

**ניטור של התפתחות ביופילם במצעים גרנולריים ע"י מדידת  
המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי**

עבודת גמר

מוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה על שם רוברט ה. סמית  
של האוניברסיטה העברית בירושלים

לשם קבלת תואר "מוסמך למדעי החקלאות"

על ידי

שני ינאי

העבודה נעשתה בהדרכת

ד"ר שמוליק פרידמן

המכון למדעי הקרקע, המים והסביבה, מרכז וולקני, בית דגן

פרופ' שלמה סלע

המכון לחקר אחסון ואיכות תוצרת חקלאית ומזון, מרכז וולקני, בית דגן

## תודות

לד"ר שמוליק פרידמן על הזכות להכיר, ללמוד, לעבוד ולהיות לצד אישיות יוצאת דופן

לפרופ' שלמה סלע על הנחיה, תמיכה מקצועית ואכפתיות

לריקי פינטו על עזרה מקצועית וסבלנות מעוררת השראה

לצוות המעבדה של פרופ' סלע על כל העזרה, העצות והתמיכה

למאיה שחר ועידו ניצן על העזרה הטכנית

לאדי בלאוסוב על העבודה במיקרוסקופ הקונפוקלי

תודה להוריי היקרים על התמיכה הנפשית והכלכלית לאורך כל הדרך

לאמיר אהובי, תודה על הכל

## תקציר

איטום ביולוגי ("bioclogging") נגרם כתוצאה מהיווצרות ביופילם, המורכב מחיידקים המוקפים במטריקס של פולימרים חוץ תאיים (EPS-Extracellular Polymeric Substances). ההקשר הסביבתי וההנדסי של היווצרות ביופילם ואיטום ביולוגי במצעים גרנולריים טבעיים או תעשייתיים נלמד בתחומים רבים כמו למשל, בארות שאיבה וטעינה, מילוי-חוזר של מי התהום, הגברת תהליך השיקום הביולוגי (bioremediation) של אקוויפרים מזוהמים, מחסומים ביולוגיים (bio-barriers) למניעת פיזור של זיהום תת קרקעי, ריאקטורים לפירוק מזהמים, השקיה עם מים מושבים וסינון מים. ההשפעה של ביופילם בקרקעות מתבטאת בפחיתה בנקבוביות ( $\phi$ ) ובמוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) של התווך הגרנולרי (נקבובי) בשיעור של בין אחוזים בודדים ועד ל-5 סדרי גודל. בכדי להעריך את השתנות תכונות ההולכה של הקרקע כתוצאה מהתפתחות ביופילם מבצעים מדידות חוזרות של המוליכות ההידראולית, בעיקר בסביבה הטבעית, אך לעיתים גם לאורכו ועומקו של פילטר גרנולרי. שיטת המדידה הינה מורכבת ויקרה. לכן, קיים צורך במציאת שיטה חדשה וחסכונית בכדי לבצע ניטור רציף של התפתחות ביופילם ואיטום התווך. המטרה המרכזית של מחקר זה, הייתה לפתח גישה חדשה לניטור של התפתחות ביופילם ואיטום ביולוגי על ידי ביצוע מדידות של המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) בתדירויות נמוכות (DC ל-1kHz) ושל המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) בתדירויות של GHz (100MHz-1GHz) בתווך הגרנולרי.

**ההיפותזה המרכזית** של מחקר זה היא כי על ידי מדידות של  $EC_a$  ו- $\epsilon_{eff}$ , ושימוש במודל מסוג "תיאוריות הערבוב הדיאלקטרי" (mean field theories) ניתן ליישם תחילה את הקשרים של ה- $\epsilon_{eff}$  ( $\phi$ ) וה- $EC_a$  ( $\phi$ ), להערכת עובי הביופילם, הפחיתה בנקבוביות והעלייה (בשלב הראשוני של תהליך האיטום) של שטח הפנים מוצק-נוזל. לאחר מכן, באמצעות המודל של Kosney-Carman, המתאר את הקשר  $K_s(\phi)$  ע"י הרדיוס ההידראולי ( $r_h$ ), ניתנת להערכה הפחיתה היחסית במוליכות ההידראולית - ( $K_s$ ). לבחינת ההיפותזה נערכו ניסויי איטום ביולוגי במערכות זרימה בעמודות חול רוויות במספר מצעים גרנולריים, הרכבים וריכוזים של תמיסות המזון וקצבי שטפים שונים. לרוב עם החיידק *Pseudomonas aeruginosa*. זהו חיידק רב-גוני, אירובי פקולטיבי, המסנתז ומפריש EPS בתגובה לשינויים בתנאי הסביבה. בניסויים בהם נאטם התווך הגרנולרי על ידי היווצרות ביופילם, פחתה המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ), בדרך כלל בסדר גודל אחד, בעוד שהפחיתה הממוצעת במוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a/EC_w$ ) נעה בטווח שבין 20% ל-40%. המקדם הדיאלקטרי המדוד לא השתנה באופן משמעותי לאורך רוב ניסויי האיטום הביולוגי. נמצא כי יחס C:N גבוה, יחד עם ריכוז נמוך של תמיסת המזון וגלוקוז כמקור פחמן הביאו לאיטום הביולוגי המשמעותי ביותר. אף על פי כן, רוב ניסויי האיטום הביולוגי נעשו עם תמיסת מזון M63+citrate. בתמיסה זו, שילוב של ריכוז נמוך של נוטריאנטים ושטף גבוה סיפק לחיידקים את התנאים האידיאלים לגדילה, התיישבות על גרגרי המצע ויצירת ביופילם. בשלב הבא של המחקר תוארה הפחיתה במוליכות ההידראולית מתוך המדידות שהתקבלו מניסויי הזרימה באמצעות שימוש במודלים תוך השוואה לתוצאות המדודות. באופן כללי, ניתן לומר שהמדידות של  $K_s$ - $EC_a$ - $\epsilon_{eff}$  יחד עם חישובי המודל מאפשרים חיזוי של הפחיתה במוליכות ההידראולית מהמדידות של

התכונות החשמליות. אך עדיין, השיטה המוצעת במחקר זה לוקה במספר חסרונות ומגבלות: החיסרון הגדול ביותר נובע מהרגישות הנמוכה של התכונות החשמליות לתהליך האיטום הביולוגי בהשוואה לזו של המוליכות ההידראולית, מה שמצריך דיוק גבוה יותר של המדידות החשמליות. שיטה זו ניתנת ליישום בעיקר עבור מצעים גרנולריים בהם התרומה של היונים הספוחים למוליכות החשמלית הספציפית היא זניחה ויותר אתגרית במצעים בהם התמיסה בעלת חוזק יוני נמוך. תהליכים כגון יצירת בועות כתוצאה מפעילות מיקרוביאלית והיווצרות של תנאים מחזרים בעמודה, משפיעים על הקשר  $K_s-EC_a-\epsilon_{eff}$ , ובמידה והם מתרחשים במקביל להתפתחות ביופילם, מקשים על חיזוי הפחיתה של  $K_s$  ממדידות ה-  $EC_a$  וה-  $\epsilon_{eff}$ . בשל הקושי ליצור מסה קריטית של ביופילם המספיקה ליצירת שינויים משמעותיים בתכונות החשמליות של התווך לאורך ניסויי הזרימה, הוחלט לנסות ולבחון את התכונות החשמליות של המצע הגרנולרי אליו הוספו חומרים דמויי EPS (סודיום אלגינט או קסנתן גאם) לצורך יצירה של ביופילם מלאכותי. מדידות של המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי והמוליכות החשמלית של הביופילם המלאכותי נערכו באריזה יבשה של האלגינט (/קסנתן) ובתערובת מים-אלגינט (/קסנתן) ביחס משתנה. ממדידות אלה ניתן היה למדל את התכונות החשמליות של מצע עם ביופילם עוטף גרגר חול כפונקציה של עובי הביופילם עבור קטרים שונים של גרגרי חול. על-פי הקשר הממודל של  $EC_a$ -עובי ביופילם,  $EC_a$  יכולה לפחות או לעלות עם התפתחות הביופילם, כתלות במוליכות החשמלית של תמיסת הרקע ( $EC_w$ ) ביחס לשכבת הביופילם ( $EC_b$ ). הקשר  $\epsilon_{eff}$ -עובי ביופילם מצביע על כך שהירידה הצפויה במקדם הדיאלקטרי האפקטיבי די מתונה, בעיקר במצעים גרנולריים בעלי מרקם גס ובביופילם עם ריכוז נמוך של EPS.

## רשימת קיצורים

### גדלים קבועים

$g$ - acceleration of gravity-  $9.8 \text{ m/sec}^2$

$c$ - light velocity-  $3 \times 10^8 \text{ m/s}$

$\rho_w$  -water density -  $1.0 \text{ gr/cm}^3$

$\epsilon_0$  - permittivity of vacuum -  $8.854 \times 10^{-12} \text{ F/m}$

$\epsilon_w$  - permittivity of water-  $78.5 (25^\circ\text{C})$

### סימונים וקיצורים

A- cross-sectional area ( $\text{cm}^2$ )

CFU- Colony Forming Units

CLSM-Confocal Laser Scanning Microscopy

CV- Crystal Violet

complex conductivity ( $\sigma^*$ ,  $\epsilon^*$ )

“real”-  $\sigma'$ ,  $\epsilon'$  / “imaginary” –  $\sigma''$ ,  $\epsilon''$

$d_w$ -water film thickness on the surface of an inclusion

$\rho_b$ - bulk density ( $\text{gr/cm}^3$ )

$\rho_s$ - partical density ( $\text{gr/cm}^3$ )

$d_p$ - particle diameter [m]

DTAF- 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein

EC-Electrical Conductivity (S/m)

$EC_a$  ( $\sigma_a$ )- apparent Electrical Conductivity (S/m)

$EC_r$ -relative Electrical Conductivity

$EC_w$ ( $\sigma_w$ )-electrical conductivity of the soil solution (S/m)

f-frequency (1/sec)

fs- fresh solution

$f_s$ - volumetric fraction of solid phase

HSL- homoserine lactone

$r_h$ - hydraulic radius

IP- induced polarization

$K_S$ - hydraulic conductivity (m/sec)

$k_s$ - hydraulic permeability ( $\text{m}^2$ )

$K_{sr}$ - relative hydraulic conductivity

$\nabla H$ - hydraulic head gradient

KC-Kozney-Carman  
LB-Luria Bertani broth  
LPS- Lipopolysaccharides  
MG-Maxwell-Garnett  
NO-Nitric Oxide  
n.s.s - non sterile solution  
 $N^i$ -Depolarization factor ( $i = a, b, c$ )  
O.D- Optical Density  
 $\emptyset$ - porosity ( $m^3/m^3$ )  
 $\emptyset_0$ -clean porosity ( $m^3/m^3$ )  
 $\epsilon$ -permittivity, dielectric constant  
 $\epsilon_s$ - solid permittivity  
 $\epsilon_0$ - permittivity of background phase  
 $\epsilon_i$ - permittivity of inclusion phase  
 $\epsilon_{eff}$  -effective permittivity  
PI-Propidium Iodide  
Q- discharge ( $m^3/sec$ )  
q- flux ( $m/sec$ )  
QS -Quorum Sensing  
 $S_A$ - surface area of a spheroid ( $m^2$ )  
SA- Sodium Alginate  
sb-solid-biofilm phase  
sbw- solid-biofilm-water medium  
 $s_r$ -shape factor  
SYTO9-green fluorescent nucleic acid stain  
TDR- time domain reflectometry  
T- tortuosity factor  
 $\mu$ - dynamic viscosity ( $g/(cm s)$ )  
 $V_S$ - Volume of Spheroid ( $m^3$ )  
XG- Xanthan gum

## תוכן עניינים

v - v	תקציר
v-v	רשימת קיצורים

### 1 מבוא

1	1.1	ספיחה של חיידקים בתווך גרנולרי
1-3	1.2	התפתחות ביופילם בקרקע
3	1.3	חומרי EPS סינתטיים- אלגינט וקסנתן
4-6	1.4	הקשר בין התכונות החשמליות לתכונות ההידראוליות
6-8	1.5	איטום ביולוגי של מצע גרנולרי
8-9	1.6	הקשר בין איטום ביולוגי לשינוי בתכונות החשמליות
10	1.7	השערת המחקר
10	1.8	מטרת המחקר
10	1.8.1	מטרות משנה

### 2 חומרים ושיטות

11	2.1	חיידקים
11-12	2.2	תמיסת מזון
12-13	2.3	תווך גרנולרי
13	2.4	כימות הביופילם
14	2.4.1	בדיקת ביופילם בפלטות ELISA
14	2.4.2	ספירה חיה
14	2.4.3	קביעת המסה הבקטריאלית באמצעות BRADFORD PROTEIN ASSAY
14	2.4.4	מיקרוסקופיה קונפוקלית
15-16	2.5	ניסויי איטום ביולוגי במערכות זרימה
16	2.6	חומרי EPS במערכת זרימה
16-17	2.7	מכשירי מדידה
17-20	2.8	מודלים של פרמיטיביות דיאלקטרית מוליכות חשמלית ומוליכות הידראולית
17-19	2.8.1	פרמיטיביות אפקטיבית
19-20	2.8.2	מוליכות חשמלית אפקטיבית



20.....	מוליכות הידראולית	2.8.3
	<b>תוצאות ניסויי זרימה- איטום ביולוגי</b>	<b>3</b>
21-38.....	תוצאות	3.1
39-40.....	דיון ומסקנות	3.2
	<b>הערכת הפחיתה במוליכות ההידראולית של התווך כתוצאה מיצירת ביופילם</b>	<b>4</b>
41-46.....	שימוש במודל של KOZNEY-CARMAN	4.1
46-48.....	השוואה מול מודלים נוספים	4.2
	<b>תכונות חשמליות של רכיבי EPS</b>	<b>5</b>
49-50.....	מדידות של הפרמיטיביות האפקטיבית מים-EPS	5.1
51-53.....	מידול של הפרמיטיביות האפקטיבית של המצע כתוצאה מיצירת מביופילם	5.2
53.....	מדידות של המוליכות החשמלית של תערובת מים-EPS	5.3
54-55.....	מידול של המוליכות החשמלית הספציפית של המצע כתוצאה מיצירת מביופילם	5.4
	מדידה ומידול של הפרמיטיביות האפקטיבית והמוליכות החשמלית של תערובת מים-EPS	5.5
55-56.....	שטופה ממלחים	
	מדידה ומידול של הפרמיטיביות האפקטיבית והמוליכות החשמלית של תערובת מים-EPS	5.6
57-61.....	שטופה ממלחים במערכת זרימה	
61-62.....	דיון ומסקנות	5.7
63-65.....	<b>סיכום ומסקנות</b>	<b>6</b>
66-71.....	<b>רשימת ספרות</b>	<b>7</b>

## 1.1 ספיחה של חיידקים בתווך הגרנולרי

יצירה של ביופילם על גרגרי המצע היא תוצאה של אינטראקציות מורכבות בין תהליכים פיזיקאליים, כימיים וביולוגיים. הסעת החיידקים על ידי המים הנעים בנקבובי התווך נקבעת על ידי מנגנון הזרימה של המים בנקבובים ועל ידי האינטראקציה ההידרודינמית שבין החיידקים הנעים ובין גרגרי המצע הניחים. תנועת החיידקים מושפעת גם מכוחות הכבידה ומכוחות חשמליים (Friedman, 1999). בתווך גרנולרי, ישנם חיידקים פלנקטוניים, המרחפים בתמיסה וחיידקים ספוחים למצע. בתנאי סביבה מתאימים, יגדלו ויתרבו החיידקים הספוחים על גבי הפאזה המוצקה ותעלה כמות הביומסה הקשורה למשטח (Cunningham et al., 1991). בין גרגרי המצע לחיידקים פועלים בעיקר כוחות אלקטרוסטטיים וכוחות ואן-דר-ואלס, המעודדים היצמדות בין שטח פני החיידק לבין המשטח (Friedman, 1999). תהליך ההצמדות של החיידקים תלוי במידה רבה בתכונות המשטח המוצק. משטחים מחוספסים מהווים מוקד מועדף עבור החיידקים להיצמדות והתיישבות בשל שטח הפנים הגדול, המספק יותר אתרי ספיחה, בנוסף להגנה יחסית ממאמצי גזירה (Characklis et al., 1990). כמו כן, קוטר הגרגרים משפיע על כמות החיידקים הנצמדים משיקולי שטח פנים, הפועלים לטובת גרגרים קטנים יותר (Or et al., 2007). ראיות ניסיוניות שנצברו מראות כי היצמדות חיידקים למשטח מאוד תלויה בהידרופוביות-הידרופיליות של החיידק ועליה בהידרופוביות של פני שטח התא יכולה להקל על ההתקרבות למשטח (בין אם המשטח הידרופובי או הידרופילי) באמצעות הכוחות הספציפיים האחראים על היצמדות בלתי הפיכה (Liu et al., 2004). יחד עם זאת במחקר אחר, הוכח שבחיידקים גרם שליליים הידבקות החיידק למשטח מתווכת ותלויה בהרכב ה-LPS (Lipopolysaccharides) של הזן. למשל, לרוב חיידקי ה-*Pseudomonas aeruginosa* שני סוגים של LPS, האחד הידרופילי יותר ונקרא B-band והשני הידרופובי יחסית ונקרא A-band. נמצא שזנים בהם B-band דומיננטי יותר תהיה העדפה להיצמדות למשטחים הידרופיליים על פני המשטחים ההידרופוביים (Makin and Beveridge, 1996). לתכונות המצע הנוזלי, כמו למשל, pH, חוזק יוני, טמפרטורה, סוג, ריכוז ובעיקר ערכיות האלקטרוליט השפעה על יכולת ההיצמדות של החיידק למשטח. ריכוז האלקטרוליט משפיע באופן ישיר על האינטראקציות האלקטרוסטטיות וסוג האלקטרוליט משפיע גם באופן עקיף. למשל, סידן ומגנזיום, שהם קטיונים תאיים חשובים וקו-פקטורים לריאקציות אנזימטיות, משפיעים גם על הפיזיולוגיה של החיידק (Fletcher, 1988).

## 1.2 התפתחות ביופילם בקרקע

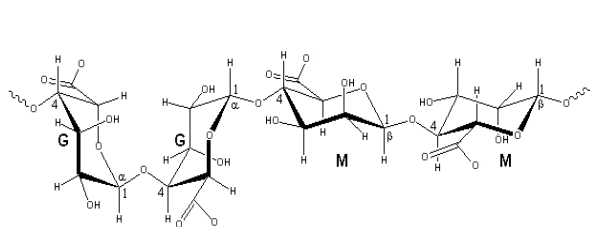
מצע גרנולרי רווי, מוגדר כתווך בו כל הנקבובים מלאים במים. שכבת המגע מוצק-נוזל יוצרת סביבה אידיאלית להיצמדות וגדילה של מיקרואורגניזמים (Donlan, 2002). התרבות של חיידקים בשטחים הפתוחים יוצרת מושבות קטנות המכונות "microcolonies". חיידקי ה-"microcolonies" ממשיכים להתרבות ומפרישים כמות גדולה של פולימרים חוץ תאיים (Extracellular Polymeric Substances) (EPS- היוצרים מטריקס רירי דביק. יחד עם חלקיקים אורגניים ואנאורגניים ממקור סביבתי, מתאפשרת הידבקות של החיידקים ויצירת ביופילם מפותח (Cunningham et al., 1991; Taylor and Jaffé, 1990a). החיידקים מסוגלים לבצע בקרה על ביטוי הגנים שלהם בהתאם לצפיפותם היחסית בסביבה בתהליך הקרוי-"Quorum Sensing" (QS). תהליך ה-QS מתווך ע"י הפרשת מולקולות סיגנל (autoinducer)

לסביבה וחישה של ריכוז הסיגנל. ידועים מספר מערכות QS. לדוגמא, חיידקים גרם-שליליים מייצרים ומפרישים (HSL) homoserine lactone, כמולקולת סיגנל, אשר ריכוזה עולה עם העלייה בצפיפות האוכלוסייה (Miller and Bassler, 2001). ה-EPS מורכב מפוליסכרידים, חלבונים, חומצות גרעין, חומצה אורנית (Uronic acid) ופוספוליפידים ובשל תכונותיו ההיגרוסקופיות מסוגל לספוח כמויות גדולות של מים, עד 97% מהמטריקס מכיל מים (Sutherland, 2001). החלבונים החוץ תאיים תורמים לתכונות ההידרופוביות של המטריקס (Gilbert et al., 2002). כמות ה-EPS הרכבו ותכונותיו עשויים להשתנות כתוצאה מהשפעות סביבתיות ובהתאם לחיידק (Ahimou et al., 2007). במקרה של חיידקים גרם-שליליים, נוכחות של חומצה אורנית (Uronic acid) ופירובט מעניקות אופי אניוני לביופילם. תכונות אלו חשובות מכיוון שהן מאפשרות קישור לקטיונים דו-ערכיים, כמו סידן ומגנזיום ויצירת "cross-linking" עם פולימרים המעניקים חוזק מכאני לביופילם המפותח (Donlan, 2002). ה-EPS מקנה לביופילם אופי ג'לי ותצורה תלת ממדית המתפשטת במרחב מעובי שנע בין מיקרומטרים בודדים למאות מיקרומטרים (Taylor and Jaffé, 1990c). בזכות המבנה הייחודי של הביופילם, החיידקים בתוך המבנה נמצאים, במידה מסוימת, במצב של איזון (הומיאוסטזיס) המשפר את כושר הישרדותם באמצעות קשרים קואופרטיביים ודרכים יעילות לחילוף נוטריינטים ומטבוליזם (Taylor and Jaffé, 1990c; Costerton et al., 1995). מחקרים רבים מראים את השפעת התנאים הסביבתיים על חוזק ומבנה הביופילם. אחד מחיידקי המודל המקובלים ביותר במחקרי ביופילים הוא החיידק הגרם-שלילי *Pseudomonas aeruginosa*. חיידק זה שוחה בנוזל באמצעות שוטון ונע על פני השטח באמצעות שעריות מסוג type IV pili (Klausen et al., 2003). *P. aeruginosa* הינו חיידק רב-גוני, אירובי פקולטטיבי, בעל יכולת הסתגלות לטווח רחב של סביבות חיים. החיידק מצוי בקרקע ובסביבה מימית, אך יכול גם להתיישב ולגרום לזיהומים אופורטוניסטיים אצל יונקים וצמחים (Franklin et al., 2011). Yoon et al. (2002) מצאו שביופילם של החיידק *P. aeruginosa* גדול פי שלושה בתנאים אנאירוביים (יותר חיידקים) מאשר בתנאים אירוביים. בתנאים אירוביים נצפו מושבות קטנות, "microcolonies", לעומת ביופילים עבה ודחוס שנוצר בתנאים אנאירוביים. בכדי שהחיידק *P. aeruginosa* יגדל באופן יעיל תחת תנאים אנאירוביים הוא זקוק לחלבונים/אנזימים (כמו למשל, החלבון OprF) המאפשרים לו להשתמש ב- $\text{NO}_2^-$  וב- $\text{NO}_3^-$  כמקבלי אלקטרונים סופיים וקשורים בייצוב מבנה התא, אקטיבציה וכושר גידול של החיידק. יחד עם זאת, חלק מחלבונים אלו מעורבים בוויסות מערכת ה-QS והרחקה של NO (Nitric oxide). מחקרים אחרים מראים את הקשר בין מבנה הביופילם למקור הפחמן (Kalusen., et al 2003). מצאו שכאשר ניתן לחיידקי *P. aeruginosa* ציטראט, כמקור פחמן, הם יצרו ביופילם שטוח לעומת זאת, עם גלוקוז (באותו ריכוז) כמקור פחמן הם יצרו מבנה-פטרייה-רב תאי-לא אחיד. במחקרים רבים נמצא גלוקוז כסובסטרט מועדף על פני מקורות פחמן אחרים לייצור הפרשות EPS, ועל כן נעשה בו שימוש בניסויים שונים הבוחנים את השפעת התפתחות ביופילם על הקרקע (Applegate and Bryers, 1991; Cuningham et al., 1991; Vandevivere and Baveye, 1992ab; Seki et al., 1996). רול (2007), לעומת זאת, הראתה בניסויי זרימה שדווקא ציטראט, מעודד יצירת ביופילם אצל החיידק *P. aeruginosa*. מעבר להשפעה של מקור הפחמן על התפתחות ביופילם, נודעת חשיבות רבה גם ליחס C:N בתמיסת המזון. באופן כללי, במצע המכיל יחס C:N גבוה יוגבר תהליך ייצור של פוליסכרידים על

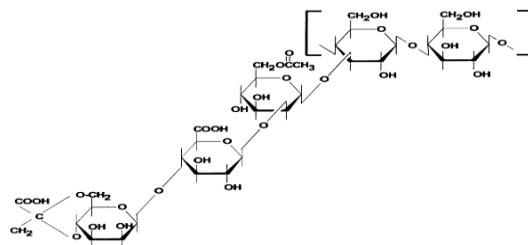
ידי התאמת המטבוליזם של תא חיידק לכיוון של יצירת EPS (Miqueleto et al., 2009, Vandevivere) Rittman (and Baveye, 1992ab, Trulear and Characklis, 1982) קבע שהגורם החשוב ביותר להתפתחות ביומאסה מיקרוביאלית במעבר ממושבות בודדות לביופילם רציף הינו קצב אספקת הסובסטרט. תהליכי הצטברות, התפתחות ובלייה של ביופילם הינם דינמיים ותלויים בסוג החיידק, במצב הפיזיולוגי שלו ובפרמטרים סביבתיים כמו סוג הקרקע, טמפרטורה, פוטנציאל חמצון-חיזור, חומרי הזנה, ריכוז חמצן וגורמים הידרודינמיים (Nevo and Mitchell, 1967; Applegate and Bryers, 1991; Peyton, 1995; Baveye et al., 1998; Donlan, 2002).

### 1.3 חומרי EPS סינתטיים- אלגינט וקסנתן

אחת האסטרטגיות המשפרות את כושר ההתאמה של החיידק *P. aeruginosa* לסביבתו היא היכולת ליצור סביב עצמו מעטפת צמיגה, המכילה בעיקר הפרשות של פולימרים חוץ תאיים- EPS. מבחינה גנטית מסוגל *P. aeruginosa* ליצור ולהפריש לפחות שלושה סוגים של פוליסכרידים: אלגינט (alginate), PA (Psl), ו- Pel (2331-2245) ו- (PA 3058-3064) (Franklin et al., 2011). כיוון שזנים המייצרים אלגינט מעורבים במקרים רבים בדלקת ריאות כרונית, מסלולי הביוסניטזה שלו הם מהמאופיינים ביותר ועיקר המחקר של הפרשות EPS בחיידק *P. aeruginosa* מתמקד באלגינט (O'Toole et al., 2000; Franklin et al., 2011). האלגינט הוא פוליסכריד אניוני חומצי המורכב מיחידות של L-guluronic acid (G) ו- (M) D-mannuronic acid (איור 1.1), מסודרים במבנה של בלוקים לאורך השרשרת. היחס, הסידור המבני של היחידות ואורך השרשרת אינו קבוע ועל פיו יקבעו התכונות הכימיות והפיזיקאליות של מולקולת האלגינט. משקלו המולקולארי הגבוה מעניק למטריקס תכונות ריריות (Franklin et al., 2011). בצורתו המסחרית הוא מוכר כסודיום אלגינט. הנוסחה הכימית של סודיום אלגינט (אלגינט הנתרן) היא:  $\text{NaC}_6\text{H}_7\text{O}_6$  והוא מופק מדופן התא של אצת ים חומה (*Phaeophyceae*). פוליסכריד נוסף המשמש במחקרים רבים כאנלוג ל-EPS הוא קסנתן (*xanthan gum*) והוא מופרש מחיידק הקרקע *Xanthomonas campestris* (Rosenzweig et al., 2011). הקסנתן הינו הטרופוליסכריד אניוני, עם מבנה ראשוני המורכב מ- 5 יחידות מבנה: 2 יחידות גלוקוז, 2 יחידות מנוז ויחידה של glucuronic acid (איור 1.2) וביחסים משתנים של קבוצות O-acetyl ו- pyruvyl, המעניקות למולקולה אופי אניוני (García-Ochoa et al., 2000).



**איור 1.1** מבנה אפשרי של הפולימר אלגינט. מורכב מ:  $\alpha(1,4)$ -  $\beta(1,4)$ -D-mannuronic acid (M) ו- L-guluronic acid (G)



**איור 1.2** יחידת הבסיס המולקולארית של קסנתן. יחידת הבסיס מורכבת משלד של: poly- $[\beta(1,4)$ -D-glucose] המחובר בקשר  $\alpha(1,3)$  לשרשרת צידית המכילה שלושה סוכרים:  $[\beta$ -D-mannose-(1,4)-D-glucuronic acid-(1,2)-D-mannose]. לרוב על קבוצת המנוז הפנימית יושבת קבוצת O-6-acetyl ועל קבוצת המנוז החיצונית בעמדות 4 ו- 6 ממוקמת בקשר ציקלי קבוצת pyruvyl.

#### 1.4 הקשר בין התכונות החשמליות לתכונות ההידראוליות של מצעים גרנולריים:

המוליכות החשמלית (הספציפית) הנדמית (האפקטיבית) של התווך  $EC_a, (\sigma_a)$   $[Q^2 T/M L^3, Sm^{-1}]$  היא היחס בין צפיפות הזרם החשמלי  $(J)$   $[Q/TL^2]$  לעוצמת השדה החשמלי  $(E)$   $[ML/QT^2]$ :

$$J = \sigma E \quad \text{משוואה 1.1}$$

המוליכות החשמלית מתארת את היכולת של החומר להוליך זרם חשמלי.

פרמיטיביות דיאלקטרית,  $\epsilon$  (Dielectric permittivity)  $[Q^2 T^2/ML^3]$  היא היחס בין הסת השדה החשמלי  $(D)$   $[QL^2]$  לעוצמת השדה החשמלי  $(E)$   $[ML/QT^2]$ :

$$D = \epsilon E \quad \text{משוואה 1.2}$$

הפרמיטיביות מתארת את יכולות הקיטוב של התווך.

יכולת הקיבול וההולכה של הקרקע מיוצגות על ידי מוליכות ופרמיטיביות מרוכבות:

$$i = \sqrt{-1}, \quad \sigma^* = i2\pi f \epsilon^* \quad \text{משוואה 1.3}$$

$\sigma^*$  או  $\epsilon^*$  מייצגים מוליכות ופרמיטיביות מרוכבות, בהתאמה. ו-  $f$  מייצג את התדירות (1/s),

כאשר המוליכות החשמלית המרוכבת מבוטאת באמצעות הרכיב הממשי  $(\sigma')$  והרכיב המדומה  $(\sigma'')$ :

$$\sigma^* = \sigma' + i\sigma'' \quad \text{משוואה 1.4}$$

הפרמיטיביות המרוכבת בדרך כלל מבוטאת באמצעות שני רכיבי פרמיטיביות חיוביים. כאשר הרכיב הממשי  $(\epsilon')$  מתאר את האנרגיה החשמלית שנאגרת בתווך והחלק המדומה  $(\epsilon'')$  מתאר את האנרגיה החשמלית שאובדת.

$$\epsilon^* = \epsilon' - i\epsilon'' \quad \text{משוואה 1.5}$$

המקדם הדיאלקטרי, הנקרא גם כפרמיטיביות יחסית  $(\epsilon_r)$ , הוא היחס בין הפרמיטיביות הממשית של החומר  $(\epsilon')$  לפרמיטיביות בוואקום  $(\epsilon_0)$   $8.854 \cdot 10^{-12} F/m$ , והוא מתכונתי לרכיב המדומה של המוליכות החשמלית המרוכבת:

$$\epsilon_r = \frac{\epsilon'}{\epsilon_0} = \frac{\sigma''}{2\pi f \epsilon_0} \quad \text{משוואה 1.6}$$

**המקדם הדיאלקטרי** אליו נתייחס בעבודה הינו המקדם הדיאלקטרי ה"ממשי" בטווח תדירות של 100MHz- 1GHz. בטווח זה, ניתן להתייחס למקדם הדיאלקטרי של מים כ"סטטי", כיוון שתדירויות אלו הן מתחת לתדירות הרלקסציה של מולקולות המים. המקור של הפרמיטיביות הוא בחלוקת המטען השונה על המימנים והחמצן במולקולת מים הגורמת ליצירת דיפול קבוע של  $6.126 \cdot 10^{-30} C m$ . כאשר מופעל שדה חשמלי, מולקולת המים "מסוגלות" להתגבר על התנועה התרמית האקראית ולהסתכרן עם כיוון השדה. כתוצאה מכך, נאגרת אנרגיה חשמלית, המתוארת על ידי הרכיב הממשי  $(\epsilon')$  של הפרמיטיביות (Robinson et al., 2003). הפרמיטיביות של תווך נקבובי תלויה בפרמיטיביות האינטרינזית של שלוש פאזות: מוצקה, גזית ונוזלית (מים חופשיים ומים בתאחיזה לחלקיקים). הפרמיטיביות היחסית של אוויר  $(\epsilon_a)$  היא 1, כאשר למינרלים של כדור הארץ ערכים שונים של פרמיטיביות יחסית  $(\epsilon_s)$  בין 4-8 ולמים פרמיטיביות יחסית  $(\epsilon_w)$  של 78.5 ב-  $25^\circ C$ , הגבוהה בהרבה מזו של שתי הפאזות האחרות (Robinson and Friedman, 2003; Robinson et al., 2003). הגורמים העיקריים הקובעים את הפרמיטיביות האפקטיבית של הקרקע הם: נקבוביות, תכולת

מים נפחית, צורת החלקיקים וסידורם במרחב, פילוג גודל החלקיקים, מינירולוגיה וטמפרטורה (Friedman, 2011).

**המוליכות החשמלית האפקטיבית ( $\sigma_a$  או  $EC_a$ )** של הקרקע תועדה במחקרים החל מהמאה ה-19. התלות של  $\sigma_a$  בנקבוביות מתוארת בד"כ על ידי גיאופיסקאים באמצעות החוק האמפירי של Archie לקרקעות רוויות (Archie, 1942):

$$\frac{\sigma_a}{\sigma_w} = \phi^m \quad \text{משוואה 1.7}$$

כאשר  $\sigma_w$  היא המוליכות החשמלית של התמיסה ( $\text{dS/m}$ ),  $\phi$  מייצגת את הנקבוביות של הקרקע ( $\text{m}^3/\text{m}^3$ ), והפרמטר  $m$  הינו מקדם אמפירי המתאר את מבנה הקרקע או הסלע וקרוי מעריך מילוט ("cementation exponent") (Archie, 1942). המוליכות החשמלית (האפקטיבית),  $EC_a(\sigma_a)$ , הנמדדת בטווח תדירות בין DC ל-1kHz, נחשבת למוליכות סטטית ("quasi-static"). בדרך כלל, מודדים את  $EC_a$  (בשדה) בטווח תדירות בין 100Hz ל-1kHz. נהוג להתייחס לתדירות של 100 Hz כגבול התחתון, משום שמתחת לערך זה הקריאות של המוליכות מושפעת מהפרעות של פולריזציה בקרבת האלקטרודה. בתדירויות גבוהות (מעל מספר kHz)  $\sigma_a$  כבר לא קבועה, ובנוסף המדידה בתדירויות גבוהות יקרה יותר (Friedman, 2005). ישנם שלושה מסלולי הולכה של הזרם חשמלי המיוחסים ל- $\sigma_a$  בקרקע: (1) הולכה בפאזה נוזלית: דרך האלקטרוליטיים המומסים בתמיסת הקרקע, (2) הולכה על פני הפאזה המוצקה: דרך חלקיקי הקרקע הצמודים אחד לשני. הקשורה בעיקר, לקטיונים חליפיים הספוחים למינרלי החרסית ולחומר האורגני, (3) הולכה בין שתי השכבות מוצק-נוזל לסירוגין (Rhoades et al., 1989; Corwin and Lesch, 2005). שלושת מסלולי ההולכה קובעים את ההשפעה של תכונות הקרקע, חלקיקי הקרקע ותמיסת הקרקע על המוליכות החשמלית. המוליכות החשמלית (של תמיסות) עולה בשיעור של 1.9% למעלה צלזיוס (Corwin and Lesch, 2005). המוליכות החשמלית האפקטיבית ( $EC_a$ ) והמקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) תלויים במוליכות החשמלית והפרמיטיביות של **מכלול** הפאזות במדיום והתצורות שלהם (Friedman, 1998, 2005; Sihvola, 1999). אחת השיטות השכיחות למדידת פרמיטיביות של קרקע היא באמצעות Time Domain Reflectometry (TDR) (Topp et al., 1980; Robinson et al., 2003). ה-TDR מודד את מהירות התקדמות גלים אלקטרומגנטיים בטווח תדרים בין 20kHz ל-1.5GHz. המהירות של גל אלקטרומגנטי,  $v$  נקבעת מדיעת אורך המחוש ("probe") ומדידת זמן המעבר הלוך וחזור דרכו (משוואה 1.8) (בתווך שאינו פרומגנטי) ומתכונתית להופכי של השורש של המקדם הדיאלקטרי (משוואה 1.9):

$$v = \frac{2L}{t} \quad \text{משוואה 1.8} \quad v = \frac{c}{\sqrt{\epsilon_{ra}}} \quad \text{משוואה 1.9}$$

כאשר  $L$  - אורך המחוש (m),  $t$  - זמן (s),  $c$  - מהירות האור בריק ( $3 \times 10^8 \text{m/s}$ ) ו- $\epsilon_{ra}$  - מקדם דיאלקטרי נדמה הנמדד ב-TDR.

משילוב של שתי המשוואות ניתן לחשב את הפרמיטיביות מתוך מדידת זמן מעבר הגל במחוש באורך ידוע:

$$\varepsilon_{ra} = \left(\frac{tc}{2L}\right)^2 \quad \text{משוואה 1.10}$$

המוליכות החשמלית נקבעת מדעיכת המשרעת של הגל החוזר (Robinson et al., 2003).  
**המוליכות ההידראולית**,  $K_s$  [L/T] מוגדרת על פי חוק דארסי כיחס בין השטף,  $q$  [L/T] לגרדיאנט העומד ההידראולי,  $\nabla H$  [L/L]:

$$q = -K_s \nabla H \quad \text{משוואה 1.11}$$

המוליכות ההידראולית נקבעת על פי תכונות הנוזל: צפיפות ( $\rho$ ) [M/L<sup>3</sup>], צמיגות דינאמית ( $\mu$ ) [N/LT], וקבוע הגרביטציה ( $g$ ) [L/T<sup>2</sup>] ועל פי תכונות התווך- חדירות (פרמיאביליות) הידראולית ( $k_s$ ) [L<sup>2</sup>], (שנקבעת על יד פילוג גודל החלקיקים, צורתם והנקבוביות):

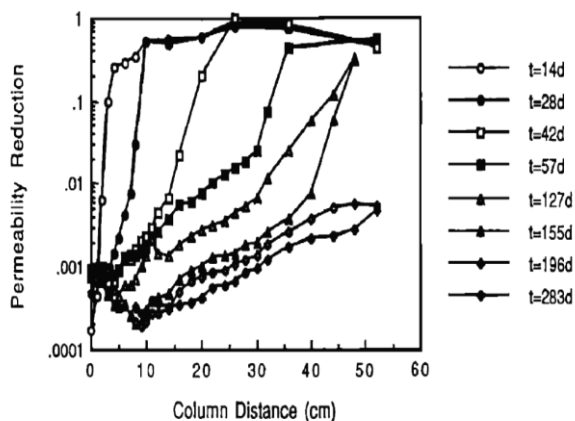
$$K_s = \frac{k_s \rho g}{\mu} \quad \text{משוואה 1.12}$$

היחס  $EC_a/EC_w$  תלוי בנקבוביות ובפיתוליות המצע, אשר משפיעים גם על החדירות ההידראולית ( $k_s$ ) שלו (Friedman and Seaton, 1998). המוליכות החשמלית והמוליכות ההידראולית מבטאות מנגנוני העברה שונים בתווך הנקבובי כתלות ברדיוס החלקיק או הנקבוב, כאשר ההולכה החשמלית מתכונתית לרדיוס הנקבוב במעלה שנייה ( $r^2$ ) בעוד שההולכה ההידראולית מתכונתית לרדיוס הנקבוב במעלה רביעית ( $r^4$ ) (Friedman and Seaton, 1998). הקשר בין שתי תכונות ההולכה נחקר בעיקר בתחומי הקרקע והסלע (Katz and Thompson, 1986; Mualem and Friedman, 1991; Bernabe, 1995).

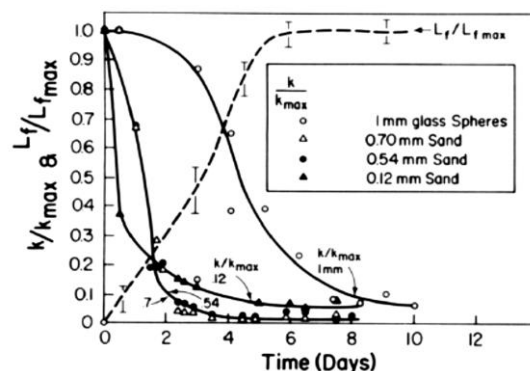
### 1.5 איטום ביולוגי של תווך גרנולרי- "bioclogging"

הצטברות של ביומסה מיקרוביאלית בתווך נקבובי עשויה להוביל לפחיתה בנקבוביות ובמוליכות ההידראולית של התווך. תופעה זו נקראת- "*bioclogging*" (איטום ביולוגי) (Thullner, 2010). איטום ביולוגי של מצעים גרנולריים על ידי חיידקים דווח לראשונה ב- 1905 על ידי Slichter. ההשפעה של התפתחות ביופילם במצעים גרנולריים ואיטום ביולוגי היא לא בהכרח שלילית. באופן כללי, נוכחות אוכלוסיות חיידקים בתווך נקבובי מאפשרת שיפור משמעותי בביצוע של תהליכים סביבתיים ותעשייתיים (Cunningham et al., 1991) הגברת תהליך השיקום הביולוגי (bioremediation) של אקוויפרים מזהמים (Baveye and Valocchi, 1989; Vandevivere et al., 1995), מחסומים ביולוגיים (bio-barriers) לפירוק של מזהמים (Kim, 2004), ביו-ריאקטורים בתהליך טיפול במי-שפכים (Iliuta and Larachi, 2004) וטיפול בשמנים ודלקים בתעשיית הנפט (Gessey et al., 1987). אולם יחד עם זאת, גידול מואץ ולא מבוקר של מיקרואורגניזמים המביא לאיטום של התווך הנקבובי יכול לגרום להצפות על פני השטח וחשיפה של מזהמים לבני אדם (Soleimani et al., 2009 Okubo and Matsumoto, 1979, 1983; Bouwer, 2002). כתוצאה מההשלכות הבריאותיות, הסביבתיות והכלכליות של תופעה זו, נעשו ונעשות עבודות רבות בנושא האיטום הביולוגי. אחת הדרכים להבנת תהליך איטום מצע גרנולרי כתוצאה מהתפתחות ביופילם בתווך נקבובי היא באמצעות ניסויי זרימה בעמודות המכילות מצע גרנולרי בתנאים שונים (Allison, 1947; Avnimelech and Nevo, 1964; Nevo and Mitchell, 1967, Okubo and Matsumoto, 1979, 1983; Geesey et al., 1987; Lappin-Scott et al., 1988; Taylor and Jaffé, 1990a; Cunningham et al., 1991; Vandevivere and Baveye, 1992abc; Lappan and Fogler,

1994,1996; Sanchez de Lozada et al., 1994; Seki et al., 1998; Rinck- Pfeiffer et al., 2000; Bielefeldt et al., 2002ab). במחקרים אלו נלמד תחום האיטום הביולוגי תחת אילוצים שונים כגון: תנאי הזרימה, תמיסת המזון, התווך הגרנולרי, גודל הגרגר ועוד. נמצא שאיטום ביולוגי יכול להתרחש על פני מגוון רחב של תנאי גידול. ברם, בשל השונות בין המחקרים קיים קושי להשוות בין תוצאותיהם (Thullner, 2010). יחד עם זאת, תוצאות של מחקרים רבים שנעשו בתנאי רוויה, בעמודות עם מצע של חול או כדורי זכוכית, הראו שהצטברות ביומאסה של חיידקים יכולה להוביל לפחיתה במוליכות ההידראולית הרוויה ב- 2 עד 3 סדרי גודל, בין אם מקור המזרע ההתחלתי היה ממתקן טיפול במי שפכים (Okubo and Matsumoto, 1979; Taylor and Jaffé, 1990a; Seifert and Engesgaard., 2007 שליליים) שבודדו מדוגמאות קידוח מאקוויפר (Vandevivere and Baveye, 1992abc), או מתרבית נקייה של החיידק *P. aeruginosa* (Cunningham et al., 1991). על אף שקיימת הסכמה, בין המחקרים השונים, בנוגע לקביעה הבסיסית כי הצטברות של ביומאסה מיקרוביאלית מובילה לפחיתה במוליכות ההידראולית ולאיטום המצע, קיים עדיין ויכוח בספרות בנוגע לאפיון התהליך. ישנן שתי גישות עיקריות המנסות לתת הסבר ותיאור מנגנוני לתופעה. המודל הראשון, המועדף על ידי Taylor et al, (1990abc) ו-Taylor and Jaffé (1990), נקרא מודל הביופילם. מודל זה מניח שהביופילם עוטף את חלקיקי הקרקע באופן אחיד ורציף. הצטברות ביופילם גורמת לפחיתה בגודל הנקבובים ובנקבוביות כיוון ששכבת הביופילם אינה חדירה וזרם המים לא עובר דרכה. הערכת ההשפעה של הפחיתה בנקבוביות על החדירות נעשית בעזרת מודל הפרמיאביליות (חדירות) של Kozeny–Carman למשל, Taylor et al., 1990; Cunningham et al., 1991) או ע"י מודל cut-and-rejoined-type (Taylor et al., 1990; Cunningham et al., 1991) and Jaffé., 1990c). הצליחו להראות באמצעות ניסוי עמודה עם חול בקוטר גרגר ממוצע של 0.7 mm, ירידה בחדירות ב-3 סדרי גודל לאחר שבועיים מתחילת הניסוי (איור 1.3). Cunningham et al (1991) בניסויי עמודות עם חול בקוטר גרגר בין 0.7-0.12 mm וכדורי זכוכית בקוטר 1 mm הראו פחיתה נמוכה של 65-95% בלבד בחדירות עם הזמן, ובהתאמה להתעבות הביופילם (איור 1.4).



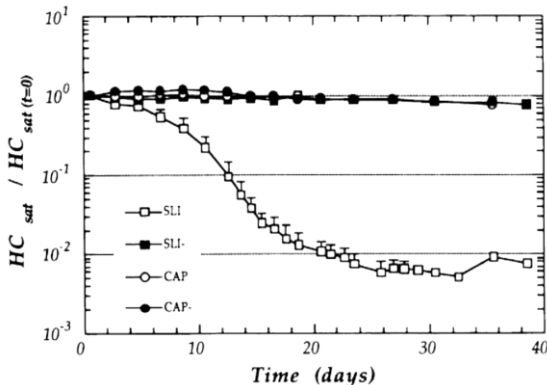
**איור 1.3** פחיתה בחדירות כפונקציה של המרחק והזמן עם מזרע חיידקים הלקוח ממתקן לטיפול בשפכים (Taylor and Jaffé., 1990a).



**איור 1.4** פחיתה בחדירות היחסית ( $k/k_{max}$ ) כפונקציה של הזמן ובהתאמה לעליה בעובי הביופילם היחסי ( $L_f/L_{fmax}$ ) במצעים שונים בקוטר בין 0.1-1mm עם החיידק *P. aeruginosa* (Cunningham et al, 1991)



המודל השני, הוצע על ידי Vandevivere and Baveye (1992ab). לטענתם, על סמך תצפיות מיקרוסקופיות, החיידקים לא יוצרים ביופילם רציף מסביב לחלקיקי הקרקע. להפך, הביומאסה החיידקית מצטברת באופן לא רציף ולא מסודר על פני שטח החלקיק. הם הצליחו להראות פחיתה גדולה בשני סדרי גודל במוליכות ההידראולית בזן המוקואידי SLI (Vandevivere and Baveye, 1992b) (איור 1.5). לדעתם, הפחיתה במוליכות ההידראולית נובעת מהצטברות של מושבות/צברים של חיידקים בנקבובים הגדולים ובין נקודות המגע של החלקיקים. שני המודלים הללו מכמתים את התופעה על ידי זרימה בנקבוב בודד. לעומתם, ישנם מודלים העוסקים בזרימה דו-תלת-ממדית ובתיאור של רשת נקבובים (pore network model) (Suchomel et al., 1998a ;Thullner et al., 2002b).



איור 1.5 שינוי במוליכות ההידראולית היחסית בעמודה במצע חול קוורץ, עם מזרע של 4 זנים שונים. SLI ו-CAP זנים מוקואידיים והזנים הלא-מוקואידיים SLI ו-CAP (Vandevivere and Baveye, 1992b).

סידור זה מורכב יותר ודורש שימוש בשיטות נומריות לתיאור של איטום ביולוגי. Rosenzweig et al (2012) יישמו במחקרם את מודל של רשת נקבובים והרחיבו אותו. בהסתמך על עבודתם של Or and Tuller (2000), הם הניחו שטח חתך משולש עבור נקבובי הקרקע (בשונה מצורת גליל, המקובלת). לטענתם, גיאומטריה טריגונומטרית מספקת תמונה מציאותית יותר של רשת הנקבובים בקרקע ולוקחת בחשבון גם את נקודות המפגש בין הנקבובים.

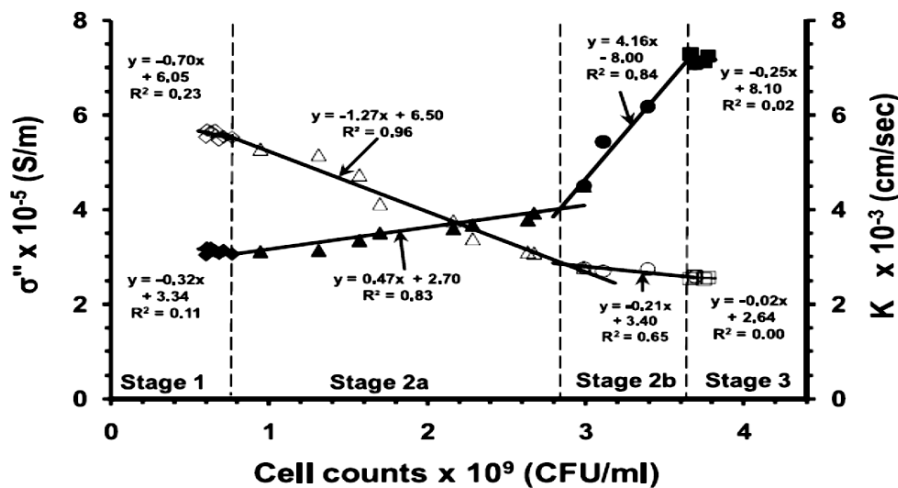
כל הגישות והמודלים שצוינו מתארים בצורה טובה

את הפחיתה בנקבוביות האפקטיבית ( $\phi$ ) ובחדירות ( $k_s$ ) כפונקציה של היווצרות ביופילם. Rittman (1993) טען כי אין זה משנה איזה מודל מאפיין את הצמדות החיידקים, בסופו של דבר הצטברות החיידקים על פני השטח תלויה בארבעה תהליכים: גדילה, שקיעה (ריבוי), דעיכה והתנתקות.

### 1.6 הקשר בין איטום ביולוגי לשינוי בתכונות החשמליות של התווך

מיקרואורגניזמים משתתפים במגוון תהליכים ביו-גיאולוגיים אשר גורמים לשינוי בתכונות הפיזיקאליות והכימיות של סביבתם (Atekwana and Atekwana, 2010). באמצעות שיטות גיאו-פיזיות נלמד הקשר בין פעילות מיקרוביאלית בקרקע לשינוי בתכונות ההולכה החשמלית של התווך. Davis et al (2006) חקרו את ההשפעה של גידול מיקרוביאלית ויצירת ביופילם על התכונות של תווך נקבובי בשיטת IP (induced polarization). מסקנתם הייתה שגדילה, היצמדות והתפתחות ביופילם על גרגרי חול גורמת לשינוי במוליכות החשמלית, בעיקר, המדומה (imaginary) וניתנת להערכה באמצעות מדידות של המוליכות החשמלית המרוכבת (complex conductivity techniques). במחקר זה, כמו גם במחקרים נוספים אחרים המתבססים על אותן שיטות מדידה בתדירויות נמוכות (0.1-1000Hz) התקבלה עלייה ברורה במוליכות החשמלית המדומה  $\sigma''$  עם העלייה בגידול המיקרוביאלית. לעומת זאת, לא ניכר שינוי משמעותי ברכיב הממשי  $\sigma'$  של המוליכות החשמלית (Abdel Aal et al., 2004, 2010; Davis et al., 2006; Atekwana et al., 2010; Albrecht et al., 2011; Revil et al., 2012). ערכו ניסוי זרימה בעמודת חול עם החיידק *P. aeruginosa* והראו קשר בין גידול מיקרוביאלית למוליכות החשמלית המדומה

ולמוליכות ההידראולית (איור 1.6) ב-4 שלבי התפתחות שונים של החיידק. לטענתם העלייה ב- $\sigma''$  קשורה בסיכום ההשפעות הנובעות מעלייה בעובי הביופילם, הגברת הפולריזציה בצוואר הנקבוב (כתוצאה מהתכווצות הנקבוב והתפתחות "ממברנה" סלקטיבית לקטיונים ואניונים), הגברת הפולריזציה בפן הביניים חיידק-נוזל בתוך הביופילם, עליה בחספוס המשטח וגידול לא סדיר של מבנה הביופילם. בתווך נקבובי, מנגנון הפולריזציה בתדירויות נמוכות קשור בדרך כלל להימצאות שכבה חשמלית כפולה העוטפת את פני שטח המינרל. חיידקים, כמו מינרלים במגע עם מים, עטופים גם הם בשכבה חשמלית כפולה, עם מטען שלילי ב-pH ניטראלי (Vaudelet et al., 2011) (Revil et al., 2012) מתארים את השכבה החשמלית הכפולה סביב תא החיידק כמברשת פולימרית מוליכה העוטפת ממברנה מבודדת (בעלת מוליכות חשמלית קטנה מ- $10^{-6}$  S/m), שממסכת את המוליכות היחסית גבוהה של הציטופלזמה (התוכן התוך- תאי). מטעמים של נוחות ויכולת בקרה, Ntarlagiannis and Ferguson (2009) בדקו את השינוי בהולכה החשמלית בתדירויות נמוכות של תווך נקבובי באמצעות שימוש בביופילם מלאכותי שהורכב מג'ל אלגינט או מאלגינט וחיידקי *P. putida* ובתוספת של  $50 \text{ mmol/l CaCl}_2$  (על מנת ליצור פאזת ג'ל) בעמודה עם כדורי סיליקה. תוצאותיהם עומדות בקנה אחד עם הממצאים הקודמים, כלומר, עלייה במוליכות החשמלית הנדמית עם העלייה בתוספת של אלגינט בלבד ועם ביופילם מלאכותי וחיידקים יחד. בנוסף התקבלה עלייה במוליכות החשמלית הממשית, אותה הם מייחסים לתוספת של סידן ( $\text{CaCl}_2(\text{aq}) \sim 0.81 \text{ S/m}$ ). מהמידע הקיים בספרות, נראה כי קיים קשר בין הפחיתה בתכונות ההידראוליות לשינוי בתכונות החשמליות של תווך נקבובי בו גדלה אוכלוסיות המיקרואורגניזם יחד עם התפתחות של ביופילם.



**איור 1.6** הצלבה בין ספירת חיידקים למוליכות החשמלית המדומה  $\sigma''$  (סמנים מלאים) למוליכות ההידראולית  $K$  (סמנים ריקים) ב-4 שלבי התפתחות שונים של האוכלוסייה המיקרוביאלית ובתדירות של  $1 \text{ Hz}$  (Abdel Aal et al., 2010). שלב 1 – הצמדות ראשונית הפיכה, שלב 2 – הצמדות לא הפיכה. שלב 3 – ביופילם בוגר. שלב 4 – ביופילם מפותח.

### **1.7 השערת המחקר**

באמצעות מדידות פשוטות של המקדם הדיאלקטרי והמוליכות החשמלית ניתן לחזות את הפחיתה היחסית במוליכות ההידראולית.

### **1.8 מטרות המחקר:**

מטרת המחקר הכללית הינה יצירת בסיס תיאורטי לשיטה חדשה לניטור התפתחות של ביופילם וחיזוי איטום ביולוגי בתווך גרנולרי.

#### **1.8.1 מטרות משנה:**

1. פיתוח מודלים לאפיון המקדם הדיאלקטרי והמוליכות החשמלית וההידראולית של תווך גרנולרי בו התפתח ביופילם כתלות בתכונות התמיסה והרכב הביופילם הטבעי והסינתטי.
2. בחינת יכולת החיזוי של הקשרים בין המוליכות ההידראולית לתכונות החשמליות של מצעים גרנולריים רוויים בהם התפתחו ביופילמים.
3. יישום קשרים אלו ללימוד השפעת האוכלוסייה המיקרוביאלית, תכונות המצע, תנאי הזרימה ואספקת המזון, על קצב התפתחות הביופילם.

## 2. חומרים ושיטות

### 2.1 חיידיקים-

חיידיק המודל ששימש ברוב ניסויי האיטום הביולוגי הינו *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 זהו מתג גרם שלילי, בגודל  $1\mu\text{m} \times 3\mu\text{m}$  עם שוטון. שטח הפנים המוערך של החיידיק הוא  $25\text{-}30\mu\text{m}^2$  (Abdel Aal et al., 2009).

### חיידיקים נוספים שנבדקו בניסויי האיטום הביולוגי:

- מוטנט (629) של זן האב *P. aeruginosa* ATCC 27853. חיידיק זה יוצר מבנה צמיגי תלת מימדי על צלחות פטרי.
  - *P. aeruginosa* PAO1 - ידוע ביכולתו להיספח למצע קוורץ (Brydie et al., 2009) ובכושר יצירת EPS, יותר מ-90% מנפח הביופילם של החיידיק (Gilbert et al., 2002).
  - *Erwinia amylovora* 238 - פתוגן של צמחים, מתג גרם שלילי, אנאירובי פקולטיבי היוצר ביופילים על גבי משטחים מוצקים (Koczan et al., 2009).
- החיידיקים נשמרו בהקפאה ב- $80^{\circ}\text{C}$  עם גליצרול (26%). לקראת כל ניסוי, הועברו מתרבית זו חיידיקים לפלטת אגר LB אשר הודגרה למשך לילה ב- $37^{\circ}\text{C}$ . מושבה של חיידיקים הועברה ל-4 mL מצע LB נוזלי והודגרה ללילה נוסף בטלטול ב-150 rpm (Lab-Line, USA), ב- $37^{\circ}\text{C}$  עבור *P. aeruginosa* וב- $28^{\circ}\text{C}$  עבור *E. amylovora*.

### 2.2 תמיסות מזון-

רוב ניסויי האיטום הביולוגי נעשו עם תמיסת מזון M63+0.4% citrate (רויל, 2007; Miller, 2001). הרכב התמיסה, מסומן כ-1X, עם מקורות פחמן שונים, מופיע בטבלה 2.1. תמיסת המזון נמהלה לריכוזים של 0.1X, 0.25X ו-0.5X, בהתאם לנדרש בניסוי.

מצע LB (Per liter) - 10gr bacto-tryptone, 5gr NaCl, 5gr yeast extract

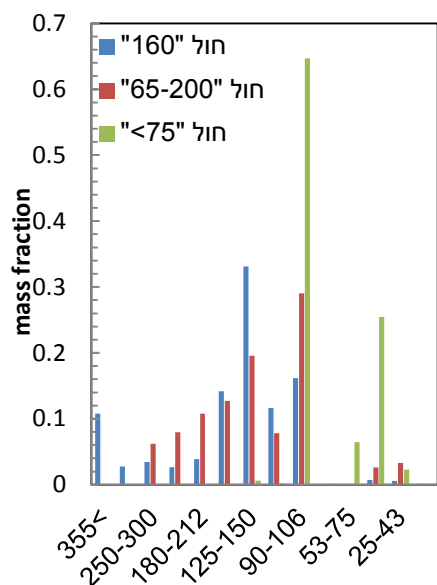
הרכב תמיסת מזון נוסף שנוסה, לפי Cunningham et al (1991) מוצגים בטבלה 2.2.

טבלה 2.1 תמיסת מזון M63 ומקורות פחמן שונים

name	formula	gr/l	supplier
Amonium Sulfate	$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	2	Merck, Germany
Potassium Hydrogen Phosphate	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	13.6	Merck, Germany
Ferrous Sulfate Heptahydrate	$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.5 mg/l	Merck, Germany
(pH =7 with) Potassium Hydroxide	KOH		Merck, Germany
1ml Magnesium Sulfate Heptahydrate (after autoclaving)	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	1M	Merck, Germany
<b>Carbon source</b>			
Tri Sodium Citrate Dehydrate	$\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7\text{Na}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.2%, 0.4%	Merck, Germany
Glucose	$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$	1%, 0.2%, 0.1%	Merck, Germany
Glycerol	$\text{C}_3\text{H}_8\text{O}_3$	0.2%	Gadot, Israel

name	formula	mg/l	Supplier
Glucose	C <sub>6</sub> H <sub>12</sub> O <sub>6</sub>	25	Merck, Germany
Ammonium Chloride	NH <sub>4</sub> Cl	7.2	Merck, Germany
Magnesium Sulfate Heptahydrate	MgSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	2	Merck, Germany
Sodium Phosphate Dibasic	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (BUFFER)	213	Merck, Germany
Potassium Hydrogen Phosphate	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (BUFFER)	204.5	Merck, Germany
Calcium Carbonate	CaCO <sub>3</sub>	50	Merck, Germany
Nitritriacetic Acid	(HOCOCH <sub>2</sub> ) <sub>3</sub> n	0.4	Sigma-Aldrich, USA
Ammonium Molybdate Hydrate	(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> MO <sub>7</sub> O <sub>24</sub> *4H <sub>2</sub> O	0.001	Merck, Germany
Ferrous Sulfate Heptahydrate	FeSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.112	Merck, Germany
Zinc Sulfate Heptahydrate	ZnSO <sub>4</sub> *7H <sub>2</sub> O	0.1	Merck, Germany
Manganese(II) Sulfate Hydrate	MnSO <sub>4</sub> *H <sub>2</sub> O	0.008	Merck, Germany
Copper Sulfate Pentahydrate	CuSO <sub>4</sub> *5H <sub>2</sub> O	0.002	Merck, Germany
Sodium Borate Decahydrate	Na <sub>2</sub> B <sub>4</sub> O <sub>7</sub> *10H <sub>2</sub> O	0.001	Merck, Germany
			pH= 6.8

### 2.3 תווך גרנולרי



איור 2.1 תוצאות האנליזה לקביעת פירוס גודל הגרנים עבור חול "160", "65-200" וחול "<75"

קוורץ נקי, סימון היצרן  $\mu\text{m} < 75$  (אגאת מינרלים בע"מ, באר שבע, ישראל) חול קוורץ דק  $90-106\mu\text{m}$  קוורץ נקי, סימון היצרן  $\mu\text{m} 65-200$  (מחצבות כפר גלעדי, ישראל) חול קוורץ, סימון היצרן "160" (אגאת מינרלים בע"מ, באר שבע, ישראל) חול דיונה ( $<400\mu\text{m}$ ) שיטת הטיפול בחול לפני כל ניסוי זרימה הייתה שונה. בחלקם נעשה שימוש בחול שלא עבר שטיפה או עיקור, באחרים נשטף החול במים מזוקקים או הורתח בחומצה מלחית 5% במשך 30 דקות ולאחר מכן נשטף במים מזוקקים והוכנס לתנור לייבוש/עיקור ב-  $105^{\circ}\text{C}$  למשך לילה.

עבור החולות: "160", "65-200", "<75" בוצעה אנליזה לקביעת גודל הגרגר באמצעות נפות (איור 2.1) וללא שטיפה מקדימה של החולות.

חישוב גודל הגרגר הממוצע נעשה מתוך תוצאות הניפוי על-פי ממוצע קוטר לפי נפח (volume mean) (Coulson and Richardson, 2002) (diameter):

$$d_p = \frac{\sum(d_i x_i)}{\sum x_i} = \sum(x_i d_i) \quad \text{משוואה 2.1}$$

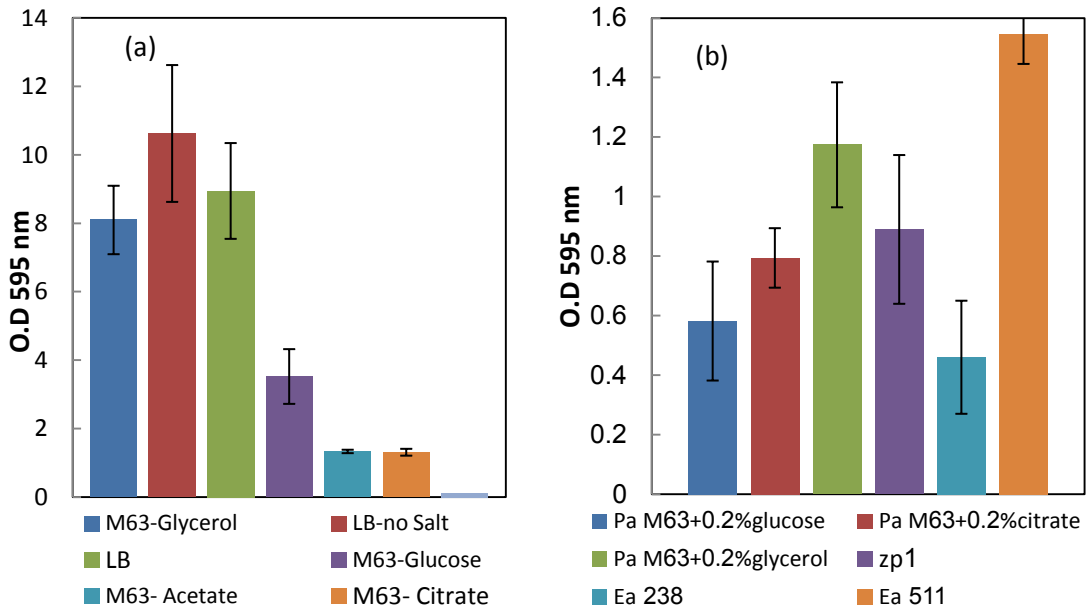
$X_i$  = פרקציה משקלית (או נפחית, בהנחה של צפיפות חלקיקים זהה),  $d_{pi}$  = קוטר גרגר

באמצעות משוואה 2.1 חושב קוטר גרגר מייצג של  $d_p=160 \mu\text{m}$ ,  $d_p=142 \mu\text{m}$  ו-  $d_p=82 \mu\text{m}$  עבור החולות "160", "65-200", "<75" בהתאמה.

## 2.4 כימות ביופילם

### 2.4.1 יצירת ביופילם בפלטות ELISA, 96 בארות-

לשם מציאת החיידק והרכב המזון המתאימים ביותר ליצירת ביופילם, נבדקו תמיסות מזון בריכוזים שונים, מקור וריכוז פחמן משתנה וחיידקים שונים במבחן ליצירת ביופילם בפלטות ELISA. המבחן בוצע על פלטת 96 בארות בעלות ציפוי הידרופילי (Greiner bio-one, Germany) (איור 2.2). מהלך העבודה בשיטה זאת מתואר להלן: תרבית החיידקים שגודלה כמתואר לעיל במצע LB, נמהלה ביחס 1:20 לקבלת תרחיף בריכוז של  $10^6 \text{CFU/mL}$ . לכל באר של תמיסת המזון הנבדקת הוספו 0.1 mL חיידקים והפלטה הועברה לאינקובציה למשך 72 שעות ב-  $26^\circ\text{C}$ . תוכן הבאר סולק באמצעות שאיבה עדינה במשאבת וואקום וכל באר נשטפה פעמיים במים דו-מזוקקים סטריליים. שאיבת הנוזל והשטיפות הרחיקו את החיידקים הפלנקטונים, כך שנשארו רק החיידקים הספוחים לדפנות ולתחתית הבאר. לכל באר הוספו 0.15 mL צבען Crystal Violet (CV) (0.1%) והפלטות הועברו להדגרה למשך 15 דקות בטמפרטורת החדר. בתום זמן ההמתנה, סולק הצבען מהבארות באמצעות פיפטור והבארות נשטפו פעמיים במים דו-מזוקקים סטריליים. ה-CV מוצה מהביופילם ע"י הוספת 0.15 mL חומצה אצטית (33% acetic acid) והדגרה ל-5 דקות נוספות. כמות הצבען, כמדד לכמות הביופילם, נקבעה ע"י קריאת הצפיפות האופטית (OD) באורך גל 595 nm של נוזל המיזוי באמצעות מכשיר (FL600, Bio-Tek, USA) Micro Plate Fluorescence Reader.



**איור 2.2** התפתחות ביופילם בפלטות ELISA. (a) החיידק *P. aeruginosa* ATCC 27853 גודל ב-5 מצעים שונים M63: (Glycerol\Acetate\Glucose\Citrate) במצע LB ו-LB-no salt, התוצאות הם ממוצע של 10 חזרות לכל מצע, לאחר הכפלה בפקטור מיהול. (b) *P. aeruginosa* ATCC 27853 (Pa) במצע M63+0.2% Glycerol\Glucose\Citrate, חיידק (zp1) *E. coli* zp pDSK-GFP<sub>uv</sub> Km<sup>R</sup>(50) (בודד מפרות) ושני זנים של החיידק *Erwinia amylovora* (Ea) במצע M63+0.4% Citrate. התוצאות הם ממוצע של 5 חזרות.

## 2.4.2 ספירה חיה-

תרחיף חיידקים נמהל במיהולים עשורוניים במים מזוקקים סטריליים. על גבי צלחת פטרי עם LB אגר, טופטפו 3 טיפות בנפח של  $10 \mu\text{l}$  עבור כל מיהול. הצלחת הודגרה ב-  $37^\circ\text{C}$  למשך לילה. חישוב מספר החיידקים למילימטר נעשה באופן הבא עבור ממוצע החזרות:

מספר המושבות X מיהול הזריעה X מיהול עשורוני = מס' המושבות למיליליטר (CFU/mL).

## 2.4.3 קביעת המסה הבקטריאלית באמצעות Bradford Protein Assay:

כמות החלבון בביופילם נקבעה בשיטת Bradford באמצעות ערכה מסחרית (Bio-Lab Laboratories, Germany). השיטה מתבססת על קשירה של הצבען Coomassie Brilliant Blue לחלבון. בתנאים חומציים, ללא לחלבון, התמיסה בעלת צבע חום-אדום. כאשר נקשר חלבון, ה- pKa של הצבען משתנה והצבע הופך לכחול (Bradford, 1976). מדידה של הצפיפות האופטית בוצעה בספקטרופוטומטר באורך גל-  $595 \text{ nm}$ . בסוף כל ניסוי זרימה (מתואר בהמשך) נלקח מהעמודה  $1 \text{ gr}$  של חול והועבר למבחנת אפנדורף שהכילה  $1.2 \text{ mL}$  מים מזוקקים. ניתוק החיידקים מהחול בוצע בוורטקס ע"י שלוש הרעדות של שנייה במהירות מקסימלית (רול, 2007). נפח של  $0.8 \text{ mL}$  מהתרחיף הועבר לקיווטה שהכילה  $0.2 \text{ mL}$  ריאגנט Bradford. התרחיף עורבב ע"י מספר פיפטציות והצפיפות האופטית של התמיסה נקבעה לאחר 5 דקות. הקשר בין כמות החלבון למספר חיידקי *P. aeruginosa* נבדק במחקר קודם (רול, 2007) ונמצא כי הוא מבוטא באמצעות עקום הכיול:

$$(CFU/mL) = -0.5 \cdot 10^9 \cdot \ln(1 - PC(OD_{595})/1.475)$$

$PC$  - מבטא את כמות החלבון הנמדדת ביחידות  $OD_{595}$

## 2.4.5 מיקרוסקופיה קונפוקלית- (Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

בחינה ויזואלית של כיסוי גרגרי החול ע"י חיידקים, בוצעה על ידי מיקרוסקופ קונפוקלי (Olympus IX81). הבחנה בין חיידקים חיים למתים בוצעה ע"י צביעת החיידקים בערכה מסחרית **Live/Dead Bacterial Viability Kit** (Invitrogen detection technologies, USA). הערכה מכילה צבען זרחני ירוק (SYTO9) הנקשר לחומצות גרעין של חיידקים חיים ומתים, וצבען זרחני אדום (PI) Propidium Iodide, הנקשר גם הוא לחומצות גרעין, אולם מסוגל לחדור רק לתאים עם ממברנות פגועות (חיידקים מתים). באופן זה חיידקים חיים יצבעו בירוק בעוד חיידקים מתים באדום. ביצוע הצביעה נעשה בהתאם להמלצת היצרן. צביעת החיידקים ב- **DTAF** 5-(4,6-dichlorotriazinyl) aminofluorescein (Sigma, USA) מאפשרת צביעה של ה- EPS, המצוי על פני הגרגר. **DTAF** הוא צבען אניוני בעל אפיונות לחלבונים, פחמימות ופוליסכרידים. צביעת גרגרי החול בוצעה כמתואר אצל רול (2007).

## 2.5 ניסויי איטום ביולוגי במערכת זרימה

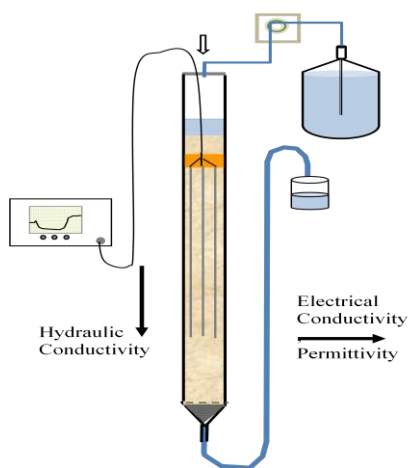
שלוש מערכות זרימה הועמדו לצורך ניסויי האיטום הביולוגי. המערכת הראשונה כללה, עמודה צרה, עם מחוש TDR יחיד, מונח בכיוון אנכי (איור 2.3), המערכת השנייה כללה, עמודה רחבה עם שישה מחושי TDR, מונחים בכיוון אופקי, במרחקים שווים (איור 2.4) והמערכת השלישית כללה, עמודה צרה לאורכה הוצבו 3 רביעיות של פני פלדת אל חלד (איור 2.5).

המערכת הראשונה, כללה עמודת זכוכית צרה, בעלת קוטר פנימי בסביבות 5 cm, אורך מדגם הקרקע היה בערך 25 cm. בזמן ניסוי הזרימה עומד המים מעל פני הקרקע נשאר קבוע. הקצה העליון של העמודה כוסה בפרפילם בכדי למנוע זיהום ע"י חיידקי הסביבה ולאפשר חילוף גזים. תחתית העמודה (בצורה של חצי-כדור), הייתה מלאה בכדורי זכוכית (3 mm) ומעליהם שכבת סקוטש התומכת בחול ומונעת מעברו. לפני הכנסת החול אל העמודה, הונח במאונך מחוש TDR באורך 15 cm ועובי אלקטרודות של 3 mm בעומק 5 cm מתחת לפני הקרקע (איור 2.3). חשוב לציין שהצבה אנכית של המחוש אינה אידיאלית, כיוון שהמוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי נמדדים בכיוון האופקי והמוליכות ההידראולית נמדדת בכיוון האנכי. אבל בשל בעיות שנצפו במערכת השנייה (ראה בהמשך), הוחלט לעבוד גם עם המערכת הראשונה. העמודה מולאה תחילה בתמיסת המזון אליה הוספו חיידקים כך שריכוז המזרע (inoculum) ההתחלתי היה  $10^5$  CFU/ mL בקירוב. החול היבש הוסף לעמודה הרוויה באיטיות תוך שמירה על הומוגניות האריזה (נעשה גם ניסיון אריזה רטוב, כאשר קודם עורבב החול עם התמיסה והחיידקים ואז נארז בעמודה. זאת, בכדי למנוע מחלקיקים קטנים/מרחפים להצטבר מעל פני הקרקע). נקבוביות העמודה (בסביבות 0.38), חושבה מהצפיפות הגושת ( $\rho_b$ ) המדודה וצפיפות החלקיקים ( $\rho_s$ ), בהנחה שהיא  $2.65 \text{ gr/cm}^3$  לגרגרי חול קוורץ. במטרה לאפשר היצמדות של החיידקים לחול, הושארה העמודה ללא זרימה למשך שעתיים (בחלק מהניסויים אף יותר, כמצוין בפרק תוצאות). תמיסת המזון הוזרמה דרך העמודה באמצעות משאבה פריסטלטי (ISM597, ISMATEC, Switzerland), על פי כושר ההולכה ההידראולית של המצע. טמפרטורת החדר לאורך הניסוי הייתה  $25 \pm 1^\circ \text{C}$ .

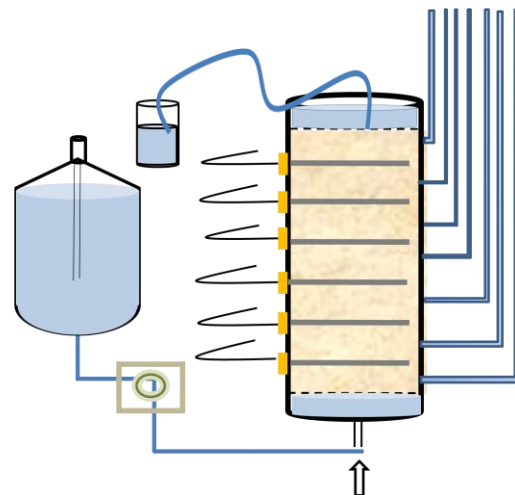
המערכת השנייה כללה, עמודת פלקסיגלס (Plexiglas) סגורה, עם קוטר פנימי של 132 mm כאשר גובה הקרקע המקסימאלי 34 cm. לאורך העמודה, הוצבו ששה מחושי TDR מקבילים זה לזה, במימדים של 12 cm אורך ו- 3 mm עובי אלקטרודה, ממוקמים במרחקים של 24.5, 19.5, 14.5, 9.5, 4.5 ו- 29.5 cm מהקצה התחתון של העמודה (איור 2.4). פיזומטרים מוקמו באמצע המרחק בין מחושי ה-TDR ואפשרו מדידה רציפה של הקשר  $k_s-EC_a-\epsilon_{eff}$  בין הפיזומטרים לאורך העמודה. מהלך הניסוי (הכנת העמודה, מילוי וזרימה) התבצע כמפורט לעיל, להוציא את כיוון הזרימה שניתן היה להחליפו במידת הצורך. בחלק מהניסויים זרמה התמיסה מעלה (up-flow) ובאחרים מטה (down-flow).

המערכת השלישית כללה, עמודת פלקסיגלס (Plexiglas) פתוחה, עם קוטר פנימי של 53 mm, גובה עמודת החול 15 cm. לאורכה הוצבו 12 פני מתכת בגובה 6, 9, 12 cm מתחתית העמודה כאשר בכל גובה מצויים 4 פנינים. פיזומטרים מוקמו באמצע המרחק שבין פני המתכת (איור 2.5). מדידת המוליכות החשמלית נעשתה באמצעות כבל קואקסיאלי באורך 2 m עם חיבור BNC מצד אחד ומצד שני 2 חיבורי תנין.



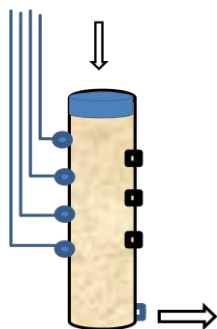


**איור 2.3** סכמה של המערכת הראשונה בניסויי האיטום הביולוגי עם מחוש TDR אנכי למדידת המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי, המוליכות ההידראולית חושבה לפי ההפרש בין גובה המים בכניסה לגובה יציאת המים.



**איור 2.4** סכמה של המערכת השנייה בניסויי האיטום הביולוגי. 6 מחושי TDR אופקיים למדידת המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי ופיזומטרים למדידת המוליכות ההידראולית.

### 2.6 ניסויי זרימה חומרי EPS סינתטיים



**איור 2.5** משמאל סקיצה של עמודת החול, מימין מבט על ריבוע שחור – פיני פלדת אל חלד, עיגול כחול- יציאה לפיזומטר.

עבור עמודה בריכוז 2% אלגינט, נשקלו 20gr (alginate) /1L (dw) ועורבבו בבלנדר בעוצמה מקסימאלית למשך מספר שניות, עד להשגת תערובת הומוגנית. התמיסה, ביחס מיהול גבוה, הוכנסה לייבוש בתנור למשך מספר ימים בטמפ' של 60°C. מידי יום, הוצאה התערובת מהתנור ורק לאחר קירורה (בטמפ' החדר עד ל- 25°C) נשקלה התערובת ונלקחו מדידות של המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי.

### 2.7 מכשירי מדידה

**Tektronix 1502C TDR cable tester** - מדידה של המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) בוצעה בשתי שיטות:

Ohm-at-cursor, במרחק מקסימלי קבוע של 600 m (בסוף תצוגת הגל החוזר) ובאמצעות תוכנת WINTDR98- waveform analysis, המאפשרת גם מדידה של המקדם הדיאלקטרי ( $\epsilon_{eff}$ ).  
**CDM 83 conductivity meter** (Radiometer, Copenhagen) - מדידות של המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) והמוליכות החשמלית של התמיסה ( $EC_w$ ) בכניסה לעמודה וביציאה מהעמודה. ה-  $EC_w$  בעמודה הרחבה הוערך לכל מחוש בהתאם למיקום האנכי של המחוש על ידי רגרסיה ליניארית. בעמודות הצרות, הוערך ה-  $EC_w$  מהממוצע בכניסה וביציאה.  
 מחושי ה-TDR חוברו דרך כבל קואקסיאלי RG58 50-Ω באורך של 1.5 m ל- Tektronix TDR או ל- Radiometer.

כיול קבוע התא של המחושים, יחד עם 1.5 m כבל קואקסיאלי והמחברים (1/m), וההתנגדות שלהם ( $\Omega$ ) נעשו בעזרת ה- Radiometer ותמיסת NaCl ב- 4 ריכוזים ידועים (0.5, 1, 5, 10 dS/m). באמצעות

הכיוול, ניתן היה לחשב בהמשך את המוליכות החשמלית הנדמית וזאת של התמיסה הזורמת. כיוול המחושבים לשימוש בתוכנת WINTDR98 נעשה על יד הכנסתם למים מזוקקים וקביעת העכבה האופיינית (impedance) ( $\Omega$ ) והאורך החשמלי האפקטיבי של כל מחוש (m).

המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) נקבעה ממדידת הספיקה ביציאה במחזורים של 10 עד 60 דקות (כאשר נדרשים לפחות 5 mL לקביעה מדויקת של  $EC_w$ ). ומחלוקת השטף בגרדיאנט ההידראולית הכולל (בהזנחה של הפסד העומד בצינורות). לעיתים, הועלתה הספיקה לפני מדידת המוליכות ההידראולית בכדי להגדיל את הגרדיאנט בין הפיזומטרים ולאפשר מדידה מדויקת יותר של גובה המים. בסוף ניסויי הזרימה, נוקזה העמודה באיטיות, על מנת למנוע ניתוק של הביופילם. תוכן החול הוצא מן העמודה באמצעות כף מתכת, ונאספו מדגמי חול בקטעים של כל 2.5 cm לאורך העמודה לקביעת ביומסת הביופילם באמצעות בדיקת חלבון ואפיון הביופילם ע"י מיקרוסקופיה קונפוקלית.

## 2.8 מודלים של פרמיטיביות דיאלקטרית, מוליכות חשמלית ומוליכות הידראולית

בפרק זה יוצגו מודלים וחישובים מקדימים באמצעותם הוערכה ההשפעה של התפתחות הביופילם על שלושת תכונות ההולכה של הקרקע-  $EC_a$ ,  $\epsilon_{eff}$  ו-  $K_s$ . המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) והמוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) של התווך הנקבובי הרווי חושבו לפי הגישה הנקראת "תיאוריות הערבוב הדיאלקטרי" (dielectric mixing theories) (Sihvola, 1999). המוליכות ההידראולית של המצע חושבה על פי המודל הקלאסי של Kozeny-Carman (Carman, 1939), בהנחה שזרימת המים מתרחשת רק דרך הנקבובים הפתוחים של התווך ולא דרך הביופילם.

### 2.8.1 מידול של הפרמיטיביות האפקטיבית $\epsilon_{eff}$

החישובים המקדימים (איור 2.6-2.7) נעשו באמצעות המודל של Maxwell-Garnett. לשם פישוט, ניתן להניח כי החלקיקים הארוזים בעמודה כדוריים. וכי כל חלקיק, מתואר כגרעין מוצק עגול עטוף בשכבת ביופילם ( $sb$ ) וטבול במים ( $w$ ). בהתאם לכך, ניתן, לפי המודל של Maxwell-Garnett, לחשב את פרמיטיביות האפקטיבית, כדלקמן:

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_0 + 3f\epsilon_0 \left( \frac{\epsilon_1 - \epsilon_0}{\epsilon_1 + 2\epsilon_0 - f(\epsilon_1 - \epsilon_0)} \right) \quad \text{משוואה 2.2}$$

כאשר  $\epsilon_1$  זה הפרמיטיביות של חלקיק כדורי טבול בתמיסת הרקע,  $\epsilon_0$  והפרקציה הנפחית של המוצקים  $f$  (Maxwell-Garnett, 1904, Friedman, 1998, Sihvola, 1999). הפרמיטיביות האפקטיבית המחושבת של חלקיקים כדוריים עם קוטר שבין  $65.5 \mu\text{m}$  ל-  $2 \text{ mm}$ , ארוזים בנקבוביות של 0.4, כפונקציה של עובי הביופילם, מופיעה באיור 2.6.

חישוב המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי המושפע מהביופילם מתואר בשלושה שלבים:

### שלב 1:

ה- EPS "עורבב" במים לקבלת הפרמיטיביות של הביופילם. בהנחה שהמקדם הדיאלקטרי של התמיסה (מים) הוא 80 ושל ה- EPS 3 (המקדם הדיאלקטרי של EPS הוערך מתוך טבלת מקדמים דיאלקטריים של פולימרים אחרים, בתדירות 1GHz ובטמפרטורה של  $25^\circ\text{C}$  למשל, נגזרות של צ'ולוז: אצטט- 3.2, אתיל

צלולוז-2.8, גומי טבעי-2.4, שעווה-2.5 (von Hippel, 1954); עם פרקציה נפחית של 0.5, מתקבלת פרמיטיביות של 34.14 עבור הביופילם ( $\epsilon_b$ ).

שלב 2:

הערכת הפרמיטיביות של הגרגר העטוף ( $sb$ ). הפעם, פרמיטיביות הרקע הינה פרמיטיביות הביופילם, ופרמיטיביות הגרגר המשוערת היא 5, ערך הקרוב לפרמיטיביות של חול קוורץ (Robinson and Friedman, 2003). הפרקציה הנפחית נקבעת על פי היחס בין רדיוס הגרגר לעובי הביופילם.

שלב 3:

גרגר העטוף בביופילם, שהפרימיטיביות שלו חושבה בשלב השני, מעורבב עם מים לקבלת הפרמיטיביות הכוללת של המדיום ( $sbw$ ) שוב באמצעות משוואה 2.2. מאחר שעל פי המודל של Maxwell-Garnett, הפרמיטיביות של החלקיק הטבול בתמיסה מושפעת בעיקר מהפרמיטיבות של הרקע ואינה לוקחת בחשבון את ההשפעה של חלקיקים נוספים הטבולים בתמיסה. נעשה שימוש במודל של (Sihvola and Kong, 1988) (מופיע בפרק 4 ו-5). הצורה הכללית של המודל (משוואה 2.3) מאפשרת התייחסות גם לחלקיקים שאינם כדוריים וגם לאינטראקציות בין חלקיקים שכנים. הביטוי הסתום לפרמיטיביות האפקטיבית של מצע איזוטרופי היא:

$$\epsilon_{eff} = \epsilon_0 + \frac{\sum_{i=a,b,c} \frac{f[\epsilon_0 + \alpha(\epsilon_{eff} - \epsilon_0)](\epsilon_1 - \epsilon_0)}{3[\epsilon_0 + \alpha(\epsilon_{eff} - \epsilon_0)] + N^i(\epsilon_1 - \epsilon_0)}}{1 - \sum_{i=a,b,c} \frac{f N^i(\epsilon_1 - \epsilon_0)}{3[\epsilon_0 + \alpha(\epsilon_{eff} - \epsilon_0)] + N^i(\epsilon_1 - \epsilon_0)}} \quad \text{משוואה 2.3}$$

כאשר  $\alpha$  הינו פרמטר חסר ממדים הנמצא בין 0 ל-1. בפרמטר  $\alpha$  משתמשים בכדי להעריך את השפעת החלקיקים השכנים על השדה החשמלי בתוך חלקיק מסוים. כאשר  $\alpha = 0$ , כלומר, ללא השפעה של חלקיקים שכנים, מתקבל המודל של Maxwell-Garnett. מקדם הדיפולריזציה,  $N^i$ , הוא פקטור המתאר את הפחתת הקיטוב החשמלי (פולריזציה) של תכליל המדיום בהתאמה לצורת החלקיקים והכיווניות שלהם ביחס לכיוון השדה החשמלי. לשם פישוט, הונח שהתכליל הינו ספרואיד (אליפסואיד מסתובב) בעל שלושה צירים עם מימדים ( $a \neq b = c$ ). יחס הצירים ( $a/b$ ) מתאר את צורת החלקיק, עבור כדור  $a/b = 1$ , דיסקה צרה  $a/b = 0.001$ , למשל ומחט ארוכה  $a/b = 1000$ , למשל.

מקדם הדיפולריזציה של ספרואיד עם יחס ( $a/b$ ), יכול להיות מוערך בעזרת פונקציה אמפירית אשר הוצעה על ידי Jones and Friedman (2000):

$$N^a = \frac{1}{1 + 1.6(a/b) + 0.4(a/b)^2} \quad ; \quad N^b = N^c = 0.5(1 - N^a) \quad \text{משוואה 2.4}$$

מקדמי הדה-פולריזציה של חלקיק כדורי הינם  $1/3, 1/3, 1/3$ , של דיסקה צרה  $0, 0, 1$ , ושל מחט ארוכה  $0, 1/2, 1/2$ .  $N^{a,b,c} = 0$

הפרמיטיביות האפקטיבית של מצע נקי אינה תלויה בגודל החלקיק, והפחיתה של  $\epsilon_{eff}$  עם העלייה בעובי הביופילם משמעותית יותר עבור חלקיקים קטנים יותר.

ניתן לראות, באיור 2.6 שעבור החלקיקים הקטנים (למשל, כאשר  $d = 250 \mu\text{m}$ ) החישוב נקטע, כיוון שהמצע, עבור נקבוביות של 0.4, לא יכול להכיל ביופילם בעובי של יותר מ-  $23 \mu\text{m}$ .

### מידול של המוליכות החשמלית $EC_a$

הפחיתה במוליכות החשמלית הנדמית של התווך ( $EC_a/EC_w$ ) מודלה (איור 2.6-2.7) באותה השיטה לפי שלושת שלבי הערבוב, על-פי המודל של MG. הערך של המוליכות החשמלית של הפאזות השונות מחליף את הערך של הפרמיטיביות במשוואות הערבוב. בהנחה שהמוליכות החשמלית היחסית של מוצקים ו- EPS היא 0 והמוליכות החשמלית היחסית של מים היא 1, הפחיתה במוליכות החשמלית צפויה להיות משמעותית יותר מהפחיתה בפרמיטיביות האפקטיבית בגלל ניגודיות גדולה יותר ביחס בין חומר הרקע לחומר הטבול  $1/0$  לעומת  $3/80$  או  $5/80$  עבור EPS/מים וגרגר/מים בהתאמה. השפעת התפתחות ביופילם על המוליכות החשמלית הנדמית של תווך גרנולרי עם חלקיקים כדוריים בקוטר שבין  $65.5 \mu\text{m}$  ל-  $2 \text{mm}$ , ארוזים בנקבוביות של 0.4, כפונקציה של עובי הביופילם, מופיעה באיור 2.6.

### מידול המוליכות ההידראולית $K_s$

המודל של Kozeny-Carman לחיזוי המוליכות ההידראולית של תווך נקבובי, המתייחס לזרימה מסביב לחלקיק מייצג, ניתן לכתיבה בצורה הבאה (Lesmes and Friedman, 2005):

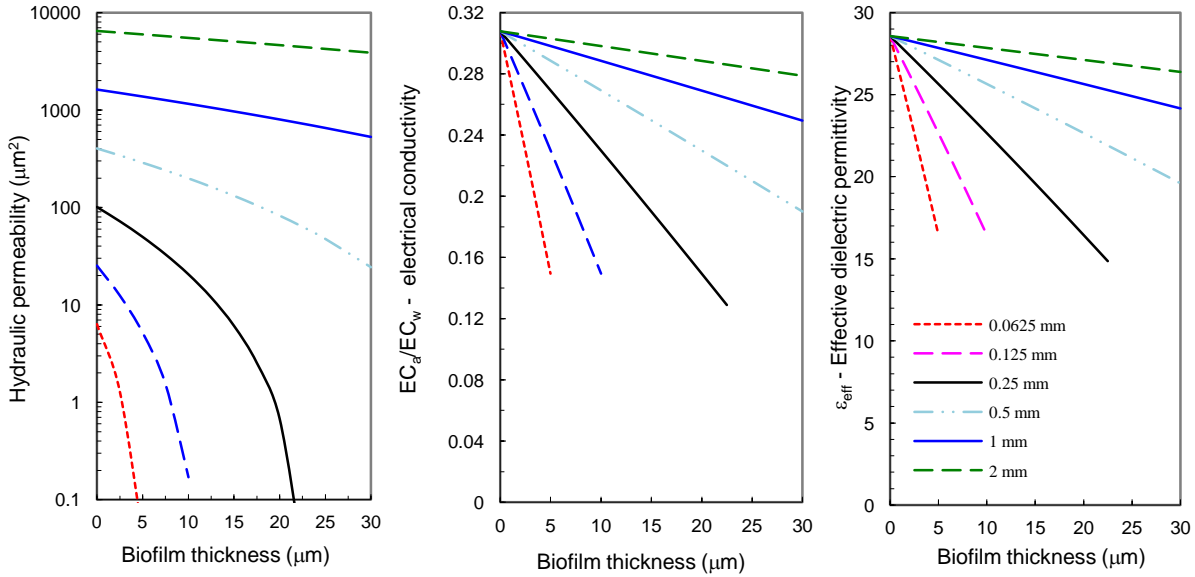
$$k_s = \frac{\phi r_h^2}{S_f T} ; T = \left(\frac{L_a}{L}\right)^2 \quad \text{משוואה 2.5}$$

כאשר נקבוביות התווך-  $\phi$ , הרדיוס ההידראולי (היחס בין נפח הנקבוב לטח הפנים של המוצק-נוזל) -  $r_h$ , פקטור הצורה-  $S_f$  (מספר חסר ממדים הנע בין 1.7 ל-3),  $T$  - פקטור פיתוליות, מייצג את היחס בין האורך האפקטיבי של מסלול הזרימה האפקטיבי,  $L_a$ , לבין אורך הדוגמה המקרוסקופי,  $L$ . בהנחה שפקטור הפיתוליות זהה לזרם חשמלי ולזרימת מים למינארית, ניתן להעריכו מהמדידות (פרק 3) או מהחישוב (כמו בדוגמת החישוב בפרק זה) של הפחיתה במוליכות החשמלית:  $T = \phi/(EC_a/EC_w)$ , כך שמקבלים:

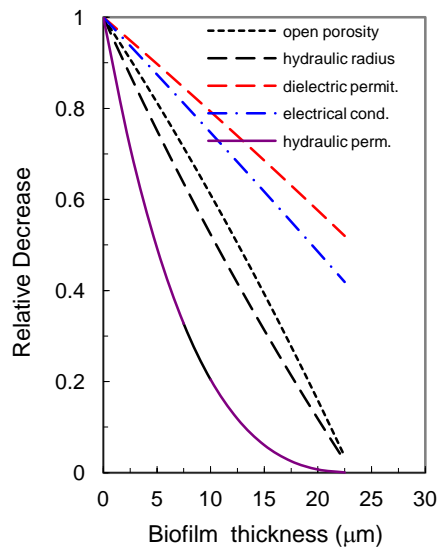
$$k_s = \frac{r_h^2 EC_a}{S_f EC_w} \quad \text{משוואה 2.6}$$

לצורך החישובים המקדימים למחקר, הונח  $S_f = 2.35$ , לפי Wyllie and Gregory (1955), הערך מייצג את פקטור הצורה של תווך המורכב מחלקיקים כדוריים.  $EC_a/EC_w$  חושב בעזרת משוואה 2.3 וה-  $r_h$  חושב כפונקציה של עובי הביופילם, רדיוס החלקיק והנקבוביות (איור 2.6). המוליכות ההידראולית, שלא כמו המוליכות החשמלית הנדמית והפרמיטיביות האפקטיבית, מושפעת מקוטר החלקיק ופרופורציונאלית לריבוע הקוטר שלו. לכן, הפחיתה היחסית משמעותית יותר. למשל, עבור קוטר של  $250 \mu\text{m}$ , התקבלה פחיתה של כשלושה סדרי גודל במוליכות ההידראולית, עד לעובי ביופילם של  $22 \mu\text{m}$ . החישובים באיור 2.6 ממחישים בצורה הפשוטה ביותר את הקשר  $k_s-EC_a-\epsilon_{eff}$ , אך הם אינם מציאותיים מספיק, בכדי לאפשר חיזוי מדויק. יחד עם זאת, נראה כי המודלים, על אף פשטותם, נותנים תוצאות הגיוניות. גם אם הם לא מצליחים לחזות את הפחיתה האבסולוטית, הם בהחלט שימושיים בנוגע לחיזוי הפחיתה היחסית, של שלושת רכיבי ההולכה

כתלות בהתעבות הביופילים בתווך הנקבובי. איור 2.7 מתאר את הפחיתה הצפויה בנקבוביות, ברדיוס ההידראולי, וב-  $k_s-EC_a-\epsilon_{eff}$  של מצע גרנולרי, הכולל גרגרים בקוטר 0.25 mm. הפחיתה ב-  $\epsilon_{eff}$  וב-  $EC_a$  קטנה לעומת הפחיתה ב-  $k_s$ . זאת משום שהירידה התלולה ב-  $k_s$ , מודלה מהפחיתה היחסית (למצע נקי) של ה-  $r_h^2$  ומהיחס  $EC_a/EC_w$ .



**איור 2.6** חישובים מקדימים הממחישים את הפחיתה הצפויה בפרמיטיביות האפקטיבית (ימין), המוליכות החשמלית (אמצע) והמוליכות ההידראולית (שמאל) כפונקציה של עובי הביופילם במצע עם חלקיקים כדוריים בקוטר שבין 0.0625 (קו אדום- תחתון) ל- 2 mm (קו ירוק- עליון), ארוזים בנקבוביות של  $\alpha = 0, 0.4$  ו-  $S_f = 2.35$ .



**איור 2.7** פחיתה יחסית בנקבוביות, רדיוס ההידראולי, מקדם דיאלקטרי, מוליכות חשמלית ומוליכות ההידראולית של מצע עם חלקיקים בקוטר 0.25 mm בתגובה להתפתחות ביופילם.

### 3. תוצאות ניסויי זרימה- איטום ביולוגי

בפרק זה יוצגו חלק מתוצאות הניסויים. התוצאות להלן מובאות לפי סדר כרונולוגי של ביצועם וזאת בכדי להראות את הרציונל מאחורי השינויים שנעשו בין הניסויים.

#### 3.1 תוצאות

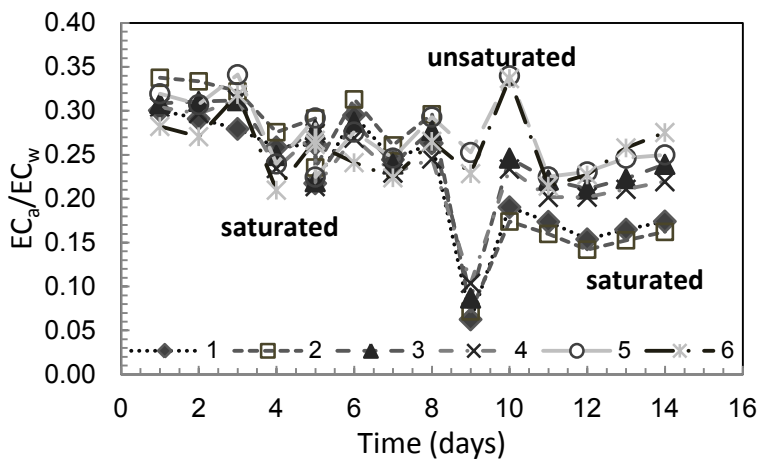
##### ניסוי 1:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 6 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 34 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.4$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" הורתח בחומצה מלחית 5% ונשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 1).

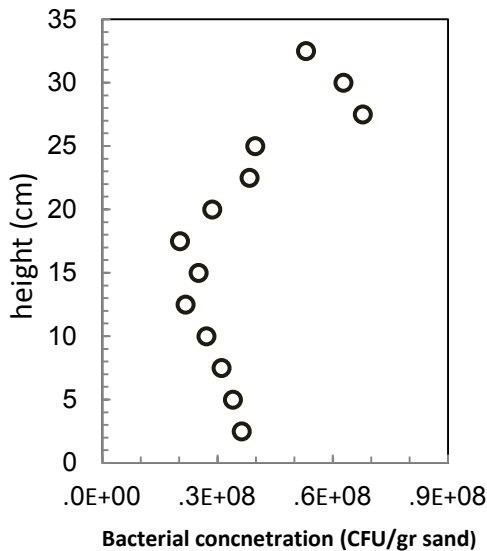
תמיסת מזון: 0.25X (כלומר,  $0.25 \times (\text{M63} + 0.4\% \text{ citrate})$ ). מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.44 \text{ S/m}$ , שטף:  $1 \text{ cm/h}$ .

השתנות המוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) לאורך הניסוי, נמדדה באמצעות 6 מחושי TDR במרחק של 5 cm אחד מהשני. הערכת המוליכות החשמלית של התמיסה ( $EC_w$ ) נעשתה לפי אינטרפולציה ליניארית בין המיקום האנכי של המחוש בעמודה למדידות שנלקחו בכניסה וביציאה מן העמודה. כיוון הזרימה בעמודה ואופן הרווייתה נעשה מלמטה כלפי מעלה. תנאי הרוויה נשמרו עד היום השמיני מתחילת הניסוי, מאחר ולא ניכר שינוי במוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ), נקוז החלק העליון של העמודה ולאחר שלושה ימים שוב הורוותה העמודה. הירידה החדה במוליכות החשמלית של ארבעת מחושי ה-TDR העליונים ממחישה את שלב הניקוז (איור 3.1). מגמות של עליה וירידה במדידות של המוליכות החשמלית לאורך הניסוי, ייתכן שנבעו מהתפתחות ביופילם וניתוקו מהמצע, אך עיקר מקורן הוא כנראה מהשוני בין המדידות בכניסה למדידות ביציאה אשר נבעו מזיהום בתמיסת המזון והחלפות של התמיסה בחדשה. ניקוז העמודה גרם לסדקים רבים בחול הארוז בעמודה



איור 3.1 השתנות  $EC_a/EC_w$  לאורך תקופת ניסוי הזרימה, שנמדדה על ידי 6 מחושי TDR הממוקמים בעומקים של 4.5, 9.5, 14.5, 19.5, 24.5, 29.5 cm מהחלק העליון של העמודה.

ולבועות שנצפו בחלק העליון של העמודה, נראה שמבנה הקרקע הופר גם לאחר שלב הרוויה השני. כניסה של חול לצינורות הפיזומטרים הביאה לאי דיוק במדידות של מוליכות הידראולית ועל כן, תוצאות אלו אינן מובאות. בניסוי זה, כמו גם בניסויים אחרים, לא התפתחה מסת ביופילם משמעותית על פני גרגרי החול על מנת ליצור פחיתה במוליכות ההידראולית והחשמלית.



איור 3.2 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי. ציר y, height, מתאר את המרחק מהקצה התחתון של העמודה. ציר x מתאר את ריכוז החיידקים.

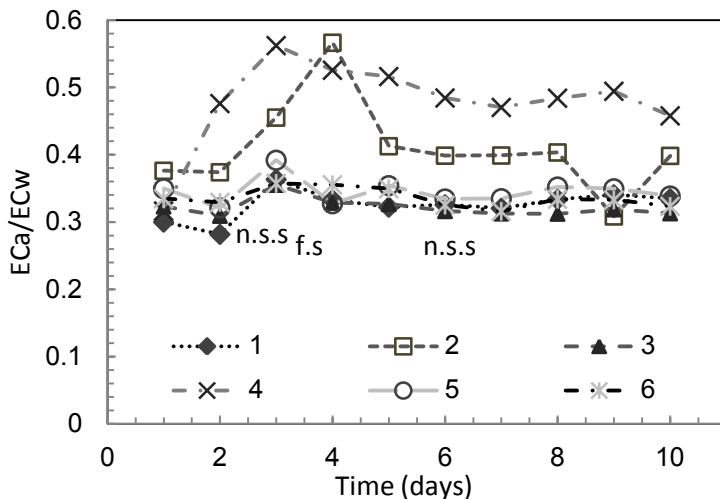
ריכוז החיידקים צריך להיות גדול יותר לפחות בסדר גודל אחד מהריכוז שהתקבל. פירוס החיידקים לאורך העמודה מוצג באיור 3.2. אי הסדר היחסי (בחלק העליון) בפיזור החיידקים הושפע כנראה משלב הניקוז וההרוויה החוזרת. בדרך כלל, בעמודות רוויות ריכוז החיידקים יהיה גבוה יותר בסמוך למקור כניסת הנוטריאנטים והחמצן וירד עם העומק.

## ניסוי 2:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 6 מחושי TDR אופקיים, שטח התך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 34 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.36$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" הורתח בחומצה מלחית 5% ונשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P.aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 1). תמיסת מזון: 1X (כלומר, M63+0.4% citrate).

מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 1.78 \text{ S/m}$ , שטף: 1 cm/h. בניסוי זה ריכוז תמיסת המזון גבוה פי ארבע מהריכוז שדווח בניסוי הקודם. בריכוז זה, המוליכות החשמלית הנדמית המדודה ( $EC_d$ ) היא בסביבות 0.59 S/m. במוליכות כזאת לא מתאפשרת מדידת המקדם הדיאלקטרי של התווך. בניסוי זה (כמו גם בניסויים רבים אחרים - שתוצאותיהם אינן מובאות) לאחר מספר ימים (9 ימים בניסוי זה) החלה השחרה בתחתית עמודת החול היכן שמתפתחים תנאים אנאירוביים, כנראה כתוצאה מחיזור של סולפאט ליצירת משקע של ברזל-סולפיד (FeS). בדרך כלל עם הופעת FeS חלה עליה במוליכות החשמלית (איורים 3.3,



איור 3.3 השתנות  $EC_d/EC_w$  על ידי 6 מחושי TDR הממוקמים בעומקים של 4.5, 9.5, 14.5, 19.5, 24.5, 29.5cm מהחלק העליון של העמודה (fs= fresh solution, n.s.s = non sterile solution).

3.17 ו-3.27). הממוצע האריתמטי

(בין 6 המקטעים בעמודה) של

הפחיתה במוליכות החשמלית

והמוליכות ( $EC_d/EC_w$ )

ההידראוליות ( $K_s$ ) לאורך ניסויי

הזרימה המוצג באיור 3.4 מצביע על

ירידה מתונה ב-  $EC_d/EC_w$  וירידה

חדה ב-  $K_s$ . המוליכות ההידראולית

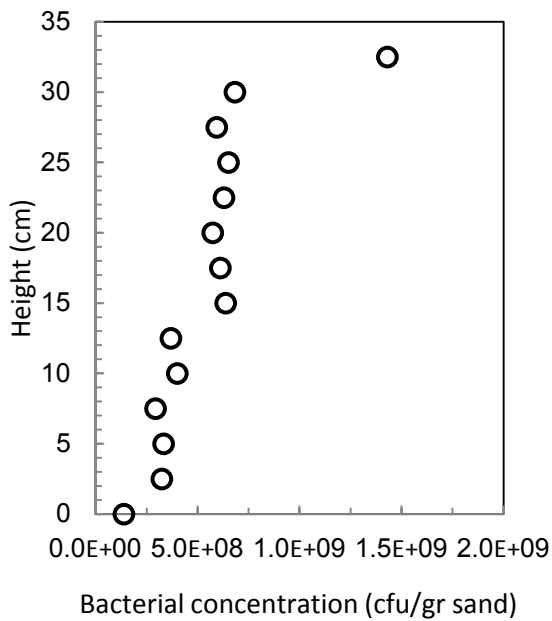
של המצע הנקי בניסוי זה גבוהה

(בערך פי 2) מהמוליכות

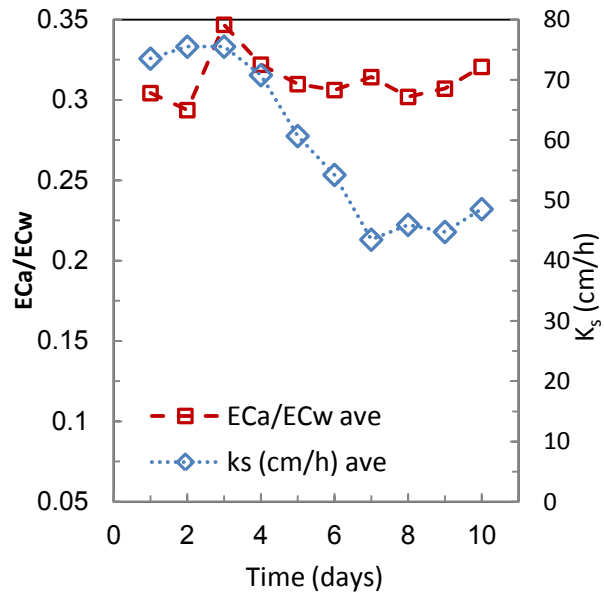
ההידראולית הממוצעת לחול זה

בשאר הניסויים, ממצא המרמז על

חוסר דיוק במדידות. ריכוז החיידקים שהתקבל בסוף הניסוי היה גבוה יותר וגרם לפחיתה משמעותית יותר במוליכות החשמלית וההידראולית, כנראה בשל הריכוז הגבוה של תמיסת המזון (1X לעומת 0.25X בניסוי הקודם). פירוס החיידקים בעמודה מוצג באיור 3.4.



**איור 3.4** פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי. ציר y, height, מתאר את המרחק מהקצה התחתון של העמודה. ציר x מתאר את ריכוז החיידקים.



**איור 3.5** השתנות ה- $EC_a/EC_w$  הממוצעת (נמדדה באמצעות Radiometer EC meter) וה- $K_s$  הממוצע לאורך הניסוי

### ניסוי 3:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 6 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 34 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.36$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" הורתח בחומצה מלחית 5% ונשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 1).

תמיסת מזון: 0.5X

(כלומר,  $0.5 \times (M63 + 0.2\% \text{ glucose})$ ).

מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.86$

S/m, שטף: 1 cm/h.

בניסויים מקדימים בפלטות ELISA נבחנה

כמות הביופילם המיוצרת של החיידק *P.*

*aeruginosa* ב-4 תמיסות M63 עם מקור

פחמן שונה ושתי תמיסות LB (איור 2.2).

בהסתמך על תוצאות אלו, נערך ניסויי זרימה

עבור 4 עמודות עם תמיסות מזון שונות:

M63+0.2%, M63+0.4% citrate

glucose, LB-no salt ומי ברז + glucose

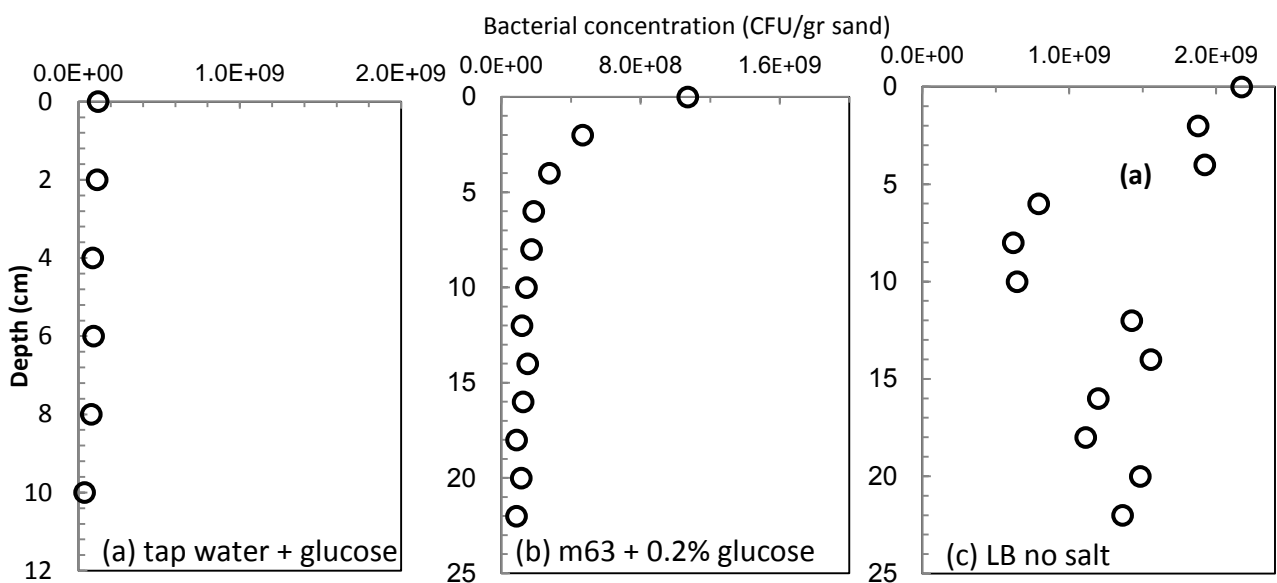
(איור 3.6). פרט לעמודת מי הברז, ביתר



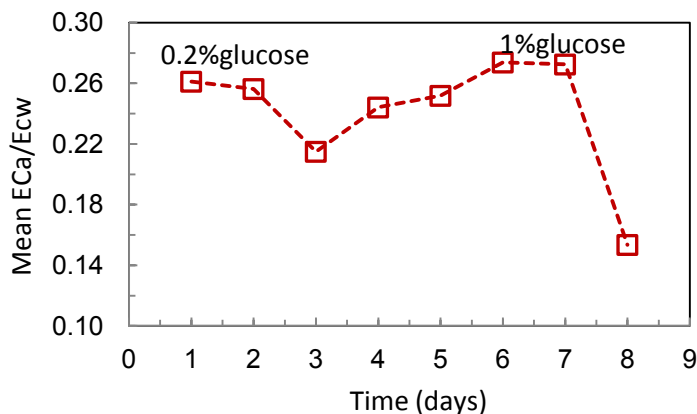
**איור 3.6** מערכת ניסוי ב-4 עמודות זרימה עם תמיסות מזון שונות.



העמודות הוכנס החיידק *P. aeruginosa* ATCC 27853 מסת החיידקים בסוף הניסוי בעמודות LB- no salt ו- M63+0.2% glucose הייתה גבוהה מאשר בעמודת מי הברז ללא החיידק *P. aeruginosa* (איור 3.7), בעמודת M63+0.4% citrate נראו הרבה בועות אוויר (תוצאות לא מובאות). בהסתמך על התוצאות המוצגות באיור 3.7, בניסוי זה הוחלף מקור הפחמן לגלוקוז במקום ציטראט. בשלושת הימים הראשונים נמדדה ירידה ניכרת ב-  $EC_a/EC_w$ , אך לאחר ארבעה ימים נוספים עלתה חזרה לערך ההתחלתי (איור 3.8). בעקבות העלייה במוליכות החשמלית הוחלפה תמיסת המזון וריכוז הגלוקוז הועלה ל- 1%. הירידה ב-  $EC_a/EC_w$  לאחר החלפת התמיסה, נבעה מיצירה של בועות אוויר ולא כתוצאה מיצירת ביופילם. המוליכות ההידראולית לא נמדדה בניסוי זה בגלל כניסה של חול לצינורות הפיזומטרים וסתימתם למעבר של מים והגעה לשיווי משקל.

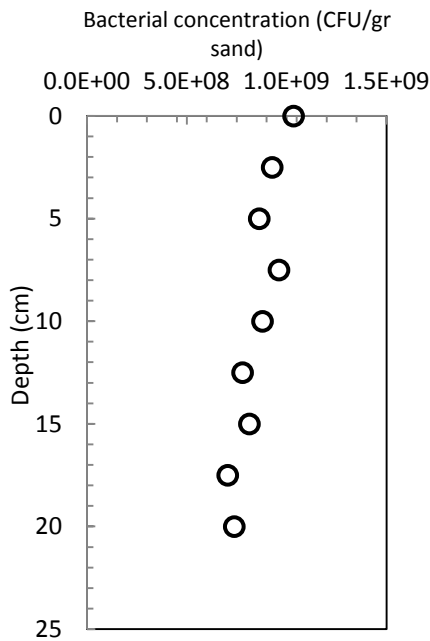


איור 3.7 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי במערכת הראשונה (עמודה צרה), בשטף של 1cm/h עם תמיסת מזון: (a) tap-water + glucose, (b) m63+ 0.2% glucose, ו- (c) LB-no salt. ציר y, Depth, מתאר את המרחק מהקצה העליון של העמודה.



איור 3.8 השתנות המוליכות החשמלית הממוצעת לאורך העמודה. עם החלפת ריכוז הפחמן.

#### ניסוי 4:



מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:

$$A = 18.47 \text{ cm}^2, \text{ גובה עמודת החול: } 23 \text{ cm}$$

נקבוביות:  $\phi = 0.35$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" נשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 1).

תמיסת מזון: 0.25X (כלומר, (0.25xM63+(1% glucose).

המוליכות החשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.45 \text{ S/m}$ ,

שטף:  $5 \text{ cm/h}$ .

ניסוי זה נערך בתנאים של ריכוז נמוך של מינרלים (0.25x),

ריכוז גבוה של גלוקוז (1%) ושטף גבוה ( $5 \text{ cm/h}$ ). לאחר

שלושה ימים מתחילת הניסוי עלו פני השטח של עמודת החול,

כנראה כתוצאה מפעילות חיידקים, ויצירת בועות אוויר. ביום

ה-4 הוחלף כיוון הזרימה (לכלפי מעלה) בכדי לנסות לדחוק

את האוויר, בנוסף, הורד ריכוז הגלוקוז ל- 0.2% (ביום ה-6). הירידה בריכוז הגלוקוז גרמה לעלייה

במוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) ובמוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) במקדם הדיאלקטרי לא התקבלו שינויים

סיסטמטיים (איור 3.10). ניתן לראות, באיור 3.10 (ובאיור 3.20), את ההתאמה הטובה בין שלוש השיטות

למדידת המוליכות החשמלית הנדמית: באמצעות מכשיר ה- Radiometer EC meter, ומכשיר ה- TDR עם

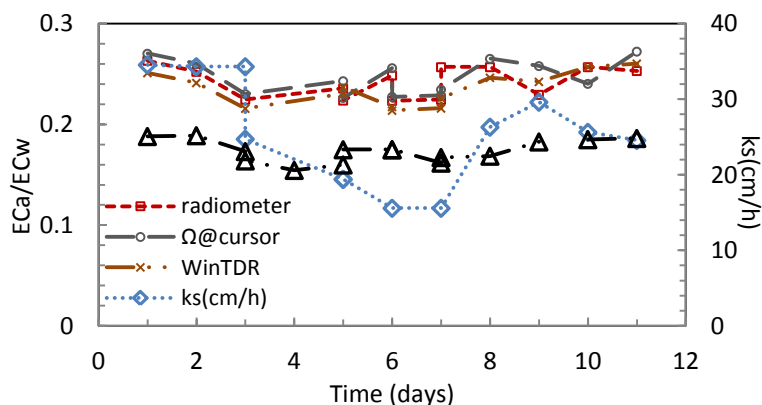
שימוש בתוכנת ה- WinTDR או בפונקציית  $\Omega@cursor$  של המכשיר. פירוס החיידקים מראה על ריכוז

גבוה ומסודר לאורך העמודה ומופיע באיור 3.9. איורים 3.11, 3.12 ו- 3.13 מראים את הקשר בין שלושת

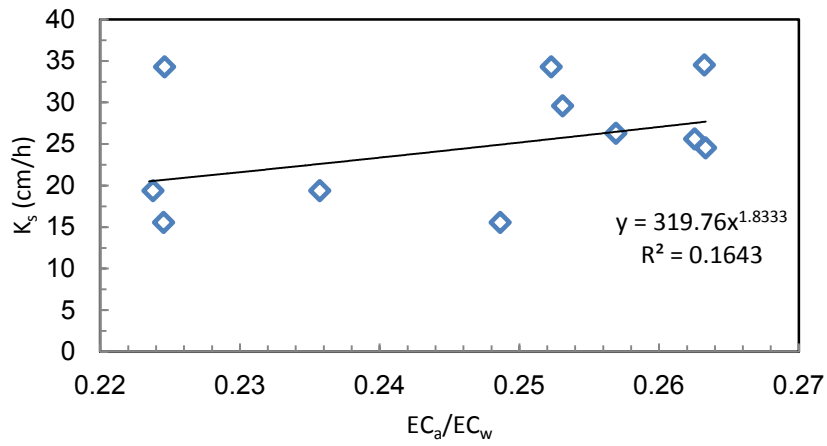
תכונות ההולכה של מצע החול המושפע מביופילם לאורך תקופת הניסוי. כאשר מקדם הרגרסיה עבור הקשר

בין שתי תכונות ההולכה החשמליות גבוה ביחס למקדם הרגרסיה בין התכונות ההידראולית לחשמליות (0.77

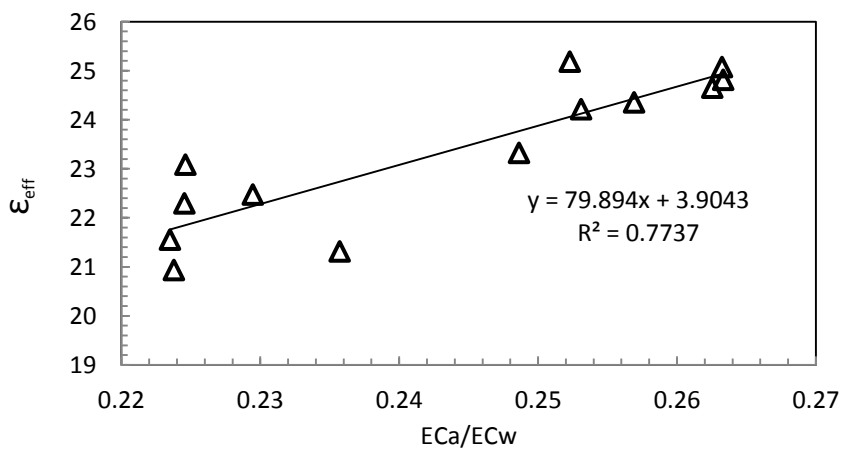
לעומת 0.16 ו- 0.38).



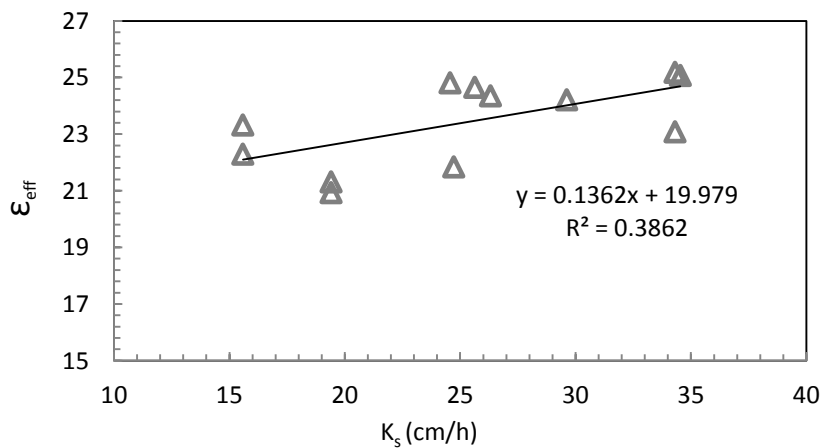
איור 3.10 השתנות המוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) בשלוש שיטות מדידה:  $\Omega@cursor$ , WinTDR, Radiometer EC meter, המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) והמקדם הדיאלקטרי ( $\epsilon$ ) לאורך תקופת ניסוי הזרימה.



**איור 3.11** קשר בין המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) למוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_d/EC_w$ ) (ממדידות באמצעות Radiometer (EC meter)).



**איור 3.12** קשר בין המקדם הדיאלקטרי ( $\epsilon_{eff}$ ) למוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_d/EC_w$ ).



**איור 3.13** קשר בין המקדם הדיאלקטרי ( $\epsilon_{eff}$ ) למוליכות ההידראולית ( $K_s$ ).

## ניסוי 5:

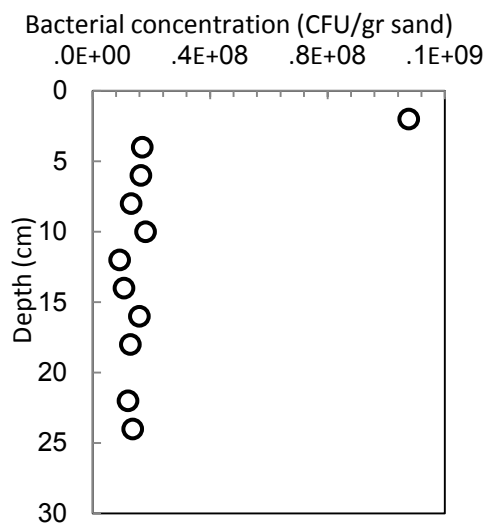
מערכת הניסוי: עמודה צרה, שטח חתך:  $A = 11.52 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 25 cm. נקבוביות:  $\phi = 0.35$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" נשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* - PA01

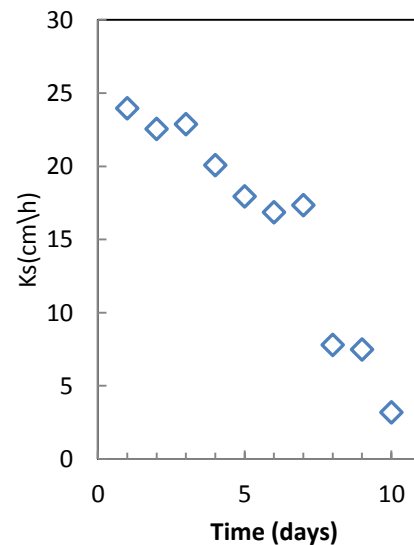
תמיסת מזון: 0.25X (כלומר, (0.25x(M63+0.4% citrate).

שטף: 2.25 cm/h

החלפת החיידק בכדי לבדוק את יכולתו ליצור ביופילם בתנאי רוויה בקרקע. עם החיידק PA01, כמו גם בניסויים רבים אחרים שנעשו במערכת הזרימה הראשונה (זרימת המים כלפי מטה), נוצרה שכבת ביופילם עד לעובי של 5 mm על פני החול, בחלק בעליון של העמודה. לכן, לפני כל מדידה של המוליכות ההידראולית היה צורך בגירוד/הסרת השכבה מפני השטח (באמצעות ספטולה). בשבוע הראשון נמדדה ירידה של 40% במוליכות ההידראולית הממוצעת. ביום השביעי מתחילת הניסוי נראתה בועת אוויר גדולה בתחתית העמודה, אשר אחראית, כנראה לפחיתה החדה במוליכות ההידראולית (איור 3.15). החיידק PA01 התרבה משמעותית רק ב- 2 cm העליונים של העמודה (איור 3.14). לכן, ניתן להניח שהפחיתה במוליכות ההידראולית במהלך 6 הימים הראשונים התרחשה רק בחלק זה של העמודה, מכאן שהפחיתה במוליכות ההידראוליות ב- 2 cm העליונים גדולה בהרבה מ- 40%.



איור 3.14 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי.



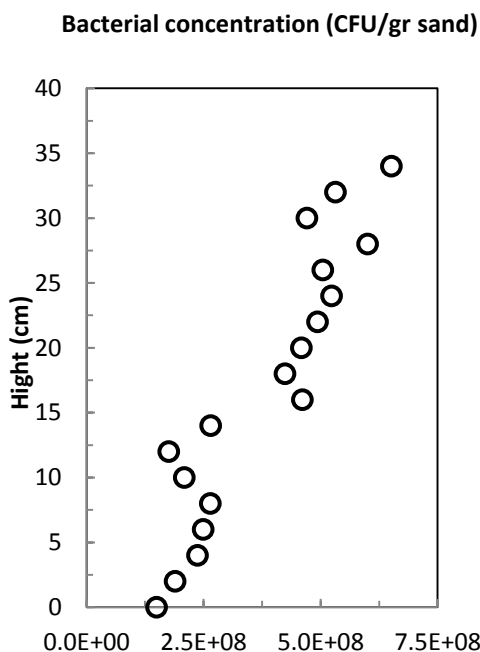
איור 3.15 השתנות המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) לאורך ניסוי האיטום הביולוגי

## ניסוי 6:

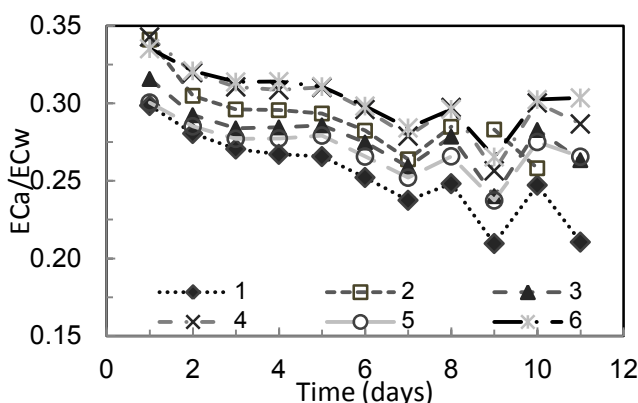
מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 6 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 34 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.36$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" נשטף במים מזוקקים.

חיידק: מוטנט של החיידק *P. aeruginosa* ATCC 27853

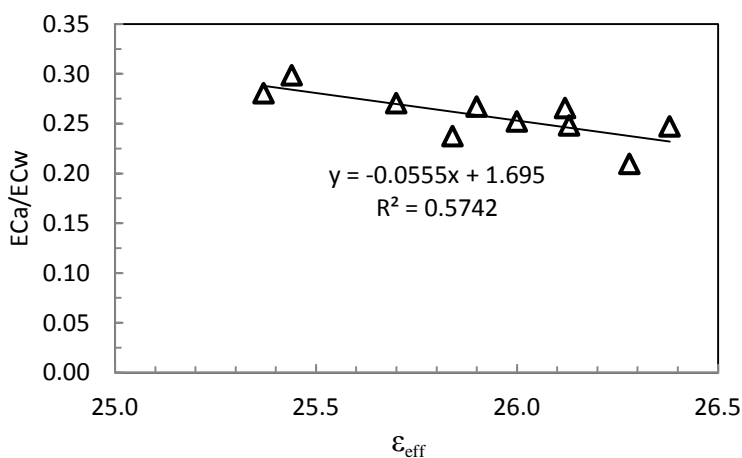
תמיסת מזון: 0.25X (כלומר,  $(0.25 \times (M63 + 0.4\% \text{ citrate}))$ ). מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.55$  S/m (גבוהה במקצת מהערך הרגיל בריכוז זה), שטף:  $1 \text{ cm/h}$ . בניסוי זה נבחנה יכולת יצירת ביופילם בעמודה רוויה של זן מוטנטי של חיידק המודל. בשבוע הראשון נמדדה ירידה רציפה ב-  $EC_d/EC_w$ . העלייה ביום ה-9 כנראה קשורה להופעת תנאים מחזרים (איור 3.17). המחשה של התפתחות תנאים אנאירוביים (FeS) בעמודה מובאת באיור 3.19 (הצילומים מניסוי אחר בו היה שימוש בעמודה צרה). הניסוי הופסק בשל השחרה ופערים בין הריכוז של המוליכות החשמלית ( $EC_w$ ) בכניסה וביציאה מהעמודה. פירוס החיידקים לאורך העמודה בסוף הניסוי מתואר באיור 3.16 המקדם הדיאלקטרי נמצא בקורלציה שלילית עם המדידות של המוליכות החשמלית הנדמית. באיור 3.18 ניתן לראות את הקשר בין המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) לפחיתה במוליכות החשמלית  $EC_d/EC_w$  לפי המחוש העליון בעמודה (TDR 1).



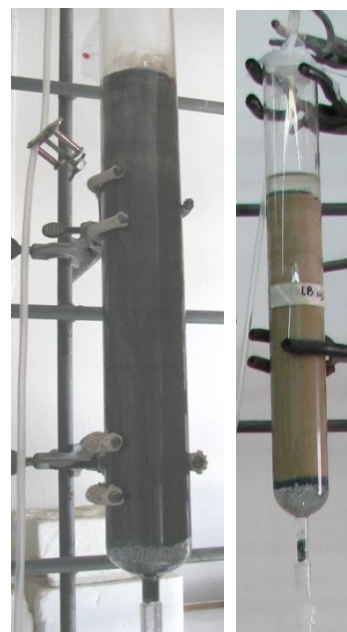
איור 3.16 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי.



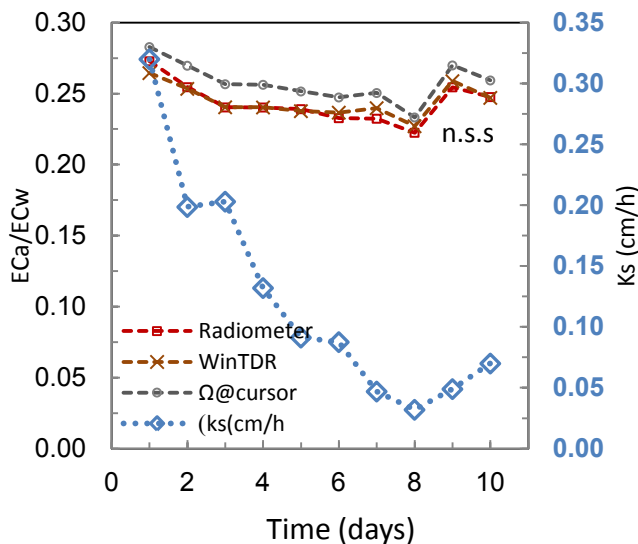
איור 3.17 השתנות  $EC_d/EC_w$  על ידי 6 מחושי TDR הממוקמים בעומקים של 4.5, 9.5, 14.5, 19.5, 24.5, 29.5cm מהחלק העליון של העמודה.



איור 3.18 הקשר בין  $EC_d/EC_w$  למקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) בעמודה רחבה, בחלק העליון של העמודה (TDR 1).



איור 3.19 השחרה של המצע כתוצאה מהתפתחות תנאים אנאירוביים (FeS) בעמודה. מימין. חול קוורץ ללא משקע FeS. משמאל. חול קוורץ עם המשקע.



**איור 3.20** השתנות המוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) בשלוש שיטות מדידה: Radiometer EC meter, WinTDR,  $\Omega$ @cursor והמוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) לאורך תקופת ניסוי הזרימה (n.s.s = non sterile solution).

### ניסוי 7:

מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:  $A = 20.11 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 30 cm. נקבוביות:  $\phi = 0.38$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ נקי ( $< 75 \mu\text{m}$ ). חיידק: *P.aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2). תמיסת מזון: 0.25X (כלומר,  $(0.25 \times (\text{M63} + 0.4\% \text{ citrate}))$ ).

מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.6$  S/m שטף: 1 cm/h.

עד הופעת זיהום בתמיסת המזון (יום 9) ניתן

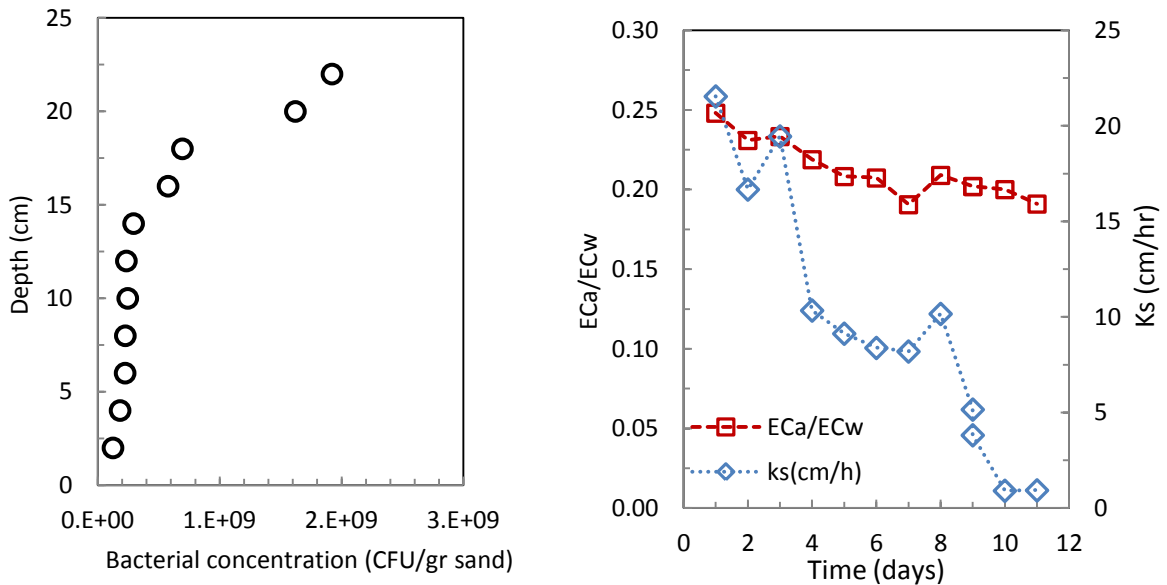
לראות פחיתה רציפה ב- $EC_a/EC_w$  (איור 3.20). בנוסף, ניתן לראות באיור 3.20 גם את ההתאמה הטובה בין שלוש השיטות למדידת המוליכות החשמלית הנדמית. המדידות של המקדם הדיאלקטרי לא הראו שינוי משמעותי לאורך הניסוי. בתחילת הניסוי ניתן לראות ירידה חדה במוליכות ההידראולית לעומת ירידה רציפה ומתונה במוליכות החשמלית. לקראת סוף הניסוי, גם הפחיתה במוליכות ההידראולית נעשית מתונה יותר. ביומיים האחרונים (יום 9 ו-10) חלה עליה הן במוליכות החשמלית הנדמית כנראה כתוצאה מזיהום ו/או היווצרת משקע ברזל-סולפיד והן במוליכות ההידראולית כנראה משום שבתמיסת המזון המזוהמת היה חסר נוטריאנט חיוני, מה שגרם לניתוק חלקי של הביופילמים. באיור 4.1c (פרק 4) הוצאו שתי הנקודות האחרונות על מנת להראות את הקשר בפחיתה היחסית של שני המשתנים עם היאטמות עמודת החול. חלקיקים דקים ( $75 \mu\text{m}$ ) נוטים להרחפה בתמיסה מימית ולכן לא התאפשרה ספירת החיידקים בשיטת Bradford.

### ניסוי 8:

מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:  $A = 20.11 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 22cm. נקבוביות:  $\phi = 0.36$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160". חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2). תמיסת מזון: 0.25X (כלומר,  $(0.25 \times (\text{M63} + 0.4\% \text{ citrate}))$ ). מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 0.55$  S/m, שטף: 1.5 cm/h.

הירידה המתונה ב- $EC_a/EC_w$  (בערך 25%) יחד עם ירידה חדה יותר ב- $K_s$  (בסדר גודל אחד) המוצגות באיור 3.21, תואמות לציפיות מניסויי איטום ביולוגי. התפתחות מאסיבית של מסת החיידקים בעיקר בחלק העליון של העמודה (איור 3.22) מעידה על תהליכי איטום בעיקר בחלק זה. המדידות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  מיוחסות לתכונה ממוצעות של עמודת החול, כאשר המיצוע של המוליכות החשמלית לאורך 15 cm של מחוש ה-TDR (מרבית העמודה) הוא אריתמטי בעוד המיצוע של המוליכות ההידראולית הוא הרמוני. מכאן

שהשפעת החיידקים על המוליכות ההידראולית בחלק העליון של העמודה גדולה יותר מהערך המדוד שהתקבל. ערכי המקדם הדיאלקטרי בניסוי זה לא השתנו באופן משמעותי.



איור 3.21 השתנות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי. איור 3.22 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי.

### ניסוי 9:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 6 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 34 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.40$ , מצע גרנולרי: חול דיונה ( $< 400 \mu\text{m}$ ) נשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2). תמיסת מזון: 0.25X

(כלומר,  $0.25x(M63+0.2\% \text{ citrate})$ )

מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w =$

0.55 S/m (גבוהה במקצת מהערך הרגיל

בריכוז זה), שטף: 2 cm/h.

בניסוי זה, הוחלף סוג החול ובנוסף, לאחר

אריזת העמודה, זמן ההמתנה לפני תחילת

ניסוי הזרימה היה 15 שעות (בשאר

הניסויים זמן ההמתנה היה שעתיים).

ערכים גבוהים של  $EC_a/EC_w$  התקבלו

כנראה בשל התרומה של הקטיונים

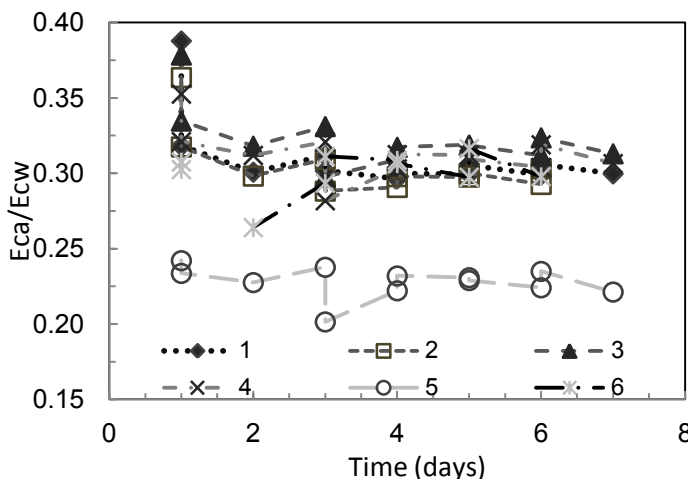
הספוחים למוליכות החשמלית של העמודה

(איור 3.23). חלקיקי החרסית התפזרו באופן הטרוגני לאורך העמודה, בגלל הרחפתם במים והצטברו בעיקר

בחלק העליון. כנראה, הסיבה לפחיתה של ה- $EC_a/EC_w$  רק בחלק זה ובתחילת הניסוי. לאחר שטיפתם של

מרבית החלקיקים העדינים כבר לא נראה שינוי במוליכות החשמלית. המוליכות החשמלית של התמיסה

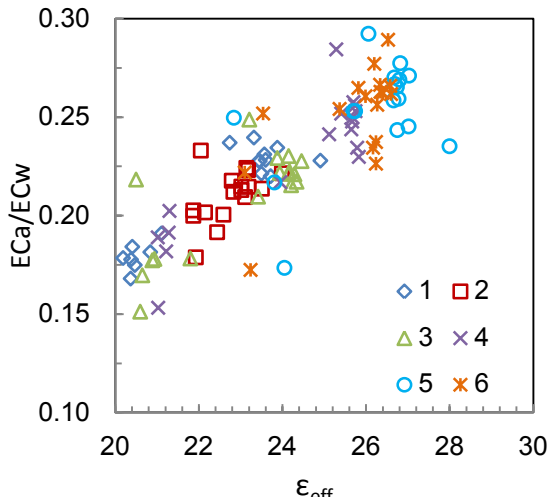
( $EC_w$ ) ביציאה מהעמודה הייתה גבוהה מהמוליכות בכניסה (בעיקר בימים הראשונים לניסוי). העלייה הקטנה



איור 3.23 השתנות  $EC_a/EC_w$  על ידי 6 מחושי TDR הממוקמים בעומקים של 4.5, 9.5, 14.5, 19.5, 24.5, 29.5cm מהחלק העליון

ב-  $EC_a/EC_w$  ביום ה-2 לניסוי היא כתוצאה מהחלפה של תמיסת המזון. המוליכות ההידראולית לא השתנתה בהרבה לאורך תקופת הניסוי (תוצאות לא מובאות). מהתוצאות הנמדדות של שתי תכונות ההולכה ניתן להסיק כי החיידקים לא נספחו לגרגרי החול, ייתכן שבזמן ההמתנה (לפני תחילת הזרימה) נוצר בעמדה מחסור בחמצן שהשפיע על המצב הפיזיולוגי של החיידקים והם נשארו במצב פלנקטוני.

### ניסוי 10:



**איור 3.24** הקשר בין המוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) למקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) לפי 6 מחושי TDR הממוקמים בעומקים של 4.5, 9.5, 14.5, 19.5, 24.5, 29.5cm מהחלק העליון של העמדה, לאורך תקופת הניסוי.

הייתה נמוכה מהצפוי (תוצאות לא מובאות). הקשר בין המדידות של  $EC_a/EC_w$  ל- $\epsilon_{eff}$  ב-6 מחושי ה-TDR מוצג באיור 3.24.

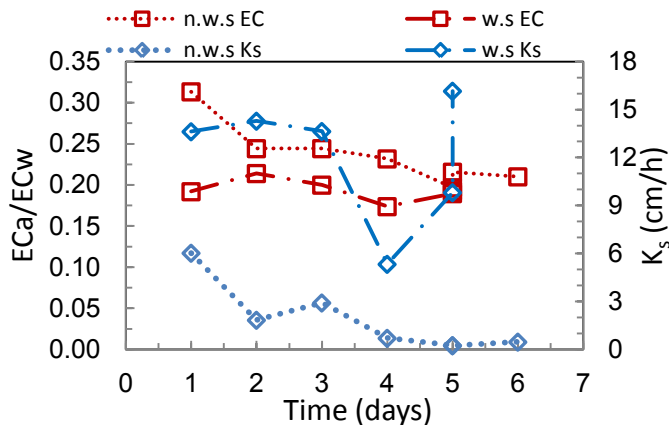
### ניסוי 11:

מערכת הניסוי: עמדה צרה, עם מחוש TDR אנכי שתי עמודות במקביל: חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2). שטף: 1cm/h.

1. מצע גרנולרי: חול קוורץ "160", לא-שטוף, נקבוביות:  $\phi = 0.30$ .

תמיסת מזון:  $0.5x(M63 + 0.4\% citrate)$ . מוליכות חשמלית של התמיסה:  $EC_w : 1.1 S/m$ .





2. מצע גרנולרי: חול קוורץ "160", שטוף במים מזוקקים, נקבוביות:  $\phi = 0.34$ . תמיסת מזון:  $0.5 \times M63 + 0.4\%$  citrate +  $1\text{mM Ca}(\text{NO}_3)_2$ . מוליכות חשמלית של התמיסה:  $EC_w: 1.0 \text{ S/m}$

איור 3.25 השתנות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי עם חול שטוף (w.s) וחול לא-שטוף (n.w.s).

בתחילת הניסוי,  $EC_a/EC_w$  בעמודת החול הלא-שטוף הייתה גבוהה יותר

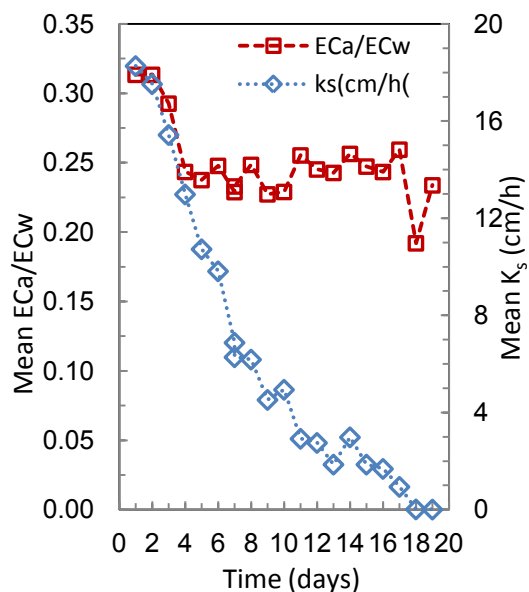
מאשר בעמודה עם החול השטוף, בגלל התרומה של הקטיונים הספוחים למוליכות החשמלית הנדמית של עמודת החול ( $EC_a$ ). הפחיתה ב- $EC_a/EC_w$  משמעותית יותר בעמודה הלא שטופה (איור 3.25), אך חלק גדול מכך נובע משטיפה של מלחים מסיסים שנשטפו החוצה בימים הראשונים לניסוי וגרמו לעלייה ב- $EC_w$  ביציאה ולפחיתה ב- $EC_w$  בתוך העמודה. הפחיתה במוליכות ההידראולית הייתה חדה יותר בעמודה עם החול הלא-שטוף, בערך בסדר גודל. הסיבה להוספה של  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  לעמודה השנייה הייתה בכדי לבדוק האם סידן יכול להגדיל את יצירת הביופילם בעוד הניטראט יכול לשמש כמקבל אלקטרונים במקום חמצן כשמתפתחים תנאים אנאירוביים.

### ניסוי 12:

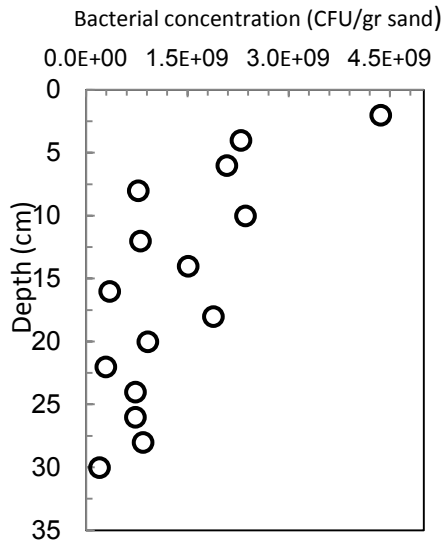
מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 5 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 30 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.37$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" לא-שטוף. חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2).

תמיסת מזון: 1X (כלומר,  $1x (M63+0.4\% \text{ citrate})$ ). מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 1.8 \text{ S/m}$ . שטף:  $0.5 \text{ cm/h}$ .

ניסוי זה נערך עם חול לא-שטוף. ריכוז תמיסת המזון גבוה (1X), השטף יחסית נמוך ( $0.5 \text{ cm/h}$ ) וכיוון הזרימה היה כלפי מטה. חלק מהירידה ב- $EC_a/EC_w$  בתחילת הניסוי, קשור באי-דיוק בקביעת ה- $EC_w$  הנובע מהרחקה של מלחים מומסים מהחול הלא-שטוף (איור 3.26). הקפיצות הקטנות בגרף מעידות על החלפה של תמיסות (או כתוצאה מזיהום או כשהתרוקן הכלי) והעלייה הברורה בסוף הניסוי תואמת לזמן היווצרות תנאים מחזרים בעמודת החול. ייתכן, ולולא הפרעות אלו, הפחיתה במוליכות החשמלית הייתה בולטת



איור 3.26 השתנות של  $EC_a/EC_w$  (ממוצע של 5 TDR) ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי.



איור 3.27 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי.

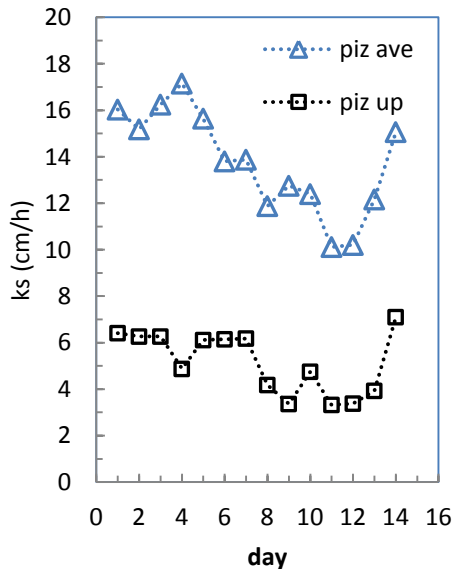
יותר. לעומת זאת, הפחיתה במוליכות ההידראולית ניכרת באופן ברור ש- $K_s$  מגיעה בסוף הניסוי לכמעט אפס, כלומר לגבול המדידה האפשרי (איור 3.26). יחד עם המדידות של ריכוז החיידקים (איור 3.27) נראה כי התנאים בניסוי זה אפשרו התפתחות של ביופילם ואיטום ביולוגי. אוכלוסיית החיידקים התפתחה עד לריכוז הגבוה מ- $10^9$  CFU/gr sand לא רק בסנטימטרים העליונים, אלא באופן ניכר גם בתחתית העמודה, בעומק 20 cm. בגלל הריכוז הגבוה של תמיסת המזון לא ניתן היה למדוד את המקדם הדיאלקטרי.

ניסוי 13:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 4 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 24 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.38$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" לא-שטוף. חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2).

תמיסת מזון:  $0.5 \times (\text{m63} + 0.2\% \text{ glycerol})$ . מוליכות חשמלית של התמיסה:  $EC_w = 1 \text{ S/m}$ . שטף: 1 cm/h.

ניסוי זה התבסס על מבחן מקדים בפלטות ELISA להתפתחות ביופילם (איור 2.2). נראה כי בניסויי הזרימה



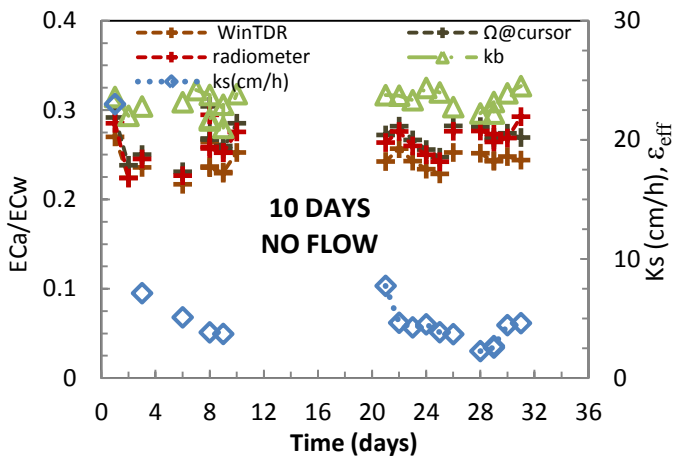
איור 3.28 השתנות של המוליכות ההידראולית לאורך הניסוי.  $\text{piz ave}$  = ממוצע של המוליכות ההידראולית לאורך העמודה,  $\text{piz up}$  = מוליכות ההידראולית מדודה בחלק העליון של העמודה.

החיידק *P. aeruginosa* ATCC 27853 לא יצר ביופילם מפותח על פני גרגרי החול עם גליצרוֹל כמקור פחמן. לאורך הניסוי תמיסת המזון הזדהמה והוחלפה בתדירות גבוהה. שינוי במוליכות החשמלית ניכר רק לאחר החלפות של כלי התמיסה (תוצאות לא מובאות). ישנה פחיתה מתונה במוליכות ההידראולית עם הזמן, בחלק העליון של העמודה לעומת פחיתה חדה יותר לפי מיצוע של 4 מחושי TDR (איור 3.28). נראה כי על אף שמקור הפחמן המועדף על ידי החיידק ליצירת ביופילם בפלטות ELISA היה גליצרוֹל, בתנאי הזרימה של הניסוי התקבל ביופילם מפותח יותר עם ציטראט כמקור פחמן.

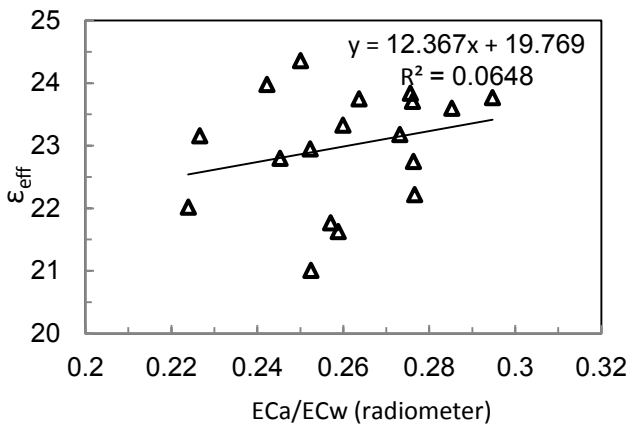
ניסוי 14:

מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:  $A = 20.11 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 22 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.50$ .

מצע גרנולרי: חול קוורץ דק (90-106  $\mu\text{m}$ ), לא שטוף. חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2).



איור 3.29 השתנות המוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) בשלוש שיטות מדידה: WinTDR, Radiometer EC meter,  $\Omega@cursor$  המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) והמקדם הדיאלקטרי ( $\epsilon$ ) לאורך תקופת ניסוי הזרימה



איור 3.30 הקשר בין  $EC_a/EC_w$  למקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ) בעמודה לאורך תקופת הניסוי.

תמיסת מזון: הוחלפו במהלך הניסוי:  
יום 1-2: 0.25xM63+0.2% glucose;  
יום 3-7: 0.25xM63+0.1% glucose;  
יום 8 ועד סוף הניסוי: 0.25x(M63+0.4% citrate)

שטף: 2 cm/h, בין הימים 11-21 לא היה שטף ( $q = 0$ ).

בניסוי זה ריכוז וסוג מקור הפחמן הוחלפו ובנוסף, לאחר 8 ימי מדידות נעצר השטף למשך 10 ימים. בתקופת הזרימה, נשאר השטף קבוע על  $q = 2$  cm/h עד היום ה-9 מתחילת הניסוי המוליכות ההידראולית פחתה בערך בכ- 88% מערכה ההתחלתי, ה- $EC_a/EC_w$  והמקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ירדו בשיעור של כ-16% ו-18%, בהתאמה (איור 3.29). כשהמערכת חזרה למצב זרימה לאחר הפסקה של 10 ימים, תכונות ההולכה של המצע נשארו כפי שהיו לפני הפסקת השטף. ישנה קורלציה חיובית, אך חלשה בין המדידות של  $\epsilon_{eff}$  ו- $EC_a/EC_w$  לאורך תקופת הניסוי (איור 3.30).

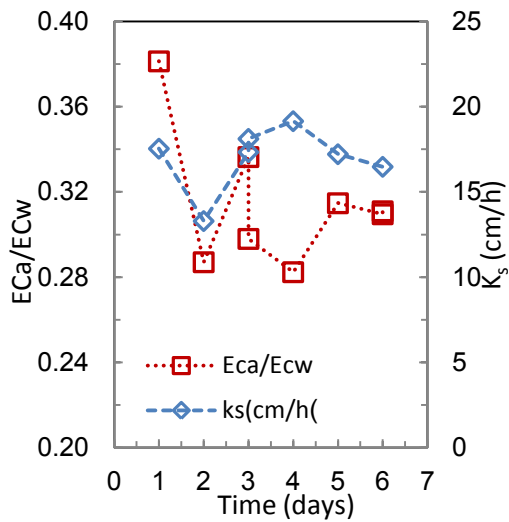
### ניסוי 15:

מערכת הניסוי: עמודה רחבה עם 4 מחושי TDR אופקיים, שטח חתך:  $A = 136.8$  cm<sup>2</sup>, גובה עמודת החול: 25 cm, נקבוביות:  $\phi = 0.38$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160" לא-שטוף.

חיידק: *Erwinia amylovora* 238

תמיסת מזון: ( $0.5 \times (M63+0.4\% \text{ citrate})$ ). מוליכות חשמלית של התמיסה  $EC_w = 1$  S/m. שטף: 2 cm/h. החיידק *Erwinia amylovora* 238 נמצא כבעל כושר ליצור כמות משמעותית של ביופילם בפלטות 96 בארות (איור 2.2). ממדידות של המוליכות ההידראולית והחשמלית ניתן לקבוע שלא התפתח הרבה ביופילים בעמודה לאורך הניסוי (איור 3.31). התנודות ב- $EC_a/EC_w$  נבעו מהפרשים במדידה של ה- $EC_w$ , בין הכניסה ליציאה מן העמודה. פיזור ריכוז החיידקים לאורך העמודה גם כן תומך בממצאים כי בניסוי זה לא התפתח ביופילם משמעותי (תוצאות לא מובאות). בחלק העליון של העמודה, למשל, ריכוז החיידקים הגיע רק ל- $7.4E+08$  CFU/gr sand.

### ניסוי 16:

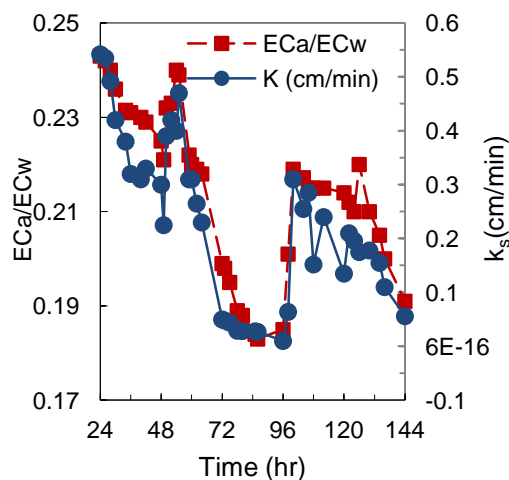


איור 3.31 השתנות של  $EC_a/EC_w$  (ממוצע של 4 מחושי TDR) ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי.

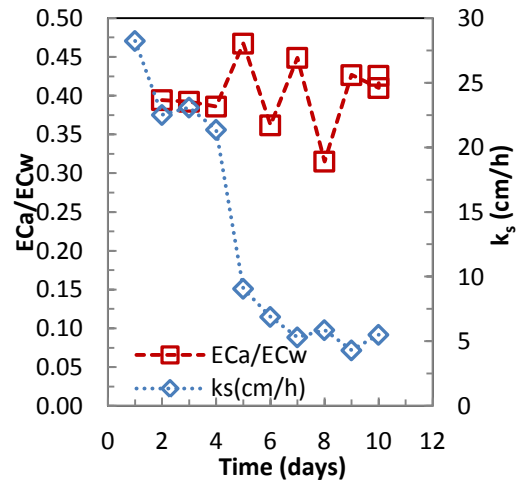
מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:  $A = 20.11 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 25cm, נקבוביות:  $\phi = 0.34$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160", נשטף במים מזוקקים. חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2). תמיסת מזון: LB ו-0.1 x LB מוליכות חשמלית של התמיסות  $EC_w = 0.09 \text{ S/m}$  ו- $EC_w = 0.38 \text{ S/m}$ , בהתאמה. שטף: 5cm/h.

בהתבסס על בחינת התפתחות ביופילם בפלטות 96 בארות (איור 2.2) ועל תוצאות ניסוי מקדים, עם תמיסת LB (0.8-0.5x) (איור 3.32). הוחלט לבצע ניסוי זרימה עם חיידק המודל *P. aeruginosa* בשני ריכוזי תמיסה שונים: LB ו-0.1x LB במקביל.

הניסוי עם LB הופסק לאחר שלושה ימים בגלל יצירה מוגברת של בועות גז. בעמודת LB 0.1x, מדידות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  הצביעו על איטום (*bioclogging*) עם הזמן (איור 3.33). המוליכות ההידראולית פחתה ב-77% מערכה ההתחלתי והמוליכות החשמלית ירדה ב-20% מערכה ההתחלתי (עד להיווצרות משקע FeS ביום השמיני לאורך כל העמודה). התנודות בגרף של המוליכות החשמלית המדודה הן כתוצאה מהחלפות של כלי תמיסת המזון. ביום הרביעי לניסוי החלה השחרה בעמודה, אך בניגוד לניסויים אחרים, השפעתה על המוליכות החשמלית לא ניכרה בשלב זה, רק ביום השמיני של הניסוי החלה עלייה בתוצאות המדודות והתייצבות על ערכים גבוהים מהערך ההתחלתי. בתחילת המחקר הוחלט לא לעבוד עם מצע מזון LB בגלל ההרכב הכימי הלא-מוגדר שלו. לאור ההבדלים הגדולים ב- $EC_w$  בין הכניסה ליציאה מהעמודה, הנובעים כנראה, מפעילות מיקרוביאלית והפיכתם של תרכובות לא טעונות לטעונות, נראה כי השימוש בתמיסה זו כמקור מזון הוא בעייתי.



איור 3.32 השתנות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי עם מחוש TDR בניסוי מקדים למחקר זה.



איור 3.33 השתנות של  $EC_a/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי עם מחוש TDR.

ניסוי 17 במצע מזון שהוצע לפי Cunningham:

ניסוי 17.1:

מערכת הניסוי: עמודה צרה, עם מחוש TDR אנכי, שטח חתך:  $A = 18.09 \text{ cm}^2$ , גובה עמודת החול: 21 cm. נקבוביות:  $\phi = 0.37$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160", נשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2).

תמיסת מזון: תמיסת מזון Cunningham (1991) כמפורט בפרק 2.  $EC_w = 0.047 \text{ S/m}$

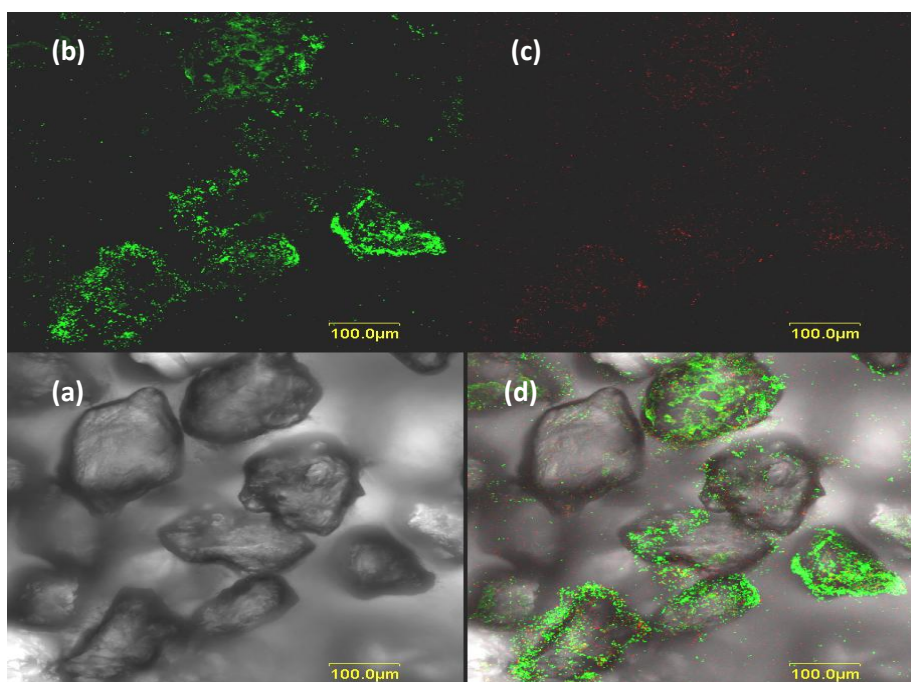
שטף: 5.5 cm/h

תמיסה זו הכילה תוספת של מתכות וסידן ( $\text{CaCO}_3$ ) שלא היו בתמיסת במצע M63 (פרק 1). יחד עם זאת, ריכוז הפחמן בתמיסה זו נמוך פי 160 מריכוז הפחמן בתמיסת M63 + 0.4% citrate, לפי  $1 \times$ , כך, שבניסוי זה הפחמן היווה גורם מגביל ולא החמצן וכתוצאה מכך, לא נוצרו תנאים אנאירוביים בתחתית, לאורך השבועיים בהם נערך הניסוי.

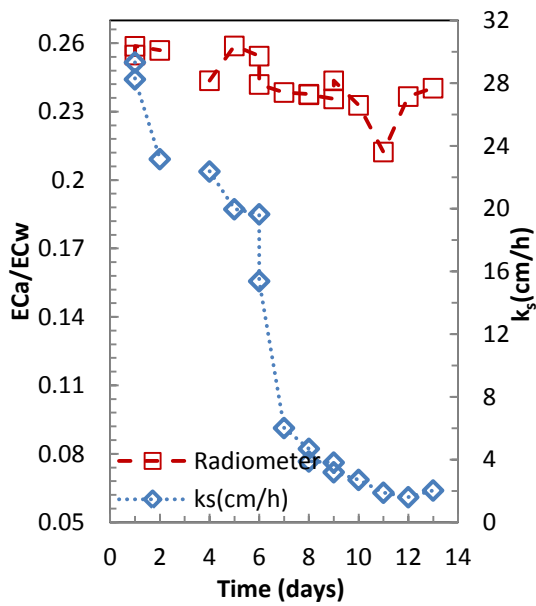
יחד עם זאת, היחס C/N בניסוי זה עלה פי 3 (מיחס מולרי C/N של 2.7 בתמיסת M63 ליחס של 8.4

בתמיסת Cunningham).

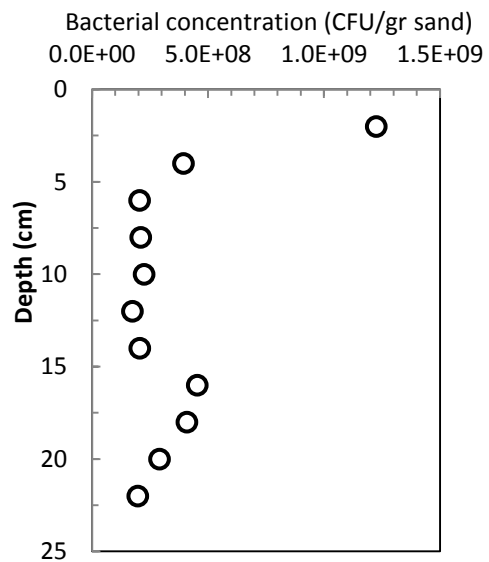
פחיתה משמעותית במוליכות ההידראולית נראתה כבר ביום השלישי לניסוי ובסוף הניסוי, המוליכות ההידראולית ירדה ב- 94% מערכה ההתחלתי, כל המדידות נעשו לאחר גירוד של שכבת הביופילם שנוצרה בפני השטח, בחלק העליון של העמודה. המוליכות החשמלית ירדה ב- 10% לעומת ערכה הנקי (איור 3.35). מצילומי המיקרוסקופ הקונפוקלי (איור 3.34) ניתן לראות מספר רב של חיידקים (רובם חיים- צבע ירוק) ספוחים לגרגרי הקוורץ בחלק העליון של העמודה. יחד עם זאת, לא נראה כיסוי מלא של גרגרי הקוורץ בחיידקים. ריכוז החיידקים בחלק העליון של העמודה הגיע ל-  $1.23 \times 10^9 \text{ CFU/gr sand}$  (איור 3.36).



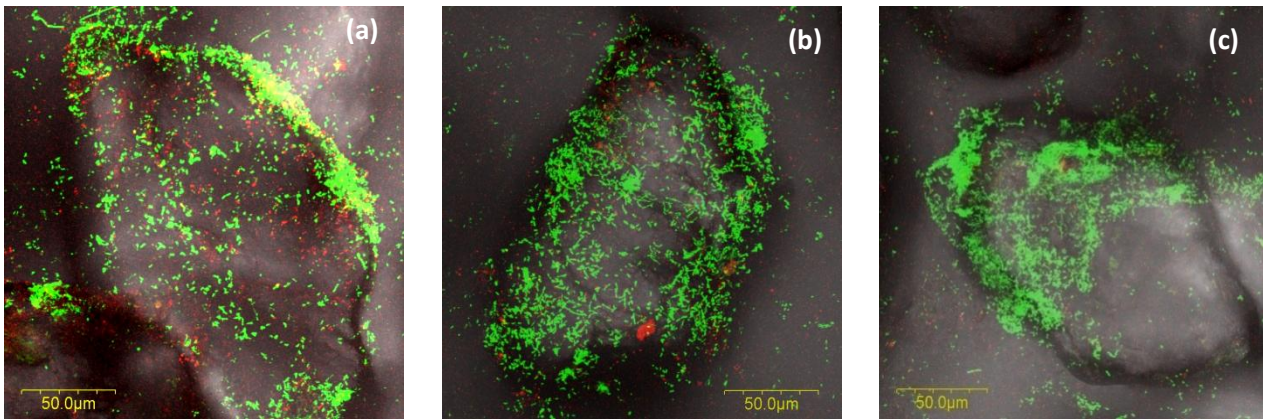
איור 3.34 צילום CSLM של דוגמת חול עם חיידקים צבועים ב-Live/Dead Kit, אורך סרגל 100µm (a) דוגמת החול, (b) פירוס חיידקים חיים (ירוק), (c) פירוס חיידקים מתים (אדום), (d) שילוב של חיידקים מתים וחיים על פני גרגרי החול.



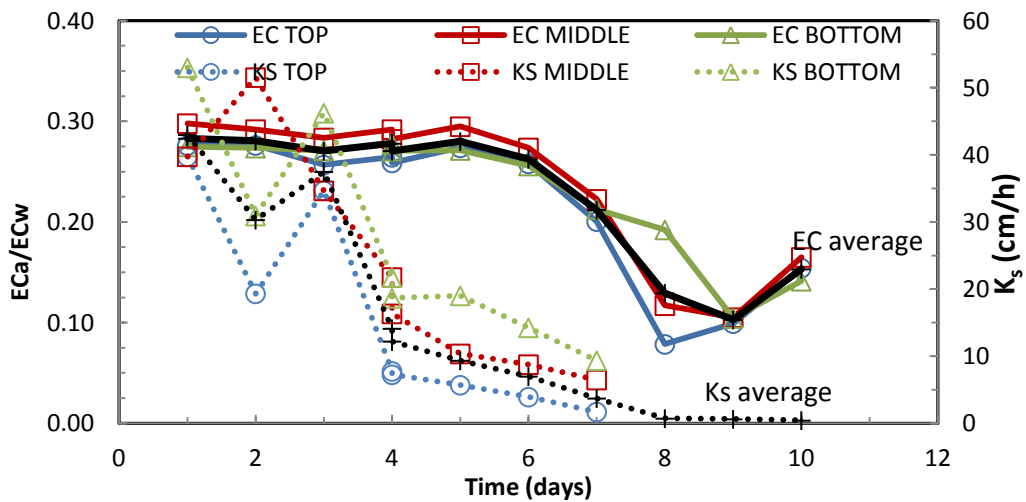
איור 3.35 השתנות של  $EC_d/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי.



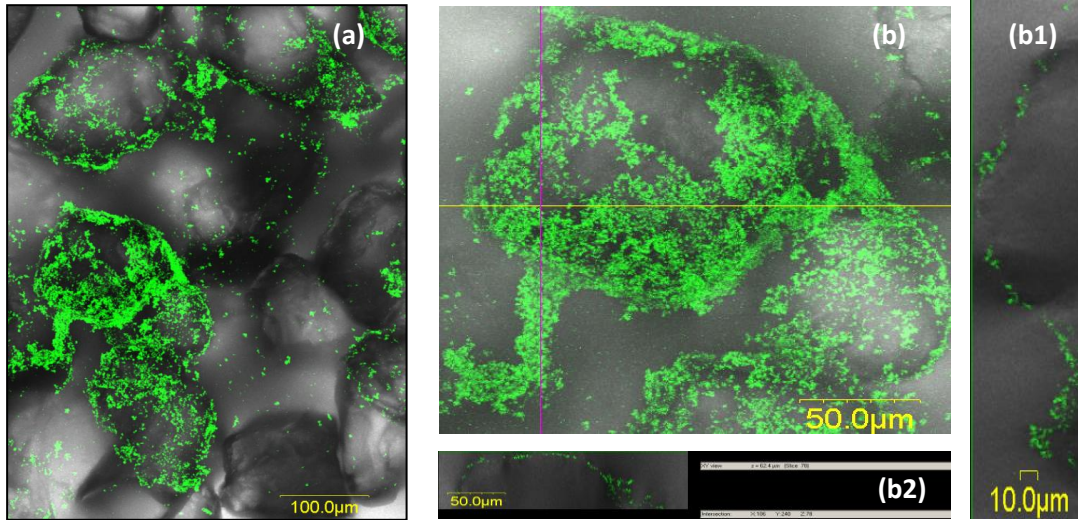
איור 3.36 פירוס אנכי של ריכוז החיידקים בסוף הניסוי.



איור 3.37 שלושה גרגרי חול מאזורים שונים בעמודה צבועים ב-Live/Dead Kit, אורך סרגל  $50\mu m$ . (a) חלק תחתון, (b) אמצע העמודה, (c) חלק עליון.



איור 3.38 השתנות של  $EC_d/EC_w$  ו- $K_s$  לאורך תקופת הניסוי בחלקים שונים בעמודה. באדום-החלק העליון, כחול- אמצע, ירוק- חלק תחתון ושחור- ממוצע של כל המקטעים.



**איור 3.39** צילומי CLSM של דוגמת חול עם חיידקים צבועים ב-DTAF. (a) צילום תצורת ביופילם על גבי מספר גרגרי חול, אורך סרגל 100µm. (b) התמקדות על 4 גרגרי חול מכוסים ומחוברים בניהם על ידי מטריקס EPS, אורך סרגל 50µm. (b1) מבט מהצד, ציר אנכי, על עובי הביופילם, אורך סרגל 10µm. (b2) מבט מהצד, ציר אופקי, על עובי הביופילם, אורך סרגל 50µm.

## ניסוי 17.2:

נקבוביות:  $\phi = 0.36$ , מצע גרנולרי: חול קוורץ "160", נשטף במים מזוקקים.

חיידק: *P. aeruginosa* ATCC 27853 (סטוק 2).

תמיסת מזון: תמיסת Cunningham (1991) כמפורט בפרק 2.

$EC_w = 0.048$  S/m

שטף: 5 cm/h

בשלושת הימים הראשונים לניסוי תמיסת המזון הייתה זהה לתמיסה המתוארת בניסוי הקודם (ניסוי 1). זיהום התמיסה גרם לעלייה קטנה במוליכות החשמלית, בין יום 3 ל-4. ביום ה-4 הוחלפה התמיסה המזוהמת בחדשה ובה ריכוז הגלוקוז הוכפל פי 4, לאחר שלושה ימים נוספים הוכפל ריכוז הגלוקוז פי 8 מערכו ההתחלתי. באופן כללי, ניתן לראות ירידה בתכונות ההולכה של עמודת החול. מעניין לציין, שלאורך הניסוי המוליכויות החשמליות שנמדדו בחלק העליון ובתחתית העמודה היו כמעט זהות למעט מדידות שנעשו כאשר תמיסת המזון הזדהמה ונמוכות מהמוליכות החשמלית באמצע העמודה. לאחר שבוע, אורך צינורות הפיזומטרים לא הספיק בכדי למדוד את הגרדיאנט בין הכניסה ליציאה ולכן מדידת המוליכות ההידראולית נעשתה בלעדיהם. ניתן לראות (איור 3.39) את הפחיתה במוליכות ההידראולית לאורך המקטעים בעמודה, כאשר הפחיתה המקסימאלית מתרחשת בחלק העליון ופחיתה מינימאלית בחלק התחתון של העמודה. בסוף הניסוי המוליכות ההידראולית הממוצעת ירדה בסדר גודל. הפחיתה במוליכות החשמלית בכ- 45% גבוהה פי 2 מהפחיתה בניסויים אחרים (בממוצע). גם בניסוי זה היה צורך בגירוד/הסרה של פני השטח, בתדירות גבוהה. ריכוז החיידקים בחלק העליון של העמודה הגיע ל-  $1.25E+9$  CFU/gr sand. דוגמת חול מהחלק העליון של העמודה נצבעה באמצעות DTAF נלקחה לצילום במיקרוסקופ קונפוקלי ומוצגת באיור 3.38.

### 2.3 דיון ומסקנות

ניסויי האיטום הביולוגי היוו את החלק הניסויי של מחקר זה. על מנת לקבוע את התנאים האידיאליים להתפתחות אוכלוסייה מיקרוביאלית והיווצרות ביופילם בקרקעות רוויות, ובמקביל לבחון את הקשר בין  $K_s$ - $EC_{a-eff}$  נערכו ניסויי זרימה רבים בהם נבדקו מגוון של מצעים גרנולריים: דק גרגר- חול קוורץ (160  $\mu m$ ) וקוורץ נקי ( $<75 \mu m$ ,  $65 \mu m-200 \mu m$ ), גס גרגר- חול דיונה ( $400 \mu m$ ), חיידק המודל ששימש לבדיקת איטום מיקרוביאלי היה החיידק *P. aeruginosa* ATCC27853 (אך נבחנו גם חיידקים נוספים) עם תמיסת מזון שונות (ריכוז התמיסה, יחסי C:N, מקור הפחמן) וקצבי שטפים שונים (בין  $0.5-5.5$  cm/h). להלן יובאו המסקנות והממצאים העיקריים מניסויי האיטום הביולוגי. חשוב לציין כי היכולת להשוואה בין הניסויים מוגבלת משום שברוב הניסויים (בתחילתם או במהלכם) שונה יותר מפרמטר אחד. אך יחד עם זאת, מתוצאותיהם של ניסויים רבים מסתמנת תמונה כללית:

- מהתוצאות המובאות להלן, מלבד הניסוי הראשון שמתואר בפרק זה- ניסוי 1, כל הניסויים נערכו בחול קוורץ דק גרגר. בהסתמך על כך ששטח הפנים הגדול של גרגר קטן, מעלה את פוטנציאל ההיצמדות של החיידקים אל פני השטח. רול (2007) הראתה כי גידול החיידק *P. aeruginosa* בחול דק בדרגות רוויה שונות, גבוה (אם כי בפקטור נמוך מהצפוי על פי שטח הפנים הסגולי) מגידולו בחול גס גרגר. מניסויים 6 ו-10 נראה כי התפתחות החיידקים על פני המקטע הדק הביאה לפחיתה משמעותית במוליכות ההידראולית. אך יחד עם זאת, בשל הרחפתו של חול דק גרגר, לא נעשה ביצוע כימות החיידקים בשיטת Bradford ולכן לא קיים דיווח כמותי של פירוס החיידקים לאורך העמודה. חול "160" נמצא כמתאים ביותר לביצוע ניסויי זרימה בעמודות ולקחת מדידות של המוליכות ההידראולית ועל כן רוב הניסויים נעשו באמצעותו. בנוסף, איטום ביולוגי התרחש בעוצמה גדולה יותר בחולות שלא נשטפו כלל לעומת חול שטוף במים מזוקקים בלבד או שטוף ב-5% חומצה מלחית.
- אילוח העמודה בחיידק *Erwinia amylovara* 238 (ניסוי 15) לא הביא לגידול משמעותי של חיידקים בעמודה, על אף שבניסוי מקדים בפלטות 96 בארות נמצא שהחיידק מסוגל לייצר כמות גדולה של ביופילם (פרק 2, איור 2.2). מה שמעיד על יכולת גידול שונה של החיידק כתלות בתנאי הסביבה. כושר הגידול ואיטום הקרקע של חיידק המודל, *P. aeruginosa* השתפר, באופן כללי, לאחר החלפת הסטוק הראשון (ישן) של החיידק.
- תמיסת המזון העיקרית הייתה M63+0.4% citrate בהתבסס על מחקרה של רול (2007). נראה כי שינוי מקור הפחמן לא השפיע על גידול החיידקים בעמודה (לא מבחינה אבסולוטית ולא קינטית). ריכוז גבוה של תמיסת המזון ייתכן ועודד התפתחות של חיידקים, אך גרם מאידך ליצירת בועות גז בעמודה, בעיקר בשטפים גבוהים. לעומת זאת, יחס C:N היווה פקטור משמעותי בכושר גידול החיידקים והתפתחות הביופילמים. ככל שעלה היחס, העמודה נאטמה יותר, דהיינו פחיתה משמעותית בתכונה ההולכה של הקרקע. בנוסף, כאשר הוחלפה תמיסת M63 לתמיסת Cunningham נראה שיפור משמעותי בכל הפרמטרים שנבדקו. כלומר, פחיתה משמעותית במוליכות ההידראוליות, כבר



מהיום הרביעי לניסוי ופחיתה של 45% במוליכות החשמלית (בניסוי השני עם תמיסה זאת). נראה שתמיסה זו מתאימה יותר להתפתחות של ביופילם של החיידק *P. aeruginosa* בעמודות חול בתנאי רוויה, כנראה בשל שילוב של כל הגורמים: גלוקוז כמקור הפחמן, יחס C:N גבוה, ריכוז תמיסת מזון נמוך (גורם מגביל חנקן ולא חמצן) ותוספת של מתכות קורט ורכיבים נוספים במינונים מזעריים.

- התפתחות של תנאים אנאירוביים בעמודה וכתוצאה מכך הופעה של סולפידים, כנראה הובחנה בחלק גדול מניסויי הזרימה. על-אף שלא ידוע כי החיידק *P. aeruginosa* מסוגל לחזר סולפאט, נראה כי הסבר זה מניח את הדעת בהתחשב הן בריח והן במשקע השחור שנוצר, כנראה כתוצאה מהמסיסות המאד נמוכה של הסולפיד ליצירת משקע ברזל-סולפיד. אפשרות נוספת להסבר של השחרת העמודה בתנאים אנאירוביים ייתכן וקשורה גם ליצירת מלנין ע"י החיידק *P. aeruginosa*. מלנינים הם פולימרים של תרכובות פנול. עבור מיקרואורגניזמים רבים מהווה המלנין מנגנון התאמה למגוון תנאים סביבתיים (Plonka and Grabacka, 2006). הפרשה של מלנין (pyomelanin) בחיידק *P. aeruginosa* דווחה כבר ב-1920 ע"י Gessard. המלנין, בדומה לתרכובות הומיות, יכול לשמש כתורם או קולט של אלקטרונים (Plonka and Grabacka, 2006). לפיכך, ניתן להניח שהיווצרות המלנין קשורה להתפתחות של תנאים מחזרים בעמודה. חשוב לציין, כי לא מצאתי מחקרי "bioclogging" נוספים אשר דיווחו על הופעת הפיגמנט והשחרה של המצע (גם לא מחקרים שנעשו בתנאי רוויה למשך מספר חודשים עד שנה).

#### 4. הערכת הפחיתה במוליכות ההידראולית של התווך כתוצאה מיצירת ביופילם

פרק זה בוחן את ההיפותזה המרכזית של המחקר, היכולת להעריך את הפחיתה היחסית במוליכות ההידראולית באמצעות מדידות פשוטות של המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי.

#### 4.1 שימוש במודל Kozney-Carman להערכת הפחיתה היחסית במוליכות ההידראולית

המודל של Kozney-Carman לחיזוי המוליכות ההידראולית של תווך נקבובי המוצג בפרק 2 משוואה 2.5 מתבסס על הרדיוס ההידראולי ( $r_h$ ), הנקבוביות ( $\phi$ ), הפיתוליות ( $T$ ) ופקטור הצורה ( $S_f$ ). בכדי להעריך את המוליכות ההידראולית היחסית למצע נקי ניתן לכתוב את המשוואה בצורה הבאה:

$$K_{sr} = \frac{\phi \left( \frac{r_h}{r_{h0}} \right)^2}{\frac{T}{T_0}} \quad \text{משוואה 4.1}$$

בהנחה שפקטור הצורה,  $S_f$  קבוע ולא משתנה במהלך האיטום.

כפי שצוין בפרק 2  $T = \phi / (EC_d / EC_w)$  כלומר, הפיתוליות משתנה כחלק מהתהליך של פחיתה בנקבוביות ומבוטאת על ידי מדידות של  $EC_r$ . לפיכך, בכדי להשתמש בנוסחה של Kozney-Carman להערכת המוליכות ההידראולית של תווך גרנולרי, המוליכות ההידראולית היחסית  $K_{sr} \equiv K_s(\text{clogged bed}) / K_s(\text{clean bed})$  (למצע נקי)  $(r_h / r_{h0})$  תלויה ברדיוס ההידראולי היחסי (למצע נקי)  $EC_r = (EC_d / EC_w(\text{clogged bed}) / EC_d / EC_w(\text{clean bed}))$  ובמוליכות החשמלית היחסית  $EC_r$  וכתיבה באופן הבא:

$$K_{sr} = r_{hr}^2 * EC_r \quad \text{משוואה 4.2}$$

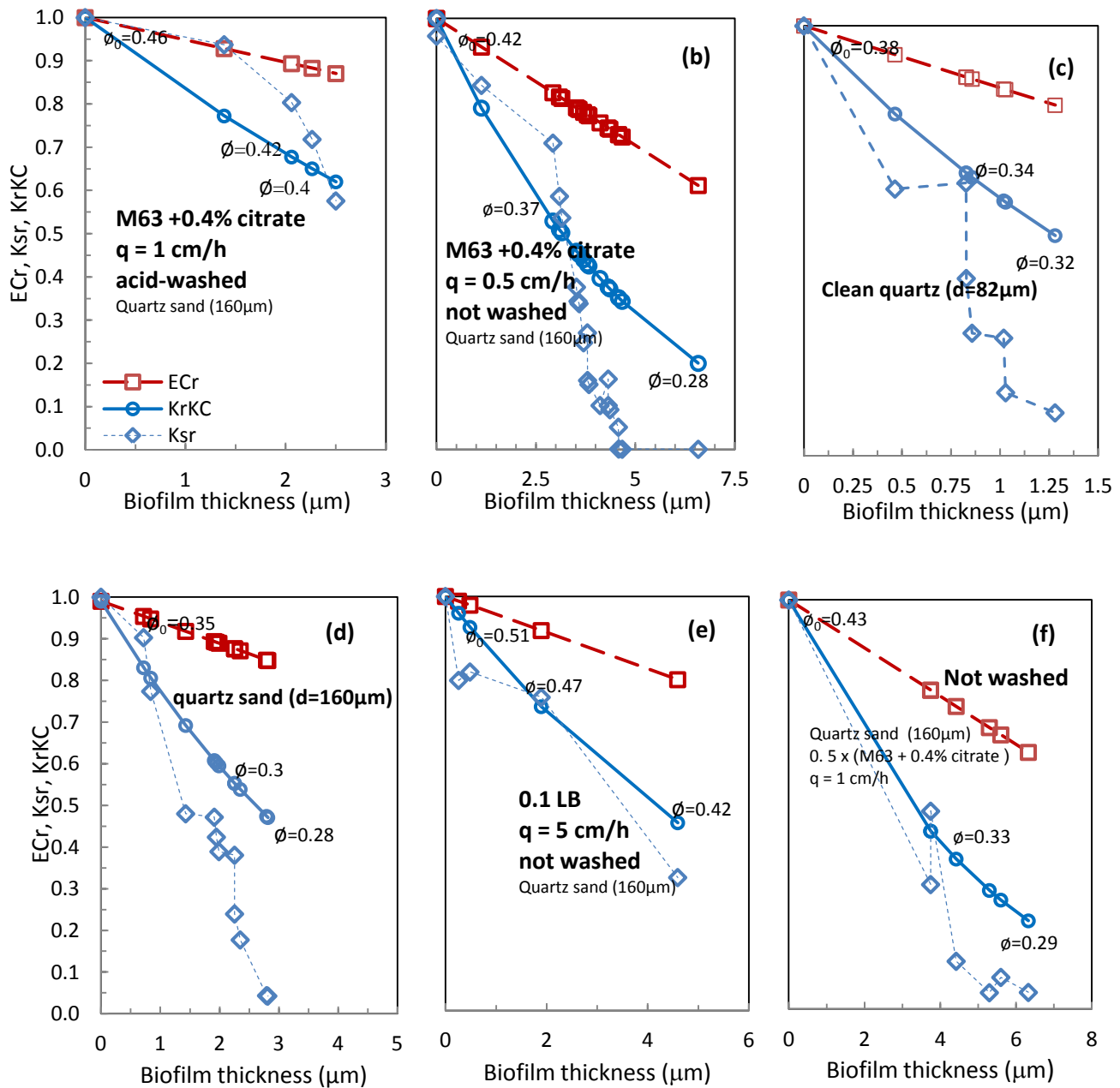
הערכת הפחיתה של המוליכות ההידראולית נעשתה מהפחיתה היחסית המדודה של המוליכות החשמלית  $EC_d / EC_w$  שנמדדה בניסויי האיטום הביולוגי ומהערכת הפחיתה היחסית ברדיוס ההידראולי באמצעות שימוש ב"תיאוריות הערבוב הדיאלקטרי", כאשר הונה יחס צירים של גרגר כדורי  $(a/b = 1)$  ו-  $\alpha = 0.2$  (פרמטר המייצג את השפעת הגרמים השכנים על השדה החשמלי של גרגר מסוים), ושהפאזה המוצקה, קרי הגרגר ופאזת הביופילם אינן מוליכות זרם חשמלי ( $EC_s = EC_b = 0$ ). בכל המצעים חושב עובי הביופילם ( $d_b$ ) לקוטר גרגר ידוע על ידי התאמה הופכית (אינברסית) למשוואה 2.3 (ראה פרק 5, משוואה 5.5). הרדיוס ההידראולי ( $r_h$ ) הוערך על פי עובי הביופילם המחושב העוטף גרגר מצע מייצג בהינתן נקבוביות ידועה של מצע נקי. השוואה בין המוליכות ההידראולית המדודה ( $K_{sr}$ ), למוערכת ( $K_{sr} KC$ ) על פי משוואה 4.2 מ-  $EC_r$  (מהמדידות שנעשו בעזרת ה- Radiometer EC meter) מוצגת באיור 4.1, a-i. לשם כך, נעשה שימוש בנתונים מניסויים שבעת ביצוע המדידות של המוליכות החשמלית וההידראולית, לא נצפו בועות גז או התפתחו תנאים מחוזרים בעמודה. יחד עם זאת, ניתן לראות בגרפים את השפעת זיהום התמיסה והחלפתה בזמן הניסוי. נתוני הניסויים מרוכזים בטבלה 4.1. באופן כללי, הערכת המוליכות ההידראולית היחסית (למצע נקי) לפי הגישה שהוצעה (משוואה 4.2) היא סבירה, אם לוקחים בחשבון את הקשיים הכרוכים במדידת המוליכות ההידראולית. ניתן לראות שיש צורך בעובי ביופילם של בערך 3% מרדיוס הגרגר בכדי לגרום לפחיתה של סדר גודל במוליכות ההידראולית (בערך  $1.25 \mu\text{m}$  עבור קוורץ נקי ו-  $4 \mu\text{m}$  עבור חול קוורץ) (איור 4.1).

#### טבלה 4.1 ריכוז נתונים של הניסויים המוצגים

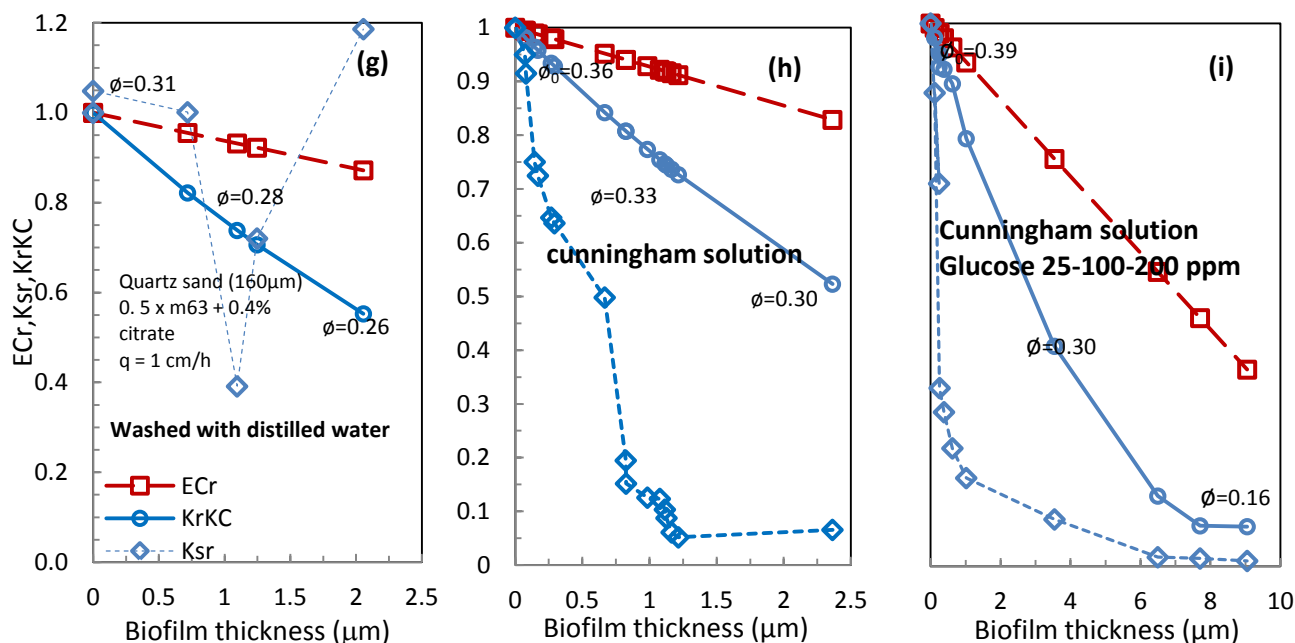
מקור הנתונים	מיצוע מדידות לאורך העמודה	שטיפה	נקבוביות (Ø)	שטף (cm/h)	שטח חתך (cm <sup>2</sup> )	כיוון הזרימה	חיידק המודל	קוטר גרגר (µm)	תמיסת מזון
איור 3.5	6 TDR sensors	HCL	0.46	1	136.80	↑	סטוק 1	"160"	m63+0.4%citrate
איור 3.26	5 TDR sensors	לא שטוף	0.42	0.5	136.80	↓	סטוק 2	"160"	m63+0.4%citrate
איור 3.20	1 TDR sensors	מים מזוקקים	0.38	1	20.11	↓	סטוק 2	"82"	0.25x(m63+0.4%citrate)
איור 3.21	1 TDR sensors	מים מזוקקים	0.35	2	20.11	↓	סטוק 2	"160"	0.25x(m63+0.4%citrate)
איור 3.33	1 TDR sensors	לא שטוף	0.51	5	20.11	↓	סטוק 2	"160"	LB 0.1
איור 3.25	1 TDR sensors	לא שטוף	0.42	1	18.47	↓	סטוק 2	"160"	0.5x(m63+0.4%citrate)
איור 3.25	1 TDR sensors	מים מזוקקים	0.31	1	18.47	↓	סטוק 2	"160"	0.5x(m63+0.4%citrate)
איור 3.35	1 TDR sensors	מים מזוקקים	0.36	5.5	18.09	↓	סטוק 2	"160"	Cunningham (1991)
איור 3.39	Stainless steel	מים מזוקקים	0.39	5	20.06	↓	סטוק 2	"160"	Cunningham inc. Glucose Con. (1991)

נראה שגידול בשטף הזרימה או בריכוז תמיסת המזון משפיעים בצורה שונה על היווצרות ביופילם. שטף גבוה, באופן תיאורטי, עשוי לגרום לניתוק של החיידקים מגרגרי המצע על ידי כוחות גזירה, אך נראה כי בניסויים אלה, שטף גבוה או העלאה של השטף במהלך הניסוי תרמו לתהליך האיטום הביולוגי, אם על ידי פיזור הומוגני יותר של ריכוז הביומסה בתווך הגרנולרי, או אם על ידי העלאה של עומס הנוטריאנטים הכללי (Thullner, 2010). במקרים אלו הגידול בביומסה מפצה על ההפסד בביומסה כתוצאה מכוחות גזירה (Rowe et al., 2002). בניגוד לכך, ריכוז גבוה של תמיסת המזון בדרך כלל הביא להיווצרות של בועות אוויר ולכן לא ניתן היה לקבוע אם הפחיתה במוליכות ההידראולית נובעת מיצירת בועות אוויר או כתוצאה מביופילם מפותח. בנוסף, ידוע כי ריכוז גבוה של נוטריאנטים מדכא היווצרות של ביופילם (Sauer et al., 2004). יחד עם זאת, בניסויים בהם נעשה שילוב של ריכוז נוטריאנטים גבוה ושטף נמוך כן התאפשרה היווצרות של ביופילימים על גרגרי החול כפי שניתן לראות באיור 4.1b. שילוב של ריכוז נמוך של תמיסת המזון ושטף גבוה (איורים 4.1f-4.1d), גם כן אפשר התפתחות ביופילם משמעותי ועל פי ה- $EC_{50}$  מוערך כי נקבוביות המצע באיור 4.1b פחתה בשיעור של 34% ובשיעור של 20% באיור 4.1d ו-4.1e ו-32% באיור 4.1f. שימוש בתמיסת המזון לפי Cunningham (1991) הביא לפחיתה משמעותית במוליכות הן החשמלית והן בהידראולית. ניתן לראות השפעה חיובית של יחס C:N גבוה על הפחיתה בערכים. העלאת ריכוזי הגלוקוז עד 200 ppm, הביאה לפחיתה בנקבוביות של עד כ-60% ועובי הביופילם המוערך הגיע ל- $9 \mu m$ . תוצאה זאת מתאימה גם לתמונות המיקרוסקופ הקונפוקלי, המראות עובי ביופילם בסביבות  $5 \mu m$ , ערך זה נמוך פי 5 עד 10 מהערכים המדווחים בספרות עבור אותו החיידק, בפרק זמן דומה (Peyton., 1996; Cunningham., 1991; Bakke and Olsson, 1986; Trulear and Characklis 1982). אולם, יכולת החיזוי של המודל בניסויים 4.1h ו-4.1i אלה מוגבלת, בעיקר בניסוי 4.1i, זאת משום שהמדידות של הפחיתה במוליכות החשמלית היו גבוהות מהצפוי יחד עם הקושי במדידת המוליכות ההידראולית לקראת סוף הניסוי. בנוסף, ראוי לציין שעובי הביופילם המוערך בתחילת הניסויים (בקוורץ נקי גם בסופו) (איור 4.1c), קטן מאורכו של חיידק בודד. עובדה זו, לא בהכרח מצביעה על פגם בשיטה המוצעת, אלא, ניתנת להסבר גם

בצורה הבאה: שכבת הביופילם העוטפת גרגר חול אינה אחידה. בעצם, לביופילם העוטף את הגרגר יש עוביים שונים, המושפעים בין היתר ממבנה המצע, הכולל אזורים מעודפים להתיישבות כמו חריצים ובקעים על גבי גרגרי החול ובנקודות המגע בין גרגרים שכנים. כך שהעובי המוצע בשיטה זו, הינו עובי הביופילם האפקטיבי המתאים (מבחינת חיזוי  $K_r$ ) למורפולוגיה האמיתית של עטיפה לא אחידה.



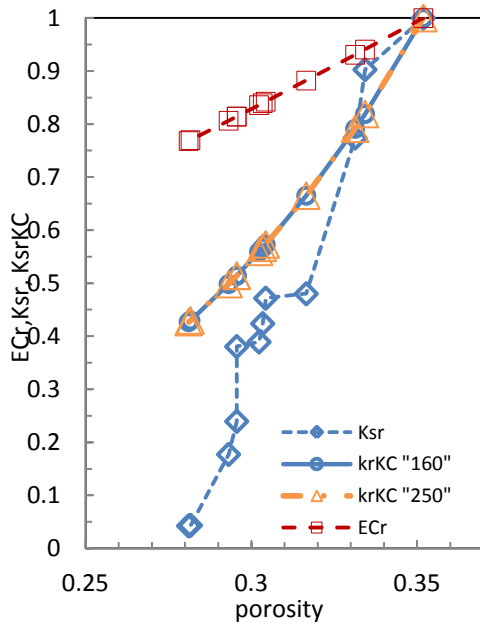
**איור 4.1** מדידות של המוליכות החשמלית היחסית ( $E_{Cr}$ ) והמוליכות ההידראולית היחסית ( $K_{sr}$ ) המוערכת מהמודל ( $k_{sr} K_C$ ) בתשעה ניסויים:  $q=0.5 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0=0.42$ , M63+0.4% citrate (b),  $q=1 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0=0.46$ , M63+0.4% citrate (a),  $q=1$ ,  $\phi_0=0.38$ , 0.25x(M63+0.4% citrate)(c),  $q=2 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0=0.35$ , 0.25x(M63+0.4% citrate) (d),  $q=1$ ,  $\phi_0=0.51$ , 0.1LB (e),  $q=5 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0=0.42$ , 0.5x(M63+0.4% citrate) (f),  $q=1 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0=0.43$ , 0.5x(M63+0.4% citrate) (f),  $q=5 \text{ cm/h}$



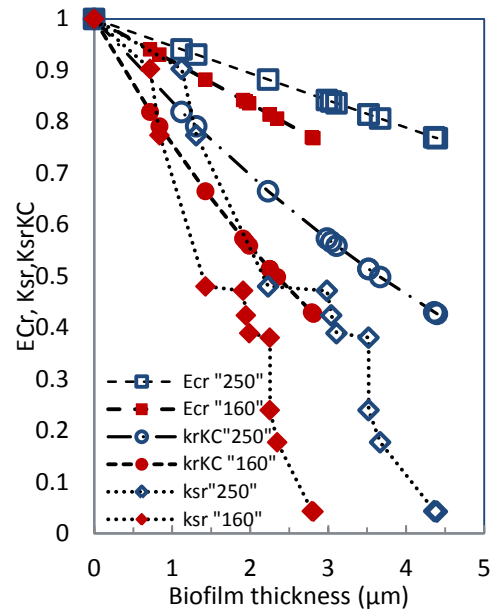
**איור 4.1** מדידות של המוליכות החשמלית היחסית ( $EC_r$ ) והמוליכות ההידראולית היחסית ( $K_{sr}$ ) המוערכת מהמודל ( $k_{sr}KC$ ) בתשעה ניסויים: (g)  $0.5 \times (M63 + 0.4\% \text{ citrate})$ ,  $\phi_0 = 0.31$ ,  $q = 1 \text{ cm/h}$ , Cunningham solution (h),  $\phi_0 = 0.36$ ,  $q = 1 \text{ cm/h}$ , Cunningham solution with glucose 25-100-200 ppm (i),  $q = 5.5 \text{ cm/h}$ ,  $\phi_0 = 0.39$ .

בכדי להבין את השפעת גודל הגרגר על הערכת המודל, נבחר גודל גרגר מייצג, על פי תוצאות אנליזה לקביעת פילוג גודל החלקיקים בשיטת הנפות (לפי סכום הממוצעים המשוקללים של 14 נפות) נמצא גודל מייצג, למשל  $d_p = 160 \mu\text{m}$ , ועבור גודל זה וגודל גרגר נוסף של  $d_p = 250 \mu\text{m}$  נעשתה הערכה ל-  $K_r$  בדרך שתוארה לעיל. יכולת הערכת הפחיתה במוליכות ההידראולית היחסית כפונקציה של הנקבוביות מוצגת באיורים 4.2 ו- 4.3 כפונקציה של עובי הביופילם. לפי איור 4.2 נראה, כי גודל הגרגר אינו משפיע על הפחיתה המוערכת של הנקבוביות. זאת משום שהשינוי המוערך בנקבוביות נקבע על ידי ה-  $EC_r$  המדוד והיחס  $EC_d/EC_w$  אינו תלוי בגודל הגרגרים אלא רק בצורתם ובנקבוביות. עם מניחים רדיוס גרגר נקי קטן יותר, אזי צריך עובי ביופילם קטן יותר כדי להגיע לאותה נקבוביות ב-  $EC_r$  מדוד. לכן, כשמציגים את הערכת המודל לפחיתה במוליכות ההידראולית כתלות בעובי הביופילם המוערך, העקומים מוסתים לעוביים קטנים יותר (שמאלה), אם מניחים גודל גרגר נקי קטן יותר. ככל שמניחים גודל גרגר קטן יותר כך יתקבל עובי ביופילם קטן יותר עבור אותה פחיתה ב-  $EC_r$ .

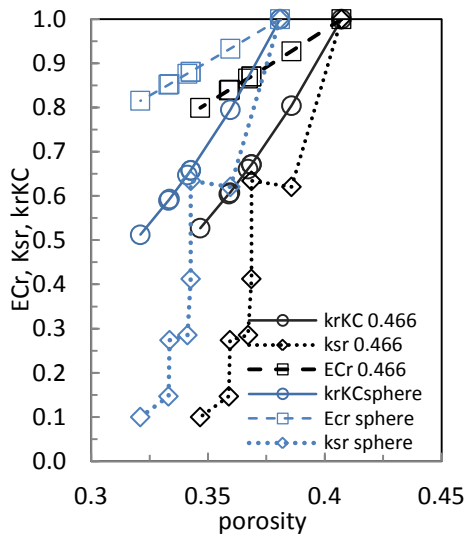
ההשפעה של צורת הגרגר נבחנה גם כן ומוצגת באיור 4.4. הקשר בין  $d_p$  ליחס  $a/b$  מוסבר בפרק 5 (משוואה 5.7). צורת הגרגר, אם מניחים צורה כדורית ( $a/b=1$ ) או צורה ספירואידית ( $a/b=0.466$ ) משפיעה על הערכת המודל לפחיתה במוליכות ההידראולית. כצפוי, ממודל הערבוב הדיאלקטרי, הנקבוביות של מצע עם חלקיקים ספרואידים שמתאימה לערך מדוד של  $EC_d/EC_w$  גבוהה יותר מהנקבוביות של מצע עם חלקיקים כדוריים (0.4 ו- 0.38, בהתאמה). כתוצאה מכך, עבור גרגר חול קוורץ עם יחס צירים של 0.466 המוליכות ההידראולית היחסית המוערכת פוחתת בשיעור נמוך במקצת (כ- 46%), לעומת שיעור הפחיתה עבור הנחה



**איור 4.2** השפעת קוטר הגרגר על יכולת החיזוי של המודל. מדידות של המוליכות ההידראולית היחסית ( $K_r$ ), וזו המוערכת מהמודל ( $K_{sr}KC$ ) בהנחה של קוטר גרגר של  $dp=160 \mu m$  ( $KrKC$ "160") או  $dp=250 \mu m$  ( $KrKC$ "250")



**איור 4.3** השפעת קוטר הגרגר על יכולת החיזוי של המודל. מדידות של המוליכות ההידראולית היחסית ( $K_{sr}$ ) המוערכת מהמודל ( $K_{sr}KC$ ) והמוליכות החשמלית היחסית ( $ECr$ ) עבור קוטר גרגר  $dp=160 \mu m$  (סימון מלא) ועבור קוטר גרגר של  $dp=250 \mu m$  (סימון ריק) כפונקציה של עובי הביופילם.



**איור 4.4** השפעת צורת הגרגר על יכולת החיזוי של המודל. מדידות של המוליכות ההידראולית היחסית ( $K_r$ ) המוערכת מהמודל ( $K_rKC$ ) עבור קוורץ נקי ( $dp=82 \mu m$ ) בהינתן גרגר כדורי,  $a/b=1$  (עיגול כחול) ובהינתן גרגר קוורץ  $a/b=0.466$  (ריבוע שחור), כפונקציה של הנקבוביות.

של גרגר כדורי (כ-50%). היחס המוערך בין הנקבוביות לשטח הפנים מוצק-נוזל (קרי הרדיוס ההידראולי) של גרגר ספיראודי קטן מאשר היחס המוערך בין הנקבוביות לשטח הפנים מוצק-נוזל של גרגר כדורי.

ראוי לציין בשלב זה, כי במחקר הנוכחי אנו מניחים עלייה רציפה של שטח הפנים עם העלייה בעובי הביופילם. אך במציאות, תיתכן עלייה של שטח הפנים עם העלייה בעובי הביופילם עד לנקודה בה הביופילמים העוטפים שני גרגרים שכנים ייפגשו ואז תחל ירידה בשטח הפנים מוצק-נוזל. ניתן

לפיכך, ללמוד על מגבלת צורת החישוב של שטח הפנים מוצק-נוזל עבור גרגרים ספירואידים ועבור מצעים הטרוגניים. יחד עם זאת, אי התלות בהנחת קוטר הגרגר והתלות החלשה בצורת הגרגר (אותה

ניתן לקבוע מהקשר של  $EC_a/EC_w(\phi_0)$  מהמצע הנקי) מהווים יתרון מעשי לשיטת החיזוי המוצעת. חשוב לציין שגם אי דיוק בביצוע המדידות עשוי להוות גורם המשפיע על ההבדלים בין תוצאות המדידה למודל המוצע. כצפוי, המוליכות ההידראולית המדודה נמוכה בדרך כלל מאשר המוליכות ההידראולית המוערכת המניחה שהביופילם העוטף את גרגרי החול הינו בעל עובי אחיד. על כן, נכון יותר יהיה להניח כי החיידקים יוצרים מיקרו-מושבות באזורים מועדפים, בנקודת המגע בין שני גרגרים וגורמים להפרעה משמעותית יותר

לזרימת המים ולפחיתה משמעותית יותר במוליכות ההידראולית מאשר ביופילם אחיד אשר צריך למלא את כל הנקבוב בכדי לגרום לאותה פחיתה.

#### 4.2 השוואה מול מודלים אחרים

המודל שמוצע במחקר זה מתאר את היחס בין המוליכות ההידראולית בתווך עם ביופילם ( $K_s$ ) למוליכות ההידראולית בתווך נקי מביופילם ( $K_{s0}$ ), שתואר בחלק הראשון של פרק זה ומתבסס על ההנחה כי פיתוליות הזרם החשמלי זהה לפיתוליות זרימת המים ומוערכת דרך המדידות של הפחיתה במוליכות החשמלית:

$$T = \phi / (EC_d / EC_w)$$

המודל של Kozeny-Carman מניח זרימה בתווך נקבובי מסביב לגרגר מייצג. כאשר אורך המסלול האפקטיבי ( $L_a$ ) גדול או שווה לאורך המקרוסקופי של הדוגמא ( $L$ ) וכי פקטור הפיתוליות ( $T$ ) נשאר קבוע בתהליך האיטום  $T = (L_a/L)^2$  (Lesmes and Friedman, 2005).

המודל של Kozeny-Carman מהווה בסיס להרבה משוואות חיזוי של חדירות בתווך נקבובי (Lesmes and Friedman, 2005). בפרק זה ייבחנו מודלים נוספים, המבוססים על הנחות דומות לאלו של Kozeny-Carman או על הנחות שונות, להערכת הפחיתה במוליכות ההידראולית ברוויה מהערכת השינוי בנקבוביות הכוללת (איור 4.5), יחד עם המודל המוצע לפי משוואה 4.2 ( $K_r, KC$ ).

Ahuja et al (1989) הסתמכו על ההנחה שפקטור הצורה ופקטור הפיתוליות פוחתים עם העלייה בנקבוביות האפקטיבית באופן פרופורציונאלי לפונקציית חזקה של הנקבוביות וניסחו את הקשר בין המוליכות ההידראולית לנקבוביות עבור 9 קרקעות שונות באופן הבא:

$$\frac{K_s}{K_{s0}} = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^3 \quad \text{משוואה 4.3}$$

Or et al (2000) השתמשו במשוואה של Kozeny-Carman בכדי להעריך את השינוי במוליכות ההידראולית היחסית, כתלול בנקבוביות, עבור מודל סטוכסטי (כאשר מתייחסים במונחים סטטיסטיים של פונקציית צפיפות ולוקחים בחשבון דיפורמציה של אגרגטים ואת הפחיתה בנקבוביות בקרקעות רטובות כתהליך דיפוזיה של מוצקים) לקרקעות מעובדות ("post tillage"). בהנחה שהפיתוליות בקרקע קבועה:

$$\frac{K_s}{K_{s0}} = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^3 \left(\frac{1-\phi_0}{1-\phi}\right)^2 \quad \text{משוואה 4.4}$$

ההבדל הקטן בין העקום שמוצע במחקר זה,  $k_r, KC$  (כחול) לבין העקום של Kozeny-Carman,  $K_r, KC-Or$  (שחור) נובע מערך הפיתוליות שעבור עקום  $k_r, KC$  הוא משתנה ועבור עקום  $K_r, KC-Or$  נשאר קבוע כפונקציה של הנקבוביות.

Assouline (2006) הציע ביטוי אמפירי לקשר בין הצפיפות הנפחית של קרקעות דחוסות למוליכות ההידראולית.

ביטוי זה (Assouline, 2006), ניתן לכתיבה כך:

$$\frac{K_s}{K_{s0}} = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^3 \left(\frac{1-\phi_0}{1-\phi}\right)^1 \quad \text{משוואה 4.5}$$

שימוש במשוואה זו מניב ערכים גבוהים במעט, לעומת המודל המוצע.

מודל אמפירי נוסף ( $K_rKC-OT$ ) שניתן להציע ונראה כי תוצאותיו קרובות ביותר למדידות (בעיקר בחול הגס איור 4.5 a-1-b), זאת אומרת שהתקבלו ערכים נמוכים יותר עבור הפרמטרים שנבדקו (ציר Y) בהשוואה למודלים האחרים שנבחנו (טבלה 4.2), מודל זה מניח השפעה מוגזמת של הפיתוליות ומבוטא בצורה הבאה:

$$\frac{K}{K_{s0}} = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^3 \left(\frac{1-\phi_0}{1-\phi}\right)^2 * EC_r \quad \text{משוואה 4.6}$$

נפשט את המשוואה למרכיביה לפי Kozeny-Carman המוצע במחקר זה כלומר, לפי משוואה 4.2

$$K_{sr} = r_{hr}^2 * EC_r$$

$$\left(\frac{r_h}{r_{h0}}\right)^2 = \left(\frac{\phi}{\phi_0}\right)^2 \left(\frac{1-\phi_0}{1-\phi}\right)^2 \quad \text{משוואה 4.7}$$

$$EC_r = \frac{\frac{\phi}{\phi_0}}{\frac{T}{T_0}} \quad \text{משוואה 4.8}$$

מכאן, שהקשר  $KrKC-OT$  ניתן לכתיבה גם כך:

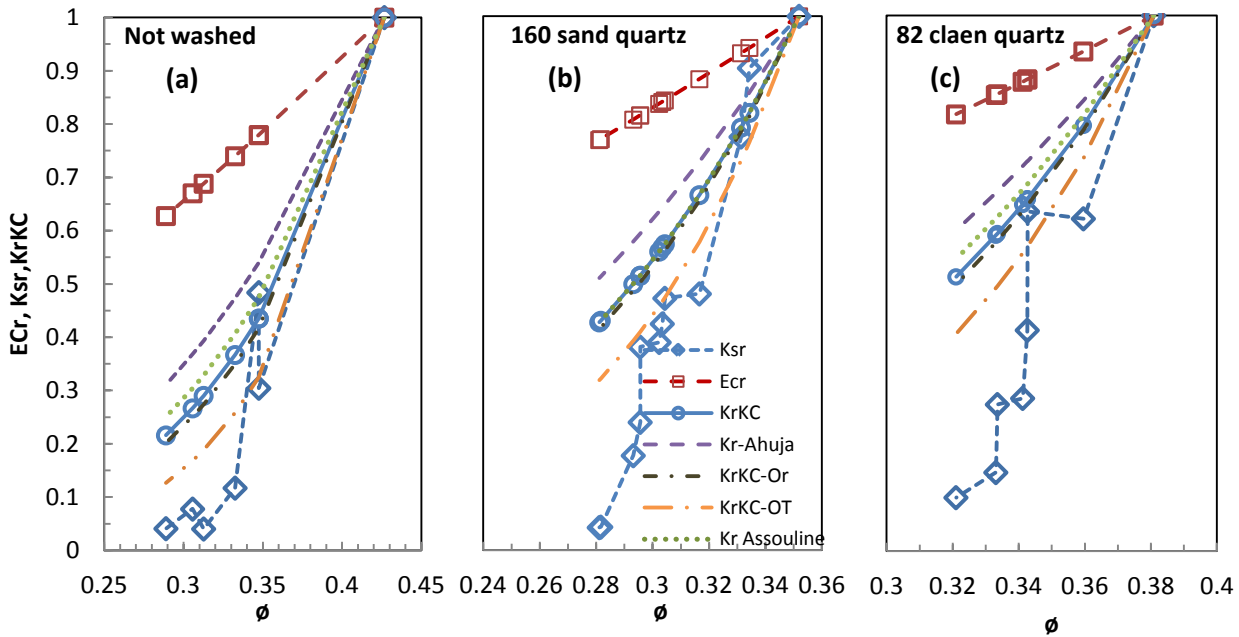
$$K_{sr} = r_{hr}^2 * EC_r * \phi_r ; \quad \phi_r = \frac{\phi}{\phi_0} \quad \text{משוואה 4.9}$$

השוואה סטטיסטית בין המודלים נעשתה באמצעות Root Mean Square Error (RMSE) (טבלה 4.2) לפי המשוואה:

$$RMSE = \left[ \frac{\sum_{i=1}^n (p_i - o_i)^2}{n} \right]^{1/2} \quad \text{משוואה 4.10}$$

כאשר  $p_i$  ו- $o_i$  הם הערכים החזויים והמדודים בהתאמה. המודל המתאים ביותר לחיזוי הפחיתה במוליכות ההידראולית הינו המודל שנותן את הערך הנמוך ביותר במבחן RMSE. המודל של Ahuja נותן את שגיאת התקן הממוצעת הגבוהה ביותר (0.2580), בעוד שהמודל  $K_rKC-OT$  נמצא קרוב ביותר לערכים המדודים ובעל שגיאת התקן הממוצעת הקטנה ביותר (0.1592) מבין המודלים שנבחנו (טבלה 4.2). אולם, העובדה כי המודל מניח פיתוליות יתר של מסלול הזרימה במצע אינה מתאימה להנחות המודל של Kozeny-Carman.





איור 4.5 השוואה ביכולת של מודלים שונים להעריך את הפחיתה במוליכות ההידראולית ( $K_{sr}$ ) כפונקציה של הנקבוביות ( $\phi$ ).  
 (a) חול קוורץ "160" לא שטוף לקוח מאיור 4.1f. (b) חול קוורץ "160" לקוח מאיור 4.1d. ו- (c) קוורץ נקי לקוח מאיור 4.1c.

טבלה 4.2 השוואה בין המודלים לפי RMSE.

Root Mean Square Error					
	krKC	kr-Ahuja	KrKC-IT	KrKC-OT	Kr Assouline
a	0.2325	0.2896	0.2228	0.1600	0.0850
b	0.3203	0.3267	0.2415	0.1976	0.2788
c	0.2325	0.2896	0.2228	0.1652	0.2547
d	0.2226	0.2848	0.2131	0.1487	0.2468
e	0.1059	0.1569	0.0986	0.0885	0.1219
f	0.1732	0.2565	0.1610	0.1123	0.2029
g	0.2841	0.2023	0.2200	0.2423	0.2100
MEAN	0.2244	0.2580	0.1971	0.1592	0.2000

## 5. תכונות השמליות של רכיבי EPS סינתטיים מעורבבים עם מים

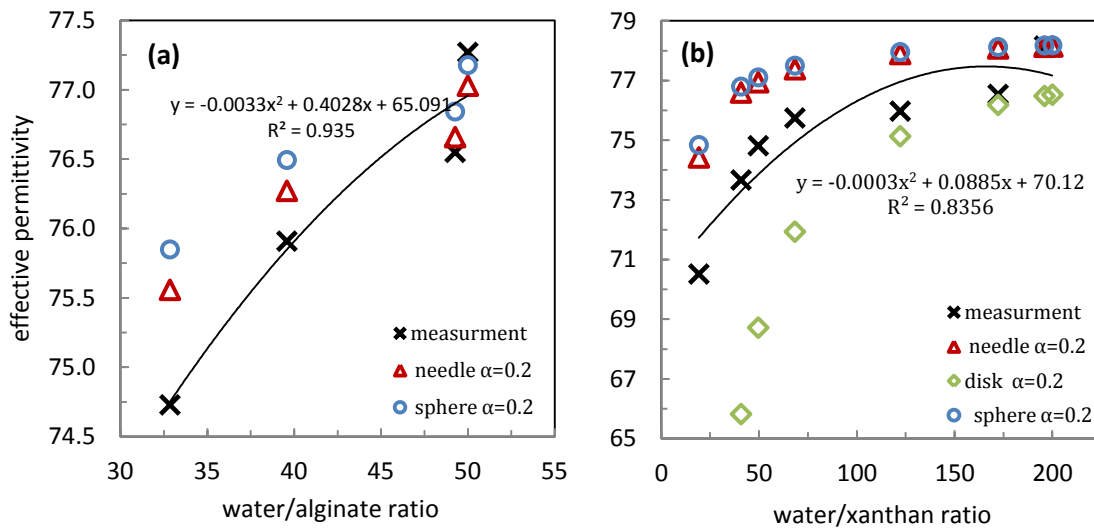
בפרק זה מוצגות תוצאות המדידות של הפרמיטיביות והמוליכות החשמלית של שני מרכיבי ה-EPS, קסנתן-גאם (XG) או סודיום אלגינט (SA), מעורבבים עם מים מזוקקים ביחס משתנה של מוצק/מים, בהתאמה ליחסים הקיימים בביופילים טבעיים, הנעים בין 1% ל-2% (Sutherland, 2001). כל המדידות המוצגות בפרק זה נעשו באמצעות מחוש TDR באורך 9 cm טבול בתערובת מים-קסנתן או מים-אלגינט חישובים תיאורטיים של הפרמיטיביות והמוליכות החשמלית נעשו ע"י "מודל הערבוב" של Sihvola and Kong (1988) (משוואה 2.3).

### 5.1 מדידות של הפרמיטיביות האפקטיבית בתערובות מים – EPS

לצורך הערכת הפרמיטיביות האפקטיבית ( $\epsilon_{eff}$ ) של EPS מעורבב במים נדרש תחילה לקבוע את הפרמיטיביות של המוצקים אלגינט וקסנתן. הפרמיטיביות האפקטיבית של החומרים במצבם היבש- כאבקה נמדדה. והתקבלו ערכים של 2.16 ו-2.31 עבור קסנתן ואלגינט, בהתאמה. הונח, כי צפיפות חלקיקים ( $\rho_s$ ) של קסנתן היא  $1.5 \text{ gr/cm}^3$  (<http://www.chemicalbook.com>) ושל אלגינט  $1.601 \text{ gr/cm}^3$  (Rowe et al., 2006). חישוב הצפיפות הגושית ( $\rho_b$ ) נעשה לפי היחס בין המסה היבשה (בגרמים) לנפח הכללי. מהיחס בין הצפיפויות, חושבה הנקבוביות ( $\phi = 1 - \rho_b/\rho_s$ ) ונמצאה הפרקציה הנפחית של המוצקים, 0.47 ו-0.53 עבור קסנתן ואלגינט, בהתאמה. בכדי לבטא במשוואה 2.3 את השפעת החלקיקים השכנים נבחר ערך של  $\alpha = 0.2$  (Friedman and Robinson, 2002) ומקדם פולריזציה המניח צורת מחט (Whitcomb., 1978; Windhues and Borchard, 2002). מהתאמת החישובים למדידות של האריזות היבשות נקבע ערך פרמיטיביות של 4.42 עבור קסנתן ו-4.266 לאלגינט (טבלה 5.1). אם היינו מניחים חלקיקים כדוריים אז הערך של הפרמיטיביות האפקטיבית היה יוצא גבוה במעט מזה של מחט (5.38/4.99).  
טבלה 5.1 סיכום התוצאות למציאת הפרמיטיביות של המוצקים אלגינט וקסנתן במים מזוקקים.

	$\rho_b$	$\rho_s$	$f_s$	$\epsilon_{eff}(\text{dry})$	$\epsilon_s(\text{needle})$	$\epsilon_s(\text{sphere})$	$\epsilon_s(\text{disc})$
	( $\text{gr/cm}^3$ )	( $\text{gr/cm}^3$ )	( $f_s = 1 - \phi$ )	( $\epsilon_0 = 1$ )			
xanthan	0.705	1.5	0.47	2.16	4.42	5.380	3.86
alginate	0.850	1.601	0.53	2.31	4.266	4.990	

בשלב הבא נמדדה הפרמיטיביות האפקטיבית של מרכיבי ה-EPS (קסנתן או אלגינט)/מים ביחס משתנה. חישובים תיאורטיים של הפרמיטיביות האפקטיבית עבור חלקיקים בעלי צורה שונה עם סידור אקראי במרחב של מחט, דיסקה וכדור, כאשר  $\alpha = 0.2$  מוצגים באיור 5.2 (ביחד עם התוצאות המדודות).



**איור 5.2** מדידות ומידול של הפרמיטיביות האפקטיבית ( $\epsilon_{eff}$ ) של תערובת (a) מים/אלגינט ו- (b) מים/קסנתן כפונקציה של היחס המשקלי ובהתחשבות בצורת החלקיק. ביחס water/alginate על הציר האופקי תהליך הייבוש מתואר מימין לשמאל.

הפרמיטיביות האפקטיבית ההתחלתית, ביחס מיהול גבוה, של התערובת: מים-קסנתן ומים-אלגינט נמוכה מזו של מים חופשיים (78.54 בטמפ' של 25°C) ויורדת עם העלייה בריכוז ה- EPS. ה-  $\epsilon_{eff}$  המחושב עבור צורה של דיסקה (איור 5.2b) קטן באופן משמעותי מהערכים המדודים והערך של ה-  $\epsilon_{eff}$  של חלקיקים כדוריים גבוה במעט מהערך עבור חלקיקים מחטיים. עבור המודל נבחר להשתמש בחלקיק מחטי, כאינטגרציה של התוצאות המובאות באיור 5.2, מהידע הקיים בספרות על קסנתן ואלגינט (Whitcomb., 1978; Windhues and Borchard, 2002), ומכך שחומרים דומים (ג'לטין, לקטוז, צלולוז ועוד) מאופיינים גם כן על פי צורה זו. יחד עם זאת, ניתן לראות בכירור כי הערכים המחושבים גבוהים מהערכים המדודים. לכן, כנראה, קיים גורם נוסף התורם להורדה של ה-  $\epsilon_{eff}$ . כתוצאה מהאינטראקציה בין מולקולות מים ופני השטח של הפולימרים, נפגעת התזוזה החופשית היחסית של מולקולות המים כתלות במרחק מפני שטח המוצק. המים הספוחים (bound water) מורידים את המקדם הדיאלקטרי (Jones and Friedman, 2000). לפי (Friedman, 1998) בכדי להוסיף את השפעת המים הספוחים למודל הקיים, יש צורך בהגדרת עובי שכבת המים ( $d_w$ ) ובשימוש בפונקציה המתארת את הפרמיטיביות של המים, מערכה המינימאלי ( $\epsilon_{min}$ ) בקרבת פני שטח המוצק ועד לערכה המקסימאלי ( $\epsilon_{max}$ ) ובהתאם, את הפרמיטיביות של שכבת המים.

$$\epsilon_w = d_w \epsilon_{max} / \left( d_w + \frac{1}{\lambda} \ln \left[ \frac{\epsilon_{max} - (\epsilon_{max} - \epsilon_{min}) e^{-\lambda d_w}}{\epsilon_{min}} \right] \right) \quad \text{משוואה 5.1}$$

כאשר  $\lambda = 10^8$  (1/cm),  $\epsilon_{max} = 78.54$ ,  $\epsilon_{min} = 5.5$  (Friedman, 1998).

עובי שכבת המים מתואר על פי משוואה 5.2:

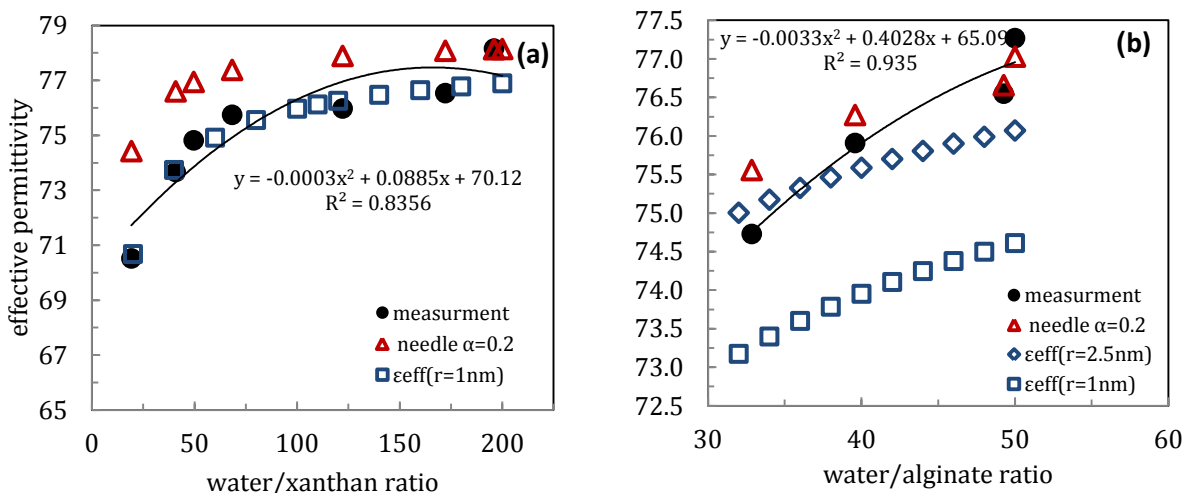
$$d_w = \theta V_s / S_A (1 - \phi) \quad \text{משוואה 5.2}$$

כאשר:  $\theta$  = תכולת רטיבות נפחית,  $V_s$  = נפח המוצקים (של אליפסואיד),  $S_A$  = שטח פנים של אליפסואיד ו-  $\phi$  = נקבוביות.

לשם הערכת השפעת המים הספוחים, נניח צורה של גליל עבור הפאזה המוצקה. אם כך, עובי שכבת המים:

$$d_w = r_s \left[ \left( \frac{(V_s + V_w)^{1/2}}{V_s^{1/2}} \right) - 1 \right] \quad \text{משוואה 5.3}$$

$V_w$  = נפח הפאזה הנוזלית,  $r_s$  = רדיוס החלקיק. כאשר עבור קסנתן נבחר רדיוס מייצג של 1 nm (Whitcomb, 1978), רדיוס מייצג עבור אלגינט לא נמצא בספרות, על כן הונח רדיוס של 2.5 nm. כדי להדגים את השינוי הצפוי ב-  $\epsilon_{eff}$  בהנחה שהנקבוביות ההתחלתית היא 0.4 ו-  $\alpha = 0.2$ , כאשר החלקיק מחטי וברדיוס נבחר, חישוב עובי שכבת המים דרך משוואה 5.3 ואחר כך, חישוב הפרמיטיביות של שכבת המים דרך משוואה 5.1. זו מוצגת באיור 5.3 a ו- b כפונקציה של היחס מים/ EPS. לאחר הכנסת הביטוי של המים הספוחים במודל, מתקבלת התאמה טובה יותר בין התוצאות המדודות למודל, בעיקר במקרה של קסנתן ברדיוס של 1 nm.



**איור 5.3** מדידות ומודול של הפרמיטיביות האפקטיבית ( $\epsilon_{eff}$ ) עם התחשבות במים ספוחים לפי משוואה 5.3, כפונקציה של היחס המשקלי של (a) מים/ קסנתן ברדיוס של 1 nm ו- (b) מים/ אלגינט ברדיוס של 1 nm וברדיוס של 2.5 nm.

## 5.2 מידול הפרמיטיביות האפקטיבית של המצע כתוצאה מיצירת ביופילם

מציאת ה-  $\epsilon_{eff}$  של תווך גרנולרי המושפע מביופילם וחישוב המודל (משוואה 2.3) נעשו בשלושה שלבים,

בדומה למתואר בפרק 2 במודל הערכוב של Maxwell-Garnett (MG), משוואה 2.2,

בשלב הראשון, נעשה שימוש בקשר האמפירי לתוצאות המדודות מאיור 5.2 על מנת להגדיר את

הפרמיטיביות של הביופילם. נבחרו שני יחסים עבור כל חומר, לפי הגבול העליון והגבול התחתון של היחס

מים/ EPS.

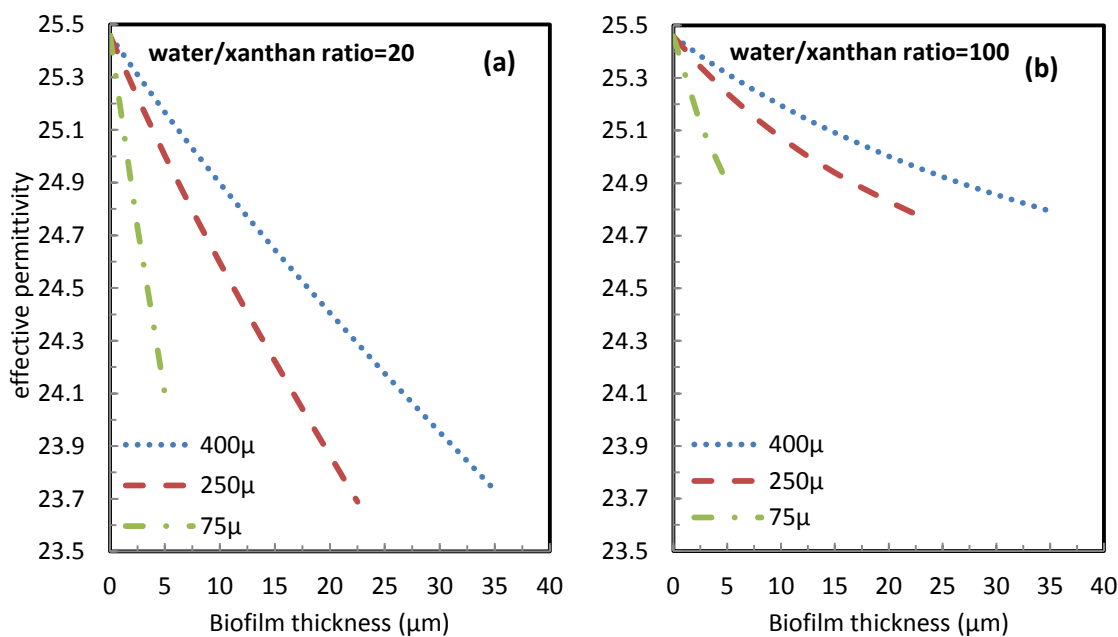
בשלב השני, הוערכה הפרמיטיביות של גרגר חול עטוף בביופילם, לפי משוואה 2.3. לשם כך, הונח יחס  $a/b = 0.466$  = המאפיין חלקיקי קוורץ (לפי Friedman and Robinson, 2002), נקבוביות של מצע נקי  $\alpha = 0.4$ ,  $\epsilon_0 = 0.2$  לפי Robinson and Friedman (2003) הפרמיטיביות של קוורץ  $\epsilon_l = 4.7$ , פרמיטיביות הרקע ( $\epsilon_0$ ) לפי איור 5.3, 71.77 ו-75.97 עבור יחס מים/קסנתן של 20 ו-100, בהתאמה. ועבור אלגינט של 71.82 ו-77.38 ביחס מים/אלגינט של 20 ו-60, בהתאמה. חישוב הפרקציה הנפחית של גרגרי החול ( $f_s$ ) נעשה לפי היחס בין הרדיוס לעובי הביופילם:

$$f_s = \frac{r_s^3}{(r_s + d_b)^3} \quad \text{משוואה 5.4}$$

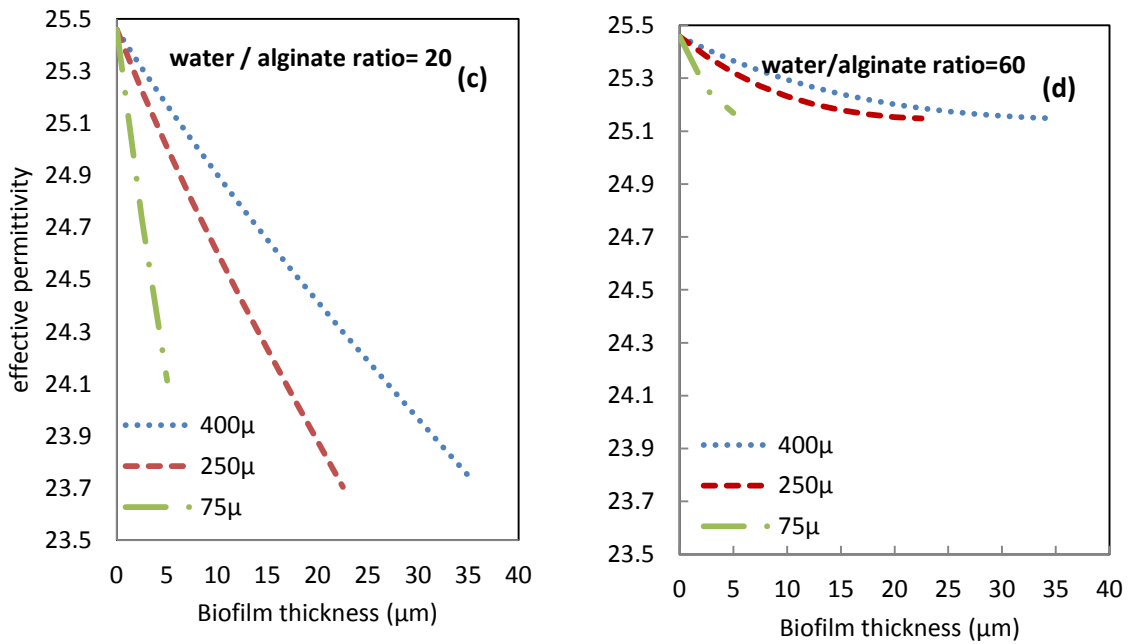
כאשר  $d_b$  = עובי שכבת הביופילם,  $r_s$  = רדיוס הגרגר (קוורץ). בשלב השלישי, מציבים במשוואה 2.3 את הערך שהתקבל בסעיף הקודם- פרמיטיביות של גרגר עם מעטפת של ביופילם, טבול ברקע של מים  $\epsilon_0 = 78.54$ . את הפרקציה הנפחית של הגרגרים והביופילם שעוטף אותם בשלב זה, מחשבים לפי היחס בין הנפח ה"נגוע בביופילם" לנפח הנקי מביופילם, לפי המשוואה:

$$f_{sb} = \frac{(r_s + d_b)^3}{r_s^3 / (1 - \theta_0)} \quad \text{משוואה 5.5}$$

איור 5.4 מציג את תוצאות המודל, לפי החישוב המוזכר לעיל, עבור שלושה קטרים שונים של גרגרי חול ( $75, 250, 400 \mu\text{m}$ ). תוצאות המודל מצביעות על ירידה מתונה יחסית בפרמיטיביות האפקטיבית, עם ההתעבות בקוטר הגרגר וכפונקציה של התפתחות ביופילם. החישובים מסתיימים עבור עובי ביופילם שממלא את כל הנקבוביות התחלתית של המצע הנקי. היחס מים/ EPS מאפיין את שכבת הביופילם ולא את המצע כולו. ככל שהסביבה יותר מוליכת חשמל, יגדל הקושי לביצוע מדידה מדויקת בשיטת ה- TDR.



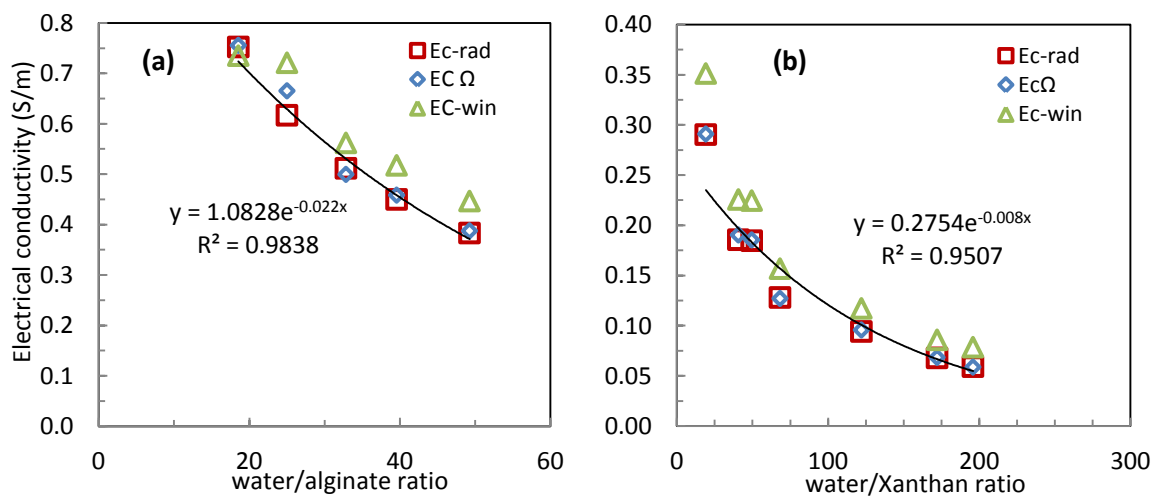
איור 5.4 מידול של הפרמיטיביות האפקטיבית ( $\epsilon_{eff}$ ) של גרגר קוורץ עטוף בביופילם, כפונקציה של עובי הביופילם בשלושה קטרים שונים של 75, 250 ו-  $400 \mu\text{m}$ . נקבוביות התחלתית  $\theta_0 = 0.4$  ו-  $\alpha = 0.2$ . (a) פרמיטיביות של 71.77 עבור יחס מים/קסנתן של 20 ו- (b) פרמיטיביות של 75.97 עבור יחס מים/קסנתן של 100.



**איור 5.4** מידול של הפרמיטיביות האפקטיבית ( $\epsilon_{eff}$ ) של גרגר קוורץ עטוף בביופילם, כפונקציה של עובי הביופילם, בשלושה קטרים שונים 75, 250 ו-400  $\mu\text{m}$ . נקבוביות התחלתית  $\theta_0 = 0.4$  ו- $\alpha = 0.2$ . (c) פרמיטיביות של 71.82 עבור יחס מים/אלגינט של 20 ו- (d) פרמיטיביות של 77.38 עבור יחס מים/אלגינט של 60.

### 5.3 מדידות של המוליכות החשמלית של תערובת מים- EPS

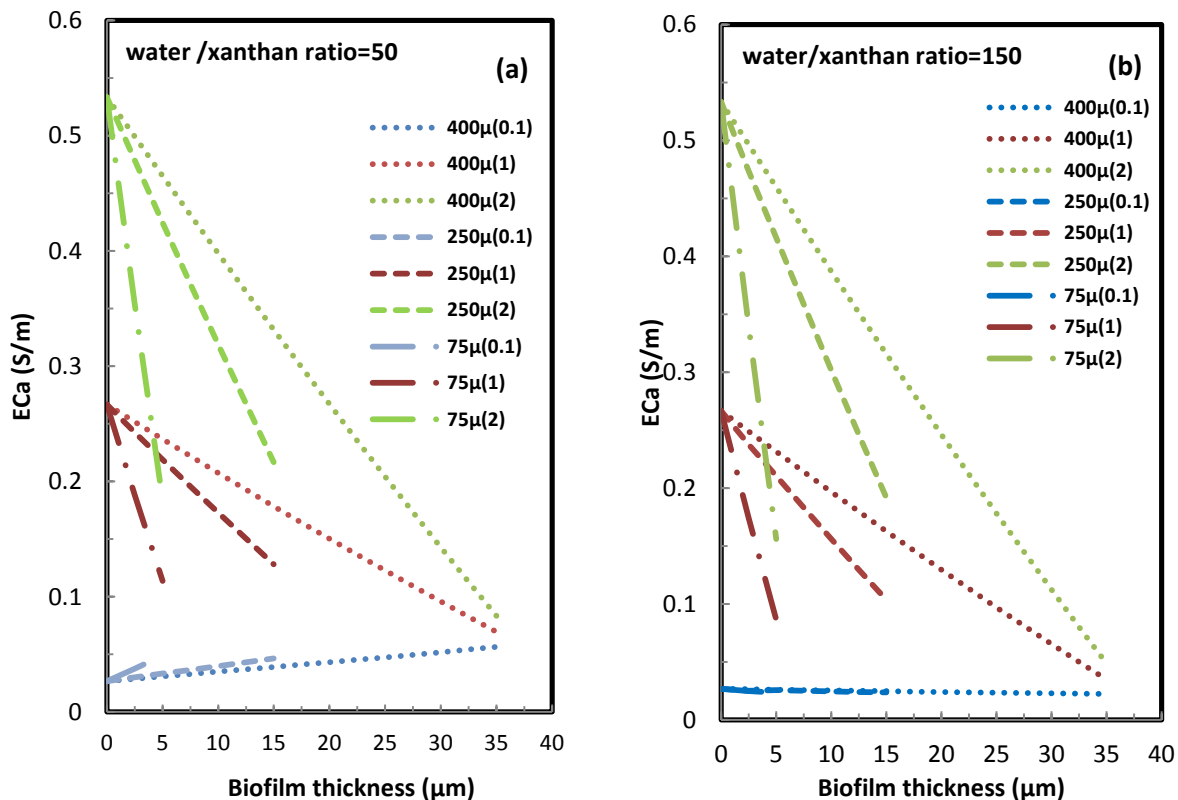
המוליכות החשמלית של חומרי ה- EPS מעורבבים במים מזוקקים נבדקה בשלוש שיטות שונות, כמפורט בפרק 2. בין שלוש השיטות קיימת קורלציה טובה מאוד. מכשיר ה- CDM83 Radiometer נחשב כאמין ביותר למדידות המוליכות החשמלית ולכן, באמצעותו נבחן הקשר בין המוליכות החשמלית ליחס מים- EPS, כפי שמוצג באיור 5.5. המוליכות החשמלית של התערובת מים- EPS, בעיקר במקרה של אלגינט (איור 5.5a), בגלל יחס מיהול נמוך יותר, גבוהה באופן ניכר מהמוליכות של מים מזוקקים בלבד (קרוב לאפס). הסיבה לכך נובעת, כנראה, מריכוז גבוה של אלקטרוליטיים (מלחי נתרן ומלחים נוספים) ב- EPS הסינתטי המסחרי.



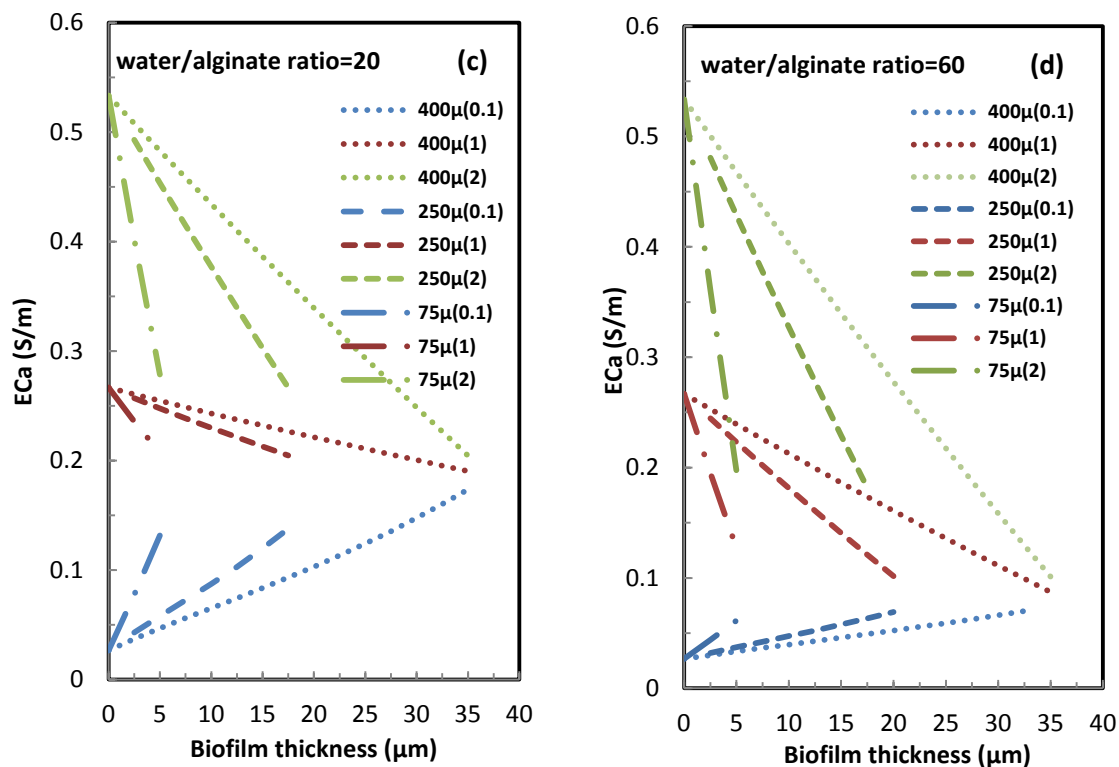
**איור 5.5** מדידות של המוליכות החשמלית בשלוש שיטות שונות, כפונקציה של היחס המשקלי (a), מים/אלגינט ו- (b), מים/קסנתן.

#### 5.4 מידול של המוליכות החשמלית הספציפית של המצע כתוצאה מיצירת מביופילם

מהפונקציה האקספוננציאלית המוצגת באיור 5.5 a ו-b חולצה המוליכות החשמלית של תערובת מים- EPS עבור שני יחסים שונים, המבטאים גבול עליון וגבול תחתון של היחס מים- EPS. עבור יחס מים- קסנתן של 150 ושל 50 התקבלו מוליכויות של  $0.0829 \text{ S/m}$  ו-  $0.1846 \text{ S/m}$ , בהתאמה. עבור יחס מים-אלגינט של 60 ושל 20 התקבלו מוליכויות של  $0.2893 \text{ S/m}$  ו-  $0.6974 \text{ S/m}$ , בהתאמה. באמצעות משוואה 2.3 חושבה המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) על פי אותם השלבים וההנחות שפורטו קודם. כלומר, בהנחה שהמוליכות החשמלית של קוורץ הינה 0 והמוליכות החשמלית של הביופילם אינה מושפעת ממוליכות הרקע ( $EC_w$ ) ונקבעת על פי המדידות שנעשו בתוספת מים מזוקקים, כפונקציה של עובי הביופילם, עבור שלושה קטרים שונים של גרגרי חול ושלוש תמיסות רקע שונות ( $EC_w$ ). באיור 5.6 מוצג הקשר בין ה-  $EC_a$  לעובי הביופילם על פי חישובי המודל. כאשר המוליכות של הביופילם גבוהה מזו של תמיסת הרקע, בריכוזים גבוהים של EPS ובערכים נמוכים של  $EC_w$ , ישנה עלייה במוליכות החשמלית כפונקציה של עובי הביופילם ו-  $EC_a$  גבוהה מ-  $EC_w$ , ולהפך: כאשר מוליכות הביופילם נמוכה מזאת של הרקע, המוליכות החשמלית הנדמית נמוכה ממוליכות הרקע ויורדת עם הגידול בעובי הביופילם. ההשפעה של הביופילם (השיפוע של הקווים) גדולה יותר במצע עם גרגירים קטנים.



**איור 5.6** מידול המוליכות החשמלית הספציפית ( $EC_a$ ) של גרגר חול עטוף בביופילם כפונקציה של עובי הביופילם עבור שלושה קטרים שונים של גרגר (75, 250, 400  $\mu\text{m}$ ) ושלוש תמיסות רקע שונות (0.1, 1, 2 S/m). יחס מים/קסנתן של 50 ו-150 (a,b). יחס מים אלגינט של 20 ו-60 (c,d). נקוביות התחלתית של 0.2, 0.4, ויחס  $a/b = 0.466$ .



**איור 5.6** מידול המוליכות החשמלית הספציפית ( $ECa$ ) של גרגר חול עטוף בביופילם כפונקציה של עובי הביופילם עבור שלושה קטרים שונים של גרגר (75, 250, 400  $\mu\text{m}$ ) ושלוש תמיסות רקע שונות (0.1, 1, 2 S/m). יחס מיס/קסנתן של 50 ו-150 (a,b) יחס מים אלגינט של 20 ו-60 (c,d). נקבוביות התחלתית של 0.2, 0.4 ויחס  $a/b = 0.466$ .

**5.5 מדידה ומידול של הפרמיטיביות והמוליכות החשמלית של תערובת מים-אלגינט שטופה ממלחים**  
 התוצאות והחישובים המוצגים בפרק הקודם מצביעים על תרומה לא מבוטלת של מלחים באבקת האלגינט המסחרית למוליכות החשמלית. בפרק זה, ננסה להסביר את התוצאות שהתקבלו עבור תערובת מים-אלגינט באמצעות מדידות ומידול, לאחר שטיפת המלחים. לניסוי זה הוכנה תמיסת מים/אלגינט ביחס 1:100. אל התמיסה הוספו 50Mm/l  $\text{CaCl}_2$  (Ntaralgiannis and Ferguson, 2009), הערבוב נעשה בבלנדר כמתואר בתחילת הפרק. כאשר מוסיפים סודיום אלגינט לתמיסת  $\text{CaCl}_2$ , יוני הסידן מחליפים את יוני הסודיום בפולימר (בתוך בלוק GG), כל יון סידן יכול להתחבר לשתי יחידות המבנה של הפולימר, מצב זה נקרא "cross linking" ויוצר את האופי הג'לי של האלגינט (Aslani and Kennedy, 1996). התערובת סורכזה בצנטריפוגה במהירות של 8,510 rpm למשך 10 דקות, כך שהתאפשרה הפרדת הנוזל מהמשקע. כמות מים מזוקקים שקולה לנפח הנוזל שהוצא, הוספה ועורבבה יחד עם המשקע. לאחר 11 חזרות של הפרדת הפאזות והוצאת הנוזל (בשלב זה, בלי צנטריפוגה, אלא ע"י ערבוב ידני של התערובת והמתנה עד ליצירת שתי פאזות) עד שערך המוליכות החשמלית של הנוזל היה קרוב לערך הנמדד עבור מים מזוקקים ( $EC_{dw} = 0.006 \text{ S/m}$ ,  $EC_f = 0.0089 \text{ S/m}$ ). מהליך זה, ניתן היה להעריך את כמות המלחים באבקת סודיום אלגינט המקורית ע"י סכימה של מכפלות נפחי התמיסה שהוצאה במוליכות החשמליות שלה והפחתת התרומה של  $\text{CaCl}_2$  אותו הוספנו לתערובות (המוליכות האקוויולנטית של  $\text{CaCl}_2$  היא  $135 \text{ cm}^2/\text{eq} \cdot \text{S}$  כלומר, 13.5 S/m בליטר).  
 מכאן מתקבלת מוליכות חשמלית של  $0.48 \text{ dS/m} \cdot \text{L}$  בגרם אבקת אלגינט. לצורך כך, הונח משקל מולקולרי של המלח (בסביבות 70 gr/mole) ( $1 \text{ dS/m} \approx 10 \text{ meq/l}$ ) כלומר, כשליש ממשקל האבקה הם מלחים



מסיסים. התערובת השטופה ממלחים הוכנסה לייבוש בתנור בטמפ'  $60^{\circ}\text{C}$ , כמתואר בתחילת הפרק. באיור 5.7 מוצגות מדידות של מוליכות חשמלית עבור יחס אלגינט-מים משתנה, ללא שטיפת מלחים (אדום) ולאחר שטיפת מלחים (כחול). ניתן לראות הבדל של פי 20 במוליכות החשמלית בין התערובות. בתערובת השטופה, העלייה הליניארית של המוליכות החשמלית עם העלייה בריכוז האלגינט, מרמזת כנראה, על התרומה של הסידן הקשור בשרשראות האלגינט. הפרמיטיביות האפקטיבית נמדדה גם כן ומוצגת באיור 5.8. תחילה,

נראה כי ישנה ירידה מסוימת בפרמיטיביות האפקטיבית, אך לאחר מכן, בניגוד לציפיות, עולה הפרמיטיביות, עם העלייה בריכוז האלגינט ביחס למים.

ייתכן ועלייה זו קשורה להיווצרות של אגרגטים בתערובת, כך שבקרבת המחוש יש יותר מולקולות מים "חופשיות" ( $\epsilon_{eff}=78.54$ ), המעלות את הפרמיטיביות האפקטיבית. מידול של המוליכות החשמלית הנדמית של תווך המושפע מביופילם, עבור תערובת אלגינט-מים ללא מלחים, ממחיש את ההשפעה של תכונות ההולכה של שכבת הביופילם על המוליכות החשמלית האפקטיבית כפונקציה של עובי הביופילם. באיור 5.9 ניתן לראות את השתנות המוליכות החשמלית של התווך בשלושה מקרים:

(1) כאשר מניחים שהביופילם לא מוליך ( $EC_b=0$ ),

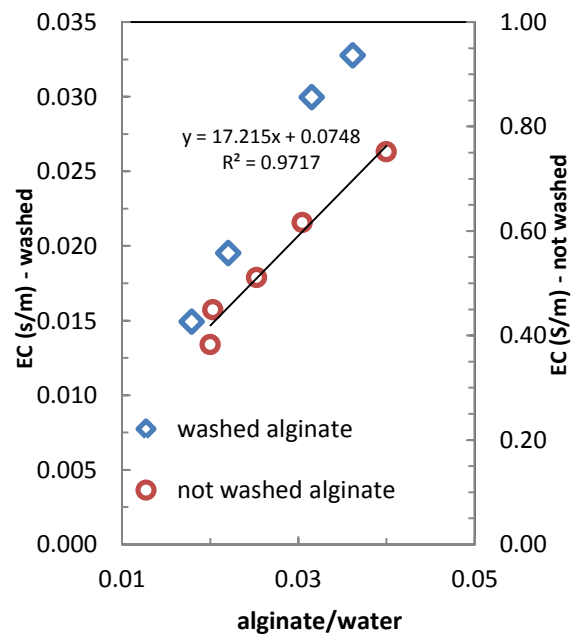
כאשר מניחים יחס מים-אלגינט 60 ללא שטיפה

$EC_b=0.015\text{ S/m}$  (איור 5.6) ו- (3) מניחים ערך נוסף

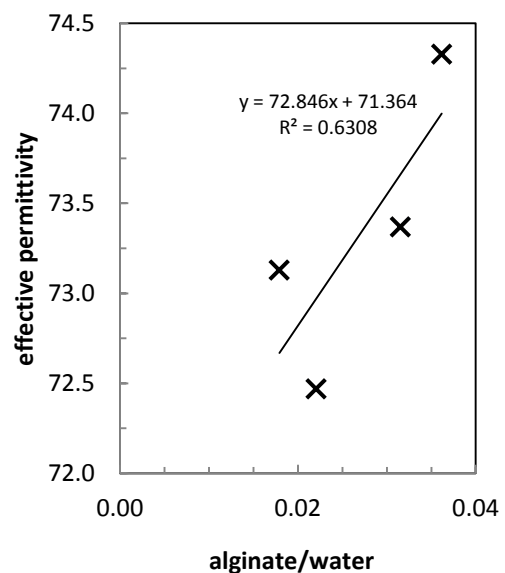
שנמצא ביניהם ( $EC_b=0.0015\text{ S/m}$ ), כאשר תמיסת הרקע בשלושת המקרים  $EC_w=0.01\text{ S/m}$ , נקבוביות התחלתית של 0.4, 0.2 ויחס  $a/b=0.466$ . באיור 5.9 נראית פחיתה במוליכות החשמלית עם העלייה בעובי הביופילם, כאשר

המוליכות של הביופילם נמוכה מזו של תמיסת הרקע. ביופילם לא מוליך משול מבחינת המוליכות החשמלית לחול קוורץ טבול במים והפחיתה במוליכות החשמלית נובעת מהעלייה בפרקציה הנפחית של הפאזות הלא מוליכות ביחס לפאזות המוליכות. היחס בין מוליכות התמיסה ( $EC_w$ ) למוליכות של

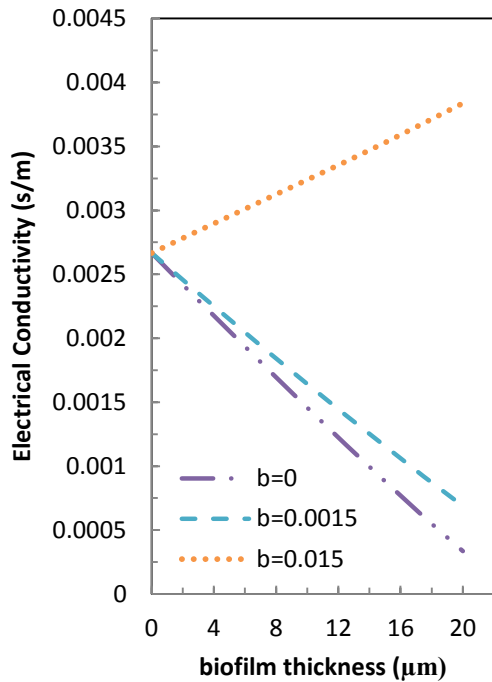
שכבת הביופילם קובע האם תתקבל פחיתה או עלייה במוליכות החשמלית של התווך עם העלייה בעובי הביופילם (איורים 5.9 ו-5.6).



איור 5.7 מדידות של מוליכות חשמלית ביחס אלגינט-מים משתנה עבור תערובות שטופה ממלחים (כחול) ועבור תערובות לא שטופה (אדום) תהליך הייבוש המתואר משמאל לימין.



איור 5.8 מדידות של פרמיטיביות אפקטיבית ביחס אלגינט-מים משתנה עבור תערובות ללא מלחים. תהליך הייבוש מתואר בגרף שמאל לימין.



**איור 5.9** המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) של גרגר חול עטוף בביופילם כפונקציה של עובי הביופילם. עבור קוטר גרגר  $250 \mu\text{m}$ ,  $EC_w = 0.01 \text{ S/m}$ ,  $\alpha = \phi = 0.4$ ,  $a/b = 0.466$ ,  $0.2$ , מוליכות הביופילם ( $b$ ) ( $\text{S/m}$ ).

### 5.6 מדידות של מוליכות חשמלית, מקדם דיאלקטרי ומוליכות הידראולית של תערובת מים-אלגינט- חול במערכת זרימה

הניסויים נערכו בשתי עמודות ( $A=19.63 \text{ cm}^2$ ) שכללו חול קוורץ "160" שטוף במים מזוקקים, וריכוז משקלי שונה של אלגינט (2% ו-5%) מעורבב עם  $50 \text{ mM CaCl}_2$ . החול יובש בטמפרטורה של  $60^\circ\text{C}$  ועורבב בתדירות גבוהה במשך שלושה ימים, עד ייבוש המים. העמודות הורו בתמיסת  $\text{CaCl}_2$  בריכוז של  $100 \text{ meq/l}$ . עם קבלת ריכוז מלחים שווה בכניסה וביציאה מהעמודה, נלקחו מדידות של מוליכות חשמלית, מקדם דיאלקטרי ומוליכות הידראולית ולאחר מכן הוחלפה התמיסה לריכוז של  $50 \text{ meq/l}$ , וחזרה על אותו הליך, עבור ריכוז תמיסה של  $10$  ו- $2 \text{ meq/l}$  וכן עם מים מזוקקים.

**הערכת המוליכות החשמלית של הביופילם ועובי הביופילם נעשו באמצעות "מודל הערבוב".**

בשלב ראשון, נקבעה המוליכות החשמלית של הביופילם הסינתטי. היחס אלגינט-קרקע חושב ע"י הכפלת צפיפות החלקיקים ( $\rho_s$ )  $2.65 \text{ gr/cm}^3$  בנפח של גרגר ספרואידי ( $V_s$ ), כמתואר במשוואה 5.6

$$V_s = \frac{4\pi ab^2}{3} ; \quad M_s = A_s * \rho_s \quad \text{משוואה 5.6}$$

כאשר:  $a = 48.085 \mu\text{m}$  ו-  $b = 103.188 \mu\text{m}$  (חושבו לפי:  $abc = r_s^3 \leftarrow (a/b)b^3 = r_s^3 \leftarrow abc = r_s^3$ )  
 $d_b = r_s (a/b)^{(-1/3)}$ ,  $(a = r_s (a/b)^{(2/3)})$  עובי הביופילם.

לאחר מכן, חושב היחס אלגינט-למים ע"י חלוקת הערך ממשוואה 5.6 בנפח המים בעמודה והכפלה בצפיפות המים ( $1 \text{ gr/cm}^3$ ). באמצעות היחס אלגינט-מים שהתקבל, ניתן היה להעריך את המוליכות החשמלית של הביופילם הסינתטי שטוף ממלחים, מתוך משוואת הקו ממדידות ע"י Radiometer EC meter (איור 5.7). בשלב השני, חושבה באמצעות המודל המוליכות החשמלית של גרגר קוורץ עטוף בביופילם ( $sb$ ), כאשר מוליכות גרגר קוורץ היא  $EC_l = 0$ , והמוליכות של הביופילם נקבעה מתוך איור 5.7 ובשימוש באותן הנחות עבור  $\alpha = 0.2$ ,  $a/b = 0.466$ . הנקבוביות ההתחלתית בעמודה בריכוז 5% הייתה  $\phi = 0.553$  ובריכוז של 2%,  $\phi = 0.53$ . הפרקציה הנפחית של הגרגרים חושבה בדומה למתואר במשוואה 5.4, רק עבור גרגר ספרואידי ( $oblate$ ), כמתואר במשוואה 5.7 ולפי עובי ביופילם מוערך (בשלב זה הינו בגדר ניחוש בלבד).

$$f_s = \frac{ab^2}{(a+db)(b+db)^2} \quad \text{משוואה 5.7}$$

ע"י הצבת הפרמטרים שהוצגו לעיל במשוואת המודל, חושבה המוליכות החשמלית של גרגר עטוף בביופילם עם עובי מוערך. בשלב הבא, באמצעות המוליכות החשמלית שנמצאה עבור הפרקציה גרגר- ביופילם ( $sb$ ), יחד עם המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) שנמדדה ועם המוליכות החשמלית של הרקע ( $EC_w$ ) (טבלה 5.2) עבור כל תמיסה (בריכוז שונה) שעברה בעמודה, חושבה הפרקציה הנפחית של הביופילם כמתואר במשוואה 5.8.

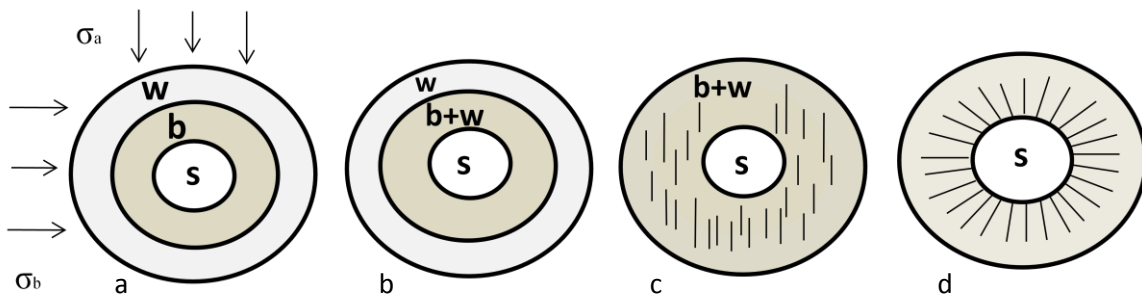
$$f_b = \frac{(a+db)*(b+db)^2 - (ab^2)}{ab^2/f_0} \quad \text{משוואה 5.8}$$

באמצעות שימוש במשוואת המודל, ניתן היה לחשב את עובי הביופילם הסופי לעומת עובי הביופילם המוערך, בשלב השני, בהליך איטרטיבי. תוצאות פסיקליות (עובי חיובי) התקבלו רק עבור הריכוזים הגבוהים (100, 50, 10 meq/l CaCl<sub>2</sub>) ומוצגות בטבלה 5.2.

**טבלה 5.2** מידול של עובי הביופילם הסינתטי עבור עמודות חול קוורץ המכילות אלגינט (5%, 2%) בתמיסות רקע ( $EC_0$ ) של 100, 50, 10 meq/l

	alginate 2%			alginate 5%		
	EC <sub>w</sub> (S/m)	EC <sub>a</sub> (S/m)	db (μm)	EC <sub>w</sub> (S/m)	EC <sub>a</sub> (S/m)	db (μm)
CaCl <sub>2</sub> (100meq/l)	<b>0.9020</b>	0.22393	7.35	<b>0.9095</b>	0.22094	9.04
CaCl <sub>2</sub> (50meq/l)	<b>0.4775</b>	0.11610	7.63	<b>0.5335</b>	0.14473	7.50
CaCl <sub>2</sub> (10meq/l)	<b>0.0985</b>	0.02589	6.58	<b>0.1107</b>	0.03479	5.20

מההיבט הכימי, היינו מצפים שעובי הביופילם יגדל עם הירידה ב-  $EC_w$ , אבל ייתכן שישנם תהליכים נוספים שהשפיעו על התוצאות. כמו למשל, איבוד (שטיפה) של אלגינט מהעמודה, בנוסף לטעויות אפשריות במדידת המוליכות החשמלית הנדמית. עבור ריכוז של 2 meq/l CaCl<sub>2</sub> ועבור מים מזוקקים, בהינתן הערכים המדודים ונקבוביות מחושבת של 0.53 ו-0.553, לא התקבל פתרון פיזיקאלי על פי מודל הערבוב. כלומר, הנפח שתופס הביופילם גדול מנפח הנקבובים ומכאן שעובי ביופילם גדול מכדי להיות פיזיקאלי. כאמור, מודל הערבוב מניח 3 שכבות נפרדות, כאשר במקרה זה גרגר הקוורץ עטוף ע"י שכבת ביופילם אחידה הטבולה ברקע של מים (איור 5.10a), אולם בפועל, תיתכן קונפיגורציה שונה של השכבות, כמתואר באיור 5.10b, כאשר בעצם נוצרת שכבת ג'ל-מים שהולכת וגדלה על חשבון הרקע, כלומר חלק מהמים "החופשיים" מתערבבים עם הביופלמים וחלק יוצרים פאזה מקיפה נפרדת. אפשרות נוספת לקונפיגורציה של השכבות, עשויה להיות היווצרות של שתי פאזות, האחת מייצגת את הגרגר המוצק והשנייה את פאזת הג'ל, הכוללת בתוכה גדילי ביופילם (יקראו מעתה, מחטים), עטופים במים (איור 5.10c). סידור המחטים בתוך שכבת ג'ל-מים יכול להיות אקראי (אוריינטציה של בין 0° ל-90°) ביחס לכיוון השדה החשמלי (הסידור הקונצנטרי), (איור 5.10d), כמאפיין תוך איזוטרופי, או באוריינטציה מועדפת ביחס לכיוון השדה, כמאפיין



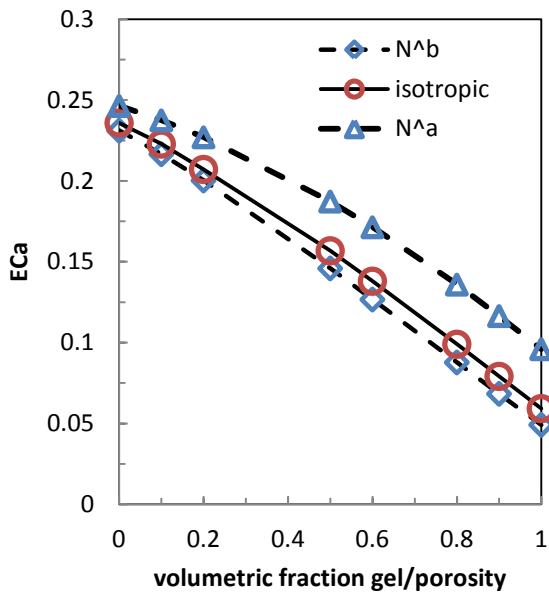
**איור 5.10** סקיצה של שלושה פאזות: w-מים, b-ביופילם, s-גרגר קוורץ. (a) לפי מודל הערבוב המוצע בעבודה זו. (b) מודל המניח שכבת ג'ל (b+w) עוטף גרגר וטבולה במי רקע (c) שכבת ג'ל מורכבת מגדילי ביופילם מחטיים בתווך אנאיזוטרופי עוטפת גרגר קוורץ. (d) סידור קונצנטרי של גדילי הביופילם שקונפיגורציה (a) או (b) מהווים קירוב שלו.

תווך אנאיזוטרופי, כאשר המחט עומדת במקביל לשדה ( $N^a=0$ ) או בניצב לכיוון השדה החשמלי המופעל ( $N^b=1/2$ ) (Jones and Friedman, 2000). עבור כל אחד מהמצבים הללו חושבה המוליכות החשמלית ביחס למוליכות החשמלית של תמיסת הרקע ( $EC=1$ ) כפונקציה של יחס ג'ל-מים עולה (המתאר את ההשפעה של תוספת המים לשכבת הג'ל וגריעתם משכבת מי הרקע). עבור החישובים הונח כי  $\phi = 0.553$ ,  $\alpha = 0.2$ , יחס משקלי אלגינט/רקע = 0.005, יחס משקלי מים/אלגינט (בביופילם) = 40, מוליכות הגרגר  $EC_s = 0$ , צפיפות המחט שווה לצפיפות מים ( $\rho = 1 \text{ gr/cm}^3$ ), המוליכות החשמלית של המחט  $EC_{needle} = 0$  (כפי שניתן לראות באיור 5.9 כאשר מבצעים שטיפה של המלחים מהביופילם הסינתטי אזי המוליכות של הביופילם נמוכה מהמוליכות של הרקע). החישוב של  $EC_a$  של התווך האנאיזוטרופי נעשה בשלושה שלבים, כאשר תחילה חושבה המוליכות החשמלית עבור מחטים בכיוון מסוים  $a$  או  $b$ , ביחס מים עולה, בתוך שכבת הג'ל לפי משוואה 5.9:

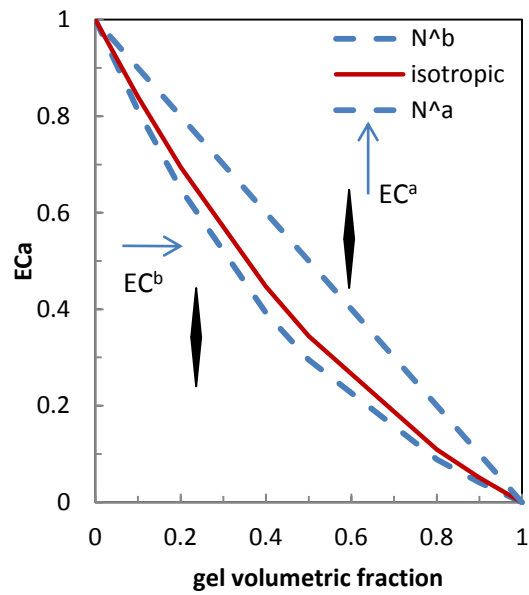
$$\sigma_{eff}^i = \sigma_0 + \frac{\left[ \frac{f(\sigma_1 - \sigma_0)[\sigma_0 + \alpha(\sigma_{eff}^i - \sigma_0)]}{[\sigma_0 + \alpha(\sigma_{eff}^i - \sigma_0)] + N^i(\sigma_1 - \sigma_0)} \right]}{\left[ 1 - \frac{fN^i(\sigma_1 - \sigma_0)}{[\sigma_0 + \alpha(\sigma_{eff}^i - \sigma_0)] + N^i(\sigma_1 - \sigma_0)} \right]} \quad \text{משוואה 5.9}$$

$\sigma_0$  - מוליכות חשמלית של הרקע,  $\sigma_1$  - מוליכות חשמלית של מחט (אפס במקרה הנדון). מקדם דה-פולריזציה  $N^i = 0$  או 0.5. חישוב של שני השלבים הבאים, ג'ל עוטף גרגר, וגרגר+ג'ל עטופים במים נעשה באמצעות משוואה 2.3 לתווך איזוטרופי. חישובים של התווך האיזוטרופי נעשו גם כן בשלושה שלבים (כמתואר בתחילת הפרק). ההבדלים בין שני הסידורים האנאיזוטרופיים לסידור האיזוטרופי-אקראי מובאים באיור 5.12 עבור השלב הראשון של החישוב, דהיינו מחטים טבולות בכמות עולה של מים. ובאיור 5.11 מוצגת המוליכות החשמלית הנדמית של התווך כפונקציה של יחס ג'ל-נקבוביות.

ניתן לראות (איור 5.11 ו-5.12) שהעקום עבור התווך האיזוטרופי תמיד נמצא בין שני העקומים האנאיזוטרופים ובסמיכות רבה לעקום שמייצג את מקדם דה-פולריזציה בניצב לכיוון השדה החשמלי ( $N^b$ ) זאת משום שבמחט יש שני כיווני  $b$  ורק כיוון  $a$  יחיד והרכיבים של מקדם דה-פולריזציה הם  $0, 1/2, 1/2$ .  $N^i =$  דוגמא זאת מתייחסת לסידור שונה של הפאזות. ככל שגדלה פאזת הג'ל, קרי יותר מים עוטפים את מולקולת האלגינט, אזי המוליכות החשמלית האפקטיבית יורדת. ייתכן ובאמצעות גישה זו ניתן להסביר את המוליכות החשמלית האפקטיבית הנמוכה שנמדדה עבור ריכוז של  $2 \text{ meq/l CaCl}_2$  ועבור מים מזוקקים.

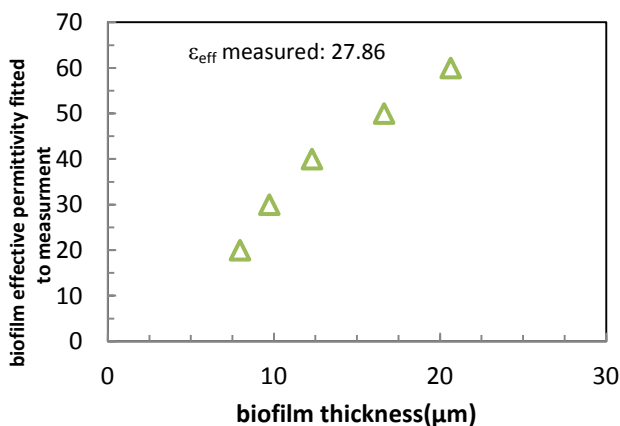


**איור 5.11** מידול של המוליכות החשמלית עבור תווך קוורץ, ביופילם כפונקציה של יחס ג'ל נקבוביות עולה. באדום- לפי תווך איזוטרופי. כחול תווך אנאיזוטרופי. עליון- במקביל לכיוון השדה, תחתון- בניצב לכיוון השדה.



**איור 5.12** מידול של המוליכות החשמלית עבור מחט (גדיל ביופילם) טבולה במי רקע. כפונקציה של יחס ג'ל נקבוביות עולה באדום- לפי תווך איזוטרופי. כחול תווך אנאיזוטרופי. עליון- במקביל לכיוון השדה, תחתון- בניצב לכיוון השדה.

**הערכת המקדם הדיאלקטרי של הביופילם הסינתטי נעשתה גם כן באמצעות מודל הערבוב על פי אותם השלבים שמפורטים לעיל.** המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי הממוצע שנמדד עבור מצע של גרגרי חול בריכוז 2 ו-5% אלגינט הינו 25.01 ו-27.86, בהתאמה. שני הערכים הללו נמוכים מהמצופה עבור מצע עם 50% נקבוביות, כאשר  $\alpha = 0.2$  ו- $a/b = 0.466$ . המקדם הדיאלקטרי של קוורץ  $\epsilon_s = 4.7$  ושל מים  $\epsilon_w = 78.54$  (הערך של המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי עבור מצע נקי לפי אותם תנאים שווה ל-32). בהנחה, שעבור תמיסת רקע עם מוליכות של  $0.9095 \text{ S/m}$  עובי הביופילם המתקבל (לפי טבלה 5.2) הוא  $9.04 \mu\text{m}$ , מתקבל מקדם דיאלקטרי בסביבות 25 של הביופילם הסינתטי (איור 5.13). כלומר, עבור מדיום המורכב בעיקרו



**איור 5.13** מידול של המקדם הדיאלקטרי של אלגינט (ביופילם) כפונקציה של עובי הביופילם. בריכוז של 5% אלגינט, נקבוביות  $\phi = 0.55$ ,  $\alpha = 0.2$ ,  $a/b = 0.466$ , מקדם דיאלקטרי של מים  $\epsilon_w = 78.54$ , ומקדם דיאלקטרי אפקטיבי מדוד  $\epsilon_{eff} = 27.86$ .

ממים התקבל ערך הנמוך בערך פי 3 מהערך של מים. הסיבה לערך הנמוך של המקדם הדיאלקטרי לא ברורה, ניתן לנסות ולהסביר את התופעה בכך שבאריזת החול נשארו כיסי אוויר שהמים לא הצליחו לדחוק. חשוב לציין שבשלב הרוויה העמודה, בריכוז 5% הופעל עומד לחץ של יותר ממטר בנוסף ללחץ שיצרה המשאבה, על מנת לדחוק את האוויר כלפי מעלה על ידי המים. כעבור כמעט שבוע ימים הורוטה העמודה (בריכוז של 2% לקח מספר שעות להרוות את

העמודה). ייתכן כי מבנה האריזה הופר בשלב זה ונוצרו כיסי אוויר באריזת החול.

**המוליכות ההידראולית הרוויה של המדיום מים-EPS-** חול שנמדדה לאורך הניסוי, לא השתנתה באופן ניכר, הממוצע של המוליכות ההידראולית בין שתי העמודות עומד על  $9 \pm 1$  cm/h. לעמודה עם 5% אלגינט הוסף יחסית מעט  $\text{CaCl}_2$  וייתכן ולא כל יוני הנתרן הוחלפו ע"י הסידן. בתחילת ניסוי הזרימה המוליכות ההידראולית הייתה נמוכה (בסביבות 4 cm/h). ייתכן וחלק מהנתרן שנשארו במערכת גרם לתפיחה ובכך למוליכות ההידראוליות הנמוכה, כאשר כל הסידן החליף את הנתרן עלתה המוליכות ההידראוליות בערך פי 2 מערכה ההתחלתי ונשארה על ערך ממוצע של 9.8 cm/h, עד סוף הניסוי (תוצאות לא מובאות). במסגרת ניסוי זה, לא ניתן להגיד הרבה על השינויים במוליכות ההידראוליות, בין המדידות ובין העמודות, לאורך הניסוי. ייתכן כי תהליכים כגון: הידרופוביות, תפיחה של אלגינט, שחרור של מים מהחומר הסופח, שינוי מבנה הקרקע והתרוממות הקרקע הביאו לתנודות במדידה של המוליכות ההידראוליות. המוליכות ההידראולית של חול קוורץ "160" בנקוביות שבין 35-40% הינה בסביבות 30 cm/h, כך שללא ספק התוספת של האלגינט למצע תרמה לשינוי ניכר בנקוביות (50%) ולפחיתה משמעותית של המוליכות ההידראולית.

### 5.7 דיון ומסקנות

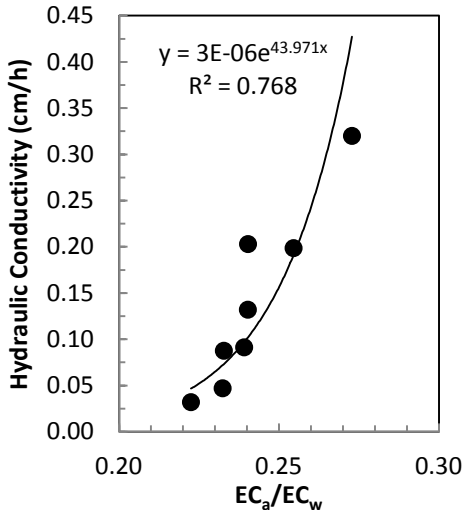
פרק זה עוסק בתכונות החשמליות של חומרי ה-EPS הסינתטיים. בכדי להשליך מחומרים אלו על חומרי ה-EPS הטבעיים אותם מפרישים חיידקים חשוב ללמוד ולהבין את התכונות הפיזיקאליות והכימיות שלהם. בתחילת הפרק, הוצגו מדידות ומידול של החומרים בתערובת עם מים מזוקקים כאשר היחס בין תכולת המים לתכולת ה-EPS הסינתטי השתנה. הפרמיטיביות שחושבה לפי המודל, בשתי התערובות (אלגינט וקסנתן), גבוהה מהפרמיטיביות המדודה. לקיחה בחשבון של השפעת המים הספוחים לפי המודל שהציעו Jones and Friedman (2000) תרמה להורדת הפרמיטיביות האפקטיבית ולהתאמה טובה יותר, בעיקר עבור קסנתן. המידול של הפרמיטיביות האפקטיבית כפונקציה של עובי הביופילם נעשה עבור שלושה קטרים של גרגרי חול ביחס מיהול גבוה וביחס מיהול נמוך לשתי התערובות. התוצאות של המודל היו צפויות. כלומר, ביחס מיהול נמוך התקבלה פחיתה חדה יותר בפרמיטיביות מאשר בתערובות מהולה. המוליכות החשמלית שנמדדה, בעיקר בתערובת של אלגינט הייתה גבוהה בהרבה מהמצופה ( $0.4-0.75$  S/m) לאחר שהנחנו בתחילת המחקר שמוליכות הביופילם שווה לאפס. המידול של המוליכות החשמלית הנדמית כפונקציה של עובי ביופילם בשלושה קטרים שונים של חלקיקים ובשלוש תמיסות רקע שונות עבור יחס מים-EPS גבוה ונמוך מלמד על ההשפעה הרבה שיש לתמיסת הרקע על השתנות המוליכות החשמלית עם העלייה בעובי הביופילם. כלומר, כאשר החוזק היוני של תמיסת הרקע נמוך בהשוואה למוליכות של הביופילם מתקבלת עלייה במוליכות החשמלית עם התעבות הביופילם. לאחר מכן נבדקו באמצעות שני ניסויי זרימה, התכונות החשמליות וההידראוליות של מצע קוורץ-אלגינט-תמיסה. מצד אחד ניסוי זה כלל בחובו מספר רב של אי-ודאויות, כגון: אופן פיזורו של האלגינט בעמודה, מדידות נמוכות מדי של המקדם הדיאלקטרי, צמיגות האלגינט והשפעתה על המוליכות החשמלית. מצד שני ניתן באמצעות אנליזה של כל הגורמים במערכת להגיע למספר מסקנות עיקריות:

(א) באבקת סודיום אלגינט המסחרית ששימשה בניסויים ישנם מלחים מסיסים אשר גרמו למוליכות החשמלית הגבוהה. הנחה זו אוששה לאחר חזרה על הניסוי עם שטיפה של המלחים כמתואר בסוף הפרק.

נמצא כי אבקת סודיום אלגינט מכילה 30% מלחים. על כן, בכדי ליישם את רעיון הביופילם בעזרת האנאלוגים הסינתטיים (בעיקר כשמודדים תכונות חשמליות) חשוב לנסות להדיח את המלחים בעזרת מים מזוקקים. (ב) הוספת  $\text{CaCl}_2$  לתערובת הייתה הכרחית על מנת שיון הסידן ידחק את יון הנתרן מהפולימר. בזכות הג'ל שהתקבל כתוצאה מקשרי "cross linking" שיוצר הסידן, התאפשרה שטיפת הנוזל המכיל מלחים מן התערבות.

במקרה של אבקת האלגינט, באמצעותה נעשו ניסויים אלה, לא קיים המידע בדבר הסידור המולקולארי (תצורת בלוקים) שלה, ולכן התכונות הפיסקו-כימיות שלה לא ידועות. בהתאם לכך לא ניתן לדעת בוודאות האם כל הסידן שהוסף החליף את הסודיום. (ג) הצמיגות של האלגינט משתנה בהתאם למבנה המולקולארי של הפולימר ולכמות המוספת של  $\text{CaCl}_2$ . ככל שעולה הכמות היחסית של מבנה GG בשרשרת הפולימר וככל שגדל ריכוז הסידן, הצמיגות של האלגינט תגדל. הצמיגות של אלגינט גבוהה פי  $10^2$ - $10^3$  מהצמיגות של מים (Simeone et al., 2004; Wolka et al., 2004) ועל כן, ייתכן שגם היא מהווה פקטור בירידה של המוליכות החשמלית המדודה, אולם לפי הערכים הקיימים בספרות היינו מצפים שההשפעה תהא גדולה יותר. (ד) מודל הערבוב עבור שלוש פאזות שונות לא הצליח להסביר פיזיקאלית עובי ביופילם כאשר המוליכות החשמלית האפקטיבית המדודה נמוכה מהמוליכות החשמלית של הביופילם בהינתן נקבוביות מסוימת ותמיסת רקע מאוד מהולה. נראה כי מודל ערבוב המניח ערבוב של מי הרקע בשכבת הג'ל סביב גדילי הביופילם, מפחית את המוליכות החשמלית האפקטיבית של גרגר עטוף בג'ל עם העלייה בעובי הביופילם, או במילים אחרות עם התווספות מי הרקע לשכבת הג'ל. ייתכן ובאמצעות גישה זו ניתן להסביר את המוליכות החשמלית האפקטיבית הנמוכה יחסית שנמדדה עבור ריכוזים נמוכים של  $\text{CaCl}_2$ .

## 6. סיכום ומסקנות



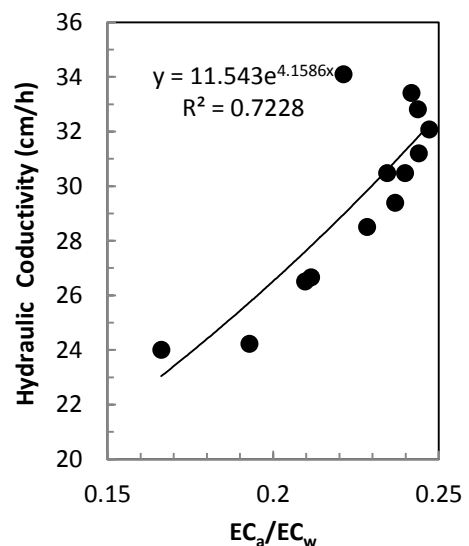
איור 6.1 הקשר בין המוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) למוליכות החשמלית ( $EC_a/EC_w$ ) מניסוי 7.

במחקר זה נבחנה גישה חדשה לניטור התפתחות ביופילם ואיטום ביולוגי בתווך גרנולרי ע"י ביצוע מדידות פשוטות של המוליכות החשמלית הנדמית ( $EC_a$ ) ושל המקדם הדיאלקטרי האפקטיבי ( $\epsilon_{eff}$ ). ההיפותזה המרכזית הייתה כי ניתן ליישם מדידות של  $EC_a$  ו- $\epsilon_{eff}$  ולהשתמש במודל "תיאוריות הערבוב הדיאלקטרי" לתיאור הקשרים של ה- $\epsilon_{eff}(\phi)$  וה- $EC_a(\phi)$ , להערכת עובי הביופילם, הפחיתה בנקוביות והעלייה (בשלב הראשוני של תהליך האיטום) של שטח הפנים מוצק-נוזל. באמצעות המודל של Kosney-Carman, המתאר את הקשר ( $K_s(\phi)$ ) ע"י הרדיוס ההידראולי, מתאפשרת הערכת הפחיתה היחסית ב- $K_s$ . אחת ממטרות המחקר הנלוות הייתה לימוד והבנת הגורמים המשפיעים על קצב התפתחות ביופילם

בעמודות חול רוויות. לשם כך נערכו ניסויי איטום ביולוגי מהם הוסק, בין היתר, כי שילוב של מספר גורמים, כמו למשל, גלוקוז כמקור הפחמן, יחס C:N גבוה, ריכוז תמיסת מזון נמוך ותוספת של מתכות קורט ורכיבים נוספים במינונים מזעריים, נחוצים לחידק *P. aeruginosa* על מנת להתרבות, להפריש חומרי EPS וליצור ביופילם מפותח על גרגרי קוורץ בתנאים של רוויה במים. הקשר בין התכונות החשמליות לתכונות ההידראולית נבחן באמצעות מדידות של המוליכות החשמלית, המקדם הדיאלקטרי והמוליכות ההידראולית. בפרק 2 (שיטות וחומרים) הוצגו חישובים ראשוניים אשר הראו את הקשרים  $K_s$ - $EC_a$ - $\epsilon_{eff}$  כפונקציה של התפתחות עובי הביופילם ואיטום הקרקע. ככלל, החישובים התיאורטיים הראשוניים מתאימים לממצאים מניסויי האיטום הביולוגי, כאשר, ההשפעה של איטום הקרקע על

המוליכות ההידראולית חזקה יותר מאשר על המוליכות החשמלית והמקדם הדיאלקטרי. דפוס הקשר בין המוליכות ההידראולית לחשמלית בניסויים בהם התפתח ביופילם משמעותי היה כמתואר באיור 6.1. כלומר, שינוי חד במוליכות ההידראולית (ציר y) לעומת שינוי מתון יחסית במוליכות החשמלית (ציר x), בעיקר בערכים הגבוהים (קרי, תחילת הניסוי) עם הפחיתה בערכים. לעומת זאת, הניסוי שמתואר באיור 6.2 ממחיש השתנות קטנה יחסית של המוליכות ההידראולית לעומת השינוי במוליכות החשמלית ולכן העקום נעשה מתון יותר.

המקדמים הדיאלקטריים ברוב הניסויים לא השתנו הרבה, למעט: ניסוי 4 (איור 3.12), ניסוי 6 (איור 3.18) וניסוי 10 (איור 3.24), בהם ניתן לראות קשר ליניארי חיובי בין המוליכות החשמלית למקדם הדיאלקטרי ( $R^2$  average = 0.65). בחלק גדול מהניסויים,



איור 6.2 הקשר בין הפחיתה במוליכות ההידראולית ( $K_s$ ) לפחיתה במוליכות החשמלית ( $EC_d/EC_w$ ) מניסוי 10.



הסיבות העיקריות להפסקתם היו קשורות, או לכך שמבנה הקרקע הופר כתוצאה מהיווצרות בועות גז, או בשל עלייה משמעותית בפרמטרים הנבדקים, אם כתוצאה מהתפתחות תנאים מחזרים ויצירת משקע ברזל-סולפיד, או כתוצאה מהתנתקות הביופילם מגרגרי המצע.

יכולת החיזוי של הקשרים בין המוליכות ההידראולית לתכונות החשמלית של מצעים גרנולריים, נבדקה באמצעות תשעה ניסויים מייצגים, בהם התפתח ביופילם. הרגישות של המוליכות החשמלית לתופעות בלתי צפויות, כמו התפתחות תנאים מחזרים, זיהום תמיסת המזון המזינה את העמודה והחלפתה, דרשו בחינה קפדנית של המדידות על מנת למנוע ארטיפקטים. על כן, בכדי למדל את התוצאות באופן האמין ביותר, לא נכללו בבחינה הזאת מדידות שבאופן ברור הצביעו על התרחשות, אחת או יותר, של התופעות המוזכרות לעיל. באופן כללי, המדידות הסימולטניות של  $K_s-EC_a-\epsilon_{eff}$ , יחד עם חישובי המודל, מוכיחים שניתן לנבא את הפחיתה במוליכות ההידראולית ממדידות של התכונות החשמליות. על מנת ליישם את הגישה המוצעת במחקר זה נדרש מידע מקדים של נקבוביות המצע (הנקייה)  $(\phi_0)$ , זו ניתנת להשגה מהמדידות של  $EC_d/EC_w$  או  $\epsilon_{eff}$  בתחילת הניסוי במצע נקי, ללא ביופילם. בתחילת הניסויים, עובי הביופילם שהתקבל מהמודל היה קטן מגודלו של חיידק בודד. סיבה אפשרית לכך, ייתכן וקשורה לפירוס לא אחיד של הביופילם על גבי הגרגר, כך שעובי הביופילם המאופיין בשיטה זו הינו עובי הביופילם האפקטיבי המייצג את האיטום המתרחש במורפולוגיה האמיתית של עטיפה לא אחידה. יחד עם זאת, ייתכן שמספר רב יותר של מדידות בשלב זה וביצוע ניסויים ארוכים יותר היו מאפשרים התאמה טובה יותר. בדרך כלל המוליכות ההידראולית המדודה נמוכה מאשר המוליכות ההידראולית המוערכת באמצעות המשוואה של Kozeny-Carman, המניחה שהביופילם העוטף את גרגרי החול הינו בעל עובי אחיד. שוב נראה, לפיכך, כי נכון יותר יהיה להניח כי החיידקים יוצרים מיקרו-מושבות באזורים מועדפים, כמו למשל, בצוואר הבקבוק של הנקבוב, שם ההשפעה על זרימת המים והפחיתה במוליכות ההידראולית של המצע חזקה יותר מאשר במצב של ביופילם אחיד אשר צריך למלא את כל הנקבוב בכדי לגרום לאותה פחיתה.

הגישה המוצעת במחקר זה לוקה במספר חסרונות ומגבלות נוספים: החיסרון העיקרי נובע מהרגישות הנמוכה של התכונות החשמליות לתהליכי האיטום הביולוגי, בהשוואה למוליכות ההידראולית, וכתוצאה מכך נדרש דיוק גבוה יותר של המדידות החשמליות. הגישה המוצעת במחקר זה ניתנת ליישום ביתר קלות ונבחנה במצעים גרנולריים בהם התרומה של היונים הספוחים למוליכות החשמלית הנדמית זניחה, אולם היא יותר אתגרית בתמיסה בעלת חוזק יוני נמוך. בנוסף, תהליכים ביולוגיים כגון יצירת בועות גז כתוצאה מפעילות מיקרוביאלית והיווצרות תנאים מחזרים (ברזל-סולפיד) בעמודה משנים את הקשרים  $K_s-EC_a-\epsilon_{eff}$  ובמידה ומתרחשים במקביל להתפתחות ביופילם, מקשים על חיזוי הפחיתה של  $K_s$  ממדידות ה- $EC_a$  וה- $\epsilon_{eff}$ . בשל הקשיים (טכניים או סיבתיים) בניסויי הזרימה ליצור מסה קריטית של ביופילם המספיקה למדידת התכונות החשמליות של תווך המושפע מיצירת ביופילם הוחלט לבחון גם את התכונות החשמליות של ביופילם מלאכותי באמצעות אנאלוגים של- $EPS$ , אלגינט וקסנתן. בכדי ליישם רעיון זה חשוב היה לשטוף תחילה את המלחים הרבים הנמצאים באבקת סודיום אלגינט. לאחר השטיפה ניתן להניח שמוליכות הביופילם הסינתטי שווה לאפס. מגמת ההשתנות של המוליכות החשמלית של מצע גרנולרי המכיל  $EPS$  סינתטי, לפי המודל, כפונקציה של עובי הביופילם, תלויה במוליכות החשמלית של התמיסה ( $EC_w$ ) ובמוליכות החשמלית של

הביופילם ( $EC_b$ ). ייתכן שהצמיגות של החומר (אלגינט) השפיעה על המדידות של המקדם דיאלקטרי, משום שהתקבלו ערכים (עבור כל יחסי הריכוזים אלגינט-מים) נמוכים מהצפוי מחומר שמכיל למעלה מ- 90% מים. מודל הערבוב, המוצע בעבודה זו, לא הצליח להסביר את המדידות (עובי ביופילם מוערך), כאשר המוליכות החשמלית האפקטיבית המדודה של המצע נמוכה מהמוליכות החשמלית של הביופילם בהינתן נקבוביות מסוימת ותמיסת רקע מאוד מהולה. נראה כי מודל ערבוב, המניח פיזור אנאיזוטרופי/איזוטרופי של גדילי הביופילם ו"ערבוב" של חלק ממי הרקע בשכבת הג'ל, מפחית את המוליכות החשמלית של המצע עם העלייה בעובי הביופילם, או במילים אחרות עם התווספות מי הרקע לשכבת הג'ל. באופן כללי, למרות המגבלות של ניסויי הזרימה ושל המודל המוצע, יכולת החיזוי של המוליכות ההידראולית היחסית (למצע נקי), לפי הגישה המוצעת בעבודה זו, סבירה, אם לוקחים בחשבון את הקושי הקיים במדידות של המוליכות החשמלית ובעיקר של המוליכות ההידראולית, בתנאים של פעילות מיקרוביאלית אינטנסיבית ואיטום ביולוגי.

רול, י. 2007. השפעת תנאים סביבתיים על התפתחות ביופילם של החיידק *Pseudomonas aeruginosa* במצע גרנולרי. עבודת מוסמך. האוניברסיטה העברית בירושלים.

- Abdel Aal, G.Z., E.A. Atekwana, and E.A. Atekwana. 2010a. Effect of bioclogging in porous media on complex conductivity signatures. *Journal of Geophysical Research* 115: G00G07.
- Abdel Aal, G.Z., E.A. Atekwana, S. Rossbach, and D.D. Werkema. 2010b. Sensitivity of geoelectrical measurements to the presence of bacteria in porous media. *Journal of Geophysical Research* 115(G3): G03017.
- Abdel Aal, G.Z., E.A. Atekwana, L.D. Slater, and E.A. Atekwana. 2004. Effects of microbial processes on electrolytic and interfacial electrical properties of unconsolidated sediments. *Journal of Geophysical Research Letters* 31(12): L12505.
- Ahimou, F., M.J. Semmens, G. Haugstad, and P.J. Novak. 2007. Effect of protein, polysaccharide, and oxygen concentration profiles on biofilm cohesiveness. *Applied and Environmental Microbiology* 73(9): 2905–2910.
- Ahuja, L.R., D.K. Cassel, R.R. Bruce, and B.B. Barnes. 1989. Evaluation of spatial distribution of hydraulic conductivity using effective porosity data. *Soil Science* 148(6).
- Albrecht, R., J.C. Gourry, M. O. Simonnot, and C. Leyval. 2011. Complex conductivity response to microbial growth and biofilm formation on phenanthrene spiked medium. *Journal of Applied Geophysics* 75(3): 558–564.
- Allison, L.E. 1947. Effect of microorganisms on permeability of soil under prolonged submergence. *Soil Science* 63(6): 439–450.
- Applegate, D.H., and J.D. Bryers. 1991. Effects of carbon and oxygen limitations and calcium concentrations on biofilm removal processes. *Biotechnology and Bioengineering* 37(1): 17–25.
- Archie, Ge. 1942. The electrical resistivity log as an aid in determining some reservoir characteristics. *Transactions of AIME* 146(99): 54–62.
- Aslani, P., and R.A. Kennedy. 1996. Studies on diffusion in alginate gels. I. Effect of cross-linking with calcium or zinc ions on diffusion of acetaminophen. *Journal of Controlled Release* 42(1): 75–82.
- Assouline, S. 2006. Modeling the relationship between soil bulk density and the hydraulic conductivity function. *Vadose Zone Journal* 5(2): 697–705.
- Atekwana, E., and E. Atekwana. 2010. Geophysical signatures of microbial activity at hydrocarbon contaminated sites: a review. *Surveys in Geophysics* 31(2): 247–283.
- Atekwana, E., and L.D. Slater. 2009. Biogeophysics: A new frontier in earth science research. *Review of Geophysics* 47(4): RG4004.
- Avnimelech, Y., and Z. Nevo. 1964. Biological clogging of sands. *Soil Science* 98(4): 222–226.
- Bakke, R., and P.Q. Olsson. 1986. Biofilm thickness measurements by light microscopy. *Journal of Microbiological Methods* 5(2): 93–98.
- Baveye, P., and A. Valocchi. 1989. An evaluation of mathematical models of the transport of biologically reacting solutes in saturated soils and aquifers. *Water Resources Research* 25(6): 1413–1421.
- Bielefeldt, A.R., T. Illangasekare, M. Uttecht, and R. LaPlante. 2002. Biodegradation of propylene glycol and associated hydrodynamic effects in sand. *Water Research* 36(7): 1707–1714.
- Bielefeldt, A., C. McEachern, and T. Illangasekare. 2002. Hydrodynamic Changes in Sand due to Biogrowth on Naphthalene and Decane. *Journal of Environmental Engineering* 128(1): 51–59.

- Bouwer, H. 2002. Artificial recharge of groundwater: hydrogeology and engineering. *Hydrogeology Journal* 10(1): 121–142.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Journal of Analytical biochemistry* 72(1): 248-254.
- Brydie, J.R., R.A. Wogelius, S Boulton, C.M. Merrifield, and D.J. Vaughan. 2009. Model system studies of the influence of bacterial biofilm formation on mineral surface reactivity. *Journal of Biofouling* 25 (5): 463-472.
- Carman, P.C. 1939. Permeability of saturated sand. *Journal of Agricultural Science* 29: 262-273.
- Corapcioglu, M.Y., and A. Haridas. 1984. Transport and fate of microorganisms in porous-media - a Theoretical Investigation. *Journal of Hydrology* 72(1-2): 149–169.
- Corwin, D.L., and S.M. Lesch. 2005. Apparent soil electrical conductivity measurements in agriculture. *Computers and electronics in agriculture* 46(1–3): 11–43.
- Costerton, J.W., Z. Lewandowski, D.E. Caldwell, D.R. Korber, and H.M. Lappin-Scott. 1995. Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology* 49(1): 711–745.
- Coulson, J.M., J.F. Richardson, J.H.A. Harker, and J.R.A. Backhurst. 2002. *Coulson & Richardson's Chemical Engineering: Particle technology and separation processes*. Elsevier Science & Technology Books.
- Cunningham, A.B., W.G. Characklis, F. Abedeen, and D. Crawford. 1991. Influence of biofilm accumulation on porous media hydrodynamics. *Environmental Science & Technology* 25(7): 1305–1311.
- Davis, C.A., E. Atekwana, E. Atekwana, L.D. Slater, S. Roszbach, and M.R. Mormile. 2006. Microbial growth and biofilm formation in geologic media is detected with complex conductivity measurements. *Journal of Geophysical Research Letters*. 33(18): L18403 .
- Donlan, R.M. 2002. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases* 8(9): 881–890.
- Fletcher, M. 1988. Attachment of *pseudomonas fluorescens* to glass and influence of electrolytes on bacterium-substratum separation distance. *Journal of Bacteriology* 170(5): 2027–2030.
- Franklin, M.J., D.E. Nivens, J.T. Weadge, and P.L. Howell. 2011. Biosynthesis of the *Pseudomonas aeruginosa* extracellular polysaccharides, Alginate, Pel, and Psl. *Frontiers in Microbiology* 2.
- Friedman, S.P. 1998. A saturation degree-dependent composite spheres model for describing the effective dielectric constant of unsaturated porous media. *Water Resources Research* 34(11): 2949–2961.
- Friedman, S.P. 1999. transport of bacteria through saturated and unsaturated soils. *Israel Agresearch* 10: 99–146.
- Friedman, S.P. 2005. Soil properties influencing apparent electrical conductivity: a review. *Computers and Electronics in Agriculture* 46(1–3): 45–70.
- Friedman, S.P., and D.A. Robinson. 2002. Particle shape characterization using angle of repose measurements for predicting the effective permittivity and electrical conductivity of saturated granular media. *Water Resources Research* 38(11): 18.1-18.11.
- Friedman, S.P., and N.A. Seaton. 1998. Critical path analysis of the relationship between permeability and electrical conductivity of three-dimensional pore networks. *Water Resources Research* 34(7): 1703–1710.
- Friedman, S.P. 2011. Electrical Properties of Soils. p. 242–255. *In Encyclopedia of Agrophysics*. Springer.
- García-Ochoa, F., V.E. Santos, J.A. Casas, and E. Gómez. 2000. Xanthan gum: production, recovery, and properties. *Biotechnology Advances* 18(7): 549–579.

- Geesey, G.G., M.W. Mittelman, and V.T. Lieu. 1987. Evaluation of slime-producing bacteria in oil field core flood experiments. *Applied and Environmental Microbiology* 53(2): 278–283.
- Gessard, C. 1920. *Technique d'identification des germes pyocyaniques*. Masson, Paris.
- Gilbert, P., T. Maira-Litran, A.J. McBain, A.H. Rickard, and F.W. Whyte. 2002. The physiology and collective recalcitrance of microbial biofilm communities. *Advances in microbial physiology* 46: 203–256.
- Iliuta, I., and F. Larachi. 2004. Biomass accumulation and clogging in trickle-bed bioreactors. *AIChE Journal* 50(10): 2541–2551.
- Jones, S.B., and S.P. Friedman. 2000. Particle shape effects on the effective permittivity of anisotropic or isotropic media consisting of aligned or randomly oriented ellipsoidal particles. *Water Resources Research* 36(10): 2821–2833.
- Kim, G. 2004. Hydraulic conductivity change of bio-barrier formed in the subsurface by the adverse conditions including freeze–thaw cycles. *Cold Regions Science and Technology* 38(2–3): 153–164.
- Klausen, M., A. Heydorn, P. Ragas, L. Lambertsen, A. Aaes-Jørgensen, S. Molin, and T. Tolker-Nielsen. 2003. Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology* 48(6): 1511–1524.
- Koczan, J.M., M.J. McGrath, Y. Zhao, and G.W. Sundin. 2009. Contribution of *Erwinia amylovora* exopolysaccharides Amylovoran and Levan to biofilm formation: implication in pathogenicity. *Journal of Phytopathology* 99(11):1237-1244.
- Lappan, R.E., and H.S. Fogler. 1996. Reduction of porous media permeability from in situ *Leuconostoc mesenteroides* growth and dextran production. *Biotechnology and Bioengineering* 50(1): 6–15.
- Lappin-Scott, H.M., F. Cusack, and J.W. Costerton. 1988. Nutrient Resuscitation and Growth of Starved Cells in Sandstone Cores: a Novel Approach to Enhanced Oil Recovery. *Applied and Environmental Microbiology* 54(6): 1373–1382.
- Lesmes, D., and S. Friedman. 2005. Relationships between the electrical and hydrogeological properties of rocks and soils. p. 87–128. *In* Rubin, Y., Hubbard, S. (eds.), *Hydrogeophysics*. Springer Netherlands.
- Liu, Y., S-F. Yang, Y. Li, Xu, L. Qin, and J-H. Tay. 2004. The influence of cell and substratum surface hydrophobicities on microbial attachment. *Journal of biotechnology* 110(3): 251-256.
- Makin, S.A., and T.J. Beveridge. 1996. The influence of A-band and B-band lipopolysaccharide on the surface characteristic and adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to surfaces. *Microbiolgy* 142 (2): 299-307.
- Miller, M.B., and B.L. Bassler. 2001. Quorum sensing in bacteria. *Annual Review of Microbiology* 55(1): 165–199.
- Miqueleto, A.P., C.C. Dolosic, E. Pozzi, E. Foresti, and M. Zaiat. 2010. Influence of carbon sources and C/N ratio on EPS production in anaerobic sequencing batch biofilm reactors for wastewater treatment. *Bioresource Technology* 101(4): 1324–1330.
- Nevo, Z., and R. Mitchell. 1967. Factors affecting biological clogging of sand associated with ground water recharge. *Water Research* 1(3): 231–236.
- Ntarlagiannis, D., and A. Ferguson. 2009. SIP response of artificial biofilms. *Geophysics* 74(1): A1–A5.
- Okubo, T., and J. Matsumoto. 1979. Effect of infiltration rate on biological clogging and water quality changes during artificial recharge. *Water Resources Research*. 15(6): 1536–1542.
- Okubo, T., and J. Matsumoto. 1983. Biological clogging of sand and changes of organic constituents during artificial recharge. *Water Research* 17(7): 813–821.

- Or, D., F.J. Leij, V. Snyder, and T.A. Ghezzehei. 2000. Stochastic model for posttillage soil pore space evolution. *Water Resources Research* 36(7): 1641–1652.
- Or, D., and M. Tuller. 2000. Flow in unsaturated fractured porous media: Hydraulic conductivity of rough surfaces. *Water Resources Research* 36(5): 1165–1177.
- Or, D., B.F. Smets, J.M. Wraith, A. Dechesne, and S.P. Friedman. 2007. Physical constraints affecting bacterial habitats and activity in unsaturated porous media – a review. *Advances in Water Resources* 30(6–7): 1505–1527.
- Peyton, B.M. 1996. Effects of shear stress and substrate loading rate on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm thickness and density. *Water Research* 30(1): 29–36.
- Plonka, P.M., and M. Grabacka. 2006. Melanin synthesis in microorganisms—biotechnological and medical aspects. *Acta Biochimica Polonica* 53(3): 429–443.
- Revil, A., E. Atekwana, C. Zhang, A. Jardani, and S. Smith. 2012. A new model for the spectral induced polarization signature of bacterial growth in porous media. *Water Resour. Res.* 48(9): W09545.
- Rhoades, J.D., N.A. Manteghi, P.J. Shouse, and W.J. Alves. 1989. Soil electrical conductivity and soil salinity: new formulations and calibrations. *Soil Science Society of America Journal* 53(2): 433–439.
- Rinck-Pfeiffer, S., S. Ragusa, P. Sztajn bok, and T. Vandavelde. 2000. Interrelationships between biological, chemical, and physical processes as an analog to clogging in aquifer storage and recovery (ASR) wells. *Water Research* 34(7): 2110–2118.
- Rittmann, B.E. 1993. The significance of biofilms in porous media. *Water Resources Research* 29(7): 2195–2202.
- Robinson, D.A., and S.P. Friedman. 2003. A method for measuring the solid particle permittivity or electrical conductivity of rocks, sediments, and granular materials. *Journal of Geophysical Research* 108(B2): 1978–2012.
- Robinson, D.A., S.B. Jones, J.M. Wraith, D. Or, and S.P. Friedman. 2003. A review of advances in dielectric and electrical conductivity measurement in soils using time domain reflectometry. *Vadose Zone Journal* 2(4): 444–475.
- Rosenzweig, R., U. Shavit, and A. Furman. 2009. The influence of biofilm spatial distribution scenarios on hydraulic conductivity of unsaturated soils. *Vadose Zone Journal* 8(4): 1080–1084.
- Rosenzweig, R., A. Furman, and U. Shavit. 2013. A Channel Network Model as a Framework for Characterizing Variably Saturated Flow in Biofilm-Affected Soils. *Vadose Zone Journal* 12(2).
- Rowe, R.K., J.F. VanGulck, and S.C. Milward. 2002. Biologically induced clogging of granular medium permeated with synthetic leachate. *Journal of Environmental Engineering and science* 1(2): 135–156.
- Rowe, R.C., P.J. Sheskey, and S.C. Owen. 2006. Handbook of pharmaceutical excipients. *Pharmaceutical Press* 6(1): 888.
- Sanchez de Lozada, D., P. Vandevivere, P. Baveye, and S. Zinder. 1994. Decrease of the hydraulic conductivity of sand columns by *Methanosarcina barkeri*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* 10(3): 325–333.
- Seifert, D., and P. Engesgaard. 2007. Use of tracer tests to investigate changes in flow and transport properties due to bioclogging of porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 93(1–4): 58–71.
- Seki, K., T. Miyazaki, and M. Nakano. 1996. Reduction of hydraulic conductivity due to microbial effects. *Transactions of the Agricultural Engineering Society, Japan* 64(1): 137–144.
- Seki, Miyazaki, and M. Nakano. 1998. effects of microorganisms on hydraulic conductivity decrease in infiltration. *European Journal of Soil Science* 49(2): 231–236.

- Sihvola, A.H. 1999. Electromagnetic mixing formulas and applications. Institution of Engineering & Technology.
- Sihvola, A.H., and J. A. Kong. 1988. Effective permittivity of dielectric mixtures. *Geoscience and Remote Sensing, IEEE Transactions on* 26(4): 420–429.
- Simeone, M., A. Alfani, and S. Guido. 2004. Phase diagram, rheology and interfacial tension of aqueous mixtures of Na-caseinate and Na-alginate. *Food Hydrocolloids* 18(3): 463–470.
- Soleimani, S., P.J. Van Geel, O.B. Isgor, and M.B. Mostafa. 2009. Modeling of biological clogging in unsaturated porous media. *Journal of Contaminant Hydrology* 106(1–2): 39–50.
- Stapper, A.P., G. Narasimhan, D.E. Ohman, J. Barakat, M. Hentzer, S. Molin, A. Kharazmi, N. Højby, and K. Mathee. 2004. Alginate production affects *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development and architecture, but is not essential for biofilm formation. *Journal of Medical Microbiology* 53(7): 679–690.
- Suchomel, B., B. Chen, and M. Allen. 1998. Macroscale properties of porous media from a network model of biofilm processes. *Transport in Porous Media* 31(1): 39–66.
- Sutherland, I.W. 2001. The biofilm matrix – an immobilized but dynamic microbial environment. *Trends in Microbiology* 9(5): 222–227.
- Taylor, S.W., and P.R. Jaffé. 1990a. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium: 1. Experimental investigation. *Water Resources Research* 26(9): 2153–2159.
- Taylor, S.W., and P.R. Jaffé. 1990b. Substrate and biomass transport in a porous medium. *Water Resources Research* 26(9): 2181–2194.
- Taylor, S.W., and P.R. Jaffé. 1990c. Biofilm growth and the related changes in the physical properties of a porous medium: 3. Dispersivity and model verification. *Water Resources Research* 26(9): 2171–2180.
- Thompson, A.H., A.J. Katz, and C.E. Krohn. 1987. The microgeometry and transport properties of sedimentary rock. *Advances in Physics* 36(5): 625–694.
- Thullner, M. 2010. Comparison of bioclogging effects in saturated porous media within one- and two-dimensional flow systems. *Ecological Engineering* 36(2): 176–196.
- Thullner, M., J. Zeyer, and W. Kinzelbach. 2002. Influence of microbial growth on hydraulic properties of pore networks. *Transport in Porous Media* 49(1): 99–122.
- Trulear, M.G., and W.G. Characklis. 1982. Dynamics of biofilm processes. *Water Pollution Control Federation*: 1288–1301.
- Vandevivere, P., and P. Baveye. 1992a. Relationship between transport of bacteria and their clogging efficiency in sand columns. *Applied and Environmental Microbiology* 58(8): 2523–2530.
- Vandevivere, P., and P. Baveye. 1992b. Effect of bacterial extracellular polymers on the saturated hydraulic conductivity of sand columns. *Applied and Environmental Microbiology* 58(5): 1690–1698.
- Vandevivere, P., and P. Baveye. 1992c. Saturated hydraulic conductivity reduction caused by aerobic bacteria in sand columns. *Soil Science Society of America Journal* 56(1): 1–13.
- Vandevivere, P., P. Baveye, D.S. de Lozada, and P. DeLeo. 1995. Microbial clogging of saturated soils and aquifer materials: evaluation of mathematical models. *Water Resources Research* 31(9): 2173–2180.
- Vaudelet, P., A. Revil, M. Schmutz, M. Franceschi, and P. Bégassat. 2011. Induced polarization signatures of cations exhibiting differential sorption behaviors in saturated sands. *Water Resources Research* 47(2): W02526.
- Whitcomb, P.J., and C.W. Macosko. 1978. Rheology of xanthan gum. *Journal of Rheology* 22: 493–507.

- Windhues, T., and W. Borchard. 2002. Temperature depending light scattering measurements of aqueous gelatin and alginate solutions and their mixtures. *European Polymer Journal* 38(6): 1219–1227.
- Wloka, M., H. Rehage, H.C. Flemming, and J. Wingender. 2004. Rheological properties of viscoelastic biofilm extracellular polymeric substances and comparison to the behavior of calcium alginate gels. *Colloid and Polymer Science* 282(10): 1067–1076.
- Yen, T.F. 2001. In-situ stabilization of subsurface contaminants using microbial polymers. Proceedings, Industry Partnerships for Environmental Science and Technology DOE-NETL, Morgantown, WV.
- Yoon, S.S., R.F. Hennigan, G.M. Hilliard, U.A. Ochsner, K. Parvatiyar, M.C. Kamani, H.L. Allen, T.R. DeKievit, P.R. Gardner, U. Schwab, J.J. Rowe, B.H. Iglewski, T.R. McDermott, R.P. Mason, D.J. Wozniak, R.E.W. Hancock, M.R. Parsek, T.L. Noah, R.C. Boucher, and D.J. Hassett. 2002. *Pseudomonas aeruginosa* anaerobic respiration in biofilms: relationships to cystic fibrosis pathogenesis. *Developmental Cell* 3(4): 593–603.



It seems that a high C/N ratio in combination with low nutrient concentration and the presence of glucose, as the main carbon source, resulted in the most significant bioclogging. However, most of the bioclogging experiments were conducted with a minimal medium (M63) containing citrate as a sole carbon source. For this medium, the combination of low nutrient concentration and high water flux provided the bacteria with ideal conditions for growth and biofilm formation. In the next stage of the study the reduction in the hydraulic conductivity was compared, measured and evaluated. In general, the simultaneous  $K_s$ - $EC_a$ - $\epsilon_{eff}$  measurements and the accompanied model computations proved that the hydraulic conductivity reduction can be predicted from measurements of the electrical properties. Yet, the proposed method suffers from a few disadvantages and limitations: The major disadvantage stems from the lower sensitivity of the electrical properties to the bioclogging process as compared to that of the hydraulic conductivity, which requires a higher accuracy of the electrical measurements. The proposed method is applicable to mostly granular media with negligible contribution of the adsorbed ions to the apparent electrical conductivity of the medium, and is problematic to use in fine-textured media, especially if saturated with solutions of low ionic strengths. The formation of gas bubbles as a result of microbial activity alters the  $K_s$ - $EC_a$ - $\epsilon_{eff}$  relationships, and if this process takes place in parallel to biofilm development it is practically impossible to predict the reduction in  $K_s$  from  $EC_a$  and  $\epsilon_{eff}$  measurements. These difficulties encouraged us to explore the electrical properties of an artificial biofilm, made of either sodium alginate or xanthan gum and mixed with the granular medium. Starting with measuring the effective permittivity of the dry packing of the synthetic biofilm material, followed by measurements of the effective permittivity and electrical conductivity of mixtures of a varying ratio of water-alginate/xanthan, enabled the modeling of electrical properties of the biofilm-coated sand grains as a function of the thickness of the biofilm for various sand grain radii. The modeled  $EC_a$ -biofilm thickness relationships can either decrease or increase upon biofilm development, depending on whether the electrical conductivity of the background solution ( $EC_w$ ) is larger or smaller than the electrical conductivity of the biofilm layer. The modeled  $\epsilon_{eff}$ -biofilm thickness relationships indicate that the expected decrease in the effective permittivities upon biofilm development is quite mild, especially in coarse-textured granular media and with biofilms of low EPS concentration.

## Abstract

Biofilm formation and biological clogging in natural and industrial granular media have engineering and environmental relevance in many applications such as pumping and recharging wells, surface water spreading for artificial groundwater recharge, enhanced in-situ bioremediation, bio-barriers for sub-surface pollution spread prevention, permeable reactive barrier for degrading pollutants, irrigation with recycled water and (/waste) water filtration. The term “biofilm” refers to sessile microbial cells and to the extracellular polymeric substances (EPS) surrounding them. Biofilm formation results in bioclogging, *i.e.*, in the reduction of the open porosity ( $\phi$ ) and hydraulic conductivity ( $K_s$ ) of the granular (/porous) media to extents ranging from just few percent up to 5 orders of magnitude. Repetitive, *in-situ* measurements of hydraulic conductivity, especially in the natural environment and sometimes also along the depth of granular filters is complex and expensive, therefore other cost-effective methods are needed for continuous monitoring of biofilm development and bioclogging. This research thesis tested a novell approach for monitoring biofilm growth and bioclogging by simpler measurements of the low-frequency, apparent electrical conductivity ( $EC_a$ ) and the GHz effective dielectric permittivity ( $\epsilon_{eff}$ ) of the granular medium. The major research hypothesis was that with  $EC_a$  and  $\epsilon_{eff}$  measurements accompanied by application of simple models based on mean field theories for describing the  $\epsilon_{eff}(\phi)$  and  $EC_a(\phi)$  relationships it is possible to evaluate the biofilm thickness, reduction of open porosity and the increase (at the initial stages of the bioclogging process) in solid-liquid interface area. Then, using a simple, hydraulic-radius-based models, such as the, Kozeny-Carman  $K_s(\phi)$  model, it will be possible to predict the relative reduction of  $K_s$ . Flow-through bioclogging experiments were conducted in columns of water-saturated granular media inoculated with monocultures of mostly *Pseudomonas aeruginosa*, a ubiquitous environmental bacterium, known for its biofilm formation capabilities. Several granular media were tested, as well as various compositions and concentrations of nutrient solutions and different flow rates. In the experiments in which the granular media were clogged by biofilm, the hydraulic conductivity ( $K_s$ ) usually decrease up to 1 order of magnitude whilst, the average decrease of the apparent electrical conductivity ( $EC_a/EC_w$ ) ranged between 20 to 40%. The measured effective dielectric permittivity has not changed much during most of the bioclogging experiments.

***In-situ* monitoring of biofilm development in granular media  
via measurement of electrical conductivity and dielectric  
permittivity**

Thesis

Submitted to

The Robert H. Smith Faculty of Agriculture, Food and

Environment

The Hebrew University of Jerusalem

For Degree of

"Master of Agricultural Science"

By

Shani Yanai

Rehovot, Israel

December 2013