

ישיבה תיכונית חספין

רמת הגולן 12920

240457

**בדיקת הקשר בין כמויות שונות של פחמן דו חמצני על פריחה של  
ציאנובקטריה משני סוגים:**

*Microcystis sp. (Brown) & Raphidiopsis raciborskii KLL07*

תחום הדעת: ביולוגיה

הנחיה:

מגיש: דביר קאופמן

ד"ר מיטל שבת סימון

מקום מגורים: הושעיה

מקום עבודה: מכללת תל חי – קמפוס קצרין

תעודת זהות: 325382315

טלפון התלמיד: 0547365564

כתובת דוא"ל תלמיד: [dvirk30@hityash.org](mailto:dvirk30@hityash.org)  
דניאל מובשוביץ, MSc.  
מקום עבודה: גליליון



**העבודה נעשתה במסגרת גליליון- השותפות האזורית להעשרה ומצוינות במדעים  
וטכנולוגיה**

דצמבר 2022

## תוכן עניינים

1. תקציר.....	3
2. סקירת ספרות.....	4
2.1. ציאנובקטריה.....	4
2.2. חשיבות והשפעת הציאנובקטריה במים מתוקים ולאדם.....	5
2.3. פריחות יתר של ציאנובקטריה במקווי מים מתוקים.....	6
2.4. פריחות יתר בישראל - ציאנובקטריה והרעלנים בכנרת.....	6
2.5. השפעת הפחמן הדו חמצני ( $CO_2$ ) על פריחות היתר של הציאנובקטריה.....	7
3. שיטות וחומרים.....	8
3.1. גידול הציאנובקטריה.....	8
3.2. הכנת מצע הגידול לניסוי.....	8
3.3. העמדת הניסוי – הכנסת הציאנובקטריה למצע.....	9
3.4. מדידת הפריחה.....	10
4. תוצאות וסטטיסטיקה.....	11
4.1. תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C1005 – הצגה 1.....	11
4.2. תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C1005 – הצגה 2.....	12
4.3. תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C3004 - הצגה 1.....	13
4.4. תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C3004 – הצגה 2.....	13
5. דיון ומסקנות.....	15
6. ביבליוגרפיה.....	18

## 1. תקציר

ציאנובקטריה הם חיידקים חד תאיים שהיו קרויים בעבר אצות כחוליות (וגם ירוקיות) ומקום גידולם הוא לרוב במים. בשונה משאר החיידקים הציאנובקטריה מייצרים את המזון שלהם בעזרת תהליך הפוטוסינתזה (אוטוטרופיים). הציאנובקטריה מכילים בתוכם רעלנים ובעת פריחת היתר שלה רעלנים אלו משתחררים לסביבה, מזהמים את המים ומהווים סכנה לכל אורגניזם אשר נמצא ומשתמש במים האלו.

מטרת המחקר היא מיתון רמת פריחת היתר הציאנובקטרית במקווי מים מתוקים בדגש על הכינרת.

במחקר זה נבדק כיצד כמויות שונות של פחמן דו חמצני משפיעות על פריחה של ציאנובקטריה משני סוגים - *Microcystis sp. (Brown) & Raphidiopsis raciborskii KLL07*. הוכנו ריכוזים שונים של פחמן דו חמצני מומס אשר נבדקו על שני סוגים של ציאנובקטריה אשר מצויים בכינרת, זמן הבדיקה היה כחודש ובו עקבנו אחרי השינויים בעזרת מכשיר קורא פלטות אלייזה.

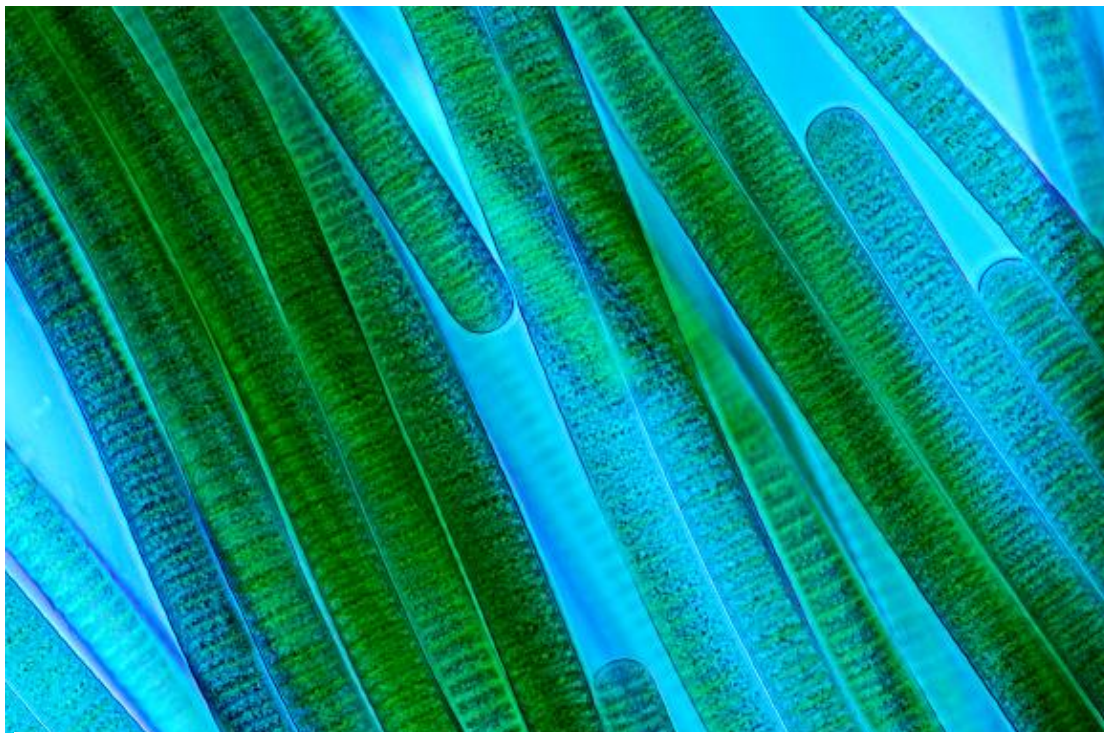
התוצאות לשני הסוגים השונים של הציאנובקטריה היו דומות בכך שבשניהם הריכוזים הגדולים ביותר הרגוהאטו את פריחת הציאנובקטריה ואילו הריכוזים הנמוכים ביותר האיזו את פריחת הציאנובקטריה.

המסקנה שלנו מניסוי זה היא שעל מנת למתן את רמת פריחת היתר הציאנובקטרית במקווי מים מתוקים אפשר להשתמש בריכוזים גבוהים ומרוכזים של פחמן דו חמצני .

## 2. סקירת ספרות

### 2.1. ציאנובקטריה

הציאנובקטריות הם חיידקי אצות (כחולות – ירוקות) (איור 1) שנתגלו לפני כ-2.5 ביליון שנה ובית גידולם הוא לרוב במים. (Mokoena and Mukhola, 2019). רוב הציאנובקטריות הן אוטוטרופיות ארוביות, משמע שתהליכי חייהם דורשים רק מים, פחמן דו חמצני, חומרים אורגניים ואור והם מייצרות את המזון שלהם בעזרת תהליך הפוטוסינתזה (שזה תהליך הפקת אנרגיה ותרכובות אורגניות מתרכובות אי-אורגניות המתקיים בחלק מהיצורים החיים, בכללם צמחים, אצות, וקבוצות מסוימות של חיידקים, כתוצאה מקליטת אור ופירוק מים ופחמן דו-חמצני). (Mur et al, 1999). הציאנובקטריות אחראיות לחמצון האטמוספירה של כדור הארץ. (Buick, 1992). פוטוסינתזה היא הדרך העיקרית שלהם לחילוף חומרים באנרגיה, בסביבה הטבעית. לעומת זאת, ידוע שמינים מסוימים מסוגלים לשרוד תקופות ארוכות בחושך מוחלט. קיבוע דיניטרוגן (תרכובת כימית:  $N_2$ ,  $O_4$ ) הוא תהליך מטבולי בסיסי של ציאנובקטריה, המעניק להם את הדרישות התזונתיות הפשוטות ביותר מכל האורגניזמים החיים (Mur et al, 1999). חיידקי הציאנובקטריה הם חיידקים קושרי חנקן אשר משלבים קיבוע של חנקן אטמוספרי, על ידי שימוש באנזים החנקן (אנזים הקיים בגוף החיידק ואחראי על פירוק החנקן האטמוספרי), הם ממירים את החנקן ( $N_2$ ) ישירות לאמוניום ( $NH_4$ ) (הצורה שדרכה נכנס חנקן לשרשרת המזון) ותורמים רבות למשק החנקן העולמי (Buick, 1992). יתר על כן, ציאנובקטריות מסוימות מראות יכולת ברורה לתזונה הטרוטרופית בשונה משאר החיידקים בעולם אשר ניזונים מתזונה אוטוטרופית. ציאנובקטריה היו מהצמחים הראשונים שהתיישבו באזורים חשופים של סלע ואדמה ומסוגלים ליישב מצעים עקרים כמו אפר וולקני, חול מדברי וסלעים. התאמות אבולוציוניות שיש לציאנובקטריה, כמו פיגמנטים של קליטת אולטרה סגול, מגבירות את כושרן בסביבת היבשה החשופה יחסית. יש מינים רבים של ציאנובקטריה, המסוגלים לחיות בקרקע ובבתי גידול יבשתיים אחרים, שם הם חשובים בתהליכים הפונקציונליים של מערכות אקולוגיות ובמחזור של אלמנטים תזונתיים. לעומת זאת בתי הגידול הבולטים יותר של ציאנובקטריה הם סביבות ימיות. הם פורחים במים מלוחים, טריים, מעיינות קרים, חמים, בסביבות בהן אין מיקרו-אצות אחרות ויכולים לשרוד טמפרטורות גבוהות ונמוכות במיוחד. רוב סוגי הציאנובקטריה הימיות צומחות לאורך רצועת החוף כצמחייה בנטית, באזור שבין סימני הגאות ומסגלות גם לעמוד בריכוזים גבוהים יחסית של נתרן כלורי. (Mur et al, 1999). בנוסף, חיידקים אלו צומחים על פני המים ומתרבים ליצירת חלאות על פני המים (אצות ירוקות הצפות בשכבה העליונה של המים, יש המכנים את זה – ירוקת). התרבות זו נקראת פריחה. הוכח כי כ-30 סוגים של ציאנובקטריות אחראים לפריחה של מים רעילים, המסוכנים לבני האדם ולחיות (Mokoena and Mukhola, 2019). המורפולוגיה הבסיסית של הציאנובקטריה כוללת צורות חוט-חד-תאיות, קולוניאליות ורב-תאיות. אך יש צורות וסוגים שונים של ציאנובקטריה הבנויים בסדרים שונים (Mur et al, 1999).



איור 1: חיידקי ציאנובקטריה מסוג *Oscillatoria*

צילום במיקרוסקופ אלקטרוניים: MAREK MIS / SCIENCE PHOTO LIBRARY

## 2.2 חשיבות והשפעת הציאנובקטריה במים מתוקים ולאדם

במשך 1.5-2 מיליארדי השנים הראשונות לקיומו של כדור הארץ לא היה כמעט חמצן באטמוספירה שלו, השינוי התרחש עקב הופעתם של חיידקי ציאנובקטריה שהיו היצורים החד-תאיים הראשונים בעולם שביצעו פוטוסינתזה והיו אחראים עיקריים של תהליך החמצון הגדול (תהליך "החמצון הגדול": שיעור החמצן באטמוספירה החל לעלות משמעותית, עד לכמה אחוזים – עדיין הרבה מתחת לריכוזו כיום, אך כבר כמות משמעותית ומורגשת. התהליך היה איטי למדי, מכיוון שהחמצן שנוצר הגיב עם מגוון חומרים והתמוסס באוקיינוסים, ועל כן ריכוזו באטמוספירה עלה בצורה מתונה למדי) (טייכמן, 2020). לציאנובקטריה יש חשיבויות אקולוגיות רבות במים מתוקים- חמצון המים בעזרת תהליך הפוטוסינתזה וקיבוע החנקן האטמוספרי, שני דברים אלו מאפשרים חמצן וחנקן לשאר האורגניזמים במים, ביקום בכלל (Dokulil and Teubner, 2000). תרומה אקולוגית נוספת של הציאנובקטריה הוא שימוש במטבוליטים שלהם לצורך הרפואי לדוגמא, הרעלנים מיקרוציסטינים וצילינדרוספרמופסין- הגורמים למחלות במערכת העיכול, בכבד ובכליות, יכולים לשמש בתחום הרפואי כגון פעילות נגד סרטן, אנטי מיקרוביאלית ומגן UV. בעשור האחרון חלה התעניינות מוגברת במחקר ציאנו-בקטריאלי, וכתוצאה מכך התרחבו השימושים במטבוליטים הציאנו-בקטריאליים מעבר לתחומי בריאות הציבור ותעשיית התרופות וכללה פיגמנטים לייצור מזון ודלקים ויישומים ביוטכנולוגיים אחרים (Mazard et al., 2016). בנוסף הופעת ציאנובקטריה במים מתוקים הוא נושא חשוב, המשפיע על אספקת המים ברחבי העולם, למשל בטולדו ובאוהיו

בארה"ב, אספקת המים נסגרה למשך 3 ימים בקיץ 2014 והושפעו מכך מעל 400,000 תושבים בעקבות פריחת יתר של ציאנובקטריה (He et al., 2016).

### 2.3 פריחות יתר של ציאנובקטריה במקווי מים מתוקים

עונת הפריחה של הציאנובקטריות מתרחשת בקיץ, הסיבה העיקרית לכך היא, השיטפונות של הביובים שבעקבותם חומרים מזינים נשטפים, למשל הזרחן והפחמן שהם מזון לציאנובקטריה. עקב פריחת יתר של ציאנובקטריה, עודף של ציאנובקטריה מתה ומתכלה, הדבר גורם לשחרור הרעלים לסביבה ובעקבות כך עלול להיגרם מצב של היפוקסיה או לאנוקסיה (מצבים פתולוגיים של חוסר חמצן בתאי הגוף, ברקמות) כאשר פריחה זו מתפוררת בסביבות חוף סגורות, הם יכולים להשליך חומרים מזינים, חומרים אורגנים ורעלים מסיסים במים, וכתוצאה מכך גורמים לאנוקסיה מקומית הגורמת לתמותה של דגים ואורגניזמים ימיים אחרים. הוכח כי כ-30 מינים של ציאנובקטריה אחראים לפריחה של מים רעילים. כמה מסוגי הרעלים אותם היא מייצרת הם: הפטוטוקסינים שתוקפים את הכבד, הנוירוטוקסינים שתוקפים את מערכת העצבים, והדרמטוטוקסינים הגורמים לגירוי בעור. מחקרים קודמים דיווחו על סוגי הרעלים השונים של הציאנובקטריה ועל השפעותיהם על המערכת הביולוגית של האדם. בנוסף, הרעלים הנחקרים ביותר של הציאנובקטריה הם המיקרוציסטינים, הם ידועים בגרימת גידולים וסרטן, ההימצאות של רעלים אלו בציאנובקטריה גבוהה יותר בעונת הפריחה, רעלים אלו נמצאים בתא ומסוגלים לפעול כ-21 יום לאחר התפוגגות של התא, לכן התא הציאנובקטרי יכול להוות סכנה בעת גסיסתו מכיוון שהוא משחרר רעלים למים שבסביבה. המיקרוציסטינים הם הרעלים המדאיגים ביותר את האדם מכיוון שהם מצויים הרבה במים מתוקים, דבר המסכן את בריאות האדם ובעלי החיים. ישנם יותר מ-80 סוגים של מיקרוציסטינים ידועים, שיש לטפל בהם במהלך טיהור המים. רוב התקני טיהור המים אינם מסוגלים לטפל במיקרוציסטינים, אלא רק ההתקנים החדשים המשתמשים במערכת פחמן פעיל (Mokoena and Mukhola, 2019).

### 2.4 פריחות יתר בישראל - ציאנובקטריה והרעלנים בכנרת

בשנת 1994 ו-1995 התרחשו בכנרת שתי פריחות יתר של ציאנובקטריה, אפניזומנון ומיקרוציסטיין. שני אירועי הפריחות הסמוכות זו לזו מהוות נקודת מפנה ברורה של השפעת פריחות היתר על איכות המים בכינרת. ממועד התרחשות אירועי פריחה אלו ועד היום, התבססו אוכלוסיית הציאנובקטריה ובמידה רבה דחקו מינים אחרים כמו הפרידיניום (סוג של פיטופלנקטון - קבוצת פלנקטון, אצות או חיידקים שיש להם פיגמנטים) שתפוצתם קטנה ובשנים מסוימות אף נעלמה לחלוטין. בהתרחש אירועי פריחה של ציאנובקטריות במקורות מים כמו בכינרת, הדאגה העיקרית של ספקי מים בארץ ובעולם, היא שמינים שונים של ציאנובקטריה מיצרים מגוון רעלנים העלולים לפגוע בצרכני המים, בני אדם כמו כן גם בעלי חיים. הכחוליות מהסוג מיקרוציסטיס יוצרות מושבות שהם צבר של תאים, בין מספר תאים בודדים עד כמה עשרות ומאות תאים. למושבות כושר ציפה ובמהלך שעות היום, במיוחד בימים חמים וכשעוצמת הרוח מתונה, המושבות נעות מעלה ויוצרות משטחים הצפים על פני המים ומתרכזים בסמוך

לחופים (איור 2). נמצא שציאנובקטריה היו מעורבות גם באירוע קיצון שהתרחש בברזיל, בו יוחסה תמותת חולי דיאליזה לחשיפה לרעלנים של ציאנובקטריה במהלך טיפול רפואי כושל. בנוסף, הצטברו ממצאים המעידים על פוטנציאל קרצינוגני של הרעלנים. לנוכח ההחמרה בהופעת כחוליות רעילות ברחבי העולם ואף מקרי מוות כתוצאה מחשיפה להם לכן ראוי לבחון בהקפדה את המשמעות של פריחת ציאנובקטריה בכינרת, והשפעתם על האגם וסביבתו ועל מערכת אספקת המים בישראל ולשכנותיה (סוקניק ועמיתו, ל"ת).



איור 2: פריחות של מיקרוציסטיס בכינרת בשנים שונות מציגות מגמה רב שנתית של נוכחות אוכלוסיות שונות של מיקרוציסטיס, שמאופיינות בהרכב פיגמנטים שונה (מתבטא בצבע סוקניק ועמיתו, ל"ת).

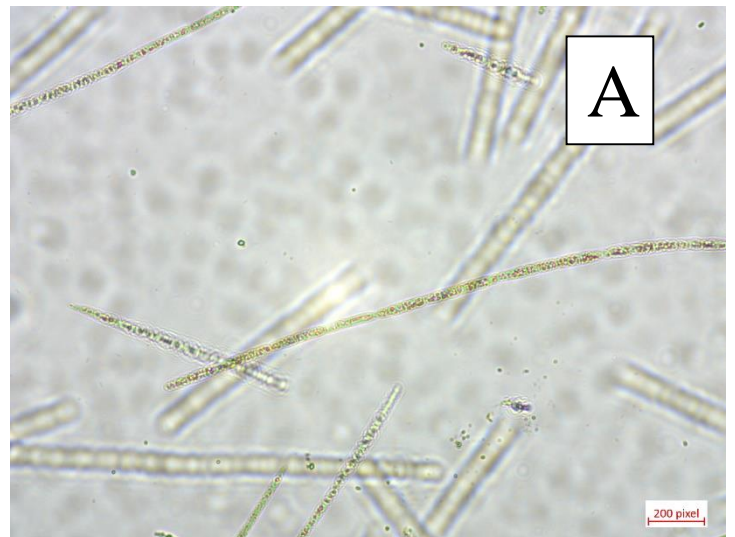
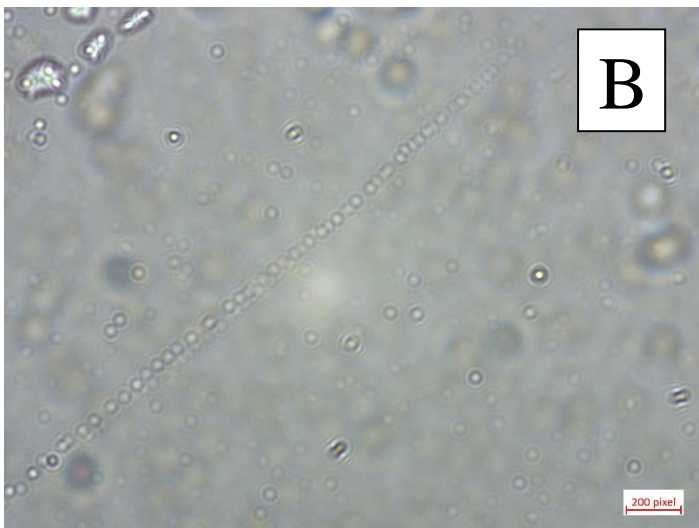
## 2.5 השפעת הפחמן הדו חמצני (CO<sub>2</sub>) על פריחת היתר של הציאנובקטריה

הגדלת ריכוז CO<sub>2</sub> באטמוספירה משפיעה לרעה על מערכות אקולוגיות במים ועלולה להחמיר את הבעיה של התפתחות פריחה ציאנובקטריאלית לא רצויה במערכות אקולוגיות במים מתוקים. פריחה ציאנובקטריאלית מעוררת דאגה רבה מכיוון שהיא מזיקה לשתית מים, השקיה ודיג. חנקן וזרחן הם החומרים העיקרים האחראיים על פריחה של ציאנובקטריה, עם זאת, CO<sub>2</sub> חיוני בפוטוסינתזה של ציאנובקטריה וצמחי מים אחרים, והטמעת CO<sub>2</sub> מספקת שלדי פחמן לתאים, ככל שעולות רמות ה-CO<sub>2</sub> האטמוספיריות עלולה לעלות רמת הפוטוסינתזה של ציאנובקטריה על ידי הקלה במגבלות הפחמן שלהן, ולהשפיע על צמיחה הציאנובקטריאלית באמצעות הקצאה מחדש של משאבים ואנרגיה לתאיים (Ma & Wang, 2020). עד כה החשיבו לעליית רמת הריכוז הפד"ח באטמוספירה רק השפעות קלות על התפתחות הפריחה הציאנובקטרית במערכות אקולוגיות של מים מתוקים (ברמת הפוטוסינתזה). אך הנחה זו מוטעית, ולעליית ריכוז רמת הפד"ח באטמוספירה יש השפעות משמעותיות על התפתחות הפריחה הציאנובקטרית במקווי מים מתוקים. ישנן עדויות משכנעות לכך שמשפיע מרכזי לשינויי אקלים, הוא ריכוז הפחמן הדו-חמצני האטמוספירי, אשר הוכח כמוסת את פני כדור הארץ ואת טמפרטורות המים באמצעות 'אפקט החממה'. היחסים בין עליית רמות הפד"ח באטמוספירה, התחממות כדור הארץ וירידה באיכות המים, נשלטים באמצעות אינטראקציות מורכבות של אידוי ושינוי גשמים, דפוסים, שינוי זרימות הידרולוגיות, תזוזות בכימיקלים ותהליכים ביולוגיים. דבר זה יוצר השלכות רבות לסוגים רבים של גופי מים שעשויים להיות מושפעים משינויים אלו, יתר על כן, הובלה ומסירה של חומרים מזינים (מינרלים שונים), הקריטיים להתפתחות והתפשטות הפריחה הציאנובקטרית, נובעים בעקבות שינויים אלו. (Visser et al., 2016)

### 3. שיטות וחומרים

#### 3.1 גידול הציאנובקטריה

בניסוי נעשה שימוש בשני סוגים שונים של ציאנובקטריה הגדולות בכינרת. הוזמן מהמעבדה לחקר הכנרת את שני סוגי הציאנובקטריה C1005 ממשפחת Microcystaceae הבנויים בסדר Chroococcales ו-C3004 ממשפחת Aphanizomenonaceae הבנויים בסדר Nostocales (איור 3) אשר מצויים בכינרת ונוח לעבוד איתם מכיוון שאינם מכילים את הרעל מיקרוציסטיין, רעיל מאוד ומסוכן לאדם. אותם גידלנו במצע נוזלי יחד עם מצע המזון המתאים להם BG-11 בארלינייר 250 מ"ל כך שלכול 50 מל של ציאנובקטריה 150 מ"ל של BG-11. כלי הארלינייר הונחו על אדן חלון המעבדה בטמפ' חדר (בערך 24°), גודלו בטמפ' ותנאי אור חיצוניים במשך 3 חודשים עד תחילת הניסוי.



איור 3: סוגי ציאנובקטריות A-C1005, ו-B-C3004 צולם תחת מיקרוסקופ במעבדה של ד"ר מיטל שבת-סימון במכללת תל חי קמפוס בקצריין (2021).

#### 3.2 הכנת מצע הגידול לניסוי

לצורך העמדת הניסוי הוכן מצע גידול נוזלי הגורם לשינויים ברמת הפד"ח על מנת לראות את השפעת הפד"ח על הציאנובקטריה. לצורך הכנת מצע הגידול חל שימוש בריכוז סודיום בי קרבונט(סודה לשתייה) על מנת לגרום לשינוי בריכוז הפד"ח בנוכחות הציאנובקטריה. במצע מורכב אבקת סודה לשתייה מהולה במצע המזון BG-11.



### שלב ראשון-תמיסת האם.

הוכן סטוק האם. 0.05g סודה לשתייה הומסה בתוך 1 מ"ל של BG-11 לקבלת תמיסה בריכוז של 600mM . בפועל נשקל 0.0672g של סודה לשתייה ולכן נמהל בנפח של 1.344 ומכך נוצר 600mM .

### שלב שני- מיהול עשרוני

בשלב המיהול העשרוני הוכנו 4 מבחנות שהכילו 900 מיקרו ליטר של BG-11 ונוצר מיהול עשרוני בריכוזים הבאים :

2= 60mM

3= 6mM

4= 0.6mM

5=0.06mM

מתוך ארבעת המבחנות נלקח אך ורק 20 מיקרו ליטר לכל בארית טיפול בהעמדת הניסוי ולכן הריכוז הסופי בבאריות היה קטן פי-10 מריכוז המבחנה כי הנפח הסופי בכל בארית הוא 200 מיקרו ליטר. בנוסף הוספה קבוצת טיפול נוספת שכללה אך ורק את מצע המזון BG-11 טיפול זה שימש כקבוצת בקרה על הניסוי.

### **3.3 העמדת הניסוי – הכנסת הציאנובקטריה למצע**

המטרה לבדוק את השפעת המצע החדש העשוי ממהילה של סודיום בי קרבונט (סודה לשתייה) יחד עם מצע המזון BG-11 . העקרון הביולוגי הוא להכניס את הציאנובקטריה אותה גידלנו יחד עם המצע החדש ולראות את ההשפעה של הריכוזים השונים של CO<sub>2</sub> על שני הסוגים השונים של הציאנובקטריה C3005 ו-C1005 .

נלקחו שתי צלחות של 96 באריות בשורות של 96 Well Cell Culture Plate Flat 12X8 (bottom with Lid Tissue Culture Treated Non-Pyrogenic Polystyrene) צלחת אחת לכל סוג של ציאנובקטריה ומתוכם נלקחנו הבאריות החיצוניות, סך הכל כ-36 באריות ובהם הוכנס מצע המזון של הציאנובקטריה BG-11, על מנת לתת לציאנובקטריה אפשרות להשיג עוד מזון במידה וחסר לה במצע שלה. שאר 60 הבאריות המסודרות בשורות של 10X6 שומשו לצורך הטיפולים השונים, 12 באריות לטיפול סך הכל חמישה טיפולים שונים בכל צלחת (איור 4).

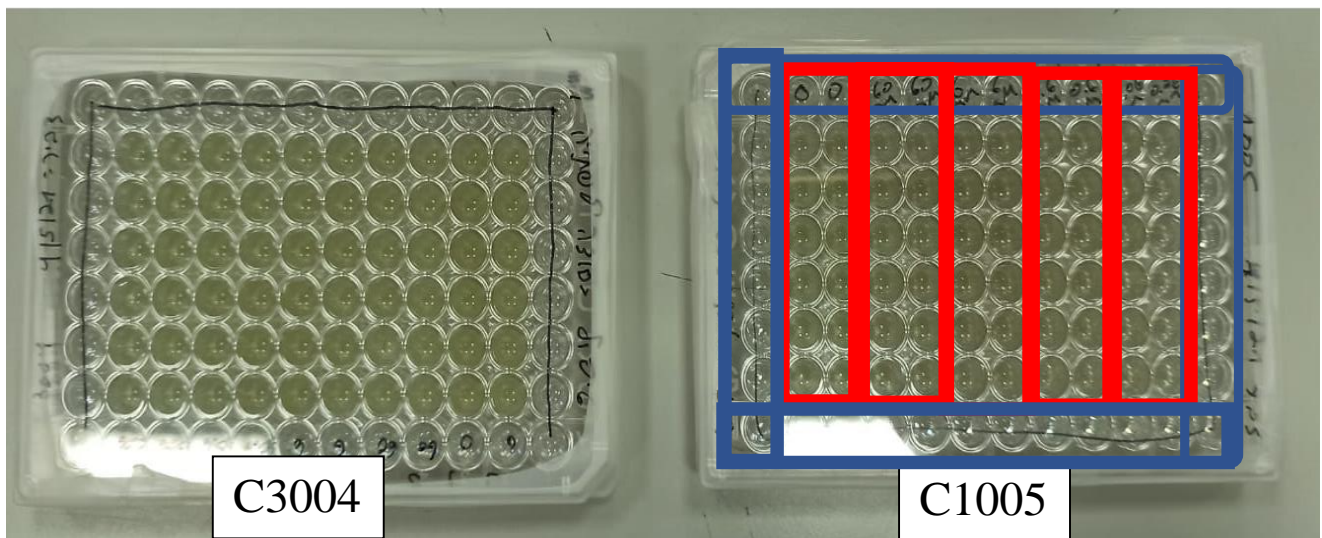
טיפול ראשון טיפול הבקרה – הטיפול כלל מצע נוזלי של BG-11 בלבד.

טיפול שני – טיפול שכלל 60mM של סודה לשתייה מהולה במצע המזון BG-11.

טיפול שלישי- טיפול שכלל 6mM של סודה לשתייה מהולה במצע המזון BG-11.

טיפול רביעי- טיפול שכלל 0.6mM של סודה לשתייה מהולה במצע המזון BG-11

טיפול חמישי- טיפול שכלל 0.06mM של סודה לשתייה מהולה במצע המזון BG-11



איור 4 : שתי הצלחות מוכנות , צלחת לכל סוג של ציאנובקטריה . הבאריות החיצוניות מסומנות בכחול ובאריות הטיפול מסומנות באדום. צולם על ידי כותב העבודה דביר קאופמן במכללת תל חי קמפוס קצרין במעבדה של ד"ר מיטל שבת-סימון (2021)

### 3.4 מדידת הפריחה

המטרה היא לראות ולעקוב אחר השינויים הנגרמים בעקבות הטיפולים השונים הכוללים ריכוזים שונים של פד"ח . עקבנו אחרי השינויים בעזרת מכשיר קורא פלטות אלייזה (Elisa plate reader) בתוכנה הנקראת Tecan i-control, 2.0.10.0, מכשיר זה מבחין בשינויים פלואורסנטיים וניתן להוציא אנליזות סטטיסטיות מדויקות לפי ההבדלים בצבע הציאנובקטריה. ההבדלים בצבע של הציאנובקטריה נגרמים בעקבות פריחה או תמותה שלה וכך בעצם אפשר לקבל סטטיסטיקה מדויקת של השינויים הנגרמים מהטיפולים.

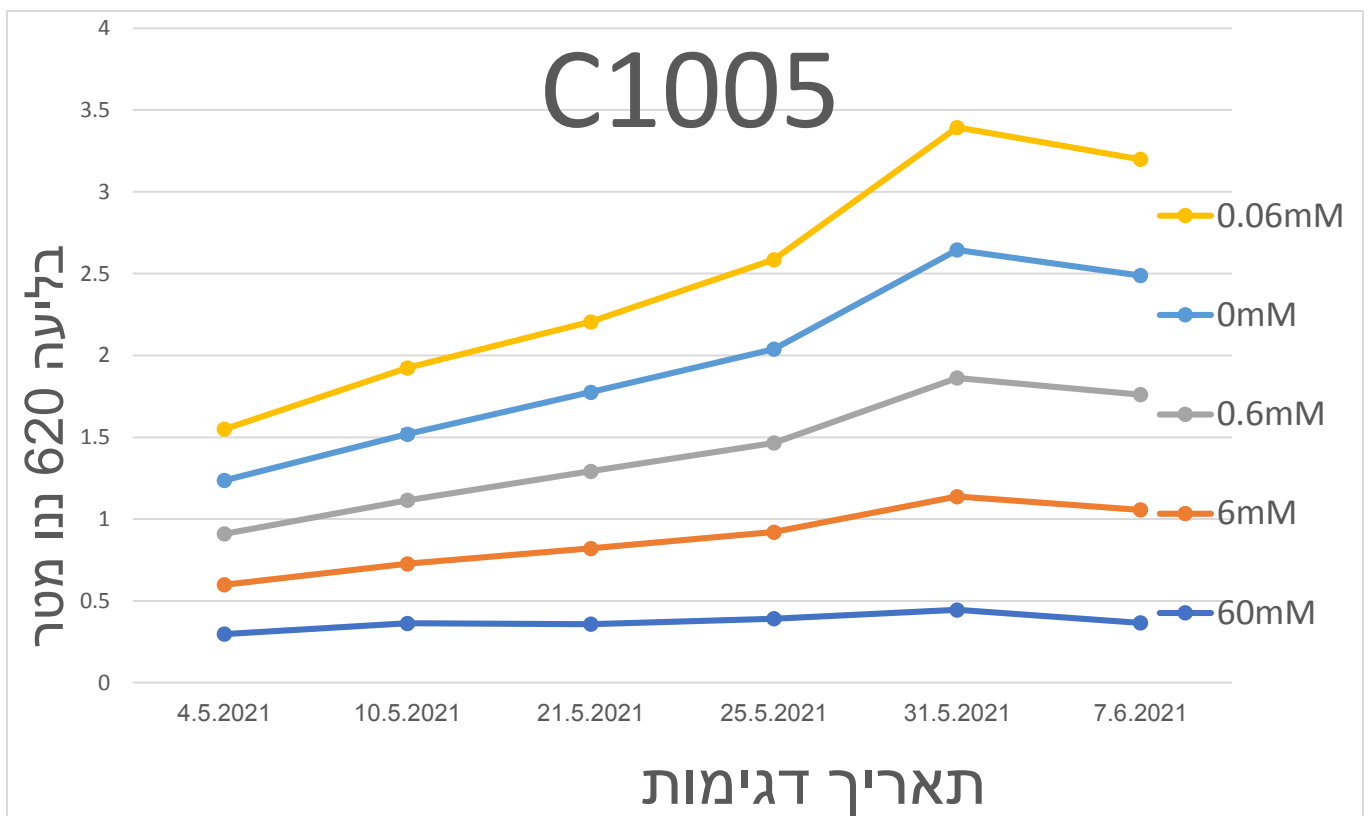
הצלחות נקראו קריאה ראשונה, הקריאה הראשונה נותנת את סטטוס תחילת הניסוי שלפיו מכשיר האלייזה יכול להבדיל בשינויים לפי הבדלי הצבע במהלך הניסוי ביחס לסטטוס ההתחלתי. הניסוי נמשך כחודש ושלושה שבועות שבהם הצלחות עמדו בטמפרטורת החדר (בערך  $24^{\circ}$ ) ונקראו במכשיר האלייזה בערך פעם בשבוע, שש קריאות סך הכל, לכל צלחת.

## 4. תוצאות וסטטיסטיקה

בניסוי נבדקו השפעות של ריכוזים שונים של פחמן דו חמצני על שני סוגים שונים של ציאנובקטריה. הקבוצות נקראו ונבדקו במעבדה של ד"ר מיטל שבת במכללת אוהלו בקצרין, במהלך חודש וחצי שבו התבצעו 6 קריאות בתאריכים שונים.

### 4.1 תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C1005 – הצגה 1

כפי שניתן לראות בגרף התוצאות של ציאנובקטריה מסוג C1005 (איור 5), רמת הגדילה של הציאנובקטריה בכל הטיפולים הייתה במגמת עלייה עד לתאריך 31.5.2021 ושם נכנסה למגמת ירידה. ניתן להבחין בגרף, שהציאנובקטריה שהייתה בטיפול של 0.06mM הגיעה לרמת הגדילה הגבוהה בגרף (כ-3.5 ננו מטר גדילה בנקודת המקסימום שהייתה בתאריך 31.5.2021) והציאנובקטריה שהייתה בטיפול של 60mM הגיעה לרמת הגדילה הנמוכה בגרף (כ-0.5 ננו מטר בנקודת המקסימום שהייתה בתאריך 31.5.2021).



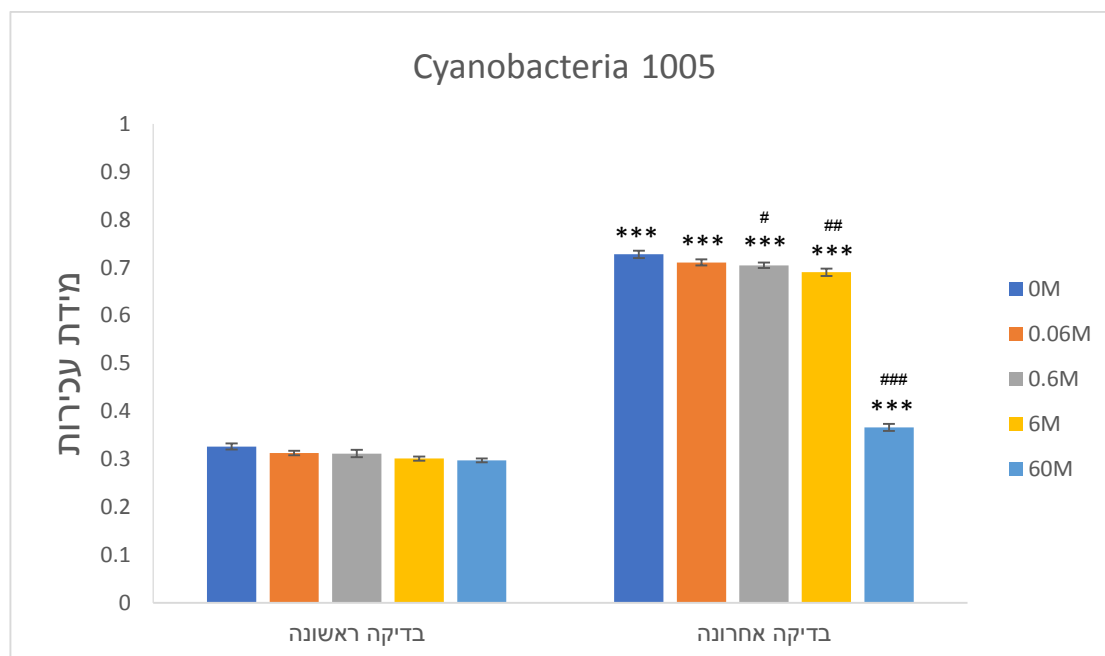
איור 5: איור זה הוא גרף רציף המתאר את הצמיחה הציאנובקטרית במהלך תאריכי הדגימות הנ"ל ואת השוני בין הטיפולים השונים. הוכן על ידי כותב העבודה דביר קאופמן (2021) באקסל לפי התוצאות שהתקבלו (Elisa plate reader) ממכשיר האלייזה.

## 4.2 תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C1005 – הצגה 2

ביצענו מבחן t-test לשם השוואה בין, תאריך המדידה הראשון (חודש אפריל 2021) לבין תאריך המדידה האחרון (חודש יולי 2021). בין ימי התאריכים השונים ביצענו השוואה בתוך הקבוצות ואילו בתאריך האחרון אשר בו בדקנו את השפעת הריכוז עצמו ביצענו השוואה בין הקבוצות (איור: 6).

כפי שניתן לראות על פי התוצאות שנתקבלו בגרף (איור: 6), ציאנובקטריה מסוג C1005 פרוחה ביתר באופן מובהק כמעט בכל הריכוזים השונים (0.06M, 0.6M, 6M), ואילו בריכוז הגבוהה (60M) הייתה פריחה באופן פחות מובהק זאת ראינו על פי מידת העכירות והמובהקות שנתקבלה במבחן הסטטיסטי אותו ערכנו ( $p < 0.0005$ , \*\*\*) ככל שמידת העכירות גבוהה יותר כך אנו יודעים שהיתה פריחה גדולה יותר של החיידקים. הכוכביות מסמלות השוואה בין יום בדיקה ראשון ליום בדיקה אחרון.

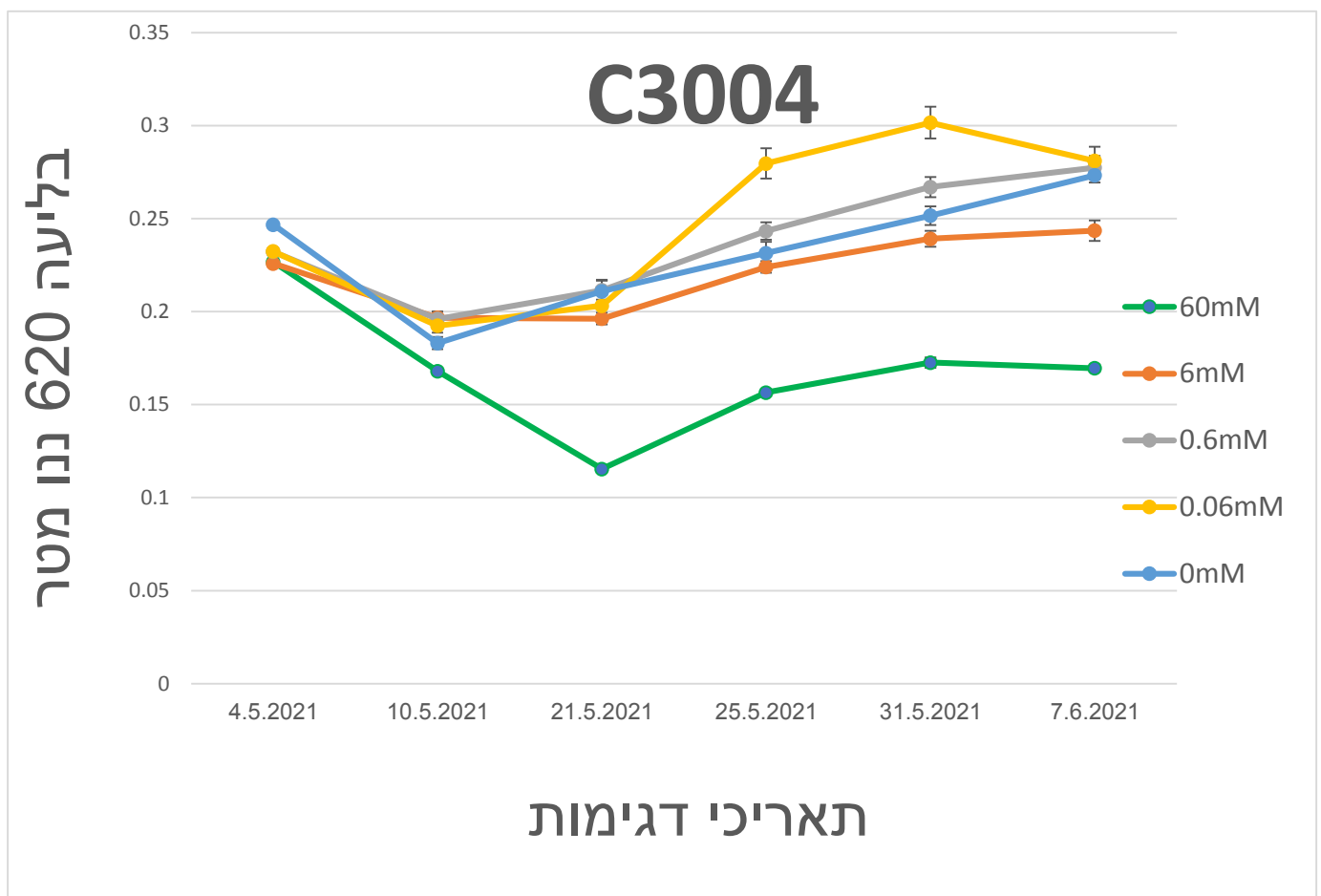
מבחן נוסף שביצענו היה לבחון את תוצאות הפריחה ביום הבדיקה האחרון למול ריכוז 0 מולר (איור: 6). ז"א השונו כל ריכוז מול ריכוז 0 מולר. התוצאות הראו שהריכוז הנמוך (0.06 מולר) לא האיץ את פריחת הציאנובקטריה מסוג C3004, לעומת זאת שאר הריכוזים האטו את קצב פריחת הציאנובקטריה. האטת פריחת הציאנובקטריה מסוג 1005 נצפתה בריכוזים – 0.06 מולר, 0.6 מולר, 6 מולר, והפגיעה הכי משמעותית היתה בריכוז 60 מולר. זאת ראינו על פי מידת העכירות והמובהקות שנתקבלה במבחן הסטטיסטי אותו ערכנו ( $p < 0.05$ , #;  $p < 0.005$ , ##;  $p < 0.0005$ , ###). הרשתיות מסמלות השוואה בין הריכוזים השונים ביום הבדיקה אחרון למול ריכוז 0 מולר.



איור: 6: גרף עמדות המתאר את השינויים בגדילת הציאנובקטריה מסוג C1005 בין הבדיקה הראשונה לבדיקה האחרונה ויוצר השוואה בין הריכוזים השונים לריכוז 0 מולר. הוכן על ידי החוקרת ד"ר מיטל שבת סימון (2021) במכללת אוהלו בקצרין לפי התוצאות שהתקבלו ממכשיר האלייזה (Elisa plate reader).

### 4.3 תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C3004 - הצגה 1

ניתן לראות בגרף התוצאות של הציאנובקטריה מסוג C3004 שהייתה מגמת ירידה ברמת הגדילה ובכמות הציאנובקטריה אצל כל הטיפולים עד לתאריך 10.2.2021 ומשם החלה מגמת עלייה אצל כל הטיפולים חוץ מהטיפול של ה- 60mM שהמשיך במגמת ירידה עד לתאריך 21.5.2021 ומשם החל במגמת עלייה. ניתן להבחין בגרף שהציאנובקטריה שהייתה בטיפול של ה- 0.06mM הגיעה לרמת הגדילה הגבוהה בגרף (כ-0.3 ננו מטר בנקודת המקסימום שהייתה בתאריך 31.5.2021) ואילו הציאנובקטריה שהייתה בטיפול של ה- 60mM הגיעה לרמת הגדילה הנמוכה בגרף (כ-0.155 בנקודת המקסימום שהייתה בתאריך 31.5.2021)



איור 7: גרף תוצאות הניסוי של ציאנובקטריה מסוג C3004, המתאר את השינויים שנגרמו בגדילה של הציאנובקטריה בעקבות הריכוזים השונים של הפחמן הדו חמצני, הוכן על ידי כותב העבודה דביר קאופמן (2021) באקסל לפי התוצאות שהתקבלו ממכשיר האלייזה (Elisa plate reader).

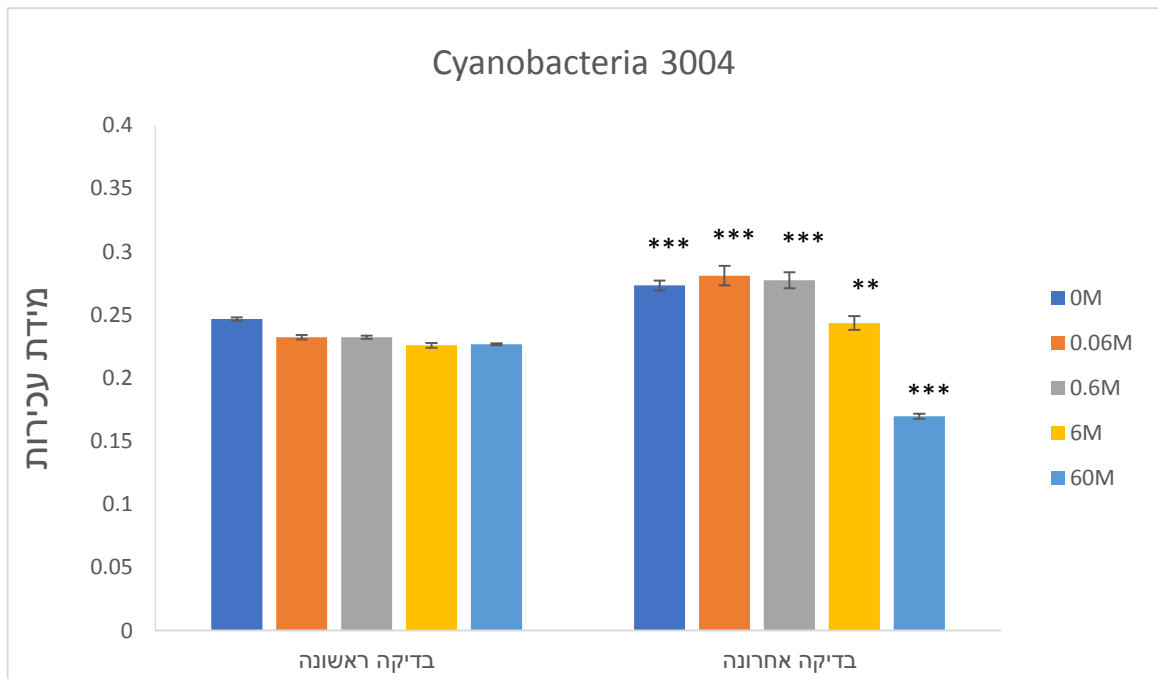
### 4.4 תוצאות הניסוי על ציאנובקטריה מסוג C3004 – הצגה 2

ביצענו מבחן t-test לשם השוואה בין, תאריך המדידה הראשון (חודש אפריל 2021) לבין תאריך המדידה האחרון (חודש יולי 2021). בין ימי התאריכים השונים ביצענו השוואה בתוך הקבוצות

ואילו בתאריך האחרון אשר בו בדקנו את השפעת הריכוז עצמו ביצענו השוואה בין הקבוצות.  
(איור : 8)

כפי שניתן לראות על פי התוצאות שנתקבלו ציאנובקטריה מסוג 3004. פריחה ביתר באופן מובהק בכל הריכוזים השונים של (פד"ח CO<sub>2</sub>) מלבד הריכוז הגבוה אשר השפיע לרעה על פריחת הציאנובקטריה ואף גרם לירידה בפריחה באופן מובהק. זאת ראינו על פי מידת העכירות והמובהקות שנתקבלה במבחן הסטטיסטי אותו ערכנו ( $p < 0.005$ ,  $** p < 0.0005$ ,  $***$ ). ככל שמידת העכירות גבוהה יותר כך אנו יודעים שהיתה פריחה גדולה יותר של החיידקים. הכוכביות מסמלות השוואה בין יום בדיקה ראשון ליום בדיקה אחרון. (איור : 8)

מבחן נוסף שביצענו היה לבחון את תוצאות הפריחה ביום הבדיקה האחרון למול ריכוז 0 מולר. ז"א השונו כל ריכוז מול ריכוז 0 מולר. התוצאות הראו שהריכוזים הנמוכים (0.06 מולר, 0.6 מולר) האיצו את פריחת הציאנובקטריה מסוג 3004 לעומת זאת ריכוז 6 מולר האט את פריחת הציאנובקטריה וראינו שריכוז ה-60 מולר פגע בפריחת הציאנובקטריה. זאת ראינו על פי מידת העכירות והמובהקות שנתקבלה במבחן הסטטיסטי אותו ערכנו ( $p < 0.0005$ ,  $###$ ). הרשתיות מסמלות השוואה בין הריכוזים השונים ביום הבדיקה אחרון למול ריכוז 0 מולר.



איור 8 : גרף עמדות המתאר את השינויים בגדילת הציאנובקטריה מסוג C3004 בין הבדיקה הראשונה לבדיקה האחרונה ויוצר השוואה בין הריכוזים השונים לריכוז 0 מולר. הוכן על ידי החוקרת ד"ר מיטל שבת סימון (2021) במכללת אוהלו בקצרין לפי התוצאות שהתקבלו ממכשיר האלייזה (Elisa plate reader).

## 5. דיון ומסקנות

הציאנובקטריות הם חיידקי אצות (כחולות – ירוקות) ובית גידולם הוא לרוב במים (Mokoena and Mukhola, 2019). רוב הציאנובקטריות הן אוטוטרופיות ארוביות, משמע שתהליכי חייהם דורשים רק מים, פחמן דו חמצני, חומרים אורגניים ואור והם מייצרות את המזון שלהם בעזרת תהליך הפוטוסינתזה (Mur et al, 1999). הציאנובקטריות אחראיות לחמצון האטמוספירה של כדור הארץ (Buick, 1992). בנוסף הציאנובקטריה הייתה משפיעה עיקרית על "החמצון הגדול" (תהליך החמצון של כדור הארץ) (טייכמן, 2020). עונת הפריחה של הציאנובקטריות מתרחשת בעיקר בקיץ, הסיבה העיקרית לכך היא, השיטפונות של הביובים שבעקבותם חומרים מזינים נשטפים, למשל הזרחן והפחמן שהם מזון לציאנובקטריה. עקב פריחת יתר של ציאנובקטריה, עודף של ציאנובקטריה מתה ומתכלה, הדבר גורם לשחרור הרעלים לסביבה, המסכנים את בריאות האדם ובעלי החיים. הוכח כי כ- 30 מינים של ציאנובקטריה אחראים לפריחה של מים רעילים וישנם יותר מ-80 סוגים של מיקרוציסטינים שהם הרעלים הנחקרים ביותר של הציאנובקטריה וידועים בגרימת גידולים וסרטן (Mokoena and Mukhola, 2019). בשנת 1994 ו-1995 התרחשו בכנרת שתי פריחות יתר של ציאנובקטריה, אפניזומנון ומיקרוציסטין. שני אירועי הפריחות הסמוכות זו לזו מהוות נקודת מפנה ברורה של השפעת פריחות היתר על איכות המים בכינרת וזיהומם (סוקניק ועמיתו, ל"ת). הגדלת ריכוז CO<sub>2</sub> באטמוספירה משפיעה לרעה על מערכות אקולוגיות במים ועלולה להחמיר את הבעיה של התפתחות פריחה ציאנובקטריאלית לא רצויה במערכות אקולוגיות במים מתוקים מכיוון שהוא חיוני בפוטוסינתזה של ציאנובקטריה והטמעת CO<sub>2</sub> מספקת שלדי פחמן לתאים, ככל שעולות רמות ה-CO<sub>2</sub> האטמוספיריות עלולה לעלות רמת הפוטוסינתזה של ציאנובקטריה, אשר משפיעה על הצמיחה הציאנובקטריאלית באמצעות הקצאה מחדש של משאבים ואנרגיה לתאים (Ma & Wang, 2020).

במחקר זה נבדקה ההשפעה של ריכוזים שונים של פחמן דו חמצני של שני סוגים שונים של ציאנובקטריה, C1005 ו-C3004 שני סוגי של ציאנובקטריה המצויים בכינרת. מטרת המחקר היא מיתון גדילתם של החיידקים מסוג ציאנובקטריה במקווי מים מתוקים בישראל.

השערת המחקר הנוכחי היא - ככל שרמת הפד"ח תעלה כך גם תעלה רמת הגדילה של הציאנובקטריה מכיוון שחיידקים אלו מקיימים את התהליך הפוטוסינתזה ולכן עלייה ברמת הפד"ח אמורה לגרום לעלייה ברמת הפוטוסינתזה, שאמורה להעניק לציאנובקטריה יותר משאבים ואנרגיה לגדילה.

צופה ושוער שבטיפולם שכללו ריכוז ממס גובהה יותר של פד"ח תהיה רמת גדילה גבוהה יותר של ציאנובקטריה מאשר בטיפולים שכללו ריכוז ממס נמוך של פד"ח. ממצאי המחקר שנעשה על ציאנובקטריה מסוג- C1005 ועל ציאנובקטריה מסוג- C3004 מפריכים חלקית את השערת המחקר הנוכחי ומראים שהטיפולים שכללו את הריכוזים הגבוהים של פד"ח הגיעו לרמת גדילה נמוכה מרמת הגדילה של ריכוז הבקרה. הדבר מראה שריכוזי הפד"ח הללו עיכבו את גדילתה של

הציאנובקטריה ומפריח את השערת-י שכלל שרמת הפד"ח גבוהה יותר כך רמת הגדילה תהיה גבוהה יותר. לעומת זאת, הטיפולים שכללו את הריכוזים הנמוכים ביותר של פד"ח הגיעו לרמות הגדילה הגבוהות מטיפול הבקרה. הדבר מראה על כך שריכוזי הפד"ח ברמות הנמוכות דווקא כן גרם לגדילה של ציאנובקטריה ולכן ההפרכה היא חלקית.

הסבר ראשון לכך שתוצאות המחקר לא תואמות באופן מלא את השערת המחקר הוא שכלל הנראה ריכוזי הפד"ח במחקר היו גבוהים ומרוכזים ביחס לריכוזי החיידק מה שגרם לעומס של פד"ח על החיידק ולכן הפד"ח השפיע עליו באופן שלילי. הסבר שני לכך הוא שהשערה התבססה על השפעה של פד"ח אטמוספרי שמומס באופן טבעי וספונטני. לעומת זאת, בניסוי עצמו נעשה שימוש בפד"ח שהופק באופן מלאכותי בתנאי מעבדה ולכן ככל הנראה הוספה זו השפיעה באופן שלילי על חומציות התמיסה. כידוע פד"ח הוא חומצי, יכול להיות שהאנזימים הפעילים בתוך הציאנובקטריה אינם יכולים לפעול בחומציות גבוהה, ולכן גדילת הציאנובקטריה הופרעה.

ממצאי המחקר שנעשה על ציאנובקטריה מסוג **C1005** (איור 5) מציגים לנו שכל הטיפולים מראים מגמת עלייה עד התאריך 31.5.2021 שזה תאריך הבדיקה הרביעי – כחודש מתחילת הניסוי, חוץ מהטיפול שכלל את הריכוז של **60mM** פד"ח, שלא מראה מגמת עלייה בגדילה ציאנובקטרית מובהקת ביחס לשאר הטיפולים. (איור 5) הטיפולים שכללו את הריכוזים הבאים של פד"ח מומס- **0.6mM**, **6mM**, **60mM** הגיעו לרמת גדילה נמוכה מרמת הגדילה של ריכוז הבקרה (**0mM**). הטיפול שכלל את הריכוז הנמוך ביותר מכל הטיפולים **0.06mM** הגיע לרמת הגדילה הגבוהה בגרף ועקף את ריכוז הבקרה. אפשר להסיק מתוצאות אלו שכאשר ריכוז הפד"ח גדול או שווה ל**0.6mM** הוא יגרום לעיכוב בגדילת הציאנובקטריה וככל שרמת הפד"ח תהיה גבוהה יותר כך יהיה יותר עיכוב בגדילה של החיידק עד לריכוז הגבוהה ביותר שנבדק **60mM**. בנוסף אפשר להסיק שריכוז פד"ח ברמה של **0.06mM** יגרום לגדילה של ציאנובקטריה. על פי התוצאות שהתקבלו משני הניתוחים הסטטיסטיים שנעשו בציאנובקטריה מסוג **C1005** (איור 5), מראים מובהקות שהריכוז הגבוה **60mM** האט משמעותית את הפריחה הציאנובקטרית ולכן אפשר להסיק מסקנה שכאשר ישנו ריכוז של פד"ח אשר גבוה מהריכוז **60mM** גדילת החיידק תיפגע.

ממצאי המחקר שנעשה על ציאנובקטריה מסוג- **C3004** (איור 7) מראים שכל הטיפולים כולל טיפול הבקרה מראים מגמת ירידה עד התאריך 10.5.2021 שזה תאריך הבדיקה השני, כשבוע מתחילת הניסוי. הסבר לירידה זו יכול לנבוע מהסתגלות איטית של החיידקים מסוג **C3004** למצע הגידול שלהם, אנו יכולים להבין זאת מכך שכל הטיפולים מראים מגמת ירידה כולל טיפול הבקרה. מהתאריך 10.5.2021 כל הטיפולים היו במגמת עלייה של גדילה ציאנובקטרית חוץ מריכוז **60mM** שהמשיך במגמת ירידה.

הריכוזים **0.6mM** והריכוז **0.06mM** הגיעו לרמת גדילה גבוהה יותר מטיפול הבקרה ואילו שאר הטיפולים גרמו לעיכובות מותה של החיידקים. אפשר להסיק מתוצאות אלה שכלל שרמת הפד"ח תהיה גבוהה מריכוז של **0.06mM** תתעכב רמת הגדילה של חיידקי ציאנובקטריה מסוג **C3004**



וככל שרמת הפד"ח תהיה גבוהה יותר כך יהיה יותר עיכוב בגדילה של החיידק . בנוסף אפשר להסיק שריכוז הפד"ח קטן מהריכוז של  $0.06\text{mM}$  הדבר יגרום לגדילה של ציאנובקטריה. על פי התוצאות שהתקבלו משני הניתוחים הסטטיסטיים שנעשו על ציאנובקטריה מסוג C3004 (איור 7 , איור 8) מראים מובהקות שהריכוז הגבוהה  $60\text{mM}$  פגע משמעותית בחיידק הציאנובקטריה ואף גרם לתמותה ולכן אפשר להסיק מסקנה שכאשר ישנו ריכוז של פד"ח אשר גבוה מהריכוז  $60\text{mM}$  החיידק ייפגע ואף ימות.

מסקנה העונה על מטרת המחקר- על מנת למתן את רמת פריחת היתר הציאנובקטריה במקווי מים מתוקים אפשר להשתמש בריכוזים גבוהים ומרוכזים של פחמן דו חמצני. הצעה למחקר המשך- במחקר הנ"ל התוצאות סתרו חלקית את השערת המחקר וזאת יכול להיות מכיוון שנעשה שימוש בסודה לשתייה שגרם לשינוי בפד"ח באופן מלאכותי ואילו ההשערה הסתמכה על פד"ח טבעי מהאטמוספירה. סיבה נוספת לכך יכלה להיות שהיה על הציאנובקטריה עומס של פד"ח. על סמך תוצאות אלו הייתי ממליץ שתי המלצות למחקר המשך, המלצה ראשונה- להשתמש בדרך אחרת לשינוי ברמת הפד"ח- דרך שיותר דומה לפד"ח אטמוספרי . המלצה שנייה- להשתמש בריכוזים יחסיים(פד"ח : ציאנובקטריה) נמוכים יותר מאילו שנבדקו במחקר הנ"ל.

## 6. ביבליוגרפיה

טייכמן א., (2020), מה הקשר בין חיידקים כחוליים, חרקים ענקיים, חלודה, שריפות ויערות גשם? כולם קשורים לסיפור המרתק של ריכוז החמצן באטמוספירה של כדור הארץ והתפתחות החיים כאן, מכון דוידסון הוחזר בתאריך 27.7.2021 מתוך :  
<https://davidson.weizmann.ac.il/online/sciencepanorama/%D7%90%D7%95%D7%95%D7%99%D7%A8-%D7%9C%D7%A0%D7%A9%D7%99%D7%9E%D7%94-%D7%9E%D7%94%D7%99%D7%9B%D7%9F-%D7%9E%D7%92%D7%99%D7%A2-%D7%94%D7%97%D7%9E%D7%A6%D7%9F>

סוקניק א., הדס א., זהרי ת., קפלן א. (לי"ת), ציאנובקטריה (יכחוליות) רעילות בכינרת – מבט לאחר עם הפנים קדימה, המעבדה לחקר הכנרת, איגוד ערים כנרת, רשות הכנרת, הוחזר בתאריך 21.12.2020 מתוך :

<http://kineret.org.il/%D7%A6%D7%99%D7%90%D7%A0%D7%95%D7%91%D7%A7%D7%98%D7%A8%D7%99%D7%94-%D7%9B%D7%97%D7%95%D7%9C%D7%99%D7%95%D7%AA-%D7%A8%D7%A2%D7%99%D7%9C%D7%95%D7%AA-%D7%91%D7%9B%D7%99%D7%A0%D7%A8%D7%AA-%D7%9E/>

Buick, R. (1992). The antiquity of oxygenic photosynthesis: evidence from stromatolites in sulphate-deficient Archaean lakes. *Science*, 255(5040), 74-77.

Dokulil, M. T., & Teubner, K. (2000). Cyanobacterial dominance in lakes. *Hydrobiologia*, 438(1-3), 1-12.

He, X., Liu, Y. L., Conklin, A., Westrick, J., Weavers, L. K., Dionysiou, D. D., ... & Walker, H. W. (2016). Toxic cyanobacteria and drinking water: Impacts, detection, and treatment. *Harmful algae*, 54, 174-193.

Ma, J., & Wang, P. (2020). Effects of rising atmospheric CO<sub>2</sub> levels on physiological response of cyanobacteria and cyanobacterial bloom development: A review. *Science of The Total Environment*, 141889.

Mazard, S., Penesyan, A., Ostrowski, M., Paulsen, I. T., & Egan, S. (2016). Tiny microbes with a big impact: the role of cyanobacteria and their metabolites in shaping our future. *Marine drugs*, 14(5), 97.

Mokoena, M. M., & Mukhola, M. S. (2019). Current Effects of Cyanobacteria Toxin in Water Sources and Containers in the Hartbeespoort Dam Area, South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 16(22), 4468.

Mur, R., Skulberg, O. M., & Utkilen, H. (1999). CYANOBACTERIA IN THE ENVIRONMENT.

Visser, P. M., Verspagen, J. M., Sandrini, G., Stal, L. J., Matthijs, H. C., Davis, T. W., ... & Huisman, J. (2016). How rising CO<sub>2</sub> and global warming may stimulate harmful cyanobacterial blooms. *Harmful Algae*, 54, 145-15