

פתרון מוצע לבחינה במיקרוביולוגיה

מועד א תשע"ז, חודש יולי שנה 2017

מחבר: דר" מיה קדמי, המכללה להנדסאים אורט בראודה כרמיאל

שאלה מספר 1

1.1 לחישוב קצב הגידול יש לבחור 2 נקודות מהשלב הלוגריתמי:

$$t_1=80 \text{ min}, N_1=0.04, t_2=120 \text{ min}, N_2=0.102$$

$$\log(N_2/N_1)=K*(t_2-t_1)/2.303$$

$$K=\log(N_2/N_1)*2.303/(t_2-t_1)=\log(0.102/0.04)*2.303/(120-80)=0.023 \text{ 1/min}$$

1.2 תפקיד מרכיבי המצע:

- מים – המים מהווים את המרכיב העיקרי בתא ודרושים לפעילות מטבולית
- גלוקוז – מקור פחמן ואנרגיה
- $(\text{NH}_4)\text{Cl}$ – מקור חנקן ומימן
- KH_2PO_4 – מקור אשלגן, מימן, זרחן ובופר
- K_2HPO_4 – מקור אשלגן, מימן, זרחן ובופר
- MgSO_4 – מקור מגנזיום וגופרית

1.3 שתי דרכים להעלאת קצב הגידול של החיידק:

- העשרת מצע המזון בגורמי גידול כגון ויטמינים וחומצות אמינו
- אופטימיזציה של תנאי הגידול (טמפ', pH, זמינות חמצן)

1.4 מבחן ביולוגי כמותי לקביעת ריכוז הוויטמין במצע הגידול:

יש להשתמש בחיידקים שלא יודעים לייצר ויטמין B_{12} בעצמם וזקוקים לאספקתו מבחוץ. תחילה נכין עקומת כיול על ידי שימוש בכלים שבכל אחד מהם נכניס מצע מזון מוגדר שלא מכיל את הוויטמין ונוסיף לכל כלי ריכוז אחר וידוע של הוויטמין. נכין גם ביקורת ללא הוויטמין. נזרע את החיידקים לכל אחד מהכלים ונגדל לפרק זמן קבוע. לאחר מכן נקבע את ריכוז החיידקים על ידי אחת השיטות למשל צפיפות אופטית. כעת ניקח כמות מדודה של מצע המזון, נוסיף לו את אותו מצע מזון מוגדר, ונגדל בו את אותם החיידקים באותם תנאים בדיוק בהם השתמשנו בהכנת עקומת הכיול (אותו ריכוז חיידקים התחלתי, אותה טמפרטורה, אותו פרק זמן מדידה וכו'). לאחר מכן נקבע את הריכוז אליו הגיעו החיידקים בכלי זה ובאמצעות עקומת הכיול שהכנו, נמצא את ריכוז הוויטמין.

שאלה מספר 2

2.1 על מנת להוכיח כי המיקרואורגניזם (מק"א) שבודד מקלחי התיירס גרם לתופעה הנצפית יש להשתמש בעקרונות קור:

- א. יש לוודא שהמיקרואורגניזם החשוד נמצא רק בקלחי תירס פגומים
- ב. יש לבדוד את המק"א החשוד ולגדל בתרבית טהורה
- ג. יש להדביק צמחי תירס תקינים במק"א החשוד המבודד ולבדוק הופעת אותם סימנים כלומר גרעינים קטנים מהרגיל בצבע חום שחור
- ד. יש לבדוד את המק"א מצמחי התיירס המודבקים, לגדל בתרבית טהורה ולהשוות למק"א שבודד בשלב ב.

2.2 שתי שיטות לבדוק האם המק"א הוא חיידק או פטרייה:

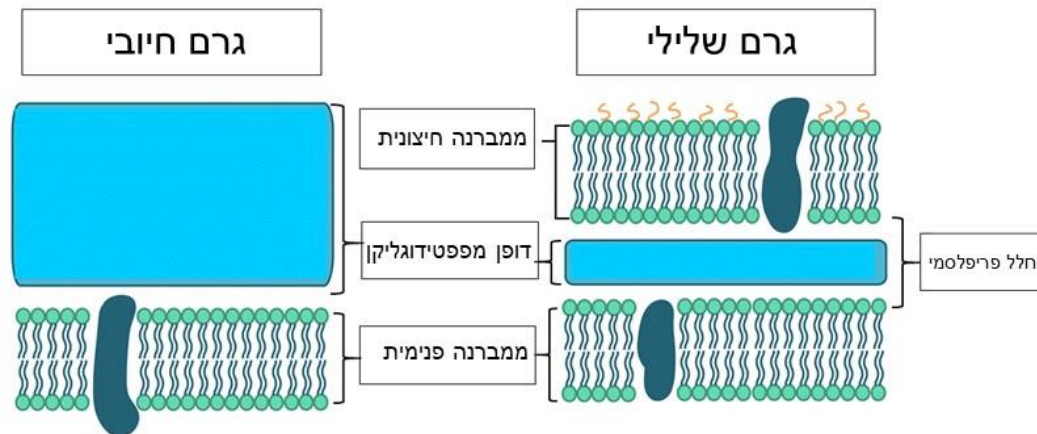
- בעזרת מיקרוסקופ אור ניתן לקבוע את גודל התא – חיידקים הם קטנים בקוטר ממוצע 0.5-2 מיקרון בעוד שפטריית גדולות יותר וקוטרן גדול מ-10 מיקרון.
- בעזרת מיקרוסקופ אלקטרוני ניתן לבדוק נוכחות גרעין עטוף קרום. חיידקים הם פרוקריוטים ולכן הם חסרי גרעין, הכרומוזום נמצא חופשי בציטופלסמה. פטריות הן אאוקריוטיות ולכן החומר התורשתי נמצא בתוך גרעין עטוף קרום.

2.3 על מנת לקבוע אם החיידק הוא גרם חיובי או גרם שלילי יש לבצע צביעת גרם. שלבי הצביעה:

- א. צביעה בקריסטל ויולט או גנצ'אן ויולט
- ב. הוספת לוגול
- ג. שטיפה בממס אורגני אתנול / אצטון
- ד. צביעה בספרנין או פוקסין

בתום הצביעה חיידקים גרם חיוביים בצבע סגול-כחול וגרם שליליים בצבע אדום-ורוד. עקרון הצביעה מבוסס על הבדלים בדופן החיידקים: לגרם חיוביים דופן עבה שעוברת דה-הידרציה בשלב השטיפה בממס האורגני ובעקבות זאת היא מתכווצת וקומפלקס הצבע נלכד בפנים. לכן הם נותרים סגולים. לגרם שליליים דופן דקה ומעטפת עשירה בליפידים והממס עושה בה חורים כך שקומפלקס הצבע יוצא החוצה והתאים הופכים שקופים. הם נצבעים מחדש באדום.

2.4 תיאור סכמתי של מעטפת גרם שלילי וגרם חיובי:



שאלה מספר 3

3.1

א. תנאי העיקור המקובלים לאוטוקלב הם טמפ' 121.6°C , למשך 20 דקות בלחץ 2 אטמוספירות.

ב. שתי שיטות נוספות לעיקור מצעי גידול המכילים אנדוספורות:

- טינדיליזציה – הרתחה (100°C) של המצע למשך 30 דקות, פעם ביום, במשך 3 ימים
- סינון תת מיקרוני – סינון המצע דרך פילטר בעל קוטר חורים מספיק קטן המונע מעבר הספורות לתסנין

3.2 יש לחשב את אחוז הספורות שנקטל כל דקה:

זמן (דקות)	מספר נבגים שורדים למ"ל	% הנבגים שנקטל
0	300	
1	168	44
2	94	69
3	52	83
4	30	90

החישוב בכל דקה מבוצע לפי מספר הנבגים ההתחלתי (300) פחות מספר הנבגים בזמן הנבדק, לחלק למספר הנבגים ההתחלתי וכפול 100 למעבר לאחוזים
 דוגמת חישוב לדקה 1:

$$44\% = 100 * (300 - 168) / 300$$

3.3 ארבעה גורמים בהרכב הספורה האחראיים ליציבות לחום ותנאי סביבה קיצוניים:

- יצירת מלח סידן של חומצה דיפיקולינית
- סינתזה של חלבוני SAP's
- דה – הידרציה
- שכבות מעטפת קשיחות כמו קורטקס, מעטפת הנבג

3.4 תאים וגטטיביים הופכים לנבגים עקב הרעה בתנאי סביבה שנובעת מירידה ברמת

נוטריינטים כמו מקור פחמן, חנקן וזרחן.

הנביטה תתרחש כאשר נוצרים שוב תנאים שמאפשרים את הגידול (למשל מצע עשיר) ולרוב דרוש הלים כלשהו (כגון הלים חום) לאקטיבציה של הנביטה.

שאלה מספר 4

4.1 זן A הוא Hfr כלומר מכיל את חלקיק F ולכן זן A יכול להעביר בקוניוגציה תכונות לחיידק מזן B.

4.2 מיפוי הגנים על גבי הכרומוזום:

<oriT ----- (10 Mal) ----- (25 His) ----- (30 Thr) -----

4.3 בניסוי קוניוגציה הזן Hfr התורם (זן A) רגיש לאנטיביוטיקה בעוד שזן F- המקבל (זן B) עמיד לאותה אנטיביוטיקה. הסיבה לכך היא שאנו רוצים לבודד רקומביננטים של הזן המקבל שקלטו גנים שונים מהחיידק התורם ולהשמיד את הזן התורם על מנת שלא יגדל במצעים.

4.4 שני תהליכים נוספים להעברת גנים בין חיידקים:

טרנספורמציה – מעבר גנים מתורם למקבל ללא מגע ישיר ביניהם
 טרנסדוקציה – מעבר גנים מתורם למקבל באמצעות בקטריופאג'

שאלה מספר 5

5.1 תרבית A מכילה תאי חיידקים, תרבית B מכילה תאים אנימליים.

5.2

סוג התרבית	רדיואקטיביות ^{32}P בנוזל עליון	רדיואקטיביות ^{32}P במשקע	רדיואקטיביות ^{35}S בנוזל עליון	רדיואקטיביות ^{35}S במשקע
תרבית A	-	+	+	-
תרבית B	-	+	-	+

נגיפים התוקפים חיידקים מחדירים את הגנום שלהם בלבד לתא (לכן רדיואקטיביות ^{32}P במשקע) בעוד שהקופסית החלבנית נשארת מחוץ לתא (לכן רדיואקטיביות ^{35}S בנוזל העליון). לעומת זאת נגיפים התוקפים תאים אנימליים נכנסים עם הנוקלאוקפסיד (גנום ביחד עם הקופסית החלבנית) לתוך הציטופלסמה (לכן הרדיואקטיביות ^{35}S ו- ^{32}P תתקבל במשקע).

5.3

סוג התרבית	רדיואקטיביות בציטופלסמה	רדיואקטיביות בכרומוזום
תרבית A	-	+
תרבית B	+	-

נגיף A מחדיר את ה- DNA שלו לתא המאכסן וה- DNA שלו משתלב בכרומוזום החיידק (במצב מתון) ואילו נגיף HIV הוא רטרווירוס בעל גנום RNA. הוא מחדיר את ה- RNA שלו לציטופלסמה של התא המאכסן ומתעתק הפוך עם רברס טרנסקריפטאז את ה- RNA ל- DNA נגיפי שחודר לגרעין ומשתלב בכרומוזום התאי. ה- DNA שנוצר בציטופלסמה הוא לא רדיואקטיבי.

שאלה מספר 6

6.1 שיטה למדידת פעילות אנטיביוטיקה: ניתן להשתמש בשיטת המיהול במבחנה לקביעת MIC. בשיטה זו מכינים סדרה של מבחנות המכילות מצע גידול המתאים לחיידקים ועושים סדרה של מיהולים של החומר האנטיביוטי הנבדק לתוך מבחנות אלה, כך שריכוז החומר ילך וירד ממבחנה אחת לשנייה. ביקורת ללא החומר. לכל מבחנה מוסיפים מזרע זהה של חיידקים רגישים ומדגירים לפרק הזמן ובטמפרטורה הדרושים לגידול החיידקים. לאחר הדגרה קובעים היכן התרחש גידול והיכן לא ע"פ הופעת עכירות או העדרה מהמבחנות השונות. מסמנים + (יש גידול) או – (אין גידול). הריכוז המינימלי המעכב (MIC) הוא המבחנה הראשונה בה לא אובחן גידול של החיידקים כלומר הריכוז הנמוך ביותר של החומר הנבדק בו המבחנה נשארה צלולה.

6.2 כלורמפניקול הוא חומר אנטיביוטי שמעכב סינתזת חלבונים ע"י קשירה לתת היחידה 50S של הריבזום. כתוצאה מכך מעוכב האנזים פפטידיל טרנספראז שאחראי על יצירת הקשר הפפטידי בין חומצות האמינו דבר שעוצר את התארכות שרשרת החלבון.

6.3 כלורמפניקול הוא אנטיביוטיקה בקטריוסטטית כלומר חומר שמעכב בלבד את התרבות החיידקים ולא קוטל אותם. השפעתו הפיכה כלומר בעת הרחקת החומר החיידקים יחזרו להתרבות.

שאלה מספר 7

7.1 שלבים וחומרים במחזור החנקן:

החומר A הוא אמוניה (NH_3)

החומר B הוא ניטראט (NO_3)

מסלול 1 נקרא אמוניפיקציה

מסלול 2 נקרא ניטריפיקציה

מסלול 3 נקרא דה-ניטריפיקציה

מסלול 4 נקרא קיבוע חנקן

7.2 התהליך המקביל לאמוניפיקציה במחזור הגופרית הוא פירוק תרכובות גופרית אורגניות.

7.3 החומר הנוצר במסלול הגופרית המקביל לחומר A במחזור החנקן הוא סולפיד (H_2S)

שאלה מספר 8

8.1 תשובה ג. אנדוטוקסין הוא רעלן מובנה שמהווה חלק ממרכיב ה-LPS בממברנה החיצונית בחיידקים גרם שליליים.

8.2 תשובה ד. $(240+360)/2 * 10^4 / 0.1 = 3*10^7 \text{ cfu/ml}$

8.3 תשובה ג. האור משמש כמקור אנרגיה והגלוקוז כמקור פחמן אורגני.

8.4 תשובה ג. חיידקים לוגריתמיים נמצאים בתהליכי חלוקה ולכן בהעברה למצע זהה (במקרה זה מדל לדל) לא יהיה שלב המתנה כיוון שהחיידקים כבר הסתגלו למצע.

8.5 תשובה ב. הכפלת הכרומוזום בחיידקים נעשית ע"י מזלגות הכפלה מרובים. מחזור הכפלה חדש מתחיל עוד לפני סיומו של מחזור ההכפלה הקודם ולכן קצב הכפלת המטען הגנטי בחיידק מוכתב על ידי הקצב שבו נוצרים מזלגות ההכפלה.

8.6 תשובה ב. בפסיכרופילים יש יותר חומצות שומן לא רוויות שהן בעלות טמפ' התכה נמוכה יותר ולכן נשמרת הנוזליות הרצויה של הממברנה בסביבות בעלות טמפ' נמוכה.

8.7 תשובה ד. תרבית רציפה מתקבלת ע"י כמוסטט ובו קצב הוספת המצע (קצב מיהול D) משפיע על קצב הגידול (K). אם $D > K$ קצב המיהול גבוה ולכן אוכלוסיית החיידקים תעלם עם הזמן. אם $D < K$ קצב המיהול לא מספיק ולכן אוכלוסיית החיידקים תגדל עם הזמן עד אשר הנוטריינט שנמצא בריכוז מינימלי יגביל את הקצב. כאשר $D = K$ גודל האוכלוסייה שבמיכל הוא קבוע והגידול מבוקר.

8.8 תשובה ב. בספירת מושבות נספרים תאים חיים בלבד מכיוון שרק תא חי מסוגל להתרבות וליצור מושבות במצע מוצק לכן בשיטה זו יתקבל המספר הקטן ביותר. בספירה מיקרוסקופית, מדידת משקל יבש ומדידת עכירות נקבעים תאים חיים ומתים יחדיו ולכן בשיטות אלו הריכוז יהיה גדול יותר.

8.9 תשובה ד. מיקופלסמה הוא חיידק קטן המתאפיין בהיעדר דופן תא והוא עטוף בממברנה בלבד. פניצילין הוא חומר אנטיביוטי שמעכב סינתזת דופן בחיידקים ולכן לא ישפיע על מיקופלסמה עקב היעדר אתר מטרה.

8.10 תשובה ב. פסטור הוא טיפול תרמי שמאפשר השמדת פתוגנים והקטנת הרמה המיקרוביאלית בחלב. 72°C למשך 15 שניות הם תנאי העבודה המקובלים לפסטור.

8.11 תשובה ג. תרבית סינכרונית היא תרבית המכילה תאים שנמצאים באותו שלב במחזור התא. אחת השיטות לקבלת תרבית סינכרונית היא להשתמש בחומרים המעכבים את אחד משלבי מחזור התא למשך זמן דור אחד. באופן זה כל התאים יעצרו באותו שלב במחזור התא. עם הרחקת המעכב התאים ימשיכו יחדיו מאותו שלב.

8.12 תשובה ב. בנגיפי RNA דרוש האנזים רפליקאז, המיובא בקופסית, לתעתוק RNA מכיוון שזהו תעתוק ייחודי שלא קיים בתאים האנימליים.

8.13 תשובה ב. אפיזום הוא פלסמיד שיכול להימצא חופשי בציטופלסמה או להיות משולב בכרומוזום החיידק. למשל חלקיק F הוא אפיזום שנמצא חופשי בציטופלסמה בחיידקי F^{+} או משולב בכרומוזום בחיידקי Hfr.