

יחסי מיקרואורגניזמים של הכרס
ודופן התא הצמחי בליגנוצולוזות
מטופלות כימית ממקורות
חד ודו פסיגיים

חיבור לשם קבלת תואר דוקטור לפילוסופיה

מאת

סולומון רן

הוגש לסנט האוניברסיטה העברית בירושלים

פברואר, 1998

שבט, תשנ"ח

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של

פרופ' דניאל בן גדליה

דר' יהושע מירון

ודר' ג'רלד שרדר

עבודה זו מוקדשת בהוקרה ובאהבה לאשתי גניה

ולבנותי, רותם, טל ויובל; להורי רחל ואדי;

ולאחי שי, על התמיכה, העידוד ואורך הרוח.

ולזכרם של סבי, שמואל שמואלוב (בובי),

וסבתי, אסתר (לוי) סולומון, ז"ל, אשר היו

מן הדוחפים בתחילת המסלול האקדמי, אך

לצערי, לא זכו לראות את סופו.

תודתי הרבה נתונה:

למדריכי בעבודה, ובמיוחד לפרופ' דניאל בן גדליה, מנהל
היחידה המטבולית, על ההדרכה המסורה, התמיכה והליווי
המדעי אשר ערכם לא יסולא בפז, האוירה החברית והעידוד
אשר תרמו רבות להבאת עבודה זו לידי סיום.

לדר' יהושע מירון על ההדרכה המסורה, ובעיקר על החברות
התמיכה, והעידוד ברגעים קשים.

לגב' אדית יוסף, מנהלת מעבדת היחידה המטבולית, על עזרתה
במישור האנליטי והתמיכה החברית.

למר ישעיהו אסט על עזרתו במהלך הניסויים עם בע"ח.

לכל חברי במחלקה לבקר, שה"מ, ובמיוחד לישראל פלמנבאום
מנהל המחלקה, על התמיכה, הקצאת הזמן והמשאבים.

עבודה זו בוצעה ביחידה המטבולית, מינהל המחקר החקלאי,

מכון וולקני, בית דגן.

תוכן הענינים

1	תקציר
4	סקירת ספרות
49	מטרות העבודה
	פרק א': בחינת מגבלות הביודגרדציה של דופן התא הצמחי בליגנוצלולוזות מודל ממקור
50	חד ודו פסיגי באמצעות טיפולים כימיים
74	פרק ב': הנעכלות בכבשים של גבעולי כותנה וקש סורגום
	פרק ג': פירוק וניצול פחמימות דופן התא של גבעולי כותנה וקש סורגום על ידי קווים
94	מוגדרים של חידקי כרס
122	פרק ד': תרומת המזון הגס והמרוכז לבניית גופי המק"א בכרס
139	סיכום כללי
i	Abstract

תקציר

ליגנוצ'ולוזות הנן חומרי לוואי עתירי דופן תא צמחי, אשר ערכן התזונתי נמוך. בעיית המפתח בביודגרדציה של ליגנוצ'ולוזות היא בעיית הנגישות לסובסטרט הנובעת מריבוי רקמות בעלות התעבות דופן תא משנית; דופן זו עבה, הידרופובית, דחוסה ביותר ובלתי חדירה לחידקים ולאנזימים. ההיפותזה עליה מבוססת עבודה זו נקראת "הגישה הסלקטיבית", הטוענת שפגיעה סלקטיבית במרכיב העיקרי של המטריקס (ליגנין או הטרוקסילאנים) בדופן התא של ליגנוצ'ולוזות נתונה, תגרום להגדלה ולריבוי החללים בדופן ותשפר בכך את הנגישות של החידקים והאנזימים הצלולוליטיים אל פחמימות המבנה. גישה זו טוענת שיעד הפגיעה במטריקס, צריך להיות שונה בליגנוצ'ולוזות ממקורות חד ודו פסיגיים.

ההיפוטזה הנ"ל ניבחה בארבעת הפרקים של עבודה זו. בשני הפרקים הראשונים המטרה היתה לבחון האם על ידי פגיעה סלקטיבית במרכיב העיקרי של המטריקס, באמצעות טיפול כימי ספציפי, ניתן להגדיל באופן משמעותי את פריקות הדופן על ידי המיקרואורגניזמים של הכרס, בליגנוצ'ולוזות הניבדלות ביניהן ביחס, ליגנין:הטרוקסילאנים. בפרק הראשון שבוצע *in vitro*, ניבחנו שתי ליגנוצ'ולוזות: גבעולי כותנה כמודל לליגנוצ'ולוזות דו פסיגית וקש סורגום כמודל לליגנוצ'ולוזות חד פסיגית. ניתנו שני טיפולים כימיים: האחד בגפרית דו חמצנית (גד"ח), טיפול הידרוליטי שנועד לפגוע בעיקר בהמיצ'ולוזות; והשני באוזון, טיפול מחמצן שנועד לפגוע בעיקר בליגנין. בגבעולי כותנה תכולת ההמיצ'ולוזות נמוכה (12%) ותכולת הליגנין גבוהה (25%). דהיינו, הליגנין הוא המרכיב העיקרי במטריקס. לעומת זאת, בקש סורגום תכולת הליגנין נמוכה יחסית (9%) ותכולת ההמיצ'ולוזות גבוהה (26%), דהיינו, בקש הסורגום ההמיצ'ולוזות היא המרכיב העיקרי במטריקס. הטיפול בגד"ח בקש סורגום גרם לירידה בתכולת ה-NDF (neutral detergent fiber) מ-69.6 ל-54.1%, בהמיסו כ-46% מההמיצ'ולוזות וכ-26% מהליגנין. כתוצאה מכך עלתה פריקות החומר האורגאני בכ-40%, עד לערך של 76.3%, ופריקות ה-NDF השאריתית עלתה בכ-47% עד ל-72%. בעיקבות הטיפול בגד"ח עלתה נעכלות כלל סוכרי החומר המלא, ונעכלות סוכרי ה-NDF של קש הסורגום מ-54.7 ו-49.5, ל-81.0 ו-77.0%, בהתאמה. מאידך, הטיפול באוזון בקש הסורגום, גרם לירידה מיזערית בתכולת ה-NDF, ולשיפור מועט בנעכלות החומר האורגאני וה-NDF השאריתית; ובהשוואה לטיפול ההידרוליטי בגד"ח, נימצא בלתי אפקטיבי. הטיפול באוזון בגבעולי כותנה גרם לירידה חזקה בתכולת ה-NDF של גבעולי כותנה, מ-79.4 ל-51.2%, בהמיסו כ-60% מהליגנין וההמיצ'ולוזות. כתוצאה מכך עלתה פריקות החומר האורגאני פי 3.1 עד ל-68.5%, ופריקות ה-NDF השאריתית עלתה פי 3.7 עד ל-51.9%. בעקבות המסת מרבית הליגנין וחלק מההמיצ'ולוזות על ידי הטיפול באוזון בגבעולי כותנה, חלה עלייה ניכרת בנעכלות כלל הסוכרים המרכיבים את החומר המלא, מ-27.2 בלא מטופלים, ל-73.6 במטופלים באוזון, וכן שיפור מפליג בנעכלות סוכרי ה-NDF הנע בין 250 ל-350%. מאידך, הטיפול בגד"ח גרם לירידה מיזערית בתכולת ה-NDF בגבעולי כותנה ולשינוי מזערי בנעכלות החומר האורגאני ודופן התא; ובהשוואה לטיפול המחמצן באוזון נימצא בלתי אפקטיבי. הטיפול המחמצן (אוזון) בגבעולי הכותנה וההידרוליטי (גד"ח) בקש הסורגום, פגעו במרכיב העיקרי של המטריקס בכל אחת

מהליגנוצולוזות (ליגנין בגבעולי כותנה; המיצולוזות בקש סורגום), וגרמו לריוח הדופן, להגדלת הנגישות של האנזימים הצלולוליטיים ולשיפור בנעכלות סוכרי דופן התא השארית.

הפרק השני מתאר ניסוי עיכול בכבשים, אשר מטרתו היתה לאושש *in vivo* את היפוטזת העבודה בליגנוצולוזות שניבדקו. גבעולי הכותנה טופלו באוזון עד להלבנת החומר ($\text{pH}=2$) והועשרו בתמיסת אמוניה עד $\text{pH} 6.18$. קש הסורגום טופל בגד"ח, והועשר בתמיסת אמוניה ואוריאה עד $\text{pH} 6$. הליגנוצולוזות הואבסו בשילוב עם מזון מרוכז. בהשפעת הטיפול באוזון עלתה נעכלות ה-NDF של גבעולי הכותנה ב-270%, ובהשפעת הטיפול בגד"ח עלתה נעכלות ה-NDF של קש הסורגום ב-58%. בהשפעת הטיפול באוזון עלתה נעכלות גלוקוז ה-NDF (צלולוזה) וקסילוז ה-NDF של גבעולי הכותנה ב-68% ו-100%, בהתאמה. בהשפעת הטיפול בגד"ח עלתה נעכלות גלוקוז ה-NDF (צלולוזה) וקסילוז ה-NDF ב-36% ו-58%, בהתאמה. תוצאות הנעכלות *in vivo*, מאוששות ותומכות בתוצאות שהתקבלו בניסוי המתואר בפרק הראשון, *in vitro*, ומחזקות בכך את הנחת העבודה בדבר חשיבות הגורם המרכזי במטריקס כמגביל פריקות הדופן בליגנוצולוזות.

בפרק השלישי של העבודה, מתואר ניסוי שמטרתו היתה לבדוק את תגובות ההיצמדות אל הדופן, פרוק הדופן וניצול תוצרי הפרוק של הדופן, על ידי קווים נקיים של חידקי כרס צלולוליטיים שהופעלו על מצע NDF של הליגנוצולוזות שניבדקו. ניבחנו תרבויות של חידקי הכרס הנקיים *Fibrobacter succinogenes* S85 ו-*Butyrivibrio fibrisolvens* D1, וכן אינטראקציות בין שני הקווים בתרבית משותפת. מבין שני החידקים, *F. succinogenes* S85 גילה יכולת הידרוליטית גבוהה ביותר, בהמיסו למעלה מ-25% ו-50% מסוכרי המטריקס של גבעולי כותנה בלתי מטופלים, ומטופלים באוזון, בהתאמה; ולמעלה מ-38% ו-60% מסוכרי המטריקס קש סורגום לא מטופל או מטופל בגד"ח, בהתאמה. ניצול הצלולוזה שפורקה מהדופן על ידי חידק זה היתה גבוהה ביותר בכל הסובסטרטים (94-98%) בעוד שניצול הקסילן היה נמוך יותר (55-80%). לעומת זאת, החידק *B. fibrisolvens* D1 היה מוגבל ביותר בפרוק הצלולוזה (14-19%), והקסילן (17-32%) בכל הסובסטרטים, אך יכולתו לנצל את הסוכרים שפרק היתה מלאה (100%). נימצא אפקט משלים בין שני זני החידקים אשר בא לידי ביטוי בעקומות הגדילה המשותפות, ובעלייה בניצול פחמימות הדופן¹ לגדילה. לעומת זאת שעור הפריקות המירבית של פחמימות הדופן בתרבית המשותפת ניקבע על פי יכולתו ההידרוליטית של החידק *F. succinogenes* S85. בחינה של החידקים הצמודים לדופן הליגנוצולוזות הניבדקות, בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני סורק, הראתה שה-*F. succinogenes* יצר מושבות גדולות של חידקים בתאחיזה אל רקמות מקולפות, בעיקר של הליגנוצולוזות המטופלות כימית, בעוד שה-*B. fibrisolvens* יצר מושבות דלילות יותר. פני השטח החיצוניים של החידק *F. succinogenes* S85 היו מגורגרים על ידי בליטות אופיניות, הקשורות כנראה בתהליכי הספיחה והצלולוליזה של החידק, בעוד שפני השטח של החידק *B. fibrisolvens* D1 היו חלקים יחסית.

בפרק האחרון של העבודה נערכו ניסויים שמטרתם היתה לאמוד את התרומה היחסית של מקורות פחמן לא סטרוקטוראליים, דהיינו, עמילן וחלבון, בהשוואה לדפנות תאים של קש

סורגום (צמח C_4) וגבעולי כותנה (צמח C_3), לביסניטזה של גופי המיקרואורגניזמים בכרס, תוך שימוש באיזוטופים יציבים של פחמן ($^{13}C/^{12}C$). בניסוי אחד, הואבסו אילים המצוידים בקנולת כרס, במנות שהכילו גבעולי כותנה בלתי מטופלים או גבעולי כותנה מטופלים באוזון, בתוספת מזון מרוכז; ובניסוי השני, מנות שהכילו קש סורגום לא מטופל או קש סורגום מטופל בגד"ח, בתוספת מזון מרוכז. הרכב האיזוטופים היציבים של הפחמן במרכיבי מנות הניסויים היה כזה שהתקיים פער ניכר בערכי $\delta^{13}C$ בין הליגנוצלולוזות והמזון המרוכז. גבעולי הכותנה (צמחי C_3) הם בעלי ערך $\delta^{13}C$ שלילי גבוה (~ -25) בעוד שגרעיני התירס והזאין (צמחי C_4) הם בעלי ערך שלילי נמוך (-10.9 ו- -13.2 , בהתאמה). בניסוי הסורגום התמונה הפוכה: מרכיבי המזון הגס היו בעלי ערך שלילי נמוך (קש סורגום, צמחי C_4 , -11.6); בעוד שמרכיבי המזון המרוכז בעלי ערך שלילי גבוה (חיטה וכוספת סויה, צמחי C_3 , -23.5 ו- -25.2 , בהתאמה). מתכונת זו אפשרה לבחון בשני ניסויים, את תרומת המזון הגס והמזון המרוכז לבניית גופי המיקרואורגניזמים שהופרדו ממעכל הכרס: חידקים שוכני סיב (PAB=Particles Adherent Bacteria), חידקים שוכני נוזל (FAB=Fluid associated Bacteria), ופרוטוזואה, בהסתמך על קביעת ערכי $\delta^{13}C$ של גופם. נימצא שערכי $\delta^{13}C$ של גופי המיקרואורגניזמים בשני הניסויים היו קרובים יותר לערכי המזון המרוכז: בניסוי גבעולי הכותנה, ערכים הנעים בין -13.5 ל- -16.5 כאשר $\delta^{13}C$ של המזון המרוכז (תירס) כ- -11 . בניסוי הסורגום התקבלה מגמה דומה אם כי הערכים שונים: $\delta^{13}C$ של המזון המרוכז (חיטה) היה -23.7 , וערכי $\delta^{13}C$ של המיקרואורגניזמים לסוגיהם היו קרובים לערכים אלו, בין -21.3 ל- -22.2 , בהתאם לסוג המיקרואורגניזמים. מחישוב מדויק על בסיס חלקו של המרכיב הגס והמרוכז מסה"כ החומר האורגני במנה, מתקבל שבניסוי הסורגום, $85-88\%$ מגופם של הפרוטוזואה, ה-PAB וה-FAB, היה בנוי ממקורות פחמן לא סטרקטוראליים (חיטה וכוספת סויה); בניסוי הכותנה התמונה היתה דומה לגבי הפרוטוזואה וה-FAB, אולם תרומת הפחמן מהמקורות הסטרקטוראליים במנה (גבעולי הכותנה) לבניית גופם של החידקים שוכני הסיב היתה גדולה יותר, כ- 35% . מתוצאות עבודה זו ניראה שאוכלוסיות הפרוטוזואה וחידקי המדיום הנוזלי בכרס בונות את תאיהן בעיקר ממקורות פחמן לא סטרקטוראליים - דהיינו מתוצרי פירוק של עמילן וחלבון. מענינת במיוחד התוצאה המראה שגופם של החידקים שוכני המיקטע החלקיקי הסיבי, שבאופיים הם חידקים צלולוליטים מנצלי דופן תא, נבנה אף הוא בעיקר ממקורות פחמן לא סטרקטוראליים. עבודה זו מצביעה לראשונה באמצעות טכניקה של איזוטופים יציבים של פחמן ($^{13}C/^{12}C$) את מוצא מקורות הפחמן המשמשים לבנין גופי המיקרואורגניזמים בכרס.

