

דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר: 3620699

**חקר השפעת אוכלוסיות פרוטוזואה ריסנית על תוצרי תסיסה ואוכלוסיית חיידקים
פונקציונליים בכרס הפרה**

Studying the effect of ciliate protozoa on fermentation parameters and
functional microbes in the bovine rumen

מוגש למועצת החלב

ע"י

אלי ז'מי - חוקר בתחום מיקרוביולוגיה של כרס מעלי הגרה, המכון לבעלי חיים מחלקה לבקר וצאן

Elie Jami, Institute of Animal Science, ARO, Volcani Research Center, Hamakabim 68
Rishon LeZion, Israel E-mail: elie@volcani.agri.gov.il

תאריך : 28.4.2024 חתימת החוקר



תקציר מדעי של תכנית המחקר

בכרס הפרה שוכנת אוכלוסיית מיקרואורגניזמים המורכבת ממספר גדול של מינים אשר חשיבותם לפרה והאפקט שלהם על הסביבה מתבטאת באופנים רבים הכוללים התמחות בפירוק ועיכול יעיל של המזון הצמחי, בריאותה של הפרה ופליטה של פסולת וגזים לסביבה. למרות ההתקדמות בשנים האחרונות בהבנת המורכבות של התהליכים המתרחשים בכרס, והתפתחויות טכנולוגיות אשר אפשרו מבט מעמיק באוכלוסייה זו, תפקידם של חלק מקבוצות המיקרואורגניזמים בכרס אינו ברור גם כיום. חסר זה נכון במיוחד לגבי הפרוטוזואה, קבוצת תאים איוקריוטים המהווים כ-50% מהביומסה של המיקרואורגניזם בכרס. מחקרים קודמים מצביעים על כך שקבוצה זו של מיקרואורגניזמים מעורבת בתהליכים רבים הקשורים לבריאות הפרה ויכולתה להפיק אנרגיה מהמזון. בנוסף קבוצה זו חשודה במעורבותה בתהליך המתאנוגנזה המייצר גז מתאן, הידוע כגז חממה פוטנטי בעל השפעה סביבתית שלילית רבה. טענה זו מבוססת על כך שקיימת מערכת יחסי גומלין בינם לבין ארכאה מתאנוגנים, האחראים הבלעדיים על יצירת מתאן בכרס, אשר מגבירה את פוטנציאל יצירת מתאן, והחסרתה של אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס יכולה להוביל לירידה משמעותית של פליטת המתאן. כל תפקידים אלו מצביעים על כך שהבנת הדינמיקה של פרוטוזואה בכרס יכולה להוביל לאסטרטגיות חדשניות למיגור פליטת מתאן במקביל לשימור פרמטרים של ייצור בפרה. **בהצעת מחקר זו שמנו כמטרה לחקור את הדינמיקה של הפרוטוזואה בכרס הפרה ויצבותה תחת משטרי הזנה שונים. בנוסף, אני שואפים לבחון השפעתם של פרוטוזואה על פרמטרים מטאבוליים של הכרס ואוכלוסיית חיידקים פונקציונליים על מנת להעריך את התכנות החסרה סלקטיבית של אוכלוסיות המעורבות באופן משמעותי בפליטת מתאן ללא השפעה או אם השפעה מינימלית על נעילות ועל ייצור מטאבוליטיים (או הגברתם) המהווים מזון לפרה. בשנה הראשונה ושנייה אנו התמקדנו באפיון הדינמיקה של אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס תחת משטרי הזנה שונים. תוצאות שנה א' במעבדה מראות כי, בניגוד לאוכלוסיית חיידקים אשר הרכבה מושפעת רבות על ידי הדיאטה, אוכלוסיית הפרוטוזואה הינה יציבה יותר, ואם זאת שונה מהותית בין הפרות. תצפית זו רומזת על כוחות אחרים, מעבר לתנאי סביבה (המושגים על ידי דיאטה למשל), המכתיבים את הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה. תוצאות אלו מחזקות את טענתנו כי, אוכלוסיית הפרוטוזואה מוכתבת בשלבים מוקדמים של ההתפתחות ולכן פוטנציאלית תהינה פשוטה יותר מאוכלוסיית החיידקים לבצע בה מניפולציה שתהיה חיובית לפנוטיפים שונים של ייצור ומיגור מתאן בפרה.**

תוצאות שנה ב' חושפות כי פרוטוזואה שונים אינם שווים בתרומתם למשק חומצות השומן הנדיפות ומתאן, כאשר אוכלוסייה אחת בלטה במיוחד בתרומה המהותית שלה בהגברת ייצור מתאן. ממצא זה ואוכלוסייה זו מהווה מטרה אטרקטיבית להחסרה מכרס הפרה למיגור פליטת מתאן תוך שימור על המשק האנרגטי של הפרה. שנה ג' חשפה כי לפרוטוזואה תפקידים רבים אשר לא היו ידועים עד כה אשר קשורים לייצור מימן ומסירתם למגוון גדול של חיידקים ופונקציות שונות הכוללות ייצור מתאן ואצטט, וחיזור סולפט

וניטריט, שהאחרון מהווה מתחרה בעל פוטנציאל גדול למתאנוגנים. יחד, תוצאות מחקר זה מהווה בסיס הבנתי חזק לתרומתם של פרוטוזואה על המטאבוליזם של הכרס ויהווה בסיס לניסויי המשך בחיה למיגור פליטת מתאן.

Abstract

Protozoa is one of the microbial groups that make up to 50% of the total microbial biomass in the adult cow's rumen. Many studies point to their impact rumen physiology, which includes food utilization, cow health, and the release of waste materials to the environment, with an emphasis on methane. The protozoa co-exist in a symbiotic relationship with methanogens, in which protozoa supply hydrogen for the methanogens metabolism, which in turn produces methane. The possibility of protozoa expanding the activity of the methanogenic population is tempting, given the results of various studies showing that the removal of protozoa in the rumen significantly reduces the amount of methane emissions in the animal. The large focus on the prokaryotic components of the microbial community led to a large gap in our understanding of the protozoa community, which we aim to remediate, together with the under-explored protozoa-bacteria interactions. Comprehensive information on the protozoal community dynamics and their associated prokaryotes will contribute to understanding the role of rumen ciliate protozoa in shaping the rumen microbial ecosystem. Therefore, our main objective is the characterization of the protozoa community and associated prokaryotes across developmental stages and feeding regimens, and evaluate the potential interactions between protozoa and the prokaryotic community and its consequences on rumen composition and function. This, in order to find a stable relationship regardless of host, developmental stage, and management conditions. The results of the first year in the laboratory show that, unlike the bacterial population, whose composition is greatly influenced by the diet, the protozoa population is more stable, and if so, differs substantially between the cows. This observation hints at other forces, beyond environmental conditions (induced by diet for example), that dictate the composition of the protozoan population. These results strengthen our claim that the protozoa population

is dictated in the early stages of development and therefore potentially it will be simpler than the bacterial population to manipulate it which will be positive for different phenotypes of methane production and eradication in the cow. The second year results reveal that different protozoa are not equal in their contribution to the volatile fatty acid and methane economy, when one population stood out in particular for its substantial contribution in increasing methane production. This finding and this population is an attractive target for removal from the cow's stomach to eradicate methane emissions while preserving the energy economy of the cow. The third year revealed that protozoa have many functions that were not known until now, which are related to the production of hydrogen and its delivery to a large array of bacteria and various functions that include the production of methane and acetate, and the oxidation of sulfate and nitrite. Together, the results of this study led to a strong understanding of the contribution of protozoa on the metabolism of the stomach and will form the basis for further animal experiments to eradicate methane emissions.

רקע ותיאור הבעיה

מערכת העיכול של הפרה מחולקת לארבעה מדורים, והראשון ביניהם הינו הכרס. במדור זה שוכנת אוכלוסייה של מיקרואורגניזמים האחראים על התסיסה והפירוק של מזון הפרה המורכבת מממלכות שונות הכוללות בקטריות ארכאות ואיוקריוטים הקרויה באופן קולקטיבי 'מיקרוביום'¹. לאוכלוסייה זו משמעות גדולה לגבי מספר רב של אספקטים הקשורים לבריאות הפרה ויעילות הייצור ברפת^{2,3}. בנוסף, לאוכלוסייה זו השפעה רבה על הסביבה, שמתבטאת בתוצרי פסולת הנובעים מתהליך תסיסת המזון הצמחי, הכוללים מתאן. מתאן הינו גז חממה פוטנטי בעל השפעה סביבתית רחבה ונמנה בין הסוגיות הדחופות ביותר בעולם המצוי בהתחממות גלובאלית. חלק משמעותי של פליטת מתאן נובע מחקלאות אינטנסיבית של החברה, בייחוד בתחום חקלאות של חיות משק לתנובת חלב ובשר. המתאן מיוצר בפרה על ידי אוכלוסייה ספציפית של מיקרואורגניזמים בשם ארכאות מתאנוגניות. אסטרטגיות רבות הוצעו במחקרים קודמים למיגור תופעת פליטת המתאן בהן מניפולציה של החיידקים ומתאנוגנים בכרס⁴⁻⁷. אספקט נוסף אשר נחקר מתמקד בתפקידים של הפרוטוזואה השוכנות בכרס והקשר שלהם לפליטתו⁸. פרוטוזואה הינם מיקרואורגניזמים איוקריוטים אשר המצויים בכרס, ולמרות שמספרם קטן במספר סדרי גודל בהשוואה לבקטריות השוכנות בכרס הם מהווים כ-50% מהמסה המיקרוביאלית בכרס, ומחקרים קודמים הצביעו

על קשר הדוק בין יצירה ופליטת של מתאן לבין אוכלוסיית הפרוטוזואה. במחקרים אלו נצפה כי ריקון תכולת הכרס מפרוטוזואה מובילה לירידה משמעותית של עד כ-13% בפליטת המתאן מהחיה לסביבה. בסיס הקשר בין הפרוטוזואה לפליטת מתאן מושתת בהבחנה כי קיימים בינם לבין מתאנוגנים יחסים של דו קיום (סימביוזה)⁹. לא רק מתאן מושפע מאוכלוסיית הפרוטוזואה אלא גם חומצות שומן נדיפות אצטט ובוטירט אשר משמשים אנרגיה לפרה, ונצפתה ירידה בייצור שלהם כאשר הכרס מרוקן מפרוטוזואה⁹. בנוסף, בניסויים ראשוניים במעבדתנו, אפיינו את הקשר בין תתי אוכלוסיות של פרוטוזואה והקשר שלה למתאן. תוצאות ניסויים אלו הראו כי תתי אוכלוסיות מסוימות מעודדות הגברת מתאן גבוה יותר באופן מובהק מאוכלוסיות אחרות. אוכלוסיות אלו כוללות *Isotricha* סוג פרוטוזואה נפוץ בכרס ואשר הדגרתם עם אוכלוסיית הכרס מגבירה את ייצור המתאן פי 3-1.5 ביחס לכל אוכלוסיות פרוטוזואה אחרות^{10,11}. לכן, אפיון ההרכב והבנת דינמיקת הפרוטוזואה בכרס עשוי להוביל לאסטרטגיות של מיגור פליטת מתאן במקביל לשימור או הגברת פרמטרים של ייצור בפרה. למרות ההתפתחויות אלו בתחום חקר אוכלוסיות מיקרוביולוגיות מורכבות, המיקוד של מרבית המחקרים הינו על אוכלוסיות הבקטריות במיקרוביום בהקשר למודולציה, אך מחקרים המתמקדים באפיון אוכלוסיית הפרוטוזואה, נדירים ביותר. אספקט שכמעט ולא נחקר לגבי הפרוטוזואה הינה הדינמיקה שלהם על פי זמן ותנאים משקיים שונים. מתוצאות ראשונות במעבדה שלנו בו אפיינו את הרכב המיקרוביום תחת דיאטות שונות, צפינו כי, בניגוד לאוכלוסיית חיידקים אשר הרכבה מושפעת רבות על ידי הדיאטה, אוכלוסיית הפרוטוזואה הינה יציבה יותר, ואם זאת שונה מהותית בין הפרות השונות. תצפית זו רומזת על כוחות אחרים, מעבר לתנאי סביבה (המושרים על ידי דיאטה למשל), המכתיבים את הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה.

מטרת המחקר

מחקר זה שמנו כמטרה לחקור את הדינמיקה של הפרוטוזואה בכרס הפרה ויציבותה תחת משטרי הזנה שונים בכדי לבחון את ההיפותזה כי מודולציה של אוכלוסיית הפרוטוזואה יכולה להוות אסטרטגיה למיגור פליטת מתאן והגברת ייצור בפרה:

1. אפיון אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס הפרה תחת דיאטות שונות
2. אפיון השפעת פרוטוזואה במתכונת החסרה על נעילות ומטאבוליטים.
3. אפיון השפעת אוכלוסיות פרוטוזואה שונות על טקסונומיה ופונקציונאליות של אוכלוסיית הפרוקריוטים.

שיטות וחומרים

הפרדה ובידוד הפרקציה הפרוטוזואלית

השלב הראשון על מנת לאפיין את אוכלוסיית הפרוטוזואה והסימביונטים הפרוקריוטים שלהם ואת התרומה הספציפית של פרוטוזואה בהינו הפרדת הפרקציה הפרוטוזואלית וניקוייה מחיידקים המצויים מחוצה לה. שיטות אלה מהוות בסיס לעבודה עם פרוטוזואה ליעדים הבאים. לצורך פיתוח וכיול של מערכת הפרדה וניקוי הפרקציה הפרוטוזואלית על פי הגדלים השונים של הפרוטוזואה ואפיון הסימביונטים המתאנוגנים, נזל כרס של עגלות בנות שישה חודשים נדגם והועבר לתא אנארובי והועבר למשפך מפריד. לאחר אינקובציה של שעה על מנת לשקע את הפרקציה הפרוטוזואלית של הכרס (איור 1), הפרקציה הפרוטוזואלית נלקחה ועברה סדרה של פילטורים על פי גודל על פי Belanche et al., 2014¹⁴, המשמש לא רק לניקוי הפרקציה אלה גם ישמש בהמשך לאפיון הפרוטוזואה והסימביונטים בגדלים שונים. מתהליך זה מתקבלות 5 פרקציות פרוטוזואלית על פי גודל: 100 מיקרון (P100) 60 מיקרון (P60) 40 מיקרון (P40) 10 מיקרון (P10) וקטן מ10 מיקרון ($P < 10$). בנוסף נזל העליון לאחר אינקובציה נלקחה בכדי לאפיין את אוכלוסיית הפרוטוזואה אשר לא שקעו (בד"כ מדובר בפרוטוזואה בעלי תנועתיות גבוהה).

לאחר קבלת הפרקציות השונות של פרוטוזואה, ובכדי לאפיין את הסימביונטים המתאנוגנים שלהם חשוב לוודא כי נפטרנו מכלל אוכלוסיית הפרוקריוטים החופשיים המצויים מסביבם. סדרה של 5 שטיפות על ידי סירכוז במהירות נמוכה (500 g) על דוגמאות הפרוטוזואה והחלפת המדיום במדיום נקי ומפולטר. לאחר הסירכוזים ובכדי לוודא כי אכן נותרנו עם פרקציות נקיות של פרוטוזואה ללא זיהומים חיצוניים, אספנו את הפרקציה הפרוטוזואלית ואת הנזל העליון אשר שימש לשטיפות של ביצענו מיצוי של DNA ואנאליזה PCR ו-Real Time PCR בכדי לכמת את מידת הזיהום החיצוני, אם קיים. ממיצוי ה-DNA מהפרקציות הפרוטוזואליות התקבלו ערכים גבוהים לעומת הערכים שנצפו בנוזל העליון בו נראה שכמות ה-DNA שהופק מזערית.

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 הנזל העליון אשר ניתן לראות הגברה מינימלית, חוץ מהנזל העליון של פרקציה < 10 , 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.

בניית מיקרוקוזמים משולבים

לאחר דיגום הפרות, נזל הכרס טופל על פי פרוצדורת הפרדה המצוינת מעלה אנו מתחילים תהליך של הדגרת הפרוטוזואה יחד עם כלל אוכלוסיית הפרוקריוטים עם מספר דומה של פרוטוזואה (10^5) בכדי לוודא כי האפקט שנצפה אינו נובע משינוי בכמות הפרוטוזואה שהוכנסו למערכת. לאחר 24,48,72 ו-96

שעות, אנו מודדים את כמות המתאן, ומקפאים חלק מהדוגמאות לכימות חומצות שומן נדיפות ואפיון אוכלוסיית הפרוטוזואה בכדי לוודא כי החסרנו באופן יעיל את אוכלוסיית המטרה.

מדידת מתאן וחומצות שומן נדיפות in-vitro

בוססה שיטה במעבדה של כימות יצירת המתאן *In-Vitro* בדגימות כרס בעזרת אנליזה של המתאן שנוצק בבקבוקונים אטומים במכשיר גז כרומטוגרפיה (Chromatography Gas) ברשותנו, בעזרת חיישן flame ionization detector (FID) המאפשר ניטור של תרכובות פחמימניות. מדידת מתאן מתבצעת על ידי אינקובציה של נוזל הכרס במשך 24 שעות ולאחר מכן נמדד כמות ייצור גז מתאן על ידי גז כרומטוגרפיה על פי פרטוקול מבוסס במעבדתנו¹⁰. בקצרה, הדגימות שהודגרו הונחו ישירות לתוך דוגם אוטומטי Gas Chromatography (GC) (10 דגימות בכל פעם). 0.250 מ"ל גז מהמבחנה הוזרק לקולונה 182.88 ס"מ × 0.3175 ס"מ × 2.1 מ"מ עם גז נשא הליום מוגדר לקצב זרימה של 10 מ"ל דקות וטמפרטורת תנור של 200 מעלות צלזיוס. הטמפרטורה בתנור נותרה יציבה למשך זמן ריצה כולל של 5 דקות. עקומת סטנדרט לכימות הופקה באמצעות גז מתאן טהור. בעזרת שילובה של שיטה זו יחד עם הפרדת הפרקציה הפוטוזואלית ניתן להעריך את מידת תרומתם של הפרוטוזואה על היווצרות מתאן. בבחינה פרלימינרית של כימות מתאן עם ובלי פרוטוזואה, ניתן כבר להבחין כי העדר פרוטוזואה מתאפיין בירידה בכמות המתאן הנוצר באופן מובהק. פרטוקול המדידה של חומצות השומן הנדיפות על בסיס (Shabat et al, 2016)² ויכלול את חומצות השומן הנדיפות הבאות: Propionic acid, Acetic acid, Butyric acid, Iso-Butyric acid, Valeric acid, Iso-valeric acid

אפיון טקסונומי של אוכלוסיית הפרוטוזואה ופרוקריוטים.

האפיון הטקסונומי של פרוטוזואה נעשה על ידי ריצוף ה-18S של היחידה הריבוזומלית המהווה טביעת אצבע לאורגניזמים איוקריוטים. הריצוף נעשה על ידי פריימרים ספציפיים לפרוטוזואה ריסנית על בסיס Levy and Jami et al 2018⁹. אפיון אוכלוסיית המתאנוגנים נעשה קודם על ידי Real Time PCR בכדי לאפיין סוגי המתאנוגנים (genus) השונים בכרס. לאחר מכן נעשה שימוש ב-Amplicon sequencing של יחידת ה-16S הריבוזומלי של הפרוקריוטים המבוסס על פריימרים אוניברסליים⁹. הפריימרים אשר שימשו לאפיון טקסונומי גם שימשו לאפיון הופעתה של הפרוטוזואה בכרס.

כימות גנים ממסלולי חיזור של הכרס

באמצעות סטים של פריימרים עבור גנים מרכזיים של מסלולים הקשורים לניצול מימן, כימתנו את השפע שלהם באוכלוסייה החיידקית הקשורה לפרוטוזואה בהשוואה לאוכלוסיית החיידקים אשר לא צמודה לפרוטוזואה (free-living). אלה כללו גנים של formyltetrahydrofolate synthetase ו אצטיל COA

סינתאז (FTFHS, acsB) של מסלול Wood Ljungdahl¹², רדוקטאז של אדנוזין-5'-פוספוסולפט (APRA) ותת-היחידה הדיסימילטורית (ds) Sulfite reductase alpha¹³, של מסלול הפחתת הסולפט המפסל, nitrite reductase (nrfA), methyl coenzyme-M reductase¹¹ (mcrA).

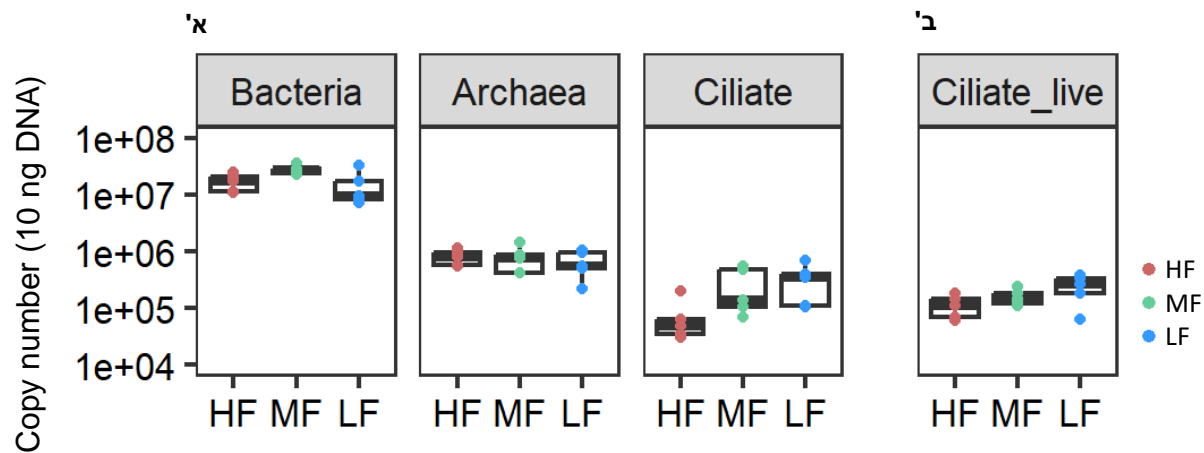
תוצאות המחקר

1. שנה א' - אפיון אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס הפרה תחת דיאטות שונות

לצורך אפיון דינמיקה ויציבות של אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס חולקו 3 קבוצות פרות תחת משטרי הזנה שונים המאופיינים באחוז סיב שונה: 80% (HF), 50% (MF), 30% (LF). בחירת אחוז סיב שונה נעשתה על בסיס מחקרים קודמים אשר מראים כי אוכלוסיית החיידקים משתנה באופן מהותי כאשר אחוז הסיב שונה. לאחר 2 חודשים של הרגלה למנה, נוזל כרס נדגם ואופיין כמות והרכב של פרוטוזואה ובקטריה. אפיון זה נעשה על ידי הפקת DNA וביצוע qPCR לכימות וריצוף עמוק של מולקולת ה-16S.

כימות הממלכות השונות בכרס הפרה תחת משטר הזנה שונה

על מנת להעריך את מספר החיידקים, הפרוטוזואה, הארכאה והשפע היחסי שלהם בדגימות נוזל הכרס והאם הרכבי תזונה שונים מביאים לפרופורציות שונות בין אוכלוסיות החיידקים בכרס, ביצענו qPCR על כל קהילת בעזרת שלושה פריימרים שונים עבור כל אוכלוסיית חיידקים, פרוטוזואה, חיידקית ו- ארכאה. התוצאות שלנו מראות שיש הבדל משמעותי במספר עותקים בין כל אוכלוסיות החיידקים (Kruskal-Wallis, $p < 0.01$). מספר העותקים החיידקיים מהווה 95.4% מסך עותקי ה-DNA המוגברים, בהשוואה ל-3.58% ו-1.02% מהארכאים והפרוטוזואה בהתאמה. בהתבסס על ההשוואה בין הדיאטות השונות, ניתן לראות כי עלייה באחוז סיב מובילה לירידה בכמות הפרוטוזואה בכרס (Wilcoxon, $P = 0.016$); איור 1). כימות החיידקים לעומת זאת, מצביע על כמות גדולה יותר בקבוצה MF (Wilcoxon, $p = 0.032$); איור 1). הפרופורציה של חיידקי ארכיאה לא שונה משמעותית בין קבוצות דיאטה (Kruskal-Wallis, $p = 0.111$). כדי לאמת את כימות מספר הפרוטוזואה בדגימות וכדי ליצור נקודת התייחסות לשיטות הכימות המולקולריות של הפרוטוזואה, בצענו ספירה מיקרוסקופית של פרוטוזואה. הספירה הממוצעת עבור MF (N=5), HF (N=5) ו-LF היא 1.53×10^5 , 1.09×10^5 ו- 2.91×10^5 בהתאמה. התוצאות מראות שיש הבדל משמעותי בכמות לפי קבוצות הדיאטה (Kruskal-Wallis, $P = 0.0075$), איור 1) אשר מתאימה לממצאים שנצפו בשיטת ה-qPCR.

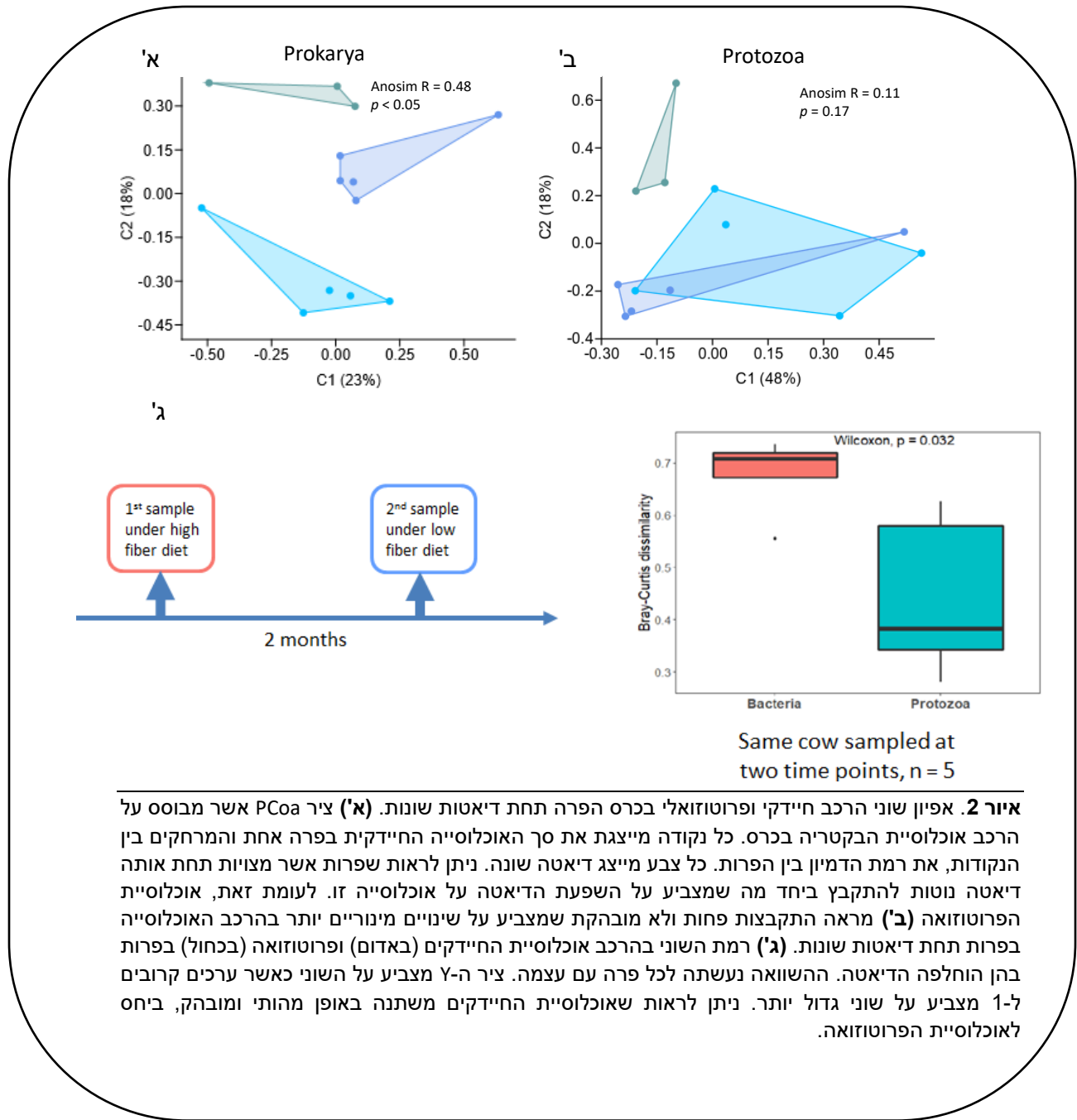


איור 1. א' כימות אוכלוסיית מיקרואורגניזמים לפי ממלכות השונות ולפי משטר הזנה בכל ממלכה. ציר ה-y מייצג את מספר העותקים של גן ה-16S לחיידקים וארכאה ו-18S לפרוטוזואה, וציר ה-x מייצג את קבוצות הדיאטה השונות: עתירי סיבים (HF), סיביוניים (MF) ודלי סיב (LF). התיבות מייצגות את הטווח הבין-רבעוני (IQR) בין הרבעון הראשון והשלישי (האחוזון ה-25 וה-75, בהתאמה) והקו האופקי בתוך התיבה מגדיר את החציון. על פי החציון, ניתן לראות שכלל שאחוז הסיב קטן, מספר הפרוטוזואה עולה באופן מובהק ב'. כימות חזותי של פרוטוזואה. ניתן לראות דפוס דומה לזה שהתקבל בעזרת השיטה המולקולרית qPCR דבר חשוב בהתחשב בעובדה שרוב האנליזות הבאות יבוצעו בעזרת שיטות מולקולריות.

השתנות הרכב אוכלוסיות בפרות תחת דיאטות שונות

כאמור, בהתבסס על מחקרים קודמים, הרכב הדיאטה בפרה מהווה גורם מרכזי לשינויים בהרכב החיידקים (פרוקריוטים) של הכרס. עם זאת, השוואה על השפעת שינוי התזונה בין הממלכות השונות השוכנות בכרס לא התבצעו במחקרים קודמים. ניתוח רצפי ה-16S rRNA ו-S18 שהופקו מנוזל הכרס מראה השפעה מובהקת של הדיאטה על הקהילה הפרוקריוטית כצפוי. לעומת זאת ניתן לראות רק השפעה מינורית ולא מובהקת על קהילת הפרוטוזואה. באמצעות מטריצת קהילת השונות של Bray-Curtis ראינו דמיון תוך-דיאטה מובהק המתבטא בהתקבצות בין הדוגמאות השונות (ANOSIM, $R = 0.525$, $P = 0.001$): **איור 2** א', בהשוואה לפרוטוזואה (ANOSIM, $R = 0.172$, $P = 0.089$; **איור 2** ב'). תוך מינוף המערך המתודולוגי שלנו על מנת להעריך האם קהילת הפרוטוזואה תלויה ויציבה יותר במארח בהשוואה לקהילה הפרוקריוטית, דגמנו 5 פרות שהתזונה שלהן התחלפה מאחוז סיב נמוך לאחוז סיב גבוה. אותן פרות נדגמו פעמיים במרווחים של חודשיים בין דגימות והוזנו לפחות 45 ימים בכל דיאטה. חישבנו את מרחקי השונות של Bray-Curtis של אוכלוסיות הפרוקריוטים והפרוטוזואה משתי נקודות זמן של אותה חיה וראינו הבדל משמעותי בין האוכלוסיות מבחינת יציבות (Wilcoxon, $P = 0.032$; **איור 2** ג'). המרחק הממוצע בתוך המארח בהתבסס על רצפי S16 הוא 0.677 לעומת 0.442 ברצפי 18S. התוצאות שלנו מראות

שהרכב המינים של אוכלוסיית הפרוטוזואה יציב יותר בסך הכל בהשוואה לאוכלוסייה הפרוקריוטית ולכן מסיקים כי אוכלוסיית הפרוטוזואה פחות מושפעת מתנאי סביבה בכרס.

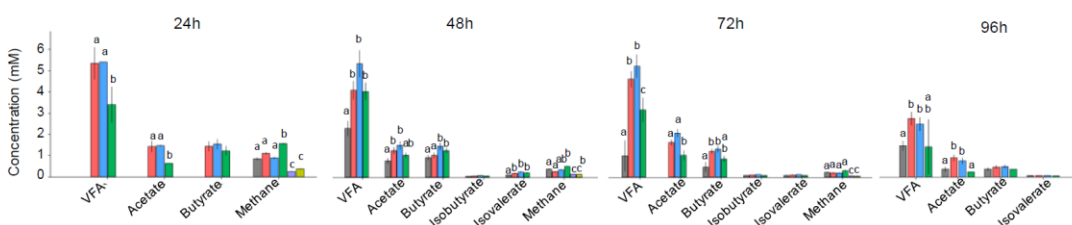


איור 2. אפיון שוני הרכב חיידקי ופרוטוזואלי בכרס הפרה תחת דיאטות שונות. (א') ציר PCoA אשר מבוסס על הרכב אוכלוסיית הבקטריה בכרס. כל נקודה מייצגת את סך האוכלוסייה החיידקית בפרה אחת והמרחקים בין הנקודות, את רמת הדמיון בין הפרות. כל צבע מייצג דיאטה שונה. ניתן לראות שפרות אשר מצויות תחת אותה דיאטה נוטות להתקבץ ביחד מה שמצביע על השפעת הדיאטה על אוכלוסייה זו. לעומת זאת, אוכלוסיית הפרוטוזואה (ב') מראה התקבצות פחות ולא מובהקת שמצביע על שינויים מינוריים יותר בהרכב האוכלוסייה בפרות תחת דיאטות שונות. (ג') רמת השוני בהרכב אוכלוסיית החיידקים (באדום) ופרוטוזואה (בכחול) בפרות בהן הוחלפה הדיאטה. ההשוואה נעשתה לכל פרה עם עצמה. ציר ה-Y מצביע על השוני כאשר ערכים קרובים ל-1 מצביע על שוני גדול יותר. ניתן לראות שאוכלוסיית החיידקים משתנה באופן מהותי ומובהק, ביחס לאוכלוסיית הפרוטוזואה.

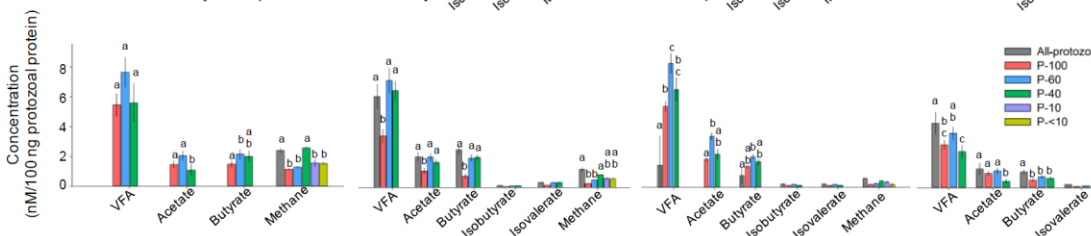
2. שנה ב' - אפיון השפעת פרוטוזואה במתכונת החסרה על נעילות ומטבוליטים.

חלק מהדוגמאות אשר נדגמו, נלקחו לאינקובציה במתכונת החסרה. מתכונת החסרה בוצעה על ידי פילטור של אוכלוסיית הפרוטוזואה תחת פילטרים שונים בגודלם אשר איפשר החסרה של משפחות מסוימות של פרוטוזואה. כך התקבלו אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה אשר ניתן להדגיר יחד עם האוכלוסייה של חיידקים וארכאה ולהעריך את תרומתם למטבוליטים ספציפיים על פני זמן (ארבעה ימי אינקובציה, איור 3). איור 3 מראה את ההפרש בין אינקובציה עם אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה לעומת אינקובציה של אוכלוסיית החיידקים וארכאה ללא פרוטוזואה, כלומר, התוספת בכמות המטבוליטים הנובעת מהמצאותם של פרוטוזואה שונים. ניתן לראות כי המצאות פרוטוזואה באופן כללי מגבירה את הייצור של חומצות שומן נדיפות שונות כאשר הבולטות בהן הינן אצטט ובוטירט. פרוטוזואה גם באופן כללי מגדילות את ריכוז המתאן. ניתן להצביע על אוכלוסיית פרוטוזואה ספציפית P-40 אשר מגירה את פליטת המתאן יותר באופן מובהק ביחס לאוכלוסיות אחרות (איור 3 עמודות ירוקות). אוכלוסייה זו מתאפיינת בהימצאות אקסקלוסיבית של פרוטוזואה מסוג *Isotricha*. **לכן ממצאינו חשפו פוטנציאלית סוג ספציפי של פרוטוזואה אשר מעורב באופן דספרופורציונלי בפליטת מתאן.** חשוב לציין כי אותה אוכלוסייה אינה מגבירה באופן מובהק ייצור חומצות שומן נדיפות ביחס לאוכלוסיות אחרות, לכן קיימת דיסוציאציה באוכלוסייה זו בין תרומתה לאנרגיה בפרה לעומת תרומתה לאיבוד אנרגיה בצורת מתאן. ממצא זה הינו חשוב שכן כל מטרה עתידית במודולציה של אוכלוסיית הפרוטוזואה למיגור מתאן תדרוש בנוסף שמירה על מאזן אנרגטי ותוצר בפרה.

א'



ב'

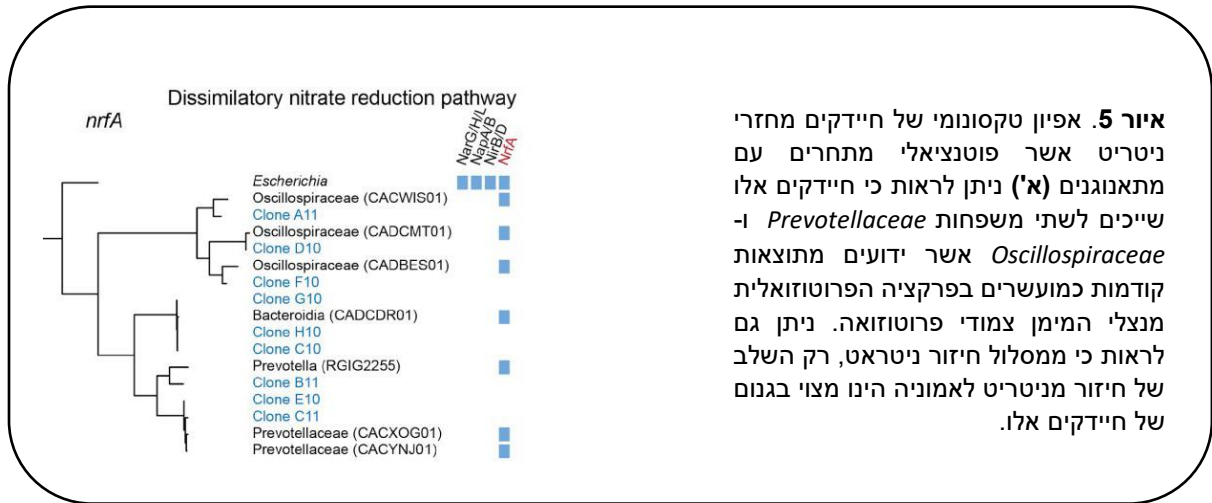


איור 3. שינוי ממוצע בייצור המטבוליטים בנוכחות אוכלוסיות פרוטוזואה שונות. הממוצע התקבל על ידי הפחתת הכימות הגולמי של מטבוליטים בכל אוכלוסיות של פרוטוזואה עם הערכים המתקבלים מהדגרה ללא קהילת פרוטוזואה של כל אחד עבור כל פרה בנפרד כאשר (א) מייצג את ההפרש הממוצע (ב) את ההפרש הממוצע המתוקן לפי הביימוסה של כל אוכלוסיית פרוטוזואה. רק אוכלוסיות ומטבוליטים שהציגו הבדל מובהק ביחס להדגרה נטולת הפרוטוזואה מוצגים. ניתוח סטטיסטי בוצע באמצעות ART-C מתוקן עבור ריבוי בדיקות עם אותיות שונות מעל העמודות המציינות מובהקות ב- $p < 0.05$.

3. שנה ג' - אפיון השפעת אוכלוסיות פרוטוזואה שונות על טקסונומיה ופונקציונאליות של אוכלוסיית הפרוקריוטים.

הממצאים המטאבוליטיים הראו כי חלק מאוכלוסיות הפרוטוזואה נוטים לשנות באופן מהותי את כמות תוצרי התסיסה. נשאלת השאלה, האם תוצרים אלו הם תוצר המטאבוליזם של פרוטוזואה עצמם או חלקם תוצר של חיידקים אשר באינטרקציה עם פרוטוזואה כפי שנין לראות עם מתאנוגנים שהינה האסוציאציה המבוססות ביותר בין פרוטוזואה לפרוקריוטים, וזו נצפתה גם בתוצאות הנוכחיות שלנו. אסוציאציה בין פרוטוזואה למתאנוגנים הוצעה במחקרים רבים כי הינה התוצאה של העברת המימן המיוצר על ידי פרוטוזואה לידי מתאנוגנים לייצור מתאן. לפיכך, אנו משערים כי מימן עשוי להיות גורם מכריע חזק של אסוציאציה מיקרוביאלית וכי פרוטוזואה עשויים לתרום מימנים לחיידקים לצרכים אחרים מעבר למתאנוגנים. השערה זו חשובה מפני שניצול מימנים שלא לצורך ייצור מתאן יקטין את פליטתו וכן יגביר ייצור של תוצרים שונים הדרושים לפרה כגון אצטט אשר גם הוא בחלקו תוצר של חיזור פחמן דו חמצני על ידי מימן שמיצור בעת תסיסה⁵. התוקף הפוטנציאלי של השערה זו מתחזק על ידי העובדה שחלק מהחיידקים המועשרים בקשר פיזי עם פרוטוזואה שייכים למשפחות אשר ידוע אליהן מיני חיידקים המנצלים מימן לחיזור מולקולות שונות. ה-*Ruminococcaceae* ו-*Lachnospiraceae* מועשרים באופן משמעותי בקהילה הפרוקריוטית הצמודה פיזית לפרוטוזואה¹¹. הטקסונים הללו נקשרו במחקרים לאצטוגנזה בעזרת חיזור פחמן דו חמצני ולמסלול Wood Ljungdahl¹². בהתאם להשערה שלנו, חקרנו האם מסלולי חיזור אחרים של חיידקים הידועים כקיימים בכרס בולטים מועשרים בפרוטוזואה. באמצעות סטים של פריימרים עבור גנים מרכזיים של מסלולים הקשורים לניצול מימן, כימתנו את השפע שלהם באוכלוסייה החיידקית הקשורה לפרוטוזואה בהשוואה לאוכלוסיית החיידקים אשר לא צמודה לפרוטוזואה (free-living). אלה כללו גנים של formyltetrahydrofolate synthetase ו אצטיל COA סינתאז (FTFHS, acsB) של מסלול Wood Ljungdahl¹², רדוקטאז של אדנוזין-5'-פוספוסולפט (APRA) ותת-היחידה הדיסימילטורית Sulfite reductase alpha (ds)¹³, של מסלול חיזור הסולפט, methyl coenzyme-M reductase¹¹ (mcrA), nitrite reductase (nrfA). הערכנו גם האם ניתן למצוא הבדל בין אוכלוסיות שונות של פרוטוזואה כפי שנעשה בכימות המטאבוליטיים (איור 4). ה-mcrA (מתאן) היה הגן הנפוץ ביותר והיה גבוה יותר באוכלוסיית החיידקים הקשורה פיזית לפרוטוזואה בהשוואה לאוכלוסיית החופשית, מה שמאשר את השיעור הגבוה יותר של מתאנוגנים שנצפו באמצעות רצף האמפליקונים ומסביר את הגברת המתאן בהדגרת אוכלוסיית הפרוקריוטים עם פרוטוזואה. הגן ftfhs (ייצור אצטט) נטה להיות נפוץ יותר באוכלוסיית ה-P-100 והיה מובהק יותר ב-P-40 (איור 4). באופן דומה בגנים הקשורים להפחתת סולפט aprA ו-dsrA שהיו בעלי כמות גבוהה ביותר באוכלוסיית P40. ממצאים אלו מצביעים על כך שפרוטוזואה אינם רק אחראים על הגברת מתאן אלה גם הגברת ייצור מטאבוליטיים כגון אצטט על ידי חיידקים אצטוגניים וחיזור סולפט וניטרט בכרס. לכן לפרוטוזואה תפקיד מהותי בפיזיולוגיה של הכרס

פרוטוזואה. חיזור ניטריט חשוב לפרוטוזואה שהרי מדובר במולקולה רעילה. לכן קיימת אפשרות כי מסלול זה מהווה דרך לפרוטוזואה להיפטר ממנו ובמקביל (איור 5).



איור 5. אפיון טקסונומי של חיידקים מחזרי ניטריט אשר פוטנציאלי מתחרים עם מתאוגנים (אי) ניתן לראות כי חיידקים אלו שייכים לשתי משפחות *Prevotellaceae* ו-*Oscillospiraceae* אשר ידועים מתוצאות קודמות כמועשרים בפרקציה הפרוטוזואלית מנצלי המימן צמודי פרוטוזואה. ניתן גם לראות כי ממסלול חיזור ניטראט, רק השלב של חיזור מניטריט לאמוניה הינו מצוי בגנום של חיידקים אלו.

דיון המחקר

התוצאות שלנו מראות שהדינמיקה של אוכלוסיית הפרוטוזואה שונה מאוכלוסיית הפרוקריוטים בכרס, בעיקר, שהמארח ולא דיאטה הוא הקובע החזק ביותר בהרכבו. יתר על כן, נראה כי האוכלוסייה היא ספציפית יותר למארח בהשוואה לאוכלוסיית הפרוקריוטים, כפי שניתן לראות בשינוי הקטן משמעותית בהרכב האוכלוסייה כאשר אותן פרות עוברות מדיאטת HF ל-LF. ההבדל בדפוסי הדינמיקה עשוי להיות קשור לכוחות האקולוגיים השונים המעצבים את אותן אוכלוסיות ולגודלן, המאפיינים הפיזיולוגיים והמורפולוגיים השונים שלהם. באופן כללי, הרכבה של מינים פרוקריוטיים היא זמנית יותר, מאופיינת בתחלופה מהירה של מינים בתגובה לתנודות סביבתיות וחומרי הזנה¹⁴, לעומת זאת, נראה כי הקהילה הפרוטוזואלית עמידה יותר לשינויי ממשק לאחר שהתבססה. אנו מציעים שבניגוד לקולוניזציה הראשונית של פרוקריוטים בכרס, המתאפיינת בשינויים מהותיים בשלבים שונים של התפתחות הפרה וכתוצאה משינויי דיאטה על פני חיי הפרה, אוכלוסיית הפרוטוזואה, מוכתבת ותלויה על ידי ההתיישבות הראשונית ונתרת יציבה לכל אורך חיי הפרה. מכלול המינים נשאר כמעט ללא שינוי לאורך כל חיי החיה, עם פחות השפעה על הרכבם, בהשוואה לחיידקים ולארכאה. ממצא זה הינו בעל חשיבות גדולה אם ברצוננו לשנות את האוכלוסייה המיקרוביאלית בכרס לאורך זמן ורומזת כי שינוי בהרכב פרוטוזואה סביר ויהיה יציב לאורך זמן ועל פני דיאטות שונות.

תוצאות המטאבוליטים והגנים החיידקיים אשר באסוציאציה עם פרוטוזואה מצביעות על כך שפרוטוזואה שונים, אינם שווים במעורבותם בהגברת תוצרי תסיסה שונים. מחקר זה מצביע על אוכלוסייה ספציפית של פרוטוזואה אשר מעורבת באופן דיספרופורציונלי בהגברת ייצור מתאן. אוכלוסייה זו מורכבת

מפרוטוזואה מסוג *Isotricha* אשר ידוע כיוצר מימן בכמויות גדולות ביחס לפרוטוזואה אחרים⁹. לכן החסרה ספציפית של סוג פרוטוזואה זה יכול להוות אסטרטגיה מעניינת בעלת פוטנציאל מיגור פליטת מתאן תוך שימור על מאזן האנרגיה של הפרה ותוצריה. סייג לממצא זה הינו כי אוכלוסיית P-40 אשר הראתה הגברה מהותית בייצור מתאן גם מועשרת בגנים האחראים לתוצרים אחרים אשר חשובים לממשק האנרגטי של הפרה בדגש על אצטט. מחקרים נוספים דרושים בכדי לאשש כי החסרת אוכלוסייה זו מכרס הפרה אינה מהווה פגיעה בייצור בפרות. המחקר שבוצע בשנה ג' גם מצביע על חשיבותם של פרוטוזואה בהעשרה של חיידקים אשר מתחרים עם מתאנוגנים על המימנים שנוצרים בזמן התסיסה. חשוב לציין שבמחקר זה לא ניתן היה לבחון אילו מיני פרוטוזואה מועשרים בחיידקים אלו, ומהווה אספקט מרתק לניסוי המשך לפרויקט זה. העשרתם של פרוטוזואה בעלי אוכלוסייה זו, על חשבון אוכלוסיות המעשירות למתאנוגנים עשוי להווה אסטרטגיה ברת קיימא למיגור פליטת מתאן מבלי לפגוע בביצועי הפרה.

מסקנות המחקר

תוצאות מחקר זה מצביעות על מספר תוצאות מעודדת בנוגע לפוטנציאל מודולציה של אוכלוסיית הפרוטוזואה לשיפור ביצועים ומיגור פליטת מתאן. יציבות הפרוטוזואה על פני דיאטות שונות מצביע על פוטנציאל להתערבות מוקדמת בקולוניזציה שלהם בכרס אשר עשוי, בניגוד לכישלונות הרבים שנצפו באוכלוסיית החיידקים, להוות אסטרטגיה ברת קיימא ויציבה על פני חיי הפרה. בכדי לאשש את היפותזה זו, נדרש ניסוי המשך המאשש כי התיישבות ראשונית של פרוטוזואה מהווה הגורם המרכזי להרכב האוכלוסייה בבוגר. ניסוי זה בהתהוות בימים אלה. אם היפותזה זו תסתמן כנכונה, זה יוביל לאסטרטגיה ריאלית של ניסוי השתלה אשר ינתבו את אוכלוסיית הפרוטוזואה לכיוון פנוטיפ "רצוי" בפרה. המחקר הנוכחי גם הצביע על קנדידת להחסרה מאוכלוסיית הפרוטוזואה ובכך הכין את הקרקע לניסויים בפרות לאחר בחינת דינמיקת הקולוניזציה של פרוטוזואה בכרס הפרה. מסקנות מחקר זה פורסמו בעיתונות מדעית בשני מאמרים doi.org/10.1101/2023.12.17.572056 ו- doi.org/10.1038/s41396-021-01170-y.

תוצרים מדעיים מהמחקר

1. Solomon, Ronnie, Tanita Wein, Bar Levy, Shahar Eshed, Rotem Dror, Veronica Reiss, Tamar Zehavi, Ori Furman, Itzhak Mizrahi, and Elie Jami. "Protozoa populations are ecosystem engineers that shape prokaryotic community structure and function of the rumen microbial ecosystem." *The ISME Journal* 16, no. 4 (2022): 1187-1197.
2. Toyber, Ido, Raghawendra Kumar, and Elie Jami. "Rumen protozoa are a hub for diverse hydrogenotrophic functions." *Environmental microbiology reports* (2024, accepted): 2023-12.

- 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/10.1073/pnas.0806191105 (2009).
- 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 Morgavi, D., Forano, E., Martin, C. & Newbold, C. Microbial ecosystem and methanogenesis in ruminants. *Animal: an international journal of animal bioscience* **4**, 1024 (2010).
- 6 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).
- 7 Attwood, G. T. *et al.* Exploring rumen methanogen genomes to identify targets for methane mitigation strategies. *Animal Feed Science and Technology* **166-67**, 65-75, doi:DOI 10.1016/j.anifeedsci.2011.04.004 (2011).
- 8 Hook, S. E., Wright, A. D. & McBride, B. W. Methanogens: methane producers of the rumen and mitigation strategies. *Archaea* **2010**, 945785, doi:10.1155/2010/945785 (2010).
- 9 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).
- 10 Solomon RS, Wein TP, Levy BS, Eshed ST, Dror RS, Reiss VT, Zehavi T, Furman O, Mizrahi I, Jami E. Protozoa populations are ecosystem engineers that shape prokaryotic community structure and function of the rumen microbial ecosystem. *ISMEJ* doi.org/10.1038/s41396-021-01170-y (2021).
- 11 Levy B S and Jami E. Exploring the prokaryotic community associated with the rumen ciliate protozoa population. *Frontiers in Microbiology* (9) 2526 (2018).

- 12 Gagen EJ, Padmanabha J, Denman SE, McSweeney CS. Hydrogenotrophic culture enrichment reveals rumen Lachnospiraceae and Ruminococcaceae acetogens and hydrogen-responsive Bacteroidetes from pasture-fed cattle. *FEMS Microbiol. Lett.*, (2015)
- 13 Meyer B, Kuever J. Molecular analysis of the diversity of sulfate-reducing and sulfur-oxidizing prokaryotes in the environment, using aprA as functional marker gene *Appl. Environ. Microbiol.*, (2007)
14. Jami E, Israel A, Kotser A, Mizrahi I. Exploring the bovine rumen bacterial community from birth to adulthood *The ISME Journal* (2013)