

דו"ח לתכנית מחקר מספר : 820-0281-11

דו"ח מסכם 2013

השפעת תוספת של ספונינים וטנינים למנת מעלי גירה על ייצור מתאן ויעילות ניצול האנרגיה בכרס

The effect of saponins and tanins in the ruminants diet on methane production and energy utilization in the rumen

מוגש להנהלת ענף בקר

ע"י

סמיר מבגיש המחלקה לבעלי חיים, הפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית, האוניברסיטה העברית.
Sameer J. Majeesh, Department of Animal Sciences, The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food, and Environment, The Hebrew University of Jerusalem, P.O.B. 12, Rehovot 76100. E-mail: Majeesh@agri.huji.ac.il.

תקציר

ייצור המתאן בכרס מעלי הגירה, מהווה כ- 15% מאובדן האנרגיה הנעכלת במנה. ייצור מתאן ממוצע מהווה 30-40% מסה"כ ייצור המתאן בענף החקלאות במדד גלובאלי. מתאן תורם לאפקט החממה הגלובלי לכן, מאמצים רבים נעשים ע"י חוקרים בענף החקלאות להפחית את ייצורו והגדלת יעילות ניצולת המזון בענף מע"ג. במחקר הנוכחי נבדקו השפעותיהם של תוספי מזון שונים: חילבה 60, חילבה 90, פסולת רימונים וגפת זיתים על תהליך התסיסה בשיטת כרס מלאכותית. כל תוסף נבדק בארבעה ריכוזים שונים (0%, 0.5%, 1%, 2%) על בסיס חומר יבש. כמו כן, נבדקו פרמטרים מאפייני תסיסה מיקרוביאלית בכרס: pH מצע לפני ואחרי תסיסה, ריכוז אמוניה, חומצות שומן נדיפות (חש"ן). פרמטרים אלו נבדקו לאחר תסיסה של 12 שעות בעוד שכמות המתאן נבדקה כל שעתיים במהלך תסיסה בת 12 שעות. בנוסף נבדקה נעכלות החומר היבש במנה במערכת מבחנה. במחקר נעשה לראשונה שימוש במערכת חדשה, Ankom RF gas production system המאפשרת דיגום גזים ובדיקת לחצים. המערכת הוכיחה את עצמה כמדויקת. הממצאים מראים כי פסולת רימונים גורמת לצמצום ייצור המתאן (ירידה של 39%) ולירידה בקצב יצירתו (8-12 שעות מתחילת התסיסה) ללא השפעה על ניצולת המזון (בריכוז של 1%). חילבה 60, נמצא כגורם לעלייה בייצור המתאן (עלייה של 58%) ובו בעת מצמצם את ייצור האמוניה (ירידה של 6%). לפיכך, ניתן להשתמש בתוסף זה (בריכוז של 2% מ DM) במנות המכילות כמות קטנה של מזון גס. גפת זיתים, הביא לפגיעה כללית באוכלוסייה המיקרוביאלית (אך לא בחיידקים יוצרי המתאן) ועקב כך לירידה בייצור האמוניה (ירידה של 20%) ולירידה בנעכלות המזון (ירידה של 23%). אם כך, ניתן להשתמש בתוסף (בריכוז של 0.5%) במנות המכילות כמות גדולה של חלבון פריק ובכך לשפר את ניצולת החנקן. חילבה 90, לא נמצא כבעל השפעה על ייצור המתאן ועל ניצולת המזון. מן הממצאים ניתן לראות שישנה השפעה שונה בין סוגי התוספים השונים על תהליך התסיסה. פסולת הרימונים הינו התוסף המועדף בין התוספים השונים לצמצום ייצור המתאן. כמו כן, ניתן להשתמש בתוספים גפת זיתים וחילבה 60 לשיפור ניצול החנקן.

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא

תאריך: 25/05/2014

חתימת החוקר:

רשימת פרסומים שנבעו מהמחקר: עבודת גמר ותוכנית אמירים.

עמוד

3
4
4
5
7
18
21
21

תוכן עניינים

.1 מבוא
.2 מטרות המחקר
.3 פירוט המחקר
3.1 פירוט הניסויים
3.2 תוצאות
.4 דיון
.5 מסקנות
.6 ספרות מצוטטת

1. מבוא:

הכרס של מעלי גירה (מע"ג) מכילה מכלול שלם של מיקרואורגניזמים (מק"א) החיים בתנאים אנאירוביים שמתססים את המזון ומייצרים תוצרי לוואי שמביאים תועלת אנרגטית וחלבון מטבולי לחיה. בין יתר תוצרי הלוואי של מק"א, ייצור מתאן בכרס מהווה כ- 2-15% מאובדן האנרגיה הנעכלת הנצרכת במנה. מדד זה תלוי בטיב והרכב המנה (Goel et al., 2008b). ייצור מתאן ממע"ג מהווה 30-40% מסה"כ ייצור המתאן בענף החקלאות במדד גלובאלי. מתאן תורם לאפקט החממה הגלובלי לכן, מאמצים רבים נעשים ע"י חוקרים בענף החקלאות להפחית את ייצורו והגדלת יעילות ניצולת המזון בענף מע"ג (Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008b). Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008, Rochfort et al., 2008a). תוספות של כימיקלים כמו חומצות אורגניות, שמנים אתרים, אנטיביוטיקות שונות ותוספים פרוביוטיים שימשו למזעור והקטנת המסלולים המטבוליים בכרס שתוצר הסופי שלהם מתאן (Rochfort et al., 2008). הפחתת ייצור המתאן בכרס מתרחש כתוצאה מהקטנת התסיסה של חומר אורגני בכרס ושינוי (shift) מקום תהליכי העיכול מהכרס למעייים (Busquet et al., 2006). תהליך הקטנת תסיסת חומר אורגני בכרס מביא לירידה בזמינות המימן לייצור ה-CH₄ ע"י מק"א בעלי יכולת מתנוגגית בתהליך מתנוגג (methanogenesis) (Goel et al., 2008b). התוצאה של השינוי הנ"ל חיסכון באיבוד אנרגיה מטבולית בכרס ורווח נטו בתהליך העיכול והספיגה במעי הדק. תוספות של תרכובות פנוליות כמו ספונינים במזון של מע"ג מביאה למוות של פרוטוזואות ע"י ליוזיס והקטנת מספרם דבר המפחית את תהליך המתנוגג. יתכן על ידי השפעה על אוכלוסיות מקירואורגניזמים מקבוצת הארכאה המקיימים יחסי גומלין עם אוכלוסיות הפרוטוזואה ותורמות בצורה משמעותית לייצור המתאן (Makkar and Becker, 1997). כמו כן, ספונינים יש להם השפעה דומה ליונופורים על חיידקי הכרס גרם חיוביים ושינוי אוכלוסיות החיידקים לכיוון ייצור פרופיונאט (Rochfort et al., 2008). מאידך, טנינים מורידים את ייצור הגאזים בכרס באמצעות אינטראקציה עם החלבון במנה ומניעת דיאמנציה ע"י החיידקים והאטת קצב התסיסה המק"א באופן כללי (Carulla et al., 2005). הידע הקיים בנושא בספרות דל מאד ורובו מתרכז בניסויים שנערכו בניסויי in vitro.

למשל לאחרונה פורסמה עבודה המתארת סקירה רחבה של צמחי מרפא (158 צמחים שונים) והשפעתם על אופי התסיסה המק"א במבחנה עם דגש על ייצור המתאן (Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008a). שלושה צמחים מתוך הצמחים שנבדקו הראו השפעה מובהקת על פרמטרים של תסיסה מק"א במבחנה. מבין הצמחים שנבדקו היו שום (*Allium Sativum*), ריבס (*Rhubard, Rheum officinale*) ופרנגולה (*Frangula/ alder buckthorn; Frangula alnus*). הצמחים הנ"ל נוספו בכמות קבועה (70 מ"ג חומר יבש, ח"י) למצע של 450 מ"ג ח"י של תערובת מזון שהכילה שחת אספסת, שחת דגן וגרעיני שעורה ביחס של 30% מזון מרוכז ו-70% מזון גס. כמו כן, התוספות הנ"ל ייצרו חומצות שומן נדיפות ב-14% בהשוואה לטיפול הביקורת ויחס חומצה אצטט לפרופיונית ירד מ-2.77 ל-1.8. ייצור המתאן קטן ב-61% יחסית לביקורת באופן יחסי לייצור סה"כ הגזים במבחנת הניסוי. בניסוי דומה שבוצע ע"י אותה קבוצת מחקר (Garc'ia-Gonza'lez et al.,)

2008b) הראה שיש קשר ישר בין ייצור הגז, הפחתת היחס של חומצה אצטט לפרופיונית והקטנת ייצור המתאן לבין כמות הצמחים (ריבס ופרנגולה) במצע. היחס שהומלץ בעבודה זו היה בין 0.5 גר' ל-1 גר' צמח מרפא לליטר מצע. מעל ל-1 גר' לליטר התוספות הנ"ל עלולים לגרום לפגיעה בתסיסה המק"א ונעכלות חומר יבש ו-NDF.

לכן, בהצעת תלת שנתית זו אנו מציעים לבדוק את השפעת תוספת של ספונינים וטנינים ממקור צמחי בצורתם הנקייה או הגולמית למנת מעלי גירה על מנת להגיע לכמות הרצויה ולקבל השפעה חיובית להורדת ייצור מתן ושינוי רצוי בייצור חומצות שומן נדיפות בכרס. כמו כן, תיבדק השפעת התוספים על נעכלות חומר אורגני ו-NDF בכרס.

2. מטרת המחקר

לאור האמור לעיל במחקר זה אנו נבדקו השפעת תוספת של ספונינים וטנינים במנת מעלי גירה על ייצור כמותי ויחסי של מתאן, ייצור חומצות שומן נדיפות ואמוניה, ונעכלות ח"י. בניסוי נבחנו תמציות גולמיות מסויה, חילבה (גרגרנית), העשירים בספונינים, ושל תמציות מפסולת חקלאית עשירה בטאנינים: גפת ענבים ופסולת רימונים.

3. פירוט עיקרי הניסויים

מוצע לערוך ניסויים לבחינת תוספים שונים ממקור צמחי בצורת הגולמית והנקיה בשתי מערכות: מערכת ניסויי *in vitro* במבחנה הינו כרס מלאכותית (כרמ"ל) המותאמת לאפשרות מדידת ייצור גזים ואנליזה שלהם, ובנוסף ממדים סטנדרטיים שניתן למדוד כמו חומצות שומן נדיפות (חש"ן), אמוניה ונעכלות של ח"י. המערכת מפורטת במאמרם של תיודורו ושותפיו (Theodorou et al., 1994). במחקר הנוכחי הועמדה שיטה חדשה לביצוע הניסויים הנ"ל. מערכת אנקום (Ankom RF gas production system) שימשה אותנו במהלך הניסויים למדידת ייצור הגז וריכוז המתאן ואילו מערכת כרמ"ל פשוטה שימשה למדידת נעכלות חומר יבש של המנה בניסויים השונים. במערכת אנקום המזון והמצע להדגרה (מיץ כרס ובופר) מודגרים בבקבוקי זכוכית ייעודיים של 125 מ"ל שניתן לפקוק אותם באופן הרמטי באמצעות מכסים ייעודיים למערכת. מכסים אלו מצויידיים בחיישנים של מד לחץ וטמפרטורה עם משדר ייחודי המשדר למערכת ממוחשבת כל העת את מדידות הלחץ והטמפרטורה בתוך הבקבוק.

3.1 תיאור הניסויים

מזונות: בכרס המלאכותית, השתמשנו בשחת ובתערובת לפיטום טלאים (שני המזונות נטחנו לגודל של 1 מ"מ). הרכב זה נבחר על מנת לדמה מנת מעלי יצרניות ויצור הגז במערכת מבחנה יהיה מדד מציאותי. **תוספי המזון:** חילבה 60 וחילבה 90 (זנים שונים של חילבה), סויה, פסולת רימונים תוצר לוואי מתעשיית הרימונים עברו מיצוי לפוליפנולים. תוצר המיצוי יובש בהקפאה ונטחן במטחנת סכינים לגודל חלקיקים של 1

מ"מ. פסולת זיתים סופקה כתוצר לוואי מתעשיית השמן (נטחנה לגודל של 1 מ"מ לאחר ייבוש בהקפאה, ושימשה אותנו כמות שהיא). אבקת Quberacho שימשה אותנו כמות שהיא. כל החומרים לפני השימוש נשמרו במקרר בטמפרטורה של 4 מ"צ. כל תוסף נבדק ב 4 ריכוזים, ביחס ל DM של המנה (0%, 0.5%, 1%, 2%) ולכל ריכוז היו 2 חזרות) וכל ניסוי בוצע בשני סיבובים.

מיץ הכרס: מיץ כרס נלקח משני כבשים בעלי קלונות כרסיות המוחזקות על מנת קיום המורכבת מבלייל גס ותערובת פיטום טלאים ביחס של 1:2, בהתאמה. מיץ הכרס נלקח לאחר צום של 36 שעות. לכבשים הייתה גישה חופשית למים, והמזון ניתן להם בכל תקופת הניסוי ב-12 חלקים שווים כל שעותיים באמצעות אבוס אוטומטי. המיץ עבר פעמיים סינון דרך 4 שכבות של בד גזה לפני שמירתו בתרמוס שחומם ל-39 מ"צ עד השימוש. לאחר מכן, מיץ הכרס עבר סינון נוסף במעבדה ועורבב מיד עם בופר מחומם (רוק מלאכותי ב-pH 6.8-7), ביחס של 1:4 לניסוי ייצור גזים וביחס של 4:1 לבדיקת נעילות חומר יבש במערכת כרמ"ל רגילה, בהתאמה.

כרס מלאכותית (כרמ"ל): לביצוע הכרמ"ל, השתמשנו בערכה של Ankom RF gas production system, הכוללת 14 בקבוקי זכוכית בנפח של 125 מ"ל ו-15 ערכות (מכסים) המתברגות על הבקבוקים, הדוגמים לחץ וטמפרטורה באופן קבוע המשודר ישירות למחשב באמצעות מערכת blue tooth. מכסה מס' 9 שימש לייחוס הערכים של שאר המערכת. לכל בקבוק זכוכית הוכנסה 437.5 מ"ג מנה (תערובת: שחת). לאחר מכן, הוספו כ-70 מ"ל מיץ הכרס (מהול) לכל בקבוק, תוסף המזון הנבדק ולבסוף הוזרם פחמן דו חמצני לכל בקבוק (במשך דקה). בסיום התהליך, הבקבוקים הוכנסו לאמבט מתנועע, שחומם מראש לטמפרטורה של 39 מ"צ במשך 12 שעות. בסוף תהליך התסיסה, נדגם ונסנן מכל בקבוק (דרך 4 שכבות של גזה) תצליל שהועבר למבחנה המכילה כספית כלוריד (ביחס של 9:1 למיץ הכרס) ועבר מיד להקפאה (ישמש לבדיקת אמוניה וחומצות שומן נדיפות).

בנוסף, בוצע סט נוסף של כרמ"ל רגילה, במבחנות פלסטיק בנפח של 50 מ"ל (8 מבחנות). אשר שימש כמערכת ייחוס לטיב מיץ הכרס והתסיסה המיקרוביאלית בין מחזורים. מזון הייחוס היה שחת קטנית שהוכנה מראש לכל תקופת המחקר.

כרמ"ל רגילה: לבדיקה זו 250 מ"ג של מזון הודגרו בארבע חזרות (מבחנות 50 מ"ל) ובנוסף ארבע מבחנות נוספות שימשו כבלאנק. לכל מבחנה הוכנס 20 מ"ל מיץ כרס (מהול כאמור לעיל) ונסגרו באמצעות פקקי בונזן. המבחנות הוכנסו לאינקובאטור בטמפרטורה של 39 מ"צ לפרק זמן של יומיים (כל 6 שעות המבחנות עורבבו ונוערו בעדינות). לאחר היומיים, הוסף לכל מבחנה (6M) HCl, עד ל-pH 1.3-1.5 והוסף פפסין והמבחנות הוכנסו שוב לאינקובאטור ליומיים. בסוף האינקובציה המבחנות עברו סירקוז ושיטיפה, ובוצעה הפרדה בין הפאזה הנוזלית למשקע. המשקע הוכנס לתנור ליבוש ללילה למדידת נעילות חומר יבש.

אנליזה של גז המאתן: האנליזה בוצעה באמצעות מכשיר ה-GC. בדיקת המאתן התבצע כל שעתיים (6 בדיקות לכל טיפול) במהלך התסיסה המיקרוביאלית במערכת אנקום. הגז נאסף, על ידי החדרת מזרק לפתח הייעודי במערכת, ושחרור נפח הגז למזרק. מהמזרק נשאב כל פעם $10 \mu\text{l}$ והוזרק למכשיר ה-GC. **אנליזה של אמוניה:** מיץ הכרס הופשר, ואחרי סירקון, נלקח $100 \mu\text{l}$ דוגמא מהתצליל. ריכוז האמוניה בוצע בשיטה ריאגנט הפינול.

אנליזה של חומצות שומן נדיפות (חש"ן): האנליזה התבצעה באמצעות מכשיר ה-GC. חומצה השומן Iso caproic שימשה כסטנדרט פנימי. המרת תוצאות הפלט של מכשיר ה-GC נעשו על ידי בניית עקום כיוול אשר הכיל את החומצות הנבדקות (Valerate, Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate) בריכוזים משתנים.

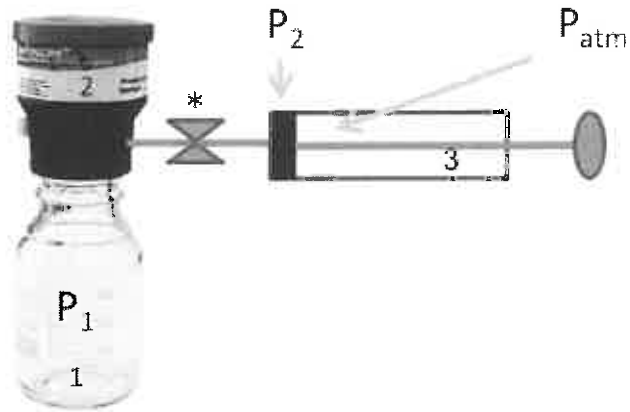
אנליזה של טונינים צפופים: כל תוסף עבר מיצוי על ידי אצטון 70% וסוניקטור, ובסוף נידוף האצטון. בשלב הבא הוסף לדוגמא Butanol:HCl ביחס של 95:5. פעם עם חימום בטמפרטורה של 95°C על מנת לזרוז את ראקצית הצבע, ופעם נוספת בטמפרטורת החדר (משמש כבלאנק – על מנת להחסיר את הצבע המקורי של התוסף). ריכוז הטונינים הצפופים בדגימות הנ"ל נבדק על פי עקרון בליעה של אור באורך גל של 450nm במכשיר Slit Spectra. על מנת להמיר את הבליעה לריכוז, נבנתה עקומת כיוול על ידי שימוש במיצוי של Quebracho בריכוזים ידועים של טונינים צפופים.

בדיקת חומציות: ה-pH נבדק בעזרת המכשיר pH/mV/Temp meter PL-600, בכרמ"ל רק בניסויים שמשך תסיסתם היה 12 שעות. הבדיקה נערכה לפני הוספת הפחמן הדו חמצני, ובתום התסיסה (לאחר 12 שעות).

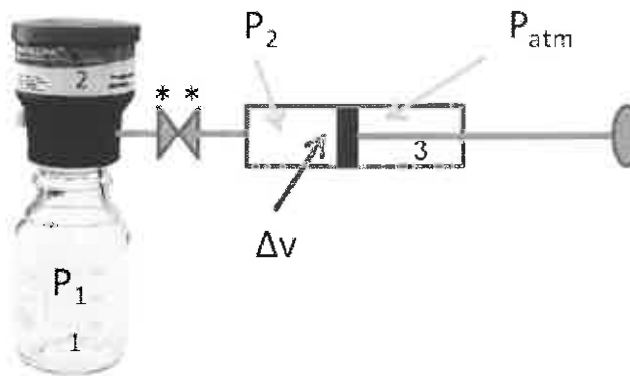
חישוב כמות המאתן: ריכוז המאתן בדגימת הגז שהתקבל מה-GC הוכפל בכמות הגז הכללית שנוצרו בפרקי הזמן במהלך התסיסה לאורך זמני הדיגום בניסוי. ריכוז המאתן חושב ביחידות של ml/l . כך, קיבלנו את כמות כלל גז המאתן שנוצרה בכל שעתיים ב- ml . על מנת להגיע לכלל הכמות שנוצרה, חיברנו את הערכים שקיבלנו. **דגימת הלחץ והנפח:** הלחץ במכשיר (P_1) נדגם באופן אוטומטי על ידי המערכת ומשודר אלחוטית ישירות למחשב (על ידי חלק 2, על פי תמונה מס' 1), דגימת הלחץ מתבצעת כל 5 דקות. על מנת לחשב את השינוי בלחץ המצטבר ביחס ללחץ השורר בסביבה למערכת ישנה בקרה, אשר דוגמת את לחץ הסביבה ומתחשבת בו בחישוב הלחץ המתפתח בבקבוקי התסיסה. מכיוון ששחררנו לחצים כל שעתיים (לבדיקת נפח וריכוז גז המתאן), התבצעה סכימה של הלחץ שנוצר כל שעתיים, פחות הלחץ שנשאר בכל לקיחת נפח. הלחץ נדגם ביחידות של psi ולאחר מכן הומר ליחידות לחץ אטמוספרי. נפח הגז נבדק על ידי חיבור מזרק פלסטיק בעל כבולת של 35 מ"ל לפתח הייעודי במערכת.

בתמונה מס' 1, מתואר מצב שבו התסיסה רק החלה, ולכן $P_1=P_2=P_{\text{atm}}$. לכן, פתיחת השסתום המחבר בין המערכת למזרק, לא תשנה את נפח הגז במזרק.

לעומת זאת, בתמונה מס' 2, $P_1 > P_2, P_{atm}$, ולכן, פתיחת השסתום תגרום למעבר גז מבקבוק התסיסה למזרק, עד למצב שבו $P_1 = P_2 = P_{atm}$ ובכך נקבל את הערך Δv שמבטא את נפח הגז שנוצר.



תמונה מס' 1. סקיצה המתארת את מערכת התסיסה בשני מצבים: בתחילת התסיסה או במהלכה לפני פתיחת השסתום.
 מקרא: 1- בקבוק התסיסה, 2- מודול, 3- מזרק, P1- לחץ בבקבוק התסיסה, P2- לחץ במזרק, Patm- לחץ הסביבה, Δv - שינוי בנפח הגז במזרק, * - שסתום סגור, ** - שסתום פתוח



תמונה מס' 2. סקיצה המתארת את מערכת התסיסה לאחר שהתסיסה התחילה בזמן פתיחת השסתום.
 מקרא: 1- בקבוק התסיסה, 2- מודול, 3- מזרק, P1- לחץ בבקבוק התסיסה, P2- לחץ במזרק, Patm- לחץ הסביבה, Δv - שינוי בנפח הגז במזרק, * - שסתום סגור, ** - שסתום פתוח

ניתוח סטטיסטי: ניתוח התוצאות בין הטיפולים השונים של כל תוסף נעשה באמצעות ניתוח שונות. מבחן Tukey שימש להפרדת הממוצעים. ניתוחים סטטיסטיים נעשו בתוכנת JMP 7. כל תוסף נבדק עצמאי ללא השוואה לתוספים האחרים.

3.2 תוצאות:

בניסוי נבדקו ריכוז מתאן, ריכוז אמוניה, קינטיקה (ייצור וקצב ייצור) של מתאן, חומציות, ריכוז חומצות שומן נדיפות (חש"ן). בדיקות אלו נערכו במבחני נעכלות במבחנה (in vitro) בשילוב עם תוספי מזון שונים (חילבה 60; חילבה 90; גפת זיתים; פסולת רימונים). בנוסף, נבדקה נעכלות כללית במבחנה בשילוב עם תוספי המזון השונים, כמו כן בוצעה אנליזה של המזונות ששימשו לתסיסה, וכן בדיקת ריכוז טאנינים צפופים בתוספי המזון.

הרכב המזונות

טבלה מס' 1. אנליזה כימית של מזונות הניסוי (מבוטאים באחוזים על בסיס חומר יבש).

מדד ^a	בליל	שחת	תערובת לפיטום טלאים
חומר יבש	58.0	90.9	87.9
אפר	14.3	9.2	13.7
NDF	50.8	53.7	20.4
ADF	28.1	43.4	6.3
ADL	2.8	9.0	2.7
מיצוי אתרי	8.95	4.6	6.0
חלבון כללי	11.0	12.5	18.0

^a ADL-acid detergent lignin, ADF-acid detergent fiber, NDF-neutral detergent fiber

ריכוז טאנינים צפופים:

טאנינים צפופים הם מטבוליים שניונים של הצמח. התוסף היחיד שהתקבל בניסוי הנוכחי היה בגפת זיתים שהכיל 2.1% מחומר יבש DM.

טבלה מס' 2. אחוז הטאנינים הצפופים בתוספי המזון.

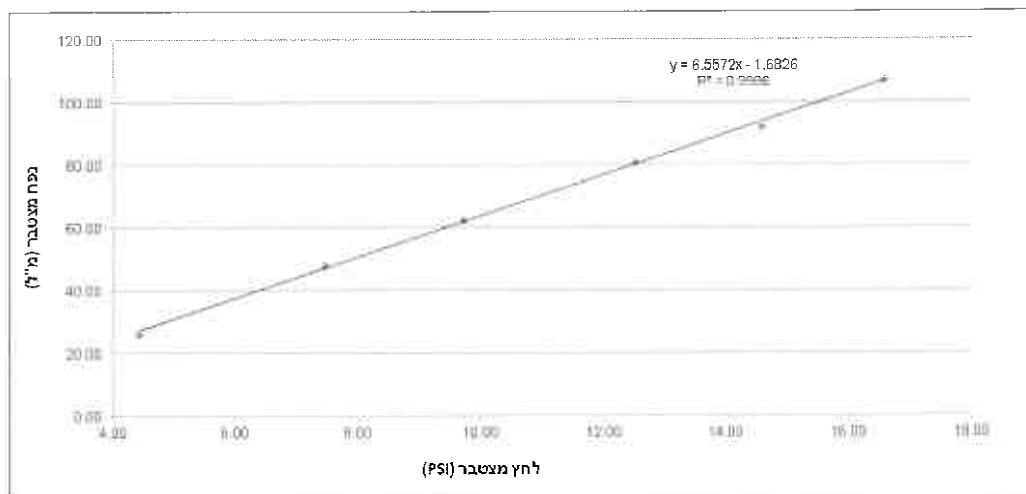
תוספי מזון	% טאנינים צפופים
חילבה 60	0
חילבה 90	0
פסולת רימונים	0
גפת זיתים	2.1

בדיקת התאמת המכשיר Ankom RF gas production system לניסוי של תסיסה ואנליזה של

גזים:

זוהי הפעם הראשונה שבה בוצע ניסוי תסיסה ואנליזה של גזים במערכת זו. כצפוי, התקבלה תלות בין הנפח ללהץ המצטבר בתסיסה של 12 שעות ($P < 0.05$), כמו כן התקבל קירוב לינארי בעל $R^2 = 0.9986$ (על פי

גרף מס' 1). המאפיין הבולט בגרף מס' 1 הוא שקיימת תלות ליניארית מושלמת בין הלחץ המצטבר לבין הנפח המצטבר.



גרף מס' 1: בדיקת המתאם שבין הלחץ והנפח המצטברים לאורך תסיסה של 12 שעות (לקוח מתסיסה שהתבצע בתאריך 3.1.2012 חילבה 90).

בדיקה נוספת שנערכה לבדיקת התאמת המכשיר לאנליזה של גזים היא בדיקת ריכוז המתאן מכלל הגזים שנוצרו במהלך התסיסה. כדוגמא נלקחה, בשעה השישית לתסיסה, תוצאה של טיפול בחילבה 90 שאינו משפיע על ייצור המתאן (ראה גרף מס' 5), נמצא שאחוז המתאן הינו 21% מהרכב כלל הגזים כפי שאמור היה להתקבל.

חילבה 60:

הטיפולים של החילבה היו בריכוזים: 0%, 0.5%, 1%, ו-2%. לאחר 12 שעות תסיסה נבדקו ייצור האמוניה, ה-pH, ייצור המתאן, הצטברות לחץ וריכוז החש"ן. בטבלה מס' 3 מרוכזות תוצאות הטיפולים של חילבה 60. חומציות המצע (pH) הייתה זהה בין הטיפולים לפני תהליך התסיסה. טיפולים 1% ו 2% בלבד גרמו לירידה מובהקת בייצור האמוניה ב- 8% ו 10%, בהתאמה, לעומת טיפול 0% ($P < 0.05$), אך הטיפולים עצמם היו זהים לפי מבחן Tukey. טיפולים 0.5%, 1%, 2% הביאו לירידה מובהקת ב-pH של 1%, 2% ו 3% בהתאמה. ממצא יוצא דופן ניכר בייצור המתאן, בטיפול 2% נמצאה עלייה מובהקת של 57% בייצור המתאן, ממצא הנוגד את הספרות המחקרית. הלחץ המצטבר היה זהה בין הטיפולים השונים. מאידך, ניתן להבחין במגמת עלייה של לחץ (טבלה מס' 3).

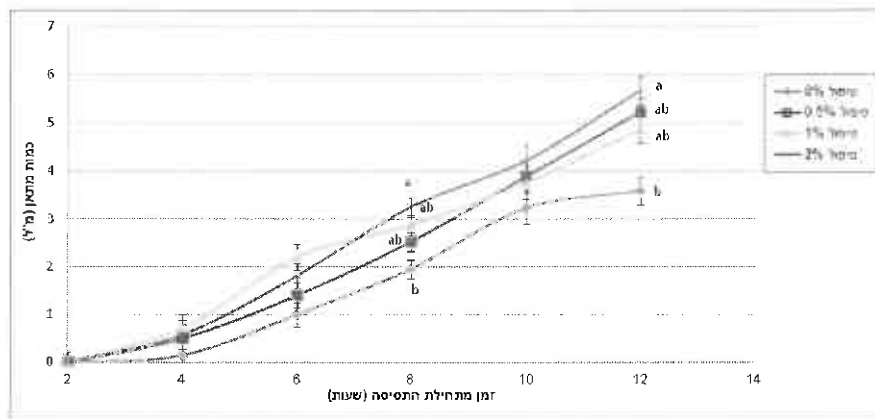
טבלה מס' 3. השפעת חילבה 60 בריכוזים משתנים על pH, התפתחות לחץ, ייצור אמוניה ומתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*, ובדיקת השפעת החילבה על ערך הנעכלות בשיטת כרמ"ל.

טיפול	אמוניה * (ml/dl)	מתאן (ml)	לחץ (atm)	%נעכלות	pH לפני התסיסה	pH אחרי 12 שעות תסיסה*
0%	a 2.83	b 3.59	2.01	68.71	7.63	a 6.56
0.5%	a 2.82	ab 5.23	2.01	67.85	7.6	b 6.49
1%	b 2.61	ab 4.86	2.09	68.86	7.61	c 6.40
2%	b 2.54	a 5.67	2.14	68.89	7.64	c 6.38
SEM#	0.041	0.29	0.56	0.8	0.02	0.01

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error of the mean

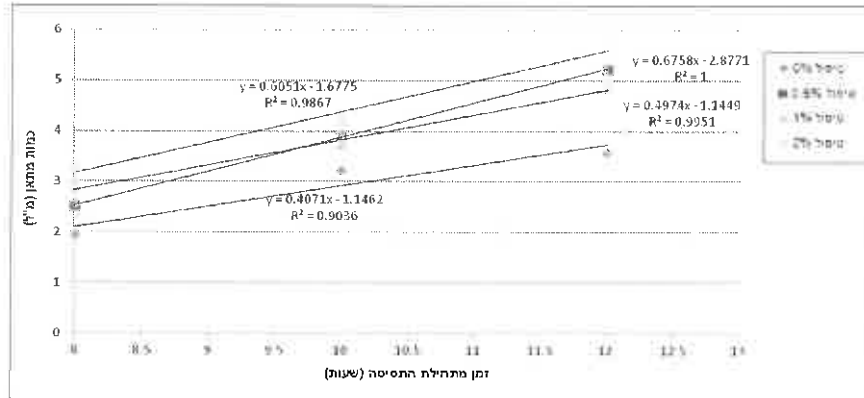
על מנת לחדד את תהליך ייצור המתאן לאורך זמן, נבדק ייצורו בנקודות זמן שונות (כל שעתיים) במשך 12 שעות. יש לציין שבספרות המחקרית יש מידע מועט על ייצור המתאן לאורך זמן. בגרף 2 מוצגות התוצאות של ייצור המתאן בתהליך התסיסה בהשפעת הטיפולים. מהגרף, ניתן לראות לאחר 8 שעות של תסיסה היה הבדל מובהק בין הטיפולים 2% ו 0%. החל משעה 10-12 לתסיסה עקום המתאן המצטבר בטיפול 0% הגיע לרוויה, לעומת שאר הטיפולים שהמשיכו במגמת עלייה.



גרף מס' 2. ייצור מתאן במהלך 12 שעות בתסיסת *in vitro* בשימוש בשחת ותערובת לפיטום טלאים ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף חילבה 60 בריכוזים משתנים.

אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$). Standard error of the mean מוצג על גבי הגרפים.

בנוסף לייצור המתאן יש השיכות גם לקצב הייצור המתאן. כפי שידוע, בספרות המחקרית לא נבדק קצב ייצור המתאן ככלל ולא כתלות בטיפולים שונים בפרט. בגרף מס' 3 מוצגים הממצאים של קצב ייצור המתאן בהשפעת הטיפולים השונים. מהממצאים עולה כי קצב הייצור בכל הטיפולים שהוצגו במחקר זהה. דהיינו, שיפועי העקומות המתארים את קצב ייצור המתאן היו זהים בין הטיפולים השונים, אך, ניתן להבחין בנטייה להתמתנות בקצב הייצור ככל שריכוז התוסף ירד.



גרף מס' 3. קצב ייצור מתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro שבה השתמשו בשחת ותערובת ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף חילבה 60 בריכוזים משתנים. קצב הייצור הינו השיפוע המתקבל מקירוב לינארי של התוצאות בטווח הזמנים של 8-12 שעות מתחילת התסיסה. אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
0.09 - Standard error of the mean

בנוסף נבדקו ריכוזי ויחסי חש"ן, בהשפעת הטיפולים השונים. ממצאי המחקר רוכזו בטבלה מס' 4. מהטבלה ניתן לראות שריכוזי ויחסי חומצות השומן הנדיפות זהים.

טבלה מס' 4. השפעת חילבה 60 בריכוזים משתנים על ייצור חומצות שומן נדיפות (Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate), במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro.

טיפול	%Acetate	%Propionate	A:P [§]	%Butyrate	%Isovalerate	**Valerate
0%	65.87	18.58	3.54	9.63	3.66	2.02a
0.5%	66.06	18.49	3.57	9.61	3.62	1.99ab
1%	66.14	18.38	3.60	9.72	3.57	1.98b
2%	65.78	18.62	3.53	9.81	3.58	2.00ab
SEM [#]	0.09	0.07	0.02	0.07	0.02	0.01

Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate - חושבו על פי היחס של החומצה מסך החומצות שנוצרו.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים מסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error of the mean

[§] היחס בין Acetate ל Propionate.

חילבה 90

תוסף מזון גוסף שנבדק הוא חילבה 90. השפעותיו בריכוזים שונים מוצגים להלן. בטבלה מס' 5 מוצגים השפעות הטיפוליים השונים (0%, 0.5%, 1% ו 2%) של חילבה 90, על מספר פרמטרים: ריכוז האמוניה, ריכוז המתאן, הצטברות הלחץ, וחומציות המצע לפני ואחרי התסיסה. כל הפרמטרים יצאו זהים.

טבלה מס' 5. השפעת חילבה 90 בריכוזים משתנים על pH, התפתחות לחץ, ייצור אמוניה ומתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*, ובדיקת השפעת החילבה על ערך הנעילות בשיטת כרמ"ל.

סיפול	אמוניה (ml/dl)	מתאן (ml)	לחץ (atm)	%נעילות	pH לפני התסיסה*	pH אחרי 12 שעות תסיסה*
0%	3.61	6.61	2.11	68.71	a 7.33	a 6.51
0.5%	3.65	5.92	2.10	74.27	a 7.22	b 6.45
1%	3.31	5.56	2.15	72.57	b 7.21	b 6.42
2%	3.15	6.09	2.15	71.94	b 7.21	b 6.45
SEM#	0.12	0.25	0.37	1.26	0.02	0.01

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error of the mean

בטבלה מס' 6 מוצגים תוצאות של השפעות הטיפולים על ריכוז החש"ן. מעיון בטבלה נמצא שריכוז החש"ן והיחסים ביניהם זהים.

טבלה מס' 6. השפעת חילבה 90 בריכוזים משתנים על ייצור חומצות שומן נדיפות (Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate), במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*.

טיפול	%Acetate	%Propionate	A:P ⁵	*%Butyrate	%Isovalerate	%Valerate
0%	64.56	18.87	3.42	10.17ab	3.94b	2.15
0.5%	63.76	19.19	3.32	10.48a	4.07a	2.19
1%	64.44	18.93	3.40	10.21ab	3.94b	2.17
2%	64.28	19.13	3.36	10.09b	3.97ab	2.19
SEM#	0.24	0.17	0.04	0.07	0.03	0.02

Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate - חושבו על פי היחס של החומצה מכך החומצות שנוצרו.

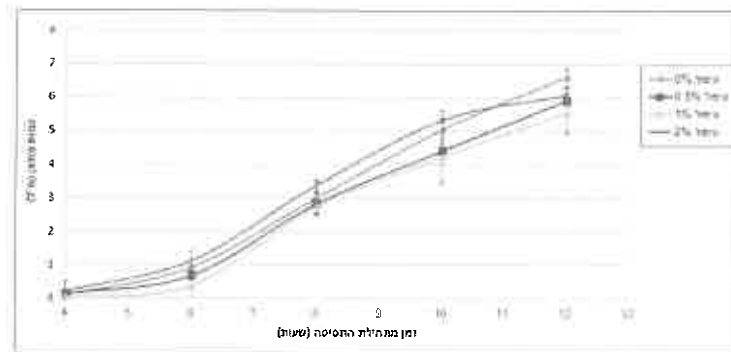
* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error of the mean

⁵ היחס בין Acetate ל Propionate.

על מנת להמחיש את תוצאות הטיפולים של חילבה 90 על ייצור המתאן ועל קצב ייצור המתאן, מוצגות תוצאות המחקר בגרפים 1-4 – 5.

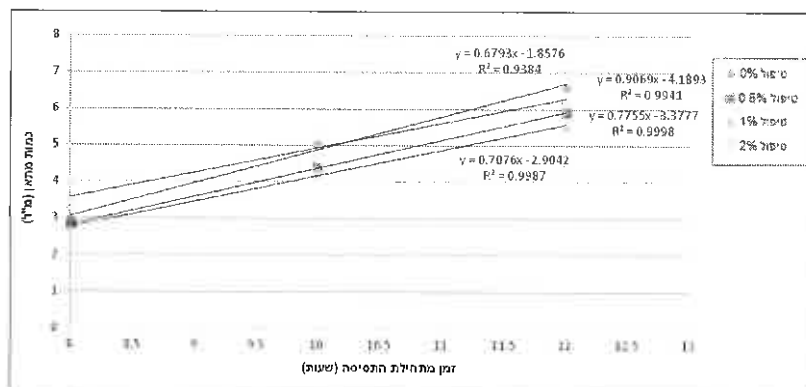
גרף מס' 4 מציג לנו את השפעת הטיפולים לאורך זמן על עקומת ייצור המתאן. ניתן לראות שהטיפולים זהים. כמו כן, ניתן לראות חלוקה על בסיס הגרפים לחלק ההסתגלות (0-6 שעות מתחילת התסיסה) לחלק המעריכי (8-12 מתחילת התסיסה) על פי עקומת הגידול של החיידקים.



גרף מס' 4. ייצור מתאן במהלך 12 שעות בתסיסת in vitro בשימוש בשחת ותערובת לפיטום טלאים ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף חילבה 90 בריכוזים משתנים.

אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
Standard error of the mean מוצג על גבי הגרפים.

בגרף מס' 5 מוצגות התוצאות של קצב ייצור המתאן כתלות בטיפולים השונים. מהמצאים עולה שהשפעת הטיפולים זהה.



גרף מס' 5. קצב ייצור מתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro שבה השתמשו בשחת ותערובת ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף חילבה 90 בריכוזים משתנים. קצב הייצור הינו השיפוע המתקבל מקירוב לינארי של התוצאות בטווח הזמנים של 8-12 שעות מתחילת התסיסה.

אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
Standard error of the mean - 0.06.

פסולת רימונים

במחקר הנוכחי, כפי הידוע עד כה, הוצגה לראשונה השפעתה של פסולת רימונים על הפרמטרים שנבדקו. בטבלה מס' 7, מוצגים תוצאותיה של השפעת התוסף על ריכוז האמוניה, כמות המתאן, הצטברות הלחץ, נעכלות וה- pH לפני ואחרי התסיסה. ניתן לראות שפסולת רימונים הינו התוסף היחיד בניסוי שגרם לירידה מובהקת של 39%, בכמות המתאן הכללי וזאת בטיפול 1% (טיפול 2% הושמט בגלל שגיאה ניסויית). שאר הפרמטרים שנבדקו היו זהים בהשפעת הטיפולים השונים.

טבלה מס' 7. השפעת פסולת רימונים בריכוזים משתנים על pH, ההפתחות לחץ, ייצור אמוניה ומתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*, ובדיקת השפעת החילבה על ערך הנעכלות בשיטת כרמ"ל.

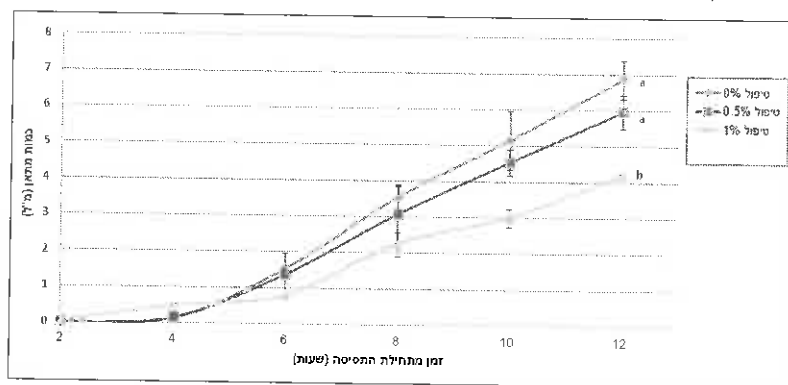
טיפול	אמוניה (ml/dl)	מתאן (ml*)	לחץ (atm)	%נעכלות	pH לפני התסיסה	אחרי 12 שעות pH תסיסה*
0%	2.46	6.87a	2.13	68.71	7.35	6.60a
0.5%	2.3	5.96a	2.10	68.24	7.35	6.55ab
1%	2.3	4.18b	2.01	69.55	7.35	6.54 ab
2%	2.32	-	2.15	69.25	7.35	6.52 b
SEM#	0.08	0.26	0.69	0.86	0.02	0.01

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error of the mean

תוצאה של מתאן בטיפול 2% הושמטה בגלל שגיאה ניסויית.

גרף מס' 6 מפרט את ייצור המתאן במהלך תסיסה של 12 שעות בנקודות זמן שונות (כל שעתיים). מגמה חשובה באה לידי ביטוי בגרף 6. ניתן לראות שהשפעת הטיפול 1% התרחשה רק 12 שעות מתחילת התסיסה.

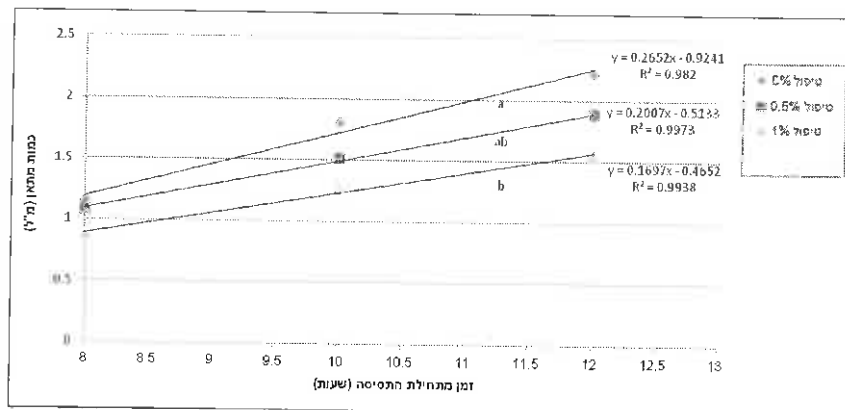


גרף מס' 6. ייצור מתאן במהלך 12 שעות בתסיסת *in vitro* בשימוש בשחת ותערובת לפיטום טלאים ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף פסולת רימונים בריכוזים משתנים.

אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).

Standard error of the mean מוצג על גבי הגרפים.

קצב ייצור הגז, מתואר בגרף מס' 7. מהגרף עולה שקצב שינוי ייצור המתאן מובהק רק עבור טיפול 1%, (טיפול 2% הושמט עקב שגיאה ניסויית), ברם, נראית נטייה של התהליך - ככל שריכוז התוסף היה גבוה יותר קצב הייצור היה נמוך יותר.



גרף מס' 7. קצב ייצור מתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro שבה השתמשו בשחת ותערובת ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף פסולת רימונים בריכוזים משתנים. קצב הייצור הינו השיפוע המתקבל מקירוב לינארי של התוצאות בטווח הזמנים של 8-12 שעות מתחילת התסיסה. אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
 .01 - Standard error of the mean

השפעות הטיפולים על יחסים בין החומצות האצטית והפרופיונית ועל ריכוזי החש"ן מרוכזים בטבלה מס' 8. מהטבלה ניתן להסיק שהטיפולים השונים יצאו זהים בהשפעתם.

טבלה מס' 8. השפעת פסולת רימונים בריכוזים משתנים על ייצור חומצות שומן נדיפות (Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate) in vitro. במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro.

%Valerate	%Isovalerate	%Butyrate	A:P [§]	%Propionate	%Acetate	טיפול
2.26	4.42	10.13	3.73	17.51	65.35	0%
2.28	4.48	10.33	3.73	17.48	65.11	0.5%
2.26	4.44	10.21	3.81	17.21	65.56	1%
2.30	4.46	10.22	3.79	17.27	65.44	2%
0.04	0.05	0.1	0.03	0.09	0.21	SEM [#]

Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate - חושבו על פי היחס של החומצה מסך החומצות שנוצרו.

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

[#] Standard error of the mean

[§] היחס בין Acetate ל Propionate.

גפת זיתים

השפעת התוסף גפת זיתים לא נבדקה על ייצור גז המתאן ולא נבדקה על תהליך התסיסה בכרמ"ל, אלא על בעל החיים עצמו. השפעות הטיפוליים מוצגות בטבלה מס' 9. ניתן לראות שהייתה השפעה של חלק מהטיפולים על ריכוז האמוניה ועל הנעכלות בלבד ולא על שאר הפרמטרים שנבדקו. טיפולים 0.5%, ו- 2% גרמו לירידה מובהקת של 11% ו- 20% בהתאמה, בעוד שטיפול 1% התקבל זהה לטיפול 0% (ביקורת). כמו כן ניכרת השפעה מובהקת של כל הטיפולים על ערך הנעכלות, כאשר טיפולים 0.5% ו- 1% היו זהים (לפי מבחן Tukey), הירידות בערך הנעכלות בעקבות הטיפולים 0.5%, 1% ו- 2% היו 6%, 10% ו- 22% בהתאמה.

שאר הפרמטרים המוצגים בטבלה מס' 9- היו זהים.

טבלה מס' 9. השפעת גפת זיתים בריכוזים משתנים על pH, התפתחות לחץ, ייצור אמוניה ומתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*, ובדיקת השפעת החילבה על ערך הנעכלות בשיטת כרמ"ל.

טיפול	אמוניה*(ml/dl)	מתאן (ml)	(**atm לחץ)	%נעכלות	pH לפני התסיסה	אחרי pH12 שעות תסיסה
0%	3.25a	6.03	2.10ab	68.71a	7.41	6.52
0.5%	2.90bc	5.29	2.01 b	64.78b	7.38	6.53
1%	3.00ab	5.38	2.10 ab	61.87b	7.36	6.52
2%	2.60c	5.56	a 2.19	53.67c	7.32	6.5
SEM ^a	0.05	0.21	0.54	0.8	0.02	0.01

* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.
Standard error of the mean

בטבלה מס' 10 מרוכזים תוצאות השפעותיה של גפת זיתים בריכוזים שונים על ריכוז ויחסי חש"ן. גפת זיתים, הינו התוסף היחיד מבין התוספים שנבדקו לעיל, שגרם להבדל מובהק ($P < 0.1$) בריכוזי החש"ן בחומצת הבוטיראט. כל הטיפולים 0.5%, 1%, ו- 2% הביאו לעלייה של 3%, 3% ו- 5% בהתאמה.

טבלה מס' 10. השפעת גפת זיתים בריכוזים משתנים על ייצור חומצות שומן נדיפות (Acetate, Propionate, Valerate, Isovalerate, Butyrate), במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת *in vitro*.

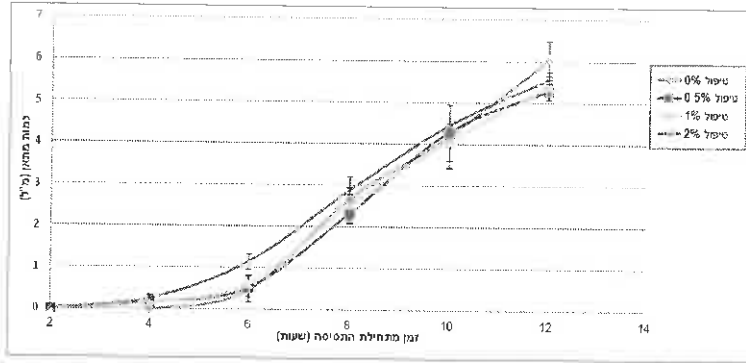
טיפול	%Acetate	%Propionate	A:P [§]	**%Butyrate	%Isovalerate	%Valerate
0%	64.77	17.83	3.63	b 10.20	4.56	2.31
0.5%	64.41	17.89	3.60	a 10.51	4.54	2.31
1%	64.54	17.96	3.59	a 10.48	4.40	2.28
2%	64.63	18.04	3.58	a 10.70	4.09	2.20
SEM [#]	0.31	0.11	0.04	0.09	0.11	0.03

Acetate, Propionate, Butyrate, Isovalerate, Valerate-חושבו על פי היחס של החומצה מסך החומצות שנוצרו.
* $P < 0.05$, ** $P < 0.1$, ממוצעים המסומנים באות שונה נבדלים.

Standard error mean

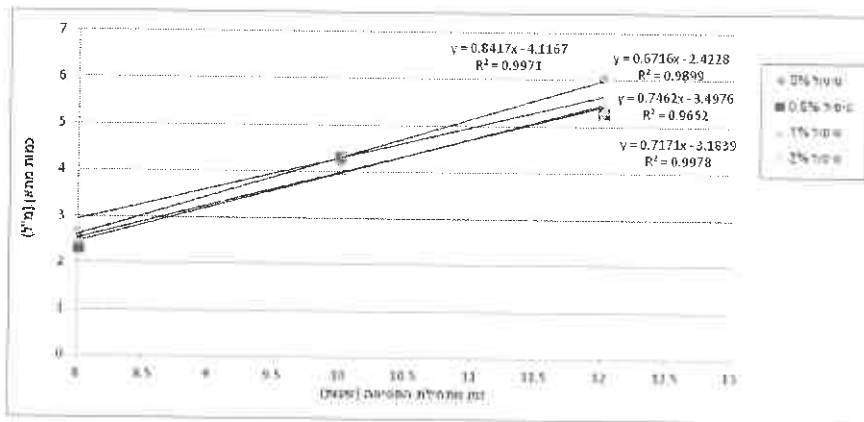
§ היחס בין Acetate ל Propionate.

בגרפים, 8 ו 9, מוצגות השפעות הטיפוליים על ייצור המתאן וקצב יצירתו לאורך זמן (כל שעותיים) בהתאמה.



גרף מס' 8. ייצור מתאן במהלך 12 שעות בתסיסת in vitro בשימוש בשחת ותערובת לפיטום טלאים ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף גפת זיתים בריכוזים משתנים.

אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
Standard error mean מוצג על גבי הגרפים.



גרף מס' 9. קצב ייצור מתאן במהלך תסיסה של 12 שעות במערכת in vitro שבה השתמשו בשחת ותערובת ביחס של 1:1 בנוסף לתוסף פסולת רימונים בריכוזים משתנים. קצב הייצור הינו השיפוע המתקבל מקירוב לינארי של התוצאות בטווח הזמנים של 8-12 שעות מתחילת התסיסה.
אותיות (a-c) בין הגרפים מראות על הבדלים מובהקים ($P < 0.05$).
Standard error mean - 0.04.

מהגרפים עולה כי השפעת הטיפוליים היתה זהה הן לגבי בייצור המתאן והן לגבי קצב יצירתו לאורך זמן. לא ניכרו הבדלים מובהקים בעקומת ייצור המתאן, אך ניתן לראות חלוקה על בסיס גרף מס' 8 לחלק ההסתגלות (0-6 שעות מתחילת התסיסה) לחלק המעריכי (8-12 מתחילת התסיסה) על פי עקומת הגידול של החיידקים.

מטרת המחקר הינה להבהיר את השפעות תוספי מזון על תהליך התסיסה ותוצריו, נעכלות המזון וייצור מתאן בכרס מלאכותית, על ידי מערכת מעבדתית חדשה *Ankom RF gas production system*. במחקר עלו ממצאים שחלקם תואמים לספרות המחקרית וחלקם נוגדים תוצאות מחקרים קודמים.

Ankom RF gas production system

במחקר הנוכחי נמצאה תלות בין הלחץ לנפח, דבר המצביע על דיוק המכשיר בבדיקת הלחצים המתקבלים. התלות בין הלחץ והנפח מתבססת על המשוואה הכימית $PV = nRT$ (P – לחץ, V – נפח, n – מספר מולים, R – קבוע הגזים, T – טמפרטורה) (44) מכיוון שהפרמטרים, R, V ו-T קבועים (מערכת סגורה), אזי $k = \frac{RT}{V}$ (k-קבוע), מכאן, נוכל לרשום את המשוואה בצורה הבאה: $P = k * n$. דהיינו, מתקבל יחס ישר בין הלחץ למספר המולים.

בדיקה נוספת שנעשתה היא בדיקת שיעור המתאן מכלל הגזים שנוצרו במהלך התסיסה. התוצאות שהתקבלו במחקר זה (בממוצע 21%) תואמות את תוצאותיהם של מחקרים קודמים (Patra et al., 2006), (Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008b) בהם התקבל אחוז מתאן בערכים דומים של כ- 21%-27%. לכן, שיטה זו יכולה להחליף את השיטה הקודמת של תיאדרו (Theodorou et al., 1994) שהייתה בשימוש עד כה.

תוסף חילבה 60:

במחקר זה נמצא שריכוז הטאנינים בזרעי החילבה היה אפסי, ממצא העולה בקנה אחד עם ממצאי מחקרים נוספים (Abdouli et al., 2012). ממצא חשוב נוסף שהתקבל במחקר הנוכחי הראה עלייה בייצור המתאן, ממצא שנוגד ממצאי מחקרים אחרים. לא נמצא מחקר שהראה שיש עלייה בייצור המתאן כתוצאה משימוש בחילבה, למעט מחקרים של סלוינסקי ועמיתיו (Sliwinski et al., 2002a) בו נמצא ששימוש בטאנינים גרמו לעלייה בייצור המתאן. וזאת כנראה בגלל שריכוז הטאנינים, שהוסף בניסוי, היה נמוך מדי (Sliwinski et al., 2002a).

עלייה בייצור גז המתאן יכולה לנבוע מכך ששימוש בחילבה גרם לירידה בפרוטוזואות ובפטריות ולעלייה בחיידקים מפרקי התאית (Goel et al., 2008a). העלייה היחסית של תת אוכלוסיה זו עשויה לגרום לפירוק מהיר יותר של המזון וכתוצאה מכך נוצרים יותר פריקוסרים (מימן, פחמן דו חמצני ואצטט) התורמים לייצור המתאן.

ממצא נוסף שהתקבל במחקר, הינו ירידה ב-pH לאחר התסיסה כתגובה לתוסף. ירידה זו נגרמה כתוצאה מתסיסה מוגברת של המזון שתוצריה גורמים אומנם לירידה ב-pH (Cantalapiedra-Hijar et al., 2009), אולם ירידת ערך ה-pH לא הגיעה לטווח שבו החיידקים מפרקי צלולוז נפגעים (Calsamiglia et al., 2008), לכן ממשיך תהליך ייצור הפריקוסרים. ירידה מתונה זו בחומציות צפויה במערכת מבחני מעבדה עקב המצאות יכולת התרסה טובה של המצע.

היינו מצפים שתתרחש גם עלייה בערך הנעכלות (פחות פרוטוזואות ועידוד החיידקים) לאחר הוספת התוסף, ברם לא נמצאה עלייה מובהקת, וזאת מכיוון שהנעכלות נבדקה לפרק זמן של 4 ימים ושאר הפרמטרים לפרק זמן של 12 שעות. לכן, השפעתו של התוסף עשויה להתמוסס במהלך התסיסה של ארבעת הימים. הסבר נוסף לאי שינוי בנעכלות הוא, שרמת ה-pH המשיכה לרדת עד שנגרמה פגיעה בחיידקים הצלוליטיים ולכן קצב העיכול ירד גם הוא (Calsamiglia et al., 2008). כמו כן, עלה במחקר זה שהתוסף גרם לירידה בריכוז האמוניה, ירידה זו יכולה להיגרם מפגיעה בפרוטוזואות (Lila et al., 2003) אך היא אינה מחייבת. מחקר אחר הראה שתיכנן ירידה באמוניה ללא השפעה על חומצות השומן הנדיפות, הנעכלות והפרוטוזואות (Sliwinski et al., 2002b) כנראה על ידי פגיעה באנזימים מפרקי חלבון (Wang et al., 1998). ניתן לראות בתמונה 2 לעיל, שבטיפול 0% חילבה (ביקורת) עקומת ייצור המתאן הגיעה לרוויה, בעוד ששאר העקומות המשיכו בקטע המעריכי, דבר המראה שהחילבה 60 עודדה את המשך ייצור הגז.

חילבה 90:

חילבה 90, בניגוד לחילבה 60, לא השפיע על שום פרמטר בניסוי הנוכחי. מאמרים בספרות המחקרית הראו שהחילבה (ללא ציון סוג) לא תמיד משפיעה על ייצור המתאן (Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008a), שנה ואזור גדילה המשפיעים על הרכב הצמח (Taylor et al., 2002). בנוסף, גם בצמחים עצמם יש שוני בריכוז הפוליפנולים בהתאם לתקופה שבה הם נמצאים במחזור הגדילה של הצמח (Abdouli et al., 2012). כמו כן, יכול להיות שתהליך המינרליזציה הזרעים של החילבה לא גורם לחשיפת הרכיב הפעיל (סאפונינים) הגורם לצמצום ייצור הגז (Goel et al., 2008b) או שסוג המינרליזציה עצמו לא התאים לזן של החילבה (Patra et al., 2006). סיבה נוספת היא הרכב המזון שהותסס, המשפיע על האוכלוסייה המיקרוביאלית, ובכך גם הוא קובע האם תהיה או לא תהיה השפעה של הרכיבים הפעילים (Hess et al., 2003). הממצא בדבר חוסר ההשפעה של הסאפונינים על ייצור אמוניה, נעכלות ח"י וחש"ן שעלה במחקר, עולה בקנה אחד עם ממצאים במחקרים קודמים (Pen et al., 2008) דבר הנגרם מפגיעה בפרוטוזואות אך בו זמנית גורם לעידוד החיידקים.

פסולת רימונים:

במחקר זה התקבל שלמינרליזציה פסולת רימונים הייתה השפעה מובהקת על ירידה בייצור המתאן בלבד. לא ניכרה השפעה מובהקת על נעכלות המזון, ריכוז אמוניה וריכוז חש"ן. במאמרם של Guo et al. (2008) נצפתה ירידה בייצור המתאן שלא חייבת לנבוע רק מפגיעה בחיידקים המתאנוגנים אלא גם מפגיעה באנזימים של ראקציית המתאנוגנוזה. במחקרם נמצא כי אוכלוסיית החיידקים שגשגה ומנגד נפגעה אוכלוסיית הפרוטוזואות. יחד עם זאת, פגיעה באוכלוסיית הפרוטוזואות אינה גורמת בהכרח לירידה בריכוז האמוניה (Valdez et al., 1986).

במחקר הנוכחי ריכוז האמוניה וחש"ן לא השתנה בין הטיפולים, ולכן לא ניכרה השפעה על נעכלות המזון, כפי שנמצא במחקרם של Hu et al. (2005). בנוסף, ריכוז חש"ן מושפע פחות מנוכחות של סאפונינים (Hu et al., 2005), אלא יותר מהרכב המנה (Hess et al., 2003).

בספרות המחקרית נמצאו ממצאים סותרים לגבי השפעת ירידה בייצור המתאן על הלחץ הכללי המצטבר במבחנה. בחלק מהמחקרים נמצא שירידה בייצור המתאן לא השפיעה על הלחץ הכללי (Hu et al., 2005), וזאת עקב העובדה שפעילות החיידקים נשמרה (דבר הניתן לראות בריכוזי הומצות השומן שלא השתנו) וייצור המימן ופחמן דו חמצני נמשך. מאידך, במחקרים אחרים נמצא שהירידה בייצור המתאן הייתה מלווה בירידת הלחץ הכללי (Garc'ia-Gonza'lez et al., 2008b) כתלות בריכוז התוסף (Holtshausen et al., 2009). במחקר הנוכחי נצפה שקצב ייצור המתאן ירד ככל שריכוז התוסף גדל, וזאת לאחר שמונה שעות מתחילת התסיסה. מאתיסון ועמיתיו (Mathison et al., 1999) הראו שפירוק הסאפונינים על ידי המיקרואורגניזם בכרס מתרחש כארבע שעות מהשהות שלהם בכרס, ולאחר מכן ישנה עלייה נוספת בריכוזם. דבר שיכול להסביר את תקופת הזמן הארוכה (8 שעות) שלאחריה נצפתה השפעת התוסף על ייצור המתאן. מחקר נוסף (Holtshausen et al., 2009), שבדק את השפעת התוסף לאורך ציר זמן מצא שהירידה בייצור המתאן החלה שלוש שעות מרגע הוספתו, בעוד שבמחקר הנוכחי, ניכרה השפעתו רק אחרי 10 שעות לתסיסה ($P=0.056$). דבר זה יכול לנבוע משוני בצמח עצמו ומשוני בריכוזים, במחקר של Hu et al. (2005) ועמיתיו השתמשו בריכוזים גבוהים יותר (Hu et al., 2005).

גפת זיתים:

במחקר זה נמצא שגפת זיתים הביאה לירידה בנעכלות, בריכוז האמוניה ולעליה בריכוז הומצות השומן בוטיראט, אולם לא נצפה שינוי בייצור המתאן. במחקר הנוכחי, הכילה המנה ריכוז גבוה של פחמימות בלתי מבניות וחלבון, לכן ניתן לשער שהירידה בנעכלות נגרמה עקב פגיעה בחיידקים העמילוליים. מאומן ועמיתיו (Moumen et al., 2008) גרסו שירידה בנעכלות נגרמת כתוצאה מהטאינינים. הם הוכיחו זאת באמצעות הוספת PEG (polyethylene glycol) למנה. חומר זה נקשר לטאינינים ומונע מהם להיקשר לחלבונים (Jones and Mangan, 1977), בכך הם בטלו את השפעת הטאינינים ובעקבות כך עלתה רמת הנעכלות.

חלק מתוצרי הלוואי של החיידקים הצלוליטיים הם הפריקוסרים שמהם נוצר המתאן. למרות שהייתה עלייה בייצור הבוטיראט במחקר הנוכחי, לא התקבל שינוי בכמות המתאן, ייתכן שתוצאה זו נובעת מפגיעה בחיידקים יוצרי המתאן, השערה שיש צורך לבדוק במחקר המשך. בהשוואה לספרות המחקרית נמצא במחקר קודם (Moumen et al., 2008) שגפת זיתים גרמה לירידה בנעכלות כפי שהתקבל במחקר הנוכחי, ברם, נצפתה ירידה בריכוז האצטט ובריכוז הבוטיראט, בניגוד לתוצאות במחקר הנוכחי. את ההבדלים ניתן להסביר בשוני בריכוז הטאנינים בין שני הניסויים. במחקר נוסף (Ruiz et al., 2004) עלה שלא היה שוני בריכוז הבוטיראט, אך הייתה ירידה בנעכלות. השוני בין תוצאות המחקרים לגבי ריכוז הבוטיראט, יכול לנבוע מהבדל בהרכב המנות בניסויים.

5. מסקנות:

Ankom RF gas production system: מאפשר מדידה מדויקת של נפח ולחץ במהלך תסיסה. פסולת רימונים: התוסף המועדף, מצמצם את ייצור המתאן (ירידה של 39%) וקצב יצירתו (8-12 שעות מתחילת התסיסה) ללא השפעה על ניצולת המזון (בריכוז של 1% מ DM).

חילבה 60: גורם לעלייה בייצור המתאן (עלייה של 58%) ובוא בעת מצמצם את ייצור האמוניה (ירידה של 6%). ניתן להשתמש בתוסף הזה (בריכוז של 2% מ DM), במנות המכילות כמות קטנה של מזון גס.

גפת זיתים: פגיעה כללית באוכלוסייה המיקרוביאלית (אך לא בחיידקים יוצרי המתאן) – ירידה בייצור האמוניה (ירידה של 20%) וירידה בנעכלות המזון (ירידה של 23%). ניתן להשתמש בתוסף (בריכוז של 0.5% מ DM) במנות המכילות כמות גדולה של חלבון פריק ובכך לשפר את ניצולת החנקן.

חילבה 90: ללא השפעה על ייצור המתאן ועל ניצולת המזון.

מומלץ להמשיך במחקר באופן דומה אך להוסיף בדיקה של ריכוז שאר הגזים שנוצרים (מימן ופחמן דו חמצני), לבצע בדיקות נוספות לתוספים (ריכוז פוליפינולים, ריכוז סאפונינים וריכוז טאנינים כללי) ובנוסף לבצע בדיקה של חיידקים ופרוטזאות ובכך להבין בצורה טובה יותר את השינוי בניצולת המזון. ולבסוף לבצע ניסוי *in vivo* בחיה יצרנית עם התוסף המועדף, ולוודא שמקבלים תוצאות זהות לכרס מלאכותית וכן לבדוק שאין השפעות שליליות על יצרנות בעל החיים.

6. רשימת ספרות מצוטטת

- Abdoui, H., M. H. Ayed, M. Elham, B. Nabila, and M. R. A. Morencos. 2012. Proximate composition, and total phenols, tannins, flavonoids and saponins, and in vitro ruminal fermentation activity of fenugreek cut at three maturity stages.
- Busquet, M., S. Calsamiglia, A. Ferret, and C. Kamel. 2006. Plant extracts affect in vitro rumen microbial fermentation. *J Dairy Sci* 89(2):761-771.
- Calsamiglia, S., P. W. Cardozo, A. Ferret, and A. Bach. 2008. Changes in rumen microbial fermentation are due to a combined effect of type of diet and pH. *J Anim Sci* 86(3):702-711.
- Cantalapiedra-Hijar, G., D. R. Yanez-Ruiz, A. I. Martin-Garcia, and E. Molina-Alcaide. 2009. Effects of forage: concentrate ratio and forage type on apparent digestibility, ruminal fermentation, and microbial growth in goats. *J Anim Sci* 87(2):622-631.

Carulla, J. E., M. Kreuzer, A. Machmüller, and H. D. Hess. 2005. Supplementation of *Acacia mearnsii* tannins decreases methanogenesis and urinary nitrogen in forage-fed sheep. *Australian Journal of Agricultural Research* 56(9):961-970.

García-González, R., S. López, M. Fernández, R. Bodas, and J. S. González. 2008a. Screening the activity of plants and spices for decreasing ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 147(1-3):36-52.

García-González, R., S. López, M. Fernández, and J. S. González. 2008b. Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 145(1-4):319-334.

García-González, R., S. López, M. Fernández, and J. S. González. 2008. Dose-response effects of *Rheum officinale* root and *Frangula alnus* bark on ruminal methane production in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 145(1-4):319-334.

Goel, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2008a. Changes in microbial community structure, methanogenesis and rumen fermentation in response to saponin-rich fractions from different plant materials. *J Appl Microbiol* 105(3):770-777.

Goel, G., H. P. S. Makkar, and K. Becker. 2008b. Effects of *Sesbania sesban* and *Carduus pycnocephalus* leaves and *Fenugreek* (*Trigonella foenum-graecum* L.) seeds and their extracts on partitioning of nutrients from roughage- and concentrate-based feeds to methane. *Animal Feed Science and Technology* 147(1-3):72-89.

Guo, Y. Q., J. X. Liu, Y. Lu, W. Y. Zhu, S. E. Denman, and C. S. McSweeney. 2008. Effect of tea saponin on methanogenesis, microbial community structure and expression of *mcrA* gene, in cultures of rumen micro-organisms. *Letters in Applied Microbiology* 47(5):421-426.

Hess, H. D., L. M. Monsalve, C. E. Lascano, J. E. Carulla, T. E. Diaz, and M. Kreuzer. 2003. Supplementation of a tropical grass diet with forage legumes and *Sapindus saponaria* fruits: effects on in vitro ruminal nitrogen turnover and methanogenesis. *Aust J Agr Res* 54(7):703-713.

Holtshausen, L., A. V. Chaves, K. A. Beauchemin, S. M. McGinn, T. A. McAllister, N. E. Odongo, P. R. Cheeke, and C. Benchaar. 2009. Feeding saponin-containing *Yucca schidigera* and *Quillaja saponaria* to decrease enteric methane production in dairy cows¹. *Journal of dairy science* 92(6):2809-2821.

Hu, W. L., J. X. Liu, J. A. Ye, Y. M. Wu, and Y. Q. Guo. 2005. Effect of tea saponin on rumen fermentation in vitro. *Animal Feed Science and Technology* 120(3-4):333-339.

Jones, W. T. and J. L. Mangan. 1977. Complexes of Condensed Tannins of Sainfoin (*Onobrychis-Viciifolia* Scop) with Fraction 1 Leaf Protein and with Submaxillary Mucoprotein, and Their Reversal by Polyethylene-Glycol and Ph. *J Sci Food Agr* 28(2):126-136.

Lila, Z. A., N. Mohammed, S. Kanda, T. Kamada, and H. Itabashi. 2003. Effect of sarsaponin on ruminal fermentation with particular reference to methane production in vitro. *Journal of Dairy Science* 86(10):3330-3336.

Makkar, H. P. and K. Becker. 1997. Degradation of quillaja saponins by mixed culture of rumen microbes. *Lett Appl Microbiol* 25(4):243-245.

Mathison, G. W., R. Soofi-Siawash, P. T. Klita, E. K. Okine, and G. Sedgwick. 1999. Degradability of alfalfa saponins in the digestive tract of sheep and their rate of accumulation in rumen fluid. *Can J Anim Sci* 79(3):315-319.

Moumen, A., D. R. Yanez-Ruiz, I. Martin-Garcia, and E. Molina-Alcaide. 2008. Fermentation characteristics and microbial growth promoted by diets including two-phase olive cake in continuous fermenters. *J Anim Physiol an N* 92(1):9-17.

Patra, A. K., D. N. Kamra, and N. Agarwal. 2006. Effect of plant extracts on in vitro methanogenesis, enzyme activities and fermentation of feed in rumen liquor of buffalo. *Animal Feed Science and Technology* 128(3-4):276-291.

- Pen, B., C. Sar, B. Mwenya, and J. Takahashi. 2008. Effects of *Quillaja saponaria* extract alone or in combination with *Yucca schidigera* extract on ruminal fermentation and methanogenesis in vitro. *Anim Sci J* 79(2):193-199.
- Rochfort, S., A. J. Parker, and F. R. Dunshea. 2008. Plant bioactives for ruminant health and productivity. *Phytochemistry* 69(2):299-322.
- Ruiz, D. R. Y., A. Moumen, A. I. M. Garcia, and E. M. Alcaide. 2004. Ruminal fermentation and degradation patterns, protozoa population, and urinary purine derivatives excretion in goats and wethers fed diets based on two-stage olive cake: Effect of PEG supply. *J Anim Sci* 82(7):2023-2032.
- Sliwinski, B. J., M. Kreuzer, H. R. Wettstein, and A. Machmuller. 2002a. Rumen fermentation and nitrogen balance of lambs fed diets containing plant extracts rich in tannins and saponins, and associated emissions of nitrogen and methane. *Arch Anim Nutr* 56(6):379-392.
- Sliwinski, B. J., C. R. Soliva, A. Machmuller, and M. Kreuzer. 2002b. Efficacy of plant extracts rich in secondary constituents to modify rumen fermentation. *Animal Feed Science and Technology* 101(1-4):101-114.
- Taylor, W. G., H. J. Zulyniak, K. W. Richards, S. N. Acharya, S. Bittman, and J. L. Elder. 2002. Variation in diosgenin levels among 10 accessions of fenugreek seeds produced in western Canada. *J Agr Food Chem* 50(21):5994-5997.
- Theodorou, M. K., B. A. Williams, M. S. Dhanoa, A. B. McAllan, and J. France. 1994. A simple gas production method using a pressure transducer to determine the fermentation kinetics of ruminant feeds. *Animal Feed Science and Technology* 48(3-4):185-197.
- Valdez, F. R., L. J. Bush, A. L. Goetsch, and F. N. Owens. 1986. Effect of Steroidal Sapogenins on Ruminal Fermentation and on Production of Lactating Dairy-Cows. *Journal of Dairy Science* 69(6):1568-1575.
- Wang, Y., T. A. McAllister, C. J. Newbold, L. M. Rode, P. R. Cheeke, and K. J. Cheng. 1998. Effects of *Yucca schidigera* extract on fermentation and degradation of steroidal saponins in the rumen simulation technique (RUSITEC). *Animal Feed Science and Technology* 74(2):143-153.