

# 54 Olimpiada Biologiczna – Pracownia 221/D

Imię i nazwisko	Grupa				Nr
	CZER	NIEB	ZIEL	ZOLT	

Zaznacz znakiem X swoją grupę

Czas: 90 min (+ 5 min na sprawdzenie kompletności zestawu egzaminacyjnego).

Łączna liczba punktów do zdobycia: 30

Drodzy uczestnicy!

- W trakcie egzaminu wykonacie dwa zadania:  
**Część A** jest zadaniem praktycznym, którego celem jest wyznaczenie parametrów kinetycznych enzymu – inwertazy (**22 pkt**),  
**Część B** jest zadaniem praktyczno-teoretycznym, którego celem jest identyfikacja patogennej bakterii na podstawie testów mikrobiologiczno-biochemicznych (**8 pkt**).
- Przed przystąpieniem do rozwiązywania zadań należy przeczytać wszystkie dostarczone materiały (**11 numerowanych stron**).
- Odpowiedzi należy udzielać jedynie na **karcie odpowiedzi (3 strony)**.
- Odpowiedzi umieszczone w arkuszu zadań nie będą oceniane.
- Kartę odpowiedzi wypełniaj za pomocą czarnego długopisu czytelnym pismem (drukowanymi literami). Dokładnie zaczerpnij pola na karcie odpowiedzi. Wartości liczbowe i tekstowe należy wpisać w odpowiednie pola – egzaminator oceni odpowiedzi i zakoduje na karcie liczbę przyznanych punktów.
- Upewnij się, że otrzymałeś wszystkie niezbędne materiały i odczynniki do wykonania zadań znajdujące się na załączonej liście. Jeżeli brakuje jakiegokolwiek pozycji, podnieś rękę.
- **Używaj dostarczonych odczynników wg instrukcji. Dodatkowe odczynniki nie będą udostępniane bez względu na okoliczności.**
- Używaj rękawiczek ochronnych.
- Zakończ udzielanie odpowiedzi i odłóż długopis natychmiast po zakończeniu egzaminu.

## Materiały i sprzęt

Materiał	Opis na etykiecie	Ilość	Jednostka
0,5 M sacharoza w buforze octanowym	Sach.	1 (2,5 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
Bufor octanowy	Bufor	1 (9 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
1% kwas dinitrosalicylowy (DNS) w 0,4 M NaOH	DNS	1 (3 ml)	probówka typu Falcon (15 ml)
Enzym	Enz.	1 (300 $\mu$ l)	probówka typu Eppendorf (1,5 ml)
Woda dejonizowana	Woda	1 (20 ml)	butelka

Wszystkie odczynniki w probówkach typu Falcon są umieszczone w statywie. Enzym znajduje się w pojemniku z lodem.

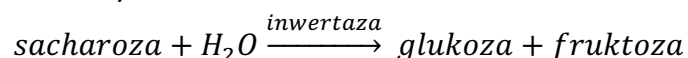
Sprzęt	Ilość	Jednostka
Pipety automatyczne 10–100 $\mu$ l i 100–1000 $\mu$ l z zestawem końcówek	1	zestaw
Blok grzejny na probówki typu Eppendorf	1 urządzenie na 2 lub 4 uczestników	
Mieszadło do probówek typu vortex	1	sztuka
Płytki wielodołkowa	1	sztuka
Probówki 1,5 ml typu Eppendorf (w torebce)	12	sztuka
Probówki 11 ml z korkami (w torebce)	3	sztuka
Statyw na probówki typu Eppendorf	1	sztuka
Statyw na probówki typu Falcon	1	sztuka
Kalkulator	1	sztuka
Marker do podpisywania probówek	1	sztuka
Linijka	1	sztuka
Pojemnik na odpady	1	sztuka
Pojemnik z lodem	1	sztuka
Ręczniki papierowe	kilka	„listek”
Rękawiczki*	1	para
Stoper	1	sztuka

\* Uczestnicy otrzymają rękawiczki przed rozpoczęciem pracowni. Zapasowe rękawiczki będą dostępne na sali.

## Część A. Wyznaczenie parametrów kinetycznych enzymu – inwertazy (22 pkt)

### Wprowadzenie

W probówce z etykietą Enz. znajduje się komercyjnie dostępny enzym – inwertaza (nazwa systematyczna –  $\beta$ -fruktofuranozydaza, nr EC 3.2.1.26), który katalizuje reakcję hydrolizy sacharozy do glukozy i fruktozy:



**Twoim zadaniem jest wyznaczenie stałej Michaelisa ( $K_M$ ) i szybkości maksymalnej ( $V_{max}$ ) tego enzymu.** Do monitorowania przebiegu reakcji enzymatycznej masz do dyspozycji kwas dinitrosalicylowy, który w środowisku zasadowym w reakcji z cukrami redukującymi tworzy czerwono-brązowe zabarwienie.

### Zadanie A.1 (15 pkt)

Wykonaj eksperyment umożliwiający wyznaczenie  $K_M$  i  $V_{max}$  dla enzymu inwertazy.

#### Instrukcja do zadania A.1

1. Ponumeruj 12 plastikowych probówek typu Eppendorf o pojemności 1,5 ml w następujący sposób A1–A4, B1–B4 i C1–C4.
2. Do każdej z probówek z pkt. 1. dodaj 0,5 ml wody dejonizowanej i 0,25 ml 1% roztworu kwasu dinitrosalicylowego (DNS).
3. Wymieszaj zawartość probówek.
4. Uzupełnij tabelę 1. (na następnej stronie), a następnie dodaj do 3 plastikowych probówek o objętości 11 ml podpisanych A, B i C odczynniki wg uzupełnionej tabeli 1. – nie dodawaj enzymu na tym etapie.
5. Do każdej z probówek A, B i C dodaj 100  $\mu$ l enzymu, wymieszaj zawartość i natychmiast pobierz 250  $\mu$ l do odpowiednich próbek: A1, B1, C1.
6. Po 5 minutach od dodania enzymu z każdej próbówki A, B i C pobierz 250  $\mu$ l roztworu i dodaj do odpowiednich próbek: A2, B2, C2.
7. Po 10 i 15 minutach ponownie pobierz z próbek A, B i C po 250  $\mu$ l roztworu i dodaj do odpowiednich próbek: A3, B3, C3 oraz A4, B4, C4.
8. Wymieszaj zawartość wszystkich 12 probówek typu Eppendorf.
9. Umieść próbki w bloku grzejmym (100 °C) na 5 minut.
10. Po ostygnięciu próbek (około 10 minut) przenieś po 200  $\mu$ l zawartości z każdej z probówek do odpowiednich dołków na płytce wielodołkowej; płytka ma numerowane wiersze (A-H) i kolumny (1–12) – dołek A1 znajduje się w lewym górnym rogu płytki.
11. Upewnij się, że kod QR na płytce odpowiada Twojemu nr. uczestnika. Załóż pokrywkę płytki. Kiedy będziesz gotów przekazać płytkę – podnieś rękę.
12. Asystenci dokonają pomiaru absorbancji i wykonają dokumentację fotograficzną. Wyniki zostaną dołączone do karty odpowiedzi po zakończeniu egzaminu.

Zadanie A1.1.

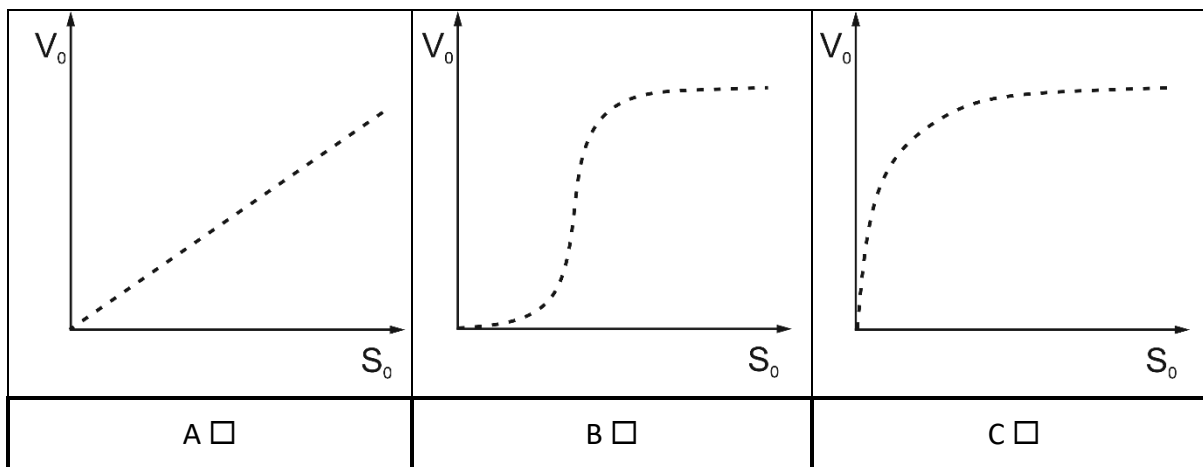
Uzupełnij tabelę 1.

Tabela 1. Skład mieszanin reakcyjnych.						
Oblicz objętości 0,5 M roztworu sacharozy, jakie należy dodać, aby uzyskać podane w tabeli końcowe stężenia. Mieszaniny uzupełnij do końcowej objętości buforem octanowym.						
	Probówka A		Probówka B		Probówka C	
Końcowe stężenie sacharozy →	20 mM		50 mM		300 mM	
Odczynnik ↓	Objętość w ml dodawanego roztworu					
0,5 M sacharoza	1		3		5	
Bufor octanowy	2		4		6	
Enzym		0,1		0,1		0,1
Objętość końcowa		3		3		3

**UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.**

Zadanie A.2 (1 pkt)

Jakiej zależności szybkości początkowej reakcji ( $V_0$ ) od stężenia początkowego substratu ( $S_0$ ) się spodziewasz, jeżeli poprawnie wykonałeś zadanie A.1? Wybierz odpowiedź spośród podanych.



**UWAGA. Odpowiedź zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Zadanie A.3 (6 pkt)

W tabeli 2. przedstawiono szybkości początkowe reakcji katalizowanej przez inwertazę przy różnych stężeniach początkowych substratu (sacharoza). Szybkość reakcji jest wyrażona w  $\mu\text{mol}$  cukrów redukujących  $\times \text{min}^{-1}$ . Wyznacz parametry kinetyczne  $K_M$  i  $V_{\text{max}}$  metodą Lineweavera-Burka. Pamiętaj, aby szybkość reakcji odpowiadała szybkości zużycia substratu reakcji.

Metoda Lineweavera-Burka jest przekształceniem równania Michaelisa-Menten do postaci liniowej (równanie prostej  $y = ax + b$ ):

$$\frac{1}{V_0} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]_0} + \frac{1}{V_{max}}$$

gdzie:  $V_0$  – szybkość początkowa reakcji [ $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ ];  $V_{max}$  – szybkość maksymalna reakcji [ $\mu\text{mol} \times \text{min}^{-1}$ ];  $[S]_0$  – stężenie początkowe substratu [mM];  $K_M$  – stała Michaelisa [mM].

Tabela 2. Szybkości początkowe reakcji w zależności od stężenia początkowego substratu.	
Stężenie substratu [mM]	Szybkość początkowa [ $\mu\text{mol}$ cukrów redukujących $\times \text{min}^{-1}$ ]
20	0,018
50	0,028
300	0,036

### Zadanie A.3.1

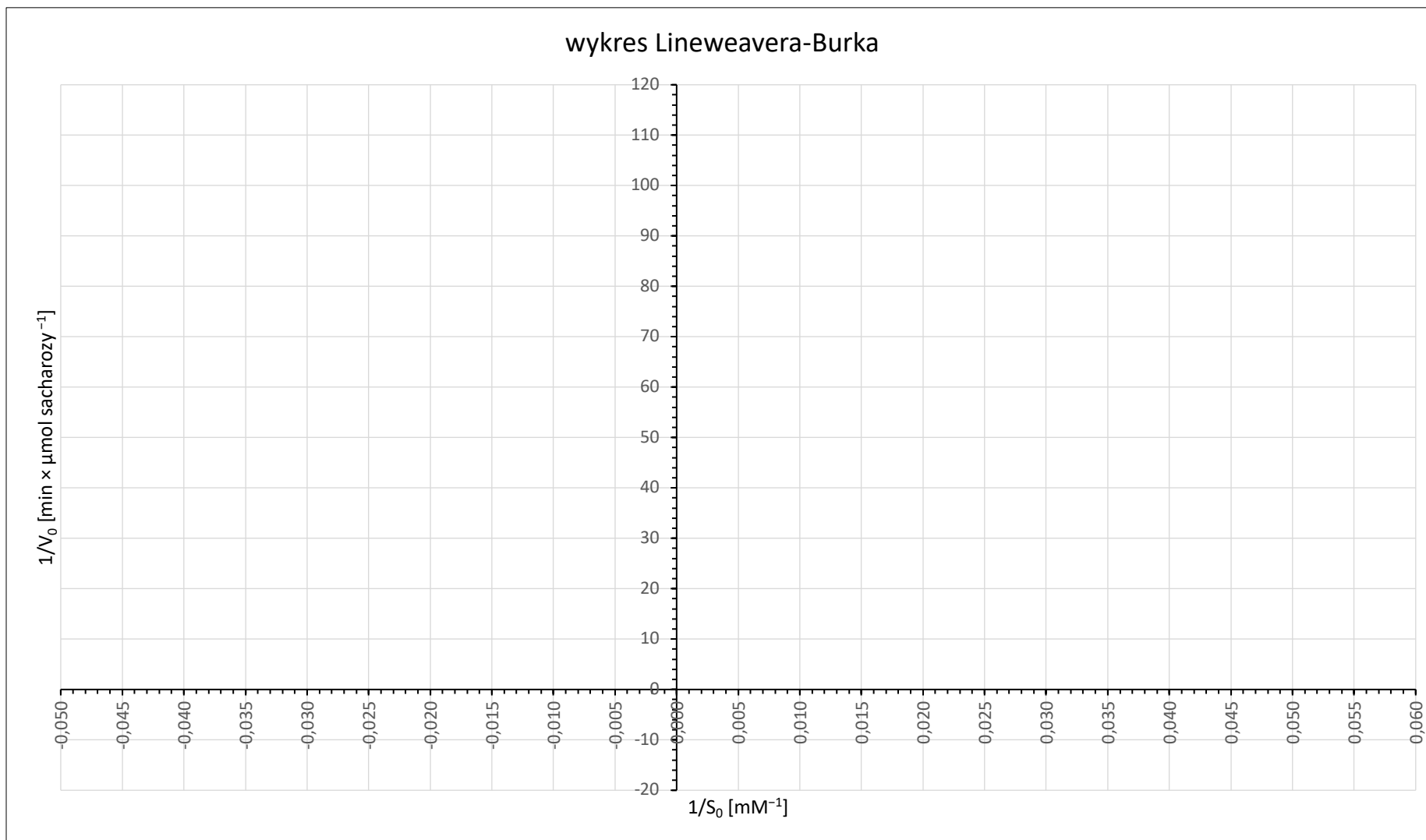
Wykonaj odpowiednie przeliczenia umożliwiające wykonanie wykresu Lineweavera-Burka.

Tabela 3. Dane do wykonania wykresu Lineweavera-Burka.			
Stężenie substratu [mM]	Szybkość początkowa [ $\mu\text{mol}$ sacharozy $\times \text{min}^{-1}$ ]	Odwrotność stężenia substratu [ $\text{mM}^{-1}$ ]	Odwrotność szybkości początkowej [ $\text{min} \times \mu\text{mol}$ sacharozy $^{-1}$ ]
20	I	IV	VII
50	II	V	VIII
300	III	VI	IX
	Zaokrąglenie do 3 miejsc po przecinku	Zaokrąglenie do 3 miejsc po przecinku	Zaokrąglenie do jedności

**UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.**

### Zadanie A.3.2

Na podstawie danych z tabeli 3. wykonaj wykres Lineweavera-Burka.



**UWAGA. Przerysuj wykres Lineweavera-Burka na kartę odpowiedzi.**

### Zadanie A.3.3

Na podstawie wykresu Lineweavera-Burka oblicz wartości  $K_M$  i  $V_{max}$ . Wartości liczbowe z wykresu odczytuj z dokładnością, którą umożliwiają działki skali. Wartości w polach c i d zaokrąglaj do dwóch miejsc po przecinku.

Przecięcie z osiami układu współrzędnych		parametr	wartość		jednostka
a		$K_M$	c		mM
b		$V_{max}$	d		$\mu\text{mol sacharozy} \times \text{min}^{-1}$

**UWAGA. Wartości wpisane w pola z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.**

**Część B.** Identyfikacja patogennej bakterii na podstawie testów mikrobiologiczno-biochemicznych (8 pkt)

#### Wprowadzenie

Do lekarza zgłosił się pacjent z dolegliwościami ze strony układu pokarmowego. Aby zidentyfikować czynnik etiologiczny i wdrożyć odpowiednie leczenie, próbki od pacjenta poddano badaniom mikrobiologiczno-biochemicznym. Przeanalizuj wyniki posiewów (Ryc. 1A, B) testu API (The analytical profile index) (Ryc. 1C) oraz antybiogramu (Ryc. 1D), a następnie odpowiedz na pytania B1–B8. Do odpowiedniej interpretacji Ryc. 1. wykorzystaj informacje podane na Ryc. 2, w Tabeli 4. oraz własną wiedzę.

#### Pytanie B1 (1 pkt)

Dlaczego *Staphylococcus aureus* nie rośnie na agarze MacConkeya?

<b>B1</b>	
-----------	--

**UWAGA. Odpowiedź wpisaną w pole z pogrubionym obramowaniem przenieś na kartę odpowiedzi.**

#### Pytanie B2 (1 pkt)

Czy *Escherichia coli* jest Gram-ujemna czy Gram-dodatnia?

<b>B2</b>	A. Gram-ujemna <input type="checkbox"/> / B. Gram-dodatnia <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------

**UWAGA. Odpowiedź zakoduj na karcie odpowiedzi.**

#### Pytanie B3 (1 pkt)

Które z bakterii fermentują laktozę? Wybierz jedną lub więcej odpowiedzi spośród podanych.

<b>B3</b>	A. <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> / B. <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> / C. <i>Klebsiella</i> sp. <input type="checkbox"/> / D. <i>Shigella</i> sp. <input type="checkbox"/> / E. <i>Proteus vulgaris</i> <input type="checkbox"/> / F. <i>Salmonella enterica</i> <input type="checkbox"/> / G. <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Pytanie B4 (1 pkt)

Które z bakterii rosnących na podłożu MacConkeya należą do *Enterobacteriaceae*? Wybierz jedną lub więcej odpowiedzi spośród podanych.

<b>B4</b>	A. <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> / B. <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> / C. <i>Klebsiella</i> sp. <input type="checkbox"/> / D. <i>Shigella</i> sp. <input type="checkbox"/> / E. <i>Proteus vulgaris</i> <input type="checkbox"/> / F. <i>Salmonella enterica</i> <input type="checkbox"/> / G. <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Pytanie B5 (1 pkt)

Jakimi bakteriami może być zakażony pacjent? Udziel odpowiedzi na podstawie porównania wyniku testu na agarze MacConkeya (Ryc. 1) ze wzorcem (Ryc. 2). Wybierz jedną lub więcej odpowiedzi

<b>B5</b>	A. <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> / B. <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> / C. <i>Klebsiella</i> sp. <input type="checkbox"/> / D. <i>Shigella</i> sp. <input type="checkbox"/> / E. <i>Proteus vulgaris</i> <input type="checkbox"/> / F. <i>Salmonella enterica</i> <input type="checkbox"/> / G. <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

spośród podanych. **UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Pytanie B6 (1 pkt)

Jakimi bakteriami może być zakażony pacjent? Udziel odpowiedzi na podstawie porównania wyniku testu na agarze SS (Ryc. 1) z informacjami na Ryc. 2 i w tabeli 4. Wybierz jedną lub więcej odpowiedzi spośród podanych.

<b>B6</b>	A. <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> / B. <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> / C. <i>Klebsiella</i> sp. <input type="checkbox"/> / D. <i>Shigella</i> sp. <input type="checkbox"/> / E. <i>Proteus vulgaris</i> <input type="checkbox"/> / F. <i>Salmonella enterica</i> <input type="checkbox"/> / G. <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Pytanie B7 (1 pkt)

Jaką bakterią jest zakażony pacjent? Udziel odpowiedzi na podstawie testu API (Ryc. 1). Wybierz jedną odpowiedź spośród podanych.

<b>B7</b>	A. <i>Escherichia coli</i> <input type="checkbox"/> / B. <i>Enterobacter aerogenes</i> <input type="checkbox"/> / C. <i>Klebsiella</i> sp. <input type="checkbox"/> / D. <i>Shigella</i> sp. <input type="checkbox"/> / E. <i>Proteus vulgaris</i> <input type="checkbox"/> / F. <i>Salmonella enterica</i> <input type="checkbox"/> / G. <i>Staphylococcus aureus</i> <input type="checkbox"/>
-----------	-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------

**UWAGA. Odpowiedź zakoduj na karcie odpowiedzi.**

Pytanie B8 (1 pkt)

Który z antybiotyków będzie nieskuteczny w leczeniu wykrytej infekcji? Wybierz jedną lub więcej odpowiedzi spośród podanych.



**B8**

A. streptomycyna  / B. chloramfenikol  / C. ampicylina  /  
D. gentamycyna  / E. ciprofloksacyna  / F. trimetoprim

***UWAGA. Odpowiedzi zakoduj na karcie odpowiedzi.***

**A)** Wynik posiewu próbki pobranej od pacjenta na agarze MacConkeya.



**B)** Wynik posiewu na agarze SS kolonii bakterii pobranej z szalki z agarem MacConkeya (punkt A).

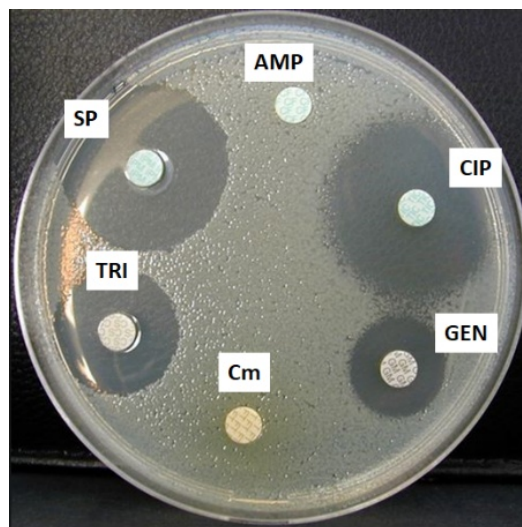


**C)** Wyniki testu API dla kolonii bakterii pobranej z szalki z agarem MacConkeya (punkt A).



**D)** Antybiogram dla kolonii bakterii pobranej z szalki z agarem MacConkeya (punkt A).

Oznaczenia użytych antybiotyków: SP – streptomycyna; Cm – chloramfenikol; AMP – ampicylina; GEN – gentamycyna; CIP – ciprofloksacyna; TRI – trimetoprim.



Rycina 1. Wyniki testów mikrobiologiczno-biochemicznych dla próbki pobranej od pacjenta.

Agar MacConkeya – jest stosowany do izolacji bakterii Gram-ujemnych jelitowych i różnicowania bakterii Gram-ujemnych fermentujących laktozę od bakterii Gram-ujemnych niefermentujących laktozy. Zawarty fiolet krystaliczny hamuje wzrost bakterii Gram-dodatnich, a czerwień obojętna barwi drobnoustroje fermentujące laktozę.



Agar SS to selektywny i różnicujący agar stosowany głównie do pozyskiwania *Salmonella* i *Shigella* z próbek pacjentów. Agar SS zawiera wskaźniki fermentacji laktozy i produkcji siarkowodoru, a także inhibitory zapobiegające wzrostowi bakterii Gram-dodatnich. Wynikiem produkcji siarkowodoru jest czarne zabarwienie kolonii bakteryjnych.

Test API (ang. *The Analytical Profile Index*) to test biochemiczny mający na celu identyfikację gatunku organizmu. Polega na określeniu zdolności mikroorganizmów do asymilacji, fermentacji lub rozkładu określonych związków chemicznych (Tabela 4).

Ryc. 2. Charakterystyka agaru MacConkeya, agaru SS oraz testu API.

Tabela 4. Tabela identyfikująca mikroorganizmy za pomocą systemu API.

Test	Substrat	Wykrywana aktywność enzymatyczna lub proces metaboliczny	Wynik negatywny (-)	Wynik pozytywny (+)	<i>Salmonella enterica</i>	<i>Shigella dysenteriae</i>	<i>Proteus vulgaris</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
ONPG	ONPG	$\beta$ -galaktozydaza	bezbarwny	Żółty	-	-	-	+	+	-
ADH	Arginina	Dihydrolaza argininy	Żółty	Czerwono-pomarańczowy	+	-	-	-	-	+
LDC	Lizyna	Dekarboksylaza Lizyny	Żółty	Czerwono-pomarańczowy	+	-	-	+	+	-
ODC	Ornityna	Dekarboksylaza ornityny	Żółty	Czerwono-pomarańczowy	+	-	-	+	+	-
CIT	Cytrynian	Wykorzystanie jako źródło węgla	Zielono-żółty	Niebiesko-zielony	+	-	+	-	+	-
H2S	Siarczan Sodu	Synteza siarkowodoru	Bezbarwny/szary	Wytrącenie/czarny	+	-	+	-	-	-
URE	Mocznik	Hydroliza mocznika	Żółty	Czerwono-pomarańczowy	-	-	+	-	-	+
TDA	Tryptofan	Deaminaza tryptofanu	Żółty	Brązowo-czerwony	-	-	+	-	-	-
IND	Tryptofan	Synteza indolu	Żółty	Czerwony (odczyt w ciągu 2 min.)	-	+	+	+	-	-
VP	Pirogronian sodu	Synteza acetoiny	bezbarwny	Różowy/Czerwony (odczyt w ciągu 10 min.)	-	+	-	-	+	-
GEL	Żelatyna	Żelatynaza	Brak dyfuzji czarnego barwnika	Dyfuzja czarnego barwnika	+	-	-	-	-	-
GLU	Glukoza	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	+	+	+	+	+
MAN	Mannitol	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	-	-	+	+	+
INO	Inozytol	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	-	-	-	+	-
SOR	Sorbitol	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	-	-	+	+	-
RHA	Ramnoza	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	+	-	+	+	-
SAC	Sacharoza	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	-	-	+	-	+	+
MEL	Melibioza	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	-	-	+	+	+
AMY	Amigdalina	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	-	-	+	-	+	-
ARA	Arabinoza	Fermentacja/utlenianie	Niebieski/zielony	Żółty	+	-	-	+	+	-