

קישור לתוכנית הלימודים

נושא המיקרואורגניזמים אינו נלמד בחטיבת הביניים כנושא ראשי. אולם, לאורך שנות החטיבה נחשפים התלמידים להיבטים שונים של עולם מרתק זה. בדרך כלל דרך ניסויי חקר בעזרת שמרים או חיידקים בכיתה ט'. כדי להעמיק את הבנת התלמידים על ייחודם וחשיבותם של מיקרואורגניזמים ובמיוחד לאחר תקופת הקורנה, יש לדעתנו חשיבות בהקניית מידע על תחום זה. לצורך הוראת המעבדות נדרשת הכנה של המורה, כמו כן רצוי להעביר לתלמידים שיעור מבוא בנושא מבנה תא חיידק, ההבדל בין חיידק לבין נגיף, ואופן הגידול האקספוננציאלי של חיידקים.

מטרות היחידה

בתום היחידה התלמיד ידע:

- לתאר את שלבי הגידול של חיידקים במצע מזון נוזלי.
- להכין מצע מזון נוזלי, ומצע גידול מוצק לחיידקים.
- להשתמש בספקטרופוטומטר כדי למדוד קצב גידול חיידקים.
- להכין ולהשתמש בעקום כיוול לצורך חישוב קצב גידול חיידקים.

רקע מדעי

ספקטרופוטומטר

במעבדה זו נעשה שימוש נרחב במכשיר הספקטרופוטומטר, שהינו מכשיר למדידת בליעת אור של חומר נבדק. הספקטרופוטומטר שולח לעבר הדוגמא הנבדקת אלומת אור בעלת טווח צר של אורכי גל. כאשר קרן האור מגיעה לדוגמא חלקה נבלע ע"י החומרים השונים בדוגמא, החלק שאיננו נבלע ושבעצם עובר את הדוגמא מזוהה ע"י גלאי. הגלאי מחשב את היחס בין עוצמת האור שעברה את הדוגמא לעוצמה שנכנסה אליה.

אנו מעוניינים למדוד בליעה של חומר מסוים אך עלינו לזכור שחומר זה נמצא בתערובת עם חומרים אחרים. אותם חומרים עשויים לבלוע קרינה אף הם ולכן יש לקזז את השפעתם. הקיזוז הנ"ל נעשה ע"י תמיסת הבלנק (Blank). תמיסה אשר מכילה את כל המרכיבים הנמצאים בדוגמא הנבדקת מלבד החומר שאת בליעתו רוצים למדוד. על כן לפני כל מדידה בספקטרופוטומטר עלינו לאפס את המכשיר עם תמיסת הבלנק.

על מנת למדוד את ערך הבליעה של חומר מסוים עלינו להעביר אותו לקיווטה. הקיווטה בעלת שתי דפנות מחוספסות ושתיים שקופות. יש להחזיק את הקיווטה רק בדפנות המחוספסות ולהכניס למכשיר כך שהדפנות השקופות מופנות לכיוון קרן האור.

הערכה כמות החיידקים 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 בהמשך). זורעים דגימה מכל אחד מהמיהולים ומאפשרים למושבות לצמוח. באמצעות ספירת המושבות וחישוב המיהול ניתן להעריך את מספר החיידקים בדגימה המקורית.

מבנה תא חיידק, מחזור גידול של חיידקים, מרכיבי מצע המזון של חיידקים, גורמים המשפיעים על קצב גידול חיידקים.

מעבדה 11: הכנת מצעים ומיהולים עשרוניים.

הנחיות ללבורנט (אפשר ומומלץ לעשות עם התלמידים)

הכנת מצע גידול נוזלי לחיידקים (LB) - הכן שני בקבוקים:

1. לתוך בקבוק פקק כחול שקול את החומרים הבאים:

- 2.5g - Difco Bacto tryptone
- 1.25g - Difco Yeast extract
- 1.25g - NaCl
- מים מזוקקים - 250ml

2. הכנס את הבקבוק לאוטוקלאב שכוון מראש לטמפרטורה של 121°C למשך 20 דקות.

הכנת סטרטר של חיידקים

1. הוסף לשתי מבחנות בנפח 15 מ"ל 3 מ"ל של תרחיף LB.

2. העבר באמצעות לופה (מקל סטרילי להעברת חיידקים), מעט מתרבית חיידקי אי קולי.

3. הדגר למשך הלילה ב- 37°C .

הכנת מיהולים עשרוניים

עקוב אחר ההנחיות כדי למהול את התמיסה המרוכזת של החיידקים לסדרה של מבחנות כך שבכל מבחנה ריכוז

התמיסה הסופי יהיה קטן פי 10. לשם כך היעזר בתמונה 19.

1. סמן 9 מבחנות בנפח של 15 מ"ל בספרות 1-9.

2. העבר מתרחיף החיידקים שגדל במשך הלילה 2 מ"ל למבחנה מספר 1 (אנו מעריכים כי במבחנה זו ריכוז

החיידקים הוא לפחות 910 חיידקים למיקרוליטר).

3. הוסף 9 מ"ל LB למבחנות 2-11.

4. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 1 למבחנה מספר 2

5. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 2 למבחנה מספר 3

6. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 3 למבחנה מספר 4

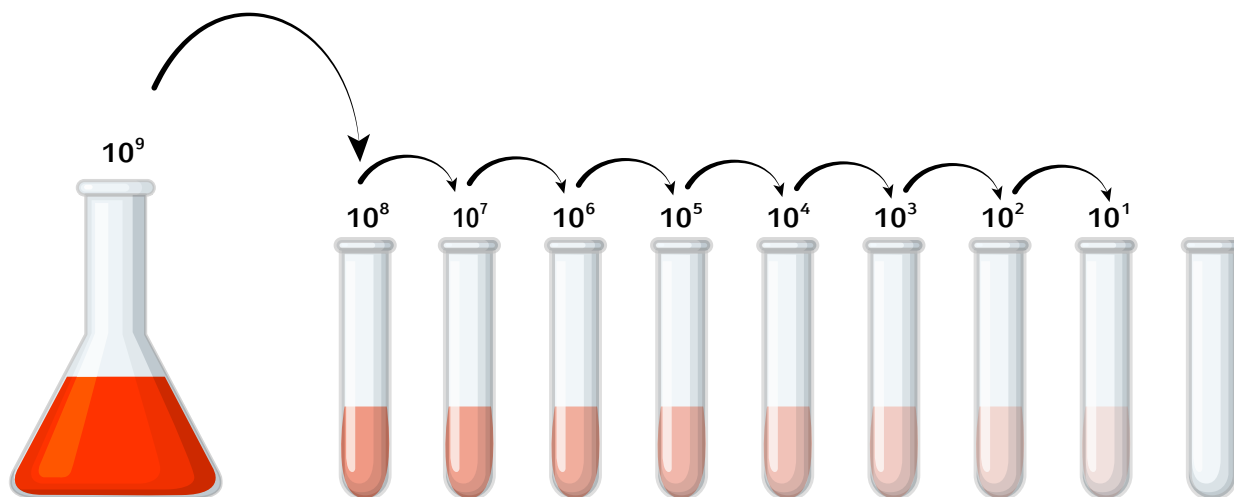
7. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 4 למבחנה מספר 5

8. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 5 למבחנה מספר 6

9. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 6 למבחנה מספר 7

10. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 7 למבחנה מספר 8

11. העבר 1 מ"ל ממבחנה מספר 8 למבחנה מספר 9



תמונה 19: תרשים המתאר כיצד להכין מיהולים עשורניים. מתחילים מהתמיסה המרוכזת ביותר, ומעבירים ממנה נפח ידוע למבחנה חדשה. משלימים עם 9 חלקים של תרחיף ללא חיידקים לקבלת מיהול פי 10. חוזרים על התהליך כ-10 פעמים.

הכנת מיהולים

יתכן שמיהול פי 10 יהיה יותר מידי, ואז מספר המושבות שנקבל יהיה קטן מידי. לכן נרצה להכין מספר מבחנות בהן המיהול יהיה קטן פי 2. לשם כך, מהל פי 2 כל אחת מהמבחנות 1-5 סמן אותן באופן הבא: 1.1, 2.1, 3.1, 4.1, 5.1

זריעה על מצע גידול מוצק

1. קח באמצעות פיפטור וטיפ סטרילי 100 מיקרוליטר של תרחיף חיידקים מהול ממבחנה מספר 4. זרע את התרחיף באמצעות מקל דרגלסקי חד פעמי על 2 צלחות פטרי שונות.
2. כתוב על כל צלחת: שם, תאריך, מספר המיהול (6-10 עבור מבחנה מספר 4), מספר סידורי רציף.
3. חזור על שלבים ד-ה עבור מבחנות 5-9.
4. הדגירו את הצלחות בטמפרטורה של 37°C למשך הלילה.

חישוב ריכוז התרבית בעזרת ספקטרופוטומטר

1. הוצא מ"ל 1 של תמיסת LB מכל אחת מהמבחנות 1.1-5.1 ומהמבחנות 6-9.
2. קרא בספקטרופוטומטר באורך גל של 600nm את עצמת הבליעה - של כל אחת מהמבחנות.
3. ספור את מספר המושבות שהתפתח 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.
4. לאחר הספירה הכפל את מספר המושבות בפקטור המיהול, והכפל שוב ב-10.

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

שימו לב! ההכפלה פי 10 בנוסחה שלעיל היא משום שזרענו 0.1 מ"ל. יש להתאים את החישוב לדרך העבודה.

דוגמת חישוב:

אם קבלנו 159 מושבות בצלחת שבה נזרעו 0.1 מ"ל מתרבית במיהול של 10^{-3} (מבחנה מספר 7) החישוב ייעשה כך:
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.
מכיוון שלזריעת צלחת זו השתמשנו בתרבית במיהול 10^{-3} : הרי שבמ"ל אחד של התרבית המקורית היו:

$$159 \times 10 \times 10^{-3} = 1,590,000$$

שהם 1.59×10^6 חיידקים ב-1 מ"ל תרחיף!

הכנת עקום כיול:

כדי למצוא את הקשר בין עצמת הבליעה (כפי שמדדנו בשלב מס' 5) לבין כמות החיידקים בדגימה עלינו לעשות את
הדבר הבא:

1. הכניסו לגליון אקסל את הנתונים הבאים: מספר מבחנה, מספר המיהול, מספר המושבות בצלחת ואת קריאת ה
OD עבור כל אחד מהמיהולים לפני הזריעה.
2. שרטטו עקום כיול של הבליעה האופטית (קריאה של הספקטרופוטומטר) כנגד כמות החיידקים בכל אחד
מהמיהולים שונים.

מעבדה 12: השפעת הטמפרטורה על קצב גידול חיידקי אי. קולי E.coli

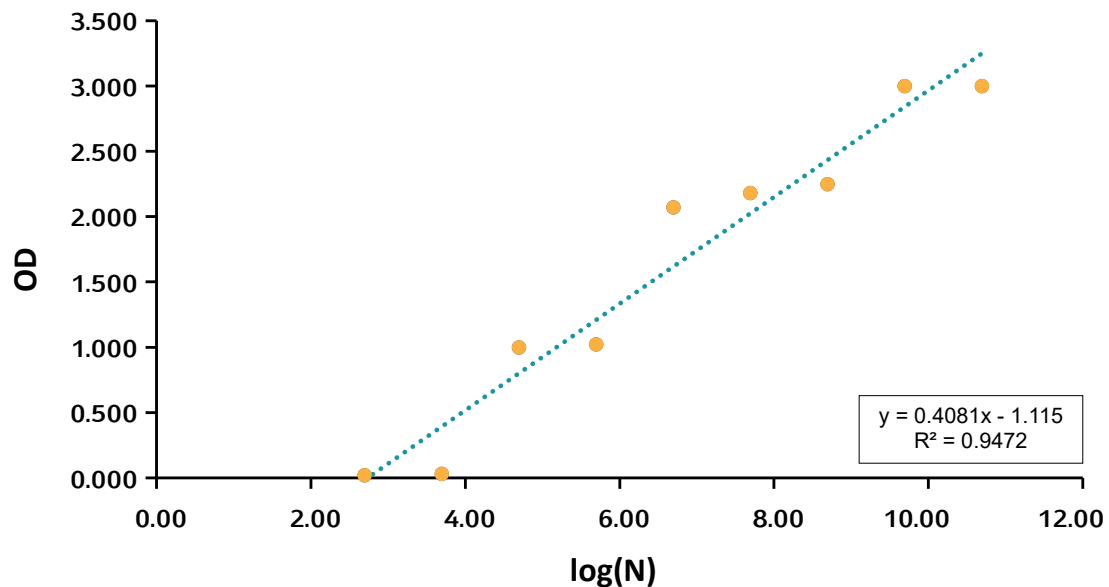
1. סמן במספרים 1-9, ארלנמיירים בנפח של 250 מ"ל.
 2. הוסף לכל אחד מהארלנמיירים 30 מ"ל של תמיסת LB מעוקרת. (וודא כי התמיסה סטרילית).
 3. הוסף לכל אחד מהכלים 200 מיקרוליטר של תרחיף חיידקי אי קולי שגודלו למשך הלילה בטמפרטורה של 37 מעלות צלסיוז.
 4. הדגר את הכלים בטמפרטורות שונות לפי הפירוט בטבלה 11.
- טבלה 11: הטיפולים השונים של הניסוי.

מספר ארלנמיייר	נפח מצע גידול במ"ל	טמפרטורה	נפח תרחיף חיידקים (מיקרו ליטר)
1	30	25	200
2	30	25	200
3	30	25	200
4	30	37	200
5	30	37	200
6	30	37	200
7	30	42	200
8	30	42	200
9	30	42	200

מעקב אחר התוצאות הניסוי

1. מיד בתחילת הניסוי הוציאו מ"ל של תמיסת LB מכלי מספר 1, וקראו בספקטרופוטומטר באורך גל של 600nm את עצמת הבליעה.
2. חזרו על הבדיקה עבור כל שאר הכלים.
3. חזרו על שלבים א-ב כל שעה במשך 6 שעות. (מאחר ויום הלימודים קצר, אפשר לבקש עזרה מהמורה או הלבורנט לקרוא חלק מהתוצאות. מומלץ לקבל טווח של 8 שעות אם מתאפשר).
4. רכזו את התוצאות בטבלה.

מעבדה 12: תוצאות למורה



OD	כמות חיידקים בסקלה לוגריתמית log(N)	כמות חיידקים	מבחנה
300	10.70	500000000000	1
3	9.70	50000000000	2
2	8.70	5000000000	3
2	7.70	500000000	4
2	6.70	50000000	5
1	5.70	5000000	6
1	4.70	500000	7
0	3.70	50000	8
0	2.70	5000	9

לפניכם תוצאות של קריאת הצפיפות האופטית של החיידקים במבחנות עם תרחיף החיידקים, כך שמבחנה מספר 1 היא מבחנת המקור וממבחנה מספר 9 מייצגת מיהול של פי 10^9 . מאחר וקבלנו קריאה אופטית של כל אחד מהמיהולים אנחנו יכולים לקשר בין ריכוז החיידקים לצפיפותם האופטית. לעבוד עם מספרים גדולים זה לא נוח לכן הוספנו עמודה של צפיפות החיידקים בסקלה לוגריתמית. השתמשנו בנתוני הטבלה כדי לבנות את עקום הכיול. שימו לב שלפי הבדיקה שלנו ערכי ה-OD במקרים מסוימים זהים, יתכן בגלל בדיקה לא טובה או חוסר רגישות של המכשיר.

איך משתמשים בעקום הכיול?

- לוקחים את ערך הקריאה האופטית בזמן כלשהו לאורך הניסוי ומציבים את ערך זה במשוואת הישר שקבלנו בעקום הכיול, במקום משתנה Y כמובן.
- מקבלים ערך X כלשהו, לשם הדוגמה נניח ש-X יצא שווה ל 7.78.
- עלינו לזכור שציר ה-X שלנו מבטא בסולם לוגריתמי לפי בסיס 10 כלומר:
- במקום לכתוב $X=7.78$ עלינו לכתוב $\log(N)=7.78$. הפתרון של N הוא $10^{7.78} = 60,255,958$. כדי שיהיה לנו נוח ניתן לכתוב זאת גם כך: 6.02×10^7 .

אפשר להכין לתלמידים תבנית בטבלת אקסל שבה יהיה עליהם להזין את ערך הקריאה האופטית, והחישובים יתבצעו באופן אוטומטי על ידי התכנה. כדאי מאד לעזור לתלמידים בחלקים המתמטיים של הניסוי כדי שזה לא ירתיע אותם. תבנית לטבלת אקסל כזו תמצא באתר מוטנ"ט.