

כפר הנוער אלוני יצחק  
עבודת גמר בביולוגיה 5 יח"ל  
**השפעת השמנים רוזמרין, עץ התה ואורגנו על גידול  
האצה איזוכריזיס (*Isochrysis*) וניקיון התרבית**

מגישת העבודה: שחר פישלזון.

ת.ז: 325110690

מנחה: גל דישון

ת.ז: 043371269

מקצוע: ביולוגיה.

העבודה בוצעה בחווה החקלאית "החממה האקולוגית" בעין שמר.

פברואר- 2020



## תודות:

ברצוני להודות על האפשרות המדהימה שניתנה לי לעשות את עבודת הגמר הזו, והכי חשוב לאנשים המדהימים שעזרו לי לאורך כל הדרך. בלעדיהם כנראה לא הייתי מקבלת את ההזדמנות האדירה לעשות עבודת גמר מרתקת כזו.

לריבי מרגלית, המורה שלי לביולוגיה שדחפה אותי לעשות את עבודת גמר זו ותמכה ועודדה אותי לאורך כל העבודה.

לד"ר גל דיסון, המנחה שלי על מעל לשנה של תמיכה, הדרכה, למידה ועזרה ענקית גם מסן דייגו. על כך שהקדשת מזמנך כדי לעזור לי להפיק את ה-100% שלי בעבודה.

לעומרי גרעיני, שעזר לי רבות מאז שגל עזב, האמין בי ועזר לי גם שהיה קשה ולא האמנתי שאצליח לסיים.

לסיגל, שלמרות שלא הייתה המנחה שלי ישבה איתו שעות שלמות במטרה לסיים את העבודה ונתנה לי את העזרה הטובה ביותר שיכולתי לבקש.

לד"ר אורן איילון, מנהל החברה ALGAHEALTH איתה עבדתי לכל אורך העבודה, על העזרה בתחילת הדרך והמידע המרתק שהעביר לי ובזכותו עזר לי לעשות את העבודה המעניינת ביותר שיכולתי לעשות.

ולכל צוות החווה החקלאית "החממה האקולוגית" עין שמר, על העזרה בהכול, על הזכות האדירה שניתנה לי ועל תקופה הכי מדהימה ומעשירה שחוויתי בשנים האחרונות.

## תקציר:

האצה איזוכריזיס הוא אחד מסוגי האצות הנפוצים ביותר בחקלאות ימית. להאכלת לרוות של צדפות וסרטנים. הרכבה התזונתי מורכב מהרבה חומצות שומן בלתי רוויות כמו חומצה דוקוסהקסנואית (DHA), חומצה סטארידונית וחומצה אלפא לינולנית (ויקיפדיה- איזוכריזיס).

שימוש נוסף באצה הוא לצורך הפקת הפיגמנט פוקוקסנטין.

בעבודה זו בדקתי באיזה מידה משפיעים השמנים האתריים רוזמרין, אורגנו ועץ התה על גידול האצה איזוכריזיס וניקיון התרבית.

במהלך הניסויים בדקתי ריכוזים שונים של שמנים על האצה יחד עם רוטיפרים.

בניסויים ההתחלתיים מצאתי כי האצה והרוטיפרים מתו ככל הנראה כי ריכוז השמן היה גבוה מידי והזיק להם לכן ערכנו ניסויים נוספים עם ריכוזי שמן נמוכים יותר ומצאנו כי השמן לא פגע באצה וברוטיפרים וכי הטור בלי הרוטיפרים ובלי ריכוז שמן היה הטור עם צפיפות האצות הגבוהה ביותר.

לאחר הסקת מסקנות הוחלט להוריד בריכוזי השמן ל-20-0 מג"ל ובניסוי זה ראינו כי הטור עם ריכוז שמן 0 מג"ל ובלי רוטיפרים הוא הטור שבו היו התוצאות הטובות ביותר של הניסוי מבין טורים עם ריכוז 0 של השמן וריכוז 20 של האצה. עוד ניתן לראות כי ריכוז שמן נמוך לא הזיק לאצה ואפילו הועיל לה.

לאור ניסויים אלו אפשר להסיק כי שמן אתרי יכול לעזור בגידול יעיל יותר של האצה ובהרחקת תרביות לא רצויות.

בזכות עובדה זאת ניתן יהיה למצוא מינונים נכונים של שמן אתרי ושלב זאת בגידול האצה איזוכריזיס ובכך לגרום לגידול יעיל יותר והפקת תועלת מהאצה.

## תוכן עניינים:

3.....	1. תקציר.....
4.....	2. תוכן עניינים.....
6.....	3. מבוא וסקירה ספרותית.....
14.....	4. שיטות.....
19.....	5. תוצאות.....
25.....	6. סיכום ודיון.....
27.....	7. ביבליוגרפיה.....

## א. מבוא וסקירה ספרותית:

### בעיית המחקר:

האצה איזוכריזיס היא אצה קשה לגידול בעקבות גדילת בקטריות לא רצויות שעוצרות את התפתחותה. הניסוי ינסה למנוע את גדילת בקטריות אלה והאצה תהיה קלה יותר לגידול.

### אצות

אצות הן קבוצה הטרוגנית של אורגניזמים.

הן קבוצת יצורים מגוונת ביותר. הן יכולות להיות מיקרואורגניזמים חד תאיות או רב תאיות, פרוקריוטיות או אאוקריוטיות (תא פרוקריוטי- תא חסר גרעין, תא אאוקריוטי- תא בעל גרעין ואברונים), וטווח הגדלים שלהן נע ממיקרו אצות חד תאיות בגודל 0.5 מיקרון עד לאצות רב תאיות שגודלן מגיע עד ל 50 מטרים.

אצות גדלות במגוון סביבות מימיות: אוקיינוסים, נחלים, אגמים ובשלוליות, ובטווח מליחיות רחב- מים מתוקים, מליחים, מי-ים ואף בלגונות (חוף רדוד מאוד) היפר-מלוחות. אפשר למצוא אצות גם בתוך קרח ובשכבה דקה המצפה סלעים וקרקע. (Graham et Al 2009 .)

אצות מתרבות ב2 דרכים:

1. רבייה מינית- בה הן מעמידות צאצאים באמצעות התלכדות של שני תאי מין.

2. רבייה אל מינית- בה הן יוצרות העתק זהה להן גנטית מבלי שיהיה מעורב בתהליך החומר תורשתי, התפתחות מתאים של פרט אחד.

(Graham et Al. 2009 .)

### תרומת האצות לאדם ולסביבה

האצות משפיעות על כדור הארץ באופן בולט בזכות הפוטוסינתזה שהן מבצעות.

הן אחראיות על כמעט מ-50% מהחמצן באטמוספירה והן מייצרות כמות גדולה של פחמן אורגני בגלל מספרן הרב.

כיום מפתחים שיטות חדשות לייצור דלקים כמקור אנרגיה מתחדש בעזרת אצות. ביודלקים (דלקים ממקור ביולוגי), המיוצרים מאצות וממקורות ביולוגיים אחרים, יוכלו לעזור להקטין את השימוש באנרגיה מחצבית.

בני אדם מנצלים אצות בצורות רבות אחרות. מיני אצות מסוימות, משמשות במערכות ביולוגיות מעבדתיות כ"חיות ניסוי". אצות מיקרו בעלות קצב שכפול גבוה אלו המשמשות כ"עכברי מעבדה" עזרו בהשגת אינפורמציה חיונית על הביוכימיה והביולוגיה המולקולרית של תהליך הפוטוסינתזה ותהליכים תאיים רבים אחרים. (דובינסקי 1983).

אצות משמשות לשם הפקת חומרי טבע רבים, חלקם לא ניתנים להשגה בשום אופן אחר.

אצות משמשות בחקלאות הימית, כחומרי צבע טבעיים, כתוספי מזון כגון הסושי ביפן, ובתעשיית החקלאות הימית כמקור למזון במכוני רבייה של דגים וצדפות.

בעזרת אצות ניתן לטפל בזיהומים במערכות ביוב ובמערכות מים חקלאיות לפני החזרתם לטבע

(Graham et al, 2009, ויקיפדיה- אצות).

### איזוכריזיס-

איזוכריזיס היא סוג מיקרו אצה ימית צהובה חומה (haptophytes). הוא כולל בתוכו את המינים: *Isochrysis galban*, *Isochrysis litoralis* ו-*Isochrysis maritima*.

צורת אצה זו דומה לצורת ביצה, קוטרה בין 4-6 מיקרומטר. יש בה שני שוטונים גמישים שעוזרים לה לנוע בצורה עיגולית (ספירלית). איזוכריזיס הוא אחד מסוגי האצות הנפוצים ביותר בחקלאות ימית להאכלת לריות של צדפות וסרטנים. הרכבה התזונתי מורכב מהרבה חומצות שומן בלתי רוויות כמו

חומצה דוקוסהקסנואית (DHA), חומצה סטארידונית וחומצה אלפא לינולנית (ויקיפדיה- איזוכריזיס).

שימוש נוסף באצה הוא לצורך הפקת הפיגמנט פוקוקסנטין.

פוקוקסנטין (fucoxanthin) הוא קסנתופיל השייך למשפחת הקרוטנואידים. הקרוטנואידים, הכוללים בין השאר פוקוקסנטין, בטא קרוטן, לוטאין וליקופן, הם פיגמנטים הנמצאים במזונות בעלי צבעים שונים.

הפוקוקסנטין מופק מאיזוכריזיס ואצות חומות המשמשות מוצר מזון פופולרי ברחבי יפן ואסיה, והוא זה שנותן לאצות את צבען החום-ירוק. (ויקיפדיה- איזוכריזיס, פוקוקסנטין)

פוקוקסנטין משמש נגד השמנת יתר (Maeda, 2005), ובטיפול נגד מחלות ממאירות כמו סרטן

(Yan, 1999)

אחת הבעיות המשמעותיות בגידול האיזוכריזיס הוא גדילת אורגניזמים שאינם רצויים בתרבויות, מה שגורם לאצות למות או להינזק (תקשורת אישית עם דר אורן איילון).

### שמנים אתריים-

שמן אתרי הוא שם שניתן לחומרים הנדיפים המקנים לצמח ארומטי את ריחו האופייני.

כל השמנים האתריים מכילים תרכובות שונות של חומרים כימיים נדיפים, בעלי מסיסות נמוכה במים ובעלי טמפרטורת רתיחה נמוכה.

ברוב המקרים ימצאו בשמן חומרים מקבוצת טרפנים או סקוויטרפנים =תרכובות המורכבות מיחידות חוזרות של איזופרן (ברורמן 2011, ויקיפדיה-שמן אתרי).

יש 3 תפקידים לשמן האתרי בצמח, התפקיד הראשון הוא ריח- מרכיבי השמן האתרי נחשבים כחומרי ביניים בתוך מסלול מטבולי לצורך יצור חומר אחר בצמחים, ותפקידם אינו ידוע. יש הטוענים שהם בעלי תפקיד מכריע למשיכה וכאמצעי זיהוי לחרקים מאביקים.

התפקיד השני הוא הגנה מאויבים- השמנים האתרים לרוב רעילים לצמח, וסביר להניח שאגירתם בבלוטות מיוחדות היא התאמה המונעת "הרעלה עצמית", תפקידם המרכזי של השמנים האתריים הוא בבחינת הקניית יתרון הישרדותי לצמח על ידי הגנה מאויבים טבעיים, כגון מזיקים, מחלות, בעלי חיים וכדומה, בחקלאות מנצלים תכונה זאת להרחקת יתושים וחרקים (ברורמן 2011).

התפקיד האחרון הוא התאמה לתנאי אקלים- השמן האתרי בצמחים מרוכז בבלוטות או בשערות על פני האפידרמיס. השערות מקנות הגנה מפני קרינה. השמן יחד עם השעריות הדקות יוצרים "שכבת בידוד" וכך, בדומה לשמן ומים, העלה המצוי בסביבה רוויה מאבד פחות מים. בנוסף, מרכיבים נדיפים בשמן האתרי מתנדפים וכך תורמים לקירור העלה (ויקיפדיה- שמן אתרי).

הפקת השמן האתרי בתעשייה ובמעבדה נעשית בשיטות פיזיקליות, כגון זיקוק באדי מים, הפקה על ידי לחץ בקור ומיצוי בממיסים אורגניים. השיטה השכיחה כיום בתעשייה היא שיטת הזיקוק בקיטור, המבוססת על הזרמת קיטור דרך מכל שבתוכו נמצאים הצמחים. הקיטור מעלה את לחץ האדים הכללי של התערובת, ובכך מאפשר לשמן להזדקק גם בטמפרטורה הנמוכה מטמפרטורת הרתיחה שלו. התערובת יוצאת מהמכל ומתקררת במעבה. השמן מופרד ממי העיבוי בזכות משקלו הסגולי הנמוך ומסיסותו הנמוכה במים.

צמחים מכילי שמנים אתריים היוו את חומרי הרפואה העיקריים של הדורות הקודמים.

בצמחים אלו השתמשו בדרכים שונות נגד מגוון רחב של מחלות כמו: דלקות בדרכי הנשימה, הפרעות במערכת העיכול, להרגעה ולכאבי פרקים.

במהלך השנים הצליחו החוקרים למצוא הסבר לפעילויות של השמנים האתריים ובעזרת שיטות מעבדתיות מתקדמות הוכח כי לחלקם פעילות אנטיביוטית.

הפעילות האנטיביוטית של סוגי הצמחים הייתה ידועה מאז הזמן העתיק ברפואה ובשימור מזון, במקרים רבים הוכח שהפעילות טמונה בשמן האתרי שבצמחים (בראל 1994).



## שמן רוזמרין

רוזמרין רפואי הוא שיח רב-שנתי ירוק-עד בעל פרחים תכולים. גבעוליו מוציאים ענפים עמוסים בעלים מחטניים, ששוליהם מקופלים לאחור וצבעם ירוק כהה בצדם העליון ואפור בצדם התחתון. מרבים את הצמח מחלוקת שורשיהם של צמחים מפותחים, הנלקחים מצמיחה חדשה ומושרשים או מזרעים. הצמח נפוץ ביותר כצמח נוי בישראל, בין השאר בשל עמידותו הגבוהה ליובש ולזיהום אוויר.

הצמח מכיל את הפנולים חומצה קרנוסולית וחומצה קרנוסית שהם חומרים נוגדי חמצון. לשמן האתרי המופק מהצמח שימושים בתעשיות התמרוקים והתרופות. שמן רוזמרין טהור בריכוז 0.6 אחוז מתקבל מאידוי ראשי הפרחים והעלים. מאידוי כל הצמח מתקבל שמן באיכות לא טובה. מרכיביו העיקריים של שמן זה הם צינאול, קאמפור ובורנאול. השמן משמש בתעשייה לייצור סבונים, בדאודורנטים ובתכשירים לשיער, בגלל היותו דוחה כינים. אפשר גם ליצור שמן לעיסוי על ידי השריית נצרי רוזמרין בשמן צמחי למשך שבוע. ברפואה העממית משתמשים בצמח מושרה במי אמבט כנגד תשישות, מיובש כאבקה לעצירת דימום בזרייה על המקום או לשתייה בחליטת הנצרים, הפרחים והעלים. יש המאמינים שהצמח יעיל לטיפול בכאבי ראש, במיגרנה, בתשישות כללית, בחולשה של מחזור הדם, ובבעיות עיכול הקשורות להפרעות רגשיות. כמו כן, משמש הצמח גם להרחקת נמלים (ויקיפדיה- רוזמרין רפואי).

הצמח מכיל גם חומצה רוזמרינית הידועה כפעילה כנגד חיידקים, נגד וירוסים, נגד לחץ חמצוני ונגד סרטן (Hossan et al. 2014).

## שמן עץ התה

השמן מופק מעלי הצמח *Melaleuca alternifolia* אשר גדל ברצועת החוף באוסטרליה הרכיב הפעיל שנמצא בשמן עץ התה הינו חומר אנטי בקטריאלי

ומחטה מסוג טרפנואיד והוא זה שאחראי למרבית תכונות המרפא של התכשיר. המחקרים הקליניים הרבים שנעשו על השמן המופק מצמח המרפא מצביעים על היעילות הגבוהה שלו במקרי ההדבקה בוירוסים וחיידקים ויראליים, פטריות וכאבים חזקים. על כן, תכשיר שמן עץ התה מומלץ לטיפול במגוון מצבים רפואיים סבוכים – מפציעות חמורות, כוויות, דלקות ועד לזיהומים פטרייתיים. המחקרים האלה התבססו על ניסויים שבהם גידלו זנים מסוימים של חיידקים ושל פטריות בנוכחות ריכוזים שונים של שמן עץ התה והשוו אותם לחיידקים ופטריות מאותו מין שגדלו בלי השמן. בשלב הראשון השוו החוקרים את קצב הגידול עצמו והראו שנוכחותו של שמן עץ התה אכן יכולה לעכב גידול של חיידקים ופטריות. חיידקים ופטריות שגדלים לאט יותר מזיקים פחות לגוף המאכסן (כלומר לגוף שלנו) כיוון שלוקח להם יותר זמן להתבסס ובינתיים מערכת החיסון יכולה להתגבר עליהם בכוחות עצמה.

לאחר מכן ביצעו חוקרים אחרים ניסויים שבהם ניסו לבחון את המנגנון שבאמצעותו שמן עץ התה מעכב את גידול המזיקים. בניסויים הללו הם בחנו פרמטרים שקשורים בחדירות של קרום התא.

כל תא חי מוקף בקרום בררני, כלומר ממברנה שלא מאפשרת לחומרים לצאת מהתא ולהיכנס אליו באופן חופשי. כאשר היכולת של הממברנה לווסת את ריכוז החומרים בתא נפגעת, גם יכולתו של התא לתפקד נפגעת בהתאם, כיוון שתהליכים רבים וחיוניים בו מבוססים על היכולת של התא לשמור על סביבה כימית שונה מהסביבה החיצונית. (מכון דוידסון שמן עץ התה על מה ולמה?)

## שמן אורגנו

אורגנו, הוא שיח רב-שנתי ממשפחת השפתניים. עלי האורגנו משמשים לתיבול ונפוצים מאוד במטבח הים-תיכוני. בנוסף ידוע שלאורגנו יש תכונות אנטי-בקטריליות (קוטלות חיידקים).

כבר בימי קדם השתמשו בצמח האורגנו לריפוי פצעים ומחלות שנקשרו בדרכי הנשימה, העיכול ועוד, ולצמח יוחסו באופן כללי תכונות של הרגעה. ברפואה הסינית משתמשים באורגנו להקלה בחום גבוה, שלשולים וגירודים בעור. באירופה משתמשים בו להקלה בבעיות שקשורות לדרכי העיכול ובהקלה על שיעול.

לשמן האורגנו יש תכונות אנטי-בקטריליות חזקות מאוד וידוע שיש לו יכולת

לחזק את מערכת החיסון. החומר הפעיל שבו נקרא "קרבקול". מחקרים מראים ששמן האורגנו הוא אמצעי אפקטיבי מאוד נגד חיידקים גראם-חיוביים (בעלי דופן עבה) וגראם-שליליים (בעלי דופן דקה). פעילותו העיקרית נובעת מהנזק שהוא גורם לממברנה של החיידק.

הקרבקול הוא "פנול טרפנאוידי" (פנול הוא הטבעת המשושה שבציור המולקולה בשילוב קבוצת ה-OH שקשורה אליה). עקב השתייכותו למשפחת הפנולים יש לו ריח חריף מעט שמעניק לאורגנו את ניחוחו האופייני.

מולקולת הקרבקול בנוייה מאזור פחממני שלא יוצר קשרים עם מים ומאזור OH שיוצר קשר עם הסביבה המימית, כך שהקרבקול יכול לתפקד כדטרנגנט (חומר בעל קבוצה "אוהבת מים" ובעל קבוצה "נרתעת ממים" שיכול בשל כך להיקשר גם למים וגם לפחממנים).

כשתא חיידקי בא במפגש עם הקרבקול, שמשמש כדטרנגנט, קרום התא שלו נקשר לחלק הפחממני בקרבקול, ובצד השני הקרבקול נקשר לתמיסה המימית שמסביב. כתוצאה מכך אזורים מסוימים בקרום התא החיידקי עוברים שינויים מרחביים משמעותיים ובסופו של דבר נוצרים חורים בקרום החיידק. כתוצאה מכך מתחילה כניסה מהירה ובלתי נשלטת של חומרים לתוך החיידק, בעיקר נוזלים ומלחים דוגמת סידן שנמצאים בכמויות גדולות מחוץ לתאים. התהליך הזה גורם לחיידק נזק בלתי הפיך והורג אותו (מכון דוידסון שמן אורגנו).

## רוטיפרים

חסרי-חוליות מיקרוסקופיים החיים במאגרי מים מתוקים, כגון שלוליות ונחלים, וכן בקרקעות לחות ועל גבי טחבים וחזזיות. קיימים כיום מאות מינים של רוטיפרים המותאמים למגוון סביבות, ממעינות חמים ועד לאנטארקטיקה. הרוטיפרים הם יצורים דיפלואידיים המתרבים אך ורק ברביית בתולין, כלומר רבייה אל-מינית: האם מטילה ביצים לא-מופרות, שמהן מתפתחות בנות שהן שיבוט שלה. ברבייה כזו אין כל צורך בזכרים, שאכן אינם קיימים. (הידען, "כיצד בעלי חיים המתרבים ברביית בתולין מצליחים לשגשג ולהתפתח"). הגוף של הרוטיפרים עשוי להיות כדורי, שטוח, דמוי שקית או דמוי תולעת. דופן הגוף מורכבת מציפורן דקה. ציציות של ציפורן בקצה הקדמי מהוות את הקורונה המשמשת להאכלה. אורגניזמים קטנים מופקים כמזון מזרמי מים הנוצרים על

ידי הקורונה הצלויה. אורגניזמים גדולים יותר, כמו מסתובבים אחרים, סרטנים ואצות, נאכלים גם הם. בדרך כלל קיימים פה ודרכי עיכול. הלוע השרירי, או המסטאקס, מכיל לסתות קשות קטנטנות. חברים מכל מין מורכבים ממספר מדויק של תאים. בנוסף לסיבובי השחייה, כמה (תת-סוג Bdelloidea) לולאות לאורך קרקעית הבריכות, ומחברים לסירוגין את קצות הראש והזנב. אחרים נשארים מעוגנים באמצעות צינורות או של ג'לי המחובר לקרקעית. מצבי הרבייה נבדלים זה מזה בין המינים. מינים מסוימים מתרבים רק פרנטנוגנטית לנקבות. מינים אחרים יכולים להתרבות בצורה מינית ומינית, בהתאם לתנאים הסביבתיים. זכרים קטנים יותר ושכיחים פחות במינים רבים (Britannica, rotifer).

### שאלת מחקר-

באיזה מידה משפיעים השמנים רוזמרין, עץ התה ואורגנו על גידול האצה איזוכריזיס (*Isochrysis*) וניקיון התרבית.

### השערות המחקר-

1. בניסוי ימצא ריכוז אופטימלי בו שמן רוזמרין ישמור על קצב גידול האצות וישפר את נקיון התרבית.
2. בניסוי ימצא ריכוז אופטימלי בו שמן עץ התה ישמור על קצב גידול האצות וישפר את נקיון התרבית.
3. בניסוי ימצא ריכוז אופטימלי בו שמן אורגנו ושמן עץ התה (בריכוזים נמוכים יותר) ישמור על קצב גידול האצות וישפר את נקיון התרבית.
4. לאחר מציאת הריכוז המתאים לגידול נכון של האצה, האצה תגדל בצורה יעילה יותר וצפיפותן יעלה.

## ב. מהלך המחקר:

### תיאור החומר החי:

הניסויים נעשו על אצות איזוכריזיס שהתקבלו מחברת סטראטאפ המגדלת אצות בחממה האקולוגית עין שמר.

האצות גודלו במדיום המקובל לגידול האצות בחברה ונשמרו בטלטול במשך יום עד לשימוש בניסוי.

בתור זיהום בניסוי נעשה שימוש ברוטיפרים שהתקבלו מחברת לטימריה ונשמרו בטלטול לא יותר מלילה עד לשימוש בניסוי.

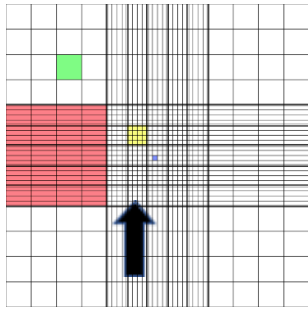
### תיאור שיטות המחקר:

צפיפות האצות בניסוי נמדדה ב2 שיטות:

**ספקטרופוטומטר** - מכשיר מדידה המאפשר למדוד את בליעת האור של חומר נבדק באורכי גל שונים. בניסוי השתמשתי במכשיר על מנת למדוד את בליעת האור באורך גל 680 ננומטר מכיוון שזהו שיא בליעה של מולקולת הכלורופיל המצויה באצות, ולכן בליעה באורך גל זה היא מדד לכמות האצות.

בשלב מקדים לתחילת הניסוי, על מנת לוודא את דיוק ספירת האצות במיקרוסקופ, לקחתי את האצה בריכוזים שונים והשוותי בין ספירת המיקרוקופ לתוצאות הבליעה בספקטרופוטומטר.

### ספירת אצות במיקרוסקופ - מכשיר המשמש להגדלה ויזואלית של עצמים



תמונה 1 - רשת המוציטומטר, החיץ מסמל את הריבועים מהסוג בו נספרו האצות

הקטנים מכדי להראות על ידי עין ללא כלי מיוחד. בניסוי השתמשתי במכשיר על מנת לספור את צפיפות האצות בצורה ישירה בתחילה ובסוף כל ניסוי. הספירה התבצעה על זכוכית המוציטומטר, זכוכית עליה מודפסת רשת קווים מדויקת המשמשת במקור לספירת תאי דם. לצורך המדידה נלקחו 20 מיקרוליטר מתרבית האצות בעזרת פיפטור, הונחו על גבי זכוכית המוציטומטר וכוסו בזכוכית מכסה. את האצות בדקתי תחת הגדלה פי 100 וצילמתי בעזרת מצלמת מיקרוסקופ את האזור המכיל לפחות שלושה ריבועים כדוגמא הריבוע הצהוב בתמונה (תמונה 4). לאחר צילום הדוגמאות האצות המופיעות

בתוך ריבוע אחד נספרו ידנית, צפיפות האצות חושבה בדרך הבאה: נפח הריבוע הצהוב הינו 4 ננוליטר כך שכדי לדעת כמה אצות היו במיליליטר יש להכפיל את מספר האצות שנספרו ב-250,000 מכיוון שהתוצאה הסופית המבוקשת היא במיליון תאים למיליליטר יש לחלק את התוצאה במיליון. ההכפלה ב-250,000 והחלוקה במיליון מסתכמת בתרגיל הסופי: צפיפות האצות (מיליון תאים למיליליטר) = מספר האצות שנספרו בריבוע חלקי 4.

### מערך המחקר:

#### משתנים בלתי תלויים:

סוגים של שמנים אתריים ( שמן עץ התה, שמן רוזמרין, שמן אורגנו)

ריכוז השמן

#### משתנים תלויים ומדדים לבדיקתם:

גידול האצה - נמדד על ידי מעקב אחר צפיפות האצות לאורך זמן

ניקיון התרבית - יוערך על ידי התבוננות במיקרוסקופ וספירת "זיהומים".

### חזרות וריבוי פריטים:

כל טיפול בניסויים הכיל 4 חזרות. בשל גודלן המיקרוסקופי של האצות, הגיע מספר האצות בכל כלי ניסוי למיליונים רבים.

### משתנים קבועים ובקרה:

הניסויים נערכו במעבדה בסביבה מבוקרת טמפרטורה (25 מעלות).

כל הניסויים התבצעו בפלטות 24 באריות כאשר כל התנאים נשמרים קבועים בתוך הפלטה מלבד ריכוז השמן (משתנה בין השורות השונות בפלטה), וסוג השמן המשתנה בין פלטה לפלטה.

הפלטות הונחו במעבדה אחת ליד השניה וקיבלו את אותם התנאים.



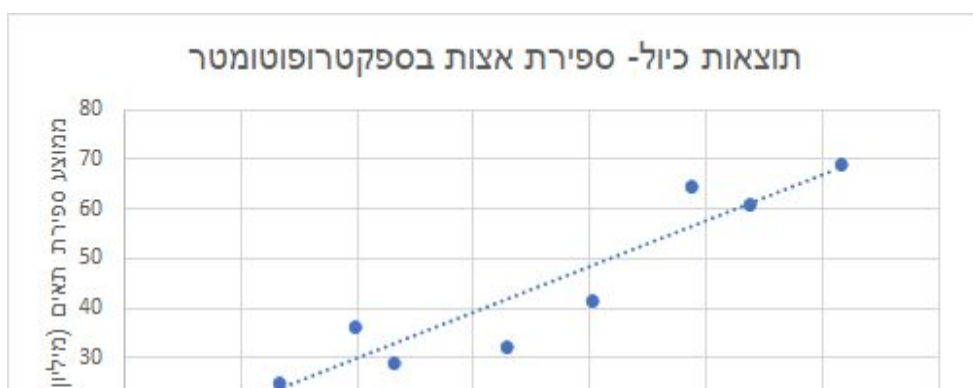
איור 1: סכמה המתארת את מבנה ניסוי בפלטת 24 באריות. בכל שורת צבע של עיגולים נמצא ריכוז שונה של השמן הנחקר יחד עם האצה והזיהום. טור ורוד- ריכוז 0 של השמן ומי רוטיפרים מסוננים. טור כחול- ריכוז 20 של השמן. טור אדום- ריכוז 50 של השמן טור ירוק- ריכוז 80 של השמן. טור צהוב- ריכוז 100 של השמן וטור סגול- ריכוז 0 של השמן ורוטיפרים.

## מהלך הניסוי:

### 1. כיוול שיטות:

- 10 דוגמאות אצות בריכוזים שונים נמדדו בספקטרופוטומטר ובמקביל נספרו בעזרת תא ספירה "המוציטומטר" במיקרוסקופ.
- תוצאות המדידות שימשו לבניית גרף כיוול ולהחלטה האם יעשה שימוש בהמשך במדידות ספקטרופוטומטר.

### כיוול שיטות:





איור 2: תוצאות כיוול  
מדידות  
בספקטרופוטומטר  
לספירת אצות  
במיקרוסקופ.

## 2. השפעת שמן רוזמרין על גידול איזוכריזיס ונקיון התרבית:

- תרבית איזוכריזיס חולקה ל24 באריות.
- לכל בארית יתווסף 0.5 מ"ל של תרבית רוטיפרים כזיהום מכון.
- לכל ארבע באריות נוסף ריכוז מסויים של שמן רוזמרין - 0, 20, 50, 80, 100 ppm
- לטור אחרון לא הוספו רוטיפרים אלא מים מתרבית הרוטיפרים שסוננו דרך פילטר 0.25 מיקרון על מנת לשמש כביקורת.
- הניסוי ימשך כשבוע, צפיפות האצות תימדד בתחילת הניסוי ובסופו, על ידי ספירה מיקרוסקופים ו/או ספקטרופוטומטר ורמת הזיהום תוערך בעזרת התבוננות במיקרוסקופ.

## 3. השפעת שמן עץ התה על גידול איזוכריזיס ונקיון התרבית:

- תרבית איזוכריזיס תחולק ל24 באריות.
- לכל בארית יתווסף 0.5 מ"ל של תרבית רוטיפרים כזיהום מכון.
- לכל ארבע באריות נוסף ריכוז מסויים של שמן עץ התה - 0, 20, 50, 80, 100 ppm
- טור אחרון ללא רוטיפרים

- הניסוי ימשך כשבוע, צפיפות האצות תימדד בתחילת הניסוי ובסופו, על ידי ספירה מיקרוסקופים ו/או ספקטרופוטומטר ורמת הזיהום תוערך בעזרת התבוננות במיקרוסקופ.

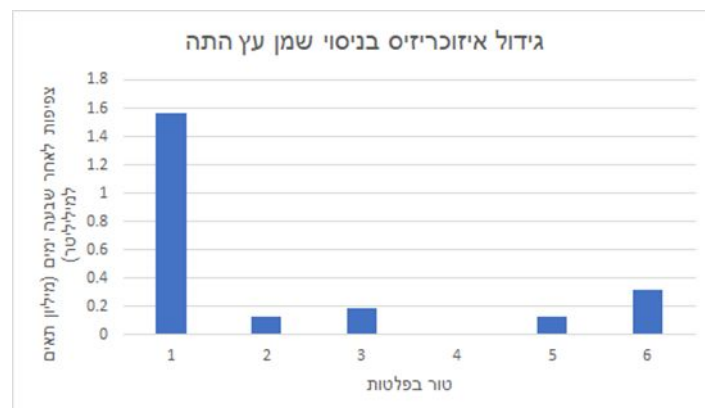
#### **4+5. השפעת שמן עץ התה ושמן אורגנו (במינונים נמוכים יותר) על גידול האיזוכריזיס וניקיון התרבית).**

- תרבית איזוכריזיס תחולק ל24 באריות.
- לכל בארית יתווסף 0.5 מ"ל של תרבית רוטיפרים כזיהום מכון.
- לכל ארבע באריות נוסף ריכוז מסויים של שמן עץ התה ושמן אורגנו- 0, 5, 10, 15, 20 ppm
- טור אחרון ללא רוטיפרים
- לאור תוצאות הניסויים הקודמים שהראו מוות של האצות והרוטיפרים במשך השבוע הראשון, הוחלט לערוך ניסויים קצרים יותר. הניסוי יימשך כיום אחד. יום לאחר תחילת הניסוי תימדד צפיפות האצות בספירה מיקרוסקופית ו/או ספקטרופוטומטר ורמת הזיהום תוערך בעזרת התבוננות במיקרוסקופ.

## ג. תוצאות:

בניסויים הראשוניים עם ריכוזי השמן 0-100 היה ניתן לראות כי האצה מתה בריכוזי שמן גבוהים מ20 לכן ניתן לשער כי ריכוזי השמן היו גבוהים מידי והזיקו לאצה.

### תוצאות ניסוי עם שמן אתרי עץ התה:



איור 2: השפעת שמן עץ התה על גידול האצה איזוכריזיס. העמודות בגרף מייצגות את ממוצע צפיפות האצות ב4 באריות לכל טיפול לאחר 7 ימים. את פירוט הטיפולים לפי מספרם (1-6) ניתן למצוא באיור 1.

טור y- צפיפות האצות לאחר 7 ימים .

טור x- טור בפלטות .

טבלה- מתארת את צפיפות האצות בתום הניסוי.

דרך למציאת הצפיפות: מספר האצות בריבוע עבה חלקי 4.

טור 1	2	3	4	5	6	
2.5	8.5	3	3	3.7	4.25	צפיפות אצות בתחילת הניסוי (מיליון תאים במיליליטר)
0.25	0.2 5	0.2 5	0	0	0.5	צפיפות אצות בסוף הניסוי חזרה 1
1.5	0.2 5	0.5	0	0.5	0	חזרה 2 (בארית)
1.25	0	0	0	0	0.75	חזרה 3
3.25	0	0	0	0	0	חזרה 4

טבלה 1: השפעת שמן עץ התה על גידול האצה איזוכריזיס. את פירוט הטיפולים לפי מספרם (1-6) ניתן למצוא באיור 1.

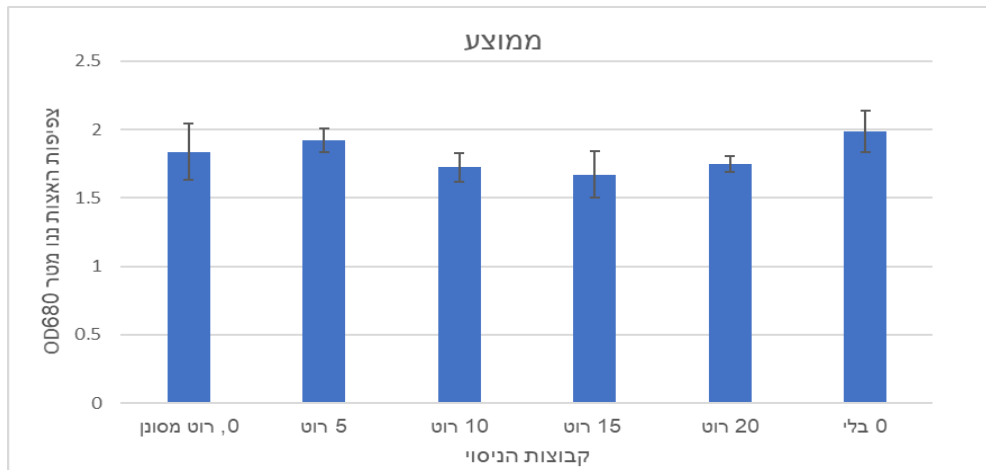
בתוצאות ניסוי זה ניתן לראות כי צפיפות האצות ירדה ככל שריכוז השמן היה גבוה יותר.

1. הסברים: לפי השוואה בין הטור ה-1 לטור ה-6 נראה שהרוטיפרים הועילו לאצה או שמי הרוטיפרים המסוננים הכילו חומר שהזיק לאצה. (אולי תוצאה של הפרשת חומרים של הרוטיפרים מהסינון). הסבר נוסף זה שאולי הרוטיפרים אכלו חלק מהאצות מתו ודישנו מחדש את האצה (לכן הוחלט לנסות ניסויים יותר קצרים בהמשך).
2. לני השוואה בין טור 1 לטורים 2 עד 5 אפשר להסיק שהריכוז שמן גבוה מידי ומזיק לאצה ולרוטיפרים ויש לנסות לבדוק עם ריכוז נמוך יותר מ-20.

### תוצאות ניסוי עם שמן אתרי עץ התה בריכוזים בין 0-20:

בניסויים הסופיים עם הריכוזים הנמוכים ובתקופת בדיקה קצרה יותר היה אפשר לראות שהאצות עדיין חיות והרוטיפרים לא הזיקו להן.

ממוצע צפיפות האצות בבדיקה של 2 באריות מכל טיפול היה : 5.082650227 (בספירה ידנית ולא ספקטרוטומטר).



איור 3: השפעת שמן עץ התה על גידול איזוכריזיס בריכוזים 0-20. העמודות בגרף מייצגות את קבוצות הניסוי ואת צפיפות האצות לאחר בדיקה במכשיר הספקטרוטומטר לאחר יום אחד. (עמודה 1: ריכוז 0 של השמן ומי רוטיפרים מסוננים, עמודה 2: ריכוז 5 של השמן ורוטיפרים, עמודה 3: ריכוז 10 של השמן ורוטיפרים, עמודה 4: ריכוז 15 של השמן ורוטיפרים, עמודה 5: ריכוז 20 של השמן ורוטיפרים, עמודה 6: ריכוז 0 של השמן ומי רוטיפרים מסוננים).

בניסוי זה ניתן לראות כי צפיפות האצה לא ירדה בצורה משמעותית.

הסברים: לפי השוואה בין טור 2 וטור 6 אפשר לראות כי הרוטיפרים לא הזיקו לאצה וריכוז השמן הנמוך לא פגע ברוטיפרים או באצה (אפילו טיפה הועיל להם), ושמה שהסקנו בניסוי הקודם נכון וריכוז נמוך יותר של השמן האתרי וזמן בדיקה קצר יותר יועילו לנו יותר. לעומת זאת, הטור עם מי הרוטיפרים המסוננים היו גם עם צפיפות גבוהה של האצות אך האצה שם לא הייתה פעילה כמו בטורים 2 ו6.

\*\*\* בגלל שאני לא בטוח מה הם מספרי הטורים ומה היה בכל טור אז קשה לי להתייחס לתוצאות, אבל אם אני מנחש נכון את סדר הטורים הייתי מסביר את התוצאות ככה(לצורך ההסבר טור 1 הוא השמאלי ביותר ו6 הימני ביותר בגרף):

בהשוואה בין טור 1 (ללא שמן אבל בתוספת רוטיפרים) ל6 (ללא שמן וללא רוטיפרים) ניתן לראות כי האצות גדלו בממוצע טוב יותר ללא הרוטיפרים מאשר בנוכחותם (אם כי הבדל זה אינו מובהק סטטיסטי) דבר המעיד כנראה על השפעתם השלילית של הרוטיפרים על גידול האצות. בנוכחות רוטיפרים (טורים 1-5), תוספת של 5 מג"ל הובילה לעליה בממוצע גידול האצות (לא מובהקת) אך תוספת גדולה יותר (10 מג"ל ומעלה) הובילה לירידה מובהקת בגידול האצות (לעומת הגידול בתוספת 5 מג"ל שמן).

## דיון וסיכום:

מטרת המחקר היתה למצוא ריכוז אופטימלי של אחד השמנים האתריים שבדקנו שיועיל לגידול האצה.

במחקר נבדקו ריכוזים שונים של שמנים אתריים שונים (עץ התה, אורגנו ורוזמרין).

לפני שהותחלו הניסויים שיערנו כי השמניים האתריים יפגעו ברוטיפרים ויגרמו לגידול יעיל יותר של האצה איזוכריזיס.

בניסויים הראשונים ריכוזי השמן היו בין 0-100 והתוצאות היו:

- בבאריות עם מי הרוטיפרים המסוננים האצה מתה כמעט לחלוטין לכן יכלנו להסיק כי משהו במי הרוטיפרים המסוננים הזיק לאצה.
- בטור עם ריכוז שמן 0 ובלי רוטיפרים ראינו כי האצה לא נפגעה.
- בטורים עם ריכוזי שמן בין 20-100 ראינו כי האצה והרוטיפרים ניזוקו.

בניסויים הראשונים הסקנו שריכוז השמן היה גבוה מידי מכיוון שראינו כי בטורים עם ריכוזי שמן גבוהים ורוטיפרים האצה נעלמה לחלוטין ולכן הוחלט להוריד בריכוזים.

"ניסויים שבהם גידלו זנים מסוימים של חיידקים ושל פטריות בנוכחות ריכוזים שונים של שמן עץ התה והשוו אותם לחיידקים ופטריות מאותו מין שגדלו בלי השמן. בשלב הראשון השוו החוקרים את קצב הגידול עצמו והראו שנוכחותו של שמן עץ התה אכן יכולה לעכב גידול של חיידקים ופטריות." (מכון דוידסון שמן עץ התה על מה ולמה?)

בזכות מידע זה על שמן עץ התה ובזכות תוצאות הניסוי הראשוני בשמן עץ התה שהניבו את התוצאות הברורות ביותר הוחלט להתרכז בשמן עץ התה בניסויים השניים.

מצפייה בתוצאות הניסוי השני אפשר לראות כי הטור עם ריכוז השמן הנמוך ביותר (ריכוז 5) וכי הטור בלי שמן ורוטיפרים הם הטורים שבהם צפיפות האצה הייתה הגדולה ביותר וכי האצה לא ניזוקה כמו כן, מהטור עם מי הרוטיפרים המסוננים היה ניתן לראות כי אומנם צפיפות האצות הייתה גבוהה גם היא אך האצות שם לא היו פעילות כמו בטורים 2 ו6 לכן ניתן היה להסיק כי מי הרוטיפרים המסוננים לא הזיקו כל כך לאצות אך כן הועילו פחות.

לאור תוצאות הניסוי אני ממליצה על המשך המחקר במכוני מחקר של התעשייה החקלאית על גידול האצה איזוכריזיס בשילוב עם שמן עץ התה.

את הניסוי שלי ערכתי במינונים נמוכים לכן אמליץ לבדוק תחילה את השפעת שמן עץ התה על מינונים גדולים יותר של האצה ובסביבת הגידול הטבעית של האצה ורק לאחר מכן לבדוק את כמות המינונים (של השמן) הנכונה לגידול אצות ברמה תעשייתית.

- 2 מ"ל של אצה הוספתי 0.20-0.5 ppm של שמן אתרי עץ התה ו0.5 מ"ל של רוטיפרים.



## ביבליוגרפיה-

- Graham, J., Graham, L. and Wilcox, L.,(2009).Algae. second edition, Benjamin Cummings. pp.1-12  
ד"ר אלי קלמנזון - תורגם לעברית על ידי
- Hossan, M. S., Rahman, S., Bashar, A. B. M. A., Jahan, R., Al-Nahain, A., & Rahmatullah, M. (2014). Rosmarinic acid: A review of its anticancer action. *World J. Pharm. Pharm. Sci.*, 3(9), 57-70

- Maeda, H., Hosokawa, M., Sashima, T., Funayama, K., & Miyashita, K. (2005). Fucoxanthin from edible seaweed, *Undaria pinnatifida*, shows antiobesity effect through UCP1 expression in white adipose tissues. *Biochemical and biophysical research communications*, 332(2), 392-397
- Yan, X., Chuda, Y., Suzuki, M., & Nagata, T. (1999). Fucoxanthin as the major antioxidant in *Hijikia fusiformis*, a common edible seaweed. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*, 63(3), 605-607
- אתר מופ"ת - אצות-  
[http://web.macam98.ac.il/~peer/botanic/algae/algae\\_present/algae1\\_pp.htm](http://web.macam98.ac.il/~peer/botanic/algae/algae_present/algae1_pp.htm)  
 נלקח בתאריך 20.12.18
- בראל ש. (1994). פעילות ביולוגית של שמנים אתריים המופקים מצמחים והפעילות האנטיביוטית של השמן האתרי המופק מאכילאה ריחנית הגדלה בנגב. סינתזיס. גליון 4. עמ' 46-47.
- ברורמן י. (2011). האוצרות הטמונים בצמחים-שמנים אתריים ומיצויים צמחיים כדוחי טפילים חיצוניים. ראש גדול. עמ' 8-9. זמין בלינק  
<https://gifted.cet.ac.il/CETHandler.ashx?n=CetEntities.FileViewer&i=7b6c26a9-ffd0-426d-b508-19d6c9d151f1&id=27395>
- דובינסקי, צ. (1983). הפרחת הביוב-באצות. "מדע" – עיתון מדעי לכל כרך כ"ז חוברת מספר 2
- ויקיפדיה - שמן אתרי -  
[https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A9%D7%9E%D7%9F\\_%D7%90%D7%AA%D7%A8%D7%99](https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A9%D7%9E%D7%9F_%D7%90%D7%AA%D7%A8%D7%99)  
 נלקח בתאריך 7.1.19
- ויקיפדיה - רוזמרין רפואי -  
[https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A8%D7%95%D7%96%D7%9E%D7%A8%D7%99%D7%9F\\_%D7%A8%D7%A4%D7%95%D7%90%D7%99](https://he.wikipedia.org/wiki/%D7%A8%D7%95%D7%96%D7%9E%D7%A8%D7%99%D7%9F_%D7%A8%D7%A4%D7%95%D7%90%D7%99)  
 נלקח בתאריך 7.1.19
- לוי ע., מוזס נ. (2016). ענף האצות- מנוע צמיחה ירוק לחקלאות הישראלית. דוח משרד החקלאות. זמין ב-  
[http://www.moag.gov.il/yhidotmisrad/fishery/Mariculture/Documents/seaweed\\_industry.pdf](http://www.moag.gov.il/yhidotmisrad/fishery/Mariculture/Documents/seaweed_industry.pdf)

- מכון דוידסון - שמן עץ התה. על מה ולמה? -

[https://davidson.weizmann.ac.il/online/asexpert/life\\_sci/%D7%A9%D7%9E%D7%9F-%D7%A2%D7%A5-%D7%94%D7%AA%D7%94-%D7%A2%D7%9C-%D7%9E%D7%94-%D7%95%D7%9C%D7%9E%D7%94-%D7%94%D7%93%D7%A8](https://davidson.weizmann.ac.il/online/asexpert/life_sci/%D7%A9%D7%9E%D7%9F-%D7%A2%D7%A5-%D7%94%D7%AA%D7%94-%D7%A2%D7%9C-%D7%9E%D7%94-%D7%95%D7%9C%D7%9E%D7%94-%D7%94%D7%93%D7%A8)

. נלקח ב 12.1.19

- מכון דוידסון - מהו התהליך שקורה לתא במגע עם שמן אתרי של אורגנו? -

[https://davidson.weizmann.ac.il/online/askexpert/med\\_and\\_physiol/%D7%9E%D7%94%D7%95-%D7%94%D7%AA%D7%94%D7%9C%D7%99%D7%9A-%D7%A9%D7%A7%D7%95%D7%A8%D7%94-%D7%9C%D7%AA%D7%90-%D7%91%D7%9E%D7%92%D7%A2-%D7%A2%D7%9D-%D7%A9%D7%9E%D7%9F-%D7%90%D7%AA%D7%A8%D7%99-%D7%A9%D7%9C-%D7%90%D7%95%D7%A8%D7%92%D7%A0%D7%95-%D7%90%D7%95%D7%A8%D7%98%D7%9](https://davidson.weizmann.ac.il/online/askexpert/med_and_physiol/%D7%9E%D7%94%D7%95-%D7%94%D7%AA%D7%94%D7%9C%D7%99%D7%9A-%D7%A9%D7%A7%D7%95%D7%A8%D7%94-%D7%9C%D7%AA%D7%90-%D7%91%D7%9E%D7%92%D7%A2-%D7%A2%D7%9D-%D7%A9%D7%9E%D7%9F-%D7%90%D7%AA%D7%A8%D7%99-%D7%A9%D7%9C-%D7%90%D7%95%D7%A8%D7%92%D7%A0%D7%95-%D7%90%D7%95%D7%A8%D7%98%D7%9)

.C. נלקח ב 12.1.19