

**מספר המחקר במשרד
לאיכות הסביבה:**

שם המוסד המחלקה והמוסד המגישים:
מכון לחקר שמירת הטבע, אוניברסיטת תל-אביב

כותרת המחקר בעברית: .
שימוש בחילוץ המים שחריר הנחלים Melanopsis כביזאינדיקטור לבחינת
איכות מים בנחלים.

כותרת המחקר באנגלית:
Use of Melanopsis Snail as a Bioindicator to Asses Water Quality of
Streams

סוג הדו"ח (חצי שנתי, שנתי או מסכם)
שנת המחקר(ראשונה שניה או שלישית)
דוח מסכם שנה שלישית

מוגש ע"י

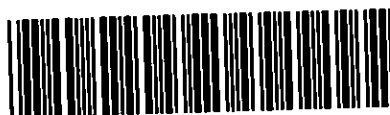
חוקרים ראשיים:

(בעמדה ימנית שם ותואר אקדמי, בעמדה השמאלית מוסד או מחלקה):

פרופ' אביטל גזית	אוניברסיטת תל-אביב

חוקרים נוספים:

(בעמדה ימנית שם מלא ותואר אקדמי, בעמדה השמאלית מוסד או מחלקה):



60513899

דנה מילשטיין	אוניברסיטת תל-אביב

מוגש למדען הראשי
המשרד לאיכות הסביבה

תאריך הגשה: נובמבר 2002

מספר עמוד	תוכן עניינים
1	תקציר בעברית ^{1,2,3}
2	תקציר באנגלית ³
2	מילות מפתח ^{2,3}
3	מבוא
	הצגת הנושא ^{1,2,3}
	סקר ספרות ^{2,3}
4	מטרות העבודה ^{1,2,3}
5	רקע מדעי ^{1,2,3}
10	השערת העבודה
11	שיטות
	ניסויים ו/או חישובים
39	תוצאות ^{1,2,3}

72		דיון בתוצאות 1*,2,3
94		מסקנות 1*,2,3

1 דו"ח חצי שנתי
2 דו"ח שנתי
3 דו"ח מסכם
* אופציונאלי

97		אפשרויות יישום תוצאות העבודה בישראל 2*,3
98		המלצות להמשך המחקר 3
99		סיכום 1,2,3
		רשימת ספרות 3
		נספחים

1 דו"ח חצי שנתי
2 דו"ח שנתי
3 דו"ח מסכם
* אופציונאלי

*רשימת טבלאות

מספר עמוד	הטבלה	מספר טבלה
11	: Selected water quality variables (dissolved oxygen, conductivity, salinity and temperature)	2.1.1

	measured in Tanninim stream at different dates	
12	Selected water quality variables (dissolved oxygen, conductivity, salinity and temperature) measured in Seadia stream at different dates	2.1.2
17	Mean and SD of the size groups of <i>Melanopsis</i> from Tanninim and Seadia (ANOVA).	2.2.1
32	Water conductivity (mean, SD) in the experimental jars.	2.4.1
36	Water quality variables along the Yarqon stream (08/00, 11/00, 03/01 04/01, 7/01).	2.5.1
44	Number of snails (N), range, mean, and SD of <i>Melanopsis lampra</i> shell length in Seadia stream. Skewness and p values for Shapiro-Wilk W test for normality are shown. Significant values shown in gray.	3.1.1
46	Number of snails (N), range, mean, and SD of <i>Melanopsis</i> sp. Shell length in Tanninim stream. Skewness and p values for Shapiro-Wilk W test for normality are shown. Significant values shown in gray.	3.1.2
50	Comparison of stressed <i>Melanopsis</i> (%) of different size group from Tanninim and Seadia streams, exposed to 0.1 and 0.25 mg/l Cu. p values for ANOVA test after % transformed top Asin, are shown)	3.2.1
51	Comparison of the sensitivity to Cu (% stressed snails) of <i>Melanopsis lampra</i> acclimated to tap water and snails tested in Seadia water (3 replicate). Copper concentration, 96h-EC ₅₀ – in grey and 95% confident limits are shown	3.2.2
53	Examination of the acclimation treatments on sensitivity of <i>Melanopsis lampra</i> to Cu. p values of posterior ANOVA test (a - d as in Fig. 3.2.7)	3.2.3
65	p values for a posterior test (transformed to Asin) conducted on percent stressed <i>Melanopsis lampra</i> snails after 96h exposure in stream water of selected sites along Yarqon stream. Significant values shown in gray	3.5.1
83	toxicity values to copper (96h-EC ₅₀ , mg/l) for different freshwater invertebrates (Initials: S – static, FT – flow thought, R – renewal, CS – copper sulfate, CC – copper chloride, CO –	4.2.1

	copper oxide)	
84	Criterion Continuous Concentration and Criterion Maximum Concentration ($\mu\text{g/l}$) calculated according to the hardness of the toxicity test water.	4.2.2
87	sensitivity values (96h-EC ₅₀) for unionized ammonia (mg/l) of freshwater invertebrate. (Initials: R – renewal, FT – floe trough, S – static)	4.3.1

רשימת תרשימים

מספר עמוד	התרשימים	מספר התרשים
24	Relationship between colorimetric (HACH DR/890) and atomic absorption (ICP-AES) measurement. Coefficient of determination and equation for the correlation are shown	2.2.1
25	Copper concentration readings (mean \pm SD) from HACH colorimeter (DR/890) of media in different pH.	2.2.2
28	Dynamics of pH in the ammonia reservoirs	2.3.2
28	Dynamics of unionized ammonia in the ammonia reservoirs	2.3.3
32	Water conductivity vs. salt added (g) to 1 liter distilled water. Coefficients of determination and regression equation are shown	2.4.1
39	Density (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> population sampled monthly in Seadia stream	3.1.1
40	Shell length (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> population sampled monthly in Seadia stream	3.1.2
41-43	Monthly values of frequency of size distribution of <i>Melanopsis</i> snails from Tanninim stream (left) and Seadia stream. code for each mm size group is shown Color	3.1.3

44	Density (mean \pm SD) of <i>Melanopsis</i> sp. population sampled in Tanninim stream	3.1.4
45	Shell length (mean \pm SD) of <i>Melanopsis</i> sp. population sampled in Tanninim stream	3.1.5
47	Changes in sensitivity of <i>Melanopsis</i> sp. To Cu (95% confident limits). P values for the correlation and coefficient of determination are shown. Regression for cumulative mean values of 96h-EC ₅₀ and coefficient of determination is shown in red	3.2.1
48	96h-EC ₅₀ (and 95% confident limits) of <i>Melanopsis lampra</i> from Seadia stream Exposed to Cu. Regression of Cumulative mean values of 96h-EC ₅₀ and coefficient of determination are shown (red). Blue lines present 2SD distance from the stable cumulative mean value (first 19 values).	3.2.2
49	Relationship between sensitivity of <i>Melanopsis</i> sp. (96h-EC ₅₀) from Tanninim stream population to Cu vs. mean shell length (mm). P value for the correlation and coefficient of determination are shown.	3.2.3
49	Relationship between sensitivity of <i>Melanopsis lampra</i> (96h-EC ₅₀) from Seadia stream population to Cu vs. mean shell length (mm). P value for the correlation and coefficient of determination are shown	3.2.4
51	Sensitivity of <i>Melanopsis lampra</i> to Cu (96h-EC ₅₀ , mean \pm SD) tested in Seadia water and in tap water adjusted to Seadia water salinity (Instant Ocean salt).	3.2.5
52	Sensitivity of <i>Melanopsis lampra</i> to Cu (96h-EC ₅₀ , mean \pm SD) tested in Seadia water and in tap water adjusted to Seadia water salinity (Sigma salt).	3.2.6
53	Comparison of the sensitivity of <i>Melanopsis lampra</i> to Cu under different acclimation conditions: a - no acclimation (1 day Seadia water), b - acclimation to tap water (2 weeks), c - acclimation to tap water (2 weeks) folloed by acclimation to tap water with adjusted conductivity to Seadia water, d - held in Seadia water for 4 weeks.	3.2.7
54	Changes of residual copper concentration (% , mean \pm SD) with time in different media (Coefficient of determination and regression are shown).	3.2.8

55	Changes in residual copper concentration (%) with time in different aeration treatments: a - no aeration, b - aeration with a stone, c - stone without aeration, d - aeration with plastic tubing (Coefficient of determination and polynomial regression are shown)	3.2.9
55	Mean and SD of residual copper concentration (%) in different treatments (a-d as Fig. 3.2.9).	3.2.10
56	Sensitivity to copper (96h-EC ₅₀ values) of different <i>Melanopsis</i> populations (mean \pm SD). Dates of bioassays are shown.	3.2.11
57	: Relationship between sensitivity to copper of different <i>Melanopsis</i> populations and the electric conductivity of the test solution (same as the conductivity in the habitat).	3.2.12
58	: Sensitivity (96h-EC ₅₀) of different <i>Melanopsis</i> populations to total ammonia. Dates of bioassays are shown	3.3.1
59	different <i>Melanopsis</i> populations to unionized ammonia. Dates of bioassays are shown.	3.3.2
62	Percent stressed (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> after 24, 48, 72 and 96h exposure to different salinity's	3.4.1
63	Relationship between percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i>) and salinity. Coefficients of determination and equation of the regression are shown.	3.4.2
64	Percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i> , mean \pm SD) after 96 h exposure in stream water of selected sites along Yarqon stream at different dates (08/00, 11/00, 03/01, 04/01, 07/01)	3.5.1
65	Relationship between percent stressed snails (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> after exposure of 96h in stream water of selected sites along the Yarqon stream to biological oxygen demand (BOD).	3.5.2
66	Relationship between percent stressed snails (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> after exposure of 96h in stream water of selected sites along the Yarqon stream to total ammonia (mg/l)	3.5.3

67	Relationship between percent stressed snails (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> after exposure of 96h in stream water of selected sites along the Yarqon stream to unionized ammonia	3.5.4
68	Relationship among the percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i>) after exposure of 96h in stream water of selected sites along the Yarqon stream and the total ammonia and the organic meter concentration (BOD)	3.5.5
69	% stress of <i>Mlanopsis lampra</i> exposed to 96h to selected sites along Yarqon stream vs. unionized ammonia and biological oxygen demand (BOD). Dotted circles illustrate different trends	3.5.6
70	Relationship between percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i>) and the proportion of damselfly in the macroinvertebrate assemblage. In-Situ snails exposure and macroinvertebrate collection were performed on the same dates (08/00, 11/00, 03/01, 04/01 and 07/01).	3.5.7
70	Relationship between percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i>) and the proportion of midge larvae in the macroinvertebrate assemblage. In-Situ snails exposure and macroinvertebrate collection were performed on the same dates (08/00, 11/00, 03/01, 04/01 and 07/01).	3.5.8
71	Relationship between percent stressed snails (<i>Melanopsis lampra</i>) and the Signal -W values of the macroinvertebrate assemblage. In-Situ snails exposure and macroinvertebrate collection were performed on the same dates (08/00, 11/00, 03/01, 04/01 and 07/01).	3.5.9
76	Shell length and density (mean \pm SD) of <i>Melanopsis lampra</i> sampled monthly in Seadia stream. p value and coefficient of determination for the correlation are shown.	4.1.1
76	Shell length and density (mean \pm SD) of <i>Melanopsis</i> sp. sampled monthly in Tanninim stream. p value and coefficient of determination for the correlation are shown	4.1.2

מספר עמוד	המפה	מספר המפה
35	Test sites along the Yarqon stream (blue – clean water, red – polluted water)	2.5.1

רשימת תמונות

מספר עמוד	התמונה	מספר התמונה
14	Spring flow near Tanninim stream (100 m downstream of the Roman bridge).	2.1.1
15	Sampling site in Seadia stream	2.1.2

תקציר

מחסור חמור במים שפירים מגביל את שיקום הנחלים בישראל ומחייב בעת הנוכחית שימוש במים מושבים. בעבודתי בחנתי את האפשרות להשתמש בשחריר הנחלים, חילוון הנפוץ בנחלי ישראל - כמין אינדיקטורי לבחינת השפעות קולחים בנחלים. נלמדה הדיטאמיקה השנתית של החלזון ונבחנה רגישותו לאמוניה, נחושת ומליחות. כמו כן נבדקה רגישותו לאיכות מים בנחל הירקון באתרים נבחרים.

נבחנו חמש אוכלוסיות שחריר מבתי גידול שונים. ערכי תגובת עקה של 50% מהפרטים בחשיפה למשך 96 שעות לנחושת ואמוניה הושוו לקריטריונים מומלצים של ה USEPA ולהמלצות המשרד לאיכות הסביבה.

רגישות השחרירים מעיינות צוקים לנחושת ואמוניה היתה נמוכה באופן משמעותי מרגישות שאר האוכלוסיות. (נחל חרמון, אגם כנרת, נחל סעדיה, נחל תנינים). במקרה של הנחושת נמצא מתאם חיובי בין הרגישות לקשיות המים.

ערכי הרגישות האקוטית לנחושת של אוכלוסיות השחרירים היו גבוהים מערכי Criteria Maximum Concentration (CMC) ו Criteria Continuous Concentration (CCC), שחשבו על פי תלות בקשיות המים. ריכוז הפליטה של נחושת המומלץ ע"י המשרד לאיכות הסביבה נמוך מהערכים הנ"ל. ממצאים אלו מעודדים, אך יש להתייחס אליהם בזהירות ראויה בשל חישוב הקריטריונים CMC ו CCC על בסיס נתונים של מינים מארה"ב.

את ערך ה CMC של אמוניה חישבנו על בסיס נתוני הרגישות האקוטית ($96h-EC_{50}$) של אוכלוסיות השחרירים. תקן הפליטה של אמוניה לנחלים המומלץ ע"י המשרד לאיכות הסביבה נמוך מערך ה CMC הנ"ל. בהעדר מבחנים כרוניים לא ניתן היה לחשב את ערך ה CCC ולכן אין עדין אפשרות להעריך את התאמת התקן המומלץ לאמוניה הנדרש לשיקום נחלים.

קשר מובהק בין תגובת עקה של השחריר ומשתני איכות מים (ריכוז חומר אורגני ואמוניה) מצביע על האפשרות לנצל מין זה כביואידיקטור לניטור איכות המים בנחלים.

Abstract

Water shortage makes the case of stream rehabilitation in Israel particularly difficult. As an interim solution, the Ministry of the Environment adopted the approach of using reclaimed wastewater for stream rehabilitation. This calls for assessment of the criteria of effluent quality planned for discharge into streams.

In this study we tested the suitability of the freshwater snail *Melanopsis* as a bioindicator of water quality in streams. We tested its sensitivity to copper, ammonia and salinity, and to stream water in selected sites of the Yarqon stream. Of the 5 populations examined: Hermon stream, Lake Kinneret, Seadia stream, Tanninim stream and Enot Zuqim, the latter was the least sensitive to both copper and ammonia. The sensitivity of all populations to copper exceeded the Criteria Maximum Concentration (CMC) and that of Criteria Continuous Concentration (CCC). The CMC and CCC were calculated based on USEPA equation for water hardness that was developed for US species. The relevance of this equation to local fauna remains to be studied. The CMC for ammonia is based on the sensitivity of the local *Melanopsis*. This concentration is lower than that recommended by the Ministry of the Environment. However, absence of chronic toxicity information prevents calculation of the CCC. This prohibits evaluation of the appropriateness of the recommended Israeli criteria for ammonia.

Significant correlation between water quality variables (BOD, ammonia) and the proportion of stressed *Melanopsis* suggests that this species can be considered for assessment of water quality in streams.

מילות מפתח

Stream, Bioindicator, *Melanopsis*, Copper, Ammonia

הצגת הנושא וסקר ספרות

במקומות רבים בעולם ובישראל נפגעו מקווי מים מפעילות אדם. בשנים האחרונות נעשה מאמץ לשקם מקווי מים פגועים. תנאי הכרחי להצלחת שיקום הוא מעקב אחר מצבו של מקווה המים. מטרתו של המחקר הנוכחי היא בחינת השימוש בחלזון שחריר הנחלים (*Melanopsis*) כבביואינדיקטור לבחינה והערכה של איכות המים ושלמות אקולוגית ("בריאות המערכת"), ובחינת רגישותו לאמוניה ונחישות כמייצגי טיפוס זיהום שונים.

החל משנות החמישים התמקד פיתוח הארץ באזור מישור החוף. פיתוח זה דרש, בין השאר, מים למגזר העירוני, התעשייתי והחקלאי. במקביל יצור השפכים גדל (Bar-Or, 2000). בעולם נהוג למהול את מי השפכים בנחלים, אך מאחר ובארץ המים נלקחו לשימושים השונים נותרו אפיקי נחל ללא זרימת בסיס. נחלים ים תיכוניים מאופיינים בזרימה שטפונית חורפית ובדעיכה הדרגתית של הזרימה במשך חודשי הקיץ (Gasith, 1992). מאחר ומאגרי מים לאגירת מי גשמים וקולחים, המספקים תוספת מים להשקיה, מוקמו באגני הניקוז של הנחלים, הם גרמו לצמצום הזרימות השטפוניות בנחל, להן תפקיד מרכזי בתחזוקת הנחל ושטיפתו (Gasith, 1992).

הפיתוח במישור החוף של ישראל גרם, בנוסף לייבוש הנחלים, להתדרדרות מהירה באיכות המים עקב הזרמת קולחים מהמגזר העירוני והתעשייתי. זיהום זה בא לידי ביטוי למשל בערכים גבוהים של ריכוז חומר אורגני (BOD), עכירות, ריכוזי אמוניה גבוהים וירידה בריכוז החמצן. בנוסף לכך קיים זיהום שמקורו במגזר החקלאי, דוגמת שיירים של חומרי הדברה ודשן. השילוב של צמצום כמות המים הזורמת לנחל וזיהומו, גורמים לשינויים קיצוניים במבנה ובתנאים של בית הגידול ופוגעים בצומח ובחי של המערכת. ברוב נחלי החוף נמצא כי מספר המינים של חסרי החוליות הגדולים ירד מאז שנות החמישים ועד היום. בנחל נעמן למשל, נמצא כי עושר המינים מקיים מתאם הפוך עם ריכוז החומר האורגני, המהווה מדד לזיהום אורגני. כמו כן תועדו בנחל זה ב-1970 14 מינים של חלזונות, בעוד שסקר שנערך ב-1989 פרט 3 מיני חלזונות בלבד (Gasith, 1992).

מאחר ופוטנציאל המים בישראל נמוך ורזרבות מים חסרות, נאלץ שיקום הנחל להסתפק במים באיכויות ירודות כדוגמת כשפכים מטופלים (קולחים). במהלך 1997 בחן המשרד לאיכות הסביבה את איכות קולחים המיוצרים ב-40 מכוני טיהור שונים בארץ, ומצא כי בכ-16% איכות המים הוגדרה בינונית, ב-31% מהמפעלים איכות מים גרועה וב-47% מהמפעלים המים לא עמדו בדרישות הקבועות בחוק (המשרד לאיכות הסביבה, 1997).

בעיה נוספת בשימוש בקולחים היא העדר תקנים מתאימים לריכוזי המזהמים. תקנים אלו אמורים להתבסס על רגישותם של המינים המקומיים למזהמים שונים; על מנת לאפשר קיום של מערכת אקולוגית בריאה ועצמאית. אולם, מידע על רגישות המינים המקומיים למזהמים טיפוסיים חסר, ולכן מרבית התקנים לריכוזי המזהמים (משרד לאיכות הסביבה, 2000), יתכן ואינם מתאימים לקיים חברה אקולוגית בריאה בנחלים.

מטרות העבודה

מטרת המחקר הנוכחי היא בחינת ההתאמה של שחריר הנחלים לשמש כאינדקס לאיכות מים, בחינת רגישותו של השחריר למזהמים מטיפוסים שונים כאמוניה ונחושת ובחינת התאמתו של השחריר לבחינה והערכה של איכות מים ו"שלמות ביולוגית" (בריאות המערכת).

בהתאם נגזרו יעדי המחקר הבאים:

1.9.1 ברור התפוצה ודינמיקה של אוכלוסיות שחריר הנחלים.

1.9.2 בחינת רגישות נחושת לחלזון שחריר הנחלים.

1.9.3 בחינת רגישות אוכלוסיות שונות של שחריר הנחלים לאמוניה.

1.9.4 בחינת רגישות שחריר הנחלים למליחות.

1.9.5 שימוש בשחריר הנחלים במבחני חשיפה *in situ* לקביעת איכות מים ושלמות ביולוגית.

1.9.6 הסקת מסקנות לגבי התאמת שחריר הנחלים לשמש כביואינדקס לאיכות מים ולשלמות ביולוגית של מערכת נחל.

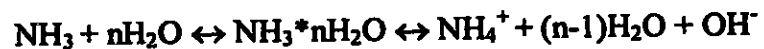
רקע מדעי

אמוניה

אחד המרכיבים הדומיננטיים בשפכים העירוניים הוא האמוניה (Monda et al., 1995). האמוניה משתחררת למים לאחר הידרוליזה של אוראה, פירוק ביולוגי של חומצות אמיניות וחומרים אורגניים אחרים המכילים חנקן. ריכוז האמוניה בשפכים גולמיים נע בדרך כלל בין 9-30 מ"ג/ליטר. טיפול ביולוגי סטנדרטי ראשוני ושניוני מרחיק בדרך כלל פחות מ 30% מהאמוניה (Ruffier, 1981).

האמוניה מתקיימת במים בשתי צורות: אמוניה בלתי מיוננת (NH_3), ואמוניה מיוננת - אמוניום (NH_4^+). מספר חוקרים הראו כי רעילות תמיסה מימית של אמוניה נגרמת בעיקרה מפרקצית האמוניה הבלתי מיוננת (Emerson et al., 1975; EPA, 1998; Andersen and Buckley, 1998). הרעילות הגבוהה של האמוניה הבלתי מיוננת נגרמת בשל מעבר מהיר דרך אפיתל העור או הזימים והצטברות של האמוניה בדם וברקמות. בדגים האמוניה גורמת לנזק עצבי מאחר והיא מעקבת את האזנים גלוטמינאז, המעורב בסינטזה של מספר נאורוטרנסמיטורים. חשיפה אקוטית של דגים לריכוזים גבוהים של אמוניה גורמת לעלייה בווטילציה בזימים, לעוויתות, חוסר קואורדינציה, איבוד שווי משקל ולבסוף מוות (Russo, 1985; Harris et al., 2001). ליוני האמוניום רעילות נמוכה יותר בשל הקושי שלהם בכניסה לתאים. יונים של אמוניום גורמים לעיכוב פעולת משאבת היונים $\text{Na}^+/\text{NH}_4^+$ בזימים, המתבטא בירידה בריכוז הנתרן ולכן פוגע ביכולת לבצע אוסמורגולציה (Maetz, 1972; Rebelo et al., 1999; Harris et al., 2001). חשיפה כרונית של דגים לריכוזים תת-ליטליים של אמוניה גורמת לשינויים היסטולוגיים ברקמות הגוף, ירידה ביכולת רבייה (מספר ביצים נמוך יותר, חיוניות ביצים נמוכה ועיכוב בהשרצה), ירידה בקצב הגדילה וירידה בעמידות למחלות (Russo, 1985).

האמוניה במים עוברת ריאקציית שיווי משקל על פי המשוואה הבאה (Emerson et al., 1975):



פרקציית האמוניה המופיעה בצורה הבלתי מיוננת מושפעת בעיקרה מ pH ומטמפרטורת המים. ריכוז האמוניה הבלתי מיוננת גדל עם העלייה ב pH והעלייה בטמפרטורה. בתנאי מעבדה, ב pH 8 וטמפרטורה של 25°C , שינוי pH של 1.5% יגרום לשינוי של 30-24% בריכוז האמוניה הבלתי מיוננת. שינוי של 1.5% בטמפרטורה גורם לשינוי של 2-4% בריכוז האמוניה הבלתי מיוננת (Andersen and Buckley, 1998). גורמים נוספים להם השפעה על רעילות האמוניה לאורגניזמים הם: ריכוזים שונים של חמצן מומס (רעילות האמוניה גדלה עם הירידה בריכוז החמצן), שינויים בריכוז הפחמן הדו חמצני (עליה בריכוז פחמן דו חמצני גורמת לירידה בערכי pH, הגורמת להקטנת הפרקצייה הבלתי מיוננת ולכן לירידה ברעילות האמוניה) ותגובה סינרגיסטית או אדטיבית עם מזהמים אחרים (EPA, 1995). לחוזק היוני השפעה, אם כי קטנה יותר, על ריכוז האמוניה הבלתי מיוננת בתמיסה. ריכוז האמוניה הבלתי מיוננת קטן ככל שהחוזק

היוני גדל. עלייה במליחות ובקשיות המים מפחיתה מעט אך משמעותית את ריכוז ה- NH_3 (Emerson et al., 1975).

מרבית מבחני רעילות לאמוניה נערכו עד כה על דגים ומיעוטם על חסרי חוליות. בעקבות מחקרים אלו רווחת הסברה כי דגים רגישים יותר לאמוניה מאשר חסרי החוליות, אם כי אותם החוקרים מציינים כי עד אשר לא יבחנו חסרי חוליות נוספים יש להתייחס אל סברה זו בספקנות (Monda, 1995; Arthur et al., 1987). על מנת להגן על החברות האקולוגיות המאכלסות את הנחלים בארה"ב, נקבעו תקנים המתירים ריכוז של 0.02 מ"ג/ליטר אמוניה בלתי מיוננת.

נחושת

הנחושת היא מתכת בעלת פעילות וחשיבות ביולוגית בריכוזים נמוכים. מתכת זו מהווה חלק מהחלבון ההמוציאנין המשמש כפיגמנט נשימה בחסרי חוליות (Underwood, 1971). אולם, בריכוזים גבוהים מהנייל הנחושת רעילה (Mansilla et al., 1995; Xue et al., 1997; Hall et al., 1999). מגנון הרעילות העיקרי של נחושת באורגניזמים המאכלסים בתי גידול מימיים הוא פגיעה באוסמורגולציה, כתוצאה מהרס של משאבות הפועלות לחילוף יונים בשטח הפנים של שכבת האפיתל (Leland and Kuwabara, 1985). ישנן עדויות בדגים כי עם החשיפה לנחושת חלים שינויים במרכיבי הדם. כך למשל, מופיעה ירידה בריכוזי הכלורידים בפלסמה (Leland and Kuwabara, 1985). לאחר חשיפת צדפות לנחושת חלה עלייה ביוני סידן בתאי אפיתל הזימים (Viarengo et al., 1996), כתוצאה מפגיעה במשאבות היונים האחראית לחילוף ה- Ca^+/Na^+ . לכן, בנוסף לעלייה בריכוז הסידן בתאים, נפגע מפל הריכוזים האלקטרוכימי של הנתון. לאחר חשיפה לנחושת, תאי האפיתל בחילזון המים המתוקים *Biomphalaria glabrata* נראו מנופחים יחסית לביקורת וכן חלו שינויים היסטולוגיים בשטח הפנים של הרקמה (Leland and Kuwabara, 1985). באופן דומה גם Engel and Fowler (1979, מצוטט ב Leland and Kuwabara, 1985) and מדווחים על התנפחות של תאי האפיתל בסרטנים. Cheng and Sullivan (1977) דיווחו על ירידה באוסמולריות של ההמולימפה בחילזון המים *Biomphalaria glabrata*. עוצמת הרעילות של מתכות שונות מושפעת מיכולת האורגניזמים לקשור ולאגור מתכות אלו ולבצע דטוקסיפיקציה. במרבית בעלי החיים, עם החשיפה לנחושת, מופיעים חלבונים בעלי משקל מולקולרי נמוך בשם מתאלותיונין. למולקולות אלו יכולת לקשור נחושת, ולכן מסייעות בהפחתת רעילות הנחושת. מגנון אחר שנצפה בסרטנים הוא יצירת גרנולות (גרגרים) בהם נאגרת הנחושת באזור מסוים של מערכת העיכול (caeca) (Icely and Nott, 1980).

אורגניזמים אקוטיים רבים מסוגלים להפריש חלק מהמתכות שנספגו בסביבות מזוהמות ועל ידי כך לשמור על רמה נורמלית של המתכות בגוף. מאידך, Leland and Kuwabara (1985) טוענים כי יכולת זו נמוכה יחסית בצדפות וחלזונות. יתכן וזו הסיבה לשימוש בנחושת כחומר הדברה נגד רכיכות.

הנחושת חודרת למערכות מים ממקורות שונים, למשל צינורות נחושת, תעשייה, שימושי חקלאות שונים דוגמת טיפול במחלות צמחים וטיפולים כנגד אצות במים. חוקרים רבים טוענים כי צורות

שונות של הנחושת דוגמת יונים מומסים (Cu^{+2}) ולא כלל ריכוז הנחושת קובעים את הזמינות הביולוגית של הנחושת לאורגניזמים ולכן משפיעים על רעילותה (Xue et al, 1995; Mansilla- Rivera and Nriagu, 1999). גם תרכובות דוגמת CuOH^+ ו $\text{Cu}_2(\text{OH})_2^{+2}$ הן בעלות השפעות רעילות בתנאים שונים (Mansilla-Rivera and Nriagu, 1999). מצב החימצון העיקרי של הנחושת במים הוא דו ערכי (Cu^{+2}), יון זה מאוד ריאקטיבי ויוצר קומפלקסים ומשקעים עם חומרים אורגניים (למשל חומצות אמינו ומוצקים מרחפים) ואנאורגניים (למשל קרבונט, פוספט). אלקליניות ו pH הם הגורמים המרכזיים המשפיעים על הספציאציה של הנחושת בהעדר ליגנדים אחרים (EPA, 1990). ב pH של מערכות מים טבעיות (6-9.3) הקומפלקס הדומיננטי של הנחושת הוא $\text{Cu}(\text{CO}_3)^{-2}$ (Stumm and Morgan, 1970; Mansilla-Rivera and Nriagu, 1999).

ניטור ביולוגי

עד כה עיקר ניטור איכות המים בנחלי ישראל התבסס על מדדים כימיים ופיסיקליים של דגימות מים (Bar-Or, 2000). מדדים כדוגמת ריכוז חומר אורגני, ריכוזי מתכות, ריכוז חמצן ואמוניה שימשו ככלי להערכת איכות המים. אולם, לניטור הכימי מספר חסרונות:

1. הוא נותן תמונת מצב נקודתית במקום איסוף הדגימה.
2. הוא נותן תמונת מצב רגעית בזמן.
3. עלות הבדיקה עשויה להיות גבוהה.
4. הוא אינו מספק מידע על השפעת איכות המים על החי והצומח (אינו משקף למשל השפעות אדטיביות וסינרגיסטיות).

אפשרות אלטרנטיבית היא ניטור המערכת על ידי שימוש במינים אינדיקטוריים. בספרות, במקרים רבים אין הבחנה בין ניטור באמצעות מינים אינדיקטוריים biological indicators לבין biological monitoring. בעבודה הנוכחית מוגדר מין אינדיקטורי כמין שנוכחותו או היעדרותו מצביעים על תנאי בית הגידול ("בריאות המערכת"). לכל אורגניזם עמידות מוגבלת לעקות סביבתיות ולמזהמים שונים. בחשיפה קצרת טווח או בחשיפה לריכוזים נמוכים של מזהם יפעיל האורגניזם מנגנוני התמודדות שונים וישרוד. בחשיפה ארוכה יותר או לריכוזים גבוהים יותר יופיעו סימני עקה, עד אשר החשיפה תעבור ערך סף קריטי עימו לא יוכל האורגניזם להתמודד ויעלם מהמערכת (Phillips and Rainbow, 1994). בניגוד לניטור הביולוגי המבוסס על מעקב אחר שינויים בתגובות האורגניזם (מבניות או פונקציונליות), נוכחות או היעדרות של הביואינדיקטור מהווה סמן לערך הקריטי של המזהם או ערכים גבוהים ממנו. לאינדיקטור האידיאלי מספר תכונות (Johnson et al., 1992):

1. טקסונומיה ברורה וזיהוי פשוט, רצוי גם על ידי אנשים שאינם מומחים.
2. תפוצה רחבה אזורית או גלובלית המאפשרת השוואה בין בתי גידול במרחב גיאוגרפי רחב.
3. שפיעות גבוהה המאפשרת איסוף ודיגום נוחים.
4. וריאביליות גנטית צרה המפחיתה את שונות התגובה.
5. גודל גוף יחסית גדול המאפשר נוחות איסוף ובדיקה.

6. יכולת תנועה מוגבלת כך שייצג תנאים סביבתיים מקומיים.
 7. בעל רגישות נמוכה לשינויים טבעיים בתנאי הסביבה.
 8. משך חיים ארוך יחסית על מנת שישקף טווחי חשיפה ארוכים.
- כיום מקובל שימוש באורגניזמים שונים לניטור הסביבה המימית בניהם אצות, חסרי חוליות, דגים וזו חיים. ברכיכות נעשה שימוש רב מאחר והם נוחים לאיסוף, בעלי יכולת תנועה מוגבלת, גודל גוף גדול יחסית ומשך חיים ארוך (Keller and Lydy, 1997).

מבחני רעילות

אחת הדרכים המקובלות לבחינת השפעת תנאי בית הגידול על אורגניזמים היא מבחני רעילות (bioassays). מבחני הרעילות משמשים להערכת הריכוז ומשך החשיפה של החומר הנבדק הדרושים לגרימת אפקט מוגדר באורגניזם המבחן. ישנן שתי גישות עיקריות לביצוע מבחני הרעילות:

- א. בחינת הרעילות בתנאי מעבדה מבוקרים.
 - ב. בחינת רעילות בבית הגידול ע"י חשיפת האורגניזמים לתנאים במערכת (in situ).
- על פי הגישה הראשונה ניתן לחשוף את האורגניזמים לתמיסות הרעלן במספר מבחנים: א. מבחן מסוג Static test בו חומר המבחן מוסף למים בתחילת הניסוי לקבלת תנאי המבחן הרצויים, ב. מבחן מסוג Renewal test בו המבחן מתבצע במים עומדים, ללא זרימה, אולם תמיסות המבחן מוחלפות תקופתית וג. במבחן Flow-through test בו תמיסות המבחן מוזרמות אל כלי המבחן באופן רציף וריכוז החומר נשאר יחסית קבוע (Rand and Petrocelli, 1985).
- ניתן לחלק את מבחני הרעילות לפי זמן החשיפה. מבחני רעילות אקוטיים בוחנים את השפעת הרעלן על האורגניזמים לאחר חשיפה למשך זמן קצר יחסית (בדרך כלל עד 96 שעות) ומבחני רעילות כרוניים חושפים את האורגניזמים לריכוזים תת - ליטליים למשך זמן ארוך יותר. מאחר ומוות הוא מדד נוח לזיהוי, מבחני הרעילות הנפוצים ביותר בודקים את תמותה כתגובה למבחן. ניתן להגדיר תגובת השפעה שונה מתמותה כמו למשל איבוד שיווי משקל בדגים, או סגירת מכסה הקונכייה בחלזונות. תגובה זו מוגדרת כתגובת עקה (stress). במבחנים האקוטיים נהוג לחשוף את האורגניזמים לתמיסות המבחן לפרקי זמן של 96 שעות ולבחון את הריכוז הגורם למוות ב 50% מהאוכלוסייה שנבחנה. ערך מחושב זה נקרא $96h-LC_{50}$ (median lethal concentration). בבחינת תגובת עקה מחושב הריכוז האפקטיבי - $96h-EC_{50}$ (median effective concentration), (Rand and Petrocelli, 1985).

רעלן בוחן

אחת הבעיות של מבחנים ביולוגיים (bioassay) היא הצורך לאבחן את "המצב הבריאותי" (פיסיולוגי) של האוכלוסייה הנבחנת. אחד הקריטריונים לקביעת מצב בריאות האוכלוסייה הוא אחוז התמותה של אוכלוסיית המבחן במהלך תקופת האקלוס. מדד מהימן יותר הוא שימוש ברעלן בוחן reference toxicant לקביעת בריאות האוכלוסייה. רעלן בוחן הוא חומר שמטרתו

לקשר בין תגובת הרעילות של אוכלוסייה בזמן ומקום אחד לבין תגובת הרעילות של אוכלוסייה מאותו המין, בזמן ומקום אחר. במודל זה נחשפת אוכלוסיית המבחן תקופתית לרעלן הבוחן כנגד ציר זמן. תגובה יציבה (במרחב של עד 2 סטיות תקן מהממוצע) מעידה על יציבות פיסיוולוגית של האוכלוסייה, חריגה מטווח זה פוסלת את האוכלוסייה למבחן הביולוגי (Chapman, 2000).

לחומר בוחן אידיאלי מספר תכונות (Lee, 1980):

1. ניתן למדידה נוחה וזולה בתמיסות בריכוזים הרלוונטיים למבחן הביולוגי.
 2. רעילות בריכוזים נמוכים.
 3. גורם לתגובה מהירה.
 4. מנגנון רעילות לא ספציפי (רעיל הן לחסרי חוליות והן לדגים).
 5. חומר שקיים מידע על רעילותו ותכונותיו בתמיסה.
 6. חומר יציב בתמיסה מימית (לא נדיף, יציב מפני פירוק ביולוגי וכדומה) על מנת שריכוזו יישאר קבוע במערכת מבחן סטטית.
 7. בעל רעילות נמוכה לאדם.
- קשה למצוא חומר אחד העומד בכל הדרישות הנ"ל. במחקר הנוכחי בחנו את האפשרות של שימוש בגפרת הנחושת ($CuSO_4$) כרעלן בוחן. בנחושת נעשה שימוש רב במבחני רעילות, הוא מזוהה כחומר רעיל לאורגניזמים שונים בריכוזים נמוכים, ואינו מסוכן לאדם.

שחריר הנחלים

מבין הרכיכות הקיימים בארץ בחרתי לבחון את השימוש בחלזון מסוג שחריר הנחלים *Melanopsis* (*Gastropoda, Mesogastropoda, Thiaridae*) כביואינדיקטור. הסוג שחריר נפוץ סביב הים התיכון, ממצרי גיברלטר ועד מסופוטמיה. אוכלוסיות של שחריר מוצאים באופן מקוטע מזרם-מערב ספרד וצפון אפריקה ועד איטליה ויון, כולל קפריסין. גם באסיה ניתן למצוא את השחריר, פרט לאזורים המזרחיים לאנטליה, והחלק המזרחי של אירן (Glaubrecht, 1993).

שחריר הנחלים הוא חלזון המים המתוקים הנפוץ בנחלי ישראל (הלר, 1993), ניתן למצוא אוכלוסיות של שחרירים במקווי מים רבים מהגולן ועד ים המלח, מהבקעה ועד מישור החוף (אורטל, 1990; עבודה נוכחית). השחריר חי במגוון רחב של גופי מים הכוללים נחלים, מעיינות, אגמים, תעלות השקיה ומאגרים. הוא ניזון מחומר אורגני צמחי או אנימלי נרקב (תצפיות בעבודה הנוכחית; Mouahid at al., 1996). השחריר מתרבה ע"י הטלת קפסולות ביצים המודבקות בצדן התחתון של תשתיות אבניות, בשקעים או אזורים מוסתרים אחרים (נמצאו בשבי בלבד), או הטלת ביצים בודדות (נמצאו בטבע). יתכן כי לשחריר אסטרטגיות רבייה שונות המהוות התאמה לשינויים בתנאים כימיים פיסיקליים בגופי המים. הסבר חלופי הוא התאמת אסטרטגיית הרבייה להגנה מקסימלית על הביצים בבתי גידול שונים. בבית גידול עם מצע חולי מוטלות ביצים בהירות המוסוות היטב בקרקעית ואילו במצע אבני מוטלות מסות ביצים שנעטפות בחלקי סדימנט ודטריטוס המסווה את ההטלות על רקע הסלעים (Mouahid at al., 1996).

לסוג שחריר הנחלים פנוטיפים רבים של הקונכייה. וריאביליות זו הובילה במהלך השנים לאי יציבות בסיסטמטיקה של השחריר (Glaubrecht, 1993). הסוג *Melanopsis* הוגדר לראשונה על ידי Olivier (1801 מצוטט ב Heller at al., 1999) שתיאר 2 מינים: *M. costata* - בעלי קונכייה מצולעת ו *M. buccinoidea* - בעלי קונכייה חלקה. מאז Olivier החלו חוקרים רבים למצוא ולהגדיר מינים חדשים של שחרירים, בניהם Bourguignat (1884 מצוטט ב Heller at al., 1999) שחילק את הסוג שחריר סביב הים התיכון ל 93 מינים. Tchernov (1975) טוען כי הוריאביליות מקורה במגוון אקוטופים רב, וכל השחרירים סביב הים התיכון שייכים למעשה לאותו המין *M. praemorsum*. חילוקי הדעות באשר לסיסטמטיקה של השחריר עדיין קיימים. בתחילת המחקר בחרנו בסיסטמטיקה המחלקת את השחרירים בישראל ל 5 מינים: *M. saulcyi*, *M. buccinoidea*, *M. costata*, *M. eremita* ו *M. cerithiopsis* (מיניס ואורטל, 1994). בהמשך המחקר הותאמה הסיסטמטיקה לעדכון של Mienis and Ortal (2001) ומיניס (מידע בע"פ) ונקבע כי: *M. saulcyi*: אינו מין בפני עצמו, אלא היבריד של המינים *M. buccinoidea* ו *M. costata* וכן הוגדר מין נוסף: *Melanopsis lampara*. סיסטמטיקה זו מאפשרת הגדרה של מרבית אוכלוסיות השחריר בארץ. מאחר ואוכלוסיות נחל תנינים טרם הוגדרה על ידי מיניס ואורטל היא מכונה בעבודה זו *Melanopsis* sp. חמישה מיני השחריר וטיפוס המוגדר כב-כלאיים, שנאספו באתרי המחקר ואתרים נוספים מוצגים באיור 1.1.

השערת העבודה

השערת המחקר היא כי שחריר הנחלים הנעדר מקטעי נחל מזוהמים רגיש לזיהום מים. לכן צפוי כי ירידה באיכות מים, כתוצאה מזיהום, תגרום לתמותה והעלמות של פרטים. ניטור של שינויים בתגובת שחריר הנחלים תוכל לשמש כאינדיקטור לשינויים באיכות המים. מבין מרכיבי הזיהום בנחלים האמוניה, שהוא תוצר פירוק חומר אורגני, רעיל ביותר למאכלסי מים ומהווה מרכיב מרכזי. לכן, צפוי שהוא תורם עיקרי להפרעה אקולוגית הנגרמת על ידי זיהום זה ולפגיעה באוכלוסיות השחריר. הרגישות לאמוניה צפויה להשתנות עם שינוי במרכיבי איכות מים נוספים (למשל ריכוז חמצן מומס).

2. שיטות

2.1 תפוצה ודינמיקה של אוכלוסיות שחריר הנחלים

נבחנו נוכחות אוכלוסיות שחרירים בטבע במחזור שנתי והרכב האוכלוסייה (גיל/גודל).

2.1.1 תפוצת שחריר הנחלים

תפוצה ארצית של שחריר הנחלים נקבעה בעיקר על נתוני ספרות (אורטל 1990, Heller et al 1999), ובמידה מוגבלת מבדיקות בנחלים נבחרים.

2.1.2 דינמיקה ומבנה אוכלוסיות השחריר

שינויים בצפיפות וגודל הפרטים של שחריר הנחלים נבדקו מדי חודש במהלך 2000-2001, בנחלים תנינים וסעדיה. בנחל תנינים נבדקה אוכלוסייה במעיין הנובע בגדה הדרומית, כ 100 מטר במורד לסכר הרומי. האתר כולל נביעה פעילה וערוץ קטן הזורם אל הנחל. התשתית טינית, סביב הנביעה צמחייה צפופה של אשלים (איור מספר 2.1.1). נתונים על משתנים נבחרים של איכות מים באתר מסוכמים בטבלה 2.1.1. מפרט רחב יותר של מדדי מים (Kafri et al., 2001) מסוכם בנספח 1.

Table 2.1.1: Selected water quality variables (dissolved oxygen, conductivity, salinity and temperature) measured in Tanninim stream at different dates (oxygen-conductivity meter YSI 85)

Date	D.O. (%saturation)	D.O. (mg/l)	Conductivity ($\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C)	Salinity (ppt)	Temperature (°C)
16/01/00	34	2.8	4848	2.6	21
22/02/00	19	1.62	4874	2.6	22
24/03/00	10	0.85	4911	2.6	22.2
27/04/00	16.6	1.35	4900	2.6	
23/05/00	22.5	1.74	4002		
26/06/00	24.8	2.02	5030	2.7	25.2
27/07/00	33.6	2.65	5000	2.7	25.5
26/10/00		4.8	4600	2.7	24.5
18/12/00	25.5	2.3	4920	2.6	
31/01/01	35	0.95	5070	2.7	21.3
20/02/01			4898	2.6	
26/03/01	22.1	1.83	5090	2.7	23.3
30/04/01	17.7	1.55	5100	2.7	22.5
30/05/01	33	2.8	5140	2.8	24.8

בנחל סעדיה (מקורו מדרום לצומת הציק-פוסט) נבדקה אוכלוסייה במעלה הערוץ, כ - 5 מטר צפונה ממסילת הרכבת שלאורך רחוב ההסתדרות בחיפה. התשתית אבנית, וקטע קצר של תעלה יצוקה בטון עם אבנים פזורות ובהמשך תשתית טינית. באתר מזדקרת צמחיית מים הכוללת בעיקר קנה, גומא הפרקים וסמר. בגדות צומח בעיקר טיון דביק (איור 2.1.2). נתונים על משתנים נבחרים של איכות מים באתר סעדיה מסוכמים בטבלה 2.1.2. מפרט רחב יותר של נתונים מפורט בנספח 1.

Table 2.1.2: Selected water quality variables (dissolved oxygen, conductivity, salinity and temperature) measured in Seadia stream at different dates (oxygen-conductivity meter YSI 85)

Date	D.O. (%saturation)	D.O. (mg/l)	conductivity ($\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C)	Salinity (ppt)	Temperature ($^\circ\text{C}$)
03/12/99	65	5.65	2092	1.1	21.4
16/01/00	59.6	5.24	1950	1	21.1
22/02/00	60	5.26	2300	1.2	21.2
24/03/00	40.5	3.57	2325	1.2	21.2
27/04/00	66.2	5.7	2352	1.2	
23/05/00	67.5	5.92			21.5
26/06/00	66.4	5.83	2150	1.1	21.6
27/07/00	70.6	5.86	2164	1.1	21.8
28/08/00	65.7	5.63	2142	1.1	22
26/10/00				1	21
18/12/00	59	5.17	2115	1.1	21.2
08/01/01	63	5.55	2245	1.2	21.3
20/02/01	66	5.82	2344	1.2	21.1
26/03/01	75.8	6.62	2557	1.3	21.6
30/04/01	65.6	6.18	2278	1.2	21.7
30/05/01	66.6	5.8	2288	1.2	21.5

דיגום לקביעת צפיפות והרכב גדלים באוכלוסייה

1. האוכלוסייה הגדמת נאספה באמצעות דוגם גלעין בקוטר 13 ס"מ (שטח 132.7 סמ"ר), עומק הדגימה כ 5 ס"מ. כל דגימה כללה 3 תת-דגימות גלעין, שה"כ נלקחו 10 דגימות בכל אתר.

- .2 דגימות הסדימנט עם השחרירים הועברו לרשת בגודל נקבים של 200μ וסוננו על מנת להרחיק את הסדימנט.
- .3 הדגימה המסוננת הועברה לצנצנת זכוכית בנפח 720 מ"ל שמולאה במים מהאתר.
- .4 הדגימות הועברו למעבדה בציננית. בחודשי הקיץ הוסף לציננית קרח על מנת לשמור על טמפרטורה נמוכה.
- .5 עוד ביום הדיגום הועברו הדגימות לכלי פלסטיק (מידות: 22, 17.5, 8 ס"מ). על מנת להפריד את החלזונות מהסדימנט הוחזקו החלזונות בכלים כ 30 דקות (לשחרירים נטייה לעלות לפני השטח של הסדימנט ולטפס על דפנות הכלי). השחרירים נאספו לצנצנת עם מי ברז מאווררים.
- .6 אורך הקונכייה של הפרטים הגדולים מ 5 מ"מ נמדד בקליבר דיגיטלי ומספר השחרירים בדגימה נספר.
- .7 מבחן ANOVA בוצע לבחינת השונות בין ממוצע אורך הקונכייה והצפיפות הפרטים בין הדיגומים בכל אתר.
- .8 מבחן אפוסטריורי בוצע לקביעת השוני בין תאריכי הדיגום.



Figure 2.1.1: Spring flow near Tanninim stream (100 m downstream of the Roman bridge).



Figure 2.1.2: Sampling site in Seadia stream

2.2 רעילות נחושת לחילזון שחריר הנחלים

2.2.1 בחינת מערכת הניסוי

א. מבחנים סטטיים במי ברז

בדיקה זו נועדה לבחון אפשרות של עריכת המבחנים הביולוגיים במי ברז מאווררים. היתרון בשימוש במי ברז הוא שאין צורך בהבאת מים מבית הגידול. לצורך זה הופחתה המליחות של מי הנחל בהדרגה, במהלך אקלום האוכלוסיות, בקצב של 200 יחידות מוליכות חשמלית ב 48 שעות ($200\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C), עד למוליכות חשמלית של מי ברז ($1000\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C).

אקלום האוכלוסייה

1. אוכלוסיות של שחרירים נאספו במעלה נחל סעדיה ובמורד נחל תנינים.
2. במעבדה הוחזקו החלזונות באקווריומים בנפח של כ- 53 ליטר, שמולאו ב כ- 40 ליטר במים שנאספו בבית הגידול. המים סוננו באמצעות פילטר (millenium 2000) ואווררו.
3. אחת ליומיים –שלושה הואכלו החלזונות בעלי חסה טריים, גזר או תפוחי עץ.
4. אחת ליומיים נמהלו המים במי ברז שאווררו לפחות 72 שעות והמוליכות החשמלית הורדה בהדרגה.
5. בתום האקלום הועברו החלזונות למכלי פלסטיק בנפח 140 ליטר (מידות בסיס 70*50 ס"מ גובה 40 ס"מ), שמולאו ב כ 100 ליטר מי ברז. המכלים ממוקמים מחוץ למעבדה, הקרקעית רופדה באבנים וענפים והמים סוננו באופן קבוע בפילטר (millenium 2000) ואווררו.

מהלך הניסוי

1. ריכוזי הנחושת הוכנו על ידי הוספת נפח מתאים מתמיסת אם של נחושת גפרתית בריכוז 0.1 מ"ג/ליטר למי ברז מאווררים, לקבלת ריכוזי הנחושת הרצויים. מי ברז מאווררים שימשו לביקורת.
2. ממכלי הגידול הוצאו פרטים פעילים (אופרקולום פתוח וצמודים למצע) הגדולים מ 14 מ"מ. לאפיון גודל הפרטים באוכלוסיות המבחן נבחר מדגם באופן אקראי ונמדד אורך הקונכייה בעזרת קליבר דיגיטלי.
3. על מנת לפזר את החלזונות באופן שווה בצנצנות המבחן פוזרו החלזונות תחילה לצלוחיות פטרי עד שהושלם המספר הנדרש (25-15 פרטים לצלוחיות).
4. מכל צלוחית נאספו החלזונות והוכנסו לסלסילת רשת מפלסטיק (גודל נקבים 2 מ"מ), שהוכנסה לאחת מצנצנות הניסוי. רשת זו נועדה למנוע מהשחרירים לטפס על דופן הכלי מחוץ למים. המים בצנצנות אווררו. השחרירים נחשפו לתמיסות המבחן למשך 96 שעות.
5. לאחר חשיפת החלזונות לתמיסות המבחן, הועברו הסלסילות עם השחרירים לצנצנות זכוכית זהות עם מי ביקורת (מי ברז מאווררים, ללא נחושת) להתאוששות של 24 שעות.
6. בתום תקופת ההתאוששות הוצאו החלזונות מהסלסילות, הועברו לצלוחיות פטרי מזכוכית למשך 30 דקות שבסופן הוגדר מצב החלזונות כ"בלתי מושפעים" - חלזונות שפתחו

אופרקולום ונצמדו למצע ו "תחת השפעה" (stressed) - חלזונות שלא פתחו אופרקולום או בעלי אופרקולום פתוח אולם אינם מצליחים להיצמד למצע. תגובה זו הוגדרה כתגובה אפקטיבית.

7. ערכי רגישות $96h-EC_{50}$ חושבו לכל ניסוי על ידי שימוש בתכנת probit (EPA, Version 1.5).

ב. בחינת קשר גודל השחרירים ורגישותם לנחושת

ניסוי זה נועד לבדוק האם קיים מתאם בין רגישות שחרירים לנחושת (ערכי $96h-EC_{50}$) לבין גודל השחרירים.

איסוף החלזונות ואקלום

1. ב 28/09/00 נאספו אוכלוסיות שחרירים במעלה נחל סעדיה ובמורד נחל תנינים והועברו בנפרד למעבדה.

2. האוכלוסיות אוקלמו על פי הפרוטוקול המפורט בסעיף 2.2.1 (אקלום האוכלוסייה, סעיפי משנה 2-4)

הכנת הניסוי

1. ב 17/10/00 נבחרו מכל אוכלוסייה שחרירים פעילים (אופרקולום פתוח וצמודים למצע). כל אוכלוסייה נחלקה לשתי קבוצות גודל על פי הערכה. לביסוס החלוקה לגדלים נבחרו מכל קבוצת גודל 48 פרטים באופן אקראי ואורכם נמדד בקליבר דיגיטלי. מבחן סטטיסטי ANOVA בוצע לביסוס הבדלי הגדלים (טבלה 2.2.1).

Table 2.2.1: Mean and SD of the size groups of *Melanopsis* from Tanninim and Seadia (ANOVA).

size	Seadia stream		Tanninim stream	
	large	small	large	small
Mean (mm)	18.3	14.5	19.3	14.7
SD (mm)	1.7	0.8	1.9	1.3
P value	0.001>P		0.001>P	

2. הניסוי נערך בצנצנות זכוכית בגנח 1.5 ליטר, הצנצנות מולאו ב 1 ליטר מי ביקורת (מי ברז מאווררים). עבור כל קבוצת גודל הוכנו 2 ריכוזי נחושת, 0.1 ו 0.25 מ"ג/ליטר מתמיסת אס של גפרת הנחושת בריכוז 0.1 מ"ג/ליטר. לכל קבוצת גודל, בכל ריכוז בוצעו 3 חזרות.

3. על מנת לחלק את החלזונות בצנצנות המבחן באופן שווה, נבחרו מכל אוכלוסייה ובכל קבוצת גודל פרטים פעילים (צמודים למצע ונעים) והועברו באופן פרטני לצלוחיות פטרי עד ל- 20 פרטים לצלוחית.

4. מכל צלוחית נאספו הפרטים, הוכנסו לסלסילות רשת מפלסטיק (גודל נקבים 2 מ"מ) שהוכנסה לצנצנת הניסוי המתאימה. המים בצנצנות אווררו. השחרירים נחשפו לתמיסות המבחן למשך 96 שעות.
5. להתאוששות וקביעת ריכוז הנחושת האפקטיבי ראה סעיף 2.2.1 (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 5-7)

2.2.2 השפעת תהליך האקלום על רגישות שחריר לנחושת

מטרת ניסויים אלו היא בחינה של מערכת ניסוי לבדיקת רגישות החלזון שחריר הנחלים לגפרת הנחושת, והיישום של שימוש בגפרת הנחושת כ"רעלן בוחן". עבור כל המבחנים הביולוגים הועברו האוכלוסיות מבית הגידול למעבדה במכלי פלסטיק בנפח 25 ליטר ביום הדיגום.

א. בחינת השפעת תהליך האקלום

בדיקה זו נועדה לבחון את השפעת תהליך האקלום למי ברז על רגישות החלזונות לנחושת. בניסוי זה נבחנו ערכי רגישות של חלזונות שאוקלמו למוליכות חשמלית של מי ברז ונבחנו במי ברז לבין חלזונות שהוחזקו במי נחל ונבחנו במי הנחל.

איסוף החלזונות ואקלום

1. ב - 17/12/00 נאספה אוכלוסיית שחרירים ממעלה נחל סעדיה והובאה למעבדה.
2. במעבדה חולקה האוכלוסייה ל 2 אקווריומים זהים בנפח 52.5 ליטר, שמולאו בכ- 40 ליטר במים שנאספו בבית הגידול. המים סוננו בפילטר (Millenium 2000) ואווררו. האוכלוסיות הואכלו בעלי חסה טריים במינון זהה.
3. באחד האקווריומים נמהלו מי הנחל אחת ליומיים-שלושה במי ברז שאווררו 72 שעות, בקצב של 200 יחידות מוליכות ב 48 שעות ($200\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C), עד למוליכות חשמלית של מי ברז ($\sim 1000\mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C).

מהלך הניסוי

1. הניסוי בוצע בצנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר, שמולאו ב 1 ליטר במדיום הרצוי: מי ברז או מי נחל. עבור כל טיפול - אקלום-למי ברז וללא אקלום למי ברז, בוצעו 3 חזרות (בכל חזרה ביקורת ללא נחושת + 5 ריכוזי נחושת שונים). תמיסות הנחושת הוכנו על ידי הוספת נפח מתאים מתמיסת אם של נחושת גפרתית לקבלת הריכוזים הרצויים.
2. על מנת לפזר את החלזונות באופן שווה בצנצנות המבחן פוזרו החלזונות תחילה לצלוחיות פטרי עד שהושלם המספר הנדרש (15-20 פרטים לצלוחית).
3. מכל צלוחית נאספו החלזונות, הועברו לסלסילות רשת מפלסטיק (גודל נקבים 2 מ"מ) והוכנסו לאחת מצנצנות הניסוי. שחרירים שאוקלמו למי ברז, הוכנסו לצנצנות המבחן שהוכנו במי ברז. שחרירים שלא אוקלמו למי ברז ונשמרו במי נחל סעדיה, הוכנסו לצנצנות

המבחן שהוכנו במי נחל סעדיה. המים בצנצנות אווררו. השחרירים נחשפו לתמיסות המבחן למשך 96 שעות.

4. בתום החשיפה הועברו כל החלזונות להתאוששות למשך 24 שעות בצנצנות זכוכית זהות: חלזונות שעברו אקלוס הועברו להתאוששות במי ברז מאווררים וחלזונות ללא אקלוס הועברו להתאוששות במי נחל סעדיה מאווררים.

5. התאוששות וקביעת התגובה ראה סעיף 2.2.1 (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 6-7)

6. אנליזה סטטיסטית (ANOVA) בוצעה לבחינת ההבדל בערכי הרגישות (EC_{50} -96h) בין שני הטיפולים.

ב. רגישות לנחושת במבחנים סטטיים במי ברז מותאמים למוליכות חשמלית של מי המקור

מטרתו של ניסוי זה היא בחינת האפשרות של עריכת מבחני רעילות במי ברז בעלי מוליכות חשמלית זהה לזו של מי הנחל כתחליף למי הנחל.

ניסוי זה בוצע פעמיים: הניסוי הראשון בוצע במלח (Instant ocean (Aquatic System). הניסוי השני במלח מסוג Sigma שאיכותו ועלותו גבוהים יותר.

איסוף החלזונות ואקלוס

1. בניסוי הראשון נאספה אוכלוסיית שחרירים ממעלה נחל סעדיה ב 31/01/01, בניסוי השני נאספה אוכלוסייה באותו אתר ב- 30/04/01. בכל תאריך נאספו מים מהנחל למבחן הביולוגי.

2. במעבדה הוחזקה כל אוכלוסייה באקווריום בנפח כ- 52.5 ליטר, שמולא בכ - 40 ליטר במים שהובאו מבית הגידול. המים באקווריום סוננו בפילטר (Millenium 2000) ואווררו. באם נמצא כי המוליכות החשמלית עלתה (כתוצאה מנידוף) נמהלו המים במים מזוקקים להחזרים למוליכות החשמלית של מי הנחל.

מהלך הניסוי

1. הוכנו צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר. עבור כל טיפול - רגישות לנחושת במי ברז במוליכות מי המקור ובמי המקור בוצעו 3 חזרות (בכל חזרה בקרה ללא נחושת + 5 ריכוזי נחושת שונים). ריכוזי הנחושת הוכנו על ידי מילוי הצנצנות ב 1 ליטר מי ברז במוליכות מי המקור או מי הנחל, בתאמה, והוספת נפח מתאים מתמיסת אם של נחושת גפרתית עד לקבלת הריכוזים הרצויים.

2. להמשך העמדת הניסוי ראה סעיף 2.2.1. (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 2-4).

3. לאחר חשיפת החלזונות לתמיסות המבחן, הועברו השחרירים לצנצנות זכוכית זהות עם מי ביקורת (מי ברז במוליכות חשמלית זהה למי המקור או מי המקור) להתאוששות למשך 24 שעות נוספות.

4. להתאוששות וקביעת השפעת הנחושת ראה סעיף 2.2.1. (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 6-7).

5. מבחן ANOVA בוצע לקביעת הבדל ברגישות השחרירים לנחושת בין שני הטיפולים.

- ג. בחינת השפעת הורדת המליחות והשבתה למליחות מי המקור על רגישות שחרירים לנחשת**
 מטרתו של ניסוי זה היא בחינת השפעת שינויי מוליכות חשמלית על רגישות שחריר הנחלים לנחשת. בניסוי זה נבחנה רגישותם של שחרירים לנחשת בטיפול אקלוס שונים:
- I. החזקה במי נחל (יום אחד) וביצוע המבחן במי ברז במוליכות זהה למי המקור.
 - II. אקלוס למוליכות חשמלית של מי ברז בקצב של 200 יחידות מוליכות חשמלית ב 48 שעות (במשך שבועיים) ובחינת רגישות החלזונות לנחשת במי ברז.
 - III. אקלוס אוכלוסייה מסעיף II למליחות מי המקור בקצב של 200 יחידות מוליכות חשמלית ב 48 שעות (במשך שבועיים) ובחינת החלזונות במי ברז במוליכות מי המקור.
 - IV. החזקת האוכלוסייה במי הנחל (4 שבועות) ובחינה במי ברז במוליכות הזוהה למי המקור.

איסוף האוכלוסייה ואקלוס

1. ב 20/02/01 נאספה אוכלוסייה של שחרירים ממעלה נחל סעדיה והובאה למעבדה. במיכל זומה נאספו מים מבית הגידול. טרם איסוף האוכלוסייה נמדדה המוליכות החשמלית של מי הנחל בעזרת אלקטרודה YSI 85 oxygen-conductivity meter.
2. במעבדה חולקה האוכלוסייה ל 2 אקווריומים בנפח 52.5 ליטר, שמולאו בכ - 40 ליטר במי בית הגידול. בשני האקווריומים סוננו המים בפילטר (millenium 2000) ואווררו. שתי האוכלוסיות הואכלו בעלי חסה טריים במינון זהה.
3. באחד האקווריומים נמהלו מי הנחל אחת ליומיים - שלושה במי ברז. שאווררו כ 72 שעות. המוליכות החשמלית הורדה בכ- $200 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C עד הגיעה המוליכות החשמלית של המים למוליכות חשמלית של מי ברז ($1000 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C).
4. בתום האקלוס למי ברז נעשה תהליך אקלוס חוזר למליחות מי המקור על ידי הוספה של מלח מסוג Instant ocean בקצב של כ- $200 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C אחת ליומיים.

I. אקלוס במי נחל (יום אחד) וביצוע המבחן במי ברז במוליכות זהה למי המקור

1. צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר מולאו ב 1 ליטר מי ברז במוליכות מי המקור. לקבלת ריכוזי הנחשת הרצויים הוסף נפח מתאים מתמיסת אס של נחשת גפרתית בריכוז 0.1 מ"ג/ליטר. הוכנו 3 חזרות (בקרה ללא נחשת + 5 ריכוזי נחשת שונים).
2. להמשך העמדת הניסוי ראה סעיף 2.2.1. (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 2-4).
3. לאחר חשיפת החלזונות לתמיסות המבחן למשך 96 שעות הועברו השחרירים לצנצנות זכוכית זהות עם מי ביקורת (מי ברז במוליכות מי המקור) להתאוששות של 24 שעות.
4. להתאוששות וקביעת השפעת הנחשת ראה סעיף 2.2.1. (מהלך הניסוי, סעיפי משנה 6-7).

II. אקלום למוליכות חשמלית של מי ברז בקצב של 200 יחידות מוליכות ב 48 שעות (שבועיים)

ובחינת החלזונות במי ברז

1. צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר ומולאו ב 1 ליטר מי ברז מאווררים. הוכנו 3 חזרות (עבור כל חזרה בקרה אחת ללא נחושת + 5 ריכוזי נחושת שונים). ריכוזי נחושת הוכנו על ידי הוספת נפח מתאים מתמיסת אם של נחושת גופרתית בריכוז 0.1 מ"ג/ליטר.
2. נבחרו חלזונות שעברו אקלום למליחות של מי הנחל. על מנת לפזר את החלזונות באופן שווה בצנצנות המבחן פוזרו החלזונות תחילה לצלוחיות פטרי עד למספר הנדרש (20 פרטים).
3. המשך הניסוי ראה סעיף 2.2.1. (מהלך הניסוי 4-7)

III. אקלום אוכלוסייה מסעיף II למליחות מי המקור בקצב של 200 יחידות מוליכות ב 48 שעות

(סה"כ 4 שבועות) ובחינת החלזונות במי ברז במוליכות מי המקור

1. העמדת הניסוי זהה לניסוי בחלק I.

IV. אקלום האוכלוסייה במי הנחל (4 שבועות) ובחינה במי ברז במוליכות הזהה למי המקור.

1. העמדת הניסוי זהה לניסוי בחלק I.

2.2.3 בחינת הגורמים הכימיים המשפיעים על דינמיקת הנחושת במבחן סטטי

א. בדיקת השפעת מדיום התמיסה על שקיעת הנחושת

מטרתו של ניסוי זה היא השוואה של דינמיקת הנחושת בתמיסות מים שונות.

מחלך הניסוי

1. נלקחו צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר ומולאו ב 1 ליטר מהמדיום הבא:
 - מים מזוקקים (מוליכות חשמלית $5.3 \mu\text{mho/cm}^2$ at 25°C)
 - מי ברז (מוליכות חשמלית $1179 \mu\text{mho/cm}^2$ at 25°C)
 - מי ברז בתוספת מלחים (מוליכות חשמלית $2427 \mu\text{mho/cm}^2$ at 25°C)
 - מים מזוקקים בתוספת מלחים (מוליכות חשמלית $2368 \mu\text{mho/cm}^2$ at 25°C)עבור כל מדיום הוכנו 3 חזרות.
2. המוליכות החשמלית נקראה ב אלקטרודה YSI 85 oxygen-conductivity meter. נמדד ה pH של המדיומים השונים (Orion 710A).

3. בכל צנצנות הוכן ריכוז של 1 מ"ג/ליטר מתמיסת אס של נחושת גפרתית. ריכוזי הנחושת בכל הצנצנות נמדדו על ידי קולורימטר (HACH DR/890, זיוק הקולורימטר נבדק בהשוואה לבדיקת ICP, ראה סעיף 2.2.5)
4. המיס בכל הצנצנות אווררו על ידי אבן אוורור רגילה (גירית).
5. ריכוזי הנחושת נקראו בזמנים שונים: 0, 15, 23, 35, 64 ו 85 שעות.

ב. בחינת השפעת מרכיבי ניסוי שונים על דעיכת ריכוז הנחושת

מטרתו של ניסוי זה היא בחינת הדינמיקה של ריכוז הנחושת במערכת ניסוי סטטית והבנת ההשפעה של מרכיבי ניסוי שונים (אוורור, אבני אוורור) על התנהגות הנחושת.

הכנת הניסוי

1. צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר מולאו ב 1 ליטר מי ברז מאווררים בתוספת מלח מסוג Sigma (מוליכות חשמלית $2300 \mu\text{mho}/\text{cm}^2$ at 25°C). ריכוז הנחושת הרצוי הוכן על ידי הוספת תמיסת אס של נחושת גופרתית לקבלת הריכוז הרצוי. לצנצנות הוכנסו מרכיבי ניסוי שונים:
 - ב 6 צנצנות אווררו המיס על ידי צינור ואבן אוורור רגילה.
 - ב 6 צנצנות אווררו המיס בצינור פלסטי מחורר.
 - ב 6 צנצנות לא הופעל אוורור, אולם הוכנסה אבן אוורור.
 - ב 6 צנצנות לא אווררו.
2. ריכוז הנחושת ב 3 צנצנות מכל טיפול נמדד בקולורימטר (HACH DR/890, ריאגנט Vs.2- המותאם למיס קשים), אחת למספר שעות.
3. כעבור 96 שעות נלקחו 12 הצנצנות מהן לא הוצאו מיס (3 מכל טיפול). הצינורות ואבני האוורור הוצאו, וריכוזי הנחושת נקראו בקולורימטר (HACH DR/890, ריאגנט Vs.2). על ידי הוספת חומצה חנקתית הורד pH של התמיסה ל 5-6 וריכוז הנחושת נקרא בשנית.

2.2.4 מבחני רעילות ביולוגיים עם חידוש מדיום

א. רעילות נחושת - שיטת renewal

מטרת ניסויים אלו היא בחינת רגישות אוכלוסיות שונות של שחריר הנחלים לנחושת במערכת ניסויי בשיטת ה renewal. במבחן זה הוחלפו תמיסות המבחן אחת ל - 24 שעות. איסוף האורגניזמים האקלום.

1. אוכלוסיות שחריר נאספו מבתי הגידול הבאים:

מעלה נחל סעדיה - *Melanopsis lampra*

נחל תנינים, מעלה הסכר הרומי - *Melanopsis sp.*

עיינות צוקים (נחל מרכזי) - *Melanopsis buccinoidea*

כנרת חוף צנברי - *Melanopsis costata*

2. במעבדה הוכנסו החלזונות לפלאסונים בנפח של כ 108 ליטר (מידות בסיס 42*60 ס"מ, גובה 43 ס"מ), שמולאו בכ - 85 ליטר במים שנאספו בבית הגידול. המוליכות החשמלית של המים נמדדה אחת לכ - שלושה ימים. באם המוליכות החשמלית עלתה (כתוצאה מנידוף של המים) נמהלו המים ע"י הוספת מים מזוקקים. הקרקעית רופדה באבנים והמים סוננו בפילטר (millenium 2000) ואווררו. החלזונות שהו במכלים לפחות שבוע אחד לפני הניסוי ולכל היותר שבועיים. הפלסונים הוצבו בחדר בו נערכו ניסויי הרעילות (תנאי פוטופריודה: 12 שעות אור, 12 שעות חשכה) בכל יום נערך מעקב אחר האוכלוסייה, באם נראתה תמותה חריגה לא נעשה שימוש באותה אוכלוסייה לניסויים. אחת ליומיים-שלושה הואכלו החלזונות בעלי חסה טריים, תפוחי - עץ או גזר.

הכנת הניסוי

1. לביצוע הניסוי הוכנו צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר ומולאו ב 1 ליטר מי ביקורת (מי ברז מאווררים במוליכות חשמלית של מי המקור, המוליכות החשמלית הועלתה על ידי שימוש במלח Instant ocean או Sigma). בכל ניסוי הועמדו 3 חזרות (בכל חזרה צנצנת בקרה ללא נחושת + 5 ריכוזי נחושת שונים). תמיסות המבחן הוכנו על ידי הוספת נפח מתאים של תמיסת אם נחושת גפרתית. ריכוזי הנחושת באחת החזרות (6 צנצנות) נקראו בעזרת קולורימטר (HACH DR/890, וריאגנט לנחושת Vs.2).
2. מתוך מיכל הגידול הוצאו פרטים שנראו פעילים (צמודים למצע ונעים). השחרירים נבחרו באופן פרטני והועברו לצלוחיות פטרי, 15-20 לצלוחית. מכל צלוחית נאספו החלזונות והוכנסו לסלסילת רשת מפלסטיק (גודל נקבים 2 מ"מ). הסלסילה הוכנסה לאחת מצנצנות המבחן. צנצנות המבחן אווררו על ידי שימוש בצינור פלסטי מחורר (הצינור נאטם בקצהו בחום וחורר כ 2 ס"מ במחט דקה).
3. אחת ל 24 ± 1 שעות הוכנו תמיסות נחושת טריות זהות לריכוזי המבחן. ריכוזי הנחושת נמדדו באחת החזרות (6 צנצנות) בעזרת הקולורימטר. הסלסילות הועברו מתמיסה ישנה לתמיסת הנחושת הטרייה מידי 24 שעות.
4. בתום 96 שעות הועברו השחרירים לצנצנות זכוכית זהות עם מי ביקורת לשם התאוששות של 24 שעות.
5. בתום ההתאוששות הוצאו החלזונות מהסלים והוכנסו לצלוחיות פטרי ל 30 דקות שבסופן הוגדר סטטוס החלזונות כ "בלתי מושפעים" - פרטים שפתחו אופרקולום, נצמדו למצע, הוציאו מחושים והחלו לנוע או "תחת השפעה" - חלזונות שנתרו עם אופרקולום סגור או פתחו אופרקולום אך לא הצליחו להסתובב ולהיצמד למצע.
6. חישוב ערך $96h-EC_{50}$ בוצע בעזרת תכנת probit (EPA, probit version 1.5).

2.2.5 בדיקת דיוק מדידות הנחושת באמצעות קולורימטר

בניסוי נמדדו הריכוזים של אותן תמיסות נחושת על ידי קולורימטר (HACH/DR-890) ועל ידי ICP-AES (Inductively Coupled Plasma—Atomic Emission Spectrometer), הבדיקה בוצעה על ידי, בפקולטה לחקלאות, ברחובות.
הכנת הדגימות:

1. 11 צנצנות זכוכית בנפח 1.5 ליטר מולאו ב 1 ליטר מים מזוקקים.
2. ריכוזי נחושת הוכנו על ידי הוספת נפח מתאים מתמיסת מוצא של 0.1 מ"ג/ליטר נחושת גפרתית.
3. ריכוזי נחושת נקראו במעבדה בקולורימטר (HACH DR/890), וראגינט לנחושת Vs.1 - מותאם למים רכים).
4. עבור קריאות ב ICP הוכנסו 19.5 מ"ל מכל תמיסה לבקבוקי סנטימציה בנפח 25 מ"ל. הנפח הושלם ל 20 מ"ל על ידי הוספת 0.5 מ"ל חומצה חנקתית.

קיים יחס ישר משמעותי בין קריאות ריכוזי הנחושת על ידי הקולורימטר ומכשיר ה ICP-AES (איור 2.2.1).

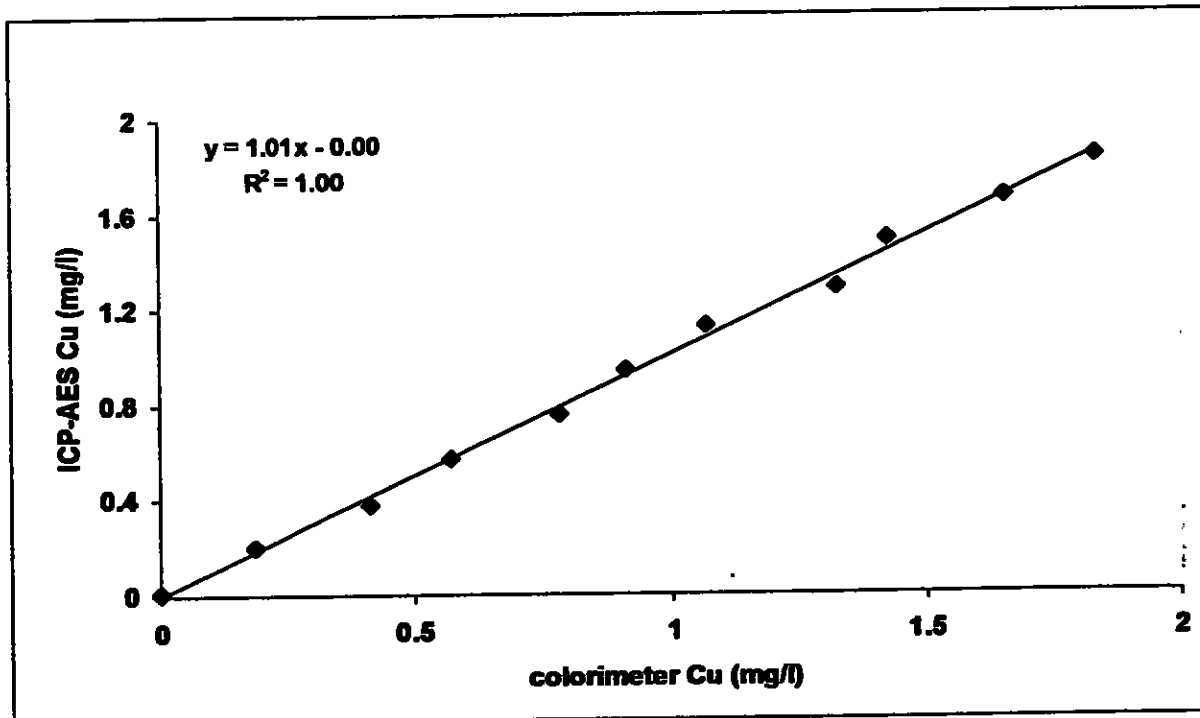


Figure 2.2.1: Relationship between colorimetric (HACH DR/890) and atomic absorption (ICP-AES) measurement. Coefficient of determination and equation for the correlation are shown.

3. השפעת pH התמיסה על מדידת הנחושת

מאחר ובחלק מהניסויים היו תנאי pH שונים, נבחנה ההשפעה של ה pH על מדידת הנחושת באמצעות הקולורימטר. לשם ביצוע הבדיקה הוכנו תמיסות בריכוזי נחושת זהים, ב pH שונה (איור 2.2.1)

הכנת הדגימות:

1. נלקחו 12 כוסות כימיות בנפח 150 מ"ל.
- 3 כוסות מולאו 100 מ"ל מים מזוקקים pH 6.
- 3 כוסות מולאו 100 מ"ל בופר פוספט pH 4.
- 3 כוסות מולאו 100 מ"ל בופר פוספט pH 10.
2. בכל אחת מהכוסות הוכנס נפח זהה מתמיסת מוצא של גפרת נחושת.
3. ריכוזי הנחושת של כל התמיסות נקראו על ידי קולורימטר (HACH DR/890) תוך שימוש בראגנט Vs.1.
4. לתמיסות הנחושת ב pH 10 הוסף 1 מ"ל תמיסת NaOH 5N על מנת להעלות את ה pH ל 13 וריכוז הנחושת נקרא בשנית (לריכוזי הנחושת נעשה תיקון לחישוב כמות הנחושת ל 100 מ"ל).

לא נמצא הבדל מובהק בין קריאות הקולורימטר בתמיסות pH שונות (איור 2.2.2). שונות גבוהה יחסית נמדדה במים המזוקקים בהם טווח ה pH נע בין 5.8 ל 6.2.

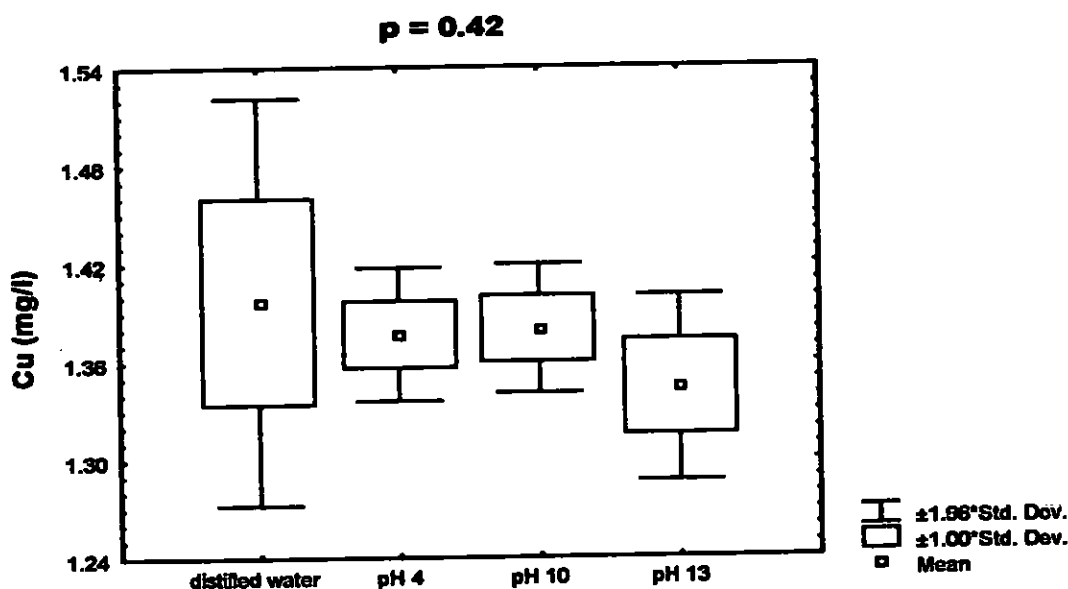


Figure 2.2.2: Copper concentration readings (mean \pm SD) from HACH colorimeter (DR/890) of media in different pH.

2.3 רעילות אמוניה לחילזון שחריר הנחלים

מאחר והאמוניה ידועה כחומר נדיף, הנעלם ממערכת המבחן (EPA, 1998) ומאחר ואורגניזמים אקוטים מפרישים את הפסולת החנקנית כאמוניה, נעשה בעבודה זו שימוש במערכת דינמית לקביעת רעילות האמוניה לחילזון המים שחריר הנחלים, שהתבססה על הזרמה רציפה של תמיסת המבחן ממאגרים גדולים (70 ליטר).

איטוף האורגניזמים ואקלום

1. טאספו אוכלוסיות של שחריר הנחלים מהאתרים הבאים:

Melanopsis lampra - מעלה נחל סעדיה

נחל תנינים, מעלה הסכר הרומי - *Melanopsis sp.*

עיינות צוקים (נחל מרכזי) - *Melanopsis buccinoidea*

כנרת חוף אמנון - *Melanopsis costata*

2. במעבדה הוכנסו החלזונות לפלאסונים בנפח של כ - 108 ליטר (מידות בסיס 42*60 ס"מ, גובה 43 ס"מ), שמולאו בכ - 85 ליטר במים שנאספו בבית הגידול. המוליכות החשמלית של המים נמדדה אחת ליומיים שלושה ימים. באם המוליכות החשמלית עלתה (כתוצאה מנידוף של המים) נמהלו המים ע"י הוספת מים מזוקקים. הקרקעית רופדה באבנים, המים סוננו בפילטר (millenium 2000) ואווררו. החלזונות שהו במכלים לפחות שבוע אחד לפני הניסוי ולכל היותר שבועיים. הפלסונים הוצבו בחדר בו נערכו ניסויי הרעילות (תנאי פוטופריודה: 12 שעות אור, 12 שעות חשכה) בכל יום נערך מעקב אחר האוכלוסייה, באם נראתה תמותה חריגה לא נעשה שימוש באותה אוכלוסייה לניסויים. אחת ליומיים-שלושה הואכלו החלזונות בעלי חסה טריים, תפוחי-עץ או גזר.

מבנה מערכת הזרימה

במערכת 6 מיכלי פוליאתילן (בקרה + 5 ריכוזי אמוניה שונים) בנפח 70 ליטר (מידות בסיס: 320*320 מ"מ, גובה: 770 מ"מ וברז יציאה בתחתית המיכל 3/4"). המכלים מולאו מי ברז על ידי ברזים הניצבים מעל לכל מיכל. המים מוזרמים מהמכלים אל 12 צנצנות מבחן מזכוכית בנפח 1.5 ליטר, באמצעות משאבה פריסטלטיית בעלת 12 ערוצים (Ismatec ICP-12), (2 חזרות, בכל חזרה: בקרה ללא אמוניה + 5 ריכוזי אמוניה שונים). הצינורות (Taigon), קוטר פנימי: 1.6 מ"מ, עובי דופן: 1.6 מ"מ) יוצאים מפתח בחלק העליון של המיכל ומזרימים מים אל המשאבה. המשאבה ממשיכים הצינורות אל צנצנות המבחן וחודרים דרך נקבים בקוטר 6 מ"מ שנקדחו במרכז מכסה הצנצנת, עד לקרקעית הצנצנת. המשאבה הפריסטלטיית הופעלה באמצעות קסטות מתכווננות (דגם ISO 122). הצינורות מתחת לקסטות Ismaphren (קוטר פנימי 2.29 מ"מ, דופן 0.85 מ"מ). על פי הקריטריונים לביצוע מבחני רעילות דרוש כי נפח המים בצנצנות המבחן יוחלף לפחות 6 פעמים בכל 24 שעות (APHA 1995), בהתאם המשאבה כוונה להזרים מים בספיקה של 4.2 מ"ל/דקה. בדופן צנצנות המבחן נקדחו חורים בקוטר 6 מ"מ אליהן חוברת צינורית זכוכית ועליה

חובר צינור ניקוז מפלסטיק גמיש המזרים את עודפי המים לצינור מאסף מפלסטיק קשיח. צינור זה מנקז את המים לפתח ביוב, נפח המים בצנצנות המבחן נשמר קבוע 10 ± 1000 מ"ל.

הכנת מערכת הניסוי

1. מכלי הפוליאתילן מולאו במי ברז. המים אווררו לפרק זמן של לפחות 72 שעות על מנת לאפשר נידוף הכלור והרווית המים בחמצן. רצוי כי טרם תחילת הניסוי יגיעו המים לפחות ל -90% רוויה על מנת שבמהלך הניסוי לא ירד החמצן מתחת ל -40% (APHA 1995).
2. בתום האוורור ולפחות 50 שעות טרם הכנסת האורגניזמים, מוכנס לכל מיכל אמוניום כלוריד (פרט למיכל הבקרה) ליצירת הריכוז המדרש. המלח הומס במעט מים והוכנס אל המיכל המתאים, לאחריו עורבבו המים במיכל היטב. המוליכות החשמלית של המים נמדדה בעזרת אלקטרודה (oxygen-conductivity meter YSI 85). באם המוליכות החשמלית של המים בבית הגידול גבוהה יותר, הוסף מלח ים (Sigma או Instant ocean) עד הגעת המים למוליכות החשמלית הרצויה. נוטרו מזדי איכות מים: pH (Orion 710A), ריכוז total ammonia (Orion 95-12), טמפרטורה, מוליכות חשמלית, מליחות, חמצן (% רוויה) וריכוז חמצן (oxygen-conductivity meter YSI model 85, נתונים מוצגים בנספח 3). ריכוז אמוניה לא מיוננת חושב לפי המשוואה Emerson et al (1975):

$$NH_3 = \frac{NH_3 + NH_4}{1 + 10^{pKa - pH}}$$

$$pka = 0.09018 + 2729.92/T$$

אלרון (2000) מצא דינמיקה של שינויי pH לאחר המסת אמוניום כלוריד במיכלים. שינויי pH גורמים לשינויים בריכוז האמוניה הבלתי מיוננת במיכלים ונמשכים כמספר שעות. בניסויים פרילימינריים שביצעתי נמצא כי ריכוז האמוניה ו pH מתייצבים לאחר כ 50 שעות (איור 2.3.2 ו 2.3.3).

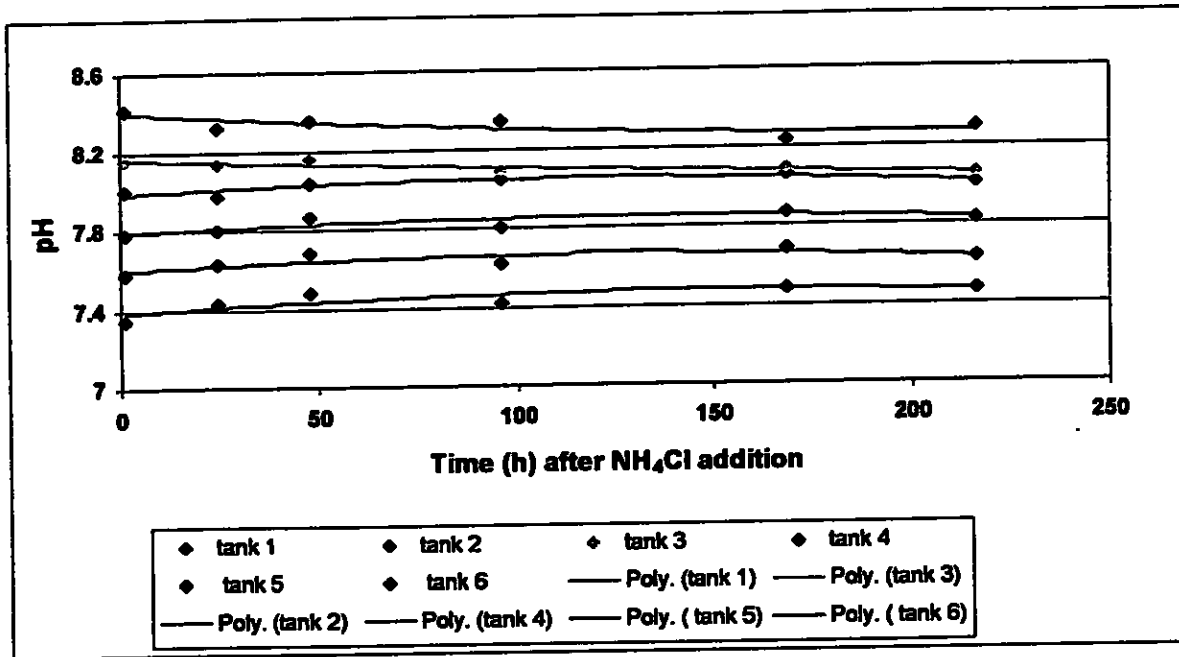


Figure 2.3.2: Dynamics of pH in the ammonia reservoirs.

מאיר זה ניתן לראות כי לאחר כ 50 שעות לא חלו שינויי pH משמעותיים במיכלי המבחן.

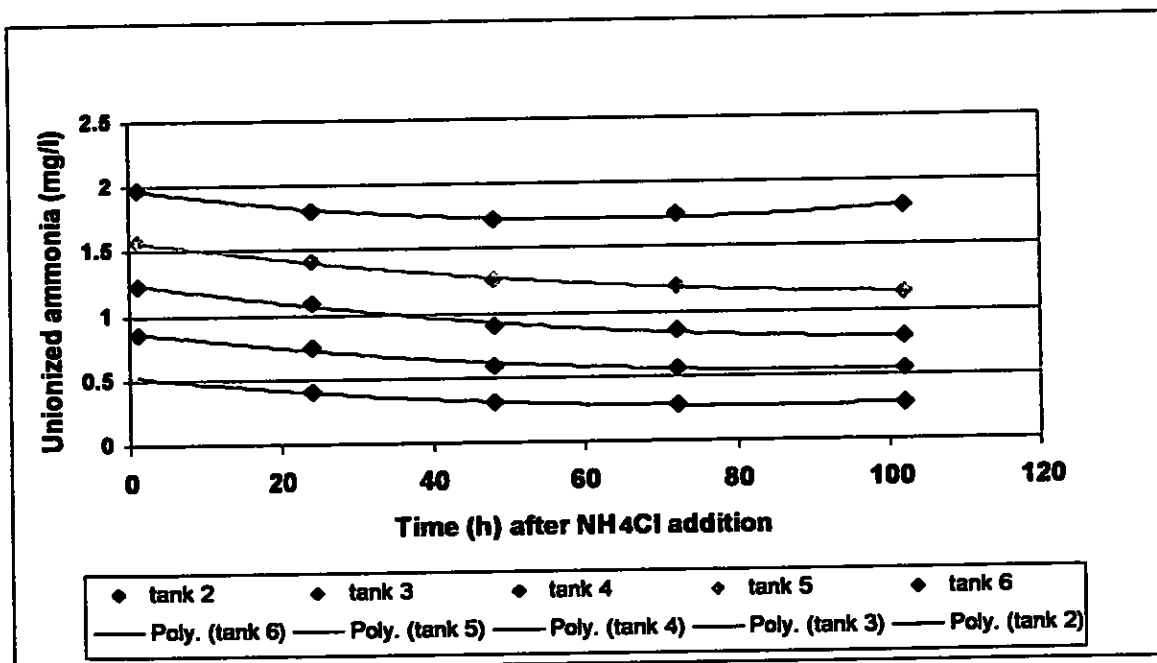


Figure 2.3.3: Dynamics of unionized ammonia in the ammonia reservoirs

מאיר 2.3.3 ניתן להסיק כי לאחר כ 50 שעות חלה התייצבות בריכוז האמוניה הבלתי מיוננת במיכלי המבחן.

