

**דו"ח מסכם לתכנית מחקר מספר: 3620780
(2026)**

**חקר יציבות אוכלוסיית הפרוטוזואה על פני זמן ואפיון השפעתם האינדיווידואלית על
ייצור מטאבוליטים סופיים**

Studying the stability and variation of the protozoa community in the rumen
and their effect on end-product metabolites

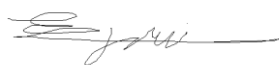
מוגש למועצת החלב

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 : 15.06.2026 חתימת החוקר



תקציר

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 איקריוטים המהווים כ-50% מהביומסה של המיקרואורגניזם בכרס. מתוצאות ראשונות במעבדה 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. תצפית זו רומזת על כוחות אחרים, מעבר לתנאי סביבה (המושרים על ידי דיאטה למשל), המכתיבים את הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה.

לכן, במחקר זה שמנו כמטרה לבחון את ההיפותזה כי אוכלוסיית הפרוטוזואה מוכתבת על ידי הרכישה הראשונית ונשארת יציבה לאחר מכן, זאת בניגוד לאוכלוסיית החיידקים אשר משתנה בהתאם לדיאטה.

במחקר זה, בשילוב עם דיגומים הנובעים ממחקרים קודמים אספנו את נוזל הכרס של 50 עגלות מהלידה ועד לחליבה הראשונה, מדגם חסר תקדים בארץ אשר מאפשר לנו לבחון את ההיפותזות שלנו.

תוצאות אנאליזת אוכלוסיית הפרוטוזואה וחיידקים על פני זמן מראות כי אוכלוסיות הפרוטוזואה בין העגלות השונות בתחילת החיים דומות אחת לשנייה יותר מאשר בשלבי התפתחות מאוחרים יותר, זאת בניגוד מוחלט לאוכלוסיות החיידקים אשר במחקר זה ובמחקרים קודמים בהן אנו רואים עלייה בדמיון בין האוכלוסיות השונות עם הזמן. ממצא זה מצביע על כך שתהליך ההרכבה של הפרוטוזואה שונה באופן מוחלט מתהליך ההרכבה של חיידקים. בנוסף, מדדנו את ייצור המתאן וכימתנו את תרומתה היחסית של אוכלוסיית הפרוטוזואה כאופן אינדיוודואלי בפרה הבוגרת. ממצאי בדיקה זו מראים כי בפרות שונות, בעלות אוכלוסיות פרוטוזואה שונות, הבדל מהותי בתרומת הפרוטוזואה לייצור מתאן אשר יכול לנוע בין 5% תרומה לעד 80% הגברת מתאן. בהמשך, כימתנו את פרופיל חומצות השומן הנדיפות, ובחנו את הקשר בין השינוי בייצור מתאן לבין השינוי בחש"ן בעקבות הוספת אוכלוסיית הפרוטוזואה. תוצאות אלו הראו כי בניגוד לעלייה העקבית בייצור מתאן, השפעת הפרוטוזואה על פרופיל ה-VFA-הייתה מתונה יותר ולא הצביעה על שינוי עקבי בכלל הפרות, אם כי נצפו קשרים חיוביים מסוימים בין העלייה במתאן לבין שינויים באצטט ובבוטיראט. ככלל, ממצאי המחקר מצביעים על כך שאוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס אינה רק רכיב יציב ונבדל בהרכבו בין פרות, אלא גם גורם פונקציונלי בעל תרומה אינדיוודואלית ומשתנה לייצור מתאן. ממצאים אלו עשויים לתרום להבנה טובה יותר של הגורמים המיקרוביאליים המשפיעים על פליטת מתאן בפרות, ולפתוח בעתיד אפשרות לזיהוי מוקדם או הכוונה של אוכלוסיות פרוטוזואה בעלות תרומה נמוכה יותר למתאנוגנזה, כחלק מאסטרטגיות לשיפור יעילות הייצור והפחתת ההשפעה הסביבתית של משק החלב.

Abstract

The bovine rumen harbors a complex microbial community composed of a large number of species, whose importance to the cow and impact on the environment are reflected in many ways. These include specialization in the efficient breakdown and digestion of plant-based feed, effects on cow health, and the emission of waste products and gases into the environment. Despite recent advances in understanding the complexity of the processes taking place in the rumen, and technological developments that have enabled a deeper view of this microbial community, the role of some rumen microbial groups remains unclear. This gap is particularly evident for protozoa, a group of eukaryotic cells that constitute approximately 50% of the microbial biomass in the rumen. Based on preliminary results from our laboratory, in which we characterized microbiome composition under different diets, we observed that, in contrast to the bacterial community, whose composition is strongly affected by diet, the protozoal community is more stable, yet differs substantially between individual cows. This observation suggests that additional forces, beyond environmental conditions such as those induced by diet, shape the composition of the protozoal community.

Therefore, in this study, we aimed to test the hypothesis that the protozoal community is determined by initial acquisition and remains stable thereafter, in contrast to the bacterial community, which changes in response to diet.

In this study, together with samples derived from previous studies, we collected rumen fluid from 50 heifers from birth until first milking. This represents an unprecedented dataset in Israel, enabling us to examine our hypotheses.

Analysis of the protozoal and bacterial communities over time showed that protozoal communities among different heifers were more similar to one another early in life than at later developmental stages. This stands in complete contrast to bacterial communities, for which both this study and previous studies show an increase in similarity among individuals over time. This finding indicates that the assembly process of the protozoal community is fundamentally different from that of the bacterial community.

In addition, we measured methane production and quantified the relative contribution of the protozoal community on an individual basis in adult cows. These results showed that different cows, harboring different protozoal communities, exhibit substantial variation in the contribution

of protozoa to methane production, ranging from a 5% contribution to as much as an 80% increase in methane production.

We then quantified the volatile fatty acid profile and examined the relationship between changes in methane production and changes in VFAs following the addition of the protozoal community. These results showed that, in contrast to the consistent increase in methane production, the effect of protozoa on the VFA profile was more moderate and did not indicate a consistent shift across all cows, although certain positive associations were observed between the increase in methane and changes in acetate and butyrate.

Overall, the findings of this study indicate that the rumen protozoal community is not merely a stable component whose composition differs between cows, but also a functional factor with an individual and variable contribution to methane production. These findings may contribute to a better understanding of the microbial factors influencing methane emissions in cows and may, in the future, open the possibility for early identification or guidance of protozoal communities with lower contributions to methanogenesis, as part of strategies to improve production efficiency and reduce the environmental impact of the dairy industry.

רקע ותאור הבעיה

בכרס מעלי הגירה 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}. לאוכלוסייה זו גם 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. 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 בתפקידם של הפרוטוזואה השוכנות בכרס והקשר שלהם לפליטת⁸. פרוטוזואה הינה 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. לכן הבנת אוכלוסייה זו, ותורמתן למשק האנרגטי של הפרה ולפליטת המתאן עלול להוביל לאסטרטגיות לתיעול אוכלוסייה זו לכיוון הגברת ייצור תוצרים שמישים לפרה, יחד עם מיגור פליטת מתאן. בניסויים קודמים 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^{10,11}. לכן, הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה מהווה פקטור משמעותי בפליטת מתאן. בשנים האחרונות גם גברה ההבנה כי לשלבים ראשונים של התפתחות האוכלוסייה המיקרוביאלית בכרס השפעה ארוכת תווך על החיה גם במחקרים בבני אדם וגם במחקרים בפרות במכון וולקני. לכן מחקרים עדכניים מתמקדים בשלב רכישת המיקרואורגניזמים כשלב בו סיכוי מרבי למניפולציה של המיקרוביום לשיפור תוצרת ומיגור פליטת מתאן¹². דבר זה נכון לאוכלוסיות החיידקים בכרס ובמידה מסוימת ארכאה אך קיים פער גדול במיקוד באוכלוסיות פרוטוזואה בכרס והדינמיקה שלהן מהלידה ועד הבגרות כמעט ולא נחקרה. 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 השונות¹⁴. תצפית זו רומזת על כוחות אחרים, מעבר לתנאי סביבה (המושרים על ידי דיאטה למשל), המכתיבים את הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה, ואותן כוחות לא נבחנו על פני חיי הפרה.

מטרות המחקר:

על בסיס ממצאי המעבדה פיתחנו היפותזה אשר מחקר זה בא לבחון המציע כי אוכלוסיית הפרוטוזואה של הפרה הבוגרת מוכתבת על ידי דינמיקת הרכישה בשלבים הראשונים של ההתיישבות של אוכלוסייה זו. היפותזה זו, אם תימצא נכונה, תאפשר פוטנציאלית ביצוע חיזוי של פרמטרים מסויימים בשלבים מוקדמים של התפתחות החיה כגון פליטת מתאן וחומצות שומן נדיפות, ומעבר לכך, יפתח אופציה למניפולציה בהרכב הפרוטוזואה בשלבים מוקדמים, אשר סיכוי גבוהה שתוצאותיו ישמרו על פני חיי הפרה ביחס למניפולציה של אוכלוסיית החיידקים כפי שמרבית המחקרים מציעים. לכן מטרת המחקר בהצעה זו הינו אפיון אוכלוסיית הפרוטוזואה בשלבי ההתיישבות ובחינת השפעת דינמיקת ההתיישבות על הרכב של הפרה הבוגרת בפרות שונות ובחינת תרומתן של אוכלוסיות הפרוטוזואה השונות (בין הפרות השונות) בהגברת ייצור מתאן בכדי לבחון האם קיימת אוכלוסייה מתיישבת יותר "רצויה" מאוכלוסייה אחרת בפרה בתקופת החליבה.

לצורך כך, מחקר זה מחולק ל-3 מטרות משניות:

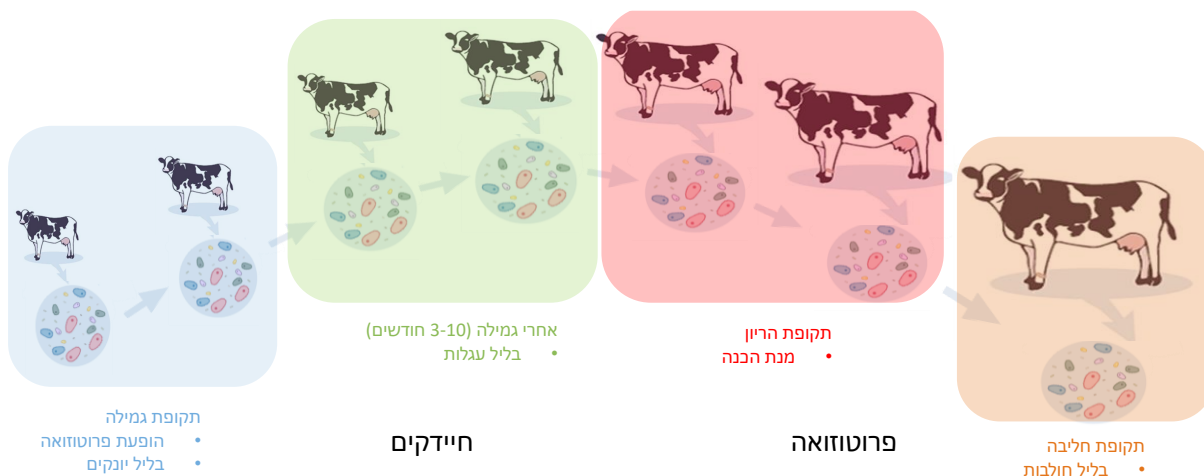
1. דיגום עגלות על פני זמן, מרגע הופעת הפרוטוזואה עד לחליבה ראשונה.
2. אפיון הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה על פני זמן ומציאת קשר בין הרכב ראשוני להרכב הבוגרת.
3. בחינת מידת ההשפעה של הרכב הפרוטוזואה על ייצור מתאן וחומצות שומן נדיפות.

תוצאות המחקר שנה א'

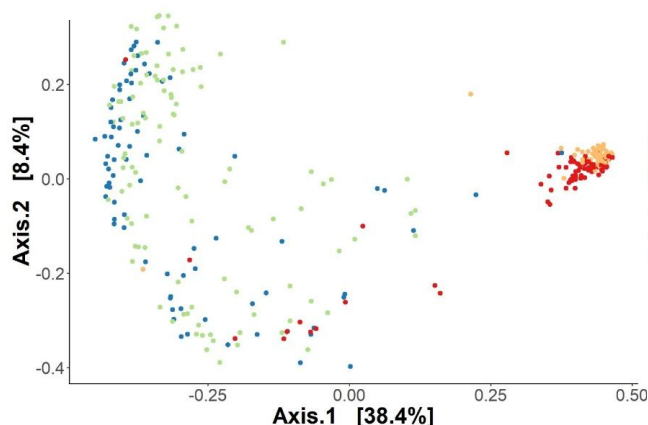
1. דיגום עגלות על פני זמן, מרגע הופעת הפרוטוזואה עד דיגום עד למועד ההמלטה הראשונה ואחריה. בשילוב עם תכניות קודמות של מועצת החלב (תכניות 3620699 ו-3620624) במחקר זה ריכזנו מעקבים ודיגומים של 50 עגלות משלבים הראשונים של התיישבות פרוטוזואה אשר מתרחש כחודשיים לאחר המלטה ועד לתקופת ההמלטה הראשונה וחליבה. מאגר זה הינו יחיד במינו בארץ ומאפשר מבט גלובאלי על הרכב המיקרוביום בשלבים השונים של החיים ותחת דיאטות שונות בתקופות השונות (איור 1). בעזרת אפיון מולקולרי של אוכלוסיית הפרוטוזואה על ידי ריצוף יחידת ה-18S הריבוזומלי אשר מאפשר להשיג את הטקסונומיה ופילוגנזה של אוכלוסיות איוקריוטים מורכבות וגן ה-16S של חיידקים וארכאה, בחנו את תהליך הרכישה והשתנות האוכלוסייה על פני שנתיים בפרות השונות (איור 1), זאת בכדי לענות על השאלות הבאות: מה דינמיקת ההתפתחות של הפרוטוזואה ואיך התפתחות זאת משפיע על אוכלוסיית הפרוטוזואה הבוגרת? האם אוכלוסיות פרוטוזואה בפרה הבוגרת תלויה בקולוניזציה הראשונים יותר מאשר אוכלוסייה הפרוקריוטית בפרות שונות? ממצאנו מראים כי קיים שוני רב בין חיידקים ופרוטוזואה עם אוכלוסיית החיידקים בין הפרות השונות בעלות דמיון נמוך בתחילת החיים, ובהמשך עלייה בדמיון (הרכב החיידקים) בשלבים מאוחרים יותר של החיים. לעומת זאת, אוכלוסיית הפרוטוזואה מפגינה תמונה הפוכה לחלוטין, עם דמיון גבוהה בתחילת החיים אשר יורד יותר ויותר עם גיל הפרה. ממצא זה מראה כי כוחות אקולוגיים שונים ובעת זו לא ברורים משפעים על אוכלוסיית החיידקים ופרוטוזואה.

על בסיס ממצאים אלו אנו שוקדים בעת זו לבחון האם הבדל זה בין אוכלוסיית החיידקים לאוכלוסיות הפרוטוזואה מוביל לאפשרות של חיזוי אוכלוסיית הפרוטוזואה הבוגרת בעזרת הרכבי אוכלוסיות בשלבים הראשונים של התפתחות החיה.

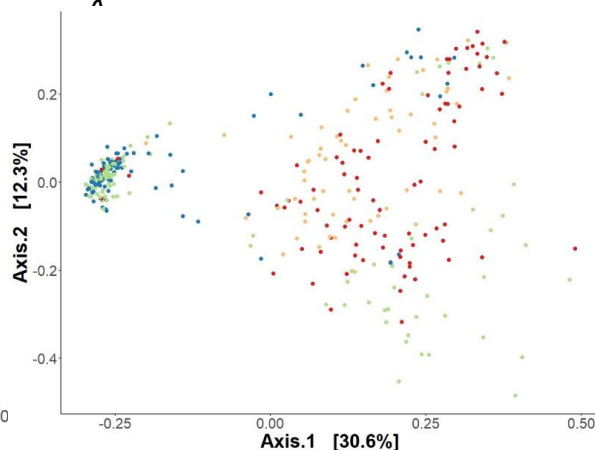
א'



ב'



ג'



איור 1. אפיון שוני הרכב חיידקי ופרוטוזואלי בכרס הפרה תחת דיאטות שונות. (א') סכמת דיגום והדיאטות של 100 העגלות שנדגמו. (ב' ג') צירי PCoA אשר מבוסס על הרכב אוכלוסיית (ב') הבקטריה ו(ג') פרוטוזואה בכרס על פני זמן. מוצגות ארבע נקודות המייצגות שלבי התפתחות שונים בעגלה (על פי צבעים של איור 1א'). כל נקודה מייצגת את סך האוכלוסייה החיידקית או פרוטוזואלית בפרה אחת והמרחקים בין הנקודות, מייצגות את רמת הדמיון בהרכב האוכלוסיות בין הפרות (נקודות קרובות יותר = יותר דומות). ניתן לראות ש אוכלוסיות החיידקים בין הפרות השונות מתקבצות קרוב יותר ככל שהעגלה בוגרת יותר. לעומת זאת, אוכלוסיית הפרוטוזואה (ג') מראה התקבצות חזקה בשלבים הראשונים של ההתפתחות.

תוצאות המחקר שנה ב'

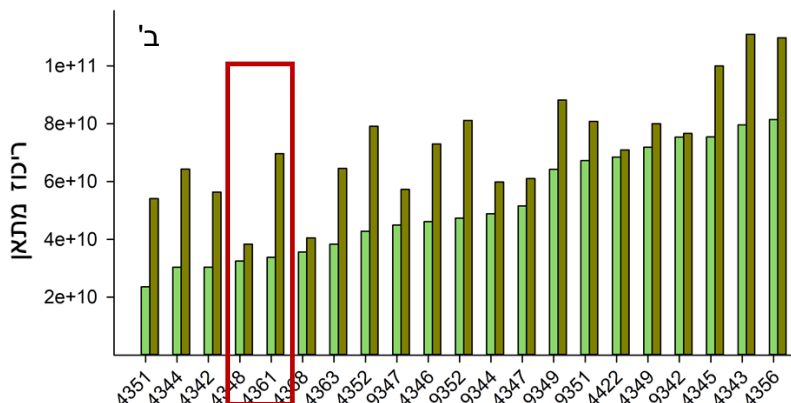
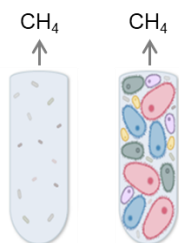
3. בחינת מידת ההשפעה של הרכב הפרוטוזואה על ייצור מתאן.

הדוגמאות שנדגמו בתקופת החליבה, בנוסף לאפיון הרכב המיקרוביום, נועדו גם לכמת ייצור מתאן בכל פרה באופן אינדיווידואלי, בהדגרה עם ובלי פרוטוזואה, ובכך לכמת את מידת ההשפעה של אוכלוסיות פרוטוזואה השונות בין הפרות לייצור מתאן. ניסוי זה מאפשר לנו להעריך גם את השוואת ייצור מתאן בפרות השונות, גם מהו ההבדל בתרומה של אוכלוסיית הפרוטוזואה בכל פרה, וגם, בשילוב עם הממצאים על התפתחות האוכלוסייה, יאפשר לנו לעריך האם ניתן לחזות את פוטנציאל ייצור המתאן של פרה בוגרת כבר בשלבים ראשונים של החיים. היעד המרכזי שלנו הינו למצוא את הדיפרנציאל הגבוהה ביותר בין אינקובציה בלי פרוטוזואה לאינקובציה יחד עם פרוטוזואה, מה שיחשוף את הרכבים השונים אשר מובילים לתרומה שונה לייצור מתאן.

ניסוי זה מבוצע *In-Vitro* כאשר לאחר דגום נוזל הכרס, מפרידים באמצעות שיטות מבוססות במעבדה את הפרוטוזואה מכלל אוכלוסיית המיקרואורגניזמים ובוחרים את פוטנציאל הייצור של מתאן עם ובלי פרוטוזואה (איור 2א). אנאליזה זו מבוצעת בעזרת גז כרומטוגרפיה, שיטה אשר מבוססת במעבדה ותאפשר לכמת מתאן באופן פרטני לכל פרה¹⁰.

תוצאות ניסוי זה מראות קודם כי המיקרוביום שלמיקרוביום של פרות שונות יש פוטנציאל ייצור מתאן שונה. בנוסף, ניתן לראות באופן עקבי כי אינקובציה של חיידקים וארכאה יחד עם אוכלוסיית הפרוטוזואה של כל אחת מהפרות מוביל להגברת ייצור מתאן. למרות זאת, ניתן לראות כי הגברה זו אינה שווה ערך בין הפרות השונות. לדוגמא פרות מס' 4348 ו-4361 (איור 2ב), מייצרות כמות דומה של מתאן כאשר המיקרוביום שלהם מודגר ללא פרוטוזואה. כאשר אותן אוכלוסיות מודגרות עם אוכלוסיות הפרוטוזואה שלהן, ניתן לראות שפרה 4348 מייצרת כ-5% יותר מתאן לעומת פרה 4361 המייצרת קרוב ל-50% יותר מתאן.

א'
הדגרת נוזל כרס עם ובלי פרוטוזואה



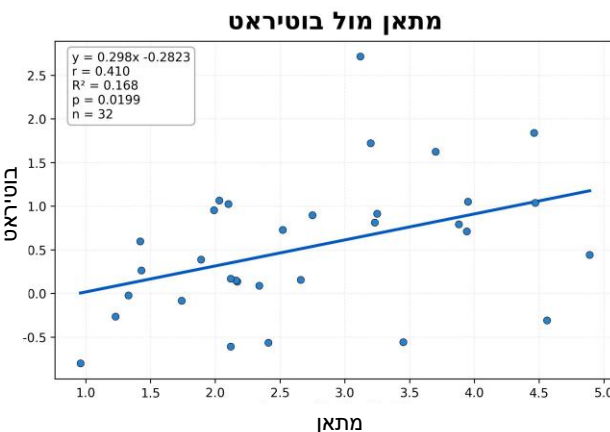
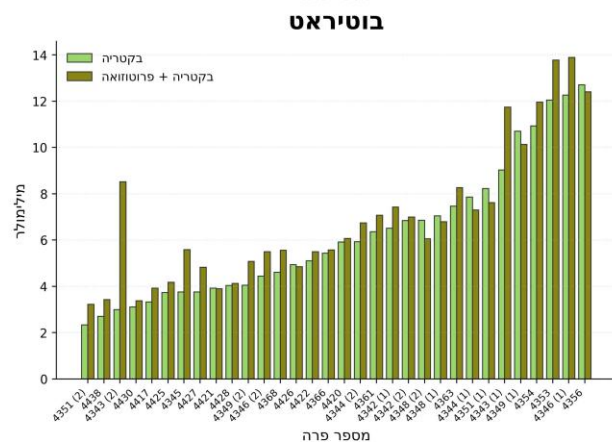
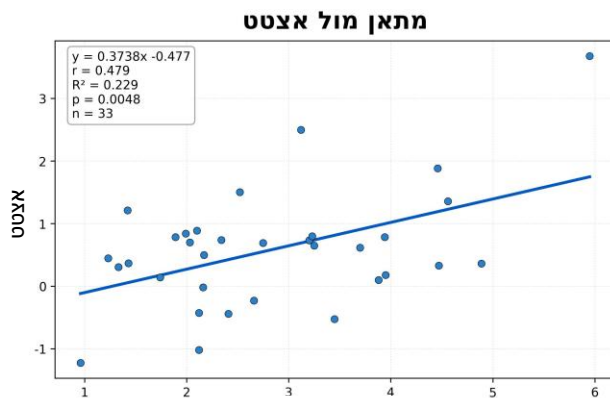
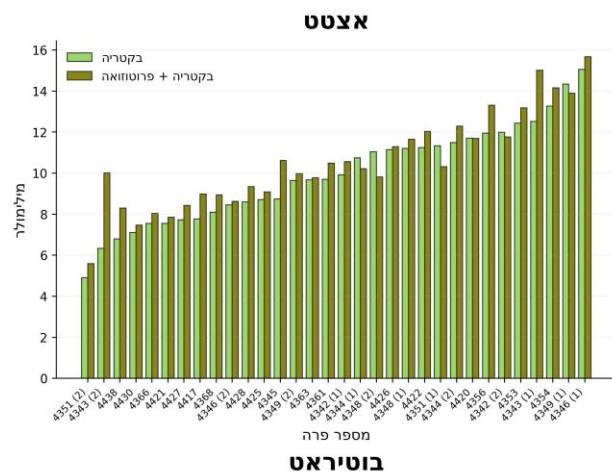
איור 2. (א'). סכמת ניסוי הדגרה עם ובלי פרוטוזואה. (ב') כימות ייצור מתאן *in-vitro* של המיקרוביום של כל פרה בנפרד עם ובלי הפרוטוזואה שלהן. ניתן לראות שקיים הבדל מהותי בתרומת לייצור מתאן של אוכלוסיות הפרוטוזואה הנע בין 5% הגברה לקרוב ל-70% הגברה בפרטים מסוימים. חשוב לציין כי לא משנה הפרה והרכב המיקרוביום, פרוטוזואה מגבירים ייצור מתאן

תוצאות שנה ג'

בשנה השלישית כימתנו במערכת המיקרוקוזם את השפעת נוכחות הפרוטוזואה על פרופיל חומצות השומן הנדיפות (VFA), תוך השוואה בין אינקובציות של פרוקריוטים בלבד לבין אינקובציות הכוללות גם את אוכלוסיית הפרוטוזואה של אותה פרה. בניגוד לעלייה הברורה והעקבית בייצור המתאן בקבוצת, עבור מרבית ה-VFA לא נצפה טרנד אחיד בין הפרות, והשינוי הממוצע היה קטן ולא עקבי. בבדיקה זוגית נצפתה עלייה מובהקת בעיקר בבוטיראט ($p < 0.05$), עבור אצטט נצפתה שונות גבוהה בין הפרות וללא עדות לעלייה ממוצעת עקבית אך עדיין עלייה מובהקת ($p < 0.05$) על פני כלל הפרות. כלומר, בניגוד למתאן, שבו תוספת הפרוטוזואה לאחר נרמול הובילה לעלייה עקבית וברורה בכל הדגימות, פרופיל חומצות השומן הנדיפות לא הצביע על תגובה אחידה או חזקה באותו סדר גודל.

בנוסף בחנו האם עוצמת העלייה במתאן קשורה לעוצמת השינוי ב-VFA באותה דגימה. ניתוחי הרגרסיה הראו מתאמים חיוביים מתונים בין העלייה במתאן לבין העלייה באצטט, בבוטיראט ובאיזובוטיראט. קשרים אלו היו מובהקים סטטיסטית, אך הסבירו רק חלק מוגבל מהשונות (R^2 של כ-0.17–0.24). לכן, נראה כי הקורלציה החיובית שנצפתה עבור אצטט ובוטיראט אינה משקפת בהכרח קשר ישיר בין מסלול ייצור המתאן לבין כלל פרופיל ה-VFA, אלא עשויה לנבוע מכך שהפרוטוזואה הידועים כתורמים לייצור חומצות אלו במסגרת פעילותם המטבולית.

לסיכום, במערכת מיקרוקוזם, ההשפעה הברורה ביותר של נוכחות הפרוטוזואה היא הגברת ייצור המתאן. לעומת זאת, השפעתן על ריכוז והרכב חומצות השומן הנדיפות היא חלשה יותר, משתנה בין פרות, ואינה מציגה מגמה עקבית בדומה למתאן. ממצא זה תומך בכך שבמערכת הניסוי הנוכחית, תרומת הפרוטוזואה לפנוטיפ המטבולי ניכרת בעיקר דרך הגברת מתאנוגנזה, בעוד שהשפעתן על תוצרי התסיסה המרכזיים המשמשים כמקור אנרגיה לפרה היא מוגבלת יותר.



איור 3. שפעת נוכחות פרטוזואה על ריכוזי אצטט ובוטיראט ועל הקשר בינם לבין השינוי בייצור מתאן במערכת מיקרוקוהם לאחר 24 שעות אינקובציה.

בפאנלים השמאליים מוצגת השוואה בין ריכוזי אצטט ובוטיראט בשתי קבוצות הניסוי: **בקטריה** (פרוקריוטים בלבד) ו-**בקטריה + פרטוזואה** (אינקובציה הכוללת גם את אוכלוסיית הפרטוזואה של אותה פרה). ערכי ה- ΔVFA מוצגים במילימולר, והפרות מסודרות בסדר עולה לפי הערך בקבוצת הבקטריה. לצורך הצגת גרפי העמודות הוסרו הפרות 4347 ו-4352. בפאנלים הימניים מוצג הקשר בין השינוי במתאן ($N - B$) לבין השינוי בריכוז אצטט או בוטיראט ($\Delta VFA = N - B$). קו הרצף מייצג רגרסיה ליניארית, ובכל פאנל מוצגים משוואת הקו, מקדם המתאם r , ערך R^2 , ערך p ומספר הדגימות (n). חישוב הרגרסיות בוצע בהתאם לסינון ששימש באנליזה המקורית.

דיון

תוצאות המחקר מצביעות על כך שאוכלוסיית הפרטוזואה בכרס מתנהגת באופן שונה מהותית מאוכלוסיית החיידקים במהלך התפתחות החיה. בעוד שאוכלוסיות החיידקים בין פרטים שונים נוטות להתכנס עם הזמן להרכבים דומים יותר, אוכלוסיות הפרטוזואה מראות דפוס הפוך של דמיון גבוה יחסית בשלבי ההתיישבות הראשונים וירידה בדמיון בין פרות עם ההתבגרות¹². ממצא זה תומך באפשרות כי תהליך ההרכבה של אוכלוסיית הפרטוזואה מושפע מכוחות אקולוגיים שונים מאלו המכתיבים את הרכב אוכלוסיית החיידקים, וייתכן כי לאירועי רכישה מוקדמים, אינטראקציות בין-ממלכתיות ותכונות ספציפיות של המאכסן יש תפקיד משמעותי יותר בעיצוב אוכלוסייה זו. חשיבות ממצא זה מתחזקת

לאור עבודות קודמות המראות כי שלבי החיים המוקדמים מהווים חלון זמן משמעותי לעיצוב המיקרוביום של הכרס ולהשפעה אפשרית על תפקודו בהמשך החיים¹².

במקביל, ניסויי המיקרוקוזם מראים כי אוכלוסיות פרוטוזואה שונות אינן שקולות מבחינה תפקודית. בכל הפרות שנבחנו נוכחות הפרוטוזואה הגבירה את ייצור המתאן, ובקבוצה בה הפרוקריוטים והפרוטוזואה עברו אינקובציה נצפתה עלייה עקבית וברורה ביחס לאינקובציה של פרוקריוטים בלבד. עם זאת, עוצמת ההשפעה השתנתה מאוד בין פרות — מטוח נמוך יחסית ועד להגברה משמעותית של ייצור המתאן, כפי שמתואר בדוח הנוכחי. ממצא זה משתלב עם הספרות ומחקרים קודמים במעבדתנו המראה כי פרוטוזואה בכרס קשורים באופן הדוק למתאנוגנזה, בין היתר דרך ייצור מימן וקשרים פיזיים ומטבוליים עם ארכאות מתאנוגניות^{1,10}, אך מוסיף נדבך חשוב בכך שהוא מדגים שונות אינדיווידואלית בתרומת הפרוטוזואה למתאן, ולא רק קשר כללי בין נוכחות פרוטוזואה לבין פליטת מתאן.

לעומת זאת, נתוני חומצות השומן הנדיפות מצביעים על תמונה שונה. בניגוד למתאן, שבו נראתה עלייה ברורה כמעט בכל הדגימות לאחר הוספת אוכלוסיית הפרוטוזואה, פרופיל ה-VFA לא הראה טרנד אחיד או שינוי עקבי בין הפרות. גם כאשר נמצאו הבדלים זוגיים בחלק מהמדדים, גודל האפקט והכיוון הממוצע לא הצביעו על שינוי מערכתי ברור בהרכב חומצות השומן הנדיפות. בוטיראט הראה את האות העקבי ביותר של עלייה מתונה בקבוצת האינקובציה עם פרוטוזואה, ואילו עבור אצטט, פרופיונאט, איזובוטיראט וחומצות נוספות נצפתה שונות גבוהה בין פרות, ללא מגמה אחידה המקבילה לעלייה החזקה במתאן. לכן, בתנאי המיקרוקוזם קצרי הטוח, נוכחות הפרוטוזואה משפיעה באופן בולט על מתאנוגנזה, אך אינה גורמת לשינוי מקביל וברור בסך תוצרי התסיסה המרכזיים המשמשים כמקור אנרגיה לפרה. ממצא זה מעודד במידה מסוימת בכך שאם ברצוננו לבצע מניפולציה באוכלוסיית הפרוטוזואה (כאמור בגלל חלון ההזדמנות בתחילת החיים הגדולה מלאוכלוסיית הפרוקריוטים) למיגור פליטת מתאן, סביר שלא תהינה השפעה על המשק האנרגטי של הפרות.

ניתוחי הקורלציה בין השינוי במתאן לבין השינוי בכל אחד ממדדי ה-VFA מחזקים מסקנה זו. בניתוח שכלל את כלל הדגימות, נצפו מתאמים חיוביים מתונים בדלתא האבסולוטית של אצטט, ובוטיראט ביחס לדלתא של מתאן. עם זאת, סביר שממצא זה משקפים תרומה מטבולית ישירה של הפרוטוזואה לייצור חומצות אלו, בעיקר אצטט ובוטיראט, ולא קשר סיבתי פשוט בין ייצור VFA לבין ייצור מתאן. פרשנות זו תואמת את ההבנה כי פרוטוזואה יכולים לתרום בעצמם לייצור אצטט ובוטיראט^{5,1}, אך במקביל להוות מוקד חשוב להעברת מימן ולתמיכה במתאנוגנים. לכן, תרומת המחקר הנוכחי היא בהבחנה בין עצם נוכחות הפרוטוזואה לבין זהות והרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה של כל פרה: קיימות אוכלוסיות פרוטוזואה בעלות פוטנציאל שונה להגברת מתאן, בעוד שהשפעתן על פרופיל ה-VFA במערכת המיקרוקוזם מוגבלת ואינה אחידה. שילוב נתוני ההרכב לאורך החיים עם נתוני המתאן וה-VFA יאפשר בהמשך לבחון האם ניתן לחזות כבר בשלבים מוקדמים אילו פרות יפתחו אוכלוסיות פרוטוזואה בעלות תרומה גבוהה יותר למתאנוגנזה, ובכך לפתוח אפשרות למניפולציה מוקדמת וממוקדת של אוכלוסייה זו להפחתת פליטת מתאן תוך שמירה על תפקוד התסיסה בכרס.

סיכום

לסיכום, המחקר הנוכחי יצר תשתית ייחודית להבנת התפתחות אוכלוסיית הפרוטוזואה בכרס והשפעתה התפקודית על ייצור מטאבוליטים סופיים. באמצעות מעקב ארוך טווח אחר עגלות משלבי ההתיישבות הראשוניים ועד לתקופת החליבה, הראינו כי דינמיקת ההרכבה של אוכלוסיית הפרוטוזואה שונה מזו של אוכלוסיית החיידקים: בעוד שהקהילה החיידקית נוטה להתכנס עם הזמן בין פרות, קהילת הפרוטוזואה נעשית מובחנת יותר בין פרטים. בנוסף, ניסויי המיקרוקוזם הראו כי פרוטוזואה מגבירים באופן עקבי את ייצור המתאן, אך שעוצמת ההגברה משתנה באופן משמעותי בין פרות, דבר המדגיש כי הרכב אוכלוסיית הפרוטוזואה ולא רק עצם נוכחותה הוא גורם חשוב בקביעת הפוטנציאל המתאנוגני. לעומת זאת, השפעת הפרוטוזואה על חומצות השומן הנדיפות הייתה קטנה יותר ולא הצביעה על שינוי מערכתי ברור בפרופיל ה-VFA. יחד, הממצאים מצביעים על כך שאוכלוסיית הפרוטוזואה היא רכיב מרכזי אך אינדיבידואלי בתפקוד המיקרוביום של הכרס, בעיקר בהקשר של מתאנוגנזה, ומבססים את האפשרות שבעתיד ניתן יהיה לחזות או לכוון את הרכב אוכלוסייה זו בשלבי חיים מוקדמים במטרה להפחית פליטת מתאן תוך שמירה על תרומת המיקרוביום לעיכול ולמשק האנרגיה של הפרה, מטרה שתהינה נושאים עתידיים במעבדתנו.

רשימת ספרות מצוטטת

- 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 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 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 Jami E and Mizrahi I . A method to the madness - The plasticity of the rumen microbiome and the ecological rules governing it. *EMBO reports* (22):e52269 (2020).
 13. Bolyen, Evan, Jai Ram Rideout, Matthew R. Dillon, Nicholas A. Bokulich, Christian C. Abnet, Gabriel A. Al-Ghalith, Harriet Alexander et al. "Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2." *Nature biotechnology* 37, no. 8 (2019): 852-857.
 14. Toyber, I., Kumar, R. and Jami, E., 2024. Rumen protozoa are a hub for diverse hydrogenotrophic functions. *Environmental Microbiology Reports*, 16(4), p.e13298.