



**ניטור אקוטוקסיקולוגי של נהר הירקון וקרקעיתו:  
התאמת מבחני רעילות מהירים**

**דו"ח מסכם לשנים 1999 - 2002**

**מוגש למשרד לאיכות הסביבה ורשות נחל הירקון**

על ידי

פרופ' שמשון בלקין ושגיא מגריסו

היחידה למדעי הסביבה

ביה"ס למדע יישומי ע"ש פרדי ונדין הרמן

האוניברסיטה העברית, ירושלים

יוני 2003



60513900



**המשרד לאיכות הסביבה**  
وزارة جودة البيئة  
Ministry of the Environment





**ניטור אקוטוקסיקולוגי של נהר הירקון וקרקעיתו:  
התאמת מבחני רעילות מהירים**

**דו"ח מסכם לשנים 1999 - 2002**

**מוגש למשרד לאיכות הסביבה ורשות נחל הירקון**

על ידי

פרופ' שמשון בלקין ושגיא מגריסו

היחידה למדעי הסביבה

ביה"ס למדע יישומי ע"ש פרדי ונדין הרמן

האוניברסיטה העברית, ירושלים

יוני 2003

## תודות

- לאנשי המשרד לאיכות הסביבה, בעיקר לד"ר ישעיהו בר אור ולד"ר אלי שטרן, על המימון והתמיכה
- למר דוד פרגמנט ואנשי רשות נחל הירקון
- לגבי שוש צייזל-פרי ז"ל ולאנשי רשות נחל הקישון

העבודה היוותה חלק מעבודת הגמר לתואר מוסמך בלימודי הסביבה באוניברסיטה העברית של שגיא מגריסו.

## תקציר

הפיתוח התעשייתי המואץ והעלייה באוכלוסיית האדם יצרו זיהום סביבתי כבד באזורים רבים בארץ כבעולם. בד בבד עם העלייה בהיקף הזיהום האנטרופוגני, עלתה גם המודעות בדבר הסכנות הטמונות בו והצורך להעריך נכונה את עצמתו ולנטר נוכחותם של חומרים רעילים. צורך זה קיים כמובן בסביבות מסוגים שונים, אולם זכה לתהודה מיוחדת בהקשר של נחלי הארץ בגלל אירועים דוגמת אסון המכבייה ופרשת השייטת.

לצורך ניטור נוכחות רעלים קיימות שתי גישות שונות ומשלימות:

1. אנליזה כימית לאפיון מדויק של הרכב הדוגמא
2. מבחנים ביולוגיים המכמתים את השפעת הדוגמא על יצורי מבחן שונים. קיימים מבחנים מגוונים המבוססים על אורגניזמים אאוקריוטים ופרוקריוטים מרמות טרופיות שונות.

בשנים האחרונות, עם הגברת השימוש במבחנים ביולוגיים, עלתה זמינותם של מבחני רעילות ממוזערים, בהם יצור מבחן מצוי במצב "רדום" (ביצים ברות-קיימא, חיידק מיובש, או אצה מקובעת) היכול להישמר במצב זה מספר חודשים וניתן ל"שפעול" (הבקעה או הרחפה) בפרק זמן קצר יחסית סמוך למועד המבחן. בכך נחסך זמן רב וידע הנדרשים לגידול מתמשך ויומיומי של יצורי מבחן כדוגמת עכברים, דגים או חסרי חוליות שונים.

בעבודה הנוכחית נעשה שימוש במספר מבחנים ממוזערים על מנת לבחון את אפשרות התאמתם לבדיקת "בריאות" נחלים, תוך התמקדות ראשונית בנחל הירקון. כבר עם תחילת העבודה התברר שעל מנת לקבל תמונה נאמנה יותר יש להרחיב את המחקר לנחל אחד נוסף לפחות, ולשם כך נבחר נחל הקישון. במסגרת העבודה נבדקה רעילות שני הנחלים אלה במספר נקודות דיגום. בכל אחת מהנקודות נבדקו הן רעילות המים הזורמים והן רעילות הקרקעית ע"י בדיקת המים הבין חלליים והסדימנט עצמו. במקביל למבחני הרעילות, נעשו גם בדיקות כימיות של הדוגמאות השונות לאפיון וכימות מזהמים שונים כמתכות וחומרים אורגניים שונים באותן דוגמאות.

מהעבודה עולה כי קיים הבדל בערכי הרעילות הביולוגית בין הנחלים השונים, ובין נקודות הדיגום השונות. כמו כן נמצא מתאם טוב בינם לבין ריכוזי המזהמים שהתקבלו בבדיקות הכימיות.

ערכי הרעילות של יצורי המבחן השונים אף היא משתנה בהתאם לרגישותם ותחום הגילוי האפשרי של כל יצור ויצור הן במעבדה והן בשטח. לפיכך אין מבחן אחד המספק מידע מלא על רעילותם של מגוון המזהמים הקיים, לשם זיהוי רעילות בדוגמאות סביבתיות, והגנה מבעוד מועד על הסביבה. מתוך עבודה זאת ניתן להמליץ על ערכה בת מספר מבחנים המבוססת על מבחר מיצורי המבחן הבאים:

1. האצה *Selenastrum capricornutum*

2. הסרטנים *Thamnocephalus platyurus, Daphnia pulex*

3. הצידפנית *Heterocypris incongruens*

4. החיידק המאיר *Vibrio fischeri*

5. הריסנית *Tetrahymena thermophila*

אנו מאמינים ששימוש מושכל בערכה כזו יכול להיות לעזר רב הן כמדד לבחינת זיהום בנחלים והן למעקב אחר יעילותם של הליכי שיקומם.

## תוכן העניינים

10	1. מבוא
10	1.1 כללי
11	1.2 בדיקות רעילות ביולוגיות
11	1.2.1 סוגי המבחנים
12	1.2.2 מדדי הרעילות
12	1.2.3 מנגנוני רעילות
12	1.3 מבחני גנוטוקסיות
13	1.4 מבחני רעילות ספציפיים
14	1.5 מבחני רעילות כלליים
14	1.5.1 ניטור ביולוגי
15	1.5.2 סמנים ביולוגיים
15	1.5.2.1 פעילות אנזימטית
17	1.5.2.2 ATP-TOX
17	1.6 מבחנים ביולוגיים
17	1.6.1 מבחנים צמחים ואצות
18	1.6.2 מבחן <i>Hydra</i>
18	1.6.3 מבחני דגים
19	1.6.4 מבחנים בחסרי חוליות
19	1.6.5 מבחנים בקטריאלים
19	1.7 מבחנים אאוקריוטים ממוזערים
21	1.7.1 סוללת מבחנים ממוזערים
21	1.8 זיהום נחלים
21	1.8.1 זיהום סדימנטים
22	1.8.2 שיטות לבדיקת סדימנט
22	1.8.2.1 מיצוי
23	1.9 נחל הירקון
23	1.10 נחל הקישון
25	2. מטרת המחקר ושלבי העבודה
25	2.1 מטרות העבודה
25	2.2 הגישה לעבודת המחקר

25.....	2.3 שלבי העבודה
25.....	2.3.1 סריקה ראשונית של הנחלים
25.....	2.3.2 בחירת נקודות מאפיינות
25.....	2.3.3 יישום מבחני רעילות ממוזערים ואנליזת מזהמים
27.....	3. שיטות וחומרים
27.....	3.1 דיגום
27.....	3.1.1 כללי
27.....	3.1.1.1 דיגום מים
27.....	3.1.1.2 דיגום קרקע
28.....	3.2 מבחני רעילות
28.....	3.2.1 מבחני דוגמאות מלוחות
28.....	3.2.1.1 מבחן <i>Artemia salina</i>
28.....	3.2.1.2 מבחן <i>Brachionus plicatylis</i>
29.....	3.2.2 מבחני דוגמאות מתוקות
29.....	3.2.2.1 מבחן <i>Thamnocephalus platyurus</i>
30.....	3.2.2.2 מבחן <i>Daphnia pulex</i>
30.....	3.2.2.3 מבחן <i>Tetrahymena thermophila</i>
31.....	3.2.2.4 מבחן <i>Selenastrum capricornutum</i>
31.....	3.2.2.5 מבחן <i>Microtox</i>
31.....	3.2.3 מבחן סדימנט ישיר
31.....	3.2.3.1 מבחן <i>Heterocypris incongruens</i>
32.....	3.3 חישובי רעילות
32.....	3.3.1 חישוב ערכי $EC_{50}$ למבחן <i>Microtox</i>
33.....	3.3.2 חישובי רעילות למבחני TOXKIT
34.....	3.4 אנליזת מתכות
34.....	3.5 אנליזת חומרים אורגניים
34.....	3.5.1 אנליזת פאזות מימיות
34.....	3.5.2 אנליזת קרקע
34.....	3.5.3 זיהוי החומרים וקביעת ריכוז חצי כמותי
35.....	3.5.4 קביעת ריכוזים מדויקת
36.....	4. תוצאות

36.....	4.1 נחל הקישון - רעילות
36.....	4.1.1 מבחן <i>Microtox</i>
37.....	4.1.2 מבחני <i>Brachionus plicatilis</i> ו <i>Artemia salina</i>
38.....	4.1.3 מבחני <i>Thamnocephalus</i> ו <i>Daphnia</i>
39.....	4.2 אנליזה כימית - קישון
39.....	4.2.1 אנליזה אורגנית
41.....	4.2.2 תרומת רעילות חומרים אורגנים
45.....	4.2.1 ריכוזי מתכות
48.....	4.3 נחל הירקון –רעילות
48.....	4.3.1 מבחני <i>Thamnocephalus</i> ו <i>Daphnia</i>
50.....	4.3.2 מבחני <i>Heterocypris</i> ו <i>Selenastrum</i> , <i>Tetrahymina</i>
53.....	4.4 אנליזה כימית
53.....	4.4.1 אנליזה אורגנית
54.....	4.4.2 תרומת רעילות אורגנית
55.....	4.4.2 אנליזת מתכות
57.....	4.5 ריכוז תוצאות ומסקנות עיקריות
58.....	5. דיון
58.....	5.1 קרקעית כמבלע למזהמים
58.....	5.2 מפל רעילות
59.....	5.3 נחל הירקון אל מול נחל הקישון
60.....	5.4 המלצות
60.....	5.4.1 שיטות מיצוי
60.....	5.4.2 מדד לכריאות נחל
61.....	5.4.3 סוללת המבחנים
63.....	5.4.4 המלצות נוספות
63.....	5.4.4.1 ניתוח התוצאות
63.....	5.4.4.2 תדירות הבדיקה
63.....	5.4.4.3 שיקום נחלים ואיכות המים
64.....	6. רשימת מקורות

## רשימת איורים

- איור 1 - שינויים מורפולוגיים ב *Hydra attenuata* לאחר חשיפה לרעלן. 18.....
- איור 2 - תכולת ערכת Microbiotest. 20.....
- איור 3 - נחל הירקון וסביבתו, אתרי הדיגום שמותיהם וחלקי הנחל. 24.....
- איור 4 - נחל הקישון וסביבתו, אתרי הדיגום שמותיהם וחלקי הנחל. 24.....
- איור 5 - סכימה של מתקן להוצאת גלעינים. 27.....
- איור 6 - לרווה מהמין *Artemia salina* בשלבי בקיעה. 28.....
- איור 7 - פרט מהמין *Brachionus plicatilis* לאחר בקיעה. 29.....
- איור 8 - לרווה מהמין *Thamnocephalus platyurus* לאחר בקיעה. 29.....
- איור 9 - פרטים מהמין *Daphnia pulex* לאחר בקיעתם. 30.....
- איור 10 - פרט מהריסנית *Tetrahymena thermophila*. 30.....
- איור 11 - תאי אצת *Selenastrum capricornutum* בצורתם החופשית והמקובעת. 31.....
- איור 12 - פרט מהמין *Heterocypris incongruens*. 32.....
- איור 13 - דוגמא לחישוב רעילות במבחן Microtox. 33.....
- איור 14 - תוצאות רעילות במבחן Microtox בנקודות הדיגום בנחל הקישון. 36.....
- איור 15 - תוצאות רעילות במבחן *Artemia salina* בנקודות הדיגום YAGUR ו CHEM. 37.....
- איור 18 - תרומת הרעילות האורגנית המחושבת באתרי הדיגום בנחל הקישון. 44.....
- איור 19 - רעילות חומרים אורגניים שנמצאו בנחל הקישון למערכות הניסוי. 45.....
- איור 20 - ריכוזי מתכות במים הבין חלליים בנחל הקישון. 46.....
- איור 21 - ריכוזי מתכות שנמצאו בסדימנט באתר CHEM. 47.....
- איור 22 - רעילות המתכות השונות ליצורי המבחן השונים שהתקבלו בעבודה זו. 47.....
- איור 23 - ערכי רעילות במבחן *Daphnia pulex* בדוגמאות מים מנחל הירקון. 49.....
- איור 24 - ערכי רעילות במבחן *Thamnocephalus* בדוגמאות מים מנחל הירקון. 50.....
- איור 25 - ערכי רעילות במבחן *Tetrahymena thermophila* מנחל הירקון. 51.....
- איור 26 - רעילות שתי נקודות דיגום בנחל הירקון במבחן *Selenastrum capricornutum*. 52.....
- איור 27 - אחוזי תמותה במבחן *Heterocypris* לסדימנט נחל הירקון. 53.....
- איור 28 - תרומת רעילות מחושבת באתרי הדיגום בנחל הירקון בפאזות השונות. 55.....
- איור 29 - ריכוזי מתכות שנמצאו במים החלליים בנקודות הדיגום בנחל הירקון. 57.....



## רשימת טבלאות

- טבלה 1 - אנזימים בקטריאלים המשמשים למבחני רעילות ומסלולם המטבולי.....16
- טבלה 2 - מספר מבחנים ביולוגיים ממוזערים המשוקים מסחרית.....20
- טבלה 3 - החומרים הרעילים שאותרו בסקר ספרות, שימושים וריכוחם בנחל הקישון.....40
- טבלה 4 - רשימת החומרים הרעילים, ערכי הרעילות ליצורי המבחן השונים ופקטור רעילות.....43
- טבלה 5 - חומרים הרעילים שאותרו בסקר ספרות, שימושים וריכוחם בנחל הירקון.....54
- טבלה 6 - סיכום תוצאות הרעילות בדוגמאות השונות מנחל הירקון.....58
- טבלה 7 - סיכום תוצאות הרעילות בדוגמאות השונות מנחל הקישון.....58

## רשימת קיצורים ומונחים

ASW	Artificial Sea Water
DDW	Double Distilled Water
EC <sub>50%</sub>	Concentration causing a 50% decrease in activity
EPA	Environmental Protection Agency (USA)
GCMS	Gas Chromatograph Mass Spectrometer
HPLC	High Pressure Liquid Chromatography
ICP	Inductively Coupled Plasma
IS	Interstitial
ISO	International Standardization Organization
LC <sub>50%</sub>	Concentration causing 50% lethality
NAD	Nicotineamide Dinucleotide
OECD	Organisation for Economuc Cooperation and Development
PAH	Polynuclear Aromatic Hydrocarbon
PCB	Polychlorobiphenyl
RW	River Water
TU	Toxicity Unit
מלמ"ש	מליון מטר מעוקב לשנה
סל"ד	סיבובים לדקה

# 1. מבוא

## 1.1 כללי

בשנים האחרונות גברה בארץ המודעות בקרב הרשויות לסכנות הנובעות מזיהום סביבתי של נחלים. נוכחות המזהמים אינה מוגבלת לתחומי הנחל בלבד: המזהמים מתקדמים במורד הזרם על גבי חומר מרחף או תוך תנועת גרגרי הסדימנט וכך מגיעים אל אזור השפך ולחוף הים, ומובילים להצטברותם בסדימנט הימי ובבעלי חיים ימיים (27).

כתוצאה מכך נוצר הצורך לתקן את המעוות על ידי שיקום הנחלים וקביעת תקנים לאיכות מים וסדימנט (99), אשר בכדי לאוכפם וליישמם יש להשתמש באמצעי ניטור רגישים ויעילים. בדרך זו ניתן יהיה להעריך את מידת הנזק והסכנה שבזיהומים קיימים ולאתר חריגות בסוג ובריכוז המזהמים הקיימים בגופי מים שונים ולהתריע על כך. כלים אלה אף יכולים לאפשר הגנה על מקורות מי שתייה. כיום קיימות שתי שיטות שונות ומשלימות לניטור מים: שיטות כימיות פיזיקליות ושיטות ביולוגיות (22).

### שיטות כימיות פיזיקליות

שיטות אלה מזהות ומכמותות את מרכיבי הדוגמא תוך שימוש בציוד אנליטי כגון HPLC, ICP או GCMS. שיטות אלו מאופיינות ברמת רגישות, דיוק ואמינות גבוהות (53) וחלקן אף נדרשות לשם עמידה בחוקים ותקנות. אך לשיטות אלו מספר חסרונות ביניהם, עלות ציוד גבוהה, משכי זמן ארוכים בהפעלתן ודרישה למיומנות גבוהה (31, 53). זיהוי החומרים מתבסס על מאגר נתונים מוגבל אשר אינו מספק בהכרח מידע על רעילותם הביולוגית, שכן מידע טוקסיקולוגי קיים רק לגבי מספר מצומצם של חומרים (82). כמו כן לא ניתן להעריך השפעות ואפקטים סינרגיסטים ואנטגוניסטים וכן את מידת זמינותם הביולוגית של הרעלנים (87) אשר משפיעים על רעילותם של חומרים או דוגמא נעלמת.

### שיטות ביולוגיות

שיטות אלה אינן מזהות את הרכב הדוגמא אלא בוחנות את השפעתה על יצורי מבחן שונים או על אלמנטים תוך תאיים מסוימים. השפעה זו ניתנת למדידה וכך ניתן לכמת את שיעור השינוי (עליה או ירידה) ביחס לביקורת (4). הפרמטרים הנבדקים תלויים באופי המבחן וביצורי המבחן לדוגמא שינוי בעוצמת אור, צבע או פלואורסנציה (53), שינוי בקצב הגידול, בשיעורי התמותה כושר רבייה והתנהגות (79), בעיוותים מורפולוגיים ביצורי המבחן (84), תוצרי פעילות אנזימטית, או מטבולית (63) ועוד (8), (26).

לשיטות הביולוגיות מספר יתרונות על פני השיטה הכימית (4) :

(I) מאפשרת לזהות רעילות כללית אשר יכולה להיות התוצאה של מספר רעלנים גם כאשר החומר הרעיל אינו ידוע או כאלה שיש ביניהם השפעות סינרגיסטיות.

(II) מאפשרת לזהות פגיעה עקב רעילות ברמות טרופיות שונות או ברמות אקולוגיות שונות, מרמת הפרט, ועד רמת האוכלוסיה.

(III) מאפשרת את הגדלת מסד הנתונים לאיתור חומרים רעילים באנליזות כימיות. החסרון העיקרי בשיטה הביולוגית הוא היכולת המצומצמת לאפיין ולזהות במדויק את הרעלן/ים.

## 1.2 בדיקות רעילות ביולוגיות

### 1.2.1 סוגי המבחנים

מחקר הבדק רעילות ביולוגית עשוי להיות בעל איפיון טוקסיקולוגי או אקוטוקסיקולוגי: המחקר הטוקסיקולוגי עשוי לספק הגנה לבאים במגע עם הרעלן על ידי בחינת עוצמתו, איתור אבר/ המטרה שלו (35), וקביעת ערכי חשיפה מותרים ומרביים (Short Term Exposure Limit, Time-Weighted Average) מחקר זה מבוסס על שימוש ביצורי מבחן עילאיים כגון עכברים, ארנבות ואף ממידע רפואי המתקבל מאירועים בהם נחשפו בני אדם. דרכי החשיפה לחומר הנבדק שונות ומגוונות בהתאם לאופיו הכימי ושימושו האפשריים, עליהן ניתן למנות חשיפה עורית, הזרקה תוך ורידית, חשיפה עינית, נשימתית ואורלית (35).

לעומתו, המחקר האקוטוקסיקולוגי אומד את הנזק הסביבתי שנגרם או עשוי להיגרם על ידי מזהמים שונים, ובכך עשוי לסייע למקבלי החלטות לקבוע מדיניות שתאפשר להגן על הסביבה (4). בדרך זו, קבוצת האורגניזמים נחשפים לריכוזים שונים של המזהם בצורתו הנחלת או על ידי מגע עם דוגמה מוצקה, כך שהחומרים השונים יחדרו לגוף האורגניזמים ויבואו לידי ביטוי כפי שהיו חודרים באופן טבעי בבית הגידול הטבעי וללא אילוץ באופן חשיפתם או כניסתם לגוף.

את אופן החשיפה לחומר הנבדק ניתן לחלק על פי מספר החלפות הדוגמא במשך ביצוע המבחן (67).

1 מבחן סטטי (static) - בו לא מבוצעת החלפה של המדיום במהלך המבחן. בד"כ מאפיין מבחנים קצרי מועד.

2 מבחן חצי סטטי (semi static) - בו מוחלף המדיום מספר פעמים במהלך המבחן אשר מדמה מספר אפיזודות זיהום סביבתי. בד"כ מאפיין מבחנים ארוכים יחסית הנמשכים מספר ימים.

3 מבחן זרימה (flow through) - בו מוחלף המדיום הנבדק בצורה קבועה ומתמשכת: דוגמת המזהם מוזרמת ללא הרף במיכל ובו יצורי המבחן.

בשני המבחנים האחרונים החלפת המדיום נועדה לסלק תוצרי פירוק ופסולת המיוצרים על-ידי יצור המבחן ולשמור על ריכוז רעלן קבוע מאחר ותהליכי ספיחה, פירוק ואידוי מקטינים את ריכוזו (41). שינויים במשך המבחן עשויים לבחון רעילות אקוטית בחשיפה קצרת טווח או רעילות כרונית בחשיפה ארוכת טווח. הגדרתה של חשיפה אקוטית וכרונית קשורה גם בקשר ישיר לזמן הדור של יצור המבחן: ככל שהוא ארוך יותר משך החשיפה ארוך יותר (67) ולהפך. השימוש בבחינת רעילויות אלו מאפשר להעריך ולזהות השפעות שונות של אותו החומר (67).

## 1.2.2 מדדי הרעילות

רעילות מבוטאת במספר מדדים. בדרך כלל משתמשים בערך מספרי המציין את ריכוז הדוגמא הגורם לשינוי במדד הנבדק. המדד המקובל הוא  $LC_{50}$  (Lethal Concentration) שמשמעותו ריכוז הדוגמא שגורם לחמותה במחצית יצורי המבחן. מדד דומה הוא ה- $EC_{50}$  (Effective Concentration), המייצג הפחתה של מחצית מהפעילות הנמדדת ביחס לביקורת (11). באופן דומה ניתן להציג תוצאות רעילות תוך שימוש במדדים כגון  $EC_{10}$ ,  $EC_{20}$ , או  $EC_{80}$  שבכולם ככל שהערך המצוין נמוך יותר, רעילות החומר גדולה יותר (נדרש ריכוז קטן יותר של החומר כדי להפחית את הפעילות). דרך נוספת להצגה רעילות היא TU (Toxicity Units) שהוא למעשה הערך ההופכי ל- $EC_{50}$  המוכפל פי 100 ( $TU = (1/EC_{50}) * 100$ ). ככל שהרעילות גדלה, גדל גם ערך ה-TU (70).

## 1.2.3 מנגנוני רעילות

כאשר דנים במבחני רעילות, יש להבחין בין רעילות כללית הפוגעת בדרכים שונות במערכות שונות כגון פגיעת טולואן או פנול, לבין רעילות גנטית (גנוטוקסיות) המוגדרת כמידת הפגיעה ב-DNA ועשויה לגרום לאפקטים מוטגנים וקרצינוגנים, ולבין רעילות ספציפית הפוגעת במנגנונים תאיים מסוימים, כמו למשל:

- מפרי צימוד פוספורילציה חמצונית – Pentachlorophenol

- מעכבי אצטילכולין אסטראז – Malathion

- גירויים ממברנליים – Chlorine

- מערכת עצבים מרכזית – Andrin

- חוסמי נשימה – Cyanide

- מעכבי חלוקת תא – Trifluarlin

- מעכבי פוטוסינתזה – Atrazine

## 1.3 מבחני גנוטוקסיות

מבחנים אלה בודקים את מידת הפגיעה ב-DNA ומבוססים על עליה בשיעור המוטציות, שינוי בפעילות מנגנוני תיקון נזקי DNA או שינויים ופגיעות כרומוזומליות (92). עיקר מבחני הגנוטוקסיות נעשו בעבר ביצורים אאוקריוטים (מכרסמים בעיקר); כיום הולך ומתגבר השימוש במבחנים בקטריאלים הודות לעלותם הנמוכה והזמן הקצר לקבלת תשובה. מבין האחרונים ניתן למנות את מבחן Ames (2), בו נעשה שימוש בחיידקי *Salmonella typhimurium*. בעקבות חשיפה לחומר גנוטוקסי חלה מוטציה חזרת במוטנטים שאינם מסוגלים לסנתז את החומצה האמינית היסטידין; בעקבות כך הם מסוגלים לגדול

על מצע חסר היסטידין וליצור מושבות. ככל שהדוגמא הנבדקת מוטגנית יותר, תתקבלנה מושבות רבות יותר (2).

מבחן דומה הוא מבחן ה- Mutatox™ (86). במבחן זה נעשה שימוש במוטנט חשוך של החיידק הימי המאיר (באופן טבעי) *Photobacterium leiognatti* אשר חוזר להאיר לאחר מוטציה חוזרת. שיעור החזרה להארה משקף את מידת המוטגניות של הדוגמא.

שיטה אחרת מבוססת על הפעלת מערכת ה-SOS החיידקית. במבחן ה-SOS Chromotest (90), בו משתמשים בחיידק *Salmonella typhimurium* שאליו הוחדר הפרומוטר לגן *sulA* (ממערכת SOS של *E. coli*) אליו מצומד הגן המדווח *lacZ* (המקודד לאנזים  $\beta$ -Galactosidase הניתן למדידה). פגיעה ב-DNA תגרום לאינדוקציה הפרומוטר שיוביל ליצירה מוגברת של  $\beta$ -Galactosidase. מבחן ה-Umu (68) עושה שימוש באותו רעיון ומבוסס על צימוד הפרומוטר לגן *umuC* (ממערכת SOS של *E. coli*) לאותו גן מדווח.

## 1.4 מבחני רעילות ספציפיים

מבחנים אלה מבוססים על מדידת פעילות אנזימטית או עיכובה באופן ישיר או עקיף. רגישותם גבוהה מאד באופן יחסי אם כי הם מגיבים למגוון צר יחסית של רעלנים, ולכן משתמשים בהם בדרך כלל לזיהוי נוכחות ורעילות של חומר מסוים או קבוצת חומרים, כגון חומרים אורגניים, מתכות או חומרי הדברה (59, 77). לעובדה זו חסרון עקרי מאחר ותיתכנה תגובות שליליות שגויות (בהן לא מזוהת רעילות על אף היות חומר רעיל בדוגמא) עקב העדר היכולת לזיהוי רעלנים אחרים בדוגמא (57).

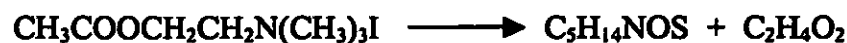
### מתכות כבדות

למתכות כבדות יכולת ליצור קומפלקסים תוך תאיים ולפגוע בפעילות חלבונים, להתחרות עם מתכות חיוניות לתפקוד תקין או לשנות את פעילותם של אלמנטים תוך תאיים (42). מבחן ה-Urease (43, 78) מבוסס על פעילות האנזים Urease המפרק אוריאה לפחמן דו חמצני ואמוניה שאת ריכוזה ניתן לקבוע בשיטה קולורימטרית. בנוכחות מתכות מעוכבת פעולת האנזים ומתבטאת בתגובת צבע חלשה יחסית לביקורת. באופן דומה המבחנים החיידקים MetPLATE™ (10) ו-MetPAD מבוססים על מדידה קולורימטרית של פעילות האנזים  $\beta$ -galactosidase בפירוק הסובסטרט המוסף  $\beta$ -D-galactopyranoside Chlorophenol red ויצירת ריאקציה צבע המעוכבת בנוכחות מתכות.

## חומרי הדברה

שימוש בחומרי הדברה מעצם הגדרתם מצריך בחינת השפעתם על אורגניזמים שונים שיחשפו לחומרים אלו, על אף ויתכן שאינם יצור היעד של כל חומר. מבחן אצטיל כולין אסטראז מבוסס על עיכוב פעילות

האנזים המפרק אצטילתיו- כולין איודיד לתיוכולין וחומצה אצטית באופן הבא



בעת ביצוע המבחן, מוסף ריאגנט אלמן אשר נקשר לתיוכולין ונוצרת תגובה קולורימטרית הנמדדת לאחר פרק זמן קבוע. מבחן זה מגיב לחומצות זרחניות וקרבמטים (89) המשמשים כקוטלי מזיקים.

ניתן לכמת את התגובה אף על-ידי מדידת החומצה האצטית שנוצרת על ידי מדידת pH או תגובת צבע ושינויי מוליכות (61). גישה דומה מבוססת על עיכוב בפעילות האנזים אלדהיד דהידרוגנאז המחמצן



לתגובה זו מצומדת תגובת חיזור של  $\text{NAD}^+$  ל  $\text{NADH}$ . המבחן מודד את קינטיקת יצירת ה  $\text{NADH}$ ; ככל שהדוגמא רעילה יותר קצב החיזור ויצירת  $\text{NADH}$  איטיים יותר. מבחן זה רגיש לקוטלי פטריות מסוג Ethenbithiocarbamate (63).

## 1.5 מבחני רעילות כלליים

עם העלייה בסוגי המזהמים עקב התפתחות התעשייה (16) עלה הצורך במדידת השפעתם על בני אדם. העובדה כי חומרים רבים משוחררים או עושים זרכם לביוספירה הוביל להתפתחות ענף חדש, אקוטוקסיקולוגיה, הבוחן את השפעת הזיהום על הסביבה (14). תחת ענף זה כלולים למעשה שלוש גישות ביולוגיות שונות ומשלימות להערכת רעילות: ניטור ביולוגי (Biomonitoring), סמנים ביולוגיים (Biomarkers) ומבחנים ביולוגיים (Bioassays).

### 1.5.1 ניטור ביולוגי

על מנת לאפיין את מצבם של נחלים או גופי מים מזוהמים יחסית לגוף מים נקי נעשית עבודת שדה הכוללת איסוף וניטור אורגניזמים שונים. השיטה מבוססת על ההנחה ששינויים בתנאי בית הגידול, כגון איכות המים ומשטר הידרולוגי, יגרמו לשינוי במבנה האקוסיסטמה אותו אומדים באמצעים שונים (13). מבנה האקוסיסטמה ניתן לבחינה על ידי חברת חסרי החוליות, חברת בעלי החוליות או חברת הצמחים במקום. (50, 93, 95). השינויים במבנה האקוסיסטמה מתבטאים בצמצום או העלמות מינים הרגישים לזיהום והשתלטות מינים עמידים יותר אשר נהנים משפע מזון ולחץ טריפה נמוך יותר. מידת ועוצמת השינויים ניתנים לכימות על ידי מדדים שונים ומשולבים כגון: מגוון מינים והרכב יחסי של המינים (50). בגישה זו ניתן לעקוב אחר שינויים החלים בהרכב אוכלוסיה לפני ואחרי הזיהום, או לחלופין, לעקוב אחר מידת התאוששותה של האוכלוסיה עם שיקום בית הגידול. השימוש בחברות אורגניזמים שונות מאפשרת בחינה נפרדת של האוכלוסיות הפלנקטוניות ו/או הבנטוניות (94).

בעבודות שנעשו בארץ בשיטות אלו נמצא כי לאחר זיהום נחל הירקון נעלמו מיני צמחים מסוימים כליל ושטח תפוצתם של אחרים הצטמצם (98). כשנבחנה חברת חסרי החוליות, נמצא כי מינים מסוימים שמופיעים בחלק הלא מזוהם נעלמו בחלק המזוהם ואת מקומם תפסו מינים עמידים (96).

לשיטה זו מספר חסרונות ככלי מדידה קצר-טווח:

1. נדרש ידע טקסונומי נרחב בכדי לזהות ולמיין את האורגניזמים השונים המרכיבים את האוכלוסיה.
2. זמן רב מושקע באיסוף המידע וניתוחו.
3. שינויים טופוגרפיים בין בתי גידול כגון הצללה, שיפוע קרקעית ועומק המים עשויים לגרום לשינוי במדדי האסופה ולעוות את המסקנות.
4. על מנת לזהות שינוי באקוסיסטמה דרושים נתונים שלא תמיד נאספו טרם הזיהום.
5. חסרונה העיקרי של גישה זו טמון בעובדה כי אין ביכולתה להעריך מראש את מידת הנזק ולצמצמו או למונעו, אלא אומדת את חומרתו רק לאחר שהתרחשה הפגיעה.

## 1.5.2 סמנים ביולוגיים

שיטה זו כוללת סדרת מבחנים הכוללים בחינת מדדים אנזימטיים, פיזיולוגיים ואימונולוגיים אשר כוללות בדיקות ביו-רפואיות לבחינת השפעות פרמקולוגיות לשם הערכת רעילותם של חומרים שונים (60), כמו גם סמנים ביולוגיים שפותחו בשיטות של ביולוגיה מולקולרית. מבחנים כאלה עשויים להצביע על הקשר הסיבתי בין המזהם והאפקט הטוקסי (85). חלקם מבוססים על העלמות חומרי מצע, יצירת תוצרים חדשים ומדידתם בשיטות פלואורומטריות, ספקטרופוטומטריות, או סימון רדיואקטיבי (11).

### 1.5.2.1 פעילות אנזימטית

אנזימים ממלאים תפקיד חשוב במטבוליזם של כלל האורגניזמים ולכן ישנם מבחני רעילות, המבוססים על מדידת פעילותם בפירוק סובסטרט אשר עם פירוקו מופעל סיגנל אור, פלואורסנציה או צבע (12). המבחן ניתן לביצוע *in vitro* בו ניתן להוסיף את הסובסטרט הבוחן פעילות אנזים מסוים כגון (Esterase, Trpsine, Cellulase) (33) להומוגנט יצורי מבחן, או *in vivo* בו מוסף הסובסטרט ויצורי מבחן חיים לדוגמא הנבדקת והסיגנל שהתקבל בתוך גוף היצור נמדד (47). מספר האנזימים בהם נעשה שימוש הינו רחב והם עשויים להיות בעלי פעילות ספציפית או כללית (טבלה 1).



טבלה 1- אנוימים בקטריאלים המשמשים למבחני רעילות ומסלולם המטבולי.

מסלול מטבולי	אנוים	סובסטרט פוטומטרי	סובסטרט פלואורסצנטי	מקור
Non specific hydrolases	Esterase	Fluoresceindiacetate		(63)
	Phosphatase	Nitrophenylphosphate	MUF- phosphate*	(63)
Carbohydrate metabolism	Amylases	Amylopectin azure		(63)
	Cellulases	Carboxymethylcellulose	MUF- cellobiopyranoside	(63)
	Glucosidases	Nitrophenyl- $\alpha/\beta$ -glucosidase	MUF- $\alpha/\beta$ -glucoside	(81)
Protein metabolism	Protease	Hide powder azure	Casein resorufin	(63)
	Alaninpeptid-ases	Alaninnitroanilidehydrochloride	L-Alanine-4-methoxy- $\beta$ -naphthylamide	(63)
Electron transport system	Dehydrogenases	Iodonitrotetraazoliumchloride		(39)

MUF – Methylumbelliferone \*

רוב המבחנים האנוימתיים מהירים ומדויקים יותר ממבחנים העושים שימוש באורגניזם השלם (57) אולם, בדומה למבחנים אחרים העושים שימוש באברונים ובמקטעים תאיים הם משמשים כמודל ואינם יכולים להצביע באופן ודאי על הרעילות *in vivo* ביצור החי, שכן תהליכי אקטיבציה או נטרול, הוכלה תוך תאית, הפרשה, קליטה והצטברות המשנים את ריכוז, תכונות ורעילות החומר אינם באים לידי ביטוי במבחן זה. כמו כן רעלנים המתווכים ע"י שימוש ברצפטורים ספציפיים שלא מבטאים בחלק ממבחני *in vitro* יספקו תשובות שליליות מוטעות (30).

שיטות נוספות במבחנים אנוימתיים כוללות קישור לנוגדנים ומדידת רמות החלבון HSP70 (Heat Shock Protein 70) שריכוזו עולה עם החשיפה לעקה או לרעילות (62).

גישה נוספת מבוססת על פעילותם של ציטוכרומים האחראים למטבוליזם של חומרים "מוכרים" כמו חומצות שומן או הורמונים) ו "זרים" כגון חומרים ארומטיים שונים PAH ו Polychlorobiphenyl. לאחר החשיפה, מולקולות הרעלן נקשרות לרצפטור המביא לשפעול הציטוכרום אשר מחמצן את הרעלן

תוך פתיחת קשרים כפולים והידרוליזה. מטרת הפירוק הוא מניעת פגיעה ב-DNA ונטרול הרעילות תוך הגדלת מסיסותם במים שמאיצה את סילוקם מהגוף (29). לאחר האינדוקציה ניתן לבדוק מספר מדדים שונים: מדידת רמת mRNA של הציטוכרום, כימותו ומדידת הפעילות הקטליטית (41).

### ATP-TOX 1.5.2.2

ATP הינו תוצר נפוץ של פעילות קטבולית בתאים וריכוזו בתא החי קבוע למדי (52), אך נעלם מהר מאוד לאחר מות התא, ולכן ריכוזו יכול לשמש מדד טוב. בשיטה זו מפיקים ATP מתרחיף חיידקים שנחשפו לרעלן במשך מספר שעות. החשיפה לרעלן המביאה לעיכוב בגידול החיידקים תגרום לירידה בריכוז ה-ATP.

## 1.6 מבחנים ביולוגיים

גישה זו כוללת שימוש ביצורי מבחן ובצמחים החיים כרמות טרופיות שונות. המבחן מתבצע בפרק זמן קבוע תחת תנאים מוגדרים ומבוקרים בהתאם לפרוטוקול של כל מבחן. פרמטרים שונים נמדדים על מנת להעריך את מידת רעילות הדוגמא, ביניהם ניתן למנות עיכוב גדילה, תמותה (65), פגיעה ברכייה או השלמת מחזור חיים (76), שינוי בהארה ובפלואורסנציה (53) ושינויים פיזיולוגיים (23). מספרם של מבחני הרעילות רב ועולה בהתמדה (48), אולם רק חלקם הקטן נדרש על ידי תקנות או מופיעים בתחיקה במדינות שונות כאמצעי לקביעת איכות מים, סדימנט, תשטיפים ושפכים (4). בפרק זה אפרט את המבחנים הסטנדרטים והנפוצים ביותר.

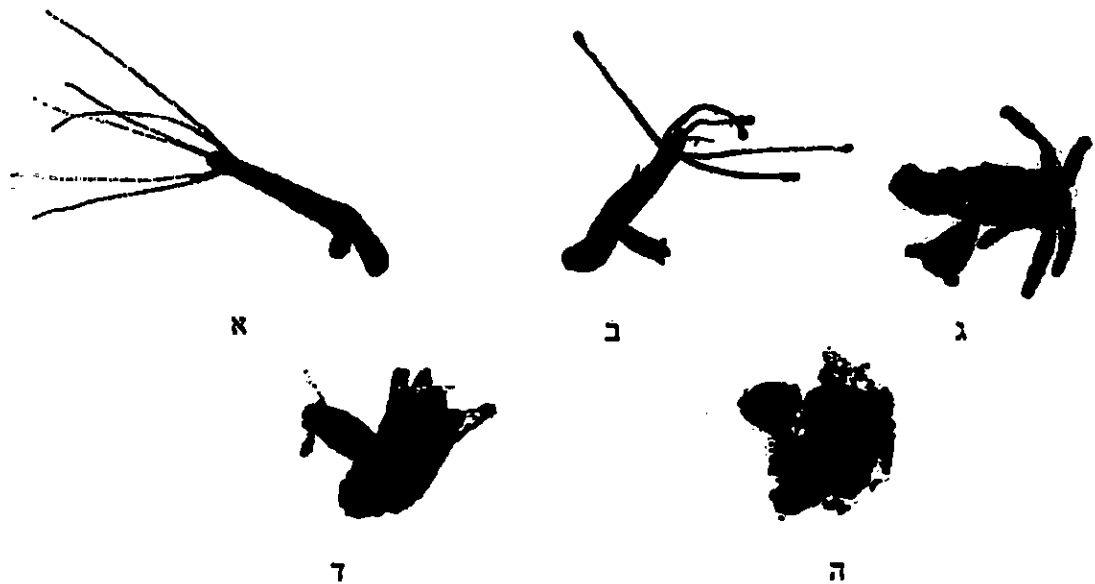
### 1.6.1 מבחנים צמחים ואצות

מספר מבחני רעילות נעשים בעזרת צמחים שונים: במבחן ה-*Allium* נמדד העיכוב בהתארכות שורשי בצל *Allium cepa* ביחס לביקורת שלילית לאחר שלושה ימים בהם היו טבולים בדוגמא (36). השימוש בזרעי *Typha latifolia* Linnaeus בוחן הן את אחוז הנביטה והן את התארכות השורשים לאחר 7 ימי חשיפה לדוגמא ביחס לביקורת שלילית (23). מבחנים אלה חוסכים את הצורך בגידול צמח מבחן, אך מהייכים בחירת פרטים (בצל, זרע) בעלי אותו גודל, גיל ומשקל טרם חשיפתם לדוגמא הרעילה על מנת למנוע עיוות אפשרי של התוצאה.

מבחני אצות עושים שימוש במינים שונים של אצות מים מתוקים ואצות ימיות. מבחן כזה יכול להיות מבוסס על מדדים שונים כמו צפיפות אופטית, ביומסה, תמותה, וגידול חוזר לאחר חשיפה לרעלן ושיטפה, ייצור חמצן וקיבוע  $^{14}\text{CO}_2$  (67). חלק ממבחנים אלה עבר מיזעור וניתן לבצעו בפלטות מיקרוטיטר (15).

## 1.6.2 מבחן Hydra

מבחן זה עושה שימוש בהידרה מסוג *Hydra attenuata* אשר מודגרת עם הדוגמא הרעילה למשך 96 שעות (84). במצבן הבריא פרורות זרועות הציד של ההידרה, ואילו חשיפה לדוגמא רעילה תגרום לכיווץ ועיוות הזרועות (84). ככל שהדוגמא הנבדקת רעילה יותר תתכווצנה יותר זרועות הציד (איור 1 ב ג) עד לכיווץ מלא ומוות ההידרה (איור 1 ד ה). מבחן זה מתאים בעיקר לדוגמאות נוזליות, אך ניתן להתאימו גם לדוגמאות קרקע לאחר סרכוזן או הרחפתן במדיום נוזלי ו"הושבת" ההידרות על גבי ממברנה חדירה.



איור 1 - שינויים מורפולוגיים ב *Hydra attenuata* לאחר חשיפה לרעלן. (א) מצב בריא. מצבים תת-ממיתים: (ב) Disintegration (ה Tulip (ד מצבי תמותה: (ה Short (ג Clubbed

## 1.6.3 מבחני דגים

מבחני הדגים הופיעו בשנות ה 50 ו 60 והיו למעשה מבחני הרעילות הסדורים הראשונים (16). במסגרת מבחנים אלה נעשה שימוש בדגיגים ממינים שונים כמו (*Salmo gairdneri*, *Poecilia reticulata*) (*Pimephales promelas*) מבחנים אלה מבוססים על בחינת התמותה לאחר חשיפה לדוגמא הרעילה במשך מספר ימים (בד"כ 4). מבחנים אלה הם היחידים העושים שימוש בחוליתניים מפותחים, אולם סובלים ממספר חסרונות עקב הצורך בניסיון מקצועי נרחב לשם גידול וטיפול שוטף בדגים שכן יש להשתמש בפרטים בני אותו גיל מין ומשקל (67). חסרון נוסף הוא הצורך במרחב ובנפחי דוגמא גדולים (67).

## 1.6.4 מבחנים בחסרי חוליות

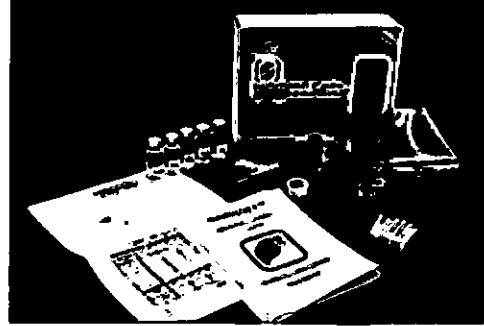
מבחנים אלה מבוססים על שימוש בסרטנים ימיים כגון *Artemia fransiscana* ושל מים מתוקים כמו *Thamnocephalus platyurus* וכן במיני דפניה שונים *D. magna* ו *D. pulex*. מבחנים אלו יכולים להיות מבוססים על מדידת השיתוק (Immobilization) של הפרטים, שינוי ביכולת הרבייה, או התזונה (80), מבחנים אחרים בוחנים התפתחות לרוולית של רכיכות מהמין *mytilus edulis* ו- *mytilus californianus* (44), או עיכוב בהתפתחות ותמותה בנמטודות מהמין *Panagrellus redivivus* (23).

## 1.6.5 מבחנים בקטריאלים

לשימוש בחיידקים כיצורי מבחן מספר יתרונות בהם: עלות נמוכה, פשטות הגידול, זמן דור קצר המביא לקבלת תוצאות במהירות (דקות עד שעות), ניתן להשתמש במספר רב של פרטים ומכאן שמספר החזרות רב, כמו כן האפשרות למניפולציה גנטית פשוטה באופן יחסי (7) מאפשרת בחינת חומרים רבים ושימוש בגורמי דיווח שונים. קיימים מספר מבחני רעילות בקטריאלים כשהנפוץ שבהם הוא מבחן רעילות כללי, המבוסס על הפחתה בהארה הטבעית של החיידק הימי *Vibrio fischeri* (19) המוכר בעיקר בשמו המסחרי של אחד המוצרים הראשונים מסוגו, Microtox.

## 1.7 מבחנים אאוקריוטים ממוזערים

כיום קיימת דרישה הולכת וגדלה בניטור ממושך של גופי מים, מה שהוליד את הצורך בפיתוח מבחנים פשוטים לתפעול, קלים לביצוע וחולים, הנקראים מבחנים ביולוגיים ממוזערים (Microbiotests) (16) ועונים על דרישות אלה. מבחנים אלה היגן למעשה ערכות מסחריות (assay kits) הכוללות את יצור מבחן האאוקריוט במצב "רדום" (חיידק מיובש בהקפאה, ביצים ברות-קיימא או אצות מקובעות), מדיום גידול מתאים, וציוד לביצוע המבחן (איור 2). יצור המבחן ניתן ל"שפעול" (הרחפה או הבקעה) סמוך למועד המבחן, וכך נמנע הצורך המתמשך בגידולו. לעובדה כי יצור המבחן מסופק במצב "רדום" יש יתרונות נוספים: נחסך שטח עבודה, זמן, ואין צורך בידע רב או במרחב לצורך הגידול והטיפול מכאן שעלויות התפעול נמוכות (49). רוב המבחנים אינם דורשים ציוד נוסף, למעט אינקובטור ו/או ספקטרופוטומטר ובכך מוזילים את העבודה. יתרון נוסף הוא הצורך בנפחי דוגמא קטנים יחסית למבחן דומה לא ממוזער (80), מבחנים אלו מסופקים עם פרוטוקול מדויק ומאפשרים השוואת הרעילות של דוגמא/אתר לאורך זמן.



איור 2- תכולת ערכת Microbiotest (השייכת למבחן *Daphnia pulex*) הכוללת פרוטוקול, תמיסות להכנת מדיים הגידול, פלטות מיקרוטיטר ויצור המבחן במצב רדום.

יצורי המבחן הממוחזרים (טבלה 2) נבחרים על סמך מספר קריטריונים (69, 80):

1. יכולת שימור במצב רדום לאורך זמן.
2. איכלוס בית גידול בתפוצה גלובלית.
3. מינים בעלי חשיבות אקולוגית.
4. מינים שנבחנו במבחני מעבדה סטנדרטים לאורך זמן.
5. מינים שבהם נראה כי הרגישות לאחר המזעור דומה או טובה יותר בהשוואה טרם המזעור.

טבלה 2 – מספר מבחנים ביולוגיים ממוחזרים המשוקים מסחרית.

(F) מים מתוקים, (M) מים מלוחים, (\*) בדיקת סדימנט במגע ישיר ללא מיצוי.

שם המבחן	צורת שימור	מדד נבדק	זמן מבחן (שעות)	מקור
<b>Algaltoxit F™</b> ( <i>Selenastrum capricornutum</i> )	קיבוע באלג'נט	עיכוב גידול	72	(1)
<b>Daphtokit F™</b> ( <i>Daphnia pulex</i> )	ביצים	שיתוק	48/24	(32)
<b>IQ Toxicity Test™</b> ( <i>Daphnia magna</i> )	ביצים	פלואורסנציה	24	(46)
<b>Thamnotokit F™</b> ( <i>Thamnocephalus platyurus</i> )	ביצים	שיתוק	48/24	(83)
<b>Rotoxkit F Chromic™</b> ( <i>Brachionus calyciflorus</i> )	ביצים	תמותה	24	(25)
<b>Rotoxkit M™</b> ( <i>Brachionus plicatilis</i> )	ביצים	תמותה	24	(75)
<b>Artoxkit M</b> ( <i>Artemia salina</i> )	ביצים	תמותה	24	(5)
<b>Protoxkit™</b> ( <i>Tetrahimena termophila</i> )	חיים	עיכוב גידול	24	(71)
<b>Ostracodtoxkit F™</b> ( <i>Heterocypris incognuens</i> )	ביצים	תמותה ועיכוב גידול	7 ימים *	(65)

## 1.7.1 סוללת מבחנים ממוזערים

הרעילות הנמדדת במבחנים הביולוגיים, תלויה במספר גורמים וקשורה ישירות ביצור המבחן בו נעשה שימוש (6), ולכן מבחן אחד אינו יכול לספק תמונה שלמה על מגוון חומרים רחב (9). כתוצאה מכך נוצר הצורך בשימוש במספר מבחנים שונים בעת ובעונה אחת (22). עקב המגוון הרב של יצורי המבחן האפשריים, יש להרכיב את הסוללה המתאימה על סמך מספר קריטריונים (23):

1. טווח גילוי רחב.
2. רגישות גבוהה.
3. רלוונטיות אקולוגית של יצורי המבחן לאזור הנבדק.
4. התאמה למאפייני הסביבה הנבדקת (מליחות, קשיות).
5. הפעלה פשוטה ונוחה.
6. עלות נמוכה.

השימוש בסוללת המבחנים מאפשר בחינת רעילות תוך שימוש ביצורים ברמות טרופיות שונות, המצויים בדרגות התפתחות שונות והגיוונים באופנים שונים, להרחבת טווח הגילוי והגברת רגישות הניטור.

## 1.8 זיהום נחלים

זיהום נחלים ממקור אנטרופוגני הינו תופעה הנפוצה ברחבי העולם מזה שנים רבות (34, 74), הגורמת לפגיעה בסביבה (22) ובמקורות מי-שתייה (56, 73). מקורות הזיהום עשויים להיות שפכים עירוניים, שפכים תעשייתיים (אורגניים או אנאורגניים), תשטיפים עירוניים מכבישים ומזבלות, חומרי הדברה, או שיקוע יבש או רטוב של מזהמים אטמוספריים (73). חלק גדול מנחלי ישראל מזוהמים בשפכים או קולחין עירוניים וחלקם אף בשפכים תעשייתיים (97). נוסף להשפעה הישירה של הזיהום בשפכים, קיימת השפעה עקיפה של הטייה ושאבת המים השפירים מהנחל לצרכי השקיה או תעשייה אשר מקטינים משמעותית את ספיקת הנחל (101, 102), ולכן מיהול המזהמים במים וגריפת הקרקעית המזוהמת וצמצום הנזק אינם אפשריים (1.9 ו 1.10).

### 1.8.1 זיהום סדימנטים

איכות המים העיליים הזורמים עשויה להשתנות ולהשתפר בפרק זמן קצר מאוד (שעות עד ימים) בעקבות הפסקת זיהום. אולם קרקעית הנחל המשמשת מבלע למזהמים השונים (87) עשויה להכיל

מזהמים בריכוזים גבוהים בהרבה מאלו שבמים הזורמים (24, 58). כיום הולכת וגוברת החשיבות לבחינת הרכבם ורעילותם של סדימנטים בנחלים מזהמים, הן כחלק מפתרון כולל של מזהמים בסביבה (54), והן כמדד המשקף את בריאות המערכת המימית (91). המזהמים השונים עשויים להימצא בשני אופנים: מומסים במים הבין-חלליים (87) ולכן זמינים לסביבתם או, ספוחים על גרגרי סדימנט (66), צמחים או בע"ח במקרה כזה המזהמים עשויים לשוב ולהפוך לזמינים בעקבות שינויים בתנאים הפיזיקו-כימיים (טמפ' זרמים, pH) או הפרת שיווי המשקל בין הסדימנט למים (30).

## 1.8.2 שיטות לבדיקת סדימנט

את רעילות הסדימנט אפשר לבחון בצורה ישירה או עקיפה. בבחינה ישירה נבדק הסדימנט ללא הפעלת מיצוי כלשהו (מימי או אורגני), ויצור המבחן נחשף למים הבין חלליים ולגרגרי הסדימנט על ידי מגע חיצוני או דרך מערכת העיכול. שיטה זו הולכת והופכת נפוצה יותר מאחר והיא משקפת טוב יותר את רעילות החומרים הזמינים ביולוגית (38). את הפאזה הנחלת שבמים הבין חלליים ניתן להפיק בארבע טכניקות שונות: סרכוז, סחיטה, ואקום או דיאליזה (17). טכניקת הסרכוז היא הפשוטה והנפוצה ביותר (3). לאחר ההפקה יש לבצע (במידת הצורך) התאמת פרמטרים (מליחות, pH, טמפ') על פי הקריטריונים של המבחן המבוצע. הרעילות המתקבלת בסופו של כל אחד מהתהליכים נמצאת בערכים דומים (21). דרך נוספת היא בחינה *is situ* בו מושמים יצורי המבחן בנחל הנבדק ומדדים שונים מושוים לקבוצת ביקורת שבאתר נקי (40), דרך זו משקפת בצורה הריאלית ביותר את הרעילות, אך לא ניתן ליישמה עם כל יצורי המבחן, כמו כן יתכנו שינויים פיזיקו-כימיים כגון טמפרטורה, מליחות, זרמים, pH ומסיסות גזים אשר עשויים להטות את תוצאות הרעילות (51).

### 1.8.2.1 מיצוי

בדיקה עקיפה נעשית על-ידי מיצוי הסדימנט שנועד לשחרר את המזהמים הספוחים אליו (66). בטכניקה זו ניתן למצות את הסדימנט לפאזה מימית ואורגנית (34). המיצוי המימי כולל שימוש בבופר, מים, חומצה או בסיס, תוך טלטול הסדימנט לפרק זמן מסוים וסרכוז. במיצוי אורגני לעומתו מטלטלים את הסדימנט בממס או בתערובת ממסים אורגנים על מנת לשחרר כמה שיותר חומרים אורגניים הידרופובים (58). שיטת המיצוי האורגני מציבה שני חסרונות עיקריים: האחד, השימוש בממסים אורגניים שרובם רעילים ליצורי המבחן (58) והשני, כי מיצוי אורגני אינו משקף את זמינותם הביולוגית וכן גם את רעילותם של החומרים השונים הספוחים (37).

## 1.9 נחל הירקון

הנחל זורם לאורך 27 ק"מ ממקורותיו בראש העין וחוצה את גוש דן. החל משנת 1955 הוחל בשאיבת מי המעינות והעברתם להשקיית הנגב ובכך הוקטנו ספיקות הנחל מ 220 מלמ"ש ל 1.5-6 מלמ"ש בלבד (100). פעילות זאת הובילה לפגיעה ישירה בבית הגידול המימי שהתעצמה על ידי הזרמת שפכים עירוניים ותעשייתיים לנחל שיכולת מיהולם במים ובסדימנט פחתו לפיכך בצירה ניכרת. כיום ניתן לחלק את הנחל לשלושה חלקים שונים בהתאם לאיכות המים הזורמים בו (איור 3) (100):

1. חלק טבעי – ממעינות הירקון עד למפגש נחל קנה, קטע באורך 7 ק"מ בו זורמים מים שפירים אם כי בכמויות נמוכות ובו ניתן למצוא מגוון מינים עשיר יחסית.
2. חלק מזוהם – ממפגש נחל קנה עד שבע טחנות, קטע באורך 16 ק"מ, מימיו הם למעשה שפכים מטופלים המגיעים באופן רציף ממכונני הטיהור של כפר סבא ורמת השרון, בנוסף למי שטפונות החורף הזורמים מיובלים שונים (נחל הדרים, נחל שילה ונחל פרדס).
3. חלק מלוכלך – משבע טחנות עד שפך הנחל לים, קטע באורך 4 ק"מ. מימיו של הנחל הם תמהיל של קולחין ומי ים שמליחותם משתנה בהתאם לגאות ושפל וספיקת הנחל בחלק המזוהם. בשני הקטעים האחרונים מגוון המינים בנחל קטן יחסית לחלק הטבעי.

## 1.10 נחל הקישון

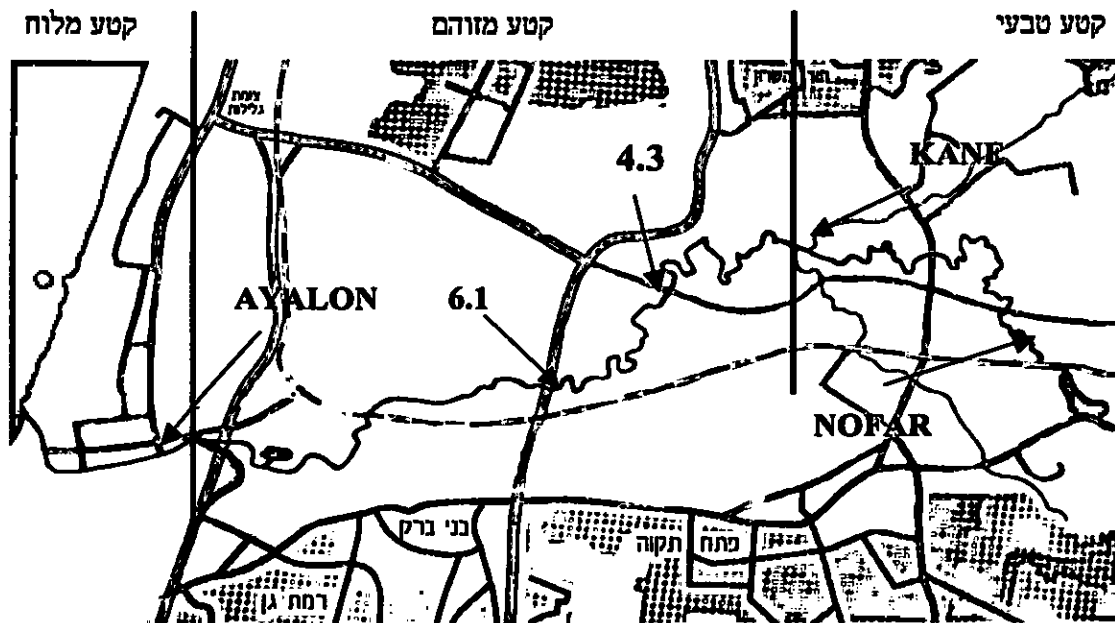
נחל הקישון זורם ממקורותיו בצפון השומרון דרך עמק יזרעאל עד למפרץ חיפה. בדומה לירקון, לפני כחמישים שנה נסכר הנחל וחלק ממימיו הוטו לצרכי חקלאות ובמקביל זוהמו מימיו בשפכים תעשייתיים ועירוניים (102). כתוצאה מכך, הנחל ניתן לחלוקה ברורה על פי איכות המים הזורמים בו (איור 4):

קטע טבעי – ממקורות הנחל באזור ג'נין עד למפגש נחל ציפורי. באזור זה זורמים מים שפירים ומעט זיהומים עירוניים-בקטריאלים אקראיים (102). לאורך קטע זה ישנה צמחיית נחלים מגוונת, וכן ניתן לראות שם עופות מים, דגים וחסרי חוליות שונים (<http://www.kishon.org.il>).

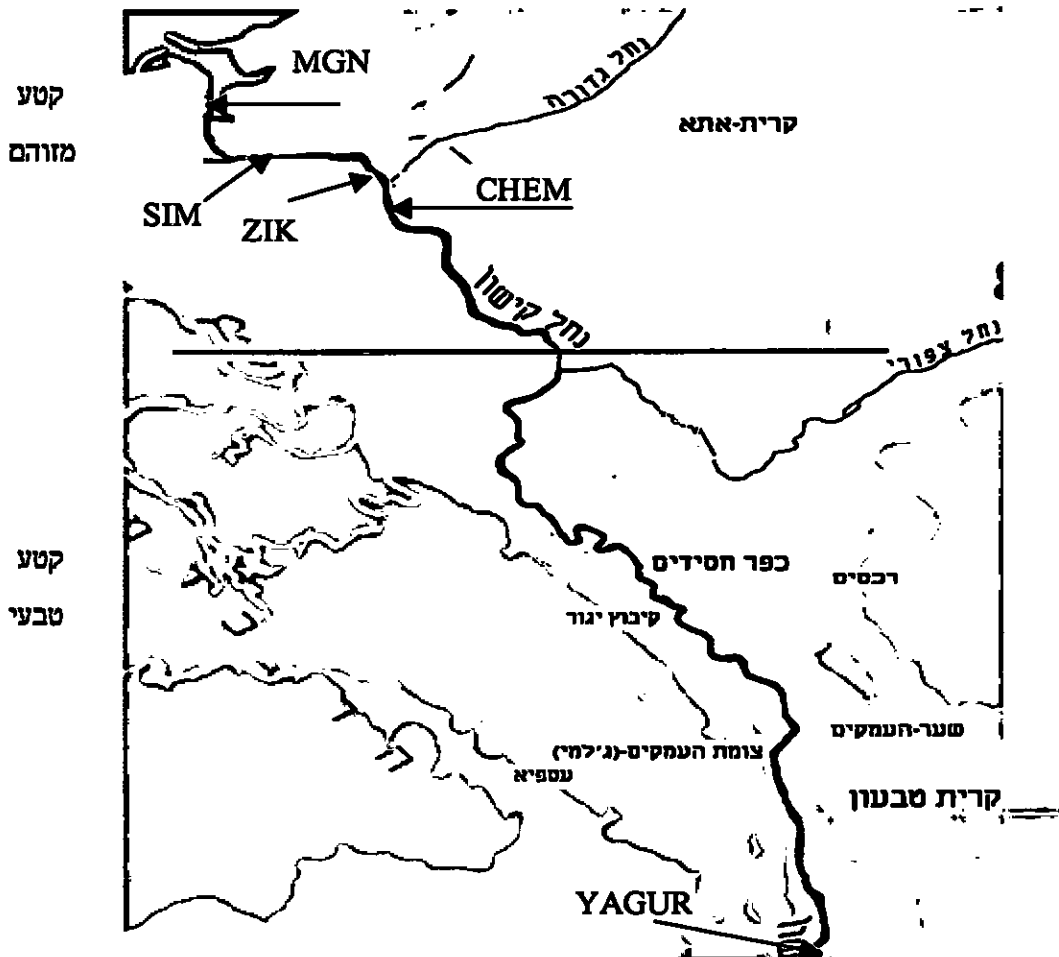
קטע מזוהם – ממפגש נחל ציפורי עד שפך הנחל, באורך 7 ק"מ. קטע זה מזוהם במשך עשרות שנים ע"י מכון טיהור שפכי חיפה ושישה מפעלי תעשייה שונים, הגורמים לזיהום כבד של נוטריאנטים, מתכות כבדות וחומרים אורגניים. אזור זה מאופיין ב- pH נמוך מאוד (2-3) (102). לאורך קטע זה ישנו תמהיל של המזהמים במי ים ההולך וגדל במורד הנחל.

בשנת 2000 הוחלט במשרד לאיכות הסביבה וברשות נחל הקישון לשקם את הנחל והחל משנת 2002 החל שלב השיקום הראשוני בו צומצמו הספיקות והרכב המזהמים שמזרמים לנחל.





איור 3 - נחל הירקון וסביבתו, אתרי הדיגום ושמותיהם, חלקי הנחל על פי איכות המים מסומנים על-ידי קו אדום מאונך.



איור 4 - נחל הקישון וסביבתו, אתרי הדיגום ושמותיהם. חלקי הנחל על פי איכות המים מסומנים בקו אדום מאונך.

## **2. מטרת המחקר ושלבי העבודה**

מחקר זה נעשה על מנת לבחון את אפשרויות יישומם של מבחני רעילות ממוזערים ככלי יעיל לניטור נחלים, מעקב אחר תשהליכי שיקום וסיוע למקבלי החלטות ברשויות הסביבתיות והמחוקקות.

### **2.1 מטרת העבודה**

1. בחינת התאמתם של מבחני רעילות ממוזערים על ידי יישומם בבחינת הרעילות הביולוגית של המים העיליים וקרקעית נחלי ירקון וקישון ותוך השוואה לאנליזות כימיות.
2. גיבוש המלצות אופרטיביות לרשויות הרלוונטיות לשימוש במבחני רעילות ממוזערים, ובה פירוט הרכב "סוללת" המבחנים התדירות הנדרשת לבחינתם ואופן השימוש בהם.
3. הפקת תמונת מצב על רעילות המים והקרקעית בנחלי הירקון והקישון והפקדת המידע הנצבר בידי הרשויות הרלוונטיות.

### **2.2 הגישה לעבודת המחקר**

נוכחות של מזהמים בריכוזים שונים במי הנחלים והצטברותם בסדימנט יגרמו לאפקט רעיל ביצורי מבחן שונים אפקט זה יורגש בעוצמות שונות בהתאם לריכוז הרעלן ולרגישות המבחן. בעוד שמוצא הנחלים כמעט ואינו מזוהם, הרי שמורדות הנחלים מזוהמים, ולפיכך ערכי הרעילות ישתנו לאורך הנחל בנקודות הדיגום השונות וכך ניתן יהיה להשוות ביניהן.

### **2.3 שלבי העבודה**

#### **2.3.1 סריקה ראשונית של הנחלים**

בשלב ראשון בוצעה סריקה ראשונית לבחינת רעילותם של המים והקרקעית בנחל הירקון והקישון ומקורותיהם במספר נקודות דיגום שונות תוך שימוש במבחן Microtox.

#### **2.3.2 בחירת נקודות מאפיינות**

לאחר הסריקה הראשונית נבחרו מספר נקודות דיגום מאפיינות להמשך העבודה:

- אזור טבעי במקורות הנחלים בו הזיהום מינימלי, ועל כן הוא משמש כייחוס לערכי הרעילות המתקבלים באזורים המזוהמים;
- אזור מרכזי באמצע הנחל בו קיימת רמת זיהום גבוהה,
- תחנה במורד הנחל בה נוכחות מי הים מעלה את המליחות ומוהלת את הזיהום. נקודות אלו נבחנו בעזרת מבחן ה - Microtox.

#### **2.3.4 יישום מבחני רעילות ממוזערים**

בשלב הבא נבחנו דוגמאות מים וסדימנט מנקודות הדיגום המשקפות את חלקיו השונים של הנחלים ע"י מספר מבחני רעילות ממוזערים תוך ביצוע סריקה במקביל לזיהוי מזהמים אורגניים ומתכות במים ובקרעית הנחל.

### 3. שיטות וחומרים

#### 3.1 דיגום

##### 3.1.1 כללי

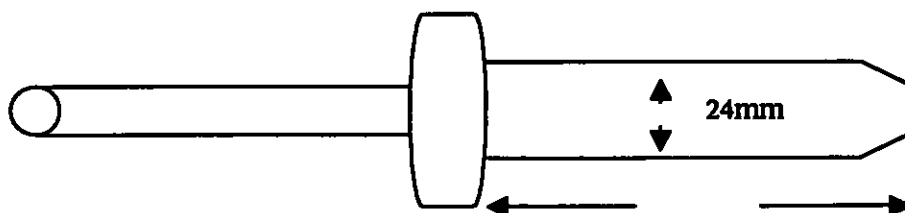
בתקופה שבין אוקטובר 1999 ליוני 2002 נידגמו דוגמאות מים ודוגמאות סדימנט מחמש נקודות דיגום שונות שלאורך נחל הקישון ונחל הירקון (איור 3 ואיור 4).

##### 3.1.1.1 דיגום מים

מכל נקודות הדיגום נלקחו דגימות מים בנפח 250ml, מגובה פני המים לבקבוקי פלסטיק סטריליים, Becton Dickinson, France) Falkon 3024. הבקבוקים נשמרו בקרח, ובתום הדיגום סוננו המים במעבדה על ידי נייר סינון בקוטר חור של 0.45µm (Millipore Corporation, USA).

##### 3.1.1.2 דיגום קרקע

מכל נקודת דיגום הוצאו גלעיני קרקע, על-ידי מתקן שנבנה באוניברסיטה העברית (איור 5). המתקן עשוי צינור פרספקס בקוטר פנימי של 24 mm, באורך 70 cm ומחובר בקצהו לצינור אלומיניום. צינור הפרספקס מוחדר לסדימנט, נאטם בפתחו העליון ומוצא עם הגלעין בתוכו. הגלעינים שהוצאו נפרסו מייד לתת-גלעינים במרווחים של כ- 10cm והועברו למבחנות פלסטיק בנפח 50 ml (Corning Incorporated, USA) שנשמרו בקרח. דוגמאות הקרקע נלקחו למעבדה ושם הופקו המים הבין-חלליים (IS) על-ידי סרכוז בצנטרפוגה Eppendorf R 5810 - 3700 סל"ד למשך 10 דקות בטמפרטורה של 4°C (Eppendorf, Germany).



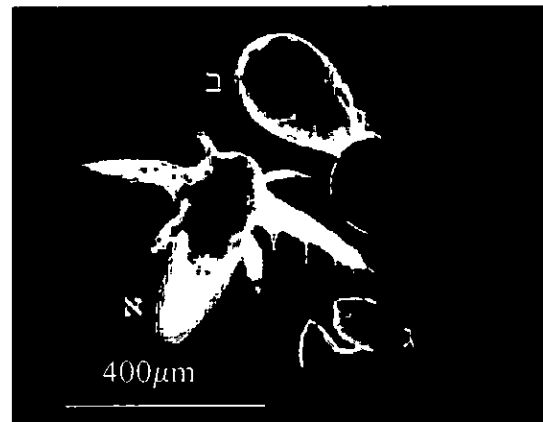
איור 5 - סכימה של מתקן להוצאת גלעינים, לא בקנה מידה.

## 3.2 מבחני רעילות

### 3.2.1 מבחני דוגמאות מלוחות

#### 3.2.1.1 מבחן *Artemia salina*

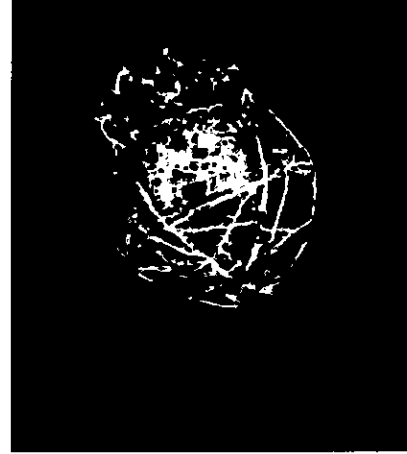
מבחן Artoxkit M™ עושה שימוש בלרוות של הסרטן הימי מהמין *Artemia salina* (איור 6). המבחן בוצע על פי פרוטוקול היצרן (5): ביצי הסרטן הושרו ב- 35 ml תמיסת מי ים מלאכותיים במליחות של 2%, בטמפרטורה של 25°C, בהארה קבועה בעוצמה של 3000 lux (GOSSEN, PANLUX electronon2 Germany) למשך כשעה ולאחריה למשך 24 שעות נוספות בחשכה. המבחן בוצע בפלטות מיקרוטיטר המכילה 24 באריות (Microbitest, Belgium). דוגמאת המים הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים. לכל בארית הוספו 1 ml מכל מיהול ועשר לרוות, הניסוי נערך במשך 24 שעות בטמפרטורה של 25°C בחשכה מלאה. כביקורת שלילית, נעשה שימוש בתמיסת מי ים מלאכותיים במליחות של 2%. בתום המבחן נספרו הפרטים המתים בכל בארית. כל מבחן בוצע בשלוש חזרות לפחות.



איור 6 - לרווה מהמין *Artemia salina* לאחר בקיעה (א) בשלב הבקיעה (ב) וכיצח מבוקעת (ג).

#### 3.2.1.2 מבחן *Brachionus plicatilis*

במבחן Rotokit M™ נעשה שימוש בלרוות של הרוטיפר הימי מהמין *Brachionus plicatilis* (איור 7) המבחן בוצע על פי הפרוטוקול (75). ביצי הרוטיפר הושרו ב 3 ml תמיסת מי ים מלאכותיים במליחות של 2% בטמפרטורה של 25°C ובהארה קבועה בעוצמה של 3000 lux למשך כשעה ולאחריה למשך 28 שעות נוספות בחשכה. המבחן בוצע בפלטות מיקרוטיטר המכילה 24 באריות (Microbiotest, Belgium). דוגמת המים הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים. לכל בארית הוספו 300 µl מכל מיהול וחמישה רוטיפרים, המבחן נערך במשך 24 שעות בטמפרטורה של 25°C בחשכה מלאה. כביקורת שלילית נעשה שימוש בתמיסת מי ים מלאכותיים במליחות של 2%. בתום המבחן נספרו הפרטים המתים בכל בארית. כל מבחן בוצע בשש חזרות לפחות.



איור 7 – פרט מהמין *Brachionus plicatilis* לאחר בקיעה.

### 3.2.2 מבחני דוגמאות מים מתוקים

#### 3.2.2.1 מבחן *Thamnocephalus platyurus*

מבחן Thamnotoxkit F<sup>TM</sup> מבוסס על שימוש בלרוות של סרטן מימי מהמין *Thamnocephalus platyurus* (איור 8). המבחן בוצע על פי פרוטוקול היצרן (83). ביצי הסרטן הושרו ב- 35 מ"ל תמיסת מים מתוקים סטנדרטית (64) למשך 22 שעות, בטמפרטורה של 25°C ובהארה קבועה בעוצמה של 3500 lux. הדוגמא הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים והועברה לפלטת מיקרוטיטר עם 24 באריות (Microbiotest, Belgium). לכל בארית הוספו 1 מ"ל מהדוגמא ועשר לרוות, שהודגרו למשך 24 שעות בטמפרטורה של 25°C בחשכה. כביקורת שלילית שימשה תמיסת מים מתוקים סטנדרטית. בתום המבחן נספרו הפרטים המתים בכל בארית. כל מבחן בוצע בשלוש חזרות לפחות.



איור 8 - לרווה מהמין *Thamnocephalus platyurus* לאחר בקיעה.

### 3.2.2.2 מבחן *Daphnia pulex*

במבחן הרעילות Daphtoxkit F™ נעשה שימוש בלרוות של הסרטן המימי מהמין *Daphnia pulex* (איור 9). המבחן בוצע על פי הפרוטוקול (32): ביצי הסרטן הושרו ב 35 ml תמיסת מים מתוקים למשך 72-96 שעות, בטמפרטורה של 20°C, בהארה קבועה בעוצמה של 6000 lux. המבחן בוצע בפלטות מיקרוטיטר המכילות 30 באריות (Microbitest, Belgium). דוגמת המים הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים. לכל בארית הוספו 1 ml מהדוגמא ועשר לרוות, שהודגרו למשך 24 שעות באותה הטמפרטורה ועוצמת אור. כביקורת שלילית נעשה שימוש בתמיסת מים מתוקים סטנדרטית. בתום המבחן נספרים הפרטים המתים בכל בארית. כל מבחן בוצע בארבע חזרות לפחות.



איור 9 - פרטים מהמין *Daphnia pulex* לאחר בקיעתם.

### 3.2.2.3 מבחן *Tetrahymena thermophila*

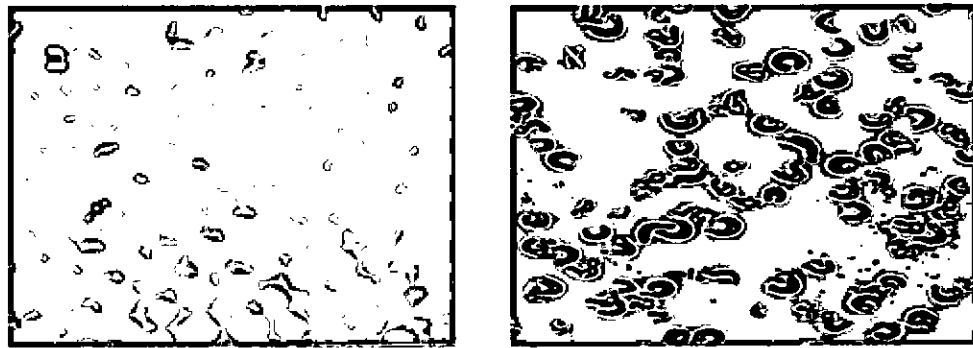
במבחן הרעילות Protoxkit F נעשה תוך שימוש בפרטים מהריסנית *Tetrahymena thermophila* (איור 10). המבחן בוצע עלפי הפרוטוקול (71). המבחן מבוסס על מדידת עיכוב חלוקת תא וצריכת מזון מוסף לאחר 24 שעות חשיפה. המבחן בוצע בתוך קיוטות פלסטיק בנפח סופי של 4 ml. דוגמאת המים הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים. לכל קיוטה הוספו 2 ml מכל מיהול, 40 µl תרחיף פרוטוזואה (O.D 0.030 440nm) ו 40 µl מתמיסת מזון המסופק בערכה (Microbitest, Belgium) הקיוטות הודגרו בטמפרטורה של 30°C למשך 24 שעות בחושך, ובסיום המבחן נמדדה הכליעה האופטית באורך גל 440 nm בעזרת ספקטרופוטומטר (VARIAN, Australia) CARY 1E כביקורת חיובית נבדקה דוגמת DDW.



איור 10 - פרט מהריסנית *Tetrahymena thermophila*.

#### 3.2.2.4 מבחן *Selenastrum capricornutum*

מבחן Algatokit מבוסס על האצה מהמין *Selenastrum capricornutum* (איור 11) המקובעת באלגינט ומבוסס על עיכוב גידול. המבחן בוצע על פי הפרוטוקול (1). לאחר המסת האלגינט ושטיפתו שוחררו האצות, והורחפו במדיום הגידול (45). המבחן בוצע בקיווטות גידול בעלות תא באורך 10 cm (Microbitest, Belgium). הדוגמא הנבדקת עברה סדרה של חמישה מיהולים כפולים ולכל קיווטה הוספו 25 ml מהדוגמא ו  $250 \mu\text{l}$  תרחיף אצות בריכוז סופי של  $10^4$  אצות במ"ל. המבחן נערך במשך 72 שעות בטמפרטורה של  $24^{\circ}\text{C}$  תחת הארה קבועה בעוצמה של  $3500 \text{ lux}$ . בתום המבחן נמדדה הצפיפות האופטית באורך גל 670nm בספקטרופוטומטר. כביקורת שלילית נעשה שימוש במדיום הגידול.



איור 11 - תאי אצות *Selenastrum capricornutum* בצורתם החופשית (א), ובצורה המקובעת באלגינט (ב).

#### 3.2.2.5 מבחן Microtox

במבחן זה נעשה שימוש בחיידק ימי מיוכש בהקפאה מהמין *Vibrio fischeri* (Azur Ltd.) ומבוסס על עיכוב ההארה הטבעית של החיידק. המבחן בוצע על פי המומלץ (72), למעט שינוי אחד. לחיידקים המיוכשים הוספו ( $1-4^{\circ}\text{C}$ ) 1 מ"ל מים מזוקקים ו-19 מ"ל Tris Buffer 50mM המכיל 2% NaCl ב  $\text{pH}=7$ .

המבחן נעשה בפלטות מיקרוטיטר לבנות אטומות (Germany, Dynatech) בעלות 96 באריות. הדוגמאות השונות עברו סדרה של שבעה מיהולים כפולים בעזרת Tris Buffer 50mM המכיל 2% NaCl, לגנף סופי של  $100 \mu\text{l}$  בכל בארית. לכל בארית בפלטת המיקרוטיטר הוספו  $20 \mu\text{l}$  תמיסת חיידקים. לאחר 15 דקות בהן הודגרה הפלטה ב  $15^{\circ}\text{C}$  נמדדה ההארה באמצעות מכשיר לומינומטר מדגם Anthos Lucy 1 (Labtec Instruments, Austria). בכל המבחנים כוסתה הפלטה בכיסוי פלסטיק שקוף. כל ניסוי בוצע בשתי חזרות. הדוגמאות הנוזליות עברו סינון בניר סינון בקוטר חור של  $0.45 \mu\text{m}$  (Millipore Corporation, USA) טרם המבחן.



### 3.2.3 מבחן סדימנט ישיר

#### 3.2.3.1 מבחן *Heterocypris incongruens*

במבחן הרעילות הכרוני Ostracodtoxkit F™, נעשה שימוש בלרוות של סרטן מימי מהמין *Heterocypris incongruens* (איור 12). המבחן בוצע על פי הפרוטוקול: ביצי הסרטן הושרו ב- 35 ml תמיסת מים מתוקים סטנדרטית למשך 52 שעות, בטמפרטורה של 25°C, בהארה קבועה בעוצמה של 3500 lux. המבחן בוצע בפלטת מיקרוטיטר בעל 12 באריות (Microbitest, Belgium). לכל בארית הוספו 300µl סדימנט, 2 ml תרחיף אצות מהמין *Rophidocelis subcapitata* בריכוז  $3 \times 10^7$  תאים ב 1 ml ועשר לרוות. הפלטה הודגרה למשך 6 ימים בטמפרטורה של 25°C בחשכה וטולטלה באופן ידני אחת ליומיים. כביקורת שלילית נעשה שימוש בסדימנט נקי (Microbiotest, Belgium). בתום המבחן נספרו מספר הפרטים המתים. כל מבחן בוצע בארבע חזרות לפחות.



איור 12 - פרט מהמין *Heterocypris incongruens*.

### 3.3 חישובי רעילות

#### 3.3.1 חישובי רעילות למבחני TOXKIT

במבחני Daphtoxkit, Thamnotoxkit, Artoxkit, Ostracodtoxkit, Rotoxkit הרעילות מבוטאת בערך  $LC_{50}$  או  $EC_{50}$  שהוא ריכוז הדוגמא המחושב הגורם לפגיעה ב 50% מיצורי המבחן (בדוגמת הביקורת השלילית, לא תעלה הפגיעה על 10%). לצורך החישוב שורטט על גבי גרף חצי לוגריתמי אחוז הפגיעה כפונקציה של ריכוז הדוגמא.

$$R_i = N_i / N_0 \quad \text{כך: } R_i = \text{אחוז הפגיעה מחושב כך}$$

$$R_i = \text{אחוז הפגיעה בריכוז } i$$

$$N_i = \text{מספר יצורי המבחן שנפגעו בריכוז } i$$

$$N_0 = \text{מספר יצורי המבחן בביקורת (ריכוז דוגמא 0\%)}$$

במבחן ה Protoxkit אחוז הפגיעה מחושב באופן הבא:

$$R = (1 - \Delta OD_i / \Delta OD_0) \times 100$$

$R =$  אחוז העיכוב.

$\Delta OD_i =$  השינוי בבליעה האופטית של דוגמא ריכוז  $i$ .

$\Delta OD_0 =$  השינוי בבליעה האופטית של הביקורת.

במבחן ה Algaltokit אחוז הפגיעה מחושב באופן הבא:

$$R = (OD_0 - OD_i) / OD_0$$

$R =$  אחוז העיכוב.

$OD_0 =$  הבליעה האופטית של הביקורת השלילית.

$OD_i =$  הבליעה האופטית של דוגמא בריכוז  $i$ .

$EC_{50} / LC_{50} / IC_{50}$  הוא הריכוז (באחוזים או  $mg/l$ ) בו קו ההתאמה הלינארי נחצה על ידי האנך היוצא מהערך של 50% פגיעה.

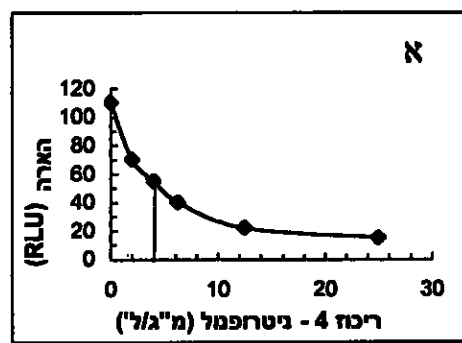
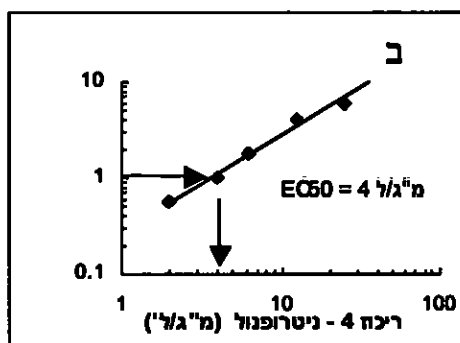
### 3.3.2 חישוב ערכי $EC_{50}$ למבחן Microtox

הרעילות מבוטאת בערך  $EC_{50}$  שהוא ריכוז הדוגמא הנבדקת הגורם לירידה ב 50% בעוצמת ההארה, בהשוואה להארת דוגמת בקרה, שכוללת את כל מרכיבי המבחן ללא הדוגמא הנבדקת. לצורך החישוב,

משתמשים בפקטור  $\Gamma$  (Gamma), המוגדר כיחס בין הירידה בעוצמת ההארה להארת הביקורת (18):

$$\Gamma = (I_c - I_s) / I_s$$

$I_c$  - דוגמא גרפית לאופן החישוב של רעילות החומר 4-ניטרופנול, מובאת באיור 13.



איור 13 - דוגמא לחישוב רעילות במבחן Microtox. עוצמת הארה כתלות בריכוז 4-ניטרופנול (א) וערכי  $\Gamma$  לריכוזים השונים (ב).

$I_c$  - הארת מערכת הביקורת (0% דוגמא).

$I_s$  - הארה בנוכחות הדוגמא הנבדקת בריכוז  $s$ .

$EC_{50}$  הוא הריכוז בו  $I_s = I_c / 2$ . משוואה זו מתקיימת כאשר  $\Gamma = 1$ .

EC<sub>50</sub> נקבע על ידי שרטוט ערכי  $\Gamma$  כפונקציה של ריכוז הדוגמא בגרף לוגריתמי כפול. הריכוז בו קו ההתאמה חוצה את ציר ה-X ב-  $\Gamma = 1$  הוא EC<sub>50</sub> (18).

### 3.4 אנליזת מתכות

אנליזה לקביעת ריכוזי המתכות בדוגמאות המים השונות משלושה תאריכי דיגום שונים, נעשתה ע"י שימוש ב ICP axial Optime 3000 XL (Perkin Elmer, USA). המכשיר כויל עם תמיסות סטנדרטיות והחמצת הדוגמאות ע"י HNO<sub>3</sub> בדרגת ניקיון suprapur (Merck, Germany).

### 3.5 אנליזת חומרים אורגניים

#### 3.5.1 אנליזת פאזות מימיות

500 ml מהדוגמא המימית (IS ו RW) מוצו ע"י הוספת 100 ml פטרול אתר (Merck, Germany) ו- 100 ml דיכלורומתאן (Merck, Germany) למשפך מפריד. הדוגמא עורבבה והונחה למשך מספר דקות עד להפרדת פאזות. הפאזה האורגנית הופרדה ונלקחה ואילו הפאזה המימית עברה מיצוי נוסף בעזרת 100ml דיכלורומתאן באותו אופן. הפאזה האורגנית שהתקבלה משני המיצויים הועברה דרך גבישי NaSO<sub>4</sub> על מנת לספוח את שאריות המים. הפאזה האורגנית שהתקבלה הועברה למנדף למשך מספר דקות, לנידוף הממסים. לאחר הנידוף הומסה הפאזה ב 5 ml מתנול והחרקה ל GCMS HP5890 (Hewlett Packard, USA) בעל קולונה מדגם (Alltech, USA) AT624. התוצאות מוצגות כריכוז החומר ב 1 ml מהפאזה המימית.

#### 3.5.2 אנליזת קרקע

50 g קרקע שלא עברה סרכוז מוצתה ב 100ml אצטון בטלטול למשך 12 שעות בטמפרטורת החדר. הדוגמא סורכוה לקבלת פאזה נחלית נפרדת. פאזה זו עברה מיצוי כפי שפורט בסעיף 3.5.1. התוצאות מוצגות כריכוז החומר ב mg/l.

#### 3.5.3 זיהוי החומרים וקביעת ריכוז חצי כמותי.

החומרים השונים בדוגמאות (מיצוי קרקע ודוגמאות מימיות) זוהו על פי השוואת זמני יציאתם מהקולונה לאלו של חומרים ידועים בעזרת MS מדגם HP5989A (Hewlett Packard), תוך שימוש בספריית נתונים. קביעת ריכוזם החצי כמותי של החומרים נעשה על ידי השוואת גובה השיא של כל חומר לעקום כויל של אורטוקסילן (Merck, Germany). עקום הכויל התקבל מהשוואת גובהי השיאים השונים המתקבלים ביציאה מהקולונה לאחר הזרקת האורטוקסילן במספר ריכוזים ידועים.

### 3.5.4 קביעת ריכוזים מדויקת

ריכוזם המדויק של מספר חומרים בדוגמא נקבע על ידי השוואת גובה השיא של כל חומר שזוהה לעקום כול ספציפי, שהתקבל מהשוואת גובהי השיאים השונים המתקבלים ביציאה מהקולונה לאחר הזרקת סטנדרט של כל חומר בריכוזים ידועים. כל הממסים והסטנדרטים ששימשו לאנליזת חומרים אורגניים, הינם ברמת ניקיון suprapur .

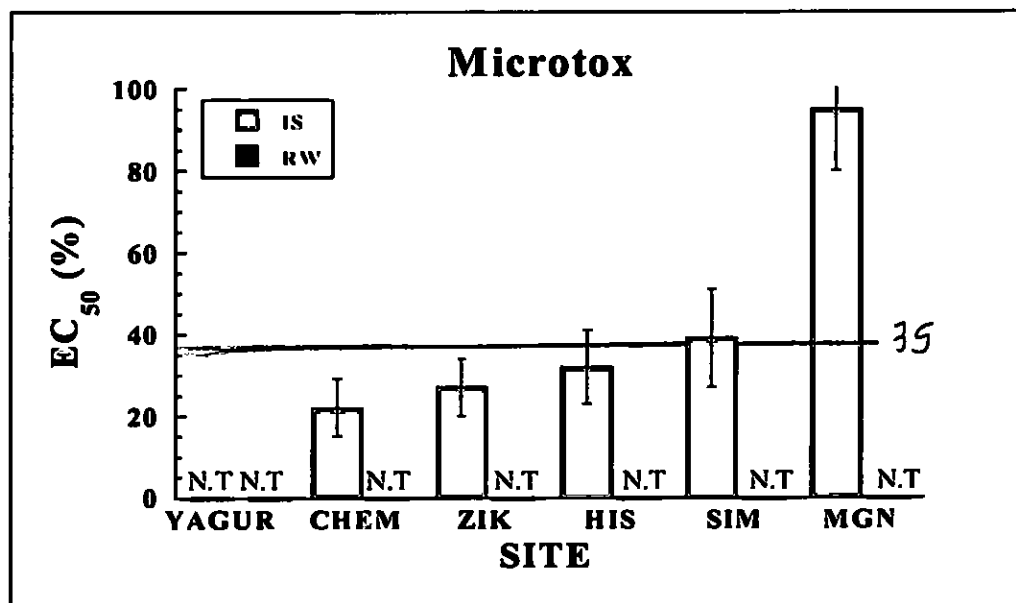
## 4. תוצאות

### 4.1 נחל הקישון – רעילות

#### 4.1.1 מבחן Microtox

בנחל הקישון נבחנו 5 נקודות שונות המייצגות קטע נקי – YAGUR, מזוהם – LEB HIS, CHEM, ZIK, ומלוח – MGN. בנקודות אלו נבדקה רעילותם של דוגמאות המים העיליים והמים החלליים שהופקו מגלעינים שחולקו למקטעים של 10 cm. ראשית נעשתה הבדיקה על-ידי מבחן החיידקים המאירים ובהמשך בעזרת מבחני *Artemia*, *Brachionus*, *Daphnia*, *Thamnocephalus*. התוצאות מוצגות באיורים 14-17 בהתאמה.

איור 14 מציג את התוצאות שהתקבלו ממבחן החיידקים המאירים (Microtox) תוך השוואת הרעילות שבסדימנט אל מול רעילות המים הזורמים. הרעילות מבוטאת בערך  $EC_{50}$ . ניתן לראות בבירור כי במבחן זה הנחשב לנפוץ ולמקובל כיום, לא זוהתה כל רעילות בדוגמאות המים העיליים מכל נקודות הדיגום (N.T = no toxicity), ולעומת זאת בסדימנט זוהתה רעילות ברורה בכל נקודות הדיגום. הרעילות נמצאת במגמת ירידה לאורך הנחל. בנקודה CHEM שבה נפח ועומס המזהמים הגדול ביותר בנחל (103), זוהתה הרעילות הגבוהה ביותר אשר הולכת ופוחתת בהדרגה לאורך הנחל. בנקודת הדיגום MGN בה הרעילות נמוכה מכולן, אין מוצא קרוב לשפכים, אלה מגיעים ממעלה הנחל ונמהלים במי הים ומתפרסים על פני נפח ושטח קרקעית רחב יותר, לפיכך הרעילות שזוהתה בנקודה זו נמוכה בצורה מובהקת ( $p < 0.02$  T-test) משאר הנקודות.

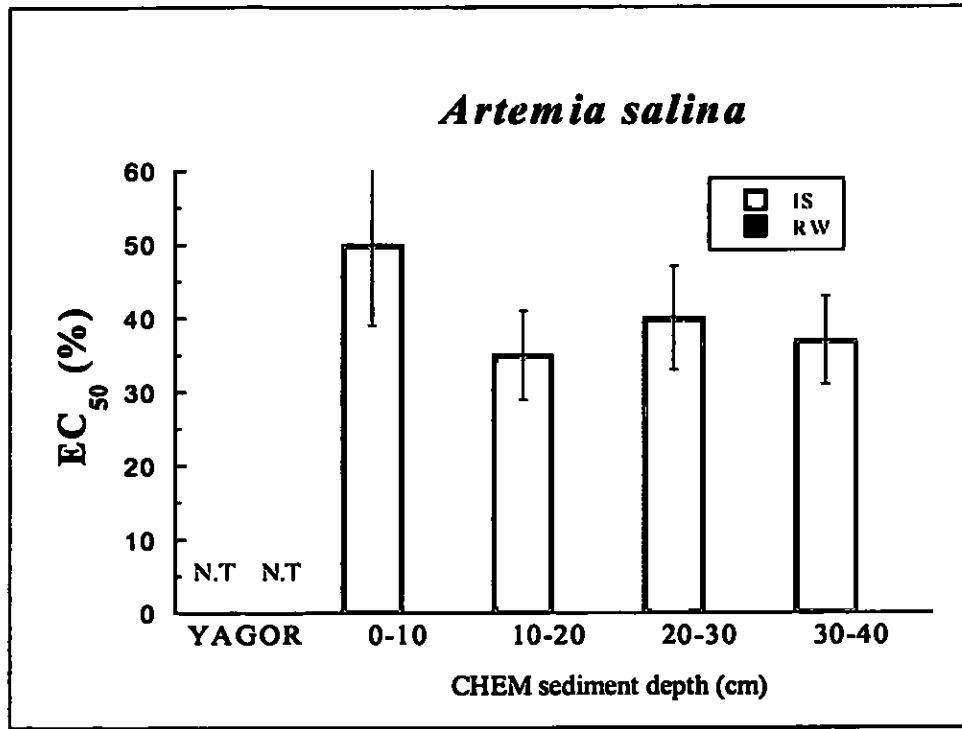


איור 14 – תוצאות רעילות במבחן Microtox בנקודות הדיגום בנחל הקישון. N.T. – לא זוהתה רעילות. IS – מי סדימנט; RW – מי הנחל.

## 4.1.2 מבחני *Artemia salina* ו *Brachionus plicatilis*

בעקבות התוצאות ממבחן המיקרוטוקס נבחנו כל אותן נקודות הדיגום על-ידי מבחנים נוספים, המיועדים לבחינת דוגמאות מלוחות המאפיינות את מימי נחל הקישון.

מבחן הארטמיה לא נחגלה רעילות במים או בסדימנט באף לא אחת מהנקודות למעט בנקודה CHEM בה מוצגת הרעילות שזוהתה בעומקים השונים באיור 15.



איור 15 - תוצאות רעילות במבחן *Artemia salina* בנקודות הדיגום YAGOR ו CHEM בעומקים השונים N.T - לא נמצאה רעילות. IS - מי סדימנט; RW - מי הנחל.

הרעילות בשכבות הסדימנט השונות דומה, למעט העליונה שיתכן ונראית רעילה מעט פחות. יתכן שדוגמא זו מושפעת מקולחי חיפה המזורמים סמוך מאוד לנקודה זו ובכך מוהלים במעט את המזהמים השונים.

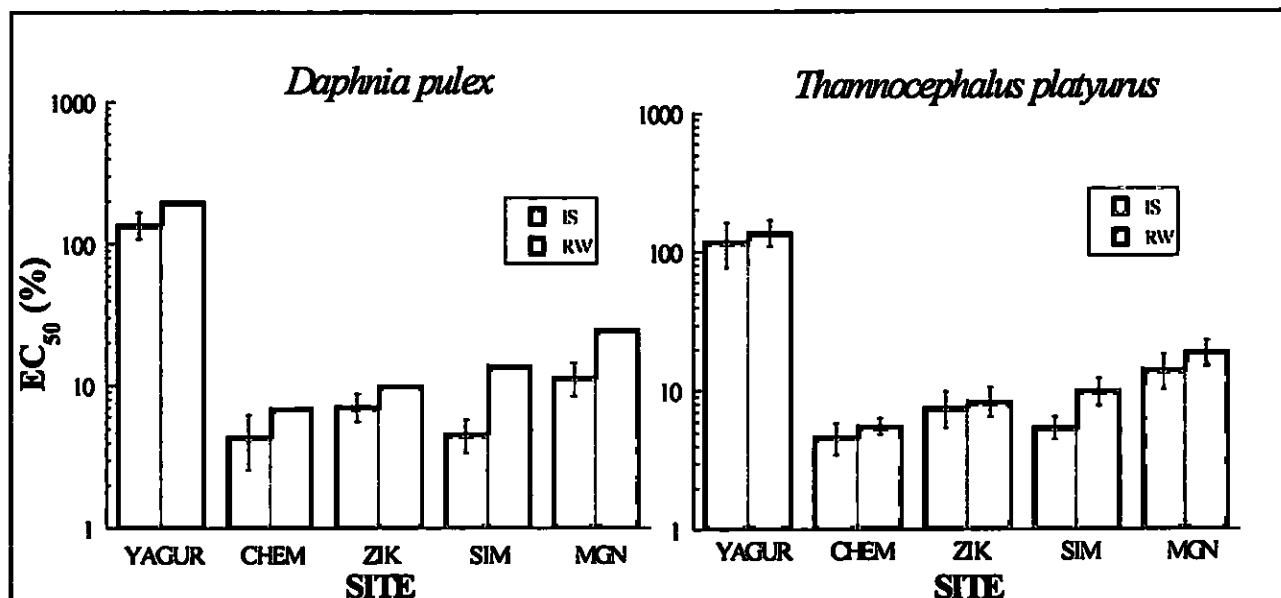
מבחן ה- *Brachionus* המוגדר אף הוא, בדומה למבחן ה *Artemia*, כמבחן רעילות אקוטית לדוגמאות מלוחות, לא זיהה כלל רעילות בכל נקודות הדיגום השונות (מידע אינו מוצג). על מנת לנסות להגביר את רגישות המבחן הווארך משך החשיפה ל 48 שעות (במקום 24) שלאחריון זוהתה רעילות רק בנקודת הדיגום CHEM על כל עומקיה כפי שנמצא גם במבחן ה *Artemia*, אולם בערכי EC<sub>50</sub> גבוהים יותר הנעים בין 86-110%.

### 4.1.3 מבחני *Daphnia* ו *Thamnocephalus*

העובדה כי לא נמצאה רעילות במים העיליים על-ידי המבחנים שפורטו לעיל ניתנת להסבר בשני אופנים:  
 (א) ריכוז רעלנים ומזהמים ברמה נמוכה מאוד.

(ב) רגישות נמוכה של יצורי המבחן.

על מנת ולקבוע את הגורם, נבחנו אותן הנקודות עם מבחנים נוספים: *Daphnia* ו *Thamnocephalus*  
 (איור 16, 17) למרות העובדה כי מבחנים אלו מיועדים לדוגמאות מים מתוקים, לאחר מיהול הדוגמאות  
 אל מתחת למליחות המקסימלית המותרת לכל יצור מבחן.



איור 17 – רעילות מים וסדימנט בנקודות הדיגום בנחל הקישון על פי מבחן *Daphnia pulex* IS – מי סדימנט; RW – מי הנחל.

איור 16 – רעילות מים וסדימנט בנקודות הדיגום בנחל הקישון על פי מבחן *Thamnocephalus platyurus* IS – מי סדימנט; RW – מי הנחל.

מהשוואת רעילות הסדימנט והמים העיליים שהתקבלה ממבחנים אלו לעומת אלו שהתקבלו ממבחני החיידקים, הארטמיה והרוטיפר ניתן לזהות מספר מגמות:

(א) לראשונה זוהתה רעילות במים העיליים, עובדה המעידה כי העדר הרעילות במים העיליים שהתקבלה במבחני החיידקים, הארטמיה והרוטיפר נובעת מרגישותם הנמוכה יחסית למבחני ה *Daphnia* ו *Thamnocephalus*.

(ב) לראשונה זוהתה גם רעילות באתר הביקורת – YAGUR, אם כי קטנה בסדר גודל מיתר הנקודות שלאורך הנחל. מכאן עולה כי קטע זה מזוהם בצורה פחותה וכנראה ממקור שונה (יתכן למשל, תשטיפי כביש וחומרי הדברה ממקור חקלאי) לעומת מורד הנחל. הרעילות הנמוכה יחסית עדיין פוגעת ביצורי המבחן.

(ג) מגמת הירידה ברעילות מהנקודה CHEM במורד הנחל מסתמנת בשני המבחנים הנ"ל בדומה למבחן החיידקי.

ד) בכל המקרים, רעילות מי הסדימנט גבוהה משמעותית מרעילות המים העיליים.

משקלול התוצאות ניתן לדרג את המבחנים על סמך רגישותם לדוגמאות שנבדקו מנחל הקישון מהרגיש יותר לפחות:

*Artemia salina* < *Microtox* < *Thamnocphalus platyurus* = *Daphnia pulex*  
*Brachionus plicatilis*

## 4.2 אנליזה כימית - קישון

רעילות הדוגמאות השונות נובעת מנוכחות מתכות וחומרים אורגניים שונים אשר מגיעים למי הנחל וקרקעיתו ממספר מקורות זיהום הסמוכים לנחל. ריכוזם של אלה נקבע באנליזות כימיות שונות על מנת לזהות את המזהמים השונים וריכוזיהם ובכדי לנסות ולקבוע את תרומת הרעילות של כל חומר בנפרד לסך הרעילות.

### 4.2.1 אנליזה אורגנית

דוגמאות הקרקע מנקודות הדיגום CHEM, ZIKUK, MGN, YAGUR עברו מיצוי אורגני של המים הבין חלליים ושל הסדימנט הרטוב (ללא סרכוז). פאזה זו הוזרקה למכשיר GCMS והתקבלה רשימת חומרים שזוהו יחד עם ריכוזיהם. טבלה 3 מפרטת את רשימת החומרים שהופקו מכלל החומרים שזוהו ולהם מידע בספרות על רעילותם.

טבלה 3 - רשימת החומרים הרעילים שאותרו מכלל החומרים שנמצאו בנחל הקישון, שימושים עיקריים, וריכוזם ב mg/g sediment  
 IS - מיצוי מים חלליים, EX - מיצוי סדימנט ללא הפרדת המים החלליים, r - זוהה במיצוי מי הנחל. הריכוזים ב-mg/l.

חומר	שימושים עיקריים	CHEM		ZIK		MGN		YAGUR	
		IS	EX	IS	EX	IS	EX	IS	EX
2-Methyl Naphtalene	חומר הדברה, תעשיית צבע				0.05		1.7		
1-Methyl Naphtalene	תעשיית צבע				0.04				
nonyl Phenol	חומר הדברה, חומר סיכה, ייצור שרף, גומי/פלסטיק						0.4		
Isooctyl Mercaptoacetate	חומר הדברה, Plasticizer		13						
DL-Limonene	ממס אורגני, ייצור שרף, חומר טעם	0.1 r					0.05		
Tributyl Phosphate	ייצור שרף, לכה, גומי/פלסטיק תעשיית צבע, נוזל הידראולי	0.4		0.07	4				



חומר	שימושים עיקריים	CHEM		ZIKUK		MGN		YAGUR	
		IS	EX	IS	EX	IS	EX	IS	EX
4-Hydrox-4-methyl-2-Pentanone	ממס אורגני, ייצור שרף, חומר משמר,	0.1 r					0.02		0.02
Pentanoic acid	חומר סיכה, Plasticizer חומר טעם, תעשיית קוסמטיקה וחקחות	2.8 26							
Butanoic acid	חומר חיטוי, ייצור גומי, ייצור לכה, רוקחות, חומר טעם	0.4							
4-Methyl Phenol	ממס אורגני, ייצור שרף, ייצור פלסטיק חנ"פ תעשיית צילום, חקחות	1.4 19					0.04		0.3
Benzeneacetic Acid	חומר הדברה, חומר טעם, קוסמטיקה, ייצור פנצילין	0.3							
Pentadecane	ממס אורגני, ייצור פרפין, אוליפין, כהלים, חומצה ציטרית וסולפונטים, תעשיית הגומי.	0.2	10	0.1	2				
Tetradecane		0.7		0.1	4				
Tridecane				0.2	5.6 116	0.01	3.2		
Undecane			2		0.2 21		0.01		
Dodecane			1.5		0.3	5	0.01		
Hexadecanoic acid		0.1		0.2	1.6		2.1		
2,4-bis(1,1-dimethylethyl) Phenol	ייצור פנלים, הגנה מפני U.V	0.0 1r					0.012		
1,2- Bis Benzenedicarb-oxylic acid,	ייצור שרפים, נוזל דיאלקטרי, Plasticizer		18				2.4		
1-Undecanol	חומר טעם, תעשיית קוסמטיקה		12						
1-Octanamine N,N-dioctyl	תעשיית צבע		68 463		1.1				0.4

ריכוזם של החומרים השונים המצויינים בטבלא 3 נקבע ב 2 דרכים:

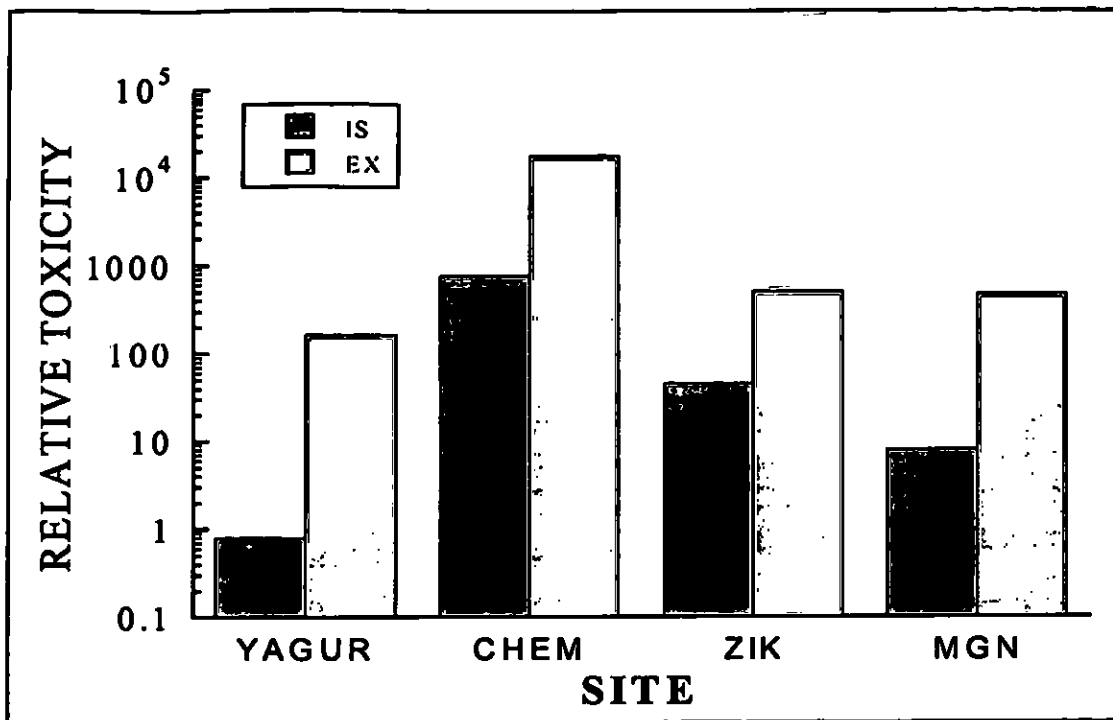
- 1) קביעה חצי כמותית (הערכה על סמך השוואה לריכוזי אורתוקסילן כעקום כיוול מקורב)
  - 2) כמותי תוך שימוש בעקומי כיוול ספציפיים. ריכוזים אלו מופיעים בטבלה כמספרים נטויים ומודגשים. מהשוואת ריכוזי החומרים בשתי השיטות עולה כי האפיון החצי כמותי גורם לתת-הערכה לגבי ריכוזם של החומרים השונים בפקטור הנע בין פי 9-20. לאור האמור לעיל, סביר כי חלק מהערכים בטבלה הנ"ל ובאיור 20 עשויים להיות גבוהים הרבה יותר. אולם מאחר ועיקר התוצאות הינן מההערכה החצי כמותית, ההתייחסות לתוצאות מבוססת על ערכים אלה.
- מניתוח טבלה זו עולה כי מספר חומרים מצומצם ובריכוזים נמוכים וזהו בדוגמאות מי הנחל לעומת דוגמאות מים חלליים בהן נמצאו מגוון חומרים רחב יותר ובריכוזים גבוהים יותר. חומרים אלה הם בעלי שימושים שונים בתעשייה וכן בעלי מגוון תחומי רעילות. במיצוי הכללי (EX) נתגלו חומרים רבים יותר ובריכוז גבוה יותר יחסית לשאר הדוגמאות. תוצאה זו נובעת מספיחה והצטברות המזהמים על גבי הסדימנט ושחרורם בריכוז גבוה יותר לפאזה אורגנית במיצוי אורגני, לעומת הפאזה המימית, עקב ערכי מסיסות נמוכים יותר במים. עוד מסתמן כי מספר וריכוז החומרים הגבוהים ביותר נמצא בנקודת הדיגום CHEM ומשם קיימת מגמת ירידה עם ההתקדמות במורד הנחל עד למינימום בנקודת הדיגום NOFAR ששימשה כביקורת שלילית.

## 4.2.2 תרומת רעילות חומרים אורגנים

מאחר ורמתם של הרעלנים האורגנים מתנהגת באופן "דומה" לזו של תוצאות הרעילות בנקודות הדיגום, נעשה ניסיון ראשוני להעריך את מידת תרומתם של מזהמים בדידים לרעילות הכללית. לשם כך נלקח מהספרות לכל חומר ערך הרעילות  $LD_{50}$ . ערך זה חולק בערך הרעילות הגבוה ביותר שנמצא לחומר הרעיל פחות, לקבלת "פקטור רעילות" (טבלה 4). פקטור זה הוכפל בריכוז החומר לקבלת ערך מספרי כלשהו נטול יחידות. ככל שערך זה שהתקבל גבוה יותר אזי החומר הוא בעל רכיב רעילות גבוה יותר בדוגמא. סכימת כלל רכיבי הרעילות של החומרים השונים בדוגמא מסוימת עשוי להצביע על הרעילות הצפויה (מחומרים אורגנים בלבד) ועל הבדלים בערכי הרעילות בין דוגמאות שונות (איור 18).

טבלה 4. רשימת החומרים הרעילים שאותרו בנחל הקישון, ערכי הרעילות ליצורי מבחן שונים ופקטור הרעילות...  
 פקטור רעילות חושב בנפרד ליצורי המבחן Mouse ו Rat על פי המוסבר. # IV הזרקה תוך ורידית.

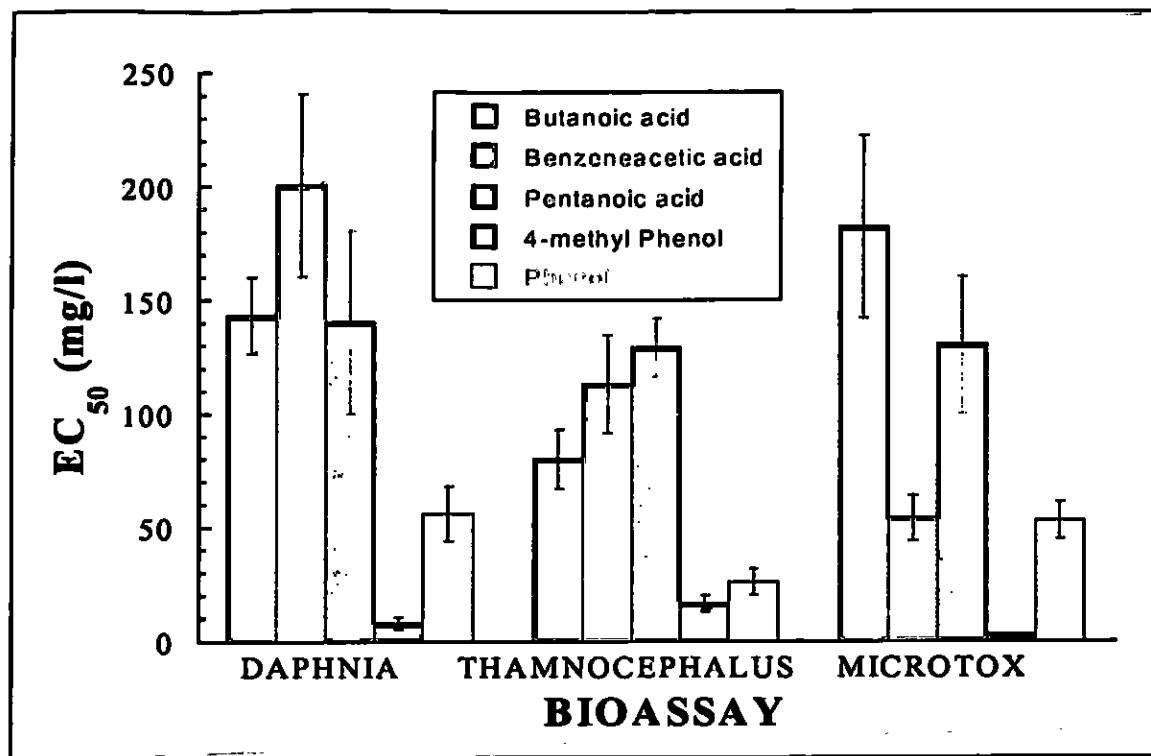
חומר	LD <sub>50</sub> Oral Rat (mg/Kg)	LD <sub>50</sub> IV # Mouse (mg/Kg)	"פקטור" רעילות	EC <sub>50</sub> Fish (mg/l)	LC <sub>50</sub> Daphnia (mg/l)
4-Methyl Phenol	207		63		
Isooctyl mercaptoacetate	348		37		
Pentanoic acid	600		22	77	45
Tributyl Phosphate	1200		10.9	13	2.6
2,4-BIS(1,1- DiMethylEth) Phenol	1500		8.7		
Phenol nonyl	1620		8	0.14	
4-nony Phenol	1620		8		
2-Methyl Naphtalene	1630		8		0.18
1-Methyl Naphtalene	1840		7.1	2.6	1.4
Butanoic acid	2000		6.5		61
Benzenacetic acid	2250		5.8		
1-Undecanol	3000		4.35	1.04	
4-Hydroxy-4-Methyl2-Pentanone	4000		3.3	420	
1-methyl-4-(1-methyl ethyl) Benzen	4750		2.75		
DL-Limonene	5000		2.6		
1-Octanamine N,N dioctyl	5600		2.33		
Hexadecane	5800		2.25		
1,2 Benzenedicarboxylic acid, bis	13060		1		
Hexadecanoic acid		57	102		
Undecane		517	11.2		
Tridecane		1161	5		
Dodecane		2672	2.2		
Pentadecane		3493	1.7		
Ttradecane		5800	1		



איור 18 – תרומת הרעילות האורגנית המחושבת באתרי הדיגום בנחל הקישון לאחר מיצוי אורגני של המים הבין חלליים וסדימנט ללא סרכוז. IS – מי סדימנט; RW – מי הנחל.

איור 18 מציג את סך הרעילות המחושבת לחומרים אורגנים רעילים שזוהו בדוגמאות השונות. על אף שערכים אלו נובעים רק מחומרים עליהם קיים מידע טוקסיקולוגי מתוך כלל החומרים שזוהו באנליזה, (טבלה 3, 4), ניתן להבחין כי ערכה של הרעילות הגבוהה ביותר כפי שחושבה ב 2 סוגי הדוגמות הינה בנקודה CHEM וממנה הולכת ויורדת לאורך הנחל עד למינימום בנקודת הביקורת ב YAGUR וזאת בדומה לתוצאות מבחני הרעילות. תוצאה נוספת היא כי רעילות המיצוי הכללי גדולה פי 10 מדוגמאות המים החלליים לאורך הקטע המזוהם ופי 100 מאתר הביקורת; מכאן ניתן ללמוד כי ככל הנראה עיקר החומרים האורגנים נמצאים כספוחים על גרגרי הסדימנט בשיעור הנע בין פי 10 ל 100 ולכן יתכן וזמינותם הביולוגית נמוכה. גם באתר הביקורת הרעילות המחושבת איננה אפסית, אם כי היא נמוכה משמעותית מזו שחושבה באתרים המזוהמים.

על מנת להבהיר את הקשר בין החומרים שנמצאו בדוגמאות לבין רעילותן של דוגמאות אלו כפי שנבחנה בעבודה הנוכחית, נבדקה רעילותם של ארבעה חומרים שזוהו ושל חומר היחוס פנול כמפורט בפרק 3.2.3 ל 3 יצורי מבחן. תוצאות בדיקה זו מוצגת באיור 19.

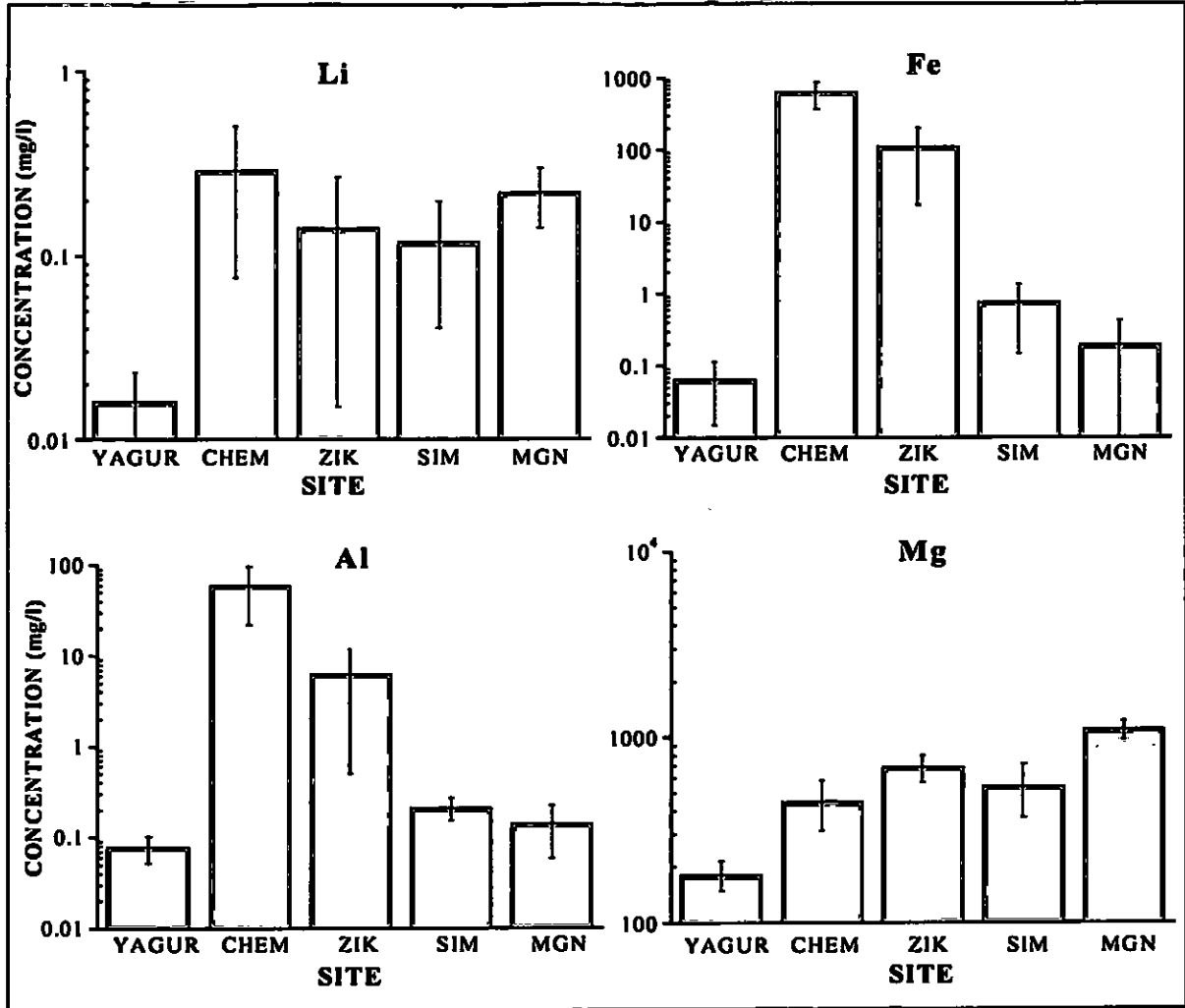


איור 19 - רעילות חומרים אורגניים שנמצאו בנחל הקישון ו Phenol כחומר ייחוס למערכות הניסוי כפי שהתקבלו בעבודה זו.

באיור 19 מוצגת רעילותם של Phenol ו ארבעת החומרים שנבחרו לשלושה יצורי מבחן *Daphnia* *Thamnocephalus* ו *Microtox*. מבין החומרים שנבחנו, 4-methyl Phenol הוא הרעיל ביותר בשלושת המבחנים, בשיעור פי 10-50 מיתר החומרים. תוצאה זו דומה למידע הטוקסיקולוגי שהתקבל ממדד ORAL LD<sub>50</sub>, מרעילותו וריכוזיו של חומר זה, ניתן להסיק כי מבין החומרים האורגניים, תרומתו של חומר זה לכלל הרעילות שנמדדה בנקודות MGN, CHEM ו YAGUR בעלת משקל. ניתן להבחין בהבדלי רגישויות משמעותיים ( $p < 0.05$  T-test) בין שלושת היצורים השונים לרעילות החומר 4-methyl phenol, ובין רגישות *Thamnocephalus* ל *Daphnia* ו *Microtox* לרעילות החומרים Phenol ו Benzene acetic acid. תוצאות אלו מחזקות את הצורך בשימוש ביותר ממבחן רעילות אחד בכדי לקבל תמונה מלאה ומהימנה על אופי החומר.

## 4.2.1 ריכוזי מתכות

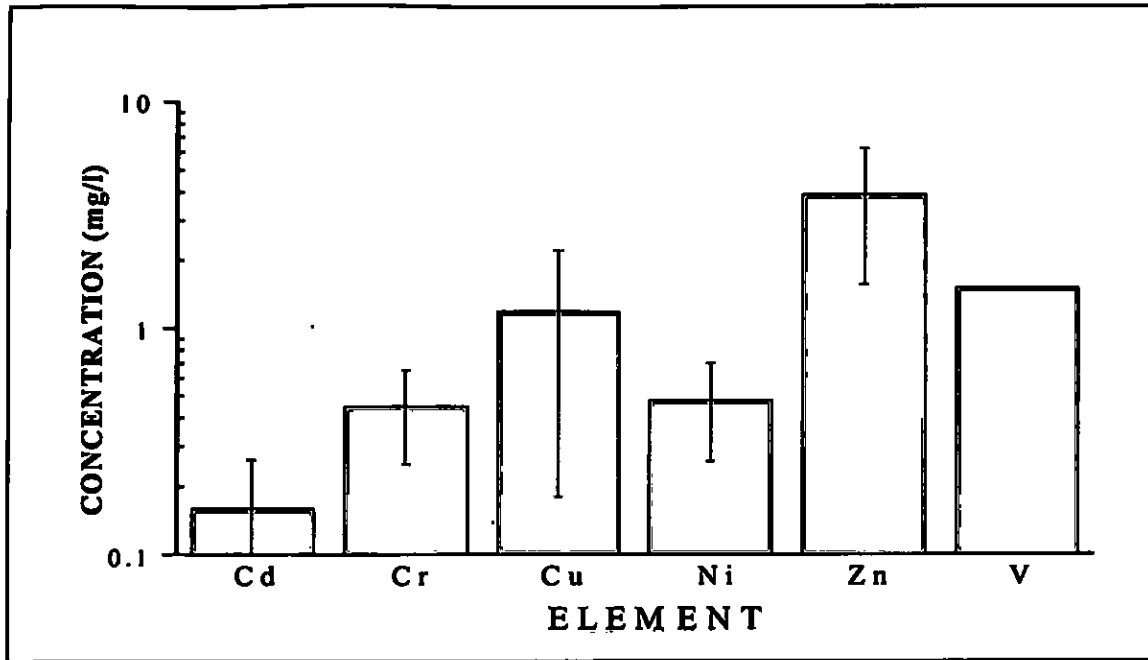
מתכות שונות עושות דרכן למימי הנחל וקרקעיתו משפכי המפעלים השונים. ריכוזם במים הבין חלליים נבדק על-ידי ICP כפי שמובא באיור 20.



איור 20 - ריכוזי מתכות במים הבין חלליים בנחל הקישון. התוצאות הן ממוצע של שלוש חזרות משני העומקים : 0-10 ו 20 ס"מ.

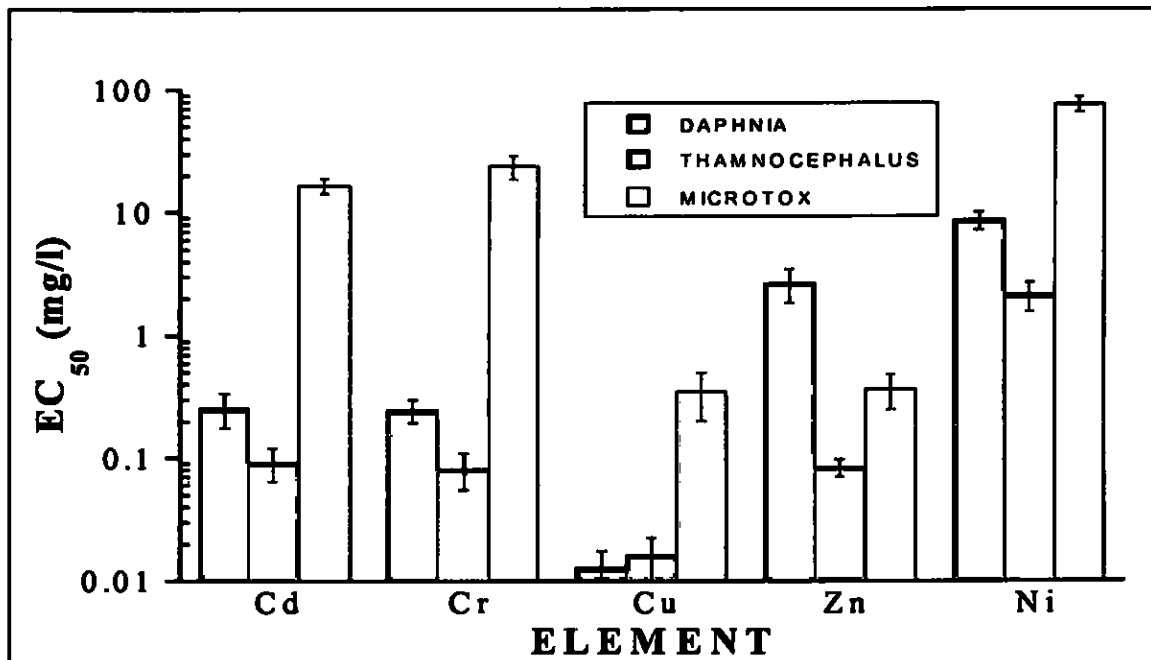
מהאיור ניתן לראות כי ריכוזי ברזל ואלומיניום גבוהים ומקסימליים בנקודה CHEM והולכים וקטנים במורד הנחל עד למוצאו בים ב 3 סדרי גודל, עד לריכוז הדומה לזה שבאתר הביקורת. לעומת זאת, ריכוזי מגנזיום וליתיום נמוכים באתר הביקורת יחסית לקטע המזוהם שבו ריכוזיהם נותרים ברמה דומה לכל אורכו.

מתכות נוספות עושות דרכן אל הנחל אולם אלו נמצאו רק בנקודה CHEM, איור 21 מפרט את ריכוזי המתכות הנוספות שנמצאו.



איור 21 - ריכוזי מתכות שנמצאו בסדימנט באתר CHEM בלבד.

מקורן העיקרי של המתכות המשוחררות לנחל בכמות של מספר גרמים עד מאות קילוגרמים ביממה (103) הינו ככל הנראה שפכי מפעל "חיפה כימיקלים" שמוצאו נמצא בנקודה CHEM (103). עובדה זו מסבירה את השוני בסדרי הגודל בריכוזי המתכות שנמצאו, את ריכוזי המקסימום בנקודה זו, ואת הימצאותם הבלעדית של Cd, Cr, Cu, Ni, Zn, Vn. מתכות אלו השייכות לקבוצת מתכות המעבר ידועות ברעילותן הגבוהה. באיור 22 מושוות רעילות המתכות בחלק ממערכות הניסוי ששימשו בעבודה זו. (לפירוט ראה פרק 3.2.3)



איור 22 - רעילות המתכות השונות ליצורי המבחן השונים שהתקבלו בעבודה זו.

