

פעילות האנזים פוספטאז הנוצר בתאים של שורשוני לוביה

יא' בטבת, 8.1.2020

מבוסס על בעיה 2, [בחינת בגרות במעבדה 5 יח"ל, תשע"א](#) (2011) וכולל עדכונים (למורה וללבורנט)

מבוא

אחד המינרלים החיוניים לקיומם של בעלי חיים וצמחים הוא פוספט (זרחה). פוספט אי אורגני המצוי בקרקע נקלט בשורשי הצמחים, ומשמש בתאיהם כחומר מוצא ליצירת תרכובות אורגניות המכילות פוספט כגון ATP, פוספוליפידים וחומצות גרעין. תרכובות אורגניות המכילות פוספט ומצויות בקרקע אינן נקלטות בשורשי הצמחים. האנזים פוספטאז מזרז פירוק של תרכובות אורגניות המכילות פוספט. יש פוספטאזות שהן ייחודיות לסובסטרט מסוים (לדוגמה גלוקוז 6 פוספטאז), ואילו לאחרות יש טווח רחב של ספציפיות וכושר. לנתק קבוצת פוספט מהרבה סובסטרטים. יש מינים של צמחים בהם הפוספטאז מופרש אל מחוץ לתאי השורשים, ופעיל בקרקע.

כפי שפורסם [באתר המרכז לפיתוח ותמיכה / בחינת בגרות / עדכונים והתאמות לניסויים מבחינות בגרות](#), בבעיה 2 יש להשתמש בזרעי לוביה ולא בזרעי קישוא שבהם השתמשו בבחינה.

בקובץ זה נדון בייחודו של האנזים שנבדק בניסוי, בתוצאות הניסוי, בשאלות המלוות את הניסוי ונציע רעיונות אותם אפשר לבדוק בעבודות ביוחקר.

הערות למורה וללבורנט

עדכונים בהוראות הבטיחות וברשימת הציוד והחומרים

א. החל משנת תשע"א מספקים במרכז לפיתוח ותמיכה [תמיסת פנול פתלאין](#) ולא אבקה כפי שסיפקו בעבר. ריכוז התמיסה הוא 2% פנול פתלאין באתנול, ונפחה הוא 10 מ"ל. לכן, יש לתקן את רשימת ציוד וחומרים שהתפרסמה לקראת הבחינה: למחוק את ההערות לבעיות 1-3 בפריט 18 סעיפים א, ב "העבר 0.1 גרם פנול פתלאין...מים מזוקקים.." ובמקומם לרשום: "יש להעביר למשורה 0.5 מ"ל תמיסת פנול פתלאין בריכוז 2% ולהוסיף תמיסת אתנול 70% עד לנפח כולל של 100 מ"ל." ההנחיות בסעיפים ג, ד הן ללא שינוי.

ב. חשוב שהלבורנט, המורה והתלמידים (בניסויים בכיתה או בעבודת ביוחקר) יעבדו עם משקפי מגן וכפפות וימלאו את כל הוראות הבטיחות כמפורט בקובץ [פנול פתלאין – עדכונים למורה וללבורנט](#).

הערות הנוגעות לשלבי הניסוי ולשאלות

א. בניסוי, פוספטאז מזרז את פירוק התרכובת האורגנית פנול פתלאין פוספט ותוצרי הפירוק הם פנול פתלאין (תרכובת אורגנית) ופוספט (תרכובת אי אורגנית). פנול פתלאין פוספט הוא חומר סינטטי שאינו מהווה מקור לפוספט אי אורגני בטבע. חומר זה נבחר כמצע לאנזים מכיוון שבהוספת בסיס אפשר לזהות את אחד מתוצרי התהליך (פנול פתלאין).
זאת ועוד, בתנאי הניסוי שיטת המדידה מתאימה לבדיקת תהליך פירוק של פוספט אורגני מכיוון שהתוצר שנבדק גם הוא חומר אורגני ואינו מנוצל על ידי הצמחים.
לתהליך יצירת פוספט אי אורגני בסביבה החיצונית יש חשיבות לקיום צמחים והתפתחותם.

ב. בחלק א1 התלמידים ביצעו ניסוי איכותי (זכוכית 1) ובו שני טיפולי בקרה (זכוכיות 2 ו-3) ובדיקת הצבע של פנול פתלאין בנוכחות בסיס (זכוכית 4).

מס' טיפול / זכוכית	שורשונים מעוכים	פנול פתלאין פוספט	מים מזוקקים	פנול פתלאין	הוספת בסיס לאחר 5 דקות	צבע לאחר 5 דקות
1	+	+	--	--	+	סגול
2	+	--	+	--	+	חסר צבע
3	--	+	--	--	+	חסר צבע
4	--	--	--	+	+	סגול

ג. על פי המידע בפתח לניסוי (חלק א), בהתבסס על התוצאה בזכוכית 1 והשוואה בינה לבין התוצאה בזכוכית 3, יש בשורשוני לוביה פוספטאז המזרז את פירוק פנול פתלאין פוספט ואחד מתוצרי התהליך הוא פנול פתלאין אשר צבעו בסביבה בסיסית הוא סגול (הבדיקה בזכוכית 4 מאשרת את הקשר בין נוכחות פנול פתלאין לבין הצבע הסגול).
בשורשונים המעוכים (זכוכית 2) וגם בתמיסת פנול פתלאין פוספט (זכוכית 3) לא נוצר פנול פתלאין ולא התקבל צבע סגול מפני שבזכוכית 2 לא היה פנול פתלאין פוספט (מצע) ובזכוכית 3 לא היו שורשונים (אנזים) (שאלה 17).

¹ **בבעיה 1 בחלק א** התלמידים הכירו את שיטת המדידה. הם הכינו סדרה של מבחנות שבכל אחת מהן תמיסת פנול פתלאין בריכוז שונה. התלמידים השתמשו בסולם צבעים ומצאו בעזרתו ערך שמבטא את ריכוז פנול פתלאין בכל תמיסה.
בחלק ב הניסוי היה כמותי. התלמידים השתמשו בסולם הצבעים ובדקו את השפעת ריכוז מיצוי קישוא על הריכוז היחסי של פנול פתלאין שנוצר בתהליך.

ד. מומלץ להוסיף סעיף לשאלה 17 בדפים לתלמיד, סעיף בו התלמיד יידרש לדון **בחיבות**
הבקרות בטיפולים 2-4:

טיפול 2 מאפשר לשלול הסבר חלופי על פיו בשורשוני לוביה יש חומר כלשהו המגיב
עם בסיס לקבלת צבע סגול.

טיפול 3 מאפשר לשלול שלושה הסברים חלופיים:

- הבסיס מגיב עם פנול פתלאין פוספט ותוצר התגובה הוא חומר שצבע סגול.
 - הבסיס גורם לפירוק פנול פתלאין פוספט לפנול פתלאין.
 - התרכובת פנול פתלאין פוספט היא לא יציבה ובתנאי הניסוי היא מתפרקת מעצמה.
- טיפול 4** הוא בקרת צבע.

ה. מעיכת השורשוני על זכוכית 1 (סעיף ג) גרמה לפגיעה בתאי השורשוני וליציאה של חלק
מתכולתם. בין החומרים שיצאו היו מולקולות פוספטאז. הפוספטאז זרז את פירוק פנול פתלאין
פוספט (סעיף ד) ובנוזל שעל הזכוכית נוצר פנול פתלאין. לאחר כ- 5 דקות התלמידים הוסיפו
תמיסה מרוכזת של בסיס (סעיף ז, תמיסת נתרן קרבונט בריכוז 10%) שהגיב עם פנול פתלאין
שנוצר, והתקבל צבע סגול. תוצאה זו מעידה שפעילות האנזים פוספטאז אינה תלויה בשלמות
התאים. יתכן שהיו מולקולות של פוספטאז גם ברווחים הבין תאיים ומחוץ לתאים של שורשוני
הנבטים.

ו. **בחלק א2** נבדקה פעילות האנזים בדרך איכותית השונה מזו שנבדקה בחלק א1. את ההכנות
לבדיקה ביצע הלבורנט על פי הנחיות מפורטות שנמסרו לו (ראו פריטים 23, 24 ו-25 [ברשימת](#)
[ציוד וחומרים תשע"א - 2001](#) וגם הערה 1 עמ' 1 ברשימה זו).

1. 8 ימים לפני ביצוע הניסוי הלבורנט הישרה זרעי לוביה והנביט אותם.
2. הלבורנט הכין 2 כלים ובכל אחד מהם אגר²: כלי "I" בו הניח על האגר נבט לוביה שהשורשון
שלו הציץ וכלי "II" - שעליו לא הניח נבט.
עד ביצוע הניסוי נבט הלוביה התפתח: צמחו לו עלים והשורשון שלו צמח אל תוך האגר.
3. יום לפני ביצוע הניסוי הלבורנט טפטף תמיסת פנול פתלאין פוספט על האגר שבכל אחד
מהכלים.

ז. התלמידים קיבלו בתחילת הניסוי (סעיף א) את שני הכלים עם האגר שהכילו פנול פתלאין פוספט
וטפטפו תמיסת בסיס על האגר שבכל כלי.
10-20 דקות לאחר הטפטוף, התלמידים השוו את צבע האגר בכלים "I" ו-"II". נמצא שהשינוי
בצבע האגר קשור להימצאות השורשוני (שאלה 18 א, ב).

² ריכוז האגר בניסוי הוא 1% (נמוך מריכוז המתאים לגידול חיידקים) וזה מאפשר את צמיחת השורשוני.

הסבר אפשרי לתוצאה הוא שהבסיס שהוסף פגע בקרומי התאים של השורשונים וגרם ליציאת פוספטאז אל האגר. הפוספטאז זרז את פירוק פנול פתלאין פוספט ונוצר צבע וורוד.

יש לשלול הסבר זה מפני שהבסיס שהתלמידים טפטפו גרם גם לדנטורציה של האנזים ולכן אם יצא אנזים מהתאים הפגועים – הוא אינו פעיל כלל.

הסבר אפשרי אחר לתוצאה הוא שפנול פתלאין פוספט שהלבורנט טפטף נכנס אל תוך תאי השורשונים והפוספטאז שבתאים זרז את פירוקו.

יש לשלול הסבר זה מפני שמולקולות פנול פתלאין פוספט הן גדולות (כמו גם מולקולות של תרכובות אורגניות אחרות המכילות פוספט) וסביר שאינן עוברות את קרומי התאים ונכנסות אל תוכם (להמחשה, ראו נוסחת מבנה של החומר [פנול פתלאין](#)).

ח. לפיכך **המסקנה** היא שפוספטאז הוא אחד מהאנזימים הנוצרים בתאים, מופרשים אל הסביבה החוץ תאית ופעילים בה (שאלה 18ג). אנזימים כאלה נקראים **אקסו-אנזימים (exoenzyme)**. ברוב המקרים הם מזרזים פירוק של מולקולות גדולות שאינן עוברות קרומי תאים (לדוגמה אנזימי עיכול).

ט. **ייחודה של שיטת הבדיקה** בחלק 2 של הניסוי הוא בכך שהיא לא בוצעה ברסק או במיצוי של תאים אלא בסביבה שמחוץ לתאים שלמים³. בשיטות מתקדמות (אך לא במעבדה בבית הספר) אפשר לבדוק ישירות את נוכחות האנזים ואת כמותו בסביבה החוץ תאית⁴ ולא להסתפק בבדיקת תוצר התהליך אותו מזרז האנזים.

י. **בחלק ב** התלמידים הכינו תכשיר של שורשון לזביה והתבוננו מבעד למיקרוסקופ בצינורות ההובלה שבשורשונים. בשאלה 20 הם נדרשו ליישם את המסקנה שניסחו בחלק 2א (שאלה 18ג) לגבי צינורות ההובלה. פוספטאז שמופרש אל הסביבה החיצונית מזרז פירוק של פוספט אורגני לפוספט אי אורגני אשר נקלט בשורשים ומגיע באמצעות צינורות הובלה אל כל חלקי הצמח.

יא. **בחלק ג** בשאלה 23 נדרשים התלמידים להתבסס על התוצאות בחלקים 1א ו-2א של הניסוי ולהסביר את העלייה בפוספט אי אורגני שנקלט בצמחים (טבלה 1) כתוצאה מריכוזים שונים של פוספט אורגני.

על פי התוצאות מתעוררות שאלות מעניינות שלא נידונו בניסוי כגון: האם פוספטאז נוצר באופן קבוע בתאי השורשונים? האם פוספטאז מופרש מתאי השורשונים באופן קבוע? האם פוספטאז מיוצר בתאים רק על פי אות מהסביבה החיצונית? אם כן, מהו האות?

³ המשך פיתוח הנושא זה ראו ברעיונות לניסויים בביוחקר (עמ' 5-7)
⁴ כפי שמתואר בניסויי בבעיה 1 (פרק ג – ניתוח תוצאות ניסוי)

הצעות לשילוב הנושא במסגרת עבודת ביוחקר

סציופיט 1 - 4 מוצגים כמה רציונות הקשורים לנושא הניסוי. המורה יוכל לפתח כל אחד מהם, לפרש ניסוי מקדים ולבדוק עם תלמידיו את ההיתכנות של הרציון שבחר לביוחקר.

תזכורת: לפני ביצוע ניסוי כלשהו, חובה על המורה לבדוק את הוראות הבטיחות הרלוונטיות כפי שפורסמו באתר מפא"ר ולצבור רק על פיהן.

1. אפשר לבצע ניסויים דומים לניסוי שבחלקים א ו-ב בבעיה 2.
 - להשתמש באורגניזם אחר או באיבר אחר של צמח כגון שורשני עדשים, סויה, שעועית.
 - לשנות את הטווח של המשתנה הבלתי תלוי בניסוי.
 - להשתמש בשיטת מדידה אחרת בה מודדים את פנול פתלאין שהוא אחד מתוצרי תהליך הפרוק של פוספט אורגני. במקום להשתמש בסולם צבעים אפשר למדוד את הבליעה של תמיסות פנול פתלאין בסיסיות באמצעות ספקטרופוטומטר [באורך גל 550 ננומטר](#).
2. אפשר לבדוק את פעילותו של האנזים פוספטאז באופן דומה למתואר בפרק ג בניסוי שבבעיה 1 (ניתוח תוצאות ניסוי: פעילות האנזים פוספטאז בשורשי קישוא), ובניסוי א בבעיה 3 (עיבוד תוצאות באקסל).
בהתבסס על נתונים אלו ועל [מידע בספרות](#)⁵, אפשר לבצע ניסוי מקדים בו שורשני הנבטים יהיו בתוך **תמיסת גידול** (כמתואר בקצרה בהמלצות שבסעיפים א-ח שבהמשך).
 - א. להתפיח זרעי לוביה ולהעביר אותם להנבטה עד שיציץ שורשון קטן.
 - ב. להכין כמה סדרות של כוסיות קטנות (לדוגמה, כוסיות לשתיית ליקר). אם נפח הנוזל בכוסיות יהיה קטן ויופרש אנזים לסביבה החיצונית, תתקבל תמיסת אנזים מרוכזת ככל שניתן.
 - ג. בכל סדרה יש להכין כמה כוסיות⁶ ולהכניס לכל אחת כ-25 מ"ל של תמיסת גידול, לדוגמה: מים, תמיסת פנול פתלאין פוספט (בריכוז התחלתי 0.1% או 0.2%) ותמיסת KH_2PO_4 (בריכוז התחלתי 0.5%)⁷.

⁵ R. Yadav & J. Tarafdar, *Biology and Fertility of Soils* volume 34, pages 140–143 (2001), [Influence of organic and inorganic phosphorus supply on the maximum secretion of acid phosphatase by plants](#)

⁶ כוסית לכל טיפול ולכל בדיקה שברצונכם לבצע (מומלץ לבדוק כל טיפול בכמה פרקי זמן מתחילת הניסוי).
⁷ KH_2PO_4 הוא פוספט אי אורגני אותו מספקים במרכז (חומר זה כלול בערכת בופר פוספט).

- ד. לאחר שהנבטים יתפתחו (2 או 3 ימים), לכסות כל כוסית בפיסת גזה ולהניח עליה את הנבטים, כך שכל שורשון יהיה נעוץ בחור שבגזה וטבול בנוזל שבכוסית (כפי שמפורט בסעיף ג). מומלץ להכניס לכל כוסית 10 – 20 שורשונים.
- ה. כמה שעות לאחר מכן (לדוגמה 3 או 4 שעות) להעביר חלק מתמיסת גידול מכל אחת מהכוסיות למבחנה נקיה ולפי הצורך להוסיף לכל מבחנה מים או תמיסת פנול פתלאין פוספט.
- ו. להעביר את המבחנות לאמבט מים פושרים למשך כ-15 דקות, להוציא אותן ולהמתין לירידת הטמפרטורה בנוזל.
- ז. לטפטף טיפה של תמיסת בסיס (נתרן קרבונט) לכל מבחנה ולרשום מיד את צבע התמיסה בכל אחד מהטיפולים. מומלץ להיעזר בסולם הצבעים שבנספח לשאלון בחינת בגרות תשע"א.
- ח. אם הכנתם יותר ממבחנה אחת לכל סדרה אפשר להמשיך ולבדוק מבחנות נוספות אחרי פרקי זמן נוספים (כגון אחרי 6 שעות, 12 שעות, 24 שעות).

הערות:

- מכיוון שהניסוי נמשך ימים אחדים, הנבטים הצעירים יכולים להתקיים ולהתפתח במים ללא הוספת מינרלים חיוניים.
 - חיוניותם של הנבטים בכוסיות שמכילות תמיסת פנול פתלאין פוספט או פוספט אי אורגני נשמרת במשך יומיים שלושה.
 - המהלך המתואר בסעיף זה דומה לזה שבוצע בכלי עם האגר (בעיה 2 חלק א2), אלא שכאן אם יתקבל פנול פתלאין בתמיסה, הוא יהיה תוצר של פעילות אנזימטית שהתרחשה רק בתמיסת גידול ולא בתאי השורשונים. תוצאות כאלה תומכות בכך שהאנזים הופרש מתאי השורשונים.
 - אם בניסוי מקדים דומה להצעה שלעיל נמצא שבתנאים כלשהם לא מופרש פוספטאז לתמיסת הגידול, אפשר בסיום הניסוי לשטוף את השורשונים ולבדוק האם יש פוספטאז **בתוך** תאי השורשונים (כמתואר בבעיה 2, חלק א1).
התוצאה שתתקבל תתמוך בכך שהאנזים נוצר כל הזמן, והוא מופרש אל מחוץ לתא בתנאים מסוימים.
3. אפשר גם לבדוק את השפעת גיל הנבט על פעילות פוספטאז באמצעות מערכת דומה לזו שהוצגה בסעיף 2. בניסוי מקדים זה אפשר להשהות קבוצה של נבטים בכוסית מסוימת, לאחר פרק זמן (שעות או יום) להעביר את הנבטים לכוסית עם תכולה זהה, להשהות את הנבטים לפרק זמן ולהעביר שוב לכוסית חדשה.

4. ידוע כי פוספטאז מופרש גם מחיידקים המצויים בקרקע, על פי הוראות הבטיחות אין לגדל ואין לבודד חיידקים מהקרקע (ראו חוזרים בנושא מעבדה) שימוש בחומר חי במעבדות בתי הספר" (24.10.2019).

אפשר לבדוק איזה מבין מיני החיידקים המסופקים על ידי המרכז לפיתוח ותמיכה (Escherichia coli, Staphylococcus aureus, Bacillus subtilis) מייצר פוספטאז ולתכנן ניסויים עם חיידקים ממין זה, כל זה תוך הקפדה על כללי הזהירות בעבודה עם חיידקים.