

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר: 13-0300-362
ייעול תזונת מעלי גרה על ידי פגיעה סלקטיבית באוכלוסיות המתאנוגנים
בכרס מעלי גרה תוך שימוש בוירוסים להפחתת פליטת המתאן.

**Improving ruminants' nutritional gain by the use of archaeal viruses to
decrease methane emission**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות
ע"י

יצחק מזרחי - חוקר בתחום מיקרוביולוגיה של כרס מעלי הגרה, המכון לבעלי חיים מחלקה לבקר וצאן

Itzhak Mizrahi, Institute of Animal Science, ARO, Volcani Research Center, P.O. Box 6 Bet Dagan 50-

250 Israel E.mail: itzhakm@volcani.agri.gov.il

הצהרת החוקר הראשי:

הממצאים בדו"ח זה הינם תוצאות ניסויים.

הניסויים מהווים המלצות לחקלאים: לא (מחק את המיותר)

חתימת החוקר _____ תאריך: _____

תקציר

רקע הבעיה

פליטת גז מתאן על ידי מעלי גרה הינה כיום בעיה ראשונה במעלה של ענף החקלאות וכן של איכות הסביבה. על יצור המתאן במעלי גרה אחרים מיקרואורגניזמים מקבוצת הארכאה הנקראים מתאנוגנים (Methanogens) השוכנים בכרס החיה. יצורים אלו משתמשים במימן הנפלט בכרס לחיזור תרכובות פחמן כדוגמת פחמן דו חמצני, אצטאט, פורמט ומתאנול- תוצרי פירוק של החומר הצמחי ממנו ניזונים בעלי החיים. מהבחינה התזונתית חלק ניכר מהאנרגיה הטמונה במזון (5-15%) מופרש בצורת גז מתאן ולא מנוצל לצרכי תפוקת חלב או בשר. יתרה מכך, מכיוון שמזונות עשירים בסיבים מעלים את יצור המתאן על ידי מעלי גרה, יש חשש להפעלת לחץ על הרפתות להזנת הפרות במזונות עשירים בעמילן ודלים בסיבים. מזונות אלה מייקרים את המנה ומגבירים את הסיכוי של החמצת הכרס כתוצאה מהפרשת חומצה לקטית בכמות מוגברת על ידי חיידקים המעכלים עמילן. בנוסף, מתאן הינו גז חממה בעל פוטנציאל הגדול פי 23 מפחמן דו חמצני לגרום להתחממות כדור הארץ, פלטתו על ידי מעלי גרה הינה משמעותית מאוד ובארצות מסוימות כדוגמת אוסטרליה וניזילנד מגיעה לכדי 61% מכלל פליטת המתאן לאטמוספירה. גורם זה פוגע בתדמית הסביבתית של גידול מעלי גרה ואף יכול להביא לפגיעה משמעותית בתפקוד השוטף של ענף זה, כגון איסורי רעיה והגבלות הזנה בסיבים.

מטרות המחקר

מטרת העל של הצעת מחקר זו הינה לבודד וירוסים ליטיים כנגד זני המתאנוגנים הנפוצים ביותר בכרס הפרה ושימוש בוירוסים אלו לפגיעה סלקטיבית באוכלוסייה המתאנוגנית בכרס. על מנת להשיג מטרה זו נחלק את הפרויקט לשלוש מטרות משנה:

1. מיפוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס הפרה הישראלית כתלות בסוגי המנות אותן היא אוכלת.
2. בידוד מתאנוגנים וכיול שיטות לבידוד וירוסים ליטיים כנגד זני המתאנוגנים הנפוצים ביותר בכרס הפרה.
3. פיתוח וכיול השימוש בוירוסים אלו לפגיעה סלקטיבית באוכלוסייה המתאנוגנית מכרס מעלי גרה בתנאי *in vivo* ו *in vitro*.

שיטות עבודה

על מנת לאפיין את אוכלוסיות המתאנוגנים כתלות בסוגי המנות אותן אוכלות הפרות נעשה שימוש בשיטת Real time PCR ובריצוף עמוק. כמו כן נעשה שימוש בכלים מיקרוביולוגים קלאסיים על מנת לגדל את המינים המתאנוגנים. הפרקציה הויראלית הופקה מנוזל הכרס בטכניקות אנאירוביות על מנת להשאיר את הדוגמא נקייה מחמצן כך שתתאים לאופי הניסויים. כמו כן נעשה שימוש במיקרוסקופיה פלורוסנטית על מנת לזהות את המתאנוגנים ואת הפרקציה הויראלית. לבסוף נעזרנו בכלים ביואינפומטיים מגוונים על מנת לחקור את המתאנוגנים המבודדים ולנסות ולמצוא וירוסים כלואים בתוך הגנום שלהם, ללמוד עליהם ולנסות להפעילם על מנת שיוכלו להוות כלי איכותי לפגיעה במתאנוגנים.

תוצאות עיקריות

ממצאנו מראים שישנן שתי אוכלוסיות עיקריות של סדרות מתאנוגנים בכרס הפרה אשר מגיבות בצורה הפוכה לשינויי אחוז הסיבים במנה. פיתחנו שיטות לגידול אוכלוסיות אלו במעבדה וכיום אנו מגדלים זנים מסדרות טקסונומיות אלו במעבדה. כמו כן הצלחנו לבודד זנים חדשים של מתאנוגנים אשר לא בודדו עד כה מכרס הפרה. במקביל כיינו פרטוקולים לבידוד וירוסים, והפרקציה המכילה חלקיקי וירוס צולמה במיקרוסקופ אלקטרוני חודר. על מנת לבחון את יכולת הפרקציה הוויראלית להדביק ולפגוע בתאי מתאנוגנים השתמשנו בטכניקות צביעה פלורוסנטיות וכן בטכניקות מיקרוביולוגיות קלאסיות כגון מבחני הדבקה ומבחני גידול - טכניקות שהותאמו על ידנו על מנת להתאים לאופי העבודה האנאירובית.

בנוסף לכך הגנום של מספר מתאנוגנים שבודדו אך ורק במעבדתנו רוצף והרצף הגנטי שלהם נחקר על ידינו וסיפק לנו מידע על וירוסים שכלואים בתוכם. מידע זה יעזור לנו לפתח כלים ואמצעים כנגד התאים המתאנוגנים. לבסוף, הוכחנו כי ניתן להשתמש במערכת עיטוף חיידיקים על מנת להרבות וירוסים ובימים אלו בוחנים את התכנות המערכת בדוגמאות In-vivo בחיות הניסוי.

מסקנות והמלצות לגבי יישום התוצאות

העל פי ממצאנו מספר סדרות טקסונומיות קיימות בכרס הפרה הישראלית, הוירוס אותו מצאנו בגנום אחד המתאנוגנים מעיד שניתן להדביק מתאנוגנים בוירוסים אך בתקופת מחקר זו לא הצלחנו לזהות את הדרך הכונה להדבקה. כמו כן מערכת העיטוף אותה פיתחנו תיושם על תרביות מתאנוגנים מבודדים ותרבויות מעורבות של מספר מתאנוגנים לייצירת מלכודות וירוסים ספציפיים למתאנוגנים אלו. המלכודות ישמשו ללכידת וירוסים ספציפיים למתאנוגנים אלו היישר בכרס הפרה.

מבוא ותיאור הבעיה

כרס מעלה הגירה מכילה אוכלוסיות מיקרואורגניזמים אשר כוללות בתוכן פרוטוזואה, חיידקים, פטריות וארכאה. אוכלוסיות אלו מקיימות יחסי גומלין סבוכים הנעים מסימביוזה לתחרות ומהוות מרכיב חשוב בעיכול המזון וכפועל יוצא בתפקוד בעלי החיים. המזון הצמחי אשר נצרך על ידי חיות המשק נעכל בכרס על ידי אוכלוסיות המיקרואורגניזמים ומפורק לשרשראות פחמן קצרות, ח' אמינו, מימן, פחמן דו חמצני וכיו"ב. אחת מאוכלוסיות המיקרואורגניזמים בכרס מקבוצת הארכאה המכונה מתאנוגנים (methanogens) משתמשת בגז המימן לחיזור פחמן כגון פחמן דו חמצני ליצירת מתאן. אוכלוסייה זו מחולקת ל 5 סדרות ושתיים מהן, מתאנובקטריאלס ומתאנומיקרוביאאלס הן השכיחות ביותר בכרס הפרה. יצירת המתאן על ידי המתאנוגנים בכרס מעלה הגרה הינה בעייתית בשני היבטים- חיזור תרכובות הפחמן למתאן גורם לאיבוד של 5-19% מהאנרגיה הטמונה במזון [1] ובנוסף מתאן הינו גז חממה פעיל מאוד בעל פוטנציאל הגדול פי 23 מפחמן דו חמצני לגרום להתחממות כדור הארץ [2]. פליטת המתאן ממעלי גרה בארצות מסימות כגון אוסטרליה וניו-זילנד מגיעה ל 61% מסך פליטת המתאן לאטמוספירה [3]. עובדות אלו מסמנות את פליטת המתאן על ידי חיות המשק כגורם בעייתי אשר הפחתת פליטתו מהווה אינטרס חשוב של החקלאות המודרנית הירוקה, שכן הדבר יעלה את יעילות המרת האנרגיה בכרס ובכך יעלה את כמות ואיכות החלב ויפחית את פליטת המתאן לאטמוספירה.

הקונספציה המוצגת בבסיס העבודה הנוכחית הינה בידוד וירוסים ליטיים (הורגים) בעלי יכולת פגיעה ספציפית באוכלוסיית המתאנוגנים בכרס ושימוש בהם כנגד אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס. וירוסים ליטיים כנגד מיקרואורגניזמים מקבוצת הארכאה בודדו בעבר אך לא נעשה בהם שימוש למטרת פגיעה באוכלוסיות מתאנוגנים [4].

מטרות המחקר

מטרת העל של הצעת מחקר זו הינה לבודד וירוסים ליטיים כנגד זני המתאנוגנים הנפוצים ביותר בכרס הפרה ושימוש בוירוסים אלו לפגיעה סלקטיבית באוכלוסייה המתאנוגנית בכרס. על מנת להשיג מטרה זו נחלק את הפרויקט לשלוש מטרות משנה:

1. מיפוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס הפרה הישראלית כתלות בסוגי המנות אותן היא אוכלת.
2. בידוד מתאנוגנים וכיול מערכות לבידוד וירוסים ליטיים כנגד זני המתאנוגנים הנפוצים ביותר בכרס הפרה.
3. פיתוח וכיול השימוש בוירוסים אלו לפגיעה סלקטיבית באוכלוסייה המתאנוגנית מכרס מעלי גירה בתנאי in vivo ו vitro.

שנה א

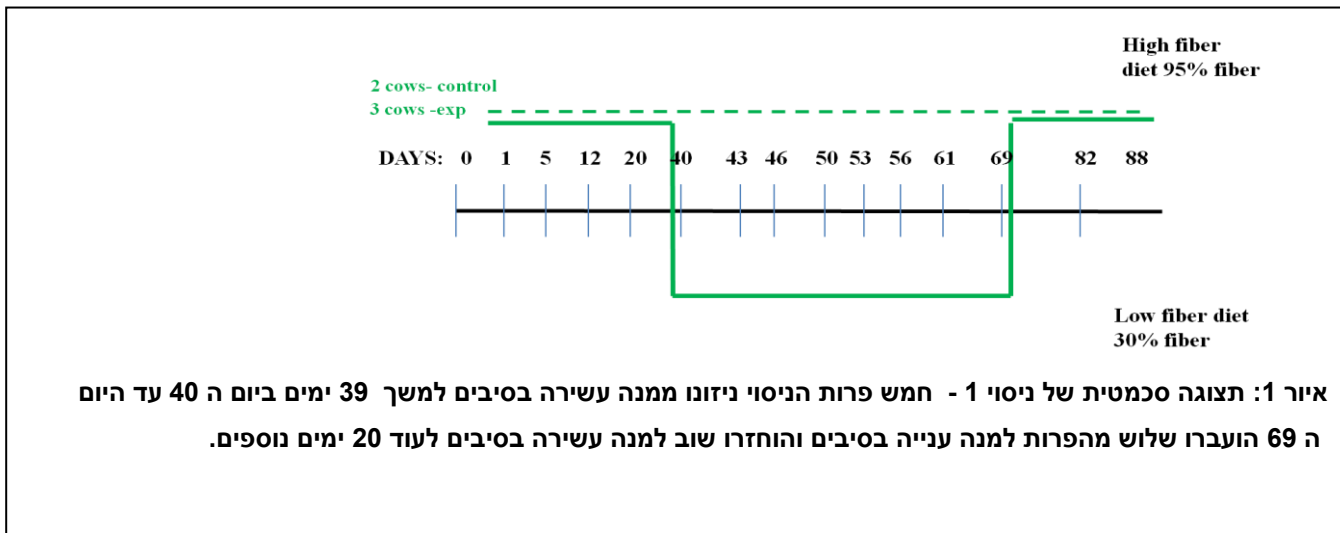
יעדים: מיפוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס הפרה הישראלית כתלות בסוגי המנות אותן היא אוכלת ובידוד זני המתאנוגנים אשר יזוהו כשכיחים בפרות הניסוי [5].

ניסוי 1: זיהוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים כתלות במנה אותה אוכלות הפרות.

חמש פרות מקונלות הוזנו במנה עשירה בסיבים וענייה באנרגיה High Fiber 95% (מזון גס). לאחר 39 ימים,

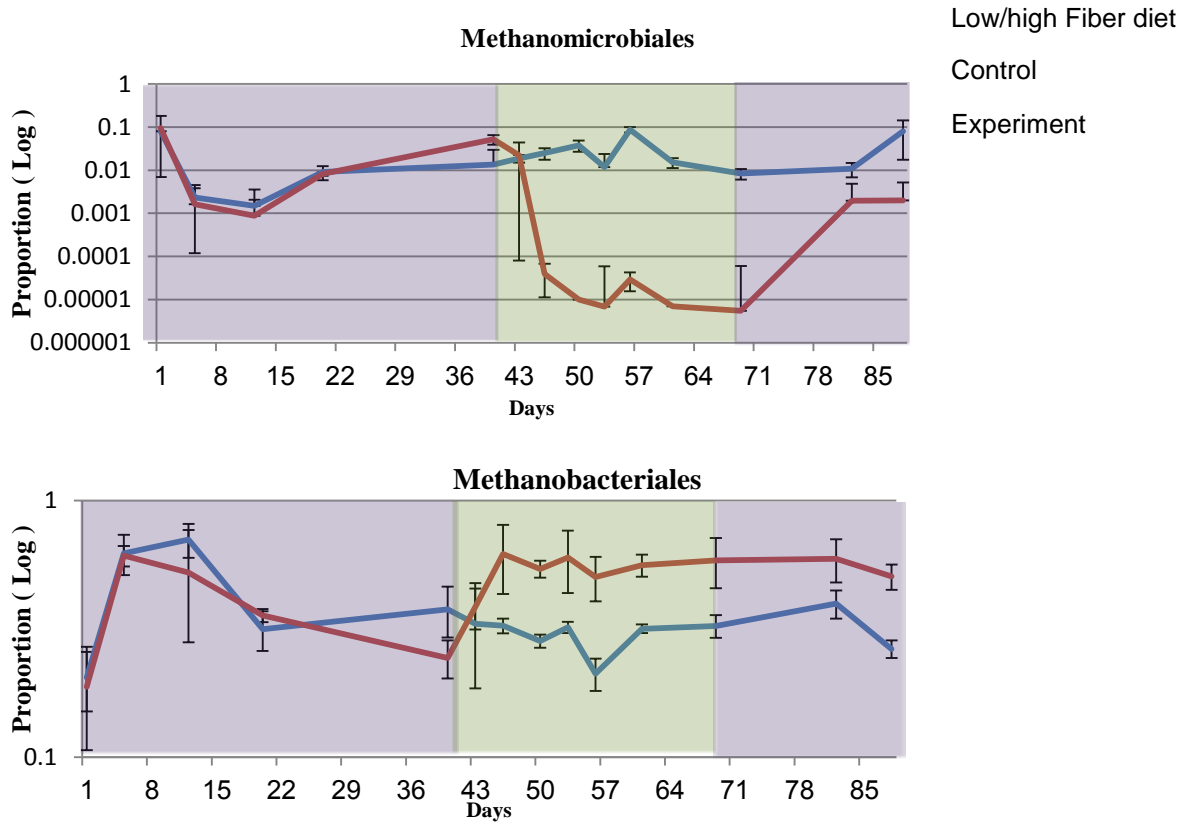
3 פרות הועברו למנה ענייה בסיבים ועשירה באנרגיה - Low Fiber 30% למשך חודש ואז הועברו למנה עשירה בסיבים - 95% למשך שבועיים נוספים ואילו שתי הפרות הנותרות נשאו על המנה העשירה בסיבים כביקורת (איור 1). חומר גנטי (DNA) הופק מדוגמאות מיץ כרס של הפרות בשיטת הפקה שפותחה במעבדה ובוצע אפיון של האוכלוסיות המתאונגניות בשיטת qReal Time PCR המולקולארית (איור 2), המאפשרת כימות מדויק של קבוצות טקסונומיות ידועות וכן באמצעות ריצוף עמוק המאפשר בניית פרופיל טקסונומי של אוכלוסיות המתאונגנים גם ללא ידע מוקדם (איור 3) כמו כן נבחן פוטנציאל פלטת המתאן מכל אחת מאוכלוסיות הכרס במנות השונות (איור 4).

תוצאות :

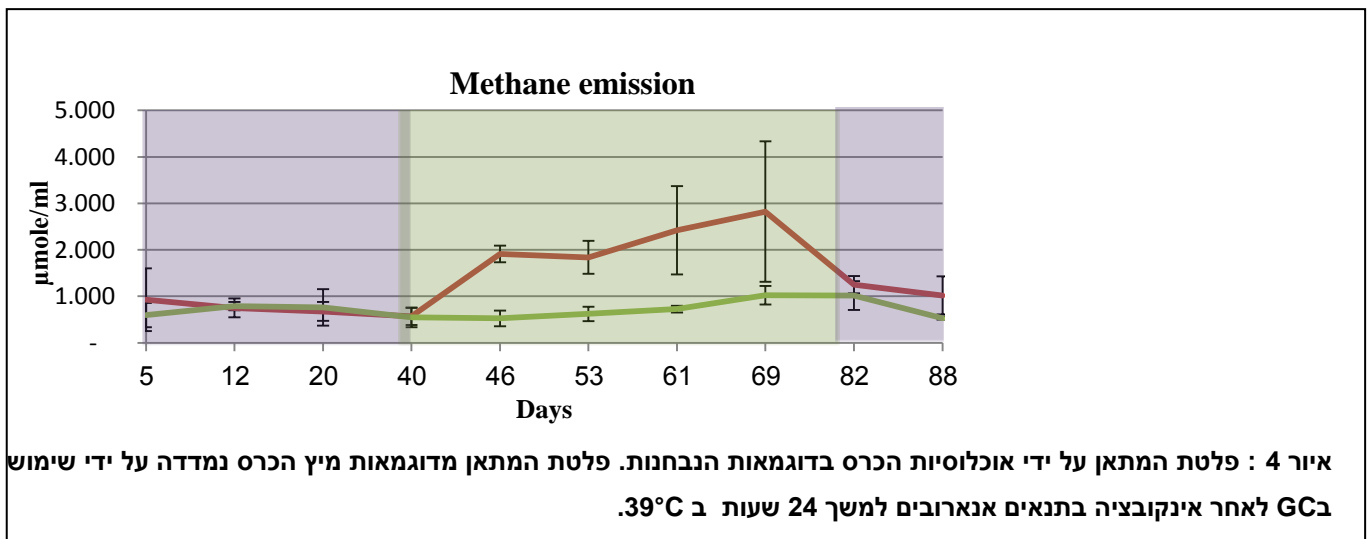
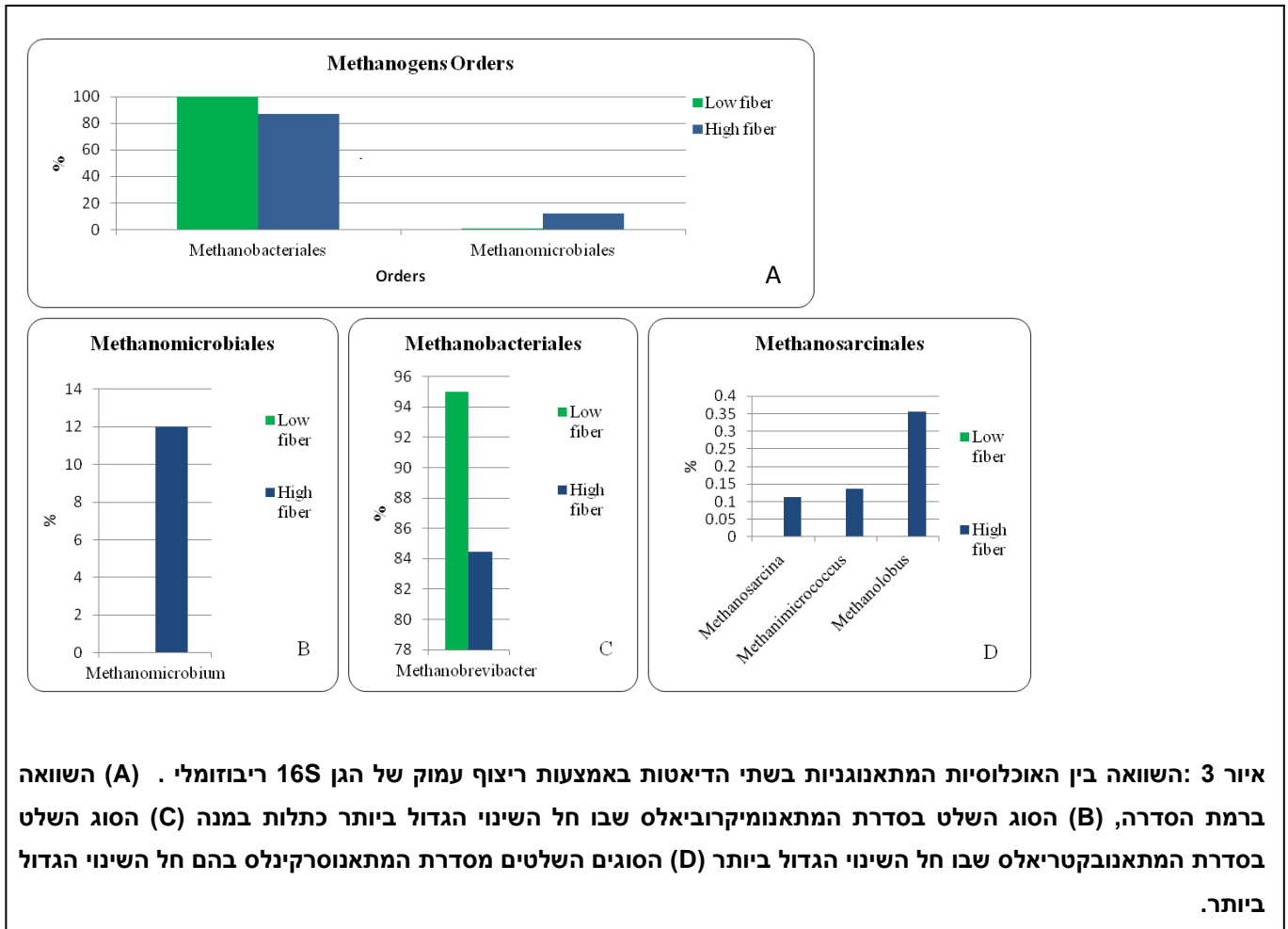


High fiber diet





איור 2 : תוצאות אנליזת qReal Time PCR של אוכלוסיות המתאונגנים ברמת הסדרה. בימים 1-39 הפרות ניזונו מדיאטה עשירה בסיבים, בימים 40-69 הפרות ניזונו מדיאטה ענייה בסיבים (למעט שתי פרות ביקורת אשר הושארו בדיאטה עשירה בסיבים) בימים 70-88 הוחזרו הפרות למנה עשירה בסיבים. בקו אדום הפרות אשר תזונתן השתנתה ובכחול פרות הביקורת אשר תזונתן לא השתנתה.



מסקנות ניסוי 1:

המסקנות העולות מניסוי זה מצביעות על כך שבכרס הפרה הישראלית ישנן שתי אוכלוסיות מתאנוגנים שולטות ברמת הסדרה מתאנובקטריאלס ומתאנומיקרוביאאלס. ישנה גם נוכחות לסדרת המתאנוסרקנילס, אך היא מעטה ביותר. התוצאות מצביעות על כך ששכיחות אוכלוסיות אלו משתנה כתלות במנה אותה אוכלת הפרה (בכפוף לתנאי הניסוי) וכן שהשינוי של אוכלוסיות אלו נמצא ביחס הפוך אחת לשניה, כלומר שהאחת עולה שתי האחרות. אוכלוסיית המתאנומיקרוביאאלס והמתאנוסרקנילס עולה כשאחוז הסיבים במנה עולה ואוכלוסיית המתאנובקטריאלס יורדת בתנאים אלו. כשאחוז הסיבים נמוך אוכלוסיית המתאנומיקרוביאאלס והמתאנוסרקנילס נעלמות כליל, עיקר השינוי מיוחס לסוגים מסוימים בסדרות אלו.

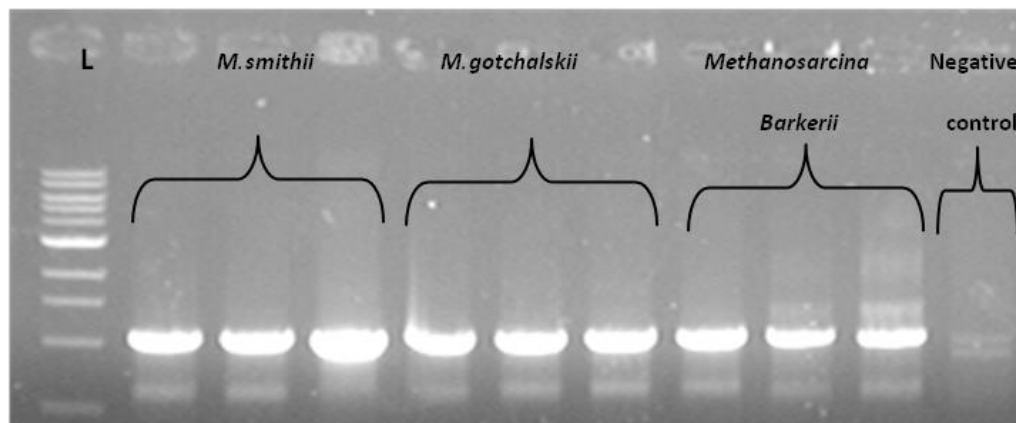
ניסוי 2: כיול מערכות גידול בעבור מתאנוגנים ובידודם מפרות הניסוי

שלבי הניסוי יכללו:

- כיול תערובות גזים במנדף האנארובי במעבדה, כיול מצעי גידול, ותהליכי גידול (גידול על פלטות דורש כיול נוסף)
- בידוד זני מתאנוגנים מכרס פרות הניסוי על פי פרוטוקולים ידועים [6] ושימוש ב qR.T PCR לזהותם.

תוצאות

בעקבות תוצאות ניסוי 1 הוחלט על גידול של זנים מסוימים מסדרות המתאנובקטריאלס, המתאנומיקרוביאאלס והמתאנוסרקנילס. לצורך כך הוקמו וכיילו מערכות גידול אנארובי למתאנוגנים במעבדה. בעזרת מערכות אלו מגודלים במעבדה בימים אלו זנים שונים מסדרות אלו, ונעשה שימוש ב qR.T PCR על מנת לעקוב אחריהם (טבלה 5). כמו כן זנים אלו משמשים לכיול כמצע לבידוד וירוסים.



איור 5: הגברה ב PCR של גן ה 16S ריבוזומלי של זני מתאנוגנים. מהסוג מתאנובקטריאלס המסומן ב M מגודלים שני מיני מתאנוסרקניאלס אשר רוצפו וזוהו ככאלה

<i>Order</i>	<i>Genus</i>	<i>Species</i>	<i>Sequenced</i>
Methanobacteriales	Methanobrevibacter	Ruminantium	+
	Methanobrevibacter	Smithii	+
	Methanobrevibacter	Gottschalkii	+
Methanomicrobiales	Methanomicrobium	Mobile	+
Methanosarcinales	Methanosarcina	Barkeri	+

טבלה 1 : זני מתאנוגנים נפוצים בכרס אשר מגודלים במעבדה.

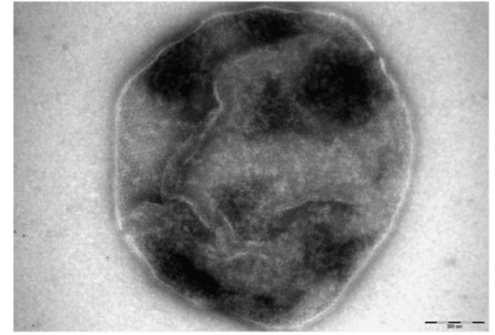
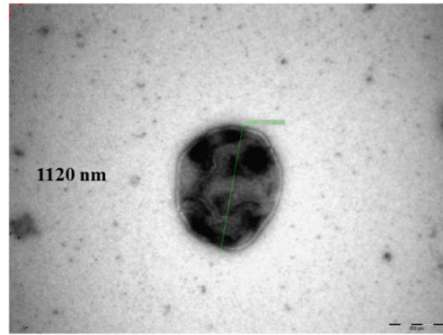
מסקנות

בהתאם לתוכנית העבודה לשנה זו. בשלב השני של הפרויקט המתבסס על מסקנות השלב הראשון של הפרויקט, הצלחנו לגדל תאים מתאנוגנים מהמינים הנפוצים ביותר בכרס הפרות (טבלה 1), מינים אלו משמשים לכיול תנאים באמצעותם יבודדו וירוסים כנגדם בשנה הקרובה.

שנה ב

יעדים: המשך בידוד זני המתאנוגנים אשר יזוהו כשכיחים בפרות הניסוי, וכיול מערכות בידוד לוירוסים מכרס הפרות.

ניסוי 1: בידוד זני מתאנוגנים מכרס הפרה תוך שימוש במערכות הגידול אשר כוילו בשנה א הצלחנו לבודד מספר מני מתאנוגנים שכיחים מכרס פרות הניסוי, מתאנוגנים אלו שייכים לסדרות השכיחות הנזכרות לעיל, בצורה מעניינית הצלחנו לבודד מין מסדרת המתאנומיקרוביאליס - *Methanocorpusculum labreanum* שעד כה בודד מסביבות משקעים ימיים (איור 6) לאחר בידודם אפיינו את פוטנציאל פליטת המתאן שלהם וכן באלו הימים אנו מרצפים את הגנומים שלהם על מנת לזהות ווירוסים אשר עברו איחוי, בשלב הבא נחפש את הווירוסים הללו בכרס הפרות.

Methanocorpusculum labreanum

[Archaea](#)

[Euryarchaeota](#)

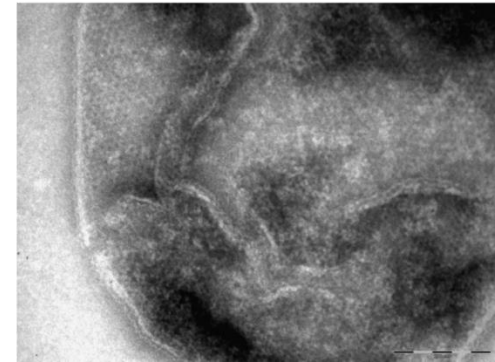
[Methanomicrobia](#)

[Methanomicrobiales](#)

[Methanocorpusculaceae](#)

[Methanocorpusculum](#)

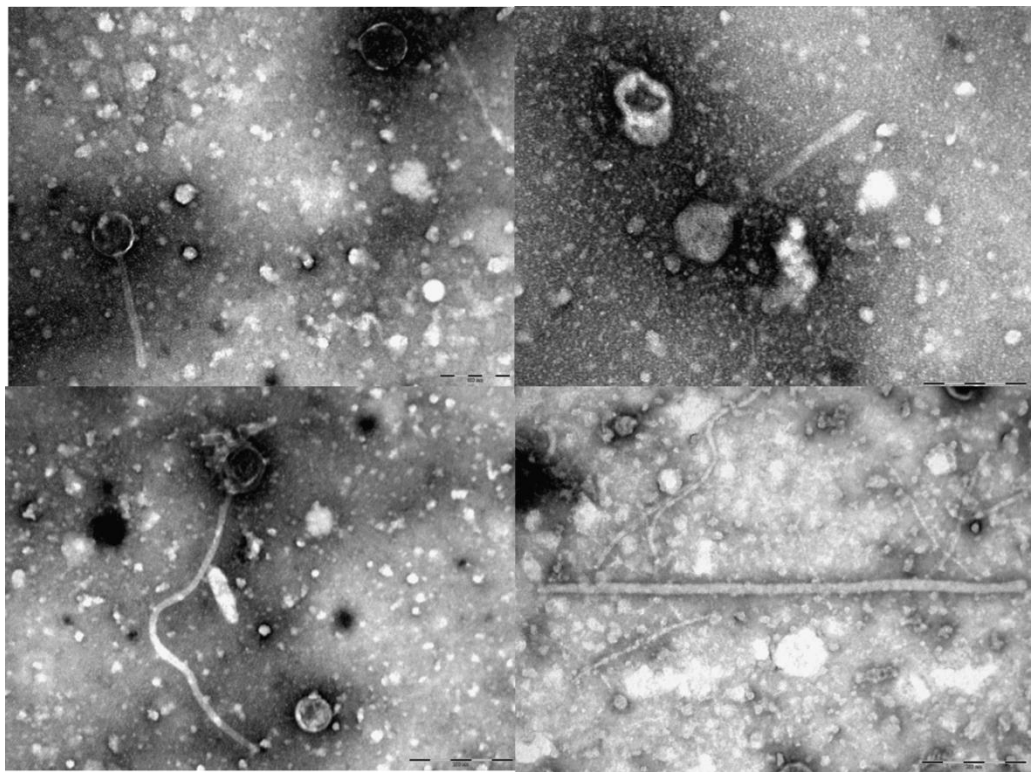
[Methanocorpusculum labreanum](#)



איור 6: תמונת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר של *Methanocorpusculum labreanum* מסדרת המתאנומיקרוביאליס אשר בודד מפרות הניסוי.

ניסוי 2: כיוול מערכות בידוד לוירוסים

בשנה זו כוילו שיטות לריכוז ובידוד וירוסים מהכרס. בעזרת שיטות אלו הצלחנו לבודד פרקציה המכילה חלקיקי וירוסים (איור 7) המשמשים באלו הימים להדבקת זני המתאנונגנים אשר בודדו ומבודדים בשנה א' ו ב'.



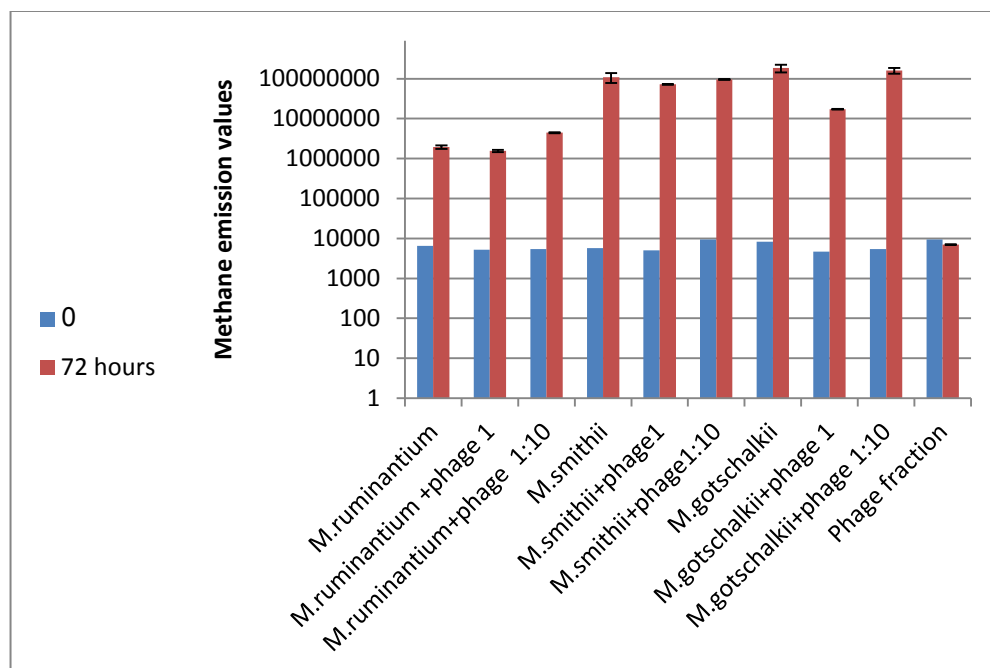
איור 7 : תמונת מיקרוסקופ אלקטרוני חודר של חלקיקי וירוסים שמקורם בכרס פרות הניסוי אשר בודדו בעזרת הפרוטוקולים המוזכרים לעיל.

שנה ג

יעד: הדבקת המתאנוגנים בעזרת אוכלוסיות הוירוסים המבודדות מכרס הפרה ניסוי 1: הדבקת זני מתאנוגנים ידועים עם כלל אוכלוסיות הוירוסים המרוכזת.

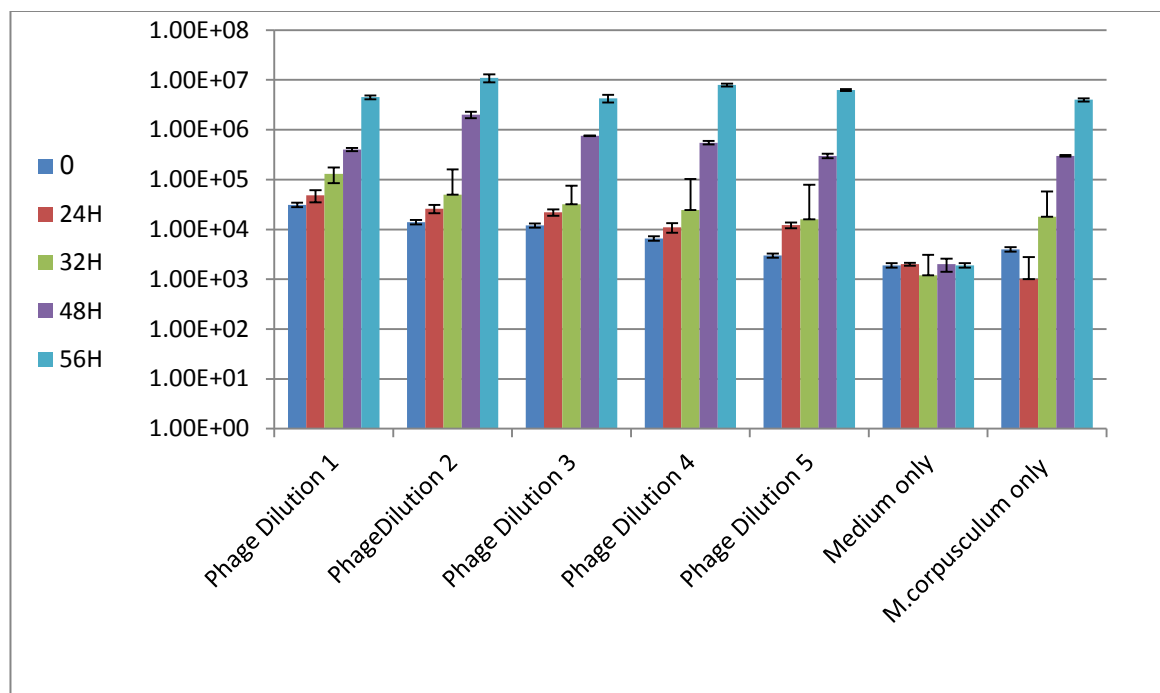
על מנת לבדוד וירוסים התוקפים ספציפית מתאנוגנים תוכננו ניסויי הדבקה המבוססים על שימוש בפרקציה מרוכזת המכילה סוגים שונים של וירוסים מהכרס כנגד דוגמה הומוגנית של מתאנוגנים ספציפיים. כדי ליצור פרקציה כזו היה עלינו לשלב מספר פרוטוקולים של בידוד וירוסים מסביבות אקולוגיות שונות. מכיוון שכרס הפרה הינה נישה אקולוגית ייחודית הן מבחינת הרכב המיקרואורגניזמים שבה והן מבחינת התנאים הפיזיולוגיים (ללא חמצן), היה עלינו לכייל פרוטוקול שיאפשר איסוף מירבי של כלל הוירוסים מהכרס תוך כדי המנעות מפגיעה בהם על ידי חשיפה לחמצן. לאחר שפרוטוקול זה כוייל, נעשה שימוש בעיקר במתאנוגנים שבודדו על ידינו מהכרס (כפי שהוסבר מקודם) כאשר הרעיון המרכזי הוא התאמה מקסימלית בין וירוסים ובין מתאנוגנים החולקים נישה אקולוגית זהה.

מתאנוגנים שונים גודלו עד לשלב לוגריתמי (כ $OD\ 0.6$) ואז הודבקו בצורה אנאירובית עם ריכוז אחד או מספר ריכוזים של וירוסים מהפרקציה שבודדה מהכרס. כמות המתאן שנפלטה מאותם מתאנוגנים נמדדה בזמן 0 ולאחר 72 שעות. מטרת הניסוי הייתה לראות אם הוספה של וירוסים לתרבית המתאנוגנים תפחית את כמות המתאן הנפלטת מאותן תרביות. כפי שניתן לראות באיור 8 לא נצפה הבדל בכמות המתאן הנפלט משלוש תרביות המתאנוגנים כאשר הוספו וירוסים או כאשר התרבית גודלה ללא וירוסים.



איור 8: ניסוי הדבקה של שלושה מיני מתאנוגנים: *M.ruminantium*, *M.smithii*, *M.gotschalkii* על ידי תערובת וירוסים שהופקה מהכרס. העמודות מייצגות את פליטת המתאן של מתאנוגנים בזמן 0 (עמודות כחולות) ולאחר 72 שעות (עמודות אדומות). ציר ה X מציין את מין המתאנוגן וציר ה Y מציין את פליטת המתאן.

בניסוי נוסף שנעשה נבדקה הפרקציה של תערובת הוירוסים על אחד המתאנוגנים שבודדו מכרס הפרות אצלנו במעבדה (ראה איור 6). בניסוי זה נבדקו 5 מיהולים חציוניים של אותה הפרקציה (Dilution1, Dilution2....) כאשר כל מיהול מכיל מחצית מריכוז הוירוסים ביחס למיהול שלפניו. (Dilution 5 מכיל מחצית מריכוז הוירוסים מ Dilution 4 שמכיל מחצית מריכוז הוירוסים מ Dilution 3 וכך הלאה). כפי שניתן לראות באיור 9 אף אחד מהמיהולים השונים לא גרם להפחתה בייצור המתאן בהשוואה לביקורת שהיתה דוגמת מתאנוגן בלבד ללא הוספה של וירוסים בכלל.

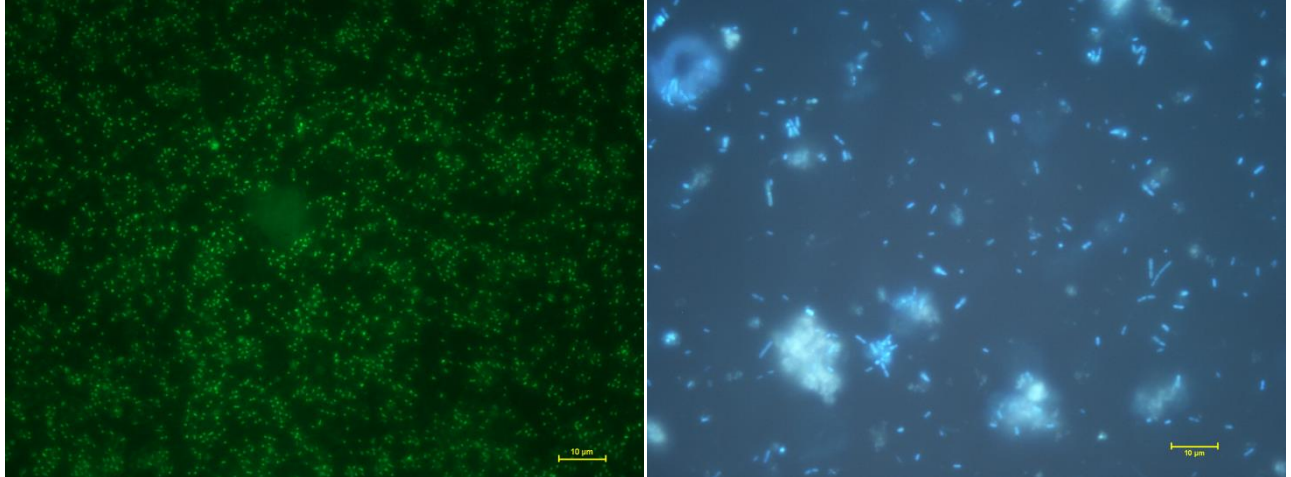


איור 9: ניסוי הדבקה לאורך זמן של מתאנוגן מין *M. labreanum* על ידי תערובת וירוסים שהופקה מהכרס. העמודות מייצגות את הזמנים השונים בהם נמדדה פליטת המתאן על ידי הדוגמאות השונות. ציר ה X מציין את מין המתאנוגן וציר ה Y מציין את פליטת המתאן.

ניסוי 2: הדבקה זני מתאנוגנים ידועים עם וירוסים מסומנים בסימון פלורוסנטי על מנת לנסות ולזהות אינטראקציה כלשהי בין מיני מתאנוגנים שונים ובין הוירוסים שבכרס השתמשנו בשיטת צביעה פלורוסנטית. למתאנוגנים תכונה יחודית הגורמת להם לזהור באור כחול תחת תנאים מסוימים (הקרנה באורך גל מסוים גורים להם לפלוט אור באורך גל בצבע כחול) וגם את הזהירה הזו ניתן לראות במיקרוסקופ הפלורוסנטי.

באמצעות שיטה זו החומר הגנטי, ה-DNA של הוירוסים נצבע באמצעות חומר הזורח הניתן לזיהוי תחת מיקרוסקופ פלורוסנטי. בניסוי זה פרקצית הוירוסים נצבעה בחומר זה ולאחר מכן היא עורבבה עם דוגמאות הומוגניות של מתאנוגנים ספציפיים.

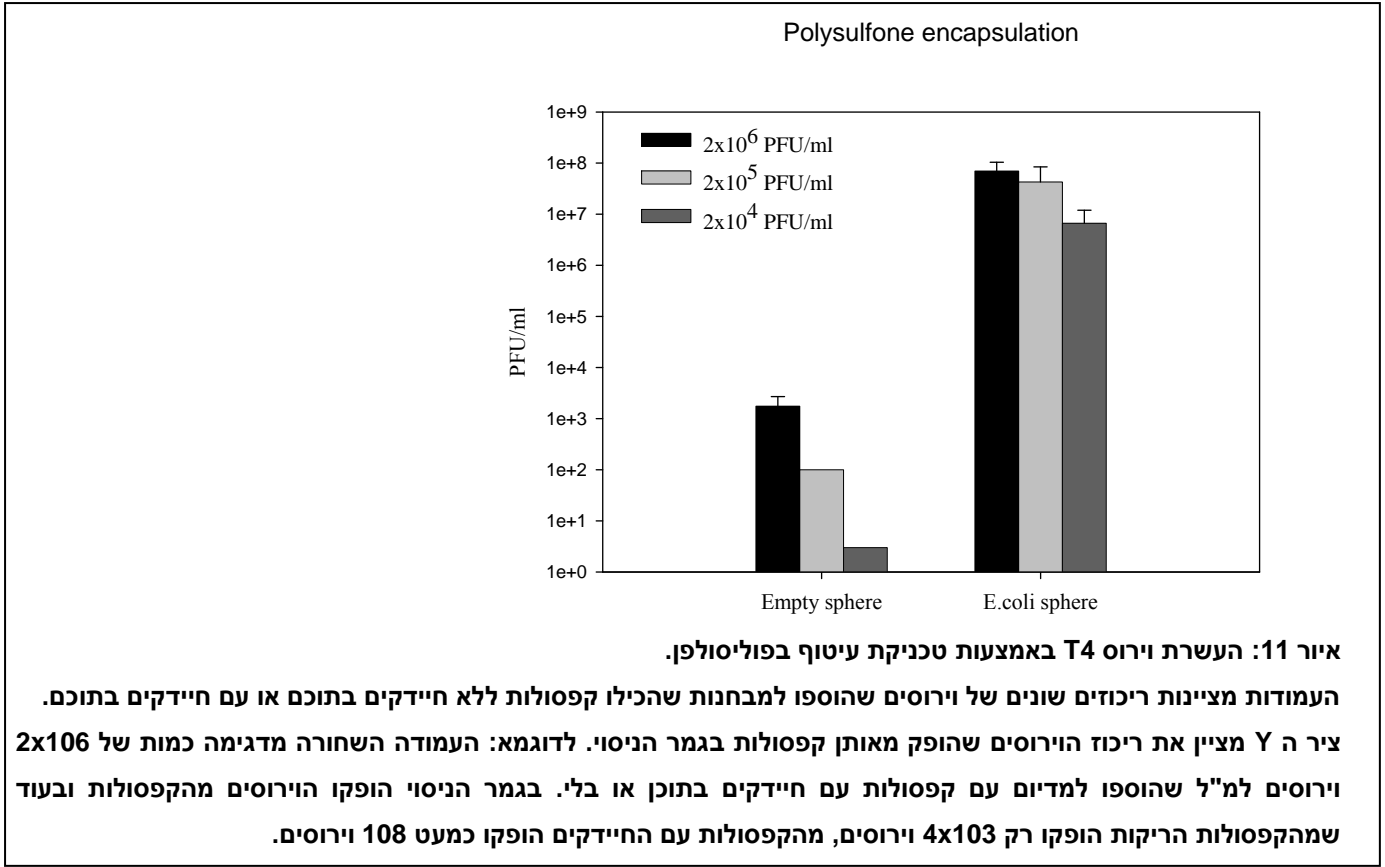
לאחר מכן, קובעו הדוגמאות על פני פילטרים מיוחדים ונבדקו תחת מיקרוסקופ פלורוסנטי על מנת לנסות ולזהות בצורה ויזואלית האם ישנם וירוסים (הפולטים אור ירוק) בסמיכות או בתוך תאים מתאנוגנים (הפולטים אור כחול). איור 10 מדגים כיצד נראים המתאנוגנים והוירוסים הצבועים תחת מיקרוסקופ פלורוסנטי. המתאנוגנים פולטים אור כחול ואילו הוירוסים שעברו צביעה פולטים אור ירוק. כאשר שתי הדוגמאות עורבבו לא ניתן היה לראות צבע ירוק בסמוך לצבע הכחול או בתוכו, כלומר לא הצלחנו לזהות אינטראקציות פיזיות ממשיות בין הפרקציה הויראלית לבין מתאנוגנים שונים.



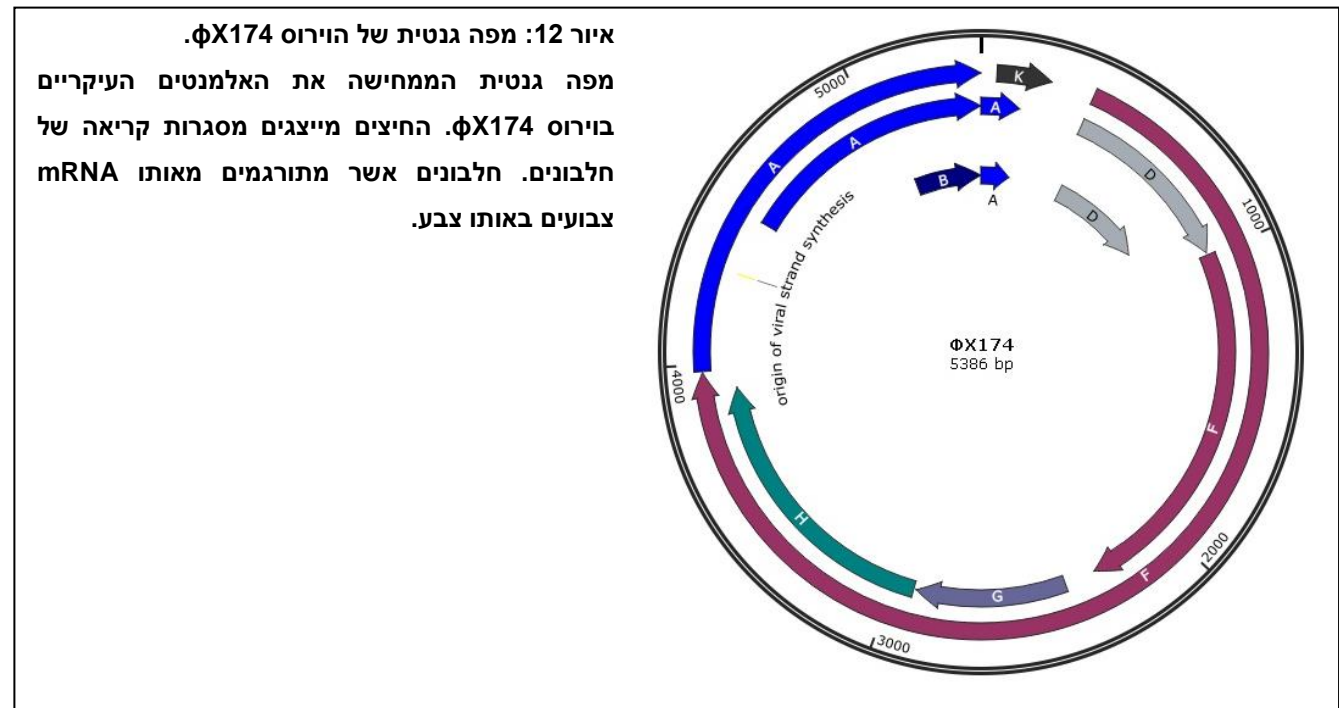
איור 10: צילום ממיקרוסקופ פלורוסנטי. מימין פרקציית וירוסים שעברה צביעה גנומית וזורחת בירוק. משמאל מתאנוגנים הזוהרים בכחול.

ניסוי 3: בניית מערכת בידוד וירוסים ייחודית המבוססת על קפסולות העשויות מפוליסולפן. בניסוי זה נעשה שימוש בקפסולות העשויות מפוליסולפן. כפי שהודגם בעבר [7] ניתן באמצעות שיטה זו לעטוף חיידקים שאין דרך ידועה להעשירם באמצעים רגילים (לדוגמא חיידקי אצות) ולכן הם נעטפים בפוליסולפן, מוחזרים למדיום המקורי שלהם (בניסוי המצוטט הוחזרו לאקווריום ונטמנו ליד האלמוגים) ושם הם מקבלים את כל הנוטריינטים ההכרחיים לגידולם. לאחר מספר ימים הקפסולות מוצאות מהמדיום והחיידקים מופקים וניתן לעבוד עימם. במעבדה אנו השתמשנו במערכת זו על מנת לנסות ולהרבות וירוסים כנגד מתאנוגנים ספציפיים. הרעיון היה לעטוף תרבית הומוגנית של מתאנוגן ספציפי בתוך אותן קפסולות ולהחדיר לתוך כרס הפרה. בכרס, וירוסים שונים יכנסו ויצאו בצורה חופשית מהקפסולה עד שיגיע וירוס שמסוגל להדביק את המתאנוגן שנמצא בקפסולה, הוא יתרבה בה ואז לאחר מספר ימים הקפסולה תוצא מן הכרס, הוירוסים יופרדו ותבוצע הדבקה נוספת בתוך מבחנות בהיקף גדול יותר על מנת להעשיר את תרבית הוירוסים שנמצאים בתקווה בקפסולה. תחילה, היה עלינו לבחון האם וירוסים יכולים להיכנס לתוך הקפסולה ולהתרבות ולשם לכך השתמשנו במודל שח חיידק E.coli ווירוס הידוע שמדביק אותו T4.

באיור 11 ניתן לראות שני סוגי קפסולות: קפסולה ריקה וקפסולה שמכילה את חיידק ה E.coli. כאשר הוכנסו למדיום קפסולות ללא חיידקים ביחד עם ריכוזים שונים של וירוסים, ניתן לראות כי כמות הוירוסים שהופקה מהקפסולות היתה נמוכה בהשוואה לכמות הוירוסים שהופקה מאותן קפסולות שהכילו חיידקים. ההסבר לכך הוא שהוירוסים נכנסו לשני סוגי הקפסולות אך היכן שהיו חיידקים, הוירוסים התרבו ולכן התקבלה כמות גדולה יותר מאשר בקפסולות הריקות ששם הוירוסים נכנסו ויצאו באופן ספונטני אך לא התרבו. תוצאות אלו מוכיחות את התכונות המערכת ולכן יש להמשיך ולבדוק את יכולתה בבידוד וירוסים מכרס הפרה.



ניסוי 4: חיפוש זני וירוסים אשר הדביקו מתאנוגנים ואשר יתכן וישמשו כוירוסים להדבקה בעתיד



גנומים של מתאנוגנים מבודדים רוצפו בעזרת שיטות ריצוף DNA מתקדמות. הרצפים שהתקבלו נבחנו באופן מעמיק, ובצורה זו מצאנו גנום שלם של וירוס $\phi X174$ (איור 12), אשר ידוע כוירוס שמדביק חיידקים מסויימים. המצאות הגנום הויראלי בתוך הגנום של המתאנוגן מרמזת על כך שיתכן כי הוא יכול להדביק גם מתאנוגנים. וירוס מסוג זה יכול לשמש להדבקת מתאנוגנים בעתיד. כמו כן, בצורה זו ניתן למצוא וירוסים נוספים בעלי יכולת הדבקת מתאנוגנים.

מסקנות:

במהלך שנה זו שולבו בד ובד דוגמאות המתאנוגנים שבודדו מהכרס ושנרכשו יחד עם פרקציות של וירוסים ונבדקה יכולתם של אותם וירוסים להדביק ולפגוע במתאנוגנים. ננקטו מספר גישות החל מניסויי הדבקה ישירים של מתאנוגנים עם פרקציה ויראלית וכלה בניסיון לזהות אינטראקציה פיזית בין המתאנוגנים לבין הוירוסים. ניסויים אלו לא צלחו ולא עלה בידינו נכון לרגע זה לבודד וירוסים כנגד מתאנוגנים מהכרס. בנוסף לכך נוסתה גישה חדשנית של העשרת וירוסים בנישה המקורית שלהם (כרס הפרה) על מנת לבודד וירוסים.

- .1 Johnson KA & Johnson DE (1995) Methane emissions from cattle. *J Anim Sci* **73**, 2483-2492.
- .2 Wuebbles DJ HK (2002) Atmospheric methane and global change. *Earth-Sci Rev* **57**, 117-210.
- .3 Wright AD, Kennedy P, O'Neill CJ, Toovey AF, Popovski S, Rea SM, Pimm CL & Klein L (2004) Reducing methane emissions in sheep by immunization against rumen methanogens. *Vaccine* **22**, 3976-3985.
- .4 Prangishvili D, Forterre P & Garrett RA (2006) Viruses of the Archaea: a unifying view. *Nat Rev Microbiol* **4**, 837-848.
- .5 Miller TL, Wolin MJ, Zhao HX & Bryant MP (1986) Characteristics of methanogens isolated from bovine rumen. *Appl Environ Microbiol* **51**, 201-202.
- .6 Gilbert RA, Ouwerkerk D, Zhang LH & Klieve AV (2010) In vitro detection and primary cultivation of bacteria producing materials inhibitory to ruminal methanogens. *J Microbiol Methods* **80**, 217-218.
- .7 Ben-Dov E, Kramarsky-Winter E & Kushmaro A (2009) An in situ method for cultivating microorganisms using a double encapsulation technique. *Fems Microbiology Ecology* **68**, 363-371

סיכום עם שאלות מנחות

מטרות המחקר תוך התייחסות לתוכנית העבודה.
שנה א - מיפוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס הפרה הישראלית כתלות בסוגי המנות אותן היא אוכלת כשכיחים בפרות הניסוי
שנה ב - המשך בידוד זני המתאנוגנים אשר יזוהו כשכיחים בפרות הניסוי, וכיול מערכות בידוד לוירוסים מכרס שנה ג –בחינה in vitro של יעילות הוירוסים בפגיעה סלקטיבית במתאנוגנים, ובהפחתת פליטת המתאן
עיקרי התוצאות.
לאחר מיפוי ואפיון אוכלוסיות מתאנוגנים בכרס הפרה הישראלית כתלות בסוגי המנות אותן היא אוכלת כיילנו מערכות גידול למתאנוגנים במעבדה וכיום אנו מגדלים זני מתאנוגנים אלו במעבדה.
מערכות הבידוד לוירוסים כוילו ונבדקו הן אינטראקציות פיזיות של הוירוסים עם המתאנוגנים והן יכולתם של הוירוסים להדביק ולפגוע בתאים המתאנוגנים.
מסקנות מדעיות וההשלכות לגבי יישום המחקר והמשכו. האם הושגו מטרות המחקר לתקופת
כן
בעיות שנתרו לפתרון ו/או שינויים (טכנולוגיים, שיווקיים ואחרים) שחלו במהלך העבודה; התייחסות
כרגע אין
הפצת הידע שנוצר בתקופת הדו"ח: פרסומים בכתב - ציטט ביבליוגרפי כמקובל בפרסום מאמר
אנחנו בעיצומו של כתיבת המאמר
פרסום הדו"ח: אני ממליץ לפרסם את הדו"ח: (סמן אחת מהאופציות)
ללא הגבלה (בספריות ובאינטרנט)
האם בכוונתך להגיש תוכנית המשך בתום תקופת המחקר הנוכחי? כן

*יש לענות על שאלה זו רק בדו"ח שנה ראשונה במחקר שאושר לשנתיים, או בדו"ח שנה שניה במחקר שאושר לשלוש

שנים