

## תוכן עניינים

2	תקציר
3	דו"ח המחקר המסכם
3	מבוא
3	מטרות המחקר
4	עיקרי הניסויים
6	תוצאות
10	הפרדת פרקציות הכרס לפי גודל חלקיק והרכב מתאנוגנים צמודי פרוטוזואה
10	השפעת מספר הפרוטוזואה על ייצור מתאן
11	פרקציות פרוטוזואליות שונות מפגינות יכולות ייצור מתאן שונות
13	דיון ומסקנות
15	ציטוטים

**דו"ח מדעי לתכנית מחקר מספר 362-0542**

**שנת המחקר: שלישיית מתוך שלוש שנים**

**זיהוי ואפיון הרכב אוכלוסיות המתאנוגנים בפרקציות השונות של כרס  
הפרה למציאת מטרות למיגור פליטת המתאן.**

**Identification of highly active methanogens in the different fractions  
of the bovine rumen for targeted microbiome modulation**

מוגש לקרן המדען הראשי במשרד החקלאות

ע"י

אלי ז'מי

מחלקה לבקר וצאן, המכון לחקר בע"ח, מנהל המחקר החקלאי

Elie Jami, Dept. of Ruminant Science, Inst. of Animal Science, Agricultural Research  
Organization. E-mail: [elie@agri.gov.il](mailto:elie@agri.gov.il)

## תקציר

במחקר הנוכחי, אנו מתמקדים באוכלוסיות מתאנוגניות המצויות בפרקציות השונות של כרס הפרה (microhabitats) בדגש על אוכלוסיית המתאנוגנים המצויים באסוציאציה עם פרוטוזואה ריסניות שונות. אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס נצפתה במחקרים קודמים כמעודד מרכזי של פליטת מתאן, על ידי אינטראקציות סימביוטיות עם המתאנוגנים בכרס. למחקר הנ"ל שתי מטרות מרכזיות (1) אפיון אוכלוסיית המתאנוגנים אשר באסוציאציה עם אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה (2) אפיון מידת תרומתם של אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה על ייצור מתאן. במחקר זה נבנו מערכות מחקריות ופותחו כלים מחקריים המאפשרים לאפיין את השפעתם של פרוטוזואה על האקוסיסטמה של הכרס. הקמנו מערכת לשיכוב ובידוד תתי אוכלוסיות של פרוטוזואה, פיתחנו פרוטוקול לניקוי הפרוטוזואה מחיידקים חופשיים בכדי לאפיין את אוכלוסיית הסימביונטים שלהם, וכן בדקנו את השפעתם של פרוטוזואה שונים על ייצור מתאן. כלים אלו אפשרו לנו לזהות אוכלוסיות פרוטוזואה ספציפיות אשר מפגינות השפעת מובהקת גדולה יותר על ייצור מתאן, מה שמראה על תפקוד שונה של פרוטוזואה שונים בכרס, ומעמיד את אותם אוכלוסיות כמועמדים טובים להסרה סלקטיבית למיגור פליטת המתאן.

במהלך המחקר ביססנו פרוטוקולים לבידוד תתי אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה והמתאנוגנים הצמודים להם. פרוטוקול זה יחד עם שיטות ריצוף עמוקות אפשרו לאפיין את גודל אוכלוסיות המתאנוגנים המצויים בקשר פיזי עם אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה ולהשוות אותם למתאנוגנים החופשיים בסביבת הכרס בכדי לעמוד על ההבדלים ביניהם. איששנו את הנחת המוצא שלנו שקיימים הבדלים בזיקה בין המתאנוגנים לפרוטוזואה, ושאוכלוסיות פרוטוזואה מסוימות מאופיינות באסוציאציה עם מספר רב של מתאנוגנים ביחס לאוכלוסיות אחרות שנבחנו. בשנה השנייה, ובהתבסס על הפרוטוקול אשר פותח, אנו בדקנו את מידת תרומתם של מאגדי פרוטוזואה שונים על ייצור מתאן. תוצאות מאששות את ההיפותזה נוספת כי אוכלוסיות פרוטוזואה מסוימות אחראיות על ייצור מתאן באופן מוגבר ביחס לאוכלוסיות אחרות. ספציפית, פרקציות המועשרות בפרוטוזואה מסוג *Isotricha* מפגינות ייצור מוגבר משמעותית של מתאן. תוצאות ניסויים אלה מראות כי לפרוטוזואה תפקיד חשוב בהגברת תהליך המתאנוגנזה בפרה וכי סוגים ספציפיים של פרוטוזואה אחראים לכך באופן דיספרופורציוני. תוצאות אלו מאפשרות לשקול דרכים למיגור פליטת מתאן בעזרת מניפולציה סלקטיבית של אוכלוסיית הפרוטוזואה, ולא, כפי שנעשה עד כה, החסרה מוחלטת של אוכלוסיית הפרוטוזואה אשר משפיע באופן ישיר על התפוקה.

## דו"ח המחקר המסכם

### מבוא

מערכת העיכול של הפרה מחולקת לארבעה מדורים, כשהראשון ביניהם הינו הכרס. במדור זה שוכנת אוכלוסייה ענפה ומגוונת של מיקרואורגניזמים, הקרויה באופן קולקטיבי 'מיקרוביום', אשר מבצעים את תהליך התסיסה והפירוק של החומר הצמחי במזון הפרה<sup>1</sup>. למיקרוביום משויכים תפקידים מרכזיים בפיזיולוגיה הפרה, שכן תוצרי התסיסה המיקרוביאלית מספקים לחיה את מרבית האנרגיה האצורה בחומר הצמחי ונמצא כי קיים קשר בין הרכב האוכלוסייה האינדיבידואלי של כל פרה לבין יעילות ניצולת המזון שלה<sup>2-4</sup>. למרות זאת, לאוכלוסייה זו גם ידועות השפעות שליליות על הסביבה, אשר מתבטאת בייצור מתאן, גז חממה פוטנטי בעל השפעה סביבתית רחבה, אשר נפלט לאוויר ותורם משמעותי לאפקט החממה והתחממות גלובלית<sup>5</sup>.

הקשר ייצור מתאן לפרוטוזואה בכרס נצפה במחקרים קודמים בהם נמצא, כי ריקון תוכן הכרס מפרוטוזואה בשיטת defaunation מובילה לירידה משמעותית של עד כ-13% בפליטת המתאן מהחיה לסביבה<sup>6,7,8</sup>. מחקרים אלו ונוספים הציעו כי אוכלוסיית המתאנוגנים השוכנת בתוך הפרוטוזואה פעילה יותר מהאוכלוסייה המתאנוגנים החופשיים, ומציעים כי הדו-קיום ביניהם הוא זה שמאפשר תנאים אופטימליים לגדילתם של הסימביונטים<sup>6</sup>. מספר רב של שאלות נותרות לגבי היחס בין מתאנוגנים מיצרי מתאן ופרוטוזואה: (1) האם קיים שוני בין אוכלוסיות הסימביונטים המתאנוגניים המצויים באוכלוסיות פרוטוזואה שונות ו(2) האם ישנה לכך השפעה על שחרור המתאן, וכיצד משפיעים הפרוטוזואה על הפעילות המתאנוגנית. השאיפה היא לפתח שיטות מגוונות לניתוב סלקטיבי של האוכלוסייה המיקרוביאלית לשיפור תנובת המשק, להוביל לאסטרטגיות להפחתת ייצור המתאן והגברת יעילות פעילות הכרס ובכך יעילות הייצור ברפת וצמצום נזקים סביבתיים.

### מטרות המחקר

לאור השאלות והמטרות הללו, המחקר הנ"ל בא לאפיין את אוכלוסיות המתאנוגנים בכרס הפרה בפרקציות השונות שלו, הכוללות תתי אוכלוסייה של פרוטוזואה והמתאנוגנים החופשיים ולהעריך האם קיימת תרומה משמעותית של תתי אוכלוסיית פרוטוזואה בייצור מתאן. בשנה הראשונה של המחקר פותח פרוטוקול לבידוד תתי אוכלוסייה של מתאנוגנים על פי המיקרוהביטטים השונים שלהם (אוכלוסיות פרוטוזואה שונים ומנגד אוכלוסיית המתאנוגנים החופשית), אשר מאפשר לנו להעריך את מידת תרומתם של אוכלוסיות הפרוטוזואה השונות בייצור מתאן. לכן, בשנה השנייה כילנו ומדדנו את האפקט של אותן פרקציות שהופקו

על פוטנציאל ייצור מתאן שלהן *in-vitro*. אנו מצאנו שאכן באופן כללי, הימצאות של פרוטוזואה יחד עם אוכלוסיית הבקטריה וארכאה של הכרס משפיע באופן חיובי (יותר מתאן) על פליטת המתאן, ושפרקציות פרוטוזואליות המועשרות בפרוטוזואה ספציפיים מפגינות ייצור מוגבר של מתאן ביחס לפרקציות אחרות. ממצאי השנה ימקדו ניסיונות עתידיים פוטנציאליים של מיגור פליטת מתאן על ידי מניפולציה ממוקדת של הפרוטוזואה אשר מהווים שחקנים מרכזיים בפליטת מתאן.

במחקר זה אנו מתמקדים באוכלוסיית המתאנוגנים ולאפיינם, לא כאוכלוסייה הומוגנית אחת, אלה כתלות בסביבות השונות בכרס מהן הם מגיעים – בחנו את מידת תרומתם של מינים שונים או מאגד מינים שונים על פי מקורם, על פליטת המתאן. המחקר מהווה בסיס הבנתי על תורמתם של מתאנוגנים ספציפיים ועל מידת ההשפעה של הדו קיום עם פרוטוזואה שונים על המתאנוגנזה למיקוד המאמץ למציאת פתרונות מיגור התופעה תוך כדי מזעור השפעות נלוות. מחקר זה מחולק ל-3 מטרות עיקריות:

1. בידוד של מינים או מאגד מיני מתאנוגנים החופשיים והסימביוטיים בפרקציות השונות על פי גודל בכרס הפרה.
2. מדידת פוטנציאל המתאנוגנזה של מינים או מאגד מיני המתאנוגנים השונים בתלות למקורן בכרס.
3. אפיון הרכבם של המתאנוגנים בפרקציות השונות מהן בודדו ובחינת מתאם בין ייצור המתאן להרכב.

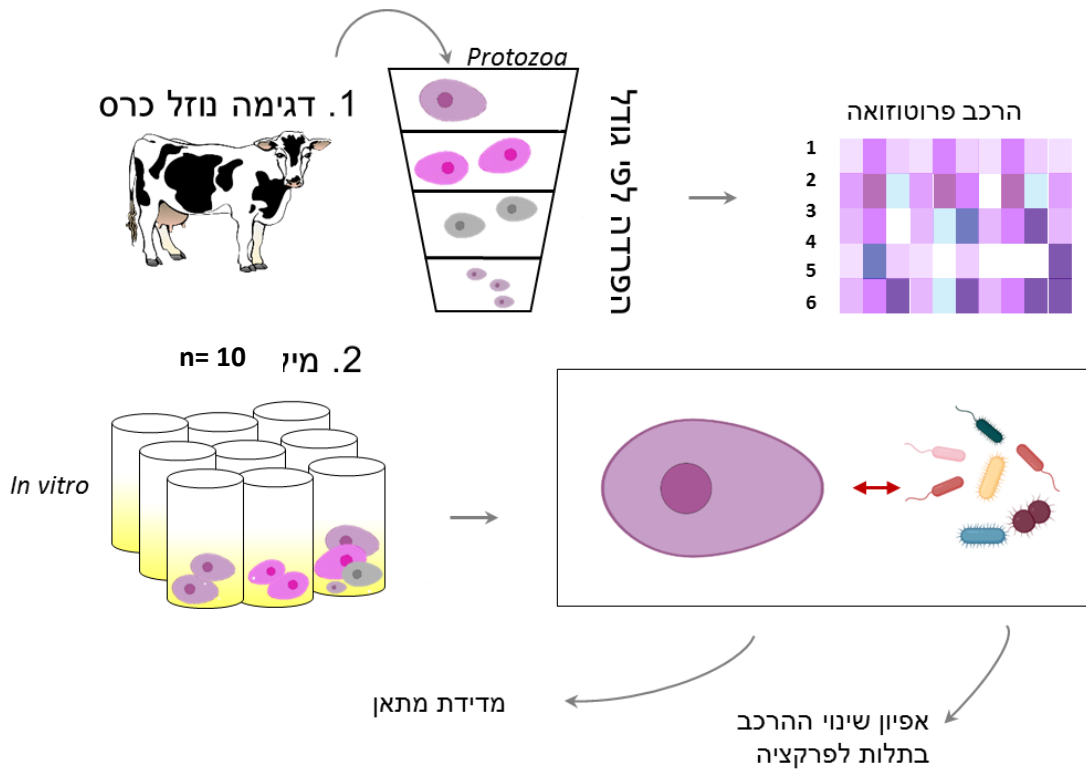
## עיקרי הניסויים

### שיטות וחומרים

בשלב הראשונים של המחקר התמקדנו בכיול פרוטוקולים להפרדת פרקציות נקיות שונות המצויות בכרס הפרה. לפרוטוזואה טווח רחב של גדלים הנעים בין מעל 100 מיקרון לקטנים מ-10 מיקרון. תכונות אלו אפשרו לנו להפרידם לתתי אוכלוסיות יחד עם אוכלוסיות המתאנוגנים הייחודיות לכל פרקציה (סכמה 1). פרוטוקול זה אפשר לנו לאפיין את אוכלוסיות המתאנוגנים צמודי פרוטוזואה ולהעריך האם מדובר באוכלוסיות בלתי תלויות באוכלוסיות הפרקציה החופשית של הכרס (סכמה 1 ניסוי 1).

בשנה השנייה, חלק מפרוטוקול זה שימש לצורך הערכת מידת תרומתם של אוכלוסיות פרוטוזואה שונות על ייצור מתאן. הערכה זו נעשתה על ידי שני ניסויים מרכזיים (1) הערכת השפעתם של מספר התאים הפרוטוזואליים שונה על ייצור מתאן (2) ביצוע ניסוי מיקרוקוזם (microcosm) בו אוכלוסיית הפרוקריוטים החופשית מודגרת במשך 5 ימים עם הפרקציות פרוטוזואליות בגדלים שונים שהתקבלו מהפרוטוקול שפותח בשנה הראשונה אשר מועשרים במיני פרוטוזואה שונים (סכמה 1, ניסוי 2), וכל יום נמדדת פליטת

המתאן מאותן פרקציות. מדידת מתאן נעשתה יומית, על ידי גז כרומטוגרפיה. בשנה השלישית, אפיינו את השפעת הפרוטוזואה על אוכלוסיית המתאנוגנים, ומשלים את התמונה של יחסי גומלין ביניהם.



**סכמה 1. סכמת עבודה כוללת לכל שנות המחקר להפרדה של פרוטוזואה לפרקציות על פי גודל.** נוזל הכרס של 10 פרות המצויות כחודשיים על אותה מנת יבשות (מנה עתירת סיב) נדגמו בכדי לאפיין את האוכלוסיות השונות בכרס. לאחר הדגימה, נוזל הכרס מודגר במשך שעה אחת במשפך מפריד עם ברז על הקרקעית לשפוך את שבר פרוטוזואה. הפרוטוזואה מופרדים אז באמצעות פילטרים בעלי גדלים שונים של הנקבוביות ( $10\mu\text{m}$  -  $60\mu\text{m}$ ,  $40\mu\text{m}$ ,  $100\mu\text{m}$ ). לאחר מכן DNA מופק ומרוצף גן ה-18S הריבוזומלי בכדי לקבל מידע טקסונומי על הרכבי אוכלוסיות הפרוטוזואה שהתקבלו בכל פרקציה. לאחר ספירת מספר התאים במיקרוסקופ, כל פרקציה מודגרת עם נוזל כרס נטול פרוטוזואה אך עם סך כל אוכלוסיית הפרוקריוטים של הכרס (בקטריה וארכאה). כל הדגרת פרקציה נעשתה בטריפליקטים לכל פרה שנדגמה. בנוסף לפרקציות הפרוטוזואה, הודגרו נוזל כרס ללא פרוטוזואה וטריפליקטים נוספים הודגרו עם מכלול אוכלוסיית הפרוטוזואה. כל הפרקציות הודגרו עם אותו מספר פרוטוזואה של  $10^5$  פר מבחנה.

## תוצאות

### הרכב פרוטוזואה ומתאנוגנים כללי בכרס הפרות

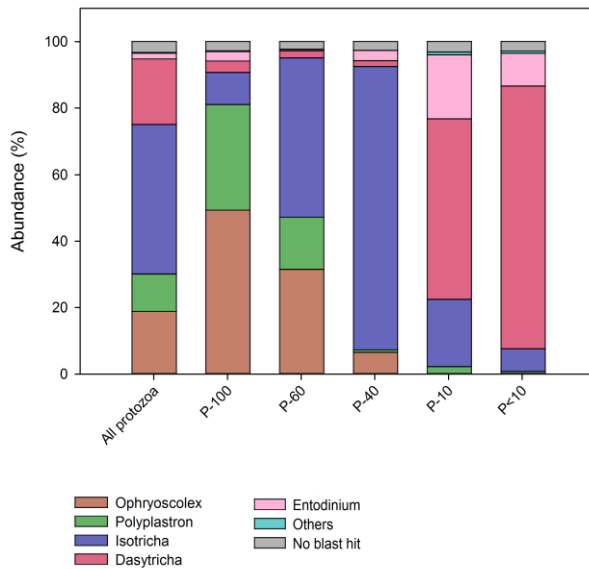
ריצוף של יחידת הריבזום 18S אפשרה לנו לאפיין את אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס על פני הפרות השונות. נמצאו בסה"כ 13 סוגים שונים של פרוטוזואה אשר הפגינו שונות בין הדוגמאות השונות. השוואת pairwise בין הדוגמאות השונות הראתה רמת דמיון בין הפרות של 0.71 בעזרת Bray Curtis index. מדד זה לוקח בחשבון את המצאות המינים וגם כמותם בכדי להשוות בין הדוגמאות השונות. ניתן להסיק כי קיימת שונות באוכלוסיות הפרוטוזואה בכרס הפרה, ושונות זו דומה לרמת השונות באוכלוסיות חיידקים בין פרות שונות אשר נצפה בעבודות קודמות<sup>14</sup>. לכן חשיבות רבה להעמיק באופן בו השונות משפיע על הפרט, כפי שנעשה בעבר באוכלוסיות החיידקים. חשוב לציין כי הבדל זה קיים למרות שהפרות נמצאו תחת אותה דיאטה ובשלבים דומים של חליבה.

Genus	035-4	035-11	035-25	035-32	035-39	035-46	035-53	035-57	035-67	035-71
Dasytricha	26.74643	6.303087	26.66096	28.09985	18.70419	4.391863	13.12363	47.77356	39.44361	48.50201
Entodinium	24.87391	35.02693	32.49144	26.92994	33.35622	57.66023	34.75285	40.92091	29.25288	24.99017
Eudiplodinium	19.98605	4.692356	7.808219	7.228188	14.97103	10.06043	13.98779	3.83532	6.655397	3.208304
Polyplastron	19.96459	45.20406	12.51712	18.27644	18.21761	21.51247	23.20544	3.591549	11.52475	2.024849
Diploplastron	2.307114	4.666459	0.796233	0.782688	1.118537	1.136267	1.580827	0.021668	1.109845	0.043249
Charonina	0.579461	1.900767	0.239726	0.255403	0.323043	0.578773	0.336444	0	0.863621	0
Isotricha	0.525807	0.502382	16.28425	16.84014	10.00828	1.055409	8.9296	2.540628	8.930212	19.87104
Ophryoscolex	0.101942	0.005179	0.710616	0.156538	2.338024	2.064005	2.744556	0.016251	1.15762	0.007863
Ostracodinium	0.080481	0.212347	0.085616	0.227941	0.258434	0.40429	0.230441	0.065005	0.047775	0.003932
Others	0.021462	0.005179	0.008562	0.02197	0.014133	0.017023	0.013826	0.005417	0.011025	0.011795
No blast hit	4.812748	1.481251	2.39726	1.180897	0.690505	1.119244	1.094596	1.229686	1.003271	1.336793

**טבלה 1. הרכב אוכלוסיות הפרוטוזואה בפרות השונות.** הרכב הפרוטוזואה בפרות השונות שיתקבלו נבדק על ידי ריצוף עמוק של יחידת ה-18S של ה-RNA הריבזומלי. כל טור מייצג פרה שונה וכל שורה סוג פרוטוזואה שונה בפרה. ניתן לראות כי קיים הבדל בהרכב פרוטוזואלי (ברמת הסוג) בין הפרות השונות אשר מסתכם ברמת דמיון של 0.71.

### הפרדת פרקציות הכרס לפי גודל חלקיק והרכב מתאנוגנים צמודי פרוטוזואה

מתהליך זה התקבלו 5 פרקציות פרוטוזואליות על פי גודל: 100 מיקרון (P100) 60 מיקרון (P60) 40 מיקרון (P40) 10 מיקרון (P10) וקטן מ-10 מיקרון ( $P < 10$ ). פרקציה נוספת מהווה את סך כל האוכלוסייה של פרוטוזואה ללא כל הפרדה. הנוזל העליון, המהווה יתר המיקרואורגניזמים בכרס (בקטריה וארכאה) נלקח ומהווה מצע גידול לפרוטוזואה שהופרדו (איור 1). מהפרקציות הפרוטוזואליות שהתקבלו הופק DNA והרכב הפרוטוזואה נבחן באמצעות ריצוף Illumina של יחידת ה-18S של ה-RNA הריבזומלי. גן זה אפשר הפרקציות שהתקבלו הן בעלות הרכב שונה משמעותית ביניהן כאשר שתיים מתוכן הינן הומוגניות  $>95\%$  בסוג אחד של פרוטוזואה (פרקציות P-40 ו-P-10, איור 1). פרקציה P-40 מורכבת בעיקרה מ-*Isotricha* ופרקציה P-10 מורכבת מ-*Dasytricha*. רק *Isotricha* ניתן למצוא בכל הפרקציות בכמות יחסית שונה וידוע כי לסוג זה של פרוטוזואה טווח רחב של גדלים. ניתן לראות כי התקבלו פרקציות שמועשרות בפרוטוזואה ספציפיים, מה שיאפשר לנו להעריך את מידת תרומתם על ייצור מתאן.



איור 1. הרכב אוכלוסיות הפרוטוזואה שהתקבלו בעקבות פרטוקול ההפרדה. הרכב הפרוטוזואה בפרקציות השונות שיתקבלו נבדק על ידי ריצוף עמוק של יחידת ה-18S של ה-RNA הריבוזומלי. ניתן לראות כי למרות החפיפה בין הפרקציות, התקבלו תתי-אוכלוסיות השונות בהרכבן.

#### כימות והרכב מתאנוגנים צמודי פרוטוזואה בפרקציות השונות.

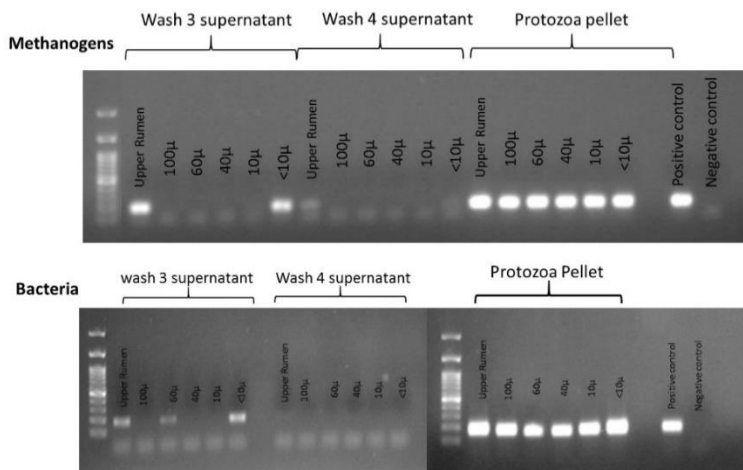
השלב הראשון והקריטי ביותר על מנת לאפיין את אוכלוסיות הפרוטוזואה והסימביונטים הפרוקריוטים שלהן הינו הפרדת הפרקציה הפרוטוזואלית וניקויה מחיידקים המצויים מחוצה לה. שיטות ההפרדה שיפותחו בשלב זה יהוו בסיס לעבודה עם הפרוטוזואה ביעדים הבאים. לצורך פיתוח וכיול מערכת ההפרדה, ניקוי הפרקציה הפרוטוזואלית על פי הגדלים השונים של הפרוטוזואה ואפיון הסימביונטים המתאנוגנים, נוזל כרס של עגלות בנות שישה חודשים נדגם, הוכנס לתא אנארובי והועבר למשפך מפריד. לאחר שיקוע של שעה, הפרקציה הפרוטוזואלית נלקחה ועברה סדרה של סינונים לפי גודל (סכמה 1) על פי Belanche et al., 2014<sup>13</sup>. הסינון משמש לא רק לניקוי הפרקציה אלה גם ישמש בהמשך לאפיון הפרוטוזואה והאנדו-סימביונטים בגדלים השונים. מתהליך זה התקבלו 5 פרקציות פרוטוזואליות על פי גודל: 100 מיקרון (P-100) 60 מיקרון (P-60) 10 מיקרון (P-40) 10 מיקרון (P-10) וקטן מ-10 מיקרון (P<10). בנוסף הנוזל העליון לאחר האינקובציה נלקח בכדי לאפיין את אוכלוסיית הפרוטוזואה אשר לא שקעו (בד"כ מדובר בפרוטוזואה בעלי תנועתיות גבוהה).

אפיון הסימביונטים המתאנוגנים בפרקציות הפרוטוזואה השונות, מצריך ניקוי מכלל אוכלוסיית הפרוקריוטים החופשיים המצויים מסביב לפרוטוזואה. לצורך כך, בוצעה סדרה של 5 שטיפות על ידי סירכוז במהירות נמוכה (500 g) לדוגמאות הפרוטוזואה והרחפה במדיום נקי ומפולטר. לאחר הסירכוזים ובכדי לוודא כי אכן נותרנו עם פרקציות נקיות של פרוטוזואה ללא זיהומים חיצוניים, אספנו את הפרקציה הפרוטוזואלית ואת הנוזל העליון אשר שימש לשטיפות, וביצענו מיצוי של DNA ואנליזת Real Time PCR-PCR בכדי לכמת את מידת הזיהום החיצוני, אם קיים. מיצוי ה-DNA מהפרקציות הפרוטוזואליות הניבו ערכים גבוהים לעומת הערכים האפסיים-שאריתיים שנצפו בנוזל העליון (איור 2). בנוסף, בוצע PCR-

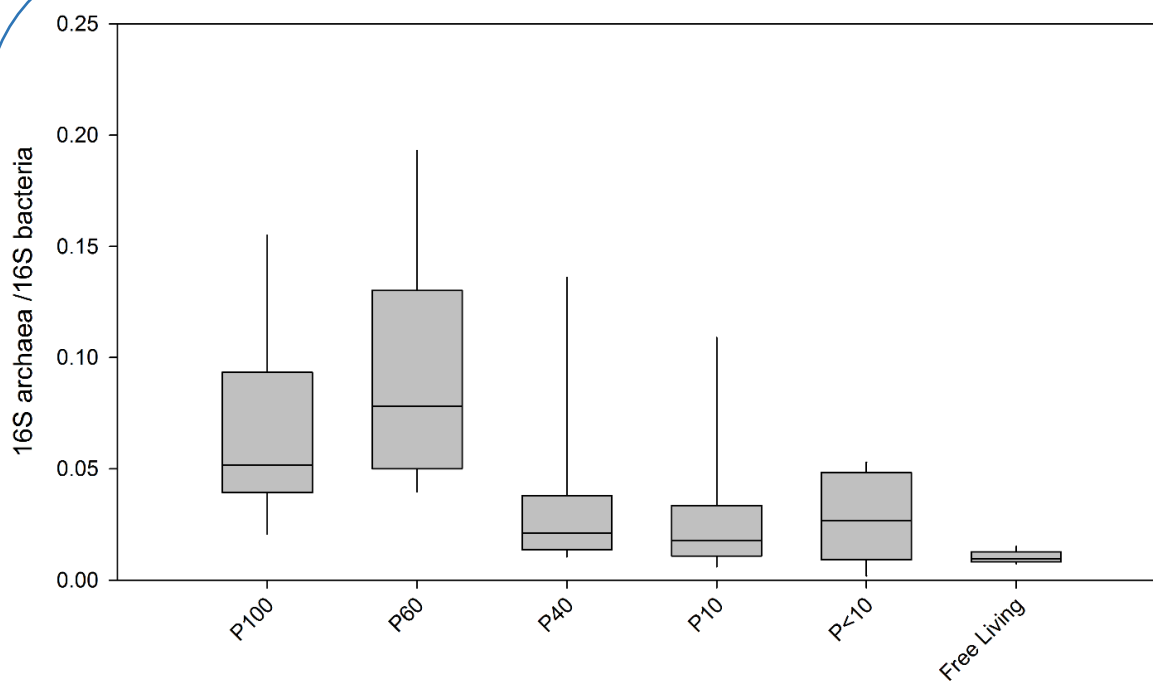


בכדי לראות האם מתקבלת הגברה של הממלכות השונות בפרקציות הפרוטוזואליות (איוקריות, בקטריה, ארכאה). ניתן לראות כי מהפרקציה הנקייה מתקבלים תוצרי הגברה לעומת פרקציות הנוזל העליון אשר ניתן לראות הגברה מינימלית, חוץ מהנוזל העליון של פרקציה <math>10</math>, אך תוצאה זו הייתה צפויה בהתחשב בכך שמדובר בפרקציה מועשרת בחיידקים חופשיים. תוצאה זו מצביע על הצורך בשלב ניקוי נוסף לפרקציה הקטנה ביותר בכדי להיפטר מכלל האורגניזמים החופשיים, אשר בוצעו בדיגומים הבאים. הכימות היחסי מראה כי קיים קשר פיזי הדוק בין פרוטוזואה למתאנוגנים. בכדי לעמוד על ההבדלים בכמות בין הפרקציות השונות לבין אוכלוסיית המתאנוגנים החופשית ביצענו כימות יחסי בעזרת Real-Time PCR (איור 3).

ניתן לראות שהפרקציות הגדולות מועשרות באופן מובהק במתאנוגנים ביחס לפרקציה החופשית (free-living). ניתן לראות זאת בהבדלים ביחס בקטריה/ארכאה אשר בפרקציה החופשית הינו 1:100 לטובת בקטריה, לעומת הפרקציות הגדולות בהן היחס גם הגיע ל-1:5. תוצאה זו מרמזת על קשר פיזי הדוק בין פרוטוזואה למתאנוגנים שמחזק את הטענה בו פרוטוזואה מעורבים באופן אקטיבי בהגברת ייצור מתאן. תצפית זו גם תואמת מחקרים קודמים אשר הראו בעזרת פרובים פלוארסנטים שמתאנוגנים רבים מתיישבים על פני דופן הפרוטוזואה ובתוכם<sup>8</sup>.

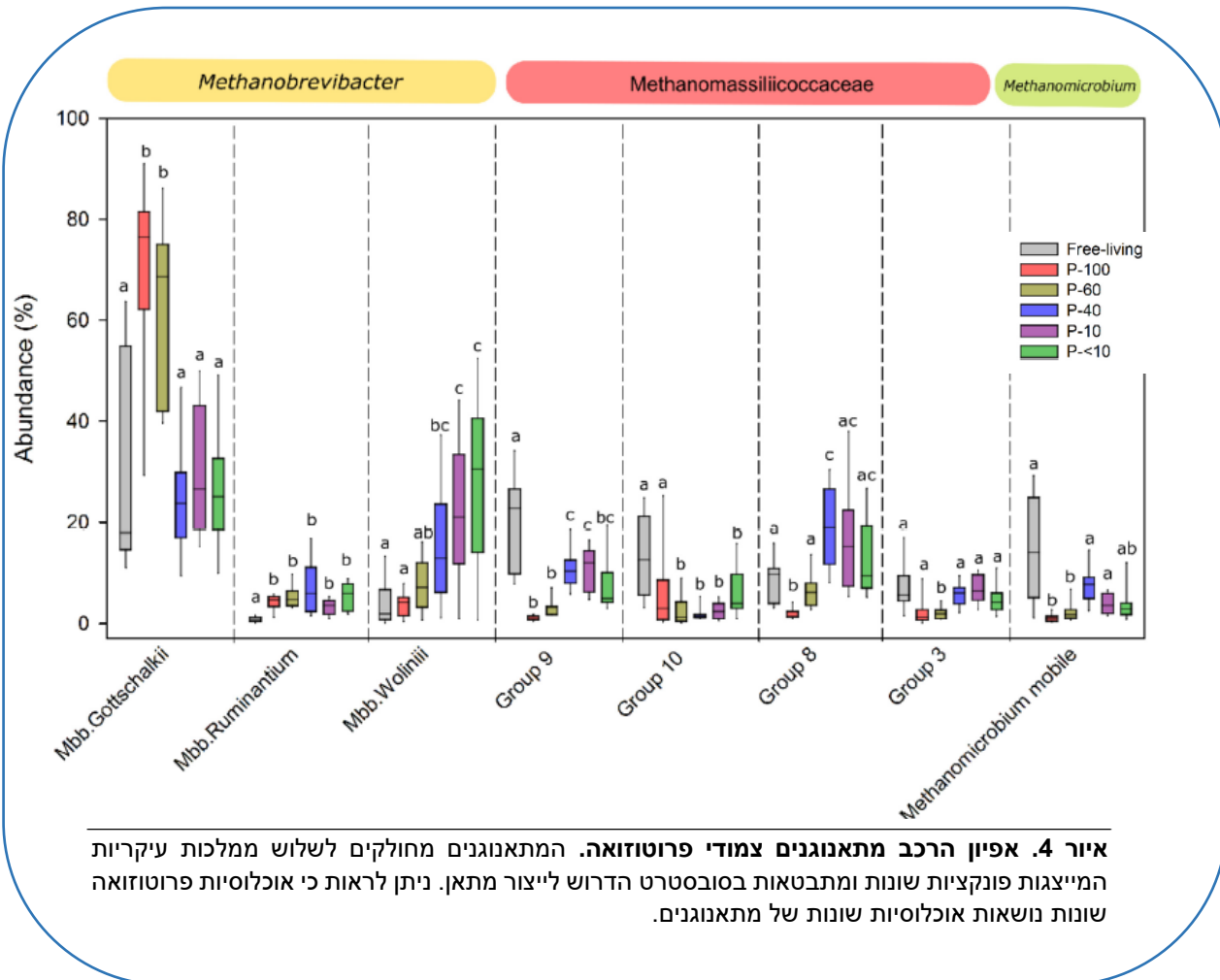


**איור 2.** בדיקת רמת הניקיון של הפרקציות הפרוטוזואליות. הפרקציות after wash מסמלות את הנוזל אשר שימשה לניקוי הפרוטוזואה מחיידקים חיצוניים. המספרים מעל כל טור משקפים את גודל הפילטר בו עברה הדוגמא במיקרונים. ניתן לראות שאין זיהום או זיהום מינימלי ברוב הגדלים בתמיסה ניקוי כמתוכנן ולכן ניתן להמשיך באפיון הפרוטוזואה ואוכלוסיית המתאנוגנים שלהם על בסיס פרוטוקול זה.



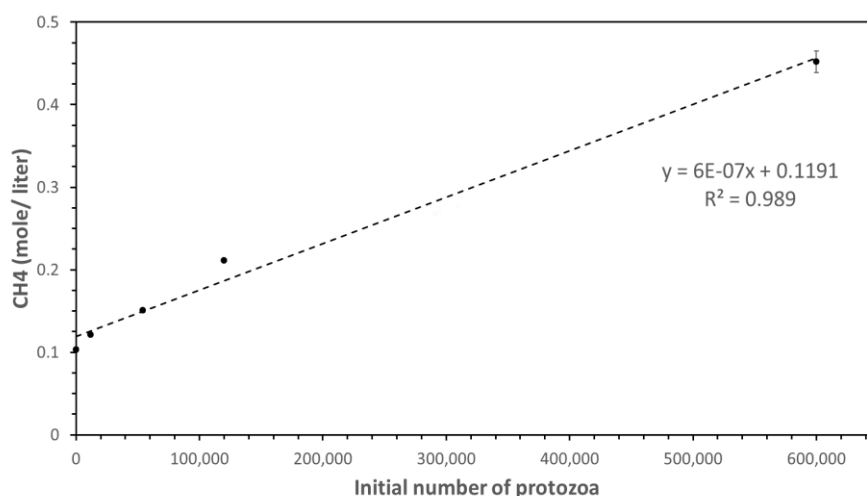
**איור 3. כימות יחסי של ממלכות המיקרואורגניזמים בכרס בפרקציות השונות.** יחסיהם של חיידקים/מתאנוגנים על פני פרקציות שונות באמצעות Real Time PCR. היחס בין ארכאה S16 לבין S16 חיידקי בכל פרקציה, כולל בפרקציה החופשית מוצג. ניתן לראות כי ביחס לפרקציה החופשית, יחס אוכלוסיית המתאנוגנים לבקטריה גבוה יותר בנוכחות פרוטוזואה.

בנוסף לכימות יחסי שאפנו לעמוד על ההבדלים בהרכב המתאנוגנים בין הפרקציות השונות לבין אוכלוסיית המתאנוגנים החופשית. אפיון ההרכב בוצע על ידי ריצוף עמוק של יחידת ה-S16 הריבוזומלי (ראה שיטות וחומרים) ואפיינו את הרכבן של אוכלוסיות אלו. אפיון ההרכב נעשה בעזרת כלים ביואינפורמטיים QIIME והשיך הטקסונומי בוצע על ידי מאגר המידע המעודכן Greengene (גרסה 13\_8). האנליזה בוצעה תחת ההיפותזה שדמיון גבוה בין הפרקציות, ייצג סימביונטים מזדמנים. לעומת זאת, הבדלים באוכלוסיות המתאנוגנים יצביעו על סלקציה מצד אוכלוסיות הפרוטוזואה או אוכלוסיות המתאנוגנים לביצוע אינטראקציה ביניהן. אפיון האוכלוסיות מראה שהרכב המתאנוגנים בפרקציות השונות, נבדל באופן מובהק מאוכלוסיית המתאנוגנים החופשית (איור 4). ממצאים אלו תומכים ברעיון של סלקציה לטובת סימביוזה בין אוכלוסיות הפרוטוזואה והמתאנוגנים. תוצאה זו מרמזת על אינטראקציות של אוכלוסיות פרוטוזואה ספציפיות עם אוכלוסיות מתאנוגנים ספציפיות, אשר תורמות באופן בלתי-פרופורציונאלי לייצור מתאן אשר סביר ישפיעו על תרומתם לייצור מתאן. זאת בעקבות ההבחנה כי חלק מהמינים המועשרים משויכים לקבוצת מתאנוגנים אשר מוכרת כ-SGMT, הכוללים *Mbb. Gottschalkii* המועשר בפרקציות הגדולות. קבוצה זו נמצאה במחקרים קודמים כמעורבת בהגברת ייצור המתאן בפרות<sup>12</sup>. הפרקציות הקטנות לעומת זאת מועשרות בקבוצת מתאנוגנים ממשפחת ה-Methanomassiliicoccaceae, אשר מייצרים מתאן בעזרת תרכובות של מתיל-אמינים ולא בעזרת מימן.



#### השפעת מספר הפרוטוזואה על ייצור מתאן

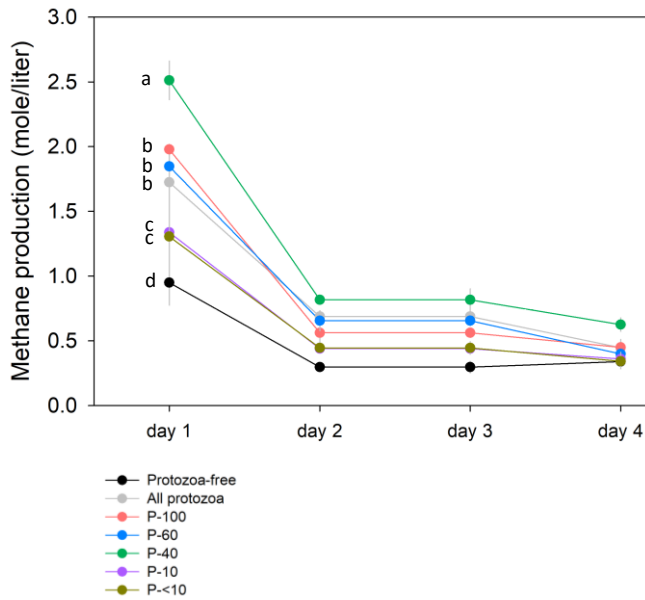
בתור ניסוי ראשון הבודק את השפעת הפרוטוזואה על ייצור מתאן, אנו שאפנו להעריך מהו האפקט הישיר של מספר הפרוטוזואה על ייצור מתאן. אוכלוסיית הבקטריה וארכאה של כרס הפרה הודגרו במשך 24 שעות יחד עם כמות שונה של תאים פרוטוזואליים. ניתן לראות כי קיים מתאם חיובי בין מספר הפרוטוזואה לבין ייצור המתאן (איור 5). ניסוי זה גם אפשר לנו להעריך את כמות הפרוטוזואה המינימלי שרצוי להוסיף בהדגרה עם אוכלוסיית הפרוקריוטים בכדי לבחון את השפעתם על מתאן. הוחלט כי,  $10^5$  תאים פרוטוזואליים הינו מספר רצוי להדגרה בניסויים הבאים שלנו הבוחנים את הפרקציות השונות של פרוטוזואה.



**איור 5. השפעת מספר תאים פרטוזואלים על ייצור מתאן.** נוזל כרס יחד עם תכולתו הבקטריאלי והמתאנוגני הודגר יחד עם מספר שונה של תאים פרטוזואה. הנקודה הנושקת לציר ה-Y מייצגת הדגרה ללא פרטוזואה. הקו החוצה נקודות מייצגות את קו המתאם בין ריכוז פרטוזואה לייצור מתאן In-vitro.

#### פרקציות פרטוזואליות שונות מפגינות יכולות ייצור מתאן שונות

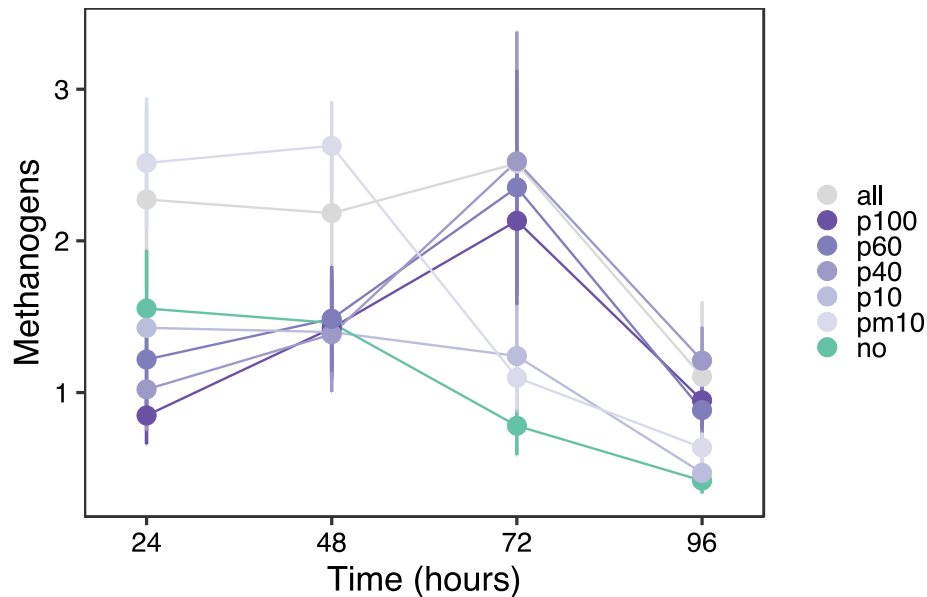
כפי שמצוין בסכמה 1, כל פרקציה שהתקבלה עברה הדגרה יחד עם נוזל הכרס הנטול פרטוזואה ואם אוכלוסיית הפרוקריוטים. ההדגרה נעשתה ב-10 מ"ל, ב-39°C במשך חמישה ימים (סכמה 1, ניסויי מיקרוקוזם). אנו מצאנו כי חלק מהפרקציות מפגינות הגברה מהותית של מתאן ביחס להדגרת המיקרוביום ללא פרטוזואה אך גם ביחס למקרוביום המודגר יחד אם כל מיני הפרטוזואה (פרקציה all protozoa). פרקציות P-40 ו P-60 אשר מועשרות בפרטוזואה מסוג *Isotrisha* מפגינות את ההגברה המהותית ביותר גם ביחס לפרקציה P-100 אשר מכילה פרטוזואה גדולים יותר (איור 6). הפרקציות של פרטוזואה קטנים (P-10 ו-P<10) אינן מראות הגברה משמעותית ביחס לנוזל כרס ללא פרטוזואה. ניתן לראות גם כי ממצאים אלו נשמרים לאורך כל הניסוי, למרות שנצפתה ירידה בייצור מתאן במהלך ימי הניסוי ככל הנראה כתוצאה ממיהול האוכלוסייה בעקבות לקיחת נוזל כרס מן המבחנות לבדיקות נוספות וכן מוות אפשרי של מספר רב של מיקרואורגניזמים אשר לא ניתן לגדל באופן יעיל מחוץ לכרס.



איור 6. כימות מתאן in-vitro של נוזל כרס מודגר עם פרקציות השונות של פרוטוזואה. כל קו מייצג את כמות המתאן אשר נמדד יומית במשך 5 ימים בפרקציות השונות. מובהקות בוצעה באמצעות בדיקת Wilcoxon מתוקן עבור השוואות מרובות. האותיות בצד כל קו מציינות את המובהקות המתקנת בין ערכים בכל פרקציה עם תיבות שאינן משתפות אות שונות באופן מובהק ב-  $P < 0.05$ .

#### כימות מתאנוגנים כפונקציה של אינקובציה עם אוכלוסיות פרוטוזואה שונים.

כימות המתאן הראה באופן מובהק כי פרקציות מסוימות אחראיות יותר על ייצור מתאן מפרקציות אחרות. ההבדל מוסבר חלקית כתוצאה מהבדלי גדלים של פרוטוזואה בין הפרקציות השונות כאשר פרוטוזואה גדולים יותר מפגינים יותר ייצור מתאן מאשר הפרקציות הקטנות. למרות זאת, ניתן גם לראות שפרקציה 40 אשר בה הפרוטוזואה נחשבים "בינוניים" בגודלם מפגינות ייצור מוגבר גם ביחס לפרוטוזואה הגדולים יותר. לכן, קיים חשד כי הפרוטוזואה המרכיבים את הפרקציה הזאת (ברובם המוחלט Isotricha) בקשר יותר הדוק עם המתאנוגנים או שמעשירים לקבוצת מיקרואורגניזם אלה. כימות המתאנוגנים אשר בוצע כל יום נעשה על ידי Real-Time PCR מראה כי, אכן פרקציה 40 מעשירה באופן מובהק ועקבי את הפלח היחסי (לסה"כ פרוקרייטים) של המתאנוגנים (איור 7). ניתן גם לראות שמיקרוקוזם אשר נטול פרוטוזואה מפגינים את הפרופורציות הנמוכות ביותר של מתאנוגנים. לכן ניתן להסיק כי המצאות פרוטוזואה בכלל מעשירה מתאנוגנים וכי פרקיה 40 מפגינה את ההעשרה הגבוהה ביותר (חשוב לציין שמדובר בנטייה ביחס לפרקציות הגדולות יותר של 60 ו-100).



**איור 7.** כימות יחסי של ארכאות מתאנוגניות במיקרוקוזמים המוגדרים עם אוכלוסיות פרוטוזואה שונות. ניתן לראות שהדינמיקה על פני הניסוי שונה בין הפרקציות השונות. בנוסף, ניתן לראות שהפרקציות הגדולות של P-40, P-60, P-100 (גוונים כהים של סגול, ללא פרוטוזואה קו ירוק), מפגינות עלייה בפרופורציות של מתאנוגנים אשר מגיע לפיק ביום השלישי. ההבדל בין הפרקציה ללא פרוטוזואה ופרקציות אלו מובהקת ביום השלישי והרביעי לאינקובציה.

## דיון ומסקנות

במחקר הנוכחי, עמדנו על יחסי הגומלין בין פרוטוזואה למתאנוגנים בשני אספקטים שונים: (1) אינטרקציות פיזיות פוטנציאליות אשר ירמזו על יחסים סימביוטים בין האוכלוסיות (2) השפעתם של פרוטוזואה על מתאנוגנים (חופשיים) כאשר הם מודגרים יחד. שני האספקטים אללו מובילים לאותן מסקנות של יחסי גומלין בין האוכלוסיות. פרטוקול ההפרדה אשר פיתחנו בשנה הראשונה של המחקר בכדי אפשר לנו לאפיין את מידת תרומתן של אוכלוסיות פרוטוזואה שונות לפליטת מתאן, ויחד עם זאת הרכב המתאנוגנים המצויים באסוציאציה פיזית עם פרוטוזואה. הימצאותה גבוהה יותר של אוכלוסיית מתאנוגנים בפרקציות הפרוטוזואה הגדולים המשתמשת במימן בפרופורציות גבוהות יותר ביחס לאוכלוסיות המתאנוגנים בפרקציה החופשית, יושבת בקנה אחד עם ההיפותזה הגורסת כי הסימביוזה בין פרוטוזואה למתאנוגנים מבוססת על העברת מימן שנוצר בפרוטוזואה כתוצאת תסיסה במתאנוגנים הצמודים להם.

מצאנו גם כי לפרוטוזואה השפעה לינארית על מתאן, שכן אינקובציה של נוזל כרס עם מספר עולה של פרוטוזואה מגביר את ייצור המתאן משמעותית. הבחנה זו אפשרה לנו להעריך את המספר המינימלי של פרוטוזואה אשר יפגינו שינוי בייצור מתאן (וככל הראה שינוי בפרופורציית המתאנוגנים) בכדי לבצע ניסוי מפורט יותר המבוסס על פרוטוקול ההפרדה שלנו.

ניתן לראות גם כי אינקובציה אוכלוסיות הפרוקריוטים יחד עם הפרוטוזואה הנובעים מהפילטרים הגדולים (בהם גודלם של הפרוטוזואה גדולים יותר), מפגינות ייצור מוגבר של מתאן *in-vitro*. לכן, גודל הפרוטוזואה מהווה פרמטר חשוב למידת תרומתם המטאבולית כלל, ועידוד פליטת המתאן בפרט. תוצאה זו מחזקת תצפיות קודמות אשר בחנו את מידת השפעתם של פרוטוזואה על טריפה חיידקים וארכאה בכרס ובהן מצאו כי לפרוטוזואה גדולים קצב טריפה גבוהה יותר<sup>6</sup>. בתוצאה זו הגיון, שכן סביר כי אורגניזמים גדולים יותר משפיעים על סביבתם באופן חזק יותר. למרות המתאם החיובי בין גודל פרוטוזואה לייצור מתאן, קבוצה אחת הראתה עידוד של פליטת מתאן דיספרופורציונית ביחס לגודל התאים. קבוצה זו המורכבת ב%90 *Isotricha* הראתה את הפליטה הגבוהה ביותר באופן מובהק ביחס לשאר הקבוצות, כולל פרוטוזואה גדולים יותר. מחקרים קודמים אשר בדקו את מידת תרומתם של מינים ספציפיים של משפחה זו לא הראו תשובות חד משמעית, וניתן למצוא מחקרים קודמים אשר מאששים את תוצאותינו אך גם כאלה בהן התוצאות היו הפוכות<sup>10-11</sup>. פרמטרים כגון דיאטה או הרכב המינים במשפחה זו יכולים להשפיע על אופן תרומתה של קבוצה זו על פליטת מתאן<sup>10-11</sup>. למרות הבדלים אלה בין מחקרים, התוצאות שלנו מאששות את ההיפותזה כי פרוטוזואה ספציפיים באינטראקציה עם מתאנוגנים באופן שונה ומרמז על אפשרות כי אוכלוסיות פרוטוזואה ספציפיות אחראיות באופן פרופורציונלי גבוהה על חלק מפליטת המתאן מכרס הפרה. השאלות אשר נשאלות כעת הן: (1) איך קבוצה זו משפיע על קבוצות חיידקים בעלי פונקציה מוגדרת בכרס כגון חיידקים מפרקי תאית ו-(2) האם אותה קבוצה גם אחראית על ייצור יתר של מטאבוליטים הכרחיים לפרה כגון VFA. אם התשובה לשאלה השנייה היא שהם לא, ניתן יהיה להפריד בין יעילות תפוקה לפליטת מתאן וקבוצה זו תוכל להוות מטרה ממוקדת להחסרה מהכרס, מבלי לפגוע בתפוקה.

- 1 Brulc, J. M. *et al.* Gene-centric metagenomics of the fiber-adherent bovine rumen microbiome reveals forage specific glycoside hydrolases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 1948-1953, doi:0806191105 [pii]
- 2 Shabat, S. K. B. *et al.* Specific microbiome-dependent mechanisms underlie the energy harvest efficiency of ruminants. *The ISME journal*.(2016)
- 3 Mizrahi, I. in *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms* (eds Eugene. Rosenberg & Uri Gophna) Ch. 203-210, (Springer Berlin Heidelberg, 2011.)
- 4 Martin, C., Morgavi, D. & Doreau, M. Methane mitigation in ruminants: from microbe to the farm scale. *animal* **4**, 351-365.(2010)
- 5 Beauchemin, K., McAllister, T. & McGinn, S. Dietary mitigation of enteric methane from cattle. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources* **4**, 1-18.(2009)
- 6 Newbold, C. J., de la Fuente, G., Belanche, A., Ramos-Morales, E. & McEwan, N. R. . The role of ciliate protozoa in the rumen. *Frontiers in microbiology* **6**.(2015)
- 7 Hegarty, R. Reducing rumen methane emissions through elimination of rumen protozoa. *Crop and Pasture Science* **50**, 1321-1328.(1999)
- 8 Finlay, B. J. *et al.* Some rumen ciliates have endosymbiotic methanogens. *FEMS Microbiology Letters* **11**.(1994) 157-161 ,7
- 9 Sharp, R., Ziemer, C. J., Stern, M. D & Stahl, D. A. Taxon-specific associations between protozoal and methanogen populations in the rumen and a model rumen system. *FEMS Microbiology Ecology* **26**, 71-78.(1998)
- 10 Ranilla, M. J., J-P. Jouany, and D. P. Morgavi. "Methane production and substrate degradation by rumen microbial communities containing single protozoal species in vitro." *Letters in applied microbiology* **45**, no. 6 (2007): 675-680.
- 11 Ranilla, M. J., D. P. Morgavi, and J. P. Jouany. "Effect of individual protozoa, *Isotricha intestinalis* and *Metadinium medium*, on ruminal fermentation and methane production in vitro." *Journal of Animal and Feed Sciences* **13** (2004): 187-190.
12. Danielsson, Rebecca, Johan Dicksved, Li Sun, Horacio Gonda, Bettina Müller, Anna Schnürer, and Jan Bertilsson. "Methane production in dairy cows correlates with rumen methanogenic and bacterial community structure." *Frontiers in microbiology* **8** (2017): 226.
- 13 Belanche, A., de la Fuente, G., & Newbold, C. J. (2014). Study of methanogen communities associated with different rumen protozoal populations. *FEMS microbiology ecology*, **90**(3), 663-677.
- 14 Jami E, Mizrahi I .(2012) Composition and similarity of bovine rumen microbiota across individual animals .PLoS ONE **7**: e33306.