

השפעת תנאים סביבתיים על התפתחות ביופילם של

***Pseudomonas aeruginosa* החיידק**

במצע גרנולרי

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה

של האוניברסיטה העברית בירושלים

במסגרת החוג לביוכימיה ומדעי המזון

לשם קבלת תואר "מוסמך במדעי החקלאות"

מאת

יוליה רול

אוגוסט 2007

רחובות

אלול, תשס"ז

עבודה זו נעשתה בהדרכתם של:

ד"ר שלמה סלע, המחלקה למדעי המזון וד"ר שמוליק פרידמן, המחלקה לפיסיקה סביבתית והשקיה, מינהל
המחקר החקלאי, מרכז וולקני.

הבעת תודה

למדריכי

ד"ר שלומה סלע וד"ר שמוליק פרידמן על ההדרכה המסורה בכל שלבי העבודה, הרעיונות, הסבלנות והעזרה
בפתרון הבעיות.

לריקי פינטו על העזרה והתמיכה היום יומית.

לאדי בלאוסוב על העבודה במיקרוסקופ הקונפוקלי.

לבוריס נפטלייב על העזרה בהרכבה ופירוק של מערכת זרימה.

לצוות המעבדה של ד"ר שלמה סלע: יוליה כץ, שמוליק פרנק, דנה רויז, מיכל וייס על העצות והתמיכה.

לבעלי, יובל, על העידוד ואהבה וגם על כך שנשאר איתי במעבדה בניסויים שנמשכו עד הבוקר.

להוריי על העידוד והתמיכה לאורך כל הדרך.

תוכן עניינים:

7 תקציר	
9 1. סקירת ספרות	
9 1.1. קרקע כמערכת נקבובית	
9 1.2. ביופילם בקרקעות רוויות ולא רוויות	
11 1.3. אינטראקציה בין חיידקים לקרקע	
14 2. חומרים ושיטות	
16 2.1. מיקרוסקופיה קונפוקלית	
16 2.2. שמירת החיידקים	
16 2.3. גידול החיידקים	
17 2.4. ספירת חיידקים	
17 2.5. מודל גידול חיידקים	
18 2.6. יצירת ביופילם בפלטות ELISA, 96 בארות	
18 2.7. ניתוק חיידקים ממצעים גרנולריים	
19 2.8. קביעת המסה הבקטריאלית ע"י בדיקת חלבון, צפיפות אופטית וספירה חיה	
22 2.9. גידול חיידקים במצע גרנולרי בדרגות רוויה שונות	
22 2.9.1. במערכת סגורה	
23 2.9.2. במערכת זרימה	
26 3. תוצאות ודיון	
26 3.1. גידול חיידקים במצע נוזלי (M63+0.4% citrate) בריכוזים שונים	
27 3.2. אפיון ויצירת ביופילם על משטחים הידרופיליים במצעי מזון שונים	
29 3.3. השפעת תכולת הרטיבות של החול על גידול החיידקים במערכת סטטית סגורה	
29 3.3.1. השפעה של ריכוז הנוטריאנטים	
36 3.3.2. שינויים פנוטיפיים בחיידק עם הזמן	
37 3.3.3. השפעת נוכחות גרגרי חול על התרבות החיידקים	
37 3.3.4. השפעת גודל גרגרי החול	
39 3.3.5. השפעת גודל המזרע	
41 3.3.6. השפעת הטמפרטורה	
43 3.4. השפעת תכולת רטיבות במערכת זרימה	
43 3.4.1. גידול החיידקים ואיטום ביולוגי	
44 3.4.2. השפעת ריכוז הנוטריאנטים	
48 3.4.3. השפעת שטף המים	
52 3.4.4. השפעת סוג המצע הגרנולרי	
54 3.4.5. השפעת אורך העמודה	
55 3.4.6. התרבות חיידקים בעמודה קרובה לרוויה	
57 4. סיכום ומסקנות	
57 4.1. השפעת תכולת רטיבות על גידול חיידקים במערכת סטטית, סגורה	
57 4.2. השפעת תכולת רטיבות על גידול חיידקים במערכת זרימה	
59 5. רשימת ספרות	
64 6. תקציר באנגלית	

AO -Acridine Orange
 ATCC –American Type Culture Collection
 AW -Air Water interface
 AWS -Air Water Solid phases
 $A \text{ (cm}^2\text{)} = \pi d^2/4$ (cross-sectional area)
 B_0 (CFU/ml) (initial inoculum concentration)
 B_{\max} (CFU/ml) (maximal value of bacterial population)
 CFU -Colony Forming Units
 CFW -Calcofluor White
 CLSM -Confocal Laser Scanning Microscopy
 DTAF -5-[4,6-dichlorotriazin-2-yl] aminofluorescein
 EPS -Extracellular Polymeric Substances
 FITC -Fluorescein isothiocyanate
 H_2-H_1 (cm) (hydraulic drop)
 K (cm/min) (hydraulic conductivity)
 LB -Luria Bertani broth
 L (cm) (length)
 M_s (g) (mass of solid particles)
 μ_{\max} (maximal specific growth rate)
 N.A. -Nutrient Amount
 N.C.-Nutrient Concentration
 N.M. –Nutrient Mass
 $n=1- \rho_b/ \rho_s$ (porosity)
 O.D.-Optical Density
 P.A –Protein Assay
 PBS -Phosphate Buffered Saline
 PI -Propidium Iodide -red fluorescent nucleic acid stain
 ρ_b (g/cm³) (bulk density)
 ρ_s (g/cm³) (particle density)
 $q=Q/A=K(H_2-H_1)/L$ (ml/cm²min=cm/min) (flux)
 Q_0 (initial value of a physiologic-state parameter)
 Q (physiologic-state parameter)
 Q_d (ml/min) (discharge)
 QS –Quorum Sensing

S.D.-Saturation Degree

$S=4\pi R^2$ (sphere surface area)

$SSA=3/R \cdot \rho_b$ (specific surface area of sand particle)

SYTO9 -green fluorescent nucleic acid stain

t_{lag} (lag phase time)

$V_{bacteria} = \pi R^2 \cdot h$ (volume of rod bacteria)

$V_t (\text{cm}^3) = V_a + V_s + V_w = A \cdot L$ (total volume)

תקציר

רקע: תכולת הרטיבות בקרקע היא הגורם המרכזי המשפיע על דיפוזיה של נוטריאנטים, חילוף גזים, התרבות ותנועה של חיידקים. ככל שתכולת הרטיבות יורדת, הקרקע יותר מאווררת, הדיפוזיה של הנוטריאנטים איטית יותר, רצף המים נקטע ותנועתיות החיידקים בקרקע מוגבלת. בקרקע לא רוויה הנקבובים מלאים חלקית בנוזל, כך שהחיידקים המצויים בהם עומדים בפני סביבה מגוונת מאוד, אשר משתנה לסרוגין בהתאם להרטבה ויבוש. חיידקים בטבע יכולים להמצא במצב פלנקטוני, כלומר מרחפים בחופשיות בנוזל או במצב של ביופילם, צמודים למשטח ועטופים בתוך מטריקס פולימרי. החיידקים בקרקע נמצאים בפילמים של המים העוטפים את הגרגרים. ככל שהפילם דק יותר, כך הם קרובים יותר למשטח של גרגרי החול. ירידה בתכולת הרטיבות מעודדת היווצרות ביופילמים, מכיוון שהמטריקס מגן על החיידקים מפני יובש בשל יכולתו לספוח מים ולספק חומרי מזון, שנלכדו בתוכו. חיים בביופילם, זו לפיכך אסטרטגיה העוזרת לחיידקים לשרוד בתנאים של ירידה בתכולת הרטיבות בקרקע. היווצרות ביופילמים גורמת לאיטום נקבובי הקרקע וירידה בהולכת המים. הבנה של הגורמים המשפיעים על גידול חיידקים בקרקע לא רוויה דרושה, למשל, לצורך תכנון יעיל של מערכות החדרת מי שפכים מטופלים לקרקע למטרות סינון ומילוי אקויפריים של מי תהום. במערכות אלה משתמשים בקרקע לא רוויה כמסנן ביולוגי, לטיהור נוסף של מי הקולחים ולשימוש חוזר להשקית גידולים חקלאיים. אחת הבעיות המרכזיות במערכות אלה היא סתימה של הקרקע וכתוצאה מכך, הצורך לעבור לשדות החדרה חדשים.

מטרת העבודה: בחינת השפעת תכולת הרטיבות על גידול החיידקים ויצירת ביופילם בקרקע לא רוויה.

תוצאות ודיון: לבדיקת השפעת תכולת הרטיבות על גידול חיידקים, השתמשנו במודל של מערכת סטטית במבחנות אשר הכילו חול, מצע גידול מינימלי עם מלחים וציטראט וחיידק *Pseudomonas aeruginosa*. ככל שדרגת הרוויה עלתה גם התרבות החיידקים עלתה. מכיוון שברכיז מזון נתון, ככל שדרגת הרוויה גבוהה יותר גם כמות המזון גדולה יותר, היה צורך לבדוד את ההשפעה של דרגת הרוויה מההשפעה של ריכוז המזון. לפיכך, נבחן גידול החיידקים גם בתנאים של כמות מזון קבועה. תנאים אלה נקבעו ע"י מצב של דרגת רוויה נמוכה וריכוז נוטריאנטים גבוה ודרגת רוויה גבוהה עם ריכוז נוטריאנטים נמוך. נמצא, כי הגורם העיקרי שהשפיע על הגידול היה כמות המזון. אספקת החמצן היתה גורם משני אשר הגביל את הגידול רק במצבים של רוויה מלאה. ככל שריכוז הנוטריאנטים היה גבוה יותר, קצב הגידול היה נמוך יותר ואורך זמן ה-lag (t_{lag}) ממושך יותר, כנראה בשל אפקט אוסמוטי מעכב. קצב הגידול עלה עם עליה בטמפרטורה ומשך ה- t_{lag} ירד. בניסויים עם מזרע התחלתי נמוך יותר, שלב t_{lag} היה ממושך יותר. גודל המזרע ההתחלתי ושינויים בטמפרטורה לא השפיעו על הערך המקסימלי של הגידול. מכיוון שהניסויים במערכת סגורה הראו, שכמות המזון היא הגורם העיקרי הקובע את התרבות החיידקים, נערכו ניסויים דומים גם במערכת זרימה, בעמודת קרקע עם פרוס תכולת רטיבות, בכדי לבחון את החשיבות של תכולת הרטיבות. בניסויים בעמודות היו תוצאות הפוכות לאלו שהתקבלו במערכת סטטית, החיידקים גדלו טוב יותר בקרקע עם תכולת רטיבות נמוכה. מספר הסברים אפשריים לתופעה זו, ייתכן ובשכבות נמוכות יותר, ככל שעולה תכולת הרטיבות, יותר נקבובים מלאים במים ולכן דיפוזיית החמצן נעשית מוגבלת. אפשרות אחרת היא שהמזון, המגיע מראש העמודה, מנוצל תחילה על ידי החיידקים בשכבות העליונות, כך שלחיידקים הנמצאים בשכבות נמוכות יותר לא נשאר די מזון. אפשרות נוספת היא, כי תוצרי המטבוליזם של

החיידקים בשכבות העליונות עכבו את גידול החיידקים שמתחתיהם. ניסויים עם ריכוזים שונים של נוטריאנטים, הראו שככל שעולה ריכוז המזון כך עלה גידול החיידקים אך רק בחלקה העליון של העמודה. כלומר, ריכוז הפחמן הוא גורם המגביל את גידול החיידקים בחלק העליון, אך לא התחתון של העמודה. תוצאות הגידול במערכת סגורה מייצגות גידול מקסימלי בשלב הסטציונרי. לעומת זאת, במערכת זרימה נמדד גידול החיידקים אחרי 24 שעות, בעוד הגידול עדיין נמשך ולכן ניתן להתיחס לתוצאות אלו כמייצגות את קצב הגידול. קצב הגידול היה גבוה יותר ככל שריכוז הנוטריאנטים עלה. בניגוד לתוצאות שהתקבלו במערכת סגורה. בניסויים עם שטפים שונים של תמיסת המזון, התקבל גידול רב יותר דווקא בשטף נמוך יותר והתוצאה חזרה על עצמה בריכוזים שונים של הנוטריאנטים. יתכן ושטף גבוה מדלל מולקולות סיגנל של Quorum Sensing המשפיעות על הגידול. בניסוי ביקורת, נבדק גידול החיידקים בעמודות ללא זרימה. הגידול המירבי היה באמצע העמודה ולא בחלקה העליון, כמו בניסויי הזרימה. בעמודות ללא זרימה, לא מוסף ציטראט ולכן בחלק העליון, היכן שתכולת הרטיבות נמוכות, קצב הספקת ציטראט מהווה גורם מגביל גידול. ניסוי בעמודה כמעט רוויה, הראה כצפוי גידול רק בחלק העליון. מדידות חמצן מומס ביציאה, מהעמודות עם פרוס תכולת הרטיבות, הראו כי היתה ירידה משמעותית באחוז החמצן (מ-100% בכניסה עד לפחות מ-60% ביציאה). תוצאות אלו מחזקות את ההשערה, שהגורם העיקרי שהגביל את גידול החיידקים בחלק התחתון של העמודה היה ריכוז החמצן. מצילומים במיקרוסקופ קונפוקלי, נראה כי החיידקים גדלים על פני הגרגרים במיקרו-מושבות. במספר מקרים נראו ביופילמים מפותחים בעובי 5-15 μm , בסדקים או שקעים של הגרגרים. באופן כללי הצילומים במיקרוסקופ תמכו בתוצאות הכמותיות.

מסקנות: במערכת סטטית סגורה, כמות המזון היא הגורם העיקרי המשפיע על התרבות החיידקים. במערכת זרימה עם הספקה קבועה של מזון והרחקה קבועה של מטבוליטים, הגורם העיקרי המשפיע על גידול החיידקים בתכולת הרטיבות הנמוכה (בחלק העליון של העמודה) היה ריכוז הנוטריאנטים ואילו בחלק התחתון של העמודה, הגורם המגביל היה אספקת החמצן. המצב האופטימלי עבור גידול החיידקים היה בתכולת הרטיבות המינימלית. בהמשך למחקר זה, יש לערוך ניסויים בתכולת רטיבות נמוכות יותר, על מנת למצוא את תכולת הרטיבות הקריטית, בה המים מהווים גורם מגביל גידול.

1. סקירת ספרות

1.1. קרקע כמערכת נקבובית

מספר תכונות מבדילות בין סביבת הקרקע לבין בתי גידול אחרים של חיידקים. התכונה הבולטת ביותר היא המצאות החלקיקים המוצקים, שתופסים את רוב הנפח (Or et al., 2007). קרקע היא תווך נקבובי תלת פאזי, הכולל פאזה מוצקה, המורכבת רובה ממינרלים אנאורגניים בשילוב עם חומרים אורגניים, פאזה נוזלית, המכונה 'תמיסת הקרקע' מהווה מקור של מים, חומרי מזון ופאזה גזית, האוויר. נקבוביות הקרקע, היא אותו חלק מנפחה הכללי אשר אינו תפוס על ידי הפאזה המוצקה. נקבובי הקרקע שאינם מלאים במים מכילים גזים. שורשי הצמחים ואוכלוסיות מיקרוביאליות קולטים את החמצן מתוך הפאזה ההנוזלית ופולטים לתוכה את הפחמן הדו-חמצני. אופן הסידור של חלקיקי הפאזה המוצקה קובע את כמות וגודל הנקבובים. לנקבובי הקרקע אין צורה גאומטרית מוגדרת, הם מהווים אוסף של צורות וגדלים משתנים. היחסים הכמותיים בין הפאזה הנוזלית והגזית משתנים במהירות כאשר הקרקע עוברת תהליך של הרטבה (גשם, השקיה) ויבוש (התאדות, ניקוז פנימי וקליטת המים על-ידי שרשי צמחים). קיימים שני מצבים בקרקע: מצב רווי, כאשר כל הנקבובים מלאים במים ומצב לא רווי, כאשר חלק מהנקבובים מלאים במים וחלק באוויר, או נקבוב בודד מלא חלקית במים וחלקית באויר. סביבת הקרקע מכילה גם מספר פני ביניים (מוצק-נוזל, מוצק-גז, נוזל-גז), שכל אחד מהם תורם להיווצרות המגוון המיקרוביאלי. תנועת המומסים בקרקע היא בקונבקציה, עם זרם המים ובדיפוזיה, לפי מפל הריכוזים של המומס (Or et al., 2007; Maier et al., 2000; Holden et al., 1997). סביבת הקרקע היא מאוד הטרוגנית. המבנה של נקבובי הקרקע מורכב, פיזור המים לא אחיד וכך נוצרות מיקרו-סביבות שונות אשר גם הן משתנות תוך דקות בהשפעת תהליכי הרטבה ויבוש. במצב רווי מינים שונים נפגשים ומתחרים על הנוטריאנטים, לעומת זאת באי-רוויה נוצרות מיקרו-סביבות נפרדות המאפשרות בידוד והישרדות גם של מינים בעלי כושר תחרות נמוך (Long and Or, 2005; Crawford et al., 2005). בנוסף לפיזור לא אחיד של המים גם פיזור של תרכובות הפחמן, שהוא מקור אנרגיה עיקרי, לא אחיד בזמן ובמרחב. המקורות העיקריים של הפחמן בקרקע מגיעים מהפרשה של שורשי הצמחים ומריקבון של רקמות צמחיות. פחמן מתפזר בקרקע עם המים, כאשר זרם המים גם הוא לא אחיד. פיזור החיידקים בקרקע מושפע בעיקר מפיזור המים והפחמן. תנועת החיידקים בקרקע היא בקונבקציה, תנועה בראונית אקראית, או תנועה אקטיבית בעזרת שוטונים (Friedman, 1999). ישנם חיידקים המסוגלים לחוש את מקור הפחמן ולהתקדם לעברו בתנועת כמוטקסיס. הגורם העיקרי המשפיע על תנועת החיידקים בקרקע הוא תכולת הרטיבות. ככל שסביבת הקרקע יבשה יותר, תנועת החיידקים נעשית מוגבלת יותר (Friedman, 1999).

1.2. ביופילם בקרקעות רוויות ולא רוויות

חיידקים בסביבות לא רוויות גדלים, לרוב, צמוד לחלקיקים העטופים בפילם של מים. חיידקים הגדלים על משטח בצמוד אחד לשני, כלואים בתוך מטריקס של פולימרים חוץ-תאיים (EPS-Extracellular Polymeric Substances), מהווים את הביופילם. לעומתם, חיידקים חופשיים, המרחפים בתמיסה קרויים חיידקים פלנקטוניים (Donlan, 2002). ביופילמים בקרקע יכולים להיות מפותחים, מצפים בשכבה עבה ורציפה את קירות הנקבובים, או דקים ומקוטעים, נמצאים רק בשקעים, בסדקים של הנקבובים, או בנקודות המגע בין חלקיקים בתוך המיניסקוסים של המים. יצירת ביופילם מפותח ורציף בקרקע גורמת לסתימה של נקבובים, ירידה

בנקוביות ולפיכך לירידה בהולכת המים. הסתימה נובעת הן מגידול של המסה המיקרוביאלית והן כתוצאה מספיגת מים ע"י ה-EPS ההיגרוסקופי (Taylor et al., 1990). ביופילמים לא רציפים גם הם גורמים לירידה בהולכת המים על ידי הצטברות הביומסה בחיבורים בין הנקובים ובשקעים. ירידה בהולכת המים תלויה ישירות בעובי הביופילם ועובי הביופילם תלוי בין השאר בהספקת מזון, כלומר בדיפוזיה וקונבקציה של הנוטריאנטים (Rittmann, 1993). תכולת הרטיבות של הקרקע משפיעה על פיזור הנוטריאנטים, חילוף גאזים, תנועת החיידקים והתפתחות הביופילמים. ככל שדרגת הרוויה של הקרקע נמוכה יותר, פילם דק יותר של מים עוטף את גרגרי הקרקע, ומאפשר קיום של החיידקים, רק בצמוד למשטח הגרגר. שיכבת המים שעל פני הגרגרים מכילה מקורות מזון כמו פחמן, חנקן, חומצות גרעין ואנזימים שונים, המקנים לחיידקים יתרון אקולוגי בנישה זו (Chenu et al., 2002). עם זאת, דיפוזיה של חומרי מזון מומסים לתוך מבנה הביופילם העטוף ב-EPS, איטית יותר מאשר לתאים פלנקטוניים המרחפים בנוזל (Harms and Zehnder, 1994). למרות שפע מידע הנוגע לביופילמים בסביבות רוויות (Okabe et al., 1999; Watnick et al., 2000; Davey and O'Toole, 2000), מעט מאוד ידוע על ביופילמים בסביבות לא רוויות (Holden et al., 1997; Auerbach et al., 2000). אחד ההבדלים בין הביופילמים בסביבות רוויות לאלו בסביבות לא רוויות, הוא המסה המשתנה בהתאם לתכולת המים. יצירת ביופילם ע"י חיידקים מתרחשת, בדרך כלל, כתוצאה מסינגל סביבתי כלשהו הקשור למצבי עקה. לדוגמה, *Pseudomonas aeruginosa* יוצר ביופילם כאשר יש מגבלות באספקת החמצן או/ו חומרי מזון (Brown et al., 1995). כתוצאה מקליטת הסינגל הסביבתי משנה החיידק את הפנוטיפ מפלנקטוני לביופילם, צמוד למשטח ומוגן בתוך המטריקס (O'Toole et al., 2000). ביופילם נוצר במספר שלבים (Davey and O'Toole, 2000). בשלב ראשון, מגיעים חיידקים פלנקטוניים למשטח באקראי או כתוצאה מכמוטקסיס באמצעות השוטונים. על פני המשטח ישנן מספר אינטראקציות בין שטח פני החיידק לבין המשטח, המעודדות הצמדות. באינטראקציות אלה מעורבים כוחות אלקטרוסטטיים וכוחות ואן-דר-ולס. שכבה של חיידקים צמודים אחד לשני ולמשטח נקראת-'monolayer'. ההצמדות בשלב הזה הינה הפיכה. בשלב הבא, מתרחשת הצמדות ספציפית בעזרת צמדנים (adhesins), כגון pili. אלו הן שערות חלבוניות, הנמצאות על פני הממברנה החיצונית בחיידקים גראם שליליים. ה-pili מכילים חומצות אמינו הידרופוביות ולכן ישנה עדיפות להצמדות למשטחים הידרופוביים. ההצמדות של החיידקים למשטח בשלב הזה היא פחות הפיכה ומתרחשת תוך מספר דקות. על פני המשטח נוצרת שכבה של חיידקים הגדלים ומתרבים ומתחילים לייצר EPS, שכבה זו נקראת – 'linking film'. התרבות של חיידקים או היצמדות של חיידקים נוספים לשכבה הראשונית מובילה להתפתחות של "microcolony". ההצמדות בשלב הזה לא הפיכה, הפרשת ה-EPS נמשכת ועוזרת בעיגון החיידקים למשטח. כמו כן, מאפשר ה-EPS לכידה של נוטריאנטים בתוכו. בהמשך, יכול הביופילם להתפתח למבנה מרחבי, תלת-מימדי. ככל שמתפתח הביופילם, חדירת חומרי מזון וגם סילוק פסולת מתחילים להיות בעיה ולכן בסביבות רוויות, מתפתח מבנה תלת מימדי המכיל תעלות, אשר במספר מקרים, כמו בחיידקי *Pseudomonas* נראה כמו פטרייה. כאשר הביופילם בשל, חלקים ממנו יכולים להתנתק ולעבור שוב למצב פלנקטוני (Davey and O'Toole, 2000). בביופילם בוגר מהווה ה-EPS 50-90% מכמות הפחמן הכללית. תכונותיו הפיסיקליות והכימיות של ה-EPS יכולות להשתנות בהתאם לחיידק. EPS מורכב בעיקר מפוליסכרידים. EPS של חיידקים גראם-שליליים מכילים בעיקר חומצות (uronic), המקנות להם מטען חשמלי שלילי ומאפשרות אינטראקציה עם יוניים דו-ערכיים חיוביים, כמו קלציום ומגנזיום, היוצרים קשרי הצלבה מאוד

חזקים ב-EPS של הביופילם הבוגר. בחיידקים גראם-חיוביים, כמו *Staphylococcus epidermidis* ה-EPS הינו בעל הרכב כימי שונה ומטענו חיובי. הפוליסכרידים המרכיבים את ה-EPS הם שרשראות של מולקולות ארוכות ודקות היוצרות רשת מסביב לתאים של החיידקים. ה-EPS הוא מאוד היגרסקופי, מסוגל ללכוד כמויות גדולות של מים וכך נוצר מטריקס דביק בעל אופי של ג'ל. לדוגמה, פוליסכריד המורכב מ-hyaluronic acid יכול לקשור יותר מקילוגרם מים לכל גרם של הפוליסכריד (Sutherland, 2001). בנוסף לפוליסכרידים, EPS מורכב גם מ-DNA חוץ תאי (eDNA) שלא ידוע עדיין אם מקורו מפירוק של תאי חיידקים או שהוא מופרש באופן אקטיבי. נמצא ש-eDNA נחוץ להתבססות הראשונית של החיידק על משטחים (Whitchurch et al., 2002). קשרי מימן ואינטראקציות אלקטרוסטטיות הם הכוחות הדומיננטיים המעצבים את ה-EPS. אינטראקציות קיימות לא רק בתוך ה-EPS אלא גם בין ה-EPS לסביבה, כאשר חומרים אורגניים שונים נקשרים לפוליסכרידים והופכים את המבנה למורכב יותר. תכונותיו אלו של ה-EPS יוצרות מיקרו-סביבה ייחודית המקנה לחיידקי הביופילם הגנה מפני התייבשות ומספקת להם מידה מסוימת של הומאוסטזיס. ל-EPS אף תפקיד נכבד בשמירה על היציבות המבנית-מכאנית של הביופילם. בנוסף לכך, הוא מגיב עם חומרים אנטיביוטיים ומאט את קצב חדירתם לתוך הביופילם ואף מקנה הגנה מסוימת מפני בקטריופאגים (Sutherland, 2001). בסביבות לא רוויות חדירת חומרי מזון וסילוק פסולת מתרחשים על ידי דיפוזיה בפן הביניים של אויר-ביופילם (Auerbach et al., 2000). אחד מהחיידקים הידועים בכושר יצירת הביופילם שלהם הוא ה-*P. aeruginosa*. זהו מתג גראם שלילי, אארוי ואנארוי פקולטטיבי (Davies et al., 1989). החיידק מסוגל לפרק בנזן וטבעות ארומטיות אחרות בסביבה אנארויבית (Mahendran et al., 2006), בעל שוטון פולרי ושערות type IV pili, המקנים לו יכולת תנועה (Sauer et al., 2002). *P. aeruginosa* הוא חיידק סביבתי נפוץ בקרקע (Shirkot et al., 1994), במים (Grobe et al., 1995), בצמחים (Iswandi et al., 1987) ובעל יכולת יצירת ביופילם על משטחים שונים (Costerton et al., 1999). *P. aeruginosa* הוא פתוגן אופורטוניסטי הומני המזהם פצעים וכוויות, גורם לדלקות עיניים ואוזניים, ברונכיטיס ומוות בחולי ציסטיק פיברוסיס ו-AIDS (Govan et al., 1996). מערכת חישת המניין (Quorum Sensing, QS), בחיידק זה היא המנהקרות ביותר. מולקולות סיגנל מופרשות בהתאם לצפיפות התאים וכך מווסתות תהליכים שונים כמו יצירת ביופילם ומגוון רחב של פנוטיפים באוכלוסיה (Miller and Bassler, 2001). תקשורת בין חיידקים הנמצאים בביופילם, יעילה יותר מאשר בחיידקים פלנקטוניים, מכיוון שמולקולות הסיגנל מרוכזות בנפח קטן יחסית בתוך הביופילם. לעומת זאת, בנפח נוזל גדול, קיים סיכוי נמוך שהאותות יגיעו לחיידק שכן (Watnick and Kolter, 2000). המנגנון של תקשורת בין חיידקים, מאפשר קואורדינציה בביטוי הגנים בכל האוכלוסיה. האותות המופרשים לסביבה, הן מולקולות קטנות, הנקראות אוטואינדיוסורים (autoinducers). בחיידקי *P. aeruginosa* ידועות שתי מערכות של QS: *las*, *rhl*. לכל מערכת יש מולקולות סיגנל משלה, כאשר צפיפות החיידקים עולה, מופרשות מולקולות סיגנל וריכוזם בסביבה עולים. במערכת *las* מולקולת סיגנל היא N-(3-oxododecanoyl) homoserine lactone ובמערכת *rhl* מולקולת סיגנל היא N-butyryl homoserine lactone. הסיגנל הכימי נקשר לקולטן החלבוני אשר מפעיל בקרה על ביטוי גנים (Wagner et al., 2006).

1.3 אינטראקציה בין חיידקים לקרקע

את האינטראקציות בין החיידקים לבין חלקיקי הקרקע ניתן לחלק באופן כללי לביוטיות ואביוטיות. אינטראקציות ביוטיות קשורות בגידול, התרבות והפרשות של אנזימים וביו-פולימרים. אינטראקציות אביוטיות הן כל

האינטראקציות הפיסיקוכימיות. אינטראקציות פיסיקליות קשורות לגיאומטריה של חלקיקי הקרקע, יכולתם להיצמד אחד לשני ויכולת החיידקים להצמד אליהם. אינטראקציות אלה תלויות בגודל, צורה, התארגנות מרחבית ותכונות שטחי הפנים. ככל שהגרגרים קטנים ומחוספסים יותר, כך יש להם יותר שטחי פנים, המאפשרים אינטראקציה עם החיידקים. התארגנות הגרגרים קובעת את גודל הנקבובים, המהווים בית גידול לחיידקים בקרקע. אינטראקציות פיסיקוכימיות קשורות בתהליכים המתרחשים בפן הביניים, בין מוצק לנוזל, או בתמיסת הקרקע, כמו תהליכי ספיחה, התמוססות, שקיעה, הידרוליזה, חמצון ובפרמטרים כמו pH. תכונות שטח של חלקיקי הקרקע כמו שטח פנים סגולי, מטען חשמלי, וקבוצות פונקציונאליות, משחקות תפקיד חשוב באינטראקציות בין חיידקים לבין חלקיקי קרקע (Friedman, 1999). האינטראקציות בין החיידקים לבין חלקיקי הקרקע הן דו-כיווניות. מצד אחד, חלקיקי הקרקע משפיעים על גידול, הישרדות ופעילות ביולוגית של חיידקים. מצד שני, גם החיידקים משפיעים על הקרקע על ידי יצירת צברים, המסת חלקיקים מינראליים, תרומה למשקעים, יצירת מינרלים חדשים ופירוק חלקיקים אורגאניים. חלקיקים מינראליים המצופים בחיידקים, מקטינים את החתך הזמין לזרימת המים על ידי הצטברות הביומסה, וכך משנים את תכונות ההרטבה ותאחיזת המים (Chenu and Stotzky, 2002). השונות בגודל חלקיקים, מבנה פני השטח של החלקיק והמטען משפיעים על תהליכי הספיחה והתאחיזה של החיידקים לחלקיקים. ככל שחלקיקי הקרקע קטנים יותר, כך עולים הסיכויים, שהחיידקים ילכדו ביניהם. לעומת זאת, ישנם כוחות משיכה אלקטרוסטטיים, שפועלים בין החיידקים לבין המשטחים וגורמים לספיחת החיידקים למשטחים. לחלקיקים קטנים יש יותר שטח פנים סגולי מאשר לחלקיקים גדולים וזה מספק יותר אתרי ספיחה לחיידקים. בנוסף לכך, על פני השטח של חלקיק מחוספס קיימים יותר אתרי ספיחה מאשר על חלקיק חלק. חישובים פיסיקליים מראים בברור, כי משטחים מחוספסים מחזיקים פילמים יותר עבים של מים המאפשרים גידול רב יותר של חיידקים לעומת משטחים חלקים (Long and Or, 2007; Or et al., 2007). בקרקע בעלת נקבובים גדולים או סדקים, יש ירידה בספיחה כתוצאה מירידה בשטח פנים הסגולי ובזמן המגע בין החלקיקים לחיידקים. משטחים מוצקים בטבע הם לרוב בעלי מטען שלילי, אך יכולים להיות מושפעים מה-pH של תמיסת הקרקע. בנוסף לגודל ולחוספוס החלקיקים, גם הטמפרטורה משפיעה על ספיחת החיידקים (Stevik et al., 2004). כך לדוגמה, נמצא כי ב-3°C ספיחת *Pseudomonads* לפוליטירן היתה נמוכה יותר מאשר ב-20°C (Fletcher, 1977). חיידקים בקרקע נעים דרך רצף של נקבובים מלאים במים. בקרקע רוויה כל הנקבובים מלאים במים ותנועת החיידקים וחזירתם בין הנקבובים מוגברת. במצב זה לחיידקים אארוביים יש בעיה של דיפוזיית אוויר. בקרקע לא רוויה, פילמים של מים עוטפים את חלקיקי הקרקע וככל שתכולת הרטיבות יורדת, שכבת המים דקה יותר ומקוטעת. ככל ששכבת המים דקה יותר, כך קטנים הקונבקציה ודיפוזיה של חומרי מזון מומסים ותנועת החיידקים מוגבלת (Or et al., 2007; Barton et al., 1995). על מנת לשרוד בתנאים של תכולת רטיבות נמוכה חייבים החיידקים להגיב במספר שינויים פיסיולוגיים. פוספוליפידים המרכיבים את הממברנות של החיידקים הופכים ממצב נוזלי לגל, חלבונים ממברנליים וציטוזוליים עוברים דה-נטורציה, מבנה המטריקס של ה-EPS משתנה מפתוח ומסודר לצפוף וחסר צורה (Halverson and Firestone, 2000). מבנה צפוף מעכב דיפוזיה של הנוטריאנטים מהביופילם ולוכד מים ונוטריאנטים בתוכו (Or et al., 2007). במצבים של אי-רוויה, חיידקים החיים בצורת ביופילם שורדים טוב יותר ומגבירים את יצור ה-EPS. המטריקס הפוליסכרידי מאט את קצב ההגעה לשיווי משקל בין החיידקים הכלואים בתוכו לבין הסביבה היבשה יותר בקרקע. המטריקס מספק לחיידקים הכלואים

בתוכו סביבה מימית וגם חומרי מזון מכיוון שבמצבים של עקת יובש בקרקע, הסביבה של המטריקס מתייבשת לאט יותר (Roberson and Firestone, 1992). בקרקע לא רוויה הנוזל זורם דרך נקבובים קטנים, יותר מאשר דרך נקבובים גדולים. חיידקים המוסעים בנוזל יהיו לפיכך בעלי סיכוי גבוה להתקע בין הגרגרים (Stevik et al., 2004). בנוכחות חומרי מזון, החיידקים שנתקעו בין חלקיקי הקרקע מתרבים וחוסמים את מעבר המים. חסימת הנקבובים על ידי החיידקים מתרחשת בעיקר בפני הקרקע, אך לעתים גם עמוק יותר (Stevik et al., 2004). היווצרות ביופילמים ומיקרו-מושבות בקרקע גורמים לירידה בהולכת המים (Or et al., 2007). ישנם מחקרים הטוענים כי השפעתם של המיקרו-מושבות על ירידה בהולכת המים חמורה יותר מאשר השפעת ביופילם מפותח ובמבנה רציף ומציעים מודל מתמטי המסביר את התופעה (Seki and Miyazak, 2001). להולכת מים בקרקע יש חשיבות גם בתהליכי טיהור מי שפכים והעשרת מי תהום ע"י החדרה לקרקע של קולחים מטופלים. חלחול הקולחים בקרקע ושהייתם בה תורמים לשיפור איכות המים על ידי תהליכי ספיחה כימיים, תהליכי סינון פיסיקליים ותהליך ביולוגי של טיהור. לאחר החדרת המים לקרקע אל האקוויפר, המים נשאבים מחדש ומשמשים להשקיה בחקלאות. הזרמת מי הקולחים לקרקע טומנת בחובה סכנה של זיהום מי התהום על ידי מיקרואורגניזמים פתוגנים. כדי למנוע זיהום של מי תהום על ידי חיידקים פתוגניים יש להבין את התהליכים המשפיעים על התרבותם והשרדותם בתווך לא רווי (Or et al., 2007; Stevik et al., 2004). נעשו ניסויים בעמודות עם זרימה רוויה, לא רוויה וזרימה לא רוויה בהפסקות. התוצאות לא הראו הבדל במעבר חיידקים בזרימה רוויה לעומת זרימה לא רוויה בהפסקות. לעומת זאת, בעמודה עם זרימה לא רוויה היה עיכוב משמעותי במעבר חיידקים. כתוצאה מכך הסיקו החוקרים, כי מעבר דרך תווך נקבובי לא רווי זה הטיפול היעיל ביותר להרחקת חיידקים פתוגנים ממי שפכים (Powelson and Mills, 2001). במחקר שנערך לאחרונה על תנועת חיידקי *Bacillus subtilis*, בקרקע בדרגות רוויה שונות, נמצא שרוב החיידקים היו בחלק העליון של העמודה (Jiang et al, 2005). החוקרים מסבירים את התוצאות בכך שעם הירידה בתכולת הרטיבות היתה ירידה בפילם המים המקשר בין הנקבובים ולכן החיידקים איבדו את האפשרות לנוע לשכבות עמוקות. בנוסף לכך, גם המצאות שורשים של צמחים בחלק העליון תרמה להצטברות החיידקים (Jiang et al, 2005). כידוע, מקורות פחמן הנחוצים לגידול חיידקים מופרשים משורשי הצמחים (Delhaize et al, 2001). מחקרים, כבר מ-1950, מראים כי פולימרים חוץ תאיים חוסמים או לפחות מורידים את מעבר המים בקרקע (McCalla, 1950). למרות שפע מחקרים שנעשו מאז בעמודות רוויות ומספר מחקרים בעמודות לא רוויות עדיין לא נעשו מספיק מחקרים בתנאים מבוקרים על השפעת תכולת הרטיבות על גידול החיידקים והתפתחות ביופילם בקרקע לא רוויה. תכולת הרטיבות בקרקע משפיעה על מגוון גורמים נוספים מה שמקשה על ניתוח תוצאות. לחיידקי הקרקע יש יכולת לפרק מזהמים אורגנים שונים ולמנוע מהם להגיע למי התהום (Holden et al., 1997). כדי להבטיח פירוק של המזהמים על ידי חיידקים יש צורך במגע ביניהם. ישנם מצבים בקרקעות לא רוויות, שהחומרים המזהמים נמצאים במרחק קטן מהחיידקים המפרקים, כתוצאה מבידוד של מיקרו-סביבות על ידי רצף מקוטע של המים ועל כן לא יתבצע הפירוק (Harms, 1996). מכיוון שנושא היווצרות הביופילם בקרקע לא רוויה כמעט שלא נחקר, דרושים מחקרים נוספים לצורך הבנת התנאים המשפיעים על היווצרות הביופילם בנישה אקולוגית זו והשפעת גידול החיידקים על הולכת המים ואיטום הקרקע.

מטרת המחקר:

המטרה הכללית של עבודה זו היא בחינת ההשפעה של תכולת הרטיבות על גידול חיידקים בקרקע לא רוויה.

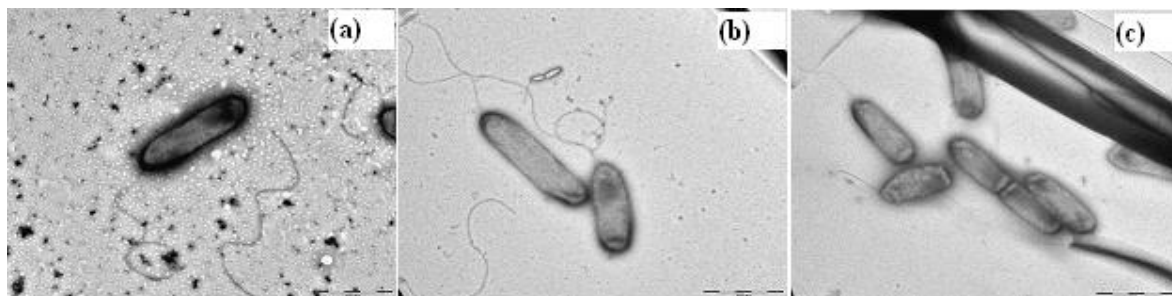
מטרות משנה:

1. בחינת השפעת המדדים הבאים על התרבות חיידקים במערכת סגורה בקרקע לא רוויה: ריכוז וכמות הנוטריאנטים, סוג וגודל גרגרי המצע, גודל מזרע (inoculum) החיידקים, טמפרטורה.
2. בחינת השפעת המדדים הבאים על התרבות חיידקים בתנאי זרימה תמידית בקרקע לא רוויה: ריכוז הנוטריאנטים, שטף המים, סוג וגודל גרגרי המצע, גובה עמודת הקרקע.

2. חומרים ושיטות

חיידק: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853

החיידק נשלח למעבדות של השירותים להגנת הצומח של משרד החקלאות להגדרת סוג החיידק באמצעות קביעת פרופיל חומצות שומן. צביעה של החיידק ב- Negative Staining ותצפית במיקרוסקופ אלקטרוני חודר הראתה שמידות החיידק הן: אורך $2.7 \mu\text{m}$ וקוטר $0.7 \mu\text{m}$ (איור 2.1).



איור 2.1: צילום חיידק במיקרוסקופ אלקטרוני חודר TEM. גודל הסרגל $2.5 \mu\text{m}$. (a) חיידק בודד. (b) שני חיידקים עם שוטונים פולריים באורך החיידק. (c) חיידקים מתחלקים.
חומרים:

Acetic Acid - Bio-Lab, Israel

Amonium Sulfate-(NH_4) $_2$ SO $_4$, Merck, Germany

Bacto Agar- Difco laboratories, USA

Crystal Violet - Hy-Labs, Israel

Ethanol- Gadot, Israel

Ferum Sulfate-FeSO $_4$ ·7H $_2$ O, Merck, Germany

Glycerol- Gadot, Israel

Glucose- Merck, Germany

Magnesium sulfate heptahydrate- MgSO $_4$ ·7H $_2$ O, Merck, Germany

Potassium dihydrogen phosphate- KH $_2$ PO $_4$, Merck, Germany

Tri sodium citrate dehydrate- C $_6$ H $_5$ Na $_3$ O $_7$ ·2H $_2$ O, Merck, Germany

קייטים:

Bradford Protein Assay- Bio-Rad Laboratories, Germany

Live/Dead Bac Light Bacterial Viability kit, Invitrogen detection technologies, USA

טבלה 1: צבענים פלואורסנטיים בהם נעשה שימוש בעבודה זו

Emission ⁽¹⁾ (nm)	Excitation ⁽¹⁾ (nm)	מאפיינים	יצרן, ארץ היצור	צבע
435	365	צבע אניוני, בעל אפיניות לפוליסכרידים	Sigma, USA	Calcofluor White (CFW)
516	492	צבע אניוני, בעל אפיניות לחלבונים, קרבוהידרטים, פוליסכרידים	Sigma, USA	5-[4,6-dichlorotriazin-2-yl] aminofluorescein (DTAF)
523	490	צבע אניוני, בעל אפיניות לחלבונים	Sigma, USA	Fluorescein isothiocyanate (FITC)
605	518	צבע קטיוני בעל אפיניות לחומצות גרעין	Sigma, USA	Acridine Orange (AO)
⁽²⁾ 500	⁽²⁾ 480	נקשר לחומצות גרעין	Invitrogen detection technologies, USA	Green fluorescent⁽²⁾ nucleic acid stain SYTO9
⁽²⁾ 635	⁽²⁾ 490	נקשר לחומצות גרעין צובע רק את התאים עם ממברנות פגועות, מסמן את החיידקים המתים	Invitrogen detection technologies, USA	Propidium Iodide (PI)⁽²⁾

⁽¹⁾ הנתונים של AO, DTAF, FITC, CFW לפי Ying Li et al., 2002

⁽²⁾ הנתונים על SYTO9 ו-PI מחוברת המצורפת ל- LIVE/DEAD kit

Handbook of fluorescent probes and research, Invitrogen detection technologies, USA

מצעים:

LB

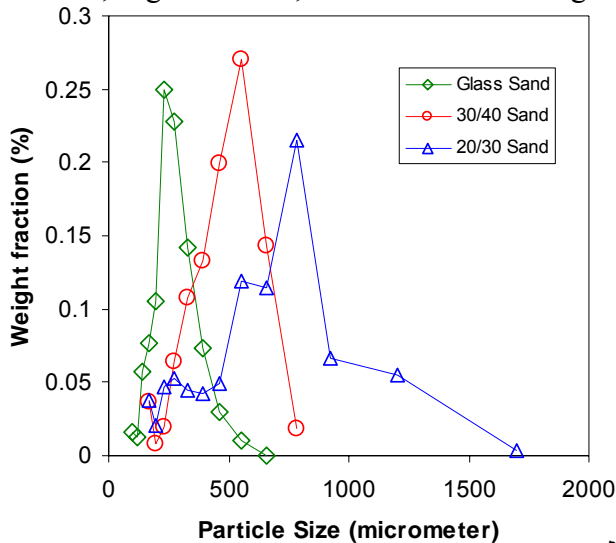
Per liter: 10g bacto-tryptone, 5g NaCl, 5g yeast extract

LB+0.2% glucose

M63 (Miller, 1972)

Per liter: 2g (NH₄)₂SO₄, 13.6g KH₂PO₄, 0.5mg FeSO₄·7H₂O, pH=7 with KOH

1ml, MgSO₄·7H₂O, 1M after autoclaving



M63+0.4% citrate

תווך גרנולרי:

חולות עברו ניפוי יבש למספר מקטעי גודל גרגרים,

כמפורט להלן:

- חול דק- גרגרי- חול דק בקוטר של 106-180 מיקרון.
- חול גס- גרגרי- חול גס בקוטר של 500-850 מיקרון.
- חול 20/30 – גרגרי חול גס לא הומוגני בקוטר של 400-1800 מיקרון, כפי שמתואר באיור 2.2.
- חול 30/40- גרגרי חול גס בקוטר של 200-800 מיקרון, כפי שמתואר באיור 2.2.

איור 2.2: פרוס גודל חלקיקי חול.

- חול זכוכית- גרגרי חול דק בקוטר 800-100 מיקרון, כפי שמתואר באיור 2.2. כל החולות הורתחו בחומצה מלחית 1M במשך 30 דקות, להרחקת קרבונטים וחומר אורגני ולאחר מכן נשטפו במים מזוקקים להרחקת החומצה. החול יובש בתנור ב-105°C למשך לילה ונשמר בכלי סטרילי סגור עד למועד הניסוי.

2.1 מיקרוסקופיה קונפוקלית

Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

הדמייה של חיידקים על גבי גרגרי חול בוצעה ע"י מיקרוסקופ קונפוקלי Olympus model IX81, המצויד בתוכנה Flouview. מיקרוסקופ זה מכיל ליזרים: green helium/neon laser, 543nm red, helium/neon, 633nm laser ופילטרים: narrow band emission filter 515-525nm, GFP/YFP excitation filter cube, המאפשרים שימוש במגוון חומרי צבע פלואורסנטיים.

הכנת צבעים וצביעת דוגמאות:

להכנת CFW, הומסו 25mg אבקת צבע ב-1ml מים מזוקקים פעמיים לקבלת תמיסה לבנה. לאחר מכן הוספו מספר טיפות 50% NaOH עד לקבלת תמיסה צהובה ושקופה. לצביעה הועברו מספר גרגרים עם חיידקים לצלחת פטרי והושרו בתמיסת הצבע בנפח המכסה את הגרגרים למשך שעתיים בטמפ' החדר בחושך. הגרגרים נשטפו 3 פעמים במים מזוקקים והועברו לזכוכית נושאת.

להכנת DTAF, הומסו 2mg צבע ב-10ml בופר (Na₂HPO₄- 7.8g/l, NaCl- 8.8g/l, pH=9). צביעה הועברו מספר גרגרי חול עם חיידקים לצלחת פטרי והושרו בתמיסת הצבע בנפח המכסה את הגרגרים למשך 30 דקות בטמפ' החדר, בחושך, בתנאי לחות גבוהים. לאחר ההדגרה נשטפו הגרגרים 3 פעמים והועברו לזכוכית נושאת.

להכנת FITC, הומסו 0.5mg צבע ב-50mM סודיום קרבונט ו-100mM סודיום כלוריד. הצביעה בוצעה בדומה למתואר עבור DTAF.

להכנת AO, הומסו 0.01g צבע ל-100ml מים מזוקקים פעמיים. הצביעה בוצעה כמתואר לעיל, אולם זמן ההשרייה היה 10 דקות בלבד.

הכנת SYTO9 ו-PI מ-Live/Dead kit, בוצעה כמתואר בהוראות היצרן (Invitrogen detection technologies, USA), כאשר הצבעים SYTO9 ו-PI עורבבו ביחס 1:1, לפי המלצת היצרן. דוגמה של גרגרי חול הושרתה בצבעים ל-15 דקות בחושך.

2.2 שמירת החיידקים

החיידקים אוכסנו בהקפאה עמוקה ב-80°C עם גליצרול (26%). מדי שבועיים נורעו מתרבית זו חיידקים לצלחת LB אגר ונשמרו ב-4°C לשימוש יומיומי.

2.3 גידול החיידקים

זריעות בידוד של החיידק *P. aeruginosa* ממבחנת סטוק ב-80°C, הודגרו על פלטות של LB אגר למשך לילה ב-37°C. שלוש מושבות בודדות בקוטר 3-8mm הועברו ל-4ml מצע LB נוזלי והודגרו לילה ב-37°C, בטלטול 150rpm (Lab-Line, USA). תהליך זה בוצע מפני שלחיידק זה ישנם שלושה פנוטיפים של מושבות: מושבה גדולה ומפושטת בקוטר כ-16mm, מושבה קטנה ועגולה בקוטר כ-3mm ומושבה בינונית בקוטר כ-

8mm. נמצא כי הפנוטיפים מתנהגים שונה ויכולת יצירת ביופילם שלהם שונה. מושבות קטנות ובינוניות הן בעלות יכולת יצירת ביופילם ולכן נבחרו לניסויים בעבודה הזו (Deziel et al., 2001).

2.4 ספירת חיידקים

הדוגמה הנבדקת נמהלה מיהולים עשרוניים במים מזוקקים סטריליים. טופטפו שתי טיפות בנפח 10µl מכל מיהול על גבי צלחת LB אגר. הטיפות נספגו במצע והצלחת הודגרה ב-37°C למשך לילה. במיהולים בהם התקבל מספר המושבות בין 10 ל-100 חושב מספר המושבות למיליליטר (CFU/ml) על ידי הכפלת ממוצע החזרות בכל מיהול בפקטור המיהול.

2.5 מודל גידול חיידקים

גידול חיידקים כפונקציה של זמן מתואר באמצעות מספר פרמטרים: גודל המזרע ההתחלתי (B_0), זמן הסתגלות החיידקים לתנאי גידול (t_{lag}), קצב הגידול הסגולי המקסימלי (μ_{max}), ערך המקסימלי שעליו האוכלוסיה יכולה להגיע (B_{max}), הפרמטר של המצב הפיסיולוגי (Q), ריכוז הפחמן (C), קבוע (K_e). מודל מתמטי לגידול חיידקים הותאם לעקומי גידול במטרה לאפיין את השפעת הגורמים הסביבתיים על הגידול. מודל גידול לוגיסטי המקובל ככלי עזר בניחות תוצאות גידול חיידקים (Baranyi and Roberts, 1994; Baranyi et al., 1995; Koseki and Isobe, 2005)

$$\frac{dB(t)}{dt} = \mu_{max} \left(\frac{Q(t)}{1+Q(t)} \right) \cdot \left(1 - \frac{B(t)}{B_{max}} \right) B(t) \quad ; \quad B(t=0) = B_0 \quad (1)$$

המודל מניח קצב גידול אקספוננציאלי, אשר מתחיל בקצב נמוך, התלוי בערך ההתחלתי של הפרמטר של המצב הפיסיולוגי, ועולה עד לקצב גידול מקסימלי:

$$\frac{dQ(t)}{dt} = \mu_{max} Q(t) \quad ; \quad Q(t=0) = Q_0 \quad ; \quad (Q(t) = Q_0 e^{\mu_{max} t}) \quad (2)$$

לקראת סיום הגידול האקספוננציאלי קצב הגידול יורד עם הזמן, לפי הפקטור הלוגיסטי, עד שהאוכלוסיה מגיעה לערכה המקסימלי ונכנסת לשלב הסטציונרי. ריכוז החיידקים בנקודת זמן ספציפית:

$$B(t) = \frac{B_0 B_{max} \left(\frac{1+Q_0 e^{\mu_{max} t}}{1+Q_0} \right)}{B_{max} - B_0 + B_0 \left(\frac{1+Q_0 e^{\mu_{max} t}}{1+Q_0} \right)} \quad (3)$$

הפונקציה הזאת מאפשרת תיאור של השלב ההתחלתי של ההסתגלות לתנאי הגידול עם קצב גידול נמוך וגם השלב הסופי של הגידול, לקראת הפאזה הסטציונרית. הפרמטר של המצב הפיסיולוגי לוקח בחשבון את ההיסטוריה של אוכלוסיית החיידקים ואת השפעתה על כושר הסתגלות לתנאי גידול חדשים ומתאר את הקצב שבו גדלים החיידקים בשלבים הראשונים של הגידול.

בהנחה כי העיכוב בגידול הינו תוצאה של מחסור במקור פחמן חיוני וגם שהגידול תלוי בריכוז של מקור פחמן זה לפי קינטיקה של מיכאליס-מנטן ניתן לתאר את קצב הגידול תחת התנאים הנתונים:

$$\frac{\mu(t)}{\mu_{max}} = \frac{C(t)}{K_e + C(t)} = \frac{C(t)/K_e}{1 + C(t)/K_e} = \frac{Q(t)}{1 + Q(t)} \quad (4)$$

היחס בין ריכוז מקור הפמחון בנקודת זמן מסוימת לבין הקבוע של מיכאליס-מנטן מתאר את הערך של המצב הפיסיולוגי. ההגדרה המקובלת לזמן ההסתגלות של החיידקים לתנאי הגידול היא הזמן, שבו חותך המשיק לנקודת פיתול בחלק האקספוננציאלי את הקו האופקי של המזרע ההתחלתי:

$$t_{lag} = \ln((Q_0+1)/Q_0)/\mu_{max} \quad (5)$$

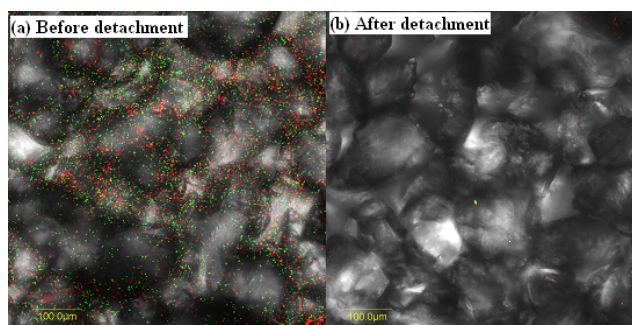
2.6. יצירת ביופילם בפלטות ELISA, 96 בארות

במטרה לבחון את כושר יצירת הביופילם של החיידק במצע נוזלי על משטח הידרופילי ולבחור מצע מזון נוזלי מתאים, נבדקה יצירת הביופילם בפלטות ELISA, 96 בארות, לפי O'Toole and Kolter, 1998 עם מספר שינויים, כמתואר להלן. החיידקים גודלו במצע LB נוזלי למשך לילה, בטלטול של 150 rpm, ב-37°C. התרבית נמהלה במצע הנבדק ביחס 1:20 ומאה מיקרוליטר הוכנסו לכל באר והודגרו למספר שעות ב-25°C. בתום הניסוי נשאב הנוזל באמצעות מערכת וואקום והבארות נשטפו 3 פעמים במים מזוקקים פעמיים, בנפח 200 מיקרוליטר. שאיבת הנוזל והשטיפות הרחיקו את החיידקים הפלנקטוניים ונשארו רק חיידקי ביופילם הספוחים לדפנות ולתחתית הבארות. לכל באר הוספו 150 מיקרוליטר צבע Crystal Violet (1%)(C.V.) והבארות הודגרו ל 15 דקות בטמפרטורת החדר. הבארות עברו שטיפה כפולה במים מזוקקים פעמיים בנפח 200 מיקרוליטר להרחקת עודפי הצבע. מיצוי הצבע מחיידקי הביופילם נעשה ע"י הוספת 150 מיקרוליטר חומצה אצטית (33%). הצפיפות האופטית של הצבע נקבעה על ידי מכשיר Micro Plate Fluorescence Reader (FL600, Bio-Tek, USA), באורך גל 595nm. הצפיפות האופטית הנמדדת מהווה מדד עקיף לכמות הביופילם בבאר. יצירת ביופילם נבדקה במספר מצעי מזון: M63+0.4% citrate, M63+0.2% glucose, 0.1xLB, LB. בכל מצע מזון החיידקים גודלו בשלוש בארות ועוד שלוש בארות שימשו כביקורת ללא חיידקים. לא ניתן להשתמש בשיטת ה-C.V. ישירות על החול, מכיוון שהחול הוא אניון וקריסטל וויולט קטיון ולכן קריסטל וויולט צובע גם את החול ולא רק את הביופילם. על מנת לכמת את המסה המיקרוביאלית בחול יש צורך בנייתוק החיידקים.

2.7. ניתוק חיידקים ממצעים גרנולריים

במטרה לבחור את השיטה היעילה ביותר לניתוק החיידקים מגררי חול נבחנו מספר שיטות. תרבית החיידקים טרייה גודלה, כמתואר לעיל. התרבית נמהלה 1:20 במצע טרי של M63+0.4% citrate. 0.75g גררי חול ו-200µl תרחיף חיידקים מהול הוכנסו למבחנות cryo-vial והודגרו למשך לילה ב-25°C. לכל מבחנה הוספו 1ml מים מזוקקים והחיידקים נותקו מהגרורים, כמתואר אצל Hinsa et al., 2003 עם מספר שינויים כמתואר להלן: סטומכר (lab-blender-400, Seward-Laboratory, UK)- במשך דקה, אמבט סוניקציה (USR3, Julabo, Germany) במשך דקה, 5 דקות, 10 דקות, 20 דקות, 30 דקות או וורטקס בעוצמה מקסימלית (Genie2, Scientific Industries, USA) 10 פעמים הרעדה קצרה, 10 שניות, 30 שניות, 60 שניות, 3 דקות. ביקורת- ללא וורטקס וללא סוניקציה. שמונה מאות מיקרוליטר הועברו לאחר הניתוק למבחנות אפנדורף (1.5 ml), המבחנות יובשו פתוחות בתנור 65°C, למשך 17 שעות. לכל מבחנה הוספו 800µl Crystal Violet (1%) למשך 15 דקות. הצבע נשאב באמצעות מערכת וואקום והמבחנה נשטפה שלוש פעמים עם 1000µl מים מזוקקים פעמיים. לבסוף הוספו 800µl חומצה אצטית (33%) למיצוי צבע. נוזל המיצוי בנפח 100µl הועבר לפלטות ELISA, והקריאות נעשו במכשיר Micro Plate Fluorescence Reader.

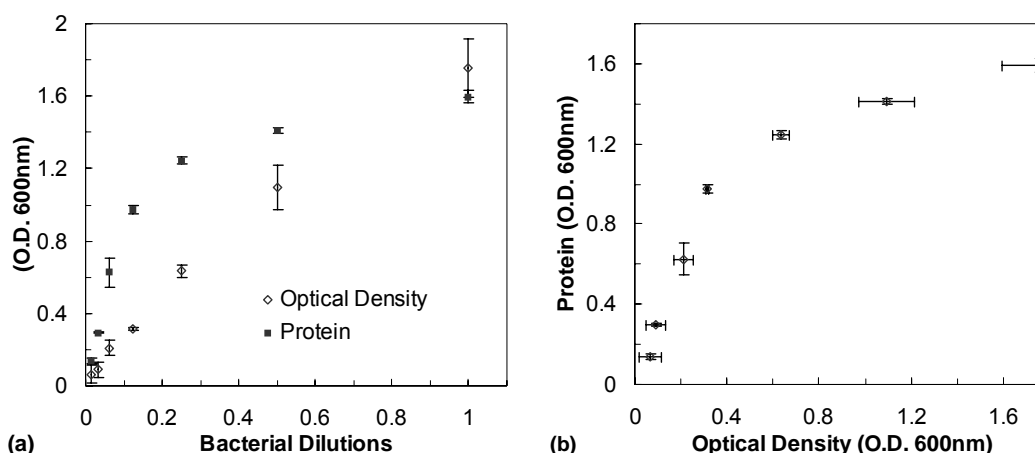
תוצאות הניסויים של השיטות השונות לניתוק לא מוצגות. השיטה שנבחרה כיעילה ביותר לניתוק החיידקים מגרגרי חול היא שלוש הרעדות של שניה בעוצמה מקסימלית במכשיר הוורטקס. יעילות הניתוק הודגמה על ידי צביעת גרגרי חול לפני ואחרי ניתוק והסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי. לאחר הניתוק לא נראו חיידקים על פני הגרגרים (איור 2.3).



איור 2.3: הסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי על גרגרי חול דק (106-180µm) עם החיידק *P. aeruginosa*, שהודגר למשך 19 שעות ב-25°C, ונצבעו ב-SYTO9 וב-PI. צבע ירוק מסמן חיידקים חיים וצבע אדום מסמן חיידקים מתים. (a) תמונה מייצגת של גרגרים לפני הניתוק (b) תמונה מייצגת של גרגרים אחרי הניתוק.

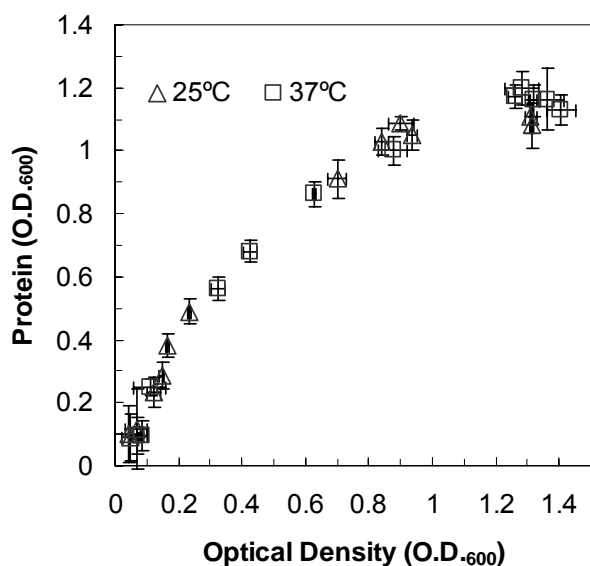
2.8. קביעת המסה הבקטריאלית ע"י בדיקת חלבון, צפיפות אופטית וספירה חיה

בדיקת חלבון (Protein Assay- PA) עם ריאגנט Bradford מבוססת על שיווי משקל בין שלוש צורות של מולקולת צבע Coomassie Brilliant Blue. בתנאים מאוד חומציים הצורה היציבה יותר היא בעלת שני פרוטונים, צבע אדום. כאשר הצבע נקשר לחלבון הצורה היציבה יותר היא ללא הפרוטונים, צבע כחול. חלבון אלבומין מסרום של בקר (BSA) (2mg/ml) שימש לבניית עקומת כיוול, כך שניתן לתרגם ערך הצפיפות האופטית (O.D.₆₀₀) לאחר הוספת הריאגנט לכמות החלבון (Bradford., 1976). במטרה לבחון האם ניתן להשתמש בבדיקת החלבון להערכת מספר החיידקים, גודלו החיידקים למשך לילה במצע LB נוזלי, ב-37°C, בטלול. התרבית נמהלה ונבדקו כמות חלבון והצפיפות האופטית של החיידקים עבור כל אחד מהמיהולים. לבדיקת חלבון הועברו 800µl מכל מיהול ו 200µl ריאגנט Bradford לקיווטה, עורבבו על ידי מספר פיפטציות ואחרי 5-10 דקות נקבעה הצפיפות האופטית ב-600nm בעזרת מכשיר ספקטרופוטומטר (CO800, Bioweye, UK) (איור 2.4).



איור 2.4: בדיקה של צפיפות אופטית וכמות חלבון, תרחיף חיידקים במצע LB. התוצאות מייצגות ממוצעים וסטיות תקן של 2 חזרות. (a) צפיפות אופטית וכמות החלבון כפונקציה של מיהול. (b) כמות החלבון כפונקציה של צפיפות אופטית.

התוצאות המוצגות באיור 2.4 מדגימות יחס לינארי יותר ככל שתרחיף החיידקים מהול יותר. בדיקת חלבון רגישה יותר עבור תרחיף מהול יותר. במטרה לכייל את בדיקת החלבון לעומת הצפיפות האופטית וספירות חיות נעשו עקומי גידול בטמפרטורות שונות (25, 37°C). חיידקים שגודלו לילה במצע LB נוזלי, נשטפו ונמהלו 1:20 וגודלו במצע מינימלי M63+citrate כאשר כל מבחנה (בנפח 10ml) מכילה 2ml תרחיף חיידקים. החיידקים גודלו בטלטול, בטמפרטורות 25, 37°C ובכל נקודת זמן נערכו בדיקות צפיפות אופטית, בדיקת חלבון וספירות חיות. הצפיפות האופטית נבדקה ישירות במבחנת גידול, בעזרת ספקטרופוטומטר ב-O.D.₆₀₀. עבור בדיקת חלבון, הועברו 800µl מהמבחנה ו- 200µl ריאגנט Bradford לקיוטה, עורבבו על ידי מספר פיפטציות ואחרי 5-10 דקות נבדקו קריאות בספקטרופוטומטר. במקביל נזרעו מיהולים עשורניים (100µl) על פלטות LB לספירה חיה



איור 2.5: הקשר בין צפיפות אופטית לבין כמות חלבון. גידול חיידקים במצע M63+citrate ב- 25°C ו- 37°C

ומספר ה-CFU/ml נקבע לאחר הדגרה ב-37°C למשך לילה. תוצאות של בדיקת חלבון כפונקציה של צפיפות אופטית, בשתי טמפרטורות, מוצגות באיור 2.5 ותוצאות של בדיקת חלבון כפונקציה של ספירות חיות, מוצגות באיור 2.6.

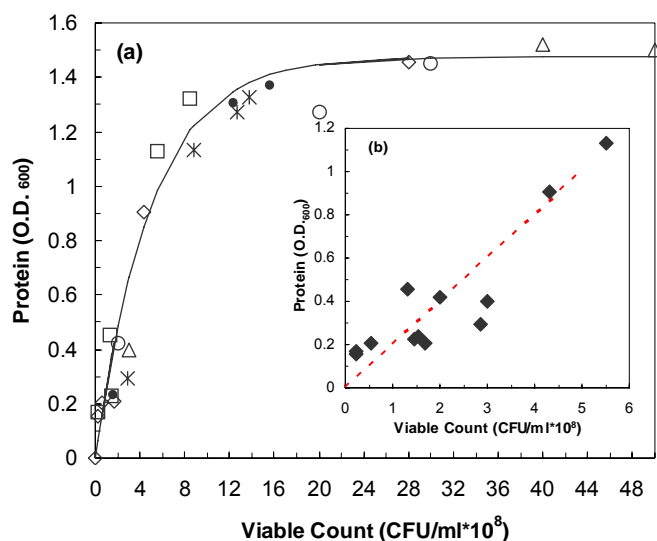
קביעת החלבון רגישה יותר מהצפיפות האופטית כאשר מספר החיידקים נמוך. הקשר בין צפיפות אופטית (איור 2.5) וספירות חיות (איור 2.6) לבין כמות החלבון אינו תלוי בטמפרטורה, בתחום הנבדק.

בכל ניסויי הגידול המדווחים בהמשך המדידות נעשו

באמצעות בדיקת חלבון ותורגמו למספר החיידקים לפי הקשר המתואר במשוואה:

$$CFU/ml = -0.5 \cdot 10^9 \cdot \ln(1 - PA/1.475)$$

PA* - מבטא את כמות החלבון הנמדדת ביחידות OD₆₀₀



איור 2.6: הקשר בין ספירות חיות לבין כמות חלבון. המשוואה המתארת את הפונקציה של הקו המחבר את הנקודות: $Protein (O.D.600) = 1.475 \cdot (1 - e^{-0.2 \cdot Viable Count (CFU/ml)})$ (a) הנתונים מייצגים ניסויים שונים בטמפ' 25°C ו- 37°C. (b) הנתונים מייצגים ערכי חלבון בריכוז חיידקים CFU/ml $0.2 \cdot 10^8$ - $6 \cdot 10^8$.

בדיקת חלבון נמצאת בקשר ישיר עם ספירה חיה, (איור 2.6b) בטווח של $0.2-6 \cdot 10^8$ CFU/ml כאשר ערכי חלבון הינם קטנים מ-1.00 (O.D.₆₀₀). כלומר, בדיקת החלבון מתאימה לכימות מספר החיידקים רק כאשר ערכי O.D.₆₀₀ קטנים מ-1.0. בחלק הלינארי של עקום כיוול ניתן להשתמש בקשר $1.00 P.A. = 5 \cdot 10^8$ CFU/ml כאשר מתקבל ערך מעל 1.00 בבדיקת החלבון יש צורך במיהול הדוגמה מכיוון שעקום הכיוול לא לינארי בתחום זה. לפי עקום כיוול סטנדרטי של בדיקת חלבון עם חלבון נקי BSA, $0.8 PA = 20 \mu g$, בהנחה שמשקל רטוב של חיידק $1.04 \cdot 10^{-12}$ g וצפיפות $1.05 g cm^{-3}$ ו-20% מהוה משקל יבש ו-60% זה החלבונים, קריאת חלבון 1 תורגמה כ- $5 \cdot 10^8$ CFU/ml לכן סה"כ חלבון לפי החישוב הבא:

$$.65.52 \mu g = 6.5 \cdot 10^{-5} g = 1.04 \cdot 10^{-12} \cdot 1.05 \cdot 0.2 \cdot 0.6 \cdot 5 \cdot 10^8 = 1 PA$$

המימצא של כמות חלבון גבוהה יותר בתמצית החיידקים יכול להעיד על הגבה שונה של הריאגנט עם מיגוון גדול של חלבונים בחיידק (לעומת הגבה עם BSA, בלבד) וכמו כן, יתכן שהיתה הגבה גם עם מרכיבים אחרים בחיידקים.

לבדיקת מספר החיידקים ע"י קביעת חלבון יש חיסרון, משום שהריאגנט נקשר לחיידקים חיים וגם למתים, ללא הבחנה. עקום הכיוול מתרגם את כמות החלבון למספר החיידקים החיים לפי עקומי הגידול במצע מזון נוזלי. בעבודה זו אנו מניחים שניתן לתרגם קשר זה גם לקביעת מספר החיידקים בניסויים בתווך גרנולרי.

2.9. גידול חיידקים במצע גרנולרי בדרגות רוויה שונות

2.9.1. במערכת סגורה

במטרה לבחון את השפעת תכולת הרטיבות על התרבות החיידקים בתווך גרנולרי, גודלו החיידקים במבחנות cryo-vial בנפח 2ml בדרגות רוויה שונות (10-100%). בכל מבחנה נקבעה דרגת הרוויה לפי כמות מצע המזון שהוסף לגרגרי החול. לפני כל ניסוי, מיזרע של החיידקים גודל, כמתואר לעיל בטמפ' 37°C למשך לילה, בטלטול. החיידקים נשטפו פעמיים (5000g, 15 דקות) והורחפו במצע גידול המתאים ונמהלו ל-0.1-O.D.₆₀₀. מניסויים קודמים נמצא ש-0.1-O.D.₆₀₀ = 3.25·10⁷ CFU/ml. דרגות הרוויה השונות בכל הניסויים נקבעו, כמתואר בטבלה 2. בשלב ראשון, הוסף תרחיף מהול ואחר כך הוספו 0.75g חול. חול דק בקוטר של 106-180 מיקרון שימש במרבית הניסויים במערכת סגורה. במטרה לחשב את נפח הנוזל הדרוש לרוויה צריך לדעת את נפח של הגרגרים, נפח הכולל ונקבוביות החול. דרגת הרוויה תוכננה לפי ערך של 40% נקבוביות וצפיפות חלקיקים של $\rho_s = 2.64 \text{g/cm}^3$ לכן הנפח שתופסים הגרגרים הוא: $0.75 \text{g} / 2.64 \text{g/cm}^3 = 0.284 \text{ml}$. 60% מהנפח הכולל מהווים המוצקים. חישוב הנפח הכולל: $0.284 \text{ml} / 0.6 = 0.473 \text{ml}$. כדי לחשב את נפח הנוזל שצריך להוסיף לרוויה יש להפחית את הנפח של החלקיקים מהנפח הכולל: $0.473 \text{ml} - 0.284 \text{ml} = 0.189 \text{ml}$. לאחר סדרה של ניסויים נקבע כי הרווית 0.75g חול במים תערך ע"י הוספת 200µl.

טבלה 2: מערכת ניסוי ששימשה לבדיקת השפעת תכולת הרטיבות

Granular media mass [g]	Bacterial suspension volume [µl]	Bacterial concentration diluted	B ₀ ⁽²⁾ (CFU/g sand)	B ₀ ⁽²⁾ (CFU/ml)	M63+0.4 citrate volume [µl]	S.D. ⁽¹⁾ [%]	Total liquid volume [µl]
0.75	10	1:20	4.33·10 ⁵	1.6·10 ⁶	190	100	200
0.75	10	1:16	4.33·10 ⁵	2.03·10 ⁶	150	80	160
0.75	10	1:12	4.33·10 ⁵	2.7·10 ⁶	110	60	120
0.75	10	1:8	4.33·10 ⁵	4.06·10 ⁶	70	40	80
0.75	10	1:4	4.33·10 ⁵	8.1·10 ⁶	30	20	40
0.75	10	1:2	4.33·10 ⁵	1.6·10 ⁷	10	10	20

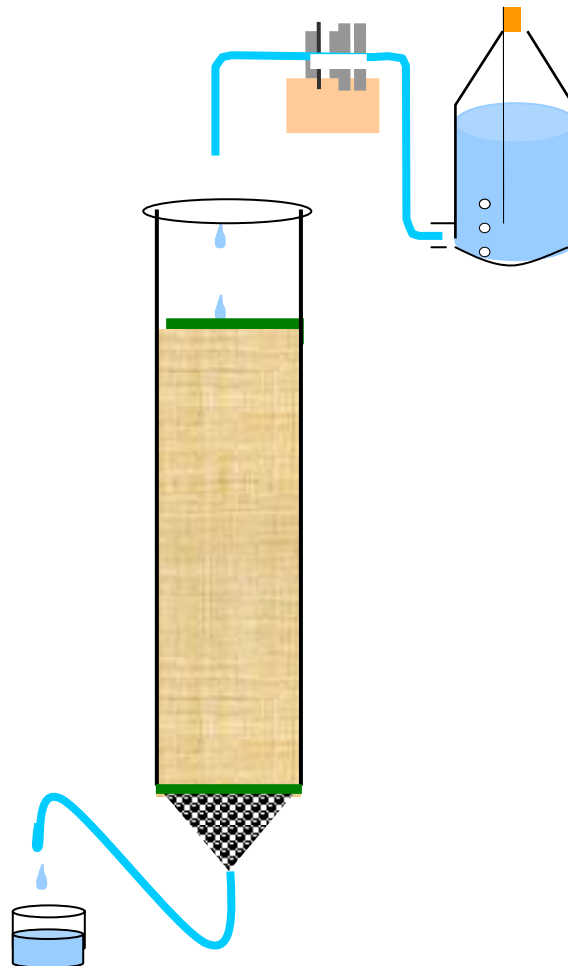
⁽¹⁾ Saturation Degree (S.D.)-דרגת רוויה, מציינת את אחוז נפח החללים המלאים במים.
⁽²⁾ B₀- מספר החיידקים בזמן אפס.

במטרה לצמצם התאדות, המבחנות היו עם סגירה אטומה (הכוללת O-Ring). המבחנות הודגרו במצב סטטי, בטמפ' של 25°C בקופסה סגורה בתנאי לחות גבוהים (מעל 85%). לאחר ההדגרה לפרק זמן מתאים, נותקו החיידקים, כמתואר לעיל וכמותם נקבעה לפי בדיקת חלבון.

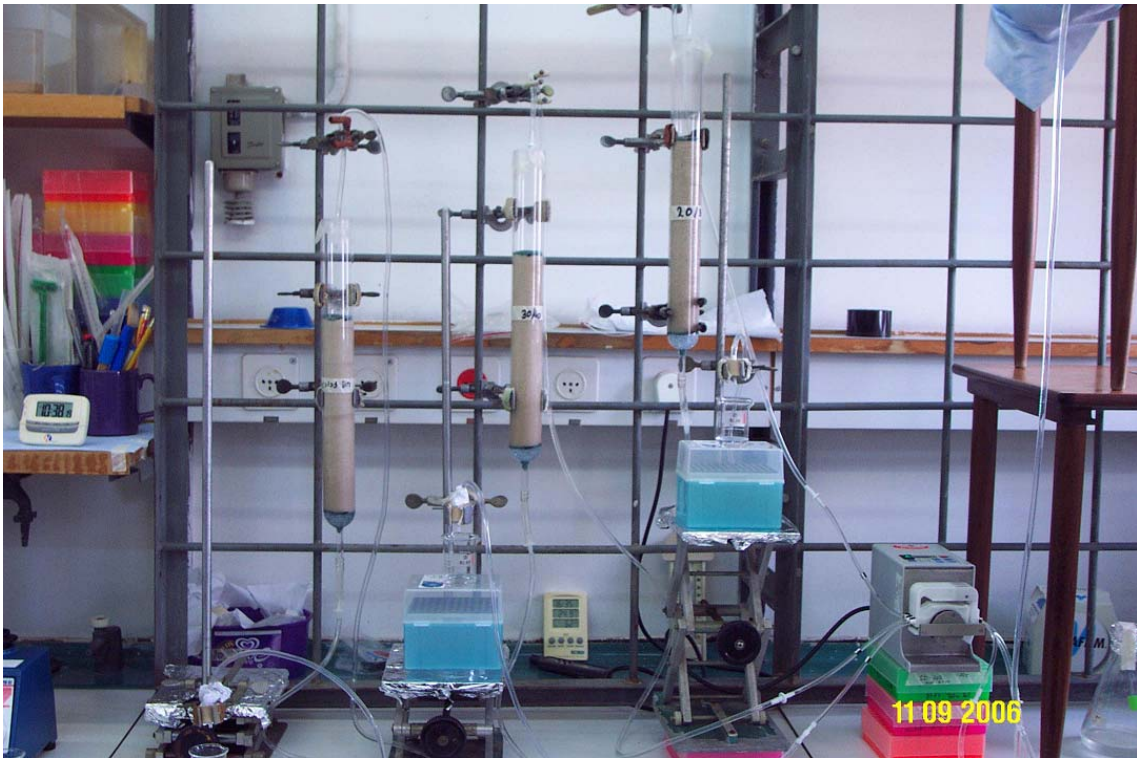
2.9.2 במערכת זרימה

מבנה המערכת:

תיאור סכמתי של המערכת מוצג באיור 2.7 ותצלום של העמודות נראה באיור 2.8. המערכת מורכבת מבקבוק מריוט ובו תמיסת מזון, משאבה פריסטלטיית (ISM597A, ISMATEC, Switzerland) ועמודת זכוכית המכילה חול וחיידקים. על פני החול הונח עיגול של סקוץ', ששימש לפיזור אחיד של תמיסת הנוזל ואילו כדוריות זכוכית בקוטר 3 מ"מ הונחו בתחתית העמודה ושימשו למילוי השטח של הקונוס מתחת לחול. עיגול נוסף של סקוץ' שימש להפרדה בין כדורי הזכוכית לבין גרגרי החול. ארלנמייר או כוס כימית שימשו לאיסוף הנוזל היוצא מהעמודה. פראפילם מחורר הוצמד לפתח העליון של העמודה על מנת להגן מפני הזיהומים מהאוויר. צילום של עמודת קרקע מקרוב מוצג באיור 2.9. צינורות (Tygon R-3603) שימשו לחיבור בין המרכיבים של המערכת. תפקיד המשאבה הפריסטלטיית היה לווסת את הספיקה ומכיוון שהספיקה, ברוב הניסויים, הייתה מאוד נמוכה, גם גובה בקבוק ההזנה ביחס לגובה הקולונות ואורך הצינור קבעו את הספיקה יחד עם המשאבה. מסיבה זו, בניסויים עם מספר עמודות במקביל היה צורך לסדר את העמודות בגבהים שונים על מנת לאפשר ספיקה זהה, כפי שנראה באיור 2.8. כל הניסויים במערכת הזרימה היו בטמפ' של $25 \pm 1^\circ \text{C}$.



איור 2.7: תאור סכמטי של מערכת זרימה.



איור 2.8: צילום של ניסוי עם שלוש עמודות וסוגים שונים של חול בכל עמודה. סידור עמודות בגבהים שונים נועד לאפשר ספיקה זהה בשלושת העמודות.

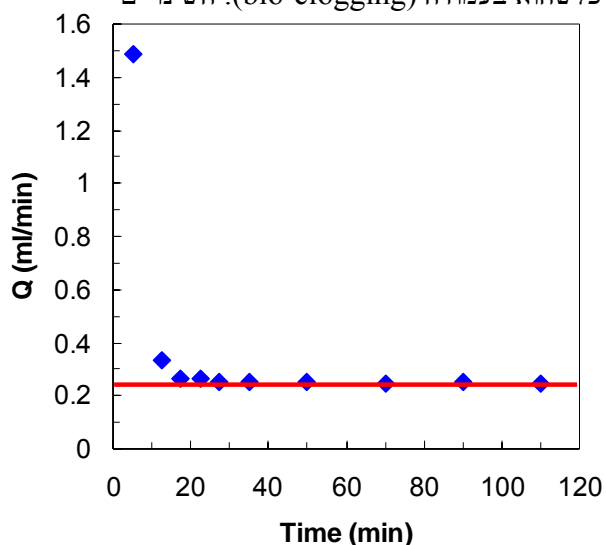
עמודות החול והפעלת המערכת עם החיידקים:
 לצורך ניסויי הזרימה שימשו עמודות זכוכית בגבהים 30, 40 ו-50 ס"מ עם קוטר פנימי (d) של 4 ס"מ, ושטח חתך (A) של 12.56 ס"מ² ($A=\pi d^2/4$). החיידקים גודלו כמתואר לעיל והתרבית נמהלה לפני תחילת כל ניסוי ל- 10^6 CFU/ml ~ O.D.₆₀₀ - 0.001. המיהול נעשה בתמיסת מזון המתאימה לניסוי. תרחיף מהול של החיידקים הוכנס לעמודה ורק לאחר מכן הוסף חול עם הרעדות תוך כדי שפיכתו, על מנת לאפשר אריזה אחידה של העמודה. גובה החול סומן מראש, העמודה הרוותה ונפח התרחיף העודף נוקז. הנפח הכולל (V_t), חושב לפי מכפלת שטח חתך (A) בגובה הקרקע (L). משקל החול שהכנסנו לעמודה (M_s), מחולק בנפח הכללי נותן את הצפיפות הגושית של החול (ρ_b). לאחר שקיבלנו את הצפיפות הגושית וצפיפות החלקיקים (ρ_s) ידועה עבור חול מסויים, ניתן לחשב את הנקבוביות בעזרת הנוסחה $n=1-\rho_b/\rho_s$. במטרה לאפשר



איור 2.9: צילום עמודת חול

היצמדות של חיידקים לגרגרי חול בתחילת הניסוי, עמודת החול עם החיידקים עמדה רוויה ללא זרימה למשך שעה, כשפתח צינור היציאה נמצא בגובה פני החול. בתום השעה הראשונה של הניסוי, הורד צינור היציאה בהדרגה (בקצב של כ-2 ס"מ לדקה) עד לגובה של 5 ס"מ מתחת לתחתית הקרקע על מנת לא לגרום לניתוק החיידקים מהגרגרים ולאפשר זרימה תמידית מבקבוק ההזנה דרך עמודת הקרקע כך, שבעמודת הקרקע נוצר פרוס של תכולות הרטיבות. גובה של 5 ס"מ מתחת לקרקע נשמר ברוב הניסויים, למעט הניסויים עם שטף גבוה או ניסויים בחול דק יותר. לאחר שעה של הצמדות ועוד כחצי שעה של הורדה הדרגתית של פתח צינור היציאה,

לוקח למערכת מספר דקות להגיע לשיווי משקל בין הספיקה (Q_d) הנכנסת, לבין הספיקה היוצאת (התנקזות של המים). הספיקה מתארת את נפח המים, דרך שטח חתך ביחידת זמן. מדידות הספיקה נעשו על ידי שקילת הנוזל שיצא מהעמודה בפרקי זמן שונים. מעקב אחרי הספיקות לאורך זמן נתן אינדיקציה לשינויים במוליכות ההידראולית, כאשר ירידה בספיקה, משמעותה איטום במקום כלשהוא בעמודה (bio-clogging). השינויים



בספיקה בתחילת הניסוי מוצגים באיור 2.10. לאחר כ-15 דקות הספיקה מתיצבת ונשארת קבועה לאורך הניסוי. בכניסה וביציאה מהעמודה נלקחו דגימות נוזל לבדיקות pH (Oyster, MCR Ltd, Taiwan), מוליכות חשמלית בעזרת מד מוליכות (CDM83, Radiometer, Copenhagen). זריעות לפלטות LB מהנוזל בכניסה לעמודה, נועדו לוודא כי אין זיהום בתמיסת ההזנה. מדידות חמצן במכשיר (Model 53, Yellow Springs Instruments, Ohio)

של הנוזל ביציאה מהעמודה, בתחילת הניסוי ולפני סוף הניסוי נועדו להדגים את מגבלת החמצן בסוף הניסוי. מדידות עכירות אופטית של הנוזל ביציאה נועדו לעקוב אחרי החיידקים הפלנקטוניים שנשטפים מהעמודה.

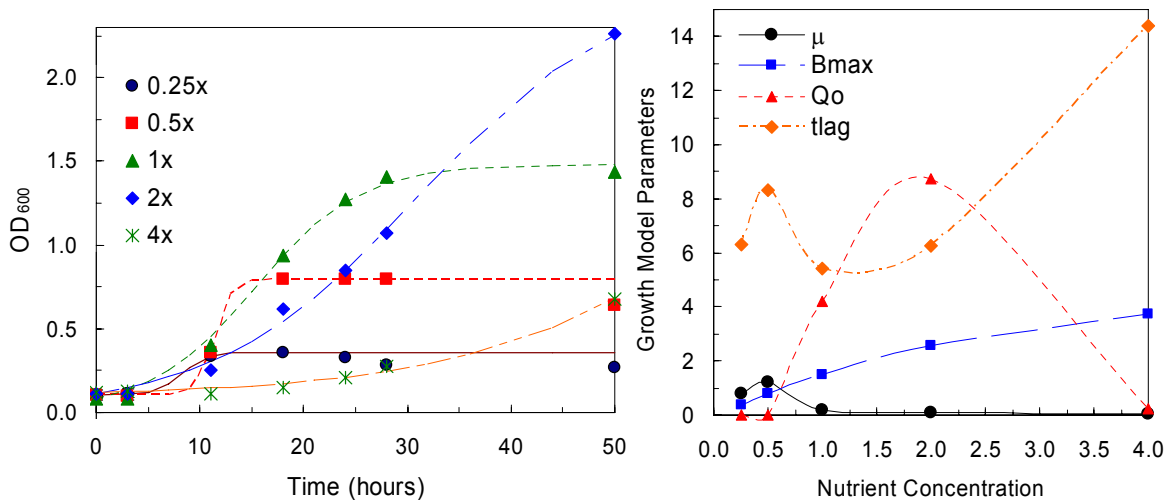
דיגום חול מהעמודה:

בסוף הניסוי נעצרה הזרימה על ידי סגירת ברז היציאה והפסקת פעילות המשאבה. באמצעות כפית מכופפת מרותכת לזרוע באורך 50 ס"מ הוצאה דוגמת חול מכל שכבה בהדרגה לכוס כימית נפרדת. עמודת החול פורקה ל-11 עד 19 מקטעים, שהונחו בכוסות כימיות. הכוסות נשקלו מיד לאחר פירוק העמודה. מכל כוס נלקחה דגימה של כ-1 גרם חול והועברה למבחנת אפנדורף, שהכילה 1200 μ l מים סטריליים וכמות החיידקים נקבעה ע"י בדיקת חלבון, כמתואר לעיל. דוגמאות נוספות של חול נלקחו מהכוסות גם לצביעות והסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי. תכולת הרטיבות בדוגמאות נקבעה ע"י שקילת הכוסות הכימיות עם החול, ייבוש ב-105 °C למשך 24 שעות ושקילה נוספת. הפרש המשקלים שימש לחישוב תכולת הרטיבות עבור כל מקטע בעמודה.

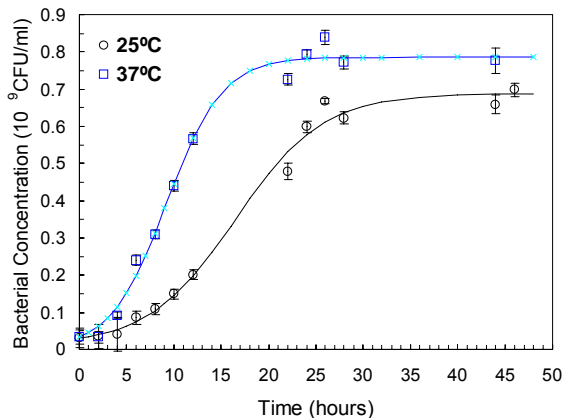
3. תוצאות ודיון

3.1. גידול חיידקים במצע נוזלי (M63+0.4% citrate) בריכוזים שונים

לפני הניסויים בתווך גרנולרי נעשו מספר ניסויי גידול של חיידקים בתמיסת מזון בריכוזים שונים. כל הניסויים בעבודה זו נעשו בריכוזים שונים של מצע M63+0.4% citrate (1 x M63C). מצע מינימלי עם תוספת ציטראט נבחן, מכיוון שציטראט נפוץ מאוד בטבע ומהווה מרכיב חיוני בכל התאים החיים (Joshi-Tope and Francis, 1995), מופרש משורשי הצמחים (Delhaize et al, 2001). הריכוזים השונים היו של ציטראט וגם של המלחים, במצע. כך ניסו לדמות מצב בטבע, כאשר עם עליה בתכולת הרטיבות גם מקורות הפחמן נמהלים וגם המלחים, לעומת מצבי יובש בהם מקורות הפחמן וגם המלחים מתרכזים בתמיסת הקרקע. החיידקים גודלו ב- 2 מ"ל מצע במבחנות פלסטיק (בנפח 10 מ"ל). גידול החיידקים בריכוזים שונים של מצע מוצג באיור 3.1.



איור 3.1: גידול החיידקים בתמיסות מזון ב- 25°C, בטלטול. (a) מודל לוגיסטי שהותאם לעקומי גידול בריכוזים שונים של תמיסת מזון. (b) השפעת ריכוז הנוטריאנטים על הפרמטרים השונים של המודל: μ- קצב הגידול, B_{max}- מקסימום גידול, Q₀- הפרמטר הפיסיולוגי, המתחשב בהיסטוריה של החיידקים לפני הניסוי, t_{lag}- זמן שלוקח לקצב גידול להתחיל לעבור לקצב הגידול המקסימלי (μ).



איור 3.2: עקום גידול חיידקים בשתי טמפ' בתמיסת מזון M63+0.4% citrate, בטלטול 150rpm. הקווים עבור המודל וכל סימן מייצג ממוצע של שלוש חזרות פחות שלוש חזרות של ביקורת וסטיית התקן.

$$\mu_{max} = 0.20 \text{ 1/h; } t_{lag} = 2.3\text{h; } 25^\circ\text{C} :$$

Pseudomonas fluorescens במצע KMB וסודיום כלוריד (Schnider-Keel et al., 2001).

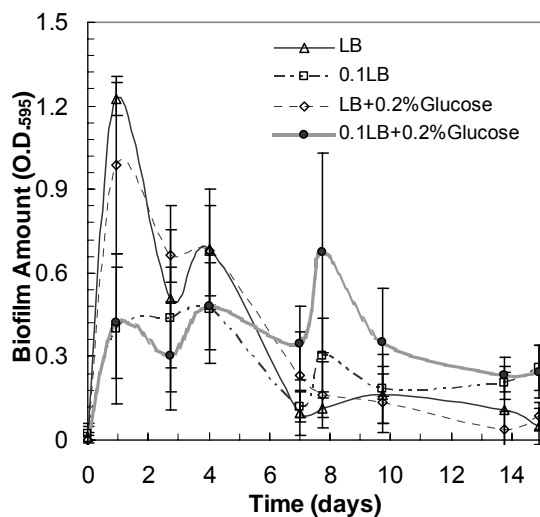
מידדות של צפיפות אופטית בפרקי זמן שונים, מראות כי ככל שריכוז הנוטריאנטים עולה כך גם הגידול המקסימלי עולה. קצב גידול עולה בריכוזים נמוכים מ- 0.5, ואחר כך יורד ככל שריכוז הנוטריאנטים עולה (איור 3.1). תוצאות של ירידה בקצב הגידול המקסימלי עם עליה בריכוז הנוטריאנטים או עליה בעקה אוסמוטית, דומות לתוצאות שדווחו עבור גידול חיידקי *E. coli* במצע עם

סוקציניט ועם סודיום כלוריד (McAneney et al., 1982), בגידול של *Pseudomonas putida* בתמיסת גלוקוז וסודיום כלוריד (Holden et al., 1997) וגם בגידול של

הפרמטר של הגידול הפיסיולוגי עלה עם עליה בריכוז הנוטריאנטים עד ערך של 2 וירד בין 2 ל-4. מכיוון שמספר המדידות בתחילת הגידול נמוך, לא ניתן לקבוע בוודאות את השפעת ריכוז המזון על Q_0 . ככל ש- Q_0 גדול יותר, כך הזמן שלוקח לחיידקים להסתגל לתנאי הגידול החדשים קצר יותר. כדי ללמוד את השפעת הטמפרטורה על התרבות החיידק *P. aeruginosa* נבדק גידול החיידק ב- 25°C וב- 37°C . הגידול המקסימלי לא הושפע מטמפ' אך קצב הגידול גדול יותר בטמפ' גבוה יותר (איור 3.5).

3.2. אפיון ויצירת ביופילם על משטחים הידרופיליים במצעי מזון שונים

לפני תחילת הניסויים בחול נערכו מספר ניסויים בנוזל על מנת לבחון את התנאים ליצירת ביופילם של החיידק על משטחים הידרופיליים במצעי מזון שונים. יצירת הביופילם נבחנה בפלטות פוליסטירן 96 בארות. הבארות בפלטות אלה טעונות שלילית והידרופיליות בדומה לתכונות גרגרי חול (Stevik et al., 2004). התפתחות ביופילם של החיידק *P. aeruginosa* נבדקה, במצב סטטי, בטמפרטורה של 25°C , למשך 15 ימים. כמות הביופילם נבדקה בנקודות זמן שונות. כל התוצאות הם ממוצעים של 3 חזרות לאחר הפחתת ערכי בארות ביקורת



(מצע ללא חיידקים). תוצאות הניסויים מוצגות באיור

3.3

לאחר יממה התפתחות הביופילם הייתה מקסימלית וכמות הביופילם ירדה בהדרגה עם הזמן. מלבד נקודת הזמן הראשונה (לאחר 24 שעות), לא נראה הבדל משמעותי ברמות הביופילם בין מצע LB לבין מצע LB מהול. לפי התוצאות (איור 3.3) תוספת של גלוקוז עיכבה את יצירת הביופילם. אפשר להסביר את העיכוב על ידי רפרסיה קטבולית. למשל, כאשר מגדלים *E. coli*

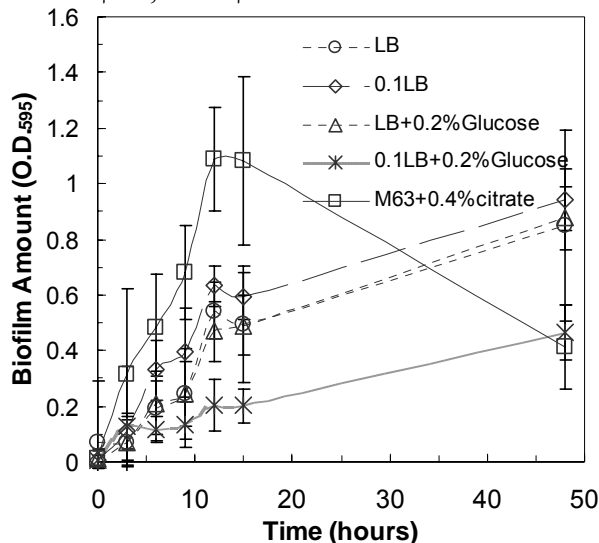
איור 3.3: קינטיקה של יצירת ביופילם בפלטת פוליסטירן בעלת 96 בארות במצעי מזון שונים. כמות הביופילם מבוטאת כערך O.D. 595nm לפי מבחן Crystal Violet (C.V.). התוצאות המוצגות הן ממוצעים של 3 חזרות לאחר הפחתת ערכי קריאה בבארות ביקורת (מצע ללא חיידקים).

עם שני מקורות פחמן, גלוקוז ולקטוז. גלוקוז הוא מקור פחמן מועדף, לכן החיידק מנצל אותו קודם ורק אחר כך כאשר כל הגלוקוז נגמר, החיידק מנצל את לקטוז. רפרסיה קטבולית מונעת ניצול של לקטוז כל עוד יש

גלוקוז בסביבה. כאשר כל הגלוקוז נגמר החיידק נכנס שוב פעם לשלב של lag, כדי להסתגל לניצול מצע חדש. במצב של גידול עם גלוקוז יש עיכוב של יצור cyclic AMP על ידי אדנילט ציקלאז ולא נוצר קומפלקס CAP-cAMP. החלבון הרגולטורי CAP (Catabolite Activator Protein), הנקשר במעלה האופרון הקטבולי ועובר אקטיבציה. בריכוז גלוקוז גבוה, רמת ה-cAMP נמוכה, כתוצאה מכך, יש עיכוב בשעתוק של אופרונים רבים (Miller, 1972). Todar's Online Textbook of Bacteriology יתכן כי גנים הקשורים ליצירת ביופילם מעוכבים אף הם במנגנון של רפרסיה קטבולית.

מכיוון, שכמות הביופילם היתה מקסימלית בנקודת הדיגום הראשונה, לאחר יממה, נבדקה יצירת הביופילם גם בפרקי זמן קצרים יותר. איור 3.4 מציג את הקינטיקה של יצירת הביופילם עד 48 שעות. בניסויים אלה נבחן גם מצע נוסף M63+0.4%citrate, מצע מזון מינימלי הכולל מלחים וציטרט, כמקור פחמן (Miller, 1972).

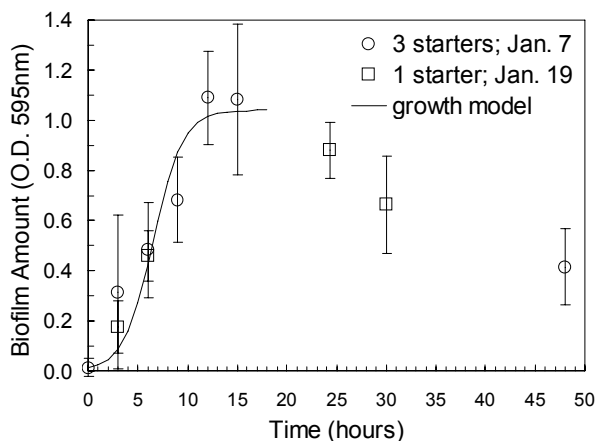
ידוע כי, מגבלות במזון מעודדות את יצירת הביופילם ותוספת מקורות פחמן מעודדת את הניתוק של החיידקים מהביופילם, המלווה בשינויים פנוטיפיים ושינויים בתנועה (Sauer et al., 2004). חיידקים בתמיסה שוחים בעזרת הפלגלום, לעומת זאת חיידקי הביופילם משתמשים בשערות הפילי ונעים בתנועה קבוצתית, הנקראת



איור 3.4. קינטיקה של ביופילם הנוצר בתוך פלטת פוליסטירן 96 בארות במצעי מזון נוזליים שונים. כל נקודה מייצגת ממוצע של 3 חזרות (מסטרטים שונים).

בזמנים של 15 עד 48 שעות על מנת לוודא, שאכן מקסימום היצור הוא בסביבות - 5 שעות.

אכן אומת כי, עליה בכמות הביופילם מתרחשת עד 15 שעות ולאחר מכן מתחילה ירידה הדרגתית בכמות הביופילם. בהסתכלות על הפלטות הצבועות ב-C.V., נראה כי רוב הביופילם נוצר כטבעת על קירות הבאר בגובה



איור 3.5: מודל גידול הותאם לניסויי קינטיקה של ביופילם הנוצר בפלטות פוליסטירן עם 96 בארות, במצע M63+0.4%citrate. התוצאות הן ממוצעים משלושה ניסויים שונים וכוללים את התוצאות שהוצגו באיור 3.2. ($t_{lag} = 0.14h$; $\mu_{max} = 0.68 1/h$)

twitching (Kearns et al., 2001). יצירת

הביופילם היתה טובה יותר במצע מינימלי M63+0.4% citrate, והוא הגיע לכמות מקסימלית כבר לאחר 12 שעות ולאחר מכן היתה ירידה בכמותו. מצע זה, שימש בעבודות רבות לבחינת יצירת ביופילם

בחיידיקי- *P. aeruginosa*

(Ramsey and Whiteley, 2004). במצעי המזון העשירים יותר, כמות הביופילם, לאחר 5 שעות היתה נמוכה יותר, אך היא ממשיכה לעלות ואחרי 48 שעות עדיין נצפתה מגמת עליה.

מאחר שבמצע M63+0.4% citrate היתה יצירת הביופילם הטובה ביותר, נערך ניסוי נוסף, לבחינת התפתחות הביופילם במצע M63+0.4% citrate

פני הנוזל וגם מעט בתחתית. הטבעת מעידה על ביופילם שנוצר בפן-הביניים בקרבת האוויר. לעומת זאת, החיידקים בתחתית הבאר יצרו ביופילם בפן-ביניים מוצק- נוזל באזור בו אספקת החמצן מוגבלת. מאחר שמצע M63+0.4%citrate נמצא כמצע המעודד יצירת ביופילם, כבר לאחר מספר שעות, נבחר מצע זה להמשך הניסויים עם תווך גרנולרי. נמצא, שקצב גידול פלנקטוני איטי יותר (איור 3.2),

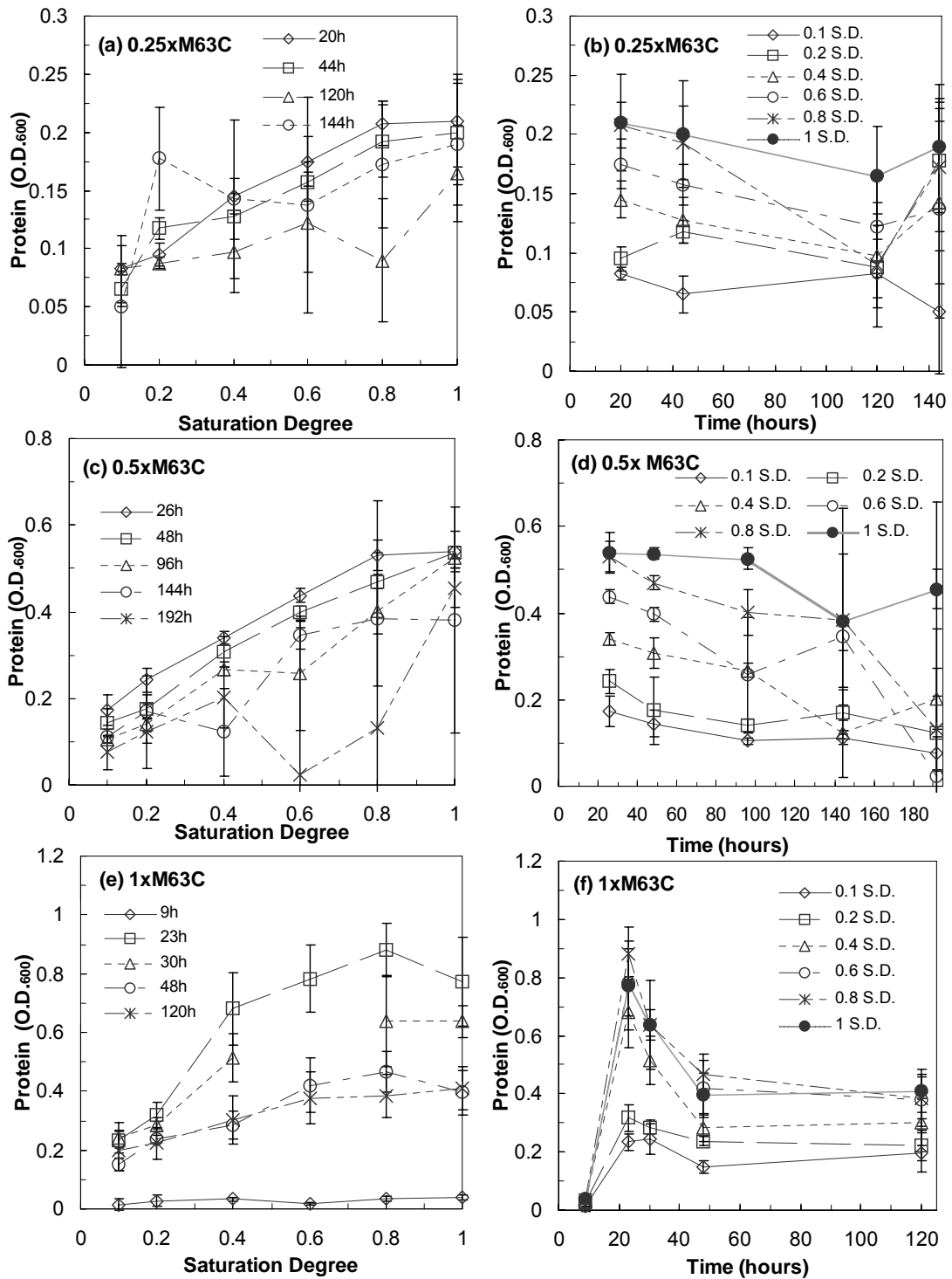
מאשר קצב יצירת הביופילם באותה טמפ' (איור

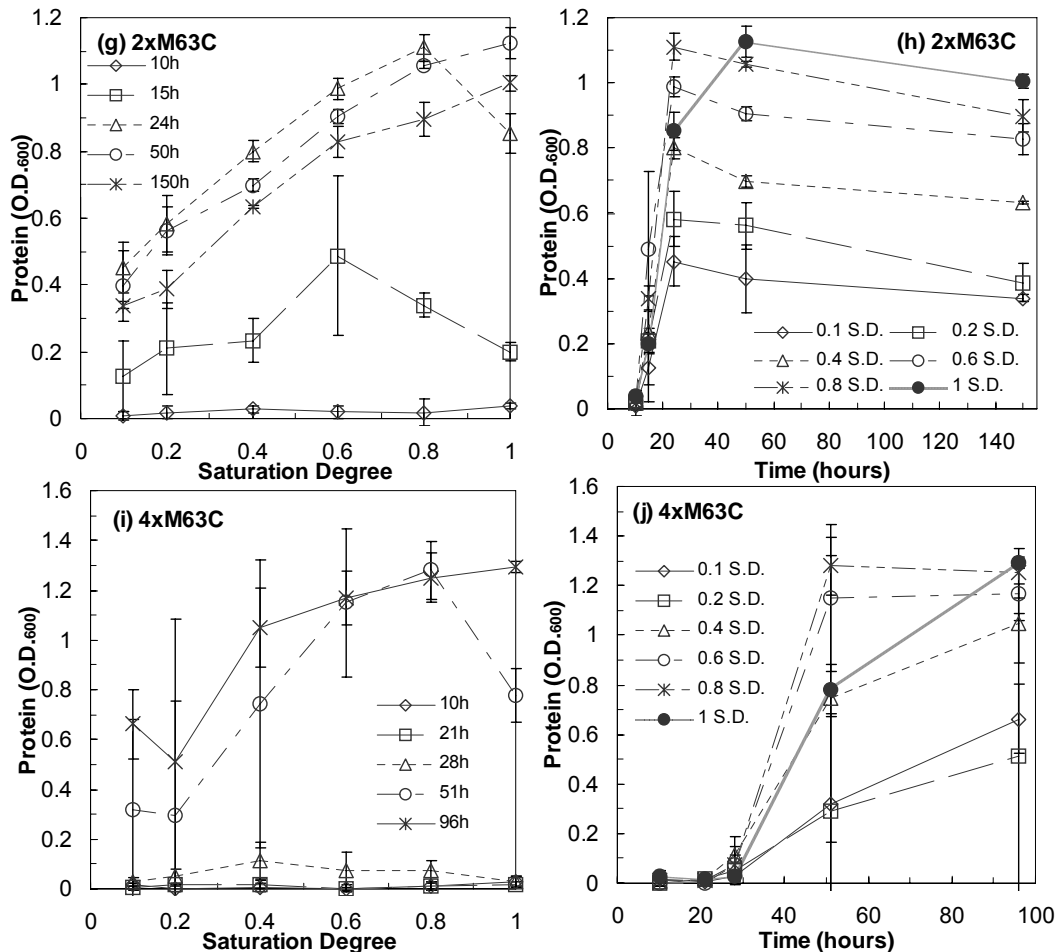
3.5)

3.3. השפעת תכולת הרטיבות של החול על גידול החיידקים במערכת סטטית סגורה

3.3.1. השפעה של ריכוז הנוטריאנטים

במטרה לבחון את השפעת תכולת הרטיבות ומשתנים משמעותיים נוספים על התרבות חיידקים ויצירת ביופילם בתווך גרנולרי, נערכו ניסויים במערכת מודל, עם חול דק בקוטר 106-180 מיקרון. מצע המזון הנבדק היה M63+0.4% citrate (1 x M63C) וכן נבדקו מצעים מרוכזים או מהולים באותו המצע ובדרגות רוויה שונות (איור 3.6).



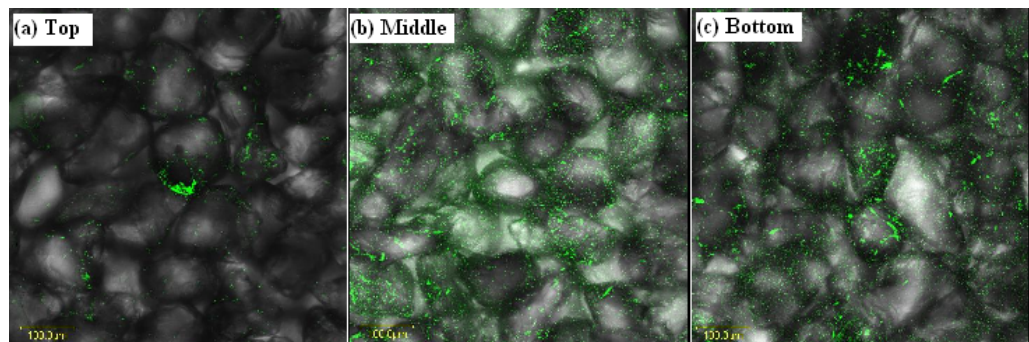


איור 3.6: כמות חיידקים כפונקציה של דרגת הרוויה או זמן, בריכוזים שונים של מצע M63C. גידול חיידקים במבחנות cryo-vials, בחול דק (106-180 μ m), ב-25 $^{\circ}$ C. כמות החיידקים מבוטאת בערכי O.D.₆₀₀ של בדיקת חלבון. (a) כמות חלבון כפונקציה של דרגת רוויה בריכוז 0.25 x M63C. (b) כמות חלבון כפונקציה של זמן בדרגות רוויה שונות בריכוז 0.25 x M63C. (c) - (e) בריכוז 0.5 x M63C. (f) - (g) בריכוז 0.1 x M63C. (h) - (i) בריכוז 0.2 x M63C. (j) בריכוז 0.4 x M63C.

לפי התוצאות המוצגות באיור 3.6, מספר החיידקים עולה עם עליה בדרגת הרוויה בכל נקודת זמן בכל הריכוזים. הגידול המקסימלי נראה לאחר יממה. שלב של lag נמשך כ-10 שעות ברוב הניסויים במערכת סגורה (חוץ מגידול בריכוז 4 x M63C), לעומת הניסויים בפלטות פוליסטרין במצע נוזלי, שהראו עליה בכמות הביופילם כבר לאחר 3-4 שעות. בניסויים בתווך גרנולרי, במערכת סגורה נראה גידול לוגריתמי של החיידקים בין 10 ל-24 שעות. בריכוז 2 x M63C לאחר 15 שעות, בניגוד לשאר הריכוזים שנבדקו, הגידול המקסימלי נצפה בדרגת רוויה 0.6 עד 0.8. יתכן שתוצאה זו מעידה, כי בתנאים אלה הספקת הנוטריאנטים בשילוב עם חילוף הגזים טובים יותר מאשר בדרגות רוויה אחרות. לאחר 24 שעות גם במצע 1 x M63C וגם במצע 2 x M63C, הגידול המקסימלי נצפה בדרגת רוויה 0.8. אחרי 15 עד 24 שעות, כשהאוקלוסיה הגיעה לגודלה המקסימלי קצב צריכת החמצן מקסימלי ויתכן שיש יתרון לדרגות רוויה של 0.6 ו-0.8 לעומת 1, בשל הספקת חמצן טובה יותר. המצע המרוכז 4 x M63C, מכיל ריכוז גבוה של מלחים ושל ציטראט. בתנאים אלה נראה כי ללחץ האוסמוטי יש השפעה על עיכוב בגידול. במצב רגיל החיידקים גדלים בסביבות היפוטוניות, כלומר ריכוז היונים, שבתוך תאי החיידקים גבוה יותר מהריכוז של הסביבה החיצונית. כדי להגיע לאיזון, המים נכנסים לתוך התאים והחיידקים מתגברים על הלחץ הנוצר בעזרת הדופן הקשיחה. המצב של עקה אוסמוטית נוצר כאשר חיידקים גדלים בסביבה

היפרטונית, כלומר ריכוז המומסים מחוץ לתאי החיידקים גבוה. כדי להגיע לאיזון, החיידקים מעלים את ריכוז היונים בתוך התאים. לאחר 28 שעות, נראה שהיתה הסתגלות של החיידקים ללחץ האוסמוטי הגבוה והחלה התרבותם. לאחר 51 שעות מקסימום גידול היה בדרגת רוויה 0.8 ואילו לאחר 96 שעות, מקסימום גידול היה במצב רוויה. הגידול המקסימלי, במספר מקרים, התקבל בדרגת רוויה 0.8 ולא ברוויה. כאשר האוכלוסיה מגיעה לגודל מקסימלי, צריכת החמצן עולה ויתכן שבמצב רוויה בו כל הנקבובים מלאים בנוזל, החמצן מהווה גורם מגביל.

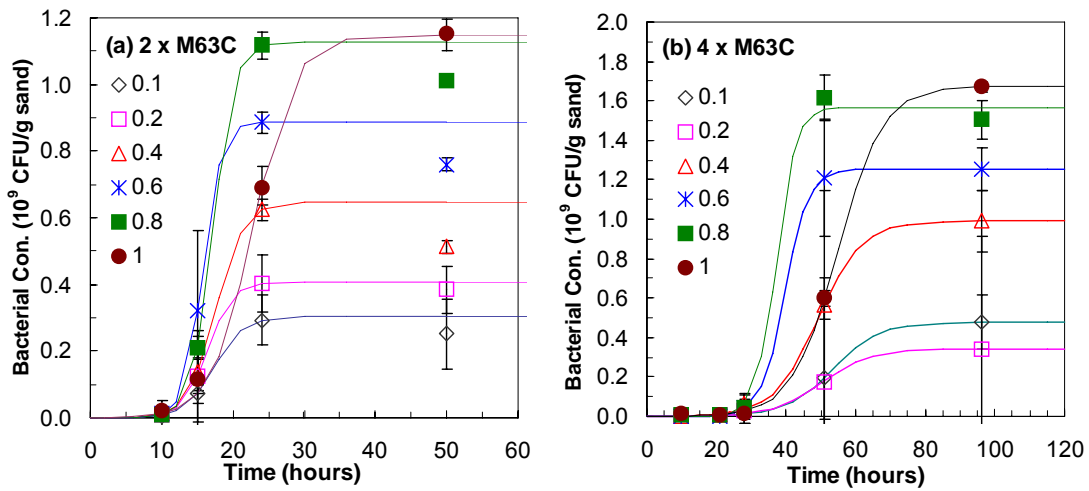
גרגרי חול עם חיידקים, שגודלו 24 שעות במצע בריכוז 1 x M63C ובדרגת רוויה 0.6, נצבעו בערכת LIVE/DEAD וצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי. נראו הבדלים בגידול החיידקים על פני גרגרים בתחתית המבחנה לעומת אמצע וגם לעומת הגרגרים שהיו למעלה. למעשה בכל מבחנה היה גרדיאנט של תמיסת המזון לא הומוגני ולכן גם הפיזור של החיידקים היה לא הומוגני (איור 3.7).



איור 3.7. צילומי CSLM של גידול החיידקים בחול דק (106-180 μ m) באזורים שונים של מדגם החול בגובה 10 מ"מ. גודל הסרגל 10 μ m. (a) בחלק העליון (b) באמצע (c) בחלק תחתון.

למרות הגודל הקטן של עמודת החול במבחנת cryo-vial (גובה כ-1.0cm), תמיסת המזון לא התפזרה בצורה אחידה לכן הגרגרים בתחתית המבחנה תמיד היו רטובים יותר מהגרגרים בחלקה העליון. איור 3.7 מתאר את גידול החיידקים בחול דק בדרגת רוויה 0.6 בחלק העליון, האמצעי והתחתון של המבחנה. בחלק התחתון של המבחנה, רוב הגרגרים לא מכוסים בביופילם ואלה המכוסים, לרוב בשכבה אחת, לא רציפה או מיקרו-מושבות. בחלק האמצעי, רוב הגרגרים מכוסים בחיידקים, אבל לא בשכבות רציפות אלא מיקרו-מושבות. בחלק העליון רק שלושה גרגרים, מתוך שדה של עשרות, מכוסים בביופילם לא רציף. פיזור החיידקים לאורך מדגם החול במבחנה מעיד כנראה על כך שבתחתית המבחנה יש מגבלת חמצן ובחלק העליון מגבלה בהספקת הנוטריאנטים ולכן רוב הביופילם נמצא על הגרגרים בחלק האמצעי של העמודה, בו קיים, כנראה שילוב מיטבי של כמות המזון והחמצן הזמינים לחיידקים.

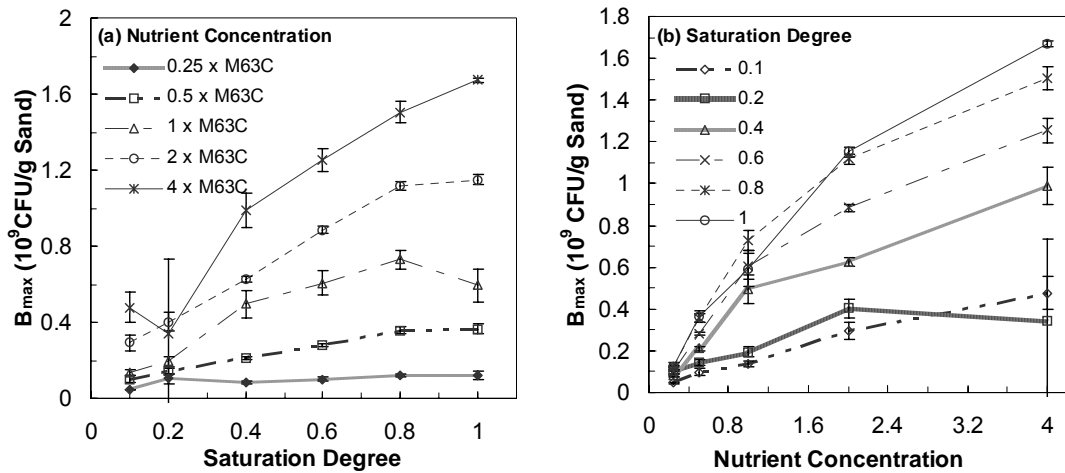
לתוצאות שהתקבלו בניסויים בריכוזים הגבוהים של הנוטריאנטים (1 x M63C, 2 x M63C, 4 x M63C) הותאמו מודלים של גידול חיידקים, לפי המשוואות שמתוארות בפרק 2.5. מודלים לוגיסטיים מאפשרים לנתח את הפרמטרים המשפיעים על גידול החיידקים. איור הבא מציג מודל של גידול חיידקים עבור תוצאות הניסויים, שהוצגו (באיורים j, h, 3.6).



איור 3.8: התאמת מודלים לעקומי גידול בריכוזים גבוהים של נוטריאנטים בתנאי גידול, כפי שמתואר באיורים j, 3.6 h. קווים עבור המודל ונקודות עבור הערכים הממוצעים שנמדדו משלוש חזרות בהפחתת הביקורת. ערכים של בדיקת חלבון תורגמו למספר החיידקים לפי עקום כיוול המוצג באיור 2.6.

הערך המקסימלי של הגידול (B_{max}) היה גבוה יותר בריכוז $4 \times M63C$, אך קצב הגידול היה נמוך יותר ושלב ה-lag ארוך יותר (איור 3.8), מה שמדגים את ההסתגלות של החיידקים לעקה אוסמוטית.

באיור 3.9 מוצגים הערכים המקסימליים של גידול החיידקים (B_{max}) בריכוזים השונים של $M63C$, כפונקציה של דרגת הרוויה או הערכים המקסימליים של גידול החיידים (B_{max}) בדרגות רוויה שונות, כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים.



איור 3.9: גידול מקסימלי של חיידקים, בתנאי גידול כפי שמתואר באיור 3.6. (a) ריכוז חיידקים כפונקציה של דרגת רוויה. (b) ריכוז חיידקים כפונקציה ריכוזי נוטריאנטים.

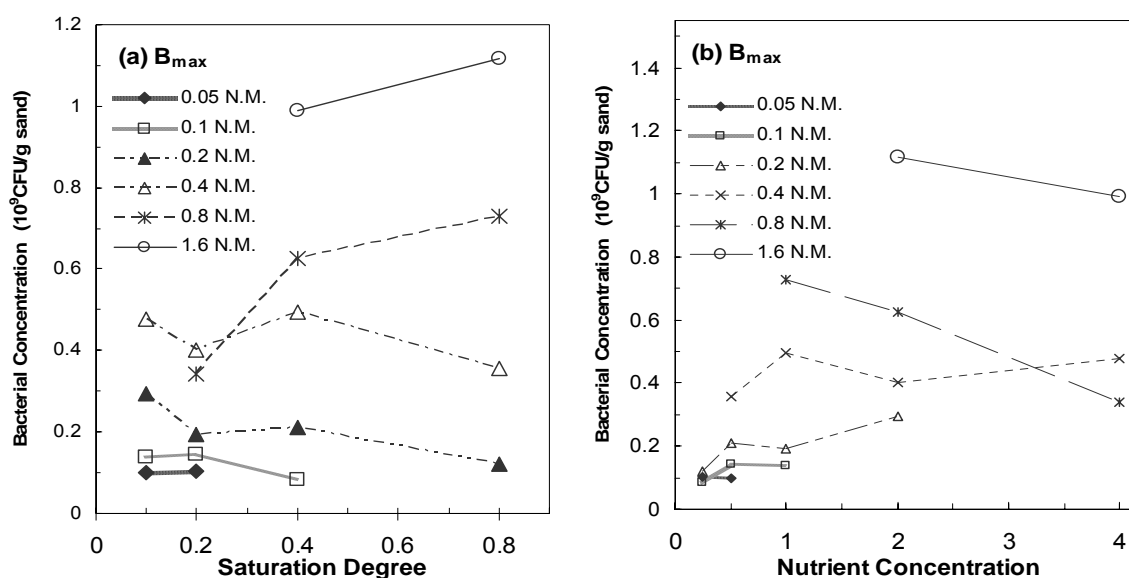
באופן כללי, הגידול המקסימלי עלה עם עליה בדרגת הרוויה וגם עם עליה בריכוז הנוטריאנטים (איור 3.9). התלות של גידול החיידקים בריכוז הנוטריאנטים מזכירה את הקינטיקה של מיכאליס-מנטן, כלומר עליה בריכוז גורמת לעליה בגידול החיידקים עד לשלב מסוים, שבו עליה בריכוז כבר לא משפיע על הגידול (איור 3.9b). מתוצאות הניסויים (איור 3.9) ניתן להסיק כי הספקת הנוטריאנטים ולא חמצן היתה הגורם המרכזי שהגביל את גידול החיידקים. מקרה אחד היה יוצא דופן, בריכוז $1 \times M63C$ בו הערך המקסימלי של הגידול (B_{max}), התקבל בדרגת רוויה 0.8 ולא 1 (איור 3.9a). במקרה זה, כנראה היתה מגבלה באספקת החמצן במצב של רוויה. נראה כי, דרגת רוויה מתחת ל-0.8, וריכוז נוטריאנטים מתחת ל- $4 \times M63C$ מגבילים את הגידול המקסימלי (איור 3.9). השאלה הנשאלת היא, האם דרגת רוויה גבוהה יותר יכולה לפצות על ריכוז נוטריאנטים נמוך ולהיפך. כיוון שריכוז תמיסת המזון בכל הניסויים היה קבוע, הרי ככל שדרגת הרוויה עלתה גם כמות

הנוטריאנטים עלתה. כדי להפריד בין ההשפעה של דרגת הרוויה לבין השפעה של כמות הנוטריאנטים, תוצאות הניסויים הוצגו עבור כמות מזון קבועה. כאשר, $NM=1$ (Nutrient Mass) המשמעות היא $0.2\text{ml}/0.75\text{g}$ (sand) בתמיסה של $1 \times M63C$, כלומר $0.8\text{mg citrate/g sand}$ או $1.067\text{mg citrate/g sand}$. ערך $NC=1$ (Nutrient Concentration), מייצג את ריכוז הנוטריאנט $1 \times M63C$. כמות המזון היא מכפלת דרגת הרוויה בריכוז הנוטריאנטים.

טבלה 3.1: ניתוח תוצאות עבור כמות מזון NM קבועה וריכוז נוטריאנטים NC ודרגת רוויה SD משתנים.

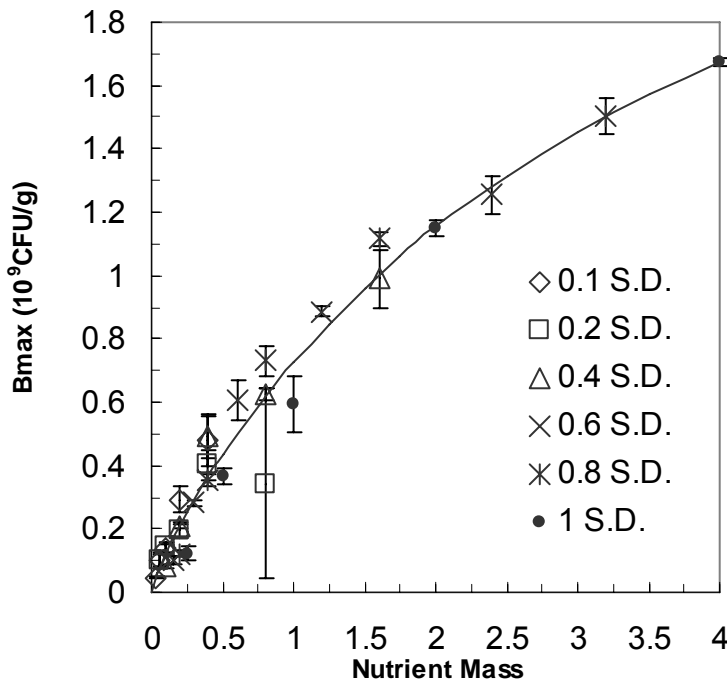
SD	0.1	0.2	0.1	0.2	0.4	0.1	0.2	0.4	0.8	0.1	0.2	0.4	0.8	0.4	0.8	0.4	0.8
NC	0.5	0.25	1	0.5	0.25	2	1	0.5	0.25	4	2	1	0.5	2	1	4	2
NM	0.05	0.05	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	0.4	0.4	0.4	0.4	0.8	0.8	1.6	1.6

לאחר חישוב כמות המזון (NM) בניסויים השונים, הוצגו התוצאות של מספר החיידקים המקסימלי כפונקציה של דרגת הרוויה וכפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים, בניסויים בהם ערך ה- NM המחושב היה קבוע (איור 3.10).



איור 3.10: סיכום תוצאות של גידול מקסימלי של החיידקים, בתנאי הגידול כפי שמתואר באיור 3.6 (a) גידול החיידקים בנוכחות כמויות מזון שונות כפונקציה של דרגת הרוויה. (b) גידול החיידקים כפונקציה של ריכוז נוטריאנטים בכמויות מזון שונות.

בכמות מזון קטנה (עד 0.4) גידול חיידקים יורד עם עליה בדרגת הרוויה (איור 3.10a). עבור כמות מזון גדולה (מעל 0.8) היה היפוך מגמה (איור 3.10a). נראה כי לריכוז הנוטריאנטים השפעה חזקה יותר ודרגת רוויה גבוהה לא יכולה לפצות על ריכוז נמוך וברור כי השילוב של דרגת הרוויה עם ריכוז הנוטריאנטים היו הגורם העיקרי שהשפיע על הגידול המקסימלי במערכת סטטית. סיכום התוצאות של הגידול המקסימלי בדרגות רוויה וריכוזים שונים כפונקציה של כמות המזון מוצג באיור 3.11.



איור 3.11: סיכום תוצאות גידול מקסימלי של חיידקים (B_{max}) בתנאים, כפי שמתואר באיור 3.6, כפונציה של כמות המזון. הקו המחבר בין הנקודות הותאם לפי המשוואה:
 $B_{max} \text{ (CFU/g)} = 2.449(1 - \exp(-0.352NM^{0.854}))$

כל התוצאות מסודרות בקו עולה ככל שכמות המזון עולה (איור 3.11), כלומר כמות המזון היתה הגורם העיקרי שקבע את גידול החיידקים במערכת סטטית. בכמות מזון קטנה הוא מהווה גורם מגביל יחיד, מכיוון שהגרף לינארי עם שיפוע $0.94 \cdot 10^9 \text{ CFU}$ citrate mg^{-1} . בכמות מזון גדולה העקום מתכופף והשיפוע יורד ל- $0.18 \cdot 10^9 \text{ CFU mg}^{-1}$ citrate בשל גורמים מגבילים נוספים, למשל אספקת חמצן, הצתברות מטבולית משניים המעכבים את הגידול. כאשר מסת הנוטריאנטים "1" (למשל, ריכוז תמיסת

המזון 1 x M63C ודרגת רוויה של 100%), יש 0.8mg citrate בתוך מבחנה עם 0.75g חול. הפחמן מהווה 28% ממולקולת ציטראט, לכן במבחנה רוויה עם 0.75g חול יש $229 \mu\text{g C}$ ו- $305 \mu\text{g C}$ לגרם חול לפי המסה המולרית

של הציטראט ושל הפחמן ($\text{MW}(\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}) = 294.1 \text{ g/mol}$; $\text{MW}(\text{C}_6) = 84 \text{ g/mol}$)

בהנחה שנפח החיידק $1.04 \mu\text{m}^3$ ($V_{\text{bacteria}} = \pi r^2 \cdot h$), ובהנחה של צפיפות רטובה 1.05 g cm^{-3} , 20% משקל יבש, ו-55% ממשקל יבש זה הפחמן, מתקבל $1.2 \cdot 10^{-13} \text{ g C cell}^{-1}$ ו- $1.9 \cdot 10^9 \text{ cells NM}^{-1}$. כאשר כמות המזון "1" השיפוע $B_{max}(\text{NM})$ הוא $0.75 \cdot 10^9 \text{ CFU}$ לערך. כלומר, רק 40% מהפחמן מצוי בחיידקים חיים ועוד 60% השתחררו בתור פחמן דו חמצני, נמצאים בתאים מתים או ב-EPS. שחרור פחמן דו חמצני יכול לגרום לירידה ב-pH. אך מדידות pH עם נייר לקמוס לא מעידות על ירידה ואולי אף עליה קלה.

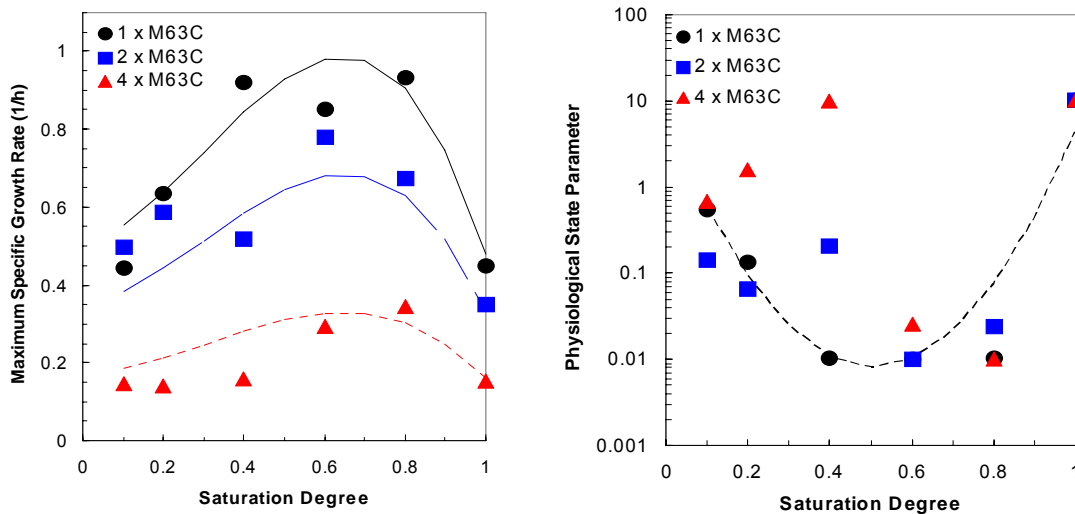
לפי מקורות בספרות, ריכוזים קריטיים של החמצן הדרוש לפירוק בנזן על ידי *Pseudomonas fluorescence* וגם *Pseudomonas putida* הם בטווח של בין 10 ל- $15 \mu\text{M}$ (Mahendran et al., 2006). כלומר, לחיידקים אלו יש יכולת לפרק בנזן בתנאים כמעט אנארוביים. ידוע גם כי *P. aeruginosa*, יכול לנצל חומצה אמינית ארגינין בתנאי גידול ללא חמצן (Mercenier et al., 1980). קצבי הנשימה של החיידקים השונים המדווחים בספרות הם: $0.79 \cdot 10^{-13}$ - $1.66 \cdot 10^{-13} \text{ gO}_2 \text{ cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ (Smith and Kemp, 2003), 0.007 - $0.043 \text{ gO}_2 \text{ dry cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ בשלב סטציונרי ולוגאריטמי (Tzoris et al., 2002), 0.015 - $0.053 \text{ gO}_2 \text{ dry cell}^{-1} \text{ d}^{-1}$ בחיידק *P. putida* M10 בשלב סטציונרי ולוגאריטמי (Tzoris et al., 2002). כמות החמצן ההתחלתית במבחנת cryo-vial בנפח של 2ml היא 0.5mg משקל יבש של החיידקים הוא $0.22 \cdot 10^{-12} \text{ g}$ מתורגם לפי קצבי נשימה בטווח של בין $0.37 \cdot 10^{-13}$ ל- $2.8 \cdot 10^{-13}$ g O_2 לחיידק ליום (Turakhia and Characklis, 1988). קצבי נשימה מקסימליים עבור *P. aeruginosa* בתנאי כמוסטט נעים בין 117 לבין $188 \mu\text{l O}_2$ למ"ג משקל יבש לשעה (Ng and Dawes, 1973). אם משקל יבש $0.22 \cdot 10^{-12} \text{ g}$, קצב נשימה בין $8.1 \cdot 10^{-13}$ לבין $13 \cdot 10^{-13} \text{ g O}_2$ לחיידק ליום (לפי הדיווחים בספרות),

0.5mg חמצן אמורים להספיק לאוכלוסיית חיידקים בסדר גודל של בין $0.4 \cdot 10^9$ לבין $2.5 \cdot 10^{10}$ מכיוון שמספרים אלו יותר גבוהים מהמקסימום שגדלו בניסויים (איור 3.11) ניתן להסיק כי לא היתה מגבלה בחמצן במערכת סגורה.

עבור חימצון הכימי של ציטראט דרושות 9 מולקולות של חמצן, כדי לחמצן שתי מולקולות של ציטראט, כלומר 0.49 mg O_2 ל- 1 mg citrate , לכן ניתן להסיק כי 0.5 mg O_2 מספיקים לחימצון של כמות מזון של 1 mg citrate . בנוסף לחמצן הכלוא במבחנה בתחילת הניסוי, גם אספקת החמצן בדיפוזיה יכולה להוות גורם מגביל עבור גידול החיידקים במבחנה.

גובה עמודת החול במבחנה $l=1 \text{ cm}$, ומקדם הדיפוזיה האפקטיבי במצב רוויה $D_a = 0.66 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, ולכן כאשר הנקבוביות היא $n=0.4$, $D_w = 2.6 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$, זמן אופייני לדיפוזיה הוא $0.8 \cdot 10^5$ שניות, ניתן לחישוב לפי $t_d = l^2/2Da$ (Friedman, 1993). בדרגת רוויה מינימלית ($S.D.=0.1$), מקדם הדיפוזיה $D_a = 0.035 \cdot 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$ (Friedman, 1993) והזמן של הדיפוזיה האופיינית הוא רק 15 שניות. בדרגות רוויה נמוכות הדיפוזיה מהירה ולא מגבליה את הגידול, לעומת זאת בדרגות רוויה גבוהות קצב הדיפוזיה איטי ויתכן שמהווה גורם מגביל גידול.

מודל לוגיסטי הותאם לתוצאות גידול חיידקים בריכוזים גבוהים (1 x M63C, 2 x M63C, 4 x M63C), המאפשר ניתוח של הפרמטרים השונים המשפיעים על גידול החיידקים. באיור 3.12 מוצגות התוצאות של קצב הגידול הסגולי המקסימלי (μ_{max}) והפרמטר של המצב הפיסיולוגי של החיידק (Q_0), כפונקציה של דרגת רוויה.



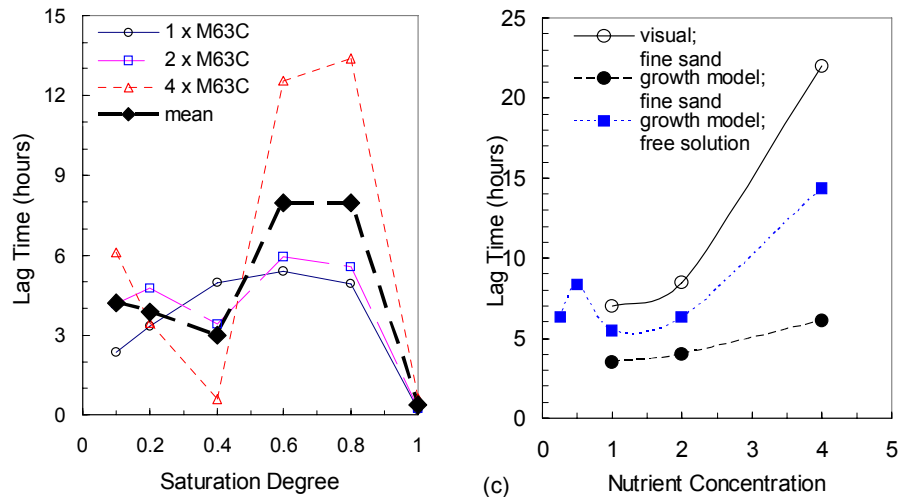
איור 3.12: קצב גידול מקסימלי של חיידקים בריכוזים משתנים של M63C, כפונקציה של דרגת רוויה, בתנאי גידול כפי שמתואר באיור 3.6. קצב הגידול מתואר לפי המשוואה:

$$\mu_{max}(25^\circ \text{C}) = (-2.89SD^3 + 2.62SD^2 + 0.25SD + 0.50) \cdot (1.46e^{-0.37NC})$$

לפי ניתוח התוצאות המוצג באיור 3.12 (בצד שמאל), קצב הגידול היה מקסימלי בדרגות רוויה 0.6-0.8, בשלושת הריכוזים של M63C. בריכוזים נמוכים יותר קצב התרבות גבוה יותר. מכאן המסקנה היא, שקצב הגידול תלוי בדרגת הרוויה וגם בריכוז. עליה בקצב גידול עם עליה בדרגת הרוויה וירידה לקראת הרוויה המלאה דווחה בספרות (Koga et al., 2003).

הפרמטר של הגידול הפיסיולוגי היה נמוך ביותר בדרגות רוויה בינוניות בכל הריכוזים (איור 3.12). למרות הסדר של התוצאות לא ניתן להסיק מסקנות לגבי הפרמטר של הגידול הפיסיולוגי עקב מיעוט המדידות בשלבים

הראשוניים של הגידול. איור 3.13 מציג פרמטר נוסף, חשוב לתיאור גידול החיידקים בתנאים שונים, והוא t_{lag} , פרק זמן שלוקח לחיידקים כדי להגיע לקצב גידול מקסימלי. פרמטר זה מוצג כפונקציה של דרגת הרוויה עבור שלושת הריכוזים הגבוהים. הצגה נוספת כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים עבור התוצאות, שנמדדו בשלושת הריכוזים הגבוהים, המודל שהותאם לגידול בשלושת הריכוזים הגבוהים והמודל שהותאם לגידול בנוזל בחמישה ריכוזים של תמיסת המזון.

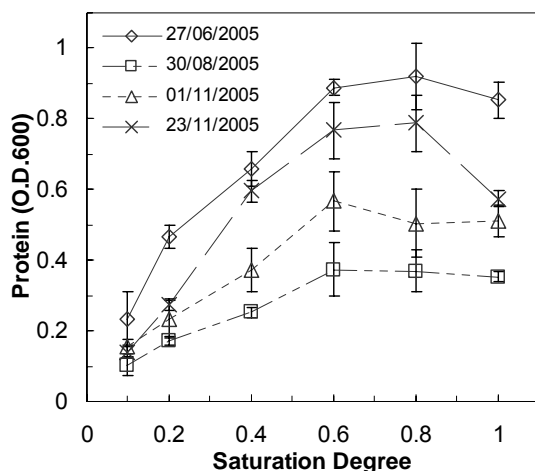


איור 3.13: הקשר בין t_{lag} לבין דרגת הרוויה בריכוזים שונים של נוטריאנטים (בצד שמאל). הקשר בין t_{lag} לבין ריכוז נוטריאנטים (בצד ימין).

t_{lag} כפונקציה של דרגת רוויה היה מקסימלי בדרגת רוויה 0.6-0.8 והתוצאה חזרה על עצמה בשלושה ניסויים עם ריכוזים שונים של תמיסת המזון (איור 3.13, בצד שמאל). t_{lag} כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים עלה ככל שהריכוז עלה, יתכן ובריכוזים נמוכים יותר מ-1 x M63C t_{lag} היה ארוך יותר אך מכיוון שחסר מדידות בשלבים ההתחלתיים של הגידול בריכוזים אלו לא ניתן לקבוע. התארכות בזמן t_{lag} עם עליה בריכוז תמיסת המזון מעידה על הסתגלות לתנאים של לחץ אוסמוטי.

3.3.2 שינויים פנוטיפיים בחיידק עם הזמן

השפעת דרגת הרוויה על גידול החיידקים נבדקה בתאריכים שונים והתוצאות מוצגות באיור 3.14. כל התנאים של הניסויים היו זהים ועל כן ניתן להניח כי ההבדלים נובעים מהשתנות של החיידקים. במטרה לבחון את השפעת השינויים המתרחשים בחיידק עם הזמן, נאספו תוצאות של ניסויים בפרקי זמן שונים. לחיידק *P. aeruginosa* כמוזכר לעיל, שלוש מורפופינים של מושבות. בכל הניסויים נבחרו מושבות קטנות או בינוניות



איור 3.14: התרבות חיידקים מ-4 ניסויים שונים, במבחנות cryo-vials, בחול גס (500-850 μ m), ב-25 $^{\circ}$ C. התרבות החיידקים נבדקה ע"י בדיקת חלבון בערכי O.D.₆₀₀, בדרגות רוויה שווה וריכוזות זמו שווה

אשר הינן בעלות יכולת יצירת ביופילם דומה.

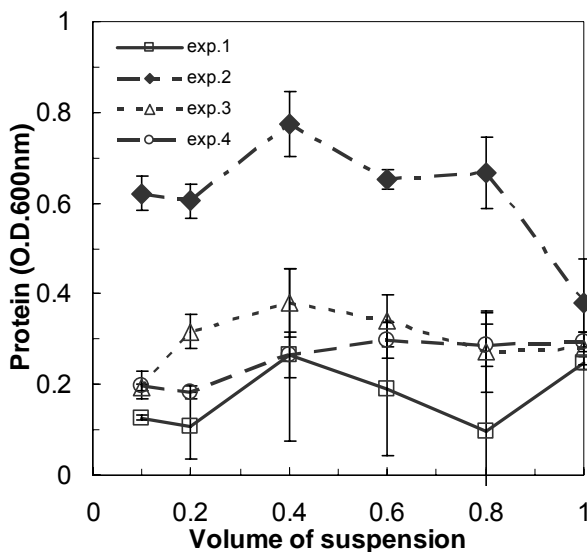
חיידקים יכולים לבקר ביטוי של אנטיגנים שונים

במנגנון הנקרא, Phase Variation

(Deziel et al., 2001). מנגנון זה מאפשר לחיידק להתאים את עצמו לסביבה משתנה. פנוטיפ יכול להשתנות מפעיל ללא פעיל בתדירות מאוד גבוהה, השינויים הם בדרך כלל אקראיים. כתוצאה משינויים במנגנון של Phase Variation, נוצרות תת-אוכלוסיות בעלות פנוטיפים מגוונים. דווח שמושבה בעלת קוטר 3mm יותר הידרופובית ממושבות גדולות עם קוטר 12mm וגם ההיצמדות של חיידקים ממושבה קטנה לגרגרי חול יותר חזקה מאשר הצמדות חיידקים שמקורם במושבות בעלות פנוטיפ של מושבה גדולה (Deziel et al., 2001). לכן, בכל הניסויים נבחרו המושבות הקטנות או הבינוניות אך לא המושבות הגדולות (2.3). למרות זאת, היו שינויים בתוצאות גידול החיידקים בחזרות של הניסויים שנערכו בפרקי זמן שונים. למרות ההבדלים בגידול החיידקים בניסויים, המגמה הכללית של התוצאות נשארה ללא שינוי, לכן השינויים המתרחשים בחיידק עם הזמן לא השפיעו, כנראה, על המסקנות.

3.3.3 השפעת נוכחות גרגרי חול על התרבות החיידקים

כדי לבחון את השפעת התווך הגרנולרי על גידול החיידקים, נערכו ניסויים עם כמויות מצע מזון זהות לאלה שהיו בניסויים עם חול, בדרגות רוויה שונות, אך ללא חול במבחנות. הניסויים נערכו עם נפחים קטנים של תמיסת המזון והיו בעיות טכניות של פיזור הנוזל במבחנה. לכן נערכו ניסויים עם נפחים הגדולים פי-5 מאלה ששימשו בניסוי החול. גידול החיידקים לאחר 24 שעות, הוצג כפונקציה של נפח תמיסת המזון, המתאימה לדרגות שונות של רוויה בניסויים עם תווך גרנולרי. ומבוטא על ידי בדיקת חלבון.



תוצאות הניסויים 1, 3 ו-4 מראים חזרות של הערכים עבור סטרטרים שונים. בניסוי 2 נפחי תמיסת המזון הוגדלו פי 5 אך הגידול עלה רק פי 2.5. הסיבה לכך יכולה להיות שחיידקי *P. aeruginosa*, הגדלים בנוזל מתרכזים בפן הביניים אוויר-נוזל וכן על קרקעית המבחנה. כיוון שללא טלטול החיידקים מתרכזים בנישות אלה, הגדלת הנפח פי-5 לא גרמה להעלאת הגידול פי-5. את הגידול בנוזל אפשר להשוות לגידול בחול, במצב רווי. גידול בחול רווי (איור 3.6) היה גבוה יותר מגידול בנוזל (איור 3.15), מכיוון

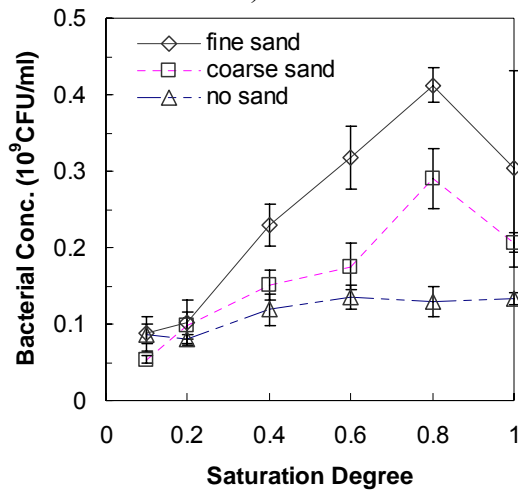
איור 3.15. גידול החיידקים לאחר 24 שעות במבחנות cryo-vials, כפונקציה של נפח תמיסת המזון המתאים לדרגות הרוויה השונות בניסויים עם תווך גרנולרי. כמות החיידקים נבדקה ע"י בדיקת חלבון בערכי O.D.₆₀₀. ניסויים 1,3,4 הכילו תמיסת מזון (1 x M63C) בנפחים זהים לאלו שהיו בניסויים עם חול. בניסוי 2 הנפחים הוגדלו פי-5.

שבמבחנה עם חול יש יותר שטחי פנים להצמד ולהתרבות עליהם. מסיבות פיסיקליות, לחיידקים הגדלים על משטחים יש סיכויים גבוהים יותר לפגוש במולקולות של מזון ועל כן הם מבזבזים פחות אנרגיה בהשגת המזון.

3.3.4 השפעת גודל גרגרי החול

ככל שהחלקיקים קטנים יותר, כך שטח הפנים הסגולי שלהם גדול יותר ולכן יש להם יותר אתרי ספיחה פוטנציאליים עבור החיידקים. כאשר משווים את שטח הפנים של חלקיקי חול דק (106-180µm), לעומת חלקיקי

חול גס ($500-850\mu\text{m}$), שטח הפנים הסגולי של החול הדק הינו פי 5 גבוה יותר מזה של חול גס. התוצאות המוצגות באיור 3.16, של ניסויי גידול חיידקים למשך 24 שעות, בתמיסת מזון $1 \times \text{M63C}$, בשני סוגי חול וניסוי ללא חול. הניסויים התבצעו באותם תנאים כמו הניסויים הקודמים במערכת מבחנות (המפורטים באיור



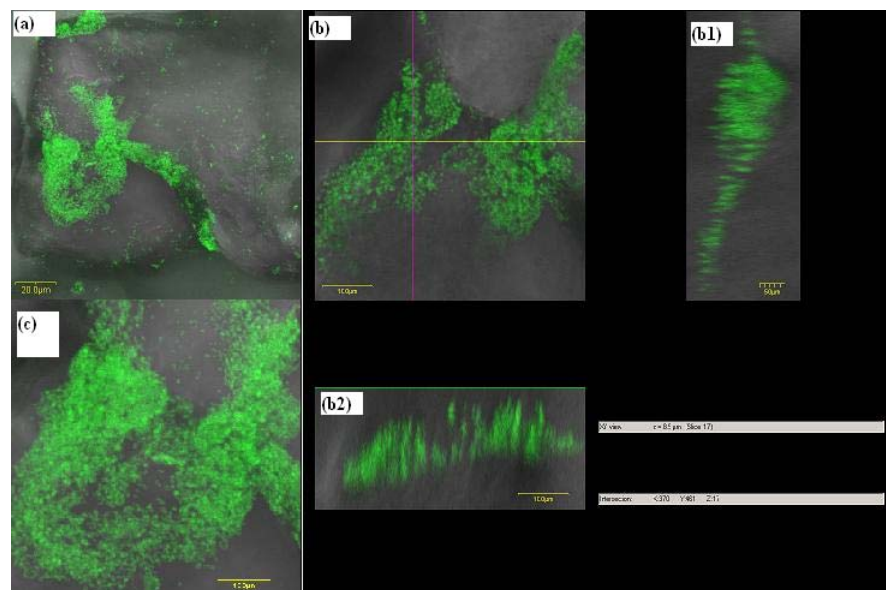
3.6). הגידול שהתקבל נמוך יחסית לתוצאות הגידול המוצגות בפרקים הקודמים, ניתן ליחס זאת לשינויים המתרחשים בחיידק עם הזמן (פרק 3.3.2).

למרות ששטח פנים סגולי בחול דק גדול פי-5 לערך, מאשר בחול גס, הגידול בחול דק היה גבוה בפקטור קטן מ-2. גידול החיידקים בחול היה גבוה יותר מאשר בנוזל. התוצאות שהתקבלו הן בסדר הגיוני, גידול גבוה ביותר בחול דק, אחר כך בגס והגידול הנמוך ביותר היה בנוזל. בדומה למצב בטבע,

איור 3.16. השוואה של גידול חיידקים בחול דק ($106-\mu\text{m}$) בחול גס ($500-850\mu\text{m}$) ובתמיסת מזון, ללא חול. נפחים של תמיסת מזון בניסוי ללא חול היו זהים לנפחים של תמיסת מזון בניסויים עם חולות בדרגות רוויה שונות. הניסוי נמשך 24 שעות ב- 25°C , במבחנות cryo-vials.

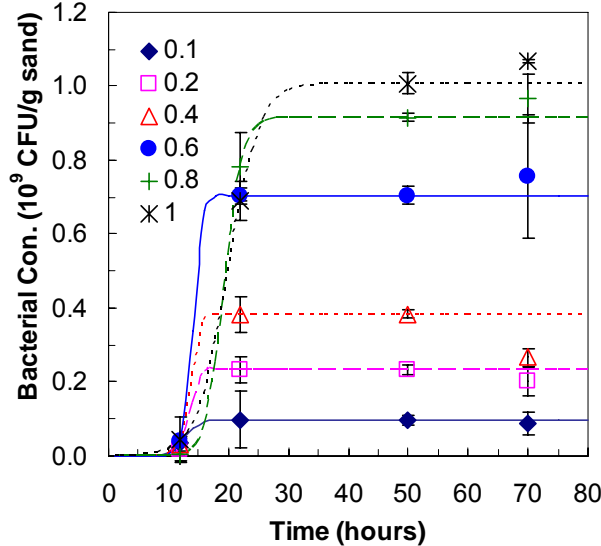
חיידקים הגדלים בצמוד למשטחים בעלי יתרונות לעומת החיידקים הפלנקטוניים באותם תנאים.

מצילומים של גרגרי חול דק במיקרוסקופ קונפוקלי, לא נראה כיסוי מלא של הגרגרים על ידי החיידקים, למרות שיש מספר מקומות בהם הביופילם בעובי $5-10\mu\text{m}$ (איור 3.17), לכן ההשפעה של שטחי פנים על גידול החיידקים קטנה. בהנחה שלגידול החיידקים מקסימלי של 10^9 CFU/g sand , שטח חיידק $2\mu\text{m}^2$ ושטח פנים סגולי של גרגרי חול דק $150\text{cm}^2/\text{g}$, מתקבל רק 13% כיסוי. במקרה של גידול בחול גס הכיסוי הוא כ-60%.



איור 3.17. צילומי CSLM של גרגרי חול דק ($106-180\mu\text{m}$) עם חיידקים צבועים ב-DTAF. (a) צילום שני גרגרים עם ביופילם ביניהם, אורך סרגל בצד שמאל למטה $20\mu\text{m}$. (b) מבט מלמעלה על אזור הביופילם בין הגרגרים, אורך סרגל $10\mu\text{m}$. (b1) מבט מהצד על הביופילם, אורך סרגל $5\mu\text{m}$. (b2) מבט מהצד על הביופילם, אורך סרגל $10\mu\text{m}$. (c) התמקדות באזור הביופילם על הגרגר התחתון, אורך סרגל $10\mu\text{m}$.

מצילומים של איזורי הביופילם (איור 3.17), נראה חלק קטן מגרגר של חול מכוסה בביופילם. לרוב הביופילם



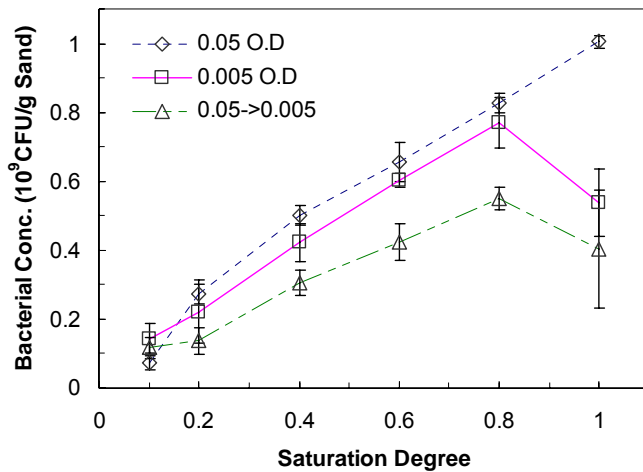
איור 3.18: התאמת מודל לגידול חיידקים בדרגות רוויה שונות בחול גס. הסמנים השונים עבור ממוצע התוצאות שנמדדו משלוש חזרות פחות הביקורת והקווים עבור המודלים, שהותאמו. גידול חיידקים במבחנות cryo-vials, בחול גס (500-850 μ m), ב-25 $^{\circ}$ C.

נראה בין שני גרגרים או בשקעים וסדקים על פני הגרגר. לפי כך, לא צפויה השפעה משמעותית של שטחי הפנים בטווח של גרגרים בין 106 עד 850 μ m. כתמיכה לכך, גם גידול החיידקים בחול גס בדרגות הרוויה השונות היה דומה מאוד לגידול בחול דק באותם התנאים. הותאם מודל עבור גידול בחול גס לאחר 24 שעות בריכוז נוטריאנטים 1 x M63C והתוצאות מוצגות באיור 3.18. תוצאות של גידול החיידקים בחול גס (איור

3.18) משחזרות את התוצאות שקיבלנו בחול דק בריכוזים הגבוהים (איור 3.10). לאחר 22 שעות גידול, היה יתרון לדרגת רוויה 0.8, בדומה לתוצאות בחול דק (3.10).

3.3.5 השפעת גודל המזרע (Inoculum)

בניסויים הקודמים כמות החיידקים ההתחלתית בכל ניסוי היתה קבועה, אולם ריכוזם השתנה בשל נפח תמיסת המזון השונה, אשר שימש לקביעת דרגת הרוויה. ריכוז החיידקים נע מ-0.005 O.D. ($1.6 \cdot 10^6$ CFU/ml)

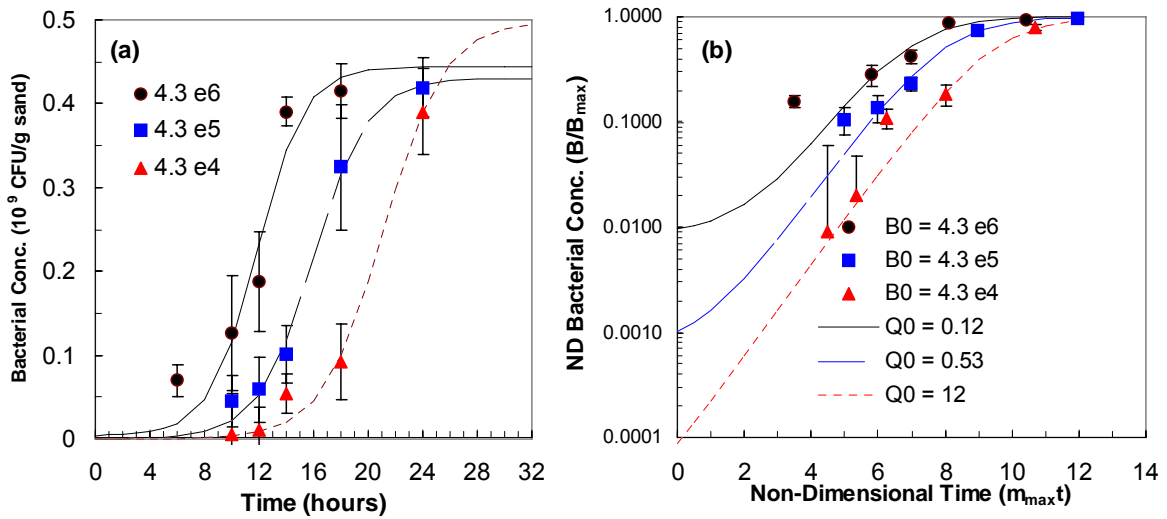


איור 3.19: גידול החיידקים לאחר 24 שעות, כאשר ריכוזם ההתחלתי קבוע 0.005 O.D., בכל דרגת רוויה וריכוז החיידקים יורד ככל שעולים בדרגת הרוויה. הניסויים נעשו בחול דק (106-180 μ m), בתמיסת מזון בריכוז 1 x M63C, בטמפ' 25 $^{\circ}$ C, במבחנות cryo-vials.

ברויה (S.D.=1), עד- ($1.6 \cdot 10^7$ CFU/ml) 0.05 O.D. בדרגת הרוויה המינימלית (S.D.=0.1). על מנת לבדוק את השפעת ריכוז החיידקים ההתחלתי על גידול החיידקים בדרגות הרוויה השונות נערכו ניסויים במצע מזון 1 x M63C, בחול דק (106-180 μ m), במערכת סטטית של מבחנות cryo-vials, למשך 24 שעות, ב-25 $^{\circ}$ C.

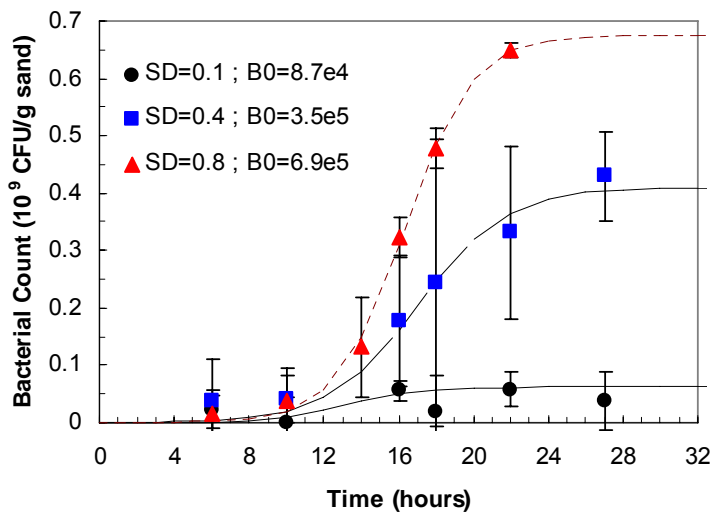
לפי התוצאות המוצגות באיור 3.19, גידול החיידקים היה הגבוה ביותר כאשר הריכוז ההתחלתי שלהם היה גבוה יותר. הגידול הנמוך ביותר היה בניסוי שבו ריכוז החיידקים הולך ויורד ככל שעולים בדרגת הרוויה. הירידה בגידול החיידקים במצב רוויה, חזרה על עצמה בשתי העקומות התחתונות. בניסויים בריכוז חיידקים קבוע, עד דרגת רוויה 0.8, ככל שדרגת הרוויה גבוהה יותר, יש יותר חיידקים בזמן אפס וגם יותר נוטריאנטים ולכן הגידול גבוה יותר.

בניסוי נוסף, נבחנה השפעת גודל המזרע על גידול החיידקים, בדרגת רוויה אחת של-0.5. ריכוזי המזרע שנבדקו היו: 0.1, 0.01, 0.001 O.D. או $4.3 \cdot 10^4$, $4.3 \cdot 10^5$, $4.3 \cdot 10^6$ CFU/g. תוצאות הניסוי מוצגות באיור 3.20a ו-3.23, מדגימות את השפעת המזרע ההתחלתי על ה- B_{max} , על קצב הגידול, שלב ה-lag והמצב הפיסיולוגי של החיידקים בתחילת הגידול (Q_0).



איור 3.20 התאמת מודל לעקומי גידול עבור ריכוזי מזרע שונים, $S.D.=0.5$. תנאי הניסוי כפי שמתואר באיור 3.19 (a) מספר החיידקים מוצג על סקאלה לינארית. (b) מספר החיידקים מוצג על סקאלה לוגאריטמית.

לפי המודל שהותאם לתוצאות גידול החיידקים שהתחיל מגודל מזרע שונה, הגידול המקסימלי לא הושפע משינויים בגודל המזרע ההתחלתי וגם לא קצב הגידול, רק t_{lag} התאריך בריכוז נמוך יותר של המזרע ההתחלתי. ככל שגודל המזרע היה גבוה יותר Q_0 , שהותאם על ידי המודל היה נמוך יותר. ככל ש- Q_0 נמוך יותר, כך שלב ה-lag ארוך יותר.

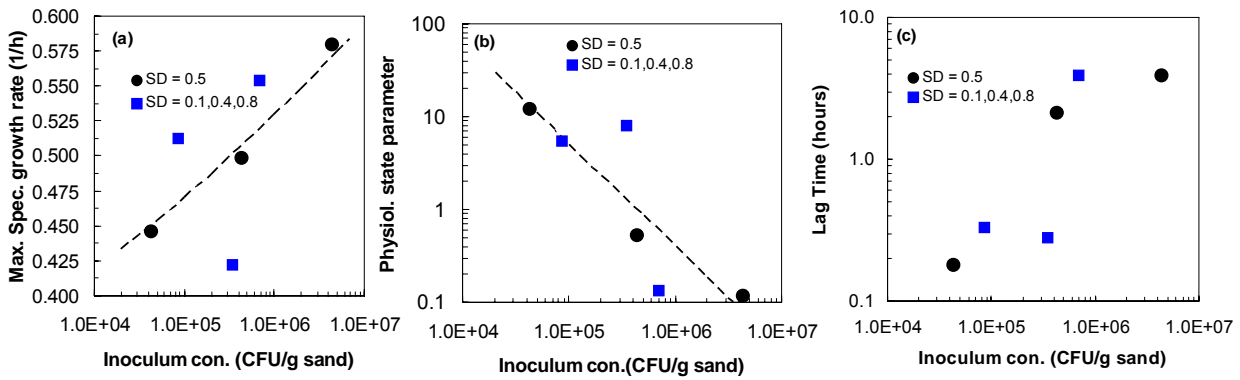


איור 3.21: התאמת מודל לעקומי גידול בשלוש דרגות רוויה, כאשר ריכוז מזרע קבוע 0.01 O.D. תנאי הניסוי כפי שמתואר באיור 3.19

במטרה לבחון את גידול החיידקים בריכוז מזרע קבוע, בדרגות רוויה משתנות, נערך ניסוי שתוצאותיו מוצגות באיור 3.21. הניסוי היה באותם תנאים כאשר נבדק גידול עם הזמן בשלוש דרגות רוויה. בדרגת רוויה 0.8 הגידול היה מיירבי ובדרגת רוויה 0.1 הגידול היה נמוך ביותר. סטיות התקן היו גבוהות יותר ככל שדרגת

הרוויה היתה נמוכה יותר, מכיוון שבדרגות רוויה נמוכות יותר, הטרוגניות במבחנה עולה.

השפעות של ריכוז המזרע ההתחתי על קצב גידול בדרגות רוויה שונות ($S.D.=0.1, 0.4, 0.5, 0.8$), על המצב הפיסיולוגי בתחילת הגידול ועל אורך שלב ה-lag מסוכמות באיור 3.22.

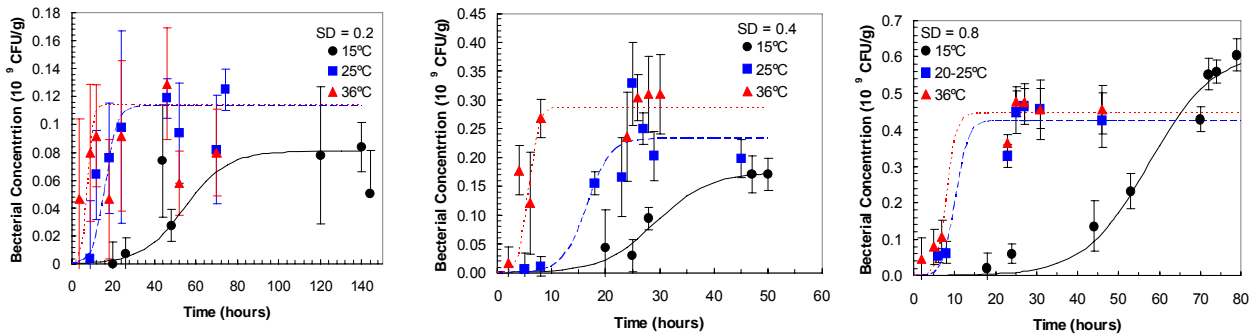


איור 3.22: השפעת המזרע ההתחלתי בניסויים עם תווך גרנולרי, בתנאים כפי שמפורט באיור 3.19 על: (a) קצב גידול החיידקים המקסימלי (b) הפרמטר של המצב הפיסיולוגי (c) אורך שלב ה-lag.

ככל שריכוז המזרע ההתחלתי עולה קצב הגידול עולה, זמן ה-lag עולה והפרמטר של המצב הפיסיולוגי יורד, ללא תלות בדרגת הרוויה. לפי התוצאות שהתקבלו (איור 3.20), אין קשר בין B_0 לבין B_{max} . בניגוד לתוצאות שהתקבלו (איור 3.20), נמצא במקורות ספרות, כי עבור החיידק *Listeria monocytogenes* הגדל בסלמון מעושן, ככל ש- B_0 עולה גם B_{max} עולה (Besse et al., 2006). תוצאות דומות דווחו עבור *P. aeruginosa* ו-*E. coli* במצעי מזון נוזליים (Hodgson et al., 1999). דיווחים נוספים הראו, כי השפעת מזרע התחלתי על אורך שלב ה-lag לא משמעותית בתנאי גידול טובים, אך בגידול עם ריכוזי NaCl גבוהים מזרע התחלתי נמוך יותר האריך את שלב ה-lag (Robinson et al., 2001).

3.3.6 השפעת הטמפרטורה

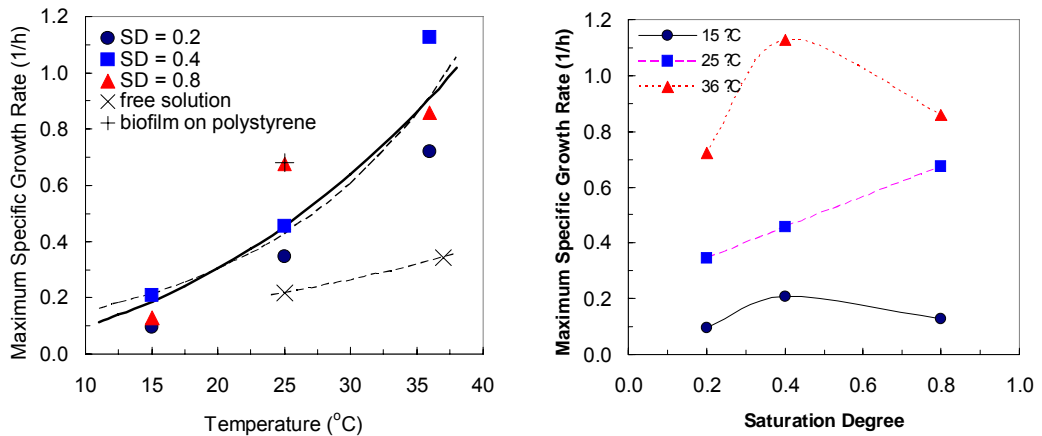
בתנאים שיש דיפוזיה טובה של חומרי מזון וגם חילוף גזים טוב, טמפ' הקרקע משחקת תפקיד עיקרי בגידול החיידקים (Hendry et al., 1999). הניסויים הבאים נערכו כדי לבחון את השפעת הטמפרטורה על גידול החיידקים בתווך גרנולרי בדרגות רוויה שונות (איור 3.23).



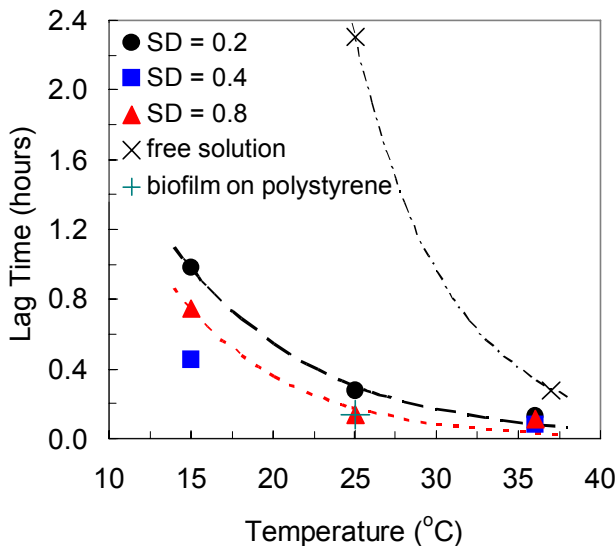
איור 3.23: התאמת מודל לעקומי גידול בשלוש טמפרטורות (15, 25, 36°C) ובשלוש דרגות רוויה (0.2, 0.4, 0.8). הניסויים נערכו בתמיסת מזון $1 \times M63C$, בחול דק (106-180 μ m). קווים עבור המודל ונקודות עבור ממוצע התוצאות משלוש חזרות בהפחתת הביקורת וסטיית התקן.

הקווים שהותאמו על ידי מודל הגידול מראים בצורה ברורה את התחלת הגידול, קצב הגידול והגידול המקסימלי. בדרגת רוויה 0.2 הגידול היה נמוך בכל הטמפרטורות. בדרגת רוויה 0.4 היה גידול רב יותר ובדרגת רוויה 0.8 היה גידול מירבי. לדרגת הרוויה לא היתה השפעה משמעותית על השלב ה-lag. לטמפרטורה בניגוד לדרגת הרוויה, לא היתה השפעה על על B_{max} , אלא רק על שלב ה-lag. ככל שהטמפרטורה עולה הריאקציות הכימיות והאנזימטיות נעשות בקצב גבוה יותר ולכן התאים גדלים מהר יותר. קצב הגידול חושב מהמודלים, התוצאות של

הקשר בין קצב הגידול לבין הטמפרטורה ודרגת הרוויה בניסויים עם תווך גרנולרי, ניסויים בנוזל וניסויי ביופילם בפלטות אליזה, מוצגות באיור 3.24.



איור 3.24: קצב גידול כפונקציה של טמפרטורה בחול בדרגות רוויה שונות (איור 3.24), לעומת גידול בנוזל (איור 3.4) או גידול ביופילם בבאות (איור 3.3). פונקציה עבור גידול בחול $\mu_{max}(1/h)=0.000121 \cdot \exp(4.01189 \cdot T(^{\circ}C)^{0.22339})$ (איור 3.3). פונקציה עבור גידול בנוזל $\mu_{max}(1/h)=0.075293 \cdot \exp(0.069436 \cdot T(^{\circ}C))$ (קוו מקווקו).



איור 3.25: הקשר בין t_{lag} לבין טמפרטורה בניסויים בחול בדרגות רוויה שונות, בניסויים בנוזל, בניסויי ביופילם.

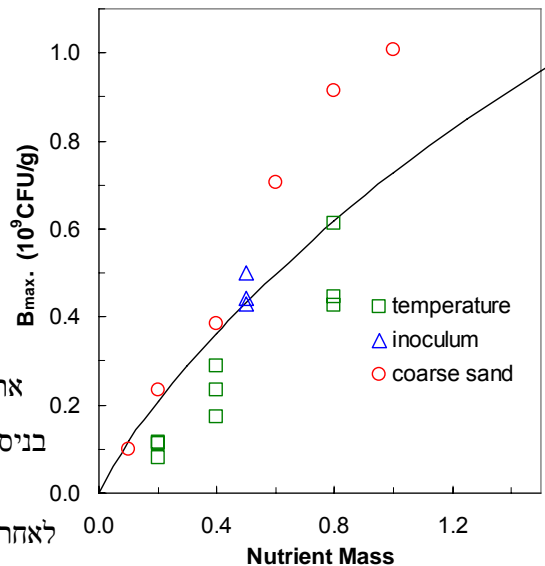
ככל שהטמפרטורה עולה זמן lag מתקצר בכל הניסויים. באותה טמפ', $25^{\circ}C$, בניסויים בתמיסות זמן ה-lag היה ארוך יותר, מאשר בניסויים בחול בכל דרגות הרוויה וגם בניסויים של ביופילם בפלטות פוליסטירן (איור 3.25).

לאחר שנבחנו הגורמים השונים המשפיעים על גידול החיידקים

בתנאים של מערכת סטטית סגורה, הוצגו התוצאות מכל הניסויים כפונקציה של כמות המזון (איור 3.26). לפי התוצאות שהתקבלו (איור 3.26), הגורם העיקרי שהשפיע על גידול החיידקים במערכת סטטית סגורה, היה כמות המזון.

ככל שכמות המזון עלתה, כך גם הגידול עלה, בהתאם לתוצאות של סדרת הניסויים הראשונה (איור 3.11).

קצב גידול עולה עם עליה בטמפ' בכל הניסויים. קצב גידול היה גבוה יותר בניסויים עם תווך גרנולרי מאשר בניסויים בנוזל. ב- $25^{\circ}C$ קצב גידול היה גבוה יותר בפלטות אליזה מאשר בתווך גרנולרי (איור 3.24, צד שמאל). בטמפ' הגבוה ביותר, קצב הגידול היה מירבי בדרגות רוויה הבינוניות (איור 3.24, צד ימין).

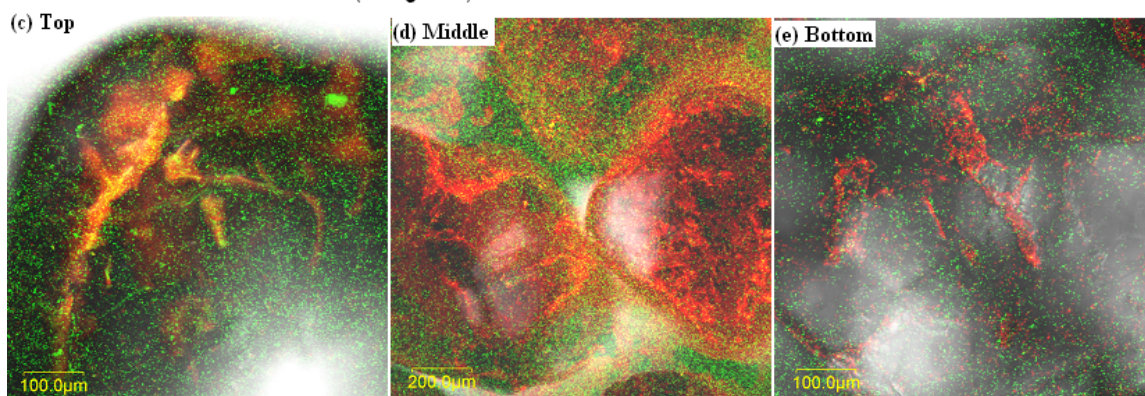
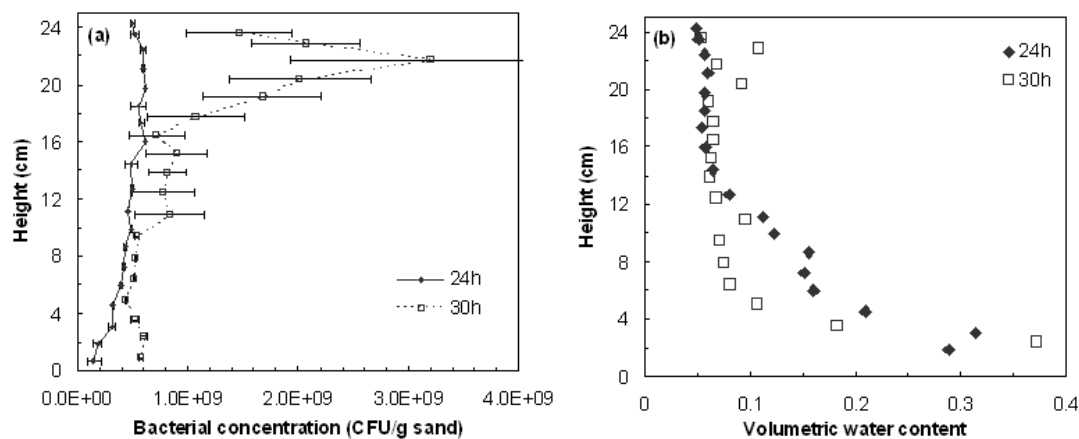


איור 3.26: הקשר בין B_{max} בניסויים עם דרגות רוויה שונות, בטמפ' שונות (איור 3.24), בגודל המזרע משתנה (3.20, 3.22), חול גם (500-850 μm) (איור 3.18) לבין כמות המזון.

3.4 השפעת תכולת רטיבות במערכת זרימה

3.4.1 גידול החיידקים ואיטום ביולוגי

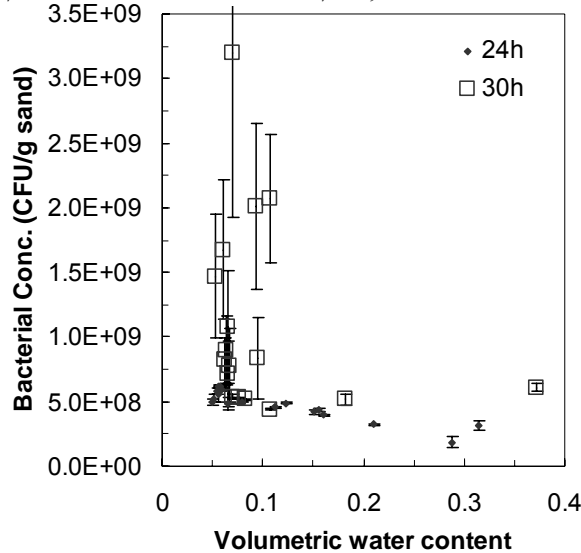
המערכת השנייה בה נערכו ניסויים להערכת השפעת דרגת הרוויה על גידול החיידקים, כאשר תמיסת המזון הוזרמה דרך עמודות עם תווך גרנולרי וחיידקים. במערכת זו היתה זרימה מהירה יחסית אשר קבעה את קצב הספקת המזון בדומה למצב בכמוסטט. במערכת זו, בניגוד למערכת סטטית, ישנן הספקת מזון והרחקת מטבוליטים רעילים רציפות. על מנת ללמוד את השפעת תכולת הרטיבות על החיידקים במערכת זרימה נבנה מודל כמתואר באיור 2.7 תמונות 2.8, 2.9. במערכת זו תמיסת ההזנה מסופקת באופן רציף לעמודה ובה חול וחיידקים. התרבות החיידקים על פני הגרגרים, ובנקבובים, מובילה לאיטום של העמודה עם הזמן ולפי כך, ירידה במוליכות ההידראולית, הנמדדת בירידה בספיקה. בשלב ראשון נערכו ניסויים בפרקי זמן שונים על מנת לאמוד את הזמן בו מתרחש האיטום. נערכו שני ניסויים בעמודות זכוכית מלאות חול וחיידקים בגובה 25cm, הראשון נמשך 24 שעות והשני בגובה 24cm נמשך 30 שעות. בשני הניסויים היה במזרע $5 \cdot 10^5 \text{CFU/ml}$ ותמיסת המזון היתה 1. M63C x נפח כללי של העמודה בניסוי של 24 שעות היה 533cm^3 , 870g חול גס ($V_w = V_t \cdot n$) והנקבוביות היתה 0.38. הנפח הכללי בעמודה בניסוי שנמשך 30 שעות היה 512cm^3 , 857g חול גס והנקבוביות שהתקבלה 0.36. השטף המוזרם לעמודות בשני הניסויים היה 0.01cm/min . חישוב השטף נעשה על ידי חלוקה של הספיקה ($0.22 \text{cm}^3/\text{min}$), בשטח חתך של העמודה (21.32cm^2). כל תוצאות ריכוז החיידקים במערכת זרימה הם ממוצע של שתי חזרות מדגימת חול בשכבה מסויימת וסטיית התקן. תוצאות הניסויים מוצגות באיורים 3.27, ו-3.28.



איור 3.27: גידול חיידקים בגבהים שונים של העמודות באורך 25cm, לאחר 24 ו-30 שעות. הניסויים נערכו עם חול גס (500-850 µm), בתמיסת הזנה בריכוז 1 x M63C, בשטף 0.01cm/min . המזרע ההתחלתי היה $5 \cdot 10^5 \text{CFU/ml}$ בכך-

(a) 200ml וכ-800 גרם חול. גרגרי חול משכבות שונות נצבעו בערכת LIVE/DEAD וצולמו במיקרוסקופ קונפוקלי. פירוס ריכוז החיידקים לאורך העמודה לאחר 24 שעות ו-30 שעות. כל נקודה מבטאת ממוצע של שתי חזרות וסטיית התקן. (b) פירוס תכולת הרטיבות בשתי העמודות. נקוביות מחושבת בניסוי, שערך 30 שעות היא 0.36 ובניסוי של 24 שעות, 0.38 (c) צילום גרגר חול אופייני מחלק העליון של העמודה, מניסוי שערך 30 שעות. (d) צילום גרגרי חול אופייני מחלק האמצעי של העמודה, מניסוי שערך 30 שעות. (e) צילום גרגרי חול מהחלק התחתון של העמודה, מניסוי שערך 30 שעות.

בניסוי של 30 שעות הייתה ירידה בספיקה כעבור 26 שעות. לפי איור 3.27a, ניתן להניח כי האיטום היה בעומק



של 2 עד 3 ס"מ בתכולת רטיבות נמוכה מ-0.1 (איור 3.27b). צילומים ממיקרוסקופ קונפוקלי (איור 3.27c-e) מראים קיום של ביופילם, די מפותח (בעובי של כ-10µm), בחלק העליון של העמודה, בו היה גידול מקסימלי של החיידקים (איור 3.27c). ניתן לראות, שריכוז החיידקים יורד ככל שיורדים לתחתית העמודה, שבה תכולת הרטיבות גבוהה יותר (איור 3.27a, b). באזורים בהם נראה ביופילם מפותח, בחלק העליון של העמודה, נצפו יותר חיידקים מתים (צבועים באדום)

איור 3.28: ריכוז החיידקים בעמודות חול גס (500-850µm) בזמנים שונים (24,30 שעות), כפונקציה של תכולת רטיבות.

(איורים 3.27c-e). בחלקים נמוכים יותר של העמודה, לא נראה ביופילם מפותח ומספר

החיידקים החיים (צבועים בירוק) היה דומה למספר המתים. איור 3.29 מציג את ריכוז החיידקים, בשני הניסויים, כפונקציה של תכולת הרטיבות.

גידול מירבי של חיידקים היה באזור עם תכולת רטיבות הנמוכה ביותר, בחלק העליון בשתי העמודות. בניסוי שערך 30 שעות הגידול היה גדול יותר בסדר גודל אחד, וזה היה מספיק להאטמות העמודה. מאחר שבניסוי זרימה שנמשך 30 שעות נאטמה עמודת חול, החלטנו לערוך את ניסויי הזרימה במשך 24 שעות (איור 3.28).

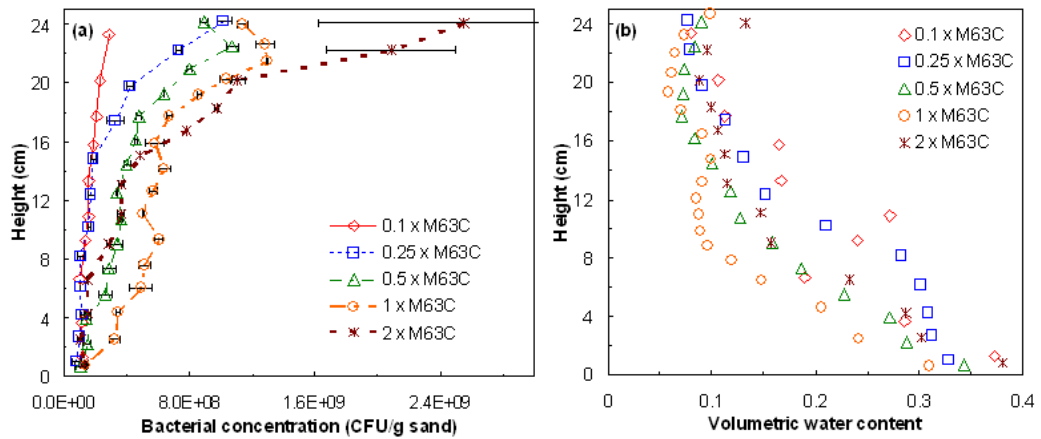
מחקרים רבים בדקו את ההשפעות של הגורמים הפיסיקליים על גידול החיידקים במערכות זרימה בעמודות קרקע (Powelson and Mills, 2001; Vandevivere and Baveye, 1992; Autset and Keller, 2005); רובם

התמקדו בהאטמות הקרקע על ידי הצטברות המסה המיקרוביאלית וירידה בהולכת המים כתוצאה מכך. המחקר הזה יחודי, בכך שבוחן את התנאים הקובעים את גידול החיידקים עד לשלב של האטמות. ידיעת התנאים המשפיעים על גידול החיידקים בתווך גרנולרי תעזור לתכנון מערכות סינון יעילות יותר. דווח מחקר על הסינון של חיידקים פתוגניים על ידי תווך גרנולרי לא רווי, שבו ריכוז החיידקים שסונן נקבע על סמך ריכוז החיידקים ביציאה לעומת ריכוזם בכניסה (Powelson and Mills, 2001). בעבודה שלנו, נבדקה מסת החיידקים in-situ על ידי הוצאת מקטעי חול בגבהים שונים של העמודה ובדיקת כמות החיידקים בכל מקטע.

3.4.2 השפעת ריכוז הנוטריאנטים

בניסויים הבאים, נבחנה השפעה של ריכוז הנוטריאנטים, בתכולות רטיבות שונות, על גידול החיידקים בעמודות חול גס. כל עמודה הונחה במצע בריכוז שונה (0.1-2 x M63C), שהוזרם בשטף קבוע של 0.017cm/min=0.96cm/hr. נפח החול הוא 314cm³ (25cm, 12.56cm²), נארוזו בו 503 עד 525 גרם חול

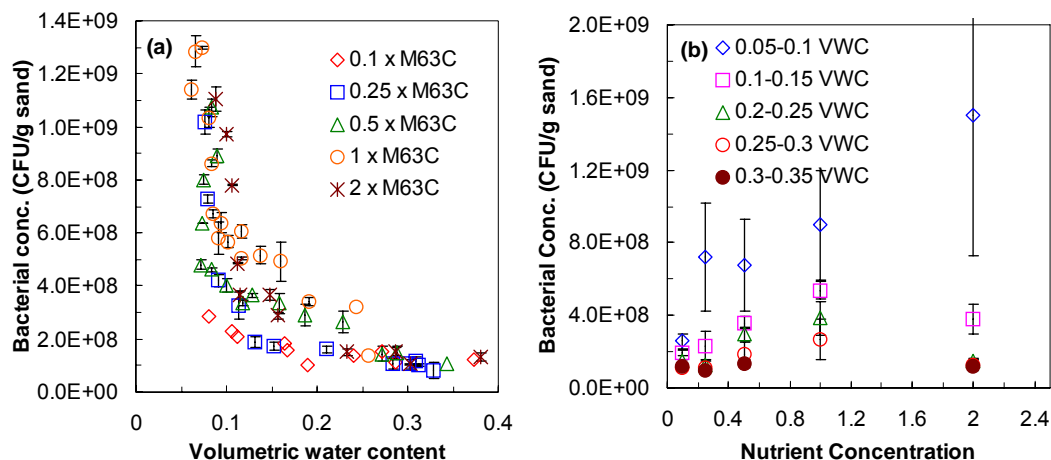
גס (400-1800 μ m) בניסויים השונים, כלומר טווח הנקבוביות היה מ-0.36 עד 0.39. המזרע התחלתי היה $5 \cdot 10^5$ CFU/ml חיידקים. נפח המים ($V_w = V_t \cdot n$) היה בטווח מ-113ml (ב-525g) עד 122ml (ב-503g) ולכן מזרע התחלתי היה בטווח בין $1.07 \cdot 10^5$ CFU/g לבין $1.22 \cdot 10^5$ CFU/g בהתאמה. הניסויים נמשכו 24 שעות בטמפ' 25°C . פרוס תכולות הרטיבות היה דומה בעמודות עם ריכוזי מצע שונים ולכן בגובה מסויים ניתן להשוות את השפעת ריכוז הנוטריאנטים על הגידול.



איור 3.29: התרבות חיידקים במערכת זרימה בריכוזי נוטריאנטים שונים. הניסוי נערך עם חול גס (400-1800 μ m) והתוצאות מייצגות את פירוס ריכוז החיידקים לאחר 24 שעות. (a) ריכוז החיידקים לאורך עמודות החול. התוצאות מוצגות כמוצעים של שתי חזרות וסטיית תקן. (b) פירוס תכולות הרטיבות בעמודות. (c) צילום גרגר חול אופייני מהחלק העליון של העמודה עם מצע מהול $0.1 \times M63C$. (d) צילום גרגר חול אופייני מחלק העליון של העמודה עם מצע $1 \times M63C$.

בריכוזי מצע הגבוהים, בחלק העליון של העמודה, בתכולת הרטיבות 0.1, פחמן היה הגורם שהגביל את הגידול, מכיוון שמסת החיידקים עלתה עם עליה בריכוז המצע. בחלק התחתון של העמודה, תכולת הרטיבות גבוהה וגם החמצן היה גורם מגביל גידול. בריכוזים נמוכים של מצע, הגידול היה נמוך יחסית לאורך כל העמודה, אך עדיין בחלק העליון בעמודה גדלו יותר חיידקים מאשר בחלק התחתון. לכן, בתנאים אלה, ריכוז הנוטריאנטים היה גורם מגביל, לאורך כל העמודה, כאשר בחלק התחתון היתה מגבלה נוספת של אספקת החמצן. בחלק העליון של העמודות תכולת הרטיבות היא הנמוכה ביותר (0.1) ועל כן אספקת החמצן שם היא טובה ביותר. ככל שיורדים בגובה העמודה תכולת הרטיבות עולה, יותר נקבובים מלאים במים ופחות נקבובים מלאים באוויר (Or et al., 2007), ולכן בחלק התחתון של העמודות, בתכולות הרטיבות הגבוהות ביותר, יתכן שיש מגבלת חמצן. בעמודות עם תמיסות הזנה בריכוזים $0.1 \times M63C$, $1 \times M63C$, נעשו דיגומי חול, בחלק העליון של העמודות ונלקחו להסתכלות במיקרוסקופ קונפוקלי (איורים 3.29 c, d). הצילומים במיקרוסקופ הקונפוקלי תאמו את התוצאות הכמותיות, כלומר בריכוז נוטריאנטים נמוך ($0.1 \times M63C$), נראו פחות חיידקים והכיסוי היה פחות

רציף, על פני הגרגר, מאשר בריכוז גבוה ($1 \times M63C$). גם בריכוז גבוה של תמיסת ההזנה, רוב הגרגר אינו מכוסה בחיידקים (איור 3.29). בכדי לבחון את ההשפעה המשולבת של ריכוז הנוטריאנטים ותכולת הרטיבות על גידול החיידקים, התוצאות של ריכוז החיידקים מוצגות כפונקציה של שני גורמים אלו (איור 3.30).



איור 3.30: התרבות חיידקים במערכת זרימה בריכוזי נוטריאנטים שונים. (a) ריכוז החיידקים כפונקציה של תכולת רטיבות בריכוזים שונים של הנוטריאנטים. (b) ריכוז החיידקים כפונקציה של ריכוז נוטריאנטים בטווחים משתנים של תכולת רטיבות. תנאי הניסוי, כמתואר במקרא לאיור 3.30.

מתוצאות ניסויי הגידול ניתן לראות כי ריכוז הנוטריאנטים מהווה גורם מגביל גידול. ככל שריכוז המצע עולה, כך גם ריכוז החיידקים עולה, אולם רק בחלק העליון של העמודה, בה תכולת הרטיבות נמוכה ביותר (איורים 3.29, 3.30). באזורים הנמוכים מ-16cm הגידול היה נמוך בכל הריכוזים שנבדקו. אם כמות המזון היתה הגורם המגביל העיקרי, אז הגידול היה עולה עם עליה בתכולת הרטיבות, בדומה לניסויים במערכת סגורה. אולם, התוצאות שהתקבלו הן הפוכות, ככל שתכולת הרטיבות יורדת, הגידול עולה ולכן מעורבים פה גורמים נוספים, כמו למשל: זמינות חמצן ונוכחות תוצרי מטבוליזם המעכבים גידול. במערכת זרימה, תמיסת המזון מגיעה לעמודה עם החיידקים מבקבוק ההזנה, באופן רציף ובקצב קבוע. לעומת זאת, במערכת סגורה, של מבחנות cryo-vials, אין אספקה שוטפת של מזון ועל כן הוא נגמר עם הזמן ואז מפסיק הגידול. בנוסף לכך, במערכת זרימה גם הפרשות של החיידקים המכילים תוצרי מטבוליזם העלולים להיות רעילים, נשטפו, לעומת מערכת סגורה, בה הפרשות הצטברו. אפשר להתיחס לתוצאות של גידול בעמודות כאל קצב הגידול, מכיוון שעצרנו את הניסויים לאחר 24 שעות, בשלב הלוגריטמי. הגידול עלה עם עליה בריכוז הנוטריאנטים והיה מקסימלי בחלק העליון של העמודות, שבו תכולת הרטיבות נמוכה ביותר (איור 3.29). כלומר, במערכת זרימה קצב הגידול עלה ככל שריכוז הנוטריאנטים עלה, בניגוד למערכת סגורה (איור 3.12), בה קצב הגידול ירד ככל שריכוז הנוטריאנטים עלה. במערכת זרימה, התנאים הרבה יותר טובים לגידול החיידקים ואין אפקט אוסמוטי המדכא גידול, כפי שהיה במערכת סגורה.

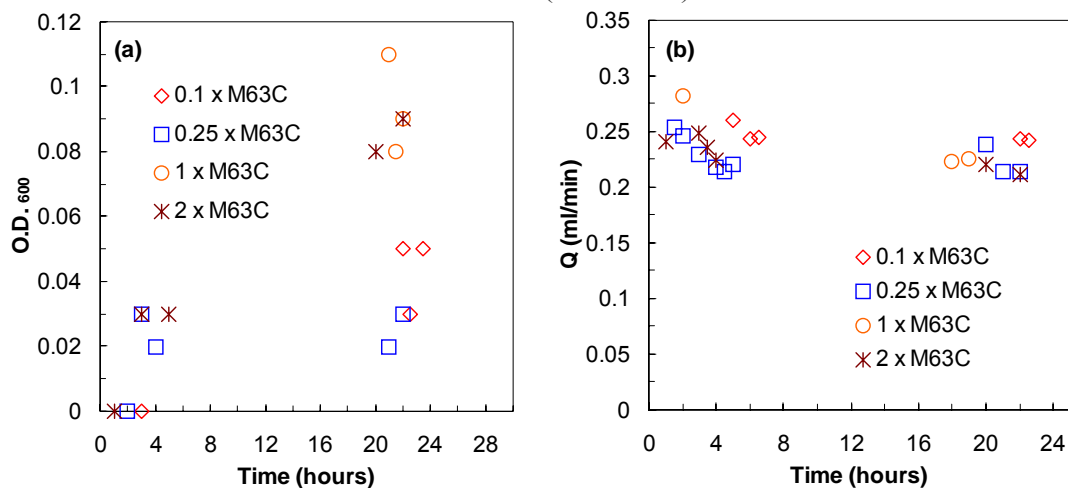
המזרע ההתחלתי בניסויים היה $2.5 \cdot 10^5$ CFU/gram sand ובסוף הניסוי בריכוז המצע הנמוך ביותר ($0.1 \times M63C$), החיידקים הגיעו ל- $0.2 \cdot 10^8$ CFU/gram sand. בהנחה שגידול לוגריטמי נמשך 22 שעות (זמן lag שעתיים), קצב הגידול היה $\mu = \ln(B/B_0)/t = 0.2(1/h)$ וזמן דור 5 שעות. בריכוז $1 \times M63C$ מספר החיידקים בסוף הניסוי היה $1.5 \cdot 10^9$ CFU/gram, קצב הגידול היה $0.39(1/h)$ וזמן דור היה 2.5 שעות. במערכת סגורה בדרגת רוויה 0.1 קצב גידול היה בסביבות $0.5(1/h)$ (איור 3.12). בריכוז המצע הגבוה ביותר

0.41(1/h) ריכוז החיידקים הגיע בסוף הניסוי ל- $2.5 \cdot 10^9$ CFU/gram sand, קצב הגידול היה $0.41(1/h)$ (2 x M63C), וזמן דור היה 2.3 שעות. קצב גידול של $0.41(1/h)$ דומה לקצב שהתקבל במערכת סגורה בדרגת הרוויה 0.1 בריכוז 2 x M63C (איור 3.12). מכיוון שרוב החיידקים גדלו בחלק העליון של העמודות, יתכן כי במהלך הניסוי הפרשות החיידקים, בחלק העליון של העמודה, נשטפות ומגיעות לחיידקים, שנמצאים מתחתיהם וכך הן מעכבות את הגידול בשכבות התחתונות. כדי לבחון האם התרחשו שינויים בהרכב המצע, כתוצאה מגידול החיידקים, אשר יסבירו את ההבדל במידת הגידול בראש ובתחתית העמודה, נעשו מדידות של פרמטרים שונים בנוזל ההזנה בכניסה וביציאה מהעמודה. מדידות של pH, מוליכות חשמלית, חמצן מומס ועכירות התמיסה (טבלה 1).

טבלה 3.2: סיכום פרמטרים שנמדדו במהלך הניסויים בעמודות חול גס ($400-1800\mu\text{m}$), בריכוזים שונים של תמיסת מזון.

	Optical Density (O.D. ₆₀₀)	pH	EC (mS/cm)	O ₂ (%)
Inflow	0	7.00-7.04	18-19	100
Outflow	0.03-0.11	6.98-7.04	18-19	20-60

מדידות של pH ומוליכות חשמלית היו ללא שינוי. ירידה משמעותית בריכוז החמצן המומס מ- 100% בתמיסת מזון רוויה (כ- $8\text{mg O}_2/\text{L}$) בכניסה לעמודה פחות מ- 20-60% ביציאה. מכיוון שמדדנו את ריכוז החמצן בכלי התמיסה היוצאת ולא ישירות בתוך מצע הגרנולרי, ניתן לשער שבפועל ריכוז החמצן בעמודה היה נמוך יותר. מדידת עכירות התמיסה המבוטאת בערכי צפיפות אופטית (O.D.₆₀₀) ביציאה מהעמודה אפשרו הערכה של מספר החיידקים הפלנקטוניים, אשר נשטפו מהחול (איור 3.31a). מדידות של ספיקה ביציאה מהעמודה אפשרו מעקב אחרי המוליכות ההידראולית בעמודה (איור 3.31b).



איור 3.31: מדידות הנוזל ביציאה מהעמודות עם ריכוזים שונים של הנוטריאנטים. (a) עכירות התמיסה מבוטאת בערכי צפיפות אופטית (O.D.₆₀₀) כפונקציה של זמן. (b) ספיקה כפונקציה של זמן.

מספר החיידקים הפלנקטוניים חושב ע"י המרה של ערכי הצפיפות האופטית, הראה כי מספר החיידקים הפלנקטוניים שיצאו מהעמודה היה זניח ביחס לחיידקים שנמצאו בסוף הניסוי (כ- 10^8 CFU/ml חיידקים פלנקטוניים לפי נקובויות 0.39, כ- $2.4 \cdot 10^7$ CFU/g, לעומת 10^9 CFU/g sand חיידקים ספוחים). הספיקה היתה קבועה במשך כל הניסוי, לכן גם השטף היה קבוע ולא היתה אנדיקציה להאטמות העמודות (איור 3.31b).

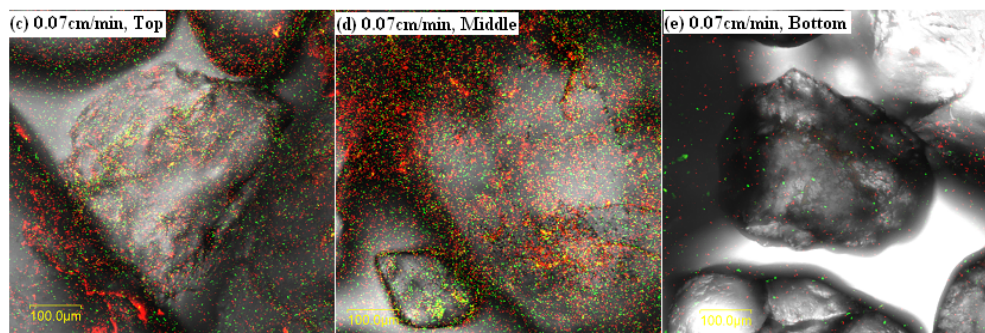
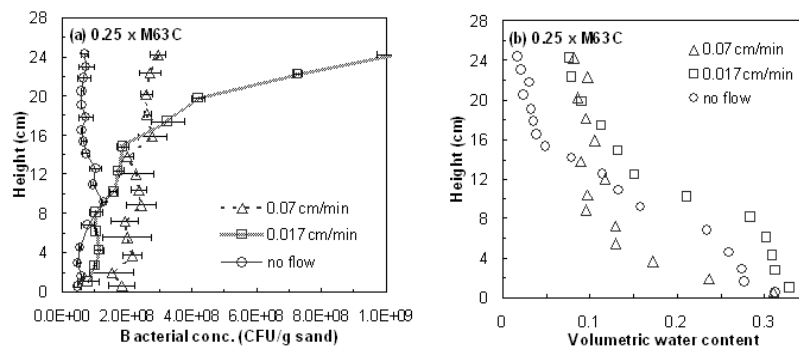
3.4.3. השפעת שטף המים

שטף מתאר את נפה המים שעובר דרך יחידת שטח של הקרקע ביחידת זמן. יחידות השטף הן יחידות של מהירות. במטרה לבחון כיצד משפיע השטף על גידול החיידקים, נעשו ניסויים בעמודות עם חול גס ($400\text{-}1800\mu\text{m}$), שטח חתך 12.56cm^2 , כאשר תמיסת ההזנה הוזרמה בשטפים שונים ובריכוזים שונים של תמיסת ההזנה. שילובים של ריכוזי תמיסת ההזנה והשטפים שנבחנו מוצגים בטבלה 3.3.

טבלה 3.3: פירוט השטפים והריכוזים של תמיסת המזון בכל ניסוי.

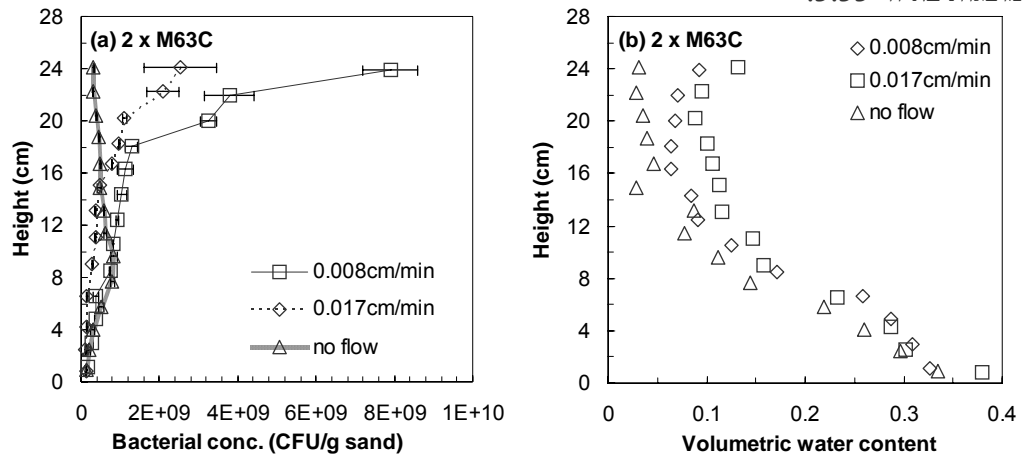
Nutrient Concentration	Water flux (cm/min)
0.1 x M63C	0.017
0.25 x M63C	0, 0.017, 0.070
0.5 x M63C	0.017
1 x M63C	0.017
2 x M63C	0, 0.008, 0.017

ניסויים עם שטפים שונים של תמיסות מזון בריכוזים שונים אפשרו ניתוח ההשפעה של קצב הספקת מזון קבוע, בתכולת רטיבות קבועה. באיור 3.32a מוצגות התוצאות של גידול החיידקים בריכוז נמוך של תמיסת המזון 0.25 x M63C בשטפים שונים. באיור 3.32b מוצגות תוצאות של פרוס תכולת הרטיבות בעמודות הניסוי. באיורים 3.32c-e, מוצגים צילומים ממיקרוסקופ קונפוקלי של גרגרים אופייניים מגבהים שונים, בעמודות הניסוי עם שטף גבוה. בחלק העליון של העמודות בגובה 12-25cm, תכולת הרטיבות נמוכה יותר (0.025) בעמודה ללא זרימה, לעומת העמודות עם זרימה (0.1). בחלק התחתון של העמודה, בגובה 0-12cm, תכולת הרטיבות נמוכה יותר בעמודה עם השטף הגבוה ביותר, היא עולה בעמודה ללא זרימה וגבוהה ביותר, בעמודה עם השטף הנמוך ביותר.



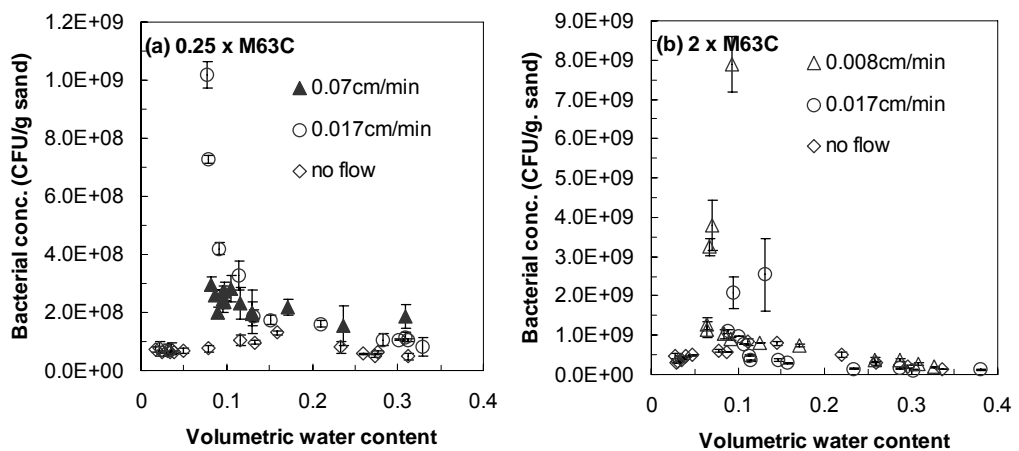
איור 3.32: השפעת השטף על גידול חיידקים בתמיסת המזון 0.25 x M63C. הניסויים נערכו בעמודות עם חול גס (400-1800µm למשך 24 שעות. (a) ריכוז החיידקים לאורך העמודה. כל נקודה בגרף מייצגת ממוצע של שתי חזרות וסטיית תקן. (b) פרוס תכולת רטיבות לאורך העמודות. (c) צילום גרגרי חול מייצגים עם חיידקים מהעמודה עם השטף הגבוה ביותר (0.07cm/min). מהחלק העליון של העמודה בעומק כ-2cm. (d) מהחלק האמצעי של העמודה, בעומק כ-10cm. (e) מהחלק התחתון של העמודה, בעומק כ-20cm.

לפי התוצאות המוצגות באיור 3.32a, בשטף גבוה (0.07cm/min) של תמיסת מזון מהולה (0.25 x M63C), הגידול היה נמוך בסדר גודל אחד ביחס לגידול בריכוז זהה ושטף נמוך (0.017cm/min). בעמודה ללא זרימה, ריכוז החיידקים היה נמוך לאורך העמודה, אך בניגוד לעמודות עם זרימה הגידול האופטימלי היה דווקא באמצע העמודה. בשתי עמודות הזרימה הגידול המירבי היה בחלק העליון של העמודה בתכולת הרטיבות הנמוכה ביותר- 0.1. לעומת זאת בעמודה ללא זרימה, הגידול המירבי היה בתכולת הרטיבות 0.2, בה הדיפוזיה של נוטריאנטים וחמצן היא כנראה אופטימלית לגידול החיידקים. ניסויים נוספים נערכו בריכוז גבוה של תמיסת המזון, 2 x M63C, באותו סוג חול עם שטפים נמוכים. תוצאות של פרוס תכולת רטיבות וגידול חיידקים לאורך העמודות מוצגות באיור 3.33.



איור 3.33 השפעת השטף על גידול החיידקים בתמיסת מזון מרוכזת 2 x M63C. (a) ריכוז חיידקים לאורך העמודות. (b) פרוס תכולת רטיבות לאורך העמודות.

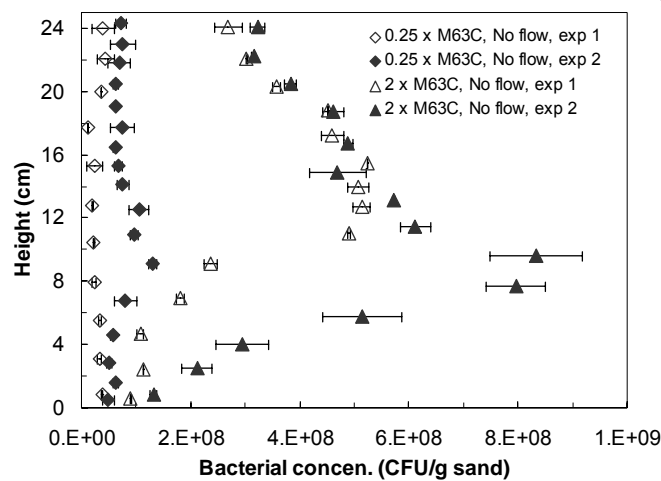
מתוצאות הניסוי המוצגות באיור 3.33b, נראה כי פרוס תכולת הרטיבות היה די דומה עבור שלושת העמודות, לכן ניתן להשוות את גידול החיידקים, בתנאים השונים, באותה תכולת רטיבות. בדומה לתוצאות שהתקבלו בריכוז נמוך של תמיסת מזון (איור 3.33a), בעמודות עם זרימה של מצע, גידול מירבי היה בחלק העליון של העמודות ואילו בעמודה ללא זרימה, גידול מירבי התקבל בגובה 8-10cm. ריכוז החיידקים בחול בשתי תמיסות המזון, כפונקציה של תכולת הרטיבות, מוצג באיור 3.34.



איור 3.34: השפעת תכולת הרטיבות על גידול החיידקים בשני ריכוזים של תמיסת מזון, בשטפים שונים. (a) ריכוז חיידקים לעומת תכולת רטיבות בריכוז נמוך של תמיסת מזון (0.25 x M63C). (b) ריכוז החיידקים לעומת תכולת הרטיבות בריכוז גבוה של תמיסת מזון (2 x M63C).

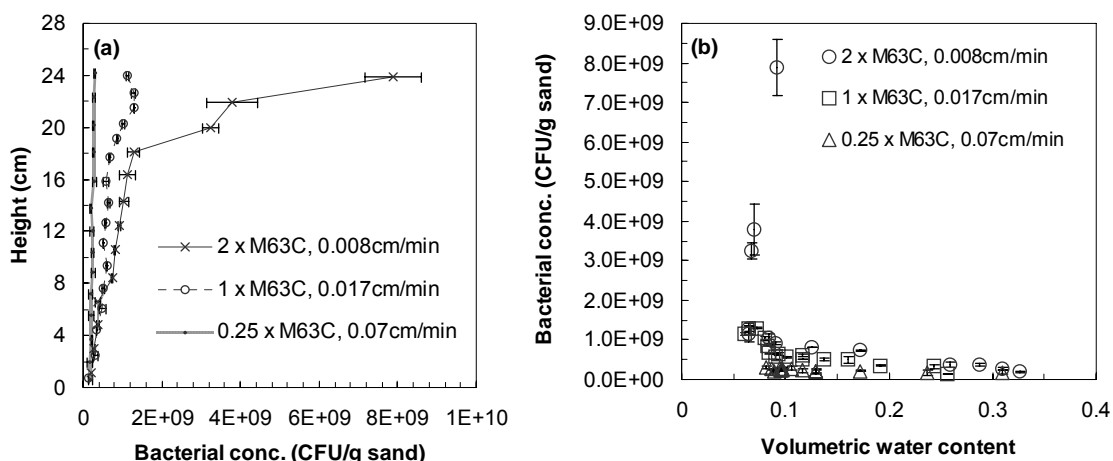
גידול החיידקים בעמודות עם ריכוז גבוה של תמיסת מזון היה בסדר גודל אחד יותר מאשר בריכוז נמוך. בניסויים עם ריכוז נמוך יותר של תמיסת מזון, השטף היה גבוה יותר מאשר בניסויים עם ריכוז גבוה של תמיסת מזון ולמרות זאת גידול החיידקים היה נמוך יותר. לכן, ניתן להסיק כי לריכוז תמיסת המזון היתה השפעה גדולה יותר על הגידול מאשר לשטף. להפתעתינו, גידול גבוה יותר היה דווקא בשטף נמוך יותר. התוצאה הזו חזרה על עצמה גם בריכוז נמוך וגם בריכוז גבוה של הנוטריאנטים. בריכוז נמוך ושטף גבוה התקבלה תוצאה יוצאת דופן של גידול גבוה גם באמצע העמודה בנוסף לגידול מקסימלי בחלק העליון. ההשערה היתה ששטף גבוה מסיע גם את החמצן ולכן אם בשטף נמוך היתה מגבלת חמצן בחלק האמצעי של העמודה אז בשטף גבוה המגבלה התבטלה. הניסוי בשטף גבוה וריכוז גבוה סתר מעט את ההשערה הזו, מכיוון שלמרות השטף הגבוה הגידול עדיין היה ברובו בחלק העליון של העמודה, כפי שהיה בכל התוצאות האחרות בזרימה. מכיוון שבריכוז גבוה של תמיסת המזון צריכת החמצן גבוה יותר לא ניתן לסתור לגמרי את ההשערה. השערה נוספת היתה, כי שטף גבוה ניתן את החיידקים אך ממדידות של התשטיפ ביציאה מהעמודה לא היתה עליה בצפיפות אופטית. יתכן והשטף הגבוה גרם למיהול של הסיגנלים של מערכת חישת מניין וזה גרם לדיכוי בגידול. תכולת הרטיבות האופטימלית לגידול החיידקים, בעמודות עם זרימה, בשני הריכוזים וגם בשטפים השונים, היא 0.1.

בעמודות ללא זרימה תכולת הרטיבות בחלק העליון של העמודות היתה נמוכה מאוד, קרוב ל-0.02. הגידול המקסימלי התקבל בגובה 8cm בריכוז הנמוך של הנוטריאנטים ובגובה 8-15cm בריכוז הגבוה. בחלק העליון של העמודות הגידול מוגבל בשל כמות מזון מוגבלת וקצבי דיפוזית מומסים נמוכים. בחלק התחתון של העמודות אספקת החמצן מוגבלת ולכן הגידול נמוך. תוצאות אלה חזרו על עצמם בשני ניסויים נפרדים (איור 3.35). את הניסויים בעמודות ללא זרימה ניתן להשוות לניסויים שנערכו במערכת סגורה. בריכוז גבוה של נוטריאנטים, החיידקים גדלו יותר לאורך כל העמודות, כלומר בכל תכולת הרטיבות. הגידול המקסימלי בעמודה עם ריכוז גבוה



איור 3.35: גידול חיידקים בעמודות ללא זרימה בשני ריכוזים של תמיסת המזון. הניסויים בכל ריכוז נעשו בשתי חזרות. סמנים ריקים עבור ניסוי בשני ריכוזים שונים באותו סטרטר. סמנים מלאים עבור ניסוי בשני ריכוזים, לאחר שבועיים. כל נקודה מייצגת ממוצע וסטטית תקן עבור שתי חזרות באותו הניסוי.

יותר של נוטריאנטים, התקבל בחלק גבוה יותר של העמודה, בו תכולת הרטיבות נמוכה יותר. ניתן להסיק מזה כי גם בעמודות ללא זרימה, כמו במערכת סגורה, הגורם העיקרי שמשפיע על גידול החיידקים זה כמות המזון. הצגת תוצאות הניסויים לגבי התרבות החיידקים בריכוזי מצע מזון שונים ובשטפים שונים, מאפשרת ניתוח של התרבות החיידקים כפונקציה של אספקת המזון. באיור 3.36a, b מוצגים ריכוזי החיידקים בתנאים שונים של קצב אספקת מזון.

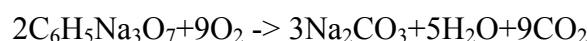


איור 3.36: ריכוז החיידקים בשלושה תנאים (שטפים וריכוזים) של קצב אספקת מזון זהה. (a) לאורך העמודות. (b) כפונקציה של תכולת רטיבות.

בריכוז גבוה של מצע ושטף נמוך היה גידול גבוה יותר של החיידקים מאשר בשטף גבוה ובריכוז נמוך של תמיסת המזון.

לפי הצילומים מהמיקרוסקופ הקונפוקלי, נראה שבמקרים מסויימים נוצרים ביופילמים מפותחים המכסים את הגרגרים, בעוד שבמקרים אחרים נוצרו ביופילמים לא רציפים, מיקרו-מושבות או נראו חיידקים בודדים מצפים את הגרגרים. לפי מאמר סקירה (Rittmann, 1993), המבוסס על אוסף ניסויים של ביופילמים הנוצרים על פני גרגרים, נמצא שהגורם הקובע את עובי הביופילם הוא קצב הספקת מזון. Rittmann מצא שכאשר ערכי ה-COD (מדד לכמות מקור פחמן), קטנים מ- $0.15\text{kgCOD}/1000\text{m}^2\text{day}$, לא נוצר ביופילם רציף, אלא מקוטע בלבד. בערכי אספקת פחמן גבוהים יותר, נוצר ביופילם רציף. ריכוז של 0.4% ציטרט שווה ערך ל- 15.5mM ($\text{MW}(\text{citrate})=258.1\text{g/mol}$).

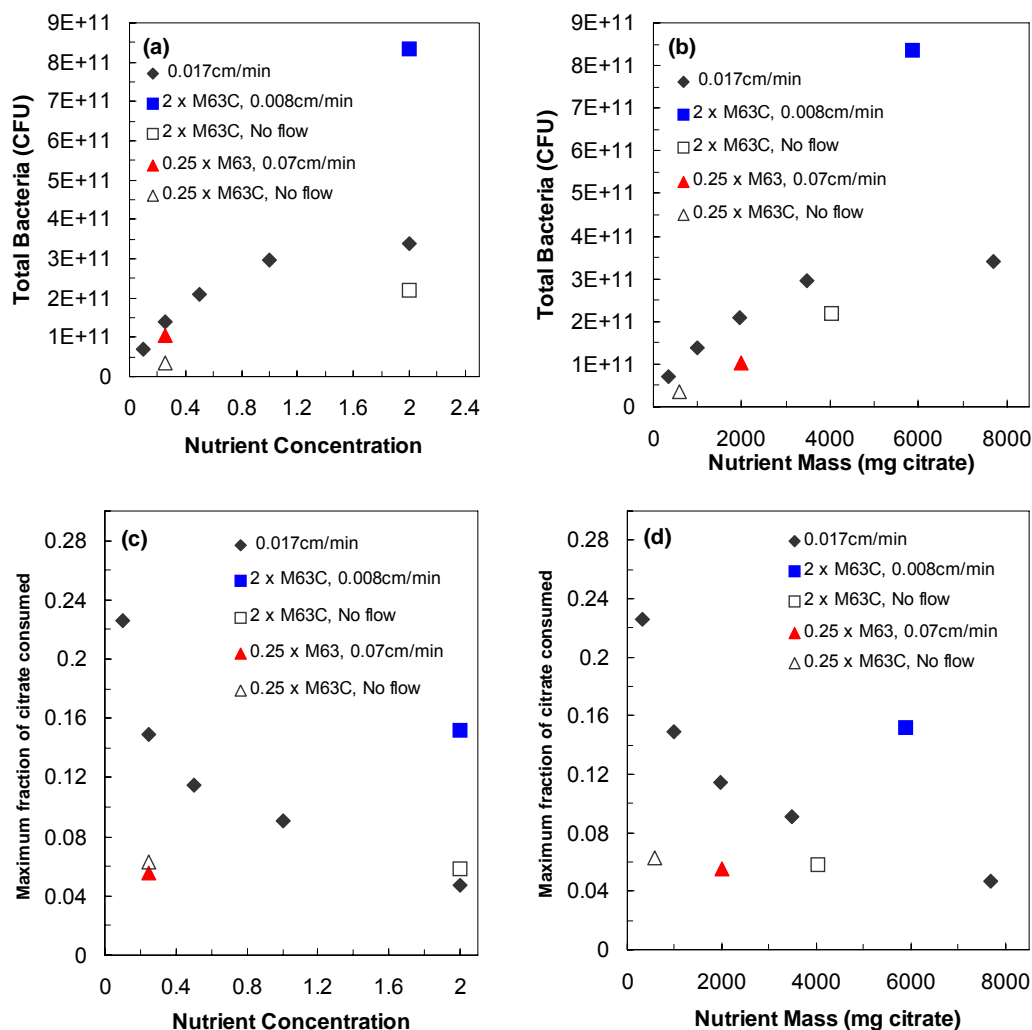
ציטרט מתחמצן לפי התגובה:



כלומר, דרושים 9 מולים של חמצן כדי לחמצן 2 מולים של ציטרט. לפי שטף הסף של Rittmann, 1993,

$$0.269\text{kg citrate}/1000\text{m}^2\text{day} \text{ או } 4.69\text{M O}_2/1000\text{m}^2\text{day}; (\text{MW}(\text{O}_2)=32\text{g/mol})$$

הכמות הכוללת של החיידקים, שגדלו בעמודות בניסויים שונים, מוצגת כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים וכפונקציה של כמות המזון, עוזרת להבין באיזה ריכוזים ושטפים הציטראט היה בעודף ומתי היה מחסור. כדי לחשב את מספר החיידקים הכולל בעמודה הוכפל מספר החיידקים לגרם חול של כל מקטע במשקל החול באותו המקטע וסוכם מספר החיידקים בכל שכבה. מסת הנוטריאנטים הזמינה לחיידקים חושבה לפי נפח הנוזל ההתחלתי בעמודה, שהוכפל בריכוז הציטראט, בתוספת למכפלת הספיקה, בריכוז הציטראט וזמן. הפרקציה המקסימלית של הציטראט שנוצל בתחית העמודה זאת המנה של ניצול ציטראט מקסימלי אפשרי לעומת מסת הציטראט הזמינה. הניצול המקסימלי האפשרי תלוי בכמות החיידקים בעמודה ובשיפוע של של מקסימום הגידול. יבול (yield) הגידול הוא מסת התאים ליחידת מסה של הנוטריאנט. השיפוע כפונקציה של כמות המזון (yield) שנלקח מהניסויים במערכת סגורה (איור 3.11).



איור 3.37: סך כל החיידקים שגדלו בעמודות עם ריכוזים שונים של הנוטריאנטים ובעמודות עם שטפים שונים לאחר 24 שעות. (a) כמות הכוללת של החיידקים מוצגת כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים. (b) כמות הכוללת של החיידקים המוצגת כפונקציה של מסת הנוטריאנטים. (c) הפרקציה המקסימלית של ציטראט שנצרכה כפונקציה של ריכוז הנוטריאנטים. (d) הפרקציה המקסימלית של ציטראט שנצרכה כפונקציה של מסת הציטראט הזמינה

מספר הכולל של החיידקים בעמודה עולה עם עליה בריכוז הנוטריאנטים וגם עם עליה בכמות המזון עבור כל הניסויים (בשטפים ובריכוזים השונים וגם עמודות ללא זרימה). עליה במספר החיידקים כפונקציה של ריכוז ומסת הנוטריאנטים דומה לקינטיקה של מיכאליס-מנטן (איור 3.37a, b). הפרקציה המקסימלית של ציטראט, שנוצל יורד ככל שריכוז ומסת הנוטריאנטים עולים. הניצול המקסימלי של ציטראט היה בניסוי עם שטף קבוע וריכוז הנמוך ביותר ($0.1 \times M63C$) ומגיע ל-25%. לכן, גם בריכוז נמוך המגבלה העיקרית היתה כנראה באספקת החמצן (איור 3.37c, d).

3.4.4 השפעת סוג המצע הגרנולרי

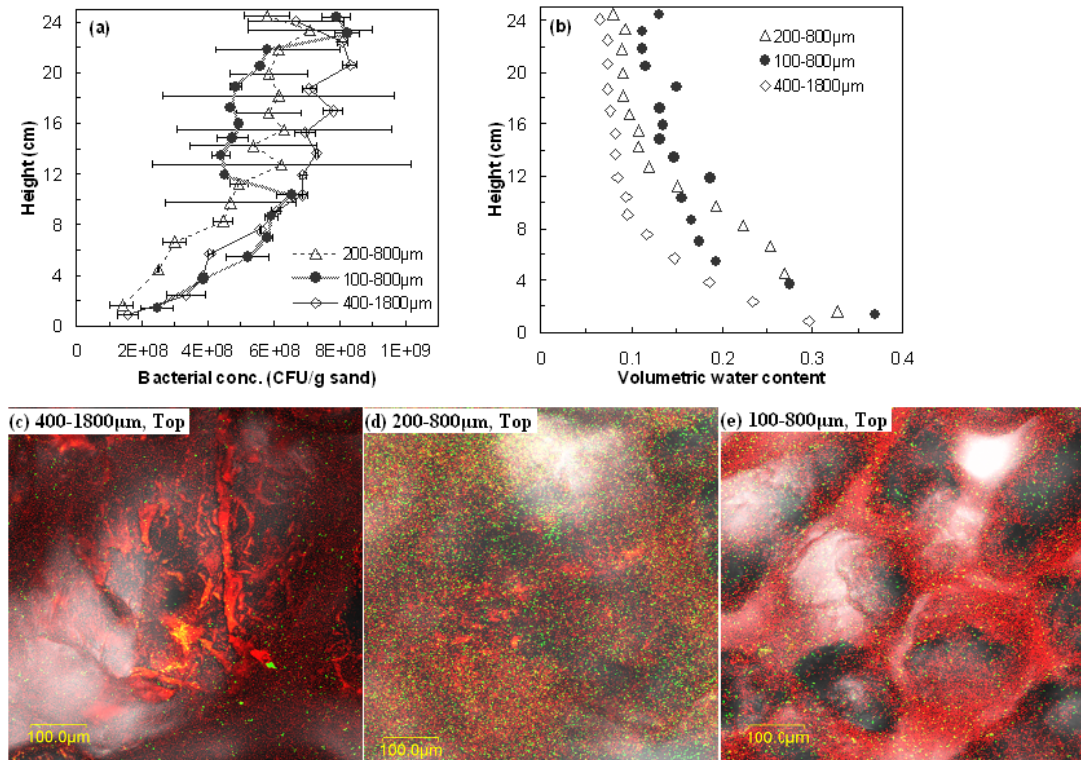
הניסויים הבאים נערכו במטרה לבדוק את ההשפעה של סוג המצע הגרנולרי על התרבות החיידקים בעמודות בתנאי זרימה תמידית. סוגי החול שנבדקו הם (פירוסי גודל החלקיקים מופיעים באיור 2.2):

חול 20/30 – גרגרי חול גס לא הומוגני בקוטר של $400-1800 \mu m$

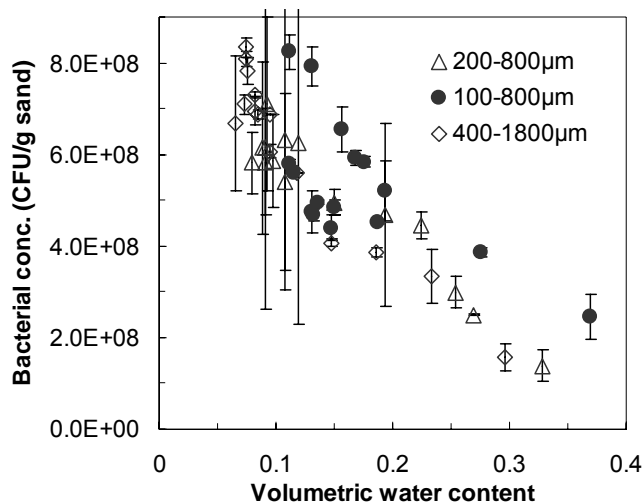
חול 30/40 – גרגרי חול גס בקוטר של $200-800 \mu m$

חול זכוכית – גרגרי חול דק בקוטר $100-800 \mu m$

הניסויים עם שלושת סוגי המצע נערכו עם תמיסת מזון בריכוז $1 \times M63C$ בתנאי זרימה זהים, בשטף של $0.017 \text{ cm/min} = 1.02 \text{ cm/hr}$, במשך 24 שעות. בעמודה עם חול גס ($400-1800 \mu\text{m}$) היו 501.1 g חול כאשר נפח כללי לפי שטח חתך 12.56 cm^2 וגובה העמודה 25 cm , היה 314 cm^3 והנקבוביות המחושבת היתה 0.395 . בעמודה עם חול ($200-800 \mu\text{m}$) היו 488.2 g כאשר נפח הכללי היה זהה והנקבוביות המחושבת היתה 0.411 . בעמודה עם חול זכוכית ($100-800 \mu\text{m}$) היו 484 g בנפח כללי זהה והנקבוביות המחושבת 0.416 .



איור 3.38: גידול חיידקים במערכת זרימה במצעים גרנולריים שונים. בצילומים של CLSM החיידקים צבועים בערכת LIVE/DEAD kit. (a) ריכוז החיידקים לאורך העמודה. התוצאות מייצגות ממוצע של שתי הזרות וסטיית התקן. (b) פרוס תכולת הרטיבות בשלושת העמודות. (c) צילום גרגרים אופייניים של חול גס ($400-1800 \mu\text{m}$) עם חיידקים צבועים. (d) צילום גרגרי חול אופייניים ($200-800 \mu\text{m}$) עם חיידקים צבועים. (e) צילום גרגרי חול זכוכית אופייניים ($100-800 \mu\text{m}$) עם חיידקים צבועים.



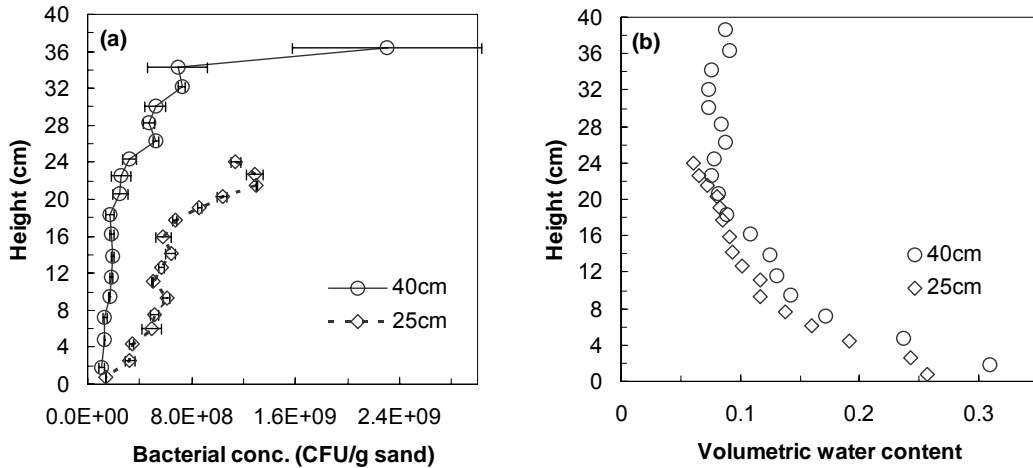
לפי התוצאות המוצגות באיור 3.38a, b, הגידול המירבי היה בחול גס ($400-1800 \mu\text{m}$) 20/30. זאת למרות, שבגרגרי חול דק יותר יש יותר שטחי פנים ולכן היה צפוי שעליהם יהיה גידול רב יותר. לפי עקומי הפרוס של תכולת הרטיבות, נראה כי בחול הגס ביותר היתה תכולת רטיבות נמוכה יותר משאר המצעים, באותו גובה בעמודה (איור 3.38b), וזה מסביר את התוצאות שהתקבלו.

איור 3.39: ריכוז החיידקים במערכת זרימה במצעים גרנולריים שונים כפונקציה של תכולת הרטיבות.

בעמודה עם גרגרים דקים יותר ($200-800 \mu\text{m}$) תכולת הרטיבות בעמודה קרובה ל-0.2, כמעט לאורך כל העמודה ורק בתחתית היא עולה (איור 3.38b) וגם, יש עליות וירידות המצביעות על אריזה לא אחידה של גרגרי החול בעמודה. זו יכולה להיות הסיבה לסטיות התקן הגבוהות שהתקבלו בניסוי (איור 3.38a). גם את תוצאות הגידול בחול זכוכית ($100-800 \mu\text{m}$), אפשר להסביר לפי עקום פרוס תכולת הרטיבות. תכולת הרטיבות בחלק העליון של העמודה, עם חול זכוכית גבוהה יותר מאשר בעמודה עם חול גס ולכן הגידול נמוך יותר. צילומים של גרגרי חול $30/40$ ($200-800 \mu\text{m}$) במיקרוסקופ קונפוקלי (איור 3.38c), מראים חיידקים המצפים כמעט את כל הגרגרים בשכבה אחת אחידה. מספר החיידקים החיים (ירוקים) דומה למספר המתים (אדומים). לעומת זאת, על פני גרגרי חול זכוכית ($100-800 \mu\text{m}$), רוב החיידקים היו מתים (אדומים) ונמצאים בנקבובים שבין הגרגרים (איור 3.38d). בחול הגס ($400-1800 \mu\text{m}$), רוב החיידקים מתים ונמצאים ספוחים לגרגר באזורים של סדקים ושקעים. מתוצאות כמותיות ומיקרוסקופיה נראה כי לתכולת הרטיבות היתה השפעה עיקרית על גידול החיידקים בניסויים המוצגים בפרק זה. התוצאות עבור ריכוז החיידקים כפונקציה של תכולת הרטיבות במצעים גרנולריים שונים (איור 3.39). בכל המצעים הגרנולריים, הגידול היה מירבי בחלק העליון של העמודה, שבו תכולת הרטיבות נמוכה ביותר. ההשפעה של שטחי פנים בא לידי ביטוי פחות, מכיוון שלא היה כיסוי מלא של גרגרי החול על ידי החיידקים (איורים 3.38c-e). דווקא בתכולת רטיבות גבוהה יחסית ($0.28-0.35$), נראה גידול רב יותר בחול זכוכית מאשר בחולות הגסים (איור 3.39). בכדי להדגים את ההשפעה של שטחי פנים צריך לעשות ניסויים בעמודות ארוכות יותר, שבהן גם בחול דק יהיה ניתן להגיע לתכולת רטיבות נמוכות ואז להשוות בין מצעים גרנולריים שונים וכך אפשר יהיה להדגים כי ככל שיש יותר שטחי פנים גם הגידול רב יותר.

3.4.5 השפעת אורך העמודה

חיידקים הנמצאים בחלק העליון של העמודה מתרבים ומקיימים מטבוליזם שתוצריו יכולים להשפיע על החיידקים הנמצאים בחלק התחתון של העמודה. כמו כן, מקור הפחמן (ציטראט) קטן, עקב ניצולו וכן החמצן המומס, המשמש בתהליך הנשימה. כדי לבחון את ההשערה שהחיידקים בראש העמודה מנצלים את החמצן ומקור הפחמן ומפרישים מטבוליטים רעילים הפוגעים בגידול של החיידקים הנמצאים מתחתיהם, נבדק גידול החיידקים בעמודות באורך שונה (25 ו- 40cm). באופן זה, בעמודה ארוכה יותר, ניתן למצוא מקום עם תכולת רטיבות זהה לזו שבעמודה קצרה יותר, אך יש עוד 15 ס"מ של גרגרי חול עם חיידקים מעליו. הניסויים נערכו בעמודות עם גרגרי חול גס בקוטר ($400-1800 \mu\text{m}$), בריכוז תמיסת מזון $1 \times \text{M63C}$, המסופקת בשטף קבוע של $0.017\text{cm}^3/\text{min}$, במשך 24 שעות. עמודה ארוכה יותר הכילה 813.6g חול, כאשר הנפח הכללי היה 502.6cm^3 והנקבוביות המחושבת היתה 0.38 . העמודה הקצרה יותר הכילה 505.3g חול, כאשר הנפח הכללי היה 314cm^3 והנקבוביות המחושבת היתה 0.39 . תוצאות הניסויים, מוצגות באיור 3.40.

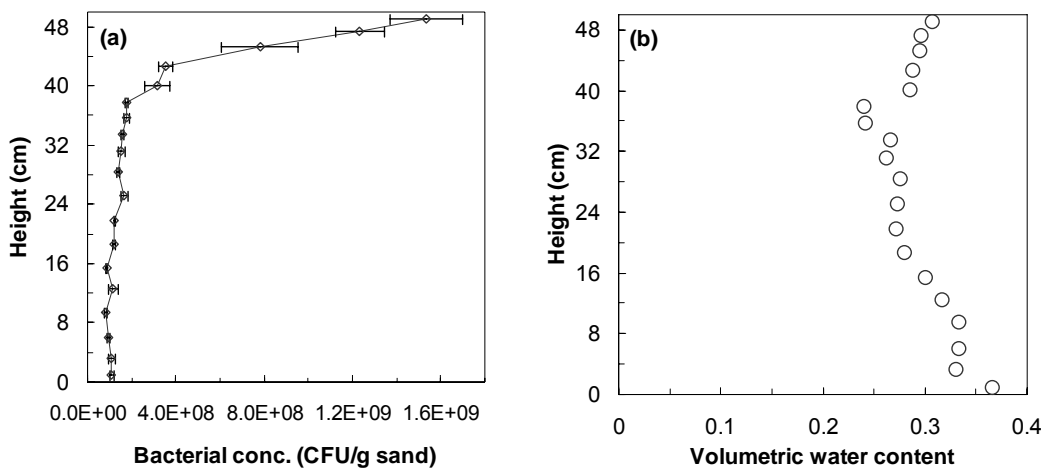


איור 3.40: ריכוז החיידקים בעמודות עם חול גס, באורכים שונים. (a) ריכוז חיידקים לאורך העמודות. (b) פרוס תכולת הרטיבות בשתי העמודות.

לפי תוצאות איור 3.40, בנקודות עם תכולת רטיבות דומה, החיידקים גדלו יותר בעמודה הקצרה של 25 ס"מ. בעמודה הארוכה יותר, בכל גובה עם אותה תכולת רטיבות, היו עוד 15 ס"מ חיידקים מלמעלה, אשר השתמשו בציטראט ובחמצן והפרישו תוצרים מטבוליים לסביבה. לפי התוצאות שהתקבלו, סביר להניח שההשערה נכונה. כלומר, בעמודה ארוכה יותר הגידול היה נמוך יותר בשל התוספת של 15 ס"מ חיידקים מלמעלה.

3.4.6 התרבות חיידקים בעמודה קרובה לרוויה

בעמודה רוויה כל הנקובים מלאים במים ולכן יש מגבלה ברורה של דיפוזיית חמצן. הניסוי הבא נערך בעמודה כמעט רוויה באורך 50cm, עם 1042.8g חול גס (400-1800 μm), כאשר הנפח הכולל הוא 628g והנקוביות המחושבת 0.37. תמיסת ההזנה בניסוי זה היתה בריכוז 1 x M63C והוזרמה בשטף קבוע של בשטף קבוע 0.017cm/min אך כתוצאה מתקלה העמדה נאטמה והיתה קרובה לרוויה, במשך 24 שעות. תוצאות פרוס תכולת הרטיבות לאורך העמודה והתרבות החיידקים מוצגות באיור 3.41.



איור 3.41: התרבות חיידקים בעמודה רוויה. הניסוי נערך בעמודה באורך 50cm, המכילה חול גס (400-1800 μm) ונמשך 24 שעות. (a) ריכוז החיידקים לאורך העמודה. (b) פרוס תכולת הרטיבות לאורך העמודה.

בתנאים של עמודה כמעט רוויה, החיידקים גדלו בעיקר בחלק העליון של העמודה, העשיר יותר בחמצן. ברוויה, הנקובים מלאים במים ולכן יש מגבלה באספקת החמצן על ידי דיפוזיה בפאזה הגזית. תוצאה זו מחזקת את

ההשערה שהגורם העיקרי שהגביל את הגידול בחלק התחתון של העמודות היה חמצן. ממקורות בספרות, *P.aeruginosa* ידוע כחיידק, שמעדיף תנאי גידול אארוביים אך יכול גם להתקיים בתנאים אנארוביים. לדוגמה, *P.aeruginosa* יכול לפרק בנזן בצורה אנארובית (Mahendran et al., 2006). בתנאים של מגבלות בחמצן *P.aeruginosa* יכול לנצל ניטראט (NO_3^-) או ניטריט (NO_2^-) על ידי דהניטריפיקציה, כלומר להשתמש בניטראט או ניטריט בתור מקבל אלקטרונים בתהליך הנשימה (בניסויים שלנו החיידק קיבל אמוניום). אם חסר במערכת ניטראט או ניטריט *P.aeruginosa* יכול להשתמש בארגינין (Mercenier et al., 1980).

4. סיכום ומסקנות

4.1. השפעת תכולת רטיבות על גידול חיידקים במערכת סטטית, סגורה

בעבודה זו נבדקו שתי מערכות של גידול חיידקים בתווך גרנולרי: מערכת סטטית סגורה ומערכת זרימה. המטרה העיקרית היתה לבחון את השפעת תכולת הרטיבות על התרבות החיידקים בקרקע ויצירת ביופילם. במערכת סגורה בחנו את השפעת תכולת הרטיבות בשילוב עם ריכוז הנוטריאנטים, כמות המזון, הגידול בחול לעומת גידול בנוזל, גודל גרגרי חול, גודל המזרע ההתחלתי והטמפ'. השפעת תכולת הרטיבות נבחנה במערכת מבחנות עם חול דק, דרגת רוויה שונה בכל מבחנה ובריכוזים שונים של מצע מינימלי עם ציטרט. בכל מבחנה נפח תמיסת המזון קבע את דרגת הרוויה של החול. נפח המזרע ההתחלתי של החיידקים היה תמיד קבוע ולכן ריכוז החיידקים ירד עם עליה בדרגת הרוויה. התאמת מודל מתמטי לגידול חיידקים סייעה להשוואה של קצב הגידול, זמן ה-lag, וערך המקסימלי של הגידול. למרות מגבלת המדידות באמצעות בדיקת חלבון, הצגת התוצאות באופן לינארי ולא לוגריתמי, כמקובל, אפשרה את השוואת הפרמטרים הבסיסיים של עקום גידול חיידקים. בתוצאות שהתקבלו במערכת סגורה, בחול דק בדרגות רוויה מ-0.1 עד 1, בריכוזים שונים של הנוטריאנטים, ככל שריכוז הנוטריאנטים עולה גם הגידול המקסימלי עולה, למרות שקצב הגידול יורד. בריכוזים גבוהים של הנוטריאנטים, אפקט אוסמוטי מקטין את קצב הגידול, אך לא גורם לירידה בערך המקסימלי. קצב הגידול המקסימלי עבור ריכוז המזון השונים התקבל בדרגות רוויה 0.6-0.8. ניתן להסיק כי ברוויה מלאה, מגבלה באספקת החמצן מעכבת את הגידול ואילו בדרגת רוויה נמוכה מגבלה בדיפוזיה של הנוטריאנטים. השפעה של גודל מזרע התחלתי על גידול החיידקים נבחנה ונמצא כי קצב הגידול היה גבוה במקצת עבור ריכוזי מזרע גבוהים ולא היתה השפעה על הערך המקסימלי של הגידול. במפתיע, ככל שהמזרע ההתחלתי היה גבוה יותר, זמן ה-lag התארך. באופן כללי, ערך המקסימום של גידול החיידקים (B_{max}) עלה, עם עליה בריכוז הנוטריאנטים בדומה לקינטיקה של מיכאליס-מנטן. במבחנות עם דרגת רוויה גבוה יותר, הגידול היה גבוה יותר בכל הריכוזים, למעט רוויה מלאה, שבה היתה ירידה בגידול במספר מקרים, כנראה עקב מגבלה בדיפוזיית החמצן. במצב רוויה כל הנקובים מלאים במים ולכן דיפוזיה של חמצן מהווה גורם מגביל גידול. גידול חיידקים בטמפ' שונות השפיע על זמן ה-lag. ככל שטמפ' הגידול היתה נמוכה יותר זמן ה-lag התארך. ככל שהטמפ' היתה גבוהה יותר, כך קצב הגידול עלה אך לא היתה השפעה על מקסימום הגידול. גידול החיידקים עלה ככל שכמות המזון עלתה. עקום לינארי התקבל עבור הקשר בין B_{max} לבין כמות המזון, בכמות מזון קטנה, עבור כל הניסויים (בריכוזים שונים, בתווך גרנולרי שונה, במזרע התחלתי שונה, בטמפ' שונות) במערכת סגורה. כלומר כל הגורמים שנבדקו במערכת סגורה, היו משניים והגורם העיקרי, שהשפיע על הגידול היה כמות מזון. בכמות מזון גדולה העקום מתכופף, בשל השפעות של גורמים נוספים כמו הצטברות מטבוליטים רעילים ומגבלה באספקת החמצן.

4.2. השפעת תכולת רטיבות על גידול חיידקים במערכת זרימה

מערכת זרימה תמידית היא המצב ההפוך ממערכת סגורה, כאשר בטבע לרוב מתקיימים מצבי ביניים. לפרקי זמן קצרים, גם מערכות סגורות וגם מערכות זרימה יכולות להתקיים. במערכת זרימה נבדקו השפעות של שטפים וריכוזים שונים של הנוטריאנטים לאורך עמודה המלאה בחול וחיידקים עם פרוס תכולת רטיבות. נמצא כי בזרימה תמידית של תמיסת המזון, הגורמים העיקריים שהשפיעו על גידול החיידקים היו ריכוז הנוטריאנטים

ואספקת החמצן. אפשר להתייחס לתוצאות של גידול החיידקים בעמודות כאל קצב הגידול, מכיוון שעצרנו את הניסויים לאחר 24 שעות (בכדי להימנע ממצב של האטמות החול), כאשר החיידקים היו בשלב הלוגאריתמי ובהנחה כי שלב ה-lag היה קצר. גידול החיידקים עלה עם עליה בריכוז הנוטריאנטים והיה מקסימלי בחלק העליון של העמודות, שבו תכולת הרטיבות היתה הנמוכה ביותר, בניגוד למצב במערכת הסגורה. החיידקים בחלק העליון של העמודה נמצאים בתכולת רטיבות נמוכה יותר מאלו שבחלק התחתון של העמודה, הם משתמשים במקור הפחמן, מנצלים את החמצן ומפרישים מטבוליטים הנשטפים אל החיידקים הנמצאים מתחתיהם בעמודה. בריכוזים נמוכים של מזון, בחלק העליון של העמודה, פחמן (ציטראט) היה גורם מגביל גידול, מכיוון שהגידול עלה עם עליה בריכוז הנוטריאנטים. **מסקנות:** במערכת סטטית סגורה, כמות המזון היא הגורם העיקרי המשפיע על התרבות החיידקים. במערכת זרימה עם הספקה קבועה של מזון והרחקה קבועה של מטבוליטים, הגורם העיקרי המשפיע על גידול החיידקים בתכולת הרטיבות הנמוכה (בחלק העליון של העמודה) היה ריכוז הנוטריאנטים ואילו בחלק התחתון של העמודה, הגורם המגביל היה אספקת החמצן. המצב האופטימלי עבור גידול החיידקים היה בתכולת הרטיבות המינימלית. בהמשך למחקר זה, יש לערוך ניסויים בתכולת רטיבות נמוכות יותר, על מנת למצוא את תכולת הרטיבות הקריטית, בה המים מהווים גורם מגביל גידול. בחלק התחתון של העמודה, תכולת הרטיבות היתה גבוהה והחמצן היה גורם מגביל גידול. גידול החיידקים היה נמוך יחסית לאורך כל העמודה, אך עדיין בחלק העליון גדלו יותר חיידקים מאשר בחלק התחתון. לכן, ריכוז הנוטריאנטים במקרה זה היה גורם מגביל לאורך כל העמודה, כאשר בחלק התחתון היתה מגבלה נוספת באספקת החמצן. ניצול הציטראט המקסימלי צפוי בעמודה עם הריכוז הכי נמוך של הנוטריאנטים והיה קטן מ-25%. לכן ניתן לשער כי מחסור בחמצן או הפרשה של מטבוליטים רעילים על ידי החיידקים, במהלך הגידול, עיכבו את ההתרבות. ניסויים עם שטפים שונים של תמיסות מזון בריכוזים שונים אפשרו בחינה של השפעת קצב הספקת מזון בתכולת רטיבות קבועה. לפי התוצאות שהתקבלו, לריכוז הנוטריאנטים היתה השפעה משמעותית יותר על הגידול מאשר לשטף. ריכוז הנוטריאנטים היה גורם מגביל עיקרי בחלק העליון של העמודות ולא ניתן היה לפצות על ריכוז נמוך במתן שטף גבוה. גידול גבוה יותר התקבל דווקא בשטפים נמוכים, גם בריכוז גבוה של הנוטריאנטים וגם בריכוז נמוך. בעמודות ללא זרימה הגידול המירבי היה באמצע העמודה, מקום בו יש, כנראה, דיפוזיה אופטימלית של הנוטריאנטים ושל החמצן. בעמודות עם אורכים שונים הודגמה השפעה של תוספת של 15 ס"מ (מלמעלה) על הגידול באותה תכולת הרטיבות. בעמודה הקצרה, הגידול היה גבוה יותר באותה תכולת רטיבות. כלומר, תוספת של 15 ס"מ, מלמעלה, עכבה את הגידול, אולי משום שהחיידקים בראש העמודה ניצלו את החמצן והפחמן והפרישו תוצרים שהשפיעו על החיידקים שמתחתיהם. צילומים במיקרוסקופ קונפוקלי הראו כי החיידקים מכסים את הגרגרים בצורה לא רציפה ולא אחידה. לרוב, נראתה שכבה של חיידקים בודדים, אשר לא כיסו לגמרי את הגרגר. ביופילמים מפותחים יותר ($5-15\mu\text{m}$), נצפו בסדקים ושקעים של הגרגרים, או במרווח בין הגרגרים. לגודל גרגרי החול היתה השפעה קטנה בלבד על גידול החיידקים, מכיוון שבתנאי הניסוי, כיסוי הגרגרים לא היה מלא ולכן הגורם של שטחי פנים לא בא לידי ביטוי. מתוצאות עבודה זו נראה כי ריכוז חומרי המזון ולא תכולת הרטיבות הוא הגורם המגביל את גידול החיידקים בקרקע. עם זאת, יש לשער כי קיימים בטבע גם מצבים בהם תכולת הרטיבות תהיה הגורם המגביל. עבודות מחקר נוספות דרושות על מנת לזהות את תכולת הרטיבות הקריטית, בה המים (ולא ריכוז המזון) מהווים גורם מגביל גידול.

- Ahearn, D. J., Borazjani, R. N., Simmons, R. B., and Gabriel, M. M.** (1999) Primary adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to inanimate surfaces including biomaterials. *Methods Enzymol* 310, 551-557.
- Al-Tahhan, R. A., Sandrin, T. R., Bodour, A. A., Maier, R. M.** (2000). Rhamnolipid-Induced Removal of Lipopolysaccharide from *Pseudomonas aeruginosa*: Effect on Cell Surface Properties and Interaction with Hydrophobic Substrates. *App Environ Microb* 66, 3262-3268.
- Auerbach, I., Sorensen, C., Hansma, H., and Holden, P.** (2000). Physical morphology and surface properties of unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *J Bacteriol* 182, 3809-3815.
- Auset, M., Keller, A. A., Brissaud, and Lazarova, V.** (2005). Intermittent filtration of bacteria and colloids in porous media. *Water Resour Res* 41, W09408.
- Bapat, P., Nandy, S. K., Wangikar, P., Venkatesh, K. V.** (2006). Quantification of metabolically active biomass using Methylene Blue dye Reduction Test (MBRT): measurement of CFU is about 200s. *J Microbiol Methods* 65, 107-116.
- Baranyi, J., Roberts, T. A.** (1994). A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *Int J Food Microbiol* 23, 277-294.
- Baranyi, J., Roberts, T. A.** (1995). Mathematics of predictive food microbiology. *Int J Food Microbiol* 26,199-218
- Barton, J. W., Ford R.M.** (1995). Determination of effective transport coefficients for bacterial migration in sand columns. *App Environ Microb* 61, 3329-3335.
- Besse, N. G., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., Colin, P.** (2006). Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *INT J Food Microbiol* 110, 43-51.
- Berry, A., DeVault, J. D., and Chakrabarty, A. M.** (1989). High osmolarity is a signal for enhanced algD transcription in mucoid and nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains. *J Bacteriol* 171, 2312-2317.
- Bloem, J., Veninga, M., and Shepherd, J.** (1995). Fully automatic determination of soil bacterium numbers, cell volumes, and frequencies of dividing cells by confocal laser scanning microscopy and image analysis. *App Environ Microbiol* 61, 926-936.
- Bradford, M.M.** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Brown, M., Aldrich, H., and Gauthier, J.** (1995). Relationship between glycocalyx and povidone-iodine resistance in *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) biofilms. *App Environ Microbiol* 61, 187-193.
- Buesing, N., Gessner, M. O.** (2002). Comparison of detachment procedures for direct counts of bacteria associated with sediment particles, plant litter and epiphytic biofilms. *Aquat Microb Ecol* 27, 29-36.
- Chandra, S., Joshi, H. C., Pathak, H., Jain, M. C., Kalra, N.** (2002). Effect of potassium salts and distillery effluent on carbon mineralization in soil. *Bioresour Technol* 83, 255-257.
- Chang, W. S., Halverson, L. J.** (2003). Reduced water availability influences the dynamics, development, and ultrastructural properties of *Pseudomonas putida* biofilms. *J Bacteriol* 185, 6199-6204.
- Chenu, C.** (1993) Clay or sand polysaccharide associations as models for the interface between micro-organisms and soil: water related properties and microstructure. Elsevier Science Publishers B.V. Amsterdam ,Geoderma.
- Chenu, C., Hassink, J., Bloem, J.** (2001). Short-term changes in the spatial distribution of microorganisms in soil aggregates as affected by glucose addition. *Biol Fertil Soils* 34, 349-356.

- Chenu, C., and Stotzky, G.** (2002). Interactions between microorganisms and soil particles: An overview. In: Interactions between soil particles and microorganisms: Impact on the terrestrial ecosystem. P.M. Huang, J.M. Bolag and N. Senesi (eds.), IUPAC. John Wiley & Sons, Ltd. Chichester, U.K., pp. 1-40.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., and Greenberg, E. P.** (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284, 1318-1322.
- Corradini, M. G., Amézquita, A., Normand M. D., Peleg M.** (2006). Modeling and predicting non-isothermal microbial growth using general purpose software. *Int J Food Microbiol* 106, 223-228.
- Crawford, J., Harris, J., Ritz, K., and Young, I.** (2005). Towards an evolutionary ecology of life in soil. *TRENDS Ecol Evol* 20, 81-87.
- Curtis, T. P., Sloan, W. T., Scannell, J. W.** (2002). Estimating prokaryotic diversity and its limits. *Proc Natl Acad Sci USA* 99, 10494-10499.
- Davies, D., Parsek, M., Pearson, J., Iglewsky, B., Costerton, J., Greenberg, E.** (1998). The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.
- Davies, K. J., Lloyd, D., Boddy, L.** (1989). The effect of oxygen on denitrification in *Paracoccus denitrificans* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Gen Microbiol* 135, 2445-2451.
- Davey, M., and O'Toole, G.** (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microb Molecul Biol Rev* 64, 847-867.
- Delhaize, E., Hebb, D. M., Ryan, P. R.** (2001). Expression of a *Pseudomonas aeruginosa* citrate synthase gene in tobacco is not associated with either enhanced citrate accumulation or efflux. *Plant Physiol* 124, 2059-2067.
- Deziel, E., Comeau, Y., Villemur, R.** (2001). Initiation of biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* 57RP correlates with emergence of hyperpiliated and highly adherent phenotypic variants deficient in swimming, swarming, and twitching motilities. *J Bacteriol* 183, 1195-1204.
- Donlan, R.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis* 8, 881-890.
- Fierer, N., and Jackson, R.B.** (2006). The diversity and biogeography of soil bacterial communities. *Proc Natl Acad Sci USA* 103, 626-631.
- Fletcher, M.** (1977). Effects of culture concentration and age, time, and temperature on bacterial attachment to polystyrene. *Can J Microbiol* 23, 1-6.
- Friedman, S. P.** (1999). Transport of bacteria through saturated and unsaturated soils. *Israel Agresearch* 10, 99-146 (in Hebrew).
- Fujikawa, H. and Morozumi, S.** (2005). Modeling surface growth of *Escherichia coli* on agar plates. *App Environ Microbiol* 71, 7920-7926.
- Gaillard, V., Chenu, C., Recous, S., Richard, G.** (1999). Carbon, nitrogen and microbial gradients induced by plant residues decomposing in soil. *Eur J Soil Sci* 50, 567-578.
- Guillou, C., Merieau, A., Trebert, B., and Guespin-Michel J. F.** (1995) Growth temperature is involved in the regulation of extracellular lipase at two different levels in *Pseudomonas fluorescens* strain MFO. *Biotechnol Lett* 17, 377-382.
- Govan, J. R. W., Deretic, V.** (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev* 60, 539-574.
- Grobe, S., Wingender, J., Truper, H. G.** (1995). Characterization of mucoid *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from technical water systems. *J Appl Bacteriol* 79, 94-102
- Halverson, L. J., Firestone, M. K.** (2000). Differential effects of permeating and nonpermeating solutes on the fatty acid composition of *Pseudomonas putida*. *App Environ Microbiol* 66, 2414-2421.
- Harms, H.** (1996). Bacterial growth on distant naphthalene diffusing through water, air, and water-saturated and nonsaturated porous media. *App Environ Microbiol* 62, 2286-2293.

- Harms, H., Zehnder, A. J.** (1994). Influence of substrate diffusion on degradation of dibenzofuran and 3-chlorodibenzofuran by attached and suspended bacteria. *App Environ Microbiol* 60, 2736-2745.
- Hendry, M. J., Mendoza, C. A., Kirkland, R. A., Lawrence, J. R.** (1999). Quantification of transient CO₂ production in a sandy unsaturated zone. *Water Resour Res* 35, 2189-2198.
- Hinsa, S., Espinosa-Urgel, M., Ramos, J., and O'Toole, G.** (2003). Transition from reversible to irreversible attachment during biofilm formation by *Pseudomonas fluorescens* WCS365 requires an ABC transporter and a large secreted protein. *Mol Microbiol* 49, 905-918.
- Holden, P. A., Hunt, J. R., Firestone, M. K.** (1997). Toluene diffusion and reaction in unsaturated *Pseudomonas putida* biofilms. *Biotechnol Bioeng* 56, 657-670.
- Jaouen, T., De, E., Chevalier, S., and Orange, N.** (2004). Pore size dependence on growth temperature is a common characteristic of the major outer membrane protein OprF in Psychrotrophic and Mesophilic *Pseudomonas* species. *App Environ Microbiol* 70, 6665-6669.
- Iswandi, A., Bossier, P., Vandenabeele, J., Verstraete, W.** (1987). Relation between soil microbial activity and the effect of seed inoculation with the rhizopseudomonad strain 7NSK2 on plant growth. *Biol Fertil Soils*. 3, 147-151.
- Jiang, G., Noonan, M. J., Buchan, G. D., Smith, N.** (2005). Transport and deposition of *Bacillus subtilis* through an intact soil column. *Aust J Soil Res* 43, 695-703.
- Joshi-Tope, G., Francis, A. J.** (1995). Mechanisms of biodegradation of metal-citrate complexes by *Pseudomonas fluorescens*. *J Bacteriol* 177, 1989-1993.
- Kennedy, C. A., and O'Gara, J. P.** (2004). Contribution of culture media and chemical properties of polystyrene tissue culture plates to biofilm development by *Staphylococcus aureus*. *J Med Microbiol* 53, 1171-1173.
- Koga, K., Suehiro, Y., Matsuoka, S. T. and Takahashi, K.** (2003). Evaluation of growth activity of microbes in tea field soil using microbial calorimetry. *J. Biosci. and bioeng.* 95, 429-434.
- Koseki, S. and Isobe, S.** (2005). Prediction of pathogen growth on iceberg lettuce under real temperature history during distribution from farm to table. *Int J Food Microbiol* 104, 239-248.
- Li, Y., Dick, W., Tuovinen, O.** (2003). Evaluation of fluorochroms for imaging bacteria in soil. *Soil Biol Biochemis* 35, 737-744.
- Lindahl, V., Bakken, L. R.** (1995). Evaluation of methods for extraction of bacteria from soil. *FEMS Microbiol Ecol* 16, 135-142.
- Long, T., and Or, D.** (2005). Aquatic habitats and diffusion constraints affecting microbial coexistence in unsaturated porous media. *Water Resour Res* 41, W08408
doi:10.1029/2004WR003796, T., and D. Or. 2007. Microbial growth on partially saturated rough surfaces: Simulations in idealized roughness networks., *Water Resour. Res.*, 43, W02409, doi:10.1029/2005WR004781.
- Maier, R., Pepper, I., Gerba, C.** (2000). *Environmental Microbiology*. Academic press, Canada.
- Mahendran, B., N.-C. Choi, J.-W. Choi, and D.-J. Kim.** (2006). Effect of dissolved oxygen regime on growth dynamics of *Pseudomonas* spp during benzene degradation. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 71:350-354.
- Mattison, R., Taki, H., and Harayama, S.** (2002). The bacterivorous soil flagellate *Heteromita globosa* reduces bacterial clogging under denitrifying conditions in sand-filled aquifer columns. *App Environ Microbiol* 68, 4539-4545.
- Mauclair, L., Schurmann, A., Thullner, M., Gammeter, S., and Zeyer, J.** (2004). Sand filtration in a water treatment plant: biological parameters responsible for clogging. *J Water Supply Res Technol* 53, 93-108.

- McCalla, T. M.** (1950). Studies on the effect of microorganisms on rate of percolation of water through soils. *Soil Sci Soc Am Proc* 15, 182-186.
- McCarthy, J.F. and McKay, L.D.** (2004). Colloid transport in the subsurface: past, present, and future challenges. *Vadose Zone J* 3(2), 326-337.
- Medilanski, E., Kaufmann, K., Wick, L., Wanner, O., and Harms, H.** (2002). Influence of the surface topography of stainless steel on bacterial adhesion. *Biofouling* 18, 193-203.
- Mercenier, A., Simon, J.P., Vander, W. C., Haas, D., Stalon, V.** (1980). Regulation of enzyme synthesis in the arginine deiminase pathway of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 144, 159-163.
- Miller, J. H.** (1972) Experiments in molecular genetics. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
- Miller, M. B., Bassler, B. L.** (2001) . Quorum-sensing in bacteria. *Annu. Rev. Microbiol.* 55,165-199.
- Mitchell, C. G.** (1996). Identification of a multienzyme complex of the tricarboxylic acid cycle enzymes containing citrate synthase isoenzymes from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochem* 313, 769-774.
- Ng, F. M.-W., and E.A. Dawes.** (1973). Chemostat studies on the regulation of glucose metabolism in *Pseudomonas aeruginosa* by citrate. *Biochem. J.* 132:129-140.
- Nunan, N., Wu, K. J., Young, I. M., Crawford, J. W., Ritz, K.** (2003). Spatial distribution of bacterial communities and their relationships with the micro-architecture of soil. *FEMS Microbiol Ecol* 44, 203-215.
- Okabe, S., Satoh, H., Watanabe, Y.** (1999). In situ analysis of nitrifying biofilms as determined by in situ hybridization and the use of microelectrodes. *App Environ Microbiol* 65, 3182-3191.
- O'Toole, G., Gibbs, K., Hager, P., Phibbs, P., and Kolter, R.**(2000). The global carbon metabolism regulator Crc is a component of a signal transduction pathway required for biofilm development by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol* 182, 425-431.
- O'Toole, G., and Kolter, R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* 30, 295-304.
- Or, D.** (2002). Physical processes affecting microbial habitats and activity in unsaturated porous media. *Agr Sci* 7, 39-45.
- Or, D., Smets, B. F., Wraith, J. M., Dechesne, A. and Friedman, S. P.** (2007). Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media- A review. *Adv Water Res* -in press.
- Perrot, F., Jouenne, T., Feuilloley, M., Vaundry, H., Junter, G. A.** (1998). Gel immobilization improves survival of *Escherichia coli* under temperature stress in nutrient-poor natural water. *Water Res* 32, 3521-3526.
- Pierson, L. S., Keppenne, V.D., Wood, D. W.** (1994). Phenazine antibiotic biosynthesis in *Pseudomonas-Aureofaciens*-30-84 is regulated by Phzr in response to cell-density. *J Bacteriol* 176,3966-3974.
- Powelson, D. K., Mills, A. L.** (1998). Water saturation and surfactant effects on bacterial transport in sand columns. *Soil Sci* 163, 694-704.
- Powelson, D. K., Mills, A. L.** (2001). Transport of *Escherichia coli* in sand columns with constant and changing water contents. *J Environ Qual* 30, 238-245.
- Rittmann, B. E.** (1993). The significance of biofilms in porous media. *Water Res Res* 29, 2195-2202.
- Roberson, E., and Firestone, M.** (1992). Relationship between desiccation and exopolysaccharide production in a soil *Pseudomonas* sp. *App Environ Microbiol* 58, 1284-1291.
- Ramsey, M. M., and Whiteley, M.** (2004). *Pseudomonas aeruginosa* attachment and biofilm development in dynamic environments. *Mol Microbiol* 53, 1075-1087.

- Sauer, K., Camper, A., Garth, D., Ehrlich, J., Costerton, W., and Davies, D.** (2002). *Pseudomonas aeruginosa* displays multiple phenotypes during development as a biofilm. *J Bacteriol* 184,1140-1154.
- Seki, K., Miyazaki, T.** (2001). A mathematical model for biological clogging of uniform porous media. *Water Res Res* 37, 2995-2999.
- Shirkot, C. K., Shirkot, P., Gupta, K. G.** (1994). Isolation from soil and growth characterisation of the tetramethylthiuram disulphide (TMTD) degrading strain of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Environ Sci Health* 29, 605–614.
- Smith, E. M., Kemp, W. M.** (2003). Planktonic and bacterial respiration along an estuarine gradient: responses to carbon and nutrient enrichment. *Aquatic Microbial Ecology* 30, 251-261.
- Stevik, K. T., Aa, K., Ausland, G., Hanssen, J. F.** (2004). Retention and removal of pathogenic bacteria in wastewater percolating through porous media: a review. *Water Res Res* 38, 1355-1367.
- Skopp, J., Jawson, M., Doran, J.** (1990). Steady-state aerobic microbial activity as a function of soil water content. *Soil Sci Am J* 54,1619-1625.
- Sutherland, I.** (2001). Biofilm exopolysaccharides: a strong and sticky framework. *Microbiol* 147, 3-9.
- Taylor, S.W., Milly, P.D. and Jaffe, P.R.** (1990). Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium 2. Permeability, *Water Res Res* 26, 2161–2169.
- Torsvik, V., Ovreas, L., Thingstad, T. F.** (2002). Prokaryotic diversity- magnitude, dynamics, and controlling factors. *Science* 296, 1064-1066.
- Treves, D. S., Xia, B., Zhou, J., Tiedje, J. M.** (2003). A two-species test of the hypothesis that spatial isolation influences microbial diversity in soil. *Microbial Ecol* 45, 20-28.
- Tuller, M., Or, D., Dudley, L. M.** (1999). Adsorption and capillary condensation in porous media: Liquid retention and interfacial configurations in angular pores. *Water Resour Res* 35, 1949-64.
- Turakhia, M. H., and W.G. Characklis.** (1989). Activity of *Pseudomonas aeruginosa* in biofilms - Effect of calcium. *Biotechnology and Bioengineering* 33:406-414.
- Tzoris, A., Cane, D., Maynard, P., Hall, E. A. H.** (2002). Tuning the parameters for fast respirometry. *Analytica Chimica Acta* 460,257-270.
- Vandevivere, P., Baveye, P.**(1992). Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Sci Soc Am J* 56,1-13.
- Vandevivere, P., Baveye, P., Delozada, D. S., Deleo, P.** (1995). Microbial clogging of saturated soils and aquifer materials-evaluation of mathematical-models. *Water Resour Res* 31, 2173-80.
- Vandevivere, P., Kirchman, D. L.** (1993). Attachment stimulates exopolysaccharide synthesis by a bacterium. *App Environ Microb* 59, 3280-3286.
- Vandevivere, P., and Baveye, P.** (1992). Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *App Environ Microbiol* 58, 1690-1698.
- Wagner, V. E., Frelinger, J. G., Barth, R. K., Iglewski, B. H.** (2006). Quorum sensing: dynamic response of *Pseudomonas aeruginosa* to external signals. *TRENDS Microbiol* 14, 55-58.
- Watnick, P., and Kolter, R.** (2000). Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* 182:2675-2679
- Whitchurch, C. B., Tolker-Nielsen, T., Ragas, P. C., Mattick. J. S.** (2002). Extracellular DNA required for bacterial biofilm formation. *Science* 295:1487
- Young, I. M., Crawford, J. W.** (2004). Interactions and self-organization in the soil-microbe complex. *Science* 304, 1634-1637.

Abstract

Understanding how changes in water content affect microbial growth and biofilm formation could help reduce bio-clogging and transport of pathogenic bacteria during the process of wastewater infiltration. The spatial arrangement of soil particles in unsaturated soil forms a continuous pore space that is filled with water or air. Soil bacteria appear in two forms: planktonic – swimming freely in water-filled pore volumes, or as biofilm – attached to the surfaces of soil particles. Unsaturated conditions in soil generate diverse microenvironments for bacteria. In water-filled pores the diffusion of O₂ is limited with air-filled pores limit nutrient diffusion in the soil, thus, the water saturation degree controls microbial activity and biofilm development. The saturation degree also controls, to a large extent, the convective and self-movement of bacteria in unsaturated soils and rock formations. Soil bacteria respond to desiccation by biofilm formation, namely by producing extracellular polymeric substance (EPS). The main objective of this study was to quantify the effect of water content on microbial growth and on biofilm formation in unsaturated granular media. We report here results obtained with a monoculture of *Pseudomonas aeruginosa*, a soil bacterium which is an aerobic, gram negative, opportunistic human pathogen, known to excrete a large amount of EPS when forming biofilms. Several granular media were tested: fine quartz sand (106-180µm), coarse quartz sand (500-850µm), mixed coarse sand (20/30), fine sand (30/40) and glass sand. Batch experiments were performed in 2ml cryo-vials, filled with 0.75g sand to which a nutrient solution and 10 µl bacterial inoculum were added. Various volumes of M63+0.4% citrate nutrient solution (referred to as 1x) were added to form 6 different saturation degrees of 10, 20, 40, 60, 80 and 100%. The batch experiments were also performed with other nutrient concentrations (0.25x, 0.5x, 1x, 2x, 4x) of the M63+0.4% citrate (M63C) growth medium. The inoculated sand was placed in a container with about 90% relative humidity, in order to reduce evaporation from the cryo-vials. The vials were incubated for up to a week at a constant room temperature of 25°C, and at pre-set times

(usually 24, 48, 72, and 96 hours) three replicates were dismantled for determining bacterial growth. The control vials, contained only sand and nutrient solution, but not bacteria. The flow experiments were performed in 30-50 cm glass columns with inner diameter of 4 cm. After packing bacterial solution with sand, usually to 25 cm height, M63+0.4% citrate solution was applied to the soil surface from a Mariotte bottle and a constant flow was set by a peristaltic pump. Quantification of bacterial growth after detaching the bacteria from the sand grains was performed by the Bradford Protein assay. Observation of the biofilm was done using a confocal laser scanning microscope (CLSM), following staining with DTAF, an anionic dye with an affinity to both carbohydrates (polysaccharides) and proteins and the Live/Dead Bacterial Viability kit. The batch experiments showed that maximum bacterial growth, as determined with the protein assay, increased, with increasing water contents. This indicates that O₂ diffusion was not limited and that the major factor affecting bacterial maximum growth in the prescribed conditions was the nutrient supply. Few exceptions to this trend, were the higher growth obtained after 24 hours at a saturation degree of 80%, as compared to 100% at optimal nutrient concentrations of 1 x M63C and 2 x M63C, and perhaps also after 50 hours for the higher 4 x M63C nutrient concentration. Thus, at these conditions of high saturation degrees and sufficient nutrient supply, O₂ diffusion might have been limited. Nutrient concentrations below 1 x M63C to 2 x M63C are limiting the growth and the high, 4 x M63C concentration elongates the lag period and slows down the growth at early stages. At longer times, the maximal growth higher at the latter concentration, which indicates on an adaptation to the high osmotic pressure. Following osmotic adaptation, the bacterial growth at 4 x M63C was higher than in 2 x M63C or 1 x M63C, especially at the lower saturation degrees. Thus, it seems that high nutrient concentrations can, at least partially, compensate for low water content effects. Analysis was made using results of maximum bacterial growth as a function of the amount of nutrients. It was found that, under the prescribed closed-system conditions of the batch experiments the maximum microbial

population at the stationary stage was determined mainly by the amount of nutrients (product of water content and nutrient concentration) and for higher nutrient mass, also by the amount of available O₂. The specific growth rate increased with temperature, and had an optimum curve dependence on water-saturation degree. High solution concentrations also extended the initial lag period and impeded the specific growth rate. Since at each nutrient concentration, the food mass increases with the saturation degree, there was a need to distinguish between the two parameters. To do so, flow-through columns were used and the nutrient mass was determined by controlling both nutrient concentration and flow velocity. The flow-through column experiments yielded opposite results to those obtained in the batch experiments. Bacterial growth decreased with increased water contents. The highest bacterial growth was achieved at the top of the column where the water content was the lowest. Measurements of dissolved oxygen concentration indicated low oxygen concentrations after percolating the column. Microscopic observations of the unsaturated sand samples from the batch experiments demonstrate that in most circumstances only part of the sand particles were covered with bacteria, most of them are growing in discontinuous microcolonies and did not form mature biofilms. Microscopic observations of particles from the column experiments showed more developed biofilms, 5-15µm in some samples and almost full coverage of the grains in some cases. Using the Live/Dead staining we observed that in the developed biofilms most of the bacteria were dead and that live bacteria were usually found in monolayers or suspended in the liquid. In summary, under the prescribed conditions of the batch experiments nutrient supply was a more limiting growth factor than was O₂ diffusion. Therefore, the most important factor affecting bacterial growth was the amount of nutrients. In the flow-through experiments, decrease in water content increased bacterial growth, and therefore it is hypothesized that under these conditions O₂ diffusion seems to be the growth limiting factor.

**Effect of environmental factors on biofilm
formation by the bacterium *Pseudomonas
aeruginosa* in granular medium**

M.Sc. Thesis

**Submitted to the Faculty of Agriculture,
Food and Environmental Quality Sciences
The Hebrew University of Jerusalem**

By

Julia Rol

Rehovot, Israel

August, 2007

