

Место для баллов:

Код:

**Четвертый этап республиканской
олимпиады
по «Биологии» (2016-2017)**

**КАБИНЕТ № 2 (25 баллов)
БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ**

Часть I. Биохимия (12,5 баллов)

1. Исследователь, проведя ревизию растворов реагентов в холодильнике, обнаружил, что надписи на некоторых этикетках частично стерлись. Так на одном из флаконов отсутствует название растворенного вещества, но сохранилась информация о его концентрации в растворе (0.2 мг/мл) и молекулярной массе (240000). Исследователь отобрал 2.5 мл раствора в кювету с длиной оптического пути 1 см и с помощью спектрофотометра записал спектр поглощения раствора (зависимость величины поглощения света от длины волны). Оказалось, что в спектре поглощения присутствует максимум в диапазоне длин волн 400-405 нм (рисунок).



Используя формулу основного закона светопоглощения:

$$A = \epsilon Cl$$

где A – оптическая плотность (интенсивность поглощенного света, безразмерная величина); ϵ - коэффициент молекулярной экстинкции (моль/л·см⁻¹), величина постоянная для каждого индивидуального соединения при определенной длине волны; C – молярная концентрация растворенного вещества (моль/л); l – длина оптического пути, расстояние, которое свет проходит через раствор (см);
исследователь смог рассчитать значение коэффициента молярной экстинкции и, найдя его в справочнике, установить какому соединению он соответствует.

Соединение	Коэффициента молярной экстинкции
Пероксидаза из хрена	109000 моль/л·см ⁻¹
Каталаза	324000 моль/л·см ⁻¹
Метгемоглобин	210000 моль/л·см ⁻¹
Цитохром с	27700 моль/л·см ⁻¹

Ответ: (2,5 балла)

2. На этикетке другого флакона сохранилось название растворенного фермента

– пероксидаза из корней хрена, которая имеет молекулярную массу 40 кДа.

Однако, когда исследователю понадобилось для проведения эксперимента

приготовить 15 мл раствора пероксидазы с концентрацией 0.1 мг/мл, оказалось

что информация о концентрации раствора на этикетке отсутствует.

Отобрав 1

мл раствора и измерив его оптическую плотность с помощью

спектрофотометра в кювете с длиной оптического пути 1 см он получил

значение $A = 0.76$. Зная величину коэффициента молярной экстинкции

пероксидазы (таблица), исследователь рассчитал какие объемы исходного

раствора пероксидазы и воды необходимо использовать для приготовления 15

мл конечного раствора с заданной концентрацией.

Ответ: мл раствора пероксидазы (2,5 балла), мл воды (2,5 балла).

3. Работа исследователя связана с получением очищенных препаратов аденина методом колоночной хроматографии. В отчете о проделанной работе исследователю необходимо указать данные о полученных фракциях аденина: объем и количество аденина в мг в каждой фракции.

Для определения неизвестных концентраций исследователь решил использовать коэффициент молярной экстинкции аденина, однако страница

в справочнике, оказалась залита кислотой. Ученый решил сам определить коэффициент. Для этого он приготовил раствор,

содержащий 250 мкг аденина (молекулярная масса 135) в 100 мл 0,1н раствора NaOH, который имел оптическую плотность 0,229 (ширина кюветы 1 см) при длине волны

262

нм.

Измерив объем полученных фракций с помощью мерного цилиндра и величины оптической плотности с помощью спектрофотометра в кювете с длиной оптического пути 1 см, исследователь рассчитал концентрации аденина.

Ответ: $\epsilon_{262} =$ моль/л·см⁻¹ (2,5 балла)

Номер фракции	Объем, мл	Оптическая плотность	Масса аденина, мг
Фракция 1	150	0.75	(0,5 балла)
Фракция 2	125	0.6	(0,5 балла)
Фракция 3	140	0.25	(0,5 балла)
Фракция 4	145	1	(0,5 балла)
Фракция 5	135	1.2	(0,5 балла)

Часть II. Микробиология (12,5 баллов)

Перед выполнением заданий убедитесь, что на Вашем рабочем столе имеются 10 чашек Петри с агаризованной питательной средой, герметизированных парафиновой плёнкой, штатив с 20 пробирками, герметизированными парафиновой плёнкой. Открывать чашки и пробирки запрещено!

Если что-то из перечисленного отсутствует, немедленно поднимите руку и позовите дежурного преподавателя!

Все оборудование после выполнения заданий должно быть оставлено в исходном состоянии.

Задания рекомендуется выполнять последовательно, одно за другим.

Вы летите на космическом корабле от Марса к Земле. В какой-то момент корабль был повреждён микрометеоритом, и второй пилот длительное время провел в открытом космосе, в том числе на солнечной стороне корабля, занимаясь ремонтом. Предположительно, доза полученного им излучения составила около 5 Гр*. Через 2 часа, у него поднялась температура, появилась тошнота и головная боль, покраснело лицо. По-видимому, у него началась...

0А (0,5 балла) Назовите заболевание



Гр* – грей, единица поглощённой дозы ионизирующего излучения
в
Международной системе единиц (СИ)

Через некоторое время симптомы прошли, однако стремительно стало уменьшаться число лимфоцитов в крови. Врачи считают, что пилоту нужна пересадка костного мозга, но сделать её можно только на Земле, до которой осталось лететь чуть больше недели. Ваша задача довести пилота живым, но, к сожалению, у него уже дополнительно обнаружались признаки инфекционного заболевания.

Задание 1 (6 баллов) Определение чувствительности исследуемых бактерий к антибиотикам.

В крови пилота Вы обнаружили клетки бактерий и получили их чистую культуру. Сейчас важнее всего как можно быстрее подобрать нужное лечение. Для этого Вы с помощью микробиологического шпателя равномерно распределили каплю исследуемой культуры бактерий по поверхности чашки Петри для получения сплошного газона, после чего сразу же положили на поверхность среды диски с антибиотиками. Каждый диск пропитан 30 мкг определённого антибиотика. Чашки Вы оставили на 16 часов при температуре...

1А. (0,5 балла) Укажите оптимальную для данного эксперимента температуру в градусах Цельсия.

Рассмотрите чашку № 1. По истечении указанного времени Вам необходимо проанализировать полученные результаты. Дно чашки Петри разбито на сектора, номер сектора соответствует номеру антибиотика.

1Б. (0,5 балла) Укажите номер диска с антибиотиком, активным против данных бактерий. Если таких дисков несколько, укажите их через запятую.

Оценив Ваши результаты, Земля рекомендовала вам продолжить работу с тремя антибиотиками: ампициллином, тетрациклином и хлорамфениколом. Ампициллин ингибирует транспептидазу клеточной стенки бактерий, таким образом, подавляя синтез муреина. Тетрациклин связывается с малой субъединицей рибосом в А сайте, ингибируя таким образом трансляцию. Хлорамфениколом останавливает трансляцию, ингибируя транспептидазную реакцию за счёт связывания с консервативным участком 23S РНК большой субъединицы рибосомы.

Вы приготовили серию разведений каждого из трёх антибиотиков в жидкой полноценной питательной среде в пробирках (Ар — ампициллин, Тс — тетрациклин, См — хлорамфеникол, концентрация указана на пробирках). Для каждого антибиотика Вы сделали шесть разведений, каждое из которых пронумеровали (№ 1–6). Всего у Вас получилось 18 опытных пробирок. В каждую пробирку, содержащую определённую концентрацию того или иного



антибиотика, Вы засеяли небольшое количество исследуемых бактерий.

Также Вы поставили два контроля. Контролем роста бактерий служит пробирка с жидкой полноценной питательной средой без антибиотика, в которую Вы засеяли такое же количество бактерий, как и в опытные. (обозначена К+). Контролем стерильности служит пробирка с жидкой полноценной питательной средой без антибиотика, в которую Вы не засеяли бактерии (обозначена К-). Через 16 часов настало время учёта результатов. Рассмотрите пробирки с антибиотиками и контроли.

1В. (1 балл) Для каждого антибиотика укажите наименьшую концентрацию, которая будет оказывать терапевтическое действие (условия в пробирках считать приближенными к таковым в тканях организма).

Антибиотик	Концентрация
Ампициллин	
Тетрациклин	
Хлорамфеникол	

Из трёх пробирок с наибольшей концентрацией антибиотика (пробирки № 4, 5 и 6 в каждой серии разведений) Вы провели высеv. Для этого из каждой пробирки Вы отобрали по 0,1 мл и смешали с 0,9 мл физиологического раствора. Далее 0,1 мл каждого полученного раствора с помощью микробиологического шпателя Вы распределили по поверхности агаризованной среды, не содержащей антибиотиков (чашки Петри № 2–10).

Через 16 часов вам необходимо учесть результаты.

Изучите чашки № 2–10 и соответствующие им пробирки. На каждой чашке указан антибиотик и его концентрация в пробирке, из которой сделан высеv, при этом в среде на чашках антибиотик отсутствует.

1Г. (1 балл) Сделайте вывод из наблюдаемых данных. О чём свидетельствует наличие бактериального роста в некоторых чашках?

1Д. (1 балл) Сделайте вывод из наблюдаемых данных. О чём свидетельствует отсутствие бактериального роста в некоторых чашках?

1Е. (2 балла) Учитывая все имеющиеся у вас данные определите, какие антибиотики и в какой концентрации (какая концентрация должна достигаться в крови больного) следует использовать, чтобы помочь второму пилоту.

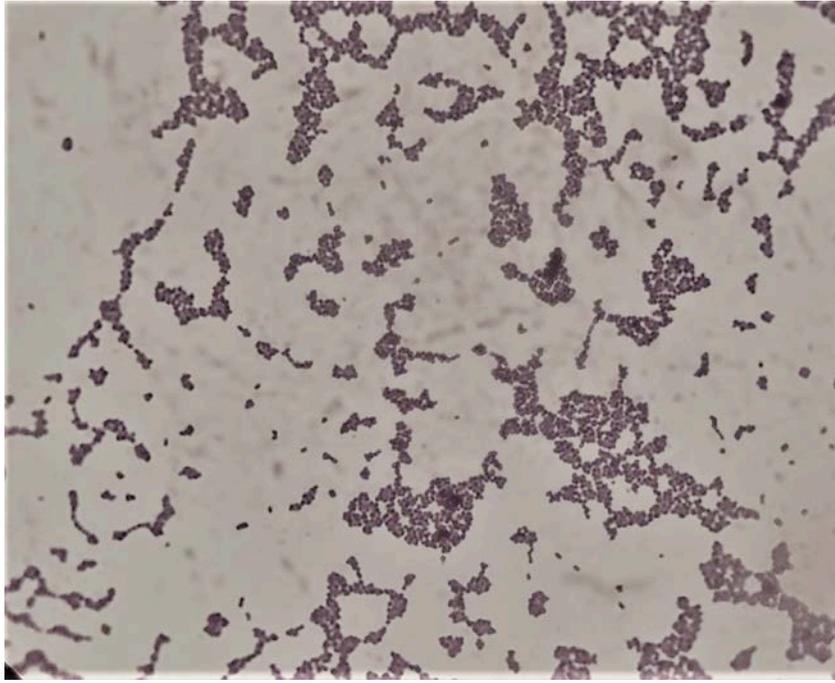
Задание 2 (6 баллов). Идентификация исследуемых бактерий.

Пока Ваш товарищ борется за жизнь, Вы решили идентифицировать бактерии, которые были выделены Вами из его крови. К сожалению, разнообразие доступных Вам тестов сильно ограничено.

2А. На первом этапе идентификации Вы определяли некоторые морфологические и физиолого-биохимические свойства бактерий.

В предварительных тестах Вы установили, что исследуемые бактерии неподвижны, оксидазоотрицательны, растут при 45 °С, сбраживают глюкозу и лактозу с образованием кислоты и способны полностью обесцвечивать кровяной агар, т. е. обладают β-гемолитической активностью.

Форма клеток и грампринадлежность. При определении грампринадлежности исследуемой бактериальной культуры Вы использовали сложный метод окрашивания бактерий по Граму, в результате Вы обнаружили, что клетки бактерий окрасились в фиолетовый цвет. Кроме того, использование этого метода позволило вам выявить форму бактериальных клеток и особенности их взаимного расположения. То, что Вы увидели при микроскопировании препарата с иммерсионной системой, представлено на рисунке.



2A1. (1 балл) Назовите форму клеток, тип их взаимного расположения и грампринадлежность исследуемых бактерий.

Разжижение желатина. Для получения необходимой полноценной питательной среды к мясо-пептонному бульону добавляют сухой желатин (12 %) в качестве уплотнителя, дают ему набухнуть, затем смесь нагревают до полного растворения желатина, разливают в пробирки по 5–8 мл и стерилизуют полученную среду автоклавированием.

Исследуемую бактериальную культуру Вы засеяли с помощью бактериологической петли уколом в столбик застывшей в пробирке среды. В качестве отрицательного контроля Вы использовали пробирку со столбиком среды, в которую бактерии не засевали. Обе пробирки Вы поместили в термостат и инкубировали в течение 24–72 часов при оптимальной для бактерий температуре. Далее Вы поместили пробирки в холодильник для полного застывания питательной среды на 30 минут, после чего потрясли пробирки и обнаружили, что в опытной пробирке большая часть столбика питательной среды жидкая, в то время как в контрольной пробирке она осталась застывшей.

2A2. (0,5 балла) Назовите ферментативную активность, о которой свидетельствует способность бактерий разжижать желатин?

Характеристика типовых штаммов некоторых видов бактерий

Вид бактерий	Г	р	а			О	О	О	Р	
	р	а	м			к		б	а	
	п	м	п			с		р	з	
	р	п	р			и		а	ж	
	и	р	и			а		з	и	
	н	и	н			к		о	е	
	а	н	и			т		в	н	
	д	е	е			и		н	и	
	л	к	к			в		е	е	
	е	н	и			н		к	ж	
	ж	е	е			о		и	е	
		л	л			с		с	л	
		ж	ж			т		л	е	
						ь		о	л	

		Н О С Т Ь						Ы	а Т И Н а	
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	П	Г -	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	К	Г +	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	К	Г +	+	+	-	-	+	+	-	-
<i>Staphylococcus aureus</i>	К	Г +	+	+	-	-	+	-	+	β +
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	П	Г -	+	+	+	+	+	+	+	β +
<i>Clostridium perfringens</i>	П	Г +	-	+	-	-	+	+	+	β +
<i>Enterococcus faecalis</i>	К	Г +	+	+	-	-	+	+	-	-

<i>Enterococcus faecium</i>	К	Г +	+	+	-	-	+	+	-	α +
<i>Escherichia coli</i>	П	Г -	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>Streptococcus agalactiae</i>	К	Г +	+	-	-	-	+	+	-	α +
<i>Streptococcus pyogenes</i>	К	Г +	+	-	-	-	+	-	+	β +
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	К	Г +	+	-	-	-	+	-	-	α +
<i>Micrococcus luteus</i>	К	Г +	+	-	-	+	-	-	+	-

Примечание: «П» или «К» – палочковидная или кокковидная форма клеток; «Г+» или «Г-» – грамположительный или грамотрицательный тип клеточной стенки; «+» или «-» – наличие или отсутствие активности, свойства; «α+» – α-гемолиз; «β+» – β-гемолиз.

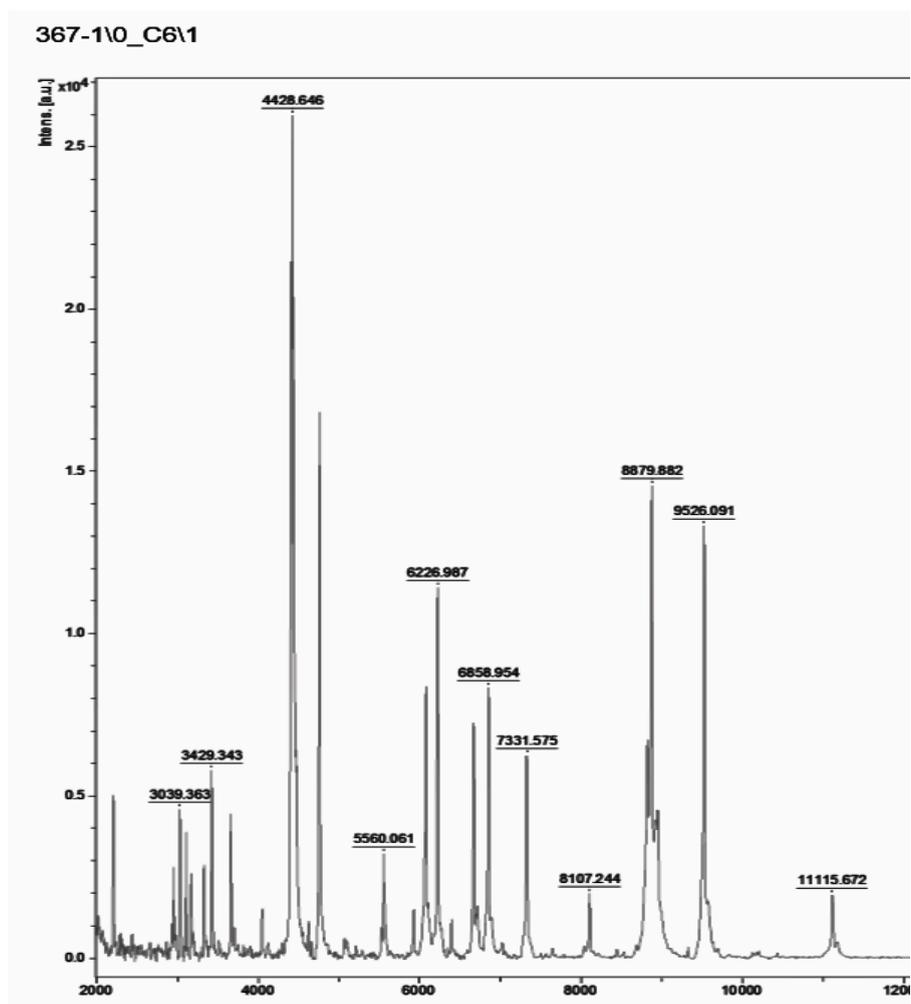
2А3. (1 балл) На основании результатов проведённых Вами тестов и анализа данных, предложенных в таблице, предположите, к какому виду относится исследуемая бактериальная культура.

2Б. Идентификация при помощи масс-спектрометрии.

Вы решаете подтвердить свои выводы при помощи MALDI-масс-спектрометрии. Данный метод основан на очень точном измерении молекулярной массы множества (нескольких десятков) белков клетки.

Масс-спектр исследуемой культуры и массы некоторых белков представлены на рисунке. При масс-спектрометрии белки ионизируются и летят в электромагнитном поле пропорционально их массе. Каждый пик на данном спектре характеризует ионизированную белковую молекулу определённой массы.

Масс-спектр исследуемой культуры бактерий



Масса, дальтон
2203,818
2959,798
3039,363
3175,456
3429,343
4426,646
5560,061
6226,967
6858,954
7331,575
8107,244
8879,882
9526,001
11115,672

Программное обеспечение прибора автоматически сравнило полученный спектр с международной базой данных и выдало заключение, согласно которому с вероятностью более 95 % данные бактерии относятся к виду *Enterococcus faecalis*.

2Б1. (0,5 балла) Учитывая предыдущие результаты и данные масс-спектрометрии, предположите, к какому виду следует отнести выделенные вами бактерии?

РНК

2В. Идентификация методом ПЦР-анализа генов 16S-рибосомальной

Так как во время полёта Вы много работали с золотистым стафилококком,

Вы решили проверить, не им ли заразился ваш второй пилот. Для этого Вы используете праймеры к вариабельному участку гена 16S-рибосомальной РНК *Staphylococcus aureus* из статьи Р. Риффона (Riffon et al 2001), в которой авторы разрабатывали ПЦР тест для идентификации бактерий *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae*, *Streptococcus parauberis* и *Streptococcus uberis*.

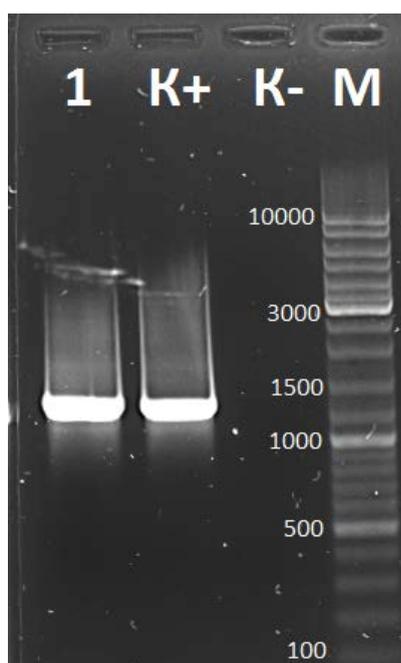
Вы выделили ДНК из культуры исследуемых бактерий. В качестве

положительного контроля Вы использовали ДНК типового штамма *S. aureus*, а

в качестве отрицательного контроля – реакцию смесь без ДНК. После ПЦР

Вы провели электрофорез в агарозном геле, результаты которого представлены

на рисунке. Ожидаемый размер фрагмента 1318 п.н.



Дорожки:

1 – образец с ДНК исследуемого штамма бактерий;

K+ – образец с ДНК типового штамма *S. aureus* (положительный контроль);

K- – образец без ДНК (отрицательный контроль);

M – маркер молекулярного веса, цифрами отмечена длина некоторых фрагментов в п.н.

2В1. (0,5 балла) На основании только данных ПЦР к какому виду Вы бы отнесли исследуемые бактерии?

2Г. (1,5 балл) Расположите три использованных вами метода идентификации (морфологический и физиолого-биохимический анализ, масс-спектрометрия и ПЦР-анализ) по степени достоверности полученных на их основе выводов о видовой принадлежности исследуемых бактерий (1. – самые достоверные результаты, 3. – наименее достоверные результаты).

1. _____

Так как во время полёта Вы много работали с золотистым стафилококком,

2. _____

3. _____



2Д. (1 балл) Учитывая все имеющиеся у вас данные, определите к какому виду относятся исследуемые бактерии?
