

נספח 1

זיהוי של עליה בריכוז מיקרו-אצות ובקטריות כחוליות במים

עליה בריכוז בגוף המים יכולה להיקבע על בסיס דוגמאות מים המובאות למעבדה ובהן נמדד באופן ישיר ריכוז התאים של מיקרו-אצות ובקטריות כחוליות ע"י ספירה במיקרוסקופ או באמצעות ציוד לספירת תאים (כגון Cell counter), זאת ללא הבחנה בין המינים השונים. מדידה עקיפה של ריכוז התאים מתבצעת בגוף המים או במעבדה באמצעות זיהוי עליה בריכוז הפיגמנטים בדוגמה (בעיקר באמצעות מדידת שינויים בריכוז כלורופיל). מדידת השינויים בריכוז הפיגמנטים יכולה להתבצע ישירות באמצעות מיצוי הפיגמנטים (במעבדה או על ספינת המחקר) או באופן עקיף ע"פ הסיגנל הפלורסנטי של הפיגמנטים שנמדד באופן בדיד או רציף ע"י חיישנים פלורסנטיים הטבולים בגוף המים. בשיטות אלה, זיהוי הרכב פיגמנטים ופלורסנציה ניתן לזהות את האורגניזמים עד לרמת המערכה. יש לציין שריכוז הפיגמנטים לא משליך באופן לינארי על ריכוז התאים (כיוון שריכוז הפיגמנטים לתא משתנה בהתאם לתנאים הפיזיולוגיים) דרך נוספת המשמשת בשנים האחרונות את החוקרים לקביעת ריכוזי כלורופיל בפני השטח היא באמצעות שימוש בלוויינים המזהים פריחות כאשר הנתונים שמתקבלים מייצגים שינויים בריכוזי המיקרו-אצות והבקטריות הכחוליות בפני המים (חישה מרחוק). בכנרת יש מעקב מ-2006 לווויינים באמצעות MERIS^[2]. וכיום משולבים צילומי הלוויינים של MODIS Aqua ו-Terra במערכת SISCAL ומאפשרים מעקב אחרי ריכוזי כלורופיל בכנרת ובים תיכון (הנתונים זמינים באתר של חקר ימים ואגמים לישראל^[13]). בחישה מרחוק ניתן למיין על פי מידת ההחזרה של אורכי גל שונים את הרכב המיקרו-אצות הפורחות, בעיקר לרמת המערכה: בקטריות כחוליות, ירוקיות, צורניות וכדומה (לא מתבצע בארץ זהו הרכב). בשיטות אלה של חישה מרחוק לא ניתן לזהות את מין האצה על בסיס הרכב הפיגמנטים. על כן, לא ניתן לקבוע האם אלו מיקרו-אצות המכילות רעלנים או שלא. לאחרונה פותחה שיטה חדשנית, גם היא תוך שימוש בלוויינים, ובאמצעותה במעבדות ספורות כגון Plymouth Marine Laboratory הצליחו לזהות מיקרים בודדים של פריחות המיקרו-אצות *Karenia mikimotoi* *Pseudo-nitzschia sp.*, *Phaeocystis globos*^[7]. בארה"ב קיים מעקב לוווייני רציף (integrated ocean observing system) ומוקמו תחנות מדידה קבועות בים אשר מופעלות בכדי להפחית את הפגיעה של פריחות רעילות. בפלורידה ניתנת תחזית יומית של NOAA העוקבת אחר התפתחות פריחות^[9].

זיהוי מינים רעילים

הזיהוי המסורתי של פריחת מיקרו-אצות ובקטריות כחוליות רעילות נעשה באמצעות מיקרוסקופ אור המאפשר זיהוי מורפולוגי או מיקרוסקופ פלורסנטי המאפשר לצפות בזהירה של פיגמנטים אופייניים. שיטות

זיהוי אלה דורשות בדר"כ מומחיות רבה. לעיתים יש צורך בשימוש במיקרוסקופ אלקטרוני- שיטה מורכבת ויקרה יותר, הדורשת הכנת מורכבת של הדוגמאות ושל הציוד הדרוש^[10,14]. זיהוי מין טקסונומי על בסיס מורפולוגי ניתן להגדירו על פי מדדים שונים בקלות יחסית, גם כאשר המין אינו מוכר לחוקר (דבר שלא מתאפשר בשיטות האחרות שהוזכרו לעיל). שיטה זו מבוצעת בכנרת ובחלק מהניטורים בים תיכון^[2,3].

זיהוי ראשוני של המיקרו-אצות/הבקטריות הכחוליות יכול להיעשות ע"י הגדרת הרכב הפיגמנטים באמצעות מכשיר Flow cytometer, אלא שרגישות המכשור איננה מאפשרת זיהוי לרמת המין. בכנרת מ-2015 יש שימוש flowCAM שמצויד גם במצלמה המגדיל את אפשרויות הזיהוי. דרך אחרת לזיהוי ראשוני של המיקרו-אצות/הבקטריות הכחוליות הוא על סמך זיהוי הרכב פיגמנטים אלא שזיהוי זה איננו מספיק בדרך כלל, שכן במרבית המקרים ההרכב ייחודי למערכה (לדוגמה בקטריות כחוליות לעומת צורניות) אך לא לרמת הסוג או המין הדרושות לזיהוי וודאי של מחולל הפריחה. שיטת אנליזה נוספת עושה שימוש במכשיר ה-HPLC (High performance liquid chromatography) המאפשר הפרדה בין פיגמנטים שונים וזיהוי של פרופיל הפיגמנטים של מיקרו-אצה/ בקטריה כחולית. שיטה המובצעת לעיתים בחקר הכנרת וים תיכון. גם שיטה זו לוקה באותן המגבלות של זיהוי מבוסס הרכב פיגמנטים. בשנים האחרונות, עם התפתחות הביולוגיה המולקולרית פותחו יישומים של מערכי דנ"א/רנ"א (Microarray) לזיהוי מיקרו-אצות/ בקטריות כחוליות רעילות. זוהי שיטה שימושית לזיהוי חוזר של פריחות רעילות. מערכי הדנ"א מבוססים על שבבים קשיחים אליהם מחוברים סמני דנ"א (DNA probs) ספציפיים לקבוצה/ות מסוימות של מיקרו-אצות או בקטריות כחוליות רעילות^[10]. כל סמן נצבע פלורסנטית כאשר הוא עובר איחוד (Hybridization) עם מקטעי דנ"א המצויים בדוגמה. תוך שימוש באור אולטרה סגול^[7]. ניתן לאתר סמנים ספציפיים ע"פ מיקומם על השבב. בדיקה באמצעות שבבי DNA ניתן לבצע כתחליף לזיהוי המורפולוגי (ע"פ צורת התאים), שכן השיטה נמצאה רגישה מאוד והראתה נוכחות גם של סוגי מיקרו-אצות/ בקטריות כחוליות שלא נמצאו בהתבוננות במיקרוסקופ אור וזאת ע"י איתור אזורים גנומיים שמורים (המהווים אינדיקטור יציב) וספציפיים למינים המנוטרים, שיטה זו מספיקת זיהוי טקסונומי לרמת המין. נכון להיום שיטה זו עדיין יקרה יחסית לשיטות המסורתיות^[7].

אלטרנטיבה לשימוש בשבבי דנ"א היא שימוש בריצוף דנ"א סביבתי. ע"י סינון מי ים בנפח מוגדר והפקת דנ"א מכל תאי המיקרו-אצות/הציאונבקטריה שסוננו, ניתן לבצע ריצוף של סמנים גנטיים שונים (בדרך כלל גנים של רנ"א ריבוזומלי כגון 16S ו-18S) ולהגיע לזיהוי מדויק ברמת המין ואף לרמת תת מין. שיטה זו דורשת שימוש במאגרי נתונים מקיפים המכילים בין היתר רצפים המאפיינים מיקרו-אצות רעילות ובקטריות כחוליות רעילות כגון EMBL או GenBank^[6]. שיטה זו בעלת רגישות גבוהה מסוגלת לספק כמויות מידע אדירות במאמץ לא גדול ואיננה דורשת אנליזות טובעניות באמצעות מיקרוסקופ הצורכות זמן רב, אולם יעילותה מוגבלת ע"י תכולתם של מאגרי הנתונים הגנטיים הזמינים. פיתוחם של מאגרי מידע גנטי ספציפיים לאצות רעילות יכולים להוות צעד חשוב להנגשת שיטות הזיהוי הגנטיות. עם זאת, נפח המידע במאגרים הקיימים מתרחב באופן שוטף ויעילות השימוש בהם גוברת. חיסרון נוסף בשיטה נוגע לכימות מספר התאים בדוגמה: הכימות מבוסס על מספר הרצפים המשויכים לגן שנבחר כסמן גנטי של מין מסוים שאותרו בדוגמה. כיוון שמספר העותקים של הגן בגנום של אותו אורגניזם לא תמיד ידוע, גורם זה חייב להילקח

בחשבון במהלך הכימות. בנוסף, אירועי הכפלה או מחיקה של עותקים של הגן הנבדק עלולים להתרחש במין המתגלה בדוגמה שאיננו זהה למין השמור במאגר הנתונים. כך עלול להיווצר מצב שספירת התאים על בסיס מספר עותקי הגן תהיה בהערכת יתר או חוסר. בים התיכון נעשה עד כה שימוש מועט בשיטות גנטיות לזיהוי מיני מיקרו-אצות רעילות^[11]. במעבדה לחקר הכנרת החלו בשנים האחרונות בהקמת מאגר זיהוי על בסיס רצפי דנ"א ע"י יצירת בר קוד גנטי המבוסס על מקטעי דנ"א של היחידה הגדולה של האנזים רוביסקו (Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase large subunit (rbcL) ושל היחידה הקטנה של הרנ"א הריבוזומלי (rRNA small subunit) ו- (SSU-ITS) intragenic space^[8]. נכון ל-2016 מתוך 72 מינים שבודדו בכנרת המעבדה לחקר הכנרת קבעה ברקוד ל-26 מינים^[8].

שיטות זיהוי נוספות מבוססות על מערכי רנ"א. על אף פוטנציאל זיהוי גבוה, רגישות השיטה לשינויים בתהליך מיצוי הרנ"א יוצרת בעייתיות בשימוש בה. כמו כן, קשה לקשור בין מספר התאים לריכוז הרנ"א שכן קיימת שונות בכמות הרנ"א לתא^[10]. מצד שני, מאחר ונוכחות של גן בגנום איננה מצביעה בהכרח על ביטוי של אותו גן, זיהוי וכימות של רנ"א המקודד לחלבונים המשתתפים ביצירת רעלנים יכול להוות אינדיקציה ליצרנות רעלנים בפועל.

בשנים האחרונות פותחו סנסורים שונים לזיהוי אצות לדוגמה ALGADEC סנסור רנ"א ריבוזומלי לזיהוי חצי אוטומטי של הדינופלגלט *Alexandrium minutum* הרגיש לריכוזים גבוהים שלו במים^[10]. כמו כן פותח כלי בשם: reverse dot blot hybridisation (RDBH) שמסוגל לזהות באמצעות אנליזת PCR ריכוז נמוך של עד 10 תאים בדוגמה מסויימת, אלא שבשלב זה הוא מוגבל ל-5 מינים בלבד^[10]. בארה"ב הוכנס לאחרונה לשימוש סנסור בשם Environmental sample Processor (ESP). סנסור זה מזהה בזמן אמת (*in situ*) רצפי דנ"א ביחידה הגדולה של הגן הריבוזומלי, של האצה הימית *Pseudo-nitzschia*^[12]. זהו המכשיר הראשון בסוגו בעולם לזיהוי בזמן אמת, אך כאמור הוא מוגבל בשלב זה לזיהוי מין בודד בלבד. בישראל מתבצע ניטור לאומי ע"י חקר ימים ואגמים לאורך חופי הים התיכון^[3] והמעבדה לחקר הכנרת^[2] תוך שימוש בזיהוי מיקרוסקופי, וכן ניטור מקומי ע"י גופים שונים^[4,1] לחלק מהחופים בהם ניתן היתר ע"י המשרד להגנת הסביבה להזרמת מי שפכים מטהורים, מי-פלט של ברכות דגים או תמלחות אל הים. בנוסף חברת מקורות מבצעת ניטור לאורך המוביל הארצי ושרשרת המאגרים שלו. למיטב ידיעתנו לא נעשה כיום בישראל שימוש בסנסור בזמן אמת לזיהוי מיני מיקרו-אצות ובקטריות רעילות בגוף המים, באף אחד מהניטורים הנ"ל.

לא ניתן להמיר זיהוי פרטני של מיקרו-אצות בבדיקות של ריכוז כלורופיל והשיטות המולקולריות הנהוגות כיום עדין אינן רגישות מספיק.

זיהוי של רעלנים בגוף המים

ניטור רעלנים מתבצע לרוב ע"י בדיקות כימיות ו/או ביולוגיות הכוללות חשיפה של אורגניזמים ימיים למים המנוטרים ובדיקת ההשפעה עליהם. הזיהוי הכימי האנליטי מתבצע באמצעות HPLC, כרומטוגרפיות נוזליות בספקטרום מסות, כשבכנרת משנת 2000 מבצוע זיהוי וכימות באמצעות שיטה זאת של

מיקרוציסטינים (שמקורם בעיקר מיקרוציסטיס) ושל צלינדרוספרמופסין (שמקורו אפניזומון *Aphanizomenon ovalisporum*)^[5].

השיטות הביולוגיות כוללות: 1. שיטות מבוססות אימונולוגיה. חלק מהשיטות מבוצעות באנליזות enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) לזיהוי נוגדנים כדוגמת הזיהוי של הרעלן (Domoic acid) המיוצר ע"י *Pseudo-nitzschia* ונאגר בבלוטי ים^[12]. קיימים אימונו סנסורים אופטיים והנפוץ בהם הוא - SPR surface plasmon resonance, שמזהה רעלנים שונים כגון diarrhetic shellfish poisoning (DSP) toxins, PSP toxins, and domoic acid). 2. שיטות מבוססות רצפטורים 3. שיטות מבוססות תאים/ רקמות.

דוגמה לזיהוי רעלים היא מהמעבדה המרכזית לבריאות הדגים בניר דוד, שם פותח פרוטוקול המאפשר זיהוי מוקדם של הפרשת הרעלן המופרש על ידי האצה פרימנזיום פרוום (*Prymnesium parvum*) אצה הנפוצה במדגה הישראלי בבריכות מים מליחים בעיקר בעונת החורף, דבר המאפשר טיפול נגד האצה, לפני שרמת הרעלן גורמת לתמותת דגים. הטיפול המקובל שעובד ביעילות גבוהה הוא טיפול בגופרית נחושת CuSO_4 .

מקורות

1. אברמזון כ, שפיר ו, ואחרים. 2016. ניטור הסביבה הימית והחופית אתר תחנות הכח "אורות רבין" H2ID מתקן להתפלת מי ים דו"ח לשנת 2015. חברת חשמל.
2. גל ג. 2017. ניטור ומחקרי כנרת דו"ח שנת 2016 המעבדה לחקר הכנרת, חקר ימים ואגמים לישראל דו"ח חיא"ל T9/2017.
3. חרות ב, שפר ע, גורדון נ, ואחרים. 2015. תכנית הניטור הלאומית של ישראל בים תיכון דוח מדעי ל2013/14. חקר ימים ואגמים. דוח חיא"ל H21/2015.
4. מידר א, ארז י, לזר ב, סטמבלר נ. 2016. ניטור ימי במפרץ חיפה ע"י המפעלים המזרימים קולחים תעשייתיים לנחל הקישון ולים. מסכם 2015. מוגש ע"י סינפסה בע"מ. עריכה שפיר ו. להתאחדות התעשיינים
5. סוקניק א וויינר-מוציני ד. 2017. רעלני כחוליות ניטור ומחקרי כנרת דו"ח שנת 2016 המעבדה לחקר הכנרת, חקר ימים ואגמים לישראל דו"ח חיא"ל T9/2017.
6. Benson DA, Karsch-Mizrachi I, Lipman DJ, et al. 2000. GenBank. *Nucleic Acids Research* **28**: 15-18.
7. Danovaro R, Carugati L, Berzano M, et al. 2016. Implementing and innovating marine monitoring approaches for assessing marine environmental status. *Front. Mar. Sci.* **3**: 213.

8. Kaplan-Levy RN, Alster-Gloukhovski A, Benyamini Y, and Zohary T. 2016. Lake Kinneret phytoplankton: integrating classical and molecular taxonomy. *Hydrobiologia*, **754**(1): 283-302.
9. Kudela RM, Berdalet E, Enevoldsen H, et al. 2017. GEOHAB–The Global Ecology and Oceanography of Harmful Algal Blooms Program: Motivation, goals, and legacy. *Oceanography* **30**(1):12–21, <https://doi.org/10.5670/oceanog.2017.106>.
10. McPartlin DA, Loftus JH, Crawley AS, et al. 2017. Biosensors for the monitoring of harmful algal blooms, *Current Opinion in Biotechnology*, **45**:164-169.
11. Penna A, Bertozzini E, Battocchi, C, et al. 2007. Monitoring of HAB species in the Mediterranean Sea through molecular methods. *Journal of Plankton Research* **29**: 19-38.
12. Seegers BN, Birch JM, Marin R, et al. 2015. Subsurface seeding of surface harmful algal blooms observed through the integration of autonomous gliders, moored environmental sample processors, and satellite remote sensing in southern California. *Limnology and Oceanography* **60**: 754-764.
13. Siscal <https://isramar.ocean.org.il/isramar2009/siscal/siscaldatasearch.aspx>
14. Zohary T, Yacobi Y Z, Alster, A. et al., 2014. Phytoplankton, Chap. 10. In Zohary, T, Sukenik A. Berman T, and Nishri A. (eds), *Lake Kinneret: Ecology and Management*. Springer, Heidelberg: 161–190.