

**השפעת תוסף מיקרואורגניזמים הטרופרמנטטיבים ואוריאה על
הכנת, ערך תזונתי, יציבות ונעכלות תחמיצים מירק חיטה ותירס**

עבודת-גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית

האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר

'מוסמך למדעי החקלאות'

ע"י

עירא פלך

עבודה זו נעשתה בהדרכת:

פרופ' סמיר מבג'יש

המחלקה למדעי בעלי חיים

"הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית בירושלים."

תודות

ברצוני להודות לפרופ' סמיר מבג'יש ולמר שי גור-אריה על ההנחיה, הליווי והאמונה.

לחברי המעבדה: קריס, לליב, ג'ני, ערין, פליסטה, כליל, פיליפ וגודסטיים על העזרה.

לחברת אי.אם.זו ישראל על המימון החלקי.

למשפחה והחברים, על התמיכה והעידוד לאורך הדרך.

תוכן עניינים

1.....רשימת קיצורים

2.....תקציר

4.....מבוא

4.....1. רקע מדעי

4.....1.1 מזונות גסים והזנת מעלי גירה

4.....1.2 הכנת תחמיצים

7.....1.2.1 תסיסה מיקרוביאלית ותוצריה

8.....1.2.2 יתרונות השימוש בתחמיצים

9.....1.2.3 חסרונות השימוש בתחמיצים

9.....1.3 תוספי החמצה

11.....1.3.1 EM-ZOO – Effective Microorganisms

12.....1.3.2 שתן (Urea)

12.....2. מטרת המחקר

12.....3. השערת המחקר

13.....שיטות וחומרים

13.....1. מהלך הניסוי

13.....1.1 עיקור צנצנות

13.....1.2 שקיות וואקום

14.....1.3 טיפולי הניסוי

14.....1.4 פתיחת דוגמאות

16.....2. אנליזות כימיות

16.....2.1 חומר יבש, חומר אורגני ואפר

16.....2.2 תכולת פחמימות דופן תא

16.....2.2.1 תכולת (Neutral Detergent Fiber) NDF

17.....2.2.2 תכולת (Acid Detergent Fiber) ADF

17.....2.3 תכולת חלבון כללי

17.....2.4 חומצה לקטית

18.....2.5 חומצות שומן נדיפות (חש"ן) - Volatile Fatty Acids (VFA)

18.....3. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר

19.....4. חיזוי נעילות מזון בעזרת ניסוי כרס מלאכותית (כרמ"ל)

19.....	4.1 עיכול בקטריאלי
20.....	4.2 עיכול אנזימטי
21.....	4.3 נעכלות NDF בכרמ"ל
21.....	5. ניתוחים סטטיסטיים

22.....תוצאות- תחמיצי חיטה

22.....	1. אנליזות כימיות
22.....	1.1 חומר יבש, pH וחלבון כללי
23.....	1.2 ADF, NDF והמיצלולוז
24.....	1.3 חומצה לקטית
25.....	1.4 חומצות שומן נדיפות (VFA)
26.....	2. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר
28.....	3. חיזוי נעכלות מזון בכרס מלאכותית (כרמ"ל)

31.....תוצאות- תחמיצי תירס

31.....	1. אנליזות כימיות
31.....	1.1 חומר יבש, pH וחלבון כללי
32.....	1.2 ADF, NDF והמיצלולוז
33.....	1.3 חומצה לקטית
34.....	1.4 חומצות שומן נדיפות (VFA)
35.....	2. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר
36.....	3. חיזוי נעכלות תחמיץ בכרס מלאכותית (כרמ"ל)

39.....דיון ומסקנות

39.....	1. תחמיצי חיטה
42.....	2. תחמיצי תירס
45.....	3. סיכום

47.....רשימת ספרות

51.....SUMMARY

רשימת קיצורים

ח"י- חומר יבש

חש"ן- חומצות שומן נדיפות

כרמ"ל- כרס מלאכותית

מע"ג- מעלי גירה

מק"ל- מגה קלוריות

ADF- Acid Detergent Fiber

CFU- Colony Forming Unit

DM- Dry Matter

EM- Effective Microorganisms

NDF- Neutral Detergent Fiber

NE_L- Net Energy of Lactation

NPN- Non Protein Nitrogen

peNDF- Physical Effective Neutral Detergent Fiber

TDN- Total Digestible Nutrients

VFA- Volatile Fatty Acid

תקציר

חיטה ותירס הם המזונות הגסים הנפוצים ביותר לשימוש בישראל, אקלים מתאים ועלות גידול יחסית נמוכה הם הגורמים לכך. קציר הגידולים הללו נעשה בעונה ספציפית בשנה אך השימוש בהם נעשה לכל אורכה. לצורך שימוש ארוך טווח במזון בעל ערך תזונתי זהה ככל האפשר לערכו בעת הקציר, יש לנקוט בשיטת שימור יעילה כדוגמת החמצה. בשיטה זו מאחסנים ומהדקים את הירק ליצירת תנאים אנאירוביים (חסרי חמצן). בתנאים אלו, משגשגות אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שינצלו פחמימות מסיסות לצורך תסיסה שתוצריה יאפשרו את שימור המזון לטווח ארוך בסביבה חומצית. לצורך הגברת יעילות החמצה, ניתן להוסיף תכשירים בעלי מאפיינים שונים בעת איסוף והידוק הירק. בישראל נעשה שימוש במזונות גסים במנת הזנה של מעלי גירה ומכאן החשיבות והאתגר של הכנת תחמיץ איכותי, בעל ערך תזונתי קבוע ועמידות חזקה בפני גורמים פתוגניים.

בעבודה זו, נבדקה השפעתם של תוספי החמצה EM-zoo ואוריאה על הכנה, ערך תזונתי, עמידות ונעילות תחמיצים מירק חיטה ותירס. תוסף EM-zoo, הנכלל בקבוצת ממריצי תסיסה, הינו תערובת מיקרואורגניזמים, בעיקר לקטובציליים הטרופרמנטטיבים שתוצר התסיסה העיקרי הוא חומצה לקטית שתגביר את החומציות. אוריאה (שתנן), נכללת בקבוצת הנוטריינטים ותפקידה להעשיר את הירק בחנקן זמין לחיידקים לסינתזת חלבון מיקרוביאלי ובכך להגביר את תכולת החלבון הכללי בתחמיץ.

ירק חיטה ותירס נאספו בעת הקציר וטופלו בארבעה טיפולים: (1) ביקורת (2) הוספת ליטר EM לטון חומר טרי (3) הוספת 4 ליטר אוריאה (21% חנקן) לטון חומר טרי (4) טיפול משולב של EM ואוריאה. הירק המטופל הוכנס לצנצנות/שקיות ואקום בנפח 1 ליטר ליצירת תנאים אנאירוביים והוחמץ למשך 14,7,1 ו-28 ימים. על התחמיצים המטופלים, בזמני ההדגרה השונים בוצעו אנליזות לבדיקת חומציות, הרכב כימי, תכולת חלבון, חומצה לקטית, חומצות שומן נדיפות, עמידות בחשיפה לאוויר ונעילות במבחנה.

ההשערה הייתה, שתוסף EM ישפר את תהליך החמצה, יגרום לירידה מהירה של ערך ה-pH בטווח הקצר והארוך ע"י ייצור מוגבר של חומצה לקטית, ישפר את עמידות התחמיץ בתנאים אירוביים. תוספת אוריאה תעשיר את הירק בחנקן זמין שיתבטא בעלייה משמעותית בתכולת החלבון הכללי אך יחד עם זאת תאט את הורדת ה-pH עקב יכולת התרסה של האוריאה עצמה. בנוסף, נצפה ששני התוספים, המגבירים תהליכי תסיסה כל אחד בדרכו יגרמו לירק פריק יותר שיתבטא בעלייה בנעילותו.

בתחמיצי החיטה ירידת ה-pH אכן הייתה מהירה יותר בתחמיץ שטופל ב-EM ותוצאות אלה נקשרות באופן ישיר על ייצור חומצות לקטית ואצטית שהן האחראיות העיקריות לעליית החומציות. לעומת זאת, בתירס, תחמיץ EM דווקא הראה את הירידה האיטית ביותר ב-pH אך בכל הטיפולים גם בחיטה וגם בתירס ערכי ה-pH הגיעו לטווחים של תחמיץ אופטימלי, מתחת לערך 4. טיפולי האוריאה, המעשירה את הירק בחנקן, אכן הראו עלייה בתכולת החלבון הכללי שהייתה בולטת הרבה יותר בתירס מאשר בחיטה, שכן, ע"פ מחקרים רבים העשרת תחמיצים באוריאה יעילה ומקובלת יותר כאשר מדובר בירק עתיר אנרגיה ודל בחנקן כדוגמת תירס.

חומצה לקטית, תוצר התסיסה הרצוי ביותר בבור התחמיץ, נראתה במגמת עלייה מתמדת לאורך כל ימי ההחמצה בטיפולי EM, שכן התכשיר מכיל חיידקי חומצת חלב המתסיסים סוכרים בעיקר לחומצה לקטית. ייצור מוגבר של חומצה לא רק השפיע על עליית החומציות אלא גם על עמידות התחמיץ בעת חשיפה לאוויר. תחמיצי התירס והחיטה שטופלו ב-EM הראו עמידות טובה יותר ביחס לטיפולים האחרים בעת החשיפה לאוויר. בתחמיץ החיטה ערכי ה-pH של טיפול זה לאחר 5 ימים בתנאים אירוביים נשארו בטווח אידיאלי.

במבחן הנעכלות במבחנה, תחמיץ חיטה שטופל ב-EM הצביע על יכולת נעכלות (TDN) גבוהה ביותר שמשמעותה תחמיץ בעל ערכים אנרגטיים גבוהים יותר. בתחמיצי התירס הטיפולים בהם הייתה נוכחות אוריאה הראו את שיעורי הנעכלות הגבוהים ביותר מה שמחזק גם כן את הטענה וההמלצה להעשיר תחמיצי תירס באוריאה.

לסיכום, שימור ירק מספוא כתחמיץ הינו בעל חשיבות עליונה בעת הזנה במנה עשירה במזונות גסים. תוספי החמצה יכולים לשמש כדרך התמודדות עם אתגר שחוזר על עצמו כל שנה כאשר המטרה העיקרית היא הכנת תחמיצים בעלי ערך תזונתי גבוה וקבוע לאורך זמן, והשימוש בסוגים השונים של תוספים אלו נעשה בכל רחבי ישראל. התוספים שנבדקו בעבודה זו הראו יתרונות בהתאם לירק שהוחמץ לעומת טיפול הביקורת. בתחמיצי החיטה, תכשיר EM גרם להגברת החומציות, תוצרי תסיסה רצויים, עלייה בתכולת החלבון הכללי, עמידות חזקה בעת חשיפת התחמיץ לאוויר ועלייה בנעכלות. בתחמיצי התירס בלטו שני הטיפולים בהם הייתה נוכחות אוריאה בתכולת החלבון הגבוהה ובנעכלות כלל החומר היבש. תוספים אלה בעלי יתרונות משמעותיים ויש לשקול בחיוב את השימוש בהם, כמובן תוך התחשבות בכדאיות הכלכלית.

מבוא

1. רקע מדעי

1.1 מזונות גסים והזנת מעלי גירה

מערכת העיכול של מעלי הגירה מוגדרת כמערכת עיכול רב-מדורית עקב הימצאות מספר חללים בין חלל הפה למעיין. הכרס (Rumen) הינה החלל הראשון שמקבל את המזון לאחר לעיסתו, קיצוץ ובליעתו על ידי הפה והיא המאפיין העיקרי של מעלי גירה. בכרס משגשגות אוכלוסיות חיידקים מגוונות, בעלות תפקידים שונים המאפשרות ניצול טוב יותר של אנרגיה ונוטריינטים האצורים בדופן התא הצמחי בניגוד לבעלי חיים חד קיבתיים כדוגמת האדם (Schoenian, 2005). מזונות גסים כדוגמת תירס וחיטה, מהווים רכיבים חשובים ביותר במנת הזנה של מעלי גירה, עקב היותם תורמי סיב פיסיקלי אפקטיבי (peNDF) שיגרום לתנועתיות ופעילות תקינות בכרס, גירוי לעיסה וקיצוץ המזון ויביא להפרשת רוק שימש ככופר לחומצות הנוצרות בכרס כתוצאה מתהליך התסיסה כדי למנוע חמצת (אצידוזיס) (Beauchemin et al., 2005). מכיוון שכרס מעלי הגירה מאפשרת פירוק יעיל יותר של מזון סיבי בתהליכי תסיסה מיקרוביאליים, פעילותה התקינה מקבלת חשיבות גדולה יותר וכך גם מזונות גסים (Schoenian, 2005). בישראל, גידול מזונות גסים וקצירתם מתבצעים בעונה ספציפית לגידול אך השימוש בהם בעת הרכבת מנות הזנה נעשה לאורך כל השנה. לכן, יש לשמור על ערכם התזונתי, שיהיה דומה ככל האפשר לזה המצוי בירק בעת הקציר, ולצורך כך נהוגות מספר שיטות כאשר בחירת השיטה המתאימה תלויה בין היתר ביכולת השימור של המזון, דרישות בעל החיים, עלויות וגורמי מזג אוויר.

1.2 הכנת תחמיצים

אחת משיטות השימור המוכרות, המוצלחות ובעלת איבוד ערך מזוני מינימלי, היא שיטת ההחמצה (Weinberg & Muck, 1996). שיטה זו תלויה במספר גורמים, כאשר הראשונים החשובים לתחילת התהליך הם שלב הבגרות המינית של הצמח הנקצר, סוג המבנה בוא יאוחסן הירק וסוג התסיסה שתפתח בעקבות התנאים שיהיו באחסון, כאשר התסיסה הרצויה הינה של חיידקים המייצרים חומצה לקטית ואצטית שייגרמו לירידת ה-pH (Schroeder, 2004). ככל שחומצות אלה ייווצרו בזמן קצר יותר, הפסדי הנוטריינטים יהיו קטנים יותר. יכולת ההובלה, תכולת החומר היבש, לחות, גודל חלקיק בעת חיתוך הצמח, רמות הסוכר שיהווה אנרגיה לתסיסה ותוספי החמצה הינם גורמים נוספים שישפיעו על איכות התהליך והתחמיץ כתוצאה סופית.

לאחר הקציר במועד הרצוי (גיל הצמח ותכולת המים שבו), הובלת הירק והידוקו בבור התחמיץ לאחסון, מתחיל תהליך החמצה המתרחש במספר שלבים (תרשים מס' 1) שתלויים אחד בהתרחשותו של השני (Schroeder, 2004; Elferink et al., 2000; Seglar, 2003):

שלב 1- השלב האירובי- מתרחש בשעות הראשונות של כיסוי הבור. עדיין יש חמצן בבור שהולך ויורד עקב המשך נשימה של חלקיקי הצמח. pH נורמלי בסביבות 6-6.5 (Elferink et al., 2000). מצד אחד שלב זה חשוב להורדת רמות החמצן בבור ויצירת תנאים אנאירוביים ומצד שני נשאף שיתרחש כמה שפחות זמן כיוון שעלולים להתפתח מיקרואורגניזמים אירוביים הצורכים את הסוכרים שבצמח וגורמים להפסד של נוטריינטים (Seglar, 2003). פירוק חלבונים לחומצות אמינו ואמוניה ע"י אנזימים מתרחש רק בשלב זה כי אותם אנזימים אינם פעילים בסביבה החומצית השוררת בשלבים מאוחרים יותר (Schroeder, 2004).

שלב 2- לאחר היעלמות החמצן מתחיל השלב האנאירובי בו מתחילים להתפתח חיידקים המתסיסים סוכרים פשוטים לחומצה אצטית. החומצה האצטית גם מסייעת בהורדת ה-pH בבור התחמיץ וגם מערכת העיכול של מעלי גירה יודעת להשתמש בה. כאשר ה-pH יורד מתחת ל-5 שגשגם של חיידקים אלה נעצר וכך גם ייצור החומצה האצטית. שלב זה נמשך בין 24 ל-72 שעות (Schroeder, 2004).

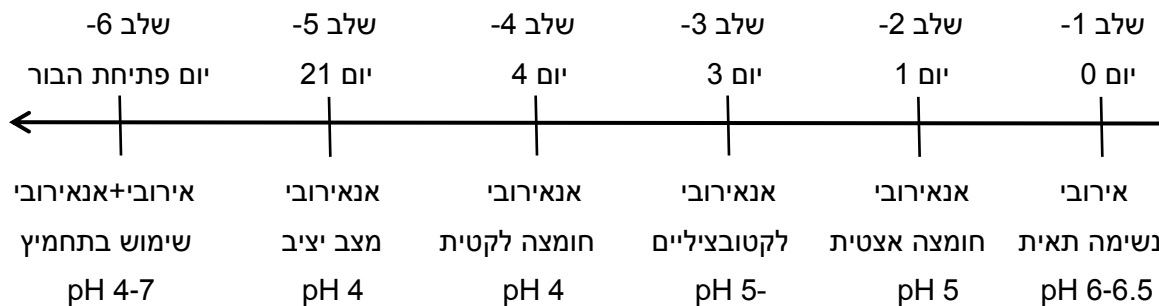
שלב 3- התפתחות חיידקים לקטובציליים יצרני חומצה לקטית בנוכחות החומציות העולה והתנאים האנאירוביים. נמשך כ-24 שעות (Schroeder, 2004; Seglar, 2003).

שלב 4- עלייה חדה במספר הלקטובציליים המתסיסים פחמימות ויוצרים חומצה לקטית. החומצה הלקטית היא תוצר התסיסה הרצוי ביותר ולצורך שימור יעיל רצוי שתכולתה תהיה לפחות 60% מסך החומצות הנוצרות בתסיסה (Schroeder, 2004). שלב זה הוא הארוך ביותר כיוון שמגיע לסיומו כאשר יש התייצבות של ה-pH ברמות מספיק נמוכות שיימנעו התפתחות חיידקים אחרים ויכול להימשך עד כשלושה שבועות מכיסוי בור התחמיץ (Schroeder, 2004).

שלב 5- שלב האחסון- מספר המיקרואורגניזמים יורד אך תוצרי התסיסה נשארים ושומרים על החומציות הקבועה. אין זה אומר שלא מתרחשים תהליכים כלל. ה-pH הסופי שיהיה בבור התחמיץ בשלב האחסון תלוי במצב הירק שנכנס לאחר הקציר. לדוגמא, ירק עם מעל ל-70% מים יכול לגרום לשגשוג חיידקים אנאירוביים שאינם רצויים כדוגמת קלוסטרדיה ואנטרו-בקטריה, שתסיסתם יוצרת חומצה בוטירית שאין ביכולתה להוריד את ה-pH ל-5 בעוד pH לשימור טוב נע סביב 4 בתירס ומעל 4 במעט בחיטה (Schroeder, 2004).

שלב 6- פתיחת הבור והתחלת השימוש בתחמיץ- שלב זה מתבצע במקומות בהם יש חשיפה נוספת לאוויר ואיכות התחמיץ מתחילה להיפגע עקב שגשוג שמרים ועובשים בתנאים האירוביים שנוצרו. אלו, גורמים לירידה בנוטריינטים ובטעימות התחמיץ עקב התססה אירובית של סוכרים בדומה למה שמתרחש בשלב 1. כמחצית מהפסדי החומר היבש בתחמיצים מתרחשת בשלב זה (Schroeder, 2004 & Seglar, 2003).

תרשים 1: תרשים זרימה של תהליך החמצת ירק בבור תחמיץ



שרשרת שלבים זו, היא שתביא להשגת המטרה בצורה המיטבית ביותר- שמירה על ערכו התזונתי של המזון הגס (לרוב מדובר על חיטה או תירס) לאורך זמן ושיישאר דומה לערכו של הירק בעת הקציר (Yitbarek et al., 2014). ניתן גם להתייחס לשלבים 2-4 כשלב אחד- שלב תסיסה אנאירובית.

סגירה ואיטום טובים של בור התחמיץ הם חשובים ביותר מכיוון שככל ששגשוג החיידקים שמייצרים חומצה אצטית ולקטית יתחיל מוקדם יותר, כך הפעילות האירובית של שלב 1 תסתים מוקדם יותר ובשלב האנאירובי לא יתפתחו חיידקים כדוגמת קלוסטרדיה ואנטרובקטריה שנותנים תוצרים שאינם רצויים (חומצה בוטירית) (Schroeder, Yitbarek et al., 2014; 2004). חשוב לציין שכל זמן שמתרחשת פעילות אירובית, בין אם בשלב 1 או 6, יהיו הפסדים בחומר היבש שמשמעותם ירידה בערך התזונתי מפני שתוצרי התסיסה האירובית הם מים (ירידה בחומר היבש), חום (ירידה בערך האנרגטי) ופחמן דו-חמצני. באזורים הנחשפים לאוויר יכולים להיות הפסדים של 1.5%-4.5% בחומר היבש (Elferink et al., 2000).

1.2.1 תסיסה מיקרוביאלית ותוצריה

בבור התחמיץ מתפתחות אוכלוסיות מיקרואורגניזמים רצויות ולא רצויות (Elferink et al., 2000). האוכלוסייה הרצויה ביותר היא של יצרני החומצה הלקטית. חומצה זו הינה הגורם העיקרי לירידת ערך ה-pH ועליית החומציות, המונעים התפתחות ושגשוג של מיקרואורגניזמים המשתייכים לאוכלוסיות שאינן רצויות. את החיידקים הלקטובציליים ניתן לחלק לשתי קבוצות עיקריות: הומופרמנטטיביים והטרופרמנטטיביים (Muck et al., 2018).

הומופרמנטטיביים- הקבוצה העיקרית שמתפתחת בבור התחמיץ בתנאים מתאימים. קבוצה זו יודעת להתסיס סוכר 6-פחמנים (הקסוזות) וליצור ממנו שתי מולוקולות לקטט (חומצה לקטית) שיהיו תוצר התסיסה העיקרי שלהן.

הטרופרמנטטיביים- מסוגלים להתסיס סוכר הקסוזות בדומה להומופרמנטטיביים אך גם יודעים לפרק הקסוז לפנטוז (סוכר 5- פחמנים) בעקבות נוכחות ופעילות אנזים פוספוקטולאז. מכאן, הפנטוז יותסס והתוצרים יהיו חומצה לקטית (3 פחמנים) וחומצה אצטית (2 פחמנים). חומצה אצטית, הינה חומצת שומן נדיפה (pKa=4.8) המסייעת לחומצה הלקטית (pKa=3.86) בהורדת ה-pH. מחקרים בנושא העידו שהחומצה האצטית גם מסייעת בעמידות התחמיץ בחשיפה לאוויר (Seglar, 2003).

אוכלוסיות מיקרואורגניזמים שאינן רצויות יכולות להתפתח בתנאים אירוביים ואנאירוביים. שמרים יכולים להתפתח בנוכחות שני התנאים- בתנאים אנאירוביים יתסיסו סוכרים לאתנול ופחמן דו-חמצני שיקטינו את כמות הסוכר הזמינה לחיידקים לקטובציליים, ובתנאים אירוביים יתסיסו חומצה לקטית למים ופחמן דו חמצני שיגרמו לעליית ה-pH (Elferink et al., 2000). עובשים יתפתחו באיזורים בהם יש נוכחות חמצן גדולה (צדי הבור, קיר הכרייה של הבור), עלולים לגרום לירידה בערך התזונתי ולהשפעות שליליות בעת הזנה בעקבות רעלנים המצויים בהם. בתנאים אנאירוביים יכולים להתפתח חיידקי אנטרו-בקטריה וקלוסטרידיה שיתחרו על הסוכרים הזמינים עם הלקטובציליים. בנוסף, לאנטרובקטריה יש פעילות פרוטאוליטית שתוריד את ערך החלבון בתחמיץ וקלוסטרידיה מייצרים חומצה בוטירית שמאטה את ירידת ה-pH לערך הרצוי וגורמת לטעם וריח שאינן נעימים (Elferink et al., 2000).

כאמור, תוצר התסיסה העיקרי בבור התחמיץ שמשפיע באופן מובהק על החומציות הנו החומצה הלקטית עקב ריכוזה הגבוה וערך ה-pKa הנמוך שלה (pKa=3.86) המעיד על חוזקה (Muck, 2010). בנוסף, נוצרות חומצות שומן נדיפות (VFA- Volatile Fatty Acid). בכרס מעלי הגירה חומצות אלה הן תוצר תסיסה שייספג דרך דפנות הכרס למחזור הדם ויהווה מקור אנרגיה

ראשוני לבעל החיים (Dijkstra et al., 1993). בתחמיצים הן גם תוצרי תסיסה אך המצב כאן שונה. מצד אחד, חומצות אלה מהוות הפסד אנרגטי מכיוון שכדי ליצור אותן החיידקים בבור משתמשים בסוכרים שבצמח, מפחיתים את תכולת האנרגיה בת-תסיסה של המזון ופוגעים בניצול החנקן ע"י חיידקי הכרס היות ויחס החנקן: אנרגיה זמינה בכרס תופס תפקיד מרכזי בסנתזת החלבון המיקרוביאלי (Charmley, 2001). תרומת חומצות שומן נדיפות להורדת חומציות התחמיץ דומה מבחינה כימית לתרומת החומצה הלקטית בגלל הדמיון בערך ה-pKa (אצטית = 4.76, פרופיונית = 4.87 ובוטירית=4.82) מצד אחד אך ריכוזם בתחמיצים נמוכים יחסית, מאידך. מצד שני לכל חומצה יש מאפיין ייחודי אורגנולפטי, חיובי או שלילי בתחמיצים. חומצה אצטית מסייעת בעמידות בחשיפה לאוויר, חומצה פרופיונית תורמת לטעם וריח התחמיץ וחומצה בוטירית משמעותה ריחות רעים שעלולים להעיד על פעילות של מיקרואורגניזמים שאינם רצויים בבור התחמיץ (Seglar, 2003).

1.2.2 יתרונות השימוש בתחמיצים

- מניעת הפסד של נוטריינטים- תוצרי התסיסה שמתקבלים שומרים על ערך תזונתי קבוע של הירק המוחמץ כך שיישאר דומה לערכו בעת הכנסתו לבור. אלה, מפחיתים הפסד של חלבונים, חומצות אמינו, ויטמינים וחומר יבש כללי.
- הזנה קבועה לאורך כל עונות השנה- שינויים תכופים במנת הזנה של פרות חלב עלולים לגרום להפרעות מטבוליות וייצור חלב שאינו תקין. הזנה בתחמיץ בעל ערך תזונתי קבוע, המתאפשר לאורך כל השנה מקטין משמעותית את השינויים במנה (Allen & Fitch, 1942).
- קציר ירק עשיר בנוטריינטים- ירק שנקצר לתחמיץ בשלב מוקדם מכיל אחוז גבוה של מים. כך יש מניעה של נפילת עלים בהם מצויים נוטריינטים רבים (Allen & Fitch, 1942), ובנוסף מזג האוויר פחות פוגע בקציר (Newman & Adesogan, 2014).
- צריכת מזון- החומצות הנוצרות בבור התחמיץ מעניקות לירק טעם וריח שמעודד צריכת מזון. פרות חלב נמצאות תחת עומס מטבולי תמידי ומכאן שעלייה בצריכת האנרגיה מהמזון היא דבר הכרחי (Chedly & Lee, 2000).
- אחסון- ירק שנקצר לתחמיץ עובר קיצוץ לחלקיקים קטנים מאוד, דבר המאפשר אחסון כמות ירק גדולה על פני שטח קטן (Newman & Adesogan, 2014).
- מתאים למגוון רחב של תכניות הזנה לשלוחות השונות של גידול בעלי חיים (Newman & Adesoga, 2014).

1.2.3 חסרונות השימוש בתחמיצים

- סכנה להפסד נוטריינטים גדול יותר ביחס לשימור בשיטות אחרות- ירק שנקצר לשימור בהחמצה עשיר מאוד בנוטריינטים עקב היותו צעיר יחסית, לכן ישנה סכנה גדולה יותר לאיבוד של נוטריינטים זמינים למגוון מיקרואורגניזמים שאינם קשורים לתהליך ההחמצה האידיאלי אך עדיין יכולים להתפתח בבור (Fitch, 1942).
- הכנת תחמיצים כרוכה בכוח עבודה רב לצורך הפעלת מכונות קציר, הובלה והידוק, הגורמים לעליית במחיר התוצר הסופי (Rotz et al., 2003).
- בור התחמיץ מכיל בתוכו ירק מאזורים בעלי תנאי גידול שונים המהווים אתגר בשמירה על תנאי לחות דומים בכל הבור מפני שישינם הבדלים בתכולת החומר היבש.
- הטעם והריח שיש לתחמיץ לא תמיד מהווים יתרון בהגברת צריכת מזון ולעיתים הפרות נמנעות לאכול מזון בעל ריח שונה (Fitch, 1942).
- עקב קציר בשלב מוקדם עם תכולת מים גבוהה ירק לתחמיץ עלול להכיל פחות ויטמין D מירק שנקצר בשלב מאוחר (Bechtel et al., 1936).

1.3 תוספי החמצה

על מנת להגיע ליעדי השימור, במשך עשורים משתמשים בתוספים לתחמיצים שמטרתיהם להפחית הפסדי חומר יבש, לשפר את תהליך ההחמצה, להקטין פעילות אירובית שבה מתפתחים חיידקים, פטריות ועובשים הפוגעים באיכות בתחמיץ וצריכתו על ידי מעלי הגירה. למעשה מטרת התוספים היא להפוך את התחמיץ ליציב על ידי הורדת החומציות ומניעת הפסדים בנוטריינטים ואנרגיה (Yitbarak et al., 2014). בעזרת תוספים אלה מנסים תזונאים להביא לשיפור בצריכת וניצול המזון ע"י בעלי החיים ולהגדלת יצרנותם. נהוג לחלק את תוספי התחמיצים למספר קטגוריות בעלות תפקידים שונים (Muck et al., 2018; Yitbarek et al., 2014; Kaiser, 1999; Bolsen et al., 1996; Weinberg & Muck, 1996)

(1) ממרצי תסיסה- פחמימות מסיסות, אנזימים, חיידקים וכו'.... המטרה של קבוצה זו היא להגביר את הגורמים לתסיסה האנאירובית בבור שתוצאתה הרצויה היא חומצה לקטית. מולסת סוכר הינה תוצר של זיקוק סוכר לבן ומופיעה כסירופ סמיך ומרוכז, ומהווה הדרך המקובלת ביותר להוספת סוכרים מסיסים לתחמיצים ולמזונות של מעלי גירה. סוכרים אלה מהווים את חומר הגלם לתסיסה האנאירובית של חיידקי הבור. אנזימים, כדוגמת צלולאזות והמיצלולאזות יכולים לפרק פחמימות מבניות המצויות בדופן התא לפחמימות

פשוטות ומסיסות שימשו כחומר גלם לתסיסה. חשוב לציין שפעילות אופטימלית של אנזימים מתרחשת כאשר ה-pH מגיע ל-4.5, מה שקורה בשלבים מאוחרים יותר של התסיסה האנאירובית. מקובל להוסיף אנזימים יחד עם תרכובת חיידקים לקטובציליים לניצול מקסימלי של אותן פחמימות מסיסות שזה עתה התקבלו. הוספת תכשירים של לקטובציליים תגרום לכך שאוכלוסייה זו תהיה החזקה ביותר בבור התחמיץ מה שיאפשר לחומצה לקטית תוצר תסיסה עיקרי.

(2) מעכבי תסיסה- חומצות, חומצות אורגניות, כימיקלים נוספים. הוספתם לבור התחמיץ גורמת לירידה מהירה של ה-pH ועיכוב תסיסה של חיידקים שאינם רצויים אך שימוש בהם מסוכן לעור ולנשימה. שימוש בהם נעשה כאשר תכולת הפחמימות המסיסות נמוכה והירק אינו יבש מספיק. חומצה פורמית היא המוכרת ביותר לשימוש בקבוצה זו.

(3) מעכבי תהליכים אירוביים- חומצות שומן נדיפות, חנקן ממקור שאינו חלבוני (NPN). חומצות שומן נדיפות כגון אצטית ופרופיונית התגלו כמעכבות גדילה של שמרים ועובשים העלולים לבצע תסיסה אירובית של פחמימות מסיסות שיגרמו לקלקול התחמיץ. חנקן ממקור שאינו חלבוני, שניתן להוסיפו בצורת אוריאה (שתנן) או אמוניה, מתפקד כבופר, המאט את ירידת ה-pH במהלך התסיסה האנאירובית ובכך למעשה מאריך אותה, גורם לייצור ממושך יותר של חומצות לקטית ואצטית, שימנעו את אותה פעילות אירובית שאינה רצויה.

(4) נוטריינטים- גרעינים, אוריאה, אמוניה, מינרלים. מטרתם העיקרית היא לשפר את ערכו התזונתי של התחמיץ. הוספה של אוריאה ואמוניה משפרת את מאזן החנקן הכללי בתחמיץ, חנקן שיגביר את תכולת החלבון הכללי ויהיה זמין לבעל החיים. הוספה של גרעינים טחונים יכולה להעלות את תכולת האנרגיה המטבולית (-Metabolize Energy ME) בתחמיץ. תוספת של מינרלים גם כן מקובלת לצורך העשרת התחמיץ במינרלים אך חשוב לציין שמינרלים מתפקדים כגורם מתריס (בופר) ולכן חשוב להוסיפם כאשר התחמיץ עשיר בפחמימות מסיסות.

(5) סופגים- גרעינים, קש. כאשר ישנם מצבי קיצון והירק הנכנס לבור בעל תכולת חומר יבש נמוכה מ-25%, ניתן להוסיף חומרים שיספגו את המים הרבים הנפלטים מהצמח בעת ההידוק. קש או גרעינים טחונים הם דוגמא לכך.

תוספים שהם תרכובות של חיידקים בעלי יתרון על פני תוספים כימיקלים מכיוון שהם פשוטים לשימוש, לא מסוכנים לאדם, לסביבה ולבעל החיים, אינם גורמים נזק למיכון חקלאי ונחשבים

למוצר טבעי (Weinberg & Muck, 1996). בעבודה זו נבדקה השפעת התוספים EM-ZOO מקבוצת ממריצי התסיסה ואוריאה (שתנן) מקבוצת הנוטריינטים, על הכנת וערך תזונתי של תחמיצים מירק חיטה ותירס.

EM-ZOO – Effective Microorganisms 1.3.1

טכנולוגיית התססה (פרמנטציה) פשוטה לשימוש שהומצאה ביפן בשנות ה-80 ומיושמת בכל שלוחות גידולי השדה ובעלי חיים בחקלאות דרך המזון, המים, הרפד והסביבה. מדובר בתערובת של מיקרואורגניזמים מועילים במדיום חומצי שבודדו מן הטבע ללא הנדסה גנטית וכוללת מגוון אדיר של חיידקים, ביניהם חיידקי חומצה לקטית (לקטובציליים), שמרים וחיידקים פוטוסינתטיים המייצרים את מזונם בריאקציית האור (פוטוסינתזה) (Higa & Parr, 1994 & Higa, 2001). הטכנולוגיה פועלת ע"פ עיקרון הדחיקה התחרותית לחיזוק המערכת האקולוגית בה המיקרואורגניזמים מנצלים את תנאי הסביבה, יוצרים חומרים נוגדי חמצון (אנטי-אוקסידנטים) ופועלים ליצירת תנאי סביבה חזקים ועמידים בפני גורמים פתוגניים, מחלות ומזיקים הפועלים בתהליכי חמצון (Higa, 2001). כל זה קורה בשיתוף פעולה עם האורגניזמים הנמצאים בסביבה ופעילותם מתחזקת בנוכחות התערובת. הטכנולוגיה פותחה לראשונה לצורך יישום בקרקע דרך מערכות השקיה שביא לגידול מהיר יותר של הצמח, שיפור ביצרנותו שיתבטא ביבולים גבוהים יותר ושיפור עמידותו בפני גורמים מזיקים (Higa & Wididana, 1991). אלה, יתאפשרו בזכות הגברת מחזור הנוטריינטים בקרקע והעשרת האדמה בוויטמינים, הורמונים ואנזימים. חשוב לציין ששימוש נכון מבחינת כמות ומגוון של מיקרואורגניזמים בתערובת יביא לתוצאות מיטביות יותר. בתחמיצים, EM-ZOO הנכלל בקבוצת ממריצי התסיסה, מוסף כנוזל בעת הכנסת הירק לבור ע"פ מינון המומלץ ע"י היצרן. מגוון המיקרואורגניזמים שבתערובת יבצעו תסיסה אנאירובית שבסופה הציפייה לקבל:

- ערך pH נמוך יותר ועמידות חזקה יותר בחשיפה לאוויר עקב ייצור מוגבר של חומצות לקטית ואצטית ע"י לקטובציליים הטרופרמנטטיביים.
 - עלייה בתכולת חלבון כללי עקב ניצול טוב יותר של חנקן ממקור שאינו חלבוני בצמח ע"י שגשוג חיידקים.
 - עלייה בפריקות ונעכלות דופן תא בעקבות הימצאות אנזימים (צלולאזות, המיצולאזות).
 - איבוד נוטריינטים מינימלי שיכול להתבטא בתכולת חומר יבש דומה לירק המוצא.
- המשמעות היא תחמיץ יציב בעל עמידות לגורמים מזיקים, עמידות לפעולות חימצון ע"י ייצור חומרים נוגדי חמצון (אנטי-אוקסידנטים) ושמירה על טמפ' נמוכה (Yitbarek et al., 2014).

1.3.2 שתן (Urea)

שתן (אוריאה), בעלת נוסחא כימית $\text{CH}_4\text{N}_2\text{O}$, הינה מולקולה שלרוב מוכרת כמסונתזת בכבד ותפקידה להפריש עודפי חנקן מגוף בעלי החיים, כולל האדם, דרך השתן. עצם היותה עשירה בחנקן שאינו ממקור חלבוני מהווה אפשרות ליתרון בהזנת מע"ג כיוון שחנקן הינו אבן בניין עיקרית ליצירת חומצות אמינו וחלבון ע"י חיידקים במעלי גירה (Cherdthong & Wanapat, 2010). ניתן לספק בהימצאותה במזון כמו שהיא כדוגמת זבל עוף וניתן להוסיפה כמלח או נוזל למזונות כדי להגביר את ערך החלבון שלהם כדוגמת תחמיצים, וכך נכללת בקבוצת הנוטריינטיים ע"פ החלוקה לתוספים. הוספת אוריאה לתחמיצים מעשירה את הירק בחנקן זמין לחיידקים המעורבים בתהליך התסיסה האנאירובית ויהפכו אותה לחלבון זמין לבעל החיים. הירק המועשר בחנקן זמין מאפשר לחיידקים בבור לא לפרק את חלבוני הצמח, להעשיר את תחמיץ בחלבון אמתי וחנקן שאינו ממקור חלבוני שלא ינוצל על ידם יכול להיות זמין במידה מסוימת לחיידקי הכרס ליצירת חלבון מיקרוביאלי (Bentley et al., 1955). כדי שתוספת האוריאה לתחמיץ תהיה יעילה נהוג להוסיפה למספוא בעל ערך אנרגטי גבוה וחלבון יחסית נמוך כדוגמת ירק תירס, מכיוון שיחס האנרגיה: חנקן חשוב מאוד לייעול התהליך. אלמנט שנחשב לחיסרון בתוספת אוריאה לתחמיץ הוא שהאוריאה מעכבת את ירידת החומציות בתהליך ההחמצה שזהו העיקרון המנחה לשימור הערך המזוני (Demirel et al., 2003).

2. מטרת המחקר

בדיקת השפעת תוספות תכשיר החיידקים EM-zoo ואוריאה לירק התירס והחיטה בתהליך החמצה אנאירובי לצורך שימור המזון. מטרת משנה: (1) השפעת התוספים על ההרכב הכימי ותכולותיו של המזון. (2) בדיקת הערך התזונתי ונעכלותו של תחמיץ מטופל ולא מטופל במבחנה.

3. השערת המחקר

תירס וחיטה הינם גידולי המספוא הנפוצים ביותר בארץ לשימור כתחמיץ עקב תנאי אקלים מתאימים לגידול ויכולת התססה טובה. מכאן שישנו אתגר בשיפור התחמיץ ע"י תוספים כאלה ואחרים. אנו משערים שתכשיר החיידקים ישפר את תהליך ההחמצה שיבוא לידי ביטוי בירידה מהירה יותר של ערך ה-pH בטווח הקצר והארורן, שיפור עמידות בתנאים אירוביים ועלייה בייצור חומצה לקטית על חשבון חומצות אורגניות אחרות (חומצות שומן נדיפות). אנו מצפים לשיפור פרמטרים תזונתיים כגון חומר אורגני, סיב נעכל, ועלייה בנעכלות התחמיץ ואנרגיה מטבולית למעלי גירה. מתוספת האוריאה נצפה לעלייה בתכולת החלבון הכללי בתחמיץ עקב השימוש בה כסובסטר לחיידקים האנאירוביים וחסכון בניצול החלבון מהירק.

שיטות וחומרים

1. מהלך הניסוי

1.1 עיקור צנצנות



תמונה 1: צנצנת בנפח 1 ליטר
לפני עיקור

צנצנות זכוכית בנפח של 1 ליטר (תמונה 1) בעלות מכסה זכוכית עם גומייה עם מנגנון לסגירה הרמטית עוקרו בתנור בחום של 120 מעלות למשך 48 שעות. לפני הכנסת הצנצנות הוסרו כלל הגומיות שלא עומדות בחום העיקור. העיקור נועד לצורך השמדת החיידקים הנמצאים בצנצנות ואינם רצויים בתהליך ההחמצה. לאחר העיקור נאטמו הצנצנות ואוחסנו במקרר לשמירה על סטריליות עד מועד הכנסת הירק (לא יאוחר מ-5 ימים). צנצנות אלה עתידות לדמות את בור התחמיץ תוך השראת תנאים אנאירוביים ואליהן יוכנס הירק ויהודק לתהליך החמצה למשך פרקי זמן שונים ובנוכחות טיפולים שונים.

1.2 שקיות וואקום

לצורך יעול העבודה פותחה שיטה של החמצה בשקיות וואקום (תמונה 3 ו-4) בעזרת מכונת וואקום ייעודית (Kunba; model DZ-400/ZT, China) (תמונה 2). השקיות מיועדות לשמירת בשר בתנאי וואקום מוחלט לצורך שימור והקפאה עמוקה וסטריליות כך שלא היה צורך בעיקור מוקדם בדומה לצנצנות. יצירת תנאים אנאירוביים בצנצנות בנפח 1 ליטר כרוכה בעבודה קשה שנמשכת זמן רב שעלול לגרום להבדלים בחומר המוצא בין הטיפולים ובין החזרות עצמן בתוך הטיפולים. לעומתן, מכונת הוואקום מופעלת בפשטות ובקלות ויוצרת סביבה אטומה לאוויר ב-100% ומספר החזרות הרצוי לצורך הניסוי מתקבל תוך זמן קצר וחשוב מכך, הירק שנכנס לדוגמאות אחיד יותר.



תמונה 4: שקית ירק לאחר יציאה ממכונת הוואקום



תמונה 3: מכונת הוואקום בפעולה



תמונה 2: מכונת וואקום

1.3 טיפולי הניסוי

ירק חיטה ותירס נקצרו במועד הקציר לתחמיץ בהתאם לעונה- תירס שנקצר נאסף בסוף חודש אוגוסט 2017 בנהלל וחיטה שנקצרה ונאספה בתחילת חודש אפריל 2018 במשואות יצחק. כחלק מהקציר הירק מקוצץ בטרם הכנסתו לבור לגודל חלקיקים שנע בין 2-4 ס"מ. הירק טופל בארבעה טיפולים בטרם הכנסתו לצנצנות או לשקיות שנאטמו במכונת וואקום (ירק תירס הוכנס לצנצנות וירק החיטה נארז בשקיות):

טיפול 1- ביקורת- ירק חיטה או תירס הוכנס כמו שהוא לתהליך החמצה ללא כל תוסף.

טיפול 2- EM-ZOO- תוספת תכשיר חיידקים במינון של 1 ליטר ל-1 טון חומר טרי ע"פ הוראות יצרן.

טיפול 3- Urea- תוספת של 4 ליטר שתן נוזלי בריכוז 21% חנקן ל-1 טון חומר טרי.

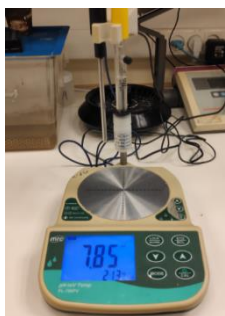
טיפול 4- טיפול משולב של שני התכשירים, EM-ZOO ו-Urea, באותם המינונים של הטיפולים הנ"ל.



תמונה 5: מערבול חשמלי

כל ירק מטופל עורבב בנפרד במערבל חשמלי (תמונה 5) לצורך פיזור הומוגני של התוספים במשך 10 דקות. טיפולי ירק התירס נארזו בצנצנות וטיפולי ירק החיטה בצנצנות ושקיות ואקום לצורך העמדת כיוול השיטה. הצנצנות והשקיות נשקלו בטרם הכנסת הירק ולאחר האריזה נרשמו משקלי הדוגמאות שהיו כ-1 ק"ג חומר טרי.

1.4 פתיחת דוגמאות



תמונה 6: pH מטר

במהלך כל יום בשבוע ההחמצה הראשון, ביום ה-14 וביום ה-28 נפתחו 2 שקיות מכל טיפול כאשר לכל אחת מהן 2 חזרות טכניות. במעמד הפתיחה נשקלה הדוגמא לשם השוואה למשקלה באריזה ונמדדו טמפ' התחמיץ ו-pH, מדדים שנותנים אינדיקציה לאיכות התחמיץ. ערך ה-pH נמדד בתהליך שכלל מיצוי של הירק בבלנדר ביתי (Vitamix VM0005, USA) אליו הוכנסו 100 גרם תחמיץ עם 400 גרם מים מזוקקים ומכשיר pH מטר (תמונה 6) שכולל מראש לצורך המדידה (GonDo;Taiwan). מיצוי הירק סונן, נאסף לאפנדורפים, הוקפא באופן מידי להמשך אנליזות. שארית התחמיץ הוכנסה לתנור בחום של 60 מעלות למשך 48 שעות לקביעת תכולת החומר היבש. זהו תהליך בו



תמונה 7: מטחנת
סכינים (Wiley;USA)

מוציאים את המים המצויים בצמח ומאפשרים לאמוד את כמות החומרים המוצקים אותם יכול בעל החיים לנצל לקיומו בעת ההאבסה. לאחר שקילת התחמיץ היבש הדוגמאות נאספו ונטחנו במטחנת סכינים (Wiley;USA) (תמונה 7) לגודל של 2 מ"מ. הדוגמאות הטחונות נשמרו בקופסאות פלסטיק עם מכסה מתברג (250 מ"ל) ייעודיות והוכנסו לקירור עד ביצוע אנליזות.

2. אנליזות כימיות

2.1 חומר יבש, חומר אורגני ואפר

דוגמאות תחמיץ שהוחמצו במשך 1,7,14 ו-28 ימים נלקחו (לאחר ייבוש ב-60 מעלות וטחינה), נשקלו לתוך כוריות חרס עמידות בחום, הושארו בתנור בחום של 105 מעלות למשך יממה ולאחר קירור בדיסיקטור נשקלו שוב. בדיקה זו מאפשרת לחשב את אחוז החומר היבש המוחלט של כל דוגמת מזון לאחר טיפול. תהליך הייבוש מחולק לשני שלבים מכיוון שייבוש ישיר ב-105 מעלות עלול להביא לרתיחה של המים הנמצאים בתוך הדוגמא ולשינויי המרכיבים שבתוכה. לכן, בשלב הראשון מייבשים את מרבית המים ב-60 מעלות ובשלב השני, שמטרתו לייבש את המים ההיגרוסקופיים שבדוגמת המזון. בצורה זו, ניתן לחשב את אחוז החומר היבש המוחלט של כל דוגמת תחמיץ שעל פיו יבוצעו החישובים באנליזות השונות מכיוון שבאנליזות אלה את כל התוצאות נהוג להציג על בסיס אחוז החומר היבש. בשלב הבא הוכנסו אותן הדוגמאות ששימשו לקביעת אחוז החומר היבש לשריפה בתנור בחום של 600 מעלות למשך 3 שעות ולאחר קירור בדיסיקטור לטמפ' חדר נשקלו שוב. בשלב זה ניתן לקבוע את תכולת החומר האורגני ותכולת האפר בתחמיץ. חומר אורגני חושב בהתאם לתכולת חומר יבש פחות תכולת אפר בדוגמא.

2.2 תכולת פחמימות דופן תא

באנליזה זו נשקלה כחצי גרם דוגמא מכל טיפול ומכל תקופת החמצה לתוך שקית פילטר יעודית (Ankom fiber filter bags; F57,USA). השקית עוברת הרתחה בשני שלבים שונים כאשר בכל אחד דטרנט אחר על מנת למצות כל פעם רכיב אחר של פחמימות הרקמה הצמחית. חישובי הרכיבים נעשים באחוזים מכיוון שהם מתבססים על משקל המקטע היחסי מתוך הדוגמא בחומר יבש. אנליזה זו מבוצעת בהתאם לפרוטוקול (Van Soest et al. (1991) תוך שימוש במכשיר Ankom Fiber Analyser II בהתאם לפרוטוקול החברה.

2.2.1 תכולת NDF (Neutral Detergent Fiber)

בשלב הראשון, השקיות הורתחו למשך שעה במכשיר Ankom ע"פ פרוטוקול החברה בדטרנט ניטרלי שהוכן במעבדה. לאחר תום התהליך נשטפו השקיות היטב, הוכנסו לתנור מסוחרר אוויר בחום של 105 מעלות למשך לילה ונשקלו למחרת לצורך חישוב אחוז מקטע ה-NDF בדוגמאות התחמיץ בטיפולים השונים. במהלך ההרצה הדטרנט גורם למיצוי של פחמימות מסיסות כולל פקטין, שמנים, מינרלים וחלבונים המצויים בתוכן התא. בכל ההרצות נוסף אלפא עמילאז עמיד בחום לדטרנט. כלל המרכיבים שהוזכרו נקראים (Neutral Detergent Soluble) NDS, ולאחר הסרתם נותרים בדוגמא סיבים הנקראים (Neutral Detergent Fiber) NDF ומייצגים למעשה את כל מרכיבי דופן התא- המיצלולוז, צלולוז, ליגנין ואפר.

2.2.2 תכולת ADF (Acid Detergent Fiber)

בשלב השני עוברות אותן דוגמאות בהן נעשה שימוש בשלב הראשון תהליך דומה אך בדטרגנט חומצי המכיל 5% חומצה סולפורית. השקיות מוכנסות למכשיר ה-Ankom למשך שעה לרתיחה בדטרגנט, נשטפות היטב, מוכנסות לתנור מסוחרר אוויר בחום של 105 מעלות ונשקלות. לאחר התהליך נותר בשקית מקטע ה-ADF (Acid Detergent Fiber) המורכב מסיבים שאינם מסיסים מדטרגנט חומצי וביניהם צלולוז, ליגנין ואפר. ההפרש בין משקל ה-NDF מהשלב הראשון למשקל ה-ADF מהשלב הנוכחי מייצג את תכולת ההמיצלולוז שמתמוסס בחומצה והינו מרכיב דופן התא הפריק ביותר. תכולה גבוהה יותר שלו נותנת אינדיקציה על פריקות דופן התא בדוגמא הנבדקת.

2.3 תכולת חלבון כללי

תכולת חלבון כללי במזונות נקבעת בהתאם לשיטת קלדהל במכשיר Kjeldahl Auto 1035. לפני הכנסת הדוגמא למכשיר נשקלו 0.3 גרם ובאמצעות חומצה סולפורית וקטליזטור בוצעה שריפה של כלל החומר האורגני ב-400 מעלות למשך שעה (או עד קבלת דוגמה צלולה). במהלך תהליך החימצון תרכובות אמיניות נהפכות לאמוניום סולפט בתמיסה. אמוניום סולפט, נדחה מתוך התמיסה באמצעות החדרת בסיס חזק NaOH ונקלט במכשיר להמשך טיטרציה וקביעת תכולת החנקן. המכשיר מבצע את תהליך הטיטרציה באופן אוטומטי על ידי חומצת מלח שריכוזה ידוע מראש. כמות החנקן בדוגמה מוכפלת בפקטור 6.25 על מנת להפוכה לכמות חלבון כללי בדוגמה. תכולת החלבון מבוטאת על בסיס חומר יבש של הדוגמא.

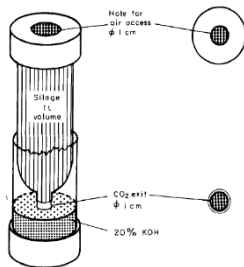
2.4 חומצה לקטית

בתחמיצים, חומצה לקטית היא אחד הגורמים המרכזיים לירידת רמות ה-pH ועליית החומציות, המתרחשים בעקבות שגשוג אוכלוסיות חיידקים לקטובציליים יצרני חומצה לקטית המתפתחים בנוכחות התנאים האנאירוביים בבור. חומציות זו היא שתאפשר שימור המזון לזמן ממושך תוך שמירה על ערך מזוני קרוב ככל האפשר לזה המצוי בירק בעת הקציר. אנליזה לבדיקת תכולת החומצה הלקטית בתחמיצים בוצעה ע"פ פרוטוקול של (Barker and Summerson 1941), על דוגמאות מיצוי התחמיץ שהוקפאו בימי פתיחת השקיות/צנצנות. באנליזה זו נעשה שימוש במכשיר ELISA plate Spectrophotometer, תוך יצירת עקומת כיוול עם ריכוזי חומצה לקטית ידועים מראש. חישובי הריכוזים בוצעו בעזרת משוואת עקומת הכיוול.

2.5 חומצות שומן נדיפות (חש"ן) - Volatile Fatty Acids (VFA)

חומצות שומן נדיפות הינן תוצר תסיסה חיידיקי ובכרס מעלי גירה מהוות מקור אנרגיה ראשוני לבעל החיים. בתחמיצים, תוצרים אלה עלולים להוות הפסד אנרגטי לערך המזוני כיוון שהחיידיקים המשתתפים בתהליכי תסיסה משתמשים בפחמימות המסיסות המצויות בירק המוחמץ. באנליזה לקביעת תכולת והרכב חומצות השומן הנדיפות נעשה שימוש במכשיר GLC- Gas Liquid Chromatography ע"פ פרוטוקול המפורט ב- Shabi et al., (1998). דוגמאות מיצוי התחמיץ (0.4 מ"ל + 0.1 מ"ל 25% חומצה HPO₃ + 0.1 מ"ל חומצה איזוקפרואית) סורכזרו במהירות 3000xg במשך 15 דקות ולאחר מכן הוזרקו למכשיר (Model 5890; GLC) Hewlett (Packardm Avondale, PA) בקולונה דחוסה המכילה 0.3% Carbowax 20M עם 0.1 חומצה פוספורית (Supelco, Bellefonte, PA).

3. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר



איור 1: תרשים בקבוק תחמיץ מונח על צנצנת KOH

בבדיקה זו נמדדה יכולת ההתמודדות של התחמיצים, בטיפולים השונים, עם חשיפה לאוויר וסבירות להתפתחות פעילויות אירוביות. כאשר התחמיץ נחשף לחמצן מתפתחים פטריות ועובשים, המוגדרים כאורגניזמים אירוביים ועלולים לפגוע בערך התזונתי של התחמיץ ואף להביא לקלקולו. הבדיקה בוצעה ע"פ שיטה מאת Ashbell et al. (1991).



תמונה 8: בקבוקי תחמיץ מונחים על צנצנות KOH

שקיות תחמיץ נפתחו לאחר 14 ו-28 ימי החמצה, pH נמדד, כ-100 גרם דוגמא הוכנסה לבקבוק פלסטיק בנפח 1 ליטר בעל חור בתחתית וחור בפקק שהוכן מראש (תמונה 8+ איור 1). הבקבוקים הונחו הפוך (פקק למטה) על צנצנות בנפח 1 ליטר המכילות 100 מ"ל בסיס חזק KOH (ריכוז ידוע) ונכנסו לאינקובציה של 5 ימים ב-38 מעלות. תפקידו של הבסיס החזק הוא לקשור את הפחמן הדו-חמצני שנפלט מתכולת הבקבוק כתוצאה מפעילות אירובית ועקב היותו גז כבד הוא ירד למטה לתחתית הצנצנת. לאחר 5 ימי אינקובציה נלקחת תכולת ה-KOH וטוטר ע"י חומצת HCl (בריכוזים ידועים), ככל שנעשה שימוש גדול יותר בחומצה לצורך הטיטור כך תכולת הפחמן דו-חמצני גדולה יותר והפעילות האירובית שהתרחשה בתחמיץ מוגברת יותר. תכולת התחמיץ שבבקבוק עברה מיצוי,

נמדד pH ונעשתה זריעה של המיצוי על צלחות פטרי עם מצע אגר שהוכן מראש. הצלחות הוכנסו ל-3 ימי אינקובציה ב-38 מעלות ומושבות עובשים ושמרים שצמחו נספרו בעזרת מכשיר ה-(MRC; China) Colony Counter.

חישוב כמות CO₂ בדוגמא:

- T- רמות HCl 1M במ"ל ששימש לטיטור מ- pH 8.1 ל- pH 3.6.
- V- נפח KOH במ"ל ששימש לקשירת CO₂ (100 מ"ל).
- A- כמות KOH במ"ל שנלקחה לצורך הטיטרציה (100 מ"ל).
- DM- אחוז חומר יבש בדוגמא הנבדקת.

$$Y = \frac{\text{פליטת CO}_2 \text{ בגרם}}{\text{DM של החומר הנבדק (ק"ג)}} = \frac{4.4 * T * V}{A * DM} = \frac{440 * T}{DM}$$

מושבות בצלחות:

$$X = \frac{\text{Colonies} * \text{Dilution}}{\text{DM \%}} \xrightarrow{\log} \text{CFU}$$

CFU – Colony Forming Unit

4. חיזוי נעילות מזון בעזרת ניסוי כרס מלאכותית (כרמ"ל)

ניסוי התבצע ע"פ שיטת (1963) Tilley & Terry. דוגמאות במשקל 0.25 גרם חומר יבש נלקחו מהתחמיצים של 4 הטיפולים ו-4 ימי הדגימה והוכנסו למבחנות פלסטיק בנפח 50 מ"ל ב- 4 חזרות. לכל שילוב של טיפול וימי החמצה היו 2 חזרות כשלכל אחת מהן 4 חזרות טכניות. הניסוי התבצע ב- 2 שלבים, המייצגים את שני שלבי העיכול העיקריים במערכת הקיבות של מעלי גירה, עיכול בקטריאלי ועיכול אנזימטי. עיכול בקטריאלי מתקיים בכרס מעלי הגירה ומיוצג בניסוי ע"י הדגרת הדגימה עם מיץ כרס ובופר רוק. עיכול אנזימטי מתקיים בקיבת המיצים במעלי גירה ומיוצג בניסוי ע"י הדגרת הדגימה עם חומצה ופפסין.

4.1 עיכול בקטריאלי

לכל מבחנה עם דוגמת תחמיץ מוסיפים 20 מ"ל תערובת המכילה בופר רוק מלאכותי ומיץ כרס ביחס של 1:4 בהתאמה. מיץ כרס נלקח ממכון וולקני משתי פרות יבשות, בעלות התקן קנולה כרסית הניזונות משחת דגן בלבד ועברו צום של 36 שעות. מיץ הכרס עבר סינון דרך 4 שכבות

פד גאזה כדי להוציא שאריות מזון שהיו בכרס, והוכנס לתרמוס שחומם מראש כדי לשמור על החיידקים. חיידקים אלה, הנמצאים במיץ הכרס הם אלה שיבצעו את פירוק הדוגמאות במבחנות. תפקידו של הבופר הוא לדמות את הרוק המגיע לכרס מעלי גירה ולשמור על חומציות קבועה של הנוזל. התסיסה החיידקית עלולה להעלות את החומציות שיכולה לפגוע בחיידקים. המבחנות נסגרו באמצעות פקקי בונזן המאפשרים זרימה חד כיוונית של גז החוצה הנוצר מהתסיסה, והוכנסו לאינקובטור בטמפ' של 38 מעלות למשך 48 שעות. אחת ל-4-6 שעות עורבבו המבחנות כדי לאפשר גישה טובה יותר של החיידקים לחומצר הצמחי.

4.2 עיכול אנזימטי

לאחר יומיים של עיכול בקטריאלי, נוספה לכל מבחנה חומצת HCl בריכוז 6M, עד להגעה ל-pH של 1.3-1.5 (מדידה באמצעות pH-meter), ואבקת פפסין בריכוז סופי של 0.2%. למעשה הוספת חומרים אלה מדמה את מעבר המזון לקיבת המיצים (אבומאזום), שם הסביבה חומצית יותר ויש נוכחות של אנזימי עיכול. המבחנות נסגרו בפקקי פלסטיק, עורבבו והוכנסו חזרה לאינקובטור ל-48 שעות נוספות. חומציות הנוזל הורגת את אוכלוסיית חיידקי הכרס ולמעשה החומצה ואנזים הפפסין הם הגורמים להמשך פירוק המזון. שלב זה מדמה את העיכול המתבצע בקיבת המיצים- החומצה והאנזים שהוספו מייצגים את החומצה והאנזימים המופרשים בקיבת בעל החיים, הן מבחינת הסוג והן מבחינת הריכוז.

לאחר השלב השני, המבחנות סורכזו בצנטריפוגה, התצליל שהכיל מיץ כרס וחומצה נשאב, הוספו מים מזוקקים, המבחנות עורבבו בוורטקס, עברו סרכוז נוסף והתצליל נשאב בשנית. כלל המבחנות, המכילות בשלב זה את משקעי דוגמאות התחמיצים וחיידקי הכרס, הוכנסו לתנור מסוחרר בטמפ' של 105 מעלות למשך 24 שעות ולמחרת נשקלו.

4 מבחנות ריקות ו-4 מבחנות עם דוגמת שחת דגן עברו את אותו תהליך כמו מבחנות הניסוי. המבחנות הריקות (בלנק) מכילות בתום התהליך את משקעי מיץ הכרס והמשקל הממוצע של תכולת מבחנות אלה הוחסר מהמשקל שנותר מדוגמאות התחמיץ במבחנות הניסוי כיוון שחיידקי הכרס גם נחשבים לחומר נעכל. מבחנות השחת מייצגות ביקורת חיובית, זוהי דוגמא שמידת הנעכלות שלה ידועה וכך ניתן לבחון האם פעילות החיידקים הייתה תקינה והניסוי התבצע כראוי.

חישובים:

משקל דוגמא התחלתי בח"י- (משקל דוגמא סופי+משקל בלנק)= משקל החומר הנעכל
% נעכלות חומר יבש= משקל החומר שנעכל/משקל דוגמא התחלתי בח"י

אנרגיה נטו לחלב (NE_L) הינו מדד המבטא כמה אנרגיה (במק"ל) יש בק"ג אחד של מזון בחומר יבש. הנוסחא לחישוב ערך זה נלקחה מ- NRC (2001) תוך שימוש בנעכלות החומר היבש מהחישוב הקודם ($DM\% = TDN\%$).

$$NE_L \text{ (Mcal/kg DM)} = 0.0245 * TDN\% - 0.12$$

4.3 נעכלות NDF בכרמ"ל

לאחר תהליך הכרמ"ל ושקילת המבחנות, כל 4 החזרות מכל דוגמא נטחנו יחד במטחנת סכינים בנפה של 1 מ"מ, נשקלו לתוך שקיות Ankom, ונעשתה בדיקת תכולת NDF שנתרה בדוגמא בהתאם לפרוטוקול שתואר קודם לכן. חישוב נעכלות NDF בדוגמא בוצעה בהתאם לנוסחאות הבאות:

חישובים:

משקל NDF בגרמים ח"י בדוגמא – משקל NDF בגרמים ח"י נשאר לאחר אינקובציה = NDF גרמים נעכל

$$\text{נעכלות NDF ב- \%} = \text{NDF נעכל/ כמות NDF מקורית בדוגמא} \times 100$$

5. ניתוחים סטטיסטיים

תוצאות ניסוי ההחמצה נותחו באמצעות ניתוח שונות (ANOVA) בהתאם למבנה ניסוי פקטוריאלי עם השפעות עיקרית של הטיפול (ביקורת לעומת תוספים). כמו כן, הניתוח נעשה בהתאם ל-repeated measures כאשר הזמן שימש כמשתנה קבוע. כאשר הייתה השפעה מובהקת של גורם עיקרי או אינטראקציה ($P < 0.05$) הפרדת הממוצעים נעשתה באמצעות מבחן Student's *t*-test. הנתונים מוצגים כ-SEM ± LSMeans. הניתוחים הסטטיסטיים בוצעו באמצעות תכנית JMP pro - JMP pro (version 14.0.0 SAS Institute Inc., Cary, NC, 1998 - 2014).

תוצאות- תחמיצי חיטה

1. אנליזות כימיות

הניסוי הכיל 4 טיפולים (ביקורת, EM, Urea ו-EM+ Urea) שהוחמצו במשך 4 פרקי זמן נבחרים (1,7,14 ו-28 ימים) ובוצעו עליהם אנליזות כימיות, לבדיקת תכולת חומר יבש, חומר אורגני, פחמימות דופן התא, חלבון כללי, pH, חומצה לקטית, ופרופיל חומצות שומן נדיפות.

1.1 חומר יבש, pH וחלבון כללי

תכולת החומר היבש מייצגת את כלל רכיבי דוגמת המזון לאחר ייבוש המים, עליהם יכול בעל החיים לבצע תהליכי עיכול לטובת צריכת הנוטריינטים המצויים במזון. ערך ה-pH הינו מדד לחומציות התמיסה ונובע מכמות יוני ההידרוניום (H_3O^+). מדידת ה-pH בעת פתיחת הדוגמאות נותנת אינדיקציה ראשונית להתרחשות תהליכי החמצה ואיכותם. חלבון כללי נמדד באמצעות שיטת קלדהל והתוצאות מוצגות באחוזים על בסיס חומר יבש.

טבלה מס' 1: תכולת חומר יבש, pH וחלבון כללי בתחמיצי חיטה מטופלים									
		Treatments							
Days	ירק מוצא	Control	EM	Urea	EM+Urea	³Main Effect P<			
						SEM	Day	Trt	Day*Trt
¹DM %									
1	45.2	43.8 ^{ABCD}	45.0 ^{AB}	45.4 ^A	43.2 ^{CDEF}	0.25	0.0001	0.0001	0.0001
7		43.7 ^{BCDE}	43.4 ^{BCDEF}	44.4 ^{ABCD}	43.7 ^{BCDE}				
14		43.9 ^{ABCD}	43.0 ^{CDEF}	44.6 ^{ABC}	43.4 ^{BCDEF}				
28		41.9 ^F	42.2 ^{EF}	44.1 ^{ABCD}	42.7 ^{DEF}				
pH						SEM	Day	Trt	Day*Trt
1	6.4	6.64 ^B	6.52 ^B	6.99 ^A	6.97 ^A	0.03	0.0001	0.0001	0.0001
7		4.32 ^C	4.15 ^D	4.4 ^C	4.35 ^C				
14		3.96 ^{EF}	3.81 ^{GH}	4.01 ^E	4 ^E				
28		3.84 ^{FGH}	3.73 ^H	3.93 ^{EFG}	3.89 ^{EFG}				
²CP %						SEM	Day	Trt	Day*Trt
1	8.78	8.81 ^{DE}	8.81 ^{DE}	9.83 ^{AB}	9.89 ^A	0.34	0.0005	0.0001	0.07
7		8.53 ^E	8.93 ^{BCDE}	9.66 ^{ABCD}	9.69 ^{ABCD}				
14		8.72 ^{DE}	8.9 ^{CDE}	9.62 ^{ABCD}	9.47 ^{ABCD}				
28		9.17 ^{ABCDE}	10.04 ^A	9.77 ^{ABC}	9.95 ^A				

¹ תכולת חומר יבש (DM%), ² תכולת חלבון כללי (CP%), ³ השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם Day*Trt. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים בהשפעת האינטראקציה Day*Trt כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן של הממוצע

תכולת החומר היבש של ירק המוצא אינה אידיאלית להחמצה מסיבות שיפורטו בהמשך. יציבות בתכולת החומר היבש (DM %) ביחס לירק המוצא יכולה להעיד על אובדן קטן של נוטריינטים.

הערכים היציבים ביותר ביחס לירק המוצא נראים בטבלה מס' 1 בטיפול האוריאה (כ-45% חומר יבש). ערכי ה-pH הנמוכים ביותר לאורך כל ימי ההחמצה הם בטיפול ה-EM (3.81 ביום 14 ו-3.73 ביום 28), דבר העולה בקנה אחד עם אחת מהשערות המחקר שתכשיר החיידקים ישפיע על עליית החומציות בטווח הקצר והארוך. ערכי ה-pH בשני הטיפולים בהם הייתה נוכחות אוריאה נצפו הערכים הגבוהים ביותר בכל ימי הדיגום (כ-4 ביום 14 ו-3.9 ביום 28). במבט על חלבון כללי, המוצג על בסיס חומר יבש, ניתן לראות באופן ברור שכמעט לאורך כל ימי ההחמצה תוספת האוריאה מגבירה את תכולת החלבון (9.5%-9.8% בימים 1-14) אך ביום 28 משתנה המגמה ובתחמיץ שטופל ב-EM יש את תכולת החלבון הכללי הגבוה ביותר (10.04%).

1.2 ADF, NDF והמיצלולוז

NDF מייצג את כלל פחמימות דופן התא שאינם מסיסים בדטרגנט ניטרלי. ADF כולל בתוכו את מרכיבי דופן התא שאינם מסיסים בדטרגנט חומצי. המיצלולוז הינה הפחמימה המבנית הפריקה ביותר מקבוצת הפחמימות המבניות, מהווה את ההפרש בין NDF ל-ADF וככל שתפוס חלק גדול יותר מתכולת דופן התא הצמח פריק זמין יותר לעיכול ע"י בעל החיים.

טבלה מס' 2: תכולת ADF, NDF והמיצלולוז בתחמיצי חיטה מטופלים									
Days	ירק מוצא	Treatments				SEM	³ Main Effect P<		
		Control	EM	Urea	EM+Urea		Day	Trt	Day*Trt
¹NDF %									
1	57.2	57.3 ^{ABCD}	56.6 ^{BCD}	55.1 ^D	56.2 ^{CD}	1.2	0.0001	0.004	0.17
7		60.0 ^A	58.4 ^{ABC}	60.0 ^A	59.3 ^{ABC}				
14		60.2 ^A	58.8 ^{ABC}	58.9 ^{ABC}	59.7 ^{AB}				
28		59.9 ^A	59.0 ^{ABC}	57.2 ^{ABCD}	57.7 ^{ABCD}				
²ADF %									
1	29.5	29.4 ^{AB}	27.1 ^{BC}	26.6 ^C	27.3 ^{ABC}	0.96	0.001	0.003	0.06
7		29.5 ^{AB}	28.1 ^{ABC}	29.0 ^{ABC}	28.9 ^{ABC}				
14		29.1 ^{AB}	28.2 ^{ABC}	28.2 ^{ABC}	29.8 ^A				
28		28.6 ^{ABC}	29.0 ^{ABC}	27.8 ^{ABC}	28.9 ^{ABC}				
Hemicellulose %									
1	27.7	27.9 ^D	29.5 ^{ABCD}	28.5 ^{CD}	28.9 ^{BCD}	0.95	0.0001	0.16	0.03
7		30.6 ^{ABC}	30.2 ^{ABCD}	31.0 ^{AB}	30.4 ^{ABC}				
14		31.0 ^{AB}	30.7 ^{ABC}	30.7 ^{ABC}	29.9 ^{ABCD}				
28		31.5 ^A	30.0 ^{ABCD}	29.4 ^{ABCD}	28.8 ^{BCD}				
¹ NDF - Neutral Detergent Fiber, ² ADF - Acid Detergent Fiber, ³ השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן של הממוצע									

בטבלה מס' 2 מוצגות השפעות הטיפוליים השונים בזמני החמצה שונים על תכולת פחמימות דופן התא. במבט על תכולת NDF, ניתן לראות כי בטיפול הביקורת תכולתו היתה הגבוהה ביותר לאורך כל ימי החמצה תוך שמירה על ערכים קבועים החל מיום 7 (60.1%). בטיפול ה-EM ישנה עלייה בתכולת ה-NDF (מ-56.6% ל-59%) ובטיפול האוריאה ישנה עלייה חדה ואח"כ ירידה החל מיום 7 (55% ל-60% וירידה ל-57%). ישנו הבדל סטטיסטי מובהק במבט על ההבדלים בין הימים, בין הטיפולים אך לא כך הדבר כאשר נבדקת האינטראקציה ביניהם. חוסר המובהקות הינו תוצאה של חוסר אחידות בין השפעת הטיפול לזמן ההדגרה. תכולת ה-ADF לאחר יום 1 גבוהה יותר בטיפול הביקורת (29.4%) ביחס לשאר הטיפולים (כ-27%) ובהתאם לכך תכולת ההמיצלולוז נמוכה יותר בביקורת (27.9%). זאת מכיוון שתכולת ה-ADF וההמיצלולוז יחד מהוות את מרכיב ה-NDF. מכיוון שמדובר ביום 1 של החמצה ההבדלים פחות משמעותיים מבחינה ביולוגית כיוון שהשימוש בתחמיצים נעשה לאחר שבועיים לפחות מסגירת הבור. תכולת ההמיצלולוז בטיפול הביקורת נמצאת במגמת עלייה לאורך ימי החמצה (מ-27.9% ל-31.5%) ובטיפול ה-EM ניתן לראות יציבות בתכולתו לאורך הימים (30%).

1.3 חומצה לקטית

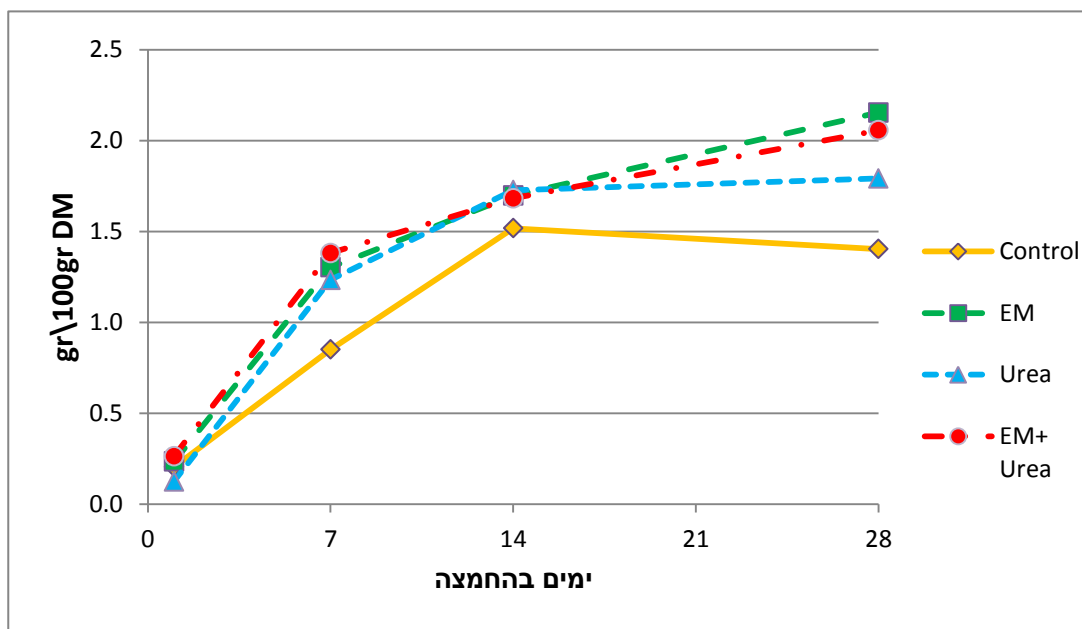
חומצה לקטית (חומצת חלב) נוצרת בעיקר ע"י חיידקים לקטובציליים (חיידקי חומצת חלב) כתוצאה מתסיסה אנאירובית של סוכרים ומהווה אחד הגורמים העיקריים לעליית החומציות (ירידת ה-pH). חומציות זו תשמור על תחמיץ יציב יותר מבחינת ערכים תזונתיים לאורך זמן.

בטבלה מס' 3 ובגרף מס' 1 ניתן לראות את מגמת העלייה המתמדת בתכולת החומצה הלקטית (גרם/100 גרם חומר יבש) בטיפולים בהם ישנה נוכחות EM ככל שמתקדמים בימי החמצה. בטיפול EM ישנה עלייה מ-0.23 ביום 1 ל-2.15 ביום 28 ובטיפול EM+Urea ישנה עלייה מ-0.26 ביום 1 ל-2.06 ביום 28. בטיפולים ללא EM ישנה עלייה עד יום 14 בהחמצה ואח"כ הגרף מתיישר בצורת פלטו-כ-1.5 בטיפול הביקורת וכ-1.7 בטיפול האוריאה (גרם/100 גרם חומר יבש). לאחר 28 ימי החמצה ניתן לראות הבדל סטטיסטי מובהק בין הטיפולים כאשר הטיפולים בהם ישנה נוכחות EM מראים תכולה של למעלה מ-2% חומצה לקטית על בסיס חומר יבש, ולעומת טיפול הביקורת מדובר על עלייה של כ-50%.

טבלה מס' 3: תכולת חומצה לקטית בתחמיצי חיטה מטופלים (גרם/100 גרם ח"י)

Days	Treatments				SEM	¹ Main Effect P<		
	Control	EM	Urea	EM+Urea		Day	Trt	Day*Trt
1	0.2 ^E	0.23 ^E	0.12 ^E	0.26 ^E	0.19	0.0001	0.006	² NS
7	0.85 ^{DE}	1.3 ^{BCD}	1.23 ^{CD}	1.38 ^{ABCD}				
14	1.52 ^{ABCD}	1.7 ^{ABC}	1.73 ^{ABC}	1.68 ^{ABC}				
28	1.4 ^{ABCD}	2.15 ^A	1.79 ^{ABC}	2.06 ^{AB}				

הנתונים בטבלה מוצגים בגרם/100 גרם חומר יבש. ¹ השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם ² Day*Trt. ללא מובהקות סטטיסטית- Non Significant. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים כאשר $P < 0.05$. SEM = סטיית תקן של הממוצע.



גרף מס' 1: תכולת חומצה לקטית בתחמיצי חיטה מטופלים לאורך ימי ההחמצה בגרם/100 גרם חומר יבש.

1.4 חומצות שומן נדיפות (VFA)

בדומה לכרס מעלי גירה, חומצות שומן נדיפות הן תוצר תסיסה חיידקי גם בבור התחמיץ בו הן נוצרות כתוצאה מתסיסה אנאירובית של חיידקים אך כאן, עלולות להוות הפסד אנרגטי במזון מכיוון שנעשה שימוש בפחמימות זמינות. החומצות העיקריות שנבדקו באנליזה הן אצטית, פרופיונית, בוטירית, וסך הכל החומצות.

למרות היעדר הבדלים סטטיסטים מובהקים ניתן לראות בטבלה מס' 4 כי בתחמיץ שטופל ב- EM ישנה מגמת עלייה מתמדת בייצור חומצה אצטית ככל שהתארכו ימי ההחמצה (מ-1.75 ביום 1 ל-2.07 ביום 28). בטיפול הביקורת הערכים נשארו קבועים לאורך כל ימי ההחמצה (ב-

1.9 גרם/100 גרם ח"י) בעוד בטיפולים בהם הייתה נוכחות אוריאיה לא ניכרה מגמתיות כלשהי לאורך הימים. בתכולת החומצות פרופיונית ובוטירית אין הבדלים בין הטיפולים לאורך ימי ההחמצה ולכן מוצגים הממוצעים של כל טיפול. סך כל חומצות השומן הנדיפות נותן אינדיקציה לגבי ההפסדים האנרגטיים של התסיסה החיידקית בבור. מכיוון שלא היו הבדלים משמעותיים לאורך ימי ההחמצה מוצג ממוצע סה"כ החומצות בכל טיפול. ניתן לראות שההפסד האנרגטי הנמוך ביותר נמצא בטיפול ה-EM (1.97), בעוד ההפסד הגבוה ביותר נמצא בטיפול EM+Urea, בו יש ממוצע של 2.24 גרם חש"ן לכל 100 גרם חומר יבש.

טבלה מס' 4: תכולת חומצות שומן נדיפות בתחמיצי חיטה מטופלים								
Days	Treatments				SEM	¹ Main Effect P<		
	Control	EM	Urea	EM+Urea		Day	Trt	Day*Trt
	Acetic Acid (gr\100gr DM)							
1	1.89	1.75	2.01	2.08	0.34	² NS	NS	NS
7	1.98	1.84	2.18	2.27				
14	1.89	1.93	1.91	2.15				
28	1.89	2.07	2.24	2.31				
	³Propionic Acid (gr\100gr DM)							
1,7,14,28	0.05	0.03	0.04	0.04	0.02	0.02	NS	NS
	³Butiric Acid (gr\100gr DM)							
1,7,14,28	0.01	0.005	0	0	0.005	NS	NS	NS
	³Total Acids (gr\100gr DM)							
1,7,14,28	2.03	1.97	2.13	2.24	0.33	NS	NS	NS

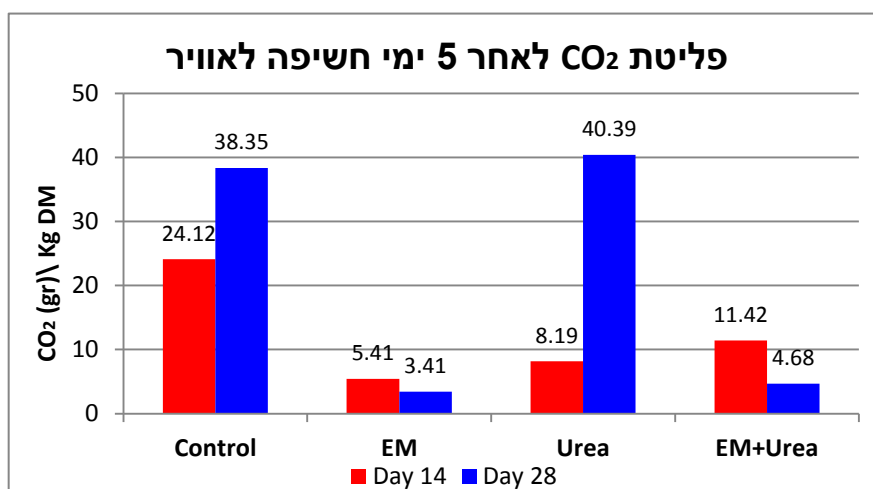
הנתונים בטבלה מוצגים בגרם/100 גרם חומר יבש. ¹השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם Day*Trt. ²ללא מובהקות סטטיסטית- Non Significant. ³התוצאות מוצגות כממוצעים של 4 ימי ההדגרה בכל טיפול.

2. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר

על מנת לבדוק את השפעת הטיפולים השונים על חשיפה אירובית נלקחו תחמיצים לאחר 14 ו- 28 ימי החמצה, נחשפו לאוויר בטמפ' הסביבה במשך 5 ימים ונמדדו בהם פליטת פחמן דו-חמצני (CO₂), (CFU (Colony Forming Unit) של עובשים ושמרים על בסיס חומר יבש ו-pH. כל אלה נותנים אינדיקציה לרמת הפעילות האירובית בתחמיץ החשוף לאוויר. ככל שהמדדים בפרמטרים אלה יהיו גבוהים יותר, משמעו פעילות אירובית גבוהה יותר. חשוב לציין שעקב בעיות טכניות בתחמיצי היום ה-14 נמדד רק ריכוז הפחמן דו-חמצני ואילו בתחמיצי יום 28 נמדדו כל שלושת המדדים.

טבלה מס' 5: יציבות אירובית בתחמיצי חיטה מטופלים						
	Treatments				SEM	P<
	Control	EM	Urea	EM+Urea		
Days	¹ CO ₂ gr/Kg DM					
14	24.1 ^A	5.41 ^B	8.19 ^B	11.4 ^B	1.94	0.0003
28	38.3 ^A	3.41 ^B	40.4 ^A	4.68 ^A	10.4	0.0001
	Log ² CFU/gr DM					
28	9.25 ^A	7.75 ^C	7.91 ^{BC}	8.17 ^B	0.2	0.0001
	pH					
28	7.06 ^A	3.91 ^C	5.08 ^B	4.07 ^C	0.39	0.0001

1 כמות הפחמן דו חמצני שנפלט מהתחמיץ במהלך חמישה ימי חשיפה לאוויר. Colony Forming Unit-² CFU- מדד המבטא את מספר מושבות החיידקים/פטרייות/עובשים שהתפתחו בגרם חומר יבש. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים סטטיסטית כאשר $P < 0.05$. SEM = סטיית תקן.



גרף מס' 2: פליטת CO₂ בגרם לק"ג חומר יבש מתחמיצי חיטה מטופלים שהוחמצו במשך 14 ו-28 ימים ולאחר 5 ימי חשיפה לאוויר. אדום- 14 ימי החמצה. כחול- 28 ימי החמצה

בטבלה מס' 5 מרוכזים כלל הנתונים וניתן לראות באופן מובהק כי ירק חיטה שהוחמיץ בנוכחות תכשיר EM-ZOO הראה את היציבות הגבוהה ביותר בעת החשיפה לתנאים אירוביים. בטיפול EM, פליטת הפחמן דו-חמצני היא הנמוכה ביותר לאחר 14 ו-28 ימי החמצה (5.41 ו-3.41 גרם/ק"ג ח"י בהתאמה). בנוסף, בטיפול זה מדד ה-CFU הוא הנמוך ביותר ביום 28 (7.75 לעומת 9.25 לגרם ח"י בביקורת) וערך ה-pH הוא הנמוך ביותר ביום 28, עומד על 3.91 ואף נשאר ברמה אופטימלית של תחמיץ שאינו נחשף לאוויר. גם בתחמיץ שטופל בשילוב שני התכשירים ניתן לראות שהערכים שהתקבלו ב-pH (4.07) ופליטת פחמן דו-חמצני (4.68) גרם לק"ג ח"י) מעידים על יציבות בהשוואה לטיפול הביקורת שכן הם יחסית קרובים לטיפול ה-EM

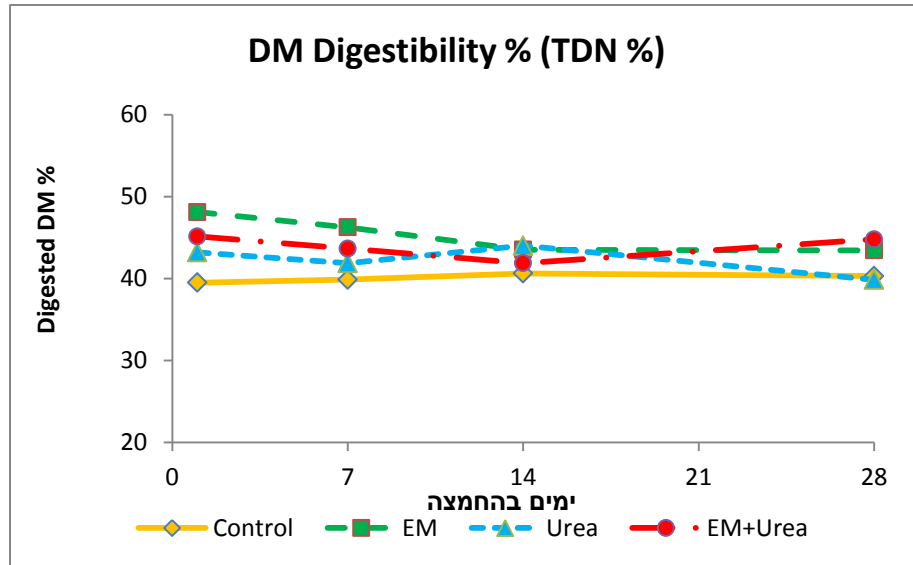
המראה את העמידות הגבוהה ביותר. גרף מס' 2 ממחיש את הפערים בין הטיפולים ואת השפעת משך ימי החמצה על פליטת ה-CO₂. העמודות האדומות מתייחסות לתחמיצים לאחר 14 ימי החמצה והעמודות הכחולות מתייחסות ל-28 ימי החמצה שכן הם גדלו משמעותית. כאשר ישנה נוכחות EM בתחמיצים פליטת ה-CO₂ יורדת מיום 14 ליום 28 בעוד בטיפולים בהם לא נעשה שימוש ב-EM פליטת ה-CO₂ עולה משמעותית (24.12 ל-38.35 גרם/ק"ג ח"י בביקורת ו- 8.19 ל- 40.39 גרם/ק"ג ח"י בטיפול Urea). בתוך כל טיפול ניתן לראות גם את ההבדל בין משך ימי החמצה, שכן ישנם טיפולים שמחזקים את עמידות לאוויר (EM ו-EM+Urea) עם התארכות ימי החמצה וישנם כאלה שעמידותם נפגעת (ביקורת ו-Urea).

3. חיזוי נעכלות מזון בכרס מלאכותית (כרמ"ל)

ניסוי נעכלות כרמ"ל נעשה ע"פ שיטת (1963) Tilley and Terry ממנו התקבלו תוצאות כלל החומר היבש הנעכל בדוגמאות התחמיץ. אנליזת תכולת NDF במזונות לאחר ניסוי הנעכלות, נעשתה בהתאם לפרוטוקול של (1991) Van Soest et al. המותאם לשקיות ולמכשיר ANKOM Fiber Analyser II.

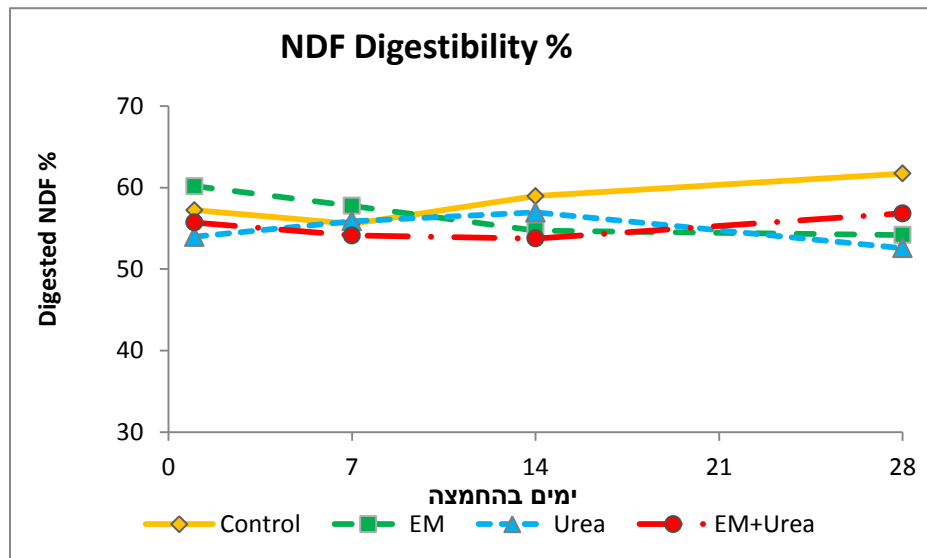
טבלה מס' 6: חיזוי נעכלות בעזרת כרס מלאכותית (כרמ"ל)						
Treatments						
Control	EM	Urea	EM+Urea	SEM	⁴ Main Effect P<	
¹ TDN %					Trt	Trt*Day
40.1 ^D	45.4 ^A	42.3 ^C	43.9 ^B	1.84	0.0001	0.0001
² NEL (Mcal/kg)						
0.86 ^D	0.99 ^A	0.92 ^C	0.96 ^B	0.045	0.0001	0.0001
³ NDF Digestibility %						
58.4 ^A	56.7 ^{AB}	54.8 ^B	55.1 ^B	1.87	0.005	0.01
¹ נעכלות כלל חומר יבש (TDN). ² Net Energy of Lactation (NEL). ³ נעכלות NDF מתוך כלל ה-NDF בדוגמא ההתחלתית. ⁴ השפעות עיקריות של טיפול Trt ואינטראקציה בין טיפול ליום (Day) בהחמצה. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים סטטיסטית כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן.						

בשלב הראשון של בדיקה זו, נבדקה נעכלות כלל החומר היבש בכל דוגמא. בטבלה מס' 6 מוצגים ממוצעי נעכלות כלל החומר היבש (TDN- Total Digestible Nutrients), אנרגיה נטו ונעכלות NDF. התוצאות בטבלה הן ממוצע של כלל ימי החמצה בכל טיפול. תכולת האנרגיה הגבוהה ביותר נמצאה בתחמיץ המטופל ב-EM, בעוד טיפול הביקורת הוא בעל תכולת האנרגיה הנמוכה ביותר (0.99 לעומת 0.86 מק"ל לק"ג ח"י). ערכים אלו חושבו באמצעות נוסחאות NRC לחישוב אנרגיה מ-TDN (ראה שיטות וחומרים).



גרף מס' 3: נעכלות כלל חומר יבש (DM) בתחמיצי חיטה מטופלים בזמני הדגרה שונים

בגרף מס' 3 ניתן לראות, כי לאורך ימי ההחמצה השונים כל טיפול שמר על התנהגות דומה יחסית לעצמו לאורך ימי ההחמצה, כאשר טיפול הביקורת מראה את ערכי הנעכלות הנמוכים ביותר, שנעים סביב ה-40%. בנוסף, שלושת הטיפולים האחרים מראים תנודות קלות של עליות או ירידות בנעכלות כלל החומר היבש ביחס לימי ההחמצה. לאחר יום 1 הנעכלות הגבוהה ביותר ביחס לביקורת היא בטיפול EM, כ-48% לעומת 39.5%, וביום 28 הטיפול המשולב של EM ואוריה מראה על אחוז נעכלות הגבוה ביותר (כ-45%). הבדלים מובהקים סטטיסטית נראו רק כאשר נבחנה השפעת הטיפול והאינטראקציה בין טיפול למשך ימי החמצה. מכיוון שלא היו הבדלים סטטיסטיים מובהקים בין ימי ההחמצה, נעכלות NDF, משמעותה כמה ממקטע ה-



גרף מס' 4: נעכלות NDF באחוזים על בסיס חומר יבש בתחמיצי חיטה מטופלים בזמני הדגרה שונים

NDF שבמזון, התפרק ונעכל ע"י חיידקי הכרס והיה זמין להם. התוצאות של בדיקה זו מוצגות בחלק התחתון של טבלה מס' 6 ובגרף מספר 4. ניתן לראות מגמות יחסית שונות בין הטיפולים. טיפול הביקורת מראה על מגמת עלייה בנעכלות ה-NDF (מתחיל ב-57% ומגיע עד 61% נעכלות) בעוד טיפול EM מראה על מגמת ירידה לאורך ימי ההחמצה (מתחיל ב-60% ויורד ל-54%). הטיפולים בהם ישנה נוכחות אוריאיה מראים על מגמות המשלבות עלייה וירידה בנעכלות לאורך ימי ההחמצה. גרפים מס' 3 ו-4 מתארים את התוצאות המוצגות בטבלה מס' 6 בצורה יותר ויזואלית, המאפשרת לראות את ההבדלים בין המגמות השונות של הטיפולים השונים בנעכלות החומר היבש ונעכלות ה-NDF לאורך ימי ההחמצה.

תוצאות- תחמיצי תירס

1. אנליזות כימיות

בניסוי נלקחו 4 הטיפולים (ביקורת, EM, Urea, EM+ Urea) שהוחמצו במשך 4 פרקי זמן נבחרים (1,7,14 ו-28 ימים) ובוצעו עליהם אנליזות כימיות, לבדיקת תכולת חומר יבש, חומר אורגני, פחמימות דופן התא, חלבון כללי, pH, חומצה לקטית, ופרופיל חומצות שומן נדיפות.

1.1 חומר יבש, pH וחלבון כללי

טבלה מס' 7: תכולת חומר יבש, pH וחלבון כללי בתחמיצי תירס מטופלים									
Days	ירק מוצא	Treatments				SEM	³ Main Effect P<		
		Control	EM	Urea	EM+Urea		Day	Trt	Day*Trt
¹DM %									
1	32.4	30.7 ^{ABCDE}	33.0 ^A	32.5 ^{AB}	32.0 ^{AB}	1.08	0.004	0.02	0.17
7		29.5 ^{CDE}	31.9 ^{AB}	29.0 ^{DE}	30.6 ^{BCDE}				
14		28.7 ^E	29.3 ^{DE}	31.6 ^{ABC}	30.7 ^{ABCDE}				
28		28.7 ^E	29.4 ^{CDE}	30.6 ^{BCDE}	31.0 ^{ABCD}				
pH									
1	5.46	3.75 ^{BCDE}	3.85 ^{ABC}	3.9 ^{AB}	3.86 ^{ABC}	0.07	0.0008	0.005	0.04
7		3.62 ^E	3.68 ^{DE}	3.65 ^{DE}	3.73 ^{CDE}				
14		3.87 ^{ABC}	3.97 ^A	3.8 ^{BCD}	3.72 ^{CDE}				
28		3.62 ^E	3.97 ^A	3.74 ^{BCDE}	3.68 ^{DE}				
²CP %									
1	7.36	8.09 ^F	8.35 ^{EF}	10.8 ^B	10.5 ^{BC}	0.325	0.0001	0.0001	0.0001
7		7.99 ^F	9.81 ^{CD}	10.9 ^B	10.5 ^{BC}				
14		8.20 ^F	9.40 ^D	11.0 ^B	11.0 ^B				
28		9.18 ^{DE}	10.5 ^{BC}	11.3 ^B	12.7 ^A				

¹תכולת חומר יבש (DM%), ²תכולת חלבון כללי (CP%), ³השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם Day*Trt. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן של הממוצע

כל ארבע הטיפולים איבדו מתכולת החומר היבש לאורך ימי ההחמצה השונים, הערכים מוצגים בטבלה מס' 7. ניתן לראות שטיפול הביקורת איבד הכי הרבה מהחומר היבש של הירק (28.7%) ביחס לחומר המוצא (32.4%), בעוד בשני הטיפולים בהם ישנה נוכחות אוריאה נראים ההפסדים הנמוכים ביותר ביום 28 (30.6% ו-31.0%). כבר לאחר יום אחד של החמצה נראים ערכי pH נמוכים מ-4 בכל הטיפולים ונשארים כך לאורך כל הימים. בימים 14 ו-28 ערכי ה-pH בטיפול EM גבוהים יותר (3.97) מהטיפולים האחרים, אפילו יותר מטיפול ה-Urea. במבט על תכולת החלבון כבר אחרי יום אחד רואים באופן טבעי ערכים גבוהים יותר בטיפולים בהם ישנה

נוכחות אוריאה (10.8 בטיפול אוריאה ו-10.5 בטיפול המשולב) לעומת טיפולי הביקורת וה-EM, מפני שהאוריאה מעשירה את הירק בחנקן. כל הטיפולים מראים מגמת עלייה בתכולת החלבון עם התקדמות ימי ההחמצה כאשר את העליות הגבוהות ביותר רואים בטיפול EM ובטיפול EM+Urea, מ-8.35 ל-10.5 ומ-10.5 ל-12.7 בהתאמה. ישנם הבדלים סטטיסטיים מובהקים כאשר נבחנת השפעת יום ההחמצה, הטיפול והשילוב ביניהם.

1.2 ADF, NDF והמיצלולוז

טבלה מס' 8: תכולת ADF, NDF והמיצלולוז בתחמיצי תירס בטופלים השונים									
		Treatments							
Days	ירק מוצא	Control	EM	Urea	EM+Urea	SEM	³ Main Effect P<		
		¹ NDF %					Day	Trt	Day*Trt
1	52.2	52.9 ^A	50.8 ^{AB}	51.7 ^{AB}	51.0 ^{AB}	1.46	0.0002	0.0001	0.001
7		51.1 ^{AB}	48.0 ^{BC}	48.3 ^{BC}	51.4 ^{AB}				
14		54.0 ^A	52.4 ^{AB}	49.9 ^{AB}	51.3 ^{AB}				
28		53.5 ^A	47.8 ^{BC}	45.1 ^C	52.0 ^{AB}				
		² ADF %							
1	28.4	31.6 ^{BCDE}	29.2 ^{EFG}	26.0 ^H	30.7 ^{CDEF}	1.02	0.0001	0.0001	0.0009
7		33.3 ^{ABC}	27.8 ^{GH}	27.9 ^{FGH}	31.3 ^{BCDE}				
14		34.0 ^{AB}	32.3 ^{ABCD}	31.6 ^{BCDE}	32.3 ^{BCD}				
28		35.8 ^A	29.7 ^{DEFG}	29.0 ^{EFGH}	31.8 ^{BCDE}				
		Hemicellulose %							
1	23.8	21.2 ^{BC}	21.6 ^B	25.7 ^A	20.3 ^{BC}	1.28	0.0001	0.3	0.0001
7		17.8 ^{CD}	20.2 ^{BC}	20.4 ^{BC}	20.1 ^{BC}				
14		20.0 ^{BC}	20.1 ^{BC}	18.3 ^{BCD}	19.0 ^{BCD}				
28		17.7 ^{CD}	18.1 ^{BCD}	16.1 ^D	20.2 ^{BC}				

¹Neutral Detergent Fiber, ²Acid Detergent Fiber, ³השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן של הממוצע

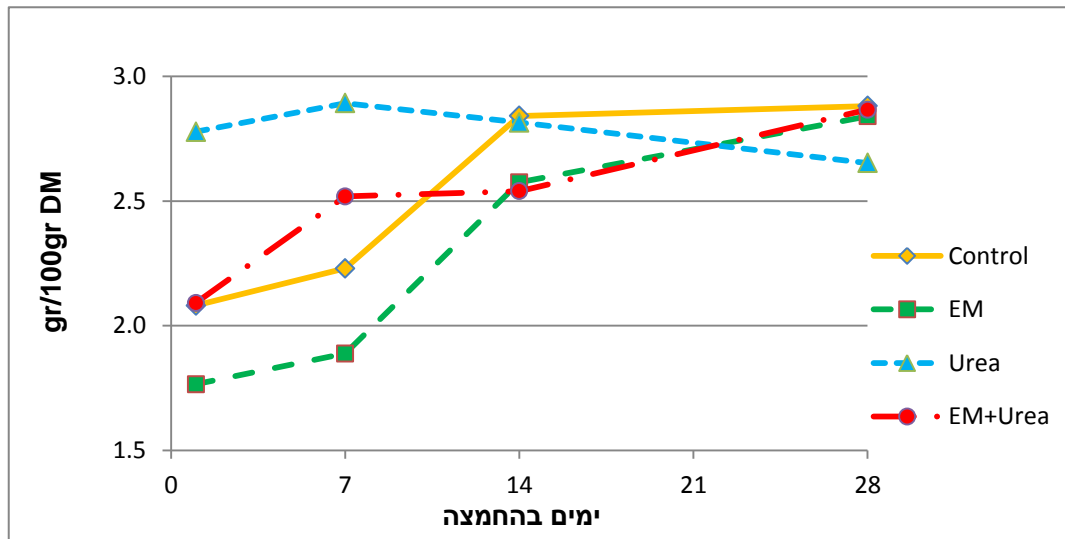
טבלה מס' 8 מסכמת את תכולת פחמימות דופן התא בתחמיצי תירס מטופלים לאורך ימי החמצה שונים כאשר כל הערכים מוצגים באחוזים על בסיס חומר יבש. NDF מכיל את כלל הפחמימות המבניות וכלל הטיפולים אינם מתנהגים באופן עקבי, כאשר בכולם ישנן עליות וירידות בתכולת ה-NDF לאורך ימי ההחמצה. הנקודה הבולטת ביותר היא ביום 28 כאשר טיפול האוריאה מראה על הערך הנמוך ביותר, 45.1%, וטיפול הביקורת מראה את הגבוה ביותר, 53.5%. במבט על ADF, ניתן לראות שבטיפול הביקורת תכולתו עולה לאורך כל ימי ההחמצה שמסתיימים ב-35.8% ADF ביום 28, וזהו הערך הגבוה ביותר. לעומת הביקורת, כלל הטיפולים מראים עלייה עד יום 14, וביום 28 ניכרת ירידה בכולם לערכים שנעים סביב 30%.

המיצלולוז הינה הפחמימה המבנית הפריקה ביותר. ניתן לראות כי בטיפול הביקורת המגמה בתכולתה אינה עקבית, בטיפול ה- EM ניכרת ירידה קלה מ-21% ל-18%, בטיפול האוריאה ניכרת הירידה החדה ביותר, 25% ל-16% ובטיפול המשלב EM ואוריאה תכולתו שומרת על יציבות לאורך כל ימי החמצה, סביב 20%.

1.3 חומצה לקטית

טבלה מס' 9: תכולת חומצה לקטית בתחמיצי תירס מטופלים (גרם/100 גרם ח"י)								
Days	Treatments				SEM	Main Effect P<		
	Control	EM	Urea	EM+Urea		Day	Trt	Day*Trt
1	2.08 ^{CDE}	1.76 ^E	2.78 ^{ABC}	2.09 ^{BCDE}	0.193	0.0001	0.0008	0.008
7	2.23 ^{BCDE}	1.89 ^{DE}	2.89 ^A	2.52 ^{ABCD}				
14	2.84 ^{AB}	2.57 ^{ABCD}	2.81 ^{ABC}	2.54 ^{ABCD}				
28	2.88 ^A	2.84 ^{AB}	2.65 ^{ABCD}	2.87 ^A				

הנתונים בטבלה מוצגים בגרם/100 גרם חומר יבש. ¹השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם Day*Trt. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים כאשר $P < 0.05$. SEM = סטיית תקן של הממוצע.



גרף מס' 5: תכולת חומצה לקטית בתחמיצי חיטה מטופלים לאורך ימי החמצה בגרם/100 גרם חומר יבש.

טבלה מס' 9 וגרף מס' 5 מתארים את תכולת החומצה הלקטית בתחמיצי תירס מטופלים לאורך ימי החמצה שונים. מצד אחד, כבר אחרי יום אחד ישנה חומצה לקטית בטיפולים השונים אך מצד שני המגמות שבימי החמצה הבאים שונות. הטבלה ממחישה את ההבדלים הסטטיסטיים מבחינה מספרית בין הטיפולים בעוד הגרף מראה את מגמות הייצור השונות בצורה יותר ויזואלית. בטיפול הביקורת ישנה עלייה עד יום 14 והתייצבות. טיפול EM מראה על מגמת עלייה מתמדת לאורך כל ימי החמצה. טיפול האוריאה מראה על התכולה הגבוהה ביותר של חומצה

לקטית ביום הראשון עקב היותו של התירס ירק עשיר בפחמימות, עני בחנקן המוגדר כירק קל לתסיסה ובעל יעילות בעת העשרתו בחנקן. יחד עם זאת, מתנהג במעין פלטו לאורך כל הימים. הטיפול המשולב (EM+Urea) מראה גם כן על מגמת עלייה בייצור לאורך ימי ההחמצה. בסיכומו של דבר, הטיפולים בהם ישנה נוכחות EM ישנה מגמת התגברות בייצור חומצה לקטית ובטיפולים האחרים (ביקורת ואוריה) ישנה עצירה והתייצבות בייצור בשלב מסוים.

1.4 חומצות שומן נדיפות (VFA)

טבלה מס' 10: פרופיל חומצות שומן נדיפות בתחמיצי תירס בטיפולים השונים								
		Treatments						
	Control	EM	Urea	EM+Urea		¹ Main Effect P<		
Days	Acetic Acid (gr/100gr DM)				SEM	Day	Trt	Day*Trt
1	1.58 ^{EF}	0.87 ^F	2.5 ^{BCDE}	2.86 ^{ABCD}	0.3	0.0001	0.0001	² NS
7	1.68 ^{DEF}	1.34 ^{EF}	2.96 ^{ABC}	3.45 ^{AB}				
14	2.31 ^{BCDE}	1.73 ^{CDEF}	3 ^{AB}	3.6 ^A				
28	3.42 ^{AB}	2.27 ^{BCDE}	3.57 ^A	3.6 ^A				
	³ Propionic Acid (gr/100gr DM)							
1,7,14,28	0.02 ^{CD}	0.19 ^{AB}	0.02 ^{CD}	0.02 ^{CD}	0.03	0.01	0.02	0.03
	³ Butiric Acid (gr/100gr DM)							
1,7,14,28	0.1 ^{ABC}	0.05 ^{BC}	0.17 ^{AB}	0.13 ^{ABC}	0.03	0.01	0.01	NS
	Total Acids (gr/100gr DM)							
1	1.68 ^{EF}	1.09 ^F	2.65 ^{BCDE}	3.12 ^{ABCD}	0.31	0.0001	0.0001	NS
7	1.77 ^{EF}	1.48 ^{EF}	3.11 ^{ABCD}	3.6 ^{ABC}				
14	2.44 ^{CDE}	2.01 ^{DEF}	3.25 ^{ABCD}	4.05 ^A				
28	3.6 ^{ABC}	2.63 ^{BCDE}	3.79 ^{AB}	4.09 ^A				

הנתונים בטבלה מוצגים בגרם/100 גרם חומר יבש. ¹ השפעות עיקריות של טיפול Trt, יום בהחמצה Day ואינטראקציה ביניהם Day*Trt. ² ללא מובהקות סטטיסטית - NS. ³ התוצאות מוצגות כממוצעים של 4 ימי ההדגרה בכל טיפול.

טבלה מס' 10 מתארת את פרופיל חומצות השומן שנוצרו בתחמיצי תירס מטופלים. ייצור החומצה האצטית, המורכבת מ-2 פחמנים, נמצא במגמת עלייה בכל הטיפולים לאורך ימי ההחמצה. לאורך כל הימים טיפול EM+Urea מראה את הערכים הגבוהים ביותר שמגיעים בימים 14 ו-28, לערכי שיא של 3.6 גרם/100 גרם ח"י. טיפול ה-EM מראה את הערכים הנמוכים ביותר כאשר הבולט ביותר נמצא ביום 28 (2.27 גרם/100 גר' ח"י). בחומצות פרופיונית ובוטירית, לא נראו הבדלים משמעותיים בין ימי ההחמצה אך כן יש הבדל בין הטיפולים. טיפול EM הראה את תכולת החומצה הפרופיונית הגבוהה ביותר (0.19) ותכולת

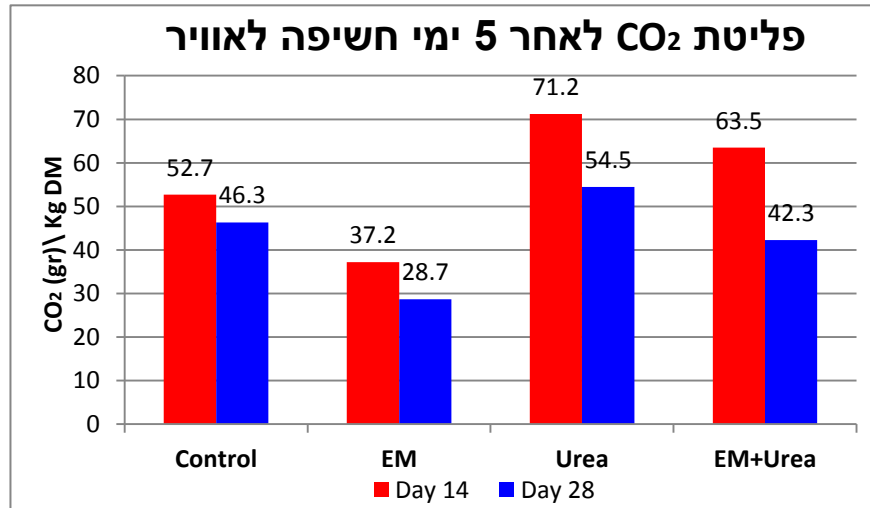
הבוטירית הנמוכה ביותר (0.05), כאשר בשתי החומצות שאר הטיפולים הערכים יחסית דומים זה לזה. במבט על סך כל החומצות ניכרת מגמת עלייה בכל הטיפולים עם התקדמות ימי ההחמצה כאשר לאורך כל הימים טיפול EM מראה על סך החומצות הנמוך ביותר (יום 28- 2.63 גרם/100 גר' ח"י). חשוב לציין כי בטיפולים בהם ישנה נוכחות אוריאה ישנם ערכים של מעל 3 גר' /100 גר' ח"י החל מהיום הראשון. החומצה האצטית היא העיקרית שמשפיעה על סך חומצות השומן הנדיפות מפני שהיא העיקרית שנוצרה.

2. יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר

טבלה מס' 11: יציבות אירובית בתחמיצי תירס מטופלים						
	Treatments				SEM	P<
	Control	EM	Urea	EM+Urea		
Days	¹ CO ₂ gr/Kg DM					
14	52.7 ^C	37.2 ^D	71.2 ^A	63.5 ^B	3.23	0.0001
28	46.3 ^{AB}	28.7 ^C	54.5 ^A	42.3 ^{AB}	10.2	0.009
	Log ² CFU\gr DM					
14	9.64 ^{AB}	9.39 ^B	9.56 ^{AB}	9.97 ^A	0.33	0.06
28	9.32 ^{AB}	9.07 ^{AB}	9.41 ^A	8.97 ^B	0.24	0.03
	pH					
14	6.56 ^B	6.3 ^C	6.85 ^A	6.76 ^A	0.08	0.0001
28	6.61 ^A	6.1 ^B	6.78 ^A	6.9 ^A	0.21	0.0002

¹ כמות הפחמן דו חמצני שנפלט מהתחמיץ במהלך חמישה ימי חשיפה לאוויר. ² CFU-Colony Forming Unit - מדד המבטא את מספר מושבות החיידקים/פטרייות/עובשים שהתפתחו בגרם חומר יבש. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים סטטיסטית כאשר $P > 0.05$. SEM = סטיית תקן.

באופן כללי לא רואים הבדלים מאוד קיצוניים כפי שנראו בתחמיצי החיטה כאשר נבחנה עמידותם לאוויר אך עדיין ישנם כאלה. טבלה מס' 11 מסכמת את כלל הפרמטרים המעידים על היציבות האירובית בתחמיצי תירס מטופלים. פליטת ה-CO₂ הייתה הגבוהה ביותר בטיפול האוריאה (71.2 ו-54.5 גרם לק"ג ח"י ביום 14 ו-28 בהתאמה) והנמוכה ביותר בטיפול EM (37.2 ו-28.7). ב-CFU לא נראו הבדלים מובהקים וכל הטיפולים נעים בין 9 ל-10 בחזקת 9 ל-10 CFU לגרם חומר יבש. תחמיץ שטופל ב-EM הינו בעל ערכי ה-pH הנמוכים ביותר לאחר 5 ימי חשיפה. נתון זה נכון גם ב-14 ימי החמצה וגם ב-28 ימים (6.3 ו-6.1 בהתאמה). תחמיצים בהם הייתה נוכחות אוריאה מראים את הערכים הגבוהים ביותר בפרמטר ה-pH (6.8-6.9) חשוב לציין שלמרות ההבדל כל התחמיצים, לאחר שנחשפו לאוויר במשך 5 ימים אינם נמצאים בטווח pH של תחמיץ טוב.



גרף מס' 6: פליטת CO₂ בגרם לק"ג חומר יבש מתחמיצי חיטה מטופלים שהחמצו במשך 14 ו-28 ימים ולאחר 5 ימי חשיפה לאוויר. אדום- 14 ימי החמצה. כחול- 28 ימי החמצה

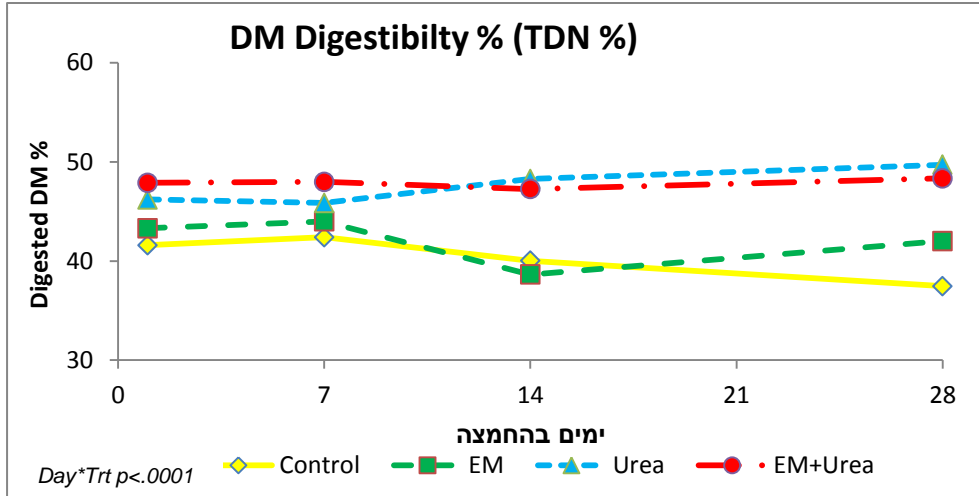
גרף מס' 6 ממחיש באופן יותר ברור את ההבדלים בין הטיפולים בשיעור פליטת הפחמן דו חמצני במהלך חמשת ימי החשיפה לאוויר, אך מה שיותר ברור הינו ההבדל בין משך ימי ההחמצה בתוך הטיפולים עצמם (אדום- 14 ימים, כחול- 28 ימים). ניתן לראות שבכל ארבעת הטיפולים ישנה ירידה בשיעור פליטת ה-CO₂ בין 14 ימי החמצה ל-28 ימי החמצה כאשר הירידה הגדולה ביותר מתרחשת בטיפול EM+Urea (מ-63.5 גרם ל-42.3 גרם לק"ג ח"י).

3. חיזוי נעילות תחמיץ בכרס מלאכותית (כרמ"ל)

טבלה מס' 12 מציגה את נעילות כלל החומר היבש, תכולת אנרגיה נטו ונעילות NDF בתחמיצי תירס מטופלים כאשר הערכים בטבלה מייצגים ממוצע של ארבע תקופות ההחמצה בכל טיפול. ניתן לראות כי נעילות החומר היבש היא הגבוהה ביותר בטיפולים בהם ישנה נוכחות אוריאה (כ-48%).

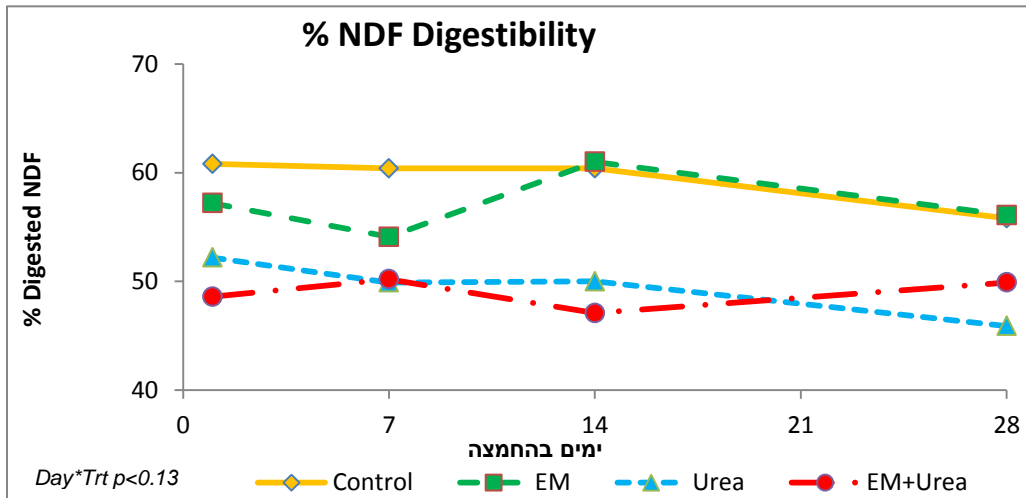
טבלה מס' 12: חיזוי נעילות בעזרת כרס מלאכותית						
Treatments						
Control	EM	Urea	EM+Urea	⁴ Main Effect P<		
				SEM	Trt	Trt*Day
¹ TDN %						
40.2 ^C	42.6 ^B	47.5 ^A	47.9 ^A	1.9	0.0001	0.0001
² NE _L (Mcal/kg)						
0.86 ^C	0.92 ^B	1.04 ^A	1.05 ^A	0.04	0.0001	0.0001
³ NDF Digestibility %						
59.4 ^A	57.3 ^A	49.5 ^B	48.9 ^B	2.23	0.0001	0.13
¹ נעילות כלל חומר יבש (TDN) ² . Net Energy of Lactation (NE _L) ³ . נעילות NDF מתוך כלל ה-NDF בדוגמא ההתחלתית. ⁴ השפעות עיקריות של טיפול Trt ואינטראקציה בין טיפול ליום (Day) בהחמצה. ממוצעים בטבלה עם אותיות שונות נבדלים סטטיסטית כאשר P<0.05. SEM = סטיית תקן.						

הטיפול המשלב אוריאה ו-EM שומר על יציבות בנעכלות החומר היבש לאורך כל הימים- סביב 48% (גרף מס' 7). כאשר נבחנת השפעת האינטראקציה בין ימי ההחמצה לטיפול ישנה מובהקות סטטיסטית ($p < .0001$) הנובעת כנראה בהבדלי הנעכלות בימים 14 ו-28.



גרף מס' 7: נעכלות כלל חומר יבש (DM) בתחמיצי חיטה מטופלים בזמני הדגרה שונים

טיפול הביקורת וה-EM מציגים מגמות עלייה וירידה לאורך הימים כאשר אחוזי הנעכלות נעים בין 39% ל-44% ואין מגמתיות מוחלטת. במבט על תכולת האנרגיה נטו (NE_L) הנובעת מנעכלות החומר היבש, גם כאן יש יתרון בולט לטיפול האוריאה. בחלק התחתון של הטבלה ובגרף מס' 8 ניתן לראות את נעכלות ה-NDF. טיפול הביקורת שומר על יציבות לאורך ימי ההחמצה (60% עד יום 14) אך ישנה ירידה ניכרת ביום 28. טיפול EM מראה גם כאן עליות וירידות בין 54% ל-60% נעכלות NDF לאורך הימים (השיא ביום 14 - 60%). הטיפולים בהם ישנה אוריאה שומרים על ערך נמוך ויציבות יחסית, בדומה לנעכלות כלל החומר היבש.



גרף מס' 8: נעכלות NDF באחוזים על בסיס חומר יבש בתחמיצי חיטה מטופלים בזמני הדגרה שונים

בגרף מס' 7 ניתן לראות בבירור את המגמות השונות בנעכלות החומר היבש- את היציבות בטיפולים בהם יש אוריאה (כחול ואדום), את הירידה בטיפול הביקורת (צהוב) ואת חוסר היציבות בטיפול EM לאורך הימים. גם בגרף מס' 8 נראות המגמות השונות, אך בנעכלות NDF. הגרף נותן תמונת מראה טובה לגרף נעכלות החומר היבש, שכן, טיפולי האוריאה היציבים המופיעים בערכים גבוהים בגרף הקודם, מופיעים כאן בצורה דומה אך בערכים נמוכים יותר. היציבות היחסית של טיפול הביקורת בנעכלות החומר היבש (בגרף מס' 7) נראית גם בגרף מס' 8 אך בערכים גבוהים יותר (כ-60%) וטיפול ה-EM מתנהג בצורה דומה של עליות וירידות כאשר המגמות הפוכות. אם בנעכלות החומר היבש התחיל הטיפול במגמת עלייה והמשיך בירידה לאורך הימים, בנעכלות ה-NDF מתחילה ירידה, אח"כ עלייה חדה ביום 14 ושוב ירידה ביום 28. למרות שישנם הבדלים בין הטיפולים בנעכלות ה-NDF, למשך ההחמצה לא הייתה השפעה וכך גם לאינטראקציה בין ימים לטיפול ($p < 0.13$). המובהקות הסטטיסטית היחידה במבחן זה היא בעת בדיקת השפעת הטיפול בלבד ($p < 0.0001$).

דיון ומסקנות

בעבודה זו נבדקה השפעתם של תוסף מיקרואורגניזמים מסוג EM-Zoo ותוספת Urea על הכנה וערך תזונתי של תחמיצי חיטה ותירס בארבעה טיפולים: 1) ביקורת 2) תוספת EM 3) תוספת Urea ו- 4) טיפול משולב של EM ו-Urea. בנוסף, נבחנה השפעת איכות תהליך ההחמצה על ציר הזמן בטיפולים השונים והימים 1,7,14 ו-28 נבחרו לצורך האפיון. הניסויים שבוצעו בדקו פרמטרים שונים שיעידו על טיב התחמיץ מבחינת תכולתו, עמידותו לחשיפה לאוויר ונעילותו.

1. תחמיצי חיטה

תהליך החמצת ירק בעל תכולת חומר יבש נמוך מ-25% עלול להביא לתוצרי תסיסה שאינם רצויים (Henderson, 1993), וגבוה מ-50% מוגדר ככזה שקשה להחמצה שתביא להשגת יעדי שימור (Yitbarek & Tamir, 2014). ירק החיטה בו נעשה שימוש בעבודה זו היה בעל תכולת חומר יבש של 45%, הנחשבת כגבוהה בישראל אך אפשרית להחמצה. בארבעת הטיפולים לא היו הפסדי חומר יבש משמעותיים. מדידת pH מהווה מדד ראשוני לאיכות התחמיץ ולמעשה מבטאת את רמת חומציות הירק הנובעת מתוצרי תסיסה אנאירוביים בעיקר של חומצה לקטית (Seglar, 2003). חומציות זו מונעת התפתחות מיקרואורגניזמים שאינם רצויים בבור התחמיץ ועלולים לגרום לפגיעה באיכותו (Elfernik et al., 2000). בכל ארבעת הטיפולים ה-pH אכן ירד לאורך ציר הזמן ככל שהתקדמו בימי ההחמצה (טבלה מס' 1) אך הערכים הנמוכים ביותר בכל ימי הדיגום היו בטיפול ה-EM (pH = 3.73 ביום 28), שכן מכיל את תוסף המיקרואורגניזמים שבין היתר מועשר בחיידקים יוצרי חומצה לקטית הגורמת לירידת ה-pH. ה-pH הגבוה ביותר שנראה לאורך כל ימי ההחמצה היה בטיפול ה-Urea (pH = 3.93 ביום 28). במחקרים של Weinberg et al. (1993) ו-Filya et al. (2000), נבדקה השפעת תוספת חיידקים לקטובציליים לתחמיצי חיטה וירידת ה-pH הייתה לערכים נמוכים יותר מטיפול הביקורת. תוספת Urea לתחמיצים יכולה להאריך את משך התסיסה, להאט את עליית החומציות וירידת ה-pH (Kaiser, 2004), ואכן כך הדבר בעבודה זו שכן ערכי ה-pH בטיפול ה-Urea הם הגבוהים ביותר לאורך כל ימי ההחמצה אך יחד עם זאת מגיעים לערכים של תחמיץ אופטימלי.

אחת המטרות העיקריות בהוספת Urea לתחמיצים היא העשרת הירק בחנקן לצורך העלאת תכולת החלבון הכללי (Yitbarek & Tamir, 2014, Demirel et al., 2003, Bentley et al., 1955, Kaiser, 2003). תכולת החלבון הכללי בשני הטיפולים בהם נוספו Urea הייתה הגבוהה ביותר פרט ליום 28 בו טיפול ה-EM הציג את תכולת החלבון הגבוהה ביותר (10.04% ע"ב ח"י),

טבלה מס' 1). הנתון נוגד את מחקרו של Amanullah (et al 2014), בו נמצא כי הוספת לקטובציליים דווקא מפחיתה את תכולת החלבון, כתוצאה מניצול יתר של חנקן ע"י הלקטובציליים. בניסוי הנוכחי, כנראה תוספת EM משפרת ניצולת וסינתזה של חנקן ע"י כלל החיידקים בתחמיץ המתבטאת בעליית תכולת החלבון הכללי. בתנאים האנאירוביים המתפתחים בבור התחמיץ, המיצולוזה בירק החיטה עוברת הידרוליזה לפחמימות זמינות יותר (הקטוזות ופנטוזות) לניצול חיידקים (Filya, 2000). עלייה בתכולת החנקן (פרוטאוליזה) והאנרגיה יכולים להסביר את העלייה בתכולת החלבון הכללי בטיפול EM שכן ניצולם ע"י החיידקים יעיל יותר.

תכולת פחמימות דופן התא לא היו שונות באופן בולט בין הטיפולים למרות הציפייה שטיפול ה-EM יפחית את כמות פחמימות דופן התא, עקב ניצולם או הידרוליזה. כך גם ע"פ Yitbarek & Tamir, (2014) הטוענים כי הוספת לקטובציליים תפחית את תכולת ה-NDF כתוצאה מתסיסת חיידקים טובה יותר, בשילוב עם הידרוליזה של ההמיצלולוזה בחיטה.

חומצה לקטית היא תוצר התסיסה המשמעותי והרצוי ביותר בתחמיצים שתגרום לירידת ה-pH המהירה ביותר (Schroeder, 2004, Elfernik et al., 2000), להפסדי החומר היבש הקטנים ביותר (Seglar, 2003) ותתרום לשיפור יציבות התחמיץ בעת חשיפתו לאוויר (Muck et al., 2018). ייצור החומצה הלקטית היה במגמת עלייה בכל הטיפולים אך נעצר ביום 14 בטיפול הביקורת וה-Urea. בטיפול EM ו-EM+Urea נמשך ייצור החומצה הלקטית גם ביום 28 להחמצה והם הגיעו לערכים הגבוהים ביותר (2.15 ו-2.06 גרם/100 גרם ח"י, בהתאמה). נתון זה ככל היותר הגורם לירידת ה-pH לערך הנמוך ביותר בטיפול EM ובהמשך נראה גם את השפעתו על היציבות האירובית. כך הדבר גם במחקרו של Weinberg et al. (1993) pH- חיטה שהוחמץ בנוכחות לקטובציליים ירד לערכים נמוכים יותר מטיפול ביקורת (3.5 לעומת 4.0) ותכולת חומצה לקטית הייתה גבוהה יותר (44 גרם לעומת 30 גרם לק"ג ח"י). כך התוצאות גם במחקר של Filya (2000), בו נבחנה השפעת תוספי חיידקים לקטובציליים הומו והטרופרמנטטיביים על תחמיצי חיטה אשר הראו שערך pH נמוך יותר וחומצה לקטית גבוהה יותר בטיפולים בהם נוספו לקטובציליים בהשוואה לביקורת.

חומצות שומן נדיפות (חש"ן) הן תוצר תסיסה נוסף המתקבל בבור התחמיץ. החומצות העיקריות שמתקבלות הן אצטית, פרופיונית ובוטירית כאשר כל אחת מהן בעלת השפעה שונה על תחמיצים. לקטובציליים הטרופרמנטטיביים (כדוגמת אלה בתוסף EM) מתסיסים פנטוזות (סוכר 5-פחמנים) לחומצות לקטית (3 פחמנים) ואצטית (2 פחמנים) (Muck et al., 2018). החומצה האצטית בעלת פעילות אנטי-מיקוטית, המונעת התפתחות של פטריות ועובשים בתנאים אירוביים (Kung, 2005, Kung & Shaver, 2001). תפקיד זה של החומצה האצטית מגיע

בהמשך לסיוע בהורדת ה-pH (Seglar, 2003), ובכך הינה בעלת תפקיד מרכזי בעמידות התחמיץ בחשיפה לאוויר. גם לחומצה הפרופיונית יש השפעה על יציבות אירובית אך גם מגבירה את ארומת התחמיץ באמצעות טעם וריח (Seglar, 2003, Ward & de Ondraza, 2000), שיכולה בעקיפין להביא להגברת צריכת מזון. תסיסת חיידקי קלוסטרדיה, השייכים לאוכלוסיית החיידקים האנאירוביים שאינה רצויה בבור תחמיץ, מייצרת חומצה בוטירית העלולה לגרום לעליית ה-pH עד 5 (Schroeder, 2004). סך כל חומצות השומן הנדיפות הנוצרות בבור נחשבות להפסד אנרגטי מכיוון שמורידות את שיעור האנרגיה בת תסיסה של התחמיץ בכרס. חיידקי הכרס אינם יכולים לנצל את החומצות הללו כאנרגיה לסינתזת החלבון המיקרוביאלי, וניצול האנרגיה שלהם ממזונות שהותססו הוא כ-70%-60% לעומת מזונות שאינם הותססו (Charmley, 2001). למרות היעדר הבדלים סטטיסטיים מובהקים, ניתן לראות שלאורך ימי ההחמצה ייצור החומצה האצטית נמצא במגמת עלייה מתמדת בטיפול EM (מ-1.75 ל-2.07 גרם/100 גרם ח"י) וכך גם בטיפול EM+Urea למרות ירידה קלה ביום 14. לתוצאה זו תהיה השפעה ישירה על יציבות התחמיץ בחשיפה לאוויר. לעומתם, ערכי האצטית הקבועים הנראים בטיפול הביקורת (כ-1.9) לאורך כל הימים ישפיעו על עמידות התחמיץ אך באופן הפוך. בטיפול ה-EM סך החומצות הוא הנמוך ביותר ומשמעו לכאורה, הפסד אנרגטי קטן יותר, המתבטא בתכולת אנרגיה נטו גבוהה יותר בניסוי הכרמ"ל.

בטבלה מס' 5 ובגרף מס' 2 נראו באופן ברור הבדלים מובהקים של עמידות תחמיצי חיטה מטופלים בעת החשיפה לאוויר. טיפול EM הראה את העמידות הגבוהה ביותר שהתבטאה ב-pH, פליטת CO₂ ו-CFU נמוכים יותר משאר הטיפולים, בעוד טיפול הביקורת הראה את הערכים הגבוהים ביותר בכל שלושת המדדים. כל אלה הם המשך ישיר של תוצרי התסיסה בטיפול EM, שכן הלקטובצילים שבתוסף מבצעים תסיסה הטרו-לקטית, שתוצריה הם חומצות לקטית ואצטית המגבירות את היציבות האירובית. מספר מחקרים בהם הוסיפו לקטובציליים הטרופרמנטטיביים לתחמיצי חיטה (Kung, 2005; Weinberg et al., 1999; Filya et al., 2000) הראו תוצאות דומות- קשר ישיר בין חומצה אצטית לעמידות טובה יותר בחשיפה לאוויר. נוסף לכך את ההמיצלולוז שעובר הידרוליזה לפנטוזות בבור (Filya, 2000) ונקבל מכלול גורמים המחזקים את הטענה כי לקטובציליים הטרופרמנטטיביים גורמים לעמידות גבוהה יותר בחשיפה לאוויר. מפליטת ה-CO₂ הגבוהה והייצור הקבוע של חומצה אצטית בטיפול ה-Urea ניתן להסיק כי אינה תורמת ליציבות האירובית של תחמיצי חיטה, ואף פוגעת בה עם ערכי פליטת CO₂ גבוהים יותר מטיפול הביקורת ביום 28.

ניסוי נעילות כרמ"ל (in vitro) התבצע כדי לאמוד את נעילות כלל החומר היבש ו-NDF של התחמיצים המטופלים. מיץ הכרס נלקח משתי פרות יבשות בעלות התקן (קנולה) כרסי הניזונות משחת דגן בלבד. שני הטיפולים בהם הייתה נוכחות EM מראים ירידה בנעילות החומר היבש וה-NDF ביחס לביקורת. יחד עם זאת, נעילות החומר היבש בטיפול EM היא הגבוהה ביותר לאורך כל ימי ההחמצה, מה שהופך אותו לתחמיץ בעל תכולת אנרגיה נטו המחושבת (NE_L) גבוהה יותר. בעבודה נוספת שנעשתה ע"י Weinberg et al. (2007), נעילות תחמיצי חיטה שטופלו בלקטובציליים הייתה דומה לתחמיצי ביקורת. תכולת המיצולוז (הנכלל במקטע ה-NDF) הגבוהה בחיטה עוברת הידרוליזה וגורמת להעשרת הירק בפנטוזות ולהקטנת מקטע ה-NDF. מכאן, ניתן לשער כי נעילות ה-NDF בטיפול EM נפגעת עקב ירידה בכמות הפחמימה הפריקה ביותר במקטע ה-NDF- המיצולוז. ראינו, כי נוכחותם של לקטובציליים הטורפרמנטטיבים המתסיסים פנטוזות אמנם מגביר את ייצור החומצה האצטית, אך מצד שני, סך חומצות השומן הנדיפות היה הנמוך ביותר בטיפול EM שמשמעותו תחמיץ אנרגטי יותר, שהתבטא בתכולת אנרגיה נטו (NE_L) גבוהה יותר. טיפול ה-Urea לא הראה מגמתיות קבועה של נעילות חומר יבש ו-NDF לאורך ימי ההחמצה כך שניתן להסיק מכך שאין ל-Urea כל השפעה על נעילות התחמיץ. אמנם נעילות במבחנה נחשב לאחד ממבחני הנעילות המהימנים ביותר, אך חשוב לזכור כי מדובר בדוגמאות הטחונות לגודל אחיד של 2 מ"מ, דבר שלרוב אינו קורה במציאות. גודל המזון הגס הנכנס למערכת העיכול של מעלי גירה לרוב אינו אחיד ואינו מגיע לממדים קטנים כמו בניסוי וזו נקודה שיש להתחשב בה.

2. תחמיצי תירס

אחת המטרות של שימוש בתוספי החמצה היא הקטנת הפסדים בחומר היבש כתוצאה מתסיסה יעילה יותר (Yitbarak et al., 2014). ההפסדים הגדולים ביותר בתכולת החומר היבש נרשמו בטיפול הביקורת לאורך כל ימי ההחמצה והנמוכים ביותר בטיפול המשולב- EM+Urea (טבלה מס' 7). ניתן לייחס זאת לניצול יעיל יותר של הנוטריינטים ע"י החיידקים בטיפולים השונים בזמן התסיסה וגם לכך שלתוספים עצמם ישנה תכולת חומר יבש משלהם ששומרת על תכולת חומר יבש גבוהה יותר בטיפולים בהם הם נוכחים (Demirel et al., 2003). pH תחמיצי התירס בכל הטיפולים ירד מתחת ל-4 כבר לאחר יום בהחמצה מפני שתירס נחשב קל להחמצה עקב תכולת פחמימות מסיסות גבוהה (Bentley et al., 1955; Van der Kolk & Smink, 2004) ויכולת התרסה נמוכה (Low Buffer Capacity) לעליית חומציות (Ward and De Ondraza, 2000). באופן לא מצופה pH טיפול EM הוא הגבוה ביותר בימים 14 ו-28 (3.97) אך יחד עם זאת עבודות של Danner et al. (2003) ו-Kristensen et al. (2010) שבדקו השפעת לקטובציליים

הטרופרמנטטיבים על תחמיצי תירס גם הראו ערכי pH גבוהים יותר בתחמיץ מטופל לעומת ביקורת. נתונים אלה נובעים מהעובדה שחומצה לקטית נוצרת בשיעור נמוך יותר בעת שגשוגם של לקטובציליים הטרופרמנטטיבים.

המטרה העיקרית בהוספת אוריאה בעת הכנת תחמיצים היא העשרת הירק בחנקן ובהתאם לכך צפויה עלייה בתכולת החלבון הכללי (Kaiser, 2004). כצפוי, תכולת החלבון הכללי עלתה מהר יותר לאורך ימי ההחמצה כאשר נוספה אוריאה בעת הכנת התחמיץ ובטיפול המשולב של EM ו-Urea העלייה אפילו יותר גדולה (12.7% ב-EM+Urea ו-11.3% ב-Urea לעומת 9.2% בביקורת ביום 28). העלייה שנראתה גם בטיפול EM (10.5% ביום 28) מעידה על ניצולת חנקן טובה יותר של חיידקי התכשיר.

תכולת פחמימות דופן התא היא הגבוהה ביותר בטיפול הביקורת בתחמיצי התירס ביום 28-53.5%, 47.8% ו-45.1% בביקורת, EM ו-Urea, בהתאמה. כאשר ההבדל מתבטא בעיקר בתכולת ה-ADF שם ההבדלים דומים לערכי ה-NDF (35.8%, 29.7% ו-29% בביקורת, EM ו-Urea בהתאמה), והמשמעות היא יותר ליגנין וצלולוז- פחמימות דופן תא המתפרקות רק במדיום חומצי ונחשבות לקשות פירוק. בניגוד לכך, במחקר של (Demirel et al, 2003), בו נבדקה השפעת האוריאה על תחמיצים מזנים שונים של תירס נמצא כי תכולת ADF נמוכה בתחמיץ תירס בעת הוספת אוריאה תלויה בזן התירס ובתכולת החומר היבש, כלומר ישנם זנים שאוריאה מורידה תכולת ADF וישנם שהמגמה הפוכה. בעבודה זו, כנראה נוכחות האוריאה הביאה לתסיסה מוגברת, נוכח הירק האנרגטי, שגרם לפירוק פחמימות מבניות ולירידה בתכולתן.

תכולת החומצה הלקטית נמצאה ביחס הפוך לירידת ה-pH. ייצור החומצה נמצא במגמת עלייה לאורך הימים בטיפולי הביקורת, EM, ו-EM+Urea, לעומת טיפול ה-Urea שמראה ערכים גבוהים החל מהיום הראשון אך ללא מגמת עלייה בהמשך. כאמור, הוספת אוריאה מומלצת כאשר מדובר בתחמיץ עתיר אנרגיה כדוגמת תירס והתוצאה היא תסיסה חזקה המתבטאת בעיקר בחומצה הלקטית (Bentley et al., 1955; Van der kolk and Smink, 2004). שתי עבודות מאת (Schmutz et al. (1969 ו-Demirel et al. (2003, שבחנו השפעת אוריאה על ערך תזונתי של תחמיצי תירס, הראו כי נוכחות האוריאה האטה את ירידת ה-pH למרות ייצור חומצה לקטית מוגבר. אולם בשתי עבודות אלה, וגם כאן, pH התחמיץ הגיע לטווח אופטימלי הנמוך מ-4. באופן די מפתיע, טיפול ה-EM מראה על עלייה ב-pH בימים 14 ו-28 (pH=3.97) למרות ייצור מתגבר של חומצה לקטית. ייתכן, שתכשיר EM-Zoo הכיל מיקרואורגניזמים שהתפתחו באופן תחרותי בתחמיץ והפרישו תרכובות בעלות יכולת התרסה שגרמה לסתירה של

Schmutz et al. - Danner et al. (2002), Kristensen et al. (2010), הראו כי הוספת לקטובציליים הטורפרמנטטיבים מגבירה את ייצור החומצה האצטית על חשבון חומצה לקטית, ותוספת אוריאיה אינה מראה הבדלים מובהקים מטיפול ביקורת. בעבודה זו אכן הייתה ירידה בייצור החומצה הלקטית בימים הראשונים, אך ייצור החומצה האצטית דווקא נחלש בטיפול EM בעוד בטיפול האוריאיה (Urea - EM+Urea) הראו ערכים גבוהים של חומצה אצטית הדומים לביקורת. חומצת אצטית בעלת קבוע פירוק יחסית ($pK_a=4.8$) דומה לחומצה הלקטית ($pK_a=3.86$) ומשפיעה ביותר מבין חומצות השומן הנדיפות על ירידת ה-pH (Seglar, 2003). ייצור מועט ולא מצופה של אצטית בטיפול EM (2.3 גרם/100 גרם ח"י לעומת 3.5-3.6 בטיפולים האחרים) יכול להסביר את ערכי ה-pH הגבוהים יותר. העובדה כי טיפול המשלב חיידקים ואוריאיה הראה ייצור מוגבר של חומצה לקטית (2.87 גרם/גרם ח"י) ואצטית (3.6 גרם/100 גרם ח"י) מביא למסקנה כי תכולת החנקן בירק המוצא לא הספיקה ליעילות של תוספת חיידקים הטורפרמנטטיבים בלבד. החומצה הפרופיונית, בעלת תפקיד של טעם וריח נוצרה בטיפול EM בשיעור גבוה פי 10 משאר הטיפולים. כך הדבר גם בעבודתו של Kristensen et al (2010). מעבר לתפקיד של טעם וריח, לחומצה הפרופיונית תפקיד בהורדת pH וחיזוק היציבות האירובית (Seglar, 2003) שנדון בהמשך. סך כל חומצות השומן הנדיפות מהווה מדד להפסדים אנרגטיים באנרגיה בת-תסיסה של המזון, שהיא למעשה אנרגיה אצורה במזון וזמינה לתסיסה בכרס בעל החיים. בטיפול EM סך החומצות הוא הנמוך ביותר ובטיפול המשולב (EM+Urea) הוא הגבוה ביותר, מה שמחזק את הטענה כי הוספה של חיידקים וחנקן לירק עם תכולה גבוהה של אנרגיה זמינה מביא לתסיסה חזקה וריבוי בתוצרים מצד אחד אך להפסדים גדולים יותר מאידך.

ערכי ה-pH בכל ארבעת הטיפולים לאחר 5 ימי חשיפה לאוויר אינם בטווח של תחמיץ אופטימלי (סביבות 4). חומצות לקטית והאצטית הן העיקריות שישפיעו על עמידות התחמיץ בפני חשיפה לאוויר כאשר גם לפרופיונית (שנוצרה רק בטיפול EM) יש השפעה קלה. בטיפול EM ייצור חומצות לקטית ואצטית הוא הנמוך ביותר, אך העמידות הגבוהה ביותר בעת החשיפה לאוויר נראתה בטיפול זה, ערכי ה-pH הנמוכים ביותר וכמות נמוכה של CO_2 שנפלט מהתחמיץ, אותם ניתן לשייך לחומצה הפרופיונית שנוצרה אך ורק בתחמיץ EM. (Danner et al. (2003), Kristensen et al. (2010) - Filya (2003) ביצעו עבודות שעסקו במבחני יציבות אירובית לתחמיצי תירס ומצאו כי הוספת לקטובציליים הטורפרמנטטיבים מגבירה משמעותית את עמידות התחמיץ, והגורם כאן הוא עלייה משמעותית בייצור החומצה האצטית. באופן כללי ירק התירס עתיר באנרגיה וכשמשתנים התנאים מאנאירוביים לאירוביים, מיקרואורגניזמים יכולים לשגשג בתנאים החדשים למרות תוצרי תסיסה אנאירובית האמורים למנוע או לעקב זאת. ע"פ

Higa (2001), תכשיר EM מכיל בתוכו מיקרואורגניזמים נוספים מלבד לקטובציליים, ששגשוגם מביא לייצור חומרים בעלי פעילות אנטי-אוקסידנטית (נוגדי חימצון). כמותם והשפעתם לא נבדקו בעבודה זו, וישנה אפשרות שאלו מסייעים בחיזוק העמידות לאוויר בטיפול EM נוכח כמות פחותה של חומצות לקטית ואצטית בטיפול זה ביחס לאחרים.

כאמור, מיץ הכרס נאסף משתי פרות יבשות בעלות התקן קנולה כרסית הניזונות משחת דגן בלבד. שני הטיפולים בהם הייתה נוכחות Urea הראו אחוזי נעילות ח"י גבוהים (47.9% ו-47.5%) בהרבה מהביקורת (40.2%) וטיפול EM (42.6%) (טבלה מס' 12). בהתאם לכך תכולת האנרגיה נטו במזון הייתה ביחסים דומים בין הטיפולים בהתאם לחישובי (NRC 2001). זהו אלמנט נוסף המעיד על יעילות הוספת אוריאה לתחמיצי תירס. בעבודתו של Weinberg et al (2007) נבדקה השפעת הוספת לקטובציליים הומו והטרופרמנטטיבים לתחמיצי חיטה ותירס על נעילותם במבחנה, וגם שם הוספת חיידקים מקבוצת הטרו העלתה באחוזים בודדים את נעילות כלל החומר היבש בהשוואה לתחמיץ תירס לא מטופל. במחקר של Demirel et al. (2003), נמצא כי בשלושה מתוך ארבעה זני תירס שנבדקו האוריאה שיפרה באופן מובהק את נעילות התחמיץ. נעילות NDF בטיפול האוריאה הייתה נמוכה ביחס לטיפול ביקורת ו-EM וניתן להשליך זאת על תכולת NDF והמיצולוץ נמוכות בטיפול זה. כלומר, המיצולוץ שעבר פירוק בעת התסיסה האנאירובית, הפך לפחמימה מסיסה ונעילותו נכללת כחלק מנעילות כלל החומר היבש. הוכחה נוספת ליעילות הוספת אוריאה בעת הכנת תחמיצי תירס.

3. סיכום

תוספי החמצה שנבדקו בעבודה זו הראו יתרונות רבים בשני סוגי הירק עליהם נבדקה השפעתם. בתחמיצי החיטה, ראינו כי תכשיר EM גרם לירידת pH נמוכה יותר, עלייה בתכולת חלבון כללי, ייצור מוגבר של חומצה לקטית, עמידות חזקה בעת החשיפה לאוויר ועלייה בנעילות כלל החומר היבש שמשמעותה תחמיץ בעל ערך אנרגטי גבוה יותר. הוספת אוריאה לחיטה, הגבירה כצפוי את תכולת החלבון, הגדילה במעט את ייצור החומצות לקטית ואצטית, חיזוק עמידות התחמיץ בחשיפה לאוויר ועלייה בנעילות כלל החומר היבש. כל אלה הינם ביטוי של שיפור החמצה ע"י התוספים. בעוד EM גורם לנוכחות מרובה של חיידקים מתסיסים, אוריאה אמנם מאטה את תהליך התסיסה אך גורמת לו להימשך זמן ארוך יותר. ירק תירס נחשב קל יותר מהחיטה להחמצה נוכח תכולת פחמימות מסיסות גבוהה יותר. מכאן, שהיתרונות שהוספת התכשירים היו פחות בולטים מאשר בחיטה אך עדיין קיימים. תכולת החלבון הכללי עלתה משמעותית בנוכחות שני התכשירים ביחס לביקורת. תכולת ה-NDF ירדה וזו תוצאה ישירה של תסיסה חזקה ופירוק פחמימות מבניות שיהפכו את הירק לפריק יותר. בכל הטיפולים ייצור

החומצה הלקטית היה בשיעור גבוה יותר מהחיטה, נתון שמחזק את הטענה כי ירק התירס קל יותר להחמצה. במבחן היציבות האירובית לא נראו הבדלים משמעותיים כמו בחיטה אך תכשיר EM גרם לתחמיץ עמיד יותר, למרות שייצור חומצות לקטית ואצטית היה מעט נמוך יותר בטיפול זה. ההשערה היא כי בתכשיר ישנם מיקרואורגניזמים נוספים פרט ללקטובציליים, שהשפעתם אינה נבדקה וישנה אפשרות שהם הגורמים לחיזוק העמידות. העלייה המשמעותית בנעילות כלל החומר היבש בטיפול האוריאיה היא המשך ישיר לירידה בתכולת פחמימות דופן תא, שמשמעותה ירק פריק וזמין יותר לבעל החיים.

לתכשירים אלו מגוון רחב של פעולות ויתרונות וכיום ישנם מערכות פשוטות ליישום והוספה שלהם לבור התחמיץ. חשוב לציין כי לתוספים אלה יש מחיר והופכים את התחמיץ ליקר יותר ויש להתחשב בכך בעת בניית מנת הזנה. תחמיצים אלו בעלי ערך תזונתי גבוה יותר, ולכן השימוש בהם יכול להפחית מקורות חלבון ואנרגיה יקרים יותר. בכך ישנה אפשרות לבנות מנת הזנה שאינה פוגעת בצרכי בעל החיים, אינה מייקרת את המנה ואף מוזילה אותה.

- 1) Allen, A. A. & Fitch, J. B. (1942). Hay Crop Silage. Minnesota Agriculture Experiment Station. Bulletin 360.
- 2) Amanullah, S. M., Kim, D. H., Lee, H. J., Joo, Y. H., Kim, S. B. and Kim, S. C. (2014). Effects of microbial additives on chemical composition and fermentation characteristics of barley silage. Asian-Australasian Journal of Animal Sciences 27, 511–517.
- 3) Ashbell, G., Weinberg, Z. G., Azrieli, A., Hen, Y. and Horev, B. (1991). A simple system to study aerobic deterioration of silages. Canadian Agricultural Engineering 33, 391-393.
- 4) Barker, S. B. & Summerson, W. H. (1941). The colorimetric determination of lactic acid in biological material. Journal of Biological Chemistry. Vol.138 pp.535-554.
- 5) Beauchemin, K. A. & Yang, W. Z. (2005). Effects of Physically Effective Fiber on Intake, Chewing Activity, and Ruminal Acidosis for Dairy Cows Fed Diets Based on Corn Silage. Journal of Dairy Science. 88: 2117-2129.
- 6) Bechdel, H. E., Huffman, C. F., Duncan, C. W., & Hoppert, C. A. (1936). Vitamin D Studies in Cattle. IV. Corn Silage as a Source of Vitamin D for Dairy Cattle. Journal of Dairy Science. 19: 359-372.
- 7) Bentley, O. G., Klosterman, E.W. & Engle, P. (1955) The Use Of Urea To Increase The Crude Protein Content Of Corn Silage For Fattening Steers. Ohio Agriculture Experiment.
- 8) Bolsen, K. K., Ashbell, G. & Weinberg, Z. G. (1996). Silage fermentation and silage additives. Asian-Australasian journal of animal science. 5: 483-493.
- 9) Charmley, E. (2001). Towards improved silage quality – A review. Canadian Journal of Animal Science. 81, 157–168.
- 10) Chedly, K. & Lee, K. (2000). Silage from by- products for smallholders. FAO Plant Production and Protection Papers. No. 161, 85–96.

- 11) Cherdthong, A., & Wanapat, M., (2010) Development of urea products as rumen slow-release feed on ruminant production: A review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*. 4(8): 2232-2241.
- 12) Danner, H., Holzer, M., Mayrhuber, E., & Braun, R. (2003). Acetic acid increases stability of silage under aerobic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:562–567.
- 13) Demirel, M., Yilmaz, I., Deniz, S., Kaplan, O. & Akdeniz, H. (2003). Effect of Addition of Urea or Urea Plus Molasses to Different Corn Silages Harvested at Dough Stage on Silage Quality and Digestible Dry Matter Yield. *Journal of Applied Animal Research*, 24:1, 7-16.
- 14) Dijkstra, J., Boer, H., Van Bruchem, J., Bruining, M. & Tamminga, S. (1993). Absorption of volatile fatty acids from the rumen of lactating dairy cows as influenced by volatile fatty acid concentration, pH, and rumen liquid volume. *British Journal of Nutrition*. 69:385–396.
- 15) Elferink, S. J. W. H. O., Frank, D., Jan, G. C., Sierk, S. F. (2000). Silage Fermentation Processes and Their Manipulation. In *FAO Electronic Conference on Tropical Silage*, Edition Netherlands: Food Agricultural Organization; 1-28.
- 16) Filya, I. (2003). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *Lactobacillus plantarum* on the fermentation, aerobic stability, and ruminal degradability of low dry matter corn and sorghum silages. *Journal of Dairy Science*. 86:3575-3581.
- 17) Filya, I., Ashbell, G., Hen, Y. and Weinberg, Z.G. (2000). The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Animal Feed Science and Technology* 88, 39–46.
- 18) Henderson, N. (1993). Silage additives. *Animal Feed Science and Technology*. 45, 35-56.
- 19) Higa, T. & Parr, J. F. (1994). Beneficial and Effective Microorganisms for a Sustainable Agriculture and Environment. *International Nature Farming Research Centre*, Atami, Japan, p. 16

- 20) Higa, T. & Wididana, G. N. (1991b) Changes in the soil microflora induced by Effective Microorganisms. Proceedings of the First International Conference on Kyusei Nature Farming. U.S. Department of Agriculture, Washington, DC. p.153-162.
- 21) Higa, T. (2001). The Technology of Effective Microorganisms– Concept and Philosophy. University of The Ryukyus, Okinawa, Japan.
- 22) Kaiser, A. G. (2004). Silage additives. Successful Silage. Dairy Australia and New South Wales Department of Primary Industries. Chapter 7, 170-196.
- 23) Kristensen, N. B., Sloth, K. H., Hojberg, O., Spliid, N. H., Jensen, C. & Thøgersen, R. (2010). Effects of microbial inoculants on corn silage fermentation, microbial contents, aerobic stability, and milk production under field conditions. *Journal of Dairy Science*. 93:3764–3774
- 24) Kung, L. (2005). Aerobic stability of silages. In: Proceedings of the Conference on Silage for Dairy Farms, Harrisburg.
- 25) Kung, L. and Shaver, R. (2001). Interpretation and use of silage fermentation analysis reports. *Focus on Forage*. 3:1–5.
- 26) Muck, R. E. (2010). Silage microbiology and its control through additives. *Revista Brasileira de Zootecnia*. v.39, p.183-191.
- 27) Muck, R.E., Nadeau, E. M. G., McAllister, T. A., Contreras-Govea, F. E., Santos, M. C. & Kung Jr, L. (2018). Silage review: Recent advances and future uses of silage additives. *Journal of Dairy Science*. 101:3980–4000.
- 28) Newman, Y. C. & Adesogan, A. T. (2014). Silage harvesting, storing and feeding. IFAS Extension, University of Florida, Gainesville.
- 29) Rotz, C. A., Ford, S. A. & Buckmaster, D. R. (2003). Silages in Farming Systems. In: Al-Amoodi, editor: *Silage Science and Technology*, Madison, Wisconsin, USA. p. 505-546. No. 42
- 30) Schmutz, W. G., L. D. Brown, & J. W. Thomas. (1969). Nutritive value of corn silages treated with chemical additives for lactation. *Journal of Dairy Science*, 52:1408-1412.
- 31) Schoenian, S. (2005) Ruminant Digestive System, [www. sheep101.info](http://www.sheep101.info).

- 32) Schroeder, J. W. (2004). Silage Fermentation and Preservation. AS-1254. NDSU Extension Service, Fargo, ND.
- 33) Seglar, B. (2003). Fermentation Analysis and Silage Quality Testing. Proceeding of the Minnesota Dairy Health Conference, pp. 119–136.
- 34) Van der Kolk, L. J. & Smink, W. (2004). Effects of the use of EM-silage in corn silage. Feed Innovation Services.
- 35) Van Soest, P. V., Robertson, J. B., & Lewis, B. A. (1991). Methods for dietary fiber, neutral detergent fiber, and nonstarch polysaccharides in relation to animal nutrition. *Journal of Dairy Science*, 74(10), 3583-3597.
- 36) Ward R. T. and De Ondraza, M. B. (2000). Fermentation analysis of silage: use and interpretation. In: Tri-State Dairy Nutrition Conference; pp. 117-135.
- 37) Weinberg, Z. G. & Muck, R. E. (1996). New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. Elsevier Science B. V. *FEMS Microbiology Reviews*. 19: 53-68.
- 38) Weinberg, Z. G., Ashbell, G. and Hen, Y. (1999). The effect of *Lactobacillus buchneri* and *L. plantarum*, applied at ensiling, on the ensiling fermentation and aerobic stability of wheat and sorghum silages. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology* 23:218–222.
- 39) Weinberg, Z. G., Shatz, O., Chen, Y. Yosef, E., Nikbahat, M., Ben-Ghedalia, D. and Miron J. (2007). Effect of lactic acid bacteria inoculants on in vitro digestibility of wheat and corn silages. *Journal of Dairy Science*. 90:4754–4762.
- 40) Yitbarek, M. B. & Tamir, B. (2014). Silage Additives: Review. *Open Journal of Applied Sciences*, 4, 258-274.

Summary

Wheat and corn are the most common roughage feedstuffs in Israel due to suitable climate and relatively low growing costs. These crops are harvested during a specific season, but long-term used throughout the year. In order to preserve the nutritional values of the feeds as similar as the values at the harvest time, an effective preservation method such as ensiling should be used. This method is based on creating anaerobic (oxygen-free) conditions. Under these conditions, populations of microorganisms that utilize soluble carbohydrates thrive for fermentation while its products will enable long-term feed preservation in an acidic environment. In order to increase acidity, additives with different properties can be added during silage preparation. In Israel, roughage feedstuffs are used when formulating diets for ruminants, and therefore the importance of preparing high quality silages, with steady nutritional value and strong resistance to pathogenic factors.

The effect of EM-zoo and urea supplements on the preparation, nutritional value, stability and digestibility of wheat and corn silages was examined in this study. The EM-zoo supplement, included in the group of fermentation stimulants, is a mixture of microorganisms, mainly heterofermentative lactobacilli, and their main fermentation product is lactic acid that will increase the acidity. Urea is included in the nutrient group and its role is to enrich the crop with available nitrogen for microbial protein synthesis and thus, increase the overall crude protein in the silage.

Wheat and corn were collected at harvest and were treated by four treatments: 1) Control 2) Adding 1 liter of EM per ton of fresh plant material 3) Adding 4 liters of urea (21% nitrogen) per ton of fresh material 4) Combined treatment of EM and urea at the same levels mentioned above. The treated plant materials were placed in 1 liter vacuum jars/bags to create anaerobic conditions and ensiled for 1,7,14 and 28 days. On the treated silages, at different incubation times analyzes

were carried out to test for acidity, chemical composition, protein content, lactic acid, volatile fatty acids, aerobic stability and in vitro digestion.

It was hypothesized that EM supplement would improve the acidification process, resulting in a rapid decrease of pH values by increased lactic acid production, and improve silage stability under aerobic conditions. Urea supplementation would enrich the silage with nitrogen which would significantly increase the total protein content, however, it will slow down the pH descent because the urea acts as a buffer itself. Furthermore, it is also expected that both additives, which increase fermentation processes, will result in a more degradable and digestible silage.

We found that in wheat silage, the pH drop was indeed faster in the silage treated with EM and these results are directly linked to the production of lactic and acetic acids which are the main cause for the rise in acidity. In corn, EM silage actually showed the slowest drop in pH. However, in all treatments, in both wheat and corn, the pH values reached the range of optimal silage, below 4. The urea treatments, aimed to enrich the crop with nitrogen, did show an increase in crude protein. This increase was much more prominent in corn than in wheat, since, according to many studies, enrichment of silage with urea is more efficient and acceptable when applied to energy-rich plant material and low in nitrogen such as corn.

Lactic acid, the most desirable fermentation product in silage, has shown a steady upward trend throughout the ensiling days in EM treatments, as this additive contains lactic acid bacteria which ferment sugars mainly to lactic acid. Increased acid production did not only affect the rise in acidity but also the stability of silage when exposed to air. The corn and wheat silages treated with EM showed stronger stability compared to the other treatments when exposed to air. In wheat silage, the pH values after 5 days exposure to aerobic conditions remained within the ideal range.

In vitro digestion test showed that wheat silage treated with EM exhibited the highest digestibility (TDN), which means that it has the highest energetic values. In corn silage, the treatments in which urea was applied showed the highest digestibility values, supporting the argument and recommendation to enrich corn silage with urea.

Preserving forage as silage is especially important when feeding with high roughage diet. Silage additives can be used in order to manage the every year challenge comes when the main goal is to make permanent and high nutritional value silage. The additives tested in this study showed benefits compared to the control treatment. In wheat silages, EM result increased acidity, desirable fermentation products, increase in crude protein content, strong stability when exposed to air and an increase in digestion. In the corn silage, the two urea treatments stood out for higher crude protein content and dry matter digestion. These additives have significant advantages and should be positively considered, taking into account the economic viability.

**The effect of heterofermentative microorganisms and
urea supplements on preparation, nutritive value,
stability and digestibility of corn and wheat silages**

M.Sc Thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty of
Agriculture, Food & Environment

The Hebrew University of Jerusalem

For the Degree

'Master of Sciences'

By

Ira Pelech

September 2019

Rehovot