

**ЗАДАНИЯ**  
**практического тура заключительного этапа XXXII Всероссийской олимпиады**  
**школьников по биологии. 2016 г. г. Ульяновск. 11 класс**

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Начинающий сотрудник медицинской микробиологической лаборатории выделил в чистую культуру две бактерии (А и В) и попытался идентифицировать их с помощью тест-системы *Enterotube* (фирмы *La Roche*), которая предназначена для идентификации энтеробактерий (бактерий кишечной группы). В соответствии с требованиями техники безопасности при работе с патогенными организмами, по окончании работы засеянные пробирки были уничтожены, но результаты посевов документированы в виде цветных рисунков, которые прилагаются. Известно, что при идентификации одной из культур сотрудник, возможно, допустил грубую ошибку, а вторую идентифицировал корректно.

**Цель работы:** установить, в отношении какой из двух культур допущена ошибка, и каково таксономическое положение корректно идентифицированной бактерии.

**Даны:** две «модельные» культуры (непатогенные аналоги) бактерий А и В, выращенные на агаризованной среде, и цветные рисунки пробирок *Enterotube* с результатами посевов обеих культур.

**Задача работы:** исследовать обе культуры в соответствии с первыми стадиями прилагаемого ключа, проанализировать результаты посева в пробирки *Enterotube*, дать описание свойств каждого микроорганизма и, если возможно, идентифицировать. Объяснить, в чем заключалась ошибка сотрудника.

**Оборудование и материалы:** Микроскоп, спиртовка или горелка, предметные и покровные стекла, бактериологические петли, красители (генциан-фиолетовый, фуксин или сафранин), раствор Люголя, 96%-спирт, иммерсионное масло, пипетки, пинцеты, полоски фильтровальной бумаги, 3% раствор КОН, контейнеры или ванночки, вода, тест-полоски на оксидазу,  $H_2O_2$ , упрощенные ключ и таблицы с дифференцирующими (отличительными) признаками энтеробактерий, 2 чашки Петри с культурами бактерий, схематизированное цветное изображение пробирок тест-системы *Enterotube*.

**Ход работы (для каждой культуры бактерий)**

**1. Определить морфологию бактерий и их принадлежность по Граму.**

**Ход определения.**

1. Приготовить мазок культуры исследуемых бактерий. Для этого:
  - нанести на предметное стекло каплю воды и внести в нее петлю с биомассой бактерий;
  - распределить биомассу микроорганизмов по поверхности стекла;
  - высушить мазок на воздухе;
  - фиксировать жаром над пламенем горелки или спиртовки.
2. На фиксированный мазок поместить бумагу, окрашенную генцианвиолетом, смочить водой и выдержать 3-5 мин.
3. Снять бумагу. Не промывая водой, налить на препарат 2-3 капли раствора Люголя и выдержать 1 мин – до почернения мазка.
4. Слить раствор Люголя и обесцветить препарат этиловым спиртом. Для этого поместить на препарат 2-3 капли этилового спирта, слегка покачать стекло и слить спирт; повторить операцию 2 раза.
5. Промыть препарат водой.
6. Поместить на препарат бумагу, окрашенную фуксином, выдержать 1-2 мин.
7. Промыть препарат водой, высушить с помощью фильтровальной бумаги, нанести 1 каплю масляной иммерсии.
8. Сфокусировать препарат под микроскопом с максимальным увеличением.

*Показать преподавателю.*

Зарисовать клетки в листе ответов, отметить их морфологию и принадлежность по Граму (граммотрицательные клетки окрашиваются в красный цвет, грамположительные – в фиолетовый).

*Оценка: макс 3 балла за культуру*

**Примечание.** Если кому-то не удастся правильно приготовить или сфокусировать окрашенный препарат, можно провести упрощенное исследование. 1. Приготовить препарат раздавленная капля (на предметное стекло поместить каплю воды, петлей внести в нее клетки, накрыть покровным стеклом, поместить на столик микроскопа, сфокусировать с объективом 40х, показать преподавателю). 2. Провести экспресс-тест по Граму (поместить на предметное стекло каплю 3% КОН, внести петлей клетки, интенсивно растирать в течение 10-15 секунд, осторожно приподнять петлю: *если суспензия тянется за петлей, то клетки грамотрицательные, а если отрывается - грамположительные*).

*Максимальная оценка за упрощенный вариант исследования: макс. 1 балл за культуру*

**2. Провести тест на оксидазу.**

Поместить тест-полоску для определения оксидазы на культуру. В случае положительной реакции цвет полоски изменится, в случае отрицательной — останется без изменения.

*Оценка: макс. 0,5 балла за культуру*

**3. Провести тест на каталазу.**

На предметное стекло поместить каплю  $H_2O_2$  и петлей внести в нее клетки. В случае положительной реакции будет наблюдаться газообразование.

*Оценка макс. 0,5 балла за культуру*

**4. Проанализировать результаты посева в тест-системе *Enterotube*.**

Для этого констатировать изменение (или отсутствие изменения) цвета среды в каждой ячейке тест-системы по сравнению с исходным (контроль, К), интерпретировать с помощью таблицы 1 и отметить в Листе ответов соответствующие физиолого-биохимические признаки.

*Оценка макс. 1.5 балла за культуру*

**5. Определить таксономическое положение бактерий с помощью ключа и таблицы 2 (если возможно).**

*Оценка макс. 2 балла за культуру*

**6. Объяснить ошибку (ошибки) сотрудника.**

*Оценка макс. 1 балл*

**7. Написать, что Вы знаете об энтеробактериях?**

*Оценка макс. 4 балла*

*Максимальная оценка за задачу 20 баллов*

**Таблица 1. Выявление признаков бактерий в системе Enterotube**

	Название ячейки (субстрат реакции)	-	+	Выявляемый признак. Примечания
1	Глюкоза	Красный	Желтый	Брожение глюкозы с образованием кислых продуктов. Агаризованная среда покрыта слоем парафина для создания анаэробных условий, позволяющих осуществлять брожение, что характерно для всех представителей Enterobacteriaceae. Эта ячейка засеивается последней; наличие в ней роста свидетельствует также о том, что посевной материал попал во все ячейки пробирки.
2	Образование газа	Интактный слой парафина	Приподнятый слой парафина	Брожение глюкозы с образованием газа.
3	Лизин	Желтый	Фиолетовый	Декарбоксилирование лизина с образованием щелочного продукта кадаверина, что вызывает изменение цвета индикатора
4	Орнитин	Желтый	Фиолетовый	Декарбоксилирование орнитина с образованием щелочного продукта путресцина, что вызывает изменение цвета индикатора
5	H <sub>2</sub> S	Бежевый	Черно-коричневый	Образование H <sub>2</sub> S (выявляется в результате взаимодействия с железом)
6	Индол	Бесцветный	Красный	Наличие фермента триптофаназы, катализирующей образование индола из триптофана
7	Адонитол	Красный	Желтый	Разложение с образованием кислых продуктов, что вызывает изменение индикатора
8	Лактоза	Красный	Желтый	То же
9	Арабиноза	Красный	Желтый	То же
10	Сорбитол	Красный	Желтый	То же
11	Реакция Фогес-Проскауэра	Бесцветный	Красный	Брожение глюкозы с образованием ацетона (выявляется реактивом Фогес-Проскауэра)
12	Дульцитол	Зеленый	Желтый	Разложение дульцитола с образованием кислых продуктов, вызывающих изменение цвета индикатора
13	Фенилаланин	Зеленый	Темно-коричневый	Разложение фенилаланина с образованием пирувата
14	Мочевина	Бежевый	Пурпурный	Гидролиз мочевины с образованием аммония, что ведет к подщелачиванию среды и вызывает изменение цвета индикатора
15	Цитрат	Зеленый	Голубой	Способность к росту за счет использования цитрата и аммония как единственных источников углерода и азота

**Таблица 2. Дифференцирующие признаки энтеробактерий**

Семейство	Род	Вид	Признак														
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
<i>Escherichiaceae</i>	<i>Escherichia</i>		+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>Edwardsiellaceae</i>	<i>Shigella</i>		+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
<i>Salmonellaceae</i>	<i>Salmonella</i>		+	+	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	+
	<i>Arizona</i>		+	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+
	<i>Citrobacter</i>	<i>Freundii</i>	+	+	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
		<i>Amalonaticus</i>	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	-	-	-	+	+
		<i>Diversus</i>	+	+	-	+	-	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
<i>Proteaceae</i>	<i>Proteus</i>	<i>Vulgaris</i>	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+
		<i>Mirabilis</i>	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
	<i>Morganella</i>	<i>Morganii</i>	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-
	<i>Providentia</i>	<i>Alcalifaciens</i>	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
		<i>Stuartii</i>	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+
		<i>Rettgeri</i>	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	+	+
<i>Klebsiellaceae</i>	<i>Enterobacter</i>	<i>Cloacae</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
		<i>Sakazaki</i>	+	+	-	+	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
		<i>Gergoviae</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+
		<i>Aerogenes</i>	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	+
		<i>Agglomerans</i>	+	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Hafnia</i>	<i>Alvei</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
	<i>Serratia</i>	<i>Marcescens</i>	+	+	+	+	-	-	+	-	-	+	+	-	-	-	+
		<i>Liquefaciens</i>	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
		<i>Rubidaea</i>	+	-	+	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	-	+
	<i>Klebsiella</i>	<i>Pneumoniae</i>	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+
		<i>Oxytoca</i>	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
		<i>Dzaenae</i>	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
<i>Yersiniaceae</i>	<i>Yersinia</i>	<i>Enterocolitica</i>	+	-	-	+	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	-
		<i>pseudotuberculosis</i>	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-

**Ключ для выбора тест-системы *Enterotube***

- |   |     |
|---|-----|
| 1. Бактерии грамотрицательные, спор не образуют | Да  |
| Другое  | Нет |
| 2. Оксидазоположительные                        | Нет |
| Другое  | Да  |
| 3. Факультативные анаэробы (сбраживают глюкозу) | Да  |
| Другое  | Нет |

Фамилия \_\_\_\_\_  
 Имя \_\_\_\_\_  
 Регион \_\_\_\_\_  
 Шифр \_\_\_\_\_

Шифр \_\_\_\_\_  
 Вариант \_\_\_\_\_  
 Итого: \_\_\_\_\_

**ЛИСТ ОТВЕТОВ НА ЗАДАНИЯ**  
**практического тура заключительного этапа XXXII Всероссийской олимпиады**  
**школьников по биологии. 2016 г. г. Ульяновск. 11 класс**

**МИКРОБИОЛОГИЯ**

Признак		Бактерия А	Бактерия В
<b>1</b> Рисунок клеток			
Морфология, принадлежность по Граму			
<b>2</b> Наличие оксидазы			
<b>3</b> Наличие каталазы			
<b>4</b> Физиолого-биохимические признаки (анализ результатов <i>Enterotube</i> ); К – без посева.		Цвет, значение признака (+ / -)	Цвет, значение признака (+ / -)
Признак			
1. Брожение глюкозы с образованием кислоты			
2. Брожение глюкозы с образованием газа			
3. Декарбоксилирование лизина			
4. Декарбоксилирование орнитина			
5. Образование H <sub>2</sub> S			
6. Наличие триптофаназы (образование индола)			
7. Разложение адонитола с образованием кислоты			
8. Брожение лактозы с образованием кислоты			
9. Брожение арабинозы с образованием кислоты			
10. Брожение сорбитола с образованием кислоты			
11. Брожение глюкозы с образованием ацетона			
12. Разложение дульцитола с образованием кислоты			
13. Образование пирувата из фенилаланина			
14. Гидролиз мочевины			
15. Рост за счет цитрата и аммония как единственных источников С и N			
<b>5</b> Таксономическое положение бактерии			
<b>6</b> Объяснение ошибки (на обороте листа)			
<b>7</b> Что вы знаете об энтеробактериях (на обороте)			