



מעבדה במיקרוביולוגיה - מבוא תיאורטי

מיקרוביולוגיה הנו תחום העוסק ביצורים זעירים. מיקרו-קטן, ביולוגיה- תורת החי. מאחר וחיידקים הם יצורים זעירים, לא ניתן לראותם בעין חשופה, לכן כדי לגדל, לאפיין ולהתבונן בהם, יש לעבוד במספר שיטות ייחודיות. במעבדה זו נכיר כמה משיטות העבודה העיקריות עם חיידקים:

- מיון חיידקים על ידי צביעה.
- שיטות להערכה או ספירה של מספר של החיידקים.

צביעת חיידקים

חיידקים חיים, הם חסרי צבע וחסרים ניגוד מספיק למצע הגידול בו הם מורחפים, לכן קשה לצפות בהם. כדי שאפשר יהיה לראות אותם בצורה ברורה, יש לבצע צביעה של התאים, המגדילה את הניגוד בינם לבין הסביבה ואז אפשר יהיה לראותם ביתר בהירות. צבעים מסוימים אף עוזרים להבחין במבנים פנימיים תוך תאיים שבדרך אחרת היו בלתי נראים.

צבעים מגיבים באופן כימי עם דופן החיידקים ולא עם הרקע וכך אפשר להבחין בהם. כלומר, היתרון הגדול של צביעת החיידקים הוא בניגודיות שהצביעה מספקת בין המיקרואורגניזמים לבין הרקע. הצביעה מאפשרת הבחנה בין סוגים מורפולוגיים שונים ומאפשרת ללמוד על המבנה הפנימי של תא החיידק כמו דופן, חלולית (vacuole) ונבגים.

ישנו מגוון רחב של צביעות שאפשר לחלק לקבוצות הבאות:
א. צביעות פשוטות:

1. צבע בסיסי 2. צבע חומצי 3. צבע ניטרלי.

ב. צביעה מבדלת:

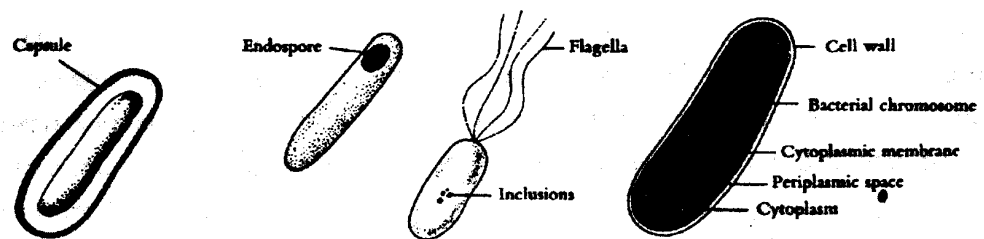
1. צביעת גראם 2. Acid-Fast stain.

ג. צביעת למבנים תאיים:

1. צביעה לנבג 2. צביעה לקפסולה 3. צביעה לשוטונים.



צורות חיידקים



מבנים פנימיים

כדי להבין כיצד נצבעים תאי החיידק, יש להבין את מנגנון פעולתו של הצבע. רוב צבעים הם מלחים שבהם אחד מהיונים צבוע. למשל - הצבע מתילן בלו הוא בעצם המלח מתילן בלו כלוריד. הקטיון, מתילן בלו הוא כחול:



לדופן החיידקים יש טעינה שלילית קלה ב- pH ניטרלי (זו בד"כ הסביבה הנורמלית).
המטענים השליליים בדופן החיידק נקשרים למטענים החיוביים של הצבע ואז התא נצבע.
צבע בסיסי - כאשר הצבע הוא ביון בעל המטען החיובי.
צבע חומצי - כאשר הצבע הוא ביון בעל המטען השלילי.

תהליך הצביעה

לפני הצביעה יש לקבע את דוגמאות החיידקים, כדי שידבקו לזכוכית הנושא, אחרת הדוגמאות תישטפנה בזמן הצביעות. מטרת הקיבוע היא להרוג את המיקרואורגניזמים, להקריש את הפרוטופלזמה שלהם ולהדביקם לזכוכית.



בצעת

גראם

צביעת

גראם

הינה אחת

מסדרת

צביעות

הנקראות

צביעה

מבדלת.

(1) הנחת הדוגמא



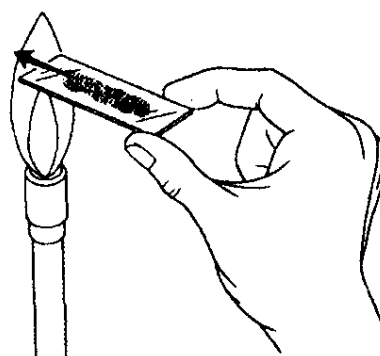
(2) מריחה על גבי זכוכית



(3) יבוש באויר



(4) קבוע בחם



מיקרואורגניזמים שונים באופן כימי ופיזיקלי גם מהסביבה וגם אחד ממשנהו ולכן מגיבים בצורה שונה לתהליכי צביעה. זהו העיקרון הבסיסי של תהליכי צביעה שונים המיועדים לאבחנה בין סוגי חיידקים שונים. צביעת גראם פותחה ע"י הביולוג הדני כריסטיאן גראם שהבחין כי חיידקים נבדלים ביכולתם לקלוט צבע. ולפי צביעה זו הוא מייך את העולם החיידקים לגראם חיובי וגראם שלילי. חיידקים שקלטו את הצבע בתחילת תהליך הצביעה מכונים גראם חיוביים ואילו חיידקים שאיבדו את הצבע מכונים גראם שליליים. זו הצביעה השימושית ביותר מבין תהליכי הצביעה של חיידקים. ההבדל בין שני סוגי התאים נובע מההרכב הכימי של דופן התא, וליתר דיוק מעובי שכבת הרב סוכר, הפפטידוגליקאן (הנקרא גם "מוראין") המצוי בשכבות החיצוניות. ההבדל בעובי שכבת המוראין קובע כנראה גם את השוני ברגישות של חיידקים גראם-חיוביים וחיידקים גראם-שליליים לתרופות ולחומרים כימיים ופיזיקליים אחרים. לצביעת גראם נדרשות ארבע תמיסות – צבע בסיסי, צבע מקבע, מסיר צבע וצבע נגדי.

- **צבע בסיסי** - היון הצבוע בעל המטען החיובי, נקשר לדופן תא החיידק הטעונה שלילית.
- **צבע מקבע** (mordant) הוא חומר המגביר את הזיקה בין התא לבין הצבע ועוזר לקשור את הצבע לתא. דוגמאות למקבע הן: חומצות, בסיסים, מלחי מתכות ויוד. תחת השפעתו של המקבע, התא נצבע בצורה חזקה ביותר וקשה לשטוף ממנו את הצבע.
- **חומר מסיר צבע** (decolorizing agent) כפי ששמו מרמז, הוא חומר המסלק את הצבע מהתא הצבוע. ישנם תאים צבועים שקל יותר לסלק מהם את הצבע. קצב סילוק הצבע הוא המבדיל בין סוגים שונים של חיידקים, כאשר משתמשים בצביעת גראם או בכל צביעה מבדלת אחרת.
- **הצבע הנגדי** (counter stain) הוא צבע בסיסי, בעל גוון שונה מהצבע הבסיסי הראשון. מטרת הצביעה הנגדית היא לצבוע את התאים שמהם סולק הצבע הראשון. הצבע הנגדי הוא בעל גוון שונה מהצבע הראשון.



אותם תאים שמהם אי אפשר היה לסלק את הצבע הראשון ונשארו בגוון של הצבע הראשון נקראים **גראם** - **חיוביים** ואילו אלו שאיבדו את הצבע הראשון ונצבעו בצבע השני נקראים **גראם** - **שליליים**.

ספירת חיידקים

במחקר המיקרוביולוגיה, יש צורך לספור את החיידקים. ולשם כך פותחו שיטות שונות:

א. השיטה הנפוצה ביותר היא ספירה חיה (נקראת גם שיטת הצלחות, או ספירת המושבות) השיטה מבוססת על ההנחה התיאורטית, שתא חיידק אחד מביא ליצירת מושבה בודדה, ולכן מספר המושבות המתפתחות על פני מצע, מתאים למספר החיידקים המקורי שהיה בחומר שנזרע על פני המצע. שיטה זו, מודדת את מספר החיידקים החיים המסוגלים להתרבות וליצור מושבות.

ב. ישנן שיטות המודדות באופן ישיר את כל התאים, חיים ומתים בדוגמא הנמדדת. שיטות אלו אינן מדויקות כמו שיטות הספירה החיה, אך הן הרבה יותר מהירות ובעלות יתרונות אחרים. אחת מהנפוצות ביותר היא ספירה מיקרוסקופית ישירה – ישנם תאי מדידה מיוחדים בעלי נפח ידוע המחולקים לריבועים, אפשר לספור חיידקים במספר ריבועים ולחשב את מספרם הכולל בדוגמא. שיטה נוספת היא ספירה אלקטרונית ב-coulter counter – הדוגמא מועברת דרך פתח קטן ומהשינוי האלקטרוני בהתנגדות מאפשר לחשב את מספר החיידקים.

ג. מדידות של מסות התאים בתרבית, ומכאן הערכה של הפרוטופלזמה הכוללת לנפח קבוע. השיטה הנפוצה ביותר היא, מדידת פיזור האור או מדידת עכירות. שיטות אלו מתבססות על העובדה, שתאים בתוך סביבה נוזלית חוסמים או מפזרים את האור בפרופורציה למסה הכוללת שלהם בתרבית. אפשר להעריך את מסת התאים גם על ידי מדידה של מרכיבים כימיים הנמצאים בתאים. למשל, חנקן תאי, חלבון, ATP וכדומה. אפשר למדוד גם משקל יבש או נפח של תאים.

במהלך המעבדה נשתמש בשתי שיטות שונות לספירת חיידקים:

- ספירה חיה לאחר סדרת מיהול.
- מדידת עכירות התרבית.

ספירה חיה לאחר מיהול

כפי שהוסבר קודם לכן, מכל תא חי נוצרת מושבה אחת. אפשר לזרוע על מצע אגר את הדוגמא הנחקרת, ולאחר 24 שעות לספור את המושבות. כדי להבטיח מדידה מדויקת, הדוגמא נמהלת בצורה סדרתית ואח"כ נזרעת. חישוב מספר החיידקים נעשה על ידי הכפלת מספר מושבות בפקטור המיהול (dilution factor). בהגדרה, פקטור המיהול



$$1. \text{ מיהול} = \frac{\text{אחרי המיהול (מ"ל / תאים)}}{\text{לפני המיהול (מ"ל / תאים)}}$$

הוא היחס בין הריכוז הסופי לבין הריכוז ההתחלתי של דוגמא שנמהלה. באופן מעשי אפשר להציבו בנוסחאות כך:

במידה ומספר החיידקים אינו ידוע נשתמש בנוסחה הבאה:

$$2. \text{ מיהול} = \frac{\text{מל של דוגמא}}{\text{מל של הדוגמא} + \text{מל שלתוכו הוכנסה}}$$

דוגמא פתורה

נבדקה שלולית כדי לבדוק את מספר החיידקים בה. נלקחו 10 מ"ל של מי השלולית לבדיקה. 2.5 מ"ל הוספו ל97.5 מ"ל מצע גידול לחיידקים. מתוך התמיסה, נלקחו 1.6 מ"ל לתוך 14.4 מ"ל מצע גידול. 0.1 מתוך תמיסה זו הוכנסו לתוך 99.9 מ"ל מצע גידול. מתוך התמיסה האחרונה נזרעו 0.1 מ"ל לצלחת אגר. אחרי 24 שעות נספרו על פני אגר 200 מושבות. מהו ריכוז החיידקים בדוגמא שנלקחה ממי השלולית?

שלב 1 ריכוז החיידקים בצלחת למ"ל:

$$\frac{200 \text{ תאים}}{0.1 \text{ מל}} = 2000 \text{ מל / תאים}$$

מאחר ומהלנו את הדוגמא הראשונית יש לחזור ולחשב את מספר החיידקים על ידי פקטור המיהול שנקבע על ידי שלבי המיהול.

שלב 2 פקטור מיהול בכל אחד מהשלבים:

- $2.5 / (2.5 + 97.5) = 2.5 \times 10^{-2}$
- $1.6 / (1.6 + 14.4) = 10^{-1}$
- $0.1 / (0.1 + 99.9) = 10^{-3}$

שלב 3 פקטור מיהול כללי:

$$(2.5 \times 10^{-2})(10^{-1})(10^{-3}) = 2.5 \times 10^{-6}$$



שלב 4 ריכוז החיידקים הראשוני (תאים/מ"ל):

$$2.5 \times 10^{-6} = 2000 / X$$

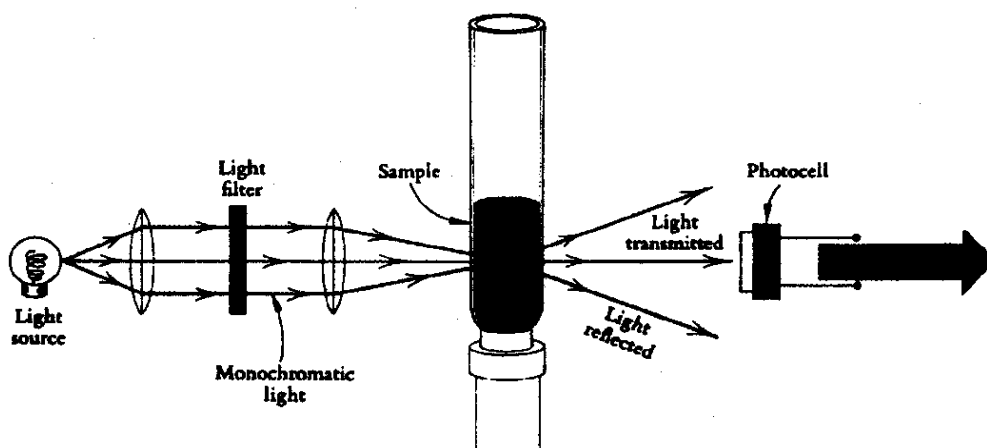
$$X = 8 \times 10^8$$

הערכת מספר חיידקים במדידת העכירות

תרבית חיידקים פועלת כמו תרחיף קולואידי – חוסמת ומפזרת אור. בתחום מסויים עכירות התרבית עומדת ביחס ישר לריכוזם. לכן, על ידי מדידת אחוז האור הנבלע אפשר להעריך את מספר החיידקים.

למדידות אלו יש להשתמש בספקטרופוטומטר. במכשיר זה ישנו מקור אור מונוכרומטי (קרן אור בעלת אורך גל אחד, שניתן לשינוי על ידי סיבוב חוגה וקביעתה על אורך הגל הרצוי). קרן האור עוברת דרך תרבית החיידקים, וכמות האור העוברת נמדדת על ידי חיישן פוטואלקטרי רגיש, המחובר גם למד מתח. מדידת הבליעה (Absorbance) היא ביחס ישיר לריכוז התאים. בליעה (A) מוגדרת כלוגריתם היחס שבין עצמת האור הפוגע

בתמיסה (I₀) לבין עוצמת האור העוזב את התמיסה (I). (חוק בר למברט). כדי למדוד מספר חיידקים לפי בליעה של האור, יש לזרוע במקביל בשיטת הספירה החיה, וכך לבנות עקום כיוול סטנדרטי שממנו ניתן לחשב את מספר החיידקים לכל מדידה של הבליעה.





עקום גידול

כאשר מגדלים חיידקים בתנאי מעבדה מבוקרים, הם גדלים באופן הבא :

שלב ראשון שלב ההשהיה (lag) (A) : אחרי זריעת החיידקים למצע נוזלי טרי, החיידקים נמצאים בשלב ההשהיה.

בשלב זה, החיידקים גדלים בממדיהם, ומתאימים את היכולת הסינטטית שלהם (דנ"א, רנ"א ויצור חלבונים) לגידול אופטימלי.

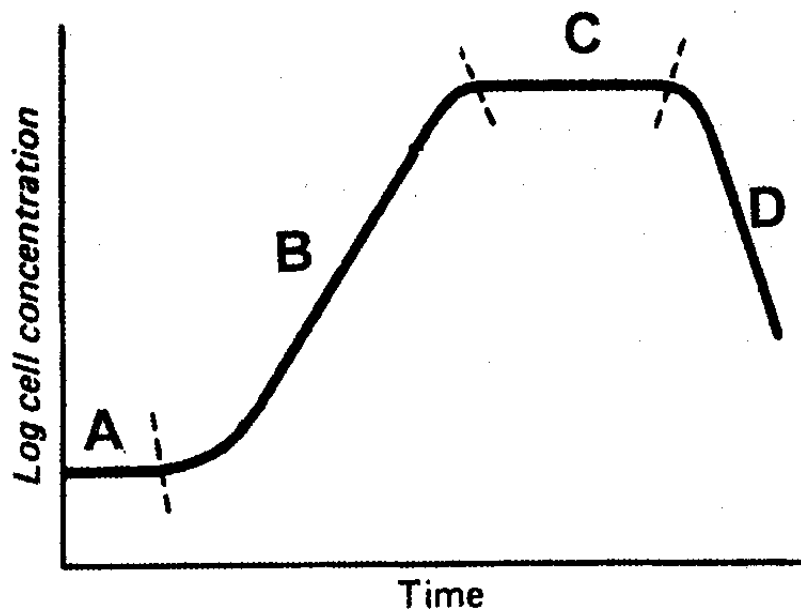
שלב שני גידול מעריכי (B) (logarithmic) (B) : בשלב זה החיידקים בגידול מאוזן וקצב הגידול הוא קבוע.

שלב שלישי העמידה - stationary (C) : עם הזמן, נגמרים חומרי המזון ההכרחיים במצע ומצטברת פסולת רעילה.

כתוצאה מכך קצב הגידול מואט ומספר החיידקים נשאר קבוע.

שלב רביעי התמותה - Lysis (D) : כאשר ההרעה בתנאים הסביבתיים מחריפה, מפסיקה העלייה במספר התאים

ולאחר זמן מספר התאים יורד. לאחר מות התאים, אם הם מתפרקים לחלקיקים קטנים בליעת האור יורדת.



השפעת טמפרטורה על גידול חיידקים

ניתן לחלק את ההשפעות הסביבתיות על החיידקים לשלוש קטגוריות :

1. השפעות פיזיקליות - טמפרטורה, לחץ.
2. השפעות כימיות - חומרי מזון, השפעת רעלים וחומרים שונים.
3. השפעות ביולוגיות - (בעיקרן כימיות) השפעת מינים שונים הנמצאים יחד.



לכל אחד ממיני החיידקים קיימים תנאי סביבה אופטימאליים. בממלכת החיידקים יש סבילות בטווח הרבה יותר רחב מאשר בצורות חיים גבוהות יותר. גוף האדם, למשל, הוא בעל טמפרטורה מווסתת של 37°C , החייבת להישאר קבועה למרות חשיפה לחום או לקור. לתאי החיידקים אין מערכת טמפרטורה מווסתת אלה הם מקבלים את הטמפרטורה של הסביבה.

תגובתם לחשיפה ממושכת לחום או לקור היא בדרך כלל הפסקת פעילות אנזימתית ולא בהכרח מוות. רב מיני החיידקים דורשים תנאי סביבה דומים אך ישנם מינים "קיצוניים", המסוגלים להתקיים (או אפילו לדרוש) תנאים קשים מאוד. עם זאת, אפילו המינים בעלי העמידות לתנאים הקיצוניים ביותר אינם מסוגלים לעמוד בפני שני "אויבים" קשים: חום קיצוני ורעלים כימיים.

השפעת הטמפרטורה

מינים שונים של חיידקים דורשים תנאי טמפרטורה מסוימים לגידול. יש טווח רחב בין טמפרטורה מינימלית לבין טמפרטורה מקסימלית אשר מעבר להן התאים מפסיקים לגדול. בתוך הטווח יש תחום מוגבל הנקרא הטמפרטורה האופטימלית. לכל מין, הטמפרטורה האופטימלית הנה בהתאמה לבית הגידול הטבעי של אותו המין. למשל, הטמפרטורה האופטימלית לגידול מיקרואורגניזם החיים בתוך בעלי חיים היא בסביבות טמפרטורת הגוף הנורמלית - 37°C

השפעת הטמפרטורה על גידול חיידקים הנה בעצם, השפעת הטמפרטורה על התהליכים האנזימטיים בתאים. ככל שיוודת הטמפרטורה, מואטת הפעילות האנזימתית ועמה הגידול. בנקודת הקיפאון פוסקת הפעילות המטבולית לא רק בגלל האטת פעילות האנזימים אלא גם בשל חוסר מים במצב נוזלי בתא. כאשר הטמפרטורה עולה מעל הטמפרטורה האופטימלית, הפעילות המטבולית עולה אך באותו זמן עולה גם קצב הדנטורציה של חלבונים ואנזימים ובסופו של דבר מגיעים למוות של התא.

מנגנון הפעולה של תרופות אנטימיקרוביאליות

חומר אנטימיקרוביאל יעיל, צריך להיות בעל רעילות בררנית. כלומר, החומר צריך להרוג את המזיק ולא את המאכסן. לעיתים קרובות הבררנות היא יחסית ולא מוחלטת. כלומר, תרופה במינון שהמארח יכול לשאת תהרוג את המזיק.

רעילות בררנית יכולה להיות תלויה בקולטן (רצפטור) מיוחד הנדרש לקשירת התרופה. קולטן כזה נמצא בקרום התא של הטפיל אך לא של המאכסן. הרעילות הבררנית יכולה להיות תלויה במאורעות ביוכימיים הכרחיים לטפיל אך לא למארח. מנגנוני הפעילות של רוב התרופות האנטימיקרוביאליות אינו לגמרי ברור אך עדיין אפשר לחלקם לקטגוריות הבאות:

1. עיכוב בנייה של דופן תא החיידק.
2. עיכוב פעילות קרום התא.
3. עיכוב בניית חלבונים.
4. עיכוב בנייה של חומצות גרעין.

האוניברסיטה העברית בירושלים
THE HEBREW UNIVERSITY OF JERUSALEM



מרכז המעבדות למדעים ע"ש בלמנטה
The Belmonte Science Laboratories Center





1) **עיכוב בנייה של דופן התא החיידק** (למשל פניצילינים). דופן התא של חיידקים הוא קשיח ומחזיק בתוכו תא בעל לחץ אוסמוטי גבוה. (הלחץ הפנימי בתאים גראם-חיוביים הוא פי 3-5 מאשר בתאי גראם-שליליים). נזק לדופן, למשל לידי האנזים כמו ליזוזים (lysozyme) או עיכוב בבנייתו יביא לפירוק (lysis) של התא. הסינטזה של דופן התא מתווכת באמצעות אנזימים מיוחדים. דופן התא מכיל חומרים מיוחדים (למשל פפטידוגליקן) הנמצאים אך ורק בעולם החיידקים והם התורמים לחוזקו של הדופן. תרופות המעכבות את בניית הדופן, נקשרות בדרך כלל לדופן החיידק דרך קולטנים מיוחדים ואז חוסמות שלבים שונים בבניה של הפפטידוגליקנים. לחיידק יש אנזימים מפרקי דופן. הקישור אליהם, על ידי הפניצילין גורם להפעלתם ולפיצוץ התא. במקרה כזה מדידת בליעה תראה ירידה. תרופות מסוג זה אינן רעילות כלל לתאי יונקים, כנראה בגלל שתאי יונק חסרי דופן וחסרי פפטידוגליקנים. ההבדל ברגישות בין תאי גראם-חיוביים וגראם-שליליים לתרופות מסוג זה, נובע כנראה מהבדלים במבנה הדופן. עמידות לפניצילין יכולה לנבוע, מיצור של אנזים המפרק פניצילין, מחסר, כתוצאה ממוטציה, בקולטנים לפניצילין או בחסר אנזימים מפרקים בדופן החיידקים.

2) **חומרים המעכבים את פעילות קרום התא** (למשל פולימיקסינים). קרום התא משמש כמחסום בררני למחצה שדרכו מתבצע מעבר גזים, יונים וחומרים שונים באמצעות מנגנוני טרנספורט שונים. כך נקבע ההרכב התוך תאי. אם השלמות התפקודית של הקרום נפגעת, מקרומולקולות ויונים בורחים מהתא, תהליך שיביא למותו של האורגניזם. קרום התא של חיידקים ושל פטריות הוא רגיש ביותר.

3) **עיכוב סינתזת חלבונים**: (למשל כלורמפניקול, טטראציקלינים). חומרים אלו יכולים לעכב בניית חלבונים בתאי החיידקים בלבד. המנגנון, איננו בהיר עד תומו. מאחר ויש הבדלים גדולים בין הריבוזומים של החיידקים לבין הריבוזומים של היונקים אפשר להבין מדוע חומרים אלו משפיעים על החיידקים ולא על המאכסן.

4) **עיכוב סינתזת של חומצות גרעין**: (למשל סולפונאמידים). אנטיביוטיקה יכולה לעכב בכל אחד מהשלבים המטבוליים של יצירת חומצות הגרעין. זו הסיבה שיש שוני רב ביעילות בסוגים שונים של חיידקים.

עמידות לתרופות אנטימיקרוביאליות

1. מיקרואורגניזמים יכולים לייצר אנזימים, המשמידים את התרופה. דוגמא - סטפילוקוקים העמידים לפניצילין מייצרים אנזים המפרק אותו. כנ"ל בחיידקים גראם-שליליים שונים.
2. החיידקים משנים את חדירות התרופה לתא. דוגמא - טטראציקלינים מצטברים בחיידקים רגישים אליהם אך לא בחיידקים עמידים.
3. החיידקים מפתחים מטרה מבנית אחרת לתרופה. דוגמא - עמידות לתרופות המונעות בניית חלבונים. אבוד או שינוי חלק בריבוזום שאליו נקשרת התרופה, מונע את השפעתה.
4. מיקרואורגניזמים יכולים לפתח מסלולים מטבוליים עוקפים לתהליך אותו מעכבת התרופה.



מקור העמידות

עמידות לתרופות יכולה לנבוע ממקור גנטי או סביבתי

סביבתי - בדרך כלל נדרשת התרבות של התאים כדי שחומר אנטיביוטי יפעל. לכן, חיידקים שאינם מתרבים יכולים להיות, עמידים באופן פנוטיפי, אך הצאצאים שלהם כן רגישים. למשל, מיקובקטריה שורדים ברקמות למשך שנים רבות אחרי הדבקה. הם מוגבלים על ידי המנגנון החיסוני של הגוף ואינם מתרבים. תרופות אנטיביוטיות לא מחסלות תאים כאלו. במידה וההתנגדות החיסונית של המארח יורדת, החיידקים מתרבים ואז אינם עמידים יותר לאותן תרופות.

גנטי - העמידות לתרופות נובעת בד"כ משינויים גנטיים. א. עמידות כרומוזומלית - יכולה להתפתח כתוצאה ממוטציה ספונטנית באתר המווסת רגישות לתרופה מסוימת. נוכחות התרופה משמשת כמנגנון סלקציה ואז רוב המוטנטים העמידים גדלים. ישנן מוטציות עמידות הקורות בתדירות גבוהה יותר מאשר תדירות מוטציה רגילה. עמידות כרומוזומלית היא בדרך כלל על ידי שינוי במבנה הקולטן לתרופה. ב. חוץ כרומוזומלית - החיידקים מכילים חומר גנטי חוץ כרומוזומלי הנקרא פלסמיד. ישנם פלסמידים רבים הנושאים עמידות לתרופות שונות ולמתכות. בדרך כלל העמידות היא על ידי ייצור אנזימים המפרקים את התרופות. פלסמידים עוברים מתא לתא על ידי:

1. טרנסדוקציה - באמצעות וירוס.

2. טרנספורמציה - דנ"א עירום עובר מתא לתא (כמו בהנדסה גנטית).

3. קוניוגציה - בזמן ההתרבות עובר חומר מתא אחד לשני.

4. טרנס פוזיציה - העברת קטעי דנ"א בין פלסמידים אחד לאחר או לתאים.

כמובן שלעמידות יש השלכות קליניות מרובות.

מדידת פעילות אנטימיקרוביאלית:

1. **שיטת המיהול** - כמויות מדורגות של חומר אנטימיקרוביאלית מוכנסת למצע ואז נזרעים החיידקים. נקודת הסוף

- כמות האנטיביוטיקה הנדרשת להפסיק את הגידול או גורמת למות 50% מהחיידקים. בדרך כלל מבצעים בדיקה זו במצע נוזלי.

2. **שיטת הדיפוזיה** - דסקית נייר סינון, המכילה כמות ידועה של תרופה מונחת על מצע מוצק לאחר שנזרע בצפיפות. אחרי אינקובציה מודדים את קוטר האזור הנקי מחיידקים. אזור זה נהווה מדד לפעילות אנטיביוטיקה של התרופה.