|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| Ankom Technology Метод 3 |  | 08-05 |
| **Определение истинной переваримости (IVTD)****с использованием инкубатора DaisyII**(для D200 и D200I) |
| **ОПРЕДЕЛЕНИЕ**Настоящий метод позволяет определять истинную переваримость в лабораторных условиях (**IVTD**) с использованием инкубатора DaisyII компании ANKOM Technology. |
| **ОБОРУДОВАНИЕ**1. Инкубатора DaisyII компании ANKOM Technology.
2. Фильтровальные пакетики, изготовленные из химически инертного и термоустойчивого фильтрующего материала (ANKOM F57).
3. Устройство запаивания пакетиков, способное надёжно запаивать фильтровальные пакетики (1915, ANKOM Technology).
4. Термос.
5. Анализатор клетчатки ANKOM A200/A220.

**РЕАКТИВЫ**1. Буферный раствор А:

|  |  |
| --- | --- |
| Реактив | грамм/литр |
| KH2PO4 | 10.0 |
| MgSO4\*7H20 | 0.5 |
| NaCl | 0.5 |
| CaCl2\*2H20 | 0.1 |
| Мочевина | 0.5 |

1. Буферный раствор В:

|  |  |
| --- | --- |
| Реактив | грамм/литр |
| Na2CO3 | 15.0 |
| Na2S \*9H20 | 1.0 |

1. Нейтрально – детергентный раствор.

**МЕТОДИКА РАБОТЫ**Подготовка фильтровальных пакетиков и образцовПредварительно промойте фильтровальные пакетики F57 в ацетоне в течение трех-пяти минут и полностью просушите их. Взвесьте каждый фильтровальный пакетик и запишите его вес (***W1***). Оттарируйте весы и взвесьте 0.25 грамм образца **непосредственно** в фильтровальном пакетике (***W2***).*Замечание:* При анализе продолжительностью 48 часов допустим размер образца 0.5 грамм.Запаяйте пакетик с образцом при помощи устройства запаивания пакетиков так, чтобы шов располагался примерно в 4 мм от края, и поместите его в сосуд инкубатора (до 25 образцов на сосуд). Образцы должны быть равномерно распределены по обеим сторонам перегородки сосуда. Предусмотрите, по крайней мере, один пустой пакетик без образца для расчета корректирующего фактора (***C1***).Приготовление комбинированного буферного раствора (для каждого сосуда)1. Предварительно нагрейте оба буферных раствора (А и В) до 39°C. В отдельной емкости добавьте примерно 266 мл раствора В к 1330 мл раствора А (соотношение 1:5). Точного соотношения растворов добиваются проверкой кислотности, которая должна быть равна 6.8pH при температуре 39°C. В дальнейшей проверке pH нет необходимости. Добавьте 1600 мл раствора в каждый сосуд для определения переваримости.
2. Поместите сосуды для определения переваримости в инкубатор и включите переключатели нагрева и вращения. Для выравнивания температуры в сосудах подождите 20-30 минут.

Приготовление инокулята и инкубация*Поддерживайте температуру в сосудах равной 39°C.*1. Подготовьте два двухлитровых термоса с водой, нагретой до 39°C. Опорожните термосы непосредственно перед сбором инокулята. Поместите два литра инокулята в термосы. Добавьте примерно две «горсти» кормовой массы из рубца в один из термосов.
2. Предварительно нагрейте блендер, наполнив его водой, нагретой до 39°C. Слейте воду непосредственно перед заполнением его инокулятом из термоса. Продуйте контейнер блендера углекислым газом (CO2) и перемешивайте на высокой скорости в течение 30 минут. Процесс перемешивания с использованием блендера необходим для перемешивания микроорганизмов, находящихся в кормовой массе рубца, для получения представительной микробиологической популяции для ферментации в лаборатории. Профильтруйте полученную массу через 4 слоя марли в пятилитровую колбу, предварительно нагретую до 39°C. Профильтруйте оставшуюся жидкость из рубца из другого термоса через 4 слоя марли в ту же самую пятилитровую колбу. *Замечание:* Для облегчения фильтрования по краям марли должно быть больше. Необходимо периодически продувать колбу углекислым газом и продолжать эту процедуру при переносе инокулята.
3. Выньте один сосуд из инкубатора и добавьте 400 мл инокулята к буферному раствору и образцам. Продуйте сосуд углекислым газом в течение 30 секунд и закройте крышку.
4. Повторите эту процедуру для остальных сосудов. *Замечание:* Углекислый газ на должен пробулькиваться через раствор инокулята, углекислота должна образовывать газовую прослойку над содержимым сосуда.
5. Инкубируйте в течение 48 часов. Инкубатор будет поддерживать температуру 39.5±5oC. Если температура сосудов отличается более чем на один градус, переместите инкубатор в более теплое место или накройте инкубатор теплоизоляционным материалом.
6. После завершения процесса инкубации выньте сосуды и слейте жидкость. Промойте пакетики холодной водопроводной водой до тех пор, пока вода не станет чистой. Старайтесь не трясти пакетики.
7. При определении истинной переваримости необходимо удалить микробиологические остатки и любые оставшиеся растворимые фракции при помощи нейтрально – детергентного раствора. После промывки образцов водой поместите их в анализатор клетчатки ANKOM A200 и следуйте процедуре по определению нейтрально-детергентной клетчатки. После этого запишите вес каждого образца (***W3***). *Замечание:* До выполнения процедуры на приборе ANKOM A200, образцы можно хранить холодильнике или морозилке.

**РАСЧЁТЫ**$$IVTD (реальная влажность) =\frac{100-(W\_{3}-(W\_{1}∙C\_{1}))}{W\_{2}}∙100, \%$$где: ***W1*** *вес пакетика,****W2*** *вес образца,****W3*** *вес образца вместе с пакетиком после инкубации и экстракции,****C1*** *корректирующий фактор (вес пакетика после окончательной сушки, делённый на первоначальную массу пакетика).***Приложение****Процедура определения переваримости** |