

עבודה במעבדה במיקרוביולוגיה

סרט הדגמה והדרכה + דפי הנחיה

קישור לסרט*:

http://video.cet.ac.il/VideoPlayer.aspx?xmlConfigPath=Mafilim/2012/Bio/maabadot_bebiologia_21082012_mdi.xml

פרויקט של מנהלת מל"מ והפיקוח על הוראת הביולוגיה. ביצוע על ידי המרכז הארצי למורי הביולוגיה בשיתוף מט"ח.

כתיבה – ד"ר מיכל מנדלובץ, מורה לביולוגיה בתיכון שליד האוניברסיטה, ירושלים.
 קריינות- סיגל שפירא, מנחה מחוזית בביולוגיה, מורה בתיכון ברנר פ"ת
 הכנת המעבדה וביצוע הדגמות- מיכל יעקובי, המרכז לפיתוח ולתמיכה בהוראת ביולוגיה בבתי הספר, אוניברסיטת בר אילן
 יעוץ ובקרה- אורה הירש, מנחה ארצית בביולוגיה, מורה בבי"ס אחד העם פתח תקוה.
 רחל נוסינובץ, המרכז הארצי למורי הביולוגיה
 ריכוז ותיאום- אילנה אדר, מנהלת המרכז למורי הביולוגיה, מורה בתיכון עירוני ב מודיעין

תוכן העניינים

1. רשימת הנושאים וסדר הופעתם בסרט
2. בטיחות
3. עיקור
 - א. עיקור כלים
 - ב. עיקור מצעי מזון ותמיסות שונות
4. מצעי מזון לגידול חיידקים
 - א. הכנת מצע מזון נוזלי
 - ב. הכנת מצע מזון מוצק
5. העברת תרביות וגידולן
 - א. העברת חיידקים ממבחנת מקור למצע גידול (מוצק או נוזלי)
 - ב. העברת חיידקים מתרבית נוזלית לתרבית נוזלית
 - ג. זריעה על מצע מוצק
 - ג1. זריעה לקבלת מרבד צפוף של חיידקים
 - ג2. זריעה לקבלת מושבות בודדות
6. שיטות להערכת מספר החיידקים בתרבית
 - א. הערכת באמצעות ספירת מושבות
 - ב. הערכה באמצעות בדיקת עכירות
 - ב1. בדיקת עכירות באמצעות ספקטרופוטומטר
 - ב2. הערכת עכירות ללא ספקטרופוטומטר

ג. הערכה באמצעות ספירה במיקרוסקופ

7. תנאי גידול של חיידקים

זיהוי ההשפעה המעכבת של חומר על גידול החיידקים

8. עיקור וחיטוי בסיום העבודה

9. נספח - הכנת מיהולים עשורניים מתרבית חיידקים נוזלית עכורה

* סרט הדרכה זה נועד למורים וללבורנטים המעוניינים להדריך את תלמידיהם לעבוד בשיטות הנהוגות במיקרוביולוגיה, לדוגמה בעבודות ביוחקר.

הצפייה בסרט איננה תחליף להתנסות מעשית לפני עבודה עם תלמידים.

1. רשימת הנושאים וסדר הופעתם בסרט

נושא	נקודת זמן בסרט (דקות)
פתיחה	
בטיחות	0.56
עיקור כלים (סטריליזציה)	2.47
עיקור תמיסות	4.59
הכנת מצעי מזון: מצע נוזלי	5.48
מצע מוצק	6.32
גידול חיידקים	8.37
גידול חיידקים על מצע מוצק	10.42
זריעת מרבד	11.07
מיהול עשורני וזריעה לקבלת מושבות בודדות	13.55
גידול חיידקים במצע נוזלי	16.42
עיקור וחיטוי בסיום העבודה	19.08
סיום	20.24

2. בטיחות

בניסויים הנערכים בבתי הספר לא עובדים עם חיידקים הגורמים מחלות בבני אדם. יחד עם זאת, כיוון שחיידקים נמצאים בכל מקום, יש סיכוי שחיידקים גורמי מחלות יגיעו למצעי הגידול המאפשרים גידולם של חיידקים רבים ביניהם חיידקים גורמי מחלות. אי לכך חשוב להתייחס לכל תרביות החיידקים כאל תרביות עם חיידקים גורמי מחלות, ולשמור על כללי הבטיחות הנהוגים במעבדות בהן עובדים עם חיידקים.

הנכם מתבקשים לקרוא את הנחיות הבטיחות המחייבות המתפרסמות באתר המפמ"ר, בכתובת:

http://cms.education.gov.il/EducationCMS/Units/Mazkirut_Pedagogit/Biology/TochnitLimudimMaasit/PilutMaabada/chozrim.htm

שימו לב: בסעיפים 1 – 11 להלן נכללו רק חלק מההנחיות שבחוזר:

1. בעבודה עם מיקרואורגניזמים יש לעבוד עם חלוק, וכפפות לשימוש חד פעמי.
2. יש להקפיד לאסוף את השיער בזמן העבודה.
3. אסור לפתוח צלחות בהן גדלו מיקרואורגניזמים שזהותם אינה ידועה. יש להתבונן בהן כשהצלחות סגורות.

4. אין לבדוד ולגדל מיקרואורגניזמים מגוף האדם, מפסולת, מקרקע או מכל מקור אחר שעלול להכיל חיידקים פתוגניים.
 5. אסור לגעת בתרבות החיידקים בפה, באצבעות, בכלי כתיבה וכדומה.
 6. לפני תחילת העבודה עם החיידקים יש לדאוג להניח על שולחן העבודה שני פחי איסוף: א. פח לאיסוף חומר ביולוגי, כגון: מצעי גידול, תמיסות, דגימות מהסביבה, וכדומה. חומר ביולוגי זה יעבור עיקור בסיום העבודה.
 - ב. פח לאיסוף כלים שבאו במגע עם תרבות החיידקים. גם כלים אלו יעברו עיקור בסיום העבודה.
 7. אסור להניח על משטח העבודה כלים שבאו במגע עם תרבות החיידקים. יש להעבירם לפחים שנועדו לעיקור.
 8. במקרה של תאונה בעבודה, כולל שבירה של כלים או שנשפכה תרבות חיידקים על משטח העבודה – הודיעו על כך למורה, והקפידו לחטא את הידיים ואת משטח העבודה.
 9. לביצוע ניסויים הבודקים התרבות של מיקרואורגניזמים יש להשתמש במיקרואורגניזמים המסופקים על ידי מקור מהימן, לדוגמה - המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות בתי הספר (אוניברסיטת בר אילן).
 10. הנחיות נוספות לסיום העבודה – ראו בסוף המסמך.
 11. הקפידו לרחוץ ידיכם במים וסבון לפני היציאה מהמעבדה.
- שימו לב! העבודה עם אש מיועדת למורה וללבורנט בלבד.**

3. עיקור כלים ותמיסות

כפי שהוסבר בהקדמה לכללי הבטיחות, באוויר הסובב אותנו קיימים מיקרואורגניזמים. לכן, כל כלי הבא במגע עם האוויר עלול לשאת מיקרואורגניזמים ולהעביר אותם אל מצעי הגידול איתם נעבוד. לכן יש לעקר כל כלי בו מעוניינים להשתמש במהלך הניסוי. גם לאחר העיקור של כלים ותמיסות יש להקפיד על עבודה בתנאים סטריליים שתמנע ממיקרואורגניזמים לא רצויים להגיע למצעי הגידול המעוקרים ולזהם אותם.

עיקור נעשה בדרך כלל באוטוקלב או בסיר לחץ. שיטת העיקור מבוססת על שימוש בחום רטוב: מחממים את תמיסת המצע באוויר רווי באדי מים, בלחץ, במשך 20 דקות או יותר, בטמפרטורה של 121°C . זו הטמפרטורה של אדי מים בלחץ של אטמוספירה אחת מעל ללחץ האוויר הרגיל. בתנאים אלה נהרסים החיידקים החיים ואף הנבגים של החיידקים העמידים ביותר.

א. עיקור כלים

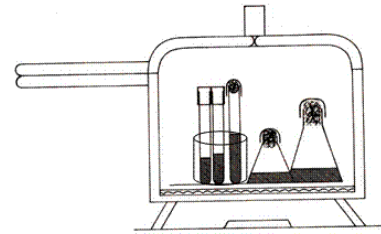
1. ארלנמיירים, משורות וכוסות כימיות יש לפקוק בצמר גפן ולכסות בנייר כסף לפני העיקור, כדי שיישארו סטריליים גם לאחר ההוצאה מהאוטוקלב. אין להכניס לאוטוקלב בקבוקים שלא ידוע אם יעמדו בתנאים השוררים בו, כגון: כלי סדוק, כלי מזכוכית רגילה, או כלי מפלסטיק.
2. כלים בתפזורת כגון פיפטות, פינצטות וכדומה יש להכניס למיכל מכוסה או לשקית עמידה באוטוקלב (שקיות ניילון מיוחדות או שקיות נייר חום) אין להכניס לאוטוקלב שקיות ניילון שאינן מיועדות לכך.
3. יש לסמן בצורה ברורה את תוכנו של הכלי. ניתן להשתמש במדבקות נייר ולרשום עליהם בעיפרון, או לכתוב בעט לסימון על זכוכית (אך רצוי לוודא שהסימון לא יורד במים ובחום).
4. יש לסמן את הכלים בסרט דביק המשנה את צבעו בזמן הסטריליזציה, ומעיד על תנאי סטריליזציה תקינים.

עיקור באוטוקלב

שימו לב! כאשר משתמשים באוטוקלב לעיקור חשוב להקפיד **לתחזק ולהפעיל** אותו על פי הוראות היצרן על מנת להבטיח קודם כל בטיחות, אך גם עיקור מלא.

כדי למנוע תאונות יש להקפיד שפתיחת האוטוקלב בסיום העיקור תבוצע על פי הנחיות היצרן. יש להקפיד לעמוד מאחורי דלת המכשיר, לפתוח סדק לשחרור אדי הקיטור ורק אז לפתוח את הדלת באופן מלא. יש להמתין עשר דקות מזמן פתיחת האוטוקלב ועד להוצאת הכלים בידיים מוגנות בכפפות חסינות חום.

עיקור בסיר לחץ



בבתי ספר שאין בהם אוטוקלב ניתן לעקר בסיר לחץ הפועל על אותו עיקרון, אך יש להכיר את כללי הבטיחות ואת מגבלות העבודה עם הסיר. **כללי השימוש הם אלה:**

א. הכניסו לסיר כ-1 ליטר מים מזוקקים (בגובה של 2-3 ס"מ).

ב. הכניסו לתחתית הסיר "מדף רשת" מיוחד (ראו איור), ועליו הניחו את הכלים לעיקור.

ג. סגרו את הסיר בלי לחבר את שסתום הלחץ. הדליקו את הלהבה מתחת לסיר ותנו למים לרתוח. חכו כמה דקות מהרגע שמתחיל לצאת קיטור כדי שהאוויר יצא ונפח הסיר יתמלא באדי מים. אחר כך סגרו את שסתום הלחץ.

ד. כאשר יושג הלחץ הדרוש הקטינו את הלהבה, והמשיכו לחמם את הסיר ל-20-30 דקות נוספות.

ה. כבו את הלהבה שמתחת לסיר ותנו לו להתקרר עד שאין עוד לחץ יתר בתוכו. אין לפתוח את השסתום כדי להוריד את הלחץ במהירות כי אז יתחילו תמיסות המצע לרתוח ולגלוש ופקקי צמר הגפן יירטבו ואף יעופו מהבקבוקים.

ו. לאחר ירידת הלחץ פתחו בזהירות את השסתום ואחר כך את מכסה הסיר, והוציאו את הכלים המעוקרים.

עיקור יבש בתנור

אם לא משתמשים בכלים חד פעמיים סטריליים אלא בכלי זכוכית שעושים בהם שימוש חוזר, כגון פיפטות ומבחנות ריקות, ניתן לעקורם בתנור יבש. עיקור בעזרת חום יבש בתנור חייב להתבצע בטמפרטורה גבוהה יותר מאשר באוטוקלב (160° - 170°), ולזמן ממושך יותר (שעה וחצי). הסיבה לכך היא שחיידקים ונבגיהם רגישים הרבה פחות לחום בתנאי יובש מאשר לחום בתנאי לחות.

ב. עיקור מצעי גידול ותמיסות שונות

1. יש לחלק לבקבוקים את התמיסה המיועדת לעיקור, באופן שכל בקבוק יהיה מלא **לכל היותר** עד שני שלישי מנפחו.

2. יש לפקוק את הבקבוק בפקק צמר גפן ומעליו נייר כסף.

3. לפני עיקור באוטוקלב יש לוודא שהחומר לא מתפרק בחום הגבוה, ושטמפרטורת הרתיחה שלו איננה נמוכה מ- 100°C .

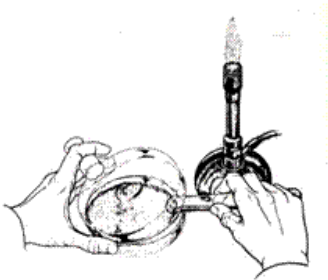
4. אין להכניס לאוטוקלב כימיקלים מסוכנים, כגון אקונומיקה.

4. מצעי מזון לגידול חיידקים

בעבודה עם חיידקים משתמשים במצעי גידול. מצעי הגידול צריכים לספק לחיידקים את כל החומרים הדרושים לגידולם. קיימים סוגים שונים של מצעי מזון המספקים דרישות שונות. המצע הנזלי המקובל ביותר לגידול חיידקים הוא מצע עשיר Nutrient Broth (NB) המאפשר גידול של סוגים רבים של חיידקים. לצורך הכנת מצע גידול מוצק משתמשים בתערובת של מצע עשיר ואגר, שנקראת Nutrient Agar (NA). האגר הוא רב סוכר המופק מאצות, שניתן להמיסו במים חמים, ובעת הקירור הוא נקשר בדומה לג'לטין המופק מבעלי חיים. יתרונו של האגר הוא בכך שקיימים מעט מאוד חיידקים המפרקים אותו לעומת הג'לטין שאותו מפרקים חיידקים רבים.

הכנת מצע מזון נוזלי

1. המיסו אבקת NB במים מזוקקים, על פי הוראות הספק.
2. עקרו את התמיסה כפי שתואר למעלה.
3. ניתן לשמור את המצע בטמפרטורת החדר במשך מספר שבועות בכלי בו הוא עוקר. במידה והמצע הזדהם החיידקים יתפתחו וניתן יהיה להבחין בזיהום ולא להשתמש במצע לגידול החיידקים.



הכנת מצע מזון מוצק

1. המיסו אבקת NA במים מזוקקים, על פי הוראות הספק.
2. עקרו את התמיסה כפי שתואר למעלה.
3. הניחו לתמיסה המעוקרת להתקרר על השולחן עד לטמפרטורה של כ-45 מעלות צלסיוס. בטמפרטורה נמוכה יותר האגר יתחיל להתמצק וקשה יהיה למזוג אותו לצלחות.
4. מזגו את התמיסה לצלחות פטרי סטריליות, כ-20 מ"ל לצלחת. כדי למנוע זיהומים מהאוויר בעת המזיגה מומלץ להעביר את פי הבקבוק באש לפני המזיגה, ולפתוח את מכסי הצלחות רק באופן חלקי ולזמן קצר. (ראו איור).
5. יש לעבוד במהירות כדי למנוע מהאגר להתמצק כבר בתוך הכלי תוך כדי מזיגה. אם בכל זאת האגר התמצק לפני המזיגה ניתן להמיסו מחדש על ידי חימום בתוך סיר מים רותחים.
6. לאחר שהאגר בצלחות התמצק יש להפוך את הצלחות. הפיכת הצלחות נועדה למנוע טפטוף טיפות מים שהצטברו על המכסה אל המצע, דבר שיכול להשפיע על ריכוז התרבית הנזרעת.
7. אם הכנתם צלחות פטרי עם מצעים שונים, חשוב לסמן בתחתית כל צלחת את סוג המצע כדי למנוע בלבול.
8. ניתן לשמור את הצלחות כחודש במקרר. אם מכינים את הצלחות עם קרקע מזון מראש מומלץ לעטוף את הצלחות בערימות בשרוול הניילון בהן הגיעו או בניילון נצמד, כדי למנוע אידיוי מים מהאגר וירידה בנפחו.
9. מומלץ להוציא את הצלחות לטמפרטורת החדר כשעה לפני העבודה, כדי להיפטר מטיפות המים הנוצרות עליהן כתוצאה מהתעבות.
10. לפני השימוש יש להסתכל על כל צלחת בנפרד ולוודא שקרקע המזון לא הזדהמה (לא התפתחו מושבות של חיידקים) ושנפח האגר לא ירד בצורה משמעותית.

בדרך זהה ניתן להכין מצעים המכילים כל הרכב חומרים שרוצים, ובלבד שיש בו גם אגר. ניתן להוסיף ל-NB חומרים שונים (ריכוזים שונים של מלחים שונים), או להכין מצע שונה לגמרי.

5. העברת תרביות וגידולן

בעבודה במעבדה אנו מעוניינים בדרך כלל לעבוד עם חיידקים מסוימים, ולכן אנו דואגים לעבוד רק בכלים ובתמיסות גידול סטריליים. אולם, מאחר וחיידקים נמצאים בכל מקום, גם לאחר העיקור של כלים ותמיסות יש להקפיד על עבודה בתנאים סטריליים שתמנע ממיקרואורגניזמים לא רצויים להגיע למצעי הגידול המעוקרים ולזהם אותם. חשוב מאוד לשמור על תנאים אלו בזמן העברת תרביות ממצע אחד לאחר.

להזכירכם, לפני תחילת העבודה עם החיידקים יש לדאוג להניח על שולחן העבודה שני כלים:

א. פח לאיסוף חומר ביולוגי, כגון: מצעי גידול, תמיסות, דגימות מהסביבה, וכדומה. חומר זה יעבור עיקור בסיום העבודה.

ב. כלי לאיסוף כלים שהזדהמו בחיידקים. גם כלים אלו יעברו עיקור בסיום העבודה.

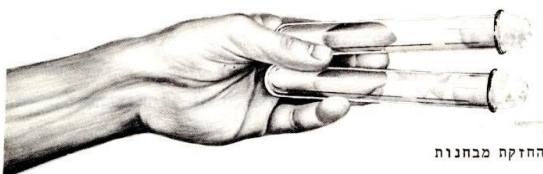


העברת חיידקים ממבחנת המקור: החיידקים המתקבלים ממרכז הפיתוח והתמיכה בבר אילן נמצאים במבחנה עם מצע מזון מוצק משופע (ראו איור). זוהי צורה נוחה לשמירת גזעי חיידקים לתקופה ממושכת. ניתן לשמור את המבחנות עם המושבות שגדלו בהן במקרר במשך חודשים עד שנים.

שימו לב! חשוב במיוחד לשמור על סטריליות של מבחנת המקור של החיידקים, כדי שאפשר יהיה להשתמש בה לחזרות על הניסוי. לכן מומלץ לא לתת מבחנה זו לתלמידים. הלבורנט או המורה יעבירו חיידקים ממבחנת המקור לצלחת מצע מוצק או למבחנת מצע נוזלי, ואלו יינתנו לתלמידים.

א. העברת חיידקים ממבחנת מקור למצע גידול (מוצק או נוזלי)

ההנחיות שלהלן מתאימות למשתמשים במחט רב פעמית. בהמשך תמצאו הנחיות המתאימות למשתמשים במחטי זריעה חד פעמיות סטריליות.



החזקת מבחנות

1. החזיקו ביד השמאלית שתי מבחנות: מבחנה המכילה תרבית של חיידקי מקור על-גבי מצע משופע של אגר, ומבחנה המכילה מצע מעוקר אליו רוצים להעביר את החיידקים (אגר או מצע נוזלי). ביד הימנית החזיקו בלולאה הבקטריוλογית.

2. להטו את הלולאה בלהבת מבער הבונזן עד שתקבלו גוון כתום. קררו באוויר את המחט במשך כ-30 שניות, או נעצו אותה בשולי האגר.

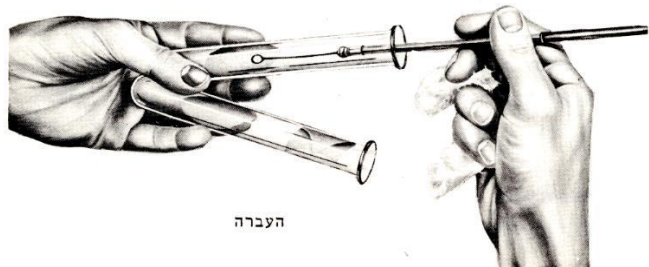
3. בעוד הלולאה מתקררת, פתחו את שתי המבחנות על ידי כך, שתשימו את פקקי צמר הגפן בין אצבעות היד הימנית.

להטו את פיות המבחנות על-ידי העברתן בלהבה אט-אט, שלוש פעמים.



רת חיידקים

חיכוך



7

4. קחו מעט ממושבבת החיידקים שעל האגר, והעבירו אותם מיד על-פני האגר המזין המעוקר (במריחה או על ידי ציור קו) או אל המצע הנוזלי. הימנעו מלחרוץ בתוך האגר. משקל המחט עצמה מספיק בהחלט כדי להעביר את החיידקים.

5. כדי לעקר את המחט להטו אותה שנית.

6. העבירו את פיות המבחנות בלהבה כמקודם. החזירו את פקקי צמר הגפן לפיות המבחנות, והציבו את המבחנות בכנים המיועדים לכך.

7. הדגירו את התרבית שזרעתם. משך ההדגרה והטמפרטורה תלויים בסוג החיידק.

8. החזירו את מבחנת המקור למקרר עד לשימוש הבא.

שימוש במחט זריעה חד-פעמית:

1. הוציאו מחט זריעה אחת מהאריזה (מצד הידית כמובן...).
2. הסירו את המכסה ממבחנת המקור והעבירו את פי המבחנה באש.
3. הוציאו בעזרת המחט כמות קטנה של חיידקים ממבחנת המקור.
4. העבירו שוב את פי מבחנת המקור באש וכסו במכסה.
5. העבירו את החיידקים שעל המחט אל צלחת מצע מוצק (במריחה או על ידי ציור קו) או אל מבחנת מצע נוזלי סטרילי.
6. השליכו את המחט לכלי האיסוף.

ב. העברת חיידקים מתרבית נוזליות לתרבית נוזלית

1. הוציאו פיפטה מעוקרת בטווח 0.1-1.0 מ"ל מעטיפתה. שימו לב לכך, ש-10 הסנטימטרים הקרובים לקצה הפיפטה לא יבואו במגע עם משטחים בלתי מעוקרים. חברו לפיפטה פיפטור מתאים.
2. החזיקו ביד השמאלית את שתי המבחנות: המבחנה המכילה את המצע עם החיידקים, והמבחנה המכילה מצע מעוקר. הפיפטור עם הפיפטה המעוקרת - ביד הימנית.
3. פתחו את שתי המבחנות כפי שנהגתם כשהעברתם חיידקים בלולאה בקטרילוגית. להטו את פיות המבחנות על-ידי העברתן בלהבה שלוש פעמים.
4. החדירו את הקצה המעוקר של הפיפטה אל תוך התרבית. שאבו בזהירות רבה את הכמות הדרושה לכם. העבירו את קצה הפיפטה מן המבחנה המכילה את התרבית אל זו שברצונכם לגדל בה את החיידקים. החזיקו את קצה הפיפטה בגובה של כשני ס"מ מעל פני מצע הגידול. בעזרת הפיפטור הוציאו 0.1 מ"ל תרבית אל תוך המבחנה המיועדת לכך.
5. שימו את הפיפטה בכלי לפסולת ביולוגית.
6. להטו את פיות המבחנות והחזירו את פקקי צמר הגפן למבחנות. העמידו את שתי המבחנות בכך המתאים.
7. התרבית מוכנה להדגרה בתנאים המתאימים.

ג. זריעה על מצע מוצק

זריעת חיידקים על מצע מוצק נעשית בדרך כלל לאחת משתי מטרות: קבלת מרבד אחיד של חיידקים, או קבלת מושבות בודדות הניתנות לזיהוי וספירה.

ג. זריעה לקבלת מרבד צפוף של חיידקים

זריעה היוצרת מרבד צפוף של חיידקים על הצלחת, הנראה כציפוי עכור על פני כל הצלחת.

זריעת מרבד בעזרת מקל דריגלסקי רב-פעמי:

1. רשמו באופן ברור על תחתית הצלחת את פרטי הניסוי ושמות התלמידים.
 2. הניחו במרכז הצלחת טיפה בנפח 0.1 מ"ל מתרבית עכורה מאד של חיידקים.
 3. חטאו את מקל הדריגלסקי על ידי טבילתו ב-100% אתנול והעברתו באש.
- שימו לב:** אתנול נדיף ודליק, יש להרחיק את האתנול מהאש!
4. לאחר שהלהבה דועכת קררו את המקל על ידי העברתו מספר פעמים על הצד הפנימי של מכסה הצלחת.
 5. פזרו את טיפת החיידקים באופן אחיד על פני הצלחת בעזרת מקל הדריגלסקי וסיבוב צלחת הפטרי.
 6. חטאו את מקל הדריגלסקי שנית על פי ההנחיות בסעיף 3.

הערה: אם הזריעה נעשית בעזרת מקל דריגלסקי חד-פעמי חשוב להקפיד על:

- הוצאה נכונה של מקל דריגלסקי מהאריזה (מצד הידית).
 - עם סיום העבודה השלכת מקל הדריגלסקי לכלי האיסוף של הפסולת הביולוגית.
- ניתן להשתמש באותו מקל דריגלסקי לפיזור החיידקים על מספר צלחות בזו אחר זו, ואין צורך לחטא בין צלחת לצלחת בתנאי שמדובר באותם חיידקים, באותו מיהול או כאשר עובדים עם ריכוזים הולכים ועולים של תרבית חיידקים.

ג. זריעה לקבלת מושבות בודדות

זריעה לקבלת מושבות בודדות מאפשרת ספירת מושבות כדרך למעקב אחר התרבות חיידקים במצע נוזלי. כל מושבה כוללת את צאצאיו של חיידק בודד שהיה בתרבית הנוזלית.

א. הכנת מיהולים עשורניים של תרבית החיידקים

(ראו בנספח הרחבת ההסבר ועקרונות שחשוב לשמור עליהם)

1. סמנו 6 מבחנות במספרים 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-.
2. הוסיפו לכל מבחנה 9 מ"ל של תמיסה פיזיולוגית (תמיסת NaCl בריכוז 0.9%) סטרילית.
3. העבירו למבחנה המסומנת 1-, 1 מ"ל מתרבית החיידקים. ערבבו היטב.
4. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 1- למבחנה 2-. ערבבו היטב.
5. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 2- למבחנה 3-. ערבבו היטב.
6. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 3- למבחנה 4-. ערבבו היטב.
7. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 4- למבחנה 5-. ערבבו היטב.
8. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 5- למבחנה 6-. ערבבו היטב.

הכנתם סדרה של 6 מבחנות, ובכל מבחנה ריכוז החיידקים קטן פי 10 מהמבחנה הקודמת לה.

ב. זריעת החיידקים בצלחות פטרי לקבלת מושבות בודדות

9. סמנו את תחתית צלחות הפטרי (עם מצע גידול מוצק) לפי המיהולים שייזרעו בהן (מספרים 1-, 2-, 3-, 4-, 5-, 6-). אל תסמנו את המכסים.

10. הניחו במרכז הצלחת טיפה בנפח 0.1 מ"ל מתרבית החיידקים בצלחת המסומנת לפי המיהול המתאים.
11. חטאו את מקל הדריגלסקי על ידי טבילתו ב-100% אתנול והעברתו באש. (ראו [הערה למעלה](#))
12. לאחר שהלהבה דועכת קררו את המקל על ידי העברתו מספר פעמים על הצד הפנימי של מכסה הצלחת.
13. פזרו את טיפת החיידקים באופן אחיד על פני הצלחת בעזרת מקל הדריגלסקי.
14. חטאו את מקל הדריגלסקי שנית על פי ההנחיות בסעיף 3.
15. הדגירו את הצלחות בטמפרטורה המתאימה עד לקבלת מושבות.

6. שיטות להערכת מספר החיידקים בתרבית

במקרים רבים בהם מגדלים חיידקים חשוב לדעת את מספרם. יש כמה שיטות המשמשות להערכת מספרם של החיידקים בתרבית הגידול. בסרט אנו דנים ב-2 שיטות מדידה: 1. הערכת ריכוז החיידקים בתרבית על פי מדידת עכירות התרבית הנוזלית, 2. ספירת מושבות בצלחות פטרי. כאן נציין שיטה נוספת - ספירה ישירה של חיידקים מבעד למיקרוסקופ. לכל שיטה יש יתרונות וחסרונות אותם נאיר בתיאור השיטה.

א. הערכה באמצעות ספירת מושבות

כאשר זורעים חיידקים על מצע מזון מוצק, נוצרת מושבה מכל חיידק בודד. כל חיידק שנגע בקרקע המזון מתחיל להתחלק. כל צאצאיו של החיידק נשארים בקרבת מקום ויוצרים מושבה (בניגוד לתרבית נוזלית בה כל החיידקים מצויים בתרחיף). בתרבית הגידול הנוזלית יש בדרך כלל מיליוני חיידקים, לכן לפני הזריעה יש למהול את תרחיף החיידקים באופן מבוקר וידוע (ראו הכנת מיהולים עשורניים לעיל). זורעים דגימה מכל אחד מהמיהולים ומאפשרים למושבות לצמוח. באמצעות ספירת המושבות וחישוב המיהול ניתן להעריך את מספר החיידקים בדגימה המקורית. שיטה זו טובה להערכת מספר חיידקים חיים, אך היא איטית יחסית, כיוון שיש לחכות עד לצמיחת המושבות.

דרך החישוב

- את ספירת המושבות כדאי לערוך בצלחת בה התפתחו בין 20 ל-200 מושבות. במהלך הספירה נוח לסמן בנקודה, על גבי תחתית הצלחת, כל מושבה שנספרה, על מנת לא לחזור ולספור את אותה מושבה שוב ושוב.
- אם סופרים בצלחת שבה יש יותר מ-200 מושבות (אך עדיין נפרדות זו מזו וניתנת לספירה), ניתן לחלק את הצלחת לגזרות על ידי סימון בתחתית הצלחת, לספור את מספר המושבות בגזרה אחת ולכפול במספר הגזרות.

דרך החישוב:

$\text{מספר החיידקים ב-1 מ"ל} = \text{פקטור המיהול} \times 10 \times \text{מספר המושבות של התרבית המקורית}$ פי כמה מהלנו
--

שימו לב! ההכפלה פי 10 בנוסחה שלעיל היא משום שזרענו 0.1 מ"ל. יש להתאים את החישוב לדרך העבודה. אם נספרה גזרה אחת מתוך כמה – יש כמובן לכפול במספר הגזרות.

דוגמת חישוב:

אם קבלנו 159 מושבות בצלחת שבה נזרעו 0.1 מ"ל מתרבית במיהול של 10^{-3} החישוב יעשה כך:

א. מאחר והתרבית שנזרעה על הצלחת הצמיחה 159 מושבות, הרי שבכמות התרבית שנזרעה היו 159 חיידקים. מאחר שזרענו 0.1 מ"ל, הרי שב-1 מ"ל של התרבית שנזרעה בצלחת היו 1,590 חיידקים.

ב. מכיוון שלזריעת צלחת זו השתמשנו בתרבית במיהול 10^{-3} , הרי שבמ"ל אחד של התרבית המקורית היו:

$$1,590,000 = 10^3 \times 1,590 \text{ חיידקים}$$

ב. הערכה באמצעות בדיקת עכירות התרבית

עכירות התרבית משמשת מדד עקיף לריכוז החיידקים בתרבית והיא נמדדת ישירות מהתרבית הנוזלית. כאשר מתחילים את הגידול עם כמות קטנה של חיידקים, המצע נראה צלול. עם התרבות החיידקים בתמיסה גדלה עכירות הנוזל, מאחר שהחיידקים מונעים מעבר אור בנוזל. מידת העכירות נמדדת באמצעות מכשירים אופטיים כמו הספקטרופוטומטר, אך אפשרית גם בשיטות פחות אובייקטיביות.

ב1. מדידת עכירות תרבית בעזרת ספקטרופוטומטר

הספקטרופוטומטר הוא מכשיר מדידה המאפשר למדוד את בליעת האור של חומר נבדק באורכי גל שונים. מאחר שכל חומר בולע אורכי גל מסוימים, יש חשיבות לאורך הגל המשמש לבדיקה. במכשיר יש גלאי המזהה את עוצמת האור העוברת את הדוגמה ומחשב את היחס בין עוצמת האור שעברה את הדוגמה לעוצמה האור שבה הוקרנה הדוגמה. (יחס בין "כניסה ליציאה") יחס זה הוא מדד כמותי מדויק לעכירות התמיסה.

הערכת מספר החיידקים בתרבית באמצעות מדידת עכירות היא שיטה יעילה ומהירה, אך חסרונה העיקרי הוא שבשיטת ספירה זו נספרים כל החיידקים הנמצאים במצע, הן החיים והן המתים (לאחר זמן חלק מהחיידקים המתים מתפרקים והעכירות שוב יורדת). נוסף לכך שיטה זו יעילה רק כאשר מספר החיידקים מגיע ל 10^7 במ"ל (עשרה מליון חיידקים במ"ל). מתחת למספר זה העכירות אינה ניכרת.

1. כווננו את הספקטרופוטומטר לאורך גל של כ-600 ננומטר ולמדידת בליעה (Absorbance, ABS).

2. אפסו את הספקטרופוטומטר עם מבחנה/קיוטה המכילה מצע גידול ללא חיידקים.

3. מדדו את עכירות התרבית.

ב2. הערכת עכירות תרבית ללא ספקטרופוטומטר

גם אם אין ספקטרופוטומטר ניתן להעריך את עכירות התמיסה. זהו מדד פחות אובייקטיבי אך מאפשר דירוג מסוים של רמות עכירות.

1. הכינו סקלה של מספרים בגווי אפור שונים, כמודגם בסרט.

2. העבירו את המבחנה עם התרבית לפני סקלת המספרים ומצאו את המספר הנמוך ביותר הניתן לקריאה

מבעד לתרבית.

10	9	8	7	6	5	4	3	2	1
----	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ג. הערכה באמצעות ספירה במיקרוסקופ

לספירת חיידקים הגדלים בתרבית נוזלית קיימת שיטה נוספת שלא הודגמה בסרט. בשיטה זו סופרים מבעד למיקרוסקופ את מספר החיידקים בדגימה מדודה שהוכנסה לתא ספירה מכויל (המכונה המוציטומטר, מכיוון שפותח לראשונה ככלי לספירת תאי דם אדומים). תא הספירה בנוי מזכוכית נושאת, המחולקת לתאים בעלי קיבול מסוים. לפני הספירה מכסים בזכוכית מכסה.

שיטה זו יותר מהירה מגידול דגימה על פלטות וספירת מושבות, אך דורשת לא רק רכישת המכשור, אלא גם מיומנות ספירה מבעד למיקרוסקופ.

7. תנאי גידול של חיידקים

נוסף על הרכב המצע, גם תנאי הסביבה משפיעים על התפתחות החיידקים. קיימים מינים המיטיבים להתפתח בטמפרטורה של 20°C , ואילו מינים אחרים יתפתחו ב- 30°C או ב- 20°C דווקא. טמפרטורת הגידול תלויה אם כן בסוג החיידק אך גם בסוג הניסוי.

יש מינים הזקוקים לסביבה חומצית ואחרים לסביבה בסיסית. יש מינים הזקוקים לחמצן ויש מינים שיתפתחו רק בהיעדר חמצן. לכן יש להתאים את תנאי הגידול לחיידקים איתם עובדים, ולשאלות המחקר ששואלים.

הצורך בחמצן: רוב החיידקים איתם עובדים בבית הספר הם חיידקים הזקוקים לחמצן, ולכן יש לדאוג לאספקת החמצן לתרבית. כשמדובר בתרבית נוזלית יש לגדל את תרבית החיידקים בכלי בעל נפח גדול פי 10-5 מנפח התרבית. רצוי לטלטל את הכלי כל חצי שעה לפחות, כשהדבר ניתן. הטלטול מערביל את התרבית עם האוויר ומגדיל את אספקת החמצן לחיידקים. אם אין אפשרות לטלטל ניתן לשקול הנחת המבחנות באלכסון להגדלת שטח המגע של התרבית עם האוויר במבחנה.

שימו לב! באמבטי טילטול אפשר לכוון טמפרטורה כך שניתן לשלב את הטלטול וטמפרטורה רצויה בכלי אחד. בצלחות פטרי יש מרווח בין המכסה לבין הצלחת כך שאוויר יכול להיכנס.

זיהוי השפעה מעכבת של חומר על גידול החיידקים במצע מוצק

1. רשמו באופן ברור על תחתית הצלחת את פרטי הניסוי ושמות התלמידים.
 2. זרעו חיידקים בזריעת מרבד כמתואר למעלה.
 3. הניחו לתרבית להיספג במצע במשך כעשר דקות.
 4. צרו דיסקיות תלת שכבתיות של נייר סינון על ידי חירור של 3 שכבות נייר סינון ביחד.
 5. טבלו את הדסקיות התלת שכבתיות בחומר הנבדק, הוציאו אותן והניחו להן להתייבש כעשר דקות בצלחת נקייה.
 6. סמנו על תחתית הצלחת עליה נזרעו החיידקים היכן יונחו הדסקיות ומה תכיל כל קבוצת דסקיות.
 7. הניחו את קבוצות הדסקיות כל אחת במקומה.
 8. הדגירו את החיידקים למשך לילה בטמפרטורה המתאימה לחיידקים שזרעתם.
- אם החומר הנבדק אכן עיכב את גידול החיידקים, תיראו מסביב לדסקית הילה צלולה, שהיא אזור העיכוב. ניתן למדוד את קוטר אזור העיכוב כדי להשוות את השפעתם של חומרים שונים או של ריכוזים שונים של אותו חומר.
- יש לזכור** ששיטה זו יעילה רק בעבודה עם חומרים שעוברים בדיפוזיה יעילה באגר¹. לא ניתן למדוד בשיטה זו את השפעתם של חומרים צמיגים, חומרים שאינם מסיסים במים וכדומה.
- כמו כן יש להבין שגודלו של אזור העיכוב תלוי לא רק במידת רגישות החיידקים לחומר אלא גם בריכוז החומר וביעילות הדיפוזיה שלו במים.

¹ האגר מורכב מסיבי אגר וביניהם תמיסה מימית. בהנחה שלא מדובר על מולקולות בגודל שלא יצליח לעבור בין סיבי האגר, מה שישפיע זה בעיקר מסיסות במים.

8. עיקור וחיתוי בסיום העבודה

בסיום העבודה המיקרוביולוגית חשוב לעקר ולחטא את כל התמיסות, הכלים והמשטחים איתם עבדנו.

עיקור באוטוקלב

1. אספו את כל הנוזלים המכילים חיידקים לבקבוק. שימו לב! גם בשלב זה אין למלא את הבקבוק יותר מ2/3 מנפחו.
2. אספו את כל הצלחות המכילות חיידקים ואת הכלים החד פעמיים המזוהמים **לשקית מיוחדת** המתאימה לאוטוקלב.
3. הכניסו לאוטוקלב את הכלי ובו הנוזלים שאספתם (סעיף 1), את השקית (סעיף 2), ואת כל שאר הכלים שהזדהמו בזמן העבודה.
4. הפעילו את האוטוקלב על-פי הוראות היצרן.
5. לאחר הטיפול באוטוקלב, השליכו את הפסולת המוצקה לפח האשפה, שפכו את הנוזלים לביוב ושטפו את הכלים לשימוש חוזר.

עיקור בעזרת אקונומיקה

יש להקפיד על שימוש בכפפות ומשקפי מגן כדי להגן על הגוף (והבגדים) מנזקי האקונומיקה. לעיקור הנוזלים:

1. אספו את כל הנוזלים המכילים חיידקים לבקבוק בעל שנתות.
 2. מדדו את נפח הנוזלים המזוהמים והוסיפו עשירית הנפח אקונומיקה.
 3. המתינו לפחות 20 דקות ושפכו לביוב.
 - לעיקור הכלים:
 4. הכינו דלי עם נפח גדול של אקונומיקה מהולה פי 10.
 5. הכניסו לדלי צלחות פטרי שגדלו עליהן חיידקים לאחר שהסרתם מהן את המכסה.
 6. הכניסו לדלי כלים שהזדהמו בזמן העבודה.
 7. המתינו 20 דקות לפחות.
- שפכו את הנוזלים לביוב והשליכו את הפסולת המוצקה לפח האשפה. שטפו את הכלים לשימוש חוזר.

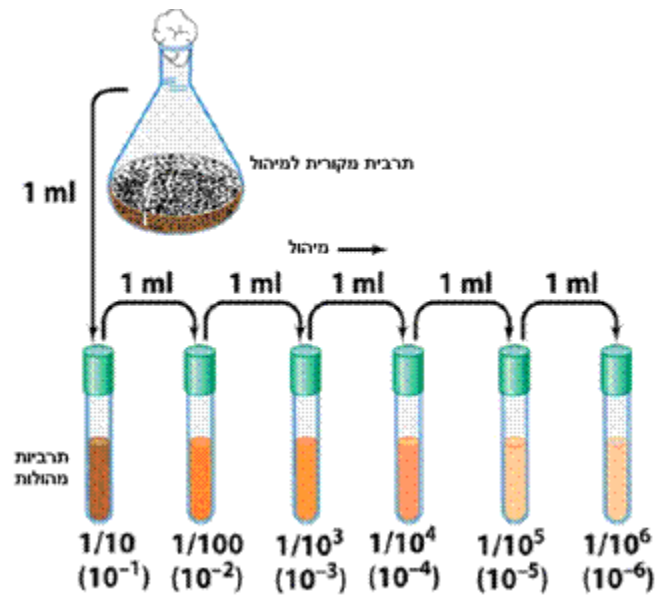
חיתוי משטח העבודה

1. צקו על משטח העבודה מעט תמיסת אתנול בריכוז 70% (לא 100%). דאגו שלא יהיה מקור אש בקרבת מקום.
2. פזרו את האתנול על כל המשטח והניחו לו להתנדף.

נספח:

הכנת מיהולים עשרוניים מתרבית חיידקים נוזלית

במצע גידול נוזלי יש בדרך כלל מיליוני חיידקים. אם רוצים לזרוע דגימה מתרבית החיידקים למצע מוצק באופן שאפשר יהיה לספור בצלחת את מספר החיידקים יש להכין לפני הזריעה סידרה של **מיהולים עשרוניים** של התרבית הנוזלית.



את המיהולים מכינים בתמיסה סטרילית של מצע הגידול, אך כדי לחסוך במצע זה ניתן גם להכין אותם בתמיסה סטרילית של NaCl בריכוז 0.9%.

את המיהולים יש לבצע באופן מבוקר שיאפשר לחשב את מספר החיידקים בתרבית המקורית על פי מספר המושבות שיצמחו.

האיור הבא מתאר באופן סכמטי את דרך הכנת המיהולים:

הסבר דרך הכנת המיהולים:

1. סמנו 6 מבחנות במספרים 1, -2, -3, -4, -5, -6.
2. הוסיפו לכל מבחנה 9 מ"ל של תמיסת NaCl סטרילית בריכוז 0.9% או מצע גידול סטרילי.
3. העבירו למבחנה המסומנת 1, -1 מ"ל מתרבית החיידקים. ערבבו היטב. [התרבית שקיבלתם במבחנה זו מהולה פי 10 מהתרבית המקורית. נהוג לרשום זאת 1:10 או 10^{-1}]
4. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 1 - למבחנה 2. ערבבו היטב. [התרבית שקיבלתם במבחנה זו מהולה פי 100 מהתרבית המקורית. נהוג לרשום זאת 1:100 או 10^{-2}]
5. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 2 - למבחנה 3. ערבבו היטב. [התרבית שקיבלתם במבחנה זו מהולה פי 1000 מהתרבית המקורית. נהוג לרשום זאת 1:1000 או 10^{-3}]
6. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 3 - למבחנה 4. ערבבו היטב.
7. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 4 - למבחנה 5. ערבבו היטב.
8. החליפו פיפטה, והעבירו 1 מ"ל ממבחנה 5 - למבחנה 6. ערבבו היטב.

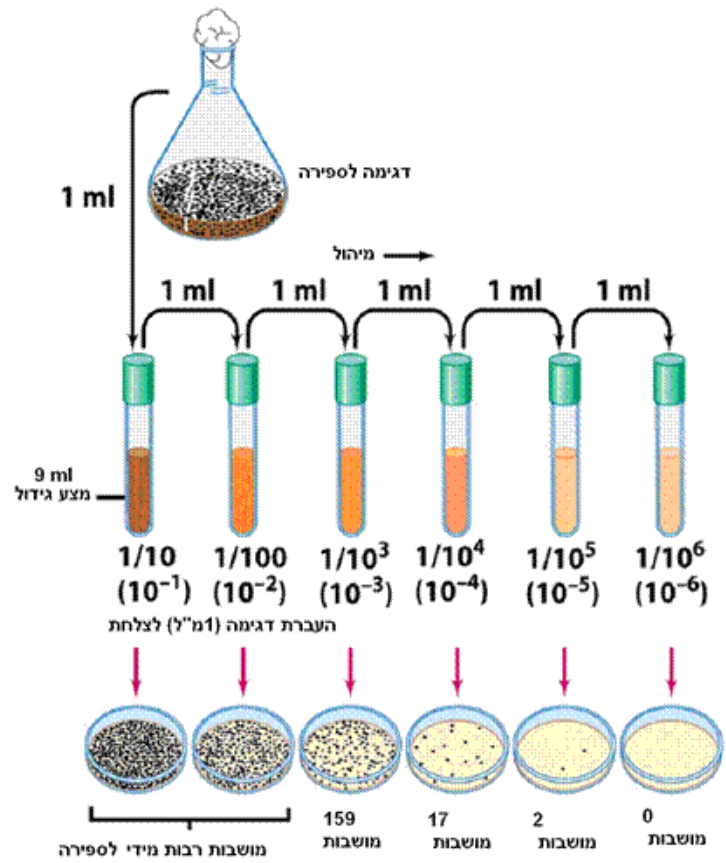
קיבלתם סדרה של 6 מבחנות. בכל מבחנה ריכוז החיידקים קטן פי 10 מהמבחנה הקודמת לה. במבחנה האחרונה ריכוז החיידקים קטן פי מיליון מהתמיסה המקורית (או כפי שנהוג לרשום זאת: 1:1,000,000 או 10^{-6}).

בהכנת המיהולים יש להקפיד על כמה עקרונות:

- בתחילת העבודה יש לסמן על כל המבחנות את מידת המיהול, ולהעביר לכולן 9 מ"ל של תמיסת NaCl סטרילית בריכוז 0.9% או מצע גידול סטרילי
- בכל מיהול (העברת 1 מ"ל מתרבית החיידקים) יש להשתמש בפיפטה חדשה.
- לפני העברת הדגימה ממבחנה אחת לבאה אחריה יש לערבב את תוכן המבחנה ביסודיות על ידי ניעור.

- בהעברת דגימה מכל מיהול לצלחות פטרי אפשר להשתמש באותה פיפטה, אך ורק בתנאי שמתחילים בתרבית הכי מהולה ומסיימים בתרבית הכי פחות מהולה (הסדר ההפוך לסדר הכנת המיהולים)

.



$$159 \times 10^3 = 1.59 \times 10^5$$

Plate count	Dilution factor	Cells (colony-forming units) per milliliter of original sample
159	10^3	1.59×10^5