

חיטוי קולחים ע"י קרינת UV לשימוש בלתי מוגבל בחקלאות

1.1.04-31.08.07

מוגש לראשות המים
ע"י

ד"ר עבד נאסר¹, חנה פולמן¹, אסתי טויטו¹, הילה קרן¹, אורלי סלע¹, פרופ' אבנר עדין²,
נעמי צדיק², ד"ר אודי צוקרמן³

1. המעבדה לחקר איכות מים, המעבדה לבריאות הציבור, משרד בריאות, ת"א
2. הפקולטה למדעי החקלאות, המזון ואיכות הסביבה, האוניברסיטה העברית, רחובות.
3. חברת מקורות

7	1. תקציר
10	2.0 רקע מדעי
10	2.1 שימוש חוזר במים
11	2.2 טיפול בשפכים
12	2.3 השבחת קולחים להשקיה
13	2.4 מיקרואורגניזמים פתוגנים בשפכים ואספקטים בריאותיים בשימוש חוזר
15	2.5 <i>Aeromonas</i>
16	2.6 קבוצות גודל של חלקיקים מרחפים בקולחים
16	2.7 בדיקת פילוג גודל חלקיקים – פג"ח (PSD-Particle Size Distribution) בקולחים
18	2.8 פוטנציאל אלקטרוקינטי (פוטנציאל זטא)
18	2.9 פילוג גודל חלקיקים בקולחים
19	2.10 הפקטורים לקביעת עוצמת קרינת ה- U.V.
19	2.10.1 סוגי מנורות U.V.
20	2.10.2 קביעת עוצמת הקרינה הממוצעת במערכת U.V.
21	2.10.3 קביעת עוצמת הקרינה הממוצעת במכשיר ה-CB עם מנורת כספית בלחץ נמוך
21	2.10.4 פקטור ההחזרה (Reflection Factor)
21	2.10.5 פקטור פטרי (Petri Factor)
22	2.10.6 פקטור המים (Water Factor)
23	2.10.7 קביעת מנת הקרינה
23	2.11 יכולת תיקון ה-DNA במיקרואורגניזמים לאחר חשיפה לקרינת U.V.
23	2.11.1 גורמי הנזק ב-DNA ותוצריו
24	2.11.2 מנגנוני תיקון נזקי ה-DNA
26	2.11.3 שיטות להערכת נזקי ה-DNA ותיקונו
28	2.12 תוצרי לוואי של החיטוי
28	2.12.1 תוצרי לוואי של תהליכי החיטוי
29	2.12.2 סוגי חיטוי ותוצרי לוואי
31	2.12.3 המטבוליזם של המחטאים ותוצרי הלוואי שלהם כאשר הם נאכלים או נשאפים
31	2.12.4 השפעת המחטאים ותוצרי הלוואי שלהם על הבריאות
32	2.12.5 השפעת החיטוי ותוצרי הלוואי שלו על בריאות בני האדם
32	2.12.6 הסיכונים הנובעים מחיטוי ותוצרי הלוואי שלו
32	2.12.7 תוצרי לוואי וגנוטוקסיות של חיטוי מקרינת UV
34	2.12.8 מוטגניות
36	2.12.9 חיטוי קולחים ע"י קרינת U.V לעומת חיטוי בכלור
38	2.13 יצירת ביופילמים ע"י מיקרואורגניזמים במערכות הולכת מים
38	2.14 יצירת ביופילם על ידי זני <i>Aeromonas</i>
40	3. מטרות המחקר
41	4. שיטות עבודה
41	4.1 קביעה כמותית של קוליפאג'ים בשיטת המוקדים-plaque assay
41	4.1.1 קביעה כמותית של קוליפאג'ים בשיטת שכבת אגר כפולה (double agar layer)
41	4.1.2 הכנת תרבית <i>E. coli</i>
41	4.2 קביעת כושר ההדבקה של הטפיל החד תאי <i>Cryptosporidium parvum</i>
41	4.2.1 הכנת תרביות תאי HCT-8 (Human ileocecal adenocarcinoma)
41	4.2.2 הכנת זכוכית המכסה לגידול תאים
42	4.2.3 תהליך החיטוי של האוואציסטות והאקסיסטציה

42	4.2.3.1 חיסוי סטוק של אואוציסטות מצואה של עגלים מודבקים
42	4.2.3.2 תהליך האקסיסטציה
42	4.2.4 הדבקת התאים
42	4.2.5 צביעת מוקדי ההדבקה
42	4.2.6 גילוי <i>Cryptosporidium parvum</i> בשיטה אימונופלווארסצנטית (IFA):
43	4.2.7 הפרדה וניקוי של <i>Cryptosporidium parvum</i> :
43	4.3 תאור אתרי הדיגום
43	4.3.1 מערכת חלוץ לטיפול שלישוני
44	4.3.2 הקואגולנט
44	4.3.3 ריאקטור ה-U.V.
44	4.3.4 החומר המרחף
45	4.3.5 הרכב המים
45	4.3.6 מקור קרינת ה-U.V. במעבדה
46	4.3.7 מהלך הניסויים במעבדה
46	4.3.8 מדידת PSD
47	4.3.9 מדידת עכירות
47	4.3.10 מדידת ערך הגבה (pH)
47	4.3.11 צילום החומר החלקיקי בדגימות
47	4.3.12 מדידת טמפ' ומוליכות
47	4.4 קביעת יעילות קטילת מיקרואורגניזמים ע"י UV
47	4.4.1 מדידת פילוג גודל חלקיקים מרחפים
48	4.4.2 בליעת UV
48	4.5 קטילה של <i>A. hydrophila</i> ע"י UV, ניטור נזקי DNA, תיקון וגידול מחדש.
48	4.5.1 הכנת מצע ADA-V
48	4.5.2 הכנת תרבית <i>A. hydrophila</i>
49	4.5.3 קביעה כמותית של חיידקי <i>A. hydrophila</i> בשיטת הזריעה הישירה
49	4.5.4 הערכת יעילות הקטילה של החיידק <i>A. hydrophila</i> ע"י קרינת UV
49	4.5.4.1 הקרנת הדוגמאות:
	4.5.4.2 הערכת התאוששות <i>A. hydrophila</i> עקב פוטוריאקטיבציה לאחר חשיפה ל UV
49	4.5.4.3 הערכת הגידול הספונטני של <i>A. hydrophila</i> ו <i>E. coli</i> בריכוזים נמוכים
49	4.5.5 הערכת נזקי קרינת ה UV ל DNA של <i>A. hydrophila</i> ויכולת תיקון ה DNA בעקבות פוטוריאקטיבציה
50	4.5.5.1 מיצוי DNA של <i>A. hydrophila</i>
50	4.5.5.2 הכנת הדגימות והטענתן
	4.6 קביעת יעילות הקטילה של Rotavirus בשלושה סוגי מים שונים בעזרת מכשיר Collimated Beam.
51	4.6.1 גידול ואחזקה של תרבית התאים MA-104
51	4.6.2 גידול הנגיף SA-11 Rota
51	4.6.3 אימות כושר ההדבקה
51	4.6.4 הכנת תאי MA-104 בפלטות של 24 בארות לקביעה כמותית של נגיף ה- Rota (SA-11)
52	4.6.5 קביעה כמותית של נגיפי ה- Rota בשיטת ה- MPN (Most Probable Number)
52	4.6.6 קטילת Rotavirus על ידי קרינת U.V. באמצעות מכשיר Collimated Beam
52	4.6.7 קביעה כמותית של נגיף ה- Rota - קריאת התוצאות
52	4.7 קביעת מוטגניות באמצעות ה- Ames Test
52	4.7.1 TA 1535
53	4.7.1.1 גידול החיידק, אימות זהות החיידק והכנת תרבית עבודה
53	4.7.1.2 הכנת תרבית לשמירת החיידק בהקפאה

53	4.7.1.3 אימות דרישת היסטידין
53	4.7.1.4 אימות מוטציית rfa
54	4.7.2 מצעים המשמשים לבדיקת פוטנציאל המוטגניות
55	4.7.3 מבחן המוטגניות Ames Test
55	4.7.3.1 שיטת ה- Ames Test לבדיקת פוטנציאל המוטגניות
55	4.7.3.2 הכנת החיידקים <i>S. typhimurium</i> למבחן המוטגניות Ames Test
56	4.7.3.3 הכנת החיידק TA1535 והחיידק TA1537:
56	4.7.3.4 הכנת החיידק TA100*:
56	4.7.3.5 ביקורת חיובית באמצעות Sodium Azide וקביעת קריאות הרקע
57	4.7.4 יישום שיטת ה- Ames Test:
57	4.7.4.1 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שטופלו במחטא כלור:
57	4.7.4.2 בדיקת הרעילות האקוטית של הדגימות המוכרות:
57	4.7.4.3 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שהוקרנו על ידי UV:
57	4.7.4.4 קביעת ריכוז COD (Chemical Oxygen Demand):
57	4.7.4.5 מהלך הניסוי במכשיר המעבדתי Collimated beam
58	4.7.5.1 יישום השיטה במכשיר המעבדתי Collimated beam:
58	4.7.5.2 הוספת כלור בריכוזים שונים
58	4.7.6 ניטור תוצרי לוואי בהתאם למבחן המוטגניות Ames Test:
58	4.8 קביעה כמותית של חיידקי <i>Clostridium prefringens</i> בשיטת הסינון הממברנלי:
58	4.9 הכנת הספורות של <i>B. subtilis</i> :
59	4.10 בדיקת ריכוז וספורות של <i>B. subtilis</i> :
59	4.11 קביעה כמותית של חיידקי קולי ממוצא צואתי בשיטת הסינון הממברנלי
59	4.12 קביעה כמותית של חיידקי <i>E. coli</i> ממוצא צואתי בשיטת הזריעה הישירה
60	5. תוצאות
60	5.1 שכיחות של מיקרואורגניזמים פתוגנים ואנדקטוריים בקולחים שניונים
	5.2 יעילות הקטילה של <i>B. subtilis</i> , <i>E. coli</i> ו- MS2 במכשיר המעבדתי Collimated beam
60	60 בקולחים לאחר טיפולים שונים
61	5.3 השפעת סוג המיקרואורגניזם על יעילות הקטילה ע"י קרינת U.V:
64	5.4 השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V:
	5.5 השוואת יעילות הקטילה של חיידקי <i>E. coli</i> , נבגי <i>B. subtilis</i> , בקטריופאג' MS2 ונגיפי Rota בסוגי מים שונים ע"י קרינת U.V
67	5.6 השוואת בין יעילות הקטילה של חיידקי <i>A. hydrophila</i> במים מזוקקים ובקולחים שניונים
70	5.7 יעילות הקטילה של טפילים מסוג <i>C. parvum</i> ע"י קרינת U.V
71	5.7.1 קביעת יעילות הקטילה של הטפיל <i>C. parvum</i> ע"י קרינת U.V:
	5.8 הערכת יעילות הקטילה של זני <i>Aeromonas</i> , קוליפורמים ממוצא צואתי וחיידקים כלליים שנמצאים בקולחים שניונים
72	5.9 מדידת התכונות הביולוגיות והפיסיקוכימיות של הקולחים השניונים שהובאו ממכון סיהור שפכים רמת-השרון
72	

5.10	השוואה בין יעילות הקטילה של זני <i>Aeromonas</i> , קוליפורמים ממוצא צואתי וחיידקים כלליים בקולחים שניונים לאחר חשיפה לקרינת UV	73
5.11	השפעת העכירות במים על יעילות הקטילה של חיידקי <i>E. coli</i> ע"י קרינת U.V.	74
5.12	השפעת ריכוז החיידק והעכירות על יעילות הקטילה של <i>A. hydrophila</i> ע"י קרינת U.V.	75
5.13	השוואת יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים אנדיקטוריים ע"י קרינת U.V וכלור במתקן חלוץ לטיפול שלישוני בקולחים	76
5.14	בדיקות פיסיקליות	80
5.15	נזקי ה-DNA שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	82
5.15.1	הערכת כושר ההתאוששות של חיידקי קולי לאחר חשיפה לקרינת U.V. ע"י גידול או ברמת ה-DNA	82
5.15.2	הערכת כושר ההתאוששות ע"י אור נראה של נבגי <i>B. subtilis</i> לאחר הקרנה ב U.V.	88
5.15.3	הערכת הנזק שנגרם ל-DNA של <i>A. hydrophila</i> מזן מעבדתי בעקבות הקרנה ב UV והערכת יכולת התיקון של ה-DNA לאחר פוטוריאקטיבציה... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	89
5.15.4	יעילות קטילת <i>A. hydrophila</i> ע"י הקרנתו ב UV והתאוששותו ע"י פוטוריאקטיבציה	92
5.15.5	השוואה בין יעילות הקטילה לבין יכולת ההתאוששות (פוטוריאקטיבציה) של <i>A. hydrophila</i>	92
5.15.6	הערכת השפעת איכות המים (מים מזוקקים וקולחים שניונים) על יעילות קטילת <i>A. hydrophila</i> ע"י קרינת UV ויכולת התאוששותו ע"י פוטוריאקטיבציה... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	93
5.15.7	הערכת הגידול הספונטני של <i>A. hydrophila</i> ו <i>E. coli</i> בריכוזים נמוכים שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	93
5.16	הערכת פוטנציאל תיקון חושך של <i>A. hydrophila</i> ושל <i>E. coli</i> שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	94
5.16.1	הערכת התאוששות הבקטריופאג' MS2 עקב פוטוריאקטיבציה או תיקון בחושך לאחר חשיפה ל UV	96
5.17	שינוי תכונות שטח הפנים של חלקיקים בקולחים ע"י קרינת U.V. ... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	97
5.18	קביעת פוטנציאל המוטגניות של קולחים מוקרנים ע"י UV או אחרי חיטוי ע"י כלור.	
5.18.2	כיול החיידק TA1537: שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	102
5.19	ניטור פוטנציאל המוטגניות באמצעות Ames Test. שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	104
5.19.1	ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שטופלו בכלור: .. שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	104
5.20	הכנת המודל למבחן המוטגניות Ames Test: שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	106
5.20.1	אימות הפקת הפלסמיד על ידי הרצה בג'ל: .. שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	107
5.20.2	יצירת זן החיידק <i>S. typhimurium</i> *TA100: שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	109
5.20.3	אימות המוטציות של זני החיידק <i>S. typhimurium</i> : .. שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	109
5.20.4	כיול זני החיידק <i>S. typhimurium</i> : שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת.	110

- 5.20.4.1 כיול החיידקים TA1535 ו- TA100* :..... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 110
- 5.20.4.2 כיול החיידק TA1537 :..... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 113
- 5.21 ניטור פוטנציאל המוטגניות באמצעות Ames Test . שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 114
- 5.21.1 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שטופלו בכלור : .. שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 114
- 5.21.2 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שהוקרנו על ידי UV :
..... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 116
- 5.21.3 קביעת ריכוז ה- COD בדגימות קולחים : שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 116
- 5.21.4 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלואי של קולחים שהוקרנו על ידי UV :
..... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 117
- 5.21.5 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי לואי של קרינת UV ולאחריה טיפול בכלור :
..... שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 120
- 5.22 ניטור תוצרי לואי ספציפיים THM's של כלור וקרינת UV באמצעות GC/ MS
בשפכים גולמיים שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 121
- 5.22.1 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי לואי של טיפול בכלור , קרינת UV וקרינת UV
של אחריה טיפול בכלור לאחר השהיה לזמנים ארוכים : שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 125
6. מסקנות שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 128
- 7 המלצות למחקר עתידי שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 129
- 8 בביליוגרפיה : שגיאה! הסימניה אינה מוגדרת. 130

1. תקציר

שימוש חוזר בשפכים לאחר טיפול שלישוני מהווה פתרון יעיל לבעיות של המחסור במים ולסילוק מבוקר של השפכים ברמה נמוכה של מפגעים בריאותית וסביבתית. בשנה הראשונה של המחקר התרכזנו בבחינת מידת ההתאמה של קרינת UV כאמצעי חיטוי ליצור קולחים ב איכות גבוהה שמתאימים להשקיה בלתי מוגבלת של גידולים חקלאיים עם מינימום מפגעים בריאותיים וסביבתיים. כך שקרינת UV תשמש כאלטרנטיבה לשיטות חיטוי קונבנציונאליות. ערכנו השוואה בין יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli*, בקטריופאג' MS2 והטפיל הפרוטוזואי *C. parvum* ע"י קרינת UV ממכשיר מעבדתי, Collimated Beam.

בנוסף, נבדקה השפעת האיכות הפיסיקוכימית של הקולחים על יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים השונים ע"י קרינת UV. כמו כן, בדקנו את שכיחותם של מיקרואורגניזמים אינדיקטורים ופתוגנים בקולחים שניונים שטופלו ע"י בוצה משופעלת במת קן לטיהור שפכים, ונערכה השוואה בין יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים אינדיקטורים בקולחים ע"י קרינת UV לעומת כלור לאחר סינון עומק עם ובלי פלוקולציה (הפתתה) במתקן חלוץ. הערכנו את רמת נזקי ה-DNA בחיידקי *E. coli* ובנבגים של *B. subtilis* ע"י קרינת UV, ונבדקה האפשרות לתיקון הנזקים במהלך חשיפה לאור פלואורסצנטי.

בשלב השני במחקר הוקדש לבחינת מידת העמידות/רגישות של טפילי *C. parvum* לקרינת U.V. בהשוואה למיקרואורגניזמים אחרים. כמו כן, נבחנה מידת הרגישות של נגיפי רוטה (גינום דו סלילי, RNA) לקרינת U.V. השפעת העכירות על יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V. נבחנה ברמות שונות של עכירות חרסיתית. בנוסף לכך, נבחן כושר התיקון של חיידקים ונבגים שנחשפו לקרינת U.V. ע"י קרינה פלואורוצינטית ברמה של גידול בהשוואה לתיקון ברמת ה-DNA. בשלב הזה בנינו מערכת לבדיקת המוטגניות של מים וקולחים שהוקרנו ע"י U.V. כמו כן, נבדקו שינויים במטען שטח הפנים של חלקיקים שנגרם בעקבות קרינת U.V.

בשלב השלישי של המחקר הוקדש לברר את פוטנציאל היצור של תוצרי לוואי טוקסיים כתוצאה מחיטוי קולחים ע"י קרינת UV. כמו כן, נבדק פוטנציאל הגידול מחדש של מיקרואורגניזמים בעקבות חיטוי קולחים ע"י קרינת UV. כאשר החיידק שנלקח כמודל הינו החיידק *A. hydrophila* שנמצא באופן טבעי במקורות מים עליים וצפוי שיהיה מצויד במנגנון תיקון יותר מתקדם מאשר חיידקי מעיים.

בשלב זה של המחקר נבחנה ההשפעה של קרינת U.V על הבקטריופאג' MS2, ונבדקה יכולת התאוששות שלו באור (פוטוראקטיבציה) ובטיפול בחושך. בנוסף, נבדקה ההשפעה של תוצרי לוואי טוקסיים שנוצרו מטיפול קצר או ארוך של קולחים ע"י קרינת UV וכלור על יצירת מוטציות בשני זנים של חיידקי סלמונלה.

תוצאות המחקר הראו שהטפיל הפרוטוזואי *C. parvum* רגיש למנות נמוכות של U.V, במנת U.V של 6 mWs/cm^2 התקבלה קטילה של שני סדרי גודל של הטפיל *C. parvum*. לעומת זאת, נגיף

רוטה SA-11 נמצא כיותר עמיד למנות גבוהות של U.V. והראה התנהגות של זנב בחשיפה לקרינת U.V. ממצאים שמצביעים על עמידות מיוחדת של הנגיף לקרינת U.V. ועמידות יתר של פרקציה של תרבית הנגיף. עכירות חרסיתית של עד 50 NTU גרמה להפחתה של סדר גודל אחד מייעילות הקטילה של חיידקי קולי בעזרת קרינת U.V. תוצאות המחקר הראו שהבקטריופאג ' MS2 יותר עמיד לקרינת UV מאשר חיידקי *E. coli* ($P < 0.0001$) בכל סוגי המים שנבדקו. נמצא כי לחיידקי קולי יש כושר התאוששות מנזקים שנגרמו ע"י קרינת U.V. כמו כן, נמצאה התאמה בהתאוששות חיידקי קולי ברמה של תיקון נזקי ה-DNA וכושר ההכפלה/ההתרבות של החיידקים. לעומת זאת, למרות שנצפה תיקון בנזקי ה-DNA לא התקבלה התאוששות בגידול של הנבגים, כנראה שלמרות התיקון שחל בדימירים, פונקציות מטאבוליות נפגעו באופן בלתי הפיך שמונע התרבות מחדש של הנבגים.

תוצאות המחקר הראו כי מנת UV של 24 mWs/cm^2 גרמה לקטילה של 5 סדרי גודל של חיידקי *A. hydrophila* במים מזוקקים ובקולחים שניונים. אך עם זאת עלול להתרחש גידול מחדש עקב פוט וריאקטיבציה ותיקון חושך. כמו כן נמצא כי לבקטריופאג ' MS2 יש יכולת התאוששות באור לאחר קרינת U.V. אך לא נצפתה התאוששות של הבקטריופאג ' בחושך. בחשיפת הבקטריופאג ' לאור פלורוסנטי למשך 120 דקות מיד לאחר ההקרנה ב-U.V. נצפתה התאוששות של ה-MS2 שהתבטאה בעלייה ממוצעת של כ-2.5 סדרי גודל בריכוז ה-MS2 לעומת ריכוזו מיד לאחר ההקרנה. בהדגרת דוגמאות הבקטריופאג ' השונות בחושך למשך 48 שעות נצפתה התאוששות קטנה ולא משמעותית בריכוז ה-MS2.

חיידקי סלמונלה טיפומריום רגילים או חיידקים שעברו טרנספורמציה במעבדה הראו רגישות לסודיום אזיד שידוע כחומר מוטגני. בבדיקת פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלוואי הנוצרים מטיפול בכלור לעומת U.V., נמצא כי תוצרי הלוואי הנוצרים מטיפול עם כלור הנם בעלי פוטנציאל מוטגניות גבוה יותר בהשוואה לטיפול בהקרנת UV. נצפה שינוי ממוצע של $2.4 \log$ ו- $2.3 \log$ בריכוז החיידקים מהזן TA100 בעקבות חשיפתם לתוצרי הלוואי שנוצרו במשך 10 ימים מרגע הטיפול עם כלור או טיפול עוקב של הקרנת UV וכלור של שפכים מסורכזים, בהתאמה.

בטיפול עם הקרנת UV לא נצפה שינוי משמעותי בריכוז החיידקים בעקבות חשיפתם לתוצרי הלוואי של הטיפול בהשוואה לביקורת השלילית (ללא חומר מוטגני – סודיום אזיד). התוצאות לא הראו מובהקות סטטיסטית להיווצרות תוצרי לוואי גנוטוקסיים ב Ames Test, באף אחד מסוגי הטיפולים, לדוגמא חיטוי בכלור. מאידך גיסא, נצפו תוצרי לוואי גנוטוקסיים ספציפיים מסוג THM's בטיפול בכלור וכן בטיפול משולב של UV וכלור. לא נמצאו כלל THM's כאשר בוצעה קרינת UV בלבד או בקבוצת הביקורת. נמצא כי ישנה עליה גבוהה ומשמעותית של THM's לאחר טיפול בכלור למשך 24 שעות בהשוואה לטיפול בכלור למשך 30 דקות.

ממצאי המחקר מצביעים על כך שקרינת UV הנה יעילה בקטילה של מגוון רחב של מיקרואורגניזמים כולל נגיפים, חיידקים, נגיפים ופרוטוזואה טפיליים. חלק מהמיקרואורגניזמים

הראה פוטנציאל לתיקון בתנאי חושך ואור לכן דרושה תוספת של מחטא שאריתי שתעכב את הגידול מחדש של מיקרואורגניזמים. ריכוז גבוה של כלור ייצר תוצרי לוואי טוקסיים לאחר תגובה עם שפכים תוצרי הלוואי הטוקסיים שנוצרו ע"י כלורינוציה הראו פוטנציאל גבוה של מוטגניות במבחן Ames. לעומת זאת, לאחר הקרנה במנות גבוהות של UV לא התגלו תוצרי לוואי ולא התגלה פוטנציאל מוטגניות במבחן Ames, מה שמצביע על כך שלא נוצרים תוצרי לוואי גינטוקסיים בקולחים ע"י קרינת UV.

2.0 רקע מדעי

2.1 שימוש חוזר במים

ניצול אינטנסיבי של מקורות המים בישראל, מים עיליים ומי תהום, במשך שנים רבות גרם למחסור במים ואף לירידה במפלס מי התהום. בשנים האחרונות, קיימת מגמה גוברת של ניצול מי קולחי מ מטהרים לצורכי חקלאות, תעשייה ובעיקר להעשרת מי האקוויפר. שימוש חוזר בקולחים נפוץ בארצות רבות בעולם, היות והוא יכול לתת פתרון משולב ל-2 בעיות המקשות על מדינות רבות בעולם. הבעיות הן: 1. הצורך בסילוק השפכים מבלי לגרום למפגעים תברואיים ומבלי לזהם את מקורות המים השפירים. 2. המחסור הקיים במים מתוקים (מים שפירים). השימוש החוזר בקולחים עוזר בפתרון שתי הבעיות, כאשר מצד אחד הוא מהווה דרך נאותה לסילוק תברואי של השפכים /קולחים, ומצד שני הקולחים המנוצלים מהווים תוספת חשובה למקורות המים של המדינה. שימוש חוזר בקולחי מ, בנוסף לפתרון הבעיות התברואיות ובעיית המחסור במים, יכול להיות משתלם גם מהבחינה הכלכלית, בהשוואה ל מחיר מים שפירים שמשמשים לחקלאות (עלוני והלפרין; 2003).

קולחים שעברו טיפול יכולים להיות בשימוש להשקיה, העשרת מי תהום והשבה לטבע באופן שלא יפגע באיכות הסביבה (10). שימוש חוזר בקולחים הפך לחיוני במהלך השנים בגלל גידול האוכלוסייה העירונית והתרחבות האיזורים העירוניים, וזה למעשה מעודד שימוש חוזר בקולחים מכיוון שמקורות המים השפירים מוגבלים, הביקוש הגובר למים שפירים להשקיה, לצריכה עירונית ולתעשייה יוצרת תחרות על הקצאת משאבי המים שנמצאים במחסור, בזמן שאספקת המים היא מוגבלת ומאוימת ע"י זיהום, כדי למנוע משברים, בהרבה מדינות חייבים לחסוך במים, לזהם פחות, לווסת את הביקוש וההיצע ולהאט את גידול האוכלוסין במצב הזה, מים מושבים הנם משאב יקר, לא בכל השימושים דרושים מים שעומדים בתקן של מי שתייה, ניתן להשתמש במים מו שבים שעברו טיפול מתאים כדי להקטין את הדרישה למקורות מים שפירים באיכות גבוהה, מחזור מים מקצר את מחזור המים הטבעי שבו המעגל הממוצע הוא מעל ל- 2500 שנה. קולחים מטהרים יכולים להיות בשימוש ישיר או בלתי ישיר, ז"א שימוש ישיר במים עצמם או ערבובם עם מקורות שונים כגון: מים עיליים, מי תהום וכו', דוגמאות לשימוש בלתי ישיר: השקיה, תעשייה וכו' (Levine & asano; 2004).

שימוש חוזר במים כולל העשרת מי תהום שדורש תכנון, טיפול ופיקוח על איכות מי השתייה, לדוגמא: ריכוז החומרים הכימיים, ריכוז מיקרואורגניזמים פתוגניים, סיכונים בריאותיים שונים וכו', ישנם אמצעים טכנולוגיים יעילים לגילוי חומרים אנאורגניים ואורגניים, כמו כן, ישנן שיטות גילוי שונות המוודאות שישנו ריכוז מינימלי של חומר מסוים שאינו גורם לסיכון בריאותי בבני אדם, חיידקים, וירוסים וטפילים מהווים גורמי סיכון חשובים ומשמעותיים במי השתייה או בקולחים באופן ישיר או באופן עקיף עם בני "א. החומרים הכימיים המצויים בקולחים הם קשים לניטור ולבדיקה, רוב החומרים הכימיים הם חומרים המזיקים לבני אדם כגון: חומרים כימיים מהתעשייה, חומרי לוואי מחיטוי, אולם נדרשת בדיקה קפדנית וניטור, הנעשים בעזרת שיטות ומכשירים מתוחכמים.

מדינות שונות פיתחו גישות שונות על מנת למנוע סיכונים בריאותיים וסביבתיים , הגישות משתנות בין טכנולוגיה גבוהה /עלויות גבוהות /סיכון נמוך לבין טכנולוגיה ירודה /עלויות נמוכות/סיכון שתלוי במאזן מקומי בין היכולת לרמת הסיכון . בגלל הזמינות של מספר טכנולוגיות טיפול עם רמת ביצועים מוכחת , מערכות מים ממוחזרות יכולות להיות בנויות בצורה כזאת שיעמדו ברמה איכות גבוהה של מים לשימוש ציבורי , תעשייתי ומסחרי , חוסר עקביות בגישה זו וכן חוסר בגישה מדעית , מעלה את דאגת הציבור בקשר לסיכונים בריאותיים וכן מעודדת תגובות שמרניות למדי בקשר למיחזור מים . ישנה אפשרות נוספת ליצור מסגרת בינלאומית מנחה למיחזור מים (חשיבה גלובלית) בעלת קו חשיבה להפוך מים באיכות ירודה/סיכון גבוה למים באיכות גבוהה/סיכון נמוך (Adin et al;2001).

בזמן שתקנות לשימוש במים ממוחזרים באופן רוטיני התרכזו ב אמצעים לשמירה על הבריאות , ב-20 השנים האחרונות ישנה הכרה גוברת בצורך להבטיח כי למים הממוחזרים לא תהיה השפעה שלילית על הקרקע ומי התהום ותישמר איכות הסביבה לדורות הבאים , ישנו ערך נמוך לשימוש במים ממוחזרים אם התוצאה היא הפיכת הקרקע ומי התהום לבלתי שמישים תוך זמן קצר . גורמים שצריך לקחת בחשבון בתקנות לשימוש חוזר בשפכים יכללו מלחים ותכולה כימית , כמו כן, המטען של הנוטריינטים . המרכיבים הנ"ל הם לא רק פונקציה של איכות המים הממוחזרים אלא גם תנאי הסביבה המקומיים ואיך משתמשים במים הממוחזרים , לכל סכימת מחזור , צריך להכין מערכת השקייה שתתאים לתנאי הסביבה המקומיים . התנאי העיקרי לשימוש החוזר בקולחים , הוא ששימוש זה לא יגרום לסיכונים בריאותיים או למפגעים תברואיים . שימוש בשיטות טיפול יעילות מבטיח הגנה על בריאות הציבור ועל איכות מקורות המים השפירים .

2.2 טיפול בשפכים

תהליכי הטיפול בקולחים כוללים מספר שלבים : 1. טיפול ראשוני-שיקוע : בשלב זה מפרידים את המוצקים הגדולים מזרם השפכים . כאשר שפכים גולמיים מגיעים למתקן הטיפול הם עוברים דרך שכבת מתכת דמוית סורגים אשר מרחיקה חומרים מוצקים כענפים , צמיגים ודומיהם . חומרים קטנים יותר כחיתולים ובקבוקים מורחקים ע"י מסנן נע , השפכין מועברים למיכל אשר מאפשר את ההפרדה הרצויה בין חצץ לחול (Pepper et al; 1996).

לאחר הסינון זורמים השפכים לאגני השיקוע בהם מסולקים מר בית המוצקים האורגנים והאנאורגנים ע"י השקעה בתחתית המיכל כבוצה או כמוצקים ביולוגיים (Pepper et al; 1996). הבוצה שנוצרת נקראת בוצה ראשונית שמורכבת מחומר אורגני מומס , חומר קולואידי ומיקרואורגניזמים פתוגנים ולא פתוגנים לא מורחקים באופן אפקטיבי בתהליך השיקוע הראשוני (Pepper et al; 1996).

2. טיפול שניוני : בטיפול זה , חומר אורגני מתפרק באמצעות מיקרואורגניזמים וכך חומרים מומסים קולואידיים הופכים לחומרים שניתן לשקע . המטרה בטיפול זה להפחית את כמות החומר האורגני המומס והמורחף שלא שקע בטיפול הראשוני (Pepper et al; 1996).

השיטות המקובלות בטיפול שניוני הן : מרבדים ביולוגיים , בוצה משופעלת ובריכות חימצון . 3. טיפול שלישוני : טיפול זה , מבוסס על מספר שלבים פיסיקו- כימיים נוספים אחרי הטיפול הראשוני והשניוני הגורמים לסילוק חומר אורגני , הפחתת העכירות וריכוז המיקרואורגניזמים הפתוגנים (Pepper et al; 1996).

הטיפול יכול לכלול קואגולציה, פלוקולציה, סינון וחיתוי. הטיפול יכול להיות ספיחה באמצעות פחם פעיל, שפכים מכילים מלחים מומסים בריכוזים משתנים. התרומה של המשחתות (המלחת בשר) ושל תעשיית הטקסטיל היא עיקרית. חלק מהמלחים המומסים הם מלחי סידן ומגנזיום הגורמים לבעיות קשיות. תהליך הריכוך מביא להרחקת המלחים יוצרי הקשיות, בתהליך ריכוך ע"י החלפת יונים, יש חילוף בין יוני הסידן ומגנזיום ליוני הנתרן שאינם יוצרים בעיות קשיות. בתהליך הספיחה מסולקים בעיקר חומרים אורגניים מהמים, ובנוסף ניתן לסלק בתהליך זה גם את יוני הפלואוריד והארסן האנאורגניים, תרכובות וחומרים אורגניים נותנים למים צבע, ריח וטעם לוואי. שתי קבוצות חשובות מבין התרכובות הנ"ל הן: הטריהלומתאנים שהם תוצרי שלב החיטוי שנוצרים מתגובת תרכובות אורגניות עם הכלור, החשודים כמסרטנים אף בריכוזים נמוכים וקבוצה נוספת היא חומרים אורגניים הנוצרים עקב פעילות אנתרופוגנית, כגון: כימיקלים ממיסים, חומרי ניקוי, חומרי הדברה ועוד המגיעים לשפכים, בתהליך הספיחה, תרכובות אורגניות נספחות לחומר הסופח (כגון פחם פעיל) על פני השטח במערכת משולבת של כוחות פיסיקאליים וריאקציה כימית.

אוסמוזה הפוכה היא תהליך לסילוק מומסים בעלי משקל מולקולרי נמוך כגון מלחים אורגניים, תהליך זה הפוך לתהליך הטבעי שהוא אוסמוזה ע"י הפעלת לחץ על הצד היותר מרוכז בתמיסה שבמגע עם הממברנה, אוסמוזה מתרחשת כאשר משתמשים בממברנה חדירה למחצה להפרדה בין שתי תמיסות בנפח דומה, אחת היא מים והשנייה תמיסה עם מלחים מומסים. מים עוברים מצד תמיסת המים דרך הממברנה לתמיסה המלווה עד שמושג שיווי משקל אוסמוטי, ע"י הפעלת לחץ בצד התמיסה עם המלחים, זרימת המים דרך הממברנה נעצרת ואם הלחץ עולה על ההפרש האוסמוטי זרימת המים מתחלפת. אוסמוזה הפוכה יכולה לעצור את כל סוגי המומסים האורגניים והאנאורגניים. אופן ההפרדה מתבסס על תהליכים המושפעים מגודל וצורת החלקיקים, מטענם היוני וקשירתם עם הממברנה בכדי להתגבר על החיכוך המולקולרי שבין מה שחודר דרך הממברנה לממברנה בזמן דיפוזיה, נדרשת הפעלת לחץ גבוה בתחום של 30-100bar. תהליך ההפתתה (קואגולציה+פלוקולציה) נועד לאפשר הרחקתם של מוצקים מרחפים קולואידלים, פתוגנים, חומצות פולביות ופרוטאינים, פוליסכרידים, חומצות הומיות. קואגולציה הוא השלב בו מתערערת יציבות המרכיבים שבמים (דסטביליזציה). התהליך כולל את התהוות הקואגולנט, את הפרת היציבות הקולואידית של החלקיק ואת המגע הפיסיקלי הבין חלקיקי. תהליך זה מושג בד"כ בערבול מהיר במיכלים אליהם מוסף המפתית. פלוקולציה הוא שלב האגרגציה - יצירת המגעים בין החלקיקים שיציבותם עורערה, והתלכדותם לצברי חלקיקים גדולים יותר. תחילת התהליך בערבול איטי. לאחר שנוצרו פתיתים גדולים יותר אפשר "לתפוס" אותם ע"י סינון שיכול לבוא בהמשך או לסלקם ע"י שיקוע.

2.3 השבתת קולחים להשקיה

הכמות המוגבלת של מים זמינים להשקיה, גידול המגזר הביתי והתעשייתי הדורש מים שפירים, וכן המחיר הגבוה של התפלת מי-ים גורמים לכך שהקולחים יהיו חלק הולך וגדל של מקורות המים הזמינים לסקטור החקלאי. שדרוג קולחים לאיכות השקיה בלתי מוגבלת נועד לתת מענה למחסור החמור במים. שיעור השבת הקולחים בישראל הוא מהגדולים בעולם. כמות הקולחים המושבים מוערכת כיום בכ-350 מלמ"ש. רוב מי

הקולחים משמשים להשקיה בחקלאות. כ-60% מהגידולים החקלאיים מושקים במי קולחים. השימוש במים מושבים בחקלאות בישראל נמצא בשנים האחרונות במגמת גידול. כיום מוקצים לחקלאות כ-200 מלמ"ש קולחים. בשנת 2015 יוקצו לחקלאות 600 מלמ"ש קולחים.

השקיה בקולחים יכולה להביא תועלת לחקלאות ולכלכלה, אך גם לזיהום מים ולהמלחת הקרקע.

2.4 מיקרואורגניזמים פתוגנים בשפכים ואספקטים בריאותיים בשימוש חוזר

שפכים גולמיים מכילים ריכוזים גבוהים של סוגים שונים של מיקרואורגניזמים גורמי מחלות (פתוגנים) ואנדקטורים, חיידקים כגון: *E. coli*, קליפורמים צואתיים – נמצאים בכמות של 10^5 10^7 cfu/100 ml (7), אנטרוקוקים, *Clostridium perfringens*. נגיפים כגון: polio (שיתוק ילדים), צהבת, Rotaviruses, Human-Caliciviruses, נגיפי מעיים וכו'.

וכן טפילים כגון: *Cryptosporidium* ו-*Giardia*.

קטילת המיקרואורגניזמים ה פתוגנים במי השפכים חשובה ואף הכרחית בתהליך שימוש חוזר במי הקולחים לצורך השקיה, חקלאות, תעשייה וכו' כדי להפחית את הסכנה הבריאותית והסביבתית.

בשימוש בקולחים להשקיית ירקות טמונה סכנת זיהום ובעקבותיה תחלואה (Bryan et al;1977). יש להעריך את הסיכון ע"י בדיקת הפרמטרים המשפיעים כגון: אופן ההשקיה (הצפה, המטרה, טפטפות), איכות הקולחים וסוג התוצרת החקלאית.

מכיוון שהחיטוי בכלור נמצא כלא יעיל בקטילת טפילים ושאר מיקרואורגניזמים פתוגנים במי הקולחים (Slifko et al; 1997), מצד שני נמצא כי חיטוי באמצעות קרינת U.V יעיל ואפקטיבי

בקטילת וירוסים, חיידקים ובמיוחד טפילי מעיים מסוג *Cryptosporidium* ו-*Giardia* (Linden et al;2001,Rajala et al;2003, De lemos chernchro et al;2003).

יעילות הקטילה ע"י U.V תלויה באיכות הקולחים, עוצמת ה-U.V, זמן החשיפה של המיקרואורגניזמים לקרינה, סוג המיקרואורגניזם וכן מקור קרינת ה-U.V. יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים נמצאת ביחס הפוך עם ריכוז החלקיקים הקולואידליים בקולחים.

הטפילים: *C. parvum* ו-*Giardia* אלו הם טפילי מעיים שבצורתם הסביבתית הם אוואוציסטות או ציסטות במקרה של *Giardia*, טפילים אלו מאופיינים בעמידות גבוהה לתנאי סביבה הודות למעגלי החיים המיוחדים שלהם ולציסטות אשר הם מייצרים, כמו כן, הם בעלי דופן עבה מאד מה שמקנה להם עמידות לחיטוי. הטפילים שורדים במים ובקרקע בתנאי טמפ' רטורה גבוהה, יובש, מליחות ופעילות מיקרוביאלית (Slifko et al; 1997).

גודל האוואוציסטה של *C. parvum* הוא $3-6 \mu m$, לאחר שהאוואוציסטה חודרת לגוף היא עוברת אקסיסטציה ומשחררת ספורוזואיטיים היכולים להתחיל את ההדבקה של תאי האפיתל של הקיבה, מה שיכול לגרום לשלשול מסיבי ואיבוד של נוזלים מהגוף, וכן לעיתים גם למוות (Pepper et al; 1996).

מחקרים רבים הראו ש- *Cryptosporidium* נמצא ב- 55%-87% מדגימות המים העיליים בארה"ב, ממצאים שמצביעים על השכיחות הגבוהה של *Cryptosporidium* יחסית ל-*Giardia* (Pepper et al; 1996).

התפרצויות של *Cryptosporidiosis* הקשורות במים דווחו ממספר מדינות רבות, המפורסמת בהן התרחשה במילוקי בשנת 1993 בה מספר החולים היה 400,000 וכ-100 אנשים מתו מן המחלה (Mekenzi et al.,1997).

ה-*Giardia* גורמת ל-*Giardiasis* בעלת סימפטומים חריפים של איבוד מים, שלשולים, הקאות וירידה במשקל, ה-*Giardia* מצוייה במים כציסטה, מה שמקנה לה יכולת לשרוד במים הקרים למשך חודשים, כמו כן, הציסטה של ה-*Giardia* עמידה לכלור (Pepper et al; 1996). נגיפים מכילים חומר תורשתי (חומצת גרעין) DNA או RNA וכן מעטפת חלבונית הנקראת capsid, אלו הם יצורים טפילים אובליגטורים, ז"א לא מתרבים מחוץ לתא המאחסן, הם שורדים לאורך תקופות ארוכות בסביבה (Pepper et al; 1996).

ישנם יותר מ-140 סוגים של נגיפי מעיים המתרבים בדרכי העיכול בבן "א כמו כן, ישנם סוגים מקבוצה זו המסוגלים להתרבות בתוך רקמות שונות: כבד, לב, עיניים, עור, מערכת העצבים. הקבוצה הראשונה של נגיפי המעיים שבודדה ממים ו משפכים הם נגיפי Polio, Norwalk, HAV, Coxsackieviruses, Echoviruses. למרות שהרבה מחלות נגרמות על ידי סוגים כגון: meningitis, fever, myocarditis, שלשולים ומחלות נשימה, רוב הזיהומים מתונים, רק 50% מהאנשים שנדבקו מפתחים סימנים קליניים.

נגיפי Rota גורמים למחלות קשות במעיים, שלשולים ודלקת חריפה במעיים בקרב ילדים מתחת לגיל שנתיים, מבוגרים וקשישים (Pepper et al; 1996).

החיידקים הינם תאים פרוקרי וטים המכילים ממברנה ודופן והם שורדים לזמן קצר, קבוצת חיידקי המעיים כוללת: סלמונלה הגורמת ל-typhoid ולשלשולים, vibro cholera, שיגלה, E.coli הגורמים לשלשולים. לעומת זאת, ישנם סוגי חיידקים המייצרים נבגים שעמידים לתנאי סביבה קשים במיוחד, הנבג מכיל שכבה חיצונית עבה במיוחד, תכולת מים נמוכה בנבג או בקליפתו, ריכוז גבוה של מינרלים בקליפת הנבג, חדירות נמוכה לקליפתו ורווית הכרומוזום בחלבונים קטנים ומסיסי חומצה המכונים SASP (Small acid soluble proteins) חלבונים אלו מיוצרים במהלך הנביגה בספורות המתפתחות ומתפרקים בתחילת תהליך הגרמינציה שמקנים לו עמידות לתנאי הסביבה ולקרנת U.V. לכן מנת הקרינה שתידרש לקטול את הנבגים תהיה גבוהה יחסית לחיידקים וגטטיביים (Pepper et al; 1996).

בשנים 1999-2000 נרשמו 39 התפרצויות של מחלות שנגרמו ע"י צריכת מי שתייה ב-25 מדינות בארה"ב, התפרצויות אלו גרמו לתחלואה בקרב 2068 אנשים ול-2 מקרי מוות (Anonymous; 2002).

56.4% מההתפרצויות נגרמו ע"י חיידקים פתוגנים וחומרים כימיקליים במים, עדיין לא ידוע מה הסיבה ל-17 מההתפרצויות שגרמו למחלות מעיים חריפות, אומנם רוב ההתפרצויות נגרמו מזיהום.

71.8% מ-39 ההתפרצויות קשורות למי תהום, אחוז ההתפרצויות שנגרמו ממים עיליים עלה מ-11.8% ב-1997-1998 ל-17.9% ב-1999-2000. אחוז ההתפרצויות שנגרמו משימוש במי תהום לא מטופלים עלה ב-87% מהפעם הקודמת שדווח על 15 התפרצויות. שבעה התפרצויות שהשפיעו על 57 אנשים נגרמו כתוצאה מהדבקה של טפילים: 6 התפרצויות של *Giardia* והתפרצות אחת של *Cryptosporidium* בבריכות שחייה המכילות כלור, כאמור *Cryptosporidium* עמיד לתנאי סביבה קיצוניים וכן עמיד מאד לחיטוי באמצעות כלור ויכול לשרוד תקופות ארוכות בבריכות המכילות כלור, לכן חיטוי של בריכות ע"י כלור יכול להוות גורם להתפרצות. תשעה התפרצויות גרמו לתחלואה של 1166 אנשים כתוצאה מזיהום של חיידקים פתוגנים ביניהם: *E.coli*, *Salmonella*, *Campylobacter jejuni* וכו' הנמצאים במקורות מים טריים וגורמים למחלות מעיים קשות, בנוסף, 426 אנשים חלו כתוצאה מהתפרצויות של הוורוס NLV(calicivirus), אך אף אחד מהם לא אושפז או מת ומקור הוורוסים היה מי תהום.

Aeromonas 2.5

זני *Aeromonas* נמצאים בסביבות מימיות. זני *Aeromonas* בודדו ממי תהום, מי שתייה, מים עיליים, שפכים, קולחים, סדימנטים וממים עם ריכוז נמוך של כלור (Method 1605, 2001). דווח על הימצאות חיידקי *Aeromonas* במערכות הפצת מי שתייה, כולל מאגרים עם רמות כלור גבוהות יחסית, ייתכן שרגישות החיידק לכלור היא יחסית נמוכה (Gavriel et al., 1998). העמידות היחסית לכלור ושרידות החיידקים במערכות הפצת מים מוסברת ע"י יצירת ביופילמים היוצרים מטריקס אורגני המשמש כמגן מפני כלור במים (Holmes and Nicolls, 1995). נוכחות חיידקי ה-*Aeromonas* במים טבעיים היא עונתית כך שבעונות חמות מספרם עולה. נוכחות זני *Aeromonas* ותפוצתם מתאימה לשמש אינדיקטור למצב הטרופי של המים. זני ה-*Aeromonas* שייכים למשפחת ה-Aeromonadaceae, דווח על 15 זנים של החיידק בהתבסס על רצף 16S rDNA, חלק מהזנים קושרו למחלות בבני אדם (Demarta et al., 1999). החיידק הוא מתג גרם שלילי, אנארובי פקולטטיבי, אוקסידאז חיובי, החיידק *Aeromonas hydrophila* (A. hydrophila) הוא בעל פלגלה פולרית ולכן בעל יכולת תנועה (Method 1605). החיידק *Aeromonas hydrophila* בודד מדגימות קליניות ואופייני גנטית ופנוטיפית. השונות הגנטית בין הזנים היא בהתאם למוצא הגאוגרפי, למקור מחלה או שיוכה (Guadalupe et al, 2005).

זני *Aeromonas* ידועים כגורמי מחלות רציניות בבע"ח ימיים: נמקים, ספטיסמיה ומחלות קיבה בבע"ח בעלי דם קר (Guadalupe et al, 2005). זני *Aeromonas* בעלי יכולת תנועה מהווים איום מיקרוביאלי לבני אדם, במיוחד לבעלי מערכת חיסון מוחלשת. החיידק *A. hydrophila* נמצא כגורם למחלות מעיים (gastrointestinal), שילשולים ולזיהומי מעיים (extraintestinal infections) בבני אדם (Guadalupe et al, 2005). הגורם הוירולנטי לשלשול עדיין לא ידוע. בודדו מספר גורמי אלימות שהחיידק מייצר אך הם לא קושרו בוודאות לגרימת שלשולים. בודדו 3

אנטרוטוקסינים מ *A. hydrophila*, מתוכם 2 נמצאו בחולים הסובלים משלשולים ,
heat labile cytotoxic enterotoxin ו heat stable cytotoxic enterotoxin. נמצא שנוכחות של
גורם אחד בלבד משני הגורמים הנ"ל לא גורם לשלשולים (Alber et al., 2000).

2.6 קבוצות גודל של חלקיקים מרחפים בקולחים

הרכב הקולחים תלוי במקור שלהם ובסוג הטיפול שעברו. מקור הקולחים יכול להיות
מתעשייה, מחקלאות או ממקור עירוני. סוג הטיפול יכול להיות טיפול שניוני בבוצה
משופעלת או בבריכת הצללה, לדוגמא. ניתן לחלק את החומרים מהם עשויים החלקיקים
לפי שלוש קטגוריות:

1. מיקרואורגניזמים – כגון וירוסים, חיידקים, פרוטוזואה, תולעים, אצות וסרטנים.
2. חומרים אורגניים – כגון חומצות הומיות, חומצות פלוויות, צלולוזה, עמילן, חומצות
אמינו, שומנים, אנזימים ונוטריאנטים.
3. חומרים אנאורגניים – כגון מלחים, מתכות, חרסיות ומינרלים.

2.7 בדיקת פילוג גודל חלקיקים – פג"ח (PSD-Particle Size Distribution) בקולחים

עד לעשור האחרון מקובל היה להגדיר חלקיקים במים ובשפכים ע"י שני סוגי בדיקות
בלבד: בדיקה גרבימטרית (S.S) ועכירות. עקב פיתוח מואץ במיכשור האלקטרוני בשנים
האחרונות, החלו להשתמש באפשרויות אחרות לבדיקת החלקיקים ע"י ספירתם לפי
גודלם.

מקובל לתאר גודל חלקיקים תוך שימוש במושג "קוטר אקוויולנטי", כלומר: קוטר של
עיגול ששטחו שווה לשטח ההיטל של החלקיק.

פילוג גודל החלקיקים המרחפים במי קולחים מתנהג לפי פונקציית החזקה (Adin &
Elimelech, 1989; Alon & Adin, 1994) עבור ערכים הנמדדים מ-1 μm ומעלה,
ומתוארת ע"י המשוואה הבאה:

$$dN/d(dp) = A(dp)^{-\alpha} \quad (3)$$

כאשר N הוא מספר החלקיקים בטווח הגודל של החלקיק,

dp הוא הגודל הממוצע של החלקיק בטווח,

A, α הם קבועים אמפיריים.

כל קבוצת גודל נשלטת ע"י מנגנון שונה. חלקיקים קטנים מ-1 μm בקירוב מוסעים לפני
השטח של הגרגר ע"י דיפוזיה. חלקיקים גדולים יותר מוסעים ע"י גרביטציה. ההסעה של
חלקיקים יחסית גדולים עשויה גם להיות דומיננטית ע"י מנגנון של יירוט.
משוואות ההסעה מבטאות תלות חזקה של יעילות מכניזם ההסעה בגודל החלקיק.

במחקרים של (Kavanaugh, 1980), (Adin et al., 1985) ועדין ואלימלך (1986) מצויינים הבדלים בצורת הפילוג בסוגים השונים של תרחיפים. ניתן לקבוע כי גודלו של מקדם החזקה מהווה מדד למספרם הכולל של החלקיקים ביחידת נפח תרחיף בעוד שערכו של המקדם מעיד על חלקם היחסי של החלקיקים בתחום גודל כלשהו. כלומר: ככל שערכו האבסולוטי של המעריך גדול יותר כך גם גדול יותר משקלם של החלקיקים הקטנים ולהיפך: ככל שערך זה קטן יותר יגדל משקלם של החלקיקים הגדולים. פילוג גודל חלקיקים הנמדד אינו נתון העומד בפני עצמו, הוא תלוי במכשיר בו הוא נמדד, בשיטת המדידה ובטווח הגדלים הנמדדים.

ספירת חלקיקים נעשית ע"י מכשירים המסווגים לפי שלושה עקרונות פעולה:

חישה אלקטרונית, חסימת אור ופיזור אור.

בחלק מן המכשירים ניתן למדוד חלקיקים תוך כדי זרימתם באופן רציף ב"זמן אמת" וחלקם מודדים דגימות שנאספו, ב"זמן נקודתי". ככל שהקולחים יציבים יותר קיימת בעיה קטנה יותר של אמינות המדידה מבחינת הדיגום והשינוי בפילוג גודל החלקיקים מזמן לקיחת הדגימה מן המקור ועד לזמן ביצוע הספירה של החלקיקים.

עבור קולחים המטופלים עם עזרים כימיים כגון פוליאלקטרוליטים, אם הדגימה עדיין איננה יציבה, יכול להיות שינוי גדול בפילוג גודל החלקיקים – אם בזמן שבין לקיחת הדוגמא ועד שהדוגמא נספרת הנוזל עדיין בתהליך היווצרות פתיתים חדשים. או דוגמא לבעיה אחרת, אם הנוזל מכיל פתיתים גדולים, הבעיה היא בשיטות דיגום, למשל הזרמת הנוזל דרך צינורות דקים מדי עלולה לגרום לשבירת הפתיתים ולשינוי בפילוג גודל החלקיקים.

כאשר משתמשים בסופר חלקיקים המבוסס על עיקרון חסימה של שטח החתך הניצב לקרן אור (או לפולס חשמלי) הגודל הממוצע נקבע ע"י קוטר המעגל האקויוולנטי, ומחושב מקוטר המעגל בעל השטח השווה לשטח החתך של החלקיק הניצב.

לביצוע הבדיקה נדרש לעתים מיהול עקב הגבלת מספר חלקיקים (Colin et al.).

יש לציין שלכל המכשירים המשמשים לספירת חלקיקים הקיימים כיום בשימוש יש יכולת אפסית, אם בכלל, לקבוע חלקיקים שמתחת ל- $1 \mu\text{m}$. חלקיקים כאלה קיימים, בהסתמך על מדידות במיקרוסקופ אלקטרוני, בכמויות גדולות.

כאשר מדובר בשפכים כמות החלקיקים (מעל ל- $1 \mu\text{m}$) יכולה להגיע לסדרי גודל של מאות אלפים לסמ"ק. לכן, חשוב הספק ספירה גדול של חלקיקים על מנת למנוע מיהולים בסדרי גודל של 1:1,000 או 1:10,000.

הנוזל לביצוע המיהול צריך להיות אותו מדגם מסווג – חסר חלקיקים. היות שבתוך השפכים נמצאים חומרים קולואידליים המקשים על תהליך קבלת נוזל ללא חלקיקים, יש צורך בסינון דרך נייר סינון בגודל נקבוביות $0.22-0.45 \mu\text{m}$. נמצא שמיהול במים מזוקקים אינו טוב כיוון שהוא מגדיל את מספר החלקיקים הקטנים ($5-15 \mu\text{m}$) ומקטין

את מספר החלקיקים הגדולים ($15-80 \mu\text{m}$) ככל שהמים מהולים יותר (Adin et al., 1984).

2.8 פוטנציאל אלקטרוקינטי (פוטנציאל זטא)

רוב החלקיקים בקולחים הם קולואידים ומטענם שלילי, ולכן קיימת ביניהם דחייה אלקטרוסטטית שמביאה ליציבותם. יונים חיוביים נמשכים לחלקיקים הנושאים מטען שלילי, ויוצרים סביבם שכבה חשמלית כפולה. יציבותו של חלקיק מבוטאת באמצעות הפוטנציאל האלקטרוקינטי של פני השטח שלו, המכונה פוטנציאל זטא (ZP), הניתן ע"י מדידה של מהירות תנועת החלקיק בשדה חשמלי בתהליך האלקטרופורזה.

באופן מעשי ניתן לקבוע שלושה אזורים יציבות בהתאם לערכי ZP (Adin, 1998; 1999):

1. עד -7mV , פוטנציאל נמוך, יציבות נמוכה ונטייה לקואגולציה.
 2. -10 עד -15mV , פוטנציאל בינוני, דחייה בינונית ויציבות נמוכה עד בינונית.
 3. -20 mV או $\geq$, פוטנציאל גבוה, דחייה גבוהה ויציבות גבוהה.
- מדידות ZP של חלקיקים שהתנהלו בסוגים שונים של מים "שים בישראל נמצאו דומים, הערכים הם שליליים ונעים בטווח שבין -10mV עד -18mV (Adin et al., 1989).

2.9 פילוג גודל חלקיקים בקולחים

Tchobanoglous & Eliassen (1969) מצאו שעבור קולחים מבוצה משופעלת בבדיקה של חלקיקים מעל ל- $1 \mu\text{m}$, המספר המרבי של חלקיקים נמצא בטווח הגודל שבין $5-10 \mu\text{m}$ והטווח השני השכיח נמצא בסביבות $80 \mu\text{m}$.

Bader (1970), קבע שחלקיקים מבוצה משופעלת ומבריכות חמצון נמצאו בעיקר בתחום שבין $1-25 \mu\text{m}$.

Kavanaugh ושותפיו (1980), מצאו כי החלקיקים בקולחי בוצה משופעלת מתפלגים בהתאם לפונקציית החזקה [נתונה ע"י משוואה (3) לעיל]. ובהתאמה של למעלה מ- 0.95 .

Elimelech (1985) מצא כי עבור קולחי בוצה משופעלת, החלקיקים מתנהגים לפי פונקציית החזקה. כמו כן, עבור קולחי קיבוץ נען, מצא שבבדיקת החלקיקים בתחום שבין $1-60 \mu\text{m}$, 87% מן החלקיקים נמצאים בתחום שבין $1-5 \mu\text{m}$.

2.10 הפקטורים לקביעת עוצמת קרינת ה- U.V.

2.10.1 סוגי מנורות U.V.

קיים מגוון של מנורות שפולטות קרינה בתחום ה- U.V. (מנורות כספית, מנורות קסנון, מנורות ממתכות הלידיות ועוד). מקובל להשתמש במנורות המכילות אדי כספית. ניצוץ חשמלי המועבר דרך אדי הכספית גורם לעירעור אלקטרונים ולפליטה של פוטונים בצורה של קרינת U.V. קיימים שלושה סוגי מנורות U.V. שפועלות בלחץ אדי כספית:

1. מנורה בלחץ נמוך (LP) – מנורת אדי כספית שפועלת בלחץ קרוב לוואקום (-0.001-0.01 torr), בטמפרטורה בינונית (40°C) ובהספק של 0.5 W/cm . מנורה זו מספקת אור מונוכרומטי באורך גל של 253.7 nm , שהוא קרוב לאורך הגל האופטימלי לחיטוי של *E. coli* ו-*Cryptosporidium* (Gates 1930; Linden et al., 2001). חיטוי עם מנורת LP לא יעיל עבור קולחים עם ריכוז TSS מעל ל-30 מג"ל (US EPA, 1999).
2. מנורה בלחץ בינוני (MP) – מנורת אדי כספית שפועלת בלחץ שבין $100\text{--}10,000\text{ torr}$, בטמפרטורות גבוהות ($600\text{--}900^{\circ}\text{C}$) ובהספק חשמלי של $50\text{--}150\text{ W/cm}$. תדירות ההתנגשויות בין אטומי הכספית גדלה ומייצרת אור פוליכרומטי - בספקטרום רחב של אורכי גל בתחום ה- U.V. ובתחום הנראה, הכוללים את התחום בו מתקיימת אינאקטיבציה של חיידקים ($200\text{--}300\text{ nm}$). בד"כ נעשה שימוש במנורות MP במתקנים גדולים. עוצמת הקרינה של מנורת MP גדולה פי 15-20 לערך מזו שמייצרת מנורת LP, לכן למנורת MP יכולת חיטוי מהירה ויכולת חדירה גבוהה יותר למים. זה מאפשר להשתמש בריאקטור קטן יותר ו/או במספר קטן יותר של מנורות. יחד עם זאת, צריכת האנרגיה של מנורת ה-MP גבוהה יותר, הטמפרטורה הגבוהה של המנורה מאיצה אילוח וזמן החיים שלה קצר יותר. ספקטרום הפליטה עבור מנורות בלחץ נמוך ובינוני מוצג בתמונה 1.
3. מנורה בלחץ נמוך ועוצמה גבוהה (LPHO) – מנורת אדי כספית בלחץ נמוך (0.76 torr) שפועלת בטמפרטורות גבוהות ($120\text{--}200^{\circ}\text{C}$) ובהספק חשמלי גבוה ($1.5\text{--}10\text{ W/cm}$). בדומה למנורת ה-LP גם מנורה זו מספקת אור מונוכרומטי ב- 254 nm .

2.10.2 קביעת עוצמת הקרינה הממוצעת במערכת U.V.

קיימות שתי שיטות עיקריות שקיבלו תוקף רשמי ע"י ה-EPA (US EPA, 1986), להערכת עוצמת הקרינה הממוצעת במערכת U.V.:

1. ביודוזימטרית (Bioassay)

2. מתמטית (PSS-Point Source Summation Method)

עבודות מחקר רבות מתבססות על השיטה המתמטית. יחד עם זאת נוטים להשתמש בשיטה הביודוזימטרית לשם השוואה בין מכשירים שונים ולשם הערכת יעילות החיטוי של מכשיר חדש שנרכש.

השיטה הביודוזימטרית – מסתמכת בעיקר על מכשיר מעבדתי המכונה *collimated-beam* (ראה פרק חומרים ושיטות). משוואה (1) מתארת את חישוב עוצמת הקרינה הממוצעת (Morowitz, 1950) והיא תוצאה של אינטגרציה של חוק הבליעה של בר-למבר (Beer-Lambert) עבור עומק הדגימה. המשוואה נכונה רק עבור דגימות מעורבות לחלוטין.

(1)

$$I_{avg} = I_0 \left(\frac{1 - e^{-d \times \ln \frac{1}{T}}}{d \times \ln \frac{1}{T}} \right)$$

כאשר:

I_0 – עוצמת הקרינה ההתחלתית (החודרת לדגימה) (mW/cm^2),

I_{avg} – עוצמת הקרינה הממוצעת בתוך הדגימה (mW/cm^2),

d – אורך המסלול האנכי של הקרינה במים (גובה המים בכוס הדגימה) (cm),

T – העבירות של המים ב-254nm בתא שאורכו 1 ס"מ

באופן כללי, התפלגות עוצמת ה-U.V. בריאקטור בעל זרימה רציפה כפופה למאפיינים הידראוליים שאינם אידיאליים ולכן אינה אחידה. באופן אידיאלי, כל המיקרואורגניזמים שעוברים דרך הריאקטור מקבלים מנה זהה של קרינה רק אם הריאקטור הוא מסוג plug flow, כלומר מהירות הזרימה בו קבועה בכל מקום, ומתקיים בריאקטור ערבוב מושלם, מה שבד"כ לא קיים בריאקטור אמיתי.

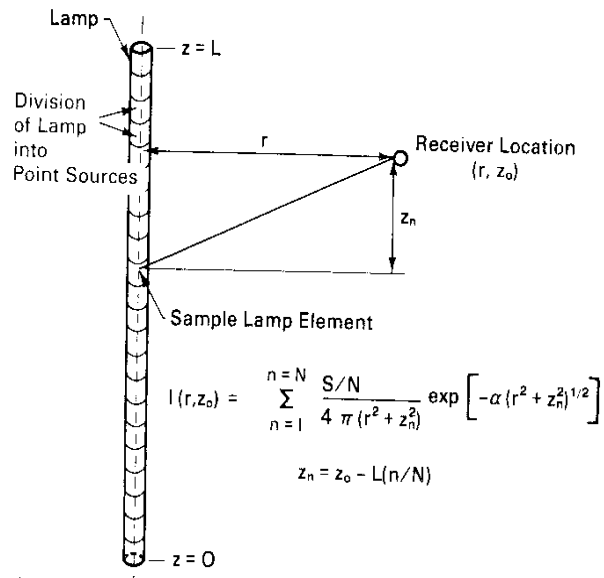
השיטה המתמטית (PSS) – משמשת לחישוב פרופיל I במערכת פוטוריאקטור שמתקיים בו ערבול טוב של הקולחים (Jacob & Dranoff, 1970), ויושמה לראשונה ע"י Qualls and Johnson (1983b). בבסיס השיטה עומדות שתי הנחות:

- למנורת ה-U.V. מספר אינסופי של מקורות נקודתיים המקרינים את האנרגיה בצורה רדיאלית לכל הכיוון ים. ה-I בנקודה מסוימת בריאקטור היא סכום של כל העוצמות המשפיעות על הנקודה הזו מכל מקורות האור שעל גבי מנורת הכספית.

- האובייקט (האורגניזם) המוקרן הוא קטן מאוד ובעל צורה כדורית. האנרגיה פוגעת בו באופן נורמלי לשטחו.

כלומר, בכדי לחשב את ה- I בנקודה מסוימת יש ל סכום את כל העוצמות מכל המקורות הנקודתיים (תמונה 1).

Figure 7-23. Lamp geometry for point source summation approximation of intensity.



תמונה 1: מודל גיאומטרי להערכת עוצמת הקרינה (I) על האורגניזם (US EPA, 1986)

2.10.3 קביעת עוצמת הקרינה הממוצעת במכשיר ה-CB עם מנורת כספית בלחץ נמוך

גלאי הרדיומטר של מכשיר ה-CB מספק מדידה של עוצמת הקרינה במרכז דגימת המים המוקרנת. לכן, על מנת לחשב את עוצמת הקרינה הממוצעת במים נדרשים מספר תיקונים. ערך זה חשוב ביותר, כיוון שהוא מספק הערכה לעוצמה הממוצעת אליה נחשף כל חלקיק או מיקרואורגניזם וממנו מחושבת מנת הקרינה.

2.10.4 פקטור ההחזרה (Reflection Factor)

כאשר קרן אור עוברת ממדיום אחד לשני, מקדם השבירה משתנה ופרקציה קטנה של הקרן מוחזרת מהפן הביני שבין התווכים. הפרקציה המוחזרת (R) ניתנת לחישוב ע"י חוק פרנסל (Meyer-Arendt, 1984). מקדמי השבירה הממוצעים של אוויר ומים באורך גל שבין 200-300nm הם 1.000 ו-1.372, בהתאמה. לכן עבור שני תווכים אלו $R=0.025$, ופקטור ההחזרה: $(1-R)=0.975$, והוא מייצג את הפרקציה של הקרן שחודרת למים.

2.10.5 פקטור פטרי (Petri Factor)

עוצמת הקרינה הנפלטת מהמנורה משתנה מעט מפני שטח הנוזל בדגימה המוקרנת, בהתאם לדגם המכשיר. בכדי לשקף ב מדויק את העוצמה הממוצעת מעל פני שטח הנוזל משתמשים בפקטור פטרי, שמוגדר כיחס שבין עוצמת הקרינה הממוצעת מעל משטח צלחת הפטרי לבין

העוצמה שנמדדת במרכז הצלחת . פקטור זה נקבע ע"י סריקה מתודית של גלאי הרדיומטר (כל 5 מ"מ) מעל השטח של צלחת הפטרי , וחלוקת עוצמת הקרינה בכל נקודה בעוצמה הנמדדת במרכז הצלחת, ומיצוע של יחסים אלו . בד"כ מכשיר CB שמתוכנן הייטב מאפשר להעביר פקטור פטרי גדול מ-90%.

2.10.6 פקטור המים (Water Factor)

פקטור זה לוקח בחשבון את בליעת ה- U.V. באורך גל 254nm על ידי מרכיבים שונים הנמצאים במים. כתוצאה מכך עוצמת הקרינה שחודרת לתוך המים פוחתת . מתוך אינטגרציה של חוק בר-למבר לפי עומק הדגימה, ניתן לגזור את פקטור המים :

(2)

$$\text{Water Factor} = \frac{1 - 10^{-a\ell}}{a\ell \ln(10)}$$

כאשר a = הבליעה עבור מסלול אנכי של 1 ס"מ

l = עומק המים בצלחת הפטרי (ס"מ)

משוואה זו נכונה רק עבור דגימות מעורבות הייטב (Morowitz, 1950).

פקטור הסטייה (Divergence Factor)

במרחקים מסוימים ממנורת ה- U.V., הקרן לא מוקרנת בצורה אנכית לחלוטין אלא סוטה מעט ממסלולה. כאשר המרחק מהמנורה (L) גדול פי 4 לערך מהקוטר של התריס דרכו נפלטת הקרינה, הקרינה נופלת ביחס הפוך לריבוע של המרחק עד לפני השטח של המים בצלחת הפטרי . לכן, הקרינה במרחק $L+x$ ביחס לזו שבמרחק L היא :

(3)

$$\frac{L^2}{(L+x)^2}$$

פקטור הסטייה הוא הממוצע של פונקציה זו עבור עומק המים בדוגמא (l) :

(4)

$$\text{Divergence Factor} = \frac{L}{(L+l)}$$

לפיכך, עבור מנורת U.V. בלחץ נמוך, העוצמה הממוצעת בדוגמת המים המוקרנת ניתנת ע"י :

$$I_{\text{avg}} = I_0 \times \text{Petri Factor} \times \text{Reflection Factor} \times \text{Water Factor} \times \text{Divergence Factor} \quad (5)$$

כאשר I_0 היא קריאת הרדיומטר במרכז הצלחת.

2.10.7 קביעת מנת הקרינה

מנת הקרינה ($U.V. \text{ Dose/Fluence}$) מתוארת כמכפלה של עוצמת הקרינה הממוצעת בזמן החשיפה (Metcalf & U.S. EPA, 1986; Harris *et al.*, 1987c):

$$\text{Dose} = I_{\text{avg}} * t \quad (6)$$

כאשר:

Dose – מנת הקרינה (mJ/cm^2),

I_{avg} – עוצמת הקרינה הממוצעת בדגימה (mW/cm^2),

t – זמן חשיפה (s)

משוואה זו מבטאת את יעילות החיטוי ולפיה ככל שהמים המטופלים נחשפים זמן ארוך יותר לקרינה ולעוצמה חזקה יותר, כך פוטנציאל החיטוי גדול יותר. עוצמת הקרינה תלויה בלחץ האדים של מנורת הכספית, בגיל המנורה (עם התיישנותה העוצמה דועכת), במידת האילוח (הפאולינג הביולוגי או הכימי) על גבי המנורה, בהרכב הכימי של שפופרת הקווארץ, בכוח החשמלי ובאיכות הקולחים.

2.11 יכולת תיקון ה-DNA במיקרואורגניזמים לאחר חשיפה לקרינת U.V

2.11.1 גורמי הנזק ב-DNA ותוצריו.

קרינת U.V הינה קרינה אלקטרומגנטית שבעיקרה בלתי מייננת, מוגדרת כקרינה בעלת אורך גל בתחום 100-400 nm, קרינה זו בעלת אנרגיה גבוהה יותר מהאור הנראה אך נמוכה יותר מהקרינה המיננת (קרינת גמא, קרינת רנטגן). משתמשים בקרינת U.V לעיקור נפחי אוויר ומשטחים, כמו כן ניתן לעקר משטחי מים דקים (film), קרינת U.V חלשה יחסית ואינה עוברת דרך זכוכית (פרט לקוורץ), פלסטיק וקרקע. מות תא עקב חשיפה לקרינת U.V הינו בראש ובראשונה כתוצאה מפגיעה בחומר הגנטי. הבסיסים purine ו-pyrimidine שבחומצות הגרעין בולעים U.V. DNA ו-RNA בולעים באורך גל של 260 nm, ה-DNA אינו רגיש יותר ממקרומולקולות אחרות ל-U.V, אבל כתוצאה מיצירת דימרים של תימין התא לא יוכל להתרבות, מה שיגרום לתמותת התא בהמשך. קרינת U.V גורמת ליצירת דימרים של תימין (thymine dimers): 2 מולקולות thymine נצמדות וכך נמנעת ההכפלה של ה-DNA. הדימר נוצר על ידי קישור בין ה-cyclobutane rings דרך הקשר הכפול על פי רוב הינו רק גדיל אחד. לחלק מהמיקרואורגניזמים ישנם אנזימי תיקון (repair enzymes) הגורמים להידרוליזה של הקשר הפוספודיאסטר (phosphodiester bond). פירוק הקטע הפגוע נעשה על ידי Endonuclease והשלמת חומצות הגרעין הקומפלמנטריות לגדיל שלא נפגע נעשית על ידי DNA-polymerase. תהליך התיקון נעשה בנוכחות אור (Shigemitsu *et al.*; 2002). קרינה של U.V גורמת לנזקים ל-DNA ברמות חומרה שונות ומביא לפגיעות כרומוזום ליות הפיכות ובלתי הפיכות, לפגיעה ביכולת השכפול וההתרבות וכן לתמותת תאים. קרינת U.V-A באורך גל 320-400 nm גורמת לנזק עקיף ב-DNA, חלבונים ושומנים ע"י רדיקלים חופשיים

כגון: חמצן פעיל, קרינת U.V.-B באורך גל 290-320 nm גורמת לנזק ישיר ועקיף בגלל שה-DNA בולע קרינה באורך גל מתחת ל-320 nm, התוצרים הכי שכיחים הנוצרים כתוצאה מקרינת U.V.-B הם cyclobutane pyrimidine dimers (CPDs) ו-pyrimidine (6-4) pyrimidone photoproducts. ה-CPD יכולים להיות קטלניים כאשר הפגיעה חוסמת את סינטזת ה-DNA ושיעתוק RNA וכן יכולים להיות מוט גניים אם הפגיעה מועברת ע"י פולימרים של DNA (Weinbauer M.G et al;1997).

יכולת זו של פגיעה בחומר התורשתי מאפשרת פגיעה בכל המיקרואורגניזמים המכילים חומצות גרעין.

2.11.2 מנגנוני תיקון נזקי ה-DNA.

החסרון הבולט והעיקרי של חיטוי באמצעות U.V. הראוי לבדיקה הוא יכולת תיקון DNA הקיימת בחלק מן המיקרואורגניזמים באמצעות אור באורך גל של 310-480 nm (photoreactivation) או ללא אור (dark repair). יכולת זו, בהעדר מחטא שאריתי טומנת סכנה לגידול מחדש של המיקרואורגניזמים במים ובקולחים (Shigemitsu et al;2002). Photoreactivation הינו תהליך שבאמצעותו המיקרואורגניזם, אחרי חשיפה לקרינת U.V., מתאושש ומבצע תיקון (repair) ל-pyrimidine dimers ב-DNA באמצעות האנזים photolyase. בתהליך זה, מתבצע תיקון של אי יכולת התא לסנטז DNA אך לא סינטז RNA או חלבונים, אורך הגל האופטימלי לפוטוריאקטיבציה בחיידק *S. griseus* הוא 436 nm ובחיידק *E. coli* הוא 365 nm, כמו כן, נמצא שישנה התאוששות (recovery) גם בבקטריופאגים לאחר חשיפה לקרינת U.V. ע"י האור הנראה ובנוכחות מיקרואורגניזמים ויש לקחת בחשבון מהי עוצמת קרינת U.V., המנה, הרכב האור הנראה וזמן החשיפה, כל הבקטריופאגים מסוג T מבצעים Photoreactivation ברמות שונות ואורך הגל האפקטיבי ביותר לתיקון הוא הקצר ביותר בתחום האור הנראה (Cleaver J.E; 2003).

נמצא שלא היה תיקון באור ע"י פוטוליאז לאחר חשיפה של *E. coli* לקרינת Medium-pressure-U.V. כנראה שהייתה הפרעה (disorder) ל-Endogenous-photolyase (Oguma K. et al;2002). תיקון בחושך הינו תיקון של הפירמידינים ללא נוכחות אור, יצורים שיכולים לבצע תיקון, שיטת החיטוי ע"י U.V. לא יעילה כנגדם (Oguma K. et al;2001).

היכולת לבצע תיקון באור תלויה בנוכחות האנזים photolyase הקושר את הדימרים של הפירמידינים בנוסף לשלב הכולל חושך האנזים גורם לפירוק הדימר, אנזים זה מכיל 2 כרומופורים נפרדים, הראשון מעביר את אנרגיית האור ל-flavin chromophore המשמש כמרכז ריאקציה לפירוק ה-CPD- cyclobutane pyrimidine dimers. Kim J.J & Sundin (G.W;2001). לרב המינים של *E. coli* יש יכולת לבצע תיקון אור כאשר היכולת לבצע תיקון חושך שונה מזן לזן ולכן יש לחקור כל זן בנפרד (Oguma K. et al;2001).

חמצון אף הוא יכול לגרום להרס של חומצות שומן בתא וחומצות גרעין ובכך להביא את הגוף להזדקנות והרס של DNA. המנגנון שבאמצעותו מתוקני שברי ה- dsDNA ביצורים אאקריוטים הוא: NHEJ (non-homologous DNA end joining), מנגנון זה חשוב באיזון של חמצון ה- DNA לבין הידרדרות מצב הגנום. לכן, מנגנון זה יכול להיות רלוונטי עבור כמה צורות של הזדקנות מוקדמת ויכול להיות חשוב בתרומה להזדקנות נורמלית של ה- גוף (Karanjawala Z.E & Lieber M.R;2004).

גם ה- DNA המטכונדריאלי וגם הגנומי חשובים מפני שכאשר יש מוטציות בהם יוצר מצב לא תקין, ישנם נזקים בקשרים הפוספודיאסטרם וכתוצאה מכך נקבל שברים ב- ssDNA בכל מיני קונפיגורציות או שנקבל single strand base damage או dsDNA. אחד הגורמים לשברים ב- dsDNA הוא reactive oxygen species כגון: hydrogen peroxid (H_2O_2). וכן, קרינה מייננת כגון קרינת x וקרינת גמא הגורמים לשברים ב- dsDNA ב- ssDNA. שברים ב- dsDNA מתוקנים ב-2 צורות: 1. Homologous recombination function בתאים סומטיים במשך ש לב ה- S וה- G2 של מחזור התא.

2. NHEJ - מנגנון אקטיבי בכל שלבי מחזור התא של רקמות בעלי החוליות, וזוהי למעשה הדרך העיקרית בכדי לתקן שברי dsDNA בשלבי G1, G0 ובשלב מוקדם של S.

בשלב מאוחר של S ו- G2 השבר יכול להי וט מתוקן גם ע"י NHEJA וגם ע"י homologous recombination. לפחות נוקלאוטיד אחד ובד"כ עד 20-10 נוקלאוטידים נעלמים מה- DNA במשך המנגנון NHEJ כלומר, כאשר מנגנון זה מופעל התא מאבד מהמידע הגנטי שלו מפני ש- NHEJ הוא הדרך העיקרית לתיקון שברי dsDNA (Karanjawala Z.E & Lieber M.R;2004).

לדוגמא, בשמרים רקומבינציה הומולוגית היא פי 100 יותר יעילה מ- NHEJ וביצורים אאקריוטים מולטיצלולריים NHEJ היא בערך פי 100-10 יעילה מרקומבינציה הומולוגית. הסיבה לתפוצה הרחבה של NHEJ בתאים סומטיים וביצורים אאקריוטים מולטיצלולריים יכולה לנבוע מצורת ארגון הגנום שלהם. בגנום של יצורים אאקריוטים מולט יצלולריים, לא כמו בשמרים, ישנם קטעים חוזרים ונישנים של DNA (substantial fraction of repetitive DNA).

homologous crossover יכול להיות מסוכן באורגניזמים עם גנומים שיש להם קטעים בולטים וחוזרים של DNA, וביצורים אלו האבולוציה הגבילה את הרקומבינציה ההומולוגית לפי זה S המאוחרת ולפזה G2 של מחזור התא. יש לציין ששברים ב- dsDNA יכולים להופיע גם כן באופן ספונטני בתא ואף המנגנון תיקון NHEJ עלול להוביל ליצירת מוטציות בתאים סומטיים.

תיקון ה- DNA ע"י NHEJ חשוב בכדי לא לאבד אינפורמציה גנטית וכאשר ישנם דפקטים ב- NHEJ, הם גורמים ל האצה בהזדקנות התאים והגוף, לדוגמא: תיסמונת וורנר- הזדקנות בגיל מוקדם נגרמת ע"י מוטציה שהתרחשה ב- DNA helicase/nuclease (Karanjawala Z.E & Lieber M.R; 2004).

2.11.3 שיטות להערכת נזקי ה-DNA ותיקוניו.

חוקרים הציעו את שיטת ה- endonuclease sensitive site assay (ESS assay) כדי לקבוע את מידת הנזק שנגרם ע"י קרינת ה-U.V (כמספר של ESS) ובכך לקבוע את מידת הנזק ב-DNA שיטה זו הוכחה כיעילה ומדויקת לא רק להשוואת הרגישות של מיקרואורגניזמים שונים לקרינת ה-U.V, אלא למחקר כמותי של מכניזם התיקון של ה-DNA (Oguma K. et al;2001). נמצא כי מספר ה-ESS עולה באופן ליניארי עם העלייה בזמן החשיפה לקרינת ה-U.V ונמצאה קורלציה חיובית בין מספר ה-ESS לבין מנת הקרינה (Oguma K. et al;2001).

כמו כן, ככל שמספר ה-ESS גדל כך יכולת ההתרבות של *E.coli* יורדת באופן ליניארי. כאשר *E.coli* נחשף ל אור פלואורוצנטי אחרי קטילה של 99.9% ע"י קרינת U.V, הדימרים של הפירמידינים עברו תיקון ויכולת ההתרבות של החיידק השתפרה באופן הדרגתי. לעומת זאת, כאשר *E.coli* הוחזק בחושך אחרי הקטילה ע"י קרינת U.V לא היה תיקון ולא נצפתה התאוששות ביכולת הגדילה שלו (Oguma K. et al;2001).

כאשר *C. parvum* נחשף לאור פלואורוצנטי לאחר מנת קרינה של 2.2 mJ/cm^2 , הדימרים של הפירמידינים תוקנו אבל לא הייתה התאוששות בכושר ההדבקה (infectivity) של *C. parvum* למרות שנרשם תיקון ב-DNA גם בחושך וזה מוביל למסקנה שקרינת U.V לא רק יוצרת נזקים ב-DNA של ה-*C. parvum* אלא גם פוגעת בכושר ההדבקה שלהם. קרינת U.V גורמת לנזקים שונים ב-DNA או לדופן, נזקים נוספים, חוץ מהדימרים של הפירמידינים, לא יתוקנו ע"י האור או ע"י החושך ומשחקים תפקיד חשוב בתהליך ההדבקה של ה-*C. parvum* (Oguma K. et al;2001, Shigemitsu M. et al;2002). לאחר 120 דקות של חשיפה לאור הנראה, נראה כי יחס ה-ESS הוא אותו הדבר בחיידק *E. coli* וב-*C. parvum*, כנראה של-*C. parvum* ול-*E. coli* יש את אותו יכולת תיקון באור. (Oguma K. et al;2001).

מנגנון תיקון ה-DNA של המיקרואורגניזמים, אחרי חשיפה לקרינת U.V הינו חיוני להישרדות החיידק הנחשף לקרינת U.V סלולרית. לחיידקים יש 3 מנגנונים נוספים לתיקון הנזק ב-DNA הנגרם ע"י הקרינה:

1. nucleotide excision repair (NER)
2. mutagenic DNA repair (MDR)
3. recombinational DNA repair (Kim J.J & Sundin G.W;2001).

מערכת MDR (mutagenic DNA repair) מקודדת ע"י הגן *ruAB* בחיידק *pseudomonas aeruginosa* והיא בעצם מקנה לחיידק עמידות לקרינת U.V-B. נמצא כי כאשר הפוטוליאז של החיידק *P. aeruginosa* עובר מוטציה ישנה ירידה בעמידות החיידק ל-U.V-B ובד בבד מתבצע מנגנון ה-MDR בתנאים של חושך ומתקן את הנזק שנגרם. מנגנון תיקון באור יעיל גם עבור אוכלוסיות נגיפים שונות בעיקר נגיפים הנמצאים בים, בעוד שכמה מהם מייצרים לעצמם את אינזימי התיקון, רובם תלויים במנגנון התיקון של התא המאכסן, כאשר הנגיפים נחשפים לקרינת ה-U.V הם מאבדים את כושר ההדבקה לתאים מכיוון שהחומר התורשתי שלהם נהרס כתוצאה מהקרינה, לכן תיקון DNA וכושר הדבקתם

יתאפשר רק לאחר הזרקתם לתאים מאכסנים ולחשיפה לאור בלבד שבנוכחותו מתאפשר תהליך תיקון באור וזה לכאורה מסביר את הפרדוקס לריכוז גבוה של וירוסים בים למרות חשיפה מתמשכת של קרינה סולרית (Weinbauer M.G et al;1997).

Comet Assay הינה שיטה לגילוי וכימות של נזקי DNA בתאים אאקריוטים לאחר חשיפה לקרינת U.V הנקראת גם Single-Cell Gel Electrophoresis (SCGE), שיטה זו טובה ויעילה בכדי למדוד נזקים ב-DNA ברמות של תא בודד (Lemay M. & Wood K.A;1999).

ה-DNA הניזוק נראה כמו כוכב שביט (comet) כולל הזנב ומכאן שמו של מבחן זה. בשיטה זו בודקים שברים ב-dsDNA וב-ssDNA וכן DNA repair במערכת alkali electrophoresis, האלקטרופורזה גורמת לנדידת ה-DNA השבור מהגרעין כאשר הוא נודד מהר יותר מה-DNA השלם, הקושי בשיטה הוא הכנת הדגימות להסתכלות במיקרוסקופ, לכן יש לדאוג שהדוגמא לא תזוז מהסלייד, כמו כן שיטה זו יקרה ודורשת שימוש במיקרוסקופ פלואורוצנטי. Comet Assay Kit מכיל סליידים מיוחדים מוכנים לקריאה במיקרוסקופ פלורסצנטי ומאפשרים שימוש ישיר לדגימת תאים, לזכוכית הנושאת ישנה שכבה הידרופובית המאפשרת היקשרות טובה של הדגימה וכמו כן מאפשרת שימוש באינזימים וריאגנטים אימונולוגיים המאפשרים זיהוי של תיקון ה-DNA (Lemay M. & Wood K.A;1999).

הכימות של נזקי ה-DNA נעשה ע"י מדידת ה-comets במיקרוסקופ פלואורוצנטי לנוכחות "זנבות" של ה-DNA, צילום הממצאים ואנליזה בתוכנה סטטיסטית מיוחדת. היתרונות של השיטה הם: רגישות גבוהה, פשטות, יעילות, אמינות, סליידים מוכנים לשימוש ואלטרנטיביות לשאר השיטות המסורתיות, בהם הכנת הסליידים היא אינטנסיבית יחסית. חוקרים רצו לבדוק את השפעת חשיפה תאי retinal pigment epithelial לקרינת U.V ונראה שלאחר הקרינה אחוז הממוצע של אורכי זנב ה-DNA היה גבוה באופן משמעותי מתאים שלא נחשפו לקרינה, כפי שנקבע ע"י ה-Comet Assay (Patton W.P et al;1999).

אחרי אינקובציה של התאים ל-24 שעות לאחר החשיפה לקרינת U.V-A ו-U.V-B, נראה שהיה תיקון של הנזק בכל התאים שנחשפו למנות נמוכות יחסית, לעומת זאת, תאים שנחשפו למנות גבוהות פיתחו אפופטוזיס (Patton W.P et al;1999).

HPLC (High Performance Liquid Chromatography) משמש כמבחן לפעילות האנזים photolyase של החיידק *E. coli* בתהליך הפוטוריאקטיבציה כאשר CPDs משמשים כסובסטרטים, נמצא כי קבוע מיכאליס (Km) של פעילות פוטוליאז הוא 100 nM והטווח הלינארי עבור calibration curve של פעילות האנזים הוא 0.026-6.64 μu/assay tube, פעילות הפוטוליאז גדלה פי 1.6 בנוכחות 5,10-methenyltetrahydrofolic acid (משמש ככרומופור שני של הפוטוליאז) בתערובת עם ריאקצית האנזים.

לאחרונה פותחה שיטה פלואורוצנטית לבדיקת פעילות פוטוליאז של *Aspergillus nidulus*, רגישות השיטה הייתה גבוהה אך הכנת הסובסטרט לריאקציה מורכבת וצורכת הרבה זמן ונראה שתנאים אופטימליים לאנזים וקבוע מיכאליס (Km) של הפוטוליאז לא נקבעו באופן מדויק, לכן,

החוקרים סינטזו גדיל בודד של cis-syn CPD-DNA ומדדו את פעילות CPD ע"י שימוש באותו גדיל בודד על מנת לפתח שיטה פשוטה ומהירה (Nakuya N. et al;2004). פותחה שיטה נוספת על מנת לכמת את ריכוז ה-CPDs של DNA לא רדיואקטיבי, דגימת ה-DNA לאחר חשיפה לקרינת U.V. הוגבה עם U.V.-endonuclease המופק מ-*Micrococcus luteus* ואח"כ הפרגמנטים של ה-DNA הופרדו בשיטת ה-alkaline elctrophoresis, היתרון של השיטה הוא שאין צורך לסמן את ה-DNA באופן רדיואקטיבי, לאחר האלקטרופורזה מסתכלים על דגימות ה-DNA מיקרוסקופ פלואורוצנטי (Sutherland B.M. & Shih A.G; 1983).

2.12 תוצרי לוואי של החיטוי

2.12.1 תוצרי לוואי של תהליכי החיטוי

פעילות אנושית ותעשייתית היא המקור להפרשות מוכפלות של חומרים כימיקאליים לסביבה והסיבה העיקרית לזיהום סביבתי. ההתעניינות במחקרים לגנטוקסיות המים באה בעקבות מחקרים אפידמיולוגים שהראו קשר בין צריכת מי שתיי ה גנטוקסיים לבין עליה במקרי הסרטן. וכך, המעקב אחר זיהומי מים למרכיבים מסרטנים פוטנציאליים מציב דאגה מרכזית לבריאות הציבור. זוהי משימה קשה, משום שסביר להניח כי המרכיב ים הגנטוקסיים שימצאו בסביבה המימית, יהיו ממגוון גדול של כימיקאליים שיכולים להגיע ממספר מקורות, כמו בתי חולים, תעשייה או שפכים ביתיים (Jolibois B & Guerbet M; 2005). מקור החומרים המוטגניים במי השתייה, לא נובעים רק מהתעשייה, מהחקלאות או מזיהום עירוני, אלא מיוצרים גם ממחטאים ותוצרי הלוואי שלהם. ידוע כי כלוריד מגיב עם חומר אורגני (חומצות humic ו-fulvic הנובעים ממתקני פסולת) הנמצא במים לא מטופלים ליצירת תוצרי לוואי מחיטוי. בנוסף, שאריות החיטוי משמשים למניעה חלקית כנגד רמות נמוכות של זיהום וגידול מחדש במערכת האספקה, וכך ישנה נוכחות של חומרי חיטוי במי הברז ביחד עם תוצרי הלוואי שלהם. למרות רמת החשיפה הנמוכה, הנוכחות של מרכיבים אלה במי השתייה חייבת להילקח בחשבון בשל החשיפה לטווח ארוך. (Buschini A et al., 2004) כלוריד מספק הגנה מאוד יעילה כנגד מחלות זיהומיות שמקורן במים. מצד שני קיימים דיווחים אפידמיולוגים על סיכון לחלות בסרטן הקשור עם מים שחוטאו על ידי כלוריד. בעיות הקשורות לכלוריד כמו, חומצה hypochlorous (HOCl) ויון היפוכלוריד (OCl⁻), בשל יצירת תוצרי לוואי trihalomethanes (THMs) ומוטגניים/ קרצינוגניים פוטנציאליים אחרים. הפעילות הגנטוקסית והקרצינוגנית של מי השתייה עם כלוריד היא כתוצאה מ- OCl⁻ עצמו. NaClO, לא מתווג כקרצינוגני על ידי International Research on Cancer Agency for [IARC]. למרות שנותן תוצאות חיוביות במבחני מוטגניות לטווח קצר: *E. coli* ו-*S. typhimurium* (מוטציה נקודתית), אוגר סיני (סטייה כרומוזומלית), פיברובלסט אנושי (אחות כרומטידה מוחלפת) ועכבר (מורפולוגית זרע). בנוסף OCl⁻ נראה כמשרה ישיר של סוגים שונים של נזקי DNA ביחס למרכיבי התא. השימוש הגובר של טיפול במי השתייה על ידי ClO₂ יצר את הצורך במעקב אחר הרמות האפשריות לסכנה מתוצרי הלוואי, כולל כלוריט ClO₂⁻ וכלוראט ClO₃⁻. כלור דו חמצני [ClO₂] נחשב ליותר בקטריצידי מאשר כלוריד מימי והשאריות שנוצרות הן חומרים אורגניים מוכלרים. לא נראה כי

ClO₂ או תוצרי הלוואי (כלורייט וכלוראט) מגיבים עם חומצות הומיות או פולבויות ליצירת THMs. למרות שידוע ש- ClO₂ הוא מחמצן חזק שמגיב עם חומרים אורגניים ליצירת מגוון תוצרי לוואי מחומצנים. ה- Environmental Protection Agency (EPA) האמריקאי שייכו את ה- ClO₂ בקבוצת D, כלומר לא נחשב כקרצינוגני אנושי, בשל חוסר נתונים אמנים על בני אדם ובעלי חיים בגלל שהנתונים על ClO₂ כגנטוקסי עדיין לא מבוססים דיים (Buschini et al., 2004).

חיטוי מי שפכים, נועד למניעת ההעברה של פתוגנים שמקורם בבני אדם. חיטוי כלוריד נמצא בשימוש נרחב בטיפול שלישוני של מי שפכים עירוניים במטרה להפחית זיהום מיקרוביאלי ולמנוע את העברת הפתוגנים לסביבה. אך כלוריד יכול להגיב עם חומרים אורגניים טבעיים (חומצות humic ו-fulvic) הנוכחים במים וגורמים לעליה של ריכוז תוצרי לוואי יציבים ולא יציבים עם פעילות מוטגנית או קרצינוגנית. ולכן נחוץ מחטא אלטרנטיבי לכלוריד שיהיה יעיל כנגד זיהום מיקרוביאלי של מי השפכים ושלא גורם לעליה בריכוז תוצרי לוואי. [PAA] Paracetic Acid. נמצא יעיל כמחטא אלטרנטיבי לכלוריד כנגד חיידקים ווירוסים הנוכחים במי שפכים. ומושפע קלות בנוכחות של חומרים אורגניים במדיום. לאחרונה, מחקרים הראו כי חיטוי מים עיליים עם PAA גורם לייצירת חומצה קרבוקסילית שהיא חסרת מאפיינים מוטגניים. עד כה, לא נערכו מחקרים על השפעת PAA על היווצרות DBP במי השפכים (Crebelli et al., 2005).

2.12.2 סוגי חיטוי ותוצרי לוואי.

מחטאים כמו, Chlorine, Chloramines, Ozone ו- Chlorine dioxide מאוד חשובים למניעת העברת גורמי מחלות דרך המים. למרות זאת המחטאים יכולים להגיב עם חומרים טבעיים במים ליצירת תוצרי לוואי לא רצויים שמהווים סכנה לבריאות הציבור. כלור, שימש בצורה נרחבת לקטילת גורמי מחלות במי שתייה שמקורן במים, אך הוא מגיב עם חומרים טבעיים במים ליצירת מגוון רחב של (DBPs) Disinfection By Product. לכן השימוש הנרחב עבר לכימיקל אחר או לבדו או בתוספת ל- Chlorine או בקומבינציה עם חומר אחר. החומרים כוללים: אוזון (O₃), כלורדיאוקסיד (ClO₂) וכלוראמין (NH₂Cl). כל אחד מהחומרים הנ"ל יצר תוצרי לוואי טוקסיים, לכן צריך להבין את הסיכון הכימי הכרוך בשימוש כל אחד מהמחטאים.

היווצרות תוצרי לוואי [DBPs], נגרמת כאשר החומרים המחטאים מגיבים במים עם חומרים אורגניים טבעיים (NOM) Natural Organic Matter או עם יוני ברומיד (Br⁻). NOM נוצרים בעיקר מפירוק של צמחים וחומר אורגני באדמה ו- Br מגיע ממקורות טבעיים ומשפכים. התגובה של החומרים המחטאים מושפעת על ידי מאפיינים פיזיקאליים של המים כמו, pH, טמפרטורה ותנאי טיפול כמו מנת המחטא. כאשר חומרים אנאורגניים כמו ברומיד נוכחים במים הם גם לוקחים חלק בתגובה ליצירת תוצרי לוואי של ברומיד. כאשר המחטא הוא Chlorine התגובה גורמת לעליה של הלוגנים (תוספת של Chlorine או ברומיד) נגזרות תוצרי לוואי כמו: 1. trihalomethanes, קבוצה של מרכיבים אורגניים המבוססים על מולקולת מתאן (CH₄) כאשר אטומי המימן הנוכחים בדרך כלל מוחלפים על ידי שלושה אטומים הלוגנים (F, Br, Cl ו/או I)

לדוגמא כולל chloroform ו- dibromochloromethane. 2. haloacetic acids (HAA), משפחה של מרכיבים אורגניים מבוססים על חומצה אצטית ($\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$) היכן שאחד או יותר מאטומי המימן המחוברים לאטומי הפחמן מוחלפים בהלוגנים ישנם 9 סוגים של HAAs כולל monochloroacetic acid (MCAA), dichloroacetic acid (DCAA) ו- dibromoacetic acid (DBAA). HAAs הם חסרי צבע, בעלי יכולת התאדות נמוכה, נמסים בקלות במים וציבים. 3. chloral hydrate, מרכיב אורגני שהוא haloaldehyde ($\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$). 4. haloacetonitriles, מרכיב אורגני בעל קבוצה מתילית המחוברת למולקולת CN כאשר אחד או יותר מאטומי המימן מוחלפים על ידי הלוגנים. דוגמאות, bromochloroacetonitrile, chloroacetonitrile ו- dibromoacetonitrile.

5. halogenated hydroxyfuranone, מרכיבים אורגניים כאשר אחד או יותר מאטומי המימן המחוברים לאטום פחמן מוחלפים בהלוגנים. דוגמאות, chlorinated hydroxyfuranone ו- MX Chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2(5H)-furanone-3. כאשר גם Br^- נוכח במים, תערובת של תוצרי לוואי שונים ייווצרו, המכילים מגוון כמויות של Br^- ו- Cl^- . כאשר חומר החיטוי הוא אוזון (O_3), אשר מחמצן חומרים טבעיים אורגניים ליצירת מספר תוצרי לוואי, עם אלדהידים ($-\text{CH}=\text{O}$) דומיננטיים. אם Br^- נוכח, האוזון יכול ליצור מרכיבים ברומיניים הדומים בחלקם לתוצרי הלוואי של הכלוריד וגם ברומאט אנאורגאני. כאשר החומר המחטא הוא ClO_2 , לא נראה יצירה מרובה של תוצרי לוואי אך הם מתפרקים ליצירת Chlorite או Chlorate. כאשר המחטא הוא NH_2Cl , זה בדרך כלל מוביל ליצירת cyanogen chloride (ClCN) חומר אנאורגאני. והפחתה משמעותית של רמות DBPs כלוריד, אבל זה יכול ליצור ניטריט (NO_2) במערכת אם זה לא מבוקר כראוי.

תוצרי הלוואי הרלוונטיים ביותר: א. כאשר המחטא הוא כלור תוצרי הלוואי הדומיננטיים הם: tri Halomethanes (THMs) מלווה על ידי halo acetic acids (HAA). ה- THM שנמצא בדרך כלל בריכוזים גבוהים הוא Chloroform (חומר אורגני) מלווה ב- dibromochloromethane. ה- HAA, הנוצרים בריכוז הגדול ביותר הם dichloroacetic acid (DCAA) ו- Trichloroacetic Acid. ב. כאשר המחטא הוא אוזון תוצר הלוואי החשוב ביותר הוא ה- Bromate (BrO_3^-) אניון אנאורגאני שנמצא בריכוזים משתנים. ג. כאשר המחטא הוא כלורדיאוקסיד (ClO_2), נוצרים כמויות צפויות של כלורט (ClO^-) וכלורט (ClO_3^-) אנאורגאניים. תלוי בכמות ClO_2 משומש.

DBPs בדרך כלל נוכחים בתערובת מורכבת שיכולה להשתנות בהרבה בהתאם לתנאים משתנים. כיצד ניתן להפחית את ריכוז תוצרי הלוואי של תהליך החיטוי, הפחתת חומרים שמשפיעלים DBPs (כמו Br^- , NOM ועוד יונים) אשר מגיבים עם המחטאים ליצירת DBPs. 1. הגבלת כמות החומר האורגני הטבעי במים על ידי קואגולציה (אגרגציה של חלקיקים מאוד דקים ליצירת חלקיק גדול הנגרם על ידי שימוש בכימיקלים) שימוש בפחמן גרנולארי (חומר ספיגה הנוצר על ידי חימום חומר אורגני, פחמן פעיל טעון חיובית ולכן מסוגל להסיר יונים שליליים מהמים כמו Cl , O_3 ו- F ולאזן מלחים אורגניים על ידי ספיחה של פחמן פעיל) סינון ממברנאלי או ביוסינון

אוזון. האוזון עצמו יכול לשמש כ מחטא עיקרי, כלור אמינים כמחטא שניוני , וגם כלור , בכמות פחותה, ClO_2 בכל אחד מהם . כלוראמינים אינם יכולים לשמש כמחטאים עיקריים כי זה פועל מאוד לאט (greenfacts.org).

2.12.3 המטבוליזם של המחטאים ותוצרי הלוואי שלהם כאשר הם נאכלים או נשאפים.

שאריות מהמחטא כלור יכולים עדיין להיות נוכחים במי שתייה ויכולים להגיב עם רוק ומרכיבי מערכת העיכול, וכתוצאה מכך ליצור DBPs בדומה לאלו הנוצרים במים . תוצרי לוואי של כלור , המטבוליזם שלהם תלוי במספר גורמים : א. THMs , יכול להגיע דרך שתית מים ודרך נשימת אדים (לדוגמא במקלחת) הם עוברים מטבוליזם ונעלמים מהר . רוב ה-THMs עוברים מטבוליזם לחומרים פחות טוקסיים, אבל חלק משנים צורה לחומרים יותר פעילים בעיקר בריכוזים גבוהים . ב. [HAA] haloacetic acids שונים מתפרקים בצורה שונה, Dichloroacetic acid [DCA] עובר מטבוליזם על ידי יצירת monochloroacetic acid וגם חומר טבעי שנמצא במטבוליזם האדם , קצב ההמרה תלוי במנה Trichloroacetic Acid , עובר מטבוליזם חלקי ל- DCA (CHCl_2COOH) שממשיך לעוד תהליכי המרה. ג. $\text{CCl}_3\text{CH}(\text{OH})_2$ chloral hydrate , עובר מספר שינויים בגוף המובילים ליצירת Dichloroacetic acid (DCAA) ו- Trichloroacetic Acid . ד. haloacetonitriles מעט ידוע על פירוקו . ה. halogenated hydroxyfuranone , הנקרא גם MX, מחקרים מראים כי MX נספג במהירות ומופרש בעקב בשתן אך גם בצואה . MX עצמו לא יכול להימדד ישירות בדם . תוצרי לוואי העיקריים של ClO_2 , ClO^- ו- ClO_3^- כנראה נספגים והרוב מתפרק לכלוריד בגוף . Bromate (BrO_3^-) נוצר במהלך תהליך אוזונציה של המים אשר מתפרק במהירות לברומיד אנאורגאני המושמד בשתן . (greenfacts.org).

2.12.4 השפעת המחטאים ותוצרי הלוואי שלהם על הבריאות.

המחטאים עצמם, בריכוזים שמשמש בהם במתקני הטיפול לא גורמים לרעילות אבל תוצרי הלוואי ותוצרים מפורקים הם אלה שמקבלים את תשומת הלב . גז כלוריד, כלור אמין ו- ClO_2 הינם מגרים נשימתיים חזקים , אבל רק בחשיפה גבוהה כתוצאה מאידוי מי השתייה. הקבוצות השונות של תוצרי הלוואי של כלור גורמים לרעילות משתנה, ונראו כמשפיעים על הכבד והכליות של חולדות ועכברי מעבדה : 1. הרעילות של THMs גבוהה בחיות מעבדה כאשר זה ניתן עם שמן תירס מאשר עם מים . כלורופורם לא נחשב כגנוטוקסי וגורם לסרטן רק במנות גבוהות לאחר שהרקמות נפגעו . שאר ה-THMs נראים כגנוטוקסיים חלשים . במנות גבוהות חלקם משרים גידולים בכבד וכליות ואחרים להגדלת המעיים , כאשר ניתנים עם שמן תירס . 2. HAA גורם למגוון השפעות על מכרסמים כולל גידולי כבד , השפעה על מערכת הרבייה והשפעות נוירולוגיות, אבל רק במנות גבוהות . HAA הם גנוטוקסיים חלשים והמנה שמשמש בה לא נראתה כגורם לגידולים. 3. chloral hydrate , הראה פוטנציאל השראה של גידולי כבד והשפעות בריאותיות אחרות במכרסמי מעבדה , אבל רק במנות מאוד גבוהות . חלק מהחומרים הלוגנים אחרים אלדהידים וקטונים מאוד גנוטוקסיים, סרטניים אפשריים ואחד מהם Chloroacetaldehyde המשרה גידולי כבד בחיות מעבדה . 4. Haloacetonitriles , לא נחקר מספיק, חלקם מוטגניים אך

לא משרים גידולים . 5. MX מוטגני חזק בחיידקים וגם נראה כגורם לגידולים בחולדות מעבדה . תוצרי לוואי של ClO_2 , ClO^- ו- ClO_3^- יכולים לפגוע בתאי דם אדומים . ClO^- במנות גבוהות יחסית יכול לגרום להשפעות נוירולוגיות קלות בגורי חולדות , אך לא גרם לגידולים בחיות מעבדה . ClO_3^- מראה טוקסיות נמוכה יותר . תוצר הלוואי העיקרי של אוזון BrO_3^- , במנות גבוהות, נראה כמשרה במכרסמים גידולי כליות , צפק ובלוטת התריס . (Jolibois B & Guerbet M., 2005;) .
(greenfacts.org).

2.12.5 השפעת החיטוי ותוצרי הלוואי שלו על בריאות בני האדם.

מספר רב של מחקרים אפידמיולוגים בוצעו על האפשרות שהכלרה וכלור אמינים בפחות הרחבה יכולים לתרום לסרטן באוכלוסיית בני האדם . ישנן אינדיקציות חלשות שמי שתייה מוכלרים גורמים לעליה במספר סוגי הסרטן , כמו בשלפוחית השתן , ברקטום וקולון . למרות זאת בגלל חשיפה לזיהומי מים שונים שלא הוערכו מספיק . אין הוכחות ממשיות שהגורם לסרטן הוא תוצרי הלוואי של תהליך החיטוי . מחקרים של אוכלוסיות שצרכו מים מוכלרים , הראו עליה מתונה ומעטה בסיכון הפוריות , כמו הפלות ופגמים בתעלות העיצביות . אך התוצאות של מחקרים שפורסמו כרגע אינם מספקים ראיות משכנעות שמים מוכלרים או THMs גורמים לנזקי פוריות (Jolibois B & Guerbet M., 2005; greenfacts.org).

2.12.6 הסיכונים הנובעים מחיטוי ותוצרי הלוואי שלו.

הכמויות הנחוצות וערכים מנחים שה- WHO World Health Organization (WHO) קבע. על פי נתונים ראויים ה- WHO קבע את רמת הכמות הבטוחה . רמות אלה נקראים Tolerable Daily Intakes (TDIs) . TDIs הינה כמות מוערכת של חומר באוויר , מזון או מי שתייה שיכול להילקח על בסיס יומי לאורך תקופת חיים בלי לעורר סיכון בריאותי . בעיקר בחיות (כמו, עכברים חולדות ואוגרים) ומהם הסקת תוצאה לכלל האוכלוסייה, TDIs Uncertainty Factor משמש כבסיס לקו מנחה במי השתייה של ארגון הבריאות העולמי שמבוסס גם במדינות רבות אחרות , כולל את האיחוד האירופאי (EU) כסטנדרט למי השתייה . הקווים המנחים נובעים מה TDIs בהנחת משקל מבוגר של 60Kg, השותה שני ליטר מים ביום . כמה אנו חשופים למחטאים ולתוצרי הלוואי שלהם ? הריכוז המגיע לברז נחשב כפחות ממה שהוזרק למים בתחילה . הריכוז משתנה ביחס לאיכות המים והמאפיינים הפיזיקאליים והכימיקאליים כמו pH, טמפרטורה ורמת הטיפול במי השתייה . דוגמאות : THMs, בדרך כלל נשלט על ידי כלורופורם אך הרמה של brominated THMs תלוי ב Br^- הנוכח במים . HAA, ריכוזו הכללי בדרך כלל כמחצית ה THMs הכללי, אבל די קשה להכללה . DCA ו TCA החומרים הראשוניים והמשניים הדומיננטיים ביותר (greenfacts.org).

2.12.7 תוצרי לוואי וגנוטוקסיות של חיטוי מקרינת UV

חוק טיפול מים לטווח ארוך (LT2ESWTR) דורש בקרה טובה יותר על פתוגנים מיקרוביאליים . ולכן בטיפול יעיל במים עיליים לא ניתן להשתמש במנות גבוהות של כלור לקטילה של פתוגנים העמידים לכלור ובמקביל לעמוד בטווח תוצרי הלוואי מחומרי חיטוי . מודל אופייני לחיטוי כולל שימוש במחטא חזק שישרת כמחטא ראשוני כנגד פתוגנים שמקורם במים ואחר כך שימוש

בכלור או מונוכלוראמין כמחטאים שניונים בכדי למנוע גידול פתוגנים מחדש במערכת. קרינה של UV בקומבינציה עם כלורינציה או כלוראמינציה היא אלטרנטיבה אפשרית למודל החיטוי. (Liu W et al., 2006).

קטילה סנרגיסטית זוהתה כאשר adenovirus מזן 2 וקוליפאגיים של MS2 נחשפו לאור UV, במנה של 40 עד 51 mJ/cm^2 ביחס ישר, ולכלור חופשי או מונוכלוראמין בריכוז של 1 mg/L . לא נראתה השפעה סינרגיסטית של קטילה כאשר נחשפו אאוציסטות של *C. parvum* ונבגים של *B. subtilis* לקרינת UV במנה של $1-16 \text{ mJ/cm}^2$, ביחס ישר ולכלור חופשי בריכוז של 1 mg/L במשך 60 שניות. קרינת UV במנות המשמשות לחיטוי מים לא נצפו כיוצרות DBP's, רק כמויות קטנות של אלדהידים נתגלו במי שפכים שהוקרנו על ידי UV במנה של מעל 200 mJ/cm^2 . ריכוז נמוך של פורמאלדהידים דווח בעקבות קרינת UV של מי תהום ומים עיליים (Liu W et al., 2006). חשיפה של מים מסוננים לקרינה של LPUV או MPUV במנות אופייניות (40, 140 mJ/cm^2) ולאחריו חשיפה לכלור חופשי בריכוז של 2 mg/L ל-24 שעות לא גרמה לעליה משמעותית של THM's ו-HAA's. רוב המחקרים האלה בוצעו על מקור מים אחד עם ריכוזים נמוכים של כלור לזמן ריאקציה קצר. Malley ושותפיו, שערכו מחקר נרחב יותר בנוסף לזיהוי ייצור פורמאלדהיד, דיווחו כי קרינת LPUV במנה של 130 mJ/cm^2 לא השפיעה בבירור על ריכוז של SDSDBP's (simulated distribution system DBP's), כולל THM's, HAA5 ו-HAN's (haloacetonitriles לאחר הכלרה) (Liu W et al., 2006).

היווצרות cyanogens chloride (CNCl) כתוצאה מתגובה של קרינת UV וכלור חופשי או מונוכלוראמין לא נחקר מספיק עדיין. CNCl בעל טוקסיות גבוהה ביונקים ומוביל לכשל נשימתי וחסימה של אנרגית מטבוליזם הנשימה. כפי שדנו קודם, פורמאלדהיד זוהה כתוצר לוואי של קרינת UV. דווח כי מנוכלורינציה של פורמאלדהיד מייצר CNCl. בנוסף דווח גם על היווצרות CNCl ממערכת של אוזון וכלוראמינים. השפעת חשיפה לקרינת UV על יצירת תוצרי לוואי יכולה להיות שונה במים ממקורות שונים (Liu W et al., 2006).

מספר רב של מחקרים אפידמיולוגיים בוצעו על מנת לברר את האפשרות שהכלרה וכלוראמינים בפחות הרחבה יכולים לגרום לעליה במקרי הסרטן באוכלוסיית בני האדם. ישנן עדויות חלשות שמי שתייה מוכלרים גורמים לעליה במספר מקרי הסרטן, כמו בשלפוחית השתן, ברקטום וקולון.

יחד עם זאת אין הוכחות ממשיות שהגורם לסרטן הוא תוצרי הלוואי של תהליך החיטוי. מחקרים של אוכלוסיות שצרכו מים מוכלרים, הראו עליה מתונה ומעוטה בסיכון הפוריות, כמו הפלות ופגמים בתעלות העצביות. אך התוצאות של מחקרים שפורסמו לאחרונה אינם מספקים ראיות משכנעות שמים מוכלרים או THMs גורמים לנזקי פוריות (Jolibois B & Guerbet M., 2005).

2.12.8 מוטגניות

גילוי של זיהום גנוטוקסי שנוצר כתוצאה מתהליכי חיטוי, הינו משימה חשובה להגנת המים ולבריאות הציבור. מחקרים אפידמיולוגים הראו קורלציה בין גנוטוקסיות של מי שתייה ועליה בעוצמת הקרנת המים עם UV (254nm) (Haider T et al., 2002). לעומת זאת בהולנד ובגרמניה לא נצפו פעילויות גנוטוקסיות בדגימות מים עיליים ומי תהום שנבדקו על ידי Ames Test לאחר טיפול בקרינת UV. עד כה, המשותף לרוב המחקרים על מוטגניות וקרצינוגניות לאחר טיפול בדגימות מים בקרינת UV, הוא שאף מחקר לא ערך מדידות מדויקות למנת ה-UV הדרושה לחטוי מי שתייה. לכן נקבע על ידי Austrian National Standard, כי לחיטוי בטוח של מי שתייה יש צורך במנה של מינימום 400J/m^2 (Haider T et al., 2002).

מרכיבים גנוטוקסיים אורגניים יכולים לחדור על פני שטח המים מטווח נרחב של מקורות תעשייתיים ועירוניים. כאשר כמות החומרים הגנוטוקסיים של מתקני טיהור שפכים עירוניים בדרך כלל גדולה הרבה יותר מאשר מתקנים תעשייתיים. מבחני מוטגניות / גנוטוקסיות (Genotoxicity/Mutagenicity Assay) – מחולקים לשתי קטגוריות עיקריות:

- מבחנים המבוססים על חיידקים, הכוללים את מבחן ה- *Salmonella mutagenicity*

או *Salmonella fluctuation*, *Salmonella umu test* ו *Chromotest SOS lux*.

- מבחני אורגניזמים וצמחים מימיים, הכוללים את מבחן ה- Micronucleus, P^{32}

postlabelling, מבחן ה- Comet ומבחן Alkaline unwinding (Ohe T et al., 2004).

Guzzella L et al., 2004).

Ames Test: הינו מבחן לקביעת פוטנציאל מוטגניות של חומרים כימיים. המבחן מבוסס על

מספר זני *Salmonella* עם מוטציות מובנות אשר מונעות מהחיידק לייצר את חומצת האמינו היסטדין, ובכך למנוע את גדילתו על מצע חסר חומצת האמינו. מוטציה חדשה (אקסוטרוף) באזור המוטציה המובנת, או בקרבה לגן הספציפי, יכולה לשחזר את הפעילות ולאפשר לחיידק לייצר

היסטדין. מוטציה חוזרת זו מאפשרת גדילה של החיידק גם על מצע חסר היסטדין, לכן מבחן זה נקרא גם "reversion assay". זני ה-*Salmonella* השונים במבחן זה בעלי מוטציות שונות בגנים שונים באופרון ההיסטדין. על כל אחת מהמוטציות הונדסו מוטציות נוספות לזנים אלה בכדי להפוך אותם לרגישים יותר למגוון נרחב של חומרים.

ישנן מספר שיטות לגילוי מוטגניות, אך השיטה Ames Test אושרה כיעילה לניטור וזאת בשל הרגישות, האמינות והיכולת לבצע מבחן זה בזמן קצר ובעלות יחסית נמוכה. השיטה פותחה על ידי Bruce N. Ames (Ohe T et al., 2004).

מבחן ה-Ames עוצב במיוחד לגילוי חומרים כימיקלים המשרים מוטגניות. במהלך השנים המבחן הוערך והוכר על ידי הקהילה המדעית, ועל ידי ארגונים ממשלתיים ותאגידים. המבחן בעל ערך ניבוי גבוה לחומרים מסרטנים של מכרסמים בתגובה לנוכחות המוטגן ולכן הוא מתבצע בכל העולם כרקע ראשוני לקביעת פוטנציאל מוטגני לכימיקלים חדשים ותרופות. בנוסף פותחו קווים מנחים בינלאומיים כמו OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), International Commission on Harmonization (ICH), לשימוש תאגידים ומעבדות לאחידות פרוצדורת המבחן (Mortelmans K & Zeiger E., 2000).

ידוע כי רוב הפעילויות הקרצינוגניות נגרמות על ידי מכניזם גנוטוקסי. לכן מבחני הגנוטוקסיות לטווח קצר יעילים לזיהוי חומרים קרצינוגניים פוטנציאליים מאשר בהשוואה למחקרים בבעלי חיים שאורכים יותר זמן ועלותם גבוהה יותר (Haider T et al., 2002).

זיהוי חומרים המשרים מוטציות, הפך לתהליך חשוב בהערכת סיכונים. כימיקלים המשרים מוטציות הם פוטנציאליים לנזקים בחיידקים המובילים לבעיות פוריות ולמוטציות בדור ההמשך. חומרים מוטגניים מסוגלים גם להשרות סרטן, דאגה זו הביאה לרוב תוכניות מבחני המוטגניות. מוטציה יכולה להתרחש כמוטציה נקודתית בגן, כאשר רק בסיס בודד עובר שינוי, או מספר בסיסים סמוכים שעברו מחיקה גדולה או סידור מחדש של DNA, על ידי שבירת כרומוזום או סידורו מחדש. אפשרות נוספת היא, רווח או איבוד של כרומוזום שלם. מוטציה בגן נמדדת בקלות בחיידקים ומערכות תאים אחרות, כאשר נגרם שינוי בדרישות של החיידק לגדילה, בעוד נזק כרומוזומאלי בתאי יונקים נמדד על ידי צביעה והרצה באלקטרופורזה ולאחר מכן צפייה בכרומוזום התא תחת הגדלה למציאת שברי כרומוזום או סידור מחדש. מבחן ה-Ames מקובל בצורה נרחבת כמבחן חיידקי לטווח קצר לזיהוי חומרים היכולים ליצור נזק גנטי במיקרואורגניזם (Mortelmans K & Zeiger E., 2000).

2.12.9 חיטוי קולחים ע"י קרינת U.V לעומת חיטוי בכלור

בטבלה מספר 1 מסוכמות תוצאות של מחקרים שבהם נקבעה יעילות הקטילה של

מיקרואורגניזמים אנדיקטוריים ופתוגנים בדגימות מים מאיכויות שונות ע"י קרינת U.V.

טבלה מספר 1: השוואת מנת קרינת U.V הדרושה לקטילת מיקרואורגניזמים שונים בדגימות מים

באיכות שונה

Reference	סוג המים	% הפחתה או לוג	מנת U.V (mW/cm ²)	סוג המיקרואורגניזם
Jacangelo <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	97.7%	20	בקטריופאגיים (סוג F)
Jeanette <i>et al</i> ; 2002	מי תהום	99%	103 mJ/cm ²	Adenovirus-40
Jeanette <i>et al</i> ; 2002	מי תהום	99%	13 mJ/cm ²	Feline calicivirus
Rajala <i>et al</i> ; 2003	מים שעברו סינון והפתה	99.9%	140	MS2
Jeanette <i>et al</i> ; 2002	מי תהום	99.9%	87 mJ/cm ²	
De Lemos Chernichro <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	4-5 לוג	13.6-50.7	<i>E.coli</i>
Jacangelo <i>et al</i> ; 2003, De Lemos Chernichro <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	99.7%	60	קליפורמים צואתיים
Jacangelo <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	99.8%	35-40	אנטרוקוקים
Keller <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	2 לוג	גדול מ-50	Salmonella spp.
Keller <i>et al</i> ; 2003	קולחים לאחר טיפול שלישוני שלא עברו סינון	2 לוג	30	Salmonella spp.
Keller <i>et al</i> ; 2003	קולחים לאחר טיפול שלישוני מסוננים	2 לוג	20	Salmonella spp.
Jacangelo <i>et al</i> ; 2003, Simpson <i>et al</i> ; 2003, De Lemos Chernichro <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	95%	75	C.perfringens
Shigemitsu <i>et al</i> ; 2002	PBS (phosphate buffered saline)	2 לוג (הדבקה)	1	C.parvum
De Lemos Chernichro <i>et al</i> ; 2003	קולחים שניונים	65%	13.6-20.3	Ascaris lumbriciodes

נמצא שיש הבדל בין קבוצות המיקרואורגניזמים השונות לגבי הרגישות לקרינת U.V, חיידק *E.coli* מקבוצת הקליפורמים הצואתיים דורש מנת קרינה של 60 mWs/cm^2 כדי לקבל קטילה של 99.7% (Jacangelo et al;2003), ואילו על מנת להוריד ב-2 סדרי גודל את הריכוז של החיידק סלמונלה נדרשת מנת קרינה של 20 mWs/cm^2 במי קולחים שלישוניים מסוננים (Keller et al;2003), לעומת זאת, כדי לקבל קטילה של 2 סדרי גודל של הטפיל *C. parvum* דרושה מנה של 1 mWs/cm^2 (Shigemitsu et al; 2002).

נראה שהחיידק *E.coli* עמיד יחסית לסלמונלה ולטפיל *C. parvum*, יתכן שככל שהאורגניזם פשוט יותר מבחינת הרכבו יהיה יותר עמיד לקרינת U.V או שההבדלים בעמידות נובעים מסיבות גנטיות (הרכב חומר התורשתי של המיקרואורגניזם), מחקרים עתידיים בנושא יוכלו לאשש טענה זו או להפריכה.

חיטוי מי שתייה וקולחים הינו תהליך שמטרתו להקטין את ריכוז ה פתוגנים לרמות בהן הסיכוי להידבק נחשב "מקובל", חיטוי בכלור ובנגזרותיו מקובל בארץ ובעולם לבקרת האיכות המיקרוביאלית של מי שתייה וקולחים ברמה שלישונית. עם זאת ידועים חסרונותיה של הכלורינציה אשר דוחפים לחיפוש אחר חלופות, שימוש בטכנולוגית ההקרנה ב-U.V לחיטוי מי שתייה ומי שפכים קיימת בעולם ומוכחת כיעילה ואמינה.

טכנולוגית החיטוי ע"י U.V כתחליף לכלור מוכיחה יתרונות רבים והם:

1. זוהי שיטה פיסיקלית ולא כ ימית לכן א ינה מייצרת תוצרי לוואי רעילים (טוקסים) כגון: THM (trihalomethanes), TOX (total organic halids), חומרים אלו מושפעים מערכי ההגבה של סביבתם כך שכל שינוי בערך ה- pH גורם לייצור של THM ובכך ריכוז תוצרי הלוואי עולה ביחס ישר לריכוז החומרים האורגניים, ידוע שהכלורינציה מגבירה את יצירת ה THM- וה- TOX ושניהם מזיקים לבריאות. פרט להיבט הבריאותי של הסכנות הטמונות בשתיית מים המכילים חומרים רעילים, גם שחרור מים כאלה לסביבה מהווה פוטנציאל לגרימת נזק לסביבה ולמי התהום. כמו כן, שימוש ב- UV אינו מצריך שימוש בניו ד ואחסון כימיקלים קורוזיביים ומסוכנים.

2. השימוש ב U.V הינו בטוח ופשוט לשימוש הן למפעיל והן לסביבה בניגוד לחיטוי ע "י כלור הדורש אחסון, ערבוב והשגחה של חומרים כימיים פעילים, כמו כן, הדרישות מן המפעיל פשוטות יותר ואין סכנה לסביבה ולמפעיל.

3. הזמן הדרוש לחי טוי- הזמן הדרוש לחיטוי באמצעות קרינת U.V הוא בשניות בעוד שהחיטוי בכלור דורש 15-30 דקות זמן מגע מינימאלי.

4. חיטוי באמצעות U.V נוח יותר לשימוש, לא דורש שטחים רחבים, מבנים וכו'.

5. יעיל עבור טווח רחב של מיקרואורגניזמים כגון נגיפים וטפילים העמידים לכלור.

חיטוי קולחים לאחר טיפול מקדים עלול להיות יעיל ביותר להפחתת ריכוז חיידקים לרמה כזאת שלא תאפשר גידול חוזר של חיידקים ויצירת ביופילמים על צנרת ההולכה.

בניגוד להכלרה, בה אנו מודאגים מהיווצרות של חומר שאירתי או תוצרי לוואי אשר משנים את איכות המים בטכנולוגיית ה-UV ניתן לפצות במנות גדולות יותר של קרינה מבלי לדאוג להיווצרות תוצרי לוואי רעילים.

מנגנון החיטוי ב-UV אינו תלוי בטמפרטורה, רמת ה-pH או חוזק יוני, לכן וריאציות בפרמטרים אלו באיכות המים אינה משמעותית, אלא אם מתקיימת השפעה על אגרגציה של מיקרואורגניזמים.

חסרון בולט של חיטוי באמצעות UV הראוי לבדיקה הוא יכולת תיקון ה-DNA הקיימת בחלק מן המיקרואורגניזמים באמצעות אור או בחושך, יכולת זו, בהעדר מחטא שאריתי טומנת סכנה להתרבותם במים (Shigemitsu et al; 2002), כמו כן, מנות נמוכות של UV אינן יעילות עבור מספר וירוסים ונבגים.

חסרון נוסף שראוי לבחון הוא שברמות עכירות גבוהות וריכוז גבוה של חלקיקים מרחפים (TSS) בקולחים יעילות קרינת UV נמוכה ולא אפקטיבית וגורמת לירידה בעוצמת האור. על מנת לפצות על המצאות מרכיבים קולטי קרינה, יש צורך להגדיל את מנת הקרינה, כלומר, את זמן המגע עם המחטא ולעיתים רחוקות יותר את עוצמת הקרינה, מדידה פיזיקאלית של מידת מעבר האור דרך המים (Transmittance) תקבע את נוכחות מרכיבים בולעי קרינה בתמיסה ותאפשר לחשב את הפיצוי הנדרש. לדוגמא חיטוי ע"י UV באמצעות low-pressure lamps לא אפקטיבי עבור קולחים שניונים עם רמות TSS מעל ל-30 mg/L.

2.13 יצירת ביופילמים ע"י מיקרואורגניזמים במערכות הולכת מים

ביופילמים הם תוצר של גידול מיקרואורגניזמים על פני שטח בעזרת מולקולות הדבקה שהם מייצרים (אדהזינים). רשת הובלת המים מספקת שטח פנים גדול ליצירת ביופילמים (Schwartz et al., 2003). בתנאים אולטיגורפים הפעילות המטבולית של האדהזיה של האוכלוסיה המיקרוביאלית עולה (Kalmbach et al. 1997). חיידק בביופילם בד"כ בעל עמידות גבוהה יותר לחומרים מחטאים כגון כלור (Lewis 2001).

ישנם מספר מכניזמים המקנים עמידות בביופילם: עיכוב חדירת החומרים האנטימיקרוביאליים דרך המטריקס האקסופולימרי של הביופילם, שינוי קצב הגדילה של המיקרואורגניזמים היוצרים את הביופילם – קצב גדילה איטי גורם לחוסר ספיגה או ספיגה איטית של החומרים האנטיביוטיים ושינויים פיזיולוגיים בעקבות שינויים בתנאי הסביבה או תנאי עקה (Donlan and Costerton, 2002) כגון אנזימים ההורסים את הביוציידים ואפקט סינרגיסטי בין הממברנה החיצונית לבין משאבות המוציאות את הביוציידים החוצה משלימות את עמידות הביופילם (Maira-Litran et al., 2000).

2.14 יצירת ביופילם על ידי זני Aeromonas

חיידקי *Aeromonas* מאכלסים ויו צרים ביופילם במערכות הובלת מי שתייה, במערכות עיבוד מזון, על גבי צמחים שוכני מים ועל גבי בעלי חיים ימיים (Janda and Abbott., 1998). השוטון של זני ה-*Aeromonas* הוא גורם אלימות התורם לתנועה, להידבקות החיידק, ליצירת ביופילם וייתכן כי גם לחדירה לתאי אפיתל המעי (Gavin et al., 2003).

לחיידיקי *Aeromonas* יש שתי מערכות שוטונים . מערכת פולרית המשמשת לתנועה בפאזה המימית ומערכת לטראלית המשמשת להתפשטות והיצמדות למשטחים . רק 60% מהזנים המזופילים מסוגלים לייצר שוטון לטראלי.

המודל האופטימלי ליצירת ביופילמים על ידי *Aeromonas* הוא על גבי זכוכית מסוג borosilicate, זנים מוטנטים ללא שוטון הראו ירידה של 30% לפחות ביכולתם ליצור ביופילם לעומת זני הבר . מוטנט הפוגע ביכולת לתנועה כמוטקטית גרם לירידה של 80% ביכולת ליצירת ביופילם לעומת זן הבר . כדי להשיג היצמדות אופטימלית דרושות שתי מערכות הש וטונים (Kirov et al., 2004).

3. מטרת המחקר

המטרה הכללית של המחקר הנוכחי הינה לבחון את מידת ההתאמה של קרינת U.V כאמצעי ליצירת קולחים באיכות גבוהה שמתאימים להשקיה בלתי מוגבלת של גידולים חקלאיים שתגרום למינימום מפגעים בריאותיים וסביבתיים.

המטרות הספציפיות של המחקר הן כדלקמן :

1. קביעת השכיחות של מיקרואורגניזמים אינדיקטורים ופתוגנים בקולחים.
2. לבחון את יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים בעלי מבנה ביולוגי שונה (חיידקים, נבגים, נגיפים של RNA עם סליל אחד או דו- סליליים, פרוטוזואה טפיליים) ע"י קרינת UV. כדי לבחון את מידת ההתאמה של בקטריופאג יים או/ו נבגים כמדדים ליעילות החיטוי של מים ע"י קרינת UV.
3. קביעת מידת ההשפעה של האיכות הפיסיקוכימית של הקולחים על יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים פתוגנים ואנדקטוריים ע"י קרינת UV. (עכירות NTU, PSD- התפלגות גודל חלקיקים ועבירות קרינת U.V).
4. השוואת יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים אינדיקטורים ע"י חיטוי בעזרת קרינת U.V בהשוואה לחיטוי ע"י כלור במתקן חלוץ שלישוני.
5. הערכת נזקי DNA של חיידקים ונגיפים שונים ע"י קרינת UV ואפשרות לתיקונם בתהליך הפוטוריאקטיבציה או ע"י תיקון חושך. השוואה בין התיקון ברמת DNA לתיקון שנמדד ע"י גידול. *E. coli*, *B. subtilis*, *A. hydrophila*, *MS2 coliphage*.
6. ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלוואי לאחר חיטוי בכלור בהשוואה לחיטוי ע"י קרינת UV. קביעת ריכוז תוצרי לוואי של חיטוי על ידי הקרנת UV וחיטוי על ידי כלור בשיטה אנליטית באמצעות המכשיר GC/MS.
7. הערכת פוטנציאל הגידול מחדש לאחר הקרנה ע"י UV ויצירת ביופלמים של החיידקים במערכת הובלת המים.
8. קביעת מידת ההשפעה של קרינת U.V על מטען שטח הפנים של חלקיקים בקולחים.
9. לבדוק את ההשפעה של זמן השהייה של קולחים מוקרנים ע"י U.V. על התפלגות גודל החלקיקים, בליעת U.V, עכירות, הפוטנציאל האלקטרוקינטי של הקולחים.

4. שיטות עבודה

4.1 קביעה כמותית של קוליפאג'ים בשיטת המוקדים-plaque assay

4.1.1 קביעה כמותית של קוליפאג'ים בשיטת שכבת אגר כפולה (double agar layer)

לצורך הניסוי, נכין תרבית של *E. coli* מזן K-13. תרבית החיידקים תוכן במצע טריפטון נוזלי ע"י טלטול באמבט מים בטמפ' של 37°C עד לקבלת צפיפות אופטית של 1 באורך גל של 520 nm, לתוך 3 סמ"ק של טריפטון חצי מוצק שישמר ב- 55°C תוכנס 0.5 סמ"ק תרבית חיידקים ולאחר מכן כמות זהה של דגימת פאג'ים, לאחר ערבוב חזק בוורטקס הדגימה תישפך על צלחת טריפטון מוצק, הדגימות יודגרו במשך 24 שעות בטמפרטורה 37°C .

קביעה כמותית של הפאג'ים תתקבל ע"י ספירת מוקדי ההדבקה, כל דגימה תיזרע בדופליקאט, ריכוז ידוע של הפאג'ים שימש כביקורת חיובית, ודגימה ללא פאג'ים שימשה כביקורת שלילית (Adams, 1959).

4.1.2 הכנת תרבית *E. coli*

מגדלים את החיידק ע"י העברתו כל 7 ימים ע"ג מצע m-FC. לוקחים מושבה של החיידק לתוך 5 סמ"ק של NB (nutrient broth) ומדגירים ב 37°C למשך לילה. שופכים את ה NB עם החיידק לתוך 50 סמ"ק NB ומטלטלים למשך 3 שעות באמבט 37°C , עד שהדגימה מגיעה לצפיפות אופטית של 1 OD ב 520nm.

4.2 קביעת כושר ההדבקה של הטפיל החד תאי *Cryptosporidium parvum*

4.2.1 הכנת תרביות תאי HCT-8 (Human ileocecal adenocarcinoma)

ליצירת מוקדי הדבקה של הטפיל *C. parvum* נשתמש בתרביות תאים מסוג HCT-8 (Human ileocecal adenocarcinoma). התאים יגדלו במצע גידול RPMI 1640 עם L- Glutamine שמכיל 10% Bovine Calf Serum, 0.2% אנטיביוטיקה (Streptomycin-Penicillin-Nystatin). התאים יועברו מדי 3-4 ימים. לצורך ההעברה יוסר מצע הגידול והתאים ישטפו פעמיים עם 3 סמ"ק תמיסת 0.25% Trypsin-EDTA. לאחר מכן, יודגרו עם 2 מ"ל תמיסת 0.25% Trypsin-EDTA לצורך הורדת התאים. לאחר ההדגרה, התאים יחולקו לבקבוקים עם מצע גידול טרי ביחס 1/3.

4.2.2 הכנת זכויות המכסה לגידול תאים

ההדבקה תתקבל בתאי HCT-8 שיגודלו על גבי סליידים עגולים מזכוכית בקוטר של 13 מ"מ לאחר טיפול של שטיפה במים מזוקקים, באתנול 70% ושוב במים מזוקקים, על מנת להקטין אפשרות של טוקסיות לתאים, ולאחר מכן יעברו תהליך סטריליזציה באוטוקלאב. הסרת התאים וגידולם יתבצע באופן זהה לטיפול השגרתי בתאים והדבקתם בטפיל תתבצע לאחר כיסוי של לפחות 70%-80% מהשטח בתאים.

4.2.3 תהליך החיטוי של האואוציסטות והאקסיסטציה

4.2.3.1 חיטוי סטוק של אואוציסטות מצואה של עגלים מודבקים

משקעים את סטוק האואוציסטות במים מזוקקים כ- 10 דקות, לאחר מכן מסרכזים את הנוזל העליון בצנטריפוגה למשך 15 דקות במהירות 1100g .
מרחיפים את המשקע בתמיסת כלור 0.03% ע"י וורטקס חזק ומשרים 5 דקות, לאחר מכן מסרכזים את התמיסה למשך 15 דקות במהירות 1100g .
מרחיפים את המשקע ב-PBS המכיל 2% אנטיביוטיקה.
שימוש באואוציסטות הוגבל לחודשיים.

4.2.3.2 תהליך האקסיסטציה

מוסיפים לאואוציסטות אקונומיקה מסחרית כך שר יכוז האקונומיקה הסופי 0.3%, מבצעים וורטקס חזק למס' שניות ומדגירים במשך 6 דקות ב-4°C. לאחר מכן מסרכזים בצנטריפוגה למשך 4 דקות ב-5100 g. מרחיפים את המשקע במדיום גידול RPMI 1640 מחומם ל-37°C לפי נפח הזריעה. הצלחת האקסיסטציה תיבדק ע"י הסתכלות במיקרוסקופ אור.

4.2.4 הדבקת התאים

תרחיף הספרוזואיטים נזרע על גבי תאי HCT-8 שגודלו על גבי זכוכיות מכסה. מדגירים למשך 90 דקות בטמפרטורה של 37°C, 5% CO₂. בתום ההדגרה מוסיפים 2 סמ"ק של מדיום גידול ומדגירים 24-48 שעות בטמפרטורה של 37°C, 5% CO₂.

4.2.5 צביעת מוקדי ההדבקה

בתום 48 שעות של ההדגרה התאים המודבקים מיובשים בטמפרטורה 40°C על גבי פלטת חימום ולאחר מכן התאים יקובעו במתנול אבסולוטי או אצטון, לאחר מכן, התאים מגבים עם Anti sporozoite (Waterborne) (מהול פי 20 בבופר) מסומנים בחומר פלואורסצנטי, למשך 40 דקות ב-37°C בתא לח. עודף הנוגדן שלא הגיב מסולק ונשטף עם בופר 0.1 M PBS והתאים מיובשים בחושך, בתום הייבוש מוסיפים לכל סלייד תמיסת DABCO (Waterborne) המונע דעיכה פלואורוצנטית, לאחר מכן כל סלייד יכוסה עם זכוכית מכסה ומוקדי ההדבקה יספרו בעזרת מיקרוסקופ פלואורסצנטי.

השיטה הסטטיסטית שנשתמש כדי לנתח את תוצאות ההדבקה היא Most Probable – MPN Number וזאת על מנת לקבוע מהי המנה המינימלית של האואוציסטות הנדרשת על מנת לקבל מוקד הדבקה אחד (foci) (Slifko et al; 1997).

4.2.6 גילוי *Cryptosporidium parvum* בשיטה אימונופלואורסצנטית (IFA):

שיטה זו תבוצע עם נוגדנים מונוקלונליים מסומנים בצבע פלואורוצין (FITC). דגימה של 50µl תיובש על גבי זכוכית נושאת בטמפרטורה של 40°C על פלטת חימום. לאחר מכן, הדוגמא תקובע באמצעות מתנול אבסולוטי בטמפרטורת החדר. לדגימה המקובעת יוספו 50µl נוגדן מונוקלונלי מסומן ב-FITC והדגימות יוגדרו באינקובטור בטמפרטורה 37°C, למשך 30 ד' בתא לח. לאחר מכן, הדוגמא תוצאה מהאינקובטור והנוגדן יישטף פעמיים עם מים מזוקקים והדגימה תיובש

בטמפרטורת החדר בחושך. לדגימה יוסף חומר המונע דעיכה פלואורסצנטית (DABCO) ולאחר מכן, תכוסה בזכוכית נושאת שקובעה ל סלייד באמצעות לקה . האואוציסטות נספרו תחת מיקרוסקופ פלואורסצנטי (2 exioscope של zeiss) (EPA-821-R-99-006; 1999).

4.2.7 הפרדה וניקוי של *Cryptosporidium parvum*

דגימה של 1 סמ"ק אואוציסטות תעורב עם 9 סמ"ק תמיסת PBS (phosphate buffered saline) ו-100 µl של בידיים מגנטיים קשורים לנוגדן anti-cryptosporidium במבחנות, הקישור עם הבידיים המגנטיים (magnetic beads) יתבצע במשך שעה בטמפרטורת החדר , תוך עירבוב במכשיר סיבובי (mixer sample) של חברת Dynal, במהירות 25 rpm, לאחר מכן, הבידיים הקשורים לאואוציסטות ירוכזו על דופן המבחנה בעזרת מתקן מגנטי (MPC-1, Dynal) ע"י טלטול במשך דקה בזווית של 90° והנוזל יסולק. הבידיים ישטפו עם 1 סמ"ק תמיסת PBS וירוכזו על דופן מבחנת אפנדרוף בעזרת מגנט ע"י טלטול של 2 דקות בזווית של 180°C בקצב של סיבוב לשנייה. הנוזל יסולק והבידיים ישטפו עם 100 µl תמיסת 0.1M HCl לאחר ערבוב של 15 שניות, הבידיים יודגרו עם תמיסת ה- HCl במשך 10 דקות בטמפרטורת החדר בכדי לאפשר את הניתוק של האואוציסטות מהבידיים, ההפרדה של האואוציסטות מהבידיים תתבצע ע"י ריכוז הבידיים על דופן המבחנה בעזרת המגנט (MPC-M) ושאיבת הנוזל שמכיל את הטפילים, תמיסת ה-HCl המכילה את הטפילים תנוטרל עם 10 µl תמיסת 1M NaOH לאחר מכן נקבע את ריכוז הטפילים בדגימה בשיטת הצביעה האימונופלואורסצנטית (EPA-821-R-99-006; 1999).

4.3 תאור אתרי הדיגום

מט"ש נתניה - מכון טיהור שפכי נתניה מטפל בשפכי העיר וסביבתה החל בשנת 1995. ספיקת השפכים היומית הממוצעת עומדת על 36,500 מ"ק, ובסה"כ 13 מלמ"ק בשנה. הטיפול במכון מבוסס על שיטת הבוצה המשופעלת. מוצקים מרחפים מורחקים בתהליכי שיקוע והחומרים האורגניים מתפרקים בתהליכים ביולוגיים. בנוסף משלב בתוכו המט"ש גם תהליך הרחקת חנקן משולב הכולל ניטריפיקציה ודה-ניטריפיקציה.

השפד"ן – המט"ש הגדול ביותר בישראל, המטפל בכשליש מהשפכים בארץ. הוקם בשנת 1970. המכון מטפל בשפכים משמונה ערים בגוש דן (תל-אביב – יפו, פתח תקווה, רמת גן, גבעתיים, בני ברק, חולון, בת ים וראשון לציון) שבהן יחד מאוכלסים כ- 1.5 תושבים. המפעל מספק כ- 100 מלמ"ק מי קולחים בשנה. השפכים מטופלים בשלושה שלבים: טיפול מכני- ביולוגי אינטנסיבי (בוצה משופעלת), בריכות ליטוש וטיפול קרקע-אקווה.

4.3.1 מערכת חלוץ לטיפול שלישוני

מתקן חלוץ מחקרי בו מתבצע סינון וחיטוי של קולחים שניונים. לאחר הטיפול השלישוני הקולחים יכולים לשמש להשקיה בלתי מוגבלת בחקלאות. מערך הטיפול בקולחים כולל סינון עומק דרך מצע דו-שכבתי וכן חיטוי בשתי שיטות במקביל - בכלור נוזלי ובקרנת U.V.. מערך זה כולל את שלבי הטיפול הבאים:

טיפול קדם - מסנן רשת לסינון הקולחים במהירות של 120 מטר לשעה.

סינון גרנוול רי - הקולחים הראשוניים מסוננים דרך שני מסננים זהים בספיקה של 5 m³/h ובמהירות סינון של 15 m/h. מצע הסינון הוא דו-שכבתי: חול קוורץ ואנטרציט. במסנן מספר 2

הקולחים עוברים טיפול בקואגולנט פוליאלומיניום כלוריד (PAC), שבתקופת המחקר שימש בריכוזים שבין 1-2 מג"ל.

חיטוי - זרם הקולחים לאחר הסינון מתפצל לשניים והקולחים המסוננים עוברים חיטוי באמצעות מערכת U.V. בלחץ נמוך ובמקביל חיטוי בכלור נוזלי (סודיום-היפוכלורית) עם תא מגע לכלור לזמן שהייה של כ-30 דקות (ריכוז כלור נותר: 4 מג"ל). מי הקולחים מכילים ריכוזי אמוניה אשר הופכים את הכלור לכלוראמין אורגני שידוע כמחטא חלש בהשוואה לכלור החופשי. קולחים שעברו טיפול שלישוני (לאחר חיטוי) עוברים למיכל מי מוצר, המשמש גם כמיכל מי השטיפה של המערכת.

קיימות במערכת החלוץ לטיפול שלישוני שבע נקודות דיגום:

- (1) בכניסה למסננים – קולחים ראשוניים.
- (2) ביציאה ממסנן מס' 1 – קולחים שניונים לאחר סינון.
- (3) ביציאה ממסנן מס' 2 – קולחים שניונים לאחר סינון וטיפול בקואגולנט.
- (4) קולחים ממסנן מס' 1 לאחר טיפול ב-U.V..
- (5) קולחים ממסנן מס' 2 לאחר טיפול ב-U.V..
- (6) קולחים ממסנן מס' 1 לאחר חיטוי בכלוראמין.
- (7) קולחים ממסנן מס' 2 לאחר חיטוי בכלוראמין.

4.3.2 הקואגולנט

במסגרת הניסויים נעשה שימוש בפולימר PAC, בעל אופי הידרוליטי מתוצרת Summit Research Labs, ארה"ב. משקל מולקולרי – 666.42 גרם למול.

4.3.3 ריאקטור ה-U.V.

ריאקטור ה-U.V. בשפד"ן כולל מנורת כספית אחת בלחץ נמוך, בהספק של 33 וואט. נפח המים הממלא את הריאקטור: 2.7 ליטר. מנת ה-U.V. נקבעה באמצעות שיטת PSS ותוך התחשבות בגיל המנורה (נתוני יצרן), בעבירות של דגימות הקולחים ובזמן שהייה (שנקבע ע"י הספיקה).

4.3.4 החומר המרחף

בניסויי המעבדה של מחקר זה נקבע מינרל חרסיתי כחומר המרחף. המינרל החרסיתי שנבחר הוא קאולין (Kaolinite). זהו מינרל אלומינו-סיליקטי דו-שכבתי: המבנה הגבישי שלו מורכב משכבת טטראדוני צורך- חמצן ושכבת אוקטאדרוני אלומיניום (אלומיניום – חמצן ואלומיניום הידרוקסיד) (Van Olphen, 1963). הלוחות קשורים ביניהם בקשרי מימן. חלקיקי הקאולין טעונים שלילית על שטח פניהם. למטען השלילי במקרה זה כנראה שתי סיבות:

1. יוניזציה של קבוצות AlOH שבקצוות ובמשטח החיצוני של לוחות המינרל ושל קבוצות SiOH בקצוות הלוחות.
2. במידה קטנה יותר – חילוף איזומורפי של אטומי צורך על ידי אטומי אלומיניום ב שכבת הטטראדר, או של אלומיניום על ידי אטומי מגנזיום בשכבת האוקטאדר.

פוטנציאל זטא של חלקיקי הקאולין ששימשו לניסויים נמדד בעזרת המכשיר וההוראות אשר פותחו על ידי "Zeta-Meter" (Zeta Meter Manual, 1968), המבוסס על אלקטרופורזה ונתקבל פוטנציאל של 25mV.

הסיבות שהביאו לבחירת קאולין במחקר זה :

1. זהו מינרל חרסיתי המצוי במים עיליים ותורם להם עכירות.
2. במצב קולואידי הוא בעל החזר אור גדול (Rebhun *et al.*, 1967). לכך שני יתרונות מבחינה אקספרימנטלית :

- הבדיקות הן בתחום היצוב של מד העכירות.
- האפקטים של חומרי הלואי, שבמים או במערכת, זניחים.

4.3.5 הרכב המים

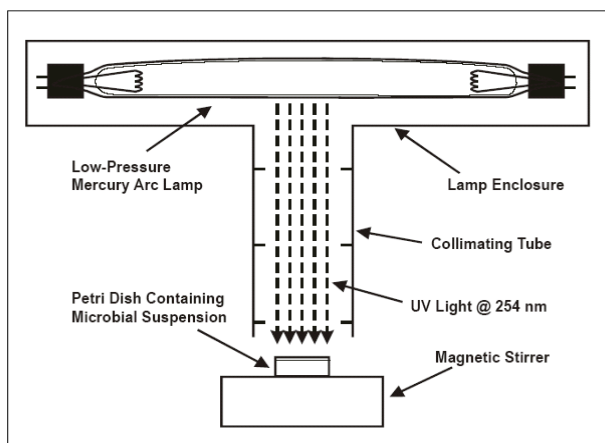
מקור המים בסדרת ניסויים אחת במעבדה היו מי ברז ובסדרת ניסויים אחרת - מים מזוקקים עם ריכוזים משתנים של NaCO_3 .

ריכוז הקטיונים הדו- ערכיים (Ca^{2+} , Mg^{2+}) במי הברז נקבע ע"י בדיקות קשיות כללית באמצעות ספקטרומטר (Inductively Coupled Plasma) ICP, ברגישות גבוהה (עד עשירית ppb).

4.3.6 מקור קרינת ה-U.V. במעבדה

העבודה במעבדה התבצעה באמצעות מכשיר ה-(CB) Collimated Beam. מטרת המכשיר היא לספק שדה קרינה הומוגני על פני שטח נתונים. המכשיר מורכב מארבע מנורות כספית בלחץ נמוך שמקרינות בצורה אנכית (בקירוב) לדגימה. עוצמת המנורות במכשיר לפני הקרנת הדגימות נקבעת באמצעות רדיומטר (מסוג IL1700, International Light, Newburyport, IL). הדגימה מונחת על פלטפורמה שניתנת להזזה בצורה אנכית, כך שניתן לשנות את מרחקה ממנורות הכספית. בניסויים שלפנינו גובה הפלטפורמה שנקבע הביא לעוצמת קרינה שקריאתה $12 \text{ mW} \cdot \text{s}/\text{cm}^2$. הדגימה מעורבלת ע"י בוחש מגנטי בעת ההקרנה. זמן החשיפה נמדד באמצעות טיימר. במכשיר ה-CB העוצמה האמיתית הממוצעת של קרינת ה-U.V. נקבעת באמצעות השיטה הביודוזימטרית (Qualls & Johnson, 1983b), ומתוקנת בהתאם למשוואה (5) שלעיל. המנה המועברת לדוגמת התרחיף מחושבת לפי משוואה (6).

Figure 4.2 Collimated Beam Test Apparatus



תמונה 2: תאור רכיבי מכשיר ה-collimated beam שנעשה בו שימוש בניסויי המעבדה

4.3.7 מהלך הניסויים במעבדה

החרסית עברה דיספרסיה במים על ידי מערבול מהיר מאוד מסוג Ultra Turax (10,000 סל"ד). בצורה זאת ניתן להשיג תרחיפים הומוגניים המאפשרים חזרה על תוצאות בניסויים. לכל ניסוי הוכן תרחיף חדש (בנפח של 4 ליטר), כדי למנוע תופעות הזדקנות אפשריות. התרחיף המוכן הועבר למיכל ועורבל כל זמן הניסוי באמצעות בוחש מגנטי (במהירות ערבול גבוהה ≈ 100 סל"ד). לפני ההקרנה נמדדו הפרמטרים הבאים: עכירות, pH, מוליכות, טמפרטורה, בליעה, PSD, ZP (בחלק מהתרחיפים). נפח תרחיף של 30 מ"ל הועבר מהמיכל לתוך צלחת פטרי (בקוטר של 9 ס"מ; גובה הנוזל בצלחת: 1 ס"מ). צלחת הפטרי הונחה על הפלטפורמה של מכשיר ה-CB הדוגמה הוקרנה ובמשך כל זמן החשיפה עורבבה באמצעות הבוחש המגנטי שנמצא מתחת לפלטפורמה (במהירות ערבול של 30 סל"ד). לאחר ההקרנה נמדדו כל אותם פרמטרים שמוזכרים לעיל. העכירות נמדדה מיד עם תום ההקרנה ולאחר מכן מידי 5 דקות לאחר ניעור אגרסיבי של הקיווטה לתוכה הועברה הדוגמה (כדי לוודא הרחפה של חלקיקים שהספיקו לשקוע). מאותו תרחיף שבמיכל הוכנו דוגמאות נוספות שהוקרנו בזמני חשיפה משתנים. עבור כל תרחיף הוכנה דוגמת בקרה שעברה את אותו תהליך בדיוק, אך לא הוקרנה.

4.3.8 מדידת PSD

בדיקת PSD בקולחים התבצעה ע"י מכשיר שדה של חברת Met One מדגם WGS-267. המכשיר מיועד לספירת חלקיקים ולמדידת גודל של חלקיקים ופילוגם לפי גודלם. נבדקו 6 תחומי גודל המקובעים במכשיר: 2-3, 3-5, 5-10, 10-15, 15-25, 25-100 מיקרומטר. עקרון פעולת המכשיר מתבסס על חסימת קרן לייזר. עפ"י עיקרון זה נוזל הדוגמא מוזרם בתעלה, בקצב קבוע, ובמהלך זרימתו הוא עובר דרך חלון של קרן לייזר. החלקיקים בנוזל חוסמים את הקרן מלהגיע לגלאי האור. הפחתה זו בעוצמת הקרן, מתורגמת בגלאי האור מסיגנל אופטי לסיגנל חשמלי. בהמשך מעובדים סיגנלים אלו לאינפורמציה על גודל החלקיק. טווח הקריאה של המכשיר הוא עד 10,000 חלקיקים למ"ל, ובמידה והקריאה עולה על ערך זה יש למהול את דוגמת המים. המיהול נעשה ע"י קולחים שניונים שסוננו וטופלו ב-PAC, על מנת למנוע שינויים בתכונות החלקיקים. כל

אנליזת דגימה לבדיקת פילוג גודל חלקיקים כללה שלוש חזרות מהן חושב ממוצע , כאשר בכל חזרה נבדקו 20 מ"ל מי דגימה.

4.3.9 מדידת עכירות

עכירות המים נובעת מהמצאות חלקיקים מרחפים תת- מיקרוניים במים והיא נמדדת ע"י כמות האור המוחזרת ביחידות עכירות נפלומטריות (NTU או יע"ן). המדידות בשפד"ן בוצעו מידית בעזרת מד עכירות נייד (דגם 2100P) של חברת HACH בעל שלוש סקלות מדידה (0-1, 0-10, 0-100). סף הרגישות של המכשיר עומד על 0.01 יע"ן. מדידת העכירות במעבדה התבצעה באמצעות מד עכירות תוצרת HACH מדגם 2100N.

4.3.10 מדידת ערך הגבה (pH)

ההגבה של הקולחים נמדדה באמצעות מד הגבה PHM 83 -PHM 83 pH meter -AUTOCAL, שכולל באמצעות תמיסות בופר סטנדרטיות.

4.3.11 צילום החומר החלקיקי בדגימות

לשם צילום התרחיפים, לפני ואחרי ההקרנה ב-CB, נעשה שימוש במצלמת Olympus מדגם DP70 המולבשת על מיקרוסקופ אלקטרוני מתוצרת Reichert Diastar.

4.3.12 מדידת טמפ' ומוליכות

הטמפ' והמוליכות נמדדו ע"י מד מוליכות מסוג MeterLab CDM210, בדיוק של $\pm 0.5^{\circ}\text{C}$ ו- $\pm 0.2\%$ בהתאמה.

4.4 קביעת יעילות קטילת מיקרואורגניזמים ע"י UV

דגימות הקולחים הוקרנו במעבדה באמצעות (CBD) Collimated Beam Device של חברת WEDECO. המכשיר מורכב מארבע מנורות כספית בלחץ נמוך (5bar) שמקרינות בצורה אנכית לדגימה. ניתן לקבוע את עוצמת המנורות במכשיר לפני הקרנת הדגימות ולמדוד אותה באמצעות רדיומטר (מסוג IL1700, International Light, Newburyport, Massachusetts). המכשיר מוגבל לעוצמה של 70W/m^2 . זמן החשיפה נמדד באמצעות טיימר. במכשיר ה-CBD העוצמה האמיתית הממוצעת של קרינת ה-UV נקבעת באמצעות השיטה הביודוזימטרית (Bioassay), בהתאם למתודולוגיה של Qualls & Johnson (1983). העוצמה היא פונקציה של מרחק צלחת הפטרי מהמנורה, עומק המים בכלי והעבירות של המים (בהתאם לחוק ביר). המנה מחושבת לפי משוואה (1) שלעיל.

4.4.1 מדידת פילוג גודל חלקיקים מרחפים

בדיקת פג"ח בקולחים נעשתה בעזרת מכשיר שדה של חברת MetOne מדגם WGS267. המכשיר מיועד לספירת חלקיקים ולמדידת גודל של חלקיקים ופילוגם לפי גודלם. למכשיר ניתן להצמיד מספר חיישנים. כל חיישן מכווון לטווח גדלים מסוים, אותו ניתן לחלק ל-6 ערוצים ($2\mu\text{m}$, $3\mu\text{m}$, $5\mu\text{m}$, $10\mu\text{m}$, $15\mu\text{m}$, $25\mu\text{m}$). המכשיר עובד על עקרון של קרני לייזר (Spectrex Prototron): העברת קרן לייזר דרך הדוגמה הנמצאת בתוך מיכל מיוחד. בעזרת מערכת אופטית מוגדר אזור רגיש בתוך המיכל, וכל החלקיקים הנמצאים באזור זה גורמים לדיפרקציה של האור. החלקיקים נספרים

בשיטת החסימה האופטית (Light blockage): חלקיקים המרחפים במים מוזרמים לצינור ועוברים דרך חלון עם שטח ידוע. אלומת אור המכוונת בזווית ישרה לתנועת הנוזל, עוברת דרך החלון ופוגעת בפרוטודיודה. החלקיק נספר וקוטרו מחושב לפי השטח החוסם את האור. תחום הבדיקה הוא $2-100 \mu\text{m}$; מספר החלקיקים המקסימלי הניתן לספירה הוא 10,000 למ"ל; ספיקה: 100 מ"ל/דקה. כל דגימה נספרת שלוש פעמים ומחושב ממוצע של התוצאות.

4.4.2 בליעת UV

בליעת UV נמדדה באמצעות ספקטרופוטומטר בתא באורך 4 cm באורך גל של 254 nm. התוצאה ניתנת ביחידות של בליעה/סנטימטר. מהבליעה ב-UV הוחסרה הבליעה באור הנראה – 545 nm. המדידה נעשתה תוך יממה מרגע הדגימה במעבדה של השפד"ן.

מדידה של ערך בליעת UV באמצעות ספקטרופוטומטר באורך גל של 253.7 nm נותנת ערך לא מדויק (Qualls *et al.*, 1983a; EPA, 1986; Schible, 1987; Abdennaceur *et al.*, 2000), מכיוון שהמוצקים המרחפים ב תמיסת המים מפזרים את קרני ה-UV. הקולטן אינו קולט את הקרניים המתפזרות ומחשיב אותם כאילו נבלעו ע"י המים. התוצאה המתקבלת איננה מדויקת. על כן מומלץ (Schible, 1987) להשתמש בספקטרופוטומטר שמתחשב באפקט הפיזור של הקרן ומבצע תיקון. אם אין בנמצא מכשיר כזה, ניתן לבצע מדידה של דוגמה מסוננת והתוצאה תהיה יותר נכונה.

4.5 קטילה של *A. hydrophila* ע"י UV, ניטור נזקי DNA, תיקון וגידול מחדש.

4.5.1 הכנת מצע ADA-V

מצע ADA-V (ampicillin-dextrin agar with vancomycin) מכילים ע"י הוספת 18.35 גרם של המצע *Aeromonas* m-500 מ"ל מים מזוקקים קרים, $\text{pH}=8.0\pm0.2$, מביאים לרתיחה תוך כדי ערבוב של התמיסה, ומעקרים את התמיסה באוטוקלאב 121°C ל 15 דקות. מקררים את התמיסה באמבט ל 50°C , מוסיפים במנדף הסטרילי את האנטיביוטיקות שהוכנו מראש באותו יום: Ampicillin (0.1%) ו- Vancomycin hydrochloride (0.02%). מחלקים את המצע לצלחות פטרי 50mm, 5 סמ"ק בכל צלחת.

4.5.2 הכנת תרבית *A. hydrophila*

מגדלים את החיידק ע"י העברתו כל 7 ימים ע"ג מצע ADA-V. לוקחים מושבה של החיידק לתוך 5 סמ"ק NB (nutrient broth) ומדגירים ב 37°C למשך לילה. שופכים את ה NB עם החיידק לתוך 50 סמ"ק NB ומטלטלים למשך 3 שעות באמבט 37°C , עד שהדגימה מגיעה לצפיפות אופטית של 1 OD ב 600nm.

4.5.3 קביעה כמותית של חיידקי *A. hydrophila* בשיטת הזריעה הישירה

קביעה כמותית של חיידקי *A. hydrophila* מבצעים ע"ג מצע אבחנתי וסלקטיבי ADA-V. זורעים בזריעת דשא 100µl של דגימה ע"ג המצע. מדגירים את הצלחות למשך 18-24 שעות בטמפ' של 37°C. בתום ההדגרה סופרים את המושבות הצהובות.

4.5.4 הערכת יעילות הקטילה של החיידק *A. hydrophila* ע"י קרינת UV

4.5.4.1 הקרנת הדוגמאות:

מקרינים ע"י המכשיר המעבדתי, Collimated beam, בזמנים של 0, 20, 50 ו 80 שניות דגימה של 1 או 10 סמ"ק חיידק ב 40 או 30 סמ"ק של שני סוגי מים שונים, בהתאמה: מים מזוקקים וקולחים שניוני. ההקרנה מתבצעת תוך כדי ערבוב הדגימה ע"י מערבול מגנטי. לאחר ההקרנה זורעים בזריעת דשא מיהולים עשורניים של הדגימות ע"ג מצע אבחנתי וסלקטיבי ADA-V. מדגירים את הצלחות ל 18-24 שעות ב 37°C וסופרים את המושבות הצהובות ע"ג המצע. חישוב הקטילה נעשה על פי הנוסחה LogCt/C0 , כאשר LogCt הוא כמות החיידק לסמ"ק בזמן הקרנה מסוים ו C0 הוא ריכוז החיידק לסמ"ק בזמן הקרנה 0.

4.5.4.2 הערכת התאוששות *A. hydrophila* עקב פוטוריאקטיבציה לאחר חשיפה ל UV

לאחר הקרנת הדגימות בזמנים שונים מניחים את הדגימה כאשר היא מעורבלת ע"י מערבול מגנטי למשך 120 דקות תחת אור פלורוסנטי באורכי גל בטווח של 400-700nm ובעוצמת אור בטווח של 22300-26800LUX. לאחר 120 דקות זורעים בזריעת דשא מיהולים עשורניים מהדגימה ע"ג מצע אבחנתי וסלקטיבי ADA-V. מדגירים את הצלחות ל 18-24 שעות ב 37°C וסופרים את המושבות הצהובות.

4.5.4.3 הערכת הגידול הספונטני של *A. hydrophila* ו *E. coli* בריכוזים נמוכים

מכילים *A. hydrophila* ו *E. coli* ומוהלים אותם לריכוזים נמוכים: 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} ו 10^{-10} , בודקים ע"י זריעה ישירה ע"ג ADA-V ו m-FC בהתאמה, את גידול החיידק שמוחזק בתנאי חושך, בטמפ' החדר, בזמנים 0, 24 ו 48 שעות מהכנת המיהולים, מדגירים את הצלחות ל 18-24 שעות ב 37°C וסופרים את מספר המושבות הצהובות ע"ג מצע ה ADA-V והכחולות ע"ג מצע ה m-FC, מחשבים את מספר המושבות לסמ"ק שזרענו.

4.5.5 הערכת נזקי קרינת ה UV ל DNA של *A. hydrophila* ויכולת תיקון ה DNA בעקבות פוטוריאקטיבציה

כדי להעריך את נזקי ההקרנה ברמת ה DNA מקרינים 10 סמ"ק חיידק ב 30 סמ"ק מים מזוקקים ל 0 שניות (ביקורת) ול 80 שניות. כדי להעריך את התיקון ברמת ה DNA מקרינים כמות זהה של חיידקים למשך פרקי זמן זהים ומניחים למשך 120 דקות תחת אור פלורוסנטי. את נזקי ה DNA ותיקונו לאחר חשיפתו לאור פלורוסנטי ברמה המולקולרית בודקים ע"י מיצוי ה DNA מהחיידק והגבתו עם אנזים רסטרקציה T4 Endonuclease V הספציפי לאתרים ב DNA בהם נוצרים דימרים של פירימידינים ע"י קרינת ה UV.

4.5.5.1 מיצוי DNA של *A. hydrophila*

מבצעים מיצוי של ה DNA וניקוי ע"י שימוש בערכה המסחרית EZ-DNA-genomic DNA isolation reagent (תעשיות ביולוגיות, בית העמק). משקעים את החיידקים שבדגימות ע"י סרכוז הדגימות (40 סמ"ק) בצנטריפוגה במהירות של 6000rpm למשך 20 דקות. נפטרים מהנוזל ומרחיפים את המשקע ב 1 סמ"ק בופר פוספט ומסרכוזים שוב למשך 5 דקות, במהירות של 10,000g. מסלקים נוזל עליון ומוסיפים 1 סמ"ק EZ-DNA ומבצעים פיפטציה להרחפת המשקע. מיצוי ה- DNA מהתאים בוצע ע"י הקפאת והפשרה של הדגימות עם חנקן נוזלי. מטלטלים את הדגימות למשך שעה באמבט מים בטמפ' של 60°C. לאחר הטילטול, מסרכוזים את הדגימות במהירות של 10,000g למשך 10 דקות. ה DNA שנמצא בנוזל העליון נאסף למבחנה חדשה, מוסיפים 1 סמ"ק אתאנול אבסולוטי ומערבבים בעדינות ע"י הפיכת המבחנה מעלה-מטה, כדי לא לפגוע ב DNA. מדגירים ל 3 דקות בטמפ' החדר, בשלב זה ה DNA אמור להיראות, במידה ואינו נראה, מסרכוזים במהירות של 5,000g למשך 5 דקות, אם עדיין לא נראה משקע חוזרים על הסירכוז אך במהירות של 10,000g. מבצעים שטיפות לדגימות: מוסיפים 1 סמ"ק של אתאנול 95%, מערבבים ע"י היפוך המבחנות ומסרכוזים במהירות של 1,000g למשך דקה. מסלקים את הנוזל וחוזרים על השטיפה. לאחר הסירכוז השני מייבשים את ה DNA במנדף סטרילי למשך 5 דקות. לאחר הייבוש ממיסים את ה DNA בתמיסת 8mM NaOH שהוספו לה 9.5µl תמיסת Hepes בריכוז 1M. מדגירים את התמיסה ל 5 דקות בטמפ' החדר. מודדים את ריכוז ה DNA ורמת הניקיון שלו בספקטרופוטומטר (Pharmacia Biotech).

4.5.5.2 הכנת הדגימות והטענתן

מכינים את הדגימות, DNA 2µg, בנפח סופי של 20µl. מדגירים חלק מהדגימות עם אנזים הרסטרקציה T4 Endonucleas V (Epicentre Biotechnologies) למשך 30 דקות ב 37°C. לאחר מכן מבצעים דנטורציה לדגימות (עם האנזים וללא האנזים) ע"י הדגרה בטמפ' של

95-100°C למשך 5 דקות. מוסיפים לדגימות x6 loading dye (Fermentas). מטעינים בגיל את המרקר Lambda mix ואת הדגימות ומריצים במכשיר אלקטרופורזה למשך 8 דקות ב 30V, למשך 18 שעות נוספות ב 10V. מצלמים את הג'ל לאחר ההרצה במצלמה דיגיטלית (Pharmacia biotech) Image Master VDS.

4.6 קביעת יעילות הקטילה של Rotavirus בשלושה סוגי מים שונים בעזרת מכשיר

Collimated Beam

4.6.1 גידול ואחזקה של תרבית התאים MA-104

התאים גודלו בבקבוקי גידול לתרביות תאים בעלי שטח פנים של 75 סמ"ר. התאים הועברו מדי 7 ימים. לצורך ההעברה הוסר מצע הגידול והתאים נשטפו פעמיים עם 4 סמ"ק תמיסת EDTA-Trypsin 0.25%. לאחר מכן, הודגרו עם 3 סמ"ק תמיסת EDTA 0.25% Trypsin (לצורך הורדת התאים) ב-37°C. לאחר ההדגרה מוסיפים 10 ml RPMI 1640 והרחפת התאים על ידי פיפטציה. התאים נאספו למבחנת צנטריפוגה של 50 ml, וסורכזו למשך 10 דקות במהירות 1000xg בטמפרטורת החדר (הסרכוז נעשה בצנטריפוגה swing out). לאחר הסרכוז, הנוזל העליון מסולק. והתאים מורחפים ב-10 ml מדיום. התאים מועברים לבקבוקים חדשים לפי ריכוז התאים הרצוי.

4.6.2 גידול הנגיף SA-11 Rota

הכנת סטוק SA-11 (נגיף Rota). חימום מדיום RPMI 1640 0% (רק עם 2 ml אנטיביוטיקה ללא סרום) באמבט 37°C. שטיפת התאים ב-10 ml מדיום 0% לפחות פעמיים. הוספת 3 ml נגיף, מאפשרים ספיחה באינקובטור 37°C לשעה. מוסיפים ל-10 ml מדיום 0% טרפסין בריכוז סופי של 1 µg/ml. ומוסיפים לבקבוק התאים. לאחר 24 שעות בודקים האם התפתח אפקט ציטופטי CPE (תמותת תאים).

שחרור הנגיפים מהתאים, הקפאת בקבוק התאים במקפיא -20°C והפשרה בטמפרטורת החדר x3. העברת התרחיף למבחנת צנטריפוגה, סינוקציה ל-30 שניות וסרכוז למשך 20 דקות במהירות 6000 rpm בצנטריפוגה מקוררת. מכאן נקבל תרבית צלולה של נגיפים (שמירת הנגיפים ב-20°C).

4.6.3 אימות כושר ההדבקה

האימות נעשה בשלושה בקבוקים (75cm²) של תרבית רקמה. ביקורת שלילית, של מדיום 0% עם טרפסין בריכוז סופי 1 µg/ml (וזאת בכדי להוכיח שהטרפסין בו השתמשנו אינו רעיל לתאים). ביקורת חיובית, SA-11. ובדיקת התרבית החדשה שהוכנה. בכל אחד מהבקבוקים שמים 3ml מהתמיסה הנבדקת. ומנטרים אחר התפתחות CPE.

4.6.4 הכנת תאי MA-104 בפלטות של 24 בארות לקביעה כמותית של נגיף ה- Rota (SA-11)

לפני כל ניסוי מבצעים העברת MA-104 לפלטת 24 בארות (העברת התאים ביחס של 1:2). כאשר יום לפני הניסוי יש לבצע החלפת מדיום RPMI 1640 (המכיל, 2ml אנטיביוטיקה Pen./ Strep 50ml סרום Bovine) במדיום RPMI 1640 0% (רק עם 2 ml אנטיביוטיקה ללא סרום).

4.6.5 קביעה כמותית של נגיפי ה- Rota בשיטת ה- MPN (Most Probable Number)

קביעה כמותית של נגיפי ה- Rota נעשתה על תאי MA-104 בפלטות של 24 בארות. מכינים מהולים של הנגיף (0.9 ml מדיום 0% ו 0.1 ml SA-11) מ (-9)-(-5). זריעה של 0.1ml מכל מיהול ל 4 בארות + ביקורת שלילית. העברה לתהליך ספיחה באינקובציה ב 37°C לשעה. לאחר שעה מוסיפים 2 ml מדיום 0% + טרפסין בריכוז סופי של 1%. החזרת הפלטה לאינקובטור ל 5 ימים עד קריאת התוצאות.

4.6.6 קטילת Rotavirus על ידי קרינת U.V. באמצעות מכשיר Collimated Beam

הוחלט על שישה זמנים שונים של הקרנת U.V. באמצעות המכשיר Collimated Beam. 0, 5, 10, 30, 50 ו 100 שניות. גובה המכשיר $12\text{w/m}^2 = 310\text{mm}$. יעילות הקטילה נבדקה בשלושה סוגי מים שונים, מים מזוקקים, קולחים שניונים וקולחים לאחר סינון. בכל סוג מים נבדקה יעילות הקטילה בזמנים השונים שנבחרו. שמים 40ml מסוג המים הנבדק בצלחת 90mm, מוסיפים 1ml מסטוק SA-11 ומקרינים את הצלחת בקרינת U.V. על ידי המכשיר Collimated Beam לזמן הנבדק. מתוך התמיסה המוקרנת מוציאים נפח של 1ml. לדגימה המוקרנת מבצעים מהולים וזורעים 0.1 ml על כל בארית שמכילה MA-104 בפלטה של 24 בארות (שהוכנו יום לפני עם מדיום 0%) לכל מיהול 4 בארות. לאחר הדגרה של שעה בטמפרטורת 37°C מוסיפים 2ml מדיום 0% עם טרפסין בריכוז סופי של 1%. ומעבירים לאינקובטור 37°C ל 5 ימים. כל סוג מים נבדק שלוש פעמים.

4.6.7 קביעה כמותית של נגיף ה- Rota - קריאת התוצאות

קריאת התוצאות התבצעה לאחר חמישה ימים באמצעות מיקרוסקופ אור לניטור התפתחות CPE. ריכוז הנגיפים בדגימות חושב לפי שיטת ה- MPN (Most Probable Number), על פי טבלת נתונים הנמצאת ב- Standard Methods. התוצאות נקבעות על פי מספר בארות מודבקות למיהול מסך הכ ל ארבע בארות. את מספר הבארות המודבקות ממירים בטבלה למספר MPN Index כופלים במיהול הכי נמוך שנלקח ומקבלים תוצאה של MPN לזמן הנבדק.

4.7 קביעת מוטגניות באמצעות ה- Ames Test

TA 1535 4.7.1

מאפייני החיידק וסמנים גנטיים : הגן המושפע- hisG, תיקון U.V.rB DNA נוכחות מוטציית U.V.rB הופכת את הזן ליותר רגיש למבחן המשרה נזק זה. מוטציית U.V.rB היא חלק ממוטצית מחיקה שגולשת לסתנתות ביוטין ולכן, החיידק דורש ביוטין- bio-. הדרישה לביוטין היא כתוצאה ממחיקת אזור תיקון DNA. האינדיקציה למוטציית U.V.rB היא הרגישות לאור

U.V. LPS-rfa , מוטציה המשנה את מאפייני דופן החיידק וכתוצאה מכך איבוד חלקי של המחסום Lipopolysaccharide (LPS) ועליה בחדירות של התא לכימיקאליים שונים . אינדיקציה למוטציית ה-rfa היא רגישות לקריסטל ויולט . זן החיידק הזה חסר פלסמידים . הפלסמידים נושאים גנים לעמידות כנגד אנטיביוטיקות מסוימות . אירוע המוטציה היא על ידי החלפת זוגות בסיסים ב-DNA החיידק. A-T מוחלף ב-G-C או ההפך.

4.7.1.1 גידול החיידק, אימות זהות החיידק והכנת תרבית עבודה

זורעים מושבה בטרפטון נוזלי, ומדגירים בטמפרטורה של 37°C ל 24 שעות. לאחר מכן, מבצעים זריעת בידוד על מצעים סלקטיביים של BG, SALCOL Chromagar - בידוד וזיהוי Salmonella spp. בעזרת ריאקציה כרומוגנית ספציפית, XLT4 - בידוד מאוד סלקטיבי של non typhoid Salmonella spp. וצלחות טריפטון אגר.

4.7.1.2 הכנת תרבית לשמירת החיידק בהקפאה

זורעים 10 סמ"ק חיידקים ל 100 סמ"ק טריפטון נוזלי . לאחר לילה יש להעביר את התרבית למבחנות צנטריפוגה ולבצע סירכוז במהירות 6000 rpm ל- 20 דקות. מסלקים את הנוזל עליון , מוסיפים NB ומרחיפים את המשקע , מוסיפים לתרבית DMSO/ml 0.09 ml (Dimethyl Sulfoxide, Me_2SO). מערבבים היטב ומעבירים למבחנות סטריליות מיוחדות להקפאה של 1.5ml. למלא כל מבחנה כמעט עד הסוף . לתייג את המבחנות להקפאה להכניס לקרח יבש ומעבירים למקפיא -80°C .

4.7.1.3 אימות דרישת היסטידין

אימות דרישת היסטידין התבצעה על ידי שפיכת דגימת תרבית חיידקים שגודלה ב-NB על צלחות אגר מינימאלי המכילים ביוטין (0.03ml) ללא היסטידין. אי גדילת מושבות על גבי המצע תעיד על הצורך של החיידק להיסטידין.

4.7.1.4 אימות מוטציית rfa

מעבירים 0.1ml דגימת תרבית חיידקים שגודלו ב-NB ל- 2ml אגר חצי מוצק מומס ומפזרים את התערובת על צלחות טריפטון אגר. מכינים דסקיות של נייר סינון ספוגות ב- crystal violet 10µl בריכוזים שונים. ה-crystal violet צריך לעבור דיפוזיה לתוך האגר . כאשר זנים רגישים יראו אזור נקי ללא גידול חיידקים מסביב לדסקיות, מראה על עיכוב בגידול. לבקבוק של 400 ml, מוסיפים 3g אגר ו 183ml מים מזוקקים. מערבבים ומעבירים לאוטוקלאב 121°C ל- 20 דקות. מקררים ולאחר מכן שומרים באמבט חם של 45°C . מוסיפים תוך כדי ערבוב 4 ml של L- 2 ml, Glucose Solution 40% 10 ml, Vogel Bonner Medium E 50x Histidine* HCl* H₂O (0.27g/ 50ml) ו- 2 ml D- biotin (6.1mg/ 50ml). (נהוג להכניס גם Ampicillin 3.15 ml, אבל היות ולזן זה אין R- factor פלסמיד אין לו עמידות לאנטיביוטיקה). מחלקים את התמיסה למנות של 15 סמ"ק לצלחות פטרי של 90 mm.

4.7.2 מצעים המשמשים לבדיקת פוטנציאל המוטגניות

Minimal agar plates .1

המצע מכיל: Bacto Agar 15 g.

אופן הכנה: החומר הוסף ל- 930 סמ"ק של מים מזוקקים ועבר עיקור באוטוקלאב למשך 20 דקות בטמפרטורה של 121°C .

לאחר קירור ל- 55°C הוספו התרכובות הבאות: 20 סמ"ק Vogel- Bonner Medium E ו- 50 סמ"ק 40 % Glucose Solution.

מחממים את שתי התמיסות לפני ההוספה באמבט 45°C . ולאחר ההוספה מעבירים 15 סמ"ק מהאגר לצלחות $90\text{mm} \times 15\text{mm}$ ומקררים את הצלחות עד לקרישתן. כאשר משתמשים במבחן עם זן בעל פלסמיד pRK2013 מוסיפים את האנטיביוטיקה Kanamycin לריכוז סופי של 25 ug/ml .

Master agar plates .2

המצע מכיל: Bacto Agar 3 g.

אופן הכנה: החומר הוסף ל- 183 סמ"ק של מים מזוקקים ועבר עיקור באוטוקלאב למשך 20 דקות בטמפרטורה של 121°C .

לאחר קירור ל- 45°C הוספו התרכובות הבאות: 4 סמ"ק Vogel- Bonner Medium E, 10 סמ"ק 40 % Glucose Solution, 2 סמ"ק L- Histidine x HCl x H_2O ו- 2 סמ"ק D- biotin. מחממים את התמיסות לפני ההוספה באמבט 45°C . ולאחר ההוספה מעבירים 15 סמ"ק מהאגר לצלחות $90\text{ mm} \times 15\text{ mm}$ ומקררים את הצלחות עד לקרישתן. כאשר משתמשים במבחן עם זן בעל פלסמיד pRK2013 מוסיפים את האנטיביוטיקה Kanamycin לריכוז סופי של 25 ug/ml .

:Top Agar .3

1. Histidine- Biotin Solution: מוסיפים תמיסה זו לחלק העליון של האגר ביחס 10: 100 ml (על מנת שיתאפשר גידול החיידק). הזן הנבדק תלוי גם בביוטין (לא גורם למוטציה). יש להוסיף D- biotin 12.4 mg ל- 100 ml מים. לחמם עד רתיחה ולהוסיף $10.5\text{ mg L-}^*\text{H}_2\text{O}$ Histidine*HCl. להעביר לאוטוקלאב 121°C למשך 20 דקות.

2. Top Agar: 6 g אגר, 5 g NaCl ו- 1L מים מזוקקים. להוסיף סטירר ולהעביר לאוטוקלאב 121°C למשך 20 דקות. כשהאגר עוד חם לחלק לבקבוקים של 100 ml. לקרר ולאחסן במקרר ב- 4°C . לפני השימוש יש לחמם את האגר במיקרוגל ולהוסיף 10 ml מהתמיסה של $0.5\text{ m}^{\square}$ היסטדין וביוטין. יש לשמור ב- 45°C .

: Sodium Azide תמיסת

1. לשקול 0.025g אבקה ולהוסיף 5ml מים מזוקקים = ריכוז 5mg/ml לשמור ב- 4°C .
2. להעביר לבקבוק עם 100ml מים מזוקקים 0.1ml מהתמיסה שהוכנה (בריכוז 5mg/ml) = ריכוז 5 $\mu\text{g/ml}$ לשמור ב- 4°C .

3. להעביר לבקבוק עם 100ml מים מזוקקים 0.1ml מהתמיסה שהוכנה (בריכוז 5µg/ml) = ריכוז 5ng/ml לשמור ב- 4°C.

5ng/ml זהו הריכוז הנדרש לשימוש החומר במבחן

4. SOC (מצע לאישוש החיידקים לאחר טרנספורמציה)

המצע מכיל: 20 g Bacto tryptone, 5 g Bacto yeast extract, 0.58 g NaCl, 0.1864 g KCl, 3.6 g glucose, 2.033 g MgCl₂, 2.4648 g MgSO₄.

אופן הכנה: החומרים הוספו לליטר אחד של מים מזוקקים ועברו עיקור באוטוקלאב למשך 20 דקות בטמפרטורה של 121°C. מקררים ומאחסנים במקרר ב- 4°C.

4.7.3 מבחן המוטגניות Ames Test

4.7.3.1 שיטת ה- Ames Test לבדיקת פוטנציאל המוטגניות

מכילים תרבית חיידקים בטרופטון נוזלי מהזנים הספציפיים של *S. typhimurium*, התרבית צריכה להיות טרייה בערך עד ארבעה ימים. מחממים אגר עליון במיקרוגל ומכניסים לאמבט של 45°C מוסיפים לאגר את הכמות המתאימה של תמיסת היסטדין- ביוטין ביחס של 100 : 10 סמ"ק. מחלקים את האגר העליון למבחנות עם 2 סמ"ק מצע אגר עליון בהתאם למספר הצלחות הנחוצות למבחן, שומרים את המבחנות בטמפרטורה של 45°C לאורך כל המבחן. את הצלחות של מצע מינימאלי ניתן לשמור במקרר 4°C עד לחודש. לפני תחילת השימוש מוצאים את הצלחות מהמקרר למנדף מספר דקות לפני תחילת המבחן כדי שיפשירו. מוסיפים לאגר עליון 0.1 סמ"ק מתרבית החיידקים הספציפית, 0.1 סמ"ק מהדגימה הנבדקת ו- 0.6 סמ"ק PBS. לאחר הוספת החומרים למבחנה מערבבים ומפזרים את תוכן המבחנה על צלחת של מצע מינימאלי. מחכים כ- 15 דקות עד לקרישת האגר העליון, לאחר מכן מדגירים את הדגימות בטמפרטורה של 37°C למשך 48 שעות. קביעה כמותית של זני *S. typhimurium* נעשתה על ידי ספירת המושבות הלבנות שגדלו על גבי המצע.

4.7.3.2 הכנת החיידקים *S. typhimurium* למבחן המוטגניות Ames Test

מאפייני החיידקים וסמנים גנטיים: הגן המושפע- hisG לזנים TA1535 ו- TA100 או hisC לזן TA1537, תיקון DNA UVrB נוכחות מוטציות UVrB הופכת את הזן ליותר רגיש למבחן המשרה נזק זה. מוטציית UVrB היא חלק ממוטציות מחיקה שגולשת לסיומת ביוטין ולכן, החיידק דורש ביוטין- bio⁻. הדרישה לביוטין היא כתוצאה ממחיקת אזור תיקון DNA. האינדיקציה למוטציית UVrB היא הרגישות לאור UV. rfa, מוטציה המשנה את מאפייני מושבת החיידק וכתוצאה מכך איבוד חלקי של המחסום Lipopolysaccharide (LPS) ועליה בחדירות של התא לכימיקלים שונים. אינדיקציה למוטציית ה- rfa היא רגישות לקר יסטל סגול. ניתן להחדיר פלסמידים הנושאים גנים לעמידות כנגד חומרים אנטיביוטיים מסוימים, וזאת על מנת ליצור זן רגיש יותר למבחן, כמו החיידק TA1535 שאליו הוחדר פלסמיד ליצירת זן הנקרא

TA100. בחיידקים TA1535 ו- TA100 אירוע המוטציה היא על ידי החלפת זוגות בסיסים בכרומוזום החיידק. A –T מוחלף ב- G –C או ההפך. לעומת זאת, החיידק TA1537 המשמש לגילוי חומרים מוטגניים מסוגים של הזות תבנית. ניתן לחקות מערכת מטבוליזם של יונקים על ידי הוספת פעילות מערכת מיקרוסומאלית מכבד עכברוש (או אדם) S9 mix לדגימות Standard (Methods, 1995).

4.7.3.3 הכנת החיידק TA1535 והחיידק TA1537:

החיידק TA1535 התקבל ממעבדתו של פרופ' ניצן. החיידק TA1537 התקבל מ- ATCC מעבירים באמצעות מחט בקטריולוגית אבקת חיידקים וזורעים ב 2 סמ"ק תמיסת טריפטון נוזלי, מדגירים בטמפרטורה של 37°C ל 24 שעות.

4.7.3.4 הכנת החיידק TA100*:

TA100 מוכן באמצעות טרנספורמציה של הפלסמיד pKM101 לחיידק TA1535 (Mccann J & Ames BN., 1976). במחקר זה, החיידק הוכן על פי הפרוטוקול של ATCC באמצעות החדרת פלסמיד pRK2013 הנמצא בחיידק *E. coli* HB101 לחיידק TA1535 *S. typhimurium*, לכן החיידק נקרא אצלנו TA100*. הפלסמיד מקנה לחיידק עמידות לקאנאמיצין (25 ug/ ml).

4.7.3.5 ביקורת חיובית באמצעות Sodium Azide וקביעת קריאות הרקע

מתבצע על מצע גידול עני, כאשר האגר העליון מורכב מההרכב המוצג בטבלה 2:

ריכוז סופי Sodium Azide [ng]	חיידקים	אגר עליון	PBS	Sodium Azide	נפח סופי
0	0.1ml	2ml	0.7ml	-	2.8ml
1	0.1ml	2ml	-	0.7ml מתוך תמיסה של 5ng/ml	2.8ml
5	0.1ml	2ml	0.7ml	3µl מתוך תמיסה של 5µg/ml	2.803ml
25	0.1ml	2ml	0.7ml	15µl מתוך תמיסה של 5µg/ml	2.815ml
125	0.1ml	2ml	0.7ml	75µl מתוך תמיסה של 5µg/ml	2.875ml
2000	0.1ml	2ml	0.7ml	1µl מתוך תמיסה של 5mg/ml	2.801ml

4.7.4 יישום שיטת ה- Ames Test :

4.7.4.1 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלוואי של קולחים שטופלו במחטא כלור :

משתמשים בכלי זכוכית אשר עברו טיפול עם חומצה סולפכרומית (אשלגן דיכרומט עם חומצה גפרתית) ובמים מזוקקים . מבצעים פעולה זו לשם חמצון שיירי חומרים בעלי צריכת כלור פוטנציאלית בכלי העבודה.

מהלך הניסוי, מכינים מהולים של כלור בריכוז המתאים עם שפכים גולמיים שעברו סינון באמצעות ממברנת ניטרצולוז (gelman science) בקוטר נקבים של $0.45 \mu\text{m}$. ממתינים כחצי שעה לאחר הכנת המהולים ומוסיפים את הריכוז המתאים של Sodium thiosulfate 50 g/L לסתירת הכלור הפעיל . כל דגימה נבדקת באמצעות Ames Test , באמצעות שלושת הזנים של *S. typhimurium*.

4.7.4.2 בדיקת הרעילות האקוטית של הדגימות המוכרות :

הבדיקה בוצעה באמצעות החיידק *E. coli* (הכנת החיידק כפי שפורט) בריכוז של 10^1 עד 10^4 , על מצע של mFC בשילוב אגר עליון של Ames Test . כאשר היחס של כמות החומרים הוא 2/3 בשל גודל צלחת mFC. מוסיפים לכל מבחנה עם 1.3 סמ"ק אגר חצי מוצק : 0.1 סמ"ק חיידקים , 0.1 סמ"ק דגימה ו- 0.3 סמ"ק PBS. ושופכים את האגר העליון על הצלחות . מדגירים את הצלחות למשך 24 שעות בטמפרטורה של 37°C . קביעה כמותית של חיידקי קולי נעשתה על ידי ספירת המושבות הכחולות שגדלו על גבי המצע.

4.7.4.3 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי הלוואי של קולחים שהוקרנו על ידי UV :

נבדקו שני משתנים , מנת הקרינה של UV ושפכים בריכוזי COD שונים לאחר סינון באמצעות ממברנת ניטרצולוז (gelman science) בקוטר נקבים של $0.45 \mu\text{m}$.

4.7.4.4 קביעת ריכוז COD (Chemical Oxygen Demand) :

מכינים מהולים מהתסנין של השפכים הגולמיים . מוסיפים 3 סמ"ק מהדגימות למבחנות COD Cell Test 10- 150 mg/ L. מכינים ביקורת של 3 סמ"ק מים מזוקקים וביקורת של 3 סמ"ק מתמיסה בריכוז COD ידוע. מעבירים את הדגימות לתנור למשך שעתיים בטמפרטורה של 150°C . מחכים כחצי שעה שהמבחנות יתקררו , וקוראים את התוצאות במכשיר Spectroquant NOVA₆₀.

4.7.4.5 מהלך הניסוי במכשיר המעבדתי Collimated beam :

מעבירים 40 סמ"ק מי שפכים מסוננים , בריכוז COD שונים לצלחות פטרי של 90 mm את הדגימות מקרינים על ידי המכשיר המעבדתי Collimated Beam בזמנים שונים של : 0, 4, 42, 420 שניות. לאחר ההקרנה כל דגימה נבדקת באמצעות Ames Test , באמצעות שלושת הזנים של *S. typhimurium*.

4.7.5 ניטור פוטנציאל המוטגניות של תוצרי לוואי של קולחים על ידי חיטוי בהקרנת UV וטיפול

באמצעות כלור לאחריו.

משתמשים בכלי זכוכית אשר עברו טיפול עם חומצה סולפכרומית (אשלגן דיכרומט עם חומצה גפרתית) ובמים מזוקקים. מבצעים פעולה זו לשם חמצון שיירי חומרים בעלי צריכת כלור פוטנציאלית בכלי העבודה.

4.7.5.1 יישום השיטה במכשיר המעבדתי Collimated beam:

מעבירים 40 סמ"ק של שפכים גולמיים שעברו סינון באמצעות ממברנת ניטרצולולז (gelman science) בקוטר נקבים של $0.45 \mu\text{m}$, בריכוז COD קבוע, לצלחות פטרי של 90 mm. את הדגימות מקרינים על ידי המכשיר המעבדתי בזמנים שונים של : 0, 4, 42, 420 שניות.

4.7.5.2 הוספת כלור בריכוזים שונים

מכל דגימה מוקרנת לוקחים 1 סמ"ק ומוסיפים ריכוזים שונים של כלור מתמיסה מרוכזת NaOCl של 74000 mg/L . לאחר ההכלרה מחכים חצי שעה ומוסיפים Sodium Thiosulfate לסתירת הכלור הפעיל. כל דגימה נבדקת באמצעות Ames Test, באמצעות שלושת הזנים של *S. typhimurium*.

4.7.6 ניטור תוצרי לוואי בהתאם למבחן המוטגניות Ames Test:

חמישה סוגים של דגימות נבדקו, כאשר כל הדגימות על בסיס שפכים גולמיים שעברו סינון באמצעות ממברנת ניטרצולולז (gelman science) בקוטר נקבים של $0.45 \mu\text{m}$: גולמי לאחר חיטוי Cl בריכוז 500 mg/L לאחר המתנה של 30 דקות. גולמי לאחר חיטוי UV במשך זמן של 7 דקות. גולמי לאחר חיטוי Cl בריכוז 500 mg/L לאחר המתנה של 24 שעות. גולמי לאחר חיטוי UV במשך זמן של 7 דקות ולאחר מכן חיטוי של Cl בריכוז 500 mg/L . וגולמי ללא טיפול. על מנת למנוע ככל האפשר את הברחה של החומרים הנדיפים הכנת הדגימות בוצעה בתוך הקולונות עצמן.

4.8 קביעה כמותית של חיידקי Clostridium prefringens בשיטת הסינון הממברנלי:

(Anonymous; 2003)

חיידק *C. prefringens* הינו חיידק אנארובי אובליגטורי.

קביעה כמותית של חיידקי *Clostridium prefringens* בוצעה על מצע SPS שיוכן מראש עד 24 שעות, לפני תחילת הבדיקה. דגימות הקולחים סוננו דרך ממברנת ניטרצולולז (gelman science) בעל נקבים של $0.45 \mu\text{m}$.

המסנן הונח על גבי מצע SPS במצב הפוך. מעל הממברנה הוספה שכבה של מצע SPS והצלחות הודגרו בטמפר' 37°C במערכת אנאירובית למשך 24 שעות.

4.9 הכנת הספורות של B. subtilis:

יש לקחת 100ml טריפטון נוזלי, הטריפטון יחומם באמבט 37°C ל- 15 דקות בתוך אלנמייר. יוספו מושבות *B. subtilis*, והאלנמייר יושאר באמבט 37°C בטלטול לשבעה ימים.

4.10 בדיקת ריכוז הספורות של *B. subtilis*:

לאחר שבעה ימים, תבוצע בדיקת ריכוז, יוכנו מיהולים של 0.9ml PBS ו-0.1ml מהתמיסה. המושבות יזרעו בזריעת דשא על צלחות אגר טריפטון. בנוסף תבוצע בדיקת ספורות, יחומם 1ml מהתמיסה באמבט 70°C ל-15 דקות. לאחר מכן יוכנו מיהולים מהתמיסה המחוממת של 0.9ml PBS ו-0.1ml.

4.11 קביעה כמותית של חיידקי קולי ממוצא צואתי בשיטת הסינון הממברנאלי

(Standard Methods, 1995)

קביעה כמותית של חיידקי קולי צואתיים תתבצע על מצע סלקטיבי מבחין של mFC. דגימות הקולחים סוננו דרך ממבראנת ניטרצולולוזה (gelman science) בעל נקבים של $0.45\mu\text{m}$.

הממברנה יונחו על גבי מצע mFC והצלחות יודגרו למשך 24 שעות בטמפרטורה של 37°C . קביעה כמותית של חיידקי קולי תתבצע ע"י ספירת המושבות הכחולות שגדלו על גבי הממברנות.

4.12 קביעה כמותית של חיידקי *E. coli* ממוצא צואתי בשיטת הזריעה הישירה

קביעה כמותית של חיידקי *E. coli* ממוצא צואתי מבצעים ע"ג מצע אבחנותי וסלקטיבי m-FC, זורעים בזריעת דשא $100\mu\text{l}$ מהדגימה ע"ג המצע, ומדגירים את הצלחות למשך 18-24 שעות בטמפ' של 37°C . קביעה כמותית של חיידקי *E. coli* מבצעים ע"י ספירת המושבות הכחולות שגדלו ע"ג המצע.

5. תוצאות

5.1 שכיחות של מיקרואורגניזמים פתוגניים ואנדקטוריום בקולחים שניונים

בטבלה מספר 3 מוצגים הריכוזים הממוצעים של חיידקי קולי ממוצא צואתי, חיידקים יוצרי נבגים *C.perfringens*, קוליפאגיים וטפילים מסוג *Cryptosporidium* ו- *Giardia* בקולחים שעברו טיפול ביולוגי בבוצה המשופעלת, במכון טיהור שפכים של נתניה. למרות היעילות הגבוהה בהרחקת מוצקים מרחפים (העכירות שמתקבלת עומדת בתקן לשימוש בלתי מוגבל בקולחים) ריכוז החיידקים האנדקטוריים נשאר גבוה. התוצאות מצביעות על כך כי הטיפול השניוני הביולוגי מיועד להרחקת חומר אורגני מומס וזמן שהיה הקצר לא גרם להרחקה משמעותית בריכוז של החיידקים האנדקטוריים. נצפה ריכוז של 5.5×10^5 cfu/100ml *Fecal coliforms*, 2.7×10^3 cfu/100ml חיידקי *C.perfringens* ו- 291pfu/100ml קוליפאגיים. נצפתה שונות גבוהה בריכוז של הטפילים בקולחים שניונים כאשר ריכוז ה- *Cryptosporidium* נקבע על 2-1200 אואוציסטות ל- 10 ליטר קולחים וריכוז ה- *Giardia* נקבע על 8 עד 100 ציסטות ל- 10 ליטר קולחים. ריכוז הטפילים בקולחים תלוי ברמת התחלואה באוכלוסיה בניגוד לאנדקטוריום המופרשים ע"י אחוז גבוהה של האוכלוסיה. גם בריכוז הטפילים לא נצפתה הרחקה משמעותית ע"י הטיפול השניוני בבוצה משופעלת.

טבלה 3. שכיחות מיקרואורגניזמים אנדקטוריום ופתוגניים בקולחים שניונים

עכירות (NTU)	F.coliform cfu/100ml	<i>C.perfringens</i> cfu/100ml	Coliphages pfu/100ml	<i>Crypto.</i> Oocysts/10L	<i>Giardia</i> Cysts/10L
3.7	550000	2733	290	401	40
3.3-4.3	340000-630000	2000-4200	150-600	2-1200	8-100

5.2 יעילות הקטילה של *B.subtilis*, *E. coli* ו- MS2 במכשיר המעבדתי Collimated beam בקולחים לאחר טיפולים שונים

במתקן לטיפול בשפכים של נתניה נבנה מתקן חלוץ לטיפול שלישוני בקולחים. המתקן הופעל כדי לבחון את האפשרות של ייצור קולחים ברמה שלישונית שיתאימו להשקיה בלתי מוגבלת של גידולים חקלאיים. במתקן החלוץ נבחנה יעילות ההרחקה של עכירות וחלקיקים מרחפים ע"י סינון עומק בהשוואה לסינון עומק בתוספת מפתית. טבלה 4 מראה עליה של 50% ביעילות ההרחקה של עכירות וחלקיקים מרחפים כאשר מוסיפים מפתית לקולחים. הוספת המפתית גרמה לירידה של העכירות מ- 1.6 ל- 0.6 NTU וריכוז החלקיקים ירד מ- 3529 ל- 1958 חלקיקים לסמ"ק.

טבלה 4. תכונות פיסקו-כימיות של הקולחים לאחר טיפולים שונים במתקן החלוצ.

סוג הטיפול	אחוז העבירות	PSD חלקיק/סמ"ק	עכירות NTU
סינון עומק	61.51	3529(98.02%)	1.2
סינון עומק עם מפתית	63.38	1958(97.9%)	0.6

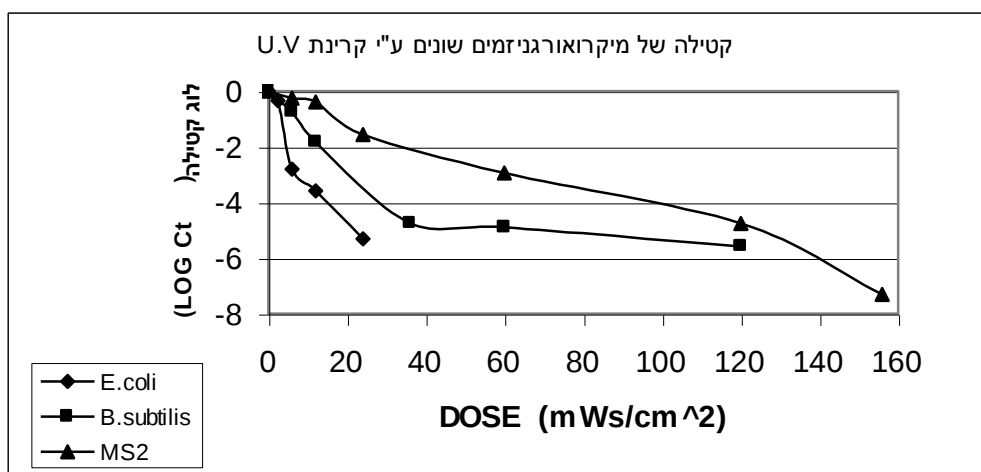
קיצורים:

1. Nephelometric Turbidity Units-N.T.U –יחידת העכירות.

2. PSD -Particles Size Distribution התפלגות גודל חלקיקים בין 2-10 micron, הערכים בסוגריים מייצגים את אחוז החלקיקים בגודל זה מכלל החלקיקים בגדלים 2-100 micron, המספרים הם מוחלטים-מס' חלקיקים בטווח גודל של מיקרונים.

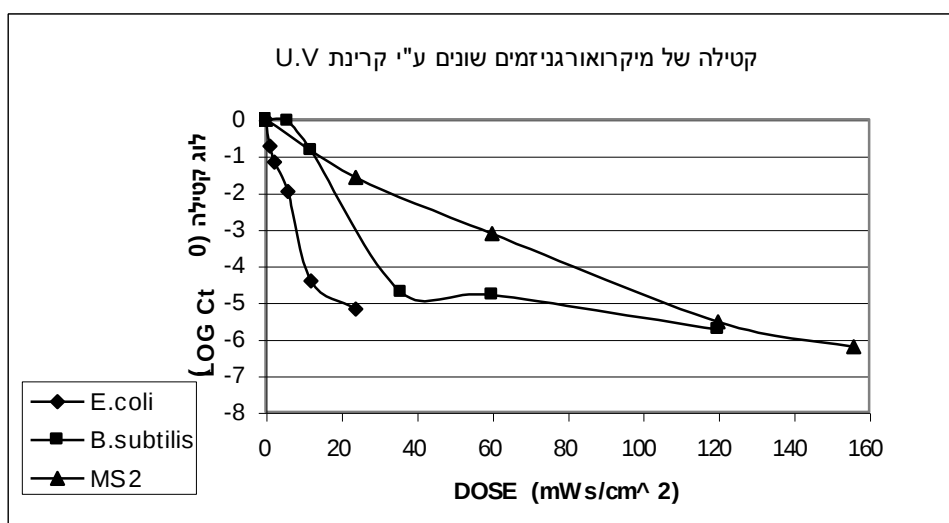
5.3 השפעת סוג המיקרואורגניזם על יעילות הקטילה ע"י קרינת U.V:

שלושת האיוורים הבאים מציגים את השפעת סוג המיקרואורגניזם על יעילות הקטילה בסוגי המים השונים. איור 1, מבטא את יעילות הקטילה במים מזוקקים. ניתן לראות דמיון יחסי ביעילות הקטילה בין חיידקי *E.coli* לבין חיידקי *B.subtilis*. בחיידקי *B.subtilis* ניתן לראות עליה ביעילות הקטילה אך במנת קרינה של 36 mWs/cm^2 יעילות הקטילה נשארה באותו טווח יחסי ומקבלת צורת זנב. לעומת זאת, ניתן לראות כי יעילות הקטילה של MS2 מקבלת צורת כתף עד למנה של 24 mWs/cm^2 ולאחר מכן צורת הקטילה היא לינארית. התוצאות מצביעות על כך שחיידקי *E.coli* הם הרגישים ביותר לקרינת U.V וקוליפאג' MS2 הנו עמיד ביותר כאשר נדרשת מנה של 24 mWs/cm^2 לקבל קטילה של 5 סדרי גודל מחיידקי *E.coli* לעומת מנה של 120 mWs/cm^2 לקבלת אותה רמת קטילה עם קוליפאג' MS2. יעילות הקטילה של חיידקי *B.subtilis* הייתה יותר גבוהה מאשר הקטילה של קוליפאג' MS2 אבל יותר נמוכה מאשר הקטילה של חיידקי *E.coli*. נדרשת מנה של 36 mWs/cm^2 כדי שתתקבל קטילה של 4 סדרי גודל של נבגים. יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים שנבדקו הייתה לפי הסדר: *E.coli* > *B.subtilis* > MS2.



איור 1: יעילות הקטילה של *E.coli*, *B.subtilis*, בקטריופאג' MS2 במים מזוקקים.

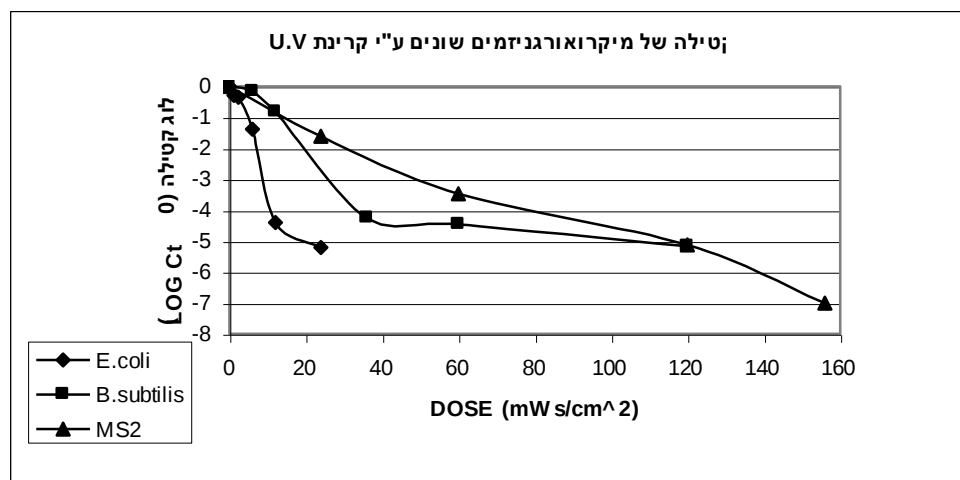
באיור מספר 2, מוצגות תוצאות יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים שנבדקו בקולחים לאחר סינון עומק והפתתה ניתן לראות דמיון יחסי ביעילות הקטילה בין חיידקי *E.coli* לבין הקטילה של חיידקי *B.subtilis*. וגם בחיידקי *B.subtilis* ניתן לראות עליה לינארית ביעילות הקטילה אך מעל למנת קרינה של 36 mWs/cm^2 נצפתה קטילה בצורת זנב ויעילות הקטילה נשארה באותו טווח יחסי. לעומת זאת, ניתן לראות כי נדרשת מנה גבוהה יותר של קרינת U.V כדי לקטול את קוליפאג' MS2 בקולחים לאחר סינון, נראה כי בקולחים לאחר סינון והפתתה התקבלה יעילות קטילה זהה לזו שהתקבלה במים מזוקקים, חלקיקים שלא גורמים לעכירות גבוהה כנראה לא מפריעים לקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V. הקטילה של MS2 נמשכת לטווח קרינה ארוך יותר ובנוסף ביחס למים המזוקקים, יעילות הקטילה נמצאת בעליה מתונה ויחסית קבועה.



איור 2: יעילות הקטילה של *E.coli*, *B.subtilis* ובקטריופאג' MS2 ע"י קרינת U.V בקולחים לאחר הפתתה וסינון.

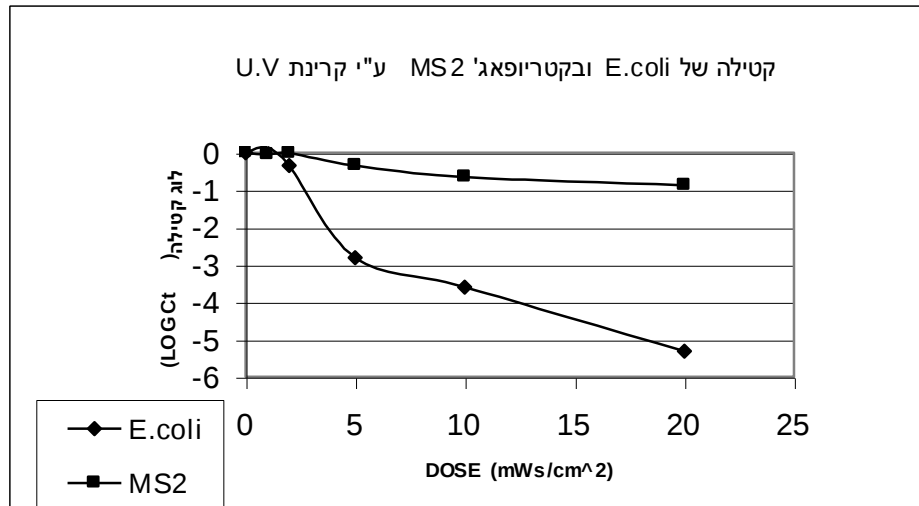
באיור מספר 3, מוצגות תוצאות של יעילות הקטילה בקולחים שניונים. ניתן לראות דמיון יחסי ביעילות הקטילה בין חיידקי *E.coli* לבין חיידקי *B.subtilis*. בחיידקי *B.subtilis* ניתן לראות עליה ביעילות הקטילה אך במנת קרינה של 36 mWs/cm^2 יעילות הקטילה נשארת באותו טווח יחסי. לעומת זאת נדרשה מנת U.V גבוהה יותר כדי לקבל קטילה דומה עם קוליפאג' MS2, האיכות הפיזיקאלית של הקולחים לאחר טיפול שניוני שהתקבלה ממתקן לטיהור שפכים בנתניה לא הפריעה לחיטוי ע"י קרינת U.V. כנראה בעכירות נמוכה מתחת ל-5 NTU ההפרעה שמתקבלת הינה מזערית. בכל סוגי המים שנבדקו התקבלה יעילות הקטילה הגבוהה ביותר עם חיידקי *E.coli* והנמוכה ביותר עם קוליפאג' MS2.

התוצאות מצביעות על כך שקוליפאג' MS2 יכול לשמש כביודזימטר להערכת יעילות החיטוי של מתקני ה-U.V, לעומת זאת, חיידקי *E.coli* נמצאו כרגישים ביותר לקרינת U.V מה שמצביע על אי התאמתם כסמן לחיטוי מיקרואורגניזמים אחרים ע"י U.V.



איור 3: יעילות הקטילה של *E.coli*, *B.subtilis*, בקטריופאג' MS2 ע"י קרינת U.V בקולחים שניניים.

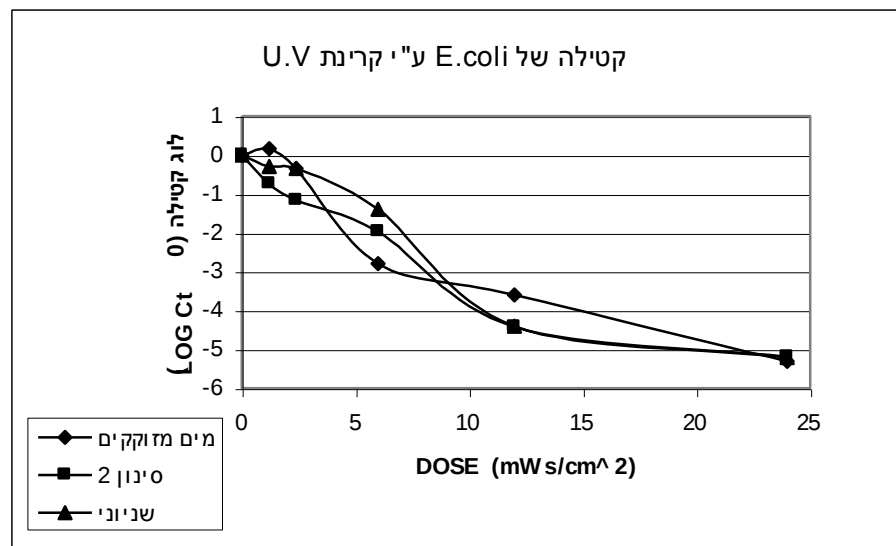
באיור מספר 4 מוצגות תוצאות ההשוואה בין יעילות הקטילה של חיידקי *E.coli* וקוליפאג' MS2 במים מזוקקים. מנה של 20 mWs/cm^2 גרמה לקטילה של 5 סדרי גודל של חיידקי *E.coli* במים מזוקקים, לעומת זאת, אותה מנה של U.V גרמה לקטילה של פחות מסדר גודל אחד של קוליפאג' MS2.



איור 4: יעילות הקטילה של *E.coli* ובקטריופאג' MS2 ע"י קרינת U.V במים מזוקקים בשניות הראשונות.

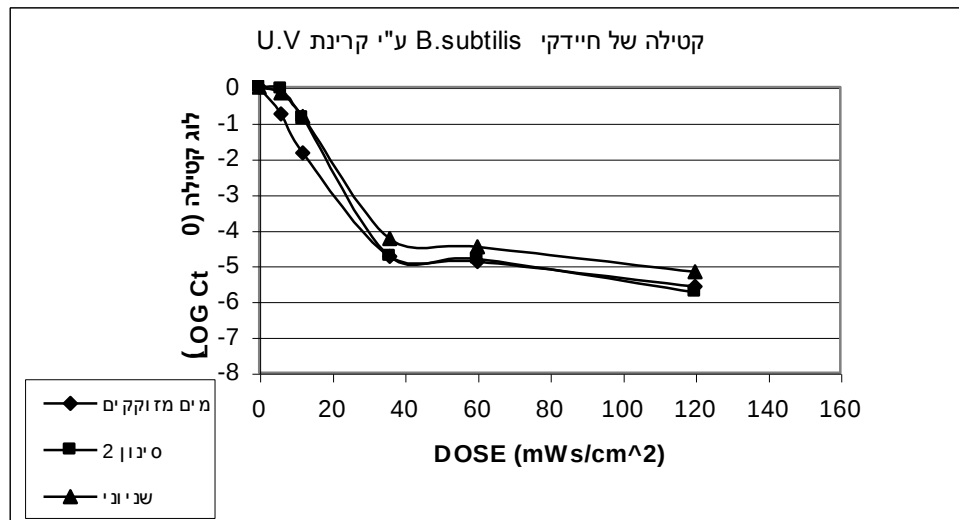
5.4 השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V:

באיור מספר 5, ניתן לראות את השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של חיידקי *E.coli*. ניתן לראות כי בקולחים שניונים וקולחים לאחר סינון והפתתה ישנה חפיפה יחסית של לוג הקטילה לעומת מים מזוקקים שישנה עליה חדה ביעילות הקטילה עד מנת קרינה של 6 mWs/cm² ולאחר מכן עליה מתונה.



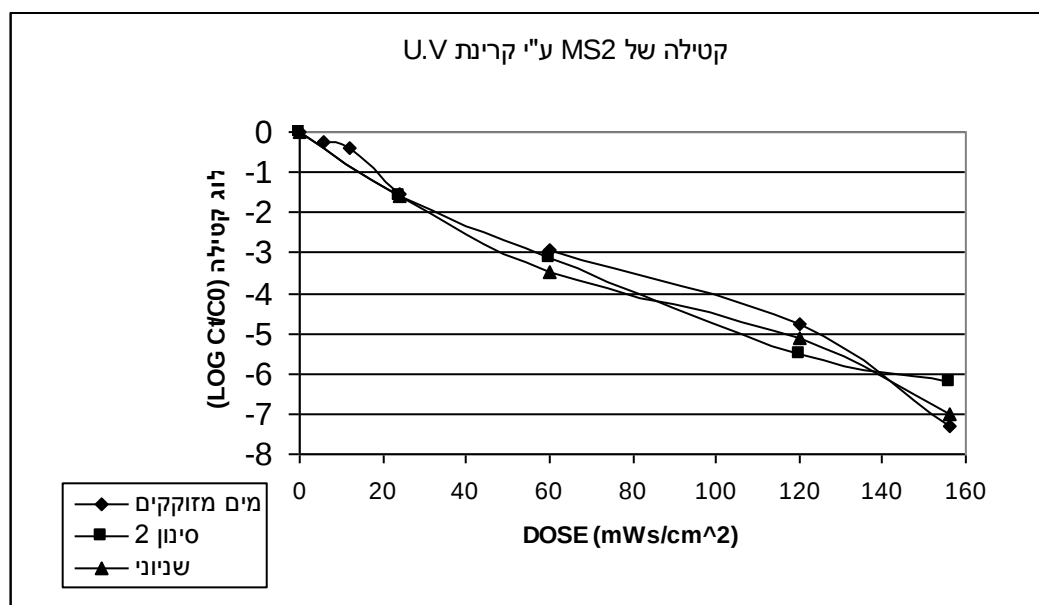
איור 5: השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של חיידקי *E.coli* ע"י קרינת U.V בסוגי המים השונים.

איור מספר 6, מבטא את יעילות הקטילה של *B.subtilis*. ניתן לראות חפיפה עקבית בין כל סוגי המים, כאשר ישנה עליה חדה ביעילות הקטילה עד מנת קרינה של 36 Ws/cm^2 ולאחר מכן ניתן לראות שיעילות הקטילה נשארת באותו טווח יחסי.



איור 6: השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של חיידקי *B.subtilis* ע"י קרינת U.V בסוגי המים השונים.

איור מספר 7 מבטא את יעילות הקטילה של MS2. ניתן לראות כי בקולחים שניונים וקולחים לאחר סינון עומק בתוספת מפתית ישנה חפיפה יחסית של לוג הקטילה לעומת מים מזוקקים שישנה ירידה ביעילות הקטילה ממנת קרינה של 40 Ws/cm^2 ולאחר מכן ניתן לראות עליה מתונה של יעילות הקטילה.



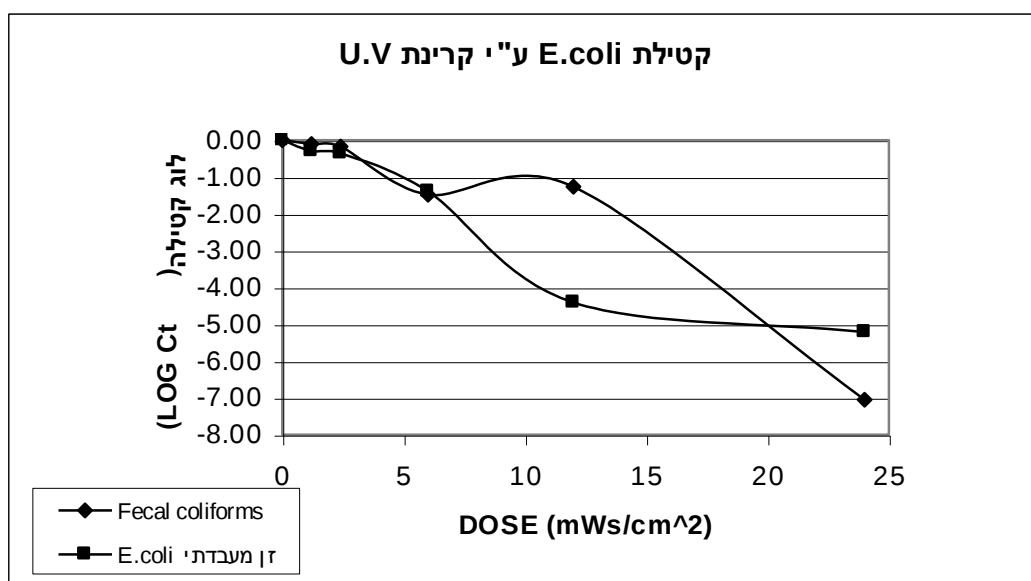
איור 7: השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של בקטריופאג' MS2 ע"י קרינת U.V.

איורים 5, 6 ו-7 מציגים תוצאות של השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים השונים ע"י קרינת U.V. התוצאות מצביעות על כך שאיכות המים והקולחים במיוחד הייתה גבוהה כך שלא נצפתה הפרעה על יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים השונים בעזרת U.V, יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים השונים הייתה זהה במים מזוקקים , קולחים שניונים וקולחים לאחר טיפול שניוני : הפתתה וסינון . כנראה החלק יקים הנמצאים בקולחים הם בריכוז וגודל כזה שלא מפריע ליעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V כך שישנה עכירות מספקת כדי לקבל קטילה יעילה.

באיור מספר 8 מוצגות תוצאות יעילות הקטילה של חיידקי קולי מעבדתיים וקוליפורמים ממוצא צואתי בקולחים שניונים ע"י קרינת U.V.

הניסוי בוצע כדי לבדוק האם חיידקים שמקורם בקולחים יהיו מוגנים יותר מפני הקרינה מאשר חיידקים מעבדתיים שנזרעו בקולחים.

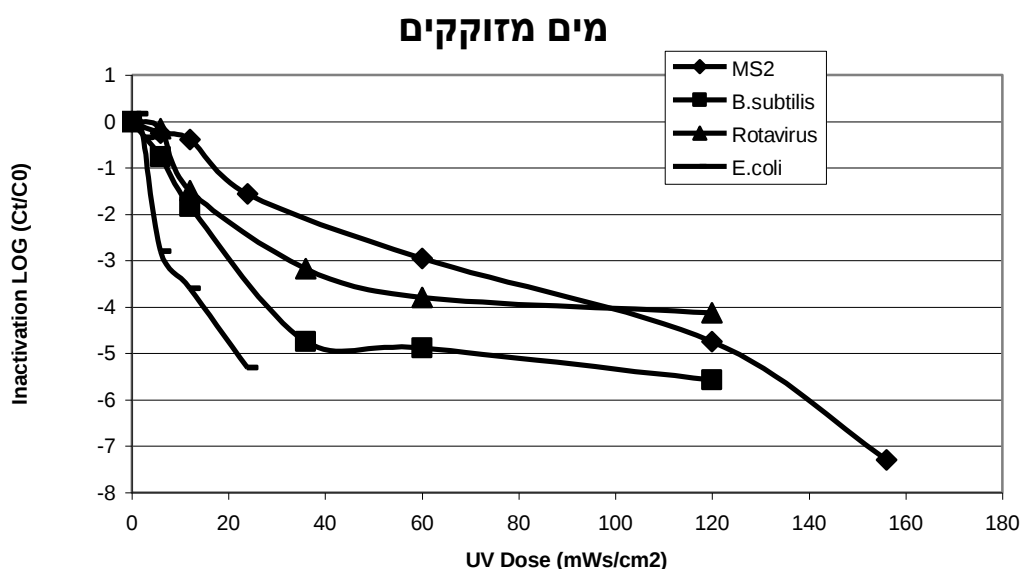
התוצאות מצביעות על כך שיש הבדל משמעותי במנה של 12 mWs/cm^2 כאשר בריכוז של קוליפורמים ממוצא צואתי לא נצפה שינוי משמעותי לעומת 4 סדרי גודל קטילה בזן המעבדתי. במנת קרינה של 24 mWs/cm^2 הקטילה של הזן המעבדתי הייתה דומה לקוליפורם ממוצא צואתי. כנראה שמנה של 24 mWs/cm^2 הספיקה להתגבר על ההגנה המוקנת לחיידקים ע"י הקולחים השניונים.



איור 8: יעילות הקטילה של חיידקי קולי מעבדתיים וקוליפורמים ממוצא צואתי (זן הבר) בקולחים שניונים ע"י קרינת U.V.

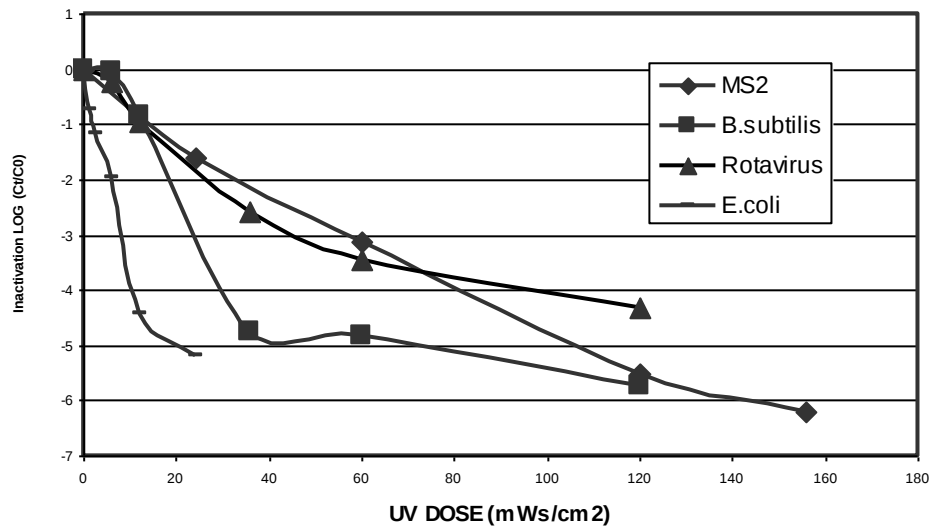
5.5 השוואת יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli*, נבגי *B. subtilis*, בקטיריפאג' MS2 ונגיפי Rota בסוגי מים שונים ע"י קרינת U.V.

באיורים 9, 10 ו-11 ובטבלה מספר 5 מוצגים תוצאות הקטילה של מיקרואורגניזמים מקבוצות שונות במים מזוקקים (עבירת מקסימלית), קולחים לאחר סינון וקולחים שניונים (עבירות נמוכה) ע"י קרינת U.V. מהאיורים ניתן לראות כי חיידקי *E. coli* הנם המיקרואורגניזמים הרגישים ביותר לקרינת U.V. קטילה של 4 לוגים מתקבלת אחרי חשיפה למנת U.V. של $12-24 \text{ mWs/cm}^2$. נבגי *B. subtilis* הראו עמידות בינונית לקרינת U.V. כאשר נדרשה מנה של 30 mWs/cm^2 כדי שתתקבל קטילה של 4 לוגים. שני הנגיפי רוטה ובקטיריפאג' MS2 הראו עמידות גבוהה לקרינת U.V. יחסית לחיידקים ונדרשה מנה של $80-100 \text{ mWs/cm}^2$ כדי שתתקבל קטילה של 4 לוגים. חשוב לציין, שלא נצפתה השפעה משמעותית של איכות המים על יעילות הקטילה של המיקרואורגניזמים השונים ע"י קרינת U.V. כנראה שהקולחים ה שניונים שמתקבלים ע"י טיפול שניוני הם באיכות כימית ופיזיקאלית מספיק טובה שלא מפריעה ליעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י קרינת U.V.



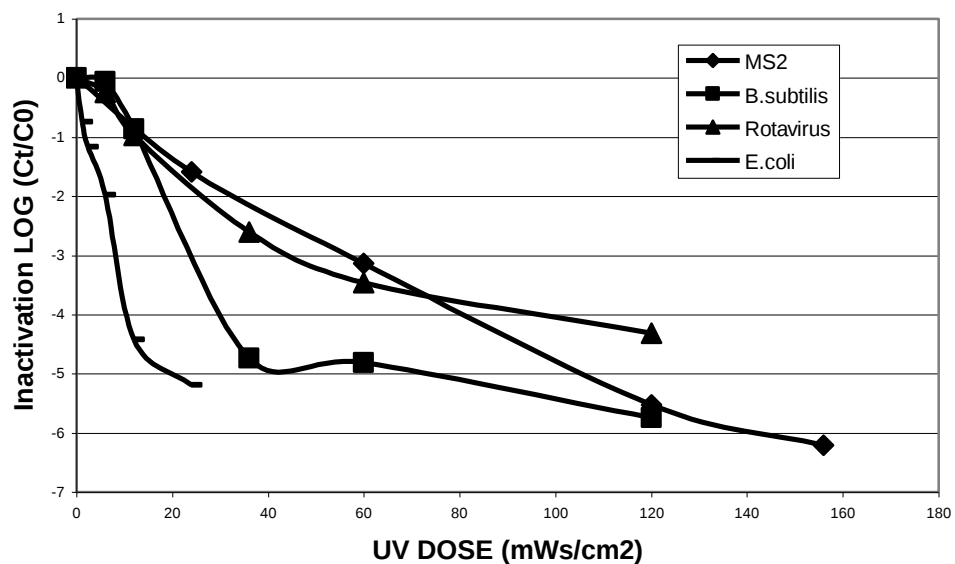
איור 9: יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli*, נבגי *B. subtilis*, MS2 בקטיריפאג' ונגיפי Rota במים מזוקקים ע"י קרינת U.V.

קולחין אחרי סינון



איור 10: יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli*, נבגי *B. subtilis*, *MS2* בקטיריפאג' ונגיפי Rota בקולחים לאחר סינון מהיר ע"י קרינת U.V.

קולחין שניוני



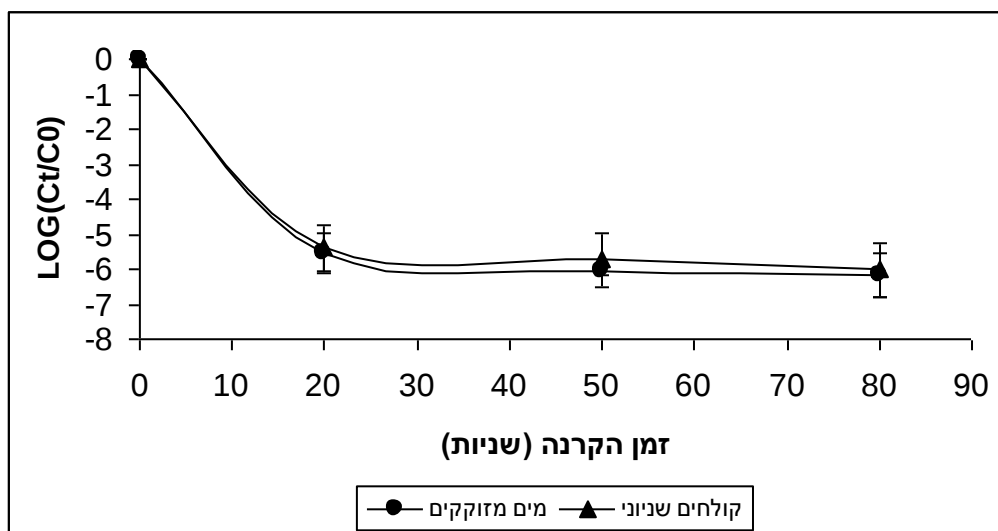
איור 11: יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli*, נבגי *B. subtilis*, *MS2* בקטיריפאג' ונגיפי Rota בקולחים שניונים ע"י קרינת U.V.

טבלה 5. השוואת מנת ה U.V. הדרושה לקטילה של 4 לוגים של חיידקי *E. coli*, נבגי *B. subtilis*, MS2 בקטיריופאג' ונגיפי Rota במים מזוקקים, קולחים לאחר סינון מהיר וקולחים שניונים

מנת ה U.V. (mWs/cm ²) הדרושה לקטילה של 4 לוגים של				
Rotavirus	MS2	<i>B. subtilis</i>	<i>E. coli</i>	
80	100	30	20	מים מזוקקים
100	80	30	20	קולחים לאחר סינון
100	80	30	12	קולחים שניונים

5.6 השוואת בין יעילות הקטילה של חיידקי *A. hydrophila* במים מזוקקים ובקולחים שניונים

1 סמ"ק *A. hydrophila* הוקרן ב 40 סמ"ק מים מזוקקים או ב 40 סמ"ק קולחים שניונים לפרקי זמן של 0, 20, 50 ו 80 שניות. מיד לאחר ההקרנה הדגימות נמהלו ו 100µl מהמיהולים השונים של הדגימה נזרעו על גבי מצע ADA-V, שתי צלחות במקביל. הצלחות הודגרו ב 37°C למשך 18-24 שעות, חושב מספר המושבות שהתקבלו לסמ"ק דגימה נספרו (CFU/ml) וחושב לוג הקטילה. תוצאות יעילות הקטילה של *A. hydrophila* במים מזוקקים ובקולחים שניונים מוצגות באיור 12. מאיור 12 ניתן לראות קטילה של 5 סדרי גודל *A. hydrophila* במים מזוקקים ובקולחים שניוני כבר לאחר הקרנה של 20 שניות לא נמצא הבדל משמעותי מבחינה סטטיסטית בין יעילות הקטילה של *A. hydrophila* במים מזוקקים לבין יעילות הקטילה שלו בקולחים שניונים (ANOVA-2-way, p=0.328). לא נצפתה עלייה ביעילות הקטילה ככל שמעלים את זמן ההקרנה (התנהגות של tailing). כל זמן הקרנה נותן קטילה המובהקת מבחינה סטטיסטית (ANOVA-2-way, p<0.05) אך כל זמן הקרנה אחר מאפס בהשוואה לזמן הקרנה אחר (20, 50 ו 80 שניות) לא נותן הבדל מובהק בקטילה (ANOVA-2-way, p>0.005).



איור 5.7: יעילות הקטילה של *A. hydrophila* במים מזוקקים או בקולחים שניוני בעקבות הקרנה ב UV לפרקי זמן שונים.

5.7 יעילות הקטילה של טפילים מסוג *C. parvum* ע"י קרינת U.V.

קביעת מנת ההדבקה של *C. parvum* בתרביות תאי HCT-8. בטבלה 6 מסוכמות תוצאות של שלוש ניסיונות של הדבקת סידרת מיהולים של אואוציסטות של *C. parvum* בתרביות תאי HCT-8. חישוב מוקדי ההדבקה foci נעשה בשיטת ה Most Probable Number (MPN). תוצאות של שלושת הניסיונות מצביעות על כך שמספיקה מנה של 70 אואוציסטות כדי ליצר מוקד הדבקה. הניסיונות נעשו במרווח של שבוע מה שמצביע על כך שכושר ההדבקה של האואוציסטות לא משתנה בתקופה של חודשיים, שנקבעה כזמן שניתן להשתמש באואוציסטות לניסיונות לקביעת יעילות הקטילה של *C. parvum* ע"י קרינת U.V.

טבלה 6. קביעת כושר ההדבקה של הטפיל החד תאי *C. parvum*

מס' הדבקה	מיהולים עשרוניים של תרחיף הספורוזואיטים				
	0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
1	++++	+++	++	+	N.D
2	++++	++++	+++	+	+
3	++++	+++	++	++	+

מקרא:

++++ נמצאו מוקדי הדבקה רבים וצפופים מאד
 +++ מוקדי הדבקה ברורים ומפוזרים יותר
 ++ מוקדי הדבקה מעטים יחסית
 + כמעט ולא ניתן להבחין במוקדי הדבקה

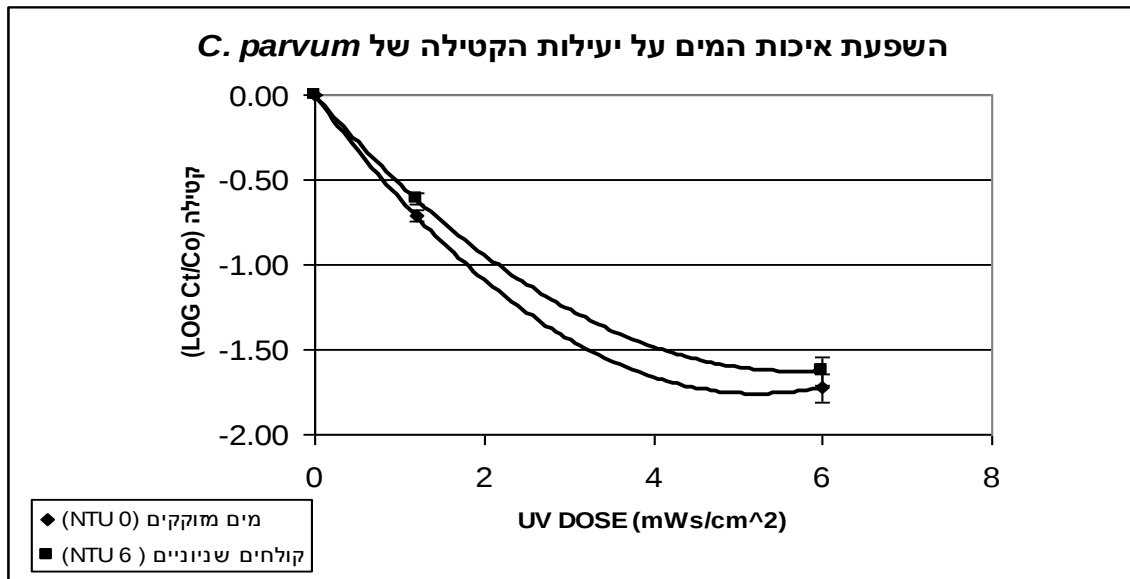
5.7.1 קביעת יעילות הקטילה של הטפיל *C. parvum* ע"י קרינת U.V:

לצורך קביעת כושר ההדבקה (Infectivity) של *C. parvum* לאחר חשיפה לקרינת U.V השתמשנו ב-2 סוגי מים: מים מזוקקים וקולחים שניונים בעכירות של 6 NTU. כמו כן, נבדקה השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של הטפיל ע"י קרינת U.V.

ל-40 סמ"ק של דגימת מים בצלחת פטרי 90 מ"מ, הוספה תמיסת טפילים של 1 סמ"ק מסוג *C. parvum*, דגימות המים בתוספת תמיסת הטפילים עורבבו באמצעות סטירר מגנטי בטמפ' החדר והוקרנו ע"י המכשיר המעבדתי Collimated Beam ב-3 מנות U.V: 0, 1.2, 6 mWs/cm². כושר ההדבקה של הטפיל *C. parvum* נקבע ע"י הדבקת תרביות רקמה HCT-8. ריכוז האואוציסטות ההתחלתי היה $2.94 \times 10^6 \pm 1.89 \times 10^6$ Oocysts/ml וחיות הטפילים הייתה $53\% \pm 0.04$.

חיות האואוציסטות של *C. parvum* נקבעה ע"פ שלושת המדדים הבאים:

1. צביעה אימונופלווארסצנטית (IFA): יכולת האואוציסטות לקשור נוגדן מונוקלונאלי ספיציפי מסומן בחומר פלואורסצנטי (FITC).
 2. חדירות של דופן האואוציסטות לצבע DAPI.
 3. המצאות אורגנולות בתוך האואוציסטות בהסתכלות דרך מיקרוסקופ DIC. אואוציסטה חיה הוגדרה כאואוציסטה שהיא FITC+/DAPI-/DIC+ . אואוציסטה קרובה לסוף תקופת החיים הוגדרה כ- FITC+/DAPI+/DIC+ . ואואוציסטה מתה הוגדרה כ- FITC+/DAPI-/DIC- .
- איור מספר 13 מבטא את השפעת איכות סוגי המים השונים על יעילות הקטילה של הטפיל *C. parvum* ע"י קרינת U.V, נראה שישנה חפיפה יחסית בלוג הקטילה במים המזוקקים ובקולחים השניונים, מנת U.V של 6 mWs/cm² גרמה לקטילה של 2 סדרי גודל בקירוב, נראה שהטפיל *C. parvum* הינו רגיש לקרינת U.V. ע"פ מבחנים סטטיסטיים, נמצא כי במנת U.V של 6 mWs/cm² אין הבדל משמעותי ביעילות הקטילה של *C. parvum* ע"י קרינת U.V במים מזוקקים לבין יעילות הקטילה בקולחים שניונים.



איור 13 : השפעת איכות המים על יעילות הקטילה של *C. parvum* ע"י קרינת U.V.

5.8 הערכת יעילות הקטילה של זני *Aeromonas*, קוליפורמים ממוצא צואתי וחידקים כלליים

שנמצאים בקולחים שניונים

דגימות של 40 סמ"ק קולחים שניוני הוקרנו למשך 0, 20, 50 ו 80 שניות תוך כדי עירבול במערבל מגנטי. נבדקה יעילות הקטילה של החידקים השונים שנמצאים בקולחים ; זני *Aeromonas*, קוליפורמים ממוצא צואתי וחידקים כלליים, בשיטת הזריעה הישירה ע"י מצע m-FC, ADA-V, וטריפטון מוצק, בהתאמה. הצלחות הודגרו ב 37°C ל 18-24 שעות, נספרו המושבות שהתקבלו לסמ"ק דגימה שנזרעה (CFU/ml) וחושב לוג הקטילה בזמני ההקרנה השונים, 20, 50 ו 80 שניות (LOG(Ct)) בהשוואה לדגימה לא מוקרנת (LOG(C0)).

5.9 מדידת התכונות הביולוגיות והפיסיקוכימיות של הקולחים השניונים שהובאו ממכון טיהור

שפכים רמת-השרון

דגימות של קולחים שניונים לאחר סינון הובאו ממכון טיהור שפכים רמת- השרון באותו יום של הניסוי. נמדדה עכירות הקולחים, ה COD וריכוז החידקים בימי הניסוי השונים. התוצאות מוצגות בטבלה 7.

טבלה 7. האיכות הפיזיקו- כימית והמיקרוביאלית של קולחים שניונים ממכון טיהור שפכים , רמה"ש.

סוג הבדיקה ויחידות המדידה	ממוצע וסטיית תקן
Turbidity (NTU)	8.905±1.78
COD (mg/L)	47.25±5.3
ריכוז חיידקי <i>E. coli</i> (CFU/ml)	5833±3214
ריכוז חיידקי <i>Aeromonas</i> (CFU/ml)	32167±33676
ריכוז חיידקים כלליים (CFU/ml)	93812±81213

5.10 השוואה בין יעילות הקטילה של זני *Aeromonas*, קוליפורמים ממוצא צואתי וחיידקים

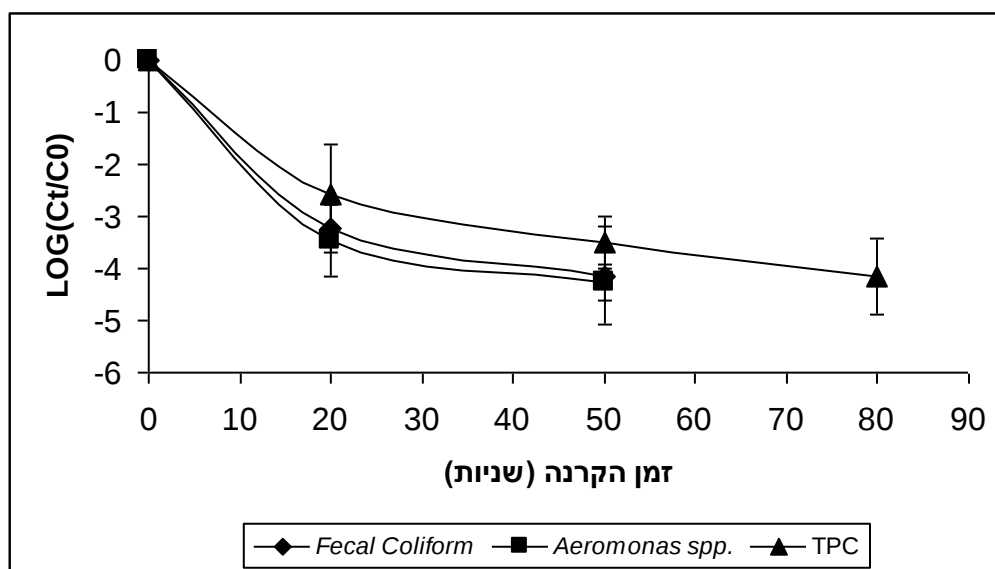
כלליים בקולחים שניונים לאחר חשיפה לקרינת UV

דגימות של 40 סמ"ק קולחים שניונים הוקרנו במכשיר ה UV המעבדתי למשך 0, 20, 50 ו 80 שניות. הדגימות נמהלו ו 100µl מהמיהולים השונים של הדגימה נזרעו ע "ג מצע ADA-V ל *A. hydrophila*, מצע m-FC לקוליפורמים ממוצא צואתי , ולספירת חיידקים כללית עורבבו 100µl דגימה עם 10 סמ"ק טריפטון מוצק ב 50°C לתוך צלחת פטרי 90 מ"מ. מספר המושבות שהתקבלו לסמ"ק דגימה חושב (CFU/ml) וחושב לוג הקטילה.

תוצאות יעילות הקטילה של זני *Aeromonas*, קוליפורמים ממוצא צואתי וחיידקים כלליים בקולחים שניוני מוצגות באיור 14.

מאיור 14 ניתן לראות כי עבור זני *Aeromonas* וקוליפורמים ממוצא צואתי בקולחים שניונים זמן הקרנה של 80 שניות גורם לקטילה שהביאה את ריכוז החיידקים מתחת לסף הגילוי בשיטות המחקר הנוכחי. ניתן לראות כי זמן הקרנה של 20 שניות גורם לקטילה של בערך 4 סדרי גודל עבור זני *Aeromonas* וקוליפורמים ממוצא צואתי ולקטילה של כמעט שלושה סדרי גודל עבור

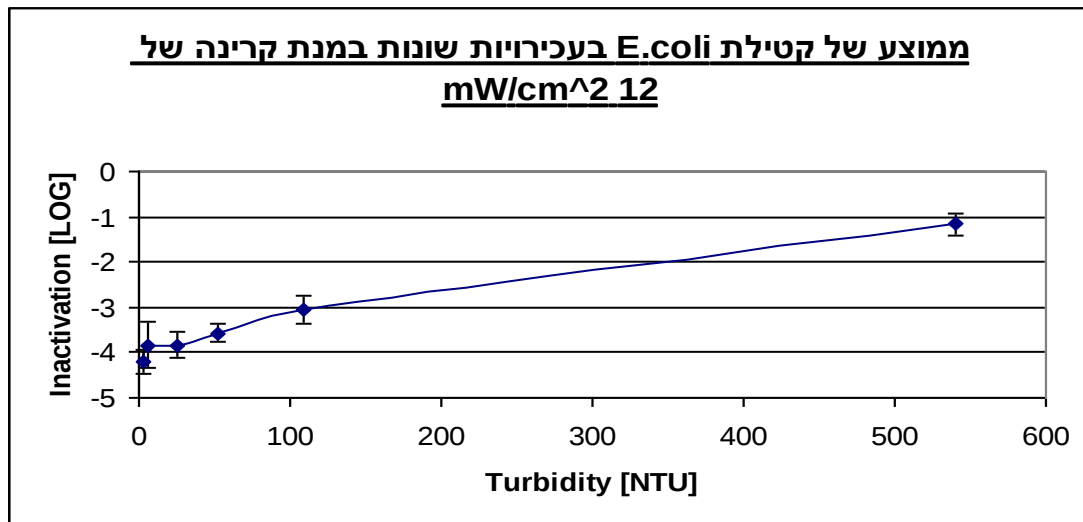
חיידקים כלליים בקולחים שניוני . לא נמצא הבדל מובהק בין יעילות הקטילה של החיידקים השונים בקולחים השניוני ים בעקבות חשיפה לקרינת UV (ANOVA-2-way, $p=1$). מבחינת השפעת זמן ההקרנה על יעילות הקטילה , נמצאה השפעה מובהקת על יעילות הקטילה בין זמני הקרנה 0, 20 ו 50 שניות (ANOVA-2-way, $p<0.05$).



איור 14: יעילות הקטילה של זני *Aeromonas*, קוליפורמים ממוצא צואתי וחיידקים כלליים בקולחים שניוני בעקבות הקרנה ב UV.

5.11 השפעת העכירות במים על יעילות הקטילה של חיידקי *E. coli* ע"י קרינת U.V.

כדי לקבוע את מידת ההשפעה של העכירות על יעילות הקטילה של חיידקי קולי ע"י קרינת U.V. השתמשנו ברמות עכירות של 0 עד 500 NTU כאשר מנת ה U.V. הייתה קבועה, 12 mWs/cm^2 . התוצאות מוצגות באיור מספר 15. ניתן לראות כי ברמות עכירות חרסיתית של עד 50 NTU ההשפעה של העכירות הסתכמה בהפרעה של סדר גודל אחד. התוצאות מצביעות על כך שברמות העכירות הקיימות בקולחים מטופלים ההשפעה על יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים ע"י U.V. לא תהיה משמעותית.



איור 15: השפעת העכירות על יעילות הקטילה של חיידקי E. coli ע"י קרינת U.V. במנה (12 mWs/cm²) UV לפרקי זמן שונים.

5.12 השפעת ריכוז החיידק והעכירות על יעילות הקטילה של A. hydrophila ע"י קרינת U.V

במכשיר ה UV המעבדתי הוקרנו לפרקי זמן של 0, 20, 50 ו 80 שניות 1 סמ"ק A. hydrophila ב- 40 סמ"ק מים מזוקקים או 10 סמ"ק A. hydrophila ב 30 סמ"ק מים מזוקקים. ריכוז החיידק היה 10^7 - 10^8 CFU/ml. נמדדה עכירות הדגימה שמכילה 1 סמ"ק חיידק ב 40 סמ"ק מים מזוקקים ועכירות הדגימה שמכילה 10 סמ"ק ב 30 סמ"ק מים מזוקקים ע"י מיהולים בעזרת מכשיר טורבידימטר שדה של חברת HATCH.

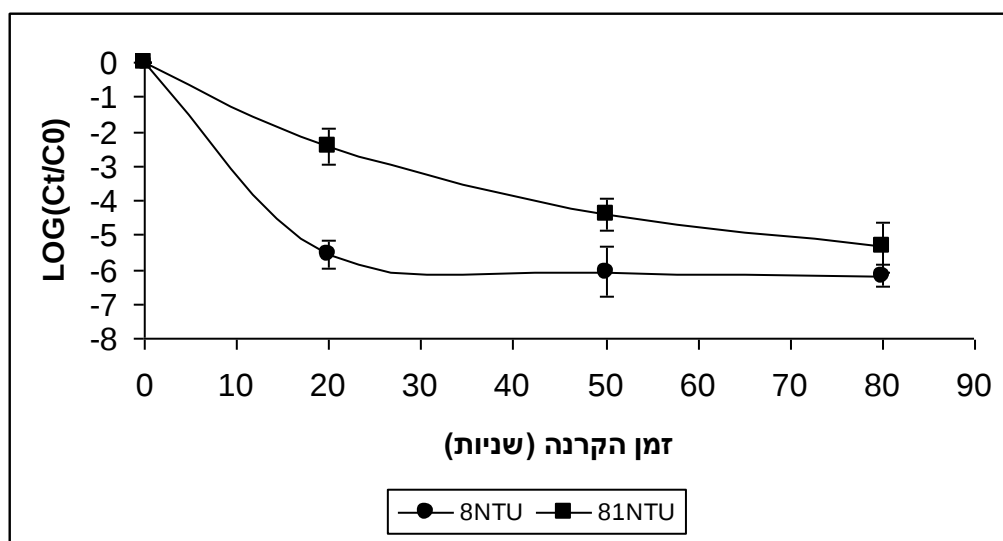
מיד לאחר ההקרנה ב UV נמהלו ונזרעו הדגימות על צלחות ADA-V, שתי צלחות במקביל, הודגרו ב 37°C ל 18-24 שעות, חושב מספר המושבות שהתקבלו לסמ"ק דגימה (CFU/ml) וחושבה הקטילה על ידי $\text{LOG}(\text{Ct}/\text{C0})$.

תוצאות מדידת עכירות הדגימות מוצגות בטבלה 8. ותוצאות יעילות הקטילה של הדגימות מוצגות באיור 16. מטבלה 8 ניתן לראות כי 1 סמ"ק של תרבית A. hydrophila ב 40 סמ"ק מים מזוקקים גורם לעכירות של $8 \pm 1.24 \text{ NTU}$ ואילו 10 סמ"ק של תרבית A. hydrophila ב 30 סמ"ק מים מזוקקים גורמת לעכירות של $81 \pm 2.02 \text{ NTU}$. ניתן לראות מאיור 16 כי הקטילה במים בעכירות של 81 NTU יותר איטית מאשר במים בעכירות של 8 NTU, במים בעכירות גבוהה הקרנה של 80 שניות מביאה כמעט לאותה יעילות קטילה שמושגת על ידי הקרנה לאחר 20 שניות במים בעכירות נמוכה. ההבדל ביעילות הקטילה של מים בעכירות שונות עקב ריכוז חיידקים שונה הוא מובהק ($\text{ANOVA-2-way}, p < 0.05$). בנוסף, בקטילה של מים בעכירות גבוהה, עקב ריכוז חיידק גבוה, ככל שמעלים את זמן ההקרנה מ 0 עד ל 50 שניות יש עלייה מובהקת ביעילות

הקטילה של החיידק (ANOVA-2-way, $p < 0.05$), אך אין השפעה מובהקת להעלאת זמן ההקרנה מ 50 שניות ל 80 שניות (ANOVA-2-way, $p = 0.120$).

טבלה 8. עכירות של דגימות החיידק *A. hydrophila* במים מזוקקים

עכירות (NTU)	כמות מים מזוקקים (סמ"ק)	כמות <i>A. hydrophila</i> (סמ"ק)
8 ± 1.24	40	1
81 ± 2.02	30	10



איור 16: יעילות הקטילה של *A. hydrophila* בריכוזים שונים במים מזוקקים בעכירות שונות בעקבות הקרנת UV לפרקי זמן שונים.

5.13 השוואת יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים אנדיקטוריים ע"י קרינת U.V

וכלור במתקן חלוץ לטיפול שלישוני בקולחים

הבדיקות נערכו על דגימות קולחים שניונים שהובאו ממתקן לטיהור שפכים בכפר ויתקין, לאחר הטיפולים הבאים: טיפול שניוני לאחר בוצה משופעלת, סינון עומק+קרינת U.V, סינון עומק בתוספת מפתית + קרינת U.V, סינון עומק+כלור, סינון עומק בתוספת מפתית+כלור.

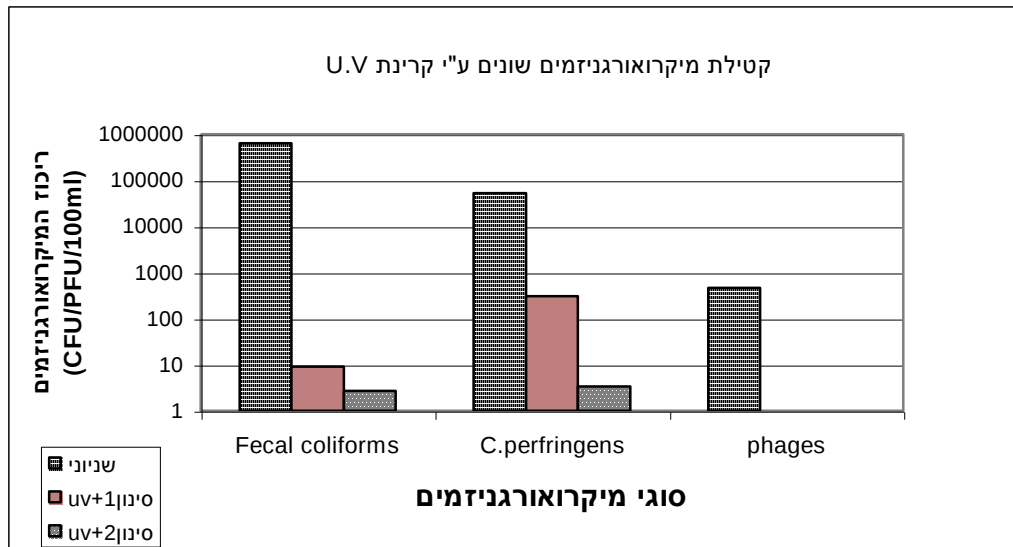
נמצא כי ריכוז חיידקי קוליפורם ממוצא צואתי בקולחים שניונים הוא $6.2 \cdot 10^5 - 6.5 \cdot 10^5$ cfu/100ml, ריכוז חיידקי *C. perfringens* הוא $9.2 \cdot 10^3 - 9.7 \cdot 10^4$ cfu/100ml וריכוז בקטריופאגים הוא 140-650 pfu/100ml. בקולחים מטופלים ע"י הפתתה וסינון נצפתה יעילות קטילה של 5-5.8 סדרי גודל של חיידקי קולי ממוצא צואתי ע"י קרינת U.V, ריכוז

חיידקי הקולי ממוצא צואתי בקולחים שעברו חיטוי ע"י כלור נקבעה על 2-80 cfu/100ml. באופן כללי נמצא כי במנת קרינה של 51 mWs/cm^2 יעילות הקטילה של חיידקי קולי בקולחים מטופלים הייתה יותר גבוהה ע"י חיטוי ב-U.V מאשר חיטוי ע"י כלור, איכות הקולחים לפי המדדים של עכירות וריכוז חיידקי קוליפורם ממוצא צואתי עומדים בתקן שנקבע לשימוש בלתי מוגבל בקולחים להשקיית גידולים חקלאיים. בקולחים מטופלים ע"י הפתתה וסינון נצפתה יעילות קטילה של $1.59-4.69$ סדרי גודל של חיידקי *C.perfringens* ע"י קרינת U.V. ריכוז חיידקי *C.perfringens* בקולחים שעברו חיטוי ע"י כלור נקבעה על $0-52 \text{ cfu/100ml}$. באופן כללי, נמצא כי במנת קרינה של 51 mWs/cm^2 יעילות הקטילה של חיידקי *C.perfringens* בקולחים מטופלים הייתה גבוהה ע"י קרינת U.V לעומת הכלורינציה למעט דיגום מספר 3, בו יעילות הקטילה של *C.perfringens* ע"י כלור הייתה גבוהה מיעילות הקטילה ע"י קרינת U.V. נצפתה יעילות קטילה של $2.15-2.81$ סדרי גודל של בקטריופאג ים בכל סוגי הקולחים לאחר הטיפולים השונים. נראה כי הבדלים ביעילות הקטילה בין קולחים שעברו חיטוי ע"י קרינת U.V לבין קולחים שעברו חיטוי בכלור לא היו גבוהים, כמו כן, אם נשווה את יעילות הקטילה בין המיקרואורגניזמים השונים נראה שיעילות הקטילה של חיידקי קוליפורם ממוצא צואתי הייתה יותר גבוהה מיעילות הקטילה של בקטריופאג ים ב-3 סדרי גודל, אפשר להסביר זאת מכיוון שהריכוז ההתחלתי של הבקטריופאג ים היה נמוך יחסית לחיידקי קולי ממוצא צואתי. תוצאות המחקר הנוכחי מצביעות על הפוטנציאל של קרינת UV לחיטוי קולחים שישמשו למטרות סביב תיות או להשקיית גידולים חקלאיים. לשימוש ב UV ישנן יתרונות על השימוש בכלור בשלושה מישורים עיקריים 1. אי יצירה של תוצרי לוואי מסרטנים 2. הרגישות של טפילים לקרינת UV לעומת עמידותם לכלורינציה 3. תחזוקה פשוטה של מתקני החיטוי ללא צורך באחסון של חומרים מסוכנים.

LOG(Ct/Co) יעילות הקטילה של:					
מס' דיגום	סוג טיפול	מנת UV (mWs/cm ²)	Fecal coliforms (cfu/100ml)	C.perfringens (cfu/100ml)	בקטריופאג'ים (pfu/100ml)
1	שניוני	N.D	6.3*10 ⁵	9250	610
	סינון+1 u.v	51	-5.02(6)	-3.12(7)	-2.79(1>)
	סינון+2 u.v	52	-5.02(6)	-3.36(4)	-2.79(1>)
	סינון+1 כלור	N.D	-4.22(38)	-2.74(17)	-2.79(1>)
	סינון+2 כלור	N.D	-4.28(33)	-2.32(44)	-2.79(1>)
2	שניוני	N.D	6.5*10 ⁵	לא ניתן לספירה	650
	סינון+1 u.v	51	-5.51(2)	-1.59(26)	-2.81(1>)
	סינון+2 u.v	51	-5.81(1)	-2.40(4)	-2.81(1>)
	סינון+1 כלור	N.D	-3.91(80)	-1.28(52)	-2.81(1>)
	סינון+2 כלור	N.D	-4.47(22)	-3(1>)	-2.81(1>)
3	שניוני	N.D	6.2*10 ⁵	97500	140
	סינון+1 u.v	51	-4.51(19)	-2.03(900)	-2.15(1>)
	סינון+2 u.v	52	-5.79(1>)	-4.69(2)	-2.15(1>)
	סינון+1 כלור	N.D	N.D	N.D	-2.15(1>)
	סינון+2 כלור	N.D	-5.49(2)	N.D	-2.15(1>)

טבלה 9. השוואת יעילות הקטילה של מיקרואורגניזמים שונים ע"י קרינת UV וכלור

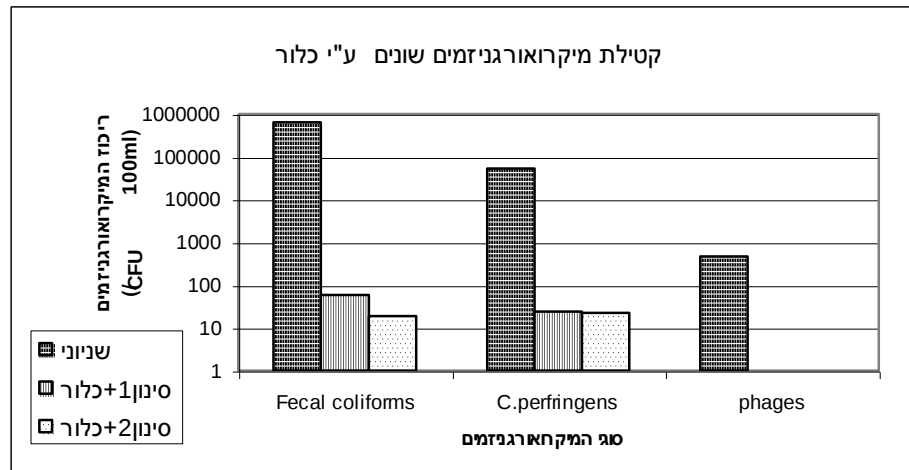
באיור מספר 17 מוצגות התוצאות של יעילות הקטילה של החיידקים Fecal coliform, *C.perfringens*, ו- בקטריופאג'ים, ע"י U.V במתקן לטיהור שפכים בכפר ויתקין. האיור מסכם תוצאות ממוצעי ריכוזים של המיקרואורגניזמים בשלושת תאריכי הדיגום המופעים בטבלה 9 של הקולחים ה שניונים, קולחים לאחר סינון עומק U.V+ (סינון 1), קולחים לאחר סינון עומק בתוספת מפתית U.V+ (סינון 2).



איור 17: יעילות הקטילה של *Fecal coliforms*, *C. perfringens* ו-phages ע"י קרינת U.V במתקן החלון.

ניתן לראות כי ריכוז חיידקי *Fecal coliforms* הופחת באופן משמעותי ע"י קרינת U.V, וכן תוצאות דומות נצפו עם חיידקי *C. perfringens*. ריכוז הקוליפאגיים היה מתחת לסף הגילוי לאחר קרינת U.V ב-2 סוגי הסינונים.

באיור מספר 18 מוצגות התוצאות של יעילות הקטילה של החיידקים *Fecal coliform*, *C. perfringens*, ו- בקטריופאגיים, ע"י U.V במתקן לטיהור שפכים בכפר ויתקין. באיור מוצגות תוצאות ממוצעי ריכוזים של המיקרואורגניזמים בשלושת תאריכי הדיגום המופעים של הקולחים השניים, קולחים לאחר סינון עומק U.V+ (סינון 1), קולחים לאחר סינון עומק בתוספת מפתית U.V+ (סינון 2).



איור 18: יעילות קטילת Fecal coliforms, C. perfringens ו-phages ע"י כלור במתקן החלוף.

ניתן לראות כי ריכוז חיידקי Fecal coliforms הופחת באופן משמעותי ע"י כלורינציה, וכן נוכל לראות תוצאות דומות עם חיידקי *C. perfringens*. לאחר הטיפולים בכלור ריכוז הבקטריופאגים נמצא בדומה לקרינת U.V מתחת לסף הגילוי של שיטת הגילוי.

5.14 בדיקות פיסיקליות

במחקר נבדקה ההשפעה של פילוג גודל החלקיקים ושל יעילות הסינון על יעילות החיטוי של הקולחים ב-U.V.

מנת ה-U.V נקבעה באמצעות שיטת PSS ותוך התחשבות בגיל המנורה, בעבירות של דגימות הקולחים ובזמן השהייה (שנקבע ע"י הספיקה). שיטת ה-PSS (Point Source Summation Method) היא שיטה מקובלת להערכה של העוצמה האמיתית הממוצעת במערכת ה-U.V (EPA, 1986).

כיוון שלא נמדדה העבירות בקולחים נלקחו הקריאות הרציפות של הסנסור הפוטואלקטרי הממוקם בדופן התא וקורא את עוצמת קרינת ה-U.V הנקלטת לאחר שעברה את התווך הנוזלי (עוצמת UV שאריתית). נמצא קשר בין עוצמת ה-U.V השאריתית לבין פילוג גודל החלקיקים, העכירות ויעילות קטילת מיקרואורגניזמים בקולחים שעברו סינון וחיטוי. עקבנו אחר השינוי בעוצמת ה-U.V השאריתית כפונקציה של העכירות ושל מספר החלקיקים הקטנים בגודלם מ-100µm במהלך מחזור סינון-חיטוי טיפוסי.