



## הנחיות להקמת מערכת ניסוי לספירולינה

ד"ר איתי ללזר, יהבית לוריא

מאחר ולקח זמן לתרבות להגיע למעבדה, יתכן ואחוז מסוים מהתאים מתו בדרך. לכן כדאי לאפשר לתאים לגדול במשך כמה ימים, כדי שנדע שאנחנו עובדים עם תאים חיים. **בשלב ראשון** נכין לנו כלי מדידה למעקב אחר גידול תרבות האצות. **בשלב שני** נעמיד את התרבות במערכת גידול של האצות בכיתה עד לתרבות חיונית.

### 1. יצירת מד צבע למדידת צפיפות התאים בתרבות האצות

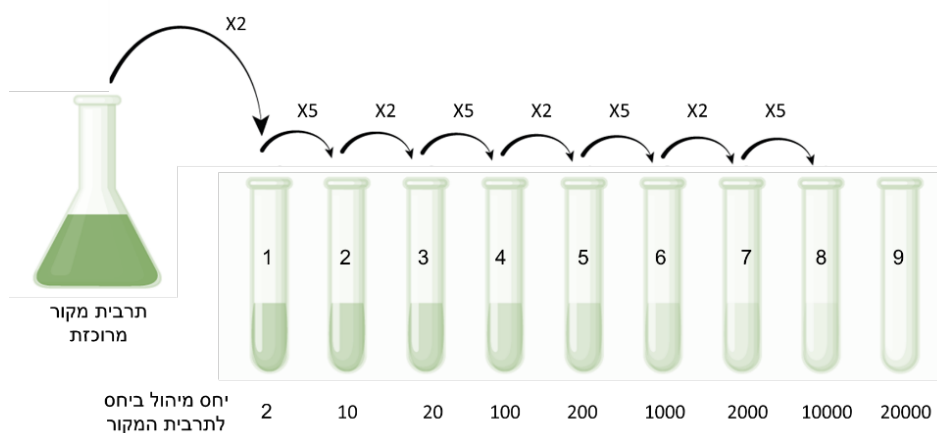
כדי לעקוב אחר קצב הגידול של התאים ניצור מד-צבע שיאפשר לנו למדוד את עכירות התרבות ככלי להערכת צפיפות התאים.

- א. הכינו 9 ארלנמיירים/בקבוקים בנפח 500 מ"ל ומשורה בנפח 500 מ"ל.
- ב. הכינו טבלה לרישום המדידות.
- ג. סמנו את הארלנמיירים בספרות 1-9.
- ד. ערבבו קלות את תרבות המקור, ומיזגו ממנה 100 מ"ל לארלנמייר מס' 1.
- ה. מדדו את עצמת הצבע בתרבות באחת משתי הדרכים:
  - מדידה בעזרת אפליקציה כמו [Color Picker](#) באנדרואיד או [Color assist lite](#) ב iOS, רשמו את התוצאה בטבלה מס' 1 (כתרבות מקור) – הקפידו לרשום את ערך H בסולם HSV או בסולם HSL. (H נותן את ערך הצבע האמיתי בסולם Hue).
  - מדידה בעזרת תצלומים של התרבות בטלפון הסלולרי, ממרחק קבוע ובתאורה קבועה. לשם כך, העמידו ארלנמייר המכיל את התרבות לצילום, בתוך קופסת נעליים עומדת שמאחוריו רקע לבן. דאגו שבתוך הקופסה תהיה נורת לד בעוצמת אור קבועה. סגרו את הקופסה בעזרת המכסה וצלמו את התרבות מבעד לחרץ שתכינו מראש. באופן הזה אתן מבטיחים שעצמת התאורה והמרחק מהאובייקט אחידים.
- ו. הוסיפו 100 מ"ל מי ברז לתרבות. בכך ביצעתם מיהול פי 2 בהשוואה לתרבות המקור. מדדו שוב את הצבע (בעזרת האפליקציה, או צלמו בעזרת הטלפון הסלולרי). רשמו את התוצאה בטבלה מס' 1 כמיהול 1.
- ז. העבירו 100 מ"ל מהתרבות המהולה פי 2, לארלנמייר חדש והוסיפו 400 מ"ל מים מזוקקים (מיהול פי 5), בכך ביצעתם מיהול כללי של פי 10 ביחס לתמיסה המקורית. מדדו שוב את הצבע (בעזרת האפליקציה או הסלולרי). רשמו את התוצאה בטבלה מס' 1 (כמיהול 2).
- ח. חזרו על התהליך עד שתתקבל תרבות כמעט צלולה (איור 1).

## קיבלתם מד-צבע של 10 ריכוזים של תרבית האצות באחת משתי הדרכים:

1. הערכים שמדדתם באפליקציה ורשמתם בטבלה מס' 1

2. ספריית תמונות ממוספרות שצילמתם בסלולרי



איור 1: הכנה של סדרת מהולים. מתמיסת המקור לוקחים נפח ידוע ומשלימים בחלק 1 של מים. לאחר מכן לוקחים מהתמיסה המהולה, חלק 1 משלימים עם ארבעה חלקים של מים. בהתאם לכך מתקבלת סדרת מהולים. במידה והתרבית נהיית צלולה כבר לאחר מיהול שני או שלישי, ניתן לבצע סידרה של מהולים ביחסים אחרים, למשל פי 2.

## טבלה 1. השפעת ריכוז התרבית על עצמת הצבע והמשקל היבש.

| מבחנה מספר | דרגת מיהול | עצמת צבע (ערך Hue) | משקל יבש |
|------------|------------|--------------------|----------|
| תרבית מקור | ללא מיהול  |                    |          |
| 1          |            |                    |          |
| 2          |            |                    |          |
| 3          |            |                    |          |
| 4          |            |                    |          |
| 5          |            |                    |          |
| 6          |            |                    |          |
| 7          |            |                    |          |
| 8          |            |                    |          |



| מבחנה מספר | דרגת מיהול | עצמת צבע<br>(ערך Hue) | משקל יבש |
|------------|------------|-----------------------|----------|
| 9          |            |                       |          |

## 2. חישוב משקל יבש של האצות

- דרך נוספת לחישוב ריכוז האצות בתרבית היא על ידי חישוב המשקל היבש של הדגימה. משקל יבש מתאר את המשקל של הרכיב התאי בלבד ללא תוספת המים. ככל שהתרבית צפופה יותר כך נפח קבוע של תרבית יתבטא במשקל יבש גדול יותר. בהתאם לכך גם צבע התרבית יהיה כהה יותר.
- א. קחו נייר סינון מסוג Whatman בקוטר 90 – 110 מ"מ ויבשו אותו בתנור שחומם מראש לטמפרטורה של 100 מעלות צלסיוס למשך 10 דקות.
- ב. שקלו במאזניים אנליטיים את הנייר היבש ורשמו את התוצאה.
- ג. הכינו מהנייר היבש משפך וסננו דרכו 100 מ"ל תרבית לתוך ארלנמייר, מכל אחד מהמיהולים שהכנתם בחלק 1. הקפידו לעבוד על כל מיהול בנפרד, להוציא דגימה ולסנן.
- ד. רשמו על נייר הסינון את מספר המיהול.
- ה. העבירו את החלק התאי לצלחת פטרי, או עטפו אותו בנייר אלומיניום והכניסו לתנור שחומר מראש לטמפרטורה של 105 מעלות צלסיוס למשך 60-90 דקות.
- ו. הוציאו את הנייר מהתנור ושיקלו מיד (כדי שלא יקלוט לחות מהאוויר). לחישוב המשקל היבש החסירו את משקל הנייר מהתוצאה ורשמו בטבלה מס' 1.
- ז. חיזרו על המדידה עבור כל אחד מהמיהולים.
- ח. לאחר 60-90 דקות בתנור, הוציאו את הדוגמאות לשקילה אחת אחת, כדי שלא יעמוד באוויר החדר ויספחו לחות.
- ט. מומלץ לחזור על בדיקה זו כל יום יומיים. אם נפח התרבית גדול דיו, כדאי לבצע חזרות גם של בדיקת המשקל היבש.

## 3. מדידת צפיפות אופטית בעזרת ספקטרופוטומטר.

הסבר מפורט על אופן פעולת הספקטרופוטומטר תמצאו בתיקיית הדרייב של ההשתלמות. מי שירצה לעקוב אחר קצב גידול תאי הספירולינה בעזרת ספקטרופוטומטר, יוכל לעשות זאת על ידי מדידה של דגימה מכלי הגידול באורך גל של 680nm.

## 4. אקלום האצות במערכת גידול בכיתה.



את תרבית האצות שקבלתם מומלץ לגדל באקווריום בנפח של 10 ליטר או בשני אלרנמיירים גדולים בנפח 5 ליטרים או במיכל גדול של מים מינרלים. כמו כן, צריך להוסיף למערכת משאבת אוויר ומקור אור בעוצמה של 1500 לוקס. טמפרטורת המים צריכה להיות מעל 20 מעלות צלסיוז אחרת קצב הגידול של הספירולינה יהיה מאד איטי. כדי לעקוב אחר שינויי טמפרטורת המים, מדדו את הטמפרטורה בעזרת מד טמפרטורה פעמיים ביום. במידה והטמפרטורה ירדה מתחת ל - 20 מעלות צלסיוז הוסיפו גוף חימום למים.

א. קחו את 900 מ"ל שנותרו מתמיסת המקור ומהלו פי 3 על ידי הוספת 1800 מ"ל של מי ברז.

ב. מדדו את עכירות התמיסה בעזרת מד הצבע שהכנתם.

ג. הוסיפו מדיום גידול לפי היחסים:

| חומר           | כמות לליטר | למערכת הגידול<br>בנפח 3 ליטר. |
|----------------|------------|-------------------------------|
| דשן שפר 7-3-7  | 1 מ"ל      | 3 מ"ל                         |
| סודה לשתייה    | 10 גרם.    | 30 גרם                        |
| מלח בישול NaCl | 0.5 גרם.   | 1.5 גרם.                      |

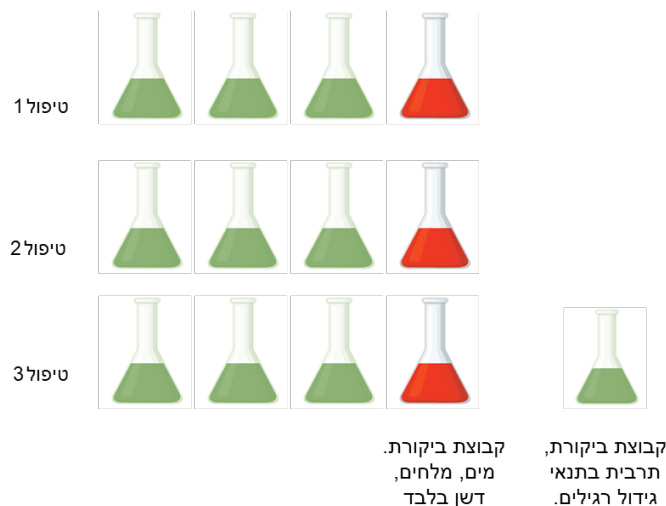
ד. העמידו את המערכת בתנאי אור (1500 לוקס) וטמפרטורה קבועים (מעל 20 מעלות צלסיוס).

ה. חזרו על מדידת העכירות פעם ביום בשעה קבועה עד שצבע התמיסה שיתקבל יהיה זהה לצבע תמיסת המקור שקבלתם. (זמן דור של ספירולינה הוא בערך 2-3 ימים מכאן שתצטרכו למדוד במשך ארבעה עד שישה ימים). לחילופין, אתם יכולים פעם ביום לבצע בדיקה של משקל יבש.

ו. כעת ברשותכם כ - 3 ליטרים של תרבית ספירולינה חיונית מרוכזת.

## 5. הכנת מערכת הניסוי על פי הגורמים המשפיעים שתבחרו לחקר.

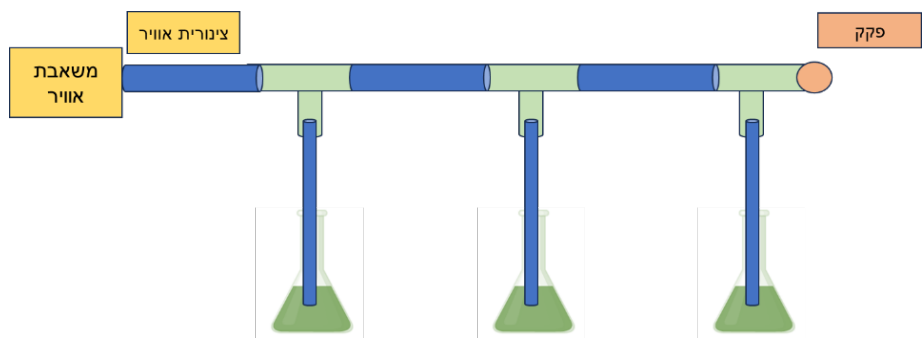
- אנו ממליצים שלכל ניסוי תבחרו שלושה טיפולים שונים ולכל טיפול תכינו שלוש חזרות. בנוסף עליכם להכין שתי קבוצות ביקורת שיעברו את אותם טיפולים בדומה לקבוצות הניסוי:
- **ביקורת חיובית** - תרבית אצות הגדלה בתנאים רגילים – הכוללים: מדיום גידול, מקור אור בעוצמה של 1500 לוקס, וטמפרטורת מים של מעל ל 20 מעלות צלסיוז.
- **ביקורת שלילית** (תלוי ניסוי כמובן) – כלים המכילים מים, מלחים, דשן, אך ללא אצות (איור 2). בהתאם לניסוי צריך לשקול כמה קבוצות ביקורת שליליות תצטרכו להכין.



**איור 2:** דוגמה למערכת ניסוי. השפעת עצמת האור על קצב גידול הספירולינה. כל טיפול מייצג עצמת אור שונה. לכל טיפול הוספנו קבוצת ביקורת ללא ספירולינה. בנוסף הוספנו קבוצת ביקורת חיובית שהיא תרבית ספירולינה הגדלה בתנאי גידול רגילים.

מומלץ לעבוד עם ארלנמיירים בנפח 1 ליטר, אם אין בנמצא אפשר לעבוד עם בקבוקים בנפח 1.5 ליטר. בכל מקרה הקפידו שנפח התרבית בכל כלי יעמוד על כחמישית מנפחו. כלומר, לבקבוק בנפח של 1.5 ליטר נוסיף מקסימום 300 מ"ל תרבית ספירולינה.

- מתרבית הספירולינה המרוכזת שהכנתם בשלב 2, קחו 1 ליטר והוסיפו 2 ליטרים של מים.
- העבירו לכל אחד מכלי הניסוי 300 מ"ל תרבית ספירולינה מהולה.
- בצעו מדידת צבע באחת השיטות שהצענו.
- חברו את כל הכלים בעזרת משאבת אוויר וצינוריות אקווריום. אם אפשר עדיף שתי משאבות לכל הניסוי (איור 2, תמונה 1).



איור 3: דוגמה לחיבור מערכת הניסוי. משאבת אוויר מחוברת בעזרת צינורית אקווריום לשלושה ארלנמיירים בעזרת מפצלים מסוג T. כדי שהצינורית לא תצוף במים, ניתן לחבר אבן אוויר או אום שחוטא קודם לכן. ה. מדדו את עכירות הכלים פעם ביום ועד הגעה לרמת עכירות הדומה לזו של תמיסת המקור.

## טבלה 2: ציוד נדרש.

| הערות                                                      | כמות לקבוצה                             | פריט                       |
|------------------------------------------------------------|-----------------------------------------|----------------------------|
| 1 ליטר תרבית מרוכזת לקבוצה.                                | 1 ליטר                                  | תרבית ספירולינה            |
| מלח 0.5 גרם לליטר. דשן – 1 מ"ל לליטר. סודה – 10 גרם לליטר. | מלח בישול, דשן שפר 7-3-7-3 סודה לשתייה. | מדיום לגידול               |
| משאבת אוויר אחת יכולה להספיק לכל החזרות של קבוצה אחת.      | 1-2                                     | משאבת אוויר                |
| או פחות מזה בהתאם למספר החזרות ולשטח שתתפוס המערכת.        | 6 מטרים                                 | צינור אקווריום             |
| בהתאם למבנה המערכת.                                        |                                         | מפצל T                     |
|                                                            | 1 חבילה                                 | אזיקונים קצרים             |
|                                                            | כמספר הכלים לניסוי                      | אבן אוויר                  |
|                                                            |                                         | פיפטות 1 מ"ל להוספת תמיסות |
| או אלרנמיירים בנפח 1 ליטר (עדיף)                           | בהתאם למבנה הניסוי.                     | בקבוקי מים בנפח 1.5 ליטר   |



תמונה 1. מרכיבי הניסוי. מתוך חוברת "ים של אורגניזמים" של עמותת אקו-אושן וברשותם.