

שיטות עבודה במעבדה לביולוגיה

משרד החינוך
מינהל חדשנות וטכנולוגיה
הפיקוח על הוראת הביולוגיה
הפיקוח על הוראת מדע וטכנולוגיה



המרכז לפיתוח ותמיכה
במעבדות הביולוגיה
בבתי הספר

הפקולטה
לחינוך
אוניברסיטת בר-אילן





**Female undergraduates at work in the laboratory
at Girton College, Cambridge University, 1900**

על סדר היום

- בטיחות כללית
- מבוא למיקרוביולוגיה
- בטיחות במעבדה למיקרוביולוגיה
- תרגול בהכנת צלחות פטרי עם קרקע מזון מוצק
- תרגול זריעת מרבד והשפעת סוגים שונים של אנטיביוטיקה על חיידקים
- מיקרוסקופיה והכנת תכשירים שונים
- הכרת שיטה חדשה לבדיקת פעילות פרוטאזות

המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה בבתי הספר

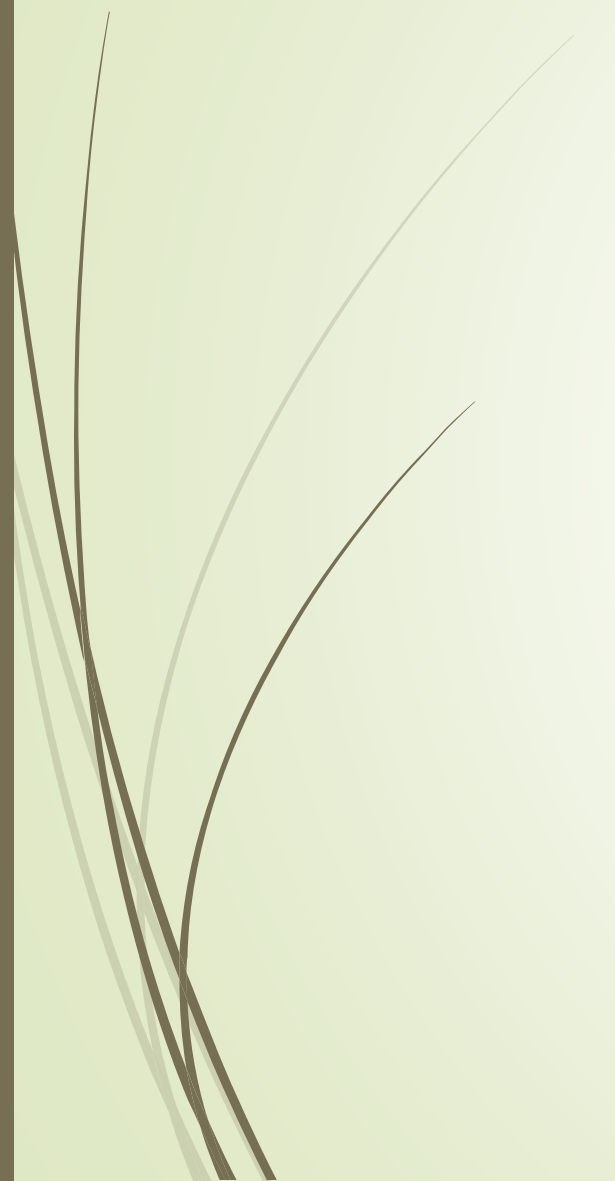
[קישור לאתר](#) ➡





בטיחות כללית

■ סופס מבדק ניהול בטיחות מעבדות

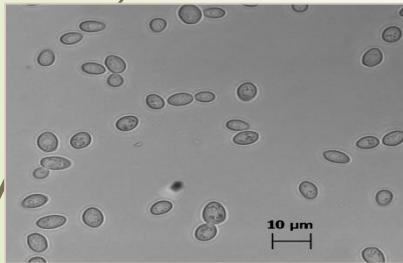


מיקרוביולוגיה

תחום בביולוגיה, העוסק במבנה ובתפקוד של מיקרואורגניזמים חד תאיים

פטריות

אאוקריוטיים



X100 שמרים הגדלה

אצות חד-תאיות

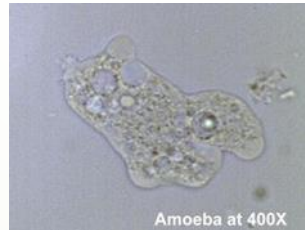
אאוקריוטיים



X400 כלורלה הגדלה

פרוטחואה – בעלי חיים

אאוקריוטיים – בעלי מבנה תאי ובעלי גרעין



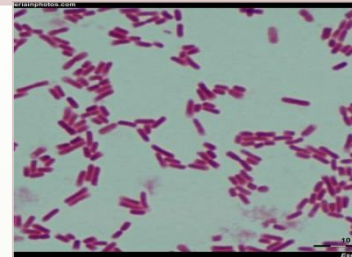
X400 אמבה הגדלה



X400 סנדלית הגדלה

חיידקים (בקטריות)

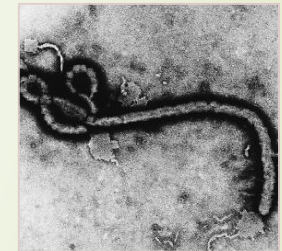
פרוקריוטיים – בעלי מבנה תאי, חסרי גרעין



E. coli חיידקי X1000 הגדלה

נגיפים (וירוסים)

חסרי מבנה תאי



נגיף אבולה X60000 הגדלה

תפוצת החיידקים



חיידקים נפוצים ב:

- אדמה, אוויר, מים
- צמחים, בעלי חיים
- מוצרי מזון
- בני אדם – בתוך הגוף ועל העור

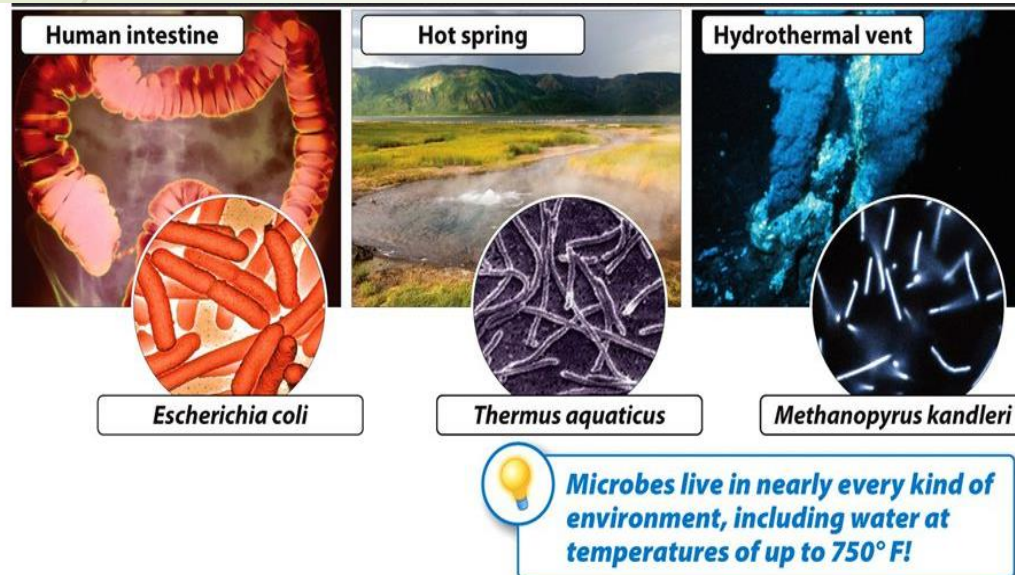


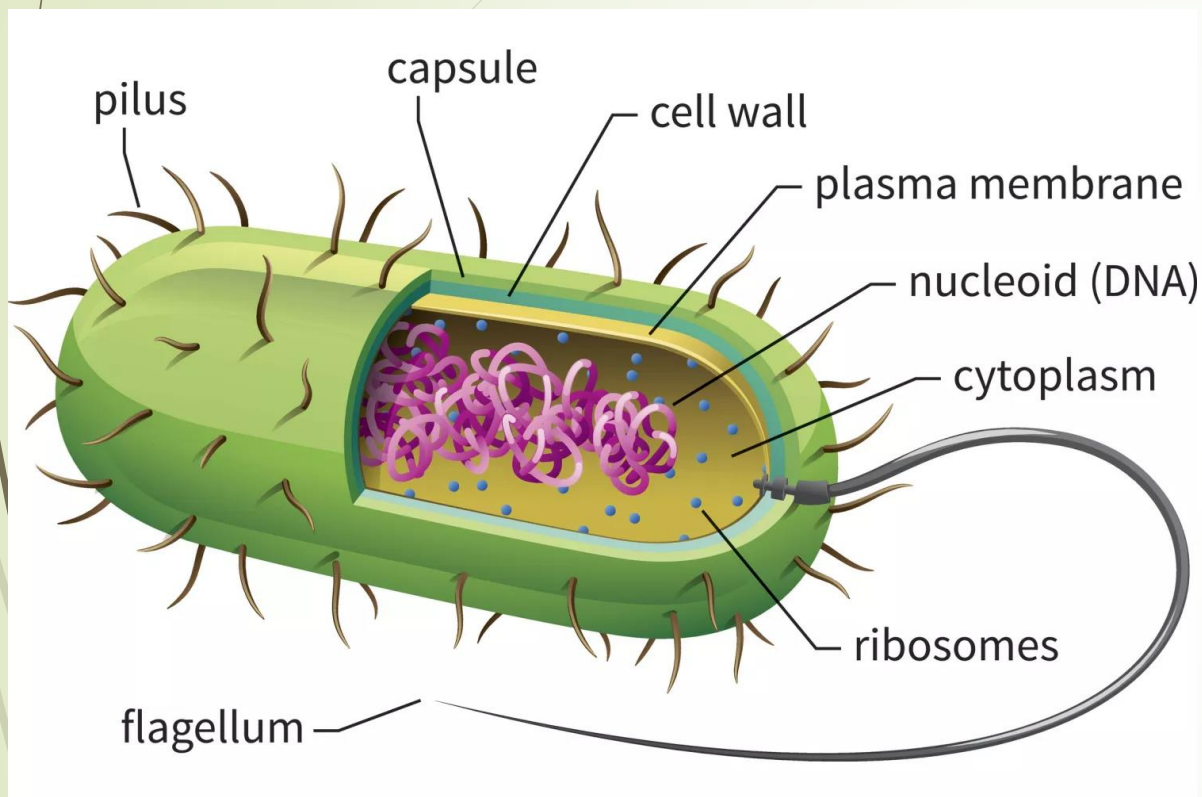
Figure 13-2
What Is Life? A Guide To Biology
© 2010 W. H. Freeman and Company

חשיבות של מינים שונים של חיידקים

- בקרקע

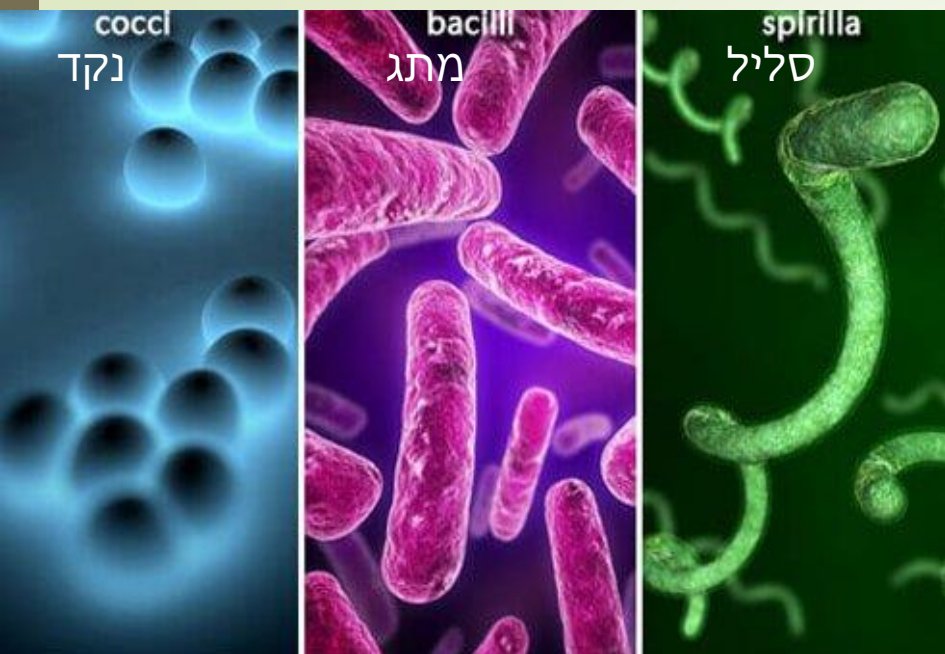
- מפרקים תרכובות אורגניות לאנאורגניות כך מתאפשר מחזור חומרים
- קושרים חנקן אטמוספרי (N_2) ומייצרים תרכובות חנקן זמינות עבור צמחים
- מקיימים יחסי הדדיות עם אורגניזמים שונים, כגון:
 - בעלי חיים מעלי גירה (מעי)
 - בני אדם (מערכת העיכול, עור)
- מעורבים בתהליכים המביאים תועלת לאדם:
 - בתעשיית המזון (תעשיית חלב והחמצת ירקות)
 - יישומים אקולוגיים - פירוק נפט, פירוק שפכים, הדברה ביולוגית
 - ייצור חומרים שונים על ידי חיידקים מהונדסים גנטית (כגון אינסולין)
- גורמי מחלות (פתוגניים)
- מהווים מודל לתאים במחקר ביולוגי בסיסי

מבנה תא חיידק



<https://www.thoughtco.com/prokaryotes-meaning-373369>

- אורך תא חיידק בין 2-5 מיקרון
- אי אפשר להבחין בחיידק בודד במיקרוסקופ אור
- כדי לראות חיידק במיקרוסקופ אור יש לצבוע אותו
- במיקרוסקופ אור אי אפשר להבחין במבנה התא



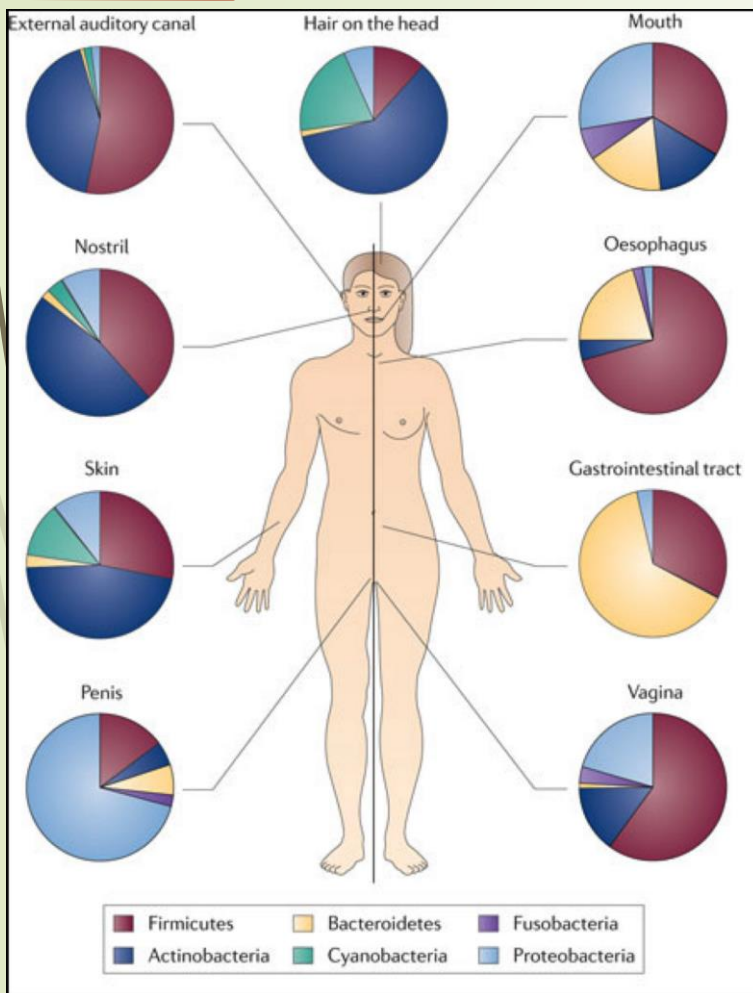
צורות החיידקים

החיידקים נחלקים ל-3 קבוצות של צורות: נקד, מתג, סליל

דוגמאות לחיידקים נפוצים:

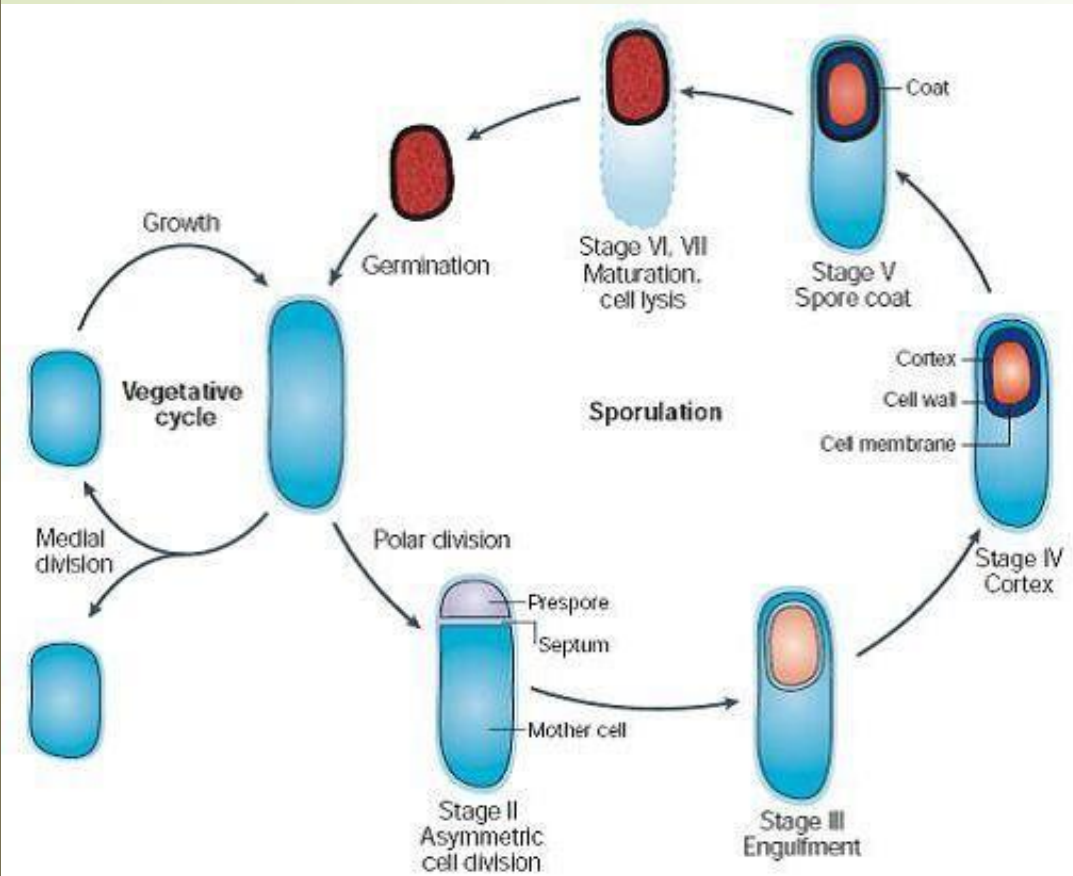
- סטפילוקוקוס – (סטפילו=אשכול)
נקד שתאיו אינם נפרדים אחרי החלוקה ויוצרים מבנה דמוי אשכול
- סטרפטוקוקוס (סטרפטו = מעוקל)
נקד שתאיו אינם נפרדים לאחר החלוקה ויוצרים שרשרות מעוקלות
- לקטובצילוס – מתג שמייצר ח. לקטית

חיידקים בגוף האדם



- בגוף האדם יש כ- 10^{13} תאים בעבר, העריכו שמספר תאי החיידקים החיים בו הוא פי 10 ממספר התאים (10^{14}) ומשקלם כ 1 ק"ג
- **חוקרים במכון וייצמן** (2016) חישבו שמספר החיידקים בגוף האדם רק כ 10^{13} ומשקלם כ - 0.2 ק"ג
- בגוף האדם יש למעלה מאלף מינים של חיידקים - יש הבדל בהרכב אוכלוסיות החיידקים ובמספרם באיברים השונים
- חוקרים בודקים מהי ההשפעה של חיידקים אלה על תהליכים שונים בגוף האדם כגון, השמנה, סוכרת, ופעילות מערכת החיסון

יצירת נבגים (אנדוספורות)



<https://www.quora.com/Is-there-bacteria-able-to-revive-dead-cells>

- במינים מסוימים של חיידקים (טטנוס, בוטוליזם ודבר), כאשר תנאי הסביבה נעשים בלתי נוחים להתרבות, בחיידק נוצרת מעטפת קשה, התא מאבד מים, נכנס למצב של תרדמה והופך לנבג.
 - במצב של נבג, פעילות חילוף החומרים כמעט אינה קיימת/נמוכה מאד. במצב כזה יכול החיידק לשרוד שנים רבות.
 - הנבגים עמידים לטמפרטורות גבוהות, לתנאי יובש קיצוניים, לקרינה ולחומרי חיטוי.
 - כאשר תנאי הסביבה חוזרים להיות נוחים להתפתחות החיידק, הנבג "נובט" ומתחיל להתרבות.
- (חיידקים ונגיפים בגוף האדם/ד"ר אורה כהנא)

הנחיות לשמירה על בטיחות במעבדה לביולוגיה

באתר המפמ"ר לביולוגיה, מדור תוכנית לימודים מעשית



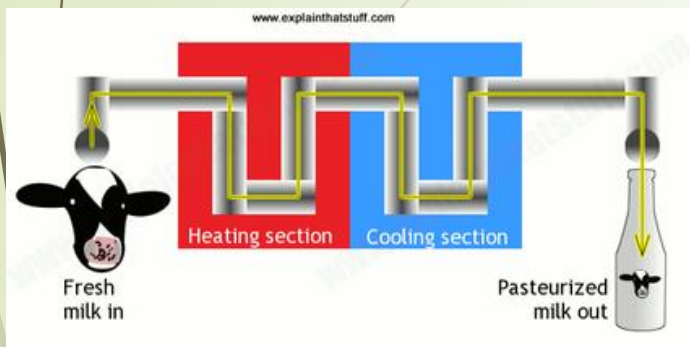
חיטוי - DISINFECTION



- חיטוי ברמה **נמוכה** באמצעות רחיצה במים וסבון:
 - אינו הורג את החיידקים
 - מוריד את מספר החיידקים וכך חומרי חיטוי אחרים יוכלו להשפיע ביעילות
- חיטוי ברמה **בינונית**, במעבדת ביה"ס, מתבצע באמצעות:
 - אלכוהול 70% (**ולא** 90% – 100%) או אקונומיקה (מהולה במים 1:10)
 - משמיד את רוב המיקרואורגניזמים הפתוגניים
 - לא יעיל כנגד: נבגים, חלק מהנגיפים



פסטור



- התהליך קרוי על שם פסטר ביצע את ההליך לראשונה עם קלוד ברנרד, בשנת 1862
- חימום ל 65°C למשך 30 דקות, יעיל להרס של רוב המיקרואורגניזמים ומינימום פגיעה באיכות המזון
- בתעשיית המזון קיימים היום תהליכי פסטור שונים:
Ultra High Temperature -UHT חימום ל- 140°C - למשך 2 שניות וקירור מידי
- TST pasteurization, חימום ל 73°C ל-16 שניות. קירור מידי ל 2°C
- איכות המזון נשמרת עם פגיעה יחסית מורחבת במיקרואורגניזמים
- במזון מפוסטר לאחר זמן, גם בתנאי קירור, חיידקים יכולים להתרבות

עיקור STERILIZATION

עיקור בתנור

העיקרון:
חום יבש

בטמפרטורה גבוהה יותר
מאשר באוטוקלב
(160°C - 170°C), במשך 90
דקות

חיידקים ונבגים רגישים
פחות לחום יבש ולכן
נדרשת טמפ' גבוהה יותר
זמן ממושך יותר

המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות ביולוגיה בבתי הספר, בר אילן

עיקור באוטוקלב

העיקרון:
חום רטוב

באוויר רווי באדי מים,
בלחץ 2 אטמ',
ב- 121°C במשך 20 דקות

הרס חיידקים חיים ונבגים
של החיידקים העמידים
ביותר



כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים



- בעבודה עם מיקרואורגניזמים יש לעבוד עם חלוק וכפפות לשימוש חד פעמי

- אם תלמיד היה חולה לאחרונה במשך תקופה ממושכת, או אם יש לאדם אחר

מבני ביתו בעיה במערכת החיסון, יש לדרוש שהתלמיד יתייעץ עם רופא

ויקבל אישור לעבוד עם מיקרואורגניזמים

- לביצוע ניסויים הבודקים התרבות של מיקרואורגניזמים יש להשתמש

במיקרואורגניזמים המסופקים על ידי מקור מהימן, המרכז לפיתוח ותמיכה

במעבדות בתי הספר, אוניברסיטת בר אילן

כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים

- אין לבודד ולגדל מיקרואורגניזמים מגוף האדם, מפסולת, מקרקע או מכל מקור אחר שעלול להכיל חיידקים פתוגניים
- אסור לגעת בתרבית החיידקים בפה, באצבעות, בכלי כתיבה וכדומה
- אסור לפתוח צלחות בהן גדלו מיקרואורגניזמים. יש להתבונן בתוצאות כשהצלחות

סגורות



כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים

לפני תחילת ביצוע הניסוי



- חטאו את משטח העבודה. השתמשו באתנול 70% (לא באתנול 100%)

- יש להניח על שולחן העבודה שני פחי איסוף:

א. פח לאיסוף חומר ביולוגי, כגון: מצעי גידול, תמיסות, וכדומה

ב. פח לאיסוף כלים שבאו במגע עם תרבית החיידקים

- **החומר הביולוגי והכלים יעברו עיקור בסיום העבודה**



כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים

טיפול בכלים שבאו במגע עם מיקרואורגניזמים, יבוצע על פי ההנחיות הבאות:

אפשרות א' - **עיקור על ידי אקונומיקה** או אפשרות ב' - **עיקור באוטוקלאב.**

עיקור על ידי אקונומיקה:

- יש להכין שני כלים (רצוי דלי) המכילים אקונומיקה מהולה במים 1:10

כלי אחד לפסולת וכלי אחד לשימוש חוזר.

- להשרות למשך הלילה.

למחרת ניתן לשפוך את הנוזלים להשליך את הפסולת המוצקה לפח רגיל ואת

הכלים לשטוף במים.

כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים

עיקור באוטוקלאב

1. שימוש בשקיות "פסולת בקטריולוגית להשמדה" (Bio-Hazard material)

- יש להכין את השקיות על פי הוראות היצרן ולהכניסן לאוטוקלב

- השקית על תכולתה מושלכת לפח לאחר העיקור.

2. כלים לשימוש חוזר - לאחר עיקור ושטיפה במים.

יש להפעיל את האוטוקלב בהתאם להנחיות בטיפול בפסולת ביולוגית:

חימום באוטוקלב בטמפ' של 130 מעלות צלזיוס במשך 30 דקות ובלחץ 2.5 בר

משך הטיפול כולו, כולל הזמן עד ליצירת תנאי הטמפרטורה והלחץ המתאימים

נמשך 60 דקות.



כללי בטיחות בעבודה במעבדה עם מיקרואורגניזמים

בגמר העבודה חובה:

- לנקות את משטחי העבודה באתנול 70%
- להסיר כפפות ולרחוץ היטב את הידיים במים ובסבון
- או לחטא אותן בחומר חיטוי, לדוגמה ג'ל אלכוהול



מצעי גידול - קרקע מזון נוזלי



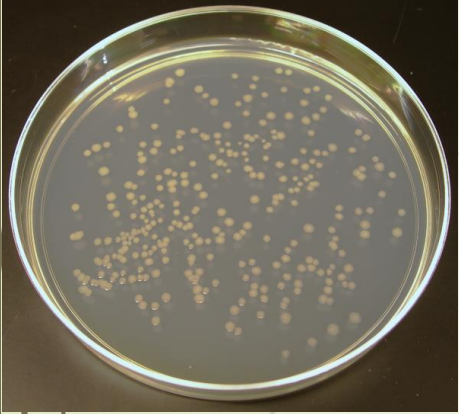
- המצע מכיל מים ותרבות אורגניות (פחמימות, חלבונים), ויטמינים ומינרלים. התמיסה המעוקרת צלולה

- החיידקים מתרבים אך אינם נשארים צמודים זה לזה, ומתפזרים בתמיסה. התמיסה נעשית עכורה

- בדיקת עכירות המצע היא דרך מדידה למספר החיידקים במצע, שינוי בעכירות מאפשר למדוד את קצב התרבות החיידקים



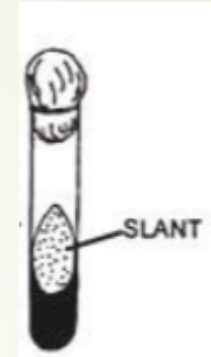
מצעי גידול - קרקע מזון מוצק



- המצע מכיל חומרי מזון כמו אלה שבקרקע מזון נוזלי, בתוספת אגר
- אגר מופק מאצות והוא תערובת של שני רב-סוכרים
- אגר ניתך רק ב 85°C
- יתרון האגר לגידול חיידקים - מעט מאוד חיידקים מפרקים אותו
- אי אפשר להבחין בחיידקים בודדים שנמצאים על קרקע המזון
- חיידק שגדל על קרקע המזון מתחלק מספר רב של פעמים ויוצר מושבה
- כל הפרטים במושבה זהים.
- ניתן לזהות את מין החיידק על פי צבע המושבות, צורתן והמרקם שלהן וכן על פי הריח
- קרקעות מזון בעלות הרכב שונה משמשות לבידוד חיידקים שונים וזיהויים

שמירת חיידקים לאורך זמן

מבחנה עם חיידקים מבר אילן
(ניתן לשמור עד שבועיים במקרר)



שימור החיידקים

העברה לקרקע מזון נוזלי
(ניתן לשמור עד שבוע במקרר)



זריעה על קרקע מזון מוצק
(ניתן לשמור עד 6 שבועות במקרר)



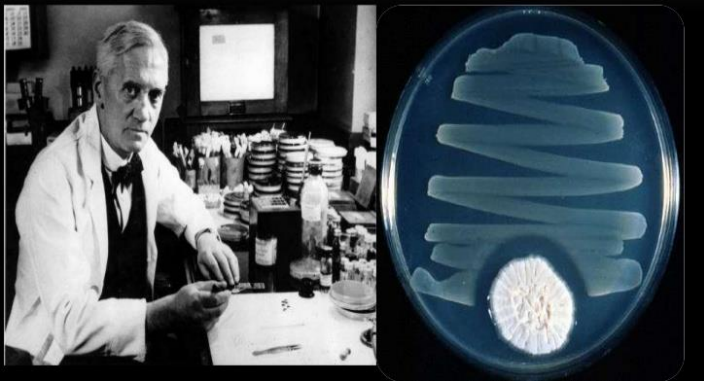
שימוש בחיידקים

העברה לקרקע מזון נוזלי או מוצק

עבודה במעבדה

■ ביצוע תרגיל 1 - יציקת צלחות

■ קישור לסרטון בנושא עבודה במעבדה למיקרוביולוגיה



אנטיביוטיקה

- אנטיביוטיקה - קבוצת חומרים הגורמים למותם או להפסקת גדילתם של חיידקים.
- בעבר התייחס המונח לחומרים טבעיים בלבד שהופקו ממיקרואורגניזמים, כיום קיימות גם אנטיביוטיקות סינתטיות
- פלמינג גילה את הפניצילין ב 1929, פלורי וחן הוכיחו את יעילותו, שלושתם קיבלו פרס נובל ב 1945
- לכל חומר אנטיביוטי מנגנון פעולה ייחודי, הפעיל נגד חיידקים מסוימים ואינו פעיל נגד חיידקים אחרים.
- האנטיביוטיקה פוגעת רק בתאי החיידקים, ולא בתאים של המאכסן
- אינה פוגעת בנגיפים
- פרופ' עדה יונת ממכון ויצמן, כלת פרס נובל ב 2009 – פענחה את מבנה הריבוזום ובכך תרמה להבנת מנגנון הפעולה של חמש תרופות אנטיביוטיות



דיסקיות אנטיביוטיקה מוכנות לשימוש

(ניתן להזמין דרך המרכז לפיתוח ותמיכה במעבדות הביולוגיה בבתי הספר)

פניצילין
ומוקסיפן

סולפה

טטרציקלין

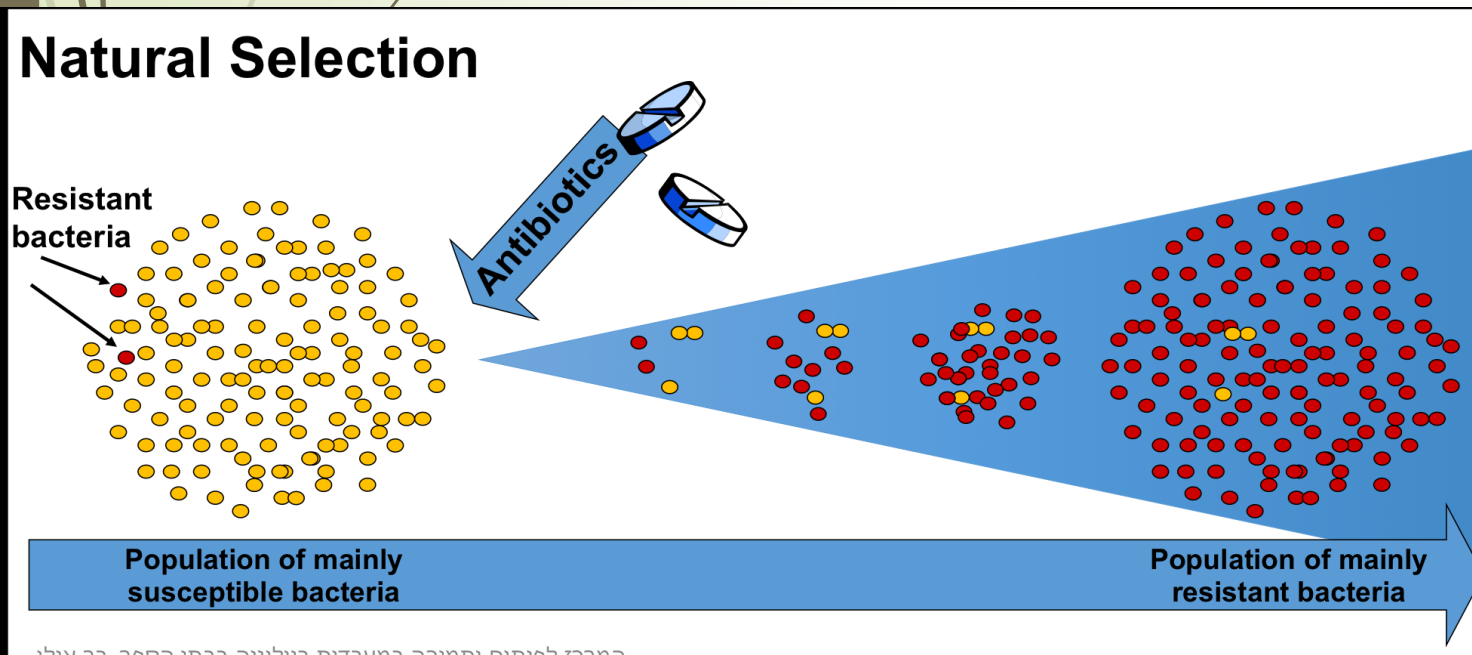
פגיעה ביצירת דופן
החידק

פגיעה ביצור
חומצה פולית

פגיעה
בריבזום

אנטיביוטיקה

- בחיידקים שונים חלות מוטציות שחלקן מקנות להם עמידות בפני אנטיביוטיקה
- עמידות לאנטיביוטיקה - יכולת של מיקרואורגניזם לשרוד ולהתרבות בנוכחות חומר אנטיביוטי, שבאופן רגיל מעכב את התרבותו או הורג אותו
- השימוש הנרחב באנטיביוטיקה מקנה יתרון לחיידקים עמידים ומאפשר התרבותם



(חיידקים ונגיפים בגוף האדם/ד"ר אורה כהנא)

https://www.reactgroup.org/wp-content/uploads/2016/09/natural-selection_140211.png

אנטיביוטיקה

- "העברה אופקית" – תהליכים שבהם חומר תורשתי מחיידקים עמידים עובר לחיידקים ממינים אחרים

- ארגון הבריאות העולמי הכריז שהעמידות לאנטיביוטיקה היא כיום אחד מהאיומים המשמעותיים ביותר על בריאות הציבור בעולם



החיידקים רגישים ל 7
סוגים של אנטיביוטיקה

החיידקים עמידים ל 4
סוגים של
אנטיביוטיקה

זיהוי השפעה מעכבת של חומר על גידול החיידקים במצע מוצק

קיימות שתי דרכים לבדוק השפעה של חומרים על גידול החיידקים:

1. הנחה של דיסקיות עם החומר הנבדק בצלחת פטרי
2. יצירת באריות בעזרת חולץ פקקים והכנסה של החומר הנבדק לתוך הבארית



זיהוי השפעה מעכבת של חומר על גידול החיידקים במצע מוצק

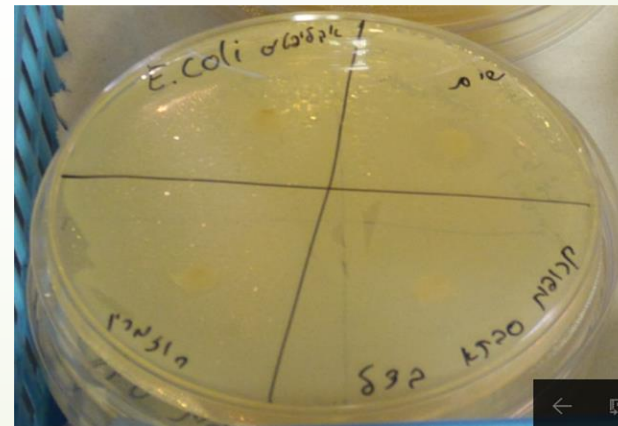
עקרון הפעולה:

- עיכוב בגידול החיידקים, יוצר מסביב לדסקית
הילה צלולה, ללא חיידקים - **אזור העיכוב**
- קוטר אזור העיכוב מעיד על מידת השפעת
החומר המעכב
- ניתן להשוות השפעת חומרים שונים / ריכוזים
שונים של אותו חומר על עיכוב בגידול
החיידקים



הכנה עצמית של דסקיות מנייר סינון

- עיקור הדיסקיות יחד עם כל הכלים שבשימוש
- השריית דיסקית אנטיביוטיקה ב 1 מ"ל מים מזוקקים למשך שעה
- הכנת תמיסות בריכוזים שונים
- טבילת דיסקיות בתמיסות בעלות ריכוזי אנטיביוטיקה שונים
- הנחת דסקיות על זריעת מרבד חיידקים



מהלך עבודה מפורט – [מסמך באתר המרכז](#)

עבודה במעבדה

- ביצוע תרגיל 2 - זריעת מרבד והשפעת אנטיביוטיקה
- דיון במגבלות תרגיל 2 – השפעת אנטיביוטיקה

ניסויים במיקרוביולוגיה בביוחקר

נושאים אפשריים:

- השפעת ריכוזים שונים של אנטיביוטיקה על גידול חיידקים
- השפעת אנטיביוטיקה (ריכוז זהה) על חיידקים שונים
- השפעת ריכוזים שונים של חומרים מהטבע (כגון מיצוי שום) על גידול חיידקים
- השפעת ריכוזים שונים של מלח על גידול חיידקים

דוגמאות לתרופות סבתא:

שום ובצל - אליצין שבשום, שהוא תרכובת גופרית, הגורמת לשני חלבונים החיוניים לתהליכי החיים של חיידקים להיות לא פעילים - ובכך מוביל למותם של חיידקים.

דבש-ריכוז הסוכר הגבוה (היפרטוני) מעכב גידול חיידקים וחומציות הדבש, אף היא תורמת לכך. פרט לכך, יש בדבש כמות לא מבוטלת של מי חמצן שגם הם קוטלים חיידקים.

מיץ לימון - מיץ לימון טרי הוא חומצי וה- pH שלו שווה בערך ל-2

אורגנו- מהצמח ניתן להפיק שמן שלשני מרכיביו העיקריים, הקרבקורל (carvacorl) והתימול (thymol) פעילות אנטי-חיידקית ואנטי-פטרייתית חזקה. הפעילות נובעת מהרס המעטפת, הגורמת להתפוצצות החיידקים.

מרווה רפואית - המכיל חומרים רבים, וביניהם ספונינים (saponins), שלהם פעילות אנטי-חיידקית.

קינמון - התבלין מופק מקליפת העץ. מכיל אאוגנול, שלו פעילות אנטי-חיידקית ואנטי-פטרייתית.

ציפורן - שמן הציפורן מכיל את החומר אאוגנול (Eugenol), שהוא בעל פעילות אנטי-חיידקית ואנטי-פטרייתית. אאוגנול פוגע במעטפת של החיידקים וגורם לפיצוצם.

מגבלות ניסויים במיקרוביולוגיה בביוחקר

- מגבלות כלליות לניסויים במיקרוביולוגיה:
 - הקפדה על הוראות הבטיחות בעבודה עם תלמידים
 - אין להשתמש באנטיביוטיקה מהבית

- מגבלות הקשורות לנושא:
דוגמאות:

- השפעת מיצוי מצמחים על חיידקים:
לא תמיד יודעים מהו החומר הפעיל
- אם משתמשים במיצוי אורגני נדרשות בקורות מתאימות עם החומר הממצה
- השפעת ריכוזים של דבש על חיידקים:
האם בריכוזים של דבש ריכוז הסוכר הוא המשפיע או חומרים
אנטיבקטריאליים בדבש (או שניהם)