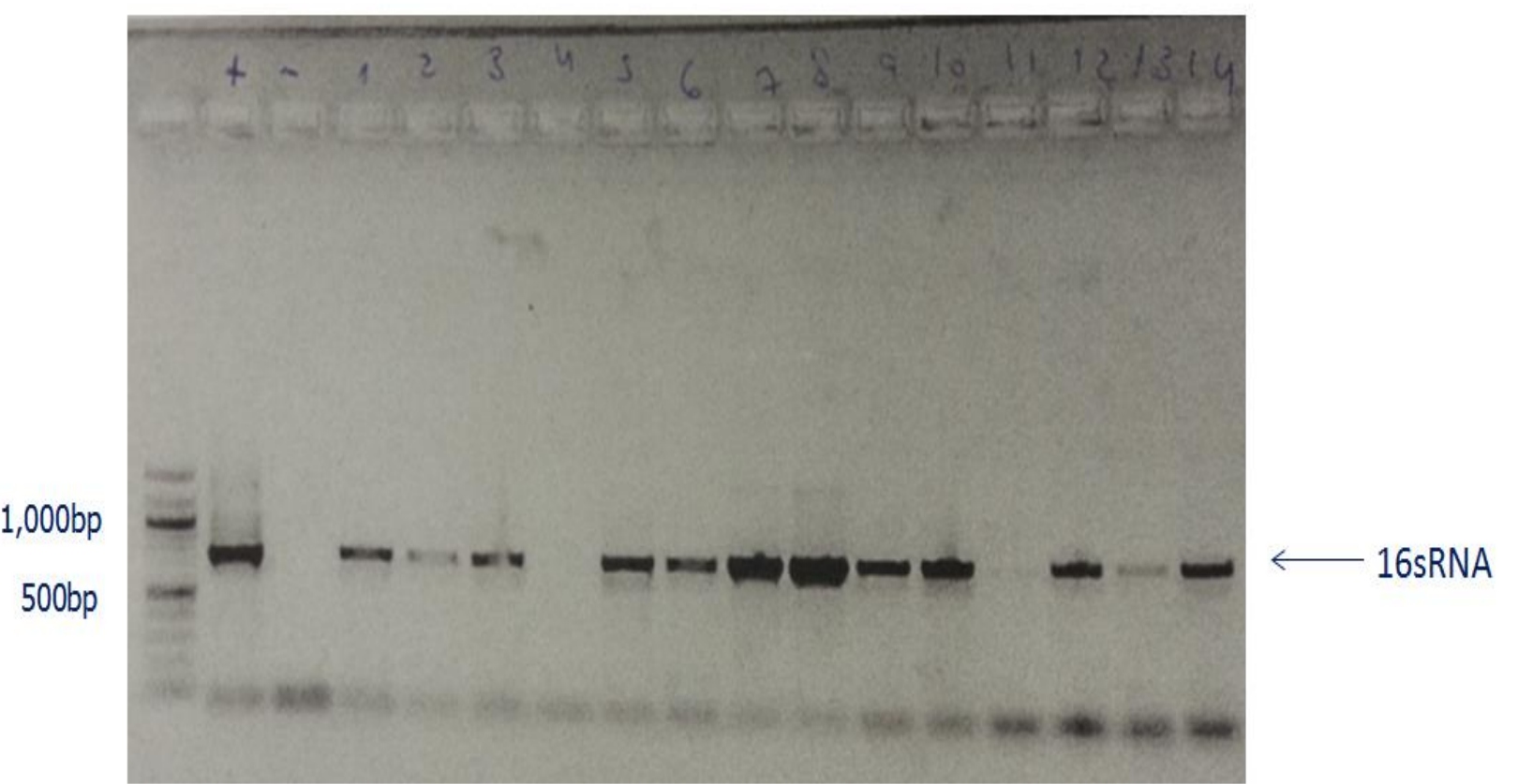


בידוד ואפיין של חיידקים מפרקי נפט מקרקעות עברונה

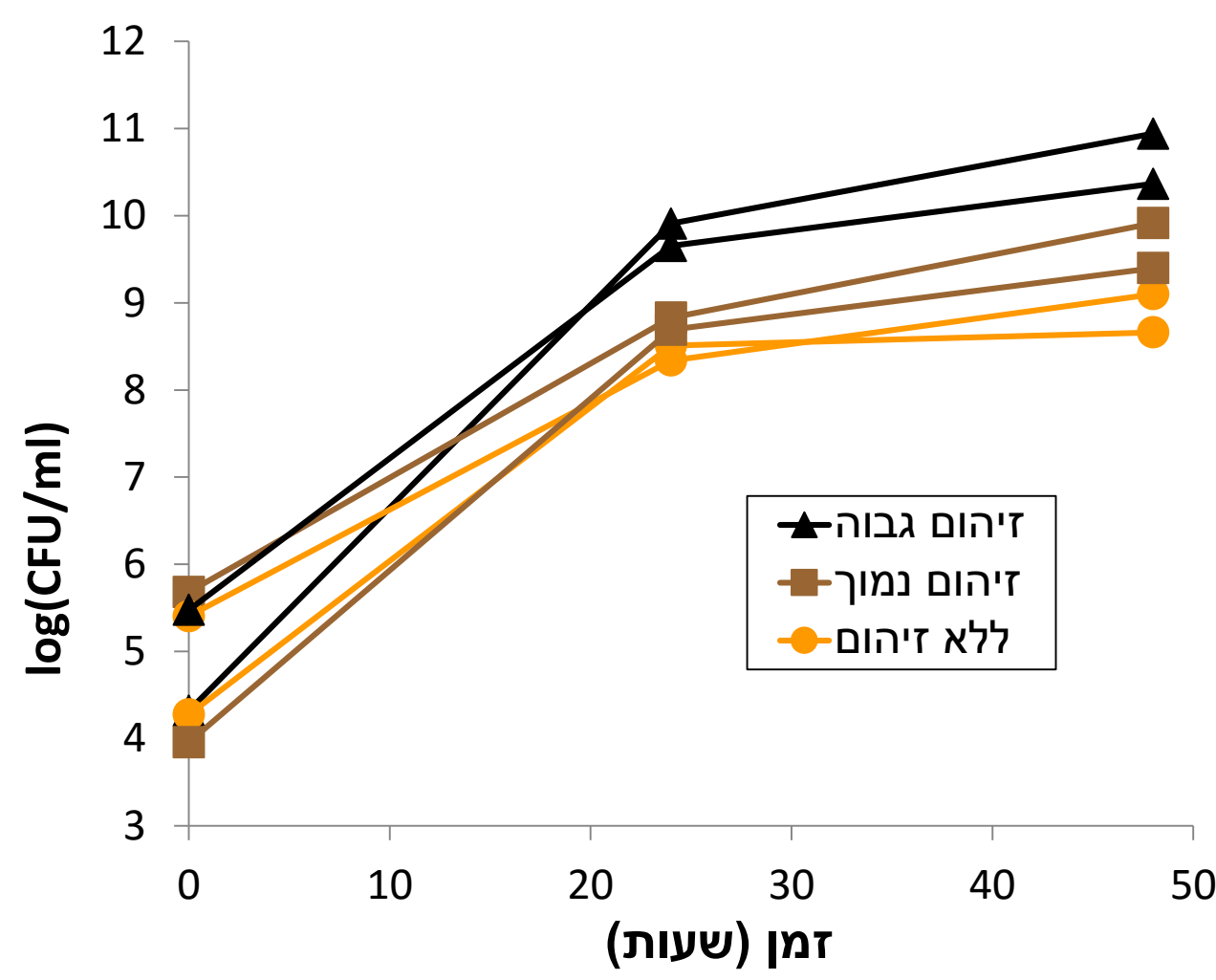
צפורה צופיף ויערה כלב
בהנחיית פרופ' סימה ירון
הפקולטה להנדסת ביוטכנולוגיה ומזון

אמפליפיקציה של הגן המקודד לרנ"א ריבוזומלי ממושבות נבחרות



מתוך המושבות שהתקבלו בהעשרה נבחרו מושבות בעלות מורפולוגיות שונות. למושבות אלו בוצעה הגברה של ה- 16s RNA ב-PCR.

עקום הגידול של החיידקים במהלך ההעשרה



ניתן לראות כי ההעשרה בוצעה בהצלחה וכי כמות החיידקים עולה עם העלייה ברמת הזיהום בקרקע.

מבוא

מאז שנות ה-40 ידוע כי מיקרואורגניזמים יכולים לפרק תרכובות פחמימניות לתרכובות בלתי מזיקות, תוך ניצול הפוטנציאל המטבולי שטמון בהן. מתוך המיקרואורגניזמים שמפרקים את הנפט חיידקים הם הדומיננטיים. הוכח כי שימוש בחיידקים לצורך פירוק נפט בים וביבשה הוא יעיל כלכלית וידידותי לסביבה בהשוואה לטכניקות אחרות.

בספרות ידועים מגוון רחב של חיידקים מפרקי נפט. כמו לדוגמה זני *Bacillus* וזני *Pseudomonas* שנמצאים בקרקע ובמקורות ימיים ומפרקים בנזן, טולואן ודיזל.

מטרות המחקר

מטרות המחקר הן לאפיין את אוכלוסיית החיידקים שנמצאים בקרקעות המזהמות של שמורת עברונה, לבדוד מן הקרקעות חיידקים בעלי פוטנציאל לפירוק נפט ולאפיין את התנאים הדרושים לחיידקים אלו כדי לפרק את הנפט.

אנליזה של אוכלוסיות החיידקים בקרקעות עברונה

	שם החיידק	ללא זיהום (%)	זיהום נמוך (%)	זיהום גבוה (%)
1	<i>Clostridia</i>	1.5	2.5	81.8
2	<i>Actinobacteria</i>	21.8	46.4	11.3
3	<i>Pseudomonadales</i>	2.8	1.9	0.1
4	<i>Bacilli</i>	26.7	6.1	2.0
סה"כ קריאות		22,219	11,158	11,737

כלל הדנ"א מדגימות הקרקע שנלקחו בדצמבר 2014 (כשבועיים לאחר הזיהום), הופק ונשלח לריצוף בשיטת Illumina. אנליזה ביואינפורמטית הראתה כי אוכלוסיית החיידקים בקרקעות המזהמות השתנתה. בטבלה ניתן לראות דוגמאות של משפחות חיידקים ששכיחותם עלתה או ירדה בקרקעות המזהמות. המספרים מציינים את אחוז הרצפים עבור כל חיידק מסך כל הרצפים שזוהו בכל סוג קרקע.

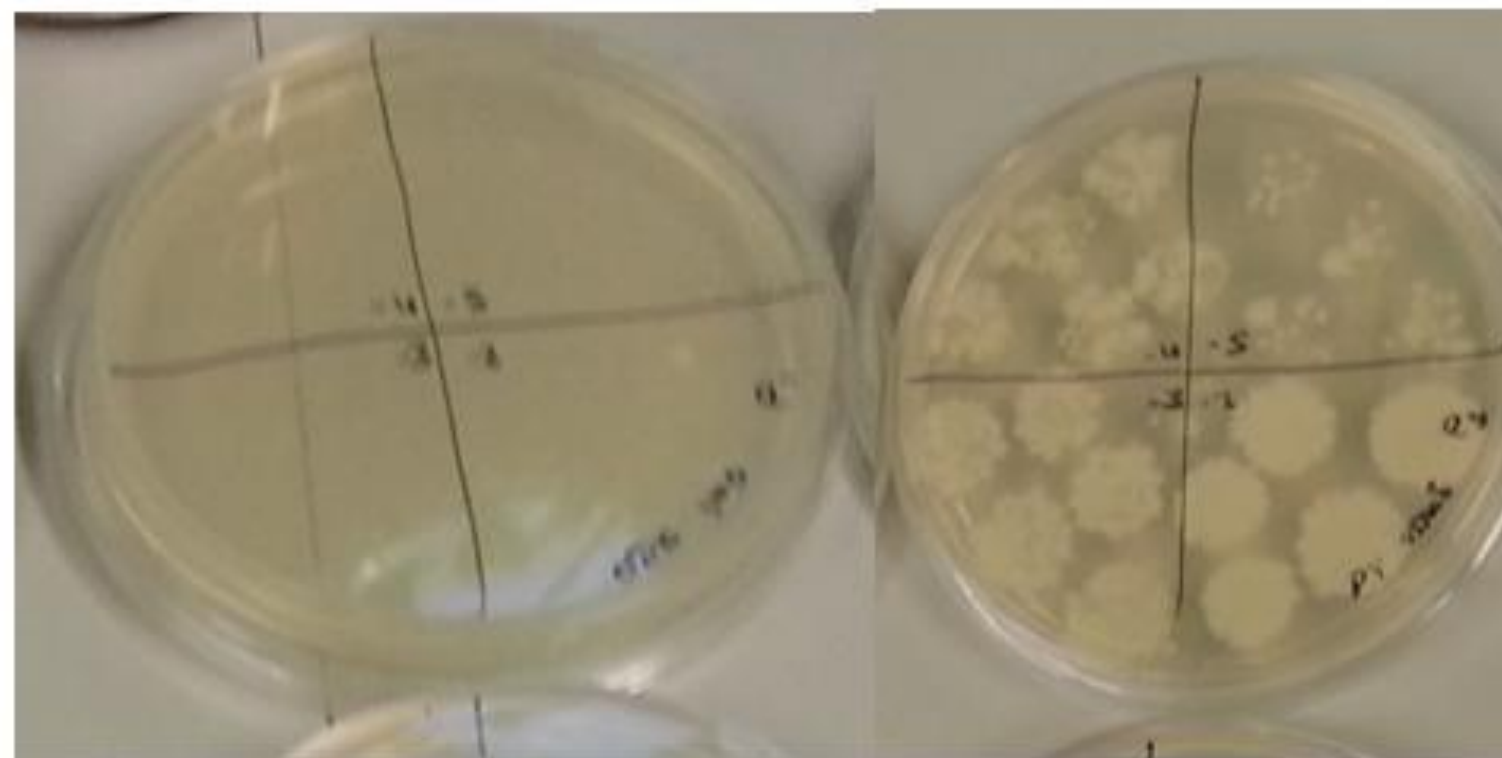


זיהוי חיידקים באמצעות העשרה על מצע שמכיל נפט

הקרקעות עברו העשרה במצע Davis, שהינו מצע מלחים שאינו מכיל מקורות פחמן נוספים. העשרה זו מבוססת על ההנחה כי החיידקים שיגדלו יהיו כאלה המסוגלים לנצל את הנפט כמקור הפחמן והאנרגיה המרכזי. לאורך ההעשרה, נלקחו דוגמאות ונזרעו על פלטות NA לצורך ספירה.



העשרת חיידקים מהקרקע במצע Davis



זמן אפס לאחר יום

דוגמה לתוצאות זריעת החיידקים על מצע NA בנקודות זמן לאורך ההעשרה

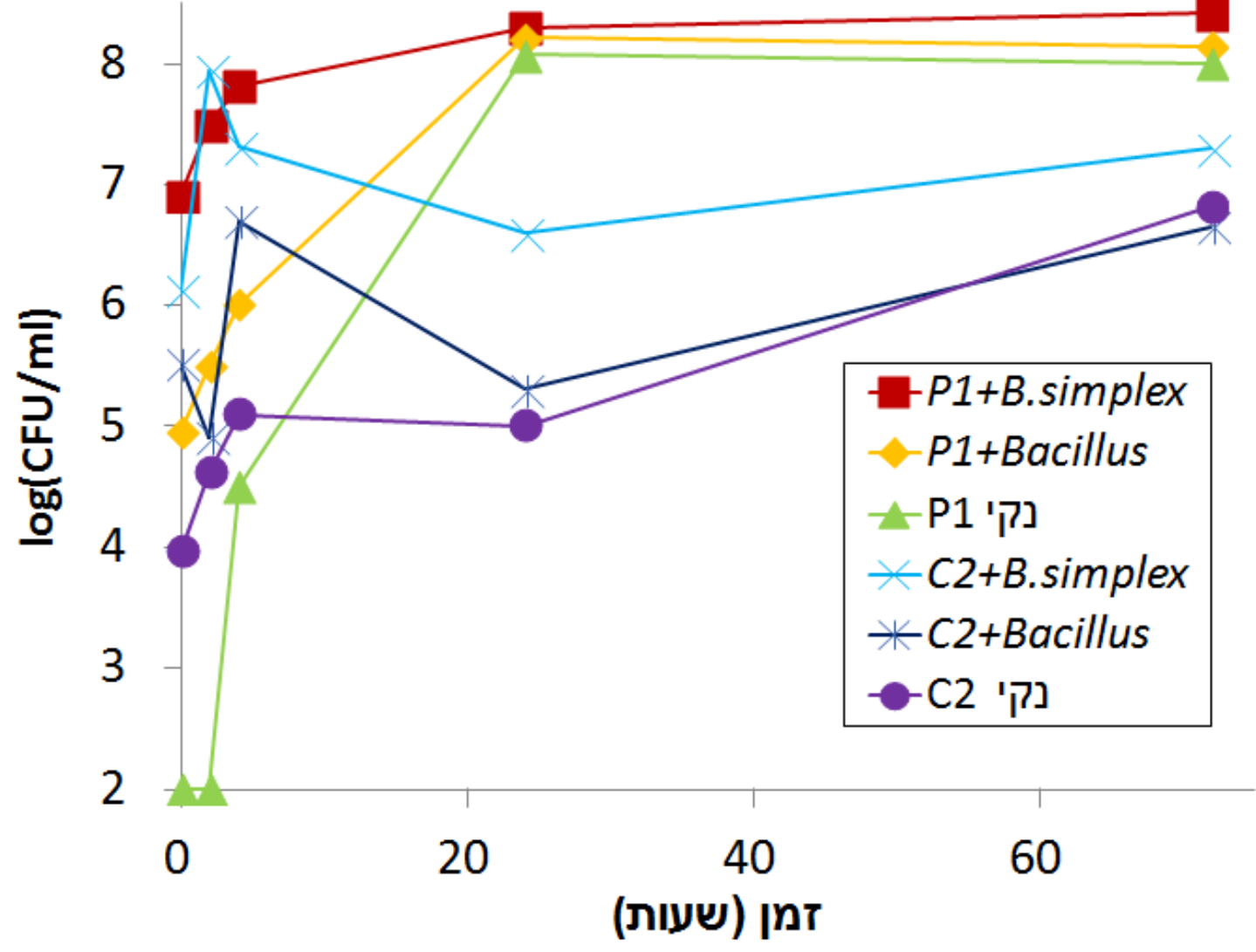
תוצאות אנליזה ביואינפורמטית של רצפי חיידקים שבודדו מהקרקעות המזהמות

שם החיידק	אחוזי התאמה (ident)	
<i>Bacillus cereus</i>	98	1
<i>Bacillus</i>	97	2
<i>Bacillus cereus</i>	99	3
<i>Bacillus simplex</i>	98	4
<i>Bacillus simplex</i>	99	5
<i>Arthrobacter</i>	97	6
<i>Bacillus aquimaris</i>	98	7
<i>Streptomyces</i>	98	8
<i>Bacillus</i>	91	9
<i>Planomicrobium okeanokoites</i>	97	10

תוצרי ה-PCR הופקו ורוצפו. התוצאות מראות כי מרבית החיידקים שזוהו הינם מסוג *Bacillus*. שני התבדידים המסומנים נבחרו לצורך אפיין מעמיק.

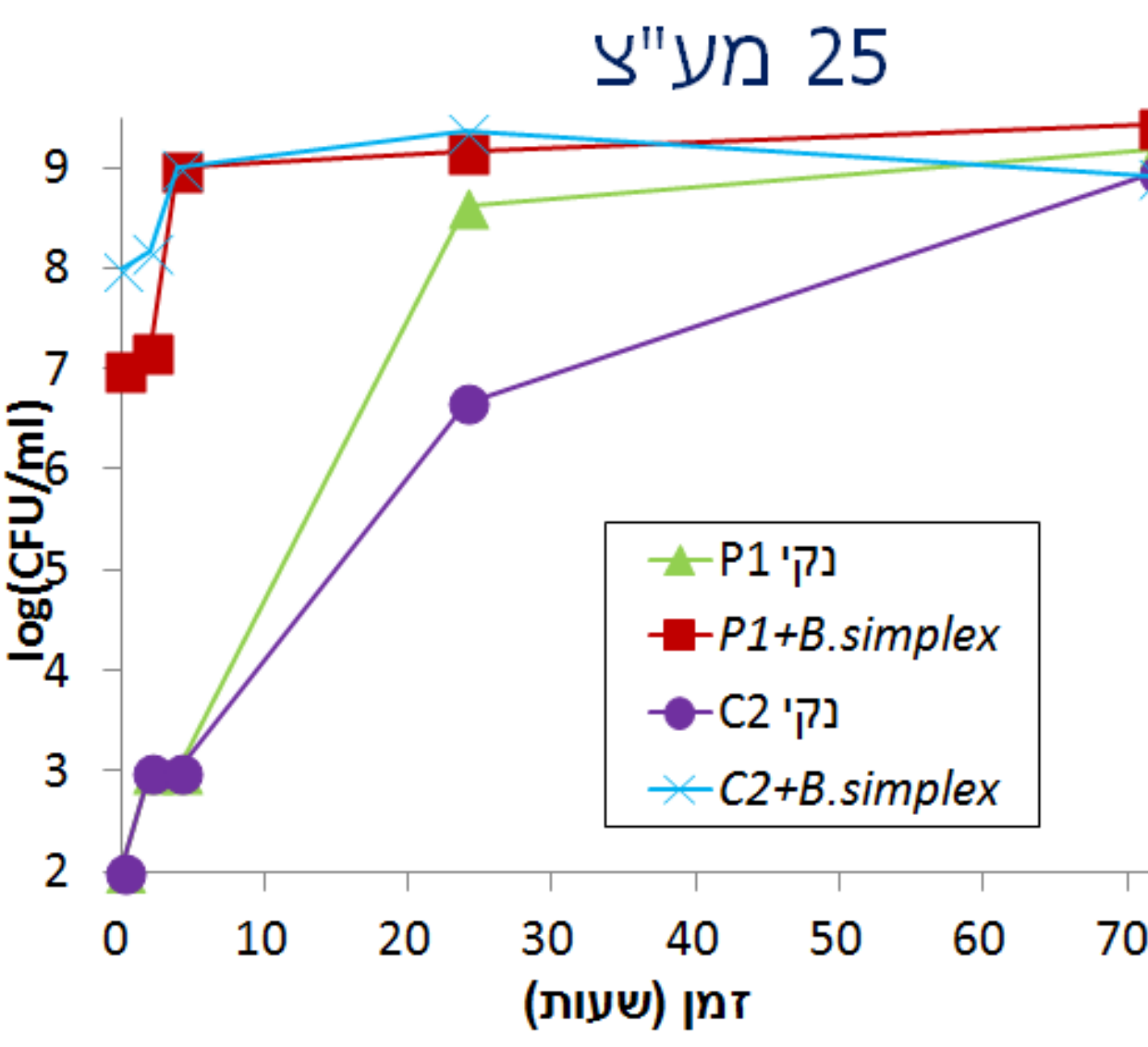
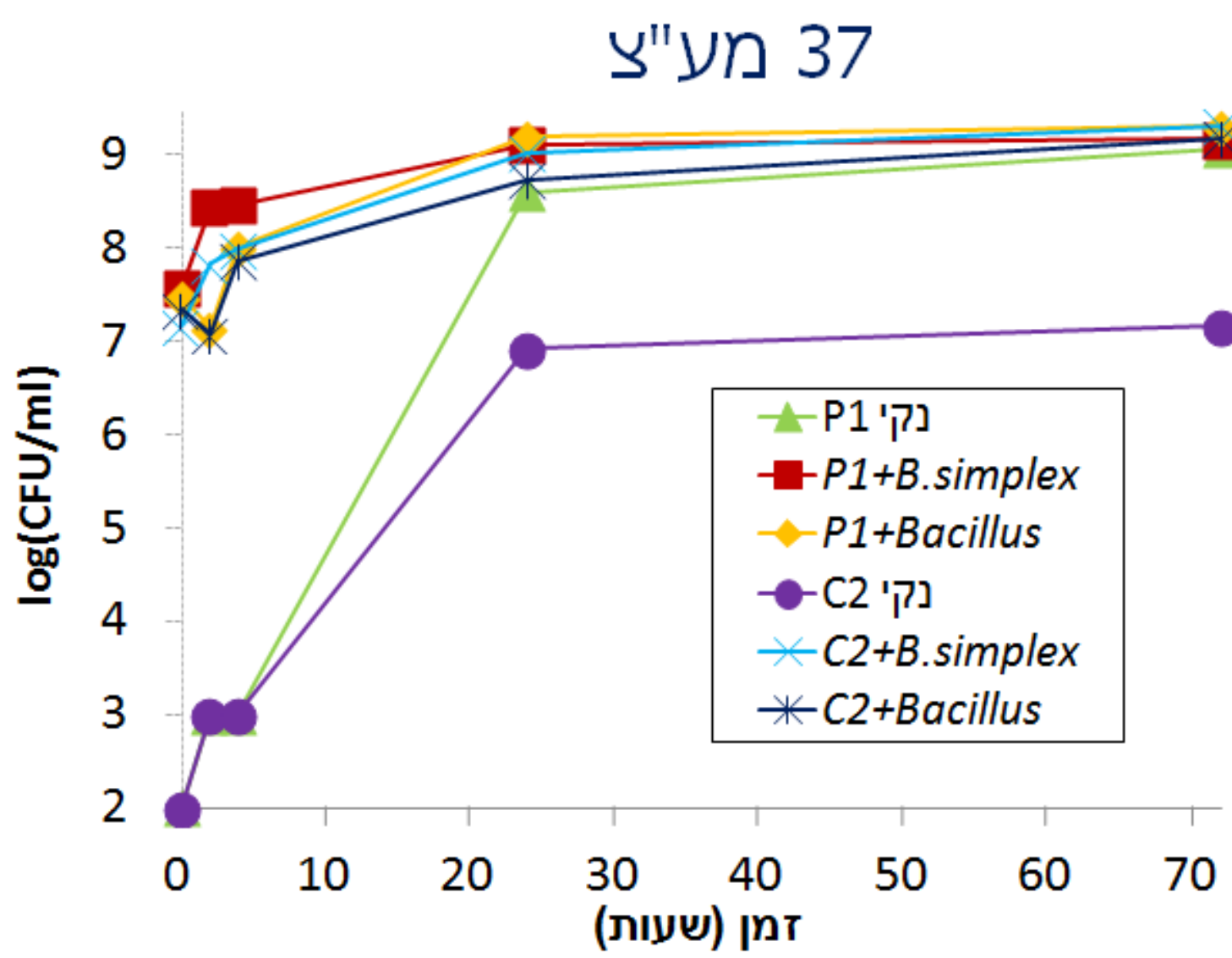
גידול החיידקים שבודדו מהקרקע בדגימות קרקע מזוהמת

דגימות קרקע מזוהמת (P1) ונקייה (C2) עברו העשרה במצע Davis בתוספת תרבית של אחד החיידקים הנבחרים, והודגרו למשך 3 ימים. מעקומי הגידול שמוצגים בגרף ניתן לראות, כי בקרקע המזוהמת כמות החיידקים הייתה גדולה יותר מן הקרקע הנקייה, וכי הוספת החיידקים לא השפיעה באופן משמעותי על תוצאות הגידול לאחר כיממה.



P1- קרקע מזוהמת, C2- קרקע נקייה (ביקורת)

עקומי גידול- קרקעות שעברו עיקור והועשרו בשתי טמפ' שונות



החיידקים הנבחרים הוספו לקרקעות לאחר שעברו עיקור באוטוקלאב, וגודלו במצע Davis בשתי טמפ'. גם בגרפים אלו ניתן לראות שלא היה הבדל משמעותי לאחר כיממה, כאשר הוספו החיידקים, וכי התקבלה אותה מגמה בשתי הטמפ'.

סיכום ומסקנות

- הנפט שינה את הרכב אוכלוסיית החיידקים בקרקעות עברונה.
- בוצעה בהצלחה העשרה של חיידקים מפרקי נפט מתוך הקרקעות.
- רוב החיידקים שהתקבלו בהעשרה הינם מסוג *Bacillus*.
- הוספת חיידקים חיצוניים בריכוז גבוה (גם כאלה שבודדו מן הקרקע), כנראה אינה נחוצה, משום שהחיידקים בקרקע גדלים במהירות.