שימוש בקרינת אינפרא- אדום (IR)
בתהליך שימור חיידקים בהקפאה

עבודת גמר בתכנית אמירים לתלמידים מצטיינים המוגשת לפקולטה לחקלאות, מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית של האוניברסיטה העברית בירושלים

מוגש על ידי
ירדן לין

סיוון תשע"ט רחובות יוני 2019

עבודה זו נעשתה בהדרכת פרופסור עדו ברסלבסקי

החוג לביוכימיה ומדעי המזון
הפקולטה לחקלאות מזון וסביבה ע"ש רוברט ה. סמית
האוניברסיטה העברית בירושלים

תודות

בראש ובראשונה, תודה רבה למנחה שלי- פרופ' עדו ברסלבסקי, שנתן לי את ההזדמנות לחוות את עולם המדע. תודה על האיכפתיות, הסבלנות, המענה על כל השאלות שהטרידו אותי לאורך הדרך והיכולת לראות ולהראות לי את תמונת הפאזל המלאה גם כשלי היה נראה שאין אפשרות למצוא את החלקים בשביל להשלים אותה.

תודה לשלומית פרייס שהובילה את הפרויקט- תודה על לימוד השיטות, הנכונות לעזור והדחיפה לעצמאות.

תודה לכל חברי המעבדה: טובה פינסקי, שי שמש, מיכאל צ'סניצקי, חן אדר, אייל הבר, יוגב נעים, רותם יוסף, אקלאביה בויסוי, סיון בן בסט וסבטלנה פן על העזרה והתמיכה, מקצועית ואישית, ועל כך שזכיתי להכיר אתכם ולעבוד לצדכם. ללא ספק יצרתם סביבה מקבלת ועוטפת שנעים להיות בה. במיוחד, חשוב לי להודות לורה סירוטינסקיה על כך שתמכה בי מקרוב לאורך כל הדרך, עודדה ברגעים קשים ותרמה לי רבות מהידע שלה מבחינה מקצועית.

תודה נוספת לד"ר חיים חייט שעזר וייעץ בנוגע לעבודה עם מערכת הלייזר.

תודה לד"ר משה שמש מהמכון הוולקני, ולבנות המעבדה השכנה של ד"ר צבי חיוקה על הייעוץ והנכונות לעזור בכל הנוגע לעבודה עם חיידקים.

תודה לדוד שלי, פרופ' אבי אביטל, על העזרה עם ניתוחים הסטטיסטיים.

תודה לעינת זלינגר ודניאל ויגר מיחידת המיקרוסקופיה שסייעו לי עם עבודת המיקרוסקופ.

תודה לחבריי היקרים ולמשפחתי האהובה שתמיד היו נוכחים, התעניינו ותמכו כשהיה צריך.

ולסיום, תודה רבה לבן הזוג שלי, הדר, שהכיל את התקופה העמוסה הזו; תמך, עודד, ייעץ והיה מעורב בכל השלבים בדרך עד לסיום כתיבת העבודה. בלעדיו ככל הנראה לא הייתי מגיעה לנקודה הזו.

תוכן עניינים

תודות II

תוכן עניינים III

תקציר V

רשימת קיצורים VI

1. מבוא וסקירת ספרות 1

1.1 הצורך בשימור חיידקים 1

1.2 שיטות לשימור חיידקים 2

1.2.1 שימור חיידקים בהקפאה (Cryopreservation) 2

1.2.2 השימוש בגליצרול כ-CPA 3

1.2.3 שני צדדים למטבע: CPAs- הגנה אל מול רעילות 3

1.3 הנזקים הנגרמים בתהליכי ההקפאה וההפשרה של חיידקים 4

1.3.1 שלב הגדילה ותנאי הגידול 4

1.3.2 סוג החיידק 5

1.3.3 קצב ההקפאה וההפשרה 5

1.3.3.1 הקפאת התא החיידקי 5

1.3.3.2 הפשרת התא החיידקי 6

1.3.3.2.1 רה קריסטליזציה (IR) 6

1.4 שליטה על גדילת גבישי קרח באמצעות שימוש בקרינת לייזר 6

1.4.1 שליטה על גדילת גבישי קרח באמצעות שימוש בקרינת IR סלקטיבית 7

2. היפותזה ומטרות העבודה 8

3. שיטות וחומרים 9

3.1 חומרים, מצעי גידול ותמיסות 9

3.1.1 רשימת חומרים לפי חברה 9

3.1.2 הרכב מצעי גידול ותמיסות 9

3.2 מכשירים 9

3.3 זני חיידקים ותנאי גידול 10

3.4 הכנת תרחיף החיידקים לתחילת הניסויים 10

3.4.1 הכנת תמיסות חיידקים בריכוזי גליצרול שונים 11

3.4.2 הכנת דוגמאות החיידקים לפני הקפאה 11

3.5 בדיקת חיות החיידקים 11

3.5.1 בדיקת חיות על ידי זריעת מושבות וספירה - Colony Forming Unit (CFU) 11

3.5.2 צביעת Live/Dead ואנליזה מיקרוסקופית על ידי CLSM.....11
3.6 הכנת Micro-device.....11
3.7 המערכת הניסויית.....13
3.7.1 במה מקוררת בצורה מבוקרת.....13
3.7.2 המערכת האופטית.....13
3.8 שיטות ההקפאה וההפשרה.....14
3.8.1 שיטות ההקפאה.....14
3.8.2 שיטות ההפשרה.....14
3.9 מהלכי הניסויים.....14
3.9.1 בחינת השפעת השימוש בעוצמות קרינה שונות בתהליך ההפשרת החיידקים.....15
3.9.2 בחינת ההשפעה של מרכיבי תמיסת החיידקים על בליעת הלייזר.....15
3.9.2.1 בחינת השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים בתמיסה על בליעת הלייזר.....15
3.9.2.2 בחינת ההשפעה של ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר.....15
3.9.2.3 מדידת הבליעה.....15
3.9.3 פיתוח תהליך הפשרה מבוקר של החיידקים ע"י שימוש בקרינת IR במקביל להורדת אחוזי הגליצרול בתמיסה.....15
3.10 פיתוח שיטה לשליטה על זמני הארת הלייזר.....16
3.11 ניתוחים סטטיסטיים.....17
4. תוצאות.....18
4.1 בחינת ההשפעה של שימוש בעוצמות קרינת IR שונות בתהליך הפשרת חיידקי BL-21 *E. coli*.....18
4.2 השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים בדוגמא על בליעת הלייזר.....19
4.3 השפעת ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר......20
4.4 בחינת ההשפעה המשולבת של שיטת הפשרת חיידקי BL-21 *E.coli* בריכוזי גליצרול שונים......20
4.5 בחינת ההשפעה המשולבת של שיטת הפשרת חיידקי B. subtilis 3610 בריכוזי גליצרול שונים. .22
4.6 צביעת Live/Dead.....24
5. דיון ומסקנות.....25
5.1 פיתוח מערכת ניסויית.....25
5.2 בליעת הלייזר כתלות בצפיפות האופטית של החיידקים וריכוז הגליצרול בתמיסה.....26
5.3 פיתוח תהליך הפשרה מבוקר של חיידקי המודל תוך הורדת ריכוז הגליצרול בתמיסה.....26
5.4 סיכום.....26
מקורות.....29

תקציר

חיידקים מהווים רכיב מרכזי במדעי החיים והביוטכנולוגיה והם בעלי תפקיד מפתח במעבדות מחקר ובתעשיית המזון. לכן, אחזקתם השוטפת תוך שמירה על חיותם היא בעלת חשיבות רבה.
שימור בהקפאה (cryopreservation) הוא כלי חשוב המסייע בשימור חיידקים ובמגוון תחומים נוספים כמו שימור של תאים, רקמות ומוצרי מזון שונים לתקופת זמן ארוכה. אך, במצב הקפוא ובתהליך ההפשרה גבישי הקרח משנים את צורתם, דבר אשר עלול להוביל להשפעות הרסניות.
אחת התופעות המתרחשות בתהליך ההפשרה נקראת רה- קריסטליזציה, במהלכה גבישי קרח גדולים גדלים על חשבון גבישי קרח קטנים. גדילת גבישי הקרח מובילה לנזקים מבניים ואוסמוטיים במהלך ההקפאה וההפשרה. על מנת להשיג תהליך יעיל של שימור בהקפאה, יש צורך לשלוט בגדילת גבישי הקרח ולמזער את הנזקים הנגרמים כתוצאה מכך.
כיום, השימוש בגליצרול מהווה Gold-standard בשימור חיידקים בהקפאה למזעור של אותם נזקים. עם זאת, במקרים רבים על מנת לקבל אפקט משמעותי, יש צורך להוסיף ריכוזים גדולים של גליצרול לתמיסה שעתידה לעבור הקפאה. הבעייתיות היא שריכוזים אלו בפני עצמם עלולים להוביל לנזקים עבור התא החיידקי עקב רעילותם.
עבודה זו בוחנת את השימוש בקרינת אינפרא-אדום (IR) סלקטיבית בתהליך ההפשרה של חיידקי גרם שלילי וחיידקי וגרם חיובי במקביל להורדת ריכוז הגליצרול. על ידי שימוש בקרינה סלקטיבית זו, אשר מחממת את הקרח במידה רבה יותר מהמים, שיערנו כי נוכל לשלוט בגדילת גבישי הקרח בעת תהליך ההפשרה ובכך להוביל לשיפור באחוזי שרידות החיידקים.
במערכת הניסויית שלנו השתמשנו בקרינת הלייזר המתאימה, באורך גל של 1540 nm, במקביל לחימום תרמי של הדוגמא. על מנת ליצור הפשרה אחידה של הדוגמא כולה, פיתחנו micro-device שמכיל גומה בעלת קוטר ועומק התואמים את הפרמטרים של קרן הלייזר.
הראנו כי כאשר הפשרת חיידקי *B. subtilis* 3610 וחיידקי *E. coli* BL-21 שהוקפאו ללא גליצרול בוצעה בעזרת שימוש בלייזר, חל שיפור של 31% ו- 12% בשרידות החיידקים, בהתאמה, בהשוואה להפשרה ללא לייזר. יחד עם זאת, כאשר החיידקים הוקפאו בתמיסת 5% גליצרול, השיפור באחוזי השרידות נצפה רק עבור חיידקי *E. coli* BL-21. עבור שני סוגי החיידקים מצאנו כי כאשר ההפשרה מתבצעת בעזרת לייזר, ניתן להפחית את השימוש בגליצרול מ- 20% ל- 5% ללא פגיעה באחוזי השרידות.
עבודה זו מציגה בפעם הראשונה את האפשרות להשתמש בקרינה סלקטיבית בתהליך ההפשרה של חיידקים, ופותחת דלת ליישום השיטה עבור מערכות ביולוגיות נוספות.

רשימת קיצורים

- **CFU-** Colony forming unit
- **Clm-** Chloramphenicol
- **CLSM-** Confocal laser scanning microscope
- **CPA-** Cryo-protectant additive
- **DDW-** Double distilled water
- **D.C-** Duty cycle
- **DMSO-** Dimethyl sulfoxide
- **IR-** Infrared
- **LB-** Luria- bertani
- **LBA-** Luria- bertani agar
- **NIR-** Near infrared
- **OD_{600}-** Optical density at 600 nm
- **PBS-** Phosphate buffered saline
- **PDMS-** Polydimethylsiloxane
- **PI-** Propidium iodide

1. מבוא וסקירת ספרות

1.1 הצורך בשימור חיידקים

אנו חיים בתוך "עולם מיקרוביאלי" שוקק חיים שבו מיקרואורגניזמים מיקרוסקופיים שאינם נראים לעין מאכלסים כמעט כל נישה ביולוגית שניתן להעלות על הדעת. קרקע, אוויר, מים, צמחים ובעלי החיים מהווים אתר מחיה של מספר גדול מאוד של מיקרואורגניזמים מסוגים ומינים רבים המשתייכים למגוון רחב של משפחות ותת משפחות. לפיכך, חיידקים הם רכיב מרכזי במדעי החיים והביוטכנולוגיה, ונמצאים בשימוש לייצור תעשייתי כמו דלקים ומוצרי מזון וכן משמשים ככלי ללימוד ומחקר[1].

מעבדות מחקר רבות מגדלות מגוון חיידקים המהווים רכיב מפתח לתוכניות מחקר ולתהליכים תעשייתיים. מבחינה מחקרית, החומר הביולוגי המשמש למחקר ולאיסוף המידע חייב להיות זמין לשם וידוא התוצאות ולשם מחקרים עתידיים או מחודשים כאשר נכנסת טכנולוגיה חדישה[1,2].

מקורות ביולוגיים אלו של זני חיידקים שונים נדרשים אם כן להישמר ללא שינוי, גם לאחר מספר מחזורי הקפאה והפשרה, על מנת להבטיח את יכולת שיחזור התוצאות ואת המשכיות המחקר. על כן, המטרה העיקרית בשימור ואיחסון בהקפאה של זנים מיקרוביאליים היא לשמור על המורפולוגיה, הפיזיולוגיה והיציבות הגנטית שלהם בתנאי מעבדה[3].

אחד מתחומי המחקר הבולטים בשנים האחרונות הוא חקר המיקרוביום וחיידקים פרוביוטיים. לפי ה-FAO של ארגון הבריאות העולמי (WHO), חיידקים פרוביוטיים, כאשר נצרכים בכמות מספקת, עשויים להטיב עם בריאותו של האדם על ידי כך שמשמרים או משפרים את האיזון החיידקי במעי [4]. ישנם ממצאים מדעיים רבים התומכים בכך ששימור ותחזוקת בריאות המיקרופלורה של המעי עשויים לספק הגנה מפני מגוון מחלות, הכוללות בין היתר מחלות גסטרו-אינטסטינליות, מחלות לב וכלי דם, דכאון והשמנה[5–8].

כמו כן, תרביות חיידקים פרוביוטיים וחיידקים נוספים נמצאים בשימוש בתעשיית המזון והתזונה לשם הכנת מגוון מוצרים כמו בירות, לחם ומוצרי חלב כמו יוגורטים, לבן וגבינות[4]. קיים צורך כי תרביות אלו תשמרנה על אחידותן מבחינה מורפולוגית וגנטית בבדי להבטיח ייצור תעשייתי עקבי, אחיד ויעיל. לכן, גם מצד תעשיית המזון והתזונה ישנה חשיבות רבה למצוא את התנאים האופטימליים לשרידות חיידקים לטווח ארוך וללא פגיעה מהותית.

1.2 שיטות לשימור חיידקים

במהלך השנים פותחו מספר שיטות ופרוטוקולים לשימור חיידקים, הן לשם יצירת מאגר לשימושי מחקר והן בבדי לאפשר שימור ארוך טווח לשימושי תעשיית המזון והתזונה.

במקרה האחרון, יבוש בהקפאה (freeze- drying) נפוץ יותר לשימוש, שכן במרבית המקרים החיידקים מוספים במצבם היבש למוצרי מזון, תוספי מזון או תרופות[4].

שימור בהקפאה (cryopreservation), בפרט במחקרים מעבדתיים, הינה השיטה הנפוצה ביותר לשימור חיידקים שכן בהשוואה לשיטת הייבוש בהקפאה הדורשת שימוש במכשור ייחודי או פורמולציות שונות, בשיטה זו אין צורך בציוד מיוחד (מלבד פריזר בטמפרטורה של ‎-80 °C‎ או חנקן נוזלי). כמו כן, כאשר החיידקים מוספים למוצרים חלב העוברים תסיסה כמו יוגורטים ולבן או לגלידות, יש לשמרם בהקפאה[1,4].

1.2.1 שימור חיידקים בהקפאה (cryopreservation)

שימור בהקפאה הוא השימוש בטמפרטורות נמוכות מאוד על מנת לשמר בשלמותם מבני תאים חיים למשך זמן ממושך, תוך שמירה על תפקודם לאחר הפשרה[9]. בטמפרטורות נמוכות ישנה האטה משמעותית של ריאקציות ביולוגיות וכימיות וירידה באחוז המים הנוזליים עקב הפיכתם לקרח, מה שמאפשר שימור יעיל לאורך זמן[10].

ישנם אורגניזמים בטבע המכונים אקסטרמופילים אשר פיתחו אסטרטגיות גנטיות שונות המאפשרות להם לחיות בתנאי קיצון. תחת קבוצה זו ישנם חיידקים פסיכרופילים אשר מסוגלים לחיות בסביבה בעלת טמפרטורה שלילית[11]. עבור אורגניזמים וביניהם סוגי חיידקים רבים חסרי אסטרטגיות גנטיות אלו, אשר אינם מסוגלים להתמודד עם טמפרטורות נמוכות ללא התערבות חיצונית, פותחו שיטות הכוללות הוספת חומרי שימור בקור (CPA; Cryo-protectant additive) לתמיסת התאים שעתידה לעבור הקפאה והפשרה.

CPA זהו מונח המתאר כל חומר שניתן להוסיף לתאים טרם הקפאתם ומוביל לאחוזי שרידות גבוהים יותר לאחר הפשרה מאלו אשר היו מתקבלים ללא נוכחותו[12]. ה- CPAs כוללים מגוון רחב של חומרים, כאשר נהוג לחלקם לשתי קבוצות עיקריות. הקבוצה האחת מכילה חומרים שיכולים לחדור את ממברנת התא, וביניהם Dimethyl sulfoxide (DMSO) וגליצרול[13]. בעוד הקבוצה השנייה מכילה חומרים שאינם מסוגלים לחדור את ממברנת התא, וביניהם 2-methyl-2,4-pentanediol, פולימרים שונים כמו polyvinyl pyrrolidone ומגוון סוכרים[14,15].

הבחירה בסוג החומר המגן תלויה בתאים אשר רוצים לשמר, כאשר עבור תאים שמקורם ביונקים השימוש העיקרי הוא ב-DMSO ועבור מיקרואורגניזמים הגליצרול הוא הנפוץ ביותר לשימוש[16].

1.2.2 השימוש בגליצרול כ-CPA

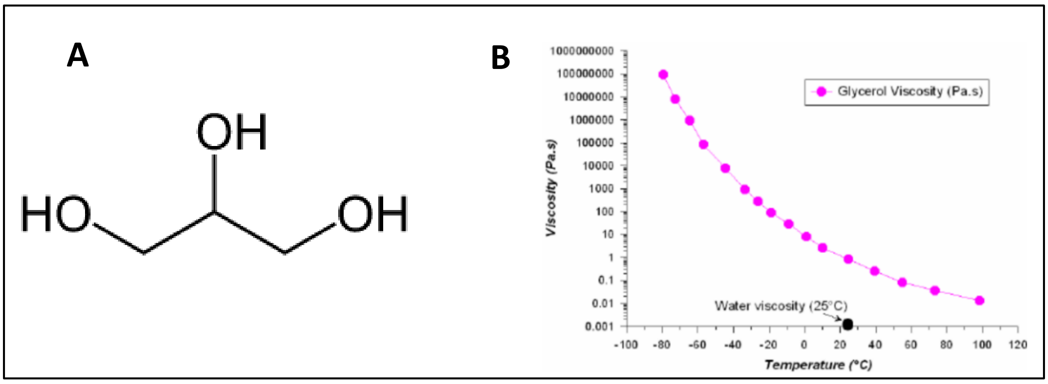
גליצרול הינו ה-CPA היעיל הראשון שתועד בספרות, אשר נמצא במקרה על ידי הקבוצה של Polage ועמיתיו[17,18]. זהו חומר בעל קבוצות הידרוקסיל המקנות לו מסיסות גבוהה במים (איור 1, A) ונמצא כי הוא בעל רעילות נמוכה לתאים חיים במידה והחשיפה אליו קצרת טווח. הגליצרול יכול ליצור אינטראקציות של קשרי מימן עם המים ויכול לחדור בקלות דרך ממברנת התא המגבילה של סוגי תאים רבים. תאים יכולים לסבול חשיפה לגליצרול בריכוזים של 1-5 mol/l, כתלות בסוג התא ובתנאי החשיפה[12].

המנגנון המדויק המסביר את תרומתו של הגליצרול בתהליכי ההקפאה וההפשרה של תאים חיים טרם פוענח עד תום, אך ישנן תאוריות אפשריות שונות שתוארו לאורך השנים. Lovelock הציע כי הגליצרול מגן על התאים על ידי כך שחודר את ממברנת התא ומפחית את העלייה בריכוז האלקטרוליטים בתוך התא ומחוצה לו (ובפרט של נתרן כלורי NaCl שהוא המרכיב העיקרי של רוב המדיום התאי), ובבך מונע את ההגעה לריכוז המלחים הקריטי הגורם לנזק[19]. Mazur טוען כי האפקט המועיל של הגליצרול קשור בהגנתו על פני השטח של התא יותר מאשר בעובדה שהוא חודר את ממברנת התא[20]. Ray הוסיף כי גליצרול מונע את הנזק שעלול להיגרם ל- DNA חד ודו גדילי בעת ההקפאה[21].Giese סבר כי בעת הוספת גליצרול לתרחיף של תאים, חלק ממנו חודר לתוך התא ועל ידי כך יורדת טמפרטורת הקיפאון הן בנוזל התוך תאי והן בנוזל מדיום התא. כך גם בעת הקפיאה כמות הקרח שתיווצר תהיה קטנה יותר והגבישים יהיו קטנים יותר עקב קשרי המימן שבין הגליצרול למים[22]. כמו כן, הצמיגות ההולכת ועולה של הגליצרול בעת הורדת הטמפרטורה (איור 1, B) זוהי תכונה נוספת שעשויה לעכב או לדחות את גדילת גבישי הקרח על בסיס קינטי[12].

1.2.3 שני צדדים למטבע: CPAs- הגנה אל מול רעילות

על פניו נראה כי השימוש ב- CPAs בעל היבטים מועילים רבים במזעור ומניעת נזקי ההקפאה. אך, כאשר נעשה שימוש בריכוזים גבוהים מדי של CPA או לחלופין ב-CPA שאינו מתאים עבור סוג התא הספציפי העובר הקפאה, החשיפה לחומר המוסף עלולה להוביל לרעילות עבור התאים ולהוריד את אחוזי שרידותם לאחר ההפשרה[16].

על אף ש- DMSO וגליצרול הם ה- CPAs הנפוצים ביותר לשימוש עבור תאים שמקורם ביונקים וחיידקים, בהתאמה, לחומרים אלו ישנם מספר חסרונות. ראשית, נדרשים ריכוזים גבוהים שלהם בתמיסה על מנת לקבל אפקט מיטבי (10-25 wt %). שנית, הם עלולים לגרום לרעילות ולכן נדרשת הוספה זהירה שלהם לתמיסת ההקפאה והסרה מהירה לאחר הפשרה בכדי לשמור על חיות התאים. ושלישית, הם אינם מובילים להתאוששות מלאה של כל התאים כפי שלעיתים נדרש[16,23].



איור 1: (A) מבנה הגליצרול. **(B)** צמיגות הגליצרול כתלות בטמפרטורה[53].

1.3 הנזקים הנגרמים בתהליכי ההקפאה וההפשרה של חיידקים

נשאלת השאלה; מה הנזקים הנגרמים לתא החיידקי כחלק מתהליך השימור בהקפאה ומה המנגנון המוביל להופעת נזקים אלו.

תאים קטנים, כמו אלו של מיקרואורגניזמים, באופן כללי עמידים יותר להקפאה בהשוואה לתאים גדולים יותר כמו אלו של צמחים או בעלי חיים[24]. כמו כן, בקרב מיקרואורגניזמים, תאים קטנים במיוחד כמו אלו של חיידקים מראים עמידות גדולה יותר להקפאה והפשרה בהשוואה לשמרים או תאים אחרים גדולים יותר[24]. על אף שמצטייר כי בסביבה בעלת טמפרטורה שלילית גודל התא הקטן של החיידקים מהווה יתרון עבורם בהשוואה לתאים גדולים מהם, אחוז גדול מהחיידקים נפגעים ומתים תחת תנאי קור קיצוניים. בשנת 1959 הראו straka ו- stokes , שתרחיף חיידקים שהוקפא והופשר מכיל בנוסף לתאים שמתו ולתאים שלמים ונורמליים, גם תאים שניזוקו במהלך התהליך[25].

ישנם גורמים רבים שיכולים להשפיע על שיעור הנזק הנגרם לתא החיידקי במהלך הקפאתו והפשרתו, ואלו כוללים את שלב הגדילה בו מצוי החיידק, תנאי הגידול, סוג החיידק והקצב שבו הוא עובר הקפאה והפשרה.

1.3.1 שלב הגדילה ותנאי הגידול

ככלל, ההנחה הרווחת היא שתאים שאינם גדלים הם בעלי עמידות גבוהה יותר לגורמי דחק שונים בהשוואה לתאים המצויים בגדילה מתמדת. ואכן, נמצא כי חיידקים הנמצאים בפאזת הגדילה הלוגריתמית (Exponential phase) בעלי רגישות רבה יותר לתוצאות הלטאליות של ההקפאה בהשוואה לחיידקים הנמצאים בפאזת הגדילה הסטציונרית (stationary phase). כמו כן, תנאי גידול שונים, כגון הרכב מצע הגידול, טמפרטורת ההדגרה והאוורור, בעלי השפעה על מצבו הפיסיולוגי של התא ועל חדירות ממברנת התא ולכן בעלי השפעה על רגישותו של התא לתהליכי ההקפאה וההפשרה[26].

1.3.2 סוג החיידק

כל סוג חיידק מגיב בצורה שונה לנזקי ההקפאה וההפשרה, ואף תתכן תגובה שונה של זני חיידקים שונים מאותו סוג שיעברו את אותה שיטה של שימור בהקפאה[3].

ככלל, נהוג לחלק את החיידקים לפי מבנה דופן התא לגרם שליליים וגרם חיוביים. חיידקי גרם חיוביים בעלי שכבה חיצונית של דופן עבה ויחסית בלתי חדירה המורכבת משכבת פפטידוגליקן, בעוד שחיידקי גרם שליליים בעלי שכבת פפטידוגליקן דקה הממוקמת בין שתי ממברנות[27]. דופן התא החיידקי מהווה תפקיד חשוב בעמידות החיידקים להקפאה והפשרה[28]. שכבות הפפטידוגליקן הרבות של חיידקי גרם חיוביים תורמות ביצירת מבנה תא קשיח, המאפשר את הגדלת העמידות הן לעקות מכאניות (כמו הקפאה והפשרה) והן לעקות כימיות, וזו אחת הסיבות לכך שהוא עמיד יותר לנזקי ההקפאה בהשוואה לחיידקי גרם שליליים[29]. הסבר נוסף לשוני בעמידות החיידקים הוא ההבדלים בחדירותם למים[30].

1.3.3 קצב ההקפאה וההפשרה

במהלך תהליך ההקפאה וההפשרה, ישנם מספר מנגנונים שניתן לצפות כי יובילו לנזק עבור התא החיידקי. שניים מהם כוללים היווצרות קרח חוץ תאי והיווצרות קרח תוך תאי, כאשר שניהם מושפעים מקצב ההקפאה וההפשרה[31,32].

1.3.3.1 הקפאת התא החיידקי

לתנאי ההקפאה, הכוללים את קצב ירידת הטמפרטורה ואת הטמפרטורה אליה מגיע החומר הקפוא, ישנה השפעה רבה על הנזקים המתרחשים בתא החיידק[33]. כאשר קצב הקירור איטי וטמפרטורת ההקפאה הסופית גבוהה יחסית מתרחשת קפיאה חוץ תאית. מכיוון שהציטופלסמה מרוכזת יותר בהשוואה למדיום, המים במדיום קופאים לפני קפיאתם בתוך התאים ובכך מובילים להגדלת ריכוז המומסים במדיום[34]. ההבדל בריכוז המומסים בתוך התא לעומת ריכוזם מחוץ לתא יוצר לחץ אוסמוטי וכתוצאה מכך מים יוצאים מהציטופלסמה לנוזל החוץ תאי, כאשר קצב יציאת המים מוגבל בהתאם לחדירותו של התא למים[30,34]. בסופו של דבר המים שהתא איבד מתגבשים גם הם מחוץ לתא, וכך גורמים להגדלת הלחץ האוסמוטי והתא ממשיך לאבד מים ומתכווץ בעוד ריכוז המומסים בתוך התא עולה משמעותית[35]. לעומת זאת, כאשר קצב הקירור בהקפאה מהיר וטמפרטורת ההקפאה הסופית נמוכה, המים אינם מספיקים לצאת מתוך התא החוצה, ולכן נוצרים גבישי קרח תוך תאיים[10]. הן קפיאה חוץ תאית והן קפיאה תוך תאית מובילים לנזק בתא בחיידקי[10,26].

קיים מגוון רחב של חיידקים בטבע ועבור כל חיידק יש למצוא את קצב ההקפאה האופטימלי עבורו. עבור החיידק *E. coli*, לפי Mazur, קצב ההקפאה האופטימלי נע בין 500 °C לדקה לבין 1 °C לדקה כאשר בקצב מהיר או איטי מהטווח שצוין נמצאה תמותה גדולה יותר של החיידק[36]. Swartz מצא כי במהירויות הקפאה של 300 °C לדקה מספר הנותרים בחיים רב יותר מאשר במהירויות הקטנות

מ- 1 °C לדקה[37]. לעומתם, Nei et al מצאו כי בהקפאה ל- 150 °C, טווח המהירויות של 0.1 °C עד 1 °C לדקה נמצא כאופטימלי לחיידקים, אך כאשר הוגברה מהירות ההקפאה מעל ל- 10 °C לדקה, חלה ירידה במספר החיידקים שנותרו בחיים לאחר ההפשרה[38].

1.3.3.2 הפשרת התא החיידקי

בהשוואה לנזקי תהליך ההקפאה, הנזקים המתרחשים בתהליך ההפשרה והחימום נחקרו בצורה מעטה לאורך השנים. אך, בשנים האחרונות מחקרים מצביעים על כך שקצב ההפשרה הינו פרמטר חשוב אשר משפיע רבות על מידת הנזק הנגרם לתא שעובר הפשרה[39,40].

במהלך החימום, ובזמן הנדרש להגעה לטמפרטורת ההמסה, נוקלאציה וגדילת גבישי קרח נוספים יכולה להתרחש. בתהליך ההפשרה, כאשר הטמפרטורה שלילית, גבישי קרח קטנים שנוצרו בעת ההקפאה עלולים להתמזג לכדי גבישים גדולים יותר בתהליך המכונה רה-קריסטליזציה[15].

1.3.3.2.1 רה- קריסטליזציה (IR)

רה-קריסטליזציה הינו Ostwald ripening process, במהלכו גבישי קרח גדולים גדלים על חשבון גבישי הקרח הקטנים, כאשר סך כל נפח הקרח בדוגמא נותר קבוע[20]. תופעת הרה-קריסטליזציה הוסברה על ידי אפקט Gibbs-Thomson הטוען כי טמפרטורת ההתכה תלויה בעקמומיות. משמעות הדבר היא שלחלקיק קטן ישנו יחס שטח פנים לנפח גדול בהשוואה לחלקיק גדול ממנו, ועל כן טמפרטורת התכה גבוהה יותר[41]. הגדילה של גבישי הקרח בתוך או מחוץ לתא, עלולה להוביל לפגיעה מכאנית בממברנת התא וכתוצאה מכך אף למוות התא. מחקרים מראים כי על ידי הפשרה מהירה ניתן למזער את נזקי הרה קריסטליזציה[39,40].

1.4 שליטה על גדילת גבישי קרח באמצעות שימוש בקרינת לייזר

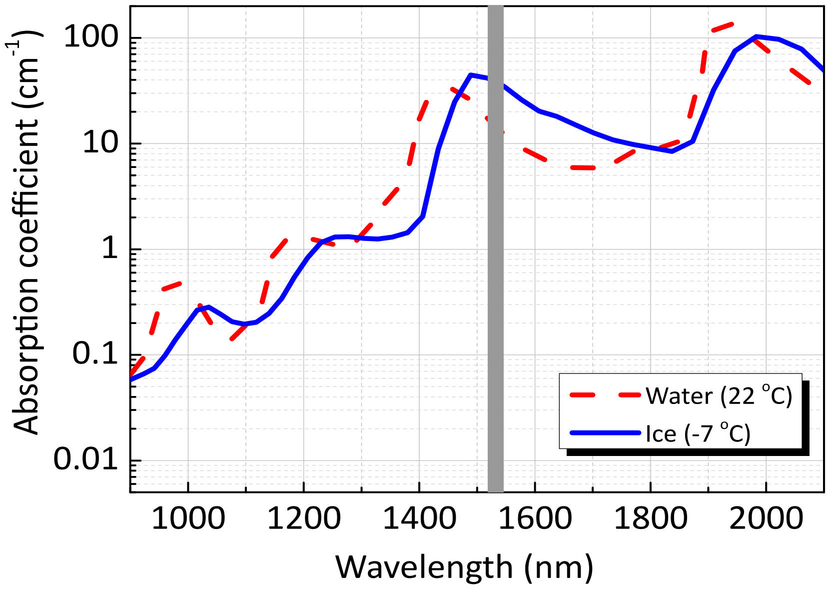
אחד הפתרונות להשגת קצב הפשרה מהיר, הוצע על ידי Mazur ועמיתיו. במחקרם הם הצליחו לקבל קצב הפשרה מהיר מאוד על ידי חימום בלייזר בשילוב השימוש בדיו שחור (carbon black), שנועד להגביר את בליעת הלייזר בתמיסה. עבודה זו הצליחה להשיג אחוזי שרידות גבוהים של ביציות עכברים לאחר הפשרה[40,42]. בהמשך לעבודה זו, נעשו ניסיונות נוספים לבצע הפשרה מהירה של ביציות דג זברה (Zebrafish) באמצעות שימוש בלייזר ובשילוב השימוש בננו-חלקיקים (gold) nanoparticles כגורם המגביר את בליעת הלייזר [39].

1.4.1 שליטה על גדילת גבישי קרח באמצעות שימוש בקרינת אינפרא- אדום (IR) סלקטיבית

בהמשך לניסויים אלו, המצביעים על תועלת רבה בהפשרה מהירה באמצעות לייזר, נעשו מחקרים במעבדתנו שבחנו את האפשרות להשתמש בקרינת לייזר סלקטיבית שתבלע ישירות בקרח ללא צורך בהוספת חומרים המגבירים את הבליעה[43].

כאשר בוחרים באורך גל ספציפי, קרינת IR יכולה להיבלע בקרח יותר מאשר במים ומכאן להוביל לחימום הקרח בצורה רבה מזו של המים[44]. על בסיס מידע זה, בשנת 2001, Ulman שיער כי ניתן יהיה להשתמש בקרינה זו, הסלקטיבית לקרח, בתור כלי לשליטה על גדילת גבישי קרח ליישומים שונים בתחום הקריוביולוגיה[45].

במחקר קודם במעבדתנו נעשה שימוש בקרינה באורך גל של 1540 nm, אשר נמצא כי נבלעת על ידי הקרח פי שלושה מאשר זו הנבלעת על ידי המים[43] (איור 2).



איור 2: מקדמי הבליעה של קרח ומים בתחום האינפרא אדום הקרוב (NIR)[44,54].
הקו הכחול הרצוף מבטא את ספקטרום הבליעה של קרח. הקו האדום המקווקו מבטא את ספקטרום הבליעה של מים. הקו האפור המאונך מבטא את אורך הגל הסלקטיבי לקרח (1540 nm).

2. היפותזה ומטרות העבודה

הפתרון המרכזי כיום לשימור חיידקים בהקפאה הוא שימוש בריכוזים גבוהים של גליצרול, אשר מצד אחד מאפשרים את שרידות התאים אך מצד שני עלולים לגרום לאפקט רעיל עבור חיידקים מסוימים. אם כן, קיים צורך במציאת פתרון המאפשר את הורדת ריכוזי הגליצרול בתהליך ההקפאה ללא פגיעה מהותית בחיות החיידקים.

השערתנו המרכזית היא שקרינת IR באורך גל של 1540 nm הסלקטיבית לקרח, כלומר נבלעת בקרח יותר מאשר במים, תוכל לסייע בהפחתת הנזקים של גדילת גבישי קרח על אף שבמצע ישנו ריכוז מינימלי של גליצרול. להערכתנו, השימוש בקרינה סלקטיבית זו תוביל לחימום הקרח בצורה משמעותית ללא חימום יתר הדוגמא ותסייע להפחית את הנזקים הנגרמים בעת תהליך ההפשרה, כמו תהליך הרה-קריסטליזציה. בצורה זו אנו מצפים כי נוכל להפחית את השימוש בגליצרול מבלי להוריד את אחוזי שרידות החיידקים בצורה משמעותית.

מטרת העל של העבודה היא לבחון את השימוש בקרינת IR סלקטיבית בעת ההפשרה בתהליכי שימור בהקפאה.
לצורך כך מטרת העבודה הספציפית התמקדה בבחינת הורדת ריכוז הגליצרול בתהליך שימור בהקפאה של חיידקי *E.coli* BL-21 וחיידקי *B. Subtilis* 3610 , בשילוב השימוש בקרינת IR באורך גל של 1540 nm בעת ההפשרה, תוך שיפור אחוזי שרידות החיידקים.

<u>לשם יישום מטרה ספציפית זו הוגדרו מטרות הביניים הבאות:</u>

1. בחינת השפעת השימוש בעוצמות קרינת IR שונות בתהליך ההפשרה על הישרדות החיידקים.
2. בחינת השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים על בליעת הלייזר.
3. בחינת ההשפעה של ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר.
4. פיתוח תהליך הפשרה מבוקר של חיידקי המודל על ידי שימוש בקרינת IR במקביל להורדת אחוז הגליצרול בתמיסה.

3. שיטות וחומרים

3.1 חומרים, מצעי גידול ותמיסות

3.1.1 רשימת חומרים לפי חברה

Difco Laboratories, Detroit, MI, USA: Bacto Agar, Bacto Yeast Extract.

Molecular Probes, Inc. (RO, USA): L13152 LIVE/DEAD® BacLight™ Bacterial Viability Kit.

Romical, Beer-Sheba, Israel: Glycerol.

Sigma, Rehovot, Israel: Chloramphenicol, SYLGARD®184 Silicone Elastomer Kit.

University Wafer, Boston MA, USA: Silicon Wafers.

3.1.2 הרכב מצעי גידול ותמיסות

LBA growth media 40 gr Bacto agar, 20 gr Bacto Yeast Extract in 1L DDW.

PBS*10 buffer: 40 gr NaCl (137mM), 1gr KCl (2.7 mM), 3.05gr Na_2HPO_4(4.3 mM), 1 gr KH_2PO_4(1.4mM)/ up to 1L DDW, adjusted to PH 7.4.

בופר ה-PBS*10 נמהל פי 10 לקבלת PBS*1 עמו בוצע הניסוי.

Chloramphenicol: 34 mg/ml in EtOH.

3.2 מכשירים

Centrifuge- model HERMLE Z-300K, Labotal.

Confocal Laser Scanning Microscope- model Leica SP8.

Function/ Arbitrary Waveform Generator- model 33120A, Agilent.

Inverted Microscope- model TE2000-U, Nikon eclipse.

Laser Power Meter- model FieldMax-TOP, no. 0440L04, COHERENT.

Single-mode 10-μm fiber 1540 nm- model KPSBT2-TFL-1550-20-FA, Keopsys

Oscilloscope- model TDS-2012, Tektronix.

Plasma Cleaner- model PDC-32G, Harrick.

Spectrophotometer- Genesys50, ThermoScientific.

Spin Coater- model SPIN-1200D, Midas System.

Temperature Controller- model 3040, New-port Corporation.

3.3 זני חיידקים ותנאי גידול

במחקר זה נעשה שימוש בשני זני חיידקים; *Escherichia Coli* BL-21(DE3)pLysS , המכונה בעבודה זו *E. coli* BL-21 ו- (WT) *Bacillus subtilis* NCIB3610 , המכונה *B. subtilis* 3610.

זן החיידקים האחרון נלקח ממעבדתו של ד"ר משה שמש מהמכון הוולקני.

חיידקים אלו נשמרו בהקפאה בטמפרטורה של ‎-80 °C‏ בתמיסת LB המכילה 20% גליצרול.

החיידקים אוששו על ידי זריעת בידוד על צלחת LBA וגודלו במשך לילה ליצירת מושבות. חיידקי *E. coli* BL-21 גודלו על צלחות המכילות אנטיביוטיקת Clm (chloramphenicol) 1:1000 בטמפרטורה של ‎37 °C‏, וחיידקי *B. subtillis* 3610 גודלו על צלחות ללא אנטיביוטיקה בטמפרטורה של ‎27 °C‏.

ממושבות אלו נלקחו חיידקים לביצוע הניסויים. גידול החיידקים התבצע במצע LB נוזלי (3 ml) אשר הוכנס לטלטול בתנאים אירוביים למשך לילה בטמפרטורה של ‎37 °C‏. חיידקי *E. coli* BL-21 גודלו במצע נוזלי זה שהכיל אנטיביוטיקת Clm 1:1000 במהירות טלטול של ‎200 RPM‏. חיידקי *B.subtillis* 3610 גודלו במצע ללא אנטיביוטיקה במהירות טלטול של ‎180 RPM‏.

בבדי לבצע גידול מושבות לספירה, נזרע נפח של 40 µl על צלחות LBA והחיידקים גודלו למשך לילה בתנאים שתוארו לעיל.

3.4 הכנת תרחיף החיידקים לתחילת הניסויים

מתרחיפי הגידול שתוארו בסעיף 3.3 נלקח נפח של 1 ml לסרכוז במכשיר צנטריפוגה במשך 2 דקות ובטמפרטורה של ‎4 °C‏. עבור חיידקי *E. coli* BL-21 הסרכוז התרחש במהירות 8,000 RPM ועבור חיידקי *B. subtilis* 3610 הסרכוז התרחש במהירות ‎10,000 RPM‏. בסיום הסרכוז החיידקים הושקעו והנוזל העליון הוצא. משקע החיידקים הורחף ב- 1 ml של PBS סטרילי, ולאחר מכן בוצע סיבוב נוסף של סרכוז והרחפה ב-PBS. בשלב הבא, נמדדה בליעה במכשיר הספקטרופוטומטר והחיידקים נמהלו ב- PBS לקבלת $OD_{600nm}=0.2$, המוערך כריכוז של $1.6X10^{8}$ CFU/ml.

3.4.1 הכנת תמיסות חיידקים בריכוזי גליצרול שונים

מריכוז החיידקים ההתחלתי (המתואר בסעיף 3.4), הוכנו דוגמאות חיידקים בריכוזי גליצרול שונים (0%, 5%, 20%) על ידי העברת 100 µl חיידקים למבחנת 1.7 מ"ל והוספה של גליצרול ו-PBS לקבלת נפח סופי של 200 µl .

3.4.2 הכנת דוגמאות החיידקים לפני הקפאה

5 µl מתמיסות החיידקים בריכוזי הגליצרול השונים נמהלו ב- PBS, נזרעו וגודלו כמתואר בסעיף 3.3. חיידקים אלו שימשו כביקורת, כלומר לא עברו הקפאה. שארית התמיסות המיועדות להקפאה נשמרו במי קרח.

3.5 בדיקת חיות החיידקים

3.5.1 בדיקת חיות על ידי זריעת מושבות וספירה - Colony Forming Unit (CFU)

בוצעה סדרת מיהולים עשרוניים ודוגמא בנפח של 40 µl נזרעה וגודלה בהתאם לתנאים שתוארו בסעיף 3.3. צלחות עליהן גדלו 20-200 מושבות נספרו (CFU). ריכוז החיידקים המבוטא ב-CFU/ml חושב בהתאם למיהול ולנפח הדוגמא שנזרעה.

3.5.2 צביעת Live/Dead ואנליזה מיקרוסקופית על ידי Confocal Laser Scanning Microscopy (CLSM)

למבחנות שהכילו 100 µl תמיסת חיידקים ב-PBS הוספו 2.5 µl מכל צבע ובוצע ערבוב[46]. הצבעים שהוספו הינם SYTO-9 הצובע חיידקים חיים בירוק ו- propidium iodide הצובע חיידקים מתים באדום. הדוגמאות נשמרו בחושך ונלקחו לצפייה תחת מיקרוסקופ קונפוקלי (CLSM).

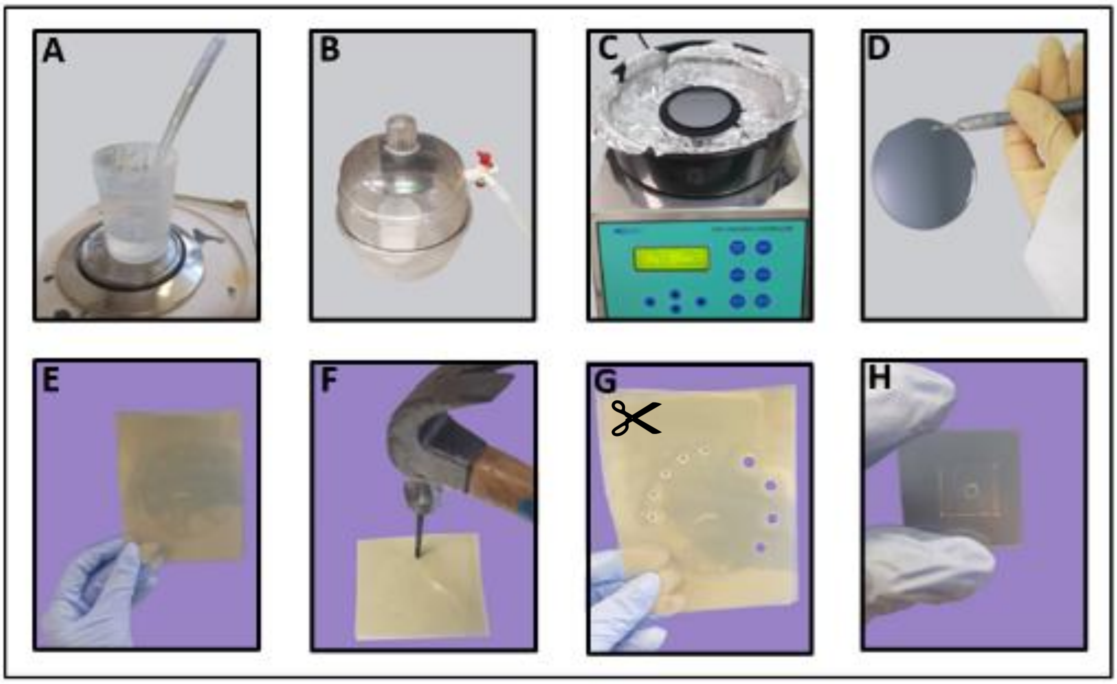
3.6 הכנת Micro-device

על מנת להשיג הפשרה אחידה של כל דוגמת החיידקים, היה צורך לפתח Micro-device התואם את הפרמטרים של קרן הלייזר. קוטר קרן הלייזר הוא 3 mm ובבדי שהדוגמא כולה תיחשף בצורה מיטבית לקרינת הלייזר, יצרתי גומה של 2 mm. כמו כן, עומק הדוגמא הנדרש בכדי להשיג בליעה אופטימלית ואחידה של שכבות הדוגמא חושב לערך של כ-200 µm.

את ה-Micro-device יצרתי בעזרת polydimethylsiloxane (PDMS). שני החומרים מ- SYLGARD®184 Silicone Elastomer Kit הוספו לכוס פלסטיק ביחס של 1:10 פולימר (base): מפלמר (curing agent). החומרים עורבבו יחד באופן ידני בעזרת כפית פלסטיק במשך 5 דקות (איור 3, תמונה A). לאחר מכן, הכוס הוכנסה למכשיר הדיסיקטור והתערובת שהתה בואקום למשך 60 דקות עד להעלמות בועות האוויר וקבלת תערובת שקופה (איור 3, תמונות B).

הכוס נלקחה לחדר נקי, שם ה- PDMS נוצק למרכזה של פרוסת סיליקון (silicon wafer) נקיה

שהונחה על מכשיר ה- spin coater. המכשיר כוון למהירות 500 rpm למשך 30 שניות לקבלת שכבת PDMS בעובי 220 ± 0.01 µm (רפרנס) (איור 3, תמונה C). פולימריזצית ה- PDMS בוצעה במלואה לאחר אינקובציה בטמפרטורת החדר במשך לילה. שכבת ה- PDMS הופרדה מפרוסת הסיליקון בעזרת סכין חיתוך ושימוש בפינצטה והונחה בין שני שקפים (איור 3, תמונות D-E). שלוש השכבות (שקף-PDMS-שקף) חוררו יחדיו על ידי שימוש בפטיש וחותכן עגול בקוטר 2 mm ולאחר מכן נגזרו לקבלת חתיכות נפרדות זו מזו (איור 3, תמונות F-G) . כל אחת מ"באריות" ה- PDMS שהוכנו הוצמדו לזכוכית מיקרוסקופ מכסה מרובעת בגודל 22X22 mm בעזרת טיפול במכשיר הפלסמה (Plasma Cleaner) (איור 3, תמונה H). ווידוא עובי חתיכות ה- PDMS בוצע ע"י מדידתן במכשיר קליבר דיגיטלי בעל סטייה של ±0.01 mm.



איור 3: תהליך הכנת ה- Micro-device. **(A)** שקילה וערבוב הפולימר והמפלמר במשך 5 דקות בכוס פלסטיק. **(B)** הכנסת הכוס למכשיר הדיסיקטור למשך כ- 60 דקות. **(C)** יציקת ה- PDMS במרכז פרוסת סיליקון המונחת על מכשיר ה- spin coater. **(D)** הפרדת שכבת ה- PDMS מפרוסת הסיליקון בעזרת סכין. **(E)** הכנסת שכבת ה- PDMS בין שני שקפים. **(F)** חירור של שלוש השכבות בעזרת חותכן עגול ופטיש. **(G)** וידוא שבוצע חירור מלא וגזירת שלוש השכבות ליצירת באריות נפרדות. **(H)** הצמדת שכבת ה- PDMS לזכוכית מיקרוסקופ מכסה לאחר טיפול במכשיר הפלסמה.

3.7 המערכת הניסויית

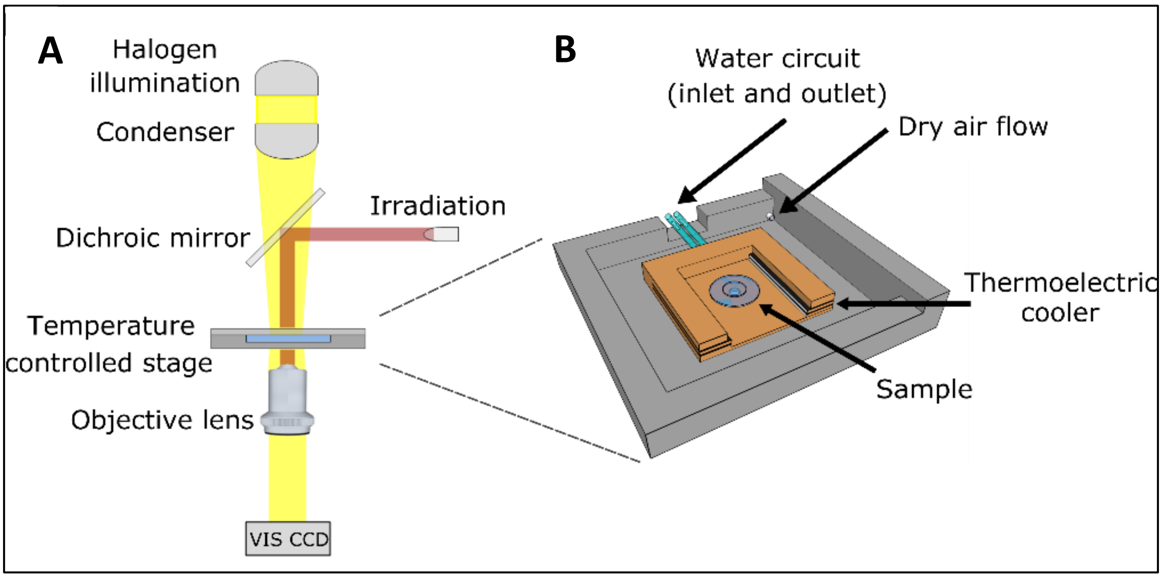
3.7.1 במה מקוררת בצורה מבוקרת

במה מקוררת בצורה מבוקרת שנבנתה במעבדתו של פרופסור עדו ברסלבסקי מכילה יחידה תרמואלקטרית אשר מקררת לוחית נחושת. בנוסף, הבמה מכילה חיישן תרמי אשר מודד את הטמפרטורה הקיימת בסמוך לדוגמא (איור 4).

הבמה מחוברת לבקר טמפרטורה בכדי לאפשר בקרה רגישה ומדויקת של הטמפרטורה מסביב לדוגמא בטווח טמפרטורות של -25 °C עד 25 °C, עם רמת דיוק של ± 0.01 °C. לבמה מחובר מעגל קירור חיצוני שמזרים מים בכדי למנוע את החימום של יחידת הקירור. בנוסף, ישנה הזרמה של אוויר יבש בכדי למנוע עיבוי מים על הדוגמא. במרכז לוחית הנחושת ישנו חור בקוטר של 3 mm המשמש כחלון תצפית על הדוגמא. השליטה על טמפרטורת הבמה נעשתה באמצעות ממשק מחשב בשם Lab-View שפותח במעבדתו של פרופסור עדו ברסלבסקי[47].

3.7.2 המערכת האופטית

במה מקוררת בצורה מבוקרת שתוארה בסעיף 3.7.1 שולבה כחלק מ- inverted microscope.
קרינת לייזר באורך של 1540 nm כוונה בצורה ישירה לעבר הדוגמא באמצעות סיב אופטי, סט של מראות ופילטר (איור 4).

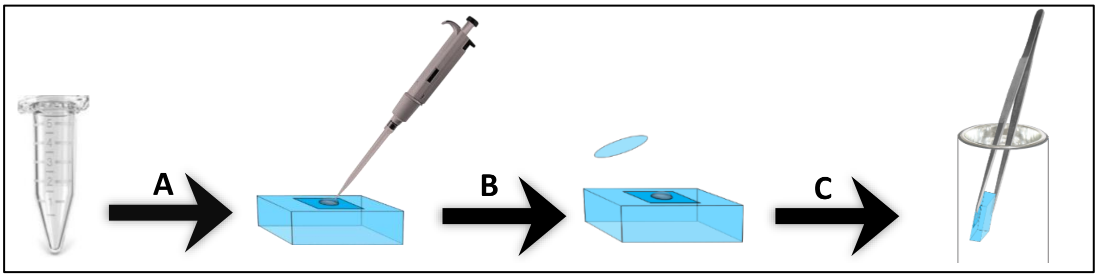


איור 4: המערכת הניסויית. (A) קרן הלייזר עוברת דרך סט של מראות ומגיעה בזווית של 90° לדוגמא. **(B)** הדוגמא מונחת על במה המכילה יחידה תרמואלקטרית. השליטה על טמפרטורת הבמה נעשית על ידי ממשק חיצוני.

3.8 שיטות ההקפאה וההפשרה

3.8.1 שיטות ההקפאה

תמיסות חיידקי BL-21 *E. coli* וחיידקי 3610 *B. subtilis* בנפח של 0.7 µl אשר הוכנו כמתואר בסעיף 3.4 הוכנסו לגומת ה- micro-device, כוסו על ידי זכוכית מיקרוסקופ מכסה עגולה בקוטר 12 mm והוכנסו לחנקן נוזלי עד להקפאה מלאה.



איור 5: סכמת תהליך ההקפאה.
(A) הכנסת דוגמת החיידקים לגומת ה-Micro-device. **(B)** סגירת הדוגמא על ידי זכוכית מיקרוסקופ מכסה. **(C)** הכנסה לחנקן נוזלי עד לקפיאה מלאה.

3.8.2 שיטות ההפשרה

במהלך הניסויים נעשה שימוש בשתי שיטות הפשרה. שיטת הפשרה אחת מוגדרת בעבודה זו כ"הפשרה ללא לייזר" ושיטה ההפשרה השנייה כ"הפשרה עם לייזר".

בהפשרה ללא לייזר הדוגמא הקפואה הונחה על במת הקירור שקוררה מראש לטמפרטורה של -20 °C. ההפשרה התבצעה על ידי העלאת טמפרטורת הבמה לטמפרטורה של כ- +0.5 °C בקצב של 100 °C לדקה.

בהפשרה עם לייזר הדוגמא הקפואה הונחה על במת הקירור (-20 °C), חוממה כמתואר ב"הפשרה ללא לייזר" ובו זמנית נחשפה לקרינת לייזר באורך גל של 1540 nm. ההפעלה והכיבוי של הלייזר בוצעו בצורה ידנית על ידי לחיצת כפתור. קרינת הלייזר הופעלה מרגע הנחת הדוגמא על במת המיקרוסקופ ובו זמנית לתחילת העלאת טמפרטורת הבמה וכובתה בעת המסת הדוגמא במלואה (כלומר, בעת העלמות מוחלטת של הצבע השחור המופיע במסך תוכנת ה- Lab-View).

3.9 מהלכי הניסויים

3.9.1 בחינת השפעת השימוש בעוצמות קרינה שונות בתהליך ההפשרה על שרידות החיידקים

גידול חיידקי BL-21 *E. coli* בוצע כמתואר בסעיף 3.3, והתרחיף הוכן כפי המתואר בסעיף 3.4. ראשית הוכנה דוגמת ה-baseline שאינה עברה הקפאה והפשרה (3.4.2). דוגמאות החיידקים

בתמיסות 0% גליצרול (3.4.1) הוקפאו והועברו לבמת המיקרוסקופ המקוררת (3.7.1), ומרגע הנחתן בוצע תהליך ההפשרה. בתהליך ההפשרה עם לייזר נעשה שימוש בעוצמות קרינה שונות של 50 mW, 250 mW ו- 450 mW (ובהתאם למתואר בסעיף 3.7.2). קבוצת החיידקים של 0 mW עברה הפשרה ללא שימוש בקרינת לייזר. בתום ההפשרה נלקחה דוגמא בנפח של 0.3 µl למיהול של 1:100 ב-PBS ובוצעו מיהולים עשרוניים לזריעה (כפי המתואר בסעיף 3.5.1).

3.9.2 בחינת ההשפעה של מרכיבי תמיסת החיידקים על בליעת הלייזר

3.9.2.1 בחינת השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים בתמיסה על בליעת הלייזר

גידול חיידקי *E. coli* BL-21 וחיידקי *B. subtilis* 3610 והכנתם לתחילת הניסוי בוצעו כמתואר בסעיפים 3.3 ו- 3.4. בוצעו מיהולים ב-PBS לקבלת דוגמאות חיידקים בעלות צפיפות אופטית שונה (OD_{600}= 0.1, 0.5, 1, 1.5). מדידת בליעת הלייזר בדוגמאות השונות בוצעה כמתואר בסעיף 3.9.2.3.

3.9.2.2 בחינת ההשפעה של ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר

הוכנו תמיסות גליצרול בריכוזים שונים: 0, 10, 20 ו- 30% (w/v). 12 gr של גליצרול הומסו ב- 30 ml של DDW לקבלת תמיסת 30% גליצרול. שאר התמיסות הוכנו מתמיסה זו על ידי מיהול ב- DDW. מדידת בליעת הלייזר בדוגמאות השונות בוצעה כמתואר בסעיף 3.9.2.3.

3.9.2.3 מדידת הבליעה

הדוגמאות שהוכנו הונחו על במת המיקרוסקופ. עוצמת הלייזר נמדדה על ידי שימוש במד עוצמה (Laser power meter). על מנת למדוד את עוצמת הלייזר הנכנסת, מד העוצמה מוקם לפני הדוגמא ובסמוך אליה. בכדי למדוד את עוצמת הלייזר הנותרת לאחר המעבר דרך הדוגמא, מד העוצמה מוקם לאחר הדוגמא מתחת לבמת המיקרוסקופ. עוצמת הלייזר הנותרת של כל אחת מן הדוגמאות נמדדה ארבע פעמים כאשר עוצמת הלייזר הנכנסת כוונה בכל הניסויים ל- 250 mW. חישוב הבליעה בוצע בצורה הבאה: $A=\frac{T_{reference}-T_{sample}}{T_{reference}}$, כאשר $T_{reference}$ זהו ערך הקרינה הנותרת של micro-device ריק ללא דוגמא ו- T_{sample} מבטא את ערך הקרינה המועברת של התמיסה הנבדקת.

3.9.3 פיתוח תהליך הפשרה מבוקר של החיידקים ע"י שימוש בקרינת IR במקביל להורדת אחוזי הגליצרול בתמיסה

ראשית הוכנה דוגמת ה-baseline של לפני הקפאה (כפי המתואר בסעיף 3.4.2) עבור כל אחד מריכוזי הגליצרול. דוגמאות החיידקים בריכוזי הגליצרול השונים (3.4.1) הוקפאו והועברו לבמת המיקרוסקופ המקוררת (3.7.1), ומרגע הנחתן בוצע תהליך ההפשרה. דוגמאות החיידקים חולקו

לשתי קבוצות לפי שיטת ההפשרה (3.7.2). קבוצת חיידקים אחת עברה הפשרה ללא לייזר בעוד קבוצת החיידקים השנייה עברה הפשרה עם לייזר בעוצמה של 250 mW. בתום ההפשרה דוגמא בנפח של 0.3 µl נמהלה פי 100 ב-PBS ובוצעו מיהולים עשרוניים לזריעה (כפי המתואר בסעיף 3.5.1). עבור קבוצות החיידקים בתמיסות 0% גליצרול, נלקחה דגימה נוספת לצביעה כפי המתואר בסעיף 3.5.2.

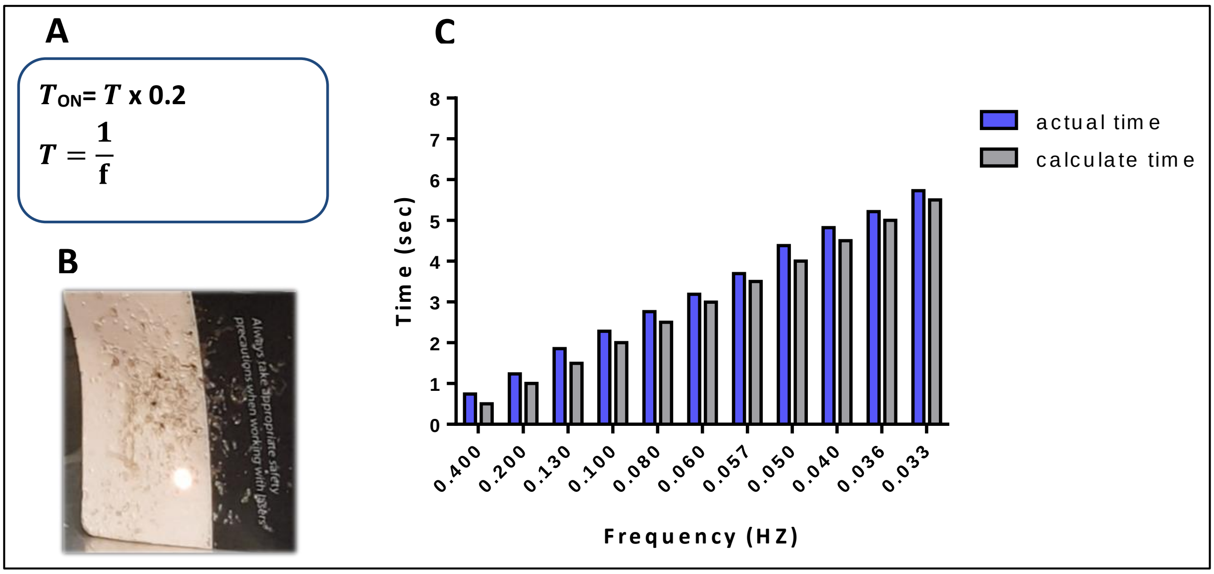
3.10 פיתוח שיטה לשליטה על זמני הארת הלייזר

את השיטה המפורטת להלן, פיתחנו בתום הניסויים ככלי לייעול השליטה על פרק זמן הארת הלייזר. עשינו שימוש במכשיר מחולל אותות (function generator) שחובר למכשיר לייזר באורך גל של 1540 nm עמו בוצעו הניסויים. למכשיר מחולל האותות הוכנסו הפרמטרים המופיעים בטבלה מספר 1, כאשר הפרמטר המשתנה היחיד (X) הינו התדירות (frequency).

הפרמטר	הערך שהוזן
D.C	20%
DC_{OFFSET}	+1.5
Ampl	4
Frequency(f)	X

טבלה מספר 1: הפרמטרים שהוכנסו למכשיר מחולל האותות.

עבור כל אחת מן התדירויות שהוזנו במחולל האותות, בוצע צילום וידאו של הארת הלייזר על גבי כרטיס דיטקציה עליו ניתן לראות תאורת אינפרא אדום (איור 6, B). סרטוני וידאו אלו נותחו על ידי תוכנת הוידיאו "Movavi Video Editor Plus" והתוצאה שהתקבלה מייצגת את הזמן בפועל (actual time) (איור 6, C). בוצעו 4 חזרות עבור חישוב כל אחד מזמני החשיפה, כאשר הזמן בפועל מייצג ממוצע של 4 חזרות אלו. את הזמן בפועל השווינו לערך הזמן המחושב (calculate time) שהתקבל על ידי הצבת הפרמטרים שנקבעו בנוסחאות המתאימות (איור 6, A).
ניתן יהיה להשתמש בכלי זה ליצירת זמני הארה קבועים בהתאם לגרף הכיול המפורט (איור 6, C).



איור 6: כיול זמן הארת הלייזר.
(A) משוואות החישוב. T_{ON} –זמן הארת הלייזר (בשניות) **(B)** כרטיס דיטקציה עליו ניתן לראות את הארת הלייזר. **(C)** גרף הכיול. העמודה הכחולה מייצגת את זמני ההארה בפועל (שחושבו על ידי ניתוח סרטוני הוידאו של כרטיס הדיטקציה). העמודה האפורה מייצגת את הזמן הרצוי שנקבע מראש והוכנס למשוואות החישוב.

3.11 ניתוחים סטטיסטיים

כל הניתוחים הסטטיסטים בוצעו באמצעות תוכנת (IBM, USA, NY) SPSS V21.

כאשר נבחנה השפעה של משתנה אחד או זוג משתנים בוצע מבחן ANOVA חד- או דו- גורמי, בהתאמה. כמבחני המשך שימש מבחן t לשני מדגמים בלתי תלויים (כאשר הושוו 2 קבוצות בלבד) או מבחן Post-Hoc מסוג 'Scheffe. תוצאה נחשבת למובהקת במידה ו-*P*<0.05.

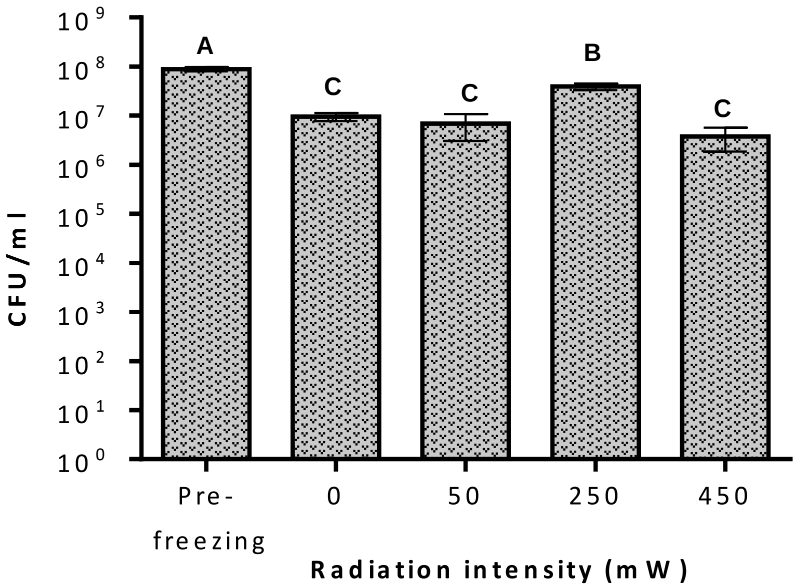
התוצאות המוצגת בגרפים מבוטאות כממוצע ± סטיית תקן.

4. תוצאות

4.1 בחינת ההשפעה של שימוש בעוצמות קרינת IR שונות בתהליך הפשרת חיידקי *E. coli* BL-21.

במטרה לבחון מהי קרינת הלייזר האופטימלית עבור תהליך הפשרת החיידקים, חשפנו את החיידקים לעוצמות קרינה שונות בתהליך ההפשרה (איור 7).

בניתוח שונות חד גורמי (One-Way ANOVA) נמצאה השפעה מובהקת לעוצמת ההקרנה בתהליך ההפשרה על כמות החיידקים [$F(4,20)=173.2$, $P<0.0001$]. במבחן המשך מסוג 'Scheffe, נמצא כי קבוצת ה- baseline שאינה עברה הקפאה הראתה את כמות החיידקים הגדולה ביותר בהשוואה ליתר הקבוצות ($P<0.0001$). בנוסף, קרינה בעוצמה של 250 mW הובילה באופן מובהק לכמות החיידקים הגדולה ביותר לאחר הפשרה בהשוואה לכל הקבוצות שעברו הקפאה ($P<0.0001$) .



איור 7: השפעת עוצמות קרינת IR שונות בתהליך ההפשרה על כמות החיידקים.

חיידקי *E. coli* BL-21 בתמיסת 0% גליצרול הופשרו על ידי שימוש בעוצמות קרינה שונות.

קבוצת ה- Pre-freezing זוהי קבוצת ה- Baseline שלא עברה הקפאה. כמות החיידקים מבוטאת כ- CFU/ml.

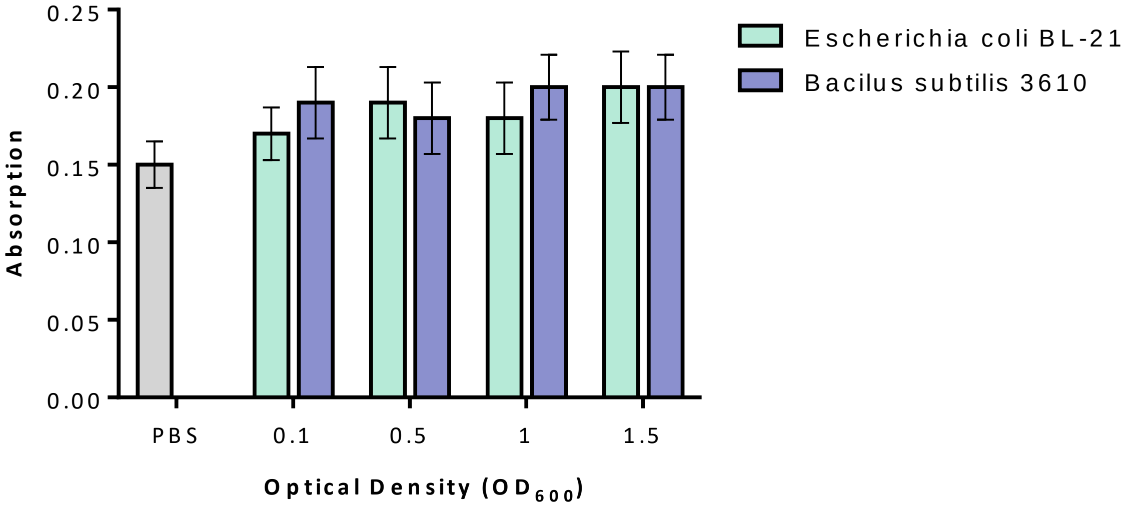
A הבדל מול יתר הקבוצות ($P<0.0001$). B הבדל מול קבוצת C (0, 50 ו-450) ($P<0.0001$).

התוצאות מוצגות כממוצע± סטיית תקן (SD) של ארבע חזרות.

4.2 השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים בדוגמא על בליעת הלייזר.

על מנת לבחון האם לנוכחות החיידקים בדוגמא ישנה השפעה על בליעת הלייזר, חיידקי BL-21 *E.coli* וחיידקי 3610 *B. subtilis* נחשפו לעוצמת לייזר זהה (250 mW) וחושבה עוצמת הבליעה באופן בלתי תלוי עבור כל אחד מסוגי החיידקים (איור 8).

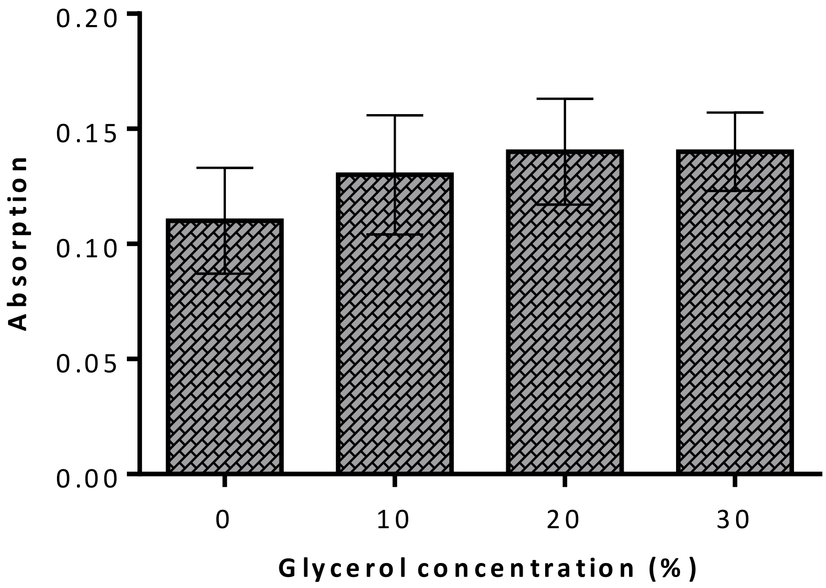
בניתוח שונות חד גורמי (One-Way ANOVA) לא נמצאה השפעה מובהקת לצפיפות החיידקית על עוצמת בליעת הלייזר, הן עבור חיידקי *E.coli* BL-21 [$F(4,15)=3$, $P>0.072$] והן עבור חיידקי 3610 *B. subtilis* [$F(4,15)=1.92$, $P>0.182$].



איור 8: השפעת הצפיפות האופטית של החיידקים על בליעת הלייזר.
דוגמאות החיידקים הוקרנו בקרינה באורך גל של 1540 nm ובעוצמה של 250 mW. בליעת הלייזר נמדדה על ידי שימוש במד עוצמה והצבת הערכים בנוסחא $A=\frac{T_{reference}-T_{sample}}{T_{reference}}$.
לא נמצאה השפעה מובהקת של הצפיפות החיידקית על בליעת הלייזר, הן עבור חיידקי *E. coli* BL-21 והן עבור חיידקי 3610 *B. subtilis*.
התוצאות מוצגות כממוצע± סטיית תקן (SD) של ארבע חזרות.

4.3 השפעת ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר.

על מנת לבחון את השפעת ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר, השתמשנו בארבעה ריכוזי גליצרול שונים (איור 9). בניתוח שונות חד גורמי (One-Way ANOVA) לא נמצאה השפעה מובהקת לריכוז הגליצרול על עוצמת בליעת הלייזר [$F(3,12)=1.08$, $P>0.41$].



איור 9: השפעת ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת הלייזר.
דוגמאות הגליצרול הוקרנו בקרינה באורך גל של 1540 nm ובעוצמה של 250 mW. בליעת הלייזר נמדדה על ידי שימוש במד עוצמה והצבת הערכים בנוסחא: $A=\frac{T_{reference}-T_{sample}}{T_{reference}}$.
לא נמצאה השפעה מובהקת של ריכוז הגליצרול בתמיסה על בליעת קרינת הלייזר.
התוצאות מוצגות כממוצע± סטיית תקן (SD) של ארבע חזרות.

4.4 בחינת ההשפעה המשולבת של שיטת הפשרת חיידקי *E.coli* BL-21 בריכוזי גליצרול שונים.

בניסוי זה השווינו שתי שיטות הפשרה (הפשרה ללא שימוש בלייזר לעומת הפשרה עם לייזר), וזאת בשלושה ריכוזי גליצרול. בניתוח שונות דו גורמי (Two-Way ANOVA) נמצאו אפקטים עיקריים הן לשיטת ההפשרה [$F(1,24)=194.37$, $P<0.0001$], הן לריכוז הגליצרול [$F(2,24)=256.39$, $P<0.0001$], כמו גם לאינטראקציה ביניהם [$F(2,24)=36.95$, $P<0.0001$] על אחוזי שרידות חיידקי *E.coli* BL-21 (איור 10).

בשלב הראשון, בחנו את האפקט העיקרי של כל שיטת הפשרה מעבר לכל ריכוזי הגליצרול השונים:

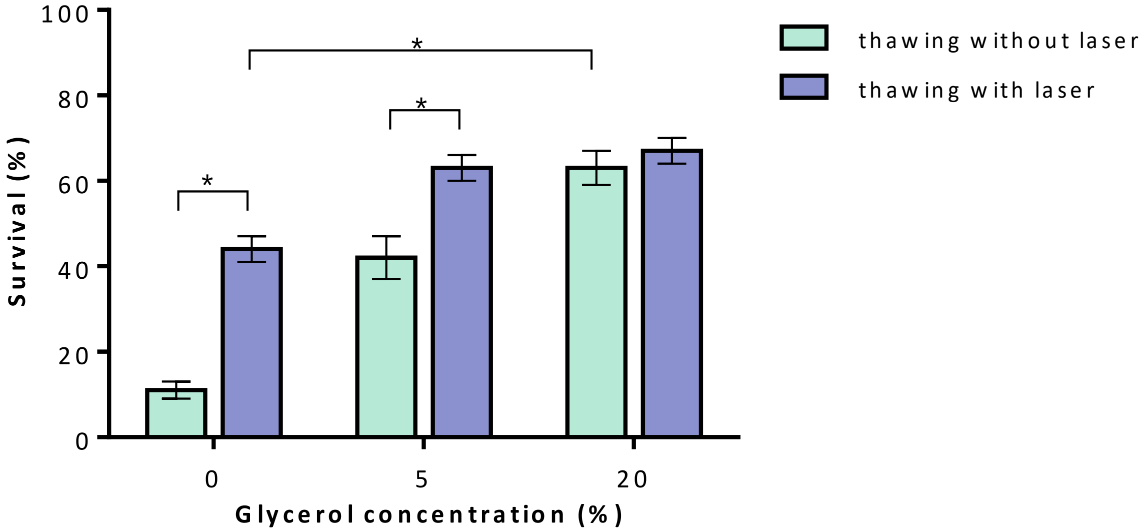
א. עבור שיטת ההפשרה באמצעות לייזר, ניתוח שונות חד גורמי (One-way ANOVA) הראה אפקט מובהק לריכוז הגליצרול על אחוז שרידות החיידקים [F(2,12)=67.4, *P*<0.0001]. במבחן המשך מסוג Scheffe' נמצאה עליה מובהקת באחוזי שרידות החיידקים בריכוז גליצרול של 20% לעומת 0% (*P*<0.0001), אך לא בהשוואה לריכוז גליצרול של 5% (*P*>0.136). כמו כן, אחוזי שרידות החיידקים היו באופן מובהק גבוהים יותר בקבוצת 5% גליצרול בהשוואה לקבוצת 0% גליצרול (*P*<0.0001).

ב. עבור שיטת ההפשרה ללא לייזר, נמצאה השפעה מובהקת לריכוז הגליצרול על אחוזי שרידות החיידקים [F(2,12)=197.39, *P*<0.0001]. באופן ספציפי, אחוז שרידות החיידקים הגבוה ביותר נצפה בריכוז גליצרול של 20% באופן מובהק בהשוואה לריכוזי גליצרול של 0% ו-5% (*P*<0.0001 , עבור שני הריכוזים). בנוסף, קבוצת 5% גליצרול הראתה אחוזי שרידות גבוהים יותר לעומת קבוצת 0% גליצרול (*P*<0.0001).

בשלב הבא, על מנת להמשיך ולחקור את מקור ההשפעה המובהקת לאינטראקציה בין שיטות ההפשרה לבין ריכוזי הגליצרול, ביצענו מבחני המשך Post-hoc מסוג מבחן t למדגמים בלתי תלויים (independent t-test), אשר בחנו את ההבדלים בין שתי שיטות ההפשרה בכל אחד מריכוזי הגליצרול (קרי, 0%, 5%, 20%).

עבור ריכוז של 0% גליצרול נמצא כי הפשרה באמצעות לייזר הובילה לאחוז שרידות חיידקים גבוה יותר בהשוואה להפשרה ללא לייזר [t(6)=21.54, *P*<0.0001]. אפקט דומה נמצא גם עבור ריכוז של 5% גליצרול [t(6)=7.24, *P*<0.0001]. לעומת זאת, לא נמצא הבדל מובהק בין שיטות ההפשרה השונות כאשר ריכוז הגליצרול עמד על 20% [t(6)=1.57, *P*>0.167].

בהמשך לאפקטים המדווחים לעיל, אשר הדגישו כי ריכוז של 20% גליצרול הוא בעל השפעה משמעותית לעומת 5% בשיטת ההפשרה הרגילה, השווינו את שרידות החיידקים כאשר ריכוז הגליצרול הוא 20% בשיטת הפשרה ללא לייזר, עם ריכוז גליצרול של 0% או 5% בשיטת ההפשרה עם לייזר. מצאנו כי שיטת ההפשרה ללא לייזר ב- 20% גליצרול הובילה לאחוז שרידות חיידקים גבוה יותר בהשוואה לשיטת ההפשרה בלייזר בריכוז של 0% גליצרול [t(6)=7.48, *P*<0.0001], אך לא בהשוואה לריכוז של 5% גליצרול בשיטת ההפשרה בלייזר [t(6)<1].



איור 10: ההשפעה המשולבת של ריכוז הגליצרול ושיטת ההפשרה על שרידות חיידקי *E. coli* BL-21.
שימוש בשיטת הפשרה באמצעות לייזר בתמיסות 0% ו-5% גליצרול, מעלה את אחוזי שרידות החיידקים באופן משמעותי בהשוואה לשיטת ההפשרה ללא לייזר. כמו כן, ניתן לראות ששילוב של הפשרה באמצעות לייזר עם 5% גליצרול מוביל לאחוז שרידות חיידקים הדומה לזה המתקבל בתמיסת 20% גליצרול ללא לייזר.
$\frac{CFU_{before\ freezing}}{CFU_{after\ freezing}}$ Survival (%) =100 X. התוצאות מוצגות כממוצע± סטיית תקן (SD) של ארבע חזרות.

(*P<0.0001)

4.5 בחינת ההשפעה המשולבת של שיטת הפשרת חיידקי *B. subtilis* 3610 בריכוזי גליצרול שונים.

בניתוח שונות דו גורמי (Two-way ANOVA), אשר כלל שלושה ריכוזי גליצרול ושתי שיטות הפשרה (2X3), נמצא אפקט עיקרי לשיטת ההפשרה [F(1,24)=10.71, P<0.004], לריכוז הגליצרול [F(2,24)=98.13, P<0.0001], אך לא לאינטראקציה ביניהם [F(2,24)=1.94, P>0.173] (איור 11).

בשלב הראשון, בחנו את האפקט העיקרי של כל שיטת הפשרה מעבר לכל ריכוזי הגליצרול השונים:

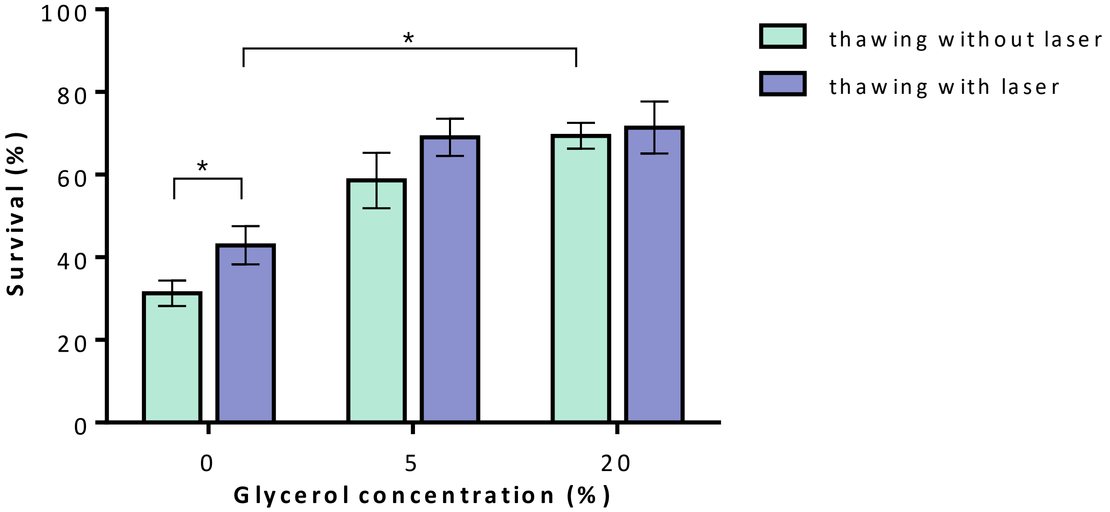
א. עבור שיטת ההפשרה באמצעות לייזר, ניתוח שונות חד גורמי (One-way ANOVA) הראה אפקט מובהק לריכוז הגליצרול על אחוז שרידות החיידקים [F(2,12)= 29.8, P<0.0001]. במבחן המשך מסוג Scheffe' נמצאה עליה מובהקת באחוזי שרידות החיידקים בריכוז גליצרול של 20% (P<0.0001) ובריכוז גליצרול של 5% (P<0.001) לעומת 0%. לעומת זאת, לא נמצא הבדל מובהק בין ריכוז 20% ל – 5% (P>0.482).

ב. עבור שיטת ההפשרה ללא לייזר, נמצאה השפעה מובהקת לריכוז הגליצרול על אחוזי שרידות החיידקים [F(2,12)= 82.36, P<0.0001]. באופן ספציפי, אחוז שרידות החיידקים הגבוה ביותר נצפה בריכוז גליצרול של 20% באופן מובהק בהשוואה לריכוזי גליצרול של 0% (P<0.0001) ו-5%

$P<0.045$). בנוסף, קבוצת 5% גליצרול הראתה אחוזי שרידות גבוהים יותר לעומת קבוצת 0% גליצרול ($P<0.0001$).

בשלב הבא, על מנת להמשיך ולחקור את מקור ההשפעה המובהקת לאינטראקציה בין שיטות ההפשרה לבין ריכוזי הגליצרול, ביצענו מבחני המשך Post-hoc מסוג מבחן t למדגמים בלתי תלויים (independent T- test), אשר בחנו את ההבדלים בין שתי שיטות ההפשרה בכל אחד מריכוזי הגליצרול (קרי, 0%, 5%, 20%).
עבור ריכוז של 0% גליצרול נמצא כי הפשרה באמצעות לייזר הובילה לאחוז שרידות חיידקים גבוה יותר בהשוואה להפשרה ללא לייזר [$t(6)= 4.28$, $P<0.005$]. לעומת זאת, עבור 5% גליצרול [$t(6)=1,49$, $P>0.185$] כמו גם עבור 20% גליצרול [$t(6)<1$]לא התקבל הבדל מובהק בשרידות החיידקים בין שתי שיטות ההפשרה (איור 11).

בדומה להשוואה הנוספת שתוארה בסעיף 4.4 עבור שרידות חיידקי *E. coli* BL-21, השווינו גם עבור חיידקי,*B. subtilis* 3610 את שרידות החיידקים כאשר ריכוז הגליצרול הוא 20% בשיטת הפשרה ללא לייזר, עם ריכוז גליצרול של 0% או 5% בשיטת ההפשרה עם לייזר. מצאנו כי שיטת ההפשרה ללא לייזר ב-20% גליצרול הובילה לאחוז שרידות חיידקים גבוה יותר בהשוואה לשיטת ההפשרה בלייזר בריכוז של 0% גליצרול [$t(6)=9.51$, $P<0.0001$] אך לא בריכוז של 5% גליצרול [$t(6)<1$].



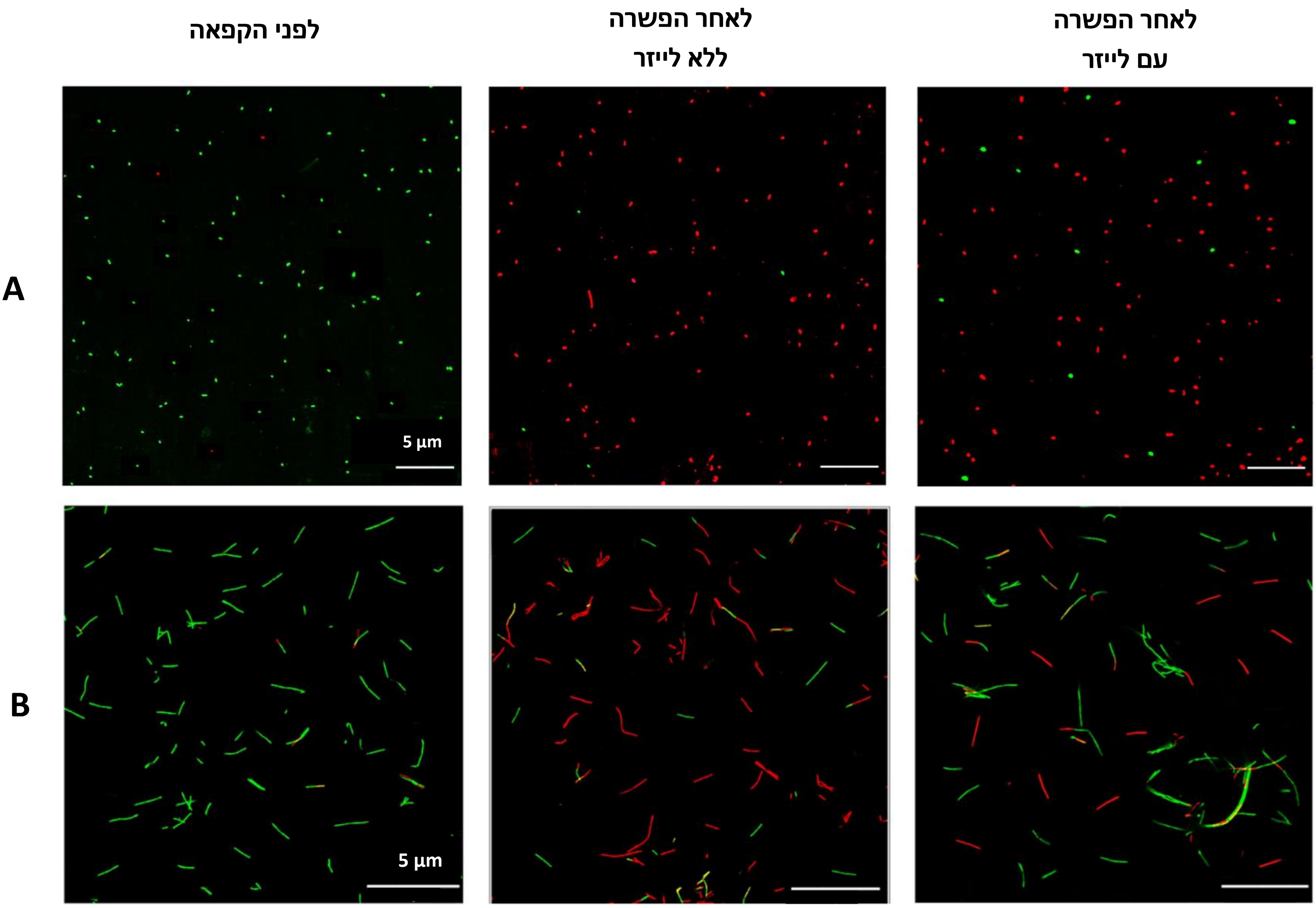
איור 13: ההשפעה המשולבת של ריכוז הגליצרול ושיטת ההפשרה על שרידות חיידקי *B. subtilis 3610*.
שימוש בשיטת הפשרה באמצעות לייזר ללא גליצרול מעלה את אחוזי שרידות החיידקים באופן משמעותי בהשוואה לשיטת ההפשרה ללא לייזר. כמו כן, ניתן לראות ששילוב של הפשרה באמצעות לייזר עם 5% גליצרול מוביל לאחוז שרידות חיידקים הדומה לזה המתקבל בתמיסת 20% גליצרול ללא לייזר.
התוצאות מוצגות כממוצע± סטיית תקן (SD) של ארבע חזרות.Survival (%) =100 X $\frac{CFU_{before\ freezing}}{CFU_{after\ freezing}}$

(*$P<0.0001$)

4.6 צביעת Live/Dead

בנוסף לבדיקת שרידות בשיטת CFU/ml, בוצעו צביעות Live/Dead של חיידקי המודל שהוקפאו בתמיסות של 0% גליצרול והופשרו בשתי שיטות ההפשרה. איור 14 מציג תמונות שנלקחו מ-CLSM לאחר צביעת החיידקים.

ניתן לראות כי מספר החיידקים החיים (צבועים בירוק) גדול יותר לאחר שהופשרו בלייזר בהשוואה להפשרה ללא לייזר בשני סוגי החיידקים. כמו כן, מהשוואת שני סוגי החיידקים שהופשרו ללא לייזר, ניתן לראות כי כמות חיידקי *B. subtilis* 3610 שנותרו בחיים גדולה מזו של חיידקי *E. coli* BL-21. אפקט דומה נצפה גם בשיטת ההפשרה בלייזר.



איור 14: תמונות מיקרוסקופ קונפוקלי (CLSM) של חיידקי *E. coli* BL-21 וחיידקי *B.subtilis* 3610 בתמיסת 0% גליצרול לאחר צביעת Live/Dead. (A) תמונות חיידקי *E. coli* BL-21 בהגדלה X40X0.75 . **(B)** תמונות חיידקי *B. subtilis* 3610 בהגדלה X40.
מעל כל אחד מטורי התמונות מצוין הטיפול שעברו החיידקים.
CYTO-9 צובע חיידקים חיים בירוק ו- PI צובע חיידקים מתים באדום.

5. דיון ומסקנות

בשנים האחרונות, מחקרים בתחום שימור תאים אנימליים הראו יתרונות ברורים להפשרה מהירה[39,42]. הפשרה מהירה זו הושגה על ידי שימוש בקרינת לייזר בשילוב חומרים נוספים שהוספו למצע הגידול או הוחדרו לתא עצמו בכדי להגביר את הבליעה. לאור ההצלחה שנצפתה בהפשרה מהירה עבור תאים אנימליים, רצינו לבדוק האם ישנו יתרון בשימוש בלייזר גם עבור הפשרת חיידקים.

מחקר שפורסם לאחרונה במעבדתנו הראה כי כאשר בוחרים באורך גל ספציפי של 1540 nm, בליעת הקרח גדולה פי שלושה מזו של המים. שימוש בקרינה זו הוביל לעיצוב גבישי הקרח ויצירת תבניות ייחודיות, זאת ללא צורך בהוספת חומרים נוספים לתמיסה המוקרנת[43].

בעבודה הנוכחית, השתמשתי בקרינה סלקטיבית זו בתהליך הפשרת חיידקי *E. coli* BL-21 וחיידקי *B. subtilis* 3610 במטרה ליצור הפשרה מהירה שאינה דורשת הוספת חומרים מגבירי בליעה.

מטרת העל שלי הייתה לפתח פרוטוקול הפשרה מבוקר של החיידקים תוך צמצום ריכוז הגליצרול בתמיסה העוברת הפשרה ובכך להוביל לעליה באחוזי שרידות החיידקים.

5.1 פיתוח מערכת ניסויית

מכיוון וזו הפעם הראשונה שבה נעשה במעבדתנו שימוש במערכת הלייזר עבור הפשרת תאים ביולוגיים, היה צורך לפתח פרוטוקול ניסויי אשר לוקח בחשבון את הפרמטרים של הלייזר. לשם כך פיתחתי Micro-device המורכב מזכוכית מיקרוסקופ עליה מונחת שכבת PDMS. ה- PDMS הותאם לפרמטרים של קוטר קרן הלייזר ועומק החדירה המקסימלי שיאפשר נפח דוגמא מספק עבור עבודה עם פיפטור. על ידי כך הצלחתי להשיג הפשרה אחידה של הדוגמא כולה.

שיטת ההקפאה שנבחרה לניסוי זה הינה הקפאה בחנקן נוזלי בטמפרטורה של 196 °C-, מכיוון וזו השיטה המקובלת כיום להקפאת חיידקים. כמו כן, ידוע כי בהקפאה מהירה מאוד כמו זו שבוצעה, נוצרים גבישי קרח קטנים בתוך תא החיידק. מהספרות עולה כי גבישים קטנים אלו אינם גורמים לנזק, אך במהלך תהליך ההפשרה כחלק מתופעת הרה- קריסטליזציה, לגבישי הקרח יש פוטנציאל לגדול ולהוביל לפגיעה מבנית[14,28]. בהמשך לזאת, השתמשתי בשתי שיטות הפשרה בכדי לבחון את יעילות ההפשרה באמצעות לייזר לעומת זו ללא לייזר.

כחלק מפיתוח הפרוטוקול הניסויי, בכדי לדייק את המערכת שפותחה עבור הפשרת החיידקים ולמצוא את משך הזמן האופטימלי לחשיפת החיידקים לקרינת הלייזר, ראינו לנכון כי יהיה זה הכרחי לפתח אמצעי לשליטה חיצונית על משך הארת הלייזר. משך זמן חשיפת הדוגמא להארת הלייזר בתהליך ההפשרה מהווה פרמטר קריטי שעשוי להשפיע בצורה משמעותית על שרידות החיידקים המצויים בדוגמא. בעזרת שימוש במכשיר מחולל האותות, הצלחנו ליצור כלי יעיל

לשליטה חיצונית על משך זמן ההארה. כלי זה ישמש אותנו למחקרי המשך בכדי לבחון את השפעת השימוש בזמני חשיפה שונים.

5.2 בליעת הלייזר כתלות בצפיפות האופטית של החיידקים וריכוז הגליצרול בתמיסה

השפעת אור וקרינה על חומר ביולוגי תלויה הן בתכונות האופטיות של החומר על הרכבו הכימי ומבנהו, והן בתכונות מקור האור הכוללות את אורך הגל, צפיפות האנרגיה ופרמטרים נוספים של ההקרנה. תכונות אלו משפיעות בצורה ישירה על בליעת האנרגיה על ידי החומר הביולוגי, שהופכת לאנרגית חום, שזו מתפזרת ומשפיעה ברקמה בהתאם לתכונות התרמיות שלה[48]. האפקט הביולוגי של מקור האור תלוי אם כן באנרגיה הנבלעת על ידי הרקמה הביולוגית, ולכן השפעת ההקרנה על חיידקים תלויה במבנה החיידק ובחומר הביולוגי המרכיב את התא החיידקי ואף בסביבת החיידקים ובצפיפותם.

לפני ביצוע הניסויים העיקריים בעבודה זו, בחנו האם להמצאות החיידקים בתמיסה או לנוכחותו של הגליצרול ישנה השפעה על בליעת הלייזר. רצינו לבחון האם הקרינה הסלקטיבית אכן נבלעת ישירות בקרח או שמא עלולה להיות מושפעת מגורמים נוספים בתמיסה. כידוע, התא החיידקי מורכב ברובו ממים וממדורים נוספים הכוללים בין היתר חלבונים, חומצות שומן וחומצות גרעין. לכל אחת מהמולקולות הללו ישנו ספקטרום בליעה ייחודי, בליעה מירבית באורכי-גל מסוימים, ולפיכך השפעה על תגובת החיידקים לאור. כמו כן, ידוע כי ישנה השפעה משמעותית למדיום החיידקים, הרכבו ובליעת האור בו, על החיידקים[48].

מצאנו כי בשימוש בקרינה בעוצמה של 250 mW, שנמצאה כאופטימלית עבור תהליך ההפשרה, החיידקים לא בלעו את קרינת הלייזר. כמו כן, ראינו כי העלייה בריכוז הגליצרול גם היא לא השפיעה על הבליעה, בדומה לעבודתם של Jung and Hwang שבחנה את בליעת הלייזר בתמיסות סוכרוז וגלוקוז[49].

5.3 פיתוח תהליך הפשרה מבוקר של חיידקי המודל תוך הורדת ריכוז הגליצרול בתמיסה

עבור שני סוגי החיידקים, מצאנו כי שיטת ההפשרה באמצעות לייזר בשילוב חימום תרמי של הדוגמא, מאפשרת להפחית את השימוש בריכוז הגליצרול המקובל כיום (20%) ל-5%, ללא שינוי באחוזי שרידות החיידקים. עם זאת, השימוש בקרינת הלייזר לא שיפר את אחוז שרידות החיידקים מעבר לאחוז השרידות שהתקבל בתמיסת 20% גליצרול.

כמו כן, מצאנו כי בריכוזי גליצרול נמוכים של 0% ו-5%, שיטת ההפשרה בלייזר הראתה יתרון על פני שיטת ההפשרה ללא לייזר עבור חיידקי *E. coli BL-21*. עבור חיידקי 3610 *B. subtilis*, יתרון זה נצפה עבור תמיסת 0% גליצרול בלבד וב-5% גליצרול כבר לא נראה הבדל מובהק בין שתי השיטות.

המנגנון דרכו הלייזר הוביל לשמירה על אחוזי שרידות החיידקים על אף הורדת ריכוז הגליצרול ל-5% לא נבחן במסגרת עבודה זו. אני משערת כי הקרינה הסלקטיבית, שהראנו בניסויים הראשוניים שאינה מושפעת מגורמים נוספים בתמיסה, נבלעה ישירות בקרח ובכך תרמה בהפשרה מהירה. יתכן והפשרה מהירה זו הפחיתה משמעותית את תופעת הרה- קריסטליזציה, המוכרת כבעלת השפעות הרסניות ומזיקות על התאים המופשרים. בנוסף, בשל הבדלי הבליעה של הקרח והמים בשימוש באורך הגל הנבחר, אני משערת כי אזורי הדוגמא שהופשרו לא חוממו יתר על המידה ובכך הורידו את הסיכון ביצירת עקה נוספת לתא החיידקי.
עולה השאלה; מדוע ההפשרה באמצעות לייזר לא הראתה שיפור מעבר לאחוז שרידות החיידקים שהתקבל בקבוצת ה-Gold standard (תמיסת 20% גליצרול, ללא לייזר).
תהליכי ההקפאה וההפשרה הולכים יד ביד, וקיים קושי להצביע על היקף הנזק המתרחש כתוצאה מכל אחד מהתהליכים בנפרד. אני משערת כי הסיבה לכך שלא נצפה שיפור מעבר לסף מסוים נובעת מנזקי ההקפאה שהורידו במידת מה את כמות החיידקים החיים בדוגמא. במחקרי המשך, נשאף לבחון קצבי הקפאה שונים בשילוב עם פרוטוקול ההפשרה שהוצג בעבודה זו.

ממצאים מדעיים מצביעים על כך שבאופן כללי חיידקי גרם חיובי עמידים יותר לתהליכים של שימור בהקפאה בהשוואה לחיידקי גרם שלילי, בין היתר עקב ההבדלים בעובי שכבת הפפטידוגליקן[28].
ואכן, כאשר השווינו את חיידקי המודל בתמיסת 0% גליצרול שעברו הפשרה ללא לייזר (כלומר ללא התערבות חיצונית כלל) ראינו כי אחוזי השרידות בקרב חיידקי הגרם חיובי (*B. subtilis* 3610) היו גבוהים בכ-20% מאלו של חיידקי הגרם שלילי (*E. coli BL*-21). הבדלים דומים נצפו בהשוואת אחוזי השרידות בתמיסה בריכוז של 5% גליצרול שעברה הפשרה ללא לייזר.
ההבדלים בעמידות החיידקים לתהליך ההקפאה וההפשרה, עשויים להסביר את השוני באפקט השיפור של שימוש בשיטת ההפשרה עם לייזר בתמיסת 5% גליצרול בהשוואת שני סוגי החיידקים. יתכן ורגישותו הנמוכה, באופן יחסי, של החיידק *B. subtilis* 3610 (שהוא חיידק גרם חיובי) לתהליכי ההקפאה והפשרה הובילה לכך שאפקט השיפור בתמיסת 5% גליצרול היה נמוך יותר עבורו. תוצאה זו מחזקת את הנקודה כי עבור כל סוג/ זן של חיידקים יש למצוא את תנאי ההקפאה וההפשרה האופטימליים. מכאן, גם את פרוטוקול ההפשרה שפותח בעבודה זו יש לבחון בצורה ספציפית ולהתאים עבור חיידקים נוספים.

אז מה עדיף- גליצרול או לייזר? רעילותו של הגליצרול נבחנה ודווחה בספרות, אך השפעות קרינת הלייזר הספציפית בה השתמשנו טרם נבדקו. ידוע כי מצבי עקה בחיידקים גוררים תגובה תאית המאופיינת בביטוי גנים ספציפיים לסוג העקה וכתוצאה מכך לשינוי פנוטיפי בחיידק, המאפשר את הסתגלותו לסביבה החדשה[50]. לדוגמא, עקה חימצונית ועקת חום מובילות להרס חלבונים מסיבי בתא כמו גם להרס חומצות שומן ולפגיעה במולקולות ה-DNA. פגיעות אלו בתא החיידקי והתגובה

התאית לסביבה החדשה משפיעות בצורה ישירה ו/או עקיפה על החיידק[51]. לפיכך סביר לשער שקרינת לייזר ואור יכולים להשפיע על חיידקים במנגנונים הדומים למצבי העקה המוכרים שכן הקרנת חומר ביולוגי עשויה ליצור אחד ממצבי העקה הידועים: עקת חום או עקת חמצון. לכן, ישנה חשיבות רבה לחקר ההשפעה של קרינת הלייזר על חיידקים לא רק מבחינת חיות החיידקים, אלא גם מבחינת ביטוי הגנים, מבנהו ותפקודו.

5.4 סיכום

למיטב ידיעתנו, מחקר זה הוא הראשון מסוגו אשר בוחן את השימוש בקרינת לייזר סלקטיבית למטרת שיפור אחוזי שרידות החיידקים. חשיבות התוצאות שהוצגו, מעבר לתחום שימור חיידקים בהקפאה, היא בעלת חשיבות עבור מגוון תחומים. בתעשיית המזון לדוגמא, תהליכי הפשרה נדרשים עבור מוצרי מזון הנשמרים במצבם הקפוא אך נצרכים לאחר הפשרתם. ניתן יהיה להשתמש בקרינה סלקטיבית זו כשיטת הפשרה יעילה שתמנע חימום יתר וגדילת קרח בלתי מבוקרת (כלומר, רה-קריסטליזציה) במהלך החימום. לעיתים קרובות נעשה שימוש במיקרוגל לשם הפשרת מזון קפוא, אך גלי המיקרו מחמים את הקרח בצורה איטית מחימום המים .הבדלי בליעה אלו גורמים לפאזה הנוזלית להתחמם יתר על המידה, בזמן שהאיזורים הקפואים ממשיכים להפשיר[52]. היפוך יחסי הבליעה כך שהאיזורים הקפואים יבלעו קרינה רבה יותר מהאיזורים שהופשרו, עשוי לסייע בהשגת הפשרה יעילה יותר.
כמו כן, תופעת הרה- קריסטליזציה מהווה בעיה קריטית בתחום הקריוביולוגיה כאשר ישנו צורך להפשיר תאים ורקמות שנשמרו באיחסון בטמפרטורות נמוכות[14]. השימוש בקרינת IR סלקטיבית עשוי להציע הפשרה מבוקרת ויעילה ללא חימום יתר של הדוגמא תוך מזעור הנזקים. עם זאת, נדרשים מחקרי המשך נוספים להבנת המנגנון דרכו קרינת הלייזר מובילה לאפקט מיטיבי בעת ההפשרה, כמו גם מחקרים הבוחנים את השפעת הקרינה על תאים ורקמות, מבנית ותפקודית.

מקורות

1. Smith, D. & Ryan, M. Implementing best practices and validation of cryopreservation techniques for microorganisms. *ScientificWorldJournal*, (**2012**).

2. *Singh, S. K. & Baghela, A. in Modern tools and techniques to understand microbes (eds. Varma, A. & Sharma, A. K.) 321–333 (Springer International Publishing, (**2017**).*

3. *Prakash, O., Nimonkar, Y. & Shouche, Y. S. Practice and prospects of microbial preservation. FEMS Microbiol. Lett. 339, 1–9 (**2013**).*

4. *foerst, petra & santivarangkna, chalat. Advances in Probiotic Thchnology . a science publishers book (**2015**).*

5. *Wang, Z. et al. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature 472, 57–63 (**2011**).*

6. *Sharon, G., Sampson, T. R., Geschwind, D. H. & Mazmanian, S. K. The central nervous system and the gut microbiome. Cell 167, 915–932 (**2016**).*

7. *Rea, K., Dinan, T. G. & Cryan, J. F. The microbiome: A key regulator of stress and neuroinflammation. Neurobiol. Stress 4, 23–33 (**2016**).*

8. *Navaneetharaja, N., Griffiths, V., Wileman, T. & Carding, S. R. A role for the intestinal microbiota and virome in myalgic encephalomyelitis/chronic fatigue syndrome (ME/CFS)? J Clin Med 5, (**2016**).*

9. *Mazur, P. Stopping Biological Time. Ann. N. Y. Acad. Sci. 541, 514–531 (**1988**).*

10. *El-Kest, S. E. & Marth, E. H. Freezing of Listeria monocytogenes and Other Microorganisms: A Review. J Food Prot 55, 639–648 (**1992**).*

11. *van den Burg, B. Extremophiles as a source for novel enzymes. Curr. Opin. Microbiol. 6, 213–218 (**2003**).*

12. *Fuller, B. J. Cryoprotectants: the essential antifreezes to protect life in the frozen state. Cryo Letters 25, 375–388 (**2004**).*

13. *Pegg, D. E. The history and principles of cryopreservation. Semin Reprod Med 20, 5–13 (**2002**).*

14. *Karlsson, J. O. & Toner, M. Long-term storage of tissues by cryopreservation: critical issues. Biomaterials 17, 243–256 (**1996**).*

15. *Jang, T. H. et al. Cryopreservation and its clinical applications. Integrative Medicine Research 6, 12–18 (**2017**).*

16. *Kim, S.-J., Park, H. W., Shin, C.-H. & Kim, C.-W. Establishment of a cryopreservation method for the industrial use of D-amino acid oxidase-overexpressing Escherichia coli. Biosci. Biotechnol. Biochem. 73, 299–303 (**2009**).*

17. *Polge, C., Smith, A. U. & Parkes, A. S. Revival of spermatozoa after vitrification and dehydration at low temperatures. Nature 164, 666 (**1949**).*

18. *Smith, A. U. & Polge, C. Survival of spermatozoa at low temperatures. Nature 166, 668–669 (**1950**).*

19. *Lovelock, J. E. & Polge, C. The immobilization of spermatozoa by freezing and thawing and the protective action of glycerol. Biochem. J. 58, 618–622 (**1954**).*

20. *Mazur, P. Cryobiology: the freezing of biological systems. Science 168, 939–949 (**1970**).*

21. *Ray, B. Impact of bacterial injury and repair in food microbiology: its past, present and future. J Food Prot 49, 651–655 (**1986**).*

22. *SOMERO, G., GIESE, A. & WOHLSCHLAG, D. COLD ADAPTATION OF THE ANTARCTIC FISH TREMATOMUS BERNACCHI I. Comp. Biochem. Physiol. (**1968**).*

23. *Hasan, M., Fayter, A. E. R. & Gibson, M. I. Ice Recrystallization Inhibiting Polymers Enable Glycerol-Free Cryopreservation of Microorganisms. Biomacromolecules 19, 3371–3376 (**2018**).*

24. *The Mechanism of Cellular Injury by Freezing in Microorganisms : HUSCAP. at <http://hdl.handle.net/2115/20415>*

25. *Straka, R. P. & Stokes, J. L. Metabolic injury to bacteria at low temperatures. J. Bacteriol. 78, 181–185 (**1959**).*

26. *Calcott, P. H. & MacLeod, R. A. The survival of Escherichia coli from freeze-thaw damage: permeability barrier damage and viability. Can. J. Microbiol. 21, 1724–1732 (**1975**).*

27. *Beveridge, T. J. Use of the gram stain in microbiology. Biotech. Histochem. 76, 111–118 (**2001**).*

28. *Calcott, P. H. Freezing and Thawing Microbes. Meadowfield Press Inc (**1978**).*

29. *Tortora, G. In Microbiology: An Introduction. 86–88 (**2001**).*

30. *Mazur, P. Kinetics of water loss from cells at subzero temperatures and the likelihood of intracellular freezing. J. Gen. Physiol. 47, 347–369 (**1963**).*

31. *Gao, W., Smith, D. W. & Li, Y. Natural freezing as a wastewater treatment method: E. coli inactivation capacity. Water Res. 40, 2321–2326 (**2006**).*

32. *Lund, B. M. Freezing: In The Microbiological Safety and Quality of Food . 1, (**2000**).*

33. *Ray, B. & Speck, M. L. Freeze-Injury in Bacteria. CRC Crit Rev Clin Lab Sci 4, 161–213 (**1973**).*

34. *Dumont, F., Marechal, P.-A. & Gervais, P. Involvement of two specific causes of cell mortality in freeze-thaw cycles with freezing to -196 degrees C. Appl. Environ. Microbiol. 72, 1330–1335 (**2006**).*

35. *Haines, R. B. The effect of freezing on bacteria. Proc R Soc Lond, B, Biol Sci (**1938**).*

36. *mazur, peter. physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. cryobiology (**1966**).*

37. *Swartz, H. M. Effect of oxygen on freezing damage. I. Effect on survival of Escherichia coli B-r and Escherichia coli Bs-1. Cryobiology 6, 546–551 (**1970**).*

38. *Nei, T., Araki, T. & Matsusaka, T. in Freezing and Drying of Microorganisms (**1969**).*

39. *Khosla, K., Wang, Y., Hagedorn, M., Qin, Z. & Bischof, J. Gold Nanorod Induced Warming of Embryos from the Cryogenic State Enhances Viability. ACS Nano 11, 7869–7878 (**2017**).*

40. *Seki, S. & Mazur, P. Effect of warming rate on the survival of vitrified mouse oocytes and on the recrystallization of intracellular ice. Biol. Reprod. 79, 727–737 (**2008**).*

41. *Buffat, P. & Borel, J. P. Size effect on the melting temperature of gold particles. Phys. Rev. A 13, 2287–2298 (**1976**).*

42. *Jin, B., Kleinhans, F. W. & Mazur, P. Survivals of mouse oocytes approach 100% after vitrification in 3-fold diluted media and ultra-rapid warming by an IR laser pulse. Cryobiology 68, 419–430 (**2014**).*

43. *Guy Preis, S. et al. Labyrinth ice pattern formation induced by near-infrared irradiation. Sci. Adv. 5, eaav1598 (**2019**).*

44. *Kou, L., Labrie, D. & Chylek, P. Refractive indices of water and ice. Appl. Opt. (**1993**).*

45. *LIQUID. Jun. 12, (**2001**) (10) Patent No.: (45) Date of Patent:*

46. *Boulos, L., Prévost, M., Barbeau, B., Coallier, J. & Desjardins, R. LIVE/DEAD BacLight : application of a new rapid staining method for direct enumeration of viable and total bacteria in drinking water. J. Microbiol. Methods 37, 77–86 (**1999**).*

47. *Braslavsky, I. & Drori, R. LabVIEW-operated novel nanoliter osmometer for ice binding protein investigations. J. Vis. Exp. e4189 (**2013**). doi:10.3791/4189*

48. *Knappe, V., Frank, F. & Rohde, E. Principles of lasers and biophotonic effects. Photomed. Laser Surg. 22, 411–417 (**2004**).*

49. *Jung, Y. & Hwang, J. Near-infrared studies of glucose and sucrose in aqueous solutions: water displacement effect and red shift in water absorption from water-solute interaction. Appl Spectrosc 67, 171–180 (**2013**).*

50. *Foster, P. L. Stress-induced mutagenesis in bacteria. Crit Rev Biochem Mol Biol 42, 373–397 (**2007**).*

51. *Gophna, U. & Ron, E. Z. Virulence and the heat shock response. Int. J. Med. Microbiol. 292, 453–461 (**2003**).*

52. *Vollmer, M. Physics of the microwave oven. Phys. Educ. 39, 74–81 (**2004**).*

53. *Nauroy. Acoustic properties of poorly cemented sandstones under temperature and stress. American Rock Mechanics Assocoation (**2011**).*

54. *Warren, S. G. & Brandt, R. E. Optical constants of ice from the ultraviolet to the microwave: A revised compilation. J. Geophys. Res. 113, (**2008**).*