



מיקרוביולוגיה

מטרות המעבדה

1. הכרת שיטות לספירת חיידקים.
 2. הכרת שיטה לצביעת חיידקים.
 3. מעקב אחר עקום גידול של חיידקים.
 4. לימוד השפעת גורמים שונים על קצב גידול חיידקי *E. coli*.
- במהלך המעבדה נבצע את הדברים הבאים :

- גידול חיידקי *E. coli* מזן B בשלוש טמפרטורות שונות: 55°C , 37°C וטמפרטורת החדר, במצע עני, בתנאי מליחות שונים, בתנאים אנארוביים ובנוכחות אנטיביוטיקות שונות. בזמן הגידול תילקחנה דוגמאות כל 20 דקות לקריאת הבליעה.
- ביצוע ספירה חיה באמצעות מיהולים וזריעה לצלחות.

הסבר כללי

בחדר המעבדה ישנם 3 אמבטי טלטול שכל אחד מהם בטמפרטורה שונה: 55°C , 37°C וטמפרטורת החדר. לכל קבוצה על השולחן ישנן 5 מבחנות שבתוכן מצע לגידול חיידקים. לכל קבוצה מסומנות המבחנות במדבקות בצבע שונה. המבחנות מסומנות באותיות A, B, C, D, E. המבחנות A, B, C, מיועדות לגידול חיידקי *E. coli* בשלוש טמפרטורות שונות. מבחנה A תגודל בטמפ' של 37°C , מבחנה B תגודל בטמפרטורת החדר ומבחנה C תגודל בטמפ' של 55°C . במבחנות D ו-E, כל קבוצה תבצע ניסוי ייחודי לה על פי הפירוט הבא:

קבוצה א' תבדוק גידול *E. coli* במצע עני.

קבוצה ב' תבדוק גידול *E. coli* בריכוזי מלח גבוהים.

קבוצה ג' תשווה גידול *E. coli* רגישים ועמידים לאמפיצילין בנוכחות אמפיצילין.

קבוצה ד' תבדוק גידול *E. coli* בנוכחות סטרפטומיציין ובנוכחות כלורמפניקול.

קבוצה ה' תבדוק גידול *E. coli* בתנאים של מיעוט חמצן.

עליך לבדוק מהי קבוצתך, ולנהוג בהתאם להוראות לקבוצה זו.



מהלך העבודה:

- זריעת החיידקים למבחנות.
- קריאת הבליעה של החיידקים בתחילת הניסוי (זמן אפס).
- גידול החיידקים באמבט מטלטל.
- מדידת הבליעה תתבצע, כל 20 דקות עד זמן 100 או 120 .
- אחרי מדידת זמן 20 דקות תתבצע הסתכלות מיקרוסקופית בתאים אאוקריוטים ופרוקריוטים.
- אחרי מדידות זמן 40 וזמן 80 ילקחו דוגמאות לספירה חיה.
 - הדוגמא תעבור סדרת מיהולים .
 - זריעת דוגמאות המיהול לשלוש צלחות פטרי במיהול 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} .
 - ספירת המושבות תתבצע 24 שעות לפחות לאחר הזריעה.
- לסיכום עליך לבצע 3 מטלות : 1. עקומי גידול. 2. מיקרוסקופיה. 3. ספירה חיה.



קבוצה א' – זכור את צבע מכסי המבחנות!

מבחנה E	מבחנה D
E.coli במצע עני בתוספת גלוקוז	E.coli במצע עני

זריעת החיידקים במבחנות:

1. הוסף למבחנות A, B, C, D, E-ו- 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים.
2. ערבב את תכולת המבחנות בוורטקס.

מדידת זמן 0:

3. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 600nm.
4. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות.
5. קרא את הבליעה במבחנות A, B, C. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
6. אפס שנית עם מצע דיוויס, וקרא הבליעה של החיידקים במבחנות D, E.

גידול החיידקים:

7. הכנס כל מבחנה לאמבט מטלטל בטמפרטורה המתאימה:
מבחנות A, D, E-ו- לאמבט בטמפרטורה של 37°C.
מבחנה B לאמבט בטמפרטורה של 25°C.
מבחנה C לאמבט בטמפרטורה של 55°C.
וודא שהפעלת את הטלטול באמבטים!
8. כוון את שעון-העצר (סטופר) ל-20 דקות והפעל אותו.
9. בזמן הנותר הסתכל בחיידקים במיקרוסקופ על פי ההוראות בעמוד 13.

מדידת זמן 20 דקות:

10. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
11. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
12. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. (שימו לב לאפס עם LB ועם מצע דיוויס).
13. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
14. החזר כל מבחנה לאמבט המתאים. וודא שהפעלת את הטלטול!
15. הפעל את השעון ל-20 דקות.

מדידת זמן 40 דקות:

16. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
17. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
18. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. (שימו לב לאפס עם LB ועם מצע דיוויס).
19. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.



לקיחת דגימה לספירה חיה:

20. רשום על מבחנת אפנדורף "1a".
21. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
22. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה A והכנס את הנוזל למבחנה 1a. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
23. זרוק את הטיפ.
24. החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
25. הפעל את השעון ל-20 דקות.
26. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 60 דקות:

27. חזור על שלבים 10-15.

מדידת זמן 80 דקות:

28. חזור על שלבים 10-15.

לקיחת דגימה לספירה חיה:

29. רשום על מבחנת אפנדורף "1b".
30. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
31. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל), ממבחנה A והכנס את הנוזל למבחנה 1b. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
32. זרוק את הטיפ.
33. החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
34. הפעל את השעון ל-20 דקות.
35. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 100 דקות:

1. חזור על שלבים 10-15.
2. בזמן שנותר עד לקריאה הבאה נקה וסדר את שולחן העבודה.

מדידת זמן 120 דקות:

1. חזור על שלבים 10-15.



קבוצה ב' – זכור את צבע מכסי המבחנות!

מבחנה E	מבחנה D
E.coli במצע המכיל 6% NaCl	E.coli במצע המכיל 3% NaCl

זריעת החיידקים במבחנות:

1. הוסף למבחנות A, B, C, D, E-ו- 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים.
2. ערבב את תכולת המבחנות בוורטקס.

מדידת זמן 0:

3. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 600nm.
4. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות.
5. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.

גידול החיידקים:

6. הכנס כל מבחנה לאמבט מטלטל בטמפרטורה המתאימה:
מבחנות A, D, E-ו- לאמבט בטמפרטורה של 37°C.
מבחנה B לאמבט בטמפרטורה של 25°C.
מבחנה C לאמבט בטמפרטורה של 55°C.
וודא שהפעלת את הטלטול באמבטים!
7. כוון את שעון-העצר (סטופר) ל-20 דקות והפעל אותו.
8. בזמן הנותר הסתכל בחיידקים במיקרוסקופ על פי ההוראות בעמוד 13.

מדידת זמן 20 דקות:

9. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
10. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
11. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
12. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
13. החזר כל מבחנה לאמבט המתאים. וודא שהפעלת את הטלטול!
14. הפעל את השעון ל-20 דקות.

מדידת זמן 40 דקות:

15. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
16. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
17. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
18. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.



לקיחת דגימה לספירה חיה:

19. רשום על מבחנת אפנדורף "1a".
20. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
21. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה A והכנס את הנוזל למבחנה 1a. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
22. זרוק את הטיפ.
23. חזור את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
24. הפעל את השעון ל-20 דקות.
25. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 60 דקות:

26. חזור על שלבים 9 – 14.

מדידת זמן 80 דקות:

27. חזור על שלבים 9 – 14.

לקיחת דגימה לספירה חיה:

28. רשום על מבחנת אפנדורף "1b".
29. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
30. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה A והכנס את הנוזל למבחנה 1b. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
31. זרוק את הטיפ.
32. חזור את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
33. הפעל את השעון ל-20 דקות.
34. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 100 דקות:

35. חזור על שלבים 9 – 14.
36. בזמן שנותר עד לקריאה הבאה נקה וסדר את שולחן העבודה.

מדידת זמן 120 דקות:

37. חזור על שלבים 9 – 14.



קבוצה ג' – זכור את צבע מכסי המבחנות!

מבחנה E	מבחנה D
E.coli עמידים לאמפיצילין במצע המכיל אמפיצילין	E.coli במצע המכיל אמפיצילין

זריעת החיידקים במבחנות:

- הוסף למבחנות A, B, C, ו-D, 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים המסומנת "E.coli".
למבחנה E הוסף 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים המסומנת "עמידים".
- ערבב את תכולת המבחנות בוורטקס.

מדידת זמן 0:

- כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 600nm.
- אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות.
- קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.

גידול החיידקים:

- הכנס כל מבחנה לאמבט מטלטל בטמפרטורה המתאימה:
- הכנס את מבחנות A, D, ו-E לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 37°C.
- הכנס את מבחנה B לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 25°C.
- הכנס את מבחנה C לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 55°C.
- כוון את שעון-העצר (סטופר) ל-20 דקות והפעל אותו.
- בזמן הנותר הסתכל בחיידקים במיקרוסקופ על פי ההוראות בעמוד 13.

מדידת זמן 20 דקות:

- עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
- נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
- קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
- רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
- החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
- הפעל את השעון ל-20 דקות.

מדידת זמן 40 דקות:

- עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
- נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
- קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
- רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.



לקיחת דגימה לספירה חיה:

19. רשום על מבחנת אפנדורף "1a".
20. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
21. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה D והכנס את הנוזל למבחנה 1a. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
22. זרוק את הטיפ.

הוספת אנטיביוטיקה:

23. הוסף למבחנות D ו-E $100\mu\text{l}$ אמפיצילין.
24. החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
25. הפעל את השעון ל-20 דקות.
26. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 60 דקות:

27. חזור על שלבים 9 – 14.

מדידת זמן 80 דקות:

28. חזור על שלבים 9 – 14.

לקיחת דגימה לספירה חיה:

29. רשום על מבחנת אפנדורף "1b".
30. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
31. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה D והכנס את הנוזל למבחנה 1b. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
32. זרוק את הטיפ.

33. החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
34. הפעל את השעון ל-20 דקות.
35. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 100 דקות:

36. חזור על שלבים 9 – 14.
37. בזמן שנותר עד לקריאה הבאה נקה וסדר את שולחן העבודה.

מדידת זמן 120 דקות:

38. חזור על שלבים 9 – 14.



קבוצה ד' – זכור את צבע מכסי המבחנות!

מבחנה E	מבחנה D
E.coli במצע המכיל כלורמפניקול	E.coli במצע המכיל סטרפטומיצין

זריעת החיידקים במבחנות:

1. הוסף למבחנות A, B, C, D, E-ו- 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים.
2. ערבב את תכולת המבחנות בוורטקס.

מדידת זמן 0:

3. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 600nm.
4. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות.
5. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.

גידול החיידקים:

6. הכנס כל מבחנה לאמבט מטלטל בטמפרטורה המתאימה:
- הכנס את מבחנות A, D, E-ו- לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 37°C.
- הכנס את מבחנה B לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 25°C.
- הכנס את מבחנה C לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 55°C.
7. כוון את שעון-העצר (סטופר) ל-20 דקות והפעל אותו.
8. בזמן הנותר הסתכל בחיידקים במיקרוסקופ על פי ההוראות בעמוד 13.

מדידת זמן 20 דקות:

9. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים.
10. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
11. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
12. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
13. החזר את המבחנות לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
14. הפעל את השעון ל-20 דקות.

מדידת זמן 40 דקות:

15. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבט.
16. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
17. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
18. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.



לקיחת דגימה לספירה חיה:

19. רשום על מבחנת אפנדורף "1a".
20. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
21. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה D והכנס את הנוזל למבחנה 1a. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
22. זרוק את הטיפ.

הוספת אנטיביוטיקות:

23. הוסף למבחנה D $100\mu\text{l}$ סטרפטומיצין.
24. הוסף למבחנה E $100\mu\text{l}$ כלורמפניקול.
25. חזור את המבחנות לאמבט. וודא שהפעלת את הטלטול!
26. הפעל את השעון ל-20 דקות.
27. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 60 דקות:

28. חזור על שלבים 9 – 14.

מדידת זמן 80 דקות:

29. חזור על שלבים 9 – 14.

לקיחת דגימה לספירה חיה:

30. רשום על מבחנת אפנדורף "1b".
31. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
32. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה D והכנס את הנוזל למבחנה 1b. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
33. זרוק את הטיפ.
34. חזור את המבחנות לאמבט. וודא שהפעלת את הטלטול!
35. הפעל את השעון ל-20 דקות.
36. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 100 דקות:

37. חזור על שלבים 9 – 14.
38. בזמן שנותר עד לקריאה הבאה נקה וסדר את שולחן העבודה.

מדידת זמן 120 דקות:

39. חזור על שלבים 9 – 14.



קבוצה ה' – זכור את צבע מכסי המבחנות!

מבחנה D
E.coli בתנאים של מיעוט חמצן

זריעת החיידקים במבחנות:

1. הוסף למבחנות A, B, C-ו 200µl חיידקים ממבחנת החיידקים. למבחנה D הוסף 800µl חיידקים.
2. ערבב את תכולת המבחנות C-A בוורטקס. את מבחנה D אטום בעזרת נייר פאראפילם, וערבב על ידי הפיכתה בעדינות. השאר את נייר הפאראפילם על המבחנה לצורך אטימה מכניסת אויר.

מדידת זמן 0:

3. כוון את הספקטרופוטומטר לאורך גל 600nm.
4. אפס את הספקטרופוטומטר בעזרת המבחנה המכילה מצע LB הנמצאת במעמד המבחנות.
5. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.

גידול החיידקים:

6. הכנס כל מבחנה לאמבט מטלטל בטמפרטורה המתאימה:
6. הכנס את מבחנה A לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 37°C.
7. הכנס את מבחנה B לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 25°C.
8. הכנס את מבחנה C לאמבט מטלטל בטמפרטורה של 55°C.
9. וודא שהפעלת את הטלטול באמבטים!
7. הכנס את מבחנה D לאינקובטור בטמפרטורה של 37°C.
8. כוון את שעון-העצר (סטופר) ל-20 דקות והפעל אותו.
9. בזמן הנותר הסתכל בחיידקים במיקרוסקופ על פי ההוראות בעמוד 13.

מדידת זמן 20 דקות:

10. עם הישמע צלצל השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים ומהאינקובטור.
11. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
12. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
13. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
14. החזר את מבחנות C-A לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
14. החזר את מבחנה D לאינקובטור.
15. הפעל את השעון ל-20 דקות.



מדידת זמן 40 דקות:

16. עם הישמע צלצול השעון, הוצא את המבחנות מהאמבטים ומהאינקובטור.
 17. נגב היטב את המבחנות ממי האמבט.
 18. קרא את הבליעה במבחנות הניסוי.
 19. רשום את הקריאות בטבלה שבמחשב.
- לקיחת דגימה לספירה חיה:
20. רשום על מבחנת אפנדורף "1a".
 21. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
 22. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה E של קבוצה ד' והכנס את הנוזל למבחנה 1a. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
 23. זרוק את הטיפ.
 24. החזר את מבחנות C-A לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
 25. הפעל את השעון ל-20 דקות.
 26. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 60 דקות:

27. חזור על שלבים 10 – 15.
- מדידת זמן 80 דקות:
28. חזור על שלבים 10 – 15.
- לקיחת דגימה לספירה חיה:
29. רשום על מבחנת אפנדורף "1b".
 30. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
 31. שאב $100\mu\text{l}$ (0.1 מ"ל) ממבחנה E של קבוצה ד' והכנס את הנוזל למבחנה 1b. מבחנה זו תשמש אותך לביצוע מיהול וזריעה לצורך ספירה חיה.
 32. זרוק את הטיפ.
 33. החזר את מבחנות C-A לאמבטים. וודא שהפעלת את הטלטול!
 34. הפעל את השעון ל-20 דקות.
 35. בזמן הנותר בצע מיהולים וזריעות על פי ההוראות בעמוד 14.

מדידת זמן 100 דקות:

36. חזור על שלבים 10-15.
37. בזמן שנותר עד לקריאה הבאה נקה וסדר את שולחן העבודה.

מדידת זמן 120 דקות:

38. חזור על שלבים 10-15.



השוואת גודל: חיידקים – תאי לחי

- א. על השולחן תמצא קיסם עם צמר גפן בקצהו. הכנס את הקיסם לפיך וגרד בו את החלק הפנימי של הלחי. בדרך זו תאסוף על הקיסם תאים מרירית הלחי הניתקים בקלות.
- ב. מרח את החומר שאספת על מרכזה של זכוכית נושאת, בשטח שגודלו כמטבע של 10 אגורות.
- ג. הנח בעזרת פיפטת פסטר טיפה מתרבית חיידקים על גבי אותו אזור.
- ד. טפטף טיפה של צבע על טיפת החיידקים.
- ה. כסה בזכוכית מכסה.
- ו. ספוג בעזרת נייר את עודפי הצבע שבשולי הזכוכית המכסה.
- ז. לפני תחילת העבודה עם המיקרוסקופ וודא שהעדשה הקרובה לשולחן המיקרוסקופ היא זו של ההגדלה הקטנה ביותר (העדשה הקצרה ביותר).
- ח. הנח את הזכוכית הנושאת עם הדגימה על שולחן המיקרוסקופ כשהיא אחוזה במסגרת המתכת. הדלק את מנורת המיקרוסקופ.
- ט. הסתכל מהצד – לא מלמעלה! – וקרב את שולחן המיקרוסקופ אל העדשה ככל האפשר מבלי שהעדשה תיגע בזכוכית.
- י. התבונן דרך העינית, וסובב באיטיות את בורג ההכוונה הגסה כך שירחיק את שולחן המיקרוסקופ כלפי מטה, עד שתבחין בדגימה בצורה מטושטשת בתוך שדה הראיה. סובב עוד את הבורג, לאט, ונסה להגיע לתמונה החדה ביותר האפשרית. סביר שבמצב זה לא ייראו תאים בבהירות רבה, או שהם ייראו קטנים מאד.
- יא. הזז את הזכוכית כך שהתא שאותו ברצונך להגדיל עוד יהיה במרכז שדה הראיה.
- יב. החלף את העדשה הקרובה לשולחן המיקרוסקופ לעדשה המגדילה יותר ($\times 10$).
- יג. לאחר שהחלפת הגדלה, סובב לאט את בורג ההכוונה העדינה עד שתשיג הגדלה וחדות מירבית.
- יד. לעיתים אפשר לשפר את חדות הראיה על ידי שינוי מידת הפתיחה של הצמצם. נסה להסיט אותו מעט, לפתיחה צרה או רחבה יותר, ועקוב אחר התוצאות.
- טו. הזז את הזכוכית כך שהתא שאותו ברצונך להגדיל עוד יהיה במרכז שדה הראיה.
- טז. החלף את העדשה הקרובה לשולחן המיקרוסקופ לעדשה המגדילה יותר ($\times 40$). בעת שהנך מסובב את מתקן העדשות, הסתכל מהצד – לא מלמעלה! – כדי לוודא שהעדשה אינה נוגעת בזכוכית.
- יז. סובב לאט את בורג ההכוונה העדינה עד שתשיג הגדלה וחדות מירבית.

איזה תאים גדולים יותר – תאי הלחי או תאי החיידקים? נסו להעריך פי כמה.

בסיום העבודה כבה את מנורת המיקרוסקופ וזרוק את הזכוכית הנושאת ואת הקיסם לפח.



ספירה חיה (מיהולים וזריעות)

מכיוון שמספר החיידקים הוא רב ואין דרך לדעת את מספרם, יש לבצע סדרת מיהולים, על מנת לקבל לפחות במיהול אחד מספר חיידקים שניתן לספור על גבי צלחת הפטרי. על מנת לקבל חיידקים בודדים צריך למהול פי מיליון!!! (10^6).

הוראות להלן מתייחסות לזריעה של זמן 40 דקות. לזריעה של זמן 80 דקות, החלף כל a ב-b.

מיהול

1. סמן 5 מבחנות אפנדורף במספרים **6a, 5a, 4a, 3a, 2a**.
2. הלבש טיפ כחול על הפיפטור של $1000\mu\text{l}$ (כחול).
3. הכנס לכל מבחנה ממבחנות 2-6 $900\mu\text{l}$ מצע LB.
4. למבחנה **1a**, שהכנת בזמן 40 דקות, הוסף $900\mu\text{l}$ מצע LB.
5. ערבב היטב את המבחנה בעזרת וורטקס.
6. שים לב! מהלת את החיידקים פי 10.
7. הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
8. שאב $100\mu\text{l}$ ממבחנה מס' **1a** והעבר אותם למבחנה מס' **2a**.
9. ערבב היטב את המבחנה בעזרת וורטקס.
10. שים לב! שוב מהלת פי 10. לכן, החיידקים מהולים פי 100.
9. חזור על שלבים 6-8 עוד 4 פעמים תוך העברה למבחנות **3a – 6a**. השתמש כל פעם בטיפ לבן חדש!
10. שים לב! מהלת עוד 4 פעמים פי 10. החיידקים במבחנה **6a** מהולים פי 1,000,000 (מיליון)!

זריעת החיידקים על גבי הצלחות.

- סמן 3 צלחות פטרי בשמך, ובמספרים **6a, 5a, 4a**.
- הלבש טיפ לבן על הפיפטור של $100\mu\text{l}$ (סגול/צהוב).
- שאב $100\mu\text{l}$ ממבחנה מס' **4a** והעבר אותם לצלחת מס' **4a**.
- זרוק את הטיפ המשומש והרכב טיפ חדש.
- שאב $100\mu\text{l}$ ממבחנה מס' **5a** והעבר אותם לצלחת מס' **5a**.
- זרוק את הטיפ המשומש והרכב חדש.
- שאב $100\mu\text{l}$ ממבחנה מס' **6a** והעבר אותם לצלחת מס' **6a**.
- זרוק את הטיפ.
- בעזרת מקל זריעה סטרילי, מקל שונה לכל צלחת, מרח את הנוזל באופן אחיד על פני הצלחת. סגור את הצלחות והצמד את שלוש הצלחות יחד בסלוטייפ.
- אחרי 24 שעות לפחות, ספור את מספר המושבות בכל צלחת.

עיבוד התוצאות

- במהלך המעבדה הינך נדרש להכניס את התוצאות למחשב כדי שתוכל לעקוב כבר במעבדה אחר עקומי הגידול השונים. לאחר שהכנסת את כל הנתונים, הדפס את התוצאות כדי שתוכל לצרפן לדו"ח. קח מחבריק את התוצאות לגבי מבחנות D ו-E שלהם והכנס אותן לטבלה המתאימה במחשב. צייר אף לנתונים אלו גרף מתאים. הסבר את ההבדלים בין הגידול בתנאים השונים.
- ספור את מספר המושבות על כל צלחת. הכפל בפקטור המיהול ורשום את ריכוז החיידקים ל-1 מ"ל בכל אחד מהזמנים. האם תוצאות הספירה החיה נמצאות בהתאמה לתוצאות מדידת הבליעה? אם לא – הסבר מדוע.