قبل التغذية .

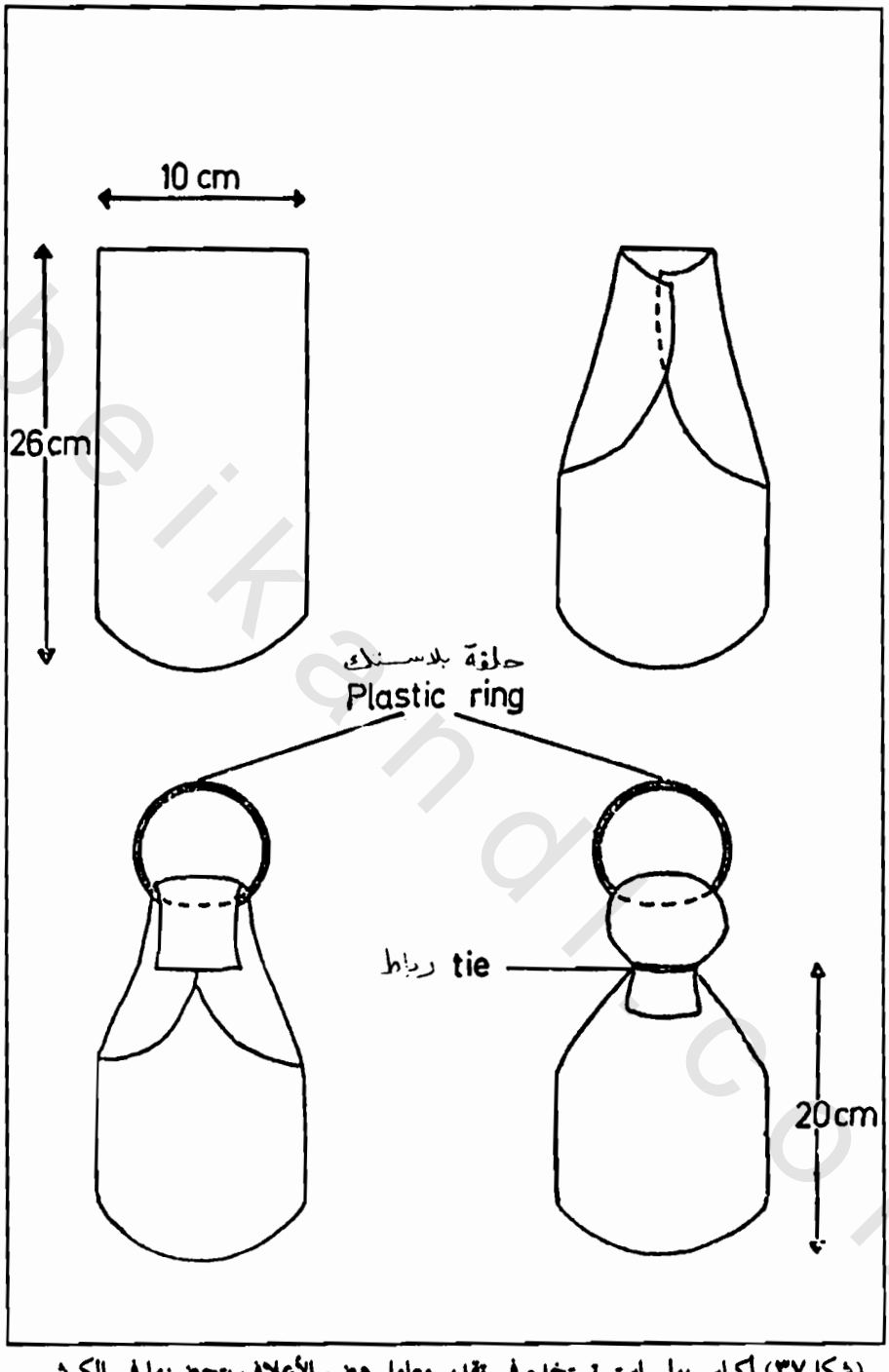
٤ ـ تحضن الأكياس في سائل الكرش بحيث يسمح بحرية حركتها (ما عدا الأكياس عند نقطة الصفر أو زمن الابتداء والتي تؤخذ وتغسل مباشرة دون تحضين) ، لمدد حتى ٧٢ ساعة للأعلاف الخشنة ، ٤٨ ساعة للمركزات ، أي أن فترات التحضين للمواد الخشنة تكون ٨ ، ١٢ ، ٢٤ ، ٤٨ ، ٧٢ ساعة ، بينما للمركزات ٢ ، ٦ ، ٨ ، ٢٤ ، ٤٨ ساعة . 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 ـ الأكياس عند زمن والابتداء والأكياس المستخرجة من الكرش بعد التحضين يتم غسيلها في ماكينة غسيل بماء بارد لمدة ٥٠ – ٦٠ دقيقة ، ثم تجفف في نفس الماكينة بلف حلتها ٥٠٠ – ٦٠٠ لفة / دقيقة .

إذا لم تتوفر ماكينة الغسيل ، فإنه يمكن غسيل 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 سيليكاچيل لحين وزنها . وبعد الوزن يجب طحن العينة حتى التجانس للتحليل للنيتروچين .

٦ ـ يعبر عن النتيجة كنسبة مئوية للنيتروچين المفقود من الكيس في زمن التحضين

٪ فقط للأزوت = $\left(1 - \frac{\text{النيتروچين المتبقي في الكيس}}{\text{النيتروچين الأصلي في الكيس قبل التحضين}}\right) \times ١٠٠$.



(شكل٣٧) أكياس بولي إستر تستخدم في تقدير معامل هضم الأعلاف بتحضينها في الكرش

obeikandl.com

هضم المادة الجافة في الكرش :

يقدر معدل اختفاء (هضم) المادة الجافة في الكرش باستخدام أكياس (١٩ × ٧سم) 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 ١٠٠م ، 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 ٣٥سم . تنقع الأكياس في ماء لمدة دقيقة قبل تعليقها في الكرش .

بعد انتهاء فترات التحضين تزال الأكياس من الكرش ، وتغسل تحت ماء صنبور جار حتى يزول لون ماء الغسيل ، ثم تجفف الأكياس حتى ثبات وزنها على ١٠٠م ، 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 Australia .
- Reab , L . (1979) Ubers. Tierernahrg .,7 : 162 .
- Reab, L . et al (1980) 31. Jahrestagung der Europaischen Vereinigung 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) Ubers Tierernahrg ., 14 : 251 .

obeikandl.com