2- تقدير معاملات الهضم بطرق مختبريه In Vitro Digestion.

2-1- استخدام ميكروفلورا الكرش فى تقييم مواد العلف (تقدير الهضم مختبرياً In Vitro Digestion أو الكرش الصناعى).

يحتوى الكرش والشبكية للحيوانات المجترة على العديد من البكتيريا والبروتوزوا التى يمكنها مهاجمة مكونات الغذاء المختلفة حيث يقوم بتحويلها إلى مواد يمكن للحيوان المجتر أن يستفيد منها فتحول السكريات والكربوهيدرات المعقدة (بدرجات مختلفة) إلى أحماض دهنية طيارة أهمها حامض الخليك (الاستيك) والبروبيونيك والبيوتريك وينتج عن هذا التحويل إنتاج غازي الميثان CH4 وثانى أكسيد الكربون Co2 . كما تقوم هذه الكائنات الحية الدقيقة بتكسير بروتينات الغذاء وكذلك المواد الآزوتية إلى أحماض أمينية ثم إلى أمونيا ثم تستخدم الأمونيا فى بناء البروتين مرة أخرى فى خلاياها. ثم تمر هذه الخلايا هذه الخلايا إلى المعدة الحقيقية حيث يتم هضم بروتينات خلاياها هضماً أنزيمياً ويستفيد منه الحيوان المجتر، مع ملاحظة أن جزء من بروتين الغذاء يهرب من الأحياء الدقيقة ويمر إلى المعدة الحقيقية حيث يتم هضمه عادياً (By pass protein).

ويمكن أيضاً للكائنات الدقيقة فى كرش الحيوان أن تقوم بتصنيع فيتامين (ب) من مواد الغذاء البسيطة حيث ينتفع الحيوان المجتر من هذه الفيتامينات ولذلك فإن علائق الحيوانات المجترة لا يضاف إليها هذه الفيتامينات حيث أن الكمية التى تصنعها الكائنات الدقيقة تكون كافية وزيادة عن حاجة الحيوان ويمكن القول بأن الفائدة الأساسية لودود مثل هذه الكائنات فى كرش وشبكية الحيوانات المجترة هو تفصيص وتكسير المواد الكربوهيدراتية المعقدة مثل السليلوز والهيموسليلوز التى لا يمكن للحيوانات هضمها (نظراً لخلو قناته الهضمية من مصدر لأنزيم السليوليز) حيث تحولها إلى صورة يمكن للحيوان الاستفادة منها وكلك يمكنها تحويل المواد الآزوتية غير البروتينية إلى بروتين حقيقى. .

وقد سبق شرح طريقة تقدير معاملات الهضم للمواد الغذائية على الحيوانات In vivo وتبين من هذه الطرق المختلفة أنه لتقدير القيمة الهضمية لكل مادة غائية فالأمر يحتاج إلى صناديق هضم وثلاثة حيوانات على الأقل والفترة اللازمة حوالي عشرون يوماً ما بين دور تمهيدي ودور رئيسي وما يتبع ذلك من كمية كبيرة من المادة الغائية المراد تقييمها.

فإذا ما استدعى الأمر المفاضلة بين العديد من مواد العلف المختلفة فإن لك سيحتاج إلى مجهود

وعمالة وتكاليف زائدة والأهم من لك هو عامل الوقت، فالقائم بالتغذية فى مثل هذه الحالة يجب أن يكون حكمه سريعاً حتى يتسنى له المفاضلة السريعة وينتهى عامل الوقت للحكم السريع لانتهاز شراء مادة العلف المناسبة بالسعر المناسب.

من أجل ذلك اتجه التفكير فى إيجاد طريقة سهلة وسريعة ودقيقة يمكن بها تقييم معامل الهضم فى المختبر هو إيجاد ظروف مطابقة لما يحدث على الغذاء داخل القناة الهضمية للحيوان والتى تتلخص فى الآتي:

1- التعرض للعاب. 2- التخمر فى الكرش. 3- الهضم الأنزيمي فى المعدة الحقيقية.

والجزء الغير ذائب بعد ذلك يعتبر غير مهضوم ويخرج مع الروث، فاللعاب يمكن تحضيره من مركبات كيماوية مشابهة لما تفرزه الغدد اللعابية للحيوانات والكائنات الدقيقة التى تعيش فى الكرش يمكن الحصول عليها من كروش الحيوانات بإحدى الطرق أما الهضم فى المعدة الحقيقية فيتم أساساً يفعل أنزيم الببسين الى يمكن تحضيره مختبرياً.

وتستخدم طريقة إجراء الهضم فى المعمل In vitro أساساً لتقدير معامل الهضم للمادة العضوية وكذلك مكونات الألياف الخام.

وتتلخص الطريقة فى تحضين المادة الغائية المراد قياس معامل هضمها مع اللعاب (كعامل منظم لدرجة الحموضة) وسائل الكرش لمدة 48 ساعة على درجة 39°م تحت ظروف لا هوائية مماثلة لظروف الكرش وذلك فى أنابيب اختبار كبيرة بالرغم من أن الغذاء لا يظل فى كرش الحيوان لهذه الفترة من الزمن إلا أنه وجد أن هذه الفترة هى اللازمة لإيجاد معامل هضم فى المعمل مماثل لما يحدث فى كرش الحيوان الحى نظراً لأنه فى أنبوبة الاختبار لا يتخلص من نواتج التفاعل كما هو الحال تحت ظروف الحيوان الحى حيث يتخلص منها عن طريق الامتصاص من نواتج التفاعل كما هو الحال تحت ظروف الحيوان الحى حيث يتخلص منها عن طريق الامتصاص خلال جدار الكرش. ولو أعقب ذلك معاملة المادة الغائية بالببسين لمدة 48 ساعة أيضاً (يحدث فى المعدة الحقيقية) فإن الجزء المتبقي بعد الهضم بالأنزيم يكون مساوياً لما يخرج فى الروث.

وبمعرفة كمية وتركيز المادة العضوية فى المادة المختبرة وكذلك كمية وتركيز المادة العضوية فى

الجزء المتبقى بعد الهضم البكتيرى والأنزيمى لأمكن حساب معامل الهضم للمادة العضوية وذلك فى حدود خمسة أيام فقط لأعداد كمية كبيرة من المواد الغذائية حيث أن كل مادة يمكن تقديرها فى 3 أنابيب اختبار.

وطريقة إجراء الهضم فى المختبركالآتى:

أولاً: المواد والمحاليل اللازمة:

1- سائل الكرش liquor Rumen : ويمكن الحصول عليه من حيوان له فتحه ثابتة بالكرش Cannula ويجب حفظ السائل على درجة حرارة 38-39°م ويرشح خلال طبقتين من الشاش الطبى قبل وضعه فى الترمس ويشبع بغاز ثانى أكسيد الكربونCo2 قبل الاستعمال، وينقل بسرعة للمعمل لإضافته على الدوارق (الكروش الصناعية).

2- لعاب صناعى Artificial saliva : 46.5 جم فوسفات صوديوم، 49 جم بيكربونات صوديوم، 2.14 جم كلوريد صوديوم، 2.85 جم كلوريد بوتاسيوم، 0.2 جم كلوريد كالسيوم، 0.6 جم كبريتات ماغنسيوم، تذاب الكميات السابقة فى ماء مقطر ويكمل الحجم إلى لتر وقبل الاستعمال يخفف المحلول إلى حجم 5 لتر ويشبع بغاز Co2.

3- مخلوط التحضين Incubation mixture : يضاف 51 سم لعاب صناعى على درجة حرارة 39°م مقدار 1250 سم3 سائل كرش وكذلك 125 سم3 محلول كبريتات أمونيوم عيارى ويجب مراعاة المحافظة على الحرارة فى حدود 39°م والتأكد من أن الظروف لا هوائية وذلك بإمرار غاز Co2 .

4- محلول حامض هيدروكلوريك Hcl : (يخفف 100 سم3 من حامض Hcl المركز بالماء المقطر).

5- محلول 2.4% ببسين Pepsin.

6- صوف زجاجى للترشيح أو بواتق خاصة للترشيح.

ثانياً: خطوات العمل:

1- تقدير المادة الجافة والمادة العضوية فى العينة المراد قياس معامل هضم مادتها العضوية.

2- يخصص 3 مكررات لكل مادة علف مختبرة.

3- يوضع فى أنبوبة اختبار أخرى 50 سم من مخلوط التحضين فقط وتستخدم كبلانك Blank .

4- يوزن 0.5 جم من المادة الغذائية فى أنبوبة اختبار كبيرة. أضف 50 سم من مخلوط التحضين ثم سخن الأنبوبة بمحتوياتها إلى 38-39°م ثم يدفع بها غاز Co2 برفق وتغطى بغطاء محكم. ثم توضع الأنبوبة فى حمام مائى أو حضانة على درجة 39°م فى ظلام مع الرج كل 6 ساعات حتى 48 ساعة، بعدها يقدر فى الكرش الصناعى الأحماض الدهنية (بالكروماتوجرافى الغازى) المخلقة من العينات المدروسة.

5- يراعى ضبط درجة الحموضة خلال هذه الفترة وإذا لزم الأمر بحيث تكون فى حدود 6.5-7 بواسطة المحلول المنظم (اللعاب الصناعى).

6- يضاف 4 سم من محلول حامض Hcl فى نهاية 48 ساعة لإيقاف فعل الأحياء الدقيقة وتضبط درجة الحموضة عند 1.2-1.5 بإضافة زيادة من الحامض إذا لزم الأمر. ثم يضاف 5 سم محلول ببسين، ويجعل الحجم النهائى لمحتويات الأنبوبة 80 سم وذلك بإضافة ماء مقطر وتخلط المحتويات جيداً وتترك فى الحضانة لمدة 48 ساعة أخرى، فإن المتبقى فى الكرش الصناعى (بترشيحه على شاش) يماثل الخارج فى روث الحيوان فتحليل العينة وتحليل ما تخلف فى الكرش بعد الهضم باللعاب وسائل الكرش والحامض والببسين يمكن حساب معامل الهضم معملياً In Vitro Digestibility.

7- تنقل محتويات الأنبوبة نقلا كمياً لبواتق الترشيح الخاصة وتغسل الراسب المتبقى فى البوتقة عدة مرات بالماء المقطر الساخن.

8- تجفف هذه البواتق بمحتوياتها على درجة حرارة 105°م لمدة 48 ساعة حتى يثبت الوزن (لتقدير المادة الجافة للراسب).

9- تحرق محتويات البواتق لتقدير الرماد وذلك فى أفران حريق على درجة 550°م لمدة 4 ساعات على الأقل (أو 600°م لمدة 3 ساعات).

10- تحسب النسبة المئوية لهضم المادة العضوية.

أ. حساب المادة العضوية من المادة المختبرة:

$$\% \text{ للمادة العضوية} = \frac{\text{وزن العينة المأخوذة} - \text{وزن الرماد}}{\text{وزن العينة}} \times 100$$

ب. حساب معامل هضم المادة الجافة والمادة العضوية:

- % معامل هضم المادة الجافة =

المادة الجافة للعينة – (المادة الجافة المتبقية – المادة الجافة للبلانك)

100 X ____

المادة الجافة للعينة

- مقدار المادة العضوية المحضنة = وزن العينة المستعملة × % للمادة العضوية.
- وزن المادة العضوية الغير مهضومة (للراسب) = وزن المادة الجافة للراسب – وزن رماد الراسب.
- الوزن الحقيقى للمادة العضوية الغير مهضومة = وزن المادة العضوية للراسب – وزن رماد البلانك.
- المادة العضوية المهضومة/100 جم مادة جافة = 100]المادة العضوية للعينة – (المادة العضوية المتبقية – المادة العضوية للبلانك)[/ المادة الجافة للعينة.
- % معامل هضم المادة العضوية = 100]المادة العضوية للعينة – (المادة العضوية المتبقية – المادة العضوية للبلانك)[/ المادة العضوية للعينة.

وزن المادة العضوية المحضنة – وزن المادة العضوية للراسب % لهضم المادة العضوية

100 x ____

وزن المادة العضوية المحضنة