

פיתוח שיטה מולקולארית למעקב אחרי הדינמיקה

של אוכלוסיות חיידקי תומצת חלב בתחמיצים

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט
ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר

'מוסמך למדעי החקלאות'

מאת

סבטלנה אוגי

עבודה זאת נעשתה בהדרכתם של:

פרופסור צבי וינברג, המעבדה לשימור מספוא ומוצרי לוואי,
המחלקה לאיכות המזון ובטיחותו, המכון לטכנולוגיה ואחסון של
תוצרת חקלאית, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן
ודוקטור משה שמש, המעבדה למיקרוביולוגיה של מזון, המחלקה
לאיכות המזון ובטיחותו, המכון לטכנולוגיה ואחסון של תוצרת
חקלאית, מנהל המחקר החקלאי, מכון וולקני, בית דגן

תודות

ברצוני להודות קודם כל למנחים שלי, פרופסור צבי וינברג ודוקטור משה שמש, על ההנחיה הנהדרת שניתנה לי לאורך כל תקופת המחקר. תודה רבה לכם על הכלים שנתתם לי כדי להתמודד עם הבעיות שהועלו במהלך המחקר ועל כל העזרה שקיבלתי.

שנית, ברצוני להודות לעוזרי המעבדה, לגברת יאירה חן ולגברת ורד זקין, שלימדו אותי את כל מה שאני יודעת במיקרוביולוגיה וביולוגיה מולקולארית ושסייעו לי רבות במהלך המחקר. כמו כן תודה לכם חברי למעבדה (דנה, אנה, דניאל, רונית, קובי, יבגניה והילה) שעזרתם לי ותמכתם בי במהלך המחקר. תודה לחברים נוספים במכון וולקני, במעבדות השונות, שהושיטו לי יד כשהיה צריך ותמכו בי כמו כן לאורך כל תקופת המחקר. תודה מיוחדת לגברת בלנקה שניצקי, ממעבדות תמר, על התמיכה הטכנית שניתנה לי עם הכרות השימוש במערכת Real Time PCR ו HRM.

לבסוף ברצוני להודות לבן זוגי ולמשפחתי שתמכו בי ועזרו לי לאורך תקופת לימודי לתואר השני ובמחקר שנעשה.

תקציר

תחמיץ הוא תוצר של שימור ירק לח אשר עבר תהליך תסיסה בתנאים אנארוביים (חוסר חמצן). בתהליך זה חיידקי חומצת חלב הופכים את הפחמימות המסיסות של צמחי המספוא לחומצות אורגניות, בעיקר חומצת החלב. כתוצאה מכך החמיצות עולה (ה-pH יורד) וכל עוד לא משתנה דרגת החמיצות ולא חודר אוויר לתחמיץ תהליכי הקלקול נמנעים. מספר חיידקי חומצת חלב האפיפטיים שנמצאים על צמחי המספוא באופן טבעי הוא קטן ביותר, אולם בהכנת התחמיץ מעוניינים שדווקא חיידקי חומצת חלב יהפכו למיקרופלורה הדומיננטית כיוון שהם שיוצרים את חומצת החלב (חומצה לקטית) אשר מהווה הגורם המשמר העיקרי בתחמיצים. לפיכך פותחו תוספות לתחמיצים לשיפור תהליך השימור עצמו ואת ערכו התזונתי של התחמיץ. התוספות הראשונות שנוסו בתחום של זירוז התסיסה היו תרביות של החיידק *Lactobacillus plantarum* השייכות לחיידקי חומצת חלב ההומופרמנטטיביים. תרביות אלו המוספות אמורות להפוך במהירות למיקרופלורה השולטת במספוא, ובכך להבטיח החמצה מהירה ונאותה של המספוא. תוצאות ממחקרים שונים הראו שחיידקי *L. plantarum* לא תמיד משפיעים על תהליך ההחמצה עקב התפתחות מהירה של חיידקי חומצת חלב אפיפטיים שנמצאים במספוא, לפעמים התרביות אינן פעילות בגלל תנאי אחסון בלתי הולמים, ולפעמים הם פוגעים בעמידות המספוא לחשיפתו לאוויר. מסיבות אלה כדאי לפתח שיטת מעקב אחרי חיידקי חומצת חלב, להבנה יותר טובה אחר ההשפעות של הוספת תרביות של חיידקי חומצת חלב ואת הדינמיקה של אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב המתרחשת במהלך תהליך החמצה. לפיכך מטרת עבודה הזאת היתה לפתח שיטה מולקולארית למעקב אחרי דינמיקה של אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב בתחמיצים.

בעקבות פרסום מחקרם של Porcellato et al. 2012 החלטנו להתמקד בשיטת Real Time PCR המשלבת אנליזת high-resolution melt (HRM). שיטת אנליזה זאת מסתמכת על הבדלים בגנום החיידקי ובכך מאפשרת להבחין בין אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב שונות, למעקב אחרי הדינמיקה של חיידקים אלו בתחמיצים. השיטה בבסיסה דומה ל Melting Curve הרגיל אולם הייחודיות של אנליזה ה-HRM הינה בכך שניתן לראות שינויים בבסיס בודד בזמן אנליזה של מקטעי ה-DNA המוגברים. עניין זה מאפשר רזולוציה טובה יותר להבחנה בין מקטעי DNA מסוגי ומיני חיידקי חומצת חלב שונים, וכמו כן בין זנים שונים של אותו מין חיידק חומצת חלב. השערת עבודת מחקר זאת היתה ששיטה זאת אכן תאפשר לעקוב אחרי הדינמיקה של אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב בתחמיצים ותוכל להבחין בין תרביות של חיידקי חומצת חלב שמוספים למספוא לבין אוכלוסיית חיידקים האפיפטיים שנמצאים באופן טבעי במספוא המוחמץ. לצורך כך בשלב ראשון נבחרו התחלים לאזור V3 ב-16S rDNA שאפשרו קבלת עקומות התכה שונות מ-DNA שהופק מ-4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. buchneri*, *P. pentosaceus*, *L. plantarum* MTD1, *E. feacium* Q (יחוס) שאליהם הושוו הדוגמאות מהתחמיצים עצמם. לבחינת אנליזה HRM בפועל, נעשו 2 ניסוי החמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין. בניסוי הראשון החיטה טופלה עם תרבית חיידקים נפרדת של *L. plantarum* MTD1 ותרבית החיידקים *E. feacium* Q, ואילו בניסוי השני התווסף גם טיפול משולב של 2 התרביות הנ"ל. תחמיצים שלא טופלו באף תרבית שימשו כביקורת. לאורך ההחמצה, בימים השונים, נדגמו כל פעם 3 צנצנות מכל טיפול. בניסוי הראשון דיגום מושבות של חיידקי חומצת חלב מתחמיצים נעשה בצורה אקראית כדי להעריך איזה

אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב נמצאת, ובניסוי השני נדגמו כל המושבות כדי לבדוק איזה אוכלוסייה מחיידקי חומצת חלב הינה האוכלוסייה הדומיננטית. התוצאות מניסוי ההחמצה הראשון הראו שקיימות אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב שונות והן משתנות כתלות בשינוי ה-pH במהלך החמצת החיטה. ניסוי החמצה השני הראה תוצאות דומות מבחינת קיום אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב שונות כאשר נערך דיגום מושבות באקראי, אבל בדיגום כלל המושבות על גבי הצלחת התקבלה דומיננטיות של החיידק *L. plantarum* במהלך החמצת החיטה, במיוחד בחיטה שעברה טיפול עם החיידק *L. plantarum* MTD1.

לאחר שהוכח שאנליזת HRM מצליחה להבחין בין סוגים ומינים שונים של חיידקי חומצת חלב בתחמיצים, בחנו שיטת אנליזה זאת להבחנה בין זנים שונים מאותם מיני חיידקי חומצת חלב. הבחנה מסוג זה תאפשר להבדיל בין תרביות מוספות של חיידקי חומצת חלב לבין חיידקי חומצת חלב האפיפיטיים שנמצאים באופן טבעי במספוא המוחמץ. תוצאות ניסויים עם זנים שונים של *L. plantarum* הצביעו על כך שאנליזת HRM לא הצליחה להבחין בין זנים שונים של אותם מיני חיידקי חומצת חלב. מהתוצאות לא ניתן היה להגיע למסקנה האם פרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* מתחמיץ שייך לתרבית שהוספה לירק הטרי או שהרי מדובר על חיידק *L. plantarum* האפיפיטי הטבעי שקיים במספוא המוחמץ. במקביל לכך נעשה ריצוף של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב הטהורות אשר שימשו כרפרנס, ומהשוואה דרך תוכנת BLAST התברר לדוגמה שקיימת 100 אחוז התאמה בין החיידק *L. plantarum* MTD1 לבין זנים אחרים מאותו מין החיידק. לסיכום, השיטה המולקולארית שפותחה כאנליזת HRM המותאמת לחיידקי חומצת חלב בתחמיצים, הוכחה כמוצלחת למעקב אחרי דינמיקה של אוכלוסיית חיידקים אלו ברמת סוג ומין של החיידק אולם לא ברמת הזן של אותו מין החיידק.

תוכן עניינים

1	רשימת קיצורים
2	1. מבוא
2	1.2. רקע מדעי
2	1.2.1. שימור מספוא על ידי החמצה והתהליכים המיקרוביאליים שמתרחשים במהלך החמצה
2-3	1.2.2. תרביות חיידקי חומצת חלב ובדיקת יעילותן בתהליך ההחמצה
3-4	1.2.3. שיטות מולקולאריות לאיפיון וזיהוי חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ
4-5	1.2.4. שיטת High- Resolution Melt (HRM) real- time PCR
5	1.3. חשיבות המחקר
5	1.4. מטרת המחקר
5	1.5. אבני הדרך של המחקר
6	2. חומרים ושיטות
6-7	2.1. חומרים
8	2.2. שיטות (תיאור הניסויים)
8-9	2.2.1. ניסויי החמצה
9	2.2.2. אנליזות לקביעת פרמטרים להחמצה
9	2.2.2.1. קביעת תכולת חומר יבש
9	2.2.2.2. בדיקות כימיות לקביעת חומציות, תוצרי תסיסה נדיפים וחומצה לקטית
9-10	2.2.3. קביעת מספר חיידקי חומצת חלב
10	2.2.4. ניתוח סטטיסטי של ניסויי ההחמצה
10	2.2.5. גידול תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות
10	2.2.6. הפקת DNA מתחמיצים ומתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות
10	2.2.7. סינטיזה של התחלים (פריימרים) לגן 16S rDNA
11	2.2.8. עקומות סטנדרט לבחינת פעילות הפריימרים לגן 16S rDNA בשימוש Real Time PCR
11	2.2.9. בחינת יכולת הבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות דרך אנליזת HRM ובשימוש Real Time PCR לגן 16S rDNA
12	2.2.10. בחינת יכולת הבחנה בין זנים שונים של אותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות בשימוש אנליזת HRM
12	2.2.11. ריצוף תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לוידוי השימוש באנליזת HRM
12	2.2.12. הרצה בג'ל אלקטרופורזה

12-13	2.2.13. שימוש באנליזת HRM לבחינת יכולת הבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות במצב בו נמצאים מעורבים ביניהם
13	2.2.14. בחינת אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR על דוגמאות DNA מהתחמיצים
13	2.2.15. עיבוד תוצאות איכותי לקבלת טבלאות מסכמות לגבי התאמת דוגמאות מתחמיצים לפרופילי עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות
14	2.2.16. שלבי הפיתוח של אנליזת HRM להתאמה לתחמיצים
14	3. תוצאות
14	3.1. תוצאות פיתוח של שיטת מעקב אחר דינמיקה של חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ בעזרת אנליזת HRM ו Real Time PCR
14-18	3.1.1. אנליזת HRM להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים, בשימוש סט הפריימרים LAC1-LAC2; LAC2-LAC3
18-20	3.1.2. אנליזת HRM להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים, בשימוש סט הפריימרים LAC2 –LAC4
21-22	3.1.3. אנליזת HRM להבחנה בין זנים שונים של אותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות, בשימוש סט הפריימרים LAC2 –LAC4
22-23	3.1.4. שימוש ברצפים של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לאימות אנליזת HRM להבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות
23-27	3.1.5. שימוש באנליזת HRM למעקב אחרי חיידקי חומצת חלב בתחמיצי חיטה בשלב דונג, בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4
28-30	3.1.6. בחינת יכולת אנליזת HRM לקביעת דומיננטיות של חיידק חומצת חלב, בשימוש סט הפריימרים LAC2- LAC4
30-38	3.1.7. שימוש באנליזת HRM לקביעת דומיננטיות חיידקי חומצת חלב בתחמיצי חיטה בשלב חלב, בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4
38-43	3.2. תוצאות מניסויי החמצה (חיטה בשלב דונג וחיטה בשלב חלב) מבחינת מספר חיידקי חומצת חלב, ערכי ה-pH והרכב תחמיצים סופיים (תוצרי תסיסה)
44-46	4. דיון ומסקנות
47-50	5. רשימת ספרות
51-62	6. נספחים

רשימת קיצורים

ח"י – חומר יבש

חש"ן- חומצות שומן נדיפות

טמפ'- טמפרטורה

מעלי גירה – מע"ג

מ"צ- מעלות צלזיוס

API 50 CH → analytical professorile index

BLAST → Basic Local Alignment Search Tool

CFU→ colony forming unit

DGGE → denaturing gradient gel electrophoresis

DM → dry matter

GFP → green fluorescent protein

HRM → high resolution melt

LAB → lactic acid bacteria

Lactobacilli MRS Broth→ Lactobacilli de **Man**, **Rogosa**, **Sharpe** broth

M.R.S agar → deMan, Rogosa and Sharpe agar

PCR → polymerase chain reaction

TBE Buffer →Tris-Borate-EDTA buffer

TMR → total mixed ration

1. מבוא

1.2. רקע מדעי

1.2.1. שימור מספוא על ידי החמצה והתהליכים המיקרוביאליים שמתרחשים במהלך החמצה

החמצה הינה דרך לשמור מספוא לח למשך תקופה ארוכה, להאבסה של מעלי גירה (מע"ג) לאורך כל השנה. במהלך הכנת התחמיץ, ירק לח עובר תהליך תסיסה בתנאים אנארוביים (חוסר חמצן). בתהליך זה חיידקי חומצת חלב הופכים את הפחמימות המסיסות של צמחי המספוא לחומצות אורגניות, בעיקר חומצת החלב. כתוצאה מכך החמיצות עולה (ה-pH יורד) וכל עוד לא משתנה דרגת החמיצות ולא חודר אוויר לתחמיץ תהליכי הקלקול נמנעים. תהליך השימור מתרחש כך שמונע התפתחות של מיקרואורגניזמים גורמי קלקול (לדוגמה שמרים ופטריית עובש), וכמו כן מפסיק את פעילות האנזימים המצויים בצמח הירוק למניעת פירוק ולאובדן החומר המזין בצמח, כגון אנזימים פרוטיאוליטיים. כל זה על מנת לקבלת מספוא משומר בעל איכות הגבוהה ביותר לאורך זמן (אשבל וחוב', 1995). הרכב הירק עצמו, כגון רמת הפחמימות המסיסות במים ותכולת רטיבות הירק, משפיע על האוכלוסיה המיקרובאלית שמתפתחת שקובעת את אופי התסיסה (אשבל וחוב', 1995). בתהליכי ההחמצה הראשוניים עדין יש חמצן בין חלקיקי הצמח, מצב אשר מוביל לתהליכים מטבוליים בצמח, ביניהם חמצון של פחמימות המסיסות ופירוק חלבונים. ברגע שהחמצן נעלם, ונוצרים התנאים האנארוביים, אוכלוסיית המיקרואורגניזמים האירובית כמו שמרים ופטריית עובש מפסיקים את פעילותם ובמקומם מתחילים להתפתח מיקרואורגניזמים אנארוביים שהחשובים ביניהם להחמצה הינם חיידקי חומצת חלב. בתהליך החמצה חיידקי חומצת חלב משתמשים בפחמימות המסיסות ונוצרת בעיקר חומצת חלב (חומצה לקטית) כאשר אופי התסיסה הומופרמנטטיבי, וכן תוצרי תסיסה נוספים כמו אתנול, פחמן דו חמצני וחומצות שומן נדיפות (חש"נ) כדוגמת חומצת חומץ (חומצה אצטית) כאשר אופי התסיסה הינו הטרופרמנטטיבי (Pahlow et al., 2003). כאשר נוצרת חומצה לקטית, אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב שהיתה תחילה מסוג *Enterococci* ו *Leuconostocs* (נוכחים מעל pH של 5) מפנה את מקומה לחיידקי חומצת חלב מסוג *Lactobacilli* ו *Pediococci* שמשלתים על תהליך ההחמצה, מכיוון שעמידים לחומציות שמתחת ל- pH 5 ועד pH 3.5 (Kung et al., 2003). משלב זה וכל עוד התחמיץ לא נחשף לאוויר, התחמיץ נשמר לאורך זמן.

1.2.2. תרבויות חיידקי חומצת חלב ובדיקת יעילותן בתהליך ההחמצה

ניתן לייעל את תהליך ההחמצה ע"י שימוש בתרבויות חיידקי חומצת חלב שנועדו לעודד יצירת חומצה לקטית ולזרז ירידה של ה-pH ובדרך זאת לשפר את שימור המספוא המוחמץ. בהשוואה לתוספים כימיים למיניהם, תרבויות החיידקים נוחות ובטוחות לשימוש, אינן מזהמות את הסביבה ונחשבות כתוספים טבעיים (Weinberg and Muck, 1996). רוב תרבויות חיידקי חומצת החלב הזמינות מורכבות מזנים הומופרמנטטיביים כמו *Pediococcus*, *L. plantarum* ו *Enterococcus* (Filya et al., 2000). כדי שתרבויות אלו יהיו יעילות בפעילותן, חיידקי חומצת חלב המוספים צריכים להשתלט על המיקרופלורה הטבעית של המספוא המוחמץ, כלומר

להפוך לאוכלוסיה המיקרוביאלית הדומיננטית בתחמיצים (Kung et al., 2003). לעתים קורה שתרביות חיידקים המוספות לתחמיצים אינן יעילות בגלל תנאי אחסון לקויים (Mulrooney and Kung, 2008), נגיפים, חוסר התאמה לצמח המספוא, או שפשוט איכות תחמיצים שלא טופלו (תחמיצי בקורת) הייתה טובה. בדיקת פעילות תרביות החיידקים לתחמיצים מתבססת על תוצרי התסיסה הנדיפים שנוצרים מפעילות חיידקי חומצת חלב, לדוגמה חומצה אצטית, ריכוז חומצה לקטית, ריכוז שארית פחמימות מסיסות, עוצמת הורדת ה-pH, וספירת מושבות חיידקי חומצת חלב הנוצרים מגידול על מצעי מזון סלקטיביים (Rooke et al., 1985; Ranjit and Kung, 2000). מאחר ושיטות עבודה אלו אינן מזהות סוגים ומינים של חיידקי חומצת חלב, פותחו מבחנים ביוכימיים כמו API 50 CH המתבססים על תסיסת סוכרים שונים (Pang et al., 2011b; Pang et al., 2011a). אולם מבחנים אלו לא היו לגמרי אמינים לזיהוי חיידקי חומצת חלב כיוון שהחיידקים הנבדקים יכלו לאבד את הפלסמידים המקודדים לתכונות המאפשרות תסיסת סוכרים שונים (Huang et al., 2011). השיטות הנ"ל המבוססות על המורפולוגיה, פיסיוולוגיה ותכונות פנוטיפיות של חיידקי חומצת חלב דורשות עבודה רבה שגוזלת זמן רב; שיטות אלה אינן מצליחות להבחין בין תרביות חיידקי חומצת חלב שמוספות למספוא המוחמץ לבין האוכלוסיה המיקרוביאלית האפיפיטית הטבעית. לפיכך, נוצר צורך לשלב שיטות מולקולאריות אשר התבססו על הגנוטיפ של חיידקי חומצת חלב.

1.2.3. שיטות מולקולאריות לאיפיון וזיהוי חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ

במטרה למצוא שיטת עבודה יעילה ומהירה לזיהוי חיידקי חומצת חלב, נעשו ניסיונות להשתמש בגנוטיפ של חיידקי חומצת חלב, כלומר בשיטות מולקולאריות. השיטות לרוב כללו קודם כל הפקת DNA חיידקי ישירות מהתחמיץ או ממושבות שגדלו על מצעי מזון סלקטיביים. לאחר מכאן בחירת התחלים (פריימרים) לאזור ספציפי בגן המיועד להגברה, Polymerase Chain Reaction (PCR), והרצה בג'ל אלקטרופורזה שאפשרה להפריד לפי גודל מקטע מוגבר שהתקבל, ובכך להבדיל בין מיני חיידקי חומצת חלב. לחלופין או במקביל ניתן היה לאחר ההגברה לרצף את ה-DNA החיידקי המוגבר ולבדוק את זהותו בעזרת תוכנת BLAST לדוגמה, בהשוואה למאגרי המידע הקיימים (Muck, R.E. 2012). עם התפתחות השיטות המולקולאריות, ניתן היה להשתמש כמו כן ב-Real Time PCR אשר מאפשר לקבוע את המספר היחסי של אותו החיידק המזוהה ביחס לשאר אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב בתחמיצים. במחקרם של Stevenson et al. (2005) השתמשו ב-real time PCR להגברת האזור השמור בגן *recA* לצורך זיהוי ספציפי של מיני חיידקי חומצת חלב בתחמיצי אספסת ובתירס ועל מנת לכמת אותם ביחס לכלל אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב. כמו כן, במאמרם של Schmidt et al. (2008) השתמשו ב-real time PCR לזיהוי וכימות החיידק *L. buchneri* בתחמיצי תירס אולם בעזרת הגברת אזור הוריאבילי בגן 16S rDNA. דבר דומה נעשה במחקרם של Klocke et al. (2006) למעקב אחרי החיידק *L. plantarum* בתחמיצים של עשבי מספוא תוך זיהוי וכימות של חיידק זה ביחס לשאר אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב. חוץ משיטות האלו המיועדות לזיהוי ספציפי של חיידקי חומצת חלב ניתן להשתמש בשיטת ה-DGGE, המאפשרת לקבל את פרופיל של האוכלוסיה המיקרוביאלית במספוא המוחמץ. שיטה זו מבוססת על הפקה של כלל ה-DNA החיידקי מתחמיץ, והרצתו בג'ל אלקטרופורזה עם גרדיאנט ריכוזים כך שמקטעי ה-DNA המוגברים מופרדים לא רק לפי גודל המקטע אלא גם לפי תכולת ה-G-C ברצף המקטע. שיטה זו מאפשרת להבדיל יותר טוב במקרה ויש

שונות במקטעי ה-DNA ובכך לקבל פרופיל רחב יותר של האוכלוסיה המיקרוביאלית של המספוא המוחמץ. לאחר ההרצה בג'ל אלקטרופוריזה יש צורך לדגום מקטעים הרצויים לזיהוי, לרצף אותם ולבסוף לבדוק את זהותם בעזרת שימוש בתוכנת BLAST לדוגמה (Muck, R.E. 2012). יישום שיטת עבודה זאת עם DGGE ניתן היה לראות במחקרם של Parvin and Nishino (2009) בו השתמשו בשיטה זו על מנת לבחון השפעת טיפול עם *L. plantarum* ו-*L. brevis* על פרופיל אוכלוסיה המיקרוביאלית של המספוא העשבי המוחמץ. במחקרם של Li and Nishino (2011b) גם כן נעשה שימוש בשיטת ה-DGGE לבחינת שינויים באוכלוסיה המיקרוביאלית של תירס המוחמץ שטופל לפני כן עם החיידק *L. buchneri* והחיידק *L. rhamnosus*. רוב השיטות המולקולאריות שהוזכרו לעי"ל הינן מספקות לאיפיון ולזיהוי חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ אולם לכל שיטה חסרונות משלה (Muck, R.E. 2012). הבעייתיות בשיטות אלו נעוצה בכך שהפקת כלל ה-DNA החיידקי מתחמץ יכולה לכלול גם DNA מחיידקים שאינם פעילים בתחמיץ, כלומר מתים (Li and Nishino, 2011a; Parvin and Nishino, 2009; Schmidt et al., 2009; Klocke et al., 2006). אם המטרה הינה לדעת שחיידק שנוסף כתרבית אכן פעיל וגורם לשיפור תהליך ההחמצה, כלומר לעקוב אחרי הדומיננטיות שלו, חייבים לוודא שאכן הפקת ה-DNA מבוצעת ממושבות שגדלות על גבי מצעי מזון כי אז אכן הינם מייצגים את אוכלוסיה המיקרוביאלית הפעילה בתחמיץ. בנוסף לכך השיטות כוללות שלבי עבודה מרובים, הדורשים לא רק זמן עבודה מיותר אלא גם מכשור יקר ולפיכך עדיין נשאר הצורך להגיע לשיטת עבודה קלה, זולה ויעילה לזיהוי חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ. במחשבה זו נעשו ניסיונות על סמך מחקרם של Gory et al. (2001) ליצר זנים רקומביננטים של חיידקי *L. plantarum* המבטאים חלבון פלורוסנטי ירוק (GFP) ועמידות לאנטיביוטיקה אריתרומיצין. בדרך זו עם הוספת תרביות אלו למספוא לשיפור תהליך ההחמצה, ניתן יהיה לעקוב אחריהן במספוא המוחמץ, כלומר להבדיל בינן לאוכלוסיה האפיפיטית של חיידקי חומצת חלב, ולראות האם אכן תרביות המוספות משפרות את טיב ההחמצה. אולם ניסיונות אלו לא עלו בקנה מידה עם הצפיות כי לא נראה ביטוי של החלבון הירוק הזוהר והתוצאות הצביעו על עמידות לאנטיביוטיקה אריתרומיצין גם באוכלוסיה האפיפיטית של המספוא המוחמץ, ובספרות ניתן היה למצוא עדויות נוספות לעניין זה (Mathur and Singh, 2005; Thumu and Halami, 2012; Egervarn et al., 2009).

1.2.4 שיטת High Resolution Melt (HRM)

לאחרונה נעשה שימוש באנליזת HRM לזיהוי חיידקי חומצת חלב במוצרי מזון כמו חלב (Porcellato et al., 2012). גם ברפואה נעשו מספר ניסיונות לזיהוי חיידקים פתוגניים בעזרת שיטת אנליזה זאת (Cheng et al., 2006). אנליזת HRM מבוססת על כך שלאחר שדוגמאות ה-DNA הרצויות מוגברות במערכת Real Time PCR, מתחיל תהליך התכה שהוא מאופיין בכך, שככל שהטמ' עולה, ככה יותר גדילי ה-DNA המוגברים מופרדים ובזמן הזה מתקבלת דעיכה בפלורוסנציה (Porcellato et al., 2012). השיטה מבוססת על סמן פלורוסנטי כגון SYBR green שהפלורוסנציה שלו מתבטאת רק כאשר בסיסי ה-DNA קשורים בין הגדילים. מכיוון שבתהליך ההגברה חלה עליה במספר הבסיסים הקשורים הרי שזו תלווה גם בעליה בפלורוסנציה. מערכת real time PCR בעלת יכולת לעקוב אחרי הפלורוסנציה הנוצרת כלומר לעקוב אחר ההגברה, ואילו בזמן תהליך ההתכה הגדילים מופרדים והפלורוסנציה פוחתת, כאשר מערכת real time PCR עוקבת גם אחר הדעיכה זאת.

הייחוד באנליזת HRM לעומת תהליך התכה רגיל בכך שהיא מאפשרת רזולוציה טובה יותר כי היא רגישה לשינויי פלורסנציה מזעריים, עד כדי בסיס אחד שמתנתק ומאבד מהזוהר שלו, והמערכת real time PCR יכולה לעקוב אחרי זה (Porcellato et al., 2012). לפיכך לאנליזת HRM יש יכולת זיהוי מוגברת, כמו היכולת לזהות שינויים בבסיס אחד בין רצפים דומים במיוחד, כגון זיהוי מוטציה של אותו גן המבוטא בבסיס אחד או זיהוי זני חיידקים שונים מאותו המין שבהם השינויים ברצפים מבוטאים במספר בסיסים זעיר. חוץ מיכולת הזיהוי המוגברת, שיטה זאת קלה לישום, חוסכת אמצעים וזמן עבודה ונותנת תוצאות בזמן מאוד קצר. כמו כן מונעת לרוב את הצורך בריצוף כל עוד דוגמאות ה-DNA הנבדקות נכללות בפרופיל שנוצר מדוגמאות DNA מוכרות (Cai et al., 2013 ; Porcellato et al., 2012).

1.3. חשיבות המחקר

המחקר נועד לפיתוח שיטה מולקולארית למעקב אחרי הדינמיקה של חיידקי חומצת חלב המתרחשת בזמן תהליך ההחמצה. פיתוח השיטה יאפשר זיהוי חיידקים בתחמיץ ובכך לייחס את הפרופיל המיקרוביאלי לאיכות ההחמצה, ובדיעבד יוכל להוכיח שהתרביות המוספות מייעלות את תהליך ההחמצה.

1.4. מטרת המחקר

לפתח שיטה מולקולארית שתאפשר מעקב אחר הדינמיקה של אוכלוסיות חיידקי חומצת חלב בשלבים השונים של החמצת מספוא, ואשר תוכל להבדיל בין תרביות מוספות של חיידקי חומצת חלב לבין אוכלוסיית חיידקים האפיפיטיים שנמצאים באופן טבעי במספוא המוחמץ.

1.5. אבני הדרך של המחקר

א. שימוש בזנים רקומביננטים שמכילים פלסמיד המקודד לגן המבטא עמידות לאנטיביוטיקה אריתרומיצין וגן שמבטא GFP (Green Fluorescent Protein) כדי להבחין בין תרביות המוספות לאוכלוסיית חיידקים האפיפיטית שנמצאת באופן טבעי במספוא המוחמץ. זנים של החיידק *L. plantarum* שהתקבלו מצרפת והיו אמורים להכיל את הפלסמיד, לא ביטאו בכלל את הגן ל GFP. בנוסף התברר שהרבה חיידקי חומצת חלב אפיפיטים עמידים לאריתרומיצין ולכן השימוש בזנים הרקומביננטים הנ"ל הופסק.

ב. לאחרונה פורסמו מאמרים המתארים שיטת אנליזת high-resolution melt (HRM) להבחנה בין חיידקי חומצת חלב במוצרי מזון שונים. שיטה זאת מיושמת לאחר הגברת מקטע DNA מסויים דרך real time PCR בעזרת פריימרים ספציפיים לאזור הוריאבילי ל 16S rDNA, ומצליחה להבחין בין חיידקי חומצת חלב שונים. לכן הוחלט לפתח שיטה המבוססת על אנליזת HRM למטרות הבחנה בין תרביות המוספות לאוכלוסיית חיידקים האפיפיטית שנמצאת באופן טבעי במספוא המוחמץ.

2. חומרים ושיטות

2.1. חומרים

טבלה 1- תרביות חיידקים

	Bacterial Culture	Source
<i>a</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 14917	Monique Zagorec Lab., France
<i>b</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	Monique Zagorec Lab., France
<i>c</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i> MTD1	Ecosyl, Stokesley, UK
<i>d</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Ecosyl, Stokesley, UK
<i>e</i>	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Agri king, Pulton, IL, USA
<i>f</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	Agri king, Pulton, IL, USA
<i>g</i>	<i>Enterococcus faecium</i> C	Agri king, Pulton, IL, USA
<i>h</i>	<i>Enterococcus faecium</i> Q	Agri king, Pulton, IL, USA
<i>i</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i>	Biotal, USA
<i>j</i>	<i>Lactobacillus buchneri</i> (Sila-Bac)	Pioneer, Germany

טבלה 2- התחלים (פריימרים) ששימשו להגברת אזור וריאבילי בגן 16S rDNA

רצף הנוקלאוטידים	פריימר
5'-AGCAGTAGGGAATCTTCCA-3'	LAC1 (F)
5'- ATTCACCGCTACACATG-3'	LAC2 (R)
5'-AGCAGTAGGGAATCTTCGG-3'	LAC3 (F)
5'-AGGCAGCAGTAGGGAATCTTC-3'	LAC4 (F)

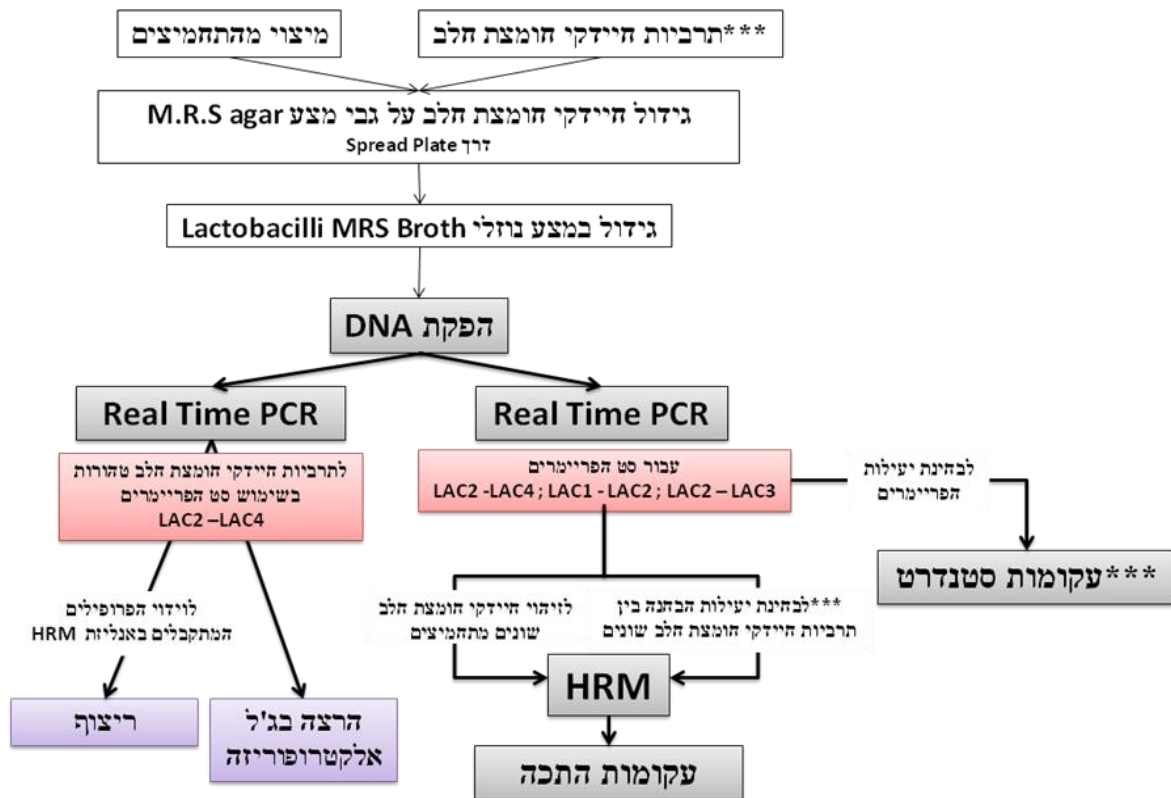
טבלה 3- מצעי גידול

סוג מצע	חברה	עיר	מדינה
Rogosa Agar	Oxoid LTD	Basingstoke, Hampshire	England
M.R.S Agar	Oxoid LTD	Basingstoke, Hampshire	England
Lactobacilli MRS Broth	Difco, Sparks	MD	USA

טבלה 4- חומרים שונים

חומר	חברה	עיר	מדינה
Erythromycin	Sigma Aldrich	St.Louis, MO	USA
HCl 1N	Solufix	Rehovot	Israel
Valeric Acid	Sigma Aldrich	St.Louis, MO	USA
GenElute TM Bacterial Genomic DNA Kit	Sigma-Aldrich Biotechnology	St. Louis, OH	USA
2x PCR Master mix Solution (<i>i-StarTaq</i> TM)	Intron biotechnology	Seongnam-Si	Korea
Ultra pure water -PCR Grade	Fisher Biotec	Wembley, WA	Australia
SYBR Safe DNA gel stain	Invitrogen-Molecular probes	Eugene, Oregon	USA
Agarose ultra pure -electrophoresis grade	Life Technologies	Paisley	Scotland
TBE Buffer	Tris- ultra pure	Bio LAB TLD	Jerusalem
	Boric Acid	Merck KGaA	Darmstadt
	EDTA	BDH laboratory supplies	Poole, Dorset
6X DNA loading Dye	Thermo Scientific	EU	Lithuania
Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder	Thermo Scientific	EU	Lithuania
Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX	Life Technologies	Grand Island, NY	USA

2.2. שיטות (תיאור הניסויים)



איור 1. תרשים זרימה המייצג את העבודה שנעשתה במהלך פיתוח שיטת אנליזת HRM לזיהוי חיידקי חומצת חלב בתחמיצים. *** עקומות סטנדרט נעשו רק לתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב.

2.2.1. ניסויי החמצה

ניסוי I - החמצת חיטה בהבשלת דונג (סוף חודש אפריל 2013)

חיטה בשלב מילוי גרעין נקצרה משדה בבית דגן, קוצצה במקצת Wientersteiger, Ried, Austria לפיסות ירק באורך 2-5 ס"מ והוחמצה בצנצנות אטומות בנפח 1.5 ליטר (Weck, Wehr-Oflingen, Germany). לכל צנצנת הוכנסו בין 500 ל-600 גר' חומר בהידוק רב ליצירת תנאים אנארוביים. הטיפולם כללו 2 סוגי חיידקי חומצת חלב: החיידק *L. plantarum* MTD1 והחיידק *E. faecium* Q (טבלה 1 תרביות c,h), ותחמיצי ביקורת ללא תוספת חיידקים. למטרת הטיפול תרביות חיידקי חומצת חלב אלו הורחפו עם תמיסת סליין מעוקרת (מים מזוקקים עם מלח בישול – 0.85% NaCl) כך שנפח האילוח הותאם לכך שיהיה 10^6 חיידקים לגרם חיטה, ע"פ הריכוז המשוער של התרביות בתרחיף הנוזלי שאושר מאוחר יותר בספירה. תרחיף החיידקים רוסס על 10 ק"ג חיטה קצוצה שעורבבה היטב לפני מילוי הצנצנות. מכל טיפול הוכנו 12 צנצנות שאוחסנו בטמפרטורת החדר (25 מ"צ). בימים 1, 5, 16, ו-76 לאחר ההחמצה נדגמו 3 צנצנות מכל טיפול לבדיקות כימיות, מיקרוביולוגיות ומשם לעבודה בשיטות מולקולאריות.

ניסוי II - החמצת חיטה בהבשלת חלב (סוף חודש מרץ 2014)

ניסוי עם חיטה בהבשלת חלב נעשה כמתואר לעיל. אולם בנוסף לתחמיצי ביקורת שלא היו מטופלים, ו 2 טיפולים, האחד עם החיידק *L. plantarum* MTD1 והשני עם החיידק *E. faecium* Q (טבלה 1 תרבויות c,h), כמו כן נעשה טיפול משולב של שתי התרביות הנ"ל. מכל טיפול הוכנו 12 צנצנות. בימים 1, 6, 15, ו-38 לאחר ההחמצה נדגמו 3 צנצנות מכל טיפול לבדיקות כימיות, מיקרוביולוגיות ומשם לעבודה בשיטות מולקולאריות.

2.2.2. אנליזות לקביעת פרמטרים להחמצה

2.2.2.1. קביעת תכולת חומר יבש

תכולת החומר היבש נקבעה בירק המוצא (לפני ההחמצה) ובתחמיצים ממועד הדגימה האחרון, על ידי יבוש בתנור בטמפ' של 60 מ"צ למשך 48 שעות (AOAC, 1984).

2.2.2.2. בדיקות כימיות לקביעת חומציות, תוצרי תסיסה נדיפים וחומצה לקטית

דוגמאות מתחמיץ נמהלו ביחס 1:9 עם מים מזוקקים ועברו מיצוי בעזרת מכשיר סטומכר (BagMixer 400, Interscience, France) למשך 3 דקות. מכל מיצוי נלקח חלק למדידת חומציות על ידי המכשיר pH מטר (SevenEasy pH, Mettler Toledo GmbH, Switzerland) וחלק נוסף לסינון דרך נייר סינון (WhatmanTM No. 1, 185 mm, UK), לצורך בדיקת תוצרי תסיסה נדיפים וחומצת חלב:

◇ קביעת חומצות שומן נדיפות ואתנול: מהמיצוי נלקח 1 מ"ל עליו הוסף 2 טיפות 1N HCl, ו 20 מיקרוליטר Valeric Acid ששימשה כסטנדרט פנימי. לאחר מכאן תערובת זאת הועברה דרך פילטר (Minisart - 0.45µm - Syringe filter, hydrophilic - Hewlett Packard, Waldbrook, Germany) בקולונה מסוג FFAP סמיקפילרית (Hewlett Packard, Waldbrook, Germany) בטווח טמפרטורות של 40 עד 230 מ"צ (Weinberg et al., 2004).

◇ קביעת חומצה לקטית: קביעת רמת חומצת חלב (חומצה לקטית) נעשתה לפי השיטה הספקטרופוטומטרית של (Barker and Summerson, 1941).

2.2.3. קביעת מספר חיידקי חומצת חלב בתחמיצים

דוגמאות תחמיץ הורחפו בתמיסת סליין מעוקרת (מים מזוקקים עם מלח בישול - 0.85% NaCl) ביחס 1:9 ועברו מיצוי בעזרת מכשיר סטומכר (BagMixerst 400, Interscience, France) למשך 3 דקות. הדוגמאות מהמיצוי עברו סדרה של מיהולים עשורוניים עוקבים ונזרעו בשיטת Spread Plate במצע M.R.S Agar. כל הצלחות לאחר הזריעה הודגרו למשך 5 ימים ב 30 מ"צ לגידול המיקרואורגניזמים. לאחר הדגירה המושבות נספרו – לקבלת הערכים של יחידות יוצרות מושבות (CFU לגרם ח"י). לאחר מכן נעשה דיגום אקראי של מושבות מכל צלחת, למצע Lactobacilli MRS Broth לאינקובציה נוספת ב 37 מ"צ למשך הלילה בשביל הפקת DNA בהמשך. לחילופין נעשה שימוש ב-cell scraper (Biologix Plastics Co., USA) והוספת 10 מ"ל

Lactobacilli MRS Broth לדיגום כל המושבות שנספרו למבחנת קונוס בנפח 50 מ"ל (Greiner Bio-One, Frickenhausen, Germany) ולאחר מכן ערבוב ופיצול ל- 3 מבחנות אפנדורף בנפח של 1.5 מ"ל כל אחת (Axygen, CA,USA) לצורך הפקת DNA בהמשך.

2.2.4. ניתוח סטטיסטי

להצגת הנתונים הקשורים לכמות מיקרואורגניזמים נעשה שימוש בלוג CFU לגר' חומר יבש ואילו הנתונים הקשורים להרכב כימי של חומרים הועברו לגר"/ק"ג חומר יבש. לאחר מכאן הממוצע וסטיית התקן חושבו על בסיס של 3 חזרות בכל טיפול, בעזרת שימוש בתוכנת Microsoft Excel. ניתוח שונות ANOVA ומבחן תחום מרובה TUKEY נערכו בעזרת תכנת JMP 7.0 ומובהקות בין הטיפולים הוכרזה עבור $p < 0.05$.

2.2.5. גידול תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות

תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) הורחפו בתמיסת סליין מעוקרת (מים מזוקקים עם מלח בישול – 0.85% NaCl) ביחס 1:9 ועברו סדרה של מיהולים עשרוניים עוקבים. לאחר מכאן נזרעו בשיטת Spread Plate על גבי המצע M.R.S Agar והועברו לאינקובציה למשך 5 ימים ב 30 מ"צ לצורך גידול המיקרואורגניזמים. לאחר הגדילה נעשו ספירות של המושבות – לקבלת הערכים של יחידות יוצרים מושבות (CFU) ודיגום מכל צלחת מושבה להעברה למצע Lactobacilli MRS Broth לאינקובציה נוספת ב 37 מ"צ למשך הלילה למען הפקת DNA בהמשך.

2.2.6. הפקת DNA מתחמיצים ומתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות

הפקת DNA מחיידקי גרם חיוביים (מתחמיצים ומתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות) נעשו לפי פרוטוקול עבודה של GenElute™ Bacterial Genomic DNA Kit (Sigma-Aldrich Biotechnology, St. Louis, OH, USA). ברגע שה-DNA הופק, נבדק ריכוזו ורמת ניקיונו במכשיר Nano Drop 2000 UV-Vis Spectrophotometer (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA).

2.2.7. סינטיזה של התחלים (פריימרים) למקטע בגן 16S rDNA

הרצף לפריימרים LAC1, LAC2, LAC3 (טבלה 2) עבור אזור וריאבילי בסביבות V3 (באורך של 349bp) בגן 16S rDNA, ליצירת פרופיל לתרביות חיידקי חומצת החלב (טבלה 1 תרביות c,d,h,i), ובהמשך לבדיקת התאמת תוצרי real time PCR ממושבות מתחמיצים לפרופיל המתקבל, נלקחו מהמאמר Porcellato et al. 2012. הפריימרים סונטזו ע"י חברת Integrated DNA Technologies (IDT, Leuven, Belgium). הרצף לפריימר LAC4 (טבלה 2) עבור אזור הוריבילי V3 בגן המדובר לעיל, תוכנן בעזרת תוכנת Primer BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>) ורוצף גם על ידי חברת IDT הנ"ל.

2.2.8. עקומות סטנדרט לבחינת פעילות הפריימרים לגן 16S rDNA בשימוש Real Time PCR
 קודם כל נעשתה הכנה של דוגמאות ה DNA הרצויות בכך שכל דוגמה נמהלה ביחס של 1:1000, 1:100, 1:10, 1:10000 עם Ultra pure water - PCR Grade. לאחר מכאן, ללא תלות במקטע שהוגבר ובפריימרים, הוכנה התערובת לריאקציה בהתאם לכמות הבאריות הרצויות וכאשר עבור כל דוגמה נדרשו 2 באריות. התערובת עבור בארית בודדת כללה: 7.5 מיקרוליטר Platinum SYBR Green qPCR SuperMix-UDG with ROX, 0.375 מיקרוליטר פריימר forward, 0.375 מיקרוליטר פריימר reverse ו 1.75 מיקרוליטר Ultra pure water - PCR Grade. לאחר הכנת התערובת, עבור כל בארית בפלטה נוסף 5 מיקרוליטר DNA המהול או Ultra pure water - PCR Grade לתערובת שנוספה גם. הפלטה הוכנסה למכשיר Real Time PCR System *EcoTm* (Illumina, San Diego, CA, USA). תוכנית ההגברה נעשתה ל- 40 מחזורים וכללה *polymerase activation* בטמפ' של 95 מ"צ למשך 15 דקות, ו PCR Cycling (בהתחלה בטמפ' של 95 מ"צ למשך 10 שניות לאחר מכאן 58 מ"צ למשך 20 שניות ולבסוף 72 מ"צ למשך 20 שניות).

2.2.9. בחינת יכולת הבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות ב- Real Time PCR לגן 16S rDNA בשילוב אנליזת HRM

א. הגברת אזור היפר-וריאבילי בסביבות V3 בגן 16S rDNA (באורך של 349 bp)

בשימוש Real Time PCR

קודם כל דוגמאות ה DNA הרצויות הובאו לריכוז משותף של 25 ננוגרם למיקרוליטר ואז נמהלו ביחס 1:100 בשימוש Ultra pure water- PCR Grade. לאחר מכאן, ללא תלות במקטע שהוגבר ובפריימרים, הוכנה התערובת לריאקציה בהתאם לכמות הבאריות הרצויות וכאשר עבור כל דוגמה נדרשו 2 באריות. התערובת עבור בארית בודדת הוכנה כמתואר בסעיף 2.2.8. לאחר הכנת התערובת, עבור כל בארית בפלטה נוסף 5 מיקרוליטר DNA המהול או Ultra pure water - PCR Grade לתערובת שנוספה גם.

הפלטה הוכנסה למכשיר *EcoTm* Real Time PCR System (Illumina, San Diego, USA). תוכנית ההגברה נעשתה ל- 40 מחזורים וכללה *polymerase activation* בטמפ' של 95 מ"צ למשך 15 דקות, ו- PCR Cycling (בהתחלה בטמפ' של 95 מ"צ למשך 30 שניות לאחר מכאן 61 מ"צ למשך 30 שניות ו 72 מ"צ למשך דקה אחת).

ב. אנליזת HRM (High Resolution Melt)

במכשיר *EcoTm* Real Time PCR System קיימת אפשרות לקבל עקומת התכה של גדילי ה- DNA לאחר שהדוגמאות הוגברו, בתוכנית High Resolution Melt Curve (HRM) שכוללת 3 שלבים: שלב ראשון – 95 מ"צ למשך 15 שניות; שלב שני – 55 מ"צ למשך 15 שניות; שלב שלישי – 95 מ"צ למשך 15 שניות. בסוף ההתכה נוצרו עקומות שבכיוון הגבולות של עקומת ההתכה מצד השמאל ל 79.0-78.5 ומצד ימין 88.0-88.5 מ"צ ניתן להשוות ויזואלית בין העקומות ולראות אם יש הבדלים בין הפרופילים שנוצרו.

2.2.10. בחינת יכולת הבחנה בין זנים שונים של אותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות בשימוש

אנליזת HRM

לאחר גידול תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות הכוללות זנים שונים של אותם מינים (טבלה 1 תרביות c-j) כמתואר בסעיף 2.2.5, והפקת DNA ממושבות שגדלו כמתואר בסעיף 2.2.6, דוגמאות ה-DNA הנ"ל עברו הגברה בשימוש real time PCR ואנליזת HRM כמתואר בסעיף 2.2.9.

2.2.11. ריצוף ה-DNA שהופק מתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לוידוא השימוש באנליזת HRM

I. גידול תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) כמתואר בסעיף 2.2.5 והפקת DNA מתרביות אלו כמתואר בסעיף 2.2.6. דוגמאות DNA אלו עברו הגברה (real time PCR) כמתואר בסעיף 2.2.9 (א) אולם עם סט הפריימרים LAC2- LAC4 (טבלה 2).

II. דוגמאות ה-DNA עצמן (לפני ההגברה) ותוצרי ה-real time PCR הובאו להרצה בג'ל אלקטרופורזה כמתואר בסעיף הבא (2.2.12) לבחינת תוצרי ה-PCR ואימות גודל המקטעים המתקבלים.

III. תוצרי ה-real time PCR יחד עם הפריימר LAC4 והפריימר LAC2 (טבלה 2) בריכוז $5 \text{ pmol}/\mu\text{l}$ כל אחד, נשלחו לריצוף בחברת Hylabs (Hy Laboratories Ltd., Rehovot, Israel).

IV. לאחר קבלת הרצפים המוגברים נעשה זיהוי שלהם בתוכנת BLAST והשוואה ביניהם לבחינת כמות הבסיסים השונים ביניהם. בנוסף לכך נבדקה טמפ' התכה של הרצפים הנ"ל בשימוש התוכנה

<http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html> ובכך אישור או הפרכה לטמפ' התכה

והפרופיל שמתקבל באנליזת HRM.

2.2.12. הרצה בג'ל אלקטרופורזה

דוגמאות DNA המוגברות כולל דוגמאות הביקורת לאחר ההגברה, ומקטעי DNA עצמם עברו צביעה עם 6X DNA loading Dye ביחס 1:5 לצורך הרצם בג'ל אלקטרופורזה. הג'ל הוכן על ידי ערבוב והמסה של Agarose ultra pure-electrophoresis grade בתוך בופר 1X TBE (LAB FAQs) לקבלת 1% ג'ל אגרוז. אחרי שהומס האגרוז בבופר, והתמיסה התקררה, נוסף ה-SYBR Safe DNA gel stain ביחס 1:25. לאחר מכאן התמיסה הועברה לפלטת ההרצה עם הבאריות, ליצירת התבנית. ברגע שהתבנית נקרשה, לכל בארית נוספה הדוגמה הצבועה והמרקר- Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder עם הצבען- 6X DNA loading Dye בכמות המותאמת לגודל הבארית. ההרצה היתה במשך 45 דקות במתח של 140V.

2.2.13. בחינת יכולת הבחנה באנליזת HRM בין תרביות חיידקי חומצת חלב מעורבות

בשלב ראשון תרביות חיידקי חומצת חלב (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) גודלו כמתואר בסעיף 2.2.5. לאחר הגידול נעשו ספירות של המושבות – לקבלת הערכים של יחידות יוצרות מושבות (CFU) ודיגום מכל צלחת 2 מושבות, אחת שמיועדת להכנת התערובת (תערובת שתכלול 2 מושבות מ-2 צלחות שונות המייצגות חיידק שונה) ומושבה שניה לגידול עצמי, למצע Lactobacilli MRS Broth לאינקובציה נוספת ב 37 מ"צ למשך הלילה בשביל הפקת DNA כמתואר בסעיף 2.2.6. לאחר ההפקה דוגמאות ה-DNA מתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות ודוגמאות

DNA מערבוב מושבות של תרביות חיידקי חומצת חלב בזמן הגידול, עברו הגברה בשימוש Real Time PCR ואנליזת HRM כמתואר בסעיף 2.2.9. בנוסף לכך, נעשה ערבוב של דוגמאות ה-DNA מתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) וכמו כן תערובות אלו עברו הגברה בשימוש Real Time PCR ואנליזת HRM כמתואר בסעיף 2.2.9.

2.2.14. זיהוי חיידקי חומצת חלב בתחמיצים באמצעות אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR

חיידקי חומצת חלב מוצו מתחמיצים במועדים שונים וגודלו על מצע M.R.S. agar כמתואר בסעיף 2.2.3. לאחר מכאן נעשה דיגום מושבות כמתואר בסעיף 2.2.3 והפקת DNA כמתואר בסעיף 2.2.6. דוגמאות DNA אלו מהתחמיצים ודוגמאות DNA מתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) עברו הגברה ב Real Time PCR ולאחר מכאן אנליזת HRM כמתואר בסעיף 2.2.9. הפרופיל של כל אחת מהדוגמאות מהתחמיץ שהתקבל באנליזת HRM, הושווה לפרופיל עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב הטהורות לקבלת התאמה או חוסר התאמה לפרופיל הנוצר.

2.2.15. עיבוד תוצאות איכותי לקבלת טבלאות מסכמות לגבי התאמת דוגמאות מתחמיצים לפרופילי עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות

בניסויי החמצה עבור כל טיפול התקבלו 3 חזרות לכל מועד דיגום. לכל חזרה התקבל פרופיל עקומת התכה. פרופיל זה נבדק להתאמה או חוסר התאמה באופן ויזואלי לפרופילי עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) ובאותו הזמן הושוותה טמפ' התכה שהתקבלה מפרופיל של דוגמאת התחמיץ לטמפ' התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב הטהורות. כאשר היתה התאמה הן מבחינת הפרופיל והן מבחינת הטמפ' התכה אזי ניתן הסימון (+) ואם היה חוסר התאמה ניתן הסימון (-). בנוסף לכך במקרה והתקבלו פרופילים שאינם תואמים לאף אחד מפרופילי עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב הטהורות - פרופילים אלו נקראו בשם Unidentified (UN). הטבלאות המסכמות מניסויי החמצה השני (II) כוללות תוצאות לגבי דיגום של כל המושבות וכן לגבי דיגום מושבות באקראי. באופן זה מתקבל מידע נוסף לגבי זהות חיידקי חומצת חלב הנוספים הנמצאים באותן הצלחות.

2.2.16. שלבי הפיתוח של אנליזת HRM להתאמה לתחמיצים

שלבי הפיתוח של אנליזת HRM להתאמה לתחמיצים



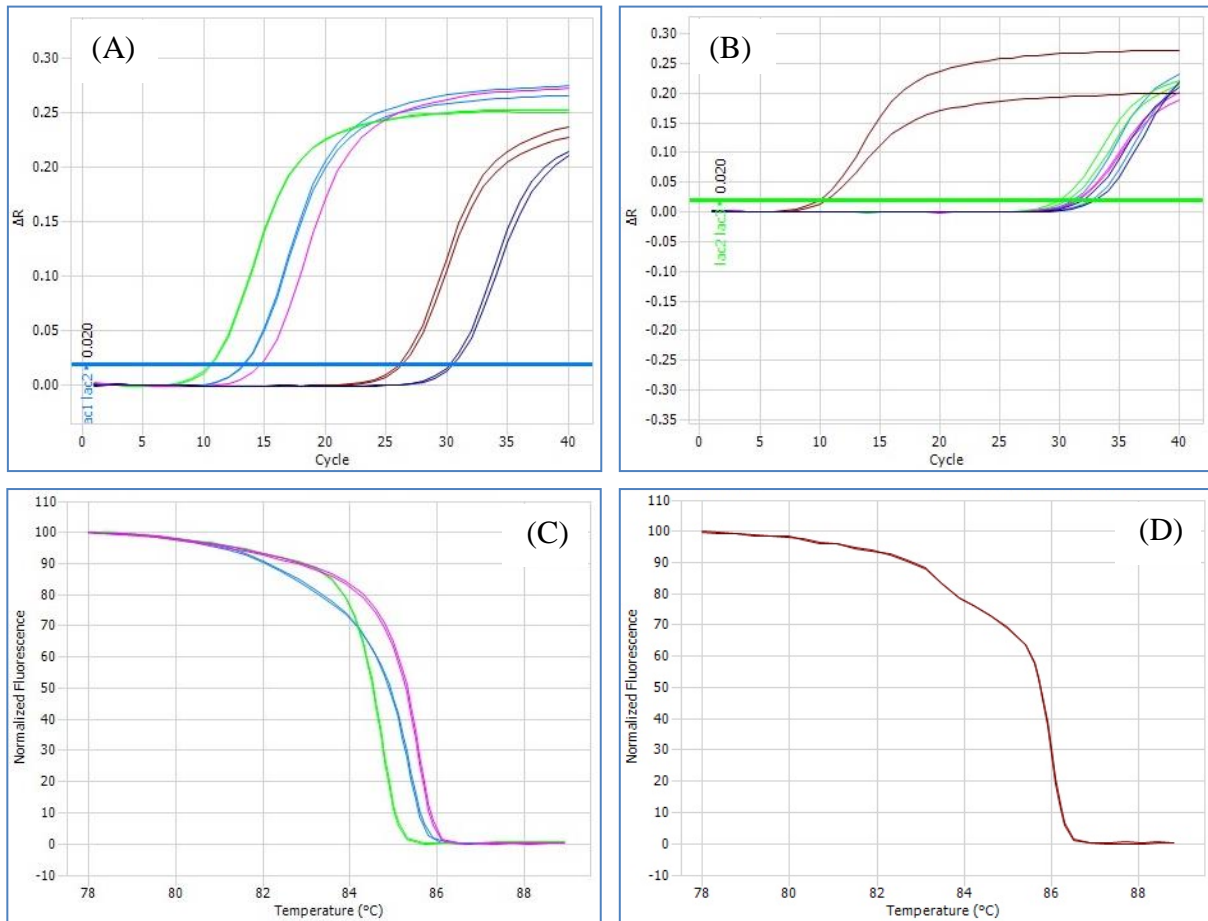
3. תוצאות

3.1. תוצאות פיתוח של שיטת מעקב אחר דינמיקה של חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ בעזרת אנליזת HRM ו Real Time PCR (לפי שלבי הפיתוח כפי שהוצגו בתרשים מסעיף 2.2.16)

3.1.1. תוצאות אנליזת HRM להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים, בשימוש סט הפריימרים LAC1-LAC2; LAC2-LAC3

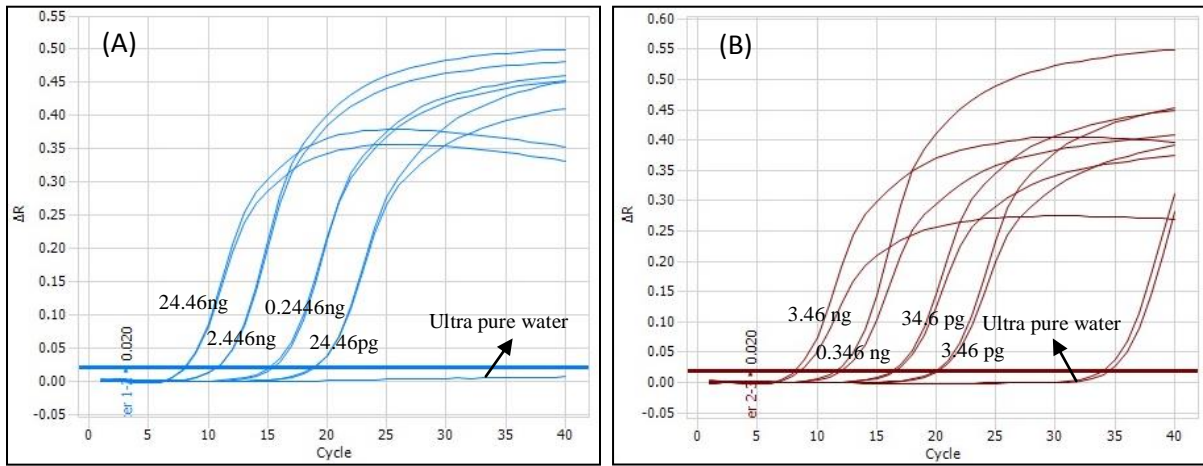
איור 2 מציג את התוצאות לבחינת ספציפיות התחלים (LAC1- LAC2 ; LAC2 -LAC3) להבחנה בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב. איור זה מציג עקומות הגברה ועקומות התכה עבור סט הפריימרים LAC1- LAC2 (חלון A,C) ועקומות כנ"ל עבור סט הפריימרים LAC2- LAC3 (חלון B,D) לתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב שונים. ניתן לראות בפאנל A, שעם שימוש בסט הפריימרים LAC1- LAC2, הגברת DNA של *E. faecium* Q בהשוואה לשאר דוגמאות ה-DNA דורשת יותר מחזורי הגברה (הגרף החום), והמצב

בדיוק הפוך בפאנל B (שימוש בפריימרים LAC2-LAC3) שבו *E. faecium* Q מוגבר בפחות מחזורים ואילו שאר הדוגמאות מוגברות אחרי מחזור 30 כמו המים (ביקורת). כל זה נותן אינדיקציה שאכן סט התחלים LAC1-LAC2 מותאם לחיידקי חומצת חלב מסוג *Lactobacilli* ו *Pediococci* וסט התחלים LAC2-LAC3 מותאם לחיידקי חומצת חלב מסוג *Enterococci*. בנוסף, ניתן לראות בחלון C וחלון D נוצרו פרופילים שונים בעקומות התכה של תרביות הטהורות של חיידקי חומצת חלב וזה נותן את היכולת היוזואלית להבדיל בין העקומות ההתכה.



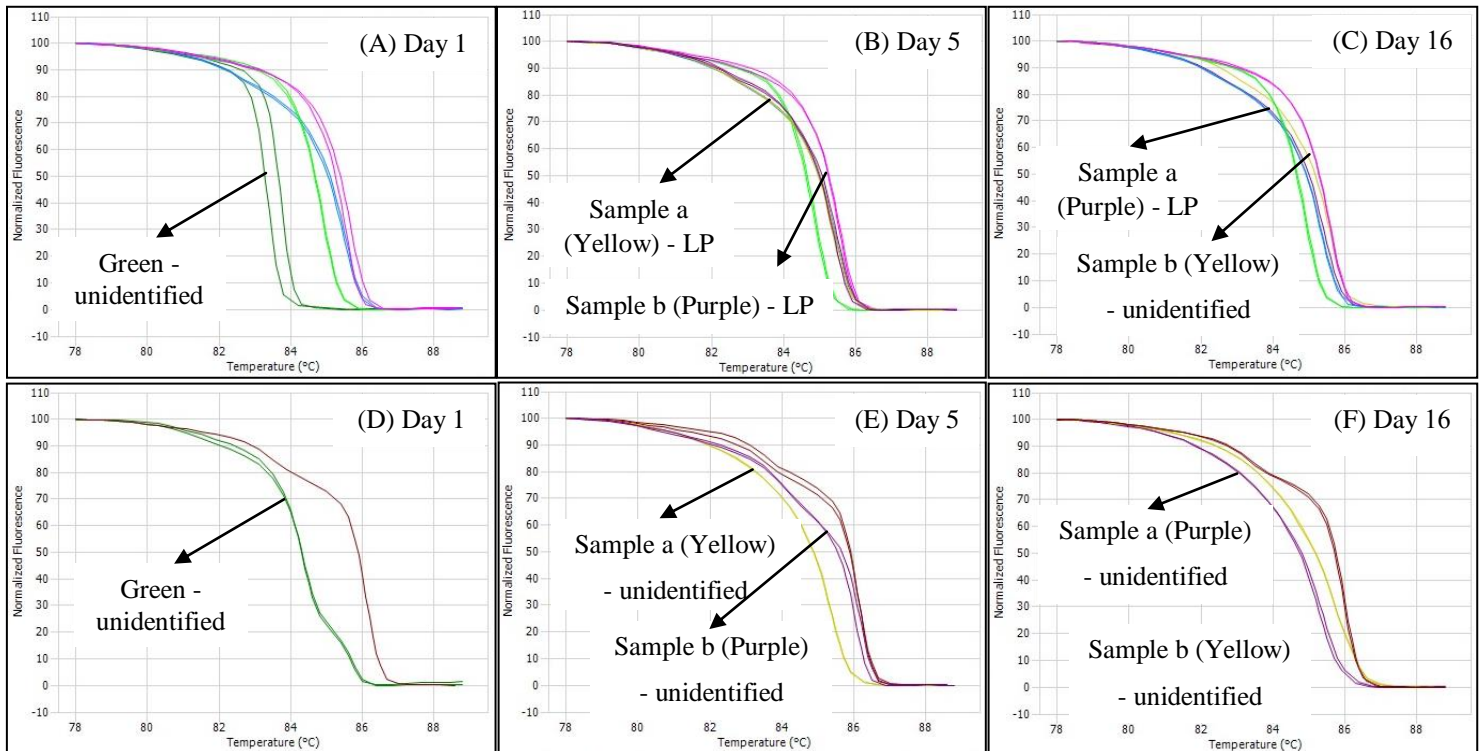
איור 2. עקומות הגברה (A-B) והתכה (C-D) של 4 חיידקי חומצת חלב שונים המשמשים כתרביות מוספות להחמצה, כדלקמן: *L. plantarum* MTD1 – כחול בהיר ; *L. buchneri* – ורוד ; *P. pentosaceus* – ירוק בהיר ; *E. faecium* Q – חום. מים (ביקורת) - כחול.
 חלונות A,C - עקומות עבור סט הפריימרים LAC1- LAC2
 חלונות B,D - עקומות עבור סט הפריימרים LAC2- LAC3

איור 3 מציג את יעילות התחלים (פריימרים) להגברת אזור וריאבילי בגן *16S rDNA*. איור זה מתאר את עקומות הסטנדרט שנעשו לחיידק *L. plantarum* MTD1 (חלון A) ו *E. faecium* Q (חלון B) לבחינת יעילות סט הפריימרים LAC1- LAC2 ו LAC2- LAC3 להגברת אותן דוגמאות ה- DNA, בהתאמה. ניתן לראות שככל שדוגמאות ה-DNA יותר מהולות ככה לוקח יותר מחזורים להגביר אותם.



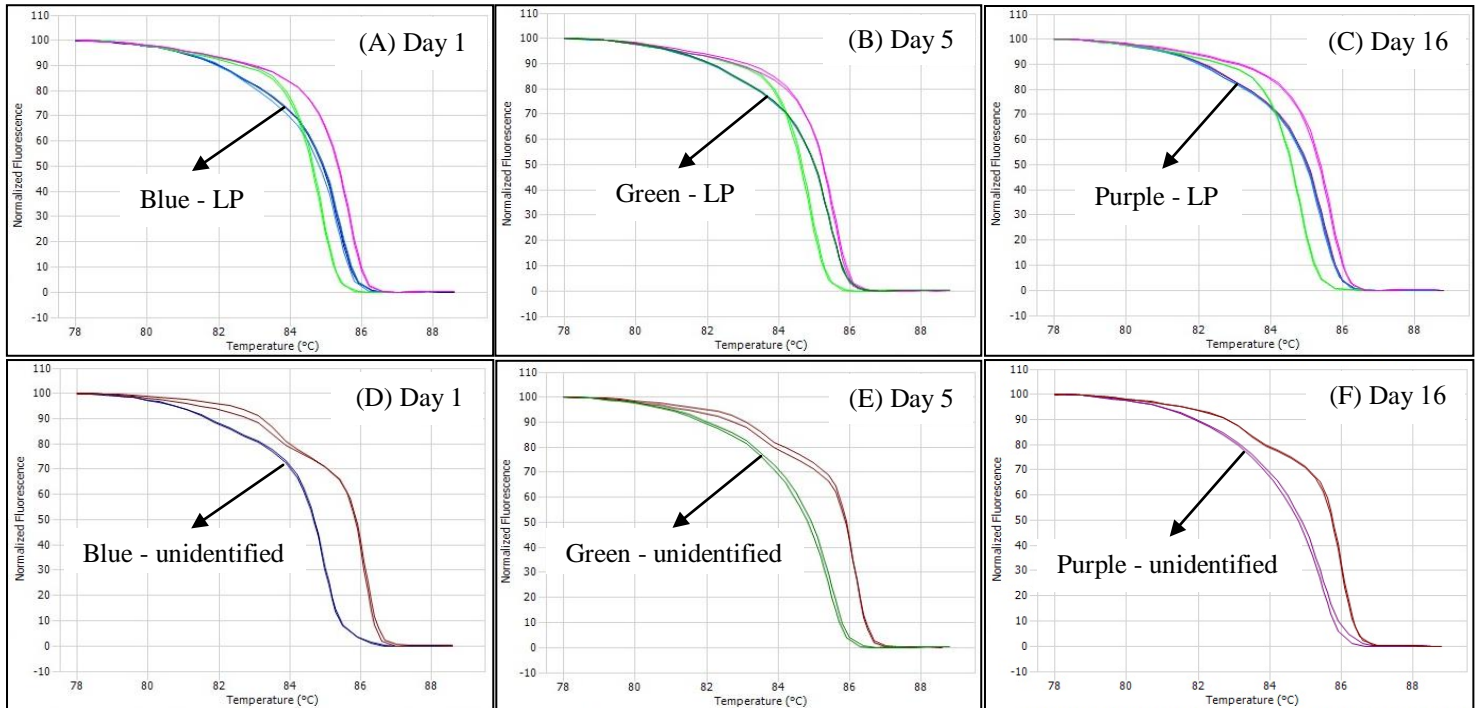
איור 3. עקומות הגברה של DNA העבר מיהולים עשורניים מהחידק *L. plantarum* MTD1 בשימוש סט התחלים LAC1- LAC2 (A) ומחידק *E. faecium* Q בשימוש סט התחלים LAC2 -LAC3 (B). השיפוע והיעילות נאמדו על 3.691, 86.62% ו 3.953, 79.04% עבור הפריימרים LAC1- LAC2 והפריימרים LAC2 -LAC3, בהתאמה.

איורים 4-6 מראים תוצאות מייצגות של אנליזת HRM עם Real Time PCR לבחינת דוגמאות DNA מתחמי חיטה בשלב דונג, בשימוש סט הפריימרים LAC1- LAC2 ו LAC2 - LAC3. באיור 4 ניתן להתרשם מהתוצאות המציגות תחמיץ חיטה שהוכן ללא תוספת תרביות. לאחר 5 ימים ניתן היה לשייך את הדוגמאות לחידק *L. plantarum* בטיפול זה, לאור העובדה שהיתה התאמה לפרופיל החידק *L. plantarum* (חלונות B,C) ולא נמצאה התאמה ויזואלית לחידק *E. faecium* (חלונות E,F).



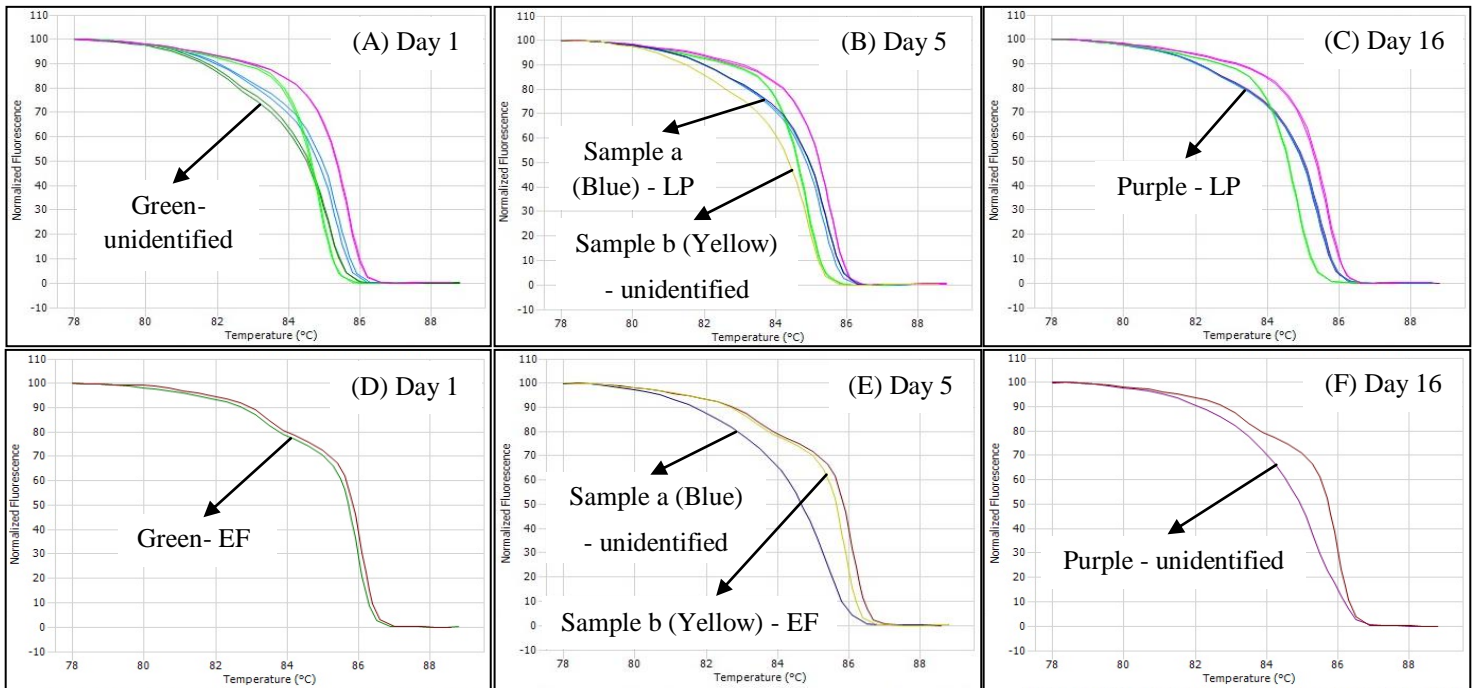
איור 4. עקומות התכה של דוגמאות שנדגמו לאורך ההחמצה של חיטה לא מטופלת, בהשוואה לפרופיל עקומות התכה של 4 תרביות הייחוס, כדלקמן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר), *E. faecium* Q (חום). (A-C) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC1 -LAC2. (D-F) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC2 -LAC3. הדוגמאות הינן: יום 1 (ירוק); יום 5 דוגמה (a) – צהוב, דוגמה (b) – סגול; יום 16 דוגמה (a) – סגול, דוגמה (b) – צהוב.

באיור 5 התוצאות מציגות תחמיץ חיטה מטופל עם *L. plantarum* MTD1. בטיפול זה כבר אחרי יום ניתן לראות שייכות הדוגמאות לחיידק *L. plantarum* (חלונות A-C), וחוסר התאמה לפרופיל של החיידק *E. faecium* (חלונות D-F).



איור 5. עקומות התכה של דוגמאות הנדגמו לאורך ההחמצה של חיטה מטופלת עם התרבית *L. plantarum* MTD1, בהשוואה לפרופיל עקומות התכה של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב, כדלקמן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). (A-C) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC1-LAC2, (D-F) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC2-LAC3. הדוגמאות הינן: יום 1 (כחול); יום 5 (ירוק); יום 16 (סגול).

באיור 6 התוצאות מציגות תחמיץ חיטה מטופל עם *E. faecium* Q. באיור זה ניתן להתרשם מהדינמיקה באוכלוסיית חיידקי חומצת חלב. לאחר יום החמצה, התקבלה התאמה של הדוגמאות לפרופיל של החיידק *E. faecium* (חלון D) אולם עם התקדמות ימי החמצה, לאחר 5 ימים ניתן היה לשים לב גם להתאמה לפרופיל של החיידק *L. plantarum* (חלון B), וביום 16 התאמה לפרופיל של החיידק זה בלבד (חלון C).

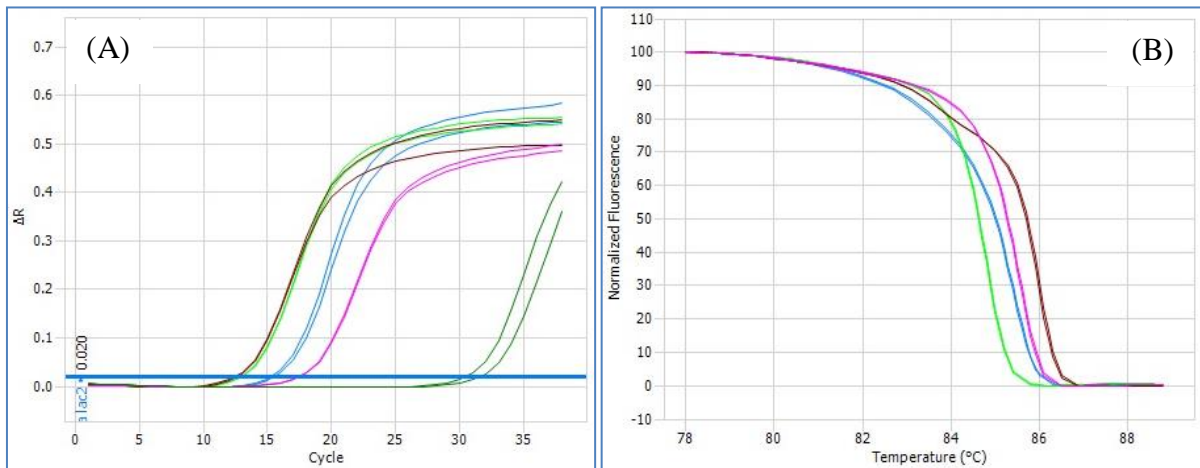


איור 6. עקומות התכה של דוגמאות הנדגמו לאורך ההחמצה של חיטה מטופלת עם התרבית *E. faecium* Q, בהשוואה לפרופיל עקומות התכה של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב, כדלקמן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). (A-C) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC1-LAC2. (D-F) דוגמאות DNA שהוגברו בשימוש הפריימרים LAC2-LAC3. הדוגמאות הינן: יום 1 (ירוק); יום 5 דוגמה a (כחול), דוגמה b (צהוב); יום 16 (סגול).

התוצאות הנ"ל (איורים 2-6) הראו שהיה צורך להשתמש בשני זוגות של התחלים כדי להבחין בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב שמתפתחים במהלך ההחמצה. כדי שאפשר יהיה להבחין בין כל סוגי ומיני חיידקים האלו עם זוג בודד של התחלים ניסינו שילוב שונה של התחלים (LAC2 – LAC4), וזאת לצורך ייעול השיטה.

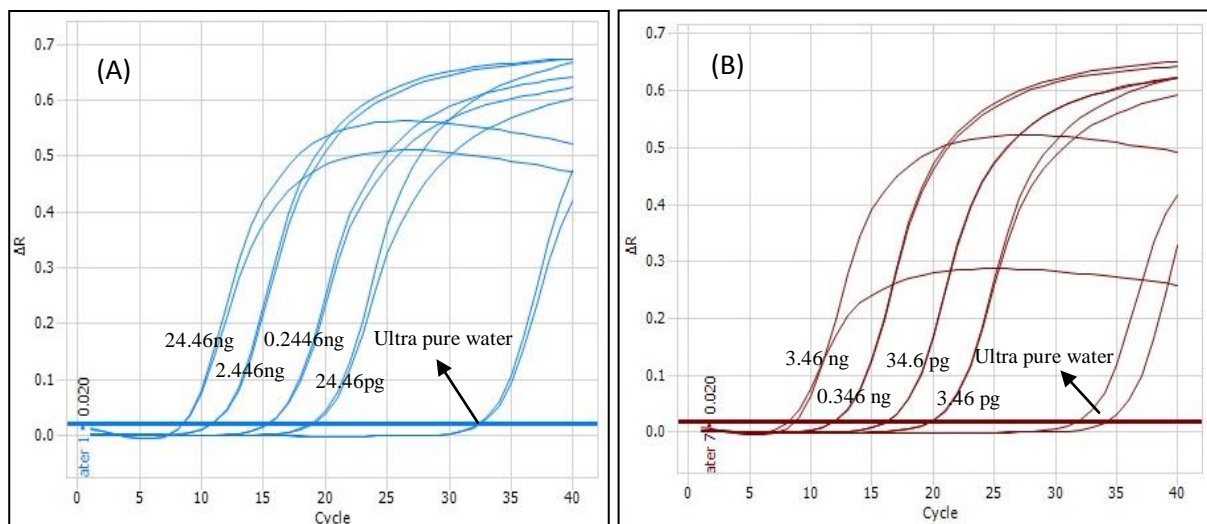
3.1.2 תוצאות אנליזת HRM להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים, בשימוש סט הפריימרים LAC2 – LAC4

איור 7 מציג את התוצאות לבחינת ספציפיות התחלים (LAC2 – LAC4) להבחנה בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב. באיור זה ניתן לראות חוץ מעקומות ההגברה של תרביות חיידקי חומצת חלב גם הגברה של מים במחזור הגברה מאוחר, מעבר ל- 30 מחזורים (חלון A). בעקומות התכה ניתן לראות שהתקבלו פרופילים שונים עבור כל אחד מהתרביות שנבדקו (חלון B).



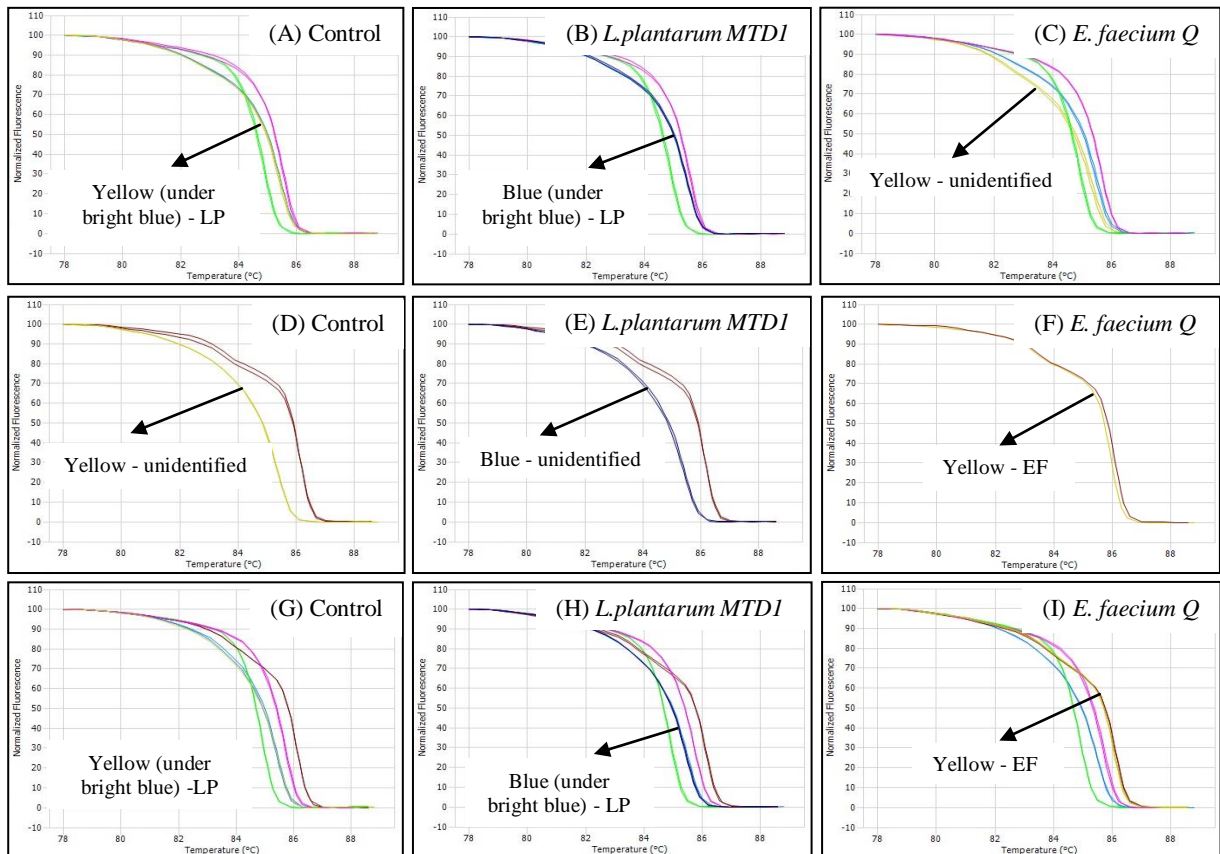
איור 7. עקומות הגברה (A) והתכה (B) של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לבדיקת ספציפיות התחלים LAC2- LAC4 להבחנה בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב אלו. התרביות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). מים כביקורת (ירוק).

איור 8 מציג את התוצאות לבחינת יעילות התחלים (פריימרים) להגברת אזור וריאבילי בגן 16S rDNA. איור זה מתאר את עקומות הסטנדרט שנעשו לחיידק *L. plantarum* MTD1 (חלון A) ולחיידק *E. faecium* Q (חלון B) לבחינת יעילות סט הפריימרים LAC2- LAC4 להגברת אותם דוגמאות ה-DNA. ניתן לראות שככל שדוגמאות ה-DNA יותר מהולות ככה לוקח יותר מחזורים להגביר אותם.



איור 8. עקומות הגברה של DNA העבר מיהולים עשורניים מהחיידק *L. plantarum* MTD1 (A) ומחיידק *E. faecium* Q (B) בשימוש סט התחלים LAC2-LAC4. השיפוע והיעילות נאמדו על 3.566, 90.73% ו-3.890, 80.74% עבור *L. plantarum* MTD1 (A) ו-*E. faecium* Q (B), בהתאמה.

איור 9 מציג את התוצאות לאימות שימוש בסט הפריימרים LAC2-LAC4 בהשוואה לסט פריימרים LAC1-LAC2 ו LAC2-LAC3 על דוגמאות מתחמיצי חיטה ממועדי דגימה שונים. באיור זה ניתן לראות שמתחמיץ הביקורת התקבלה התאמה לחיידק *L. plantarum* בשימוש סט הפריימרים LAC1-LAC2 (חלון A) ואותו הדבר בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC4 (חלון G). כמו כן ניתן לראות שבטיפול עם החיידק *L. plantarum* MTD1, התקבלה התאמה לחיידק *L. plantarum* בשימוש סט הפריימרים LAC1-LAC2 (חלון B) והן בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC4 (חלון H). בטיפול עם החיידק *E. faecium* Q, התקבלה התאמה לחיידק *E. faecium* בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC3 (חלון F) ואותו הדבר בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC4 (חלון I).



איור 9. אנליזת HRM לדוגמאות DNA מתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב ובהשוואה לדוגמאות שמוצו קודם לכן מתחמיץ ביקורת לא מטופל (A/D/G) ותחמיץ מטופל עם החיידק *L. plantarum* MTD1 (B/E/H) או עם החיידק *E. faecium* Q (C/F/I). התרביות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר);

L. buchneri (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום).

הדוגמאות מתחמיצים הינן: (A/D/G) – צהוב; (B/E/H) – כחול; (C/F/I) – צהוב.

(A-C) עקומות התכה המייצגות קודם לכן הגברת דוגמאות DNA בשימוש סט הפריימרים LAC1-LAC2.

(D-F) עקומות התכה המייצגות קודם לכן הגברת דוגמאות DNA בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC3.

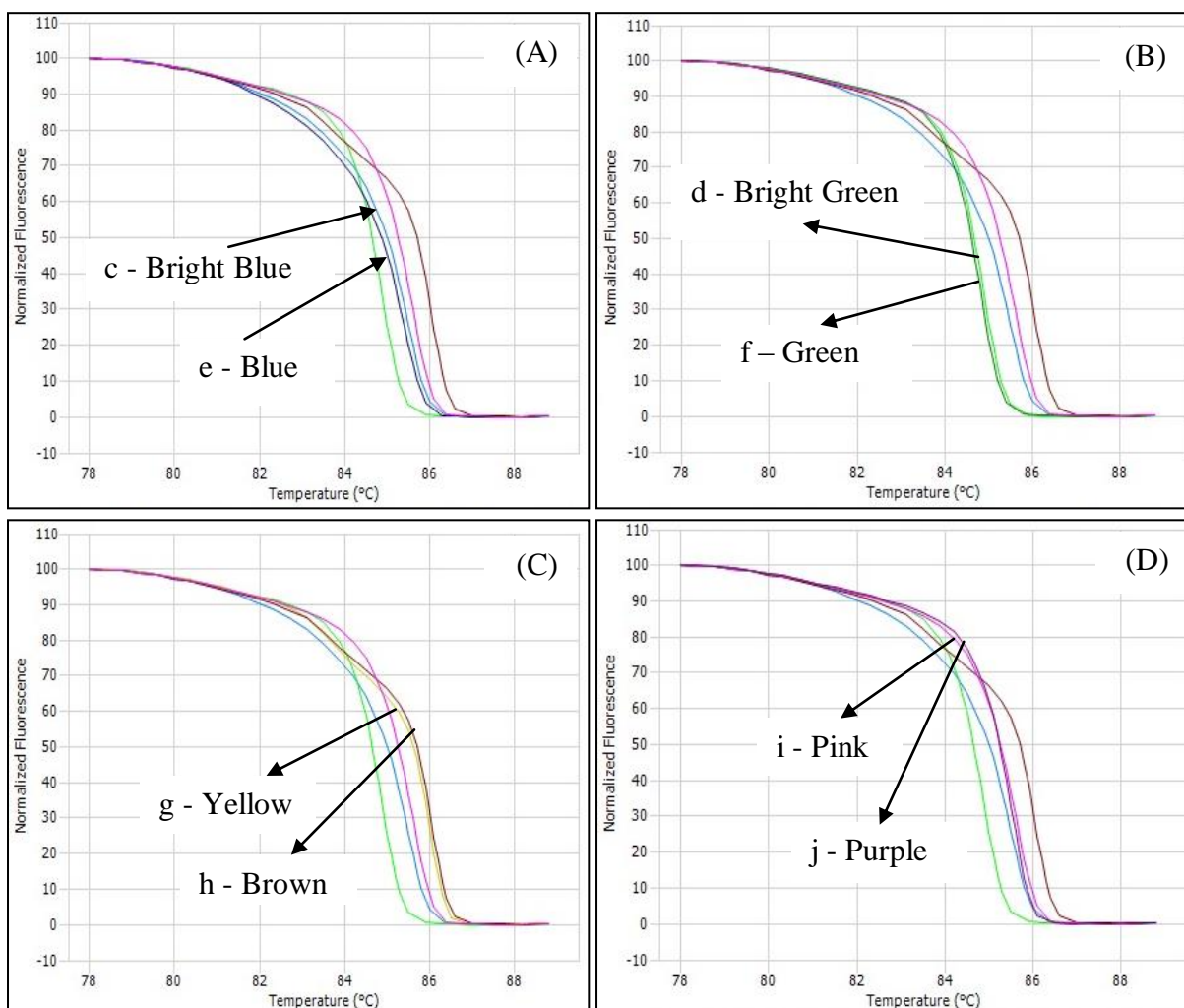
(G-I) עקומות התכה המייצגות קודם לכן הגברת דוגמאות DNA בשימוש סט הפריימרים LAC2-LAC4.

התוצאות לעיל (איורים 7-9) מאששות את אפשרות השימוש בזוג התחלים LAC2-LAC4 להבחנה בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב בתחמיצים ללא צורך בשני זוגות של התחלים.

בשלב הבא של הפיתוח השיטה בחנו את יכולת שיטת HRM עם התחלים הנ"ל (LAC2- LAC4) להבחין בין זנים שונים של אותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות.

3.1.3 תוצאות אנליזת HRM להבחנה בין זנים שונים של אותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות, בשימוש סט הפריימרים LAC2 -LAC4

איור 10 מתאר את התוצאות לבחינת אנליזת HRM בשימוש Real Time PCR לאבחנה בין זנים שונים של אותם מיני חיידקי חומצת חלב. באיור זה ניתן לראות באופן כללי שקיימת חפיפה בין פרופיל עקומות התכה של זנים שונים של אותו מין החיידק. בחלון A ניתן לראות את הקרבה הרבה בין עקומות התכה של החיידק *L. plantarum* MTD1 (c) לבין החיידק *L. plantarum* (e). אותו הדבר ניתן לראות בחלון C שבו עקומת התכה של החיידק *E. faecium* Q (h) מאוד קרובה וזהה לעקומת התכה של *E. faecium* C (g) ובחלון B שבו עקומת התכה של החיידק *P. pentosaceus* (d) צמודה וזהה לעקומת התכה של החיידק *P. pentosaceus* (f). בחלון D כמו כן אותו מצב הזהות בין פרופיל עקומות התכה של תת הזנים של החיידק מהמין *L. buchneri*.



איור 10. עקומות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לאבחנה בין זנים שונים של אותם מיני חיידקי

חומצת חלב. חלון A- הבחנה בין הזן c (כחול בהיר) לזן e (כחול) של החיידק ממין *L. plantarum*.

חלון B- הבחנה בין זן d (ירוק בהיר) לזן f (ירוק) של החיידק ממין *P. pentosaceus*.

חלון C- הבחנה בין זן g (צהוב) לזן h (חום) של החיידק ממין *E. faecium*.

חלון D- הבחנה בין זן i (ורוד) לזן j (סגול) של החיידק ממין *L. buchneri*.

תוצאות אלה (איור 10) מצביעות על כך שאנליזת HRM בשימוש Real Time PCR עם סט התחלים LAC2-LAC4 לא יכולה להבחין בצורה חד משמעית בין זנים שונים מאותם מיני תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות.

התוצאות הבאות מציגות ניתוח רצפי 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות למען קביעה האם יש הבדלים ב-DNA בין הזנים המוזכרים לעיל וכמו כן לודא את את אמינות אנליזת HRM ביחס לעקומות התכה השונות המתקבלות מתרביות טהורות של סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב.

3.1.4. תוצאות משימוש ברצפים של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לאימות אנליזת HRM להבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות

טבלה 5 מציגה את ההשוואה שנעשתה בין הרצף הידוע של 4 חיידקי חומצת חלב לרצפים ממאגר הנתונים השייכים לאותם חיידקי חומצת חלב רק מזן אחר. (להסתכלות על רצפי הזנים שנלקחו ממאגר הנתונים ועל ההשוואה בין הזנים נא לראות נספח ה'). בטבלה זו ניתן לראות שיש מאה אחוז התאמה כמעט בכל המינים בין הזנים שלהם 99% התאמה בין הזנים של החיידק *L. buchneri* וזה רק בעקבות כך שחסרה זהות של בסיס בודד ברצף כמתואר בנספח ה'.

טבלה 5. השוואה בין זנים שונים מאותו מין חיידק חומצת חלב

Lactic Acid Bacteria	Strain A	Strain B	Identification (%)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	MTD1	UCMA 3037	100
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	-----	0905CN2	100
<i>Enterococcus faecium</i>	Q	FS088	100
<i>Lactobacillus buchneri</i>	-----	OPY-2	99

טבלה 6 מציגה השוואת טמפרטורות התכה של DNA מתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות c,d,h,i) בעזרת שיטות אנליזה שונות. בטבלה זו ניתן לראות באופן כללי שישנו דימיון חלקי בין טמפ' התכה שמתקבלת משימוש בשיטת HRM לבין טמפ' התכה שניתן לחשב מידיעת הרצף של כל תרבית ותרבית של חיידקי חומצת חלב. במקרה של החיידק *P. pentosaceus* ניתן לראות חוסר התאמה מוחלט בטמפ' התכה כאשר משוואים בין שתי שיטות האנליזה, לעומת זאת במקרה של החיידק *L. plantarum* MTD1 כן ניתן לראות התאמה בטמפ' התכה כאשר משוואים בין שיטות אנליזה השונות.

טבלה 6. טמפרטורות התכה של תרביות חיידקי חומצת חלב בשימוש דרכי אנליזה שונות:

שיטת HRM מול חישוב טמפ' התכה מהרצף (Oligonucleotide Properties Calculator)

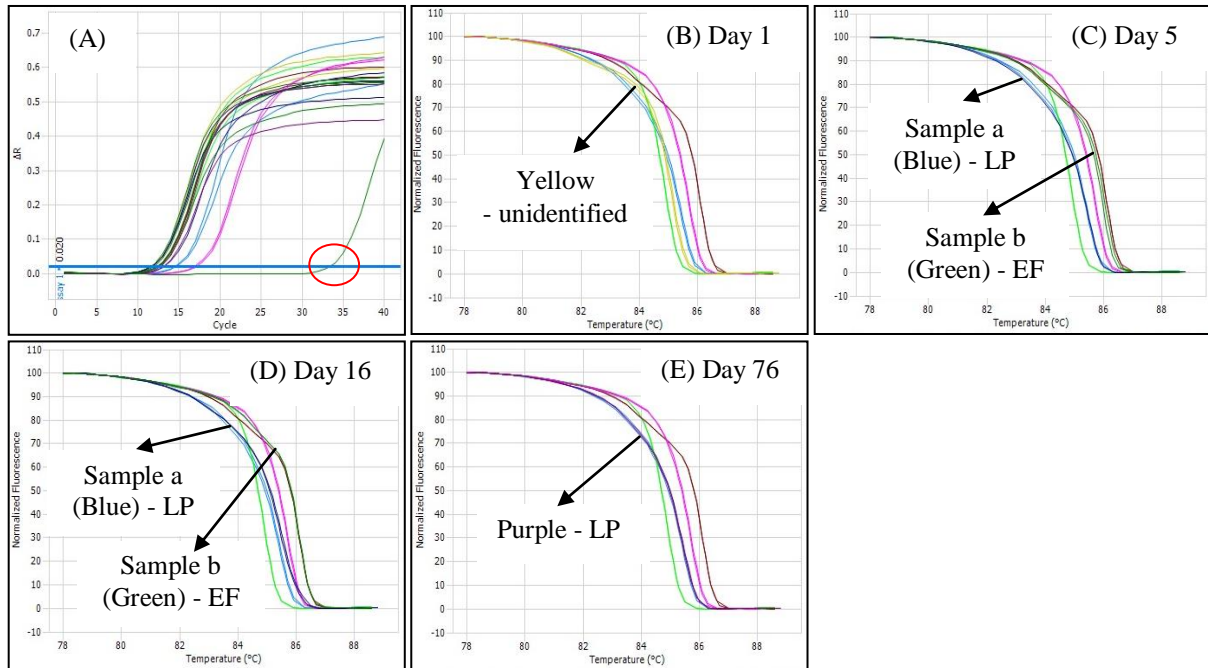
Method Analysis	HRM	Oligonucleotide Properties Calculator (Nearest Neighbor)
Lactic Acid Bacteria		
<i>Lactobacillus plantarum</i> MTD1	85.0- 85.2	85.16 °C
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	84.6- 84.8	85.48 °C
<i>Enterococcus faecium</i> Q	85.9	85.7 °C
<i>Lactobacillus buchneri</i>	85.5	85.79- 85.88 °C

מהתוצאות לעיל (טבלאות 5-6) רואים שהבקרה שבוצעה לאנליזת HRM הצליחה להראות ששיטת HRM אכן מבחינה בין סוגי ומיני חיידקי חומצת חלב אולם לא מבחינה בין זנים שונים מאותו מין החיידק לפחות בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4 המכוון לאזור V3 בגן 16S rDNA.

3.1.5 שימוש באנליזת HRM למעקב אחרי חיידקי חומצת חלב בתחמיצי חיטה בשלב דונג , בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4

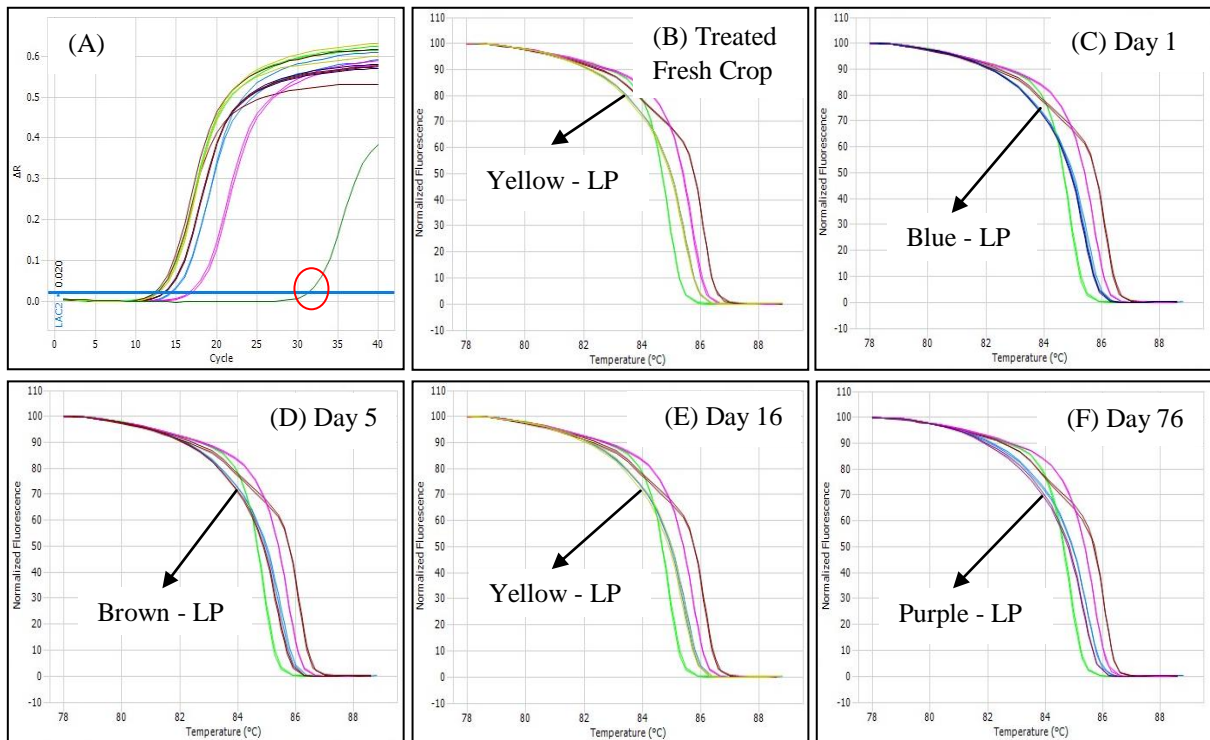
איור 11, 12, ו 13 מציגים אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR על דוגמאות DNA מהתחמיצי חיטה, בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4. (באיורים הנ"ל, בכל החלונות A, המים שימשו כביקורת שלילית, ומכיוון שהוגברו לאחר מחזור 30, ניתנים להזנחה בעקומות ההתכה).

איור 11 מדגים אנליזת HRM לדוגמאות DNA מחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך ניסוי ההחמצה של חיטה לא מטופלת (ביקורת). מבחינת עקומות ההתכה, הפרופיל של הדוגמאות תואם לחיידק *E. faecium* ולחיידק *L. plantarum* לאחר 5 (חלון C) ו 16 (חלון D) ימי החמצה. ואילו ביום 76 הפרופיל תואם רק לחיידק *L. plantarum* (חלון E).



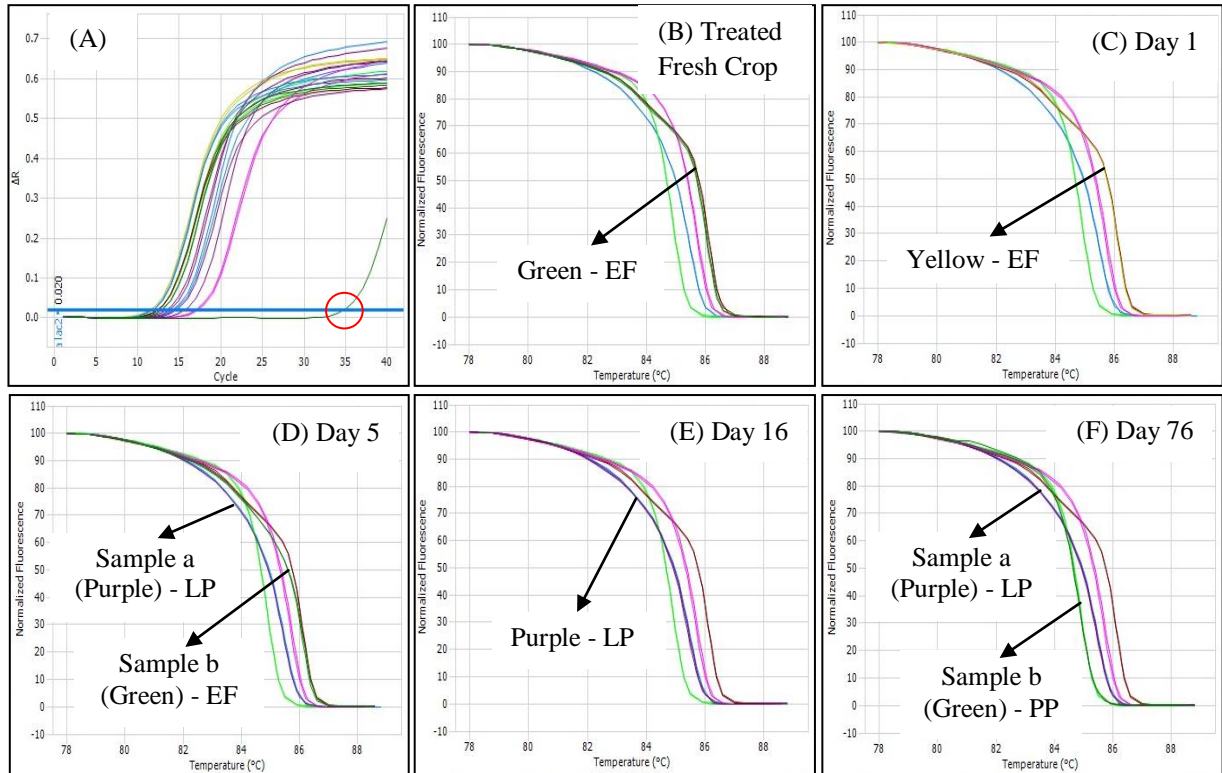
איור 11. אנליזה של חיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה לא מטופלת (ביקורת).
 (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזות HRM (B-E) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות
 טהורות של חיידיקי חומצת חלב בהשוואה לחיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך ההחמצה מחיטה לא מטופלת.
 התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ירוד);
P. pentosaceus (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום).
 פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: יום 1 (צהוב); יום 5 - דוגמה a (כחול), דוגמה b (ירוק);
 יום 16 - דוגמה a (כחול), דוגמה b (ירוק); יום 76 (סגול).

איור 12 מדגים אנליזות HRM לדוגמאות DNA מחיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם
 התרבית *L. plantarum* MTD1. בהסתכלות על עקומות ההתכה ניתן לראות שכבר בירק המוצא המטופל (חלון
 B), פרופיל עקומת התכה של הדוגמה מתאים לפרופיל של החיידיק *L. plantarum*, והתאמה לחיידיק זה נמשכת
 לאורך כל תקופת ההחמצה של החיטה עד סיום ההחמצה ביום ה-76 (חלונות B-F).



איור 12. אנליזה של חיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם החיידק *L. plantarum* MTD1 (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזות HRM (B-F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב בהשוואה לחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך ההחמצה מחיטה מטופלת. התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *E. faecium* Q (חום); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: ירק המוצא המטופל (צהוב); יום 1 (כחול); יום 5 (חום); יום 16 (צהוב); יום 76 (סגול).

איור 13 מדגים אנליזות HRM לדוגמאות DNA מחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם התרבית *E. faecium* Q. בהסתכלות על עקומות ההתכה ניתן לראות שהדוגמה מירק המוצא המטופל תואמת לפרופיל עקומת התכה של החיידק *E. faecium* (חלון B), וביום ה-5 ניתן לראות חוץ מהתאמה ל *E. faecium* Q כמו כן התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* (חלון D). ביום ה-16 ניתן לראות התאמה של הדוגמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* (חלון E). ביום ה-76, בסיום תהליך ההחמצה של החיטה המטופלת, ניתן לראות בנוסף להתאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* כמו כן התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *P. pentosaceus* (חלון F).



איור 13. אנליזה של חיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם החיידק *E. faecium* Q (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזת HRM (B-F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב בהשוואה לחלב שמוצו לאורך החמצה מחיטה המטופלת. התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: ירק המוצא המטופל (ירוק); יום 1 (צהוב); יום 5 - דוגמה a (סגול), דוגמה b (ירוק). יום 16 (סגול); יום 76 - דוגמה a (סגול), דוגמה b (ירוק).

טבלאות 7,8,9 מציגות סכימת תוצאות מאנליזת HRM של דוגמאות מתחמיצי חיטה.

טבלה 7 המסכמת את התוצאות עבור טיפול ביקורת (חיטה לא מטופלת), מראה שבירק הטרי לא נעשתה התאמה מכיוון שלא היו כלל חיידקי חומצת חלב לדיגום ($\log \text{CFU/g} < 2.00$) (איור 21). לאחר יום החמצה התקבלו חיידקי חומצת חלב אבל לא התאימו לשום פרופיל קיים (UN). לאחר 5 ימים ו 16 ימי החמצה, כן ניתן לראות התאמה לפרופיל החיידק *L. plantarum* והן לפרופיל החיידק *E. faecium*. בסיום החמצה (76 יום) ניתן למצוא התאמה לפרופיל החיידק *L. plantarum* ופרופיל נוסף שאיננו תואם לאף אחד מהפרופילים הקיימים (UN).

טבלה 7. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה לא מטופלת

(התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות*)

Match Profile	Ensiling Duration (days)				
	Fresh Crop	1	5	16	76
LP	X	-	+	+	+
EF		-	+	+	-
PP		-	-	-	-
LB		-	-	-	-
UN		+	+	+	+

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP); *E. faecium* (EF); *P. pentosaceus* (PP);

L. buchneri (LB); Unidentified (UN) - לא מזוהה

טבלה 8 המסכמת את התוצאות עבור חיטה מטופלת עם החיידק *L. plantarum* MTD1, ניתן לראות שמירק המוצא המטופל ולאורך ההחמצה עד יום 16, קיימת התאמה לפרופיל החיידק *L. plantarum* בלבד. לאחר 76 ימי החמצה, חוץ מהתאמה לחיידק *L. plantarum*, התקבל כמו כן פרופיל שאיננו תואם לאף אחד מהפרופילים הקיימים (UN).

טבלה 8. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה מטופלת עם החיידק *L. plantarum* MTD1

(התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות*)

Match Profile	Ensiling Duration (days)				
	Fresh Crop	1	5	16	76
LP	+	+	+	+	+
EF	-	-	-	-	-
PP	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-
UN	-	-	-	-	+

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ; *L. buchneri* (LB) - לא מזוהה - Unidentified (UN).

טבלה 9 המסכמת את התוצאות עבור חיטה מטופלת עם החיידק *E. faecium* Q, ניתן לראות שבירק הטרי ועד 5 ימי החמצה, קיימת התאמה לפרופיל של החיידק *E. faecium*. במקביל לכך, לאחר 5 ימי החמצה ועד סוף ההחמצה (76 יום) ניתן לראות התאמה לפרופיל החיידק *L. plantarum*. ביום ה-76 להחמצה (סוף ניסוי), ניתן כמו כן לראות התאמה לפרופיל החיידק *P. pentosaceus*, ופרופיל נוסף שלא תואם לאף אחד מהפרופילים הקיימים (UN).

טבלה 9. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה מטופלת עם החיידק *E. faecium* Q

(התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות*)

Match Profile	Ensiling Duration (days)				
	Fresh Crop	1	5	16	76
LP	-	-	+	+	+
EF	+	+	+	-	-
PP	-	-	-	-	+
LB	-	-	-	-	-
UN	-	-	-	-	+

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ; *L. buchneri* (LB) - לא מזוהה - Unidentified (UN).

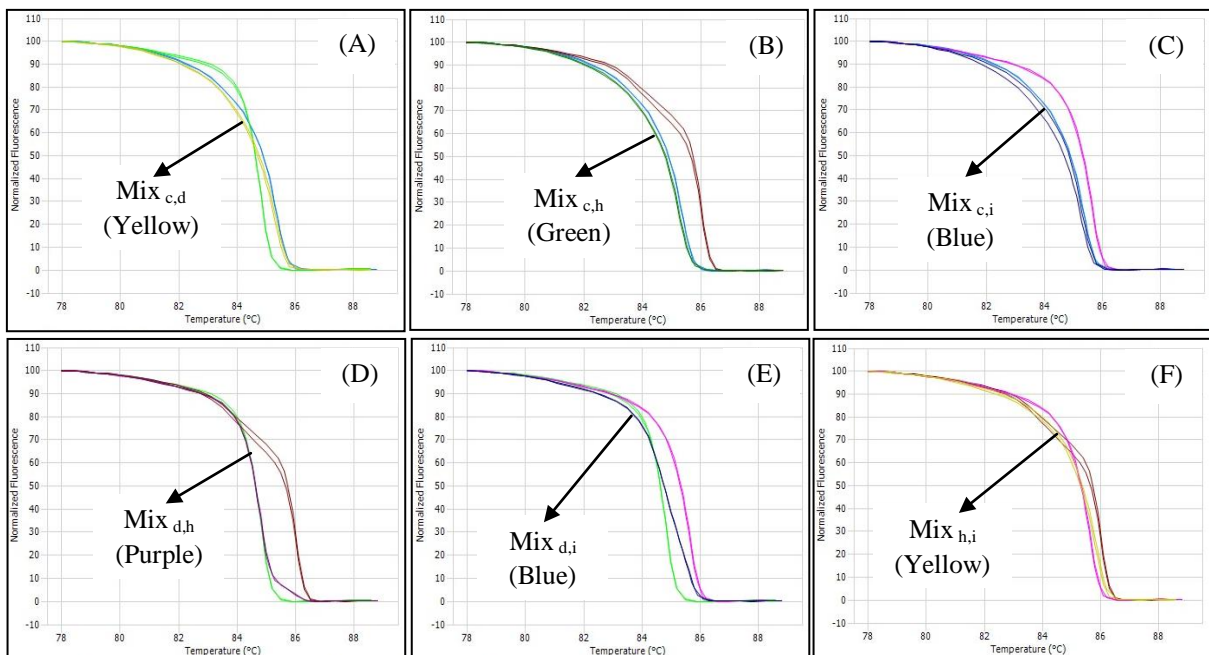
מהתוצאות לעיל (איורים 11-13 וטבלאות 7-9) רואים ששיטת HRM מצליחה לעקוב אחרי חיידקי חומצת חלב ברמת סוג החיידק והמין בתחמיצי החיטה, אולם עד כה אין התייחסות לדומיננטיות של אף אחד מחיידקי חומצת חלב אלו שנבדקו בתחמיצים. זאת משום שנעשה דיגום של המושבות ממיצוי התחמיץ בצורה אקראית ולא דיגום כוללני.

התוצאות הבאות יהוו הדגמה למה שקורה כאשר נעשה דיגום של כל המושבות בצורה כוללת.

3.1.6. התוצאות הבאות מציגות את בחינת יכולת אנליזת HRM לקביעת דומיננטיות של חיידק חומצת חלב, בשימוש סט הפריימרים LAC2- LAC4

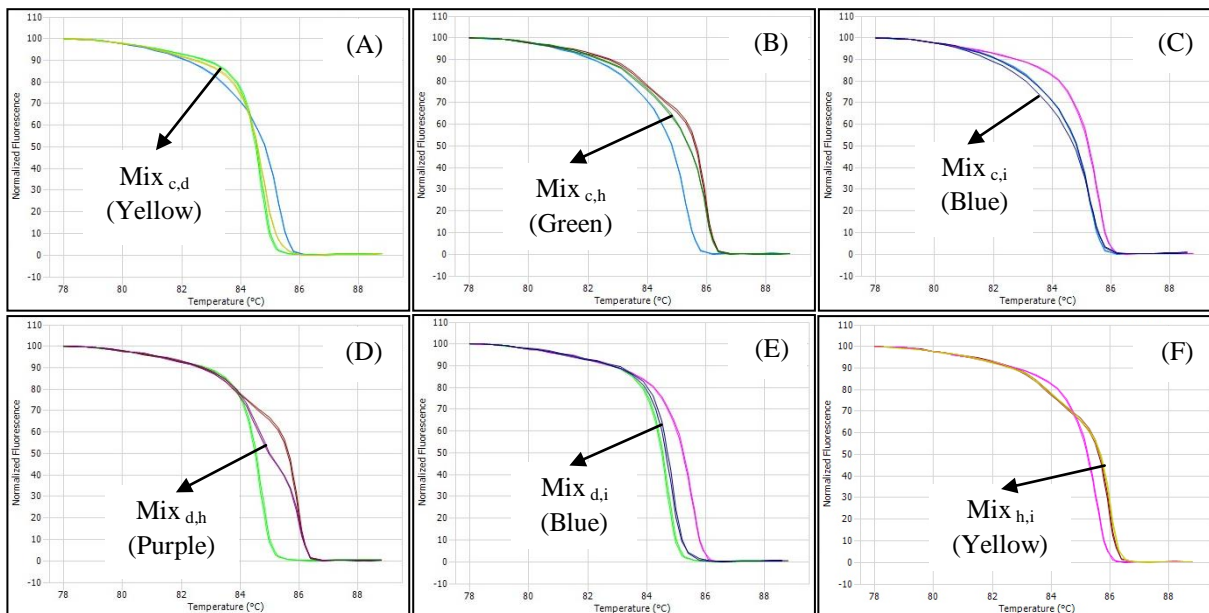
איור 14-16 מציגים שימוש באנליזת HRM לבחינת יכולת הבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים במצב בו נמצאים מעורבבים ביניהם בזמן הגידול שלהם או כאשר ה- DNA שלהם עורבב.

איור 14 מציג שימוש באנליזת HRM לבחינת יכולת הבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים כאשר גדלו קודם לכן במצב מעורבב ביניהם (הפקת DNA נעשתה לתערובת חיידקים יחד ולא לחיידק בודד). באיור זה ניתן לראות באופן כללי שהפרופילים שהתקבלו תאמו יחסית רק לאחד מ- 2 תרביות חיידקי חומצת חלב שעורבבו ביניהם (חלונות A- D) ואילו במקרים אחרים לא היתה התאמה לאף פרופיל (חלונות E,F). במצב מעורבב בין החיידק *L. plantarum* MTD1 לבין החיידק *P. pentosaceus*, נוצר פרופיל התואם ברוב חלקיו ל *L. plantarum* MTD1 (חלון A) כמו במקרה של התערובת בין *L. plantarum* MTD1 ל *E. faecium* Q (חלון B) ובתערובת בין *L. plantarum* MTD1 לבין *L. buchneri* (חלון C). במקרה של ערבוב בין החיידק *P. pentosaceus* לבין החיידק *E. faecium* Q, נוצר פרופיל התואם ברוב חלקיו לחיידק *P. pentosaceus* (חלון D).



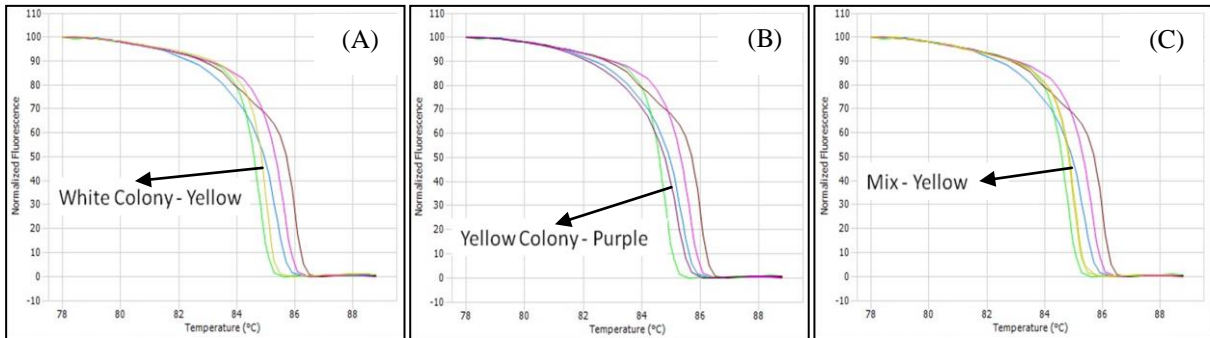
איור 14. אנליזת HRM לדוגמאות חיידקי חומצת חלב במצב גידול התחלתי מעורבב בהשוואה לתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות. התרביות הטהורות הינן: (c) *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); (d) *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); (i) *L. buchneri* (ורוד); (h) *E. faecium* Q (חום).
 התערובות: (A) Mix c,d - צהוב; (B) Mix c,h - ירוק; (C) Mix c,i (כחול); (D) Mix d,h (סגול); (E) Mix d,i (כחול); (F) Mix h,i - צהוב.

איור 15 מציג שימוש באנליזת HRM להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים כאשר ה- DNA שלהם עורבב. באיור זה ניתן לראות באופן כללי שהפרופילים שהתקבלו תאמו יחסית רק לאחד מ- 2 DNA החיידקי שעורבבו ביניהם (חלונות A,C,E,F) או כלל לא היתה התאמה לאף אחד מהפרופילים (חלון D). בערבוב בין DNA של החיידק *L. plantarum* MTD1 לבין DNA של החיידק *E. faecium* Q התקבל פרופיל שיותר מוצמד לפרופיל של *E. faecium* Q אבל עדין שונה במקצת מפרופיל של חיידק זה (חלון B).



איור 15. אנליזת HRM לדוגמאות חיידקי חומצת חלב במצב DNA מעורבב ביניהם בהשוואה לתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות. התרביות הטהורות הינן: (c) *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); (d) *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); (i) *L. buchneri* (ורוד); (h) *E. faecium* Q (חום). התערובות: (A) *Mix c,d* - צהוב; (B) *Mix c,h* - ירוק; (C) *Mix c,i* - כחול; (D) *Mix d,h* - סגול; (E) *Mix d,i* - כחול; (F) *Mix h,i* - צהוב.

איור 16 מציג שימוש באנליזת HRM לבחינת דומיננטיות תרביות חיידקי חומצת חלב כאשר תרביות אלו גדלו יחד באותה צלחת גידול. באיור זה ניתן לראות שפרופיל עקומת התכה של מושבה לבנה תואם באופן חלקי לפרופיל עקומת התכה של התרבית *P. pentosaceus* הטהורה (חלון A), ואילו פרופיל עקומת התכה של המושבה הצהובה תואם באופן כמעט מלא לפרופיל של התרבית *L. plantarum* הטהורה (חלון B). אולם כאשר מסתכלים על פרופיל עקומת התכה של המושבות מכל הצלחת, ישנה התאמה באופן חלקי רק לפרופיל עקומת התכה אחד המשתייך לתרבית *P. pentosaceus* הטהורה (חלון C).



איור 16. אנליזת HRM לדוגמאות חיידקי חומצת חלב שנדגמו מצלחת גידול על גבי מצע M.R.S Agar [במצב של דיגום מושבות בודדות (A-B) מול דיגום של כל המושבות על גבי הצלחת (C)], בהשוואה לתרביות חיידקי חומצת חלב טהורות. התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום). דיגום בודד: (A) מושבה לבנה - צהוב; (B) מושבה צהובה - סגול; (C) מושבות מכל הצלחת - צהוב.

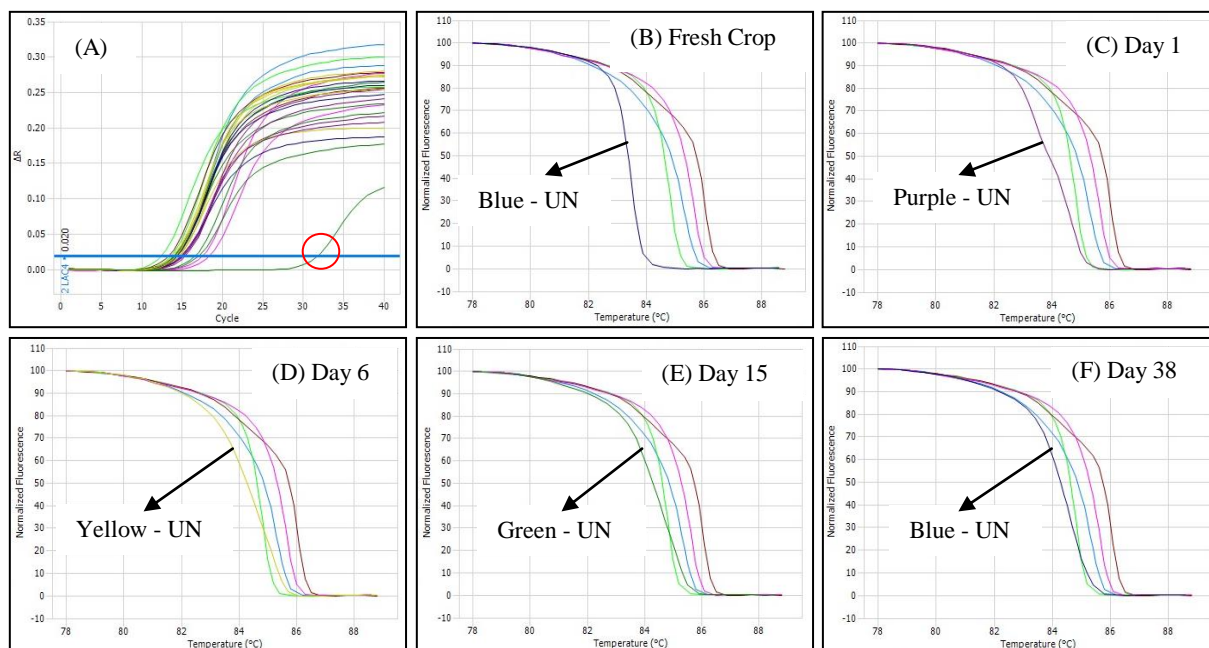
מהתוצאות לעיל (איורים 14-16) רואים ששימוש בשיטת HRM מתקבל פרופיל עקומת התכה בודד המשוייך לחיידק חומצת חלב דומיננטי כאשר ההנחה היא שדיגום כוללני של כל המושבות יביאו בסופו של דבר ל DNA לא רק מחיידק חומצת חלב בודד אלא של כל אותם חיידקי חומצת חלב השונים שגדלו על גבי מצע המזון.

התוצאות הבאות מהוות ישום מסכם לשימוש באנליזת HRM על דוגמאות מתחמיצי חיטה.

3.1.7. התוצאות הבאות מציגות שימוש באנליזת HRM לקביעת דומיננטיות חיידקי חומצת חלב בתחמיצי חיטה בשלב חלב, בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4

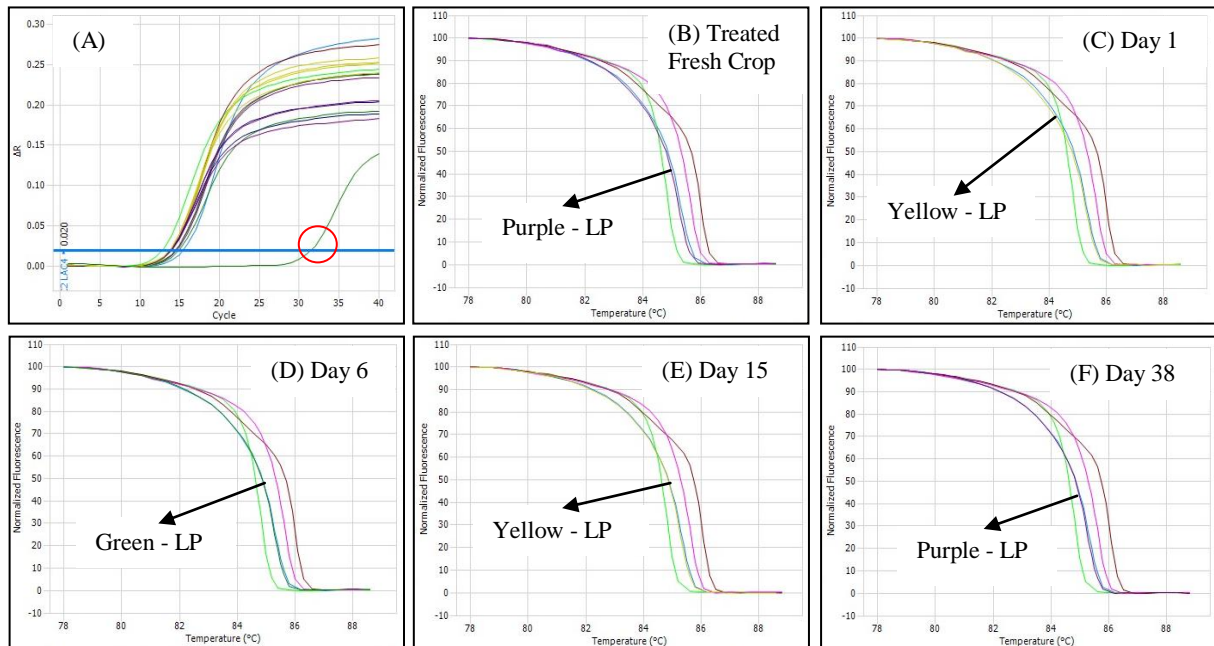
איור 17-20 מציגים אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR על דוגמאות DNA מהתחמיצי חיטה, בשימוש סט הפריימרים LAC2- LAC4. (בהכל האיורים הנ"ל המים שימשו כביקורת, ומכיוון שהוגברו לאחר מחזור 30, ניתנים להזנחה בעקומות ההתכה).

איור 17 מדגים אנליזת HRM לדוגמאות DNA מחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך התמצה של חיטה לא מטופלת (ביקורת). מבחינת עקומות ההתכה (חלון B-F), ניתן לראות שלכל אורך ההתמצה אין התאמה לאף אחד מהפרופילי עקומות התכה השייכים לתרביות חיידקי חומצת חלב הטהורות.



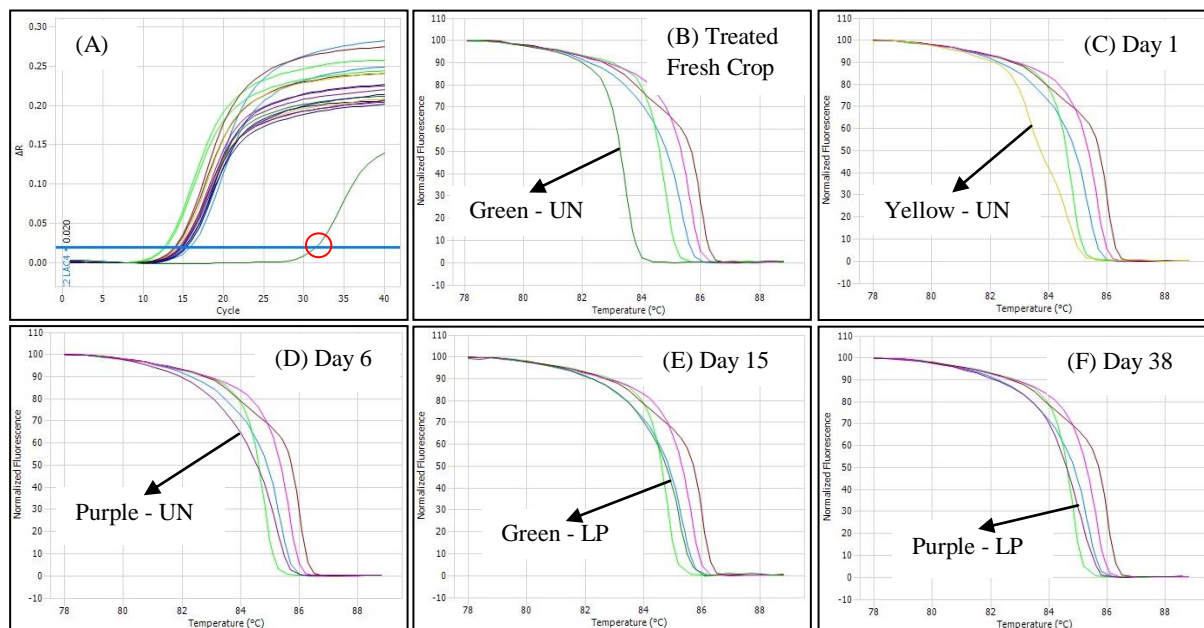
איור 17. אנליזה של חיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה לא מטופלת (ביקורת).
 (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזת HRM (B -F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות
 טהורות של חיידקי חומצת חלב בהשוואה לחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה מחיטה לא מטופלת.
 התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד);
P. pentosaceus (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום); לא מזוהה (unidentified - UN).
 פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ:
 ירק המוצא (כחול); יום 1 (סגול); יום 6 (צהוב); יום 15 (ירוק); יום 38 (כחול).

איור 18 מדגים אנליזת HRM לדוגמאות DNA מחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה
 מטופלת עם התרבית *L. plantarum* MTD1. בהסתכלות על עקומות ההתכה ניתן לראות שכבר בירק המוצא
 המטופל (חלון B), פרופיל עקומת ההתכה של הדוגמה מתאים לפרופיל של החיידק *L. plantarum*, והתאמה
 לחיידק זה נמשכת לאורך כל תקופת החמצה של החיטה עד סיום החמצה ביום ה-38 (חלונות B-F).



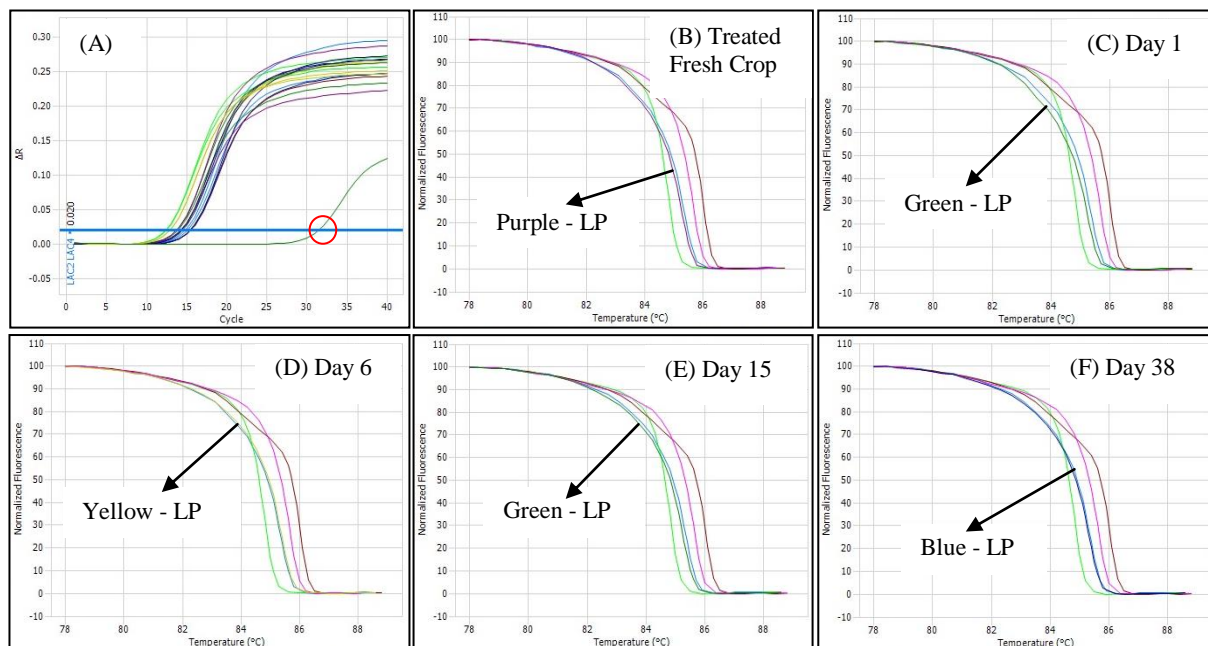
איור 18. אנליזה של חיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם החיידק *L. plantarum* MTD1 (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזות HRM (B-F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות טהורות של חיידיקי חומצת חלב בהשוואה לחיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך ההחמצה מחיטה המטופלת. התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *E. faecium* Q (חום); פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: ירק המוצא המטופל (סגול); יום 1 (צהוב); יום 6 (ירוק); יום 15 (צהוב); יום 38 (סגול).

איור 19 מדגים אנליזות HRM לדוגמאות DNA מחיידיקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם התרבית *E. faecium* Q. בהסתכלות על עקומות ההתכה, ניתן לראות שאין התאמה לאף אחד פרופילי עקומות ההתכה של תרביות חיידיקי חומצת חלב הטהורות בירק המוצא המטופל (חלון B), בתחמיץ אחרי יום (חלון C) וכמו כן לאחר 6 ימי החמצה (חלון D). עם זאת, ניתן לראות התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* לאחר 15 ימי החמצה (חלון E) והן התאמה חלקית לחיידק זה לאחר 38 ימים (חלון D).



איור 19. אנליזה של חיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם החיידק *E. faecium* Q (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזת HRM (B-F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב בהשוואה לחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך ההחמצה מחיטה המטופלת. התרביות הטהורות הינן: *L. plantarum* MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר); *E. faecium* Q (חום); לא מזוהה (unidentified - UN). פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: ירק המוצא המטופל (ירוק); יום 1 (צהוב); יום 6 (סגול); יום 15 (ירוק); יום 38 (סגול).

איור 20 מדגים אנליזת HRM לדוגמאות DNA מחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם שילוב של חיידקים (*L. plantarum* MTD1 + *E. faecium* Q). בהסתכלות על עקומות ההתכה, ניתן לראות שקיימת התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* מירק המוצא המטופל (חלון B) ולאורך כל ההחמצה (חלון C-F).



איור 20. אנליזה של חיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך החמצה של חיטה מטופלת עם שילוב חיידקים HRM (*L. plantarum* MTD1 + *E. faecium* Q). (A) עקומות הגברה (מים כביקורת – ירוק) ואנליזת HRM (B-F) לדוגמאות DNA המוגברות מתרביות טהורות של חיידקי חומצת חלב בהשוואה לחיידקי חומצת חלב שמוצו לאורך ההחמצה מחיטה המטופלת. התרביות הטהורות הינן:

L. plantarum MTD1 (כחול בהיר); *L. buchneri* (ורוד); *P. pentosaceus* (ירוק בהיר);
E. faecium Q (חום). פרופיל עקומות התכה של הדוגמאות מתחמיץ: ירק המוצא המטופל (סגול);
 יום 1 (ירוק); יום 6 (צהוב); יום 15 (ירוק); יום 38 (כחול).

טבלאות 10-13 מציגות סכימת תוצאות מאנליזת HRM של דוגמאות מתחמיצי חיטה בשלב חלב.

טבלה 10 המסכמת את התוצאות עבור טיפול הביקורת (חיטה לא מטופלת), מראה שמירק המוצא (fresh crop) ועד סוף הניסוי לא נמצא אף חיידק שתאם לפרופילי עקומות התכה של חיידקי חומצת חלב שנבדקו, כאשר נדגמו כל המושבות מאותה הצלחת (total plate). אולם בדיגום מושבות בודדות (separate colonies) כן ניתן למצוא התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *L. plantarum* לאחר יום ועד 38 ימים מההחמצה (סוף הניסוי). כמו כן, בדיגום הבודד, ניתן לראות התאמה לפרופיל עקומת התכה של החיידק *P. pentosaceus* ביום הראשון לאחר ההחמצה, ולאחר 38 ימים (סוף הניסוי).

טבלה 10. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה לא מטופלת (טיפול ביקורת)

[התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות* תוך השוואה בין דיגום של

כל המושבות על גבי הצלחת (Total Plate) מול דיגום מושבות בודדות (Separate Colonies)]

Match Profile	Ensiling Duration (days)									
	Fresh Crop		1		6		15		38	
	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies
LP	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+
PP	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
EF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UN	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ;

L. buchneri (LB) ; לא מזוהה (UN - unidentified).

טבלה 11 המסכמת את התוצאות עבור טיפול עם החיידק *L. plantarum* MTD1, מראה שמירק המוצא

(fresh crop) ועד 38 ימי החמצה (סוף ניסוי) ניתן היה למצוא התאמה רק לפרופיל עקומת התכה של *L. plantarum* כאשר נדגמו כל המושבות מהצלחת (total plate), כמו כן התאמה לפרופיל זה ניתן לראות בדיגום מושבות בודדות (separate colonies) לאורך כל מהלך ההחמצה. אולם בנוסף לכך, ניתן לראות שבמושבות בודדות שנדגמו כמו כן קיימים חיידקים שלא הותאמו לאף אחד מהפרופילי עקומות התכה של חיידקי חומצת חלב הנבדקו, בירק המוצא ולאחר יום אחד מההחמצה.

טבלה 11. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה מטופלת עם החיידק *L. plantarum* MTD1

[התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות* תוך השוואה בין דיגום של

כל המושבות על גבי הצלחת (Total Plate) מול דיגום מושבות בודדות (Separate Colonies)]

Match Profile	Ensiling Duration (days)									
	Fresh Crop		1		6		15		38	
	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies
LP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UN	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ;

L. buchneri (LB) ; לא מזוהה (UN - unidentified).

טבלה 12 המסכמת את התוצאות עבור טיפול עם החיידק *E. faecium* Q, מראה שבדיגום של כל המושבות (total plate) נמצאה התאמה לפרופיל עקומת התכה של *L. plantarum* רק לאחר 15 ימי החמצה, כאשר קיימת התאמה חלקית לחיידק זה גם לאחר 38 ימי החמצה. אולם בירק המוצא (fresh crop) ועד 6 ימי החמצה לא ניתן היה למצוא התאמה לאף אחד מפרופילי עקומות התכה של חיידקי חומצת חלב הנבדקו, במקרה של דיגום של כל המושבות. למרות זאת, בדיגום מושבות בודדות (separate colonies), כן ניתן לראות התאמה בירק המוצא (fresh crop) לפרופיל עקומת התכה של *E. faecium*, ובמהלך ההחמצה עד יום 38 (סוף ניסוי) התאמה לפרופיל עקומת התכה של *L. plantarum* MTD1. כמו כן בדיגום מושבות בודדות ניתן היה למצוא התאמה לפרופיל עקומת התכה של *P. pentosaceus* לאחר יום, 15 ימים ו 38 יום לאחר ההחמצה.

טבלה 12. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה מטופלת עם החיידק *E. faecium* Q

[התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות* תוך השוואה בין דיגום של

כל המושבות על גבי הצלחת (Total Plate) מול דיגום מושבות בודדות (Separate Colonies)]

Match Profile	Ensiling Duration (days)									
	Fresh Crop		1		6		15		38	
	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies
LP	-	-	-	+	-	+	+	+	-/+	+
PP	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+
EF	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UN	+	+	+	+	+	+	+	+	+/-	-

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ;

L. buchneri (LB) ; לא מזוהה (UN - unidentified).

טבלה 13 המסכמת את התוצאות עבור טיפול עם שילוב חיידקים (*L. plantarum* MTD1 + *E. faecium* Q), מראה שמירק המוצא (fresh crop) ועד 38 יום (סוף ניסוי) מההחמצה, קיימת התאמה לפרופיל עקומת התכה של *L. plantarum* הן בדיגום של כל המושבות בצלחת (total plate) והן בדיגום מושבות בודדות (separate colonies). אולם בירק המוצא, וביום הראשון להחמצה, התקבל בנוסף פרופיל עקומת התכה שלא תאם לאף אחד מפרופילי עקומות התכה של חיידקי חומצת חלב שנבדקו, כאשר נעשה דיגום של כל המושבות בצלחת (total plate).

טבלה 13. הימצאות חיידקי חומצת חלב במהלך החמצת חיטה מטופלת עם שילוב של חיידקים

(*L. plantarum* MTD1 + *E. faecium* O)

[התאמת דוגמאות מירק טרי ומתחמיצים לפרופיל תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות* תוך השוואה בין דיגום של

כל המושבות על גבי הצלחת (Total Plate) מול דיגום מושבות בודדות (Separate Colonies)]

Match Profile	Ensiling Duration (days)									
	Fresh Crop		1		6		15		38	
	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies	Total Plate	Separate Colonies
LP	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
PP	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EF	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
LB	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UN	+	+	+	+	-	-	-	-	-	+

* תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות: *L. plantarum* (LP) ; *E. faecium* (EF) ; *P. pentosaceus* (PP) ;

L. buchneri (LB) ; לא מזוהה (UN - unidentified).

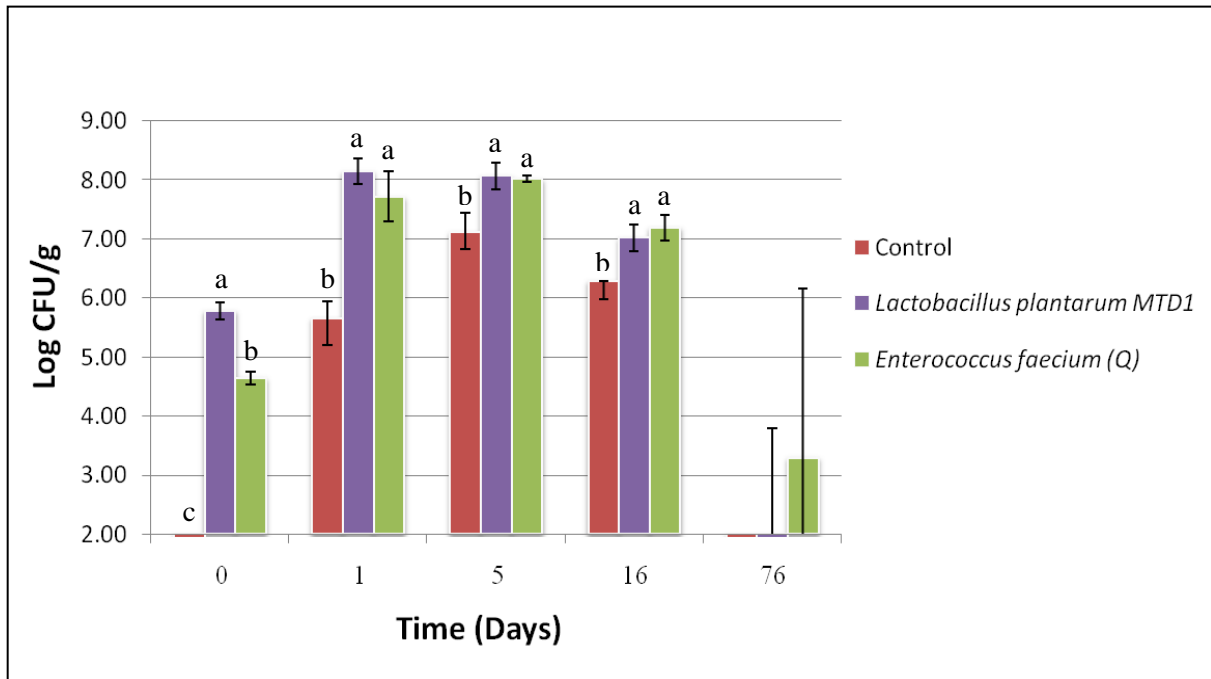
מהתוצאות לעיל (איורים 17-20 וטבלאות 10-13) רואים ששימוש בשיטת HRM מצד אחד מצליח לעקוב אחרי חיידקי חומצת חלב שונים בתחמיצים כאשר נעשה דיגום אקראי של מושבות ומצד אחר נותן אינדיקציה איזה חיידק חומצת חלב הינו הדומיננטי בכל שלב ושלב של החמצת החיטה כאשר נעשה דיגום כוללני של כל המושבות

עד כאן התוצאות לגבי פיתוח וישום שיטת אנליזת HRM למעקב אחר הדינמיקה של חיידקי חומצת חלב בתחמיצי חיטה.

3.2. התוצאות הבאות מציגות את מדדי תסיסת ההחמצה של חיטה בשלב דונג וחיטה בשלב חלב.

איור 21 מתאר את תוצאות ניסוי החמצה של חיטה בשלב דונג, בו רואים שינוי במספר חיידקי חומצת חלב ביחס להתקדמות מהלך ההחמצה (מועדי הדיגום). בניסוי זה ניתן לראות שמספר חיידקי חומצת חלב עלה עם התקדמות בתהליך ההחמצה והגיעו לשיא, לאחר 5 ימי החמצה. בטיפולי הביקורת מספר חיידקי חומצת חלב, התחילו מ $\log \text{CFU/g} < 2.0$ ביום אפס (חומר המוצא), והגיעו ל- $\log \text{CFU/g} = 7.0$, לאחר 5 ימי החמצה.

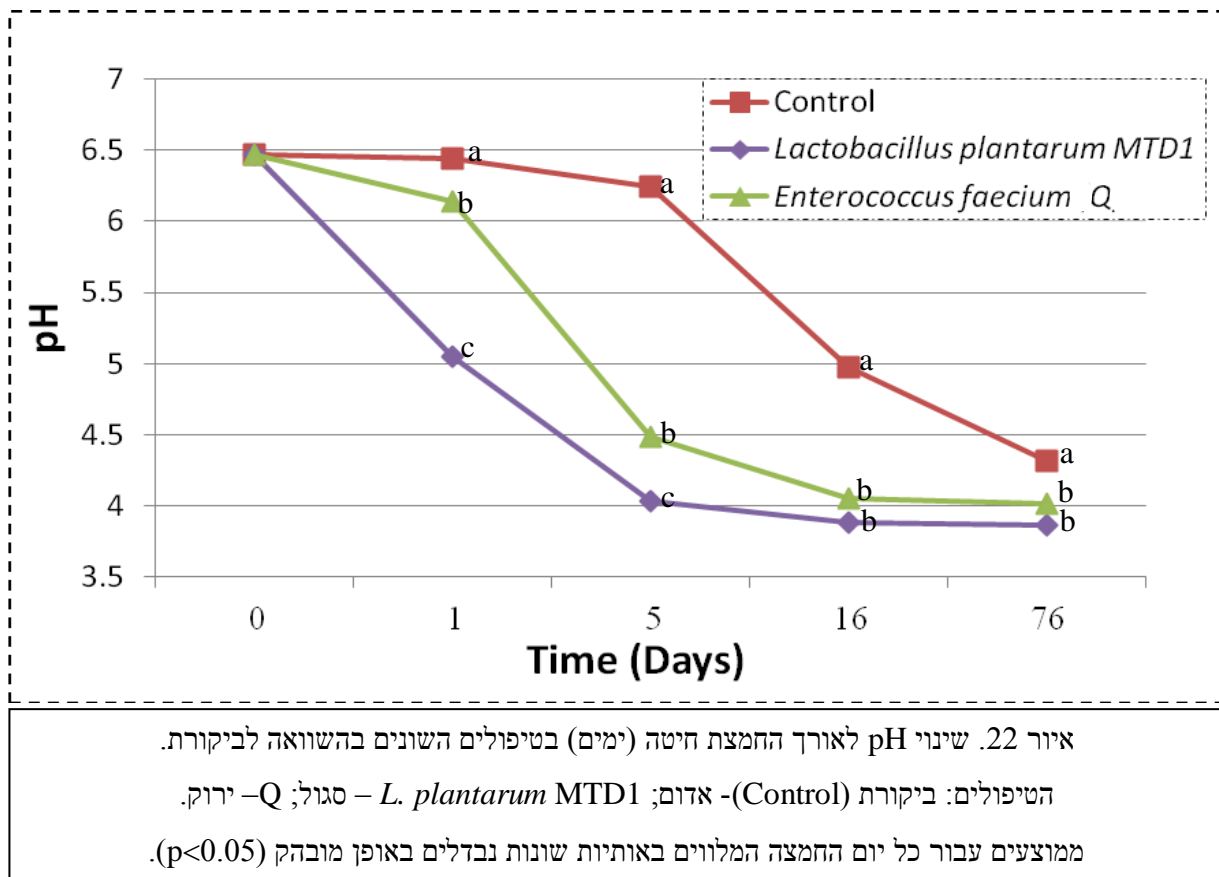
בטיפול עם *L. plantarum* MTD1 ובטיפול עם *E. faecium* Q מספר חיידקי חומצת חלב הגיעו לערכי $\log \text{CFU/g}$ מעל 7.5, לאחר 5 ימי החמצה. בנוסף לזה ניתן לראות שביום אפס (חומר מוצא) היו הבדלים מובהקים במספר חיידקי חומצת חלב בין שלושת הטיפולים. לאחר יום אחד של החמצה ועד 16 ימי החמצה, נשמר הבדל מובהק במספר חיידקי חומצת חלב בין טיפול הביקורת לטיפול עם *L. plantarum* MTD1 וכמו כן בין טיפול הביקורת לטיפול עם *E. faecium* Q. לאחר 76 ימי החמצה (סוף ניסוי) מספר חיידקי חומצת חלב הגיעו לערכים מאוד קטנים של $\log \text{CFU/g} < 3.1$, ללא הבדל מובהק בין 3 הטיפולים.



איור 21. מספר חיידקי חומצת חלב ($\log \text{CFU/g}$) לאורך החמצת חיטה (ימים) בטיפולים השונים בהשוואה לביקורת. הטיפולים: ביקורת (Control) - אדום; *L. plantarum* MTD1 - סגול; *E. faecium* Q - ירוק. ממוצעים עבור כל יום החמצה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

איור 22 מתאר את שינוי ה-pH במשך החמצת החיטה בשלב דונג.

באיור זה ניתן לראות שישנה ירידה ב-pH ככל שמתקדמים עם ימי החמצה בכל הטיפולים. ירידה בערכי ה-pH, בטיפול עם *L. plantarum* MTD1 היתה יותר מהירה והגיעה ל-pH של 5 כבר אחרי יום החמצה לעומת טיפול ביקורת וטיפול עם *E. faecium* Q שהיו מעל pH 6. רק לאחר 16 ימי החמצה, ה-pH בטיפול הביקורת הגיע לסביבות 5, ואילו בטיפול עם *E. faecium* Q היה כבר מתחת ל-pH של 4.5. ביום ה-76 להחמצה ה-pH בטיפול הביקורת הגיעה מתחת ל-4.5. מבחינת מובהקות בין הטיפולים, ניתן לראות שביום 1 וביום 5 להחמצה, היו הבדלים מובהקים בערכי pH בין כל 3 הטיפולים. ביום 16 ו-76 יום לאחר החמצה, היה הבדל מובהק בערך ה-pH בין טיפול הביקורת לטיפול עם *L. plantarum* MTD1 ובין טיפול הביקורת לטיפול עם *E. faecium* Q.



טבלה 14 מתארת את הרכב תחמיצי החיטה הסופיים לאחר 76 ימי החמצה של חיטה בשלב דונג. בטבלה זו ניתן לראות שחומצה לקטית הינה תוצר התסיסה העיקרי כאשר ישנו הבדל מובהק בריכוז חומצה לקטית בין טיפול הביקורת לבין שאר 2 הטיפולים עם *L. plantarum* MTD1 ו *E. faecium* Q. כמו כן, ניתן לראות נוכחות של אתנול, שביחס לחומצה לקטית, נמצא בריכוז יותר נמוך, וריכוזו של האתנול שונה באופן מובהק בין טיפול הביקורת לבין שאר 2 הטיפולים. ניתן לשים לב שקיים יחס הפוך בין האתנול וחומצות שומן נדיפות לבין החומצה לקטית בכך שבטיפול ביקורת יש פחות חומצה לקטית מאשר בשאר הטיפולים ואילו יותר אתנול וחומצות שומן נדיפות בטיפול הביקורת לעומת שאר 2 הטיפולים עם *L. plantarum* MTD1 ו *E. faecium* Q שהינם מינים הומופרמנטטיביים.

טבלה 14. הרכב תחמיצי החיטה הסופיים מיום 76 (מבוטאים כאחוז בח"י)

<i>E. faecium</i> Q	<i>L. plantarum</i> MTD1	Control	טיפול פרמטר נבדק
39.2 ^a	36.5 ^b	37.2 ^b	חומר יבש (אחוז)
4.0 ^b	3.9 ^b	4.3 ^a	pH
5.4 ^a	5.5 ^a	4.4 ^b	חומצה לקטית
0.4	0.4	0.5	חומצת אצטית
0.0 ^b	0.0 ^b	0.2 ^a	חומצה פרופיונית
0.0 ^b	0.0 ^b	1.4 ^a	חומצה בוטירית
1.5 ^b	1.0 ^b	2.4 ^a	אתנול

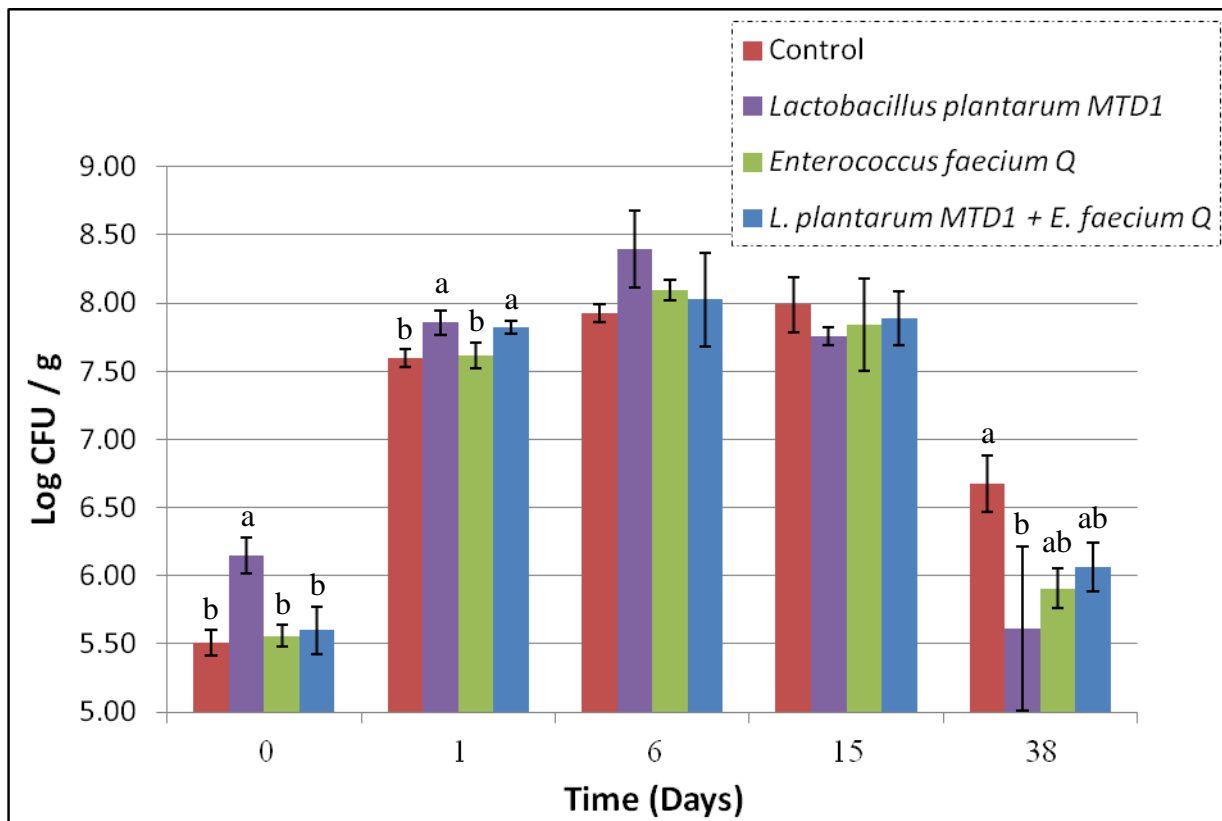
ממוצעים בכל שורה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

איור 23 מתאר את תוצאות ניסוי ההחמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין, בו רואים שינוי במספר חיידקי חומצת חלב ביחס להתקדמות מהלך ההחמצה (מועדי הדיגום). באיור זה ניתן לראות שמספר חיידקי חומצת חלב עלה עם התקדמות תהליך ההחמצה והגיע לשיאו, לאחר 6 ימי החמצה, ולאחר מכן ניתן לראות ירידה הדרגתית במספר חיידקי חומצת חלב ללא תלות בטיפול שנעשה. ביום אפס (ירק המוצא) מספר חיידקי חומצת חלב ההתחלתי היה $\log \text{CFU/g} > 5.0$ ללא תלות בטיפול שנעשה, כאשר בטיפול עם *L. plantarum* MTD1 מספר חיידקי חומצת חלב היה $\log \text{CFU/g} > 6.0$ ונבדלו באופן מובהק ממספר חיידקי חומצת חלב בשאר הטיפולים.

לאחר יום, ניתן לראות שיש הבדלים מובהקים בחינת מספר חיידקי חומצת חלב בין טיפול עם

L. plantarum MTD1 לבין טיפול הביקורת וטיפול עם *E. faecium* Q, כמו בטיפול המשולב

(*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1) שכמו כן שונה באופן מובהק מבחינת מספר חיידקי חומצת חלב מהטיפול ביקורת וטיפול עם *E. faecium* Q. בסוף ניסוי ההחמצה (38 יום) כמו כן ניתן לצפות בהבדלים מובהקים מבחינת מספר חיידקי חומצת חלב בין טיפול עם *L. plantarum* MTD1 לביקורת.



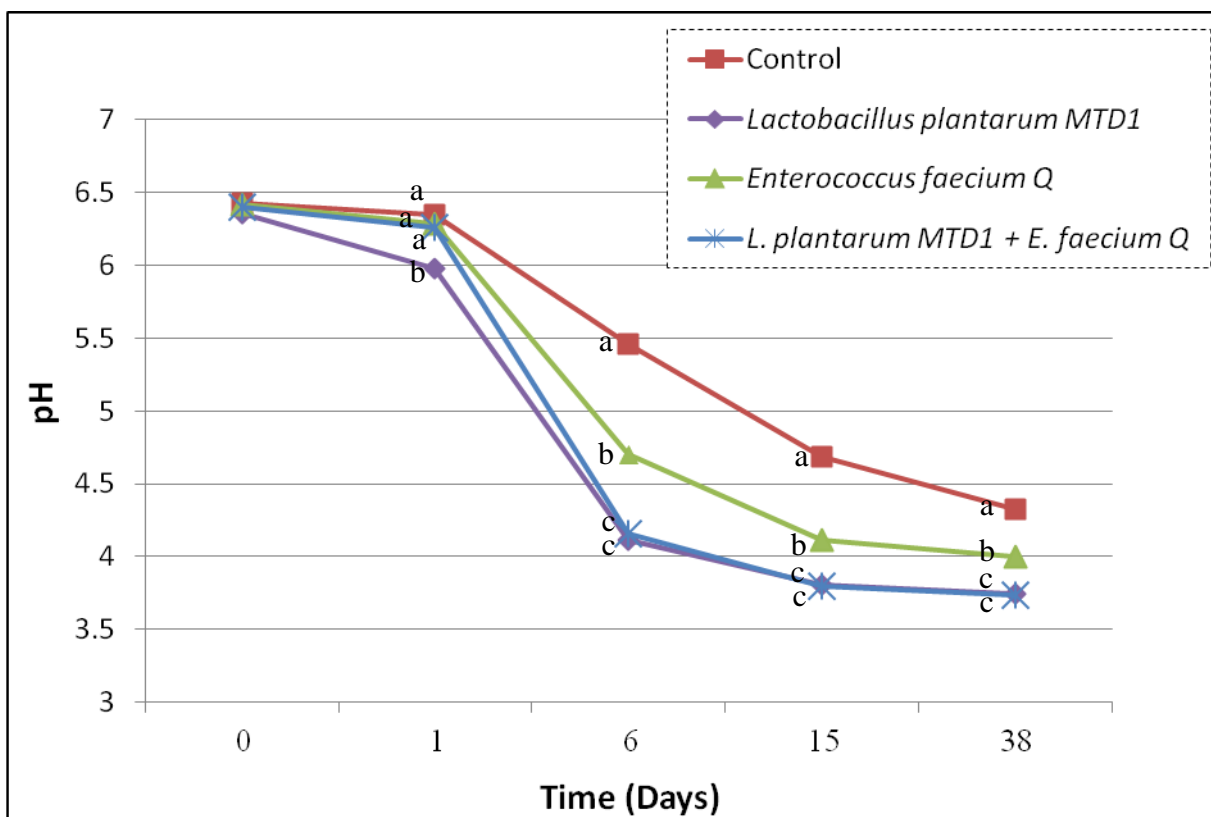
איור 23. מספר חיידקי חומצת חלב ($\log \text{CFU/g}$) לאורך החמצת חיטה (ימים) בטיפולים השונים בהשוואה

לביקורת. הטיפולים: ביקורת (Control) - אדום; *L. plantarum* MTD1 - סגול;

E. faecium Q - ירוק; טיפול משולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD) - כחול;

ממוצעים עבור כל יום החמצה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

איור 24 מתאר את שינוי ה-pH לאורך החמצת חיטה בשלב מילוי גרעין בטיפול הביקורת בהשוואה ל- 3 הטיפולים הנוספים עם התרבויות המוספות. באיור זה ניתן לראות שישנה ירידה ב-pH עם התקדמות החמצת החיטה ללא תלות בטיפול שנעשה. בטיפול עם *L. plantarum* MTD1 ניתן לראות הבדל מובהק בערך ה-pH (6.0) בהשוואה לשאר הטיפולים ($pH > 6.0$), לאחר יום אחד בלבד של החמצה. הבדלים מובהקים בערכי ה-pH בין הטיפולים גם במשך החמצת החיטה. לאחר 6 ימי החמצה, ערכי ה-pH נמוכים מ-5.00 בכל הטיפולים ואילו טיפול הביקורת הגיע ל-pH=5.5. רק לאחר 15 ימי החמצה, טיפול הביקורת הגיע ל-pH < 5.00. לאחר 38 ימי החמצה (סוף ניסוי), טיפול הביקורת גבוה באופן מובהק בערך ה-pH (4.32) מטיפול עם *E. faecium* Q ($pH = 4.0$), וכמו כן משאר הטיפולים. טיפול עם *L. plantarum* MTD1 וטיפול משולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1) גם היו שונים שניהם באופן מובהק מטיפול עם *E. faecium* Q.



איור 24. שינוי pH לאורך החמצת חיטה (ימים) בטיפולים השונים בהשוואה לביקורת. הטיפולים: ביקורת (Control) - אדום; *L. plantarum* MTD1 - סגול; *E. faecium* Q - ירוק; טיפול משולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1) - כחול. ממוצעים עבור כל יום החמצה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

טבלה 15 מתארת את הרכב תחמיצי החיטה הסופיים לאחר 38 ימי החמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין. בטבלה זו ניתן לראות שחומצה לקטית הינה תוצר התסיסה העיקרי (לעומת שאר תוצרי התסיסה שהתקבלו בפחות מ-1 אחוז מח"י כדוגמת חומצה אצטית או אתנול, או כלל לא נמצאו כמו חומצה פרופריונית או חומצה בוטירית). ללא תלות בטיפול שנעשה. ערכי החומצה הלקטית שהתקבלו שונים באופן מובהק בין טיפול הביקורת (2.8 אחוז מח"י) לטיפול עם *L. plantarum* MTD1 ולטיפול המשולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1). כמו כן ערכי חומצה לקטית בטיפול עם *L. plantarum* MTD1 (5.0 אחוז מח"י) נבדלים באופן מובהק מטיפול עם *E. faecium* Q (3.6 אחוז מח"י). קיים כמו כן הבדל מובהק מבחינת ערכי חומצה אצטית בין טיפול הביקורת (0.7 אחוז מח"י) לטיפול עם *L. plantarum* MTD1 (0.3 אחוז מח"י) ולטיפול המשולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1) (0.3 אחוז מח"י). מבחינת החומר היבש קיים כמו כן הבדל מובהק בין טיפול הביקורת (43.6 אחוז ח"י) לטיפול המשולב (*E. faecium* Q + *L. plantarum* MTD1).

טבלה 15. הרכב תחמיצי החיטה הסופיים מיום 38 (מבוטאים כאחוז בח"י)

Mix	<i>E. faecium</i> Q	<i>L. plantarum</i> MTD1	Control	טיפול פרמטר נבדק
45.4 ^a	44.4 ^{ab}	43.9 ^b	43.6 ^b	חומר יבש (אחוז)
3.7 ^c	4.0 ^b	3.7 ^c	4.3 ^a	pH
5.0 ^a	3.6 ^b	5.0 ^a	2.8 ^b	חומצה לקטית
0.3 ^b	0.5 ^{ab}	0.3 ^b	0.7 ^a	חומצת אצטית
-	-	-	-	חומצה פרופריונית
-	-	-	-	חומצה בוטירית
0.4	0.6	0.8	0.8	אתנול

ממוצעים בכל שורה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).
(-) חומצה פרופריונית ובוטירית לא נמצאו.

4. דיון

עבודת מחקר זו נועדה לפתח שיטה מולקולאריות שתצליח לעקוב אחרי חיידקי חומצת חלב במהלך החמצה. כשלעצמה השיטה שפותחה תוכל להבחין בין התרביות המוספות לחיידקי חומצת חלב האפיפיטיים שנמצאים באופן טבעי במספוא המוחמץ. בדרך זאת השיטה תאפשר לוודא שאכן התרבית של חיידק חומצת חלב המוספת משתלטת על תהליך ההחמצה והופכת לאוכלוסיה המיקרוביאלית הדומיננטית במספוא המוחמץ.

בעבודה נבדקו מספר שיטות חלופיות להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שונים שמתפתחים בתחמיץ, טבעיים ותרביות מוספות. השיטה הראשונה שנבדקה היתה שימוש בזני *L. plantarum* שמכילים פלסמידים שמקודדים עמידות לאנטיביוטיקה אריתרומיצין ואשר מבטאים את הגן לחלבון הזוהר הירוק (GFP) שהתקבלו ממעבדה בצרפת. במהלך העבודה התברר שבזנים אלה לא היה ביטוי למושבות זוהרות; בנוסף, חיידקי חומצת חלב שמוצו מתחמיצי הביקורת התפתחו גם במצע שהכיל אריתרומיצין (נספח א'). כדי לשלול אפשרות שהאנטיביוטיקה מעוכבת ע"י חומציות מצע הרגוזה (pH= 5.4) חזרנו על הניסוי עם מצע MRS (pH=6.2) וגם שם תוצאה זו חזרה על עצמה (נספח ב' איור 3). העלאת מינון האריתרומיצין לא הפחיתה את מספרי חיידקי חומצת החלב בתחמיצי תירס ובליל (נספח ב' איור 4). עקומות גידול של חיידקים שמוצו מתחמיץ תירס והזנים העמידים לכאורה היו דומות במצע MRS נוזלי שהכיל אריתרומיצין (נספח ב' איור 5). כל התוצאות האלה הצביעו על כך שהשימוש בזנים האלה לא היה יעיל להבחנה בין חיידקי חומצת חלב שמתפתחים בתחמיצים. התפתחות חיידקי חומצת חלב מתחמיץ הביקורת על מצע שהכיל אריתרומיצין הובילה לבדיקת הספרות המדעית ואכן נמצאו מספר מקורות שטענו שקיימים בחיידקי חומצת חלב גנים המבטאים עמידות לאנטיביוטיקות ובפרט לאריתרומיצין

(Egervarn et al., 2009, Mathur and Singh. 2005, Thumu and Halami. 2012). תוצאה זו הובילה

למחקר חדש במעבדה בנושא עמידות לאנטיביוטיקה של אוכלוסיות חיידקים שנמצאים בתחמיצים.

במטרה להמשיך לפתח שיטה מולקולארית שתצליח לעקוב אחרי חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ נבחנה שיטת אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR. שיטת אנליזה זו אמורה, כפי שמצויין בספרות, להצליח להבחין בשינוי בבסיס בודד בין רצפי DNA שלאחר הגברתם (PCR) עוברים תהליך התכה (Sakaridis et al., 2014); (Cheng et al., 2006). בזמן תהליך התכה זה רצפי ה-DNA המוגברים מוצמדים בבסיסיהם עם סמן פלורוסנטי; כאשר הטמפרטורה עולה, הרצפים הדו גדיליים שנוצרו במהלך ההגברה מתחילים לעבור פרימה, שגורמת לדעיכה בפלורוסנציה. אנליזת HRM, נותנת רזולוציה גבוהה יותר בזמן מעקב אחרי דעיכה פלורוסנטית זאת (Porcellato et al., 2012).

התוצאות מניסויים שנעשו לבחינת שימוש בשיטת אנליזת HRM, הראו שאכן ניתן להבחין בין סוגים ומינים שונים של חיידקי חומצת חלב (איור 7 חלון B) וכמו כן יש אפשרות דרך אנליזה זו לעקוב אחרי שינויים באוכלוסיית חיידקי חומצת חלב לאורך החמצת הירק הטרי, כאשר ההתבססות הינה על מושבות שנדגמו באקראי מצלחות גידול עם מצע סלקטיבי. התוצאות הדגימו שאכן מתחולל שינוי באוכלוסית חיידקי חומצת החלב בתחמיץ (טבלאות 7-9) שבהתאם לשינוי ב-pH (איור 22).

בנוסף לכך, כדי לעקוב אחרי הדומיננטיות של חיידקי חומצת חלב, נעשה דיגום של כל המושבות מצלחות הגידול עם מצע סלקטיבי. התוצאות הראו שאכן החיידק *L. plantarum* משתלט על המיקרופלורה במהלך החמצת הירק

הטרי שטופל עם התרבית *L. plantarum* MTD1 בהשוואה לטיפולים אחרים שאינם עברו טיפול עם חיידק זה (טבלאות 10-13). השתלטות חיידק זה מבוטאת כמו כן באופי התסיסה ההומופרמנטטיבי המתקבל בכך שנוצרה יותר חומצה לקטית באופן מובהק בטיפול עם התרבית *L. plantarum* MTD1 בהשוואה לטיפולים אחרים שלא עברו טיפול עם חיידק זה (טבלה 15). אומנם התוצאות משימוש בשיטת אנליזת HRM אינן נותנות היבט כמותי לכמה מהווה החיידק *L. plantarum* מסך כל אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב המתפתחים על גבי צלחות הגידול (לקביעת דומיננטיות שלו) אבל התוצאות נובעות משימוש בסך כל ה-DNA שקיים מכל המושבות שעל גבי צלחות הגידול. ככל שיש יותר DNA ממקור חיידקי מסויים ככה עקומת ההתכה שמתקבלת באנליזת HRM קרובה יותר לפרופיל של DNA מתרבית טהורה. עניין זה של קבלת עקומת התכה בודדת המייצגת את ה-DNA הדומיננטי, נתמך בעבודות מחקר שנעשות במעבדתו של ד"ר שמעון הרוש (בית ספר לוטרניריה, פקולטה לחקלאות, אוניברסיטה העברית) (ידע אישי), ובתוצאות של ניסוי שבדק את עקומות ההתכה של תערובות תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (איור 16). השתלטות החיידק *L. plantarum* במהלך החמצת ירק טרי, מתוארת באופן נרחב בספרות המדעית, אולם לשיטות שהשתמשו בהן במחקרים אלה היו חסרונות או דרשו שילוב של מספר שיטות שסרבלו והאריכו את משך הבדיקות. מאמריהם של Duffner et al. (1994) ו Klocke et al. (2006) יכולים להביא תמיכה לעניין הדומיננטיות של החיידק *L. plantarum* בתחמיצים של עשבי מספוא, אולם במחקר של Klocke et al. (2006) למרות ששיטת המעקב אחר החיידק *L. plantarum* היתה ביסודה כמותית, התוצאות הכלילו בתוכם DNA מחיידקים מתים ולפיכך התוצאות לא היו מהימנות והיה צורך במחקר המשכי. במאמר של Santos et al. (2014) ניתן למצוא כמו כן הוכחה לדבר דומיננטיות החיידק *L. plantarum* בתחמיצים של עשבי מספוא אולם עדין התוצאות התקבלו משימוש בשילוב של שיטות פנוטיפיות כמורפולוגיה, תכונות ביוכימיות ושימוש בקיט מסחרי API 50 CH המבוסס על תסיסת סוכרים שונים. ולבסוף, המטרה המשנית שלשמה נעשתה עבודת מחקר זאת, להבחין בין תרביות המוספות לאוכלוסיית חיידקים האפיפיטית שנמצאת באופן טבעי במספוא המוחמץ (כלומר לבדיקת האפשרות להבחין בין זנים של אותו מין חיידק חומצת חלב), לא הצליחה ע"י שימוש בשיטת אנליזת HRM (איור 10). עניין זה יכול להיות מוסבר על ידי כך שנעשית בחירה של התחלים (פריימרים) שאמורים להגביר אזור וריאבילי בגן 16S rDNA עם הבדלים מספקים לאבחנה בין סוגים, מינים וזני חיידקי חומצת חלב, ולפיכך יכול להיות שהפריימרים שנבחרו לא היו מספיק טובים כי הוגבר אזור בגן עם מעט שונות. ואכן לאחר ריצוף שנעשה ל-4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות (טבלה 1 תרביות L,K,G,F) והשוואת רצפים שלהם דרך תוכנת BLAST לרצפים של זנים אחרים של כל חיידק וחיידק, אכן התוצאות הראו שקיים דימיון של 100 אחוז בין זנים שונים של אותו מין החיידק (טבלה 5). לפיכך עבודת מחקר זאת לא הצליחה להוכיח חד משמעית שהתרבית המוספת לדוגמה של החיידק *L. plantarum* MTD1 אכן היא זאת שמשלת על אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב ובדיעבד הופכת לאוכלוסייה הדומיננטית בתחמיץ ולא *L. plantarum* האפיפיטי שנמצא באופן טבעי במספוא המוחמץ.

למרות שעבודת מחקר זאת הצליחה לבסוף לפתח שיטה מולקולארית למעקב ברמת הסוג והמין של חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ, בשימוש אנליזת HRM בשילוב Real Time PCR, עדין יש צורך במחקר נוסף להמשך פיתוח שיטה זאת כמצליחה לעקוב גם אחרי זנים שונים של אותם מיני חיידקי חומצת חלב, כעניין מהותי לבדיקת השתלטות על המיקרופלורה הטבעית האפיפיטית של המספוא המוחמץ על ידי הזן המוסף כתרבית המזרזת

את התהליך ההחמצה. אחד מהאפשרויות כפי שנרמזו לעי"ל, הינה לנתב את ההגברה (Real Time PCR) למקומות (אזורים בגנום החיידקי) שקיים סיכוי מזערי לדימיון בין זנים של אותו מין החיידק, כלדוגמה ה- 16S–23S rRNA internal transcribed spacer (ITS) כפי שמוזכר במאמרם של (Gutiérrez et al. 2013). כדבר אחרון, חשוב לציין שעבודת מחקר זאת התבססה כולה על גידול חיידקי חומצת חלב במצע סלקטיבי לאחר מיצוי מהתחמיצים ומירק הטרי, לפיכך הדומיננטיות שהתקבלה של החיידק *L. plantarum* הינה תואמת את מצב אוכלוסיית חיידקי חומצת על גבי צלחות הגידול ולא המצב האמיתי ששורר בתחמיץ, לפיכך גם ברמה זאת יש צורך לבצע ניסויים עתידיים נוספים שיתמקדו בכלל אוכלוסיית חיידקי חומצת חלב מתחמיצים ישירות {כלומר הפקת DNA מתחמיץ שיכלול גם את האוכלוסיות שלא ניתנות לגידול בתנאי מעבדה (unculturable)}.

לסיכום, שיטת ה- HRM התקבלה כשיטה המצליחה להבחין בין סוגים ומינים שונים של חיידקי חומצת חלב בתחמיצים, ובכך אפשרה לעקוב אחר דינמיקה של חיידקי חומצת חלב במספוא המוחמץ ולהצביע על המין של חיידק חומצת חלב דומיננטי במספוא המוחמץ.

5. רשימת ספרות

אשבל, ג., וינברג, צ., סולומון ר., קלי, י. 1995. שימור מספוא תחמיצים ומוצרי לוואי. מס' קטלוגי 83003. משרד החקלאות. עמודים 1-28.

Association of Official Analytical Chemists (AOAC). 1984. Official Methods of Analysis, 13th Ed. AOAC, Washington, DC.

Barker, B., and Summerson, W. H. 1941. The colorimetric determination of lactic acid in biological material. *Journal of Biological Chemistry*. 138: 535–554.

Cai, X. Q., Yu, H. Q., Ruan, Z.X., Yang, L.L., Bai, J.S., Qiu, D.Y., Jian, Z.H., Xiao, Y.Q., Yang, J. Y., Le, T. H., Zhu, X. Q. 2013. Rapid Detection and Simultaneous Genotyping of *Cronobacter* spp. (formerly *Enterobacter sakazakii*) in Powdered Infant Formula Using Real-time PCR and High Resolution Melting (HRM) Analysis. *PLoS ONE*. 8: 6: e67082.

Cheng, J. C., Huang, C. L., Lin, C. C., Chen, C. C., Chang, Y. C., Chang, S. S., Tseng, C. P. 2006. Rapid Detection and Identification of Clinically Important Bacteria by High-Resolution Melting Analysis after Broad-Range Ribosomal RNA Real-Time PCR. *Clinical Chemistry*. 52: 11: 1997–2004.

Duffner, F., Fitzsimons, A., Brophy, G., O'Kiely, P. and O'Connell, M. 1994. Dominance of *Lactobacillus plantarum* strains in grass silage as demonstrated by a novel competition assay. *Journal of Applied Bacteriology*. 76: 1: 583-591.

Egervarn, M., Roos, S., and Lindmark, H. 2009. Identification and characterization of antibiotic resistance genes in *Lactobacillus reuteri* and *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 1658–1668.

Filya, I., Ashbell, G., Hen, Y., Weinberg, Z.G. 2000. The effect of bacterial inoculants on the fermentation and aerobic stability of whole crop wheat silage. *Animal Feed Science and Technology*. 88: 39-46.

Gory, L., Montel, M.C., Zagorec, M. 2001. Use of green fluorescent protein to monitor *Lactobacillus sakei* in fermented meat products. *FEMS Microbiology Letters*. 194: 127-133.

Gutiérrez, R., Morick, D., Gross, I., Winkler, R., Abdeen, Z., Harrus, S. 2013. Bartonellae in Domestic and Stray Cats from Israel: Comparison of Bacterial Cultures and High-Resolution Melt Real-Time PCR As Diagnostic Methods. *Vector - Borne And Zoonotic Diseases*.13: 12: 857- 864.

Huang, C.H., Chang, M.T., Huang, M. C., Lee, F.L. 2011. Rapid identification of *Lactobacillus plantarum* group using the SNaPshot minisequencing assay. *Systematic and Applied Microbiology*. 34: 586– 589.

Klocke, M., Mundt, K., Idler, C., McEniry, J., O’Kiely, P., Barth, S. 2006. Monitoring *Lactobacillus plantarum* in grass silages with the aid of 16S rDNA-based quantitative real-time PCR assays. *Systematic Applied Microbiology*. 29: 49–58.

Kung, L. Jr., Stokes, M.R., Lin, C.J. 2003. Silage additives. Chapter 7 in: Buxton, D.R., R.E. Muck, and J.J. Harrison. (eds.) *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA.pp. 305-360.

LAB FAQs. Roche Molecular Biochemicals. Find a Quick Solution. 3rd Edition. Roche Applied Science. Mannheim. Germany. 5.1. Preparing Buffers and Media. pp. 149;154.

Li, Y. and Nishino, N. 2011a. Monitoring the bacterial community of maize silage stored in a bunker silo inoculated with *Enterococcus faecium*, *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus buchneri*. *Journal of Applied Microbiology*. 110: 1561-1570.

Li, Y. and Nishino, N. 2011b. Effects of inoculation of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus buchneri* on fermentation, aerobic stability and microbial communities in whole crop corn silage. *Grassland Science*. 57: 184–191.

Mathur, S. and Singh, R. 2005. Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria—a review. *International Journal of Food Microbiology*. 105: 281–295.

Muck, R.E. 2012. Microbiology of ensiling. Proc. of the XVI International Silage Conference, Hameenlinna, Finland, July 2-4. pp. 75-86.

Mulrooney, C. N., and L. Kung, Jr. 2008. The effect of water temperature on the viability of silage inoculants. *Journal of Dairy Science*. 91: 236-240.

Pahlow, G., Muck, R.E., Driehuis, F., Oude Elferink, S.J.W.H., Spoelstra, S.F. 2003. Microbiology of Ensiling. Chapter 2 in: Buxton, D.R., R.E. Muck, and J.J. Harrison. (eds.) *Silage Science and Technology*, American Society of Agronomy, Madison, WI, USA. pp. 31- 93.

Pang, H., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., Cai, Y. 2011a. Natural populations of lactic acid bacteria associated with silage fermentation as determined by phenotype, 16S ribosomal RNA and recA gene analysis. *Systematic and Applied Microbiology*. 34: 235–241.

Pang, H., Zhang, M., Qin, G., Tan, Z., Li, Z., Wang, Y., Cai, Y. 2011b. Identification of lactic acid bacteria isolated from corn stovers. *Animal Science Journal*. 82: 642–653.

Parvin, S. and Nishino, N. 2009. Bacterial community associated with ensilage process of wilted guinea grass. *Journal of Applied Microbiology*. 107: 2029–2036.

Porcellato, D., Grønnevik, H., Rudi, K., Narvhus, J., Skeie, S.B. 2012. Rapid lactic acid bacteria identification in dairy products by high-resolution melt analysis of DGGE bands. *Letters in Applied Microbiology*. 54: 344–351.

Ranjit, N. K., Kung, Jr. L. 2000. The Effect of *Lactobacillus buchneri*, *Lactobacillus plantarum*, or a Chemical Preservative on the Fermentation and Aerobic Stability of Corn Silage. *Journal of Dairy Science*. 83: 3: 526–535.

Rooke, J.A., Bell, S. L., Armstrong, D.G. 1985. The Chemical Composition Of Grass Silages Prepared With And Without Pre-Treatment With Inoculants Containing *Lactobacillus Plantarum*. *Animal Feed Science and Technology*. 13: 269-279.

Sakaridis, I., Ganopoulos, I., Madesis, P., Tsaftaris, A., Argiriou, A. 2014. Genotyping of *Listeria monocytogenes* isolates from poultry carcasses using high resolution melting (HRM) analysis. *Biotechnology and Biotechnological Equipment*. 28: 1: 107–111.

Santos, E.M., Pereira, O.G., Garcia, R., Ferreira, C.L.L.F., Oliveira, J.S., Silva, T.C. 2014. Effect of regrowth interval and a microbial inoculant on the fermentation profile and dry matter recovery of guinea grass silages. *Journal of Dairy Science*. 97: 4423–4432.

Schmidt, R.J., Hu, W., Mills, J.A., Kung, L.J. 2009. The development of lactic acid bacteria and *Lactobacillus buchneri* and their effects on the fermentation of alfalfa silage. *Journal of Dairy Science*. 92: 5005–5010.

Schmidt, R.J., Emara, M.G., Kung, L. J. 2008. The use of a quantitative real-time polymerase chain reaction assay for identification and enumeration of *Lactobacillus buchneri* in silage. *Journal of Applied Microbiology*. 105: 920–929.

Stevenson, D.M., Muck, R.E., Shinnors, K.J., Weimer, P.J. 2005. Use of real time PCR to determine population profiles of individual species of lactic acid bacteria in alfalfa silage and stored corn stover. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 71: 3: 329-338.

Thumu, S. C. R. and Halami, P.M. 2012. Acquired Resistance to *Macrolide–incosamide–Streptogramin* Antibiotics in Lactic Acid Bacteria of Food Origin. *Indian Journal of Microbiology*. 52: 4: 530-537.

Weinberg, Z.G., Chen, Y., Gamburg, M. 2004. The Passage of Lactic Acid Bacteria from Silage into Rumen Fluid, *in vitro* studies. *Journal of Dairy Science*. 87: 3386-3397.

Weinberg, Z.G. and Muck, R.E. 1996. New trends and opportunities in the development and use of inoculants for silage. *FEMS Microbiology Review*. 19: 53-68.

6. נספחים

נספח א. הבחנה בין תרביות חיידקי חומצת חלב המוספות לבין אוכלוסיה האפיפיטית הטבעית בתחמיצים, בשימוש זני *L. plantarum* ATCC 14917 ו *L. plantarum* ATCC 8014, בעלי הגן לעמידות לאריתרומיצין והגן ל-GFP.

טבלה 1 מתארת את השינויים במספר חיידקי חומצת חלב במהלך החמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין. בטבלה זו ניתן לראות באופן כללי שחיידקי חומצת חלב מתחמיצי הביקורת גדלו גם על גבי מצע רוגוזה בנוכחות אנטיביוטיקה. בחומר המוצא הלא מטופל (ביקורת), לא נמצאו חיידקי חומצת חלב כלל במצע בנוכחות אריתרומיצין ואילו ביום 14 הגיעו עד $CFU = 7.53 \log$. בטיפול עם *L. plantarum* ATCC 8014 בד"כ לא היו הבדלים מובהקים במספרי הלקטובצילים בין מצע שהכיל אריתרומיצין ובין מצע ללא האנטיביוטיקה, למעט בסוף החמצה (יום 51). לעומת זאת בטיפול עם *L. plantarum* ATCC 14917 התקבלו יותר הבדלים מובהקים בין מצע עם ובלי אריתרומיצין בימים 2, 5 וה-30 להחמצת חיטה בשלב מילוי גרעין.

טבלה 1. מספר חיידקי חומצת חלב לאחר טיפולים שונים במצע רוגוזה עם או בלי אנטיביוטיקה במהלך החמצת חיטה

(התוצאות מבוטאות כמספר הלוגוריתמוס של היחידות יוצרות המושבות לג' ח"י)

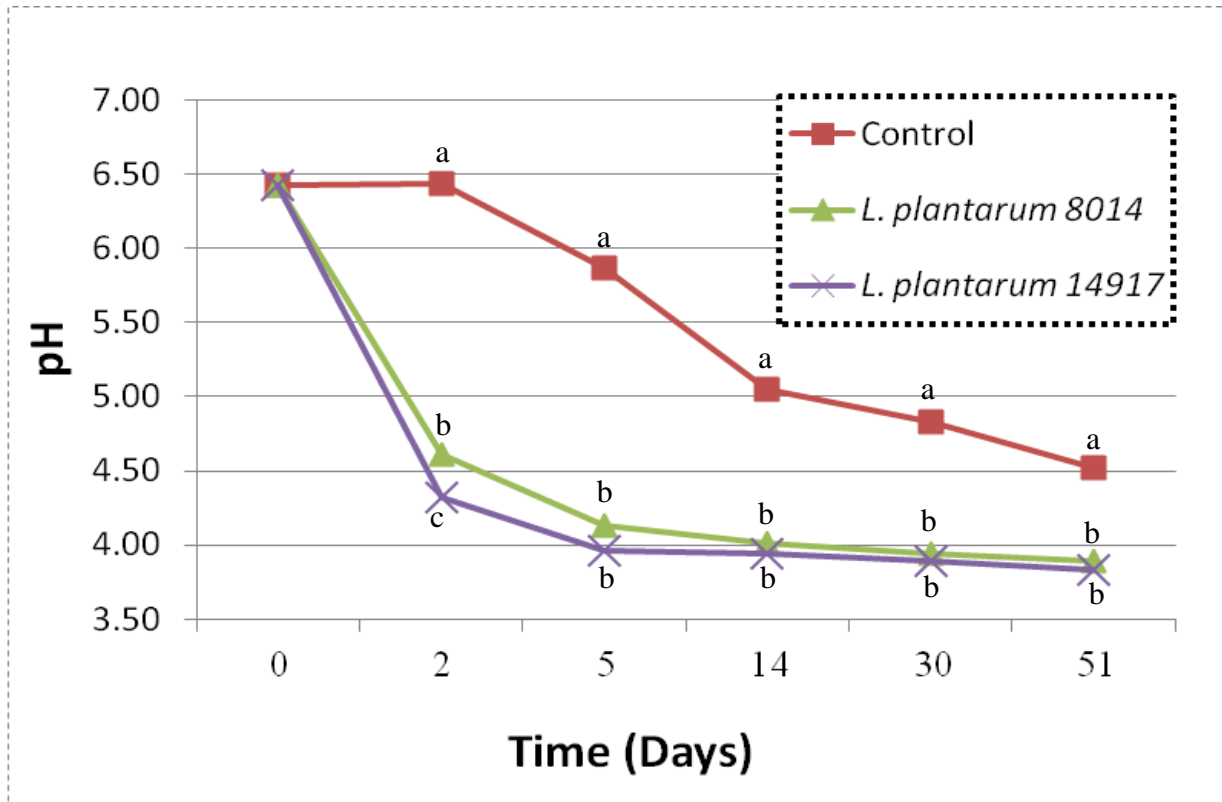
יום 51	יום 30	יום 14	יום 5	יום 2	חומר מוצא יום אפס	מועדי דיגום	
						מצע גידול*	טיפול
6.55 ^a	7.68 ^a	8.27 ^a	8.20 ^a	7.55 ^a	2.04	-	Control
4.19 ^b	6.16 ^b	7.53 ^b	7.17 ^b	5.69 ^b	0.00	+	Control
6.40 ^a	7.95	9.13	9.41	9.37	6.59	-	<i>L. plantarum</i> 8014
5.07 ^b	7.42	9.08	9.30	9.27	6.47	+	<i>L. plantarum</i> 8014
3.25	6.51 ^a	8.23	9.34 ^a	9.63 ^a	7.57	-	<i>L. plantarum</i> 14917
2.55	5.72 ^b	8.12	8.98 ^b	9.10 ^b	7.40	+	<i>L. plantarum</i> 14917

בכל מועד דיגום, ולכל טיפול בנפרד, ממוצעים המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ביחס לנוכחות

אנטיביוטיקה במצע הגידול ($p < 0.05$).

* מצע גידול רוגוזה עם אנטיביוטיקה אריתרומיצין (+) / ללא אנטיביוטיקה אריתרומיצין (-).

איור 1 מתאר את שינוי ה-pH במהלך החמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין. באיור זה ניתן לראות שבהמהלך החמצה היתה ירידה ב-pH בכל הטיפולים. לאורך כל תקופת החמצה היה הבדל מובהק בין ה-pH של טיפול הביקורת ובין הטיפולים עם זני *L. plantarum*. כבר אחרי יומיים בטיפולים עם זני *L. plantarum*, ערכי ה-pH הגיעו מתחת ל-5.0 ואילו בטיפול ביקורת ה-pH היה 6.45. לאחר 14 ימי החמצה, ערכי ה-pH הגיעו לכ-4.0 בטיפולים עם זני *L. plantarum* ואילו בטיפול הביקורת ל-pH=5.0. בסיום החמצת החיטה בשלב מילוי גרעין (יום 51), ערכי ה-pH בטיפולים עם זני *L. plantarum* הגיעו ל-3.80 ואילו בטיפול הביקורת ל-pH=4.50.



איור 1. שינוי ה-pH לאורך החמצת חיטה בטיפולים השונים. הטיפולים: ביקורת (Control) - אדום; *L. plantarum* 8014 - ירוק; *L. plantarum* 14917 - סגול. ממוצעים עבור כל יום החמצה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

טבלה 2 מתארת את הרכב תחמיצי החיטה הסופיים לאחר 51 ימי החמצה של חיטה בשלב מילוי גרעין. בתוצרי התסיסה ניתן לראות באופן כללי שחומצה לקטית היתה תוצר התסיסה מרכזי ללא תלות בטיפול. כאשר חומצה לקטית התקבלה יותר באופן מובהק בשני טיפולים עם זני *L. plantarum* לעומת טיפול הביקורת. אולם רמת אתנול וחומצה בוטירית היתה גבוהה יותר באופן מובהק בטיפול הביקורת לעומת בשני הטיפולים עם זני *L. plantarum*.

טבלה 2. הרכב תחמיצי החיטה הסופיים מיום 51 (מבוטאים כאחוז בח"י)

<i>L. plantarum</i> 14917	<i>L. plantarum</i> 8014	Control	טיפול
33.7 ^a	33.4 ^a	31.2 ^b	פרמטר נבדק
3.8 ^b	3.9 ^b	4.5 ^a	חומר יבש (אחוז)
6.7 ^a	6.5 ^a	4.5 ^b	pH
0.4	0.3	0.5	חומצה לקטית
0.0 ^b	0.1 ^b	0.2 ^a	חומצת אצטית
0.0 ^b	0.2 ^b	1.1 ^a	חומצה פרופיונית
0.7 ^b	0.9 ^b	1.8 ^a	חומצה בוטירית
			אתנול

ממוצעים בכל שורה המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ($p < 0.05$).

טבלה 3 מתארת את השינויים במספר חיידקי חומצת חלב במהלך החמצה של תירס. בניסוי זה ניתן לראות שבתחמיצי הביקורת חיידקי חומצת חלב גדלו גם על גבי מצע רוגוזה שהכיל אריתרומיצין. למרות שניתן לראות שיש הבדל מובהק במספר יחידות יוצרות מושבות בין גידול על מצע עם ובלי אריתרומיצין. לאחר 4 ימים הגיעו חיידקי חומצת חלב לערך של $\log_{10}\text{CFU/g}_{\text{DM}} = 7.19$ בגידול על גבי מצע רוגוזה עם אריתרומיצין. בטיפולים עם שני זני *L. plantarum* כמו כן ניתן לראות הבדל מובהק בין גידול במצע עם ובלי אנטיביוטיקה, לאורך כל תקופת החמצת התירס.

טבלה 3. מספר חיידקי חומצת חלב בטיפולים השונים במצע רוגוזה עם או בלי אנטיביוטיקה במהלך החמצת תירס

(התוצאות מבוטאות כמספר הלוגריתמוס של היחידות יוצרות המושבות לג' ח"י)

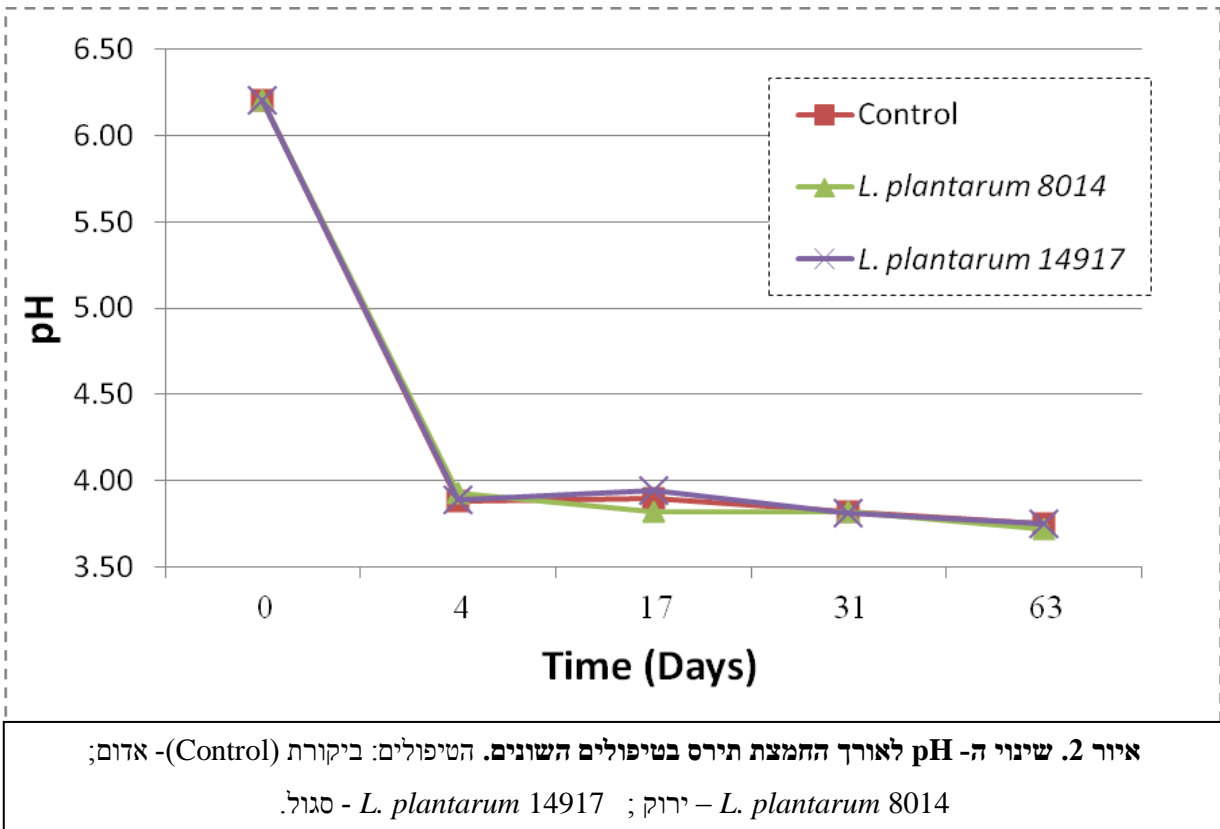
יום 63	יום 31	יום 17	יום 4	חומר מוצא יום אפס	מועדי דיגום	
					*מצע גידול	טיפול
6.52 ^a	6.77 ^a	7.45 ^a	9.20 ^a	5.55 ^a	-	Control
4.53 ^b	6.14 ^b	6.75 ^b	7.19 ^b	1.59 ^b	+	Control
5.70 ^a	7.26 ^a	7.94 ^a	8.98 ^a	7.76 ^a	-	<i>L. plantarum</i> 8014
3.38 ^b	6.78 ^b	7.40 ^b	7.65 ^b	5.07 ^b	+	<i>L. plantarum</i> 8014
5.74 ^a	6.91 ^a	7.50 ^a	9.11 ^a	7.77 ^a	-	<i>L. plantarum</i> 14917
3.81 ^b	5.80 ^b	6.72 ^b	8.52 ^b	7.04 ^b	+	<i>L. plantarum</i> 14917

בכל מועד דיגום, ולכל טיפול בנפרד, ממוצעים המלווים באותיות שונות נבדלים באופן מובהק ביחס לנוכחות

אנטיביוטיקה במצע הגידול ($p < 0.05$).

* מצע גידול רוגוזה עם אנטיביוטיקה אריתרומיצין (+) / ללא אנטיביוטיקה אריתרומיצין (-).

איור 2 מתאר את שינוי ה-pH המתרחשים במהלך החמצת התירס. באיור זה ניתן לראות שהיתה ירידה חדה ב-pH כבר אחרי 4 ימים שעמד על 3.9~. בכל הטיפולים, כאשר ה-pH ההתחלתי של התירס הטרי היה 6.2.



טבלה 4 מתארת את הרכב תחמיצי התירס הסופיים לאחר 63 ימי החמצה. ללא תלות בטיפול שנעשה, ניתן לראות שתוצר התסיסה המרכזי הינו חומצה לקטית כאשר אין הבדלים מובהקים ברמת חומצה לקטית בין הטיפולים השונים. ניתן לראות כמו כן נוכחות של אתנול וחומצה אצטית אולם ברמות נמוכות יותר בהשוואה לחומצה לקטית.

טבלה 4. הרכב תחמיצי התירס הסופיים מיום 63 (מבוטאים כאחוז בה"י)

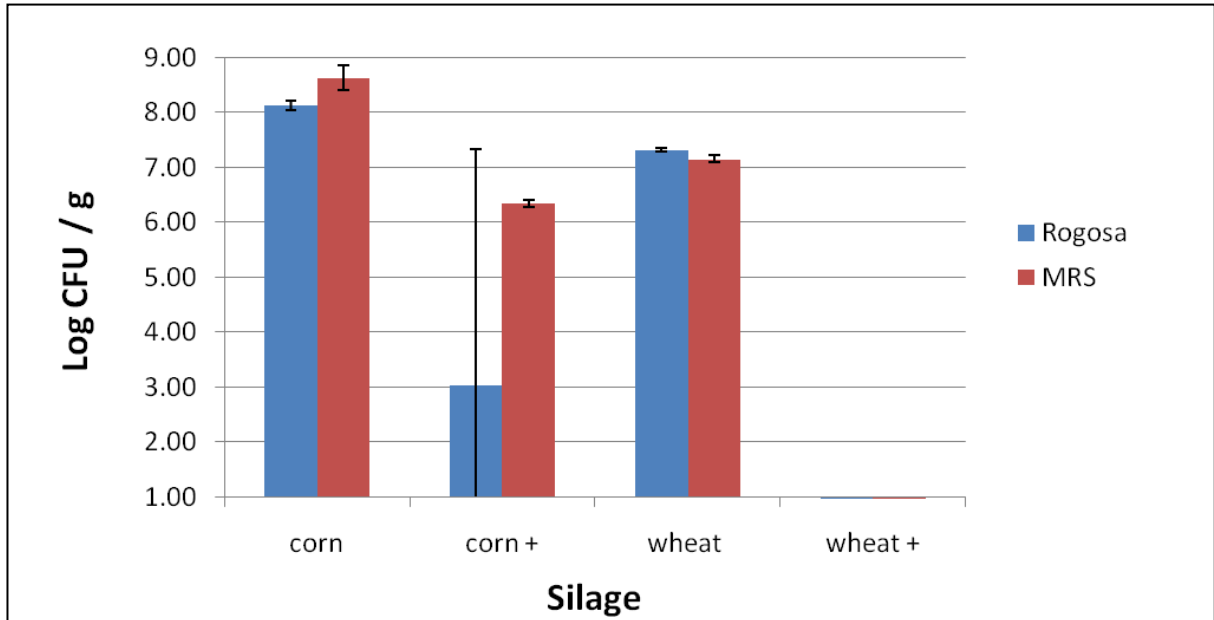
<i>L. plantarum</i> 14917	<i>L. plantarum</i> 8014	Control	טיפול
			פרמטר נבדק
37.1	36.7	36.5	חומר יבש (אחוז)
3.8	3.7	3.8	pH
6.1	5.8	6.0	חומצה לקטית
1.3	1.6	1.6	חומצת אצטית
-	-	-	חומצה פרופיונית
-	-	-	חומצה בוטירית
3.0	0.9	3.9	אתנול

(-) חומצה פרופיונית ובוטירית לא נמצאו.

מתוצאות לעיל (טבלאות 1,3) המראים שבתחמיצי הביקורת התפתחו מושבות במצעים שהכילו אנטיביוטיקה אריתרומיצין ולאור העובדה שמהתחמיצים המטופלים, המושבות שהתפתחו במצע לא ביטאו את הזוהר שהיה אמור להתקבל תחת אור UV, הביאו לכך שהשיטה של שימוש בזני חיידקי חומצת חלב רקומבננטים התבררה כלא יעילה.

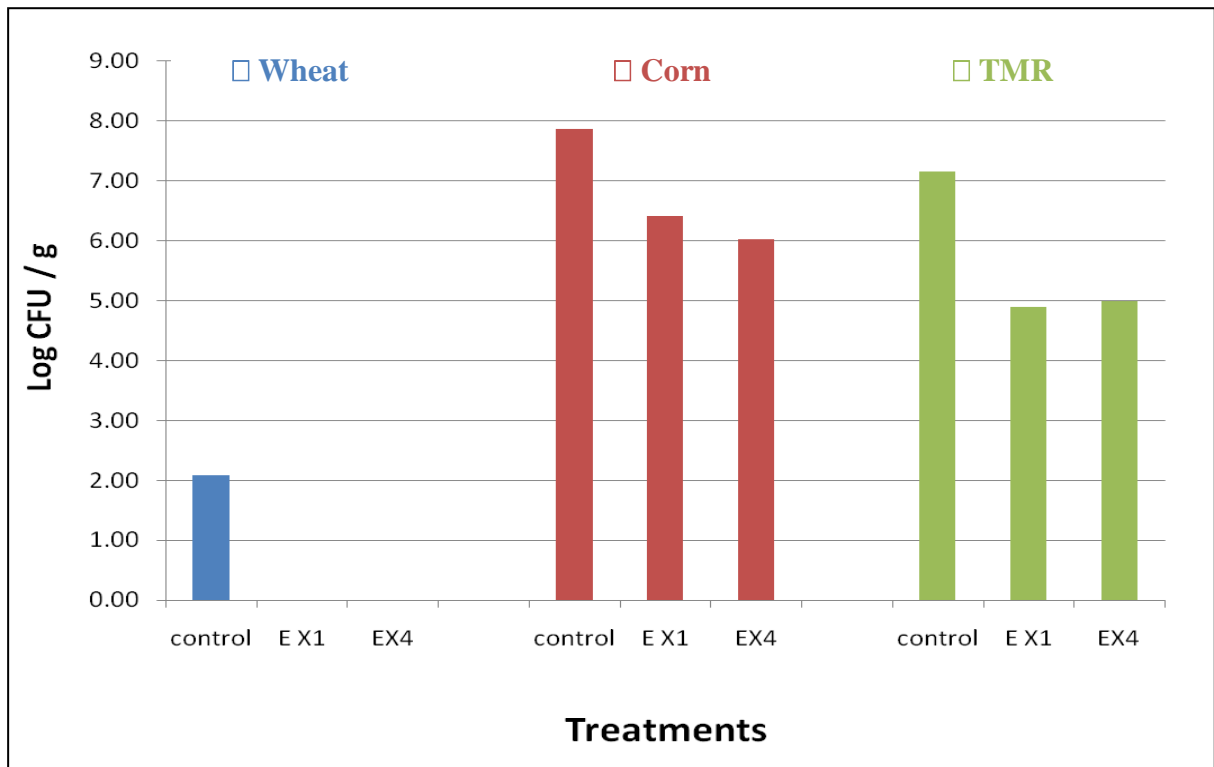
נספח ב. בחינת חיידקי חומצת חלב מתחמיצים משקיים לעמידות לאנטיביוטיקת אריתרומיצין.

איור 3 מתאר השפעת מצע גידול עם או ללא אנטיביוטיקה על מספר חיידקי חומצת חלב שמוצו קודם לכן מ 2 סוגי מספוא מסחריים: תחמיץ חיטה (wheat), pH=4.31; תחמיץ תירס (corn), pH=4.81. באיור זה ניתן לראות שמספר חיידקי חומצת חלב יוצרי מושבות לגרם חומר איננה שונה באופן מובהק בין גידול על מצע רוגוזה או MRS. חיידקי חומצת חלב שמוצו מתחמיץ חיטה לא גדלו כלל בנוכחות אריתרומיצין, ללא תלות במצע. אולם חיידקי חומצת חלב מתחמיץ תירס אכן גדלו במצעים בנוכחות אריתרומיצין, ומספרי הלוגריתמים של היחידות יוצרות המושבות פר גרם תחמיץ היו מעל 6.0 ו 3.0 במצע MRS ורוגוזה, בהתאמה. כל החישובים התבססו על שתי חזרות וברמת מובהקות של $p < 0.05$.



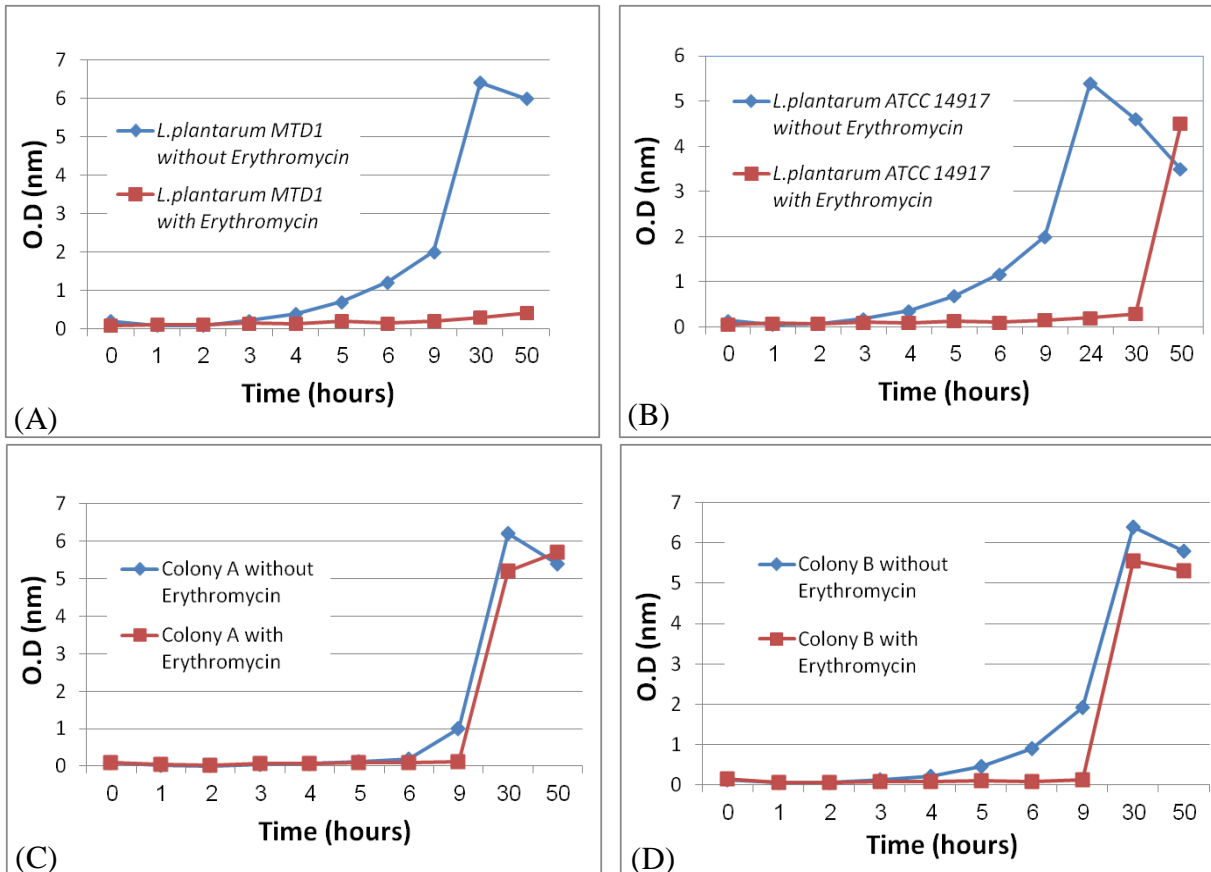
איור 3. מספר חיידקי חומצת חלב (log CFU/g) מתחמיץ חיטה ותחמיץ תירס, אשר גדלו במצע רוגוזה ובמצע MRS. כל מצע גידול נבחן ללא תוספת אנטיביוטיקה אריתרומיצין או בהוספת אנטיביוטיקה אריתרומיצין (+) בריכוז 50 מיליגרם למ"ל.

איור 4 מתאר את השפעת ריכוז האנטיביוטיקה במצע רוגוזה, על גידול חיידקי חומצת חלב שמוצו קודם לכן מ-3 סוגי מספוא מסחריים: תחמיץ חיטה (Wheat), pH=3.83; תחמיץ תירס (Corn), pH=3.89; לביל (TMR), pH=4.87. באיור זה ניתן לראות שחיידקי חומצת חלב שמוצו מתחמיץ חיטה (Wheat), לא גדלו כלל בנוכחות אנטיביוטיקה אריתרומיצין. חיידקי חומצת חלב שמוצו מתחמיץ תירס (Corn), ומביל (TMR) גדלו, בשני ריכוזי האריתרומיצין המוסף, ברמת $\log_{10} \text{CFU/g DM} = 5.0-6.0$.



איור 4. מספר חיידקי חומצת חלב (log CFU/g) מתחמיצי חיטה, תירס ומביל, אשר גדלו במצע רוגוזה ללא תוספת אריתרומיצין (control), בנוכחות 50 מיליגרם למ"ל אריתרומיצין (EX1) ובנוכחות 200 מיליגרם למ"ל אריתרומיצין (EX4).

איור 5 מתאר עקומות גידול שמושפעות מנוכחות אנטיביוטיקה אריתרומיצין במצע, על גידול חיידקי חומצת חלב שמוצו מתחמיץ תירס משקי ובהשוואה לעקומת גידול של החיידק *L. plantarum* MTD1 והחיידק *L. plantarum* ATCC 14917 (בעל העמידות לאנטיביוטיקה לכאורה). באיור זה בחלון A, ניתן לראות שהחיידק *L. plantarum* MTD1 לא הצליח לגדול במשך ההדגרה במצע עם אריתרומיצין, לעומתו החיידק *L. plantarum* ATCC 14917 כן הצליח לגדול במצע עם אריתרומיצין לאחר 50 שעות של אינקובציה (חלון B). מבחינת חיידקי חומצת חלב מתחמיץ תירס המשקי ניתן לראות ששתי המושבות שנדגמו הצליחו לגדול בנוכחות אריתרומיצין מעל 30 שעות (חלונות C,D).



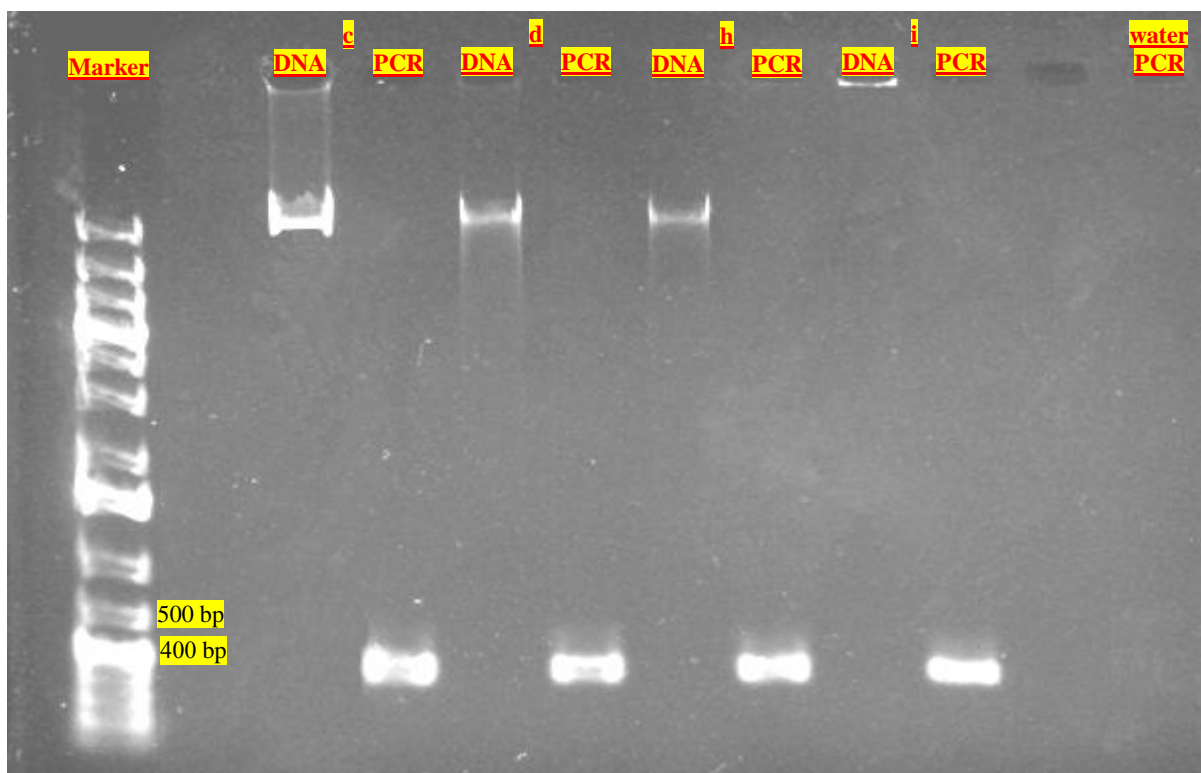
איור 5. עקומת גידול של חיידקי חומצת חלב לאורך 50 שעות במצע Lactobacilli MRS Broth ללא תוספת אנטיביוטיקה אריתרומיצין (כחול) או עם תוספת אנטיביוטיקה אריתרומיצין (אדום) למצע הגידול בריכוז 50 מיליגרם למ"ל. (A) עקומת גידול של החיידק *L. plantarum* MTD1. (B) עקומת גידול של החיידק *L. plantarum* ATCC 14917. (C) עקומת גידול של מושבה A - המייצגת חיידק חומצת חלב מתחמיץ תירס משקי. (D) עקומת גידול של מושבה B - המייצגת חיידק חומצת חלב מתחמיץ תירס משקי.

מתוצאות לעיל (איורים 3-5) ניתן לראות שקיימת עמידות לאנטיביוטיקה אריתרומיצין בחיידקי חומצת חלב אפיפיטיים הנמצאים באופן טבעי במספוא המוחמיץ.

נספח ג. תוצאות ג'ל אלקטרופורזיה לאחר הגברה של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות

ב- Real Time PCR

איור 6 מתאר את גודל המקטע שהתקבל של 4 תרביות חיידקי חומצת חלב טהורות לאחר הגברה במערכת של Real Time PCR. כל המקטעים המוגברים שהתקבלו היו בגודל מוערך ל 349 bp התואם לגודל המקטע המוגבר האמור להתקבל בשימוש סט הפריימרים LAC2 - LAC4.



איור 6. הרצה בג'ל אלקטרופורזיה דוגמאות DNA של תרביות חיידקי חומצת חלב שונות, תוצרי PCR שלהם ומים (water) כביקורת.

Marker – משמש כמרקר של Gene Ruler 1Kb Plus DNA Ladder.

תרביות החיידקים הינם: *L.plantarum* MTD1 (c) ; *E. faecium* Q (h) ; *P.pentosaceus* (d) ; *L.buchneri* (i).

נספח ד. השוואה בין רצפים של 4 תרבויות חיידקי חומצת חלב טהורות

המלבנים האדומים בכל האיורים הבאים (איור 7-12) מסמנים את האזור בו יש הבדל בבסיס בין הרצפים שמשווים.

Lactobacillus plantarum MTD1 - *Pediococcus pentosaceus*

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
551 bits(298)	1e-161	332/349(95%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC				120
Sbjct 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTGTAAAGAAGAACGTTGGTAAAGAGTAAC				120
Query 121	TGTTCAAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Sbjct 121	TGTTTACCCAGTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG				240
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG				240
Query 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Sbjct 241	TCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Query 301	AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349

איור 7: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *L. plantarum* MTD1 לחיידק *P. pentosaceus*

Lactobacillus plantarum MTD1 - *Enterococcus faecium* Q

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
490 bits(265)	3e-143	321/349(92%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCGCAATGGACGAAAGTCTGATCCGAGCAACGCCCGTGAG				60
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTGTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC				120
Sbjct 61	TGAAGAAGGTTTCGGATCGTAAACTCTGTGTAAAGAAGAACAGGATGAGAGTAAC				120
Query 121	TGTTCAAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Sbjct 121	TGTTCAATCCCTTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG				240
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG				240
Query 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Sbjct 241	TTTTCTAAGTCTGATGTGAAAGCCCGCGCTCAACCGGGAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Query 301	AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349

איור 8: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *L. plantarum* MTD1 לחיידק *E. faecium* Q

Lactobacillus plantarum MTD1 - Lactobacillus buchneri

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
542 bits(293)	7e-159	330/349(95%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATCTCTGAGAGTAAC				120
Sbjct 61	TGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAAGGTGTCAGAGTAAC				120
Query 121	TGTTTCAGGTTATGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Sbjct 121	TGTTTCAGGTTATGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG				240
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG				240
Query 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Sbjct 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Query 301	AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349
Sbjct 301	GNCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349

איור 9: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *L. plantarum* MTD1 לחיידק *L. buchneri*

Pediococcus pentosaceus - Enterococcus faecium Q

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
473 bits(256)	3e-138	318/349(91%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCCGTGAG				60
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATCTCTGAGAGTAAC				120
Sbjct 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACAATCTCTGAGAGTAAC				120
Query 121	TGTTTCAGGTTATGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Sbjct 121	TGTTTCAGGTTATGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC				180
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG				240
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCGG				240
Query 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Sbjct 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA				300
Query 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT				349

איור 10: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *P. pentosaceus* לחיידק *E. faecium* Q

Pediococcus pentosaceus - Lactobacillus buchneri

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
508 bits(275)	7e-149	324/349(93%)	0/349(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG			60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG			60
Query 61	TGAAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTGTTTAAAGAAGAACGTGGSTAAGAGTAAC			120
Sbjct 61	TGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTGTTTGGAGAAGAACAGTGTCCAGAGTAAC			120
Query 121	TGTTTACCCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC			180
Sbjct 121	TGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC			180
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG			240
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG			240
Query 241	TCTTTTAAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA			300
Sbjct 241	TTTTTTAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA			300
Query 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT			349
Sbjct 301	GNCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT			349

איור 11: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *P. pentosaceus* לחיידק *L. buchneri*

Enterococcus faecium Q - Lactobacillus buchneri

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
475 bits(257)	7e-139	320/351(91%)	4/351(1%)	Plus/Plus
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG			60
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG			60
Query 61	TGAAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTGTTTAAAGAAGAACAGTGTCCAGAGTA			118
Sbjct 61	TGATGAAGGGTTTCGGCTCGTAAACTCTGTGTTTGGAGAAGAACAGTGTCCAGAGTA			118
Query 119	ACTGTTTACATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC			178
Sbjct 119	ACTGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCC			178
Query 179	GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC			238
Sbjct 179	GCGGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGC			238
Query 239	GGTTTCTTAAAGTCTGATGTGAAAGCCCGGGCTCAACCGGGGAGGGTTCATCGGAAACTGG			298
Sbjct 239	GGTTTTTTAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACTGG			298
Query 299	GAGACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT			349
Sbjct 299	GAGNCTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT			349

איור 12: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *E. faecium* Q לחיידק *L. buchneri*

נספח ה. השוואה בין רצפי DNA של זנים שונים מאותם מיני חיידקי חומצת חלב

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
645 bits(349)	0.0	349/349(100%)	0/349(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60		
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60		
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC	120		
Sbjct 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTAAAGAAGAACATATCTGAGAGTAAC	120		
Query 121	TGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180		
Sbjct 121	TGTTTCAGGTATTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180		
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240		
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240		
Query 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA	300		
Sbjct 241	TTTTTTAAGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATCGGAAACTGGGA	300		
Query 301	AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349		
Sbjct 301	AACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349		

איור 13: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *L. plantarum* MTD1

לחיידק *L. plantarum* UCMA 3037

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
645 bits(349)	0.0	349/349(100%)	0/349(0%)	Plus/Plus
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60		
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGCAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60		
Query 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAAC	120		
Sbjct 61	TGAAGAAGGGTTTCGGCTCGTAAAGCTCTGTTGTTAAAGAAGAACGTGGGTAAGAGTAAC	120		
Query 121	TGTTTACCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180		
Sbjct 121	TGTTTACCAGTGACGGTATTTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180		
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240		
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTATCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240		
Query 241	TCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGA	300		
Sbjct 241	TCTTTTAAGTCTAATGTGAAAGCCTTCGGCTCAACCGAAGAAGTGCATTGGAAACTGGGA	300		
Query 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349		
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349		

איור 14: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *P. pentosaceus*

לחיידק *P. pentosaceus* 0905CN2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
645 bits(349)	0.0	349/349(100%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG	60			
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCGGCAATGGACGAAAGTCTGACCGAGCAACGCCGCGTGAG	60			
Query 61	TGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAC	120			
Sbjct 61	TGAAGAAGGTTTTTCGGATCGTAAAACTCTGTTGTTAGAGAAGAACAAGGATGAGAGTAAC	120			
Query 121	TGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180			
Sbjct 121	TGTTTCATCCCTTGACGGTATCTAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180			
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240			
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240			
Query 241	TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA	300			
Sbjct 241	TTTCTTAAGTCTGATGTGAAAGCCCCGGCTCAACCGGGAGGGTCATTGGAAACTGGGA	300			
Query 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT	349			
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGAGAGTGGAAATTCATGTGTAGCGGTGAAAT	349			

איור 15: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *E. faecium* Q לחיידק *E. faecium* FS088

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
641 bits(347)	0.0	348/349(99%)	0/349(0%)	Plus/Plus	
Query 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60			
Sbjct 1	AGGCAGCAGTAGGGAATCTTCCACAATGGACGAAAGTCTGATGGAGCAACGCCGCGTGAG	60			
Query 61	TGATGAAGGGTTTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAAGGTGTCAGAGTAAC	120			
Sbjct 61	TGATGAAGGGTTTTTCGGCTCGTAAAACTCTGTTGTTGGAGAAGAACAAGGTGTCAGAGTAAC	120			
Query 121	TGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180			
Sbjct 121	TGTTGACATCTTGACGGTATCCAACCAGAAAGCCACGGCTAACTACGTGCCAGCAGCCGC	180			
Query 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240			
Sbjct 181	GGTAATACGTAGGTGGCAAGCGTTGTCCGGATTTATTGGGCGTAAAGCGAGCGCAGGCCG	240			
Query 241	TTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGA	300			
Sbjct 241	TTTTTTAGGTCTGATGTGAAAGCCTTCGGCTTAACCGGAGAAGTGCATCGGAAACCGGGA	300			
Query 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349			
Sbjct 301	GACTTGAGTGCAGAAGAGGACAGTGGAACTCCATGTGTAGCGGTGAAAT	349			

איור 16: השוואה בין רצף ה-DNA של החיידק *L. buchneri* OPY-2 לחיידק *L. buchneri*

המלבן האדום מסמן את האזור עם הבסיס השונה בין הרצפים שמשוים.

practice, two ensiling experiments of wheat at the stage of grain filling were performed in anaerobic glass jars. In the first experiment, the wheat was inoculated separately with *L. plantarum* MTD1 and *E. faecium* Q, while in the second experiment a combined treatment of both cultures was also included. Silages that were not treated were used as control. Triplicate jars per treatment were sampled on different dates during storage. In the first experiment, colonies were picked randomly in order to evaluate which populations of LAB exist, and in the second experiment sampling of all colonies from respective plates were performed in order to determine the dominant LAB population.

The results from the first experiment showed a variety of LAB populations and that they changed according to the changes in pH during the ensiling of the wheat. The second experiment showed similar results with regard to the existence of different lactic acid bacteria populations, when colony sampling was done randomly. However, when all the colonies were sampled from given plates, the dominance of the *L. plantarum* showed up during the ensiling of the wheat, especially in wheat silages treated with *L. plantarum* MTD1.

After it has been proven that the HRM analysis distinguished between LAB species in silage, we tested this method in order to distinguish between strains of the same species. Such distinction would enable to tell epiphytic LAB strains from added inoculants. Results indicated that the HRM analysis was not able to distinguish between different strains of the same species of LAB. From the results, it was not possible to conclude if the melting curve profile of the *L. plantarum* from the silage belongs to the bacterial culture that was added to the fresh crop or to the epiphytic *L. plantarum* found naturally in the ensiled crop. At the same time, sequencing of 4 bacterial cultures that were used as reference, were compared using the BLAST program. From the comparison, it turned out, for example, that there is a 100% match between *L. plantarum* MTD1 to other strains from this species.

From the results based on the primers used in the current study, it is concluded that the HRM analysis for lactic acid bacteria in silages enables to follow the dynamics of lactic acid bacteria population up to the genus and species level, but it cannot distinguish between strains of the same LAB species.

Abstract

Silage is a product of forage preservation process by which moist plant material is subjected to an anaerobic fermentation. During this process, lactic acid bacteria (LAB) convert water-soluble carbohydrates into organic acids, mainly lactic acid. As a result, the pH decreases, inhibiting spoilage processes as long as the silage is not exposed to air. The number of epiphytic LAB naturally found in forage plants is very small. However, in silage preparation it is specifically required that LAB become the dominant microflora because they produce lactic acid which is the main preservation factor in silages. In order to enhance the ensiling fermentation, silage additives were developed which comprise cultures of the *Lactobacillus plantarum* and other homofermentative LAB. These cultures should become the dominant population in the silage and by this ensure a rapid and efficient fermentation of the forage crop. Results from various studies have shown that *L. plantarum* does not always affect the ensiling process due to rapid development of the epiphytic LAB, naturally found in the forage. Even if this inoculant has an effect, it does not always inhibit the secondary fermentation caused by clostridia, and sometimes it detracts the aerobic stability of the silage. For these reasons, techniques which enable to follow the dynamic of lactic acid bacteria during the ensiling fermentation and give an insight on the effects of added LAB inoculants, would be useful.

The objective of this work was to develop a molecular technique to follow the dynamics of lactic acid bacteria during ensiling of forage crops.

Following the publication of Porcellato et al. (2012) we decided to focus on Real Time PCR combined with High Resolution Melt (HRM) analysis which is based on difference in gene sequence in order to follow the dynamics of LAB in silage. The basis of the method is similar to the usual melting curve but the uniqueness of the HRM analysis is in its capability to point out a single nucleotide polymorphism when the amplified DNA went through melting process. This technique is supposed to better distinguish between different species of lactic acid bacteria and also different strains of the same species in food commodities and in silage.

It was hypothesized that this technique would enable to distinguish between the added bacterial cultures and the epiphytic LAB naturally found in the ensiled forage. In the first stage, primers were chosen for the V3 region in the 16S rDNA gene for getting different melting curves from DNA that were extracted from 4 lactic acid bacterial cultures:

L. plantarum MTD1, *E. faecium* Q, *L. buchneri*, *P. pentosaceus*. These curves were used as references, to which samples from silages were compared. To examine the HRM analysis in

**Development of a molecular technique to follow
the dynamics of lactic acid bacteria population
in ensiled crops**

M.Sc. Thesis

Submitted to the Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food
& Environment

The Hebrew University of Jerusalem

**For The Degree
'Master of Agriculture Science'**

By
Svetlana Ogiy