

השתלמות לבורנטים, חנוכה תש"ף – דצמבר 2019

ניסויים במיקרוביולוגיה

מעובד ע"פ ד"ר מיכל מנדלוביץ

מומלץ להיעזר ב**סרט הדרכה לעבודה במיקרוביולוגיה** ובדפי ההסבר הנלווים לסרט.
לכל אחד מהתרגילים צורפה טבלה שבה ציון נקודת הזמן בו יש הדגמה של הנושא.

תרגיל מס' 1 - הכנת מצעי גידול לחיידקים

המצע הנוזלי המקובל ביותר בעבודה עם חיידקים הוא מצע עשיר Nutrient Broth (NB) המאפשר גידול של סוגים רבים של חיידקים. לצורך הכנת מצע מוצק מוסיפים אגר לתערובת המצע, ומצע זה נקרא Nutrient Agar (NA).

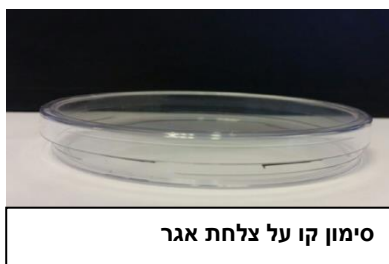
א. הכנת מצע נוזלי – NB - לא יבוצע בסדנה

1. בארלנמייר של 0.5 ליטר, יש להמיס 2.6 גרם של אבקת NB ב-200 מ"ל מים מזוקקים. לסגור את הבקבוק בפקק מצמר גפן עטוף בגזה, ולעטוף את הפקק בנייר אלומיניום.
2. רצוי להדביק על הבקבוק סרט המשנה את צבעו כאשר הסטריליזציה נעשית כראוי.
3. יש לעקר את המצע באוטוקלב בטמפרטורה של 121°C למשך 20 דקות. אם אין אוטוקלב אפשר לעקר בסיר לחץ.
4. יש לשמור את המצע – בארון (ולא במקרר). אם המצע יזדהם, החיידקים יתרבו ונוכל לראות שהמצע עכור. אין להשתמש במצע זה.

נושא	נקודת זמן בסרט (דקות)
עיקור תמיסות	4.59
הכנת מצעי מזון: מצע נוזלי	5.48

ב. הכנת צלחות עם מצע מוצק – NA

1. באמבט מים בטמפרטורה של 45°C נמצאים בקבוקים ובהם 100 מ"ל מצע NA מעוקר שהוכן מראש. לרשותכם צלחות פטרי סטריליות ריקות. רשמו את שמכם על תחתית הצלחת באמצעות עט (דק) לסימון על זכוכית. סמנו קו על דופן החלק התחתון של כל אחת משלוש צלחות (הנפח כ-25 מ"ל). באופן זה בכל אחת מהצלחות שתכינו יהיה נפח דומה של קרקע מזון. (בצלחות אלה נשתמש לניסויים בהמשך).



סימון קו על צלחת אגר

2. הניחו את הצלחות בקרבת האש, וצקו את האגר המזין, בעודו חם, עד קו הסימון בכל צלחת. אם האגר מתחיל להיקרש, ניתן לחמם אותו שוב באמבט. כסו את הצלחות והניחו לאגר להיקרש.
3. לאחר שהאגר נקרש יש להפוך את הצלחות. הפיכת הצלחות נועדה למנוע טפטוף טיפות מים שהצטברו על גבי המכסה אל המצע, דבר שיכול להפריע לזריעת החיידקים.
4. שמירת הצלחות – במקרר בערימה ניצבת, או בתוך שקית הניילון בה הגיעו הצלחות, אותה ניתן להחזיק במקרר גם במאוזן. אם מכינים את הצלחות מראש, מומלץ לעטוף אותן בשרוול הניילון בהן הגיעו או בניילון נצמד, כדי למנוע אידוי מים מהאגר וירידה בנפחו.
- ניתן להשתמש בצלחות במשך כ-2 - 3 חודשים, אך לפני השימוש יש לבדוק כל צלחת בנפרד. אם על האגר נראות מושבות של חיידקים או אם נפח האגר ירד בצורה משמעותית אין להשתמש בצלחת.
5. כשעה לפני הזריעה, מומלץ להוציא את הצלחות מהקירור, כדי להיפטר מטיפות המים שהתעבו על המכסה.

נושא	נקודת זמן בסרט (דקות)
מצע מוצק	6.32

שיטות לזריעת חיידקים

תרגיל וניסוי מס' 2 - זריעות מרבד (דשא) ובדיקת השפעת חומרים אנטיביוטיים על צמיחה

המטרה של זריעת מרבד (דשא) היא פיזור החיידקים באופן אחיד על פני קרקע המזון שבצלחת. פיזור החיידקים נעשה בעזרת מטוש או בעזרת מקל דריגלסקי.

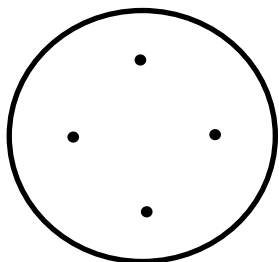
זריעת מרבד משמשת בעיקר בניסויים בהם בודקים השפעה מעכבת של חומר על גידול חיידקים בשיטת הדיפוזיה באגר. נבצע זריעה ב- 3 צלחות:

- * תרגול זריעה של מרבד חיידקים ב-2 צלחות, כל אחת תיזרע בדרך שונה (באמצעות מטוש או מקל דריגלסקי).
- * זריעה של מרבד חיידקים ועליו דסקיות של סוגים שונים של אנטיביוטיקה.

נושא	נקודת זמן בסרט (דקות)
גידול חיידקים	8.37
גידול חיידקים על מצע מוצק	10.42
זריעת מרבד	11.07

מהלך העבודה:

1. זריעת מרבד חיידקים E. coli על צלחות NA :
 - רשמו על תחתיות הצלחות את מספר הצלחת (3,2,1) ואת שמכם.
2. צלחת 1: טבלו את המטוש פעם אחת בתרבית החיידקים הנוזלית ופזרו את החיידקים על פני הצלחת באופן אחיד בכל הכיוונים.
3. צלחת 2: באמצעות פיפטה סטרילית שאבו 0.1 מ"ל מתרחיף החיידקים וטפטפו על האגר שבצלחת. פזרו את הטיפה על פני הצלחת בעזרת מקל דריגלסקי, תוך כדי סיבוב הצלחת.
4. צלחת 3: זרעו בזריעת מרבד **באחת** השיטות (מטוש או מקל דריגלסקי), לפי בחירתכם. הניחו לנוזל להיספג באגר במשך כ-5 דקות.



5. הנחת הדסקיות:

באמצעות פינצטה סטרילית, הניחו את הדסקיות על צלחת 3 במרחק שווה זו מזו (ראו איור).

הדגירו את הצלחות ב-37°C למשך לילה.

התרופה	כמות התרופה בכל דסקית
טטרציקלין	30 מיקרוגרם
אמוקסיצילין (מוקסיפון)	30 מיקרוגרם
פניצילין	10 יחידות בינלאומיות
סולפה	סולפה מאטואוקסזול 23.75 מיקרוגרם, טרימאטופרים 1.25 מיקרוגרם

6. בדיקת תוצאות (למחרת): אם אין אפשרות לבדוק את התוצאות יום לאחר ביצוע הניסוי, יש להדגיר את

הצלחות למשך 24 שעות, ואחר כך לשמור במקרר עד לבדיקת התוצאות.

- בדקו צמיחה של מרבד חיידקים על צלחות 1 ו-2.

- מדדו את קוטר אזור העיכוב שהתקבל סביב כל אחת מהדסקיות בצלחת 3 ורשמו את התוצאות.

נספחים:

גידול חיידקים במצע נוזלי:

חיידקים הזקוקים לחמצן יש לזרוע ב-10 מ"ל מצע בתוך ארלנמיייר של 100 מ"ל.

הזריעה נעשית ע"י העברה של כמות קטנה ממושבת חיידקים אל המצע הנוזלי בעזרת מחט זריעה או קצה של פיפטת פסטר סטרילית.

טמ' הגידול המומלצת תלויה בסוג החיידק.

את החיידקים המסופקים ע"י מרכז הפיתוח והתמיכה במעבדות ביולוגיה בבתי הספר בר-אילן יש לגדל בטמ' של 37°C.

חיידקים שמקורם בסביבה (אוויר, מים, קרקע) כדאי לגדל בד"כ בטמ' של 30°C.

הערה: אם החיידקים גדלים באינקובטור או באמבט מטלטל, ניתן לגדל 5 מ"ל תרבית במבחנה רגילה (אורך 20 ס"מ) מכוסה במכסה פלסטיק. (אין לסגור את המבחנה בפקק גומי, כי הדבר לא יאפשר כניסת אוויר למבחנה).

הכנת מבחנות לשמירת חיידקים לאורך זמן

1. הכינו מצע NA כמו בתרגיל 1.

2. מזגו 5 מ"ל מצע NA למבחנה סטרילית.

3. כסו את המבחנה בפקק (מצמר גפן עם גזה), והניחו לאגר להיקרש כאשר המבחנה מונחת בשיפוע קל

(למשל, ע"י הנחת צוואר המבחנה על עיפרון)

במבחנות פלסטיק סטריליות יש פקק פלסטיק מתאים.

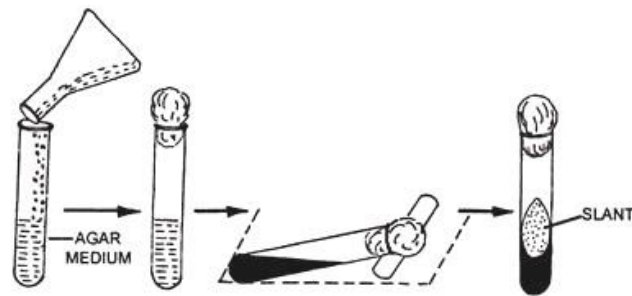


FIG. 16.11. Agar slant preparation.

4. לאחר שהאגר נקשר ניתן לזרוע על פניו חיידקים בעזרת מחט זריעה, לכסות את המבחנה, להדגיר בטמפרטורה המתאימה עד לקבלת מושבות ולשמור במקרר במאונך.