

4.1

α. Στην κλειστή καλλιέργεια οι φάσεις ανάπτυξης των μικροοργανισμών που παρατηρούνται είναι η λανθάνουσα, η εκθετική, η στατική και η φάση θανάτου. Αντίθετα, στην συνεχή καλλιέργεια οι μικροοργανισμοί τροφοδοτούνται συνεχώς με θρεπτικά συστατικά και ταυτόχρονα, απομακρύνονται από την καλλιέργεια κύτταρα και άχρηστα προϊόντα, οπότε οι μικροοργανισμοί βρίσκονται για όσο διαρκεί η καλλιέργεια σε μία εκθετική φάση ανάπτυξης και δεν παρατηρείται στατική φάση, ούτε, τελικά, η φάση θανάτου. Η συνεχής καλλιέργεια κρίνεται σκόπιμο να εφαρμόζεται όταν καλλιεργούνται μικροοργανισμοί που παράγουν χρήσιμα προϊόντα, συνήθως κατά τη διάρκεια της εκθετικής φάσης ανάπτυξής τους (εναλλακτικά: όταν το προϊόν της καλλιέργειας που μας ενδιαφέρει είναι οι ίδιοι οι μικροοργανισμοί, δηλαδή η βιομάζα).

β. Για το σχεδιασμό του πειραματικού πρωτόκολλου καλλιέργειας στο σχολικό εργαστήριο απαραίτητη είναι καταρχάς η λήψη υλικού από αρχική καλλιέργεια των επιθυμητών ειδών βακτηρίων (*E. coli*), η παρασκευή κατάλληλου στερεού θρεπτικού υλικού και η διαμόρφωση κατάλληλων συνθηκών ανάπτυξης. Για την αποφυγή ανάπτυξης άλλων μικροοργανισμών, εκτός εκείνων που πρόκειται να καλλιεργηθούν, τα θρεπτικά υλικά και οι συσκευές αποστειρώνονται πριν από την έναρξη της καλλιέργειας. Επομένως, εξασφαλίζουμε την ύπαρξη αποστειρωμένων τρυβλίων Petri και εργαλείων (όπως π.χ. εργαλείων εμβολιασμού), αλλά και πάγκων εργασίας των μαθητών, ώστε μόνο οι μικροοργανισμοί *E. coli* να αναπτυχθούν στις καλλιέργειές μας. Έπειτα, παρασκευάζουμε το υγρό θρεπτικό υλικό προσθέτοντας κατάλληλα θρεπτικά συστατικά (πηγή άνθρακα, αζώτου κτλ) σε νερό, μέσα σε επίσης αποστειρωμένο δοχείο (επίσης ρυθμίζεται το pH του θρεπτικού υλικού, ώστε να είναι το κατάλληλο για την *E. coli* που θα αναπτυχθεί αργότερα εκεί). Ακολουθεί η προσθήκη άγαρ στο υγρό θρεπτικό υλικό, προκειμένου αυτό να στερεοποιηθεί σε θερμοκρασία χαμηλότερη των 45°C. Εξασφαλίζουμε την κατάλληλη θερμοκρασία και την παροχή O₂ στον χώρο των καλλιεργειών (ή σε κλίβανο αν υπάρχει στο εργαστήριο), γνωρίζοντας ότι η *E. coli* αναπτύσσεται άριστα σε θερμοκρασία 37°C. Ξεκινάμε την καλλιέργεια με την προσθήκη μικρής ποσότητας κυττάρων *E. coli* στο θρεπτικό υλικό, μια διαδικασία που ονομάζεται εμβολιασμός. Μετά τον εμβολιασμό, οι μικροοργανισμοί παραμένουν σε χώρο που εξασφαλίζει σταθερή θερμοκρασία, οξυγόνο και pH κατάλληλα για την ανάπτυξή τους. Η συγκεκριμένη καλλιέργεια δεν θα μπορούσε

παρά να χαρακτηριστεί ως κλειστή διότι δεν προβλέπεται να γίνεται ανανέωση του θρεπτικού υλικού στα τρυβλία Petri, ούτε και απομάκρυνση των νεκρών μικροβιακών κυττάρων από αυτά καθώς και των παραπροϊόντων του μεταβολισμού τους.

4.2

α. Αφού, από το ευθύγραμμο τμήμα, προκύπτουν 10 κομμάτια σημαίνει ότι έχουμε 9 σημεία τομής, όπου η αλληλουχία 5'GAATTC3' (και η συμπληρωματική της) αναγνωρίζεται και κόβεται μεταξύ του πρώτου G-A στους δύο κλώνους του DNA. Συνεπώς, σπάνε 2 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί ανάμεσα σε νουκλεοτίδια με βάσεις G και A σε καθένα από τα 9 σημεία τομής, δηλαδή συνολικά σπάνε 18 φωσφοδιεστερικοί δεσμοί. Επιπλέον σπάνε οι 2 δεσμοί υδρογόνου που ενώνουν καθένα από τα 4 ζευγάρια T-A στη δίκλωνη αλληλουχία αναγνώρισης, που αποδιατάσσεται μετά την πέψη με το ένζυμο. Άρα υπάρχουν 8 δεσμοί υδρογόνου για καθεμιά από τις 9 αλληλουχίες αναγνώρισης σε ολόκληρο το μόριο DNA, συνολικά δηλαδή 72 δεσμοί υδρογόνου. Σε περίπτωση που χρησιμοποιούσαμε άλλη περιοριστική ενδονουκλεάση για την πέψη στον ίσο αριθμό κομματιών, η αλληλουχία αναγνώρισης του ενζύμου ίσως ήταν διαφορετική. Επομένως, μπορεί να άλλαζε ο αριθμός των δεσμών υδρογόνου, αλλά ο αριθμός των φωσφοδιεστερικών δεσμών που θα έσπαζαν θα παρέμενε ο ίδιος, καθώς ο αριθμός των σημείων κοπής στο δίκλωνο DNA θα ήταν ο ίδιος.

β. Τα δύο είδη DNA, του πλασμιδίου και του οργανισμού, αναμιγνύονται και, επειδή έχουν συμπληρωματικά άκρα, ενώνονται μεταξύ τους, οπότε αποκαθίστανται σε κάθε σημείο ένωσης οι 8 δεσμοί υδρογόνου ανάμεσα στα 4 ζευγάρια T-A. Εφόσον έχουμε δύο σημεία ένωσης, από ένα εκατέρωθεν, του “ξένου” DNA, με τα δύο άκρα του “ανοιγμένου” πλασμιδίου έχουμε συνολικά $8+8=16$ δεσμούς υδρογόνου να δημιουργούνται εκ' νέου κατά τον ανασυνδυασμό ενός πλασμιδίου. Όσον αφορά τους φωσφοδιεστερικούς δεσμούς, αυτοί αποκαθίστανται με τη μεσολάβηση ενός ειδικού ενζύμου, της DNA δεσμάσης. Η DNA δεσμάση φυσιολογικά είναι ένα από τα ένζυμα της αντιγραφής που συνδέει κομμάτια DNA. Έτσι προκύπτουν τελικά τα ανασυνδυασμένα πλασμίδια, με τη δημιουργία 2 φωσφοδιεστερικών δεσμών σε καθένα από τα δύο άκρα ενσωμάτωσης του “ξένου” DNA σε κάθε πλασμίδιο. Συμπερασματικά λοιπόν, η DNA δεσμάση καταλύει το σχηματισμό 4 φωσφοδιεστερικών δεσμών σε κάθε ανασυνδυασμένο πλασμίδιο.