

מעבדה במיקרוביולוגיה

דו"ח מעבדה 3 א' ב'

מטרת הניסוי

- קביעת משך זמן דור בחיידקי *E. coli*.
- חקר עיכוב ותמותה של חיידקי *E. coli* על ידי חימום, הוספת פניצילין והוספת כלורמפניקול.

תוצאות

טבלה מס' 1 – עקומת גידול של חיידקי *E. coli* בתרבית המקורית

רמת מיהול זמן (דק)	מיהול 10^{-5} [מס' מושבות]		מיהול 10^{-6} [מס' מושבות]	
	צלחת מספר 1	צלחת מספר 2	צלחת מספר 1	צלחת מספר 2
0	720	828	138	167
20	984	1032	140	171
40	1872	1928	160	170
60	לא ניתן לספור	לא ניתן לספור	188	197
90	לא ניתן לספור	לא ניתן לספור	285	284
120	לא ניתן לספור	לא ניתן לספור	484	600

טבלה מס' 2 - טבלת עזר להצגת נתונים לצורך עקומת גידול

זמן (דקי')	ממוצע מושבות עבור מיהול 10^{-5}	ממוצע מושבות עבור מיהול 10^{-6}	$N(10^{-5})$ [ח/מ"ל]	$N(10^{-6})$ [ח/מ"ל]	ממוצע מיהולים [ח/מ"ל]	Log N	O.D nm660
0	774	153	$1.55 \cdot 10^8$	$3.05 \cdot 10^8$	$2.30 \cdot 10^8$	8.3615	0.179
20	1008	156	$2.02 \cdot 10^8$	$3.11 \cdot 10^8$	$2.56 \cdot 10^8$	8.4087	0.212
40	1900	165	$3.80 \cdot 10^8$	$3.30 \cdot 10^8$	$3.55 \cdot 10^8$	8.5502	0.300
60	לא ניתן לספור	193	לא ניתן לספור	$3.85 \cdot 10^8$	$3.85 \cdot 10^8$	8.5855	0.396
90	לא ניתן לספור	285	לא ניתן לספור	$5.69 \cdot 10^8$	$5.69 \cdot 10^8$	8.7551	0.490
120	לא ניתן לספור	542	לא ניתן לספור	$1.08 \cdot 10^9$	$1.08 \cdot 10^9$	9.035	0.579

הערות :

- נתוני O.D. לאחר הפחתת רקע ($\Delta O.D. = 0.007$)
- ערכים מוצללים בצהוב – ערכים שיוצגו בדוגמת החישוב.

דוגמת חישוב :

כמות חיידקים ב- $t=0$ במיהול של 10^{-5} :

$$\frac{720+828}{2} = 774 \frac{\pi}{ml}$$

חישוב $N(10^{-5})$ (כאשר נפח הדגימה היה 0.5 מ"ל) :

$$\frac{774 \times 10^5}{0.5} = 1.54 \cdot 10^8 \frac{\pi}{ml}$$

השפעות מעכבים שונים על גידול חיידקי E.coli**טבלה מס' 3 – השפעת פניצילין על גידול חיידקי E.coli**

זמן (דק)	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		ממוצע 10^{-4}	ממוצע 10^{-5}	ממוצע 10^{-6}	ריכוז A [חי/מ"ל]	Log N	O.D 660 nm
	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2						
A												
60										$1.3 \cdot 10^8$	8.114	0.05
90	114	93	29	14	5	2	103.5	21.5	3.5	$4.5 \cdot 10^6$	6.649	0.048
120	4	1	0	0	2	0	2.5	0	1	$6.8 \cdot 10^5$	5.8346	0.024

טבלה מס' 4- השפעת כלורמפניקול על גידול חיידקי E.coli

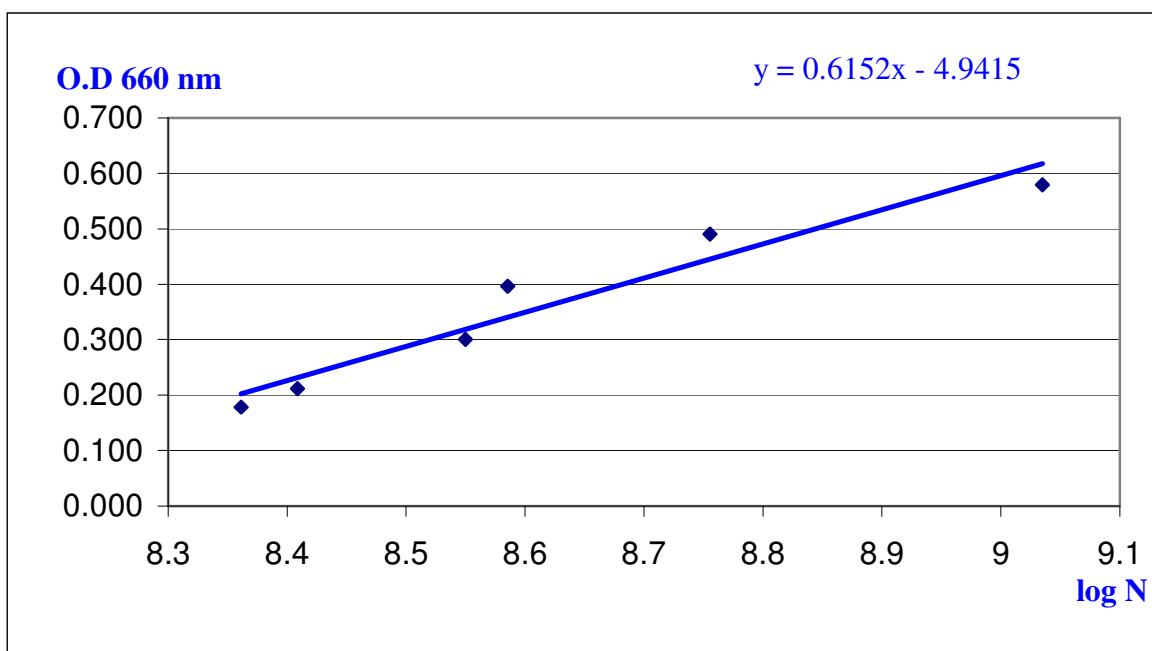
זמן (דק)	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		ממוצע 10^{-4}	ממוצע 10^{-5}	ממוצע 10^{-6}	ריכוז B [חי/מ"ל]	Log N	O.D nm660
	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2						
B												
60										$1.26 \cdot 10^8$	8.101	0.042
90	לא ניתן לספור	לא ניתן לספור	118	156	20	18	לא ניתן לספור	137	19	$3.27 \cdot 10^7$	7.5145	0.051
120	לא ניתן לספור	לא ניתן לספור	239	254	24	23	לא ניתן לספור	246.5	23.5	$2.35 \cdot 10^7$	7.3711	0.051

טבלה מס' 5- השפעת טמפ' של על גידול חיידקי E.coli

זמן (דק)	10^{-4}		10^{-5}		10^{-6}		ממוצע 10^{-4}	ממוצע 10^{-5}	ממוצע 10^{-6}	ריכוז C [חי/מ"ל]	Log N	O.D nm660
	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2						
C												
60										$1.21 \cdot 10^8$	8.084	0.032
90	0	0	0	0	1	0	0	0	0.5	$3.33 \cdot 10^5$	5.5229	0.040
120	2	1	0	0	0	0	1.5	0	0	$1 \cdot 10^4$	4	0.028

הערות :

- ח' סימון מקוצר לחיידקים.
- תאים מוצהבים בטבלאות למטה, באים לייצג ערכים שחושבו מעקומת הכיול
- הערכים בעמודות המיהולים מבטאים מס' מושבות בצלחת.



גרף מס' 1 : עקום כיול של חיידקי E.coli במרק NB

מעקומת הגידול אנו רואים כי קיים יחס ישר בין מידת העכירות לבין מס' החיידקים. הקשר מבוטא בקירוב מתמטי באמצעות הגיליון האלקטרוני ע"י המשוואה :

$$y = 0.6152x - 4.9415$$

טבלה מס' 6 : חישוב ריכוז החיידקים בבקבוקים A,B,C ב- $t=60_{\min}$

ריכוז חיידקי ב- $t=60_{\min}$ $\left[\frac{n}{ml}\right]$	log N	O.D (660nm)	בקבוק ארלין מאייר נבדק
$1.3 \cdot 10^8$	8.114	0.05	A - פניצילין
$1.26 \cdot 10^8$	8.101	0.042	B - כלורמפניקול
$1.21 \cdot 10^8$	8.084	0.032	C - טמפי 55 מעלות

הערות :

- הפחתת רקע O.D. : $(\Delta O.D._A = 0.010, \Delta O.D._B = 0.008, \Delta O.D._C = 0.006)$.
- הערכים המודגשים בצהוב לצורך דוגמת חישוב.

ע"פ הנוסחה שקיבלנו מגרף מס' 1- גרף הכיול ניתן לחשב את ריכוז החיידקים בבקבוקים A,B,C ב- $(t=60_{\min})$

לצורך נוחות, תוצאות הריכוזים הוצגו בטבלאות המרכזות את הנתונים עבור בקבוקים A,B,C בדף הקודם.

דוגמת חישוב עבור ריכוז חיידקים ב- $t=60_{\min}$ בבקבוק A :

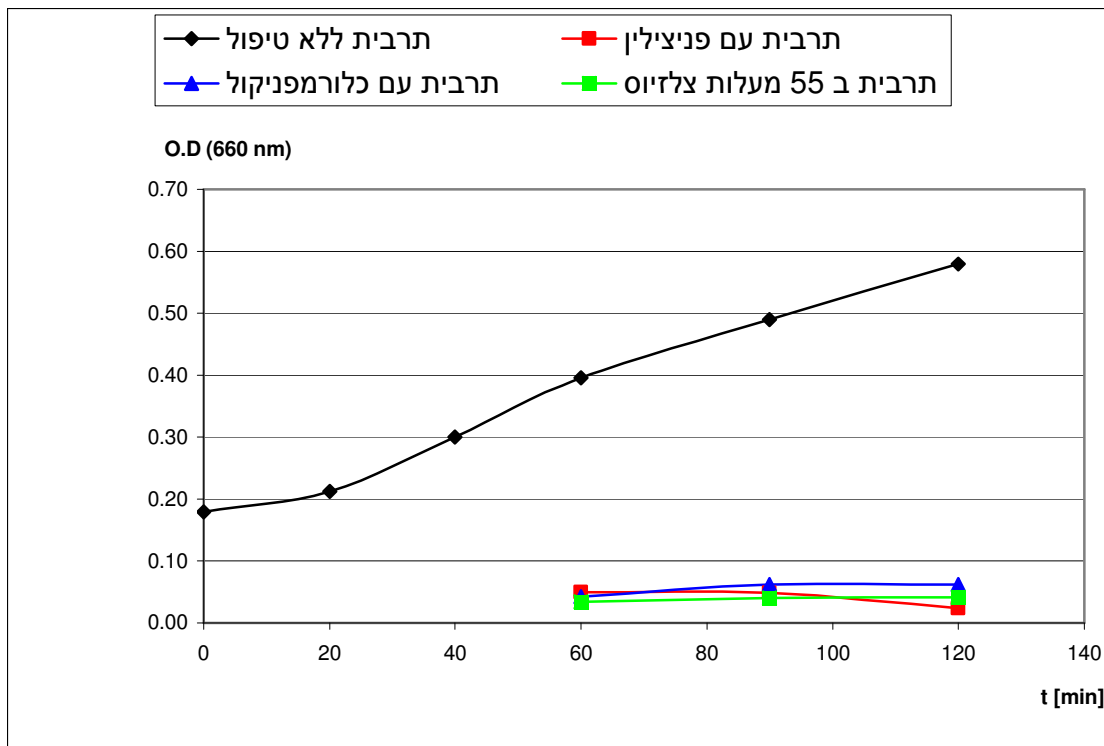
נציב בנוסחה שקיבלנו את ערך ה- O.D. :

$$y = 0.6152x - 4.9415$$

$$0.05 = 0.6152x - 4.9415$$

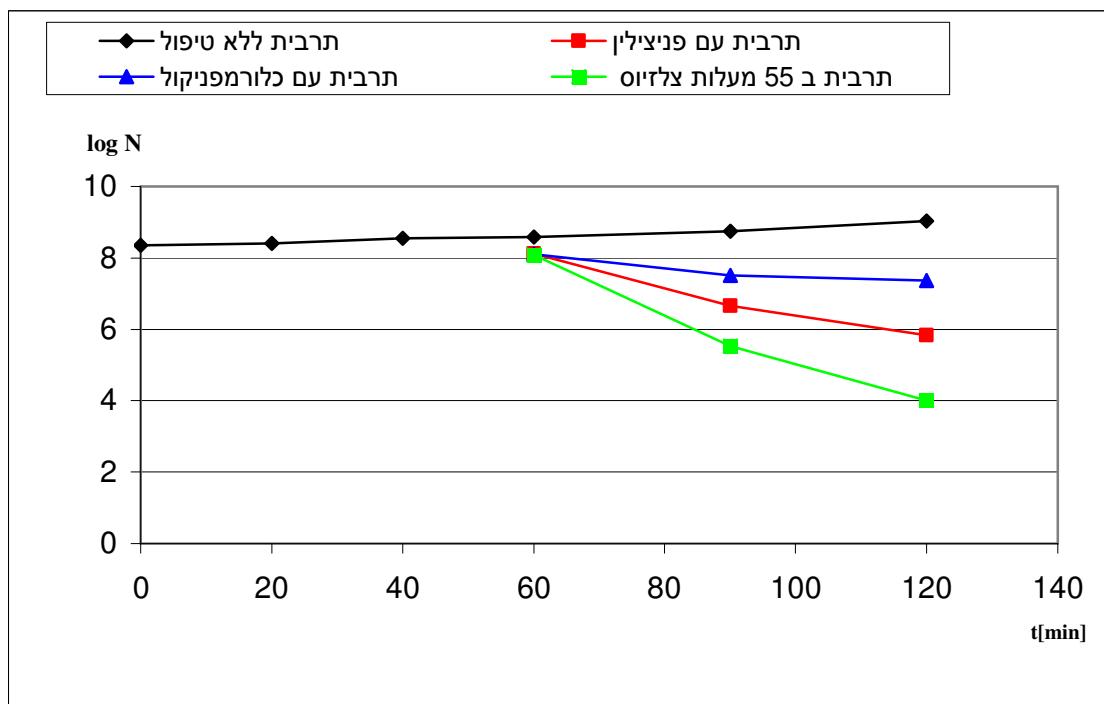
$$x = \log N = 8.114$$

$$N = 10^x = 10^{8.114} = 1.3 \cdot 10^8 \frac{n}{ml}$$



גרף מס' 2 – השפעת פניצילין כלורמפניקול וטמפ' על גידול חיידקי *E. coli*

ניתן לראות שעקומות הגידול של חיידקי *E. coli* בנוכחות כלורמפניקול, פניצילין ובטמפ' של 55 מעלות נמוכים באופן משמעותי מאשר עקום הגידול ללא החומרים, תנאים הנ"ל.



גרף מס' 3 : השפעות פניצילין, כלורמפניקול ו-טמפ' על חיידקי *E. coli* - בהצגה לוגריתמית

ניתן לראות כי עקום הגידול ללא הוספת חומרים אנטיביוטיים ובטמפ' של 37 מעלות נשאר במגמת עלייה לאורך כל זמן הניסוי בעוד ששאר הגרפים הראו מגמת ירידה. שיפוע הירידה החריף ביותר הוא של תרבית שהודגרה בטמפ' של 55 מעלות צלזיוס. השיפוע הפחות תלול הוא של תרבית שהכילה כלורמפניקול.

דיון ומסקנות

עקומת גידול של חיידקי *E. coli*

עקומת הכיול מאפשרת למצוא ריכוז חיידקים ע"י הצפיפות האופטית מכיוון שהתרביות נמצאות בשלב הלוגריתמי בו קיים יחס ישיר בין השניים. בכל פאזה אחרת היינו זקוקים לשיטות אחרות כגון ספירה חיה כדי לקבוע את הריכוז.

ניתן להסיק לנוכח תוצאות הניסוי, שגידול חיידקי *E. coli* מעוכב באופן משמעותי ע"י כל אחד מגורמי ההשפעה הנבדקים. הגורם האפקטיבי ביותר לפגיעה בגידול החיידקים הנבדקים במקרה שלנו הוא טמפ' גבוהה. נדון בכל אחד מהגורמים בהרחבה:

השפעת פניצילין על גידול חיידקי *E. coli*

פניצילין הינו חומר אנטיביוטי הגורם להפסקה בסינתזת דופן התא בשלב הלוגריתמי ע"י היקשרות לטראנספפטידאזות או קארבוקסיפפטידזות. ע"י פגיעה בסינתזת הדופן הפניצילין גורם לקרעים בדופן ולכן מוגדר כחומר בקטריוליטי- גורם לליזיס בחיידקים. תוצאות הספירה החיה והספירה בכללית ירדו כפי שניתן לראות בטבלה מס' 3. שכן החיידקים המתים עברו ליזיס וערכי העכירות ירדו בהתאם.

השפעת כלורמפניקול על גידול חיידקי *E. coli*

כלורמפניקול הינו חומר אנטיביוטי הגורם להפסקת סינתזת חלבון בתא החיידק ע"י היקשרות לחלבון S50 ריבוזומלי ומונע היווצרות קשר פפטידי בין חומצה אמינית לטרנספורטר RNA ע"י דיכוי פפטידיל טראנספראז. כלורמפניקול הינו חומר בקטריוסטטי המעכב את חלוקת החיידק אך לא הורגת אותו. ניתן לראות ע"פ טבלה מס' 4 שבספירה בכללית ובספירה החיה וכמו כן ע"פ השיפוע המתון בגרפים 2 + 3 שריכוז החיידקים נשאר פחות או יותר קבוע- כלומר גדילתם הופסקה אך הם לא מתו, העכירות כמעט ואינה משתנה, משמעות הדבר כי לא היה ליזיס.

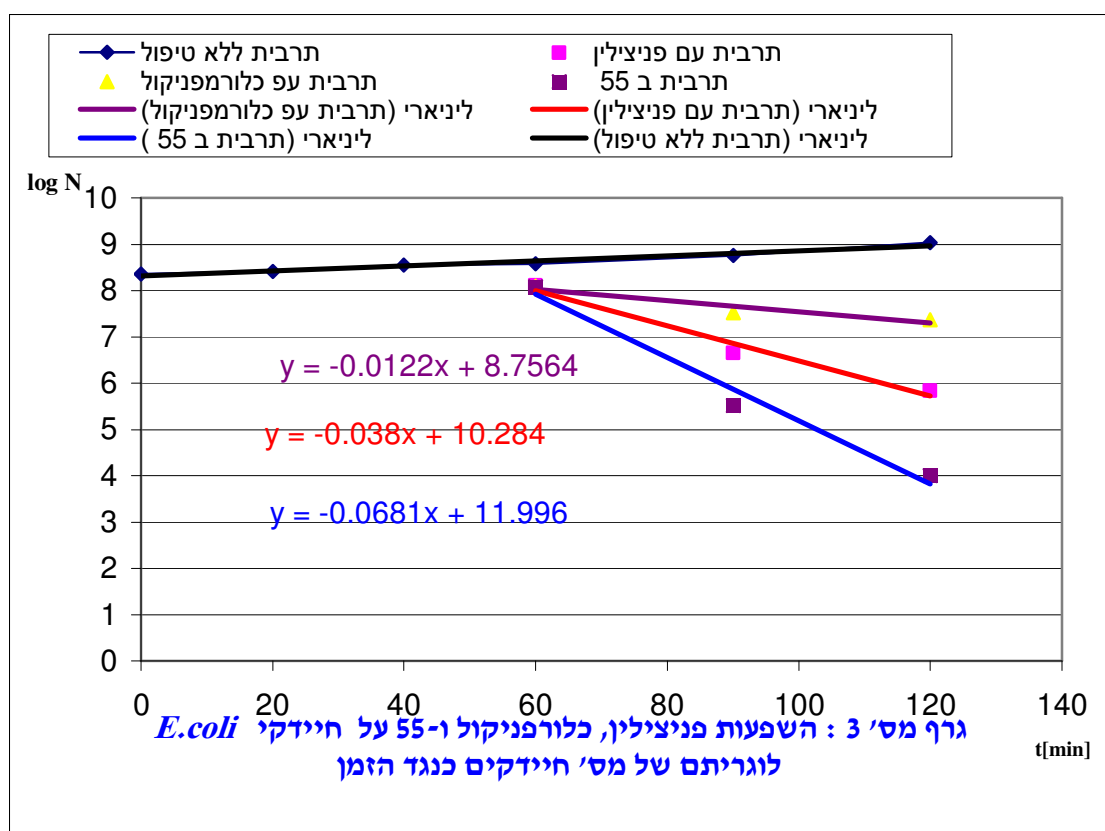
השפעת טמפ' של על גידול חיידקי *E. coli*

חיידקי *E. coli* הינם חיידקים מזופיליים החיים בטמפ' של $30 - 40^{\circ}C$. טמפ' גבוהה מזו (במקרה שלנו $55^{\circ}C$) נגרם נזק בלתי הפיך לחיידק כתוצאה מדה-נטורציה של כלל החלבונים: חומצות אמינו, אנזימים ונוקליאוטידים. בעקבות פגיעה בהני"ל החיידק לא יכול להתחלק. ולכן כפי שאנחנו רואים בתוצאות ע"פ טבלה מס' 5 בספירה החיה כמעט שאין מושבות דהיינו רוב החיידקים מתים. ניתן לראות שריכוזם הן בספירה בכללית והן בספירה חיה ירד באופן משמעותי הן בספירה הכללית והן בספירה החיה ומכאן נסיק שהטמפ' הגבוהה גרמה לליזיס בתא כתוצאה מדה-נטורציה של החלבונים השונים, ירידה בעכירות מחזקת את העובדה כי מדובר בליזיס.

חישוב מס' חיידקים משוער בעבור כל טיפול:
 החישובים מבוצעים מתוך גרף מס' 3.
 בזמן 100 דקות:

ריכוז חיידקי ב $t = 100 \text{ min}$	log N	סוג טיפול
$6.3 \cdot 10^8$	8.8	ללא טיפול
$3.1 \cdot 10^6$	6.5	A-פניצלין
$3.1 \cdot 10^7$	7.5	B-כלורמפניקול
$1 \cdot 10^5$	5	C-טמפי 55 מעלות

הריכוזים ביחידות של חיידקים למ"ל.
 ערכי log N נלקחו מהגרף בזמן 100 דקות. חישוב הריכוז ע"י ההופכי של log.



דו"ח מעבדות מרוכזות במיקרוביולוגיה

מעבדה 2

נושא המעבדה

- א. הערכה כמותית של חיידקים
 ב. הערכה איכותית של חיידקים בסביבות שונות

מטרות הניסוי

- א. קביעה כמותית של חיידקי *E. coli* ע"י ספירה חיה במצע מוצק ו – end point במצב נוזלי.
 ב. מיקרואורגניזמים בסביבתם הטבעית :
 • הכרת הפלורה של הפה, הגרון והידיים.
 • מ"א (מיקרואורגניזמים) באוויר.
 • מ"א במים.
 • מ"א באדמה.

חלק א' :

- להלן ממצאי הניסוי :
 אלכסנדרה דגמה תרבית צעירה.
 זוהר דגם תרבית זקנה.

קביעה כמותית של תרבית חיידקי *E. coli* זקנה

End point	דרגת מיהול	ריכוז חיידקים בתרחיף מקורי [חיידקים למ"ל]	מספר מושבות	
			צלחת מספר 2	צלחת מספר 1
עכור	10^{-5}	לא בוצע חישוב מסי רב מדי של חיידקים	דשא, לא ניתן לספור	דשא, לא ניתן לספור
עכור	10^{-6}	$1.46 \cdot 10^9$	78	67
עכור	10^{-7}	$1 \cdot 10^9$	12	8
עכור	10^{-8}	$1 \cdot 10^9$	2	0
צלול	10^{-9}	0	0	0

קביעה כמותית של תרבית חיידקי *E. coli* צעירה

End point	דרגת מיהול	ריכוז חיידקים בתרחיף מקורי [חיידקים למ"ל]	מספר מושבות	
			צלחת מספר 2	צלחת מספר 1
עכור	10-5	לא בוצע חישוב מס' רב מדי של חיידקים	דשא, לא ניתן לספור	דשא, לא ניתן לספור
עכור	10-6	$6.5 \cdot 10^9$	70	60
עכור	10-7	$1.1 \cdot 10^9$	10	12
עכור	10-8	$1.5 \cdot 10^9$	2	1
צלול	10-9	0	0	0

דוגמת חישוב לספירה חיה :

בתרבית בצלחת מס' 1 במיהול של 10^{-7} התגלתה מושבה אחת. לצלחת נלקחו 0.1 מ"ל של דגימת חיידקים. נבצע "ערך משולש" כדי לקבל מס' חיידקים למ"ל אחד :

$$0.1_{ml} \Rightarrow 1$$

$$1_{ml} \Rightarrow x$$

$$x = \frac{1 \times 1_{ml}}{0.1_{ml}} = 10$$

כלומר 10 חיידקים למ"ל, כדי לחשב את מס' החיידקים התרחיף המקורי עלינו פשוט לחלק בדרגת המיהול

של הדגימה אותה בדקנו : $N = \frac{10}{10^{-7}} = 1 \cdot 10^8 \text{ cfu/ml}$ כלומר $1 \cdot 10^8$ חיידקים למ"ל.

תוצאות :

1. ניתן לראות כי ריכוז החיידקים בספירה חיה בכל רמות המיהול התקבלו באותו סדר גודל גם בתרבית הצעירה וגם בתרבית הזקנה.
2. ניתן לראות כי בשתי השיטות, בספירה החיה ושיטת ה - end point, במיהול של 10-9 לא נראית צמיחה של מושבות.

חלק ב' :**בדיקת נוכחות חיידקים ממספר מקורות שונים, עבור זוהר זמיר**

מצע אגר דם	מצע NA	מקור חיידקים
הרבה מושבות קטנות	מעט מושבות קטנות	גרון
הרבה מושבות קטנות	מעט מושבות קטנות	שיניים
	מעט מושבות גדולות	ידיים לפני שטיפה
	הרבה מושבות קטנות	ידיים אחרי שטיפה
	אין מושבות	אוויר ראות

בדיקת נוכחות חיידקים בדגימות ממספר מקורות שונים, עבור אלכסנדרה צ'נק

מצע אגר דם	מצע NA	מקור חיידקים
הרבה מושבות קטנות	מעט מושבות קטנות	גרון
הרבה מושבות קטנות	מעט מושבות קטנות	שיניים
	מעט מושבות גדולות	ידיים לפני שטיפה
	פחות מושבות גדולות	ידיים אחרי שטיפה
	אין מושבות	אוויר ראות

בדיקת נוכחות חיידקים בדגימות ממספר מקורות, תוך כדי שינוי מצע הגידול מ- NA לאגר דם

מצע NA	מקור חיידקים
הרבה מושבות גדולות	אדמה
הרבה מאוד מושבות אדומות קטנות ומעט מושבות לבנות גדולות	מי ביוב
ללא מושבות	מי ברז
הרבה מושבות קטנות	אוויר במצב מאונך
מושבה אחת גדולה	אוויר במצב מאוזן

תוצאות :

1. אדמה – ניתן לראות כי באדמה קיימים הרבה חיידקים .
2. מי ביוב מול מי ברז – מי ברז לא הכילו חיידקים , ואילו מי ביוב מכילים חיידקים מסוגים שונים.
3. צלחת חשופה לאוויר במצב מאונך למול צלחת חשופה לאוויר במצב מאוזן – ניתן לראות כי לצלחת במצב מאוזן הייתה נפלו הרבה חיידקים, ולצלחת במצב מאונך נפל חיידק אחד.
4. ידיים לפני שטיפה למול ידיים אחרי שטיפה – היו הבדלים במצב זה בינינו , ידיה של אלכסנדרה לאחר השטיפה היו נקיות, ידיו של זוהר היו מלוכלכות.
5. גרון – מצע NA מול אגר דם – ניתן לראות בברור כי במצע האגר דם , גם לאלכסנדרה וגם לזוהר נתגלתה התרבות חיידקים גדולה באופן משמעותי למול מצע ה-NA .
6. שיניים – מצע NA מול אגר דם – אותו הדין כמו לגבי ממצאי הגרון.

מסקנות :**חלק א' :**

ישנה התאמה בין 2 השיטות (ספירה חיה ו- end point), וניתן להשתמש בשתייהן לצורך קביעת סדר גודל של ריכוז החיידקים התרבית המקורית.

חלק ב' :

1. אוויר – יש לטפל בצלחות ללא חשיפה מיותרת לאוויר לצורך הקניית סטריליות . שכן צלחת שנמצאת במצב מאונך הייתה חשופה פחות לחיידקים, ככל הנראה המושבה שהתפתחה ע"ג הצלחת במצב מאונך קיבלה את הזיהום ממשב רוח אקראי או מטיפול לקוי על ידינו, אחרת הייתה נשארת נקייה.
2. אדמה- ניכרת כמות חיידקים לא מבוטלת באדמה.
3. שטיפת ידיים, לצורך הקניית ניקיון עד רמת סטריליות בידיים יש לשטוף ידיים היטב וליבשן בצורה סטרילית. את התוצאות שלנו ניתן להסביר ע"י זה שמי שניגב ידיים בנייר, ידיו היו מזוהמות כי הנייר לא סטרילי, ואכן, זוהר ניגב ידיו בנייר ואלכסנדרה לא.
4. מים – מי ברז הם נקיים, מי ביוב מזוהמים מאוד.
5. גרון + שיניים – ניכר בבירור כי החיידקים ממקורות אלו התפתחו בקצב גבוה יותר במצע האגר דם מאשר במצע ה-NA, מה שמאפשר להסיק שמצע הדם הוא עשיר יותר בנוטריינטים בעבור חיידקי הגרון והשיניים שרובם המוליטיים .

מעבדה 5

מטרת הניסוי

קביעת השפעת חומרים אנטיביוטיקה שונים על חיידקים ממינים שונים.

להלן ממצאי הניסוי :

השפעת חומרים אנטיביוטיים שונים על סוגי חיידקים שונים

סוג חיידק אנטיביוטיקה	<i>Bacillus subtilis</i>		<i>Staphylococcus aureus</i>		<i>Bacillus cereus</i>		<i>E. coli</i>		<i>Sarcina lutea</i>		<i>Serratia</i>		<i>Proteus vulgaris</i>	
Penicillin	0.5	-	0.5	-	-	-	-	-	1.5	1.6	-	-	-	-
Eritromycin	3.2	3.5	1.9	2	1.5	3	0.2	-	2.7	2.7	1.7	1.6	0.4	-
Gentamicin	1.9	2	1.9	1.45	1.9	2.9	1.1	1.8	1.3	1.8	1.7	1.6	0.9	-
Sulfadiazine	2.4	1.6	1.6	-	-	-	-	-	1.6	1.1	1.6	1.4	1.2	-
Ampicillin	2	2.1	3	2.7	-	-	-	-	4	4.6	-	-	-	-
Chloramphenicol	3.2	2.8	2.2	2.3	2.2	2.2	-	-	3.1	3.3	3	2.9	1.1	0.8
Tetracycline	3.4	3.5	2.7	2.6	2.8	2.8	2.2	2.2	3.1	3.2	1.4	0.7	1	0.7
Neomycin	1.7	1.8	1	0.8	1.3	1.8	1.4	-	1.4	1.6	1.6	1.8	1.1	1.2

כל הערכים בטבלה מדודים בס"מ.

תוצאות בשחור – ממוצע כיתתי
תוצאות בכחול – תוצאות שלנו
"- מסמן היעדר הילה

סידור חומרים אנטיביוטיים שונים ע"פ טווח השפעה

פחות יעילה

יותר יעילה

Penicillin Ampicillin Sulfadiazine Chloramphenicol Neomycin Gentamicin Eritromycin Tetracycline

סידור חיידקים ע"פ עמידותם של חיידקים

לא עמיד עמיד

Staphylococcus aureus *Bacillus subtilis* *Sarcina lutea* *Serratia* *Proteus vulgaris* *Bacillus cereus* *E. coli*

מעבדה 3**נושא המעבדה**

השפעת גורמים שונים על קצב גידול של חיידקי *E. coli*

מטרת הניסוי

השפעת תנאי סביבה שונים וגיל תרבית על קצב גידול חיידקי *E. coli*.

להלן ממצאי הניסוי :

בדיקת עכירות עבור תרבויות חיידקים בתנאים שונים

time (min) מס' מבחנה	0	20	40	60	80	100	120	160	140	180	K	T
1	0.075	0.101	0.131	0.185	0.280	0.336	0.400	0.420	0.463	0.500	0.0185	53.93
2	0.080	0.116	0.163	0.229	0.303	0.365	0.430	0.457	0.494	0.520	0.0194	51.58
3	0.060	0.109	0.167	0.221	0.313	0.360	0.410	0.417	0.412	0.416	0.0185	54.14
4	0.070	0.118	0.118	0.140	0.153	0.154	0.160	0.156	0.156	0.157	0.006	156.18
5	0.068	0.102	0.104	0.116	0.141	0.147	0.140	0.134	0.125	0.130	0.011	91.08
6	0.065	0.122	0.163	0.243	0.350	0.400	0.500	0.518	0.617	0.642	0.020	49.47
7	0.049	0.073	0.076	0.136	0.226	0.300	0.380	0.400	0.435	0.435	0.019	53.35
8	0.049	0.099	0.104	0.111	0.134	0.159	0.190	0.220	0.269	0.303	0.012	83.88
9	0.049	0.081	0.180	0.216	0.242	0.260	0.360	0.333	0.363	0.280	0.009	113.09
10	0.082	0.100	0.120	0.164	0.214	0.271	0.360	0.390	0.454	0.481	0.017	58.80

הערכים המסומנים באדום הם הערכים מהם חושב קצב הגידול - K
מבחנה מס' 11 שימשה לצורך איפוס הספקטרומטר ולכן לא נכללה בטבלה .

דוגמת חישוב זמן דור וקצב גידול:

$$K = \frac{(\log N_t - \log N_0)}{0.301 \cdot \Delta t} = \frac{\log \frac{N_t}{N_0}}{0.301 \cdot \Delta t} \quad ; T = \frac{1}{K} \text{ [min]}$$

חישוב K עבור מבחנה 6 עבור הפרש זמן מ- 60 דקי עד 120 דקי (עקום ליניארי) :

$$K = \frac{\log \frac{N_t}{N_0}}{0.301 \cdot \Delta t} = \frac{\log \frac{0.400}{0.185}}{0.301 \cdot (120 - 60)} = 0.0202 \text{ min}^{-1}$$

זמן הדור הוא ערכו ההופכי של K :

$$T = \frac{1}{K} = \frac{1}{0.02} \cong 49.47 \text{ min}$$

K מחושב משלב ה-log של עקומת הגידול.

בדיקת השפעת ריכוז גלוקוז

דוגמה לחישוב גלוקוז :

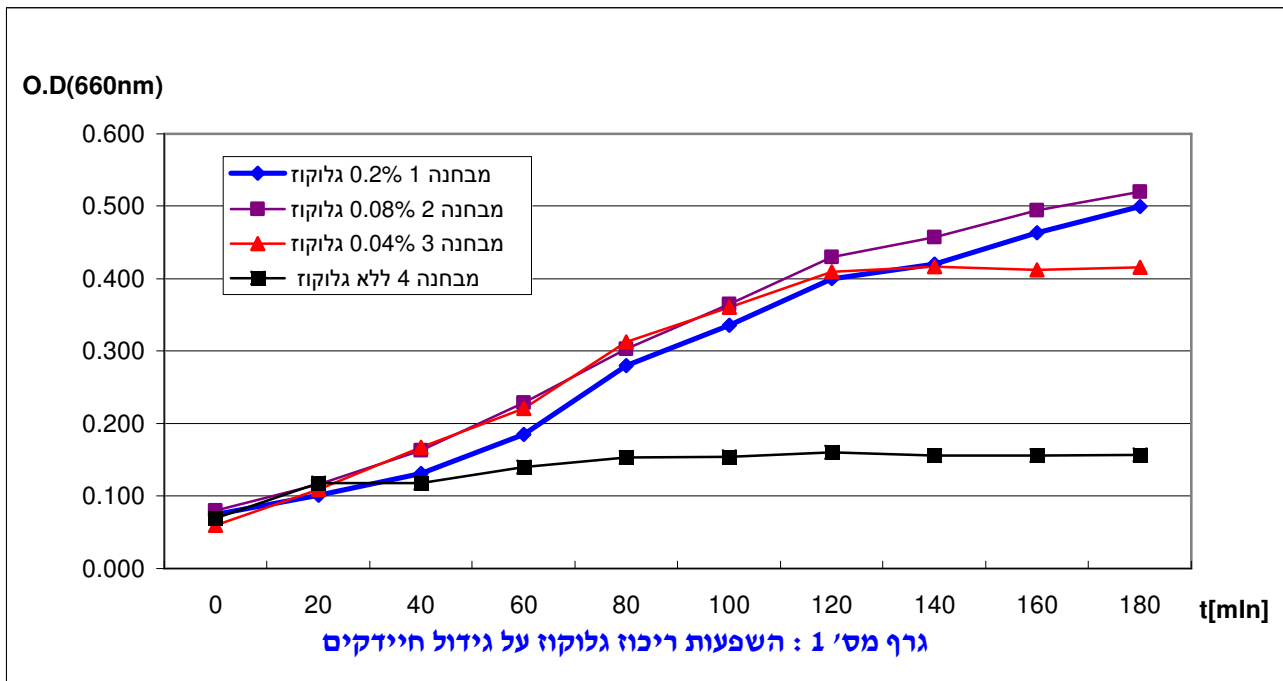
מבחנה מס' 1 : נלקחו 0.5 מ"ל גלוקוז בריכוז 2% והוספו לאינוקולום בנפח של 4.5 מ"ל .

$$C_1 \cdot V_1 = C_2 \cdot (V_2 + V_1)$$

$$0.02 \cdot 0.5_{ml} = C_2 \cdot (0.5 + 4.5)_{ml}$$

$$C_2 = \frac{0.02 \cdot 0.5_{ml}}{5_{ml}} = 0.002 = 0.2\%$$

להלן הגרף שהתקבל :



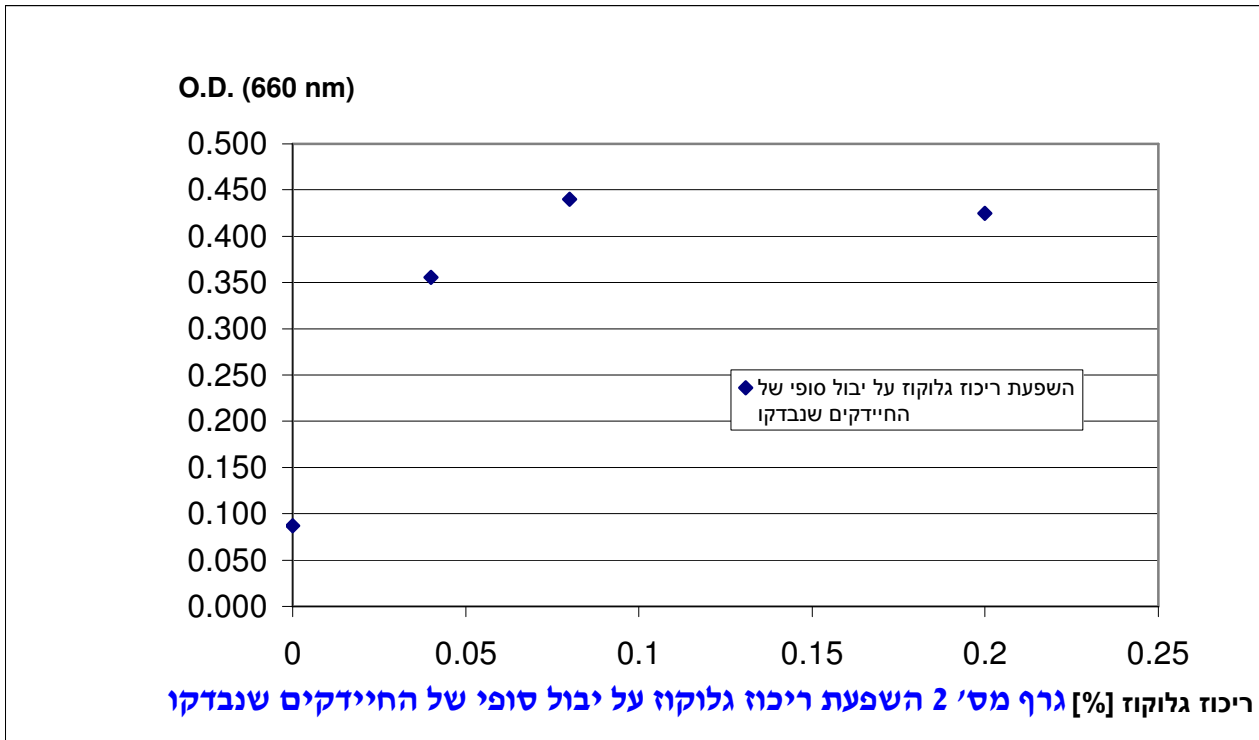
תוצאות : ניתן לראות כי קצב הגידול של חיידקים עולה ככל שריכוז הגלוקוז עולה, ללא גלוקוז (מבחנה 4) ניתן להגיד כי לא ניכר גידול חיידקים כלל.

במבחנות 1-3 שלב ההמתנה-lag קצר יותר והתרבויות נכנסות לשלב הגדילה- השלב הלוגריתמי מהר יותר ממבחנה מס' 4 אשר לא מכילה גלוקוז.

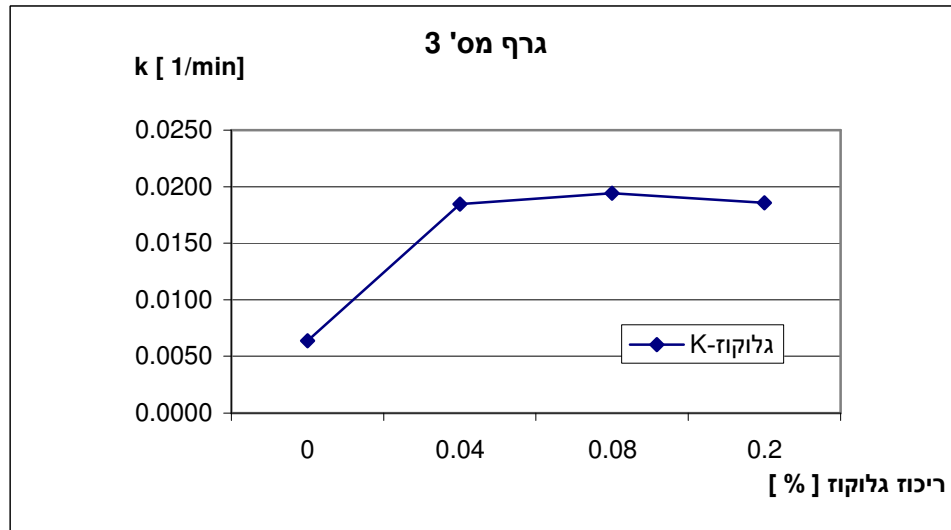
קצב הגדילה במבחנות המכילות גלוקוז דומה.

מבחנות 1-3 נכנסות לשלב הלוגריתמי בערך באותו זמן .

בעקום הגידול של מבחנה מס' 3 אנו רואים כניסה לשלב הסטציונרי בזמן 120 דקות לעומת מבחנות 1 ו 2 אשר ממשיכות להימצא בשלב הלוגריתמי.



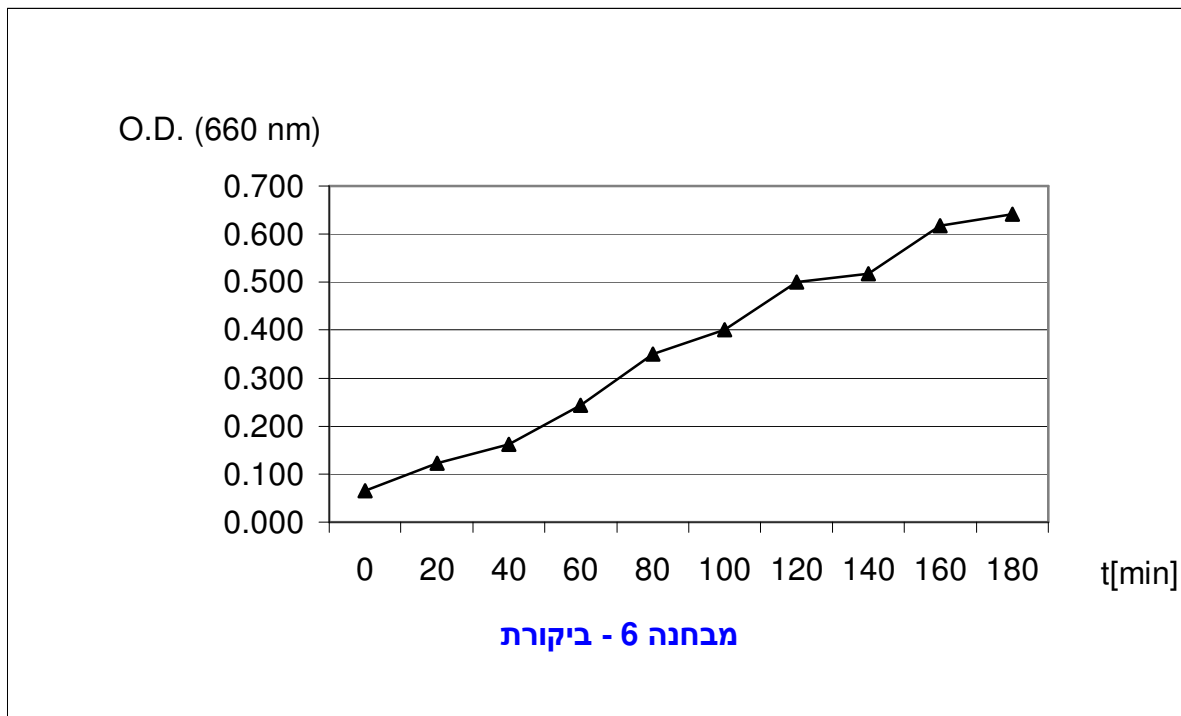
ניתן לראות שגרף היבול פרופורציונאלי ישיר לגרף של ריכוז הגלוקוז עד ל- 0.04% ומעבר לריכוז העלייה מתונה יותר מעבר לריכוז של 0.08% אין שינוי ביבול והוא נשאר מקסימאלי.



גרף מס' 3- השפעת ריכוז גלוקוז על קצב הגידול של חיידקי *E.coli*

קצב גידול החיידקים הגדול ביותר מתקבל בריכוז גלוקוז הגדול מ- 0.04% ומעבר לריכוז זה נשאר קבוע.

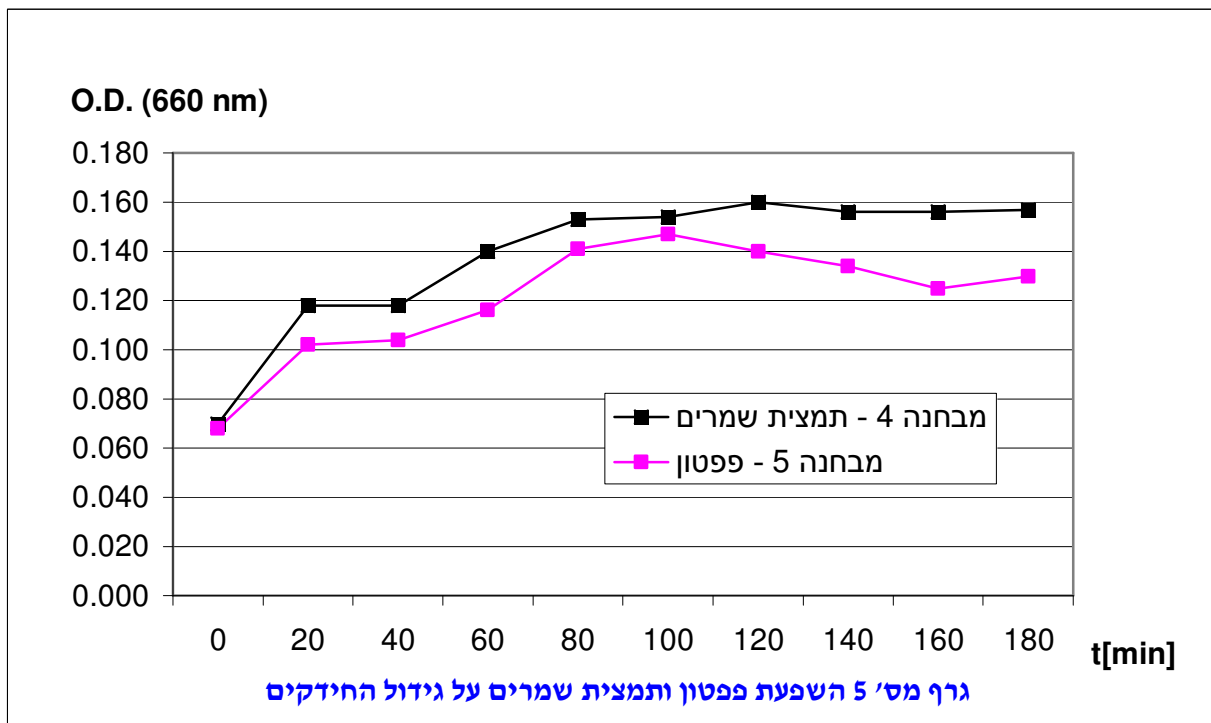
נבנה עקומת כיוול עבור גידול חיידקי *E. coli* ע"פ מבחנה מס' 6, מבחנת הסטנדרט.



גרף מס' 4 - עקומת כיוול של גידול חיידקי *E. coli*

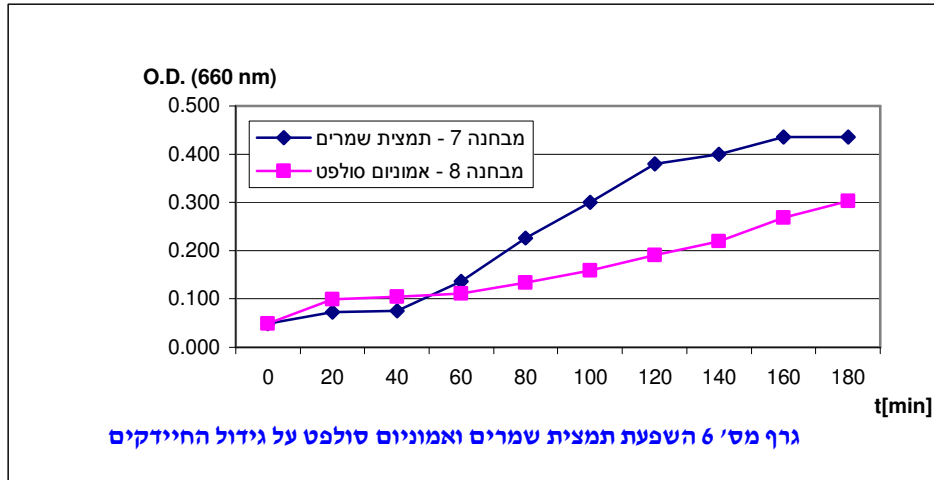
ניתן לראות כי לא קיים שלב המתנה והחיידקים נכנסו ישר לשלב הגדילה הלוגריתמי, ריכוזם עולה לאורך זמן.

בדיקת השפעת פפטון ותמצית שמרים כמקורות פחמן ואנרגיה



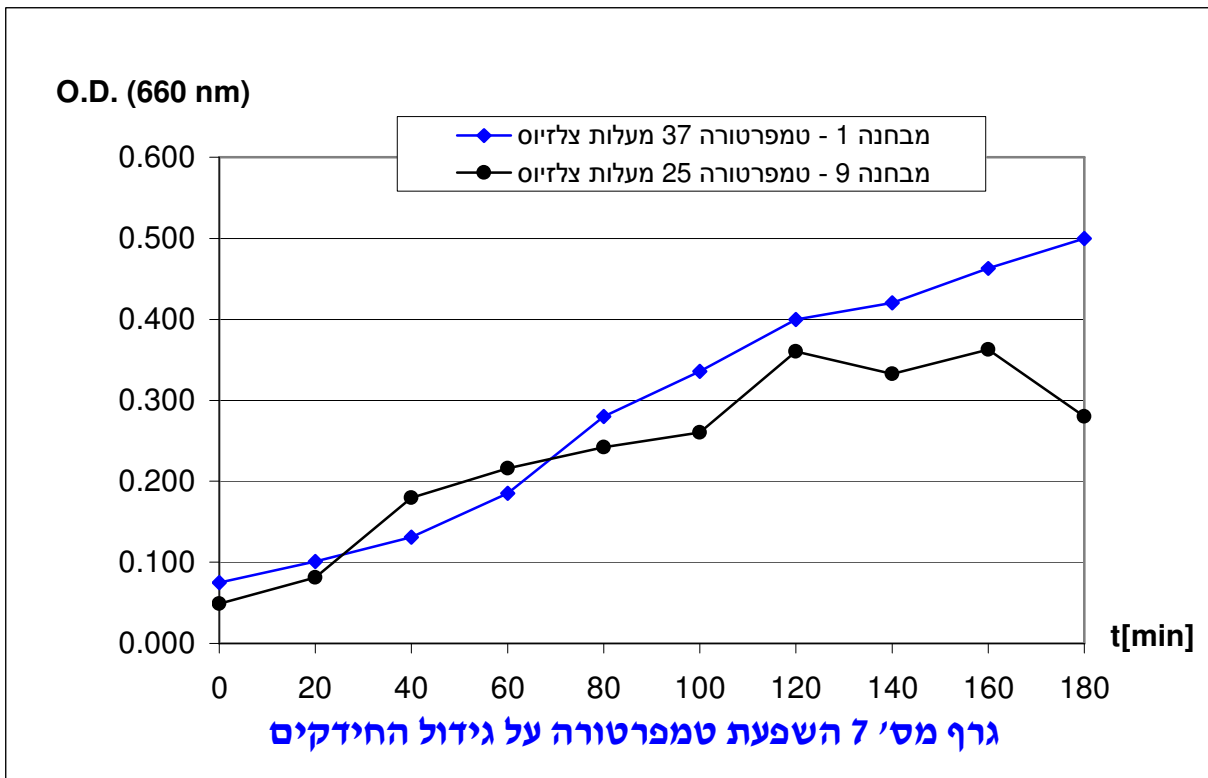
ניתן לראות כי עקומות הגידול מתנהגות בצורה דומה, אך ניתן לומר כי קצב הגידול של החיידקים במבחנה עם תמצית השמרים גבוה יותר מזה של המבחנה עם הפפטון.

בדיקת השפעת מקור חנקן : אמוניום סולפט או תמצית שמרים



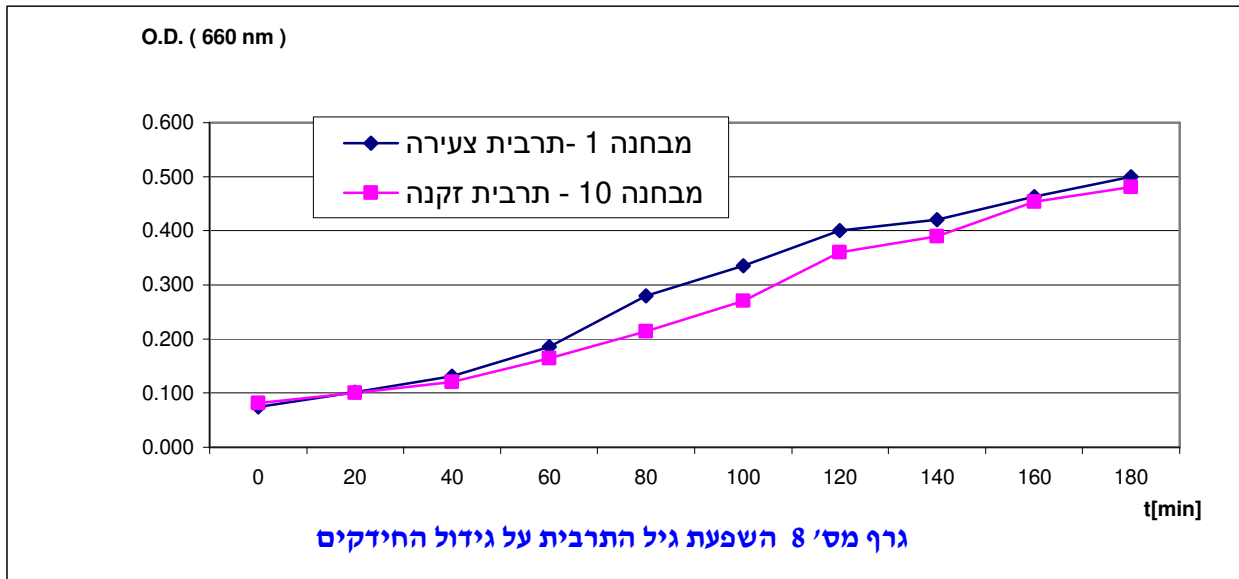
החיידקים במבחנה עם תמצית השמרים נכנסים לשלב המתנה עד לזמן של 40 דקות ואז מתחילים את שלב הגדילה הלוגריתמי בעוד שאלו הנמצאים במצע עם אמוניום סולפט מתחילים ישר את שלב הגדילה. ניתן לראות כי קצב הגידול במבחנה עם תכולת תמצית השמרים גדול יותר מקצב הגידול של המבחנה עם תכולת האמוניום סולפט.

בדיקת השפעת טמפרטורה



ניתן לראות כי בטמפרטורה של 37°C מתקבל קצב גידול קבוע למדי אשר מהיר יותר מאשר קצב הגידול בטמפ' של 25°C . עקום הגידול של החיידקים בטמפ' של 25°C אינו קבוע ולאחר 120 דקות חלה ירידה בריכוז החיידקים –כניסה לשלב תמותה.

בדיקת השפעת גיל התרבית



העקומים עוקבים זה אחר זה וקצב הגדילה שלהם דומה למרות שהוא איטי במעט בתרבית הזקנה.

דיון ומסקנות

א. השפעת ריכוז הגלוקוז: הגלוקוז משמש כמקור פחמן ואנרגיה עבור החיידק הנבדק *E. coli*. האנזימים לפירוק הגלוקוז הם קונסטיטויטיביים - קיימים בחיידק כל הזמן ללא תלות בסביבה ולכן כאשר העברנו תרבית צעירה אל מצע הגלוקוז, התרבית נכנסה מיד לפאזה הלוגריתמית.

בגרף מס' 1 ניתן לראות את השפעת ריכוזי גלוקוז שונים על קצב הגידול - ככל שריכוז הגלוקוז במצע יהיה גבוה יותר קצב גידול החיידקים יהיה מהיר יותר בסדר יורד ממבחנה מס' 1 עד מבחנה מס' 3, והחיידקים יכנסו לפאזה סטציונרית כתוצאה ממחסור במקור פחמן בשלב מאוחר יותר ואנו רואים בגרף שמבחנה מס' 3 שהכילה את ריכוז הגלוקוז הנמוך יותר נכנסה כבר בזמן 120 דקות לשלב זה בעוד שבמבחנות שמכילות ריכוז גלוקוז גבוה יותר נמשך שלה הגדילה.

על סמך גרף מס' 2 ניתן לראות שככל שריכוז הגלוקוז במצע יהיה גבוה יותר היבול הסופי יגדל גם כן, אולם קיימים גורמים מגבילים נוספים, כמות האנזימים או הנשאים לגלוקוז בכל חיידק, עבור היבול הסופי ולכן בשלב מסוים גם אם נעלה את ריכוז הגלוקוז היבול הסופי יישאר קבוע, מה שמוביל אותנו למסקנה שקיים ריכוז גלוקוז אופטימאלי המאפשר לקבל יבול מירבי בהשקעה מינימאלית וע"פ הגרף אנו רואים שריכוז זה הוא כ-0.1% מסה"כ המדיום (בניסוי הנ"ל כמובן).

בגרף מס' 3 ניתן לראות עליה בקצב הגידול במקביל לעלייה בריכוז הגלוקוז עד לשלב בו קצב הגידול נישאר קבוע גם כשריכוז הגלוקוז ממשיך לעלות מאותה הסיבה שנרשמה לעיל.

בגרף מס' 4 אנו רואים כי במבחנת הביקורת שם היו לחיידקים את כל הנוטריינטים הדרושים, ניכר גידול מיטבי, ולו קצב הגידול הגבוה ביותר מכל שאר מבחנות הניסוי, דבר המוכיח כי גידול מיטבי תלוי ישירות בראש ובראשונה בסוג ובהרכב המצע.

ב. השפעת פפטון ותמצית שמרים כמקורות פחמן ואנרגיה

חיידק מסוגל לנצל מקורות שונים לצורך הפקת אנרגיה ופחמן. שני מקורות אפשריים לגורמים הנבדקים הם פפטון ותמצית שמרים.

הפפטון זהו הידרוליזט אנזימטי המכיל ח' אמינו שונות, המשמש גם כמקור זמין של פחמן לחיידק. תמצית שמרים זוהי תמצית מימית של שמרים שעברו ליזיס, המכילה מגוון של ויטמינים, שומנים, פחמימות וחלבונים - או למעשה את כל המרכיבים הדרושים לתא.

כפי שניתן לראות בגרף מס' 5, החיידקים מתרבים מהר יותר במצע של תמצית שמרים מאשר במצע פפטון, כלומר תמצית שמרים יעילה יותר עבור החיידק *E. coli* מאשר פפטון, ההסבר לכך הוא שתמצית השמרים עשירה יותר ומספקת לתא את מגוון הנוטריינטים הדרושים לו בעוד שהפפטון מספק רק פחמן וחומצות אמינו.

ג. השפעת מקור החנקן - אמוניום סולפט ותמצית שמרים.

תמצית שמרים - מקור חנקן אורגני, לעומת אמוניום סולפט - מקור חנקן אנאורגאני. קצב הגידול של התרבית במצע עם תמצית שמרים גבוה יותר, זמן הדור קצר יותר.

בגרף מס' 6 ניתן לראות את השפעת מקורות החנקן השונים על קצב הגידול. בניסוי קיבלנו שחיידקים שהיו במצע המכיל תמצית שמרים נכנסה לשלב המתנה lag- ואילו אלו שהיו באמונים סולפט לא. ההסבר לכך הוא הצורך לייצר אנזימים לצורך ניצול החנקן שבמצע, שככל הנראה מקור החנקן שונה מזה של המצע ממנו התרבות הועברה. בתרבית בעלת מצע של אמוניים סולפט לעומת זאת אין שלב המתנה וההסבר לכך הוא שכנראה המצע המקורי של התרבית כל הכיל אמוניים סולפט בתור מקור חנקן ולכן לא היה צורך לייצר אנזימים. לאחר 40 דקות אנו רואים ששתי התרביות נמצאות בשלב הגדילה וקצב הגידול של החיידקים במצע תמצית שמרים גבוה מזה של אמוניים סולפט המסקנה היא שתמצית שמרים מהווה מקור חנקן טוב יותר עבור *E. coli* מאשר אמוניים סולפט.

ד. השפעת הטמפרטורה

חיידק *E. coli* הוא חיידק מזופילי- כלומר נצפה לגידול אופטימאלי בטווח טמפי של 30-40 מעלות צלזיוס. בהתבסס על התוצאות **בגרף מס' 7** אנו רואים שאכן הגידול היה מהיר יותר בטמפי של 37°C מאשר ב- 25°C מעלות.

ה. השפעת גיל התרבית.

כאשר לוקחים תרבית זקנה- משמע שלקחנו תרבית שנמצאת בשלב סטציונרי ולכן כאשר נעביר אותה למצע טרי נצפה לראות פאזת המתנה. היא תהיה ארוכה יותר מאשר בתרבית צעירה שבמהלכה החיידקים ייצרו את כל מרכיבי התא הדרושים לחלוקה, זהו שלב ההתאוששות, ואחריה את הפאזה הלוגריתמית. אם נשווה את קבוע קצב הגידול של תרבית צעירה לקבוע קצב הגידול של תרבית מתרבית זקנה באותם תנאי הגידול נצפה למצוא ערכים דומים, מכיוון שכעת לתרבית יש את כל הדרוש לחלוקה. **גרף מס' 8** מראה את הקשר בין עקומות הגידול של שתי התרביות – הזקנה והצעירה. כפי שניתן לראות קצב הגידול הוא כמעט זהה, ולמרות המצופה לא קיימת פאזת ההמתנה באף אחת מהתרביות, מה שמרמז על כך שהתרבית הזקנה לא הייתה בשלב הסטציונרי או לחלופין שהמצע, שהכיל תמצית שמרים, הכיל את כל הדרוש לחלוקה של החיידקים ללא צורך בייצור של מרכיבי תא חיוניים: אנזימים, חלבונים, נוקליאוטידים.