

שיעור 12 - חוקרים מחזורים ביוגיאוכימיים בעזרת עמודת וינוגרדסקי.

סרגיי ניקולאיביץ וינוגרדסקי (Sergei Nikolayevitch Winogradsky, 1856-1953) הינו אחד מאבות האקולוגיה המיקרוביאלית. מרבית המיקרוביולוגים בני זמנו, כמו לואי פסטר, התמקדו בחקר מיקרואורגניזמים על ידי גידולם בתרבית טהורה, ובתנאים הרחוקים מהתנאים השוררים בבתי הגידול הטבעיים של המינים הנחקרים. לעומתם, בחר וינוגרדסקי, בין יתר מחקריו, לבחון את ההתאמות של אוכלוסיות חיידקים שונות לקיום בבית גידולם הטבעי, ואת האינטראקציות בין אוכלוסיות חיידקים שונות בבתי גידול אלה. אחד הגילויים הרשומים לזכותו של וינוגרדסקי הוא תופעת הכימואוטוטרופיות (Chemoautotrophy). יצורים כימואוטוטרופיים מיצרים לעצמם את החומרים האורגניים מחומרים אי-אורגניים תוך שימוש בתהליכים כימיים. למשל חמצון מימן או חמצון גפרית. עד גילוי זה, המצב האוטוטרופי היחידי שהיה מוכר היה השימוש באור.

עמודות וינוגרדסקי הן כלי מעבדתי באמצעותו ניתן להדגים את האינטראקציה, ההשפעה ויחסי הגומלין בין אוכלוסיות מיקרואורגניזמים המשתייכות לקבוצות תפקודיות שונות (אוטוטרופיים, הטרוטרופיים, אירוביים, אנארוביים וכו') לבין עצמם ובינם לבין הסביבה בה הם מתקיימים.

בסתירה לכמות ולמורכבות המידע אותו ניתן להפיק מעמודות אלה, מבנה מערכת הניסוי פשוט ביותר. בתוך מיכל קיבול שקוף, דוגמאות סדימנט (בלועזית -משקע. חומרים מוצקים השוקעים בקרקעית ים או אגם). שקועות תחת מים. בהתאם לדרישות הניסוי הספציפי, הסדימנט ועמודת המים עשויים להדגם מאותה הסביבה או מסביבות שונות. בנוסף, על ידי מניפולציות פשוטות ניתן לשנות את ההרכב הכימי של עמודת המים (הוספה של מרכיבים אורגניים או אי-אורגניים, שינוי ה- pH ועוד). או את התנאים הפיסיקליים בהם היא מוצבת (אור/חושך, טמפרטורת אינקובציה ועוד).

מערכת הימים והאוקיינוסים בטבע היא מערכת מעורבלת, ולכן מי הים עשירים בחמצן בכל עומקם. בניגוד לכך, מערכות מימיות שונות (בריכות חורף למשל) הן מערכות מים עומדים. במערכות עומדות כאלה מתהווים גרדיאנטים כימיים ופיסיקליים, מפני המים ועד הסדימנט. הכוונה היא, שאם נסתכל על עמודת המים מלמעלה למטה, ריכוז החומרים, והנתונים הפיסיקלים של העמודה, pH, ריכוז חמצן מומס ועוד, משתנים בצורה הדרגתית (או חדה) מראש העמודה כלפי מטה או להפך. בניגוד למשל לעמודת מים שכל הזמן תהיה בתנאי ערבוב תמידיים. עמודות וינוגרדסקי אינן מעורבלות ולכן יתרחשו בהן תהליכי שיכוב (יצירת שכבות) הדומים לאלה המתקיימים במערכות מים עומדות (איור 1). שני הגרדיאנטים המרכזיים המתפתחים בעמודות הם גרדיאנט בריכוז החמצן, ההולך ופוחת ככל שמתרחקים מראש העמודה, וגרדיאנט בריכוז הסולפיד הקטן ככל שמתרחקים מן האזור האנארובי – תחתית העמודה (איור 1). שני גורמים אלו מושפעים באופן ישיר מחשיפה לאור והוספת חומרים אורגניים ואי-אורגניים שונים לעמודה.

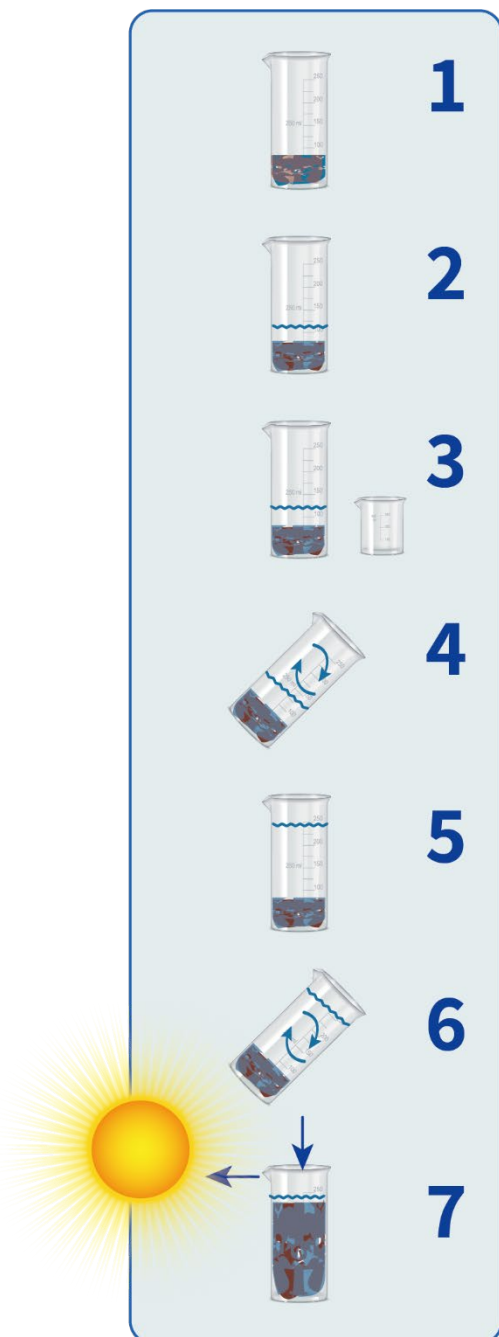
במעבדה נשתמש בעמודות וינגרדסקי כדי לבחון את המעורבות של אוכלוסיות חיידקים שונות. שמקורן במי הים ובסדימנט הימי, במחזורים ביוגאוכימיים המרכזיים המתרחשים בסביבות אלה: מעגל הפחמן, מעגל החנקן, ומעגל הגופרית.

טבלה 1: טיפולים שונים לעמודת וינגרדסקי.

חומר	אמוניה	אצטט	פפטון	חלקי דג	אגר	ניטראט
תורם אלקטרונים	+	+	+	+	+	-
מקור פחמן	-	+	+	+	+	-
מקור חנקן	+	-	+	+	-	+
מקבל אלקטרונים	-	-	-	-	-	+
ריכוז תמיסת מקור	76 mM	500 mM	40 g L ⁻¹		80 g L ⁻¹	500 mM
למשורות 500 מ"ל	2.5 ml	5 ml	2.5 ml	1 g	^{1/2} petri dish	5 ml
למשורות 1000 מ"ל	5 ml	10 ml	5 ml	2 g	1 petri dish	10 ml
ריכוז סופי בעמודה	0.38 mM	5 mM	0.2 g L ⁻¹	2 g L ⁻¹	2 g L ⁻¹	5 mM

מהלך העבודה

1. על שולחנכם תמצאו משורה בנפח 500 או 1000 מ"ל ומדבקה. כתבו על המדבקה את שמותיכם וסמנו עמה את המשורה. הדביקו את המדבקה בבסיס המשורה בצד המנוגד לפיית המשורה.
2. מלאו 1/5 מנפח המשורה במי ים (כלומר, 100 מ"ל מי ים למשורה בנפח 500 מ"ל או 200 מ"ל מי ים למשורה בנפח 1000 מ"ל). לאחר מכן הוסיפו בהדרגה, סדימנט ים. יש לדאוג שהסדימנט ישקע באופן אחיד בתחתית המשורה שלא יופיעו בו בועות. הסדימנט ימולא עד לגובה 150 מ"ל במשורות בנפח 500 מ"ל או עד לגובה 300 מ"ל במשורות בנפח 1000 מ"ל.
3. על פי הכתוב על המדבקה, בדקו לאיזה טיפול מיועדת העמודה שלכם. הוסיפו למשורה את החומרים הדרושים בכמויות המפורטות בטבלה 1.
4. נגבו את פי המשורה בנייר מעבדה וכסו אותה בפארפילם (נייר שעווה, הוא ייצמד במתיחה על פי המשורה ויאטום אותה). הטו את המשורה על צידה וערבבו את המרכיבים השונים.
5. השלימו על ידי הוספת מי ים את גובה העמודה ל 500 מ"ל או 1000 מ"ל, בהתאם למשורה שלכם.
6. נגבו את פי המשורה בנייר מעבדה וכסו אותה בפארפילם. הטו את המשורה על צידה וערבבו את המרכיבים השונים. וודאו כי אין בסדימנט בועות לאחר הערבוב.
7. הציבו את המשורה במקום המיועד לכך, כך שפיית המושרה פונה על האור. גם עמודות שמיועדות לטיפול חושך יוצבו באותו כיוון! כסו את פתח המשורה בנייר אלומיניום. משורות המיועדות לטיפול חושך יכוסו בצינור המיועד לכך.



תצפית ואיסוף נתונים

לאחר הכנת העמודות, משאירים אותן לעמוד במקום החשוף לאור שמש במשך מספר שבועות ועוקבים אחר שינויים בעמודות המים ובסדימנט (ראו הצעה לטבלת איסוף נתונים בהמשך, טבלה 2). אפשר אם רוצים להשאיר חלק מהעמודות בחושך ולראות כיצד שינוי תנאי התאורה משפיעים על התפתחות חברת החיידקים.

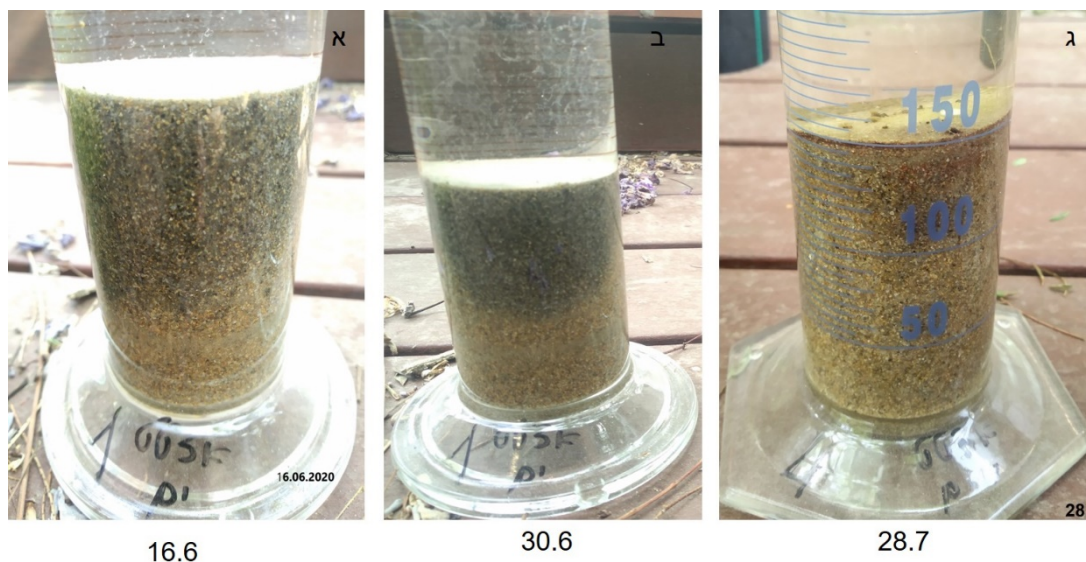
טבלה 2: הצעה לטבלת איסוף נתונים.

טיפול	פרמטר נבדק/תאריך	תאריך	תאריך שני
אור בלבד	צבע/ עכירות עמודת המים		
	צבע הסדימנט		
	גזים ובועות (מיקום וכמות)		
	ריח		
	מיקרואורגניזמים		
	ריכוז חמצן מומס במים		
	pH		

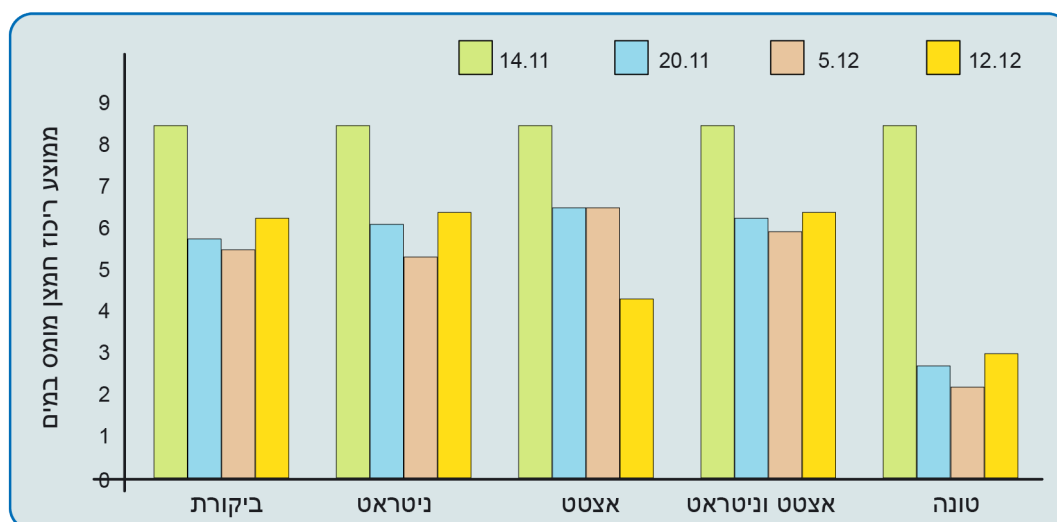
שיעור 12: תוצאות צפויות לניסוי עם עמודות ווינוגרדסקי

ניסוי וינוגרדסקי הוא ניסוי לטווח ארוך, כשאי להעמיד אותו לפחות למספר חודשים ולעקוב אחר השתנות העמודות לאורך זמן. דרך אחת לתאר את התוצאות היא באמצעות טבלת מעקב. בטבלה זו נתאר מה קרה בכל עמודה (טבלה א). כמובן שנרצה לצלם את העמודות ולתעד את השינויים. כדאי לנסות ולצלם תמיד מאותו מרחק ולשים קנה מידה כדי שיהיה קל אחר כך להשוות בין התמונות (תמונה). אם מודדים שינויים פיזיקליים בעמודת עמים נניח ריכוז חמצן מומס, ניתן ליצור גרף של השינויים בעמודות השונות. כאן חשוב להדגיש, שהמדידה צריכה להתרחש בדיוק מאותה הנקודה בעמודה שכן בכל מקום צפוי להיות גרדיאנט שונה של חמצן.

מספר בקבוק מספר	טיפול	פרמטר נבדק/תאריך	14.11	20.11	5.12	12.12
1	אור בלבד	צבע/ עכירות עמודת המים	צלול	צלול	מעט ירקרק	צלול
		צבע הסדימנט	אין שינוי	אין שינוי	אין שינוי	אין שינוי
		גזים ובועות (מיקום וכמות)	אין	אין	אין	אין
		ריח	אין	אין	אין	אין
		מיקרואורגניזמים	אין	אין	אין	אין
		ריכוז חמצן מומס במים	8.2	5.7	5.4	6.2
		pH				8.24



תמונה 31: עמודות עם תוספת אצטט כמקור פחמן יחיד. ניתן לראות שלאחר 12 יום מתחילת הניסוי נגמר החנקן בעמודה וחלקים של המצע משחירים בתהליך של חיזור סולפאט לסולפיד (א, ב). כחודשיים מתחילת הניסוי, נצפה משטח צהוב על הסדימנט. כנראה שהסולפיד חומצן בצורה אנארובית בנוכחות ניטראט לגפרית אלמנטרית (ג).



תמונה 32: השפעת הטיפולים השונים על ריכוז החמצן המומס במים בעמודות השונות.