מיקרוביולוגיה -דו"ח מעבדה מספר 4 ב'

מטרת הניסוי :
זיהוי חיידקים ע"פ תכונות הגידול המאפיינות כל סוג חיידק .

מבוא :
במעבדה נעשה שימוש במצעים מוכנים ומצעים מתוכננים על ידינו, להלן פירוט של המצעים :
אפיון מצעים מוכנים :

1. Mac-Conkey Agar Plate – מצע המאפשר בידוד של אורגניזמים מפרקי לקטוז מחיידקים גרם (-) שאינם מסוגלים לפרק לקטוז. ההפרדה היא לפי צבע, מושבות אורגניזמים שמסוגלים לפרק לקטוז יצבעו באדום ומושבות של אורגניזמים שאינם מסוגלים לפרק לקטוז יישארו חסרות צבע וצלולות. הסלקטיביות נובעת מנוכחות של קריסטל ויולט ומלחי מרה אשר מעכבים באופן בולט את צמיחתן של מושבות של חיידקים גרם (+).
2. EMB Agar Plate – מצע המאפשר בידוד של חיידקים גרם (-). ההפרדה היא לפי צבע, מושבות חיידקים מפרקי לקטוז/סוכרוז יהיו בעלות צבע שחור עם שוליים בהירים יותר מהמרכז, מושבות של חיידקים שלא מפרקים סוכרוז/לקטוז יהיו חסרות צבע. הבדלי הצבעים נובעים מהרכב המצע המכיל אינדיקאטור מתילן כחול, פפטון, פוספט, לקטוז וסוכרוז.
   E. Coli יצמח על מצע זה במושבות סגולות שחורות, S. Aureus יעוכב ולא יצמח.
3. Kligler – Iron Agar Slants – מצע המאפשר זיהוי מפרקי לקטוז (בצילוס גרם (-)), מתבסס על יכולת פרמנטציה של דקסטרוז ולקטוז וייצור H_2S .
   המצע מכיל לקטוז, דקסטרוז, פרוס סולפט כאינדיקאטור ל- H_2S ופנול אדום כאינדיקאטור לריכוז יוני מימן (נוכחות חומצה)במצע.
   סלנט אדום עם מעט צהוב + גז מעיד על פרמנטציה מועטה של דקסטרוז.
   סלנט צהוב לגמרי מעיד על פרמנטציה של לקטוז, השחרה של הסלנט מייצגת ייצור H_2S .
   E. coli - מייצר גז אך לא מייצר H_2S על מצע זה
   P.vulgaris לא מייצר גז אך מייצר H_2S על מצע זה
4. Urea – Peptone Water מצע המאפשר זיהוי חיידקים שמפרקים אוריאה כלומר מייצרים את האנזים אוריאז ,במצע זה יגדלו אך ורק חיידקים המסוגלים לפרק אוריאה.
5. 0.5% glucose plate+NA - מצע המכיל גלוקוז כמקור פחמן המאפשר גידול של רוב החיידקים.
6. 0.2% starch plate – 0.05% glucose – NB - מצע המאפשר זיהוי חיידקים שמפרקים עמילן כלומר מייצרים את האנזים עמילאז.
   פירוק העמילן נבדק ע"י טפטוף יוד על מושבה שצמחה ,במידה והחיידק פירק את העמילן לא תיווצר שום תגובה ואם לאחר טפטוף היוד האזור יצבע בשחור הדבר יעיד על המצאות עמילן כלומר העמילן במצע לא פורק ע"י החיידק.
7. Blood Agar Plate - מצע עשיר המאפשר גידול של כלל החיידקים.
   מאפשר זיהוי של חיידקים בעלי המוליזינים, הדבר יתבטא בהילה שקופה סביב המושבה.
8. 12% Gelatin – 0.05% glucose NB - מצע המאפשר זיהוי של חיידקים מפרקי ג'לטין פירוק הג'לטין יתבטא בהפיכתו לנוזלי, כלל החיידקים יגדלו על מצע זה אך לא כולם יפרקו אותו.
9. 6% NaCl agar - מצע המאפשר זיהוי חיידקים הלופיליים, מכיל מלחים בריכוז גבוה ולא יגדלו בו חיידקים שאינם הלופיליים.
10. ספורות – תרבית שחוממה בטמפ' של 80^{o}_{c} שתאפשר זיהוי חיידקים היוצרים נבגים.

מצעים שתוכננו על ידינו :
כלל המצעים הכילו אגר, השתמשנו בגלוקוז ולקטוז כמקור פחמן והשתמשנו בתמצית בשר להעשרה של מצע מינימאלי.

1. **מצע מינימאלי (גלוקוז כמקור פחמן)** – מצע המאפשר זיהוי חיידקים הגדלים על מצע מינימאלי המכיל גלוקוז.
2. **מצע מינימאלי (לקטוז כמקור פחמן)** – מצע המאפשר זיהוי חיידקים הגדלים על מצע מינימאלי המכיל לקטוז.
3. **מצע עשיר** (48^{o}_{c}) – מצע המשמש לזיהוי חיידקים תרמופיליים.
4. **מצע עשיר + פניצילין** – מצע המשמש לזיהוי חיידקים שעמידים לפניצילין.
5. **מצע עשיר** (37^{o}_{c}) – מצע אופטימאלי לגידול כלל החיידקים משמש לנו כמצע ביקורת.

תוצאות הניסוי:

טבלה מספר 1: תוצאות גידול חיידקים לא ידועים על מצעים סלקטיביים שונים

מס"ד	תכונה/חיידק	A	B	C	D	E	F
.1	בדיקת KOH	צמיגי	מימי	לא נבדק	מימי	מימי	מימי
.2	דל	-	+	-	-	-	-
.3	פניצילין (+/-)	-	+	-	+	+	-
.4	מינימאלי גלוקוז (+/-)	-	+	-	-	-	-
.5	מינימאלי לקטוז (+/-)	-	+	-	-	-	-
.6	עשיר 48^{o}_{c} (+/-)	-	+	-	-	-	+
.7	NA יוצרי ספורות (+/-)	-	-	-	-	-	-
.8	**MAC-CONKEY** (+/-), צבע	-	+ חום-אדום	-	-	+ שקוף	-
.9	Emb (+/-), צבע	-	+ סגול-שחור	-	-	+ חום- שקוף	-
.10	עמילן (+/-)	+	+	-	+	+	+ פירוק
.11	המוליזה במצע אגר דם				כן		כן
.12	פירוק ג'לטין	כן					כן
.13	Kligler תחתית/שיפוע, גז	חום / חום	אדום, גז / חום	חום-צהוב / חום-צהוב	צהוב / חום	אדום / חום שחור	אדום / חום
.14	פירוק אוריאה (צבע)					כן	
.15	NaCl	+	-	-	+	-	+
.16	קטלז	בועות	בועות	בועות	בועות	בועות	ללא בועות
.17	צורת מושבות	עגולות	שורות	עגולות	עגולות קטנות	עגולות	חסר צורה
.18	צבע מושבות	כתום	לבן	לבן	לבן-שקוף	לבן-שקוף	לבן

מקרא

(+) – מציין גדילה.

(-) – מציין אי-גדילה.

הערה : תוצאות מצע דל גלוקוז – נלקחו מעודד ואיתי, אנחנו בדקנו רק עבור מצע עם לקטוז.

להלן אפיון החיידקים ע"פ התוצאות :

חיידק A

1. בבדיקת צמיגות בעזרת KOH - צמיג.
2. לא גדל במצע דל.
3. לא גדל בנוכחות פניצילין.
4. לא גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. לא גדל במצע עשיר בטמפ' של 48^{o}_{c} .
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות .
7. לא גדל במצע EMB.
8. לא גדל במצע Mac-Conkey .
9. מצע עמילן – צבע שחור.
10. אין הילה סביב מושבות בבדיקת המוליזה.
11. מצע ג'לטין- נוזלי.
12. במצע kligler - אין שינוי בצבע.
13. מצע אוריאה – אין שינוי צבע.
14. גדל במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן(H_2O_2) נצפו בועות .
16. מורפולוגית מושבות : עגולות כתומות.

חיידק B

1. בבדיקת צמיגות בעזרת KOH - נוזלי.
2. גדל במצע דל.
3. **גדל** בנוכחות פניצילין.
4. גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. גדל במצע עשיר בטמפ' של 48^o_C.
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות.
7. גדל במצע EMB + צבע סגול.
8. גדל במצע Mac-Conkey - צבע חום-אדום.
9. מצע עמילן – צבע שחור.
10. אין הילה סביב מושבות בבדיקת המוליזה.
11. מצע ג'לטין- מוצק.
12. במצע kligler - סלנט אדום, משקע חום, נצפו בועות גז.
13. מצע אוריאה – אין שינוי צבע.
14. לא גדל במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן (H_2O_2) נצפו בועות.
16. מורפולוגית מושבות : שורות לבנות.

חיידק C

1. לא בוצעה בדיקת צמיגות בעזרת KOH .
2. לא גדל במצע דל.
3. לא גדל בנוכחות פניצילין.
4. לא גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. לא גדל במצע עשיר בטמפ' של 48^o_C.
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות.
7. לא גדל במצע EMB.
8. לא גדל במצע Mac-Conkey.
9. מצע עמילן – צבע שחור.
10. אין הילה סביב מושבות בבדיקת המוליזה.
11. מצע ג'לטין- מוצק.
12. במצע kligler - סלנט חום, משקע חום.
13. מצע אוריאה – אין שינוי צבע.
14. לא גדל במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן (H_2O_2) נצפו בועות.
16. מורפולוגית מושבות : מושבות עגולות לבנות.

חיידק D

1. בבדיקת צמיגות בעזרת KOH - מימי.
2. לא גדל במצע דל.
3. גדל בנוכחות פניצילין.
4. לא גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. לא גדל במצע עשיר בטמפ' של 48^o_C .
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות .
7. גדל במצע EMB – שינוי צבע חום בהיר.
8. לא גדל במצע Mac-Conkey.
9. מצע עמילן – צבע שחור.
10. **יש** הילה סביב מושבות המוליזה.
11. מצע ג'לטין- מוצק.
12. במצע kligler - סלנט צהוב, משקע חום.

13. מצע אוריאה – אין שינוי צבע.
14. **גדל** במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן(H_2O_2) נצפו בועות .
16. מורפולוגית מושבות : עגולות קטנות בצבע לבן-שקוף.

חיידק E

1. בבדיקת צמיגות בעזרת KOH -מימי.
2. לא גדל במצע דל.
3. **גדל** בנוכחות פניצילין.
4. לא גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. לא גדל במצע עשיר בטמפ' של 48^o_C .
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות .
7. גדל במצע EMB, מושבות בצבע חום.
8. גדל במצע Mac-Conkey – מושבות בצבע שקוף.
9. מצע עמילן- צבע שחור.
10. אין הילה סביב מושבות בבדיקת המוליזה.
11. מצע ג'לטין - מוצק.
12. במצע kligler – סלנט אדום, משקע חום.
13. מצע אוריאה – **שינוי צבע לורוד**.
14. לא גדל במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן(H_2O_2) נצפו בועות .
16. מורפולוגית מושבות : עגולות בצבע לבן-שקוף.

חיידק F

1. בבדיקת צמיגות בעזרת KOH -מימי.
2. לא גדל במצע דל.
3. לא גדל בנוכחות פניצילין.
4. לא גדל במצע מינימאלי שהכיל גלוקוז או לקטוז.
5. **גדל** במצע עשיר בטמפ' של 48^o_C .
6. לא גדל בבדיקה ליצירת ספורות .
7. לא גדל במצע EMB.
8. לא גדל במצע Mac-Conkey .
9. מצע עמילן- **אין שינוי צבע**.
10. **יש** הילה סביב מושבות בבדיקת המוליזה.
11. מצע ג'לטין - **מימי**.
12. במצע kligler – סלנט אדום, משקע חום.
13. מצע אוריאה – ללא שינוי צבע .
14. גדל במצע NaCl .
15. בבדיקת פירוק מי חמצן (H_2O_2) **לא** נצפו בועות .
16. מורפולוגית מושבות : מושבות חסרות צורה בצבע לבן.

סיכום :

חיידק A

חיידק גרהם חיובי, כמוהטרוטרופי, אינו עמיד בפני פניצילין, לא מפרק לקטוז, לא תרמופילי,לא יוצר נבגים, לא מפרק סוכרוז, לא מייצר עמילאז, אינו מייצר המוליזינים, מפרק ג׳לטין, מייצר קטלאז, אאירובי, אינו מייצר אוריאז, אינו מפרק דקסטרוז, אינו מייצר H_2S , אינו מייצר אוראז, גדל בריכוז מלחים גבוה, מייצר קטלאז.

חיידק B

חיידק גרהם חיובי, כמואוטוטרופי, עמיד בפני פניצילין, מפרק לקטוז, תרמופילי, לא יוצר נבגים, מפרק סוכרוז, לא מייצר עמילאז, לא מייצר המוליזינים, לא מפרק ג׳לטין, מבצע פרמנטציה לדקסטרוז, אינו מייצר H_2S , אינו מייצר אוראז, אינו גדל בריכוז מלחים גבוה, מייצר קטלאז.

חיידק C

כמואוטוטרופי, לא עמיד בפני פניצילין, לא מפרק לקטוז, לא גדל במצע מינימאלי, לא תרמופילי, לא יוצר נבגים, לא מפרק סוכרוז, לא מייצר עמילאז, לא מייצר המוליזינים, לא מפרק ג׳לטין, לא מבצע פרמנטציה לדקסטרוז, אינו מייצר H_2S , אינו מייצר אוראז, אינו גדל בריכוז מלחים גבוה, מייצר קטלאז.

חיידק D

חיידק גרהם חיובי, כמוהטרוטרופי, עמיד בפני פניצילין, מפרק לקטוז (פרמנטציה), לא גדל במצע מינימאלי, לא תרמופילי, לא יוצר נבגים, לא מפרק סוכרוז, לא מייצר עמילאז, מייצר המוליזינים, לא מפרק ג׳לטין, לא מבצע פרמנטציה לדקסטרוז, אינו מייצר H_2S , אינו מייצר אוראז, גדל בריכוז מלחים גבוה, מייצר קטלאז.

חיידק E

חיידק גרהם חיובי, כמוהטרוטרופי, עמיד בפני פניצילין, לא מפרק לקטוז, לא גדל במצע מינימאלי, לא תרמופילי, לא יוצר נבגים, מפרק סוכרוז, לא מייצר עמילאז, לא מייצר המוליזינים, לא מפרק ג׳לטין, מבצע פרמנטציה לדקסטרוז, מייצר H_2S , מייצר אוראז, אינו גדל בריכוז מלחים גבוה, מייצר קטלאז.

חיידק F

חיידק גרהם חיובי, כמוהטרוטרופי, לא עמיד בפני פניצילין, לא מפרק לקטוז,לא גדל במצע מינימאלי, תרמופילי, לא יוצר נבגים, לא מפרק סוכרוז, מייצר עמילאז, מייצר המוליזינים, מפרק ג׳לטין, מבצע פרמנטציה לדקסטרוז, אינו מייצר H_2S , לא מייצר אוראז, גדל בריכוז מלחים גבוה, לא מייצר קטלאז.

דיון ומסקנות :

זיהוי החיידקים התאפשר הודות לכלל התכונות המאפיינות כל חיידק ככלל והודות לתכונה ספציפית המייחדת סוג אחד של חיידק מהחיידקים הנבדקים :

- חיידק A היחיד בעל מושבות כתומות (זהובות) מבין החיידקים שגדלו במצע בעל ריכוז מלח גבוה ומפרק ג׳לטין ולכן זוהה כחיידק ***S.aureus***.
- חיידק B הינו היחידי מבין החיידקים הנבדקים בניסוי הגדל על מצע מינימאלי, ולכן זוהה כחיידק ***E.coli***.
- חיידק D הינו היחידי מבין החיידקים הגרהם חיוביים שעמיד לפניצילין ולכן זוהה כחיידק ***B.cereus***.
- חיידק E הינו היחיד מבין החיידקים הנבדקים בניסוי שהצליח לגדול על מצע אוריאה והיחיד שייצר H_2S ולכן זוהה כחיידק ***P.vulgaris***.
- חיידק F תרמופילי, מייצר עמילאז ומפרק ג׳לטין לכן זוהה כחיידק ***B.subtilis***.

- חיידק C , כמעט ולא גדל בכל הבדיקות שנערכו, ולכן **על דרך השלילה**, לא נותר אלא, להניח כי ניתן לזהותו כחיידק ***S.albus*** מה גם שעובדת מושבותיו הלבנות תורמת להנחה זו, שכן אין ספק באשר לזהות 2 החיידקים האחרים שמושבותיהן לבנות.

תוצאות שגויות (או בניגוד לציפיות)

1. חיידק C כמעט ולא גדל - בעיה טכנית שהייתה ידועה לפני הניסוי.
2. תרמופיליים - ***E.coli*** גדל בצורה מועטה.
3. נבגים – חיידקי הבצילוס לא יצרו ספורות- ייתכן חוממו יתר על המידה, ייתכן והייתה בעיה במצע.
4. עמילן - ***B.cereus*** לא פירק עמילן – ככל הנראה בבדיקה שמנו כמות גדולה מדי של יוד ופשוט לא הבחנו.
5. המוליזה - ***S.aureus*** – סביב המושבות לא הבחנו בהילה.
6. ***E.coli*** גדל שלא כצפוי במצע בעל אחוז מלח גבוה – ייתכן שהתוספה כמות מועטה של תמיסת מלח.

בידוד

חיידקים

מן הטבע

בידוד ישיר

ותרבויות השרה

מיקרוביולוגיה - דו"ח מעבדה מס' 6

מטרות הניסוי :

1. בידוד חיידקים מן הטבע .
2. הכרת שיטות בידוד ישיר ותרביות העשרה.

תוצאות הניסוי :

טבלה מס' 1: תוצאות בידוד ישיר

מקור מזרע	דרגת מיהול	טיפול מקדים	טמפ' הדגרה [צלזיוס]	סוגי מושבות	מס' כללי של מושבות	צורות מיוחדות
NA	מרוכז		37°	1	דשא	לבנות עגולות
	מרוכז		37°	1	דשא	
	10^{-1}		37°	1	דשא	
	10^{-1}		37°	1	דשא	
	10^{-2}		37°	1	25	
	10^{-2}		37°	3	2 – כתום	צבר כתום מחוספס
					1 – אדום	אדומות עגולות
					32 - לבן	לבנות עגולות
	10^{-3}		37°	1	3	
	10^{-3}		37°	2	5	עגולות לבנות + עגולות שקופות בצורת "ביצת עין"
תרמופיליים	מרוכז		48°	0	-	-
	מרוכז		48°	1	דשא	לבנות
	10^{-1}		48°	1	4	לבנות עגולות
	10^{-1}		48°	1	5	לבנות עגולות
נושאי ספורות	מרוכז	חימום ב- 80^o_c ל-10'	37°	1	דשא	לבנות עגולות
	מרוכז		37°	1	דשא	
	10^{-1}		37°	2	8	לבנות מחוספסות משונצות ולבנות עגולות
	10^{-1}		37°	1	דשא	לבנות עגולות
	מרוכז		48°	1	2	לבנות עגולות
	מרוכז		48°	1	3	
	10^{-1}		48°	1	1	עגולות שקופות בצורת "ביצת עין"
	10^{-1}		48°	1	2	לבנות עגולות
B	מרוכז 1		37°	6	דשא	* אדומות עגולות * ירוקות עגולות (עובש כנראה) * לבנות גדולות צמריות * כתומות עגולות * צהובות עגולות * לבנות עגולות
	מרוכז 2		37°	5	דשא	* אדומות עגולות * ירוקות עגולות (עובש כנראה) * לבנות גדולות צמריות * כתומות עגולות * לבנות עגולות
	10^{-1}		37°	6	דשא	כמו ב "מרוכז 1 "
	10^{-1}		37°	5	דשא	* אדומות עגולות * לבנות גדולות צמריות * כתומות עגולות * צהובות עגולות * לבנות עגולות
M	10^{-1}		37°	1	40	לבנות עגולות
	10^{-1}		37°	1	32	לבנות עגולות
T	מרוכז		37°	2	32	לבנות עגולות
	מרוכז		37°	2	51	לבנות עגולות
	10^{-1}		37°	2	53	*לבנות שקופות נקודתיות *לבנות עגולות
	10^{-1}		37°	1	41	לבנות עגולות
סוקצינאט	מרוכז		37°	2	דשא	כתומות + לבנות עגולות
	מרוכז		37°	2		
	אדמה		37°	2		

טבלה מס' 2: תוצאות בידוד לאחר העשרה מוקדמת

סוג החיידקים	זריעה	מספר סוגי מושבות	תיאור המושבות
קושרי חנקן	$M_L(37^0C) \rightarrow M_S(37^0C)$	2	לבן- שקוף משונץ חום
		2	
	$M_L(37^0C) \rightarrow T_S(37^0C)$	1	שקופות בצורת ראש סיכה
		1	
	$M_L(37^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	1	לבנות
		1	עגולות צהובות
	$M_S(37^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	1	לבנות נקודתיות
		0	-
	$M_S(37^0C) \rightarrow T_S(37^0C)$	0	-
		1	נקודתיות עגולות לבנות-שקופות
בצילוס	$B_L(37^0C) \rightarrow B_S(37^0C)$	3	לבנות עגולות
			צהובות עגולות
			חומות-זהובות עגולות
		2	לבנות עגולות
תרמופיליים	$NB(48^0C) \rightarrow NA(48^0C)$	1	לבנות-שקופות עגולות
		0	-
	$NA(48^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	0	-
		0	-
כמואוטוטרופים	$T_L(37^0C) \rightarrow T_S(37^0C)$	1	לבנות שקופות בצורת ראש סיכה
		1	
	$T_L(37^0C) \rightarrow M_S(37^0C)$	1	זהובות עגולות
		3	לבנות עגולות
			צהובות עגולות
			כתומות עגולות
	$T_L(37^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	1	צהובות חלקות
		1	צהובות חלקות
ספורופורמים	$NB(37^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	1	מושבות לבנות
		1	
	$NB(37^0C) \rightarrow NA(48^0C)$	1	דשא לבנות
		0	-
כמוהטרוטרופים	$NB(37^0C) \rightarrow NA(37^0C)$	1	דשא לבנות
		1	
	$NA(37^0C) \rightarrow NA(48^0C)$	0	-
		0	-
	$NA(37^0C) \rightarrow M_S(37^0C)$	0	כתומות עגולות-מועטות
		1	
	$NA(37^0C) \rightarrow T_S(48^0C)$	0	-
		1	שקופות עגולות בצורת ראש סיכה - מועטות

מקרא : האות S במצע מציינת מצע מוצק.
האות L במצע מציינת מצע נוזלי.
- מציין אי-גדילה.

טבלה מס' 3: תוצאות צביעת גרהם לתרבית העשרה

מקור החיידק	טמפ' הדגרה [^oC]	תוצאות
NB	37	סגול
NB (תרמו)	48	סגול + אדום
NB - ספורות (תרחיף שחומם ב-ב- 80^o_C ל-10 דקות)	37	סגול
B	37	סגול
M	37	סגול
T	37	סגול

טבלה מס׳ 4: מדידת עיכוב גדילת חיידקים ע״י אקטינומיצטים

מס״ד	סוג החיידק	גדילה / אי גדילה		מרחק מושבות החיידק הנבדק ממושבות האקטינומיצטים [בס״מ]	
		צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2
.1	*E.coli*	כן	כן	23.5	4.8
.2	*S.aureus*	כן	כן	2.9	4.6
.3	*Serratia*	כן	כן	3.1	5.2
.4	*Lutea*	כן	כן	3.2	4.2

דיון ומסקנות

דיון

חיידקים כמוהטרוטרופיים

ע״פ התוצאות שהתקבלו בטבלה מס׳ 1 במצע NA נראה כי מס׳ המושבות החיידקים עולה בהתאם לדרגת המיהול - כל שהמיהול גבוה יותר מתקבל מס׳ של מושבות גדול יותר.
הסיבה לכך יכולה לנבוע מכך שממיהול למיהול חלק ממושבות החיידקים נשטפו וקיבלנו מס׳ מושבות קטן יותר.
לגבי סוגי המושבות ניתן לראות כי המצב הפוך ודווקא במיהולים הגדולים יותר התקבל מגוון גדול של מושבות כאשר במיהולים קטנים יותר היה רק סוג מושבות אחד, ככל הנראה במיהול הגדול יותר הייתה פחות תחרות בין החיידקים שאפשרה מרווח גדילה של יותר מסוג אחד של חיידקים בלבד.

לאחר העשרה :
זריעת התרחיף המקורי במצע NB הראתה ירידה במס׳ סוגי המושבות. ירידה זו ככל הנראה מתחרות המתקיימת בין החיידקים על אותם הנוטריינטים תחרות זו היא בין מס׳ סוגים רב יותר שכן זהו מצע עשיר.

ע״פ טבלה מס׳ 3 בבידוד ישיר של חיידקים כמוהטרוטרופיים צמיחת מושבות הייתה זניחה או לא נצפתה כלל בהעברה למצע T ו-M.
מצע T שאינו מכיל מקור פחמן אורגאני אינו מאפשר לכמוהטרוטרופיים לגדול.
מצע M שאינו מכיל מקור חנקן (בצורת חנקות) אינו מאפשר לכמוהטרוטרופיים לגדול. הם אינם מסוגלים לקשור חנקן אלא זקוקים לו במצע.
לאחר הדגרה במצע NA ב- 48^o_c לא נראתה צמיחת מושבות כלל.
לכן בדגימת האדמה שלנו לא הבחנו בחיידקים שהם גם כמוהטרוטרופיים וגם תרמופיליים.

חיידקים תרמופיליים

בטבלה מס׳ 1 התקבל סוג מושבות אחד, דבר המעיד על סביבת גידול מתאימה לחיידקים תרמופיליים.

לאחר העשרה :
בהעשרת החיידקים נצפתה ירידה ניכרת במס׳ סוגי המושבות, ככל הנראה, עקב תחרות על הנוטריינטים במבחנה.

חיידקים ספורופורמים

ע״פ תוצאות טבלה מס׳ 1 ניתן לראות כי הקרקע מכילה חיידקים א-ארוביים נושאי ספורות.
בקרקע מתחת לפני השטח מתקיימים תנאים אנארוביים וכתוצאה מכך נראו סוגים שונים של מושבות.
כמו כן ניתן לראות בהדגרה ב-37^0 התקבל מס׳ מושבות רב יותר מאשר ב-48^0 . הסיבה לכך היא שלא כל החיידקים ספורופורמים הינם תרמופיליים.
בהעשרת החיידקים נצפתה ירידה ניקרת במס׳ סוגי המושבות עקב התחרות על הנוטריינטים במבחנה.
בבידוד ישיר היה גידול של מושבה אחת, דבר המצביע על יעילות ביצוע הבידוד.
לאחר העשרה :
לא היה שינוי משמעותי לאחר העשרה, אך יש לציין כי באחת הצלחות שהועברו ל 48^o_c לא הייתה גדילה, עלינו להניח שמדובר אכן בזריעה של חיידקים שהם יוצרי ספורות, אולם אינם תרמופיליים.

חיידקים קושרי חנקן

ע"פ התוצאות בטבלה 1 עבור מצע M נצפה סוג מושבה בודד שגדל ניתן להסיק כי הקרקע מכילה חיידקי Azotobacter (קושרי חנקן).

לאחר העשרה :

בבדיקת העשרה במצע מניטול נראה רק סוג אחד של מושבה. הסיבה לכך היא תחרות מפני שהעברנו את החיידקים לאותו מצע גידול.
בהעברת החיידקים למצע סלקטיבי T נראה רק סוג אחד של מושבה. ירידה במס' המושבות יכולה לנבוע מכך כי מצע T אינו מכיל מקור פחמן אורגאני הדרוש לחיידקים קושרי חנקן.
בהעברת החיידקים למצע NA הקבל מס' מושבות מועט. דבר שאינו היה אמור להתרחש מפני שמצע זה הינו מצע עשיר ואינו סלקטיבי.
הסיבה לכך יכולה לנבוע מניצול לא יעיל של הנוטריינטים.
בבידוד ישיר בהעברה ממצע M ל-NA נראו יותר סוגי מושבות מאשר העברת החיידקים ממצע M למצע-T מפני שמצע NA הינו מצע עשיר המאפשר חיידקים לעומת מצע T שהוא מצע סלקטיבי לחיידקים תיובצילוס (כימואוטוטרופיים).

חיידקי בצילוס

ע"פ התוצאות ניתן לראות כי ישנה גדילת חיידקי בצילוס בקרקע.
בניסוי לא נראתה תופעת הופעת הילות.
הסיבות לכך יכולות לנבוע :

1. לא גדלו על המצע חיידקי בצילוס אלא חיידקים מסוגים אחרים הנראים כמו בצילוס, אך אינם בצילוס ואינם מפרישים חומצה.
2. חיידקי בצילוס שאינם מפרישים חומצה.
3. עקב זיהום, וזו הסיבה היותר הגיונית בגלל שאכן היה זיהום שנראה פטרייתי במצע.

- יש לציין כמובן שהמצע הוא עשיר כך שאין מניעה שבו יגדל מגוון רחב של מיקרואורגניזמים.

לאחר העשרה :

לא חל שינוי ממשי, נצפו אותן סוגי מושבות חיידקים.

חיידקים כימואוטוטרופיים

ע"פ התוצאות ניתן לראות גדילת חיידקי ***Thiobacillus*** כימואוטוטרופיים.
בבידוד העשרה, בהעברת החיידקים ממצע T למצע M קיבלנו גדילה מועטה (מושבות בודדות).
במצע M המיועד לחיידקים קושרי חנקן אטמוספרי לא אמורה להיות גדילת חיידקים פרט לאזוטובקטריים.
הסיבה להתפתחות המושבות הבודדות היא ככל הנראה, שהחיידקים שנזרעו הכילו מאגרי נוטריינטים מהמצע הקודם, וניצלו אותם עד תום, (מצע T כאמור מכיל מקורות זמינים).
כמו כן יש לציין כי קיבלתנו 2 סוגי מושבות שלא היו במצע הקודם, או שלא יכולנו פשוט להבחין בהן כי ריכוזיהם היו קטנים, או שהופעתן נגרמה מזיהום במצע ההעשרה.
בהעברת החיידקים ממצע T למצע T , לא קיבלנו שינוי בתוצאות, ואין זה מפתיע כי למעשה לא שינינו כלום, זו הייתה מעין ביקורת.
בהעברת החיידקים ממצע T למצע NA (מצע עשיר) קיבלנו מס' סוגי מושבות חיידקים , וכאן ההסבר הוא חופף להסבר בהעברת החיידקים ממצע T למצע M , חיידקים שגדלו בקצב איטי מאוד או לא גדלו כלל במצע דל וניצלו את המאגרים שלהם, בצורה שלא אובחנה בעין בלתי מזוינת, נזרעו במצע עשיר והחלו להתרבות בצורה רגילה.

חיידקים אקטינומיצטים

חיידקים מסוג זה מייצרים אנטיביוטיקה. בשלב ראשוני גידול החיידקים התבצע על מצע S מתרחיף מרוכז. לאחר קבלת מושבות לבנות זרענו את החיידקים הנ"ל על מצע AR , מצע עשיר המכיל תמצית שמרים,פפטון, גלוקוז כמקור אנרגיה ומלחים. לאחר הדגרה בטמפ' של 37^0C במשך מס' ימים על מצע AR זרענו את חיידקים הבאים: *S. Lutea , Serratia, E.coli* ו- *St. Aureus*.בצורה אנכית ביחס לזריעת האקטינומיצטים.
התוצאות לא הראו עיכוב משמעותי של חיידקים מכל סוג שהוא ביחס לשאר החיידקים שנזרעו.

והמרחקים שנמדדו בין סוגי החיידקים אמנם לא היו זהים אך מבחינת סדרי גודל, לא היה ביניהם שוני רב.

לתוצאה זו ניתן לתת מס' הסברים :

1. החיידק החשוד כאקטינומיצט לא היה כזה.
2. החיידק לא הפריש אנטיביוטיקה או שלא הפריש מספיק.
3. אחד משלבי הניסוי לא התבצע כראוי (זריעה לא נכונה, זיהום כלשהו).
4. החיידקים שנבדקו אינם רגישים לאנטיביוטיקה המופרשת.

התייחסות לשאלות בתדריך המעבדה

מצעים עשירים לעומת מצעים סלקטיביים

ניתן לראות בבירור ע"פ טבלאות 1 + 2 כי במצעים העשירים התקבל מגוון רחב יותר מאשר במצעים הסלקטיביים, הן מבחינת כמות והן מבחינת סוגי המושבות.

ע"פ התוצאות שהתקבלו מגוון רחב של חיידקים יכול לגדול ע"ג מצע עשיר.
מצע סלקטיבי - מתאים לגדילת חיידקים עם תכונות מסוימות המאפשרות רק להם להתקיים במצע זה.

תכונה זו מקנה לנו את היכולת לבודד סוגי חיידקים מתוך מגוון של חיידקים.

האם חיידקים ספורופורמים גם תרמופילים?

ע"פ התוצאות התקבל סוג מושבה של חיידקים תרמופיליים מתרבית שעברה טיפול המתאים לזיהוי ספורפורמים, לכן עלינו להניח לפחות סוג אחד של חיידקים מדגימת האדמה שלנו הם תרמופיליים שעוברים ספורולציה.
דבר זה אינו מפתיע שכן סביר להניח שחיידקים בדגימת אדמה שנמצאת רוב הזמן בשמש (גם אם היא נלקחה מקרקע עמוקה עדיין היא צריכה לעמוד בפני תנאי טמפ' קיצוניים), יהיו לפחות בחלקם, עמידים בפני טמפ' גבוהות ובמידה של יובש גם תהיה להן היכולת לנביגה.

ההבדל בין זריעה ישירה על מצע מוצק לבין העשרה מוקדמת

בהעשרה מוקדמת קיימת תחרות בין החיידקים השונים על הנוטריינטים במצע והיא מאפשרת קבלת מס' מושבות מצומצם המותאמים אופטימאלית למצע הגידול.
בזריעה ישירה על מצע מוצק,מבחינים בגידול משמעותי וקבלת מגוון רחב של מושבות.
ניתן לראות זאת למשל במעבר בין מצע T נוזלי למצע T מוצק, וכנ"ל לגבי מעבר בין מצע M נוזלי למצע M מוצק.

תופעת ה"הילה" סביב מושבות הבצילוס ע"ג מצע B

הופעת ההילה מתרחשת כאשר החומצה המופרשת מן החיידק מגיבה עם המלח $CaCO_3$ ליצירת הילה .

התגובה היא פשוטה מאוד :

$$CaCO_3 + 2H^+ \longrightarrow Ca^{++} + H_2CO_3 \rightleftarrows Ca^{++} + H_2O + CO_2$$

בניסוי שלנו לא נצפתה התופעה הנ"ל.
הסיבות האפשריות לכך כבר נדונו בדו"ח.

תוצאות זריעה ממצע M למצע T

ע"פ תוצאות טבלה מס' 2 ניתן לראות כי הייתה גדילת חיידקים בהעברה ממצע M למצע T.
מצע M הינו מצע סלקטיבי לחיידקים קושרי חנקן כאשר מצע T הינו מצע סלקטיבי לחיידקים כימואוטוטרופיים.
עצם גדילת מושבות החיידקים מצביע על כך שחיידקים מסוג Azotobacter הם גם כימואוטוטרופיים .

האם הצלחת לבודד חיידק?

בהחלט, ע״פ התוצאות שלנו הצלחנו לבודד :

א. חיידקים קושרי חנקן.
ב. חיידקים ספורפורמים.
ג. חיידקים תרמופיליים.

לגבי שאר סוגי החיידקים שנבדקו, לא הצלחנו לבודד מכיוון שלא קיבלנו סוג אחד בלבד של חיידקים.

סיכום

א. למדנו ליישם הלכה למעשה את החומר התיאורטי אודות שיטות העבודה במיקרוביולוגיה שנלמד בהרצאות, במעבדה זו.
ב. ע״פ התוצאות שהתקבלו למדנו כיצד לבודד חיידקים ע״פ תכונותיהם, ודאי שתנאי המעבדה לא היו אידיאליים, וכמובן שהסיכוי שלשגיאות בניסוי הוא גדול, אך אף על כך, הגענו לתוצאות חד משמעיות באשר לתכונותיהם של החיידקים שקיבלנו, ובהתאם לכך, התאפשר לנו לזהותם, לפחות בצורה כללית.

טכנולוגיה מיקרוביאלית

מעבדה מס' 8

מחקור שיגול של בקטריופאג'

דו"ח מעבדה

תאריך מעבדה : 17.05.06

מטרת הניסוי

- מעקב אחרי גידול של בקטריופאג' λ בחיידק E.coli B במצע גידול עשיר ע"י ספירת פלאקים בזמנים שונים לאורך מחזור הגידול של הבקטריופאג'.

ריכוז תוצאות

טבלה מס' 1: ריכוז תוצאות פלקים במהולים וזמני מדידה שונים

פרק זמן של ביקורת	מספר הפלאקים במהולים שונים							
	מרוכז		10^{-1}		10^{-2}		10^{-3}	
	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2	צלחת 1	צלחת 2
10	200	דשא						
20	356	252	32	29				
30	836	920	98	38				
40			436	500	27	22		
50			דשא	דשא	362	342		
60			דשא	דשא	684	556		
70					664	442	150	144
80					1684	1204	162	178

הערה : נתונים לדוגמת חישוב מודגשים בצהוב !

חישוב ריכוז מוקדים למ"ל ע"פ ...

$$\text{פקטור מיהולX פקטור זריעה X מספר מוקדי plaque} = \left[{}^{pfu}\!/_{m\ell} \right]$$

דוגמת חישוב (40 דקות):

עבור מיהול 10^{-1} :

חישוב ממוצע plaques בדופליקטים :

$$\frac{500+436}{2} = 468_{plaques}$$

חישוב ריכוז פאג'ים [pfu/ml] :

$$468 \times 10 \times 10 = 46800_{pfu/m\ell} = 4.68 \cdot 10^{4}{}_{pfu/m\ell}$$

עבור מיהול 10^{-2} :

חישוב ממוצע plaques בדופליקטים :

$$\frac{22+27}{2} \cong 25_{plaques}$$

חישוב ריכוז פאג'ים $\left[{}^{pfu}\!/_{m\ell} \right]$:

$$25 \times 10 \times 10^{2} = 25000_{pfu/m\ell} = 2.5 \cdot 10^{4}{}_{pfu/m\ell}$$

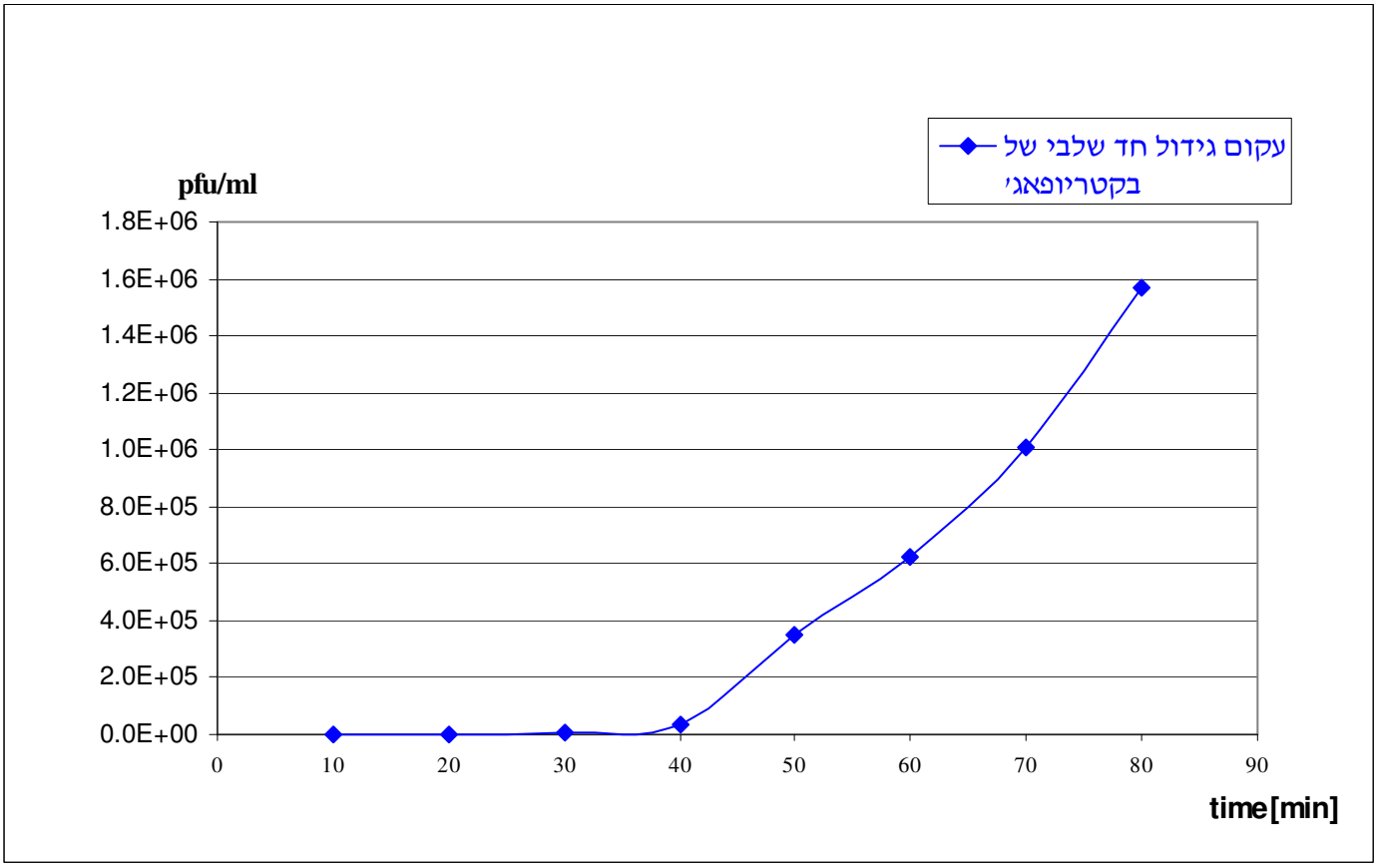
ממוצע ערכי $\left[{}^{pfu}\!/_{m\ell} \right]$ עבור הזמן הנקוב (40 דקות) :

$$\frac{46800+25000}{2}=3.59\times10^{4}\ {}^{pfu}/_{m\ell}$$

טבלה מס' 2: תוצאות חישוב מספר מוקדי הדבקה למ"ל

$\left[{}^{pfu}/_{m\ell}\right]$	זמן (min)
$1.00*10^{3}$	10
$3.05*10^{3}$	20
$8.92*10^{3}$	30
$3.57*10^{4}$	40
$3.52*10^{5}$	50
$6.20*10^{5}$	60
$1.01*10^{6}$	70
$1.57*10^{6}$	80

הערה : בזמני הבדיקה 10 דקות "מרוכז" ו- 50 + 60 דקות התקבל "דשא" במיהול של 10^{-1} , נתונים אלו לא נכללו בספירה



גרף מס-1: עקום גידול חד שלבי של בקטריאופאג'- λ

התקבל עקום גידול חד שלבי טיפוסי בה נראית בבירור תקופת הלטנט, שיפוע עקומת הגידול המעיד על גידול במס' הפאג'ים, תקופת האקליפה אינה נראית בהצגה הגראפית, אך ע"פ הנתונים המספריים ניתן לראות כי השינוי במס'

הפאג'ים התמתן בין הדקות 80 ל-70 ביחס להפרשי הזמנים הקודמים, לכן אנו מניחים כי זוהי תחילת תקופת האקליפס ולכן ע"פ הנחה זו נחשב burst size.

נחשב burst size לפי : $\left[pfu/m\ell \right]$ בשלב הרגיעה חלקי $\left[pfu/m\ell \right]$ בתקופה הלטנטית.

$\left[pfu/m\ell \right]$ בשלב הרגיעה נלקח ב 70 דקות= $1.0\cdot 10^{6}{}_{\left[pfu/m\ell \right]}$

$\left[pfu/m\ell \right]$ בתקופה לטנטית נלקח ב 30 דקות= $8.9\cdot 10^{3}{}_{\left[pfu/m\ell \right]}$

חישוב הערך burst size :

$$burst \quad size = \frac{1.0\cdot 10^{6}{}_{\left[pfu/m\ell \right]}}{8.9\cdot 10^{3}{}_{\left[pfu/m\ell \right]}} = 113.46$$

תוצאות:

ע"פ תוצאות הניסוי וחישוב ערך ה-burst size מצאנו כי מכל חיידק *E.coli* משתחררים בממוצע 113.46 בקטריופאג'ים .

ע"פ המקור הר"מ , הערך הספרותי של burst size של נגיפי λ על חיידקי *E.coli* הוא 100, כמו כן נתון כי ערך זה הוא קירוב כיוון שהוא ממוצע בין זני בקטריופאג'י λ השונים.

נחשב סטייה יחסית בין הערך הספרותי לבין הערך שהתקבל :

$$\delta_{burst_size} = \frac{|100-113.46|}{100}\cdot 100 = 13.46\%$$

לנוכח תנאי הניסוי, לחץ הזמנים, וכד', סטייה זו מניחה את הדעת.

מסקנות וסיכום:

1. ערכנו מעקב אחרי גידול של בקטריופאג' λ בחיידק E.coli B במצע גידול עשיר ע"י ספירת פלאקים בזמנים שונים לאורך מחזור הגידול של הבקטריופאג'.
2. למדנו לחשב burst size של בקטריופאג'ים מסוג λ .

מקור לערך ספרותי של burst size של נגיפי λ :

http://www.blackwellpublishing.com/trun/artwork/Animations/Lambda/lambda.html

המקור הוא גם קישור למצגת פלאש יפה של מחזור החיים השלם של נגיפי λ.