

# 27-я Международная Биологическая Олимпиада

17-23 июля 2016 года  
Ханой, Вьетнам



Практический тест 3

## **БИОХИМИЯ И МИКРОБИОЛОГИЯ**

Общее количество баллов: 100  
Продолжительность: 90 минут



## ДОРОГИЕ УЧАСТНИКИ,

Это практическое задание состоит из трех экспериментов:

- **Эксперимент 1: Экспрессия, очистка и характеристика белков (40 баллов)**
- **Эксперимент 2: Антиоксидантная активность экстракта кофе (30 баллов)**
- **Эксперимент 3: Молочнокислое брожение (30 баллов)**

Пожалуйста, обратите внимание на следующее:

- Пожалуйста, впишите свою **Страну** и **Код студента** в предусмотренную для этого клетку.
- Записывайте свои ответы только в отдельный **Лист Ответов**. **Засчитываться будут только ответы, вписанные в Лист Ответов**.
- Убедитесь, что вы получили все материалы и оборудование, перечисленные в каждом задании. Если что-либо отсутствует или повреждено, немедленно поднимите **КРАСНУЮ** карточку.
- Старайтесь выполнять работу без ошибок. Пролитые жидкости или испорченное оборудование вам предоставляться не будут .
- Гель-электрофорез в эксперименте 1 нельзя будет провести в последние 30 минут. Рекомендуем вам начать с выполнения этого задания.
- Убедитесь, что вы получили распечатку измерений спектрофотометра для ответа на вопросы в эксперименте 2.
- Прекратите отвечать на вопросы и отложите ручку немедленно после звонка. После окончания теста вложите **Лист Ответов, Лист с Заданиями** и **Распечатанные Результаты** в предоставленный конверт.
- Выносить бумагу, материалы и оборудование из лаборатории запрещено.  
**Удачи!!!**

### Материалы и оборудование

**Оборудование и материалы для всех трех экспериментов**

<b>Название</b>	<b>Количество</b>
Микропипетка P1000 (100-1000 µl (мкл))	1 штука
Микропипетка P200 (20-200 µl)	1 штука
Микропипетка P20 (2-20 µl)	1 штука
Наконечники для микропипетки P1000	1 коробка
Наконечники для микропипетки P20 и P200	1 коробка
Деионизованная вода ( <b>dH<sub>2</sub>O</b> )	1 бутылка
Круглый пластиковый контейнер для жидких отходов ( <b>Liquid waste</b> )	1 штука
Квадратный пластиковый контейнер для твердых отходов ( <b>Solid waste</b> )	1 штука
Секундомер	1 штука
Перчатки	1 пара
Бумажные салфетки	1 коробка
Клей	1 тюбик
Красная карточка	1 штука
Зеленая карточка	1 штука
Калькулятор	1 штука
Маркер	1 штука
Наклейки для кода студента	5 штук
Защитные очки	1 штука

*Для эксперимента 1*

<b>Название</b>	<b>Количество</b>
Камера для SDS-PAGE электрофореза и источник тока	1 набор
Гребенка для геля	1 штука
Контейнер для геля (с кодом студента)	1 штука
Пробирки для микроцентрифуги объемом 1,5мл	10 штук
Кассета с полиакриламидным гелем, собранная в камере для гель-электрофореза	1 штука
Пурпурная микроцентрифужная пробирка с двукратным буфером для нанесения 2X SDS-PAGE ( <b>Buffer</b> )	1 штука
Желтая микроцентрифужная пробирка с 8 мкл раствора белковых маркеров молекулярной массы ( <b>M</b> )	1 штука
Микроцентрифужная пробирка с 30 мкл клеток BL21 <b>без</b> IPTG ( <b>NO_IPTG</b> )	1 штука
Микроцентрифужная пробирка с 30 мкл клеток BL21 с IPTG ( <b>PTG</b> )	1 штука
Микроцентрифужная пробирка с 30 мкл осадка клеточного экстракта, полученного из клеток BL21 с IPTG ( <b>Pellet</b> )	1 штука
Микроцентрифужная пробирка с 30 мкл супернатанта (надосадочной жидкости) клеточного экстракта, полученного из клеток BL21 с IPTG ( <b>Super</b> )	1 штука
Микроцентрифужная пробирка с 30 мкл раствора очищенных белков ( <b>Puri-P</b> )	1 штука
Пробирка Falcon (с зеленой крышкой) с 40 мл раствора красителя для SDS-PAGE ( <b>STAIN</b> )	1 штука

Для эксперимента 2

Название	Количество
Микропланшет на 96 лунок с кодом студента ( <b>не дотрагивайтесь до нижней стороны микропланшета</b> )	1 штука
Голубая микроцентрифужная пробирка с 300 $\mu$ l раствора аскорбиновой кислоты (1 мг/мл) ( <b>АА</b> )	1 штука
Голубая микроцентрифужная пробирка с 300 $\mu$ l экстракта кофе (5 мг/мл) ( <b>СС</b> )	1 штука
Коричневая бутылка с 10 мл раствора DPPH (0,2 мМ) ( <b>DPPH</b> )	1 штука

Для эксперимента 3

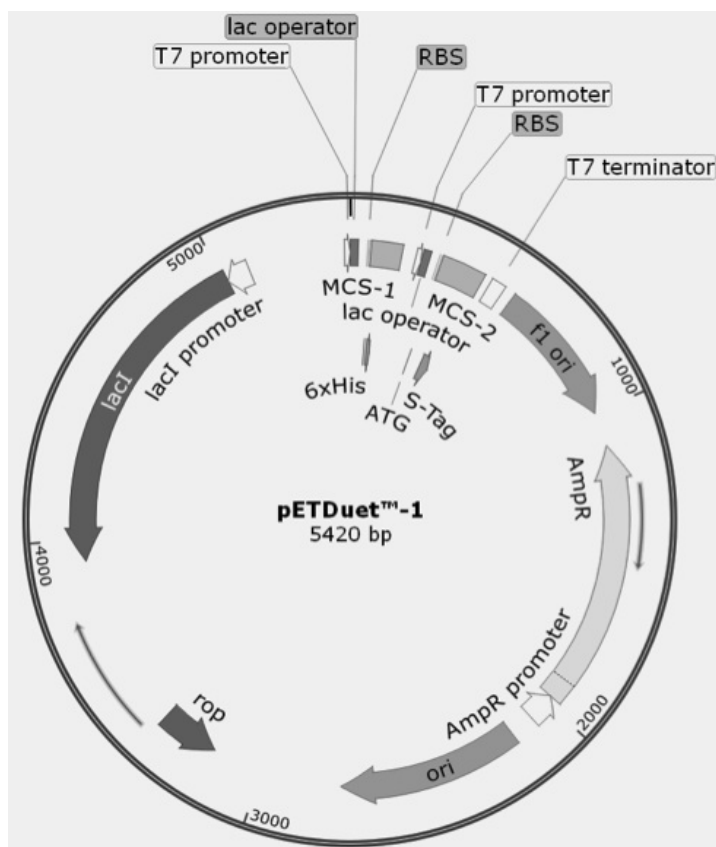
Название	Количество
Штатив с бюреткой, содержащей 25 мл 0,1 М раствора NaOH, в зажиме	1 набор
Магнитная мешалка	1 штука
Магнит для магнитной мешалки	1 штука
Пинцет	1 штука
Мерный цилиндр (10 мл)	1 штука
Мерный цилиндр (25 мл)	1 штука
Стаканчики (100 мл)	8 штук
Портативный pH-метр Hanna и отвертка	1 штука
Промывалка с водой ( <b>H<sub>2</sub>O</b> )	1 штука
Пузырек с буфером pH 4.01 ( <b>pH 4.01</b> )	1 штука
Пузырек с буфером pH 7.01 ( <b>pH 7.01</b> )	1 штука
Пробирки Falcon с 15-30 мл супернатантов культуральной жидкости (пробы <b>A0, A2, A3 и A5</b> )	4 штуки

# ЭКСПЕРИМЕНТ 1

## ЭКСПРЕССИЯ, ОЧИСТКА И ХАРАКТЕРИСТИКА БЕЛКОВ (40 БАЛЛОВ)

### Введение

Белки Н и В являются важными белками у *Aeromonas hydrophila*. Для их изучения ученый хотел осуществить коэкспрессию (одновременный синтез) этих белков в клетках *E.coli*. Для этого ген *b* был вставлен в полилинкер 1 (multiple cloning site, MCS-1), а ген *h* был вставлен в полилинкер 2 (MCS-2) вектора для экспрессии р1 (Рис.1.1). Клетки *E.coli* BL21 были трансформированы полученным вектором (р1-*b-h*) и синтез белка в них был индуцирован IPTG (изопропил- $\beta$ -D-1-тиогалактопиранозидом). Затем белки были очищены аффинной хроматографией, при которой белок, содержащий гексагистидиновую метку (6xHis-tag) связывается с никелевой колонкой. На последнем этапе синтез белков и степень их очистки были исследованы методом SDS-PAGE (гель-электрофореза в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия), который применяется для разделения белков в зависимости от их молекулярного веса. Учтите, что белок Н меньше белка В.



**Рис.1.1. Карта экспрессионного плазмидного вектора р1**

((ori: точка начала репликации, rop: репрессор праймера, AmpR: устойчивость к ампициллину))

Клетки из изолированной колонии *E.coli*, содержащие вектор р1-*b-h*, культивировались в 50 мл среды LB. Культивирование проводили при 37°C до достижения оптической плотности при 600 нм (OD600) 0,6. Для анализа экспрессии и степени очистки рекомбинантных белков ученый собрал следующие клетки и образцы белков:

- **NO\_IPTG.** 1 мл культуры был перенесен в отдельную пробирку а и культивировался при 20°C в течение 16 часов ( $OD_{600} = 2,4$ ), а затем был отцентрифугирован. Супернатант слили, а осадок клеток ресуспендировали в 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O и смешали с 50  $\mu$ l двукратного буфера для нанесения образцов (2X SDS-PAGE буфер) для получения конечного объема 100  $\mu$ l.

В оставшихся 49 мл культуры синтез белка был индуцирован добавлением IPTG. Культивирование продолжали при 20°C в течение 16 часов.

- **IPTG:** 1 мл культуры с IPTG ( $OD_{600} = 1.4$ ) отцентрифугировали. Супернатант слили, а осадок клеток ресуспендировали в 50  $\mu$ l H<sub>2</sub>O и смешали с 50  $\mu$ l двукратного буфера для нанесения образцов (2X SDS-PAGE буфер) для получения конечного объема 100  $\mu$ l.

Оставшиеся 48 мл культуры отцентрифугировали, супернатант слили, а осадок с клетками ресуспендировали с 2 мл никель-связывающего буфера. Затем провели лизис клеток, после чего провели центрифугирование. Собирали и осадок, и супернатант.

- **Осадок (Pellet):** Осадок клеток, полученный из лизата IPTG-клеток ), ресуспендировали в 2 мл буфера, а затем смешали с 2 мл 2X SDS-PAGE буфера для нанесения образцов (сток-раствор осадка).
- **Супернатант (Super):** 10  $\mu$ l супернатанта, полученного из лизата IPTG-клеток, смешали с 10  $\mu$ l 2X SDS-PAGE буфера для нанесения образцов.
- **Puri-P:** Остаток супернатанта наносился на никелевую колонку для очистки белков. Очищенные белки элюировали с колонки буфером для элюции общим объемом 2 мл . Затем 10  $\mu$ l очищенных белков смешивали с 10  $\mu$ l 2X SDS-PAGE буфера для нанесения образцов.

Все образцы для SDS-PAGE кипятили при 100°C в течение 5 минут.

*Спланируйте ваш SDS-PAGE эксперимент для анализа экспрессии белков.*

Стандартная конечная концентрация общего белка для анализа методом SDS-PAGE должна быть эквивалентна  $5 \times 10^6$  клеток/ $\mu$ l. Сначала рассчитайте концентрацию клеток в каждом образце, считая, что значение  $OD_{600}$  равное 1 соответствует  $8 \times 10^8$  клеток/мл и учитывая разведение каждого образца в процессе его получения.

### Q.1.1. (6 БАЛЛОВ)

Рассчитайте и запишите объёмы ( $\mu$ l) образцов в таблицу **в Листе ответов**.  
Округляйте числа до первого знака после запятой.

## Ход работы

1. Исходя из приведенной выше таблицы, приготовьте в предоставленных пустых пробирках для микроцентрифуги все образцы для SDS-PAGE. Перемешайте каждый образец, набирая и выпуская жидкость из пипетки 4-5 раз

*После завершения этой стадии поднимите вашу Зеленую карточку. Ассистент покажет вам, куда нужно вносить образцы, и поможет прикрепить наклейку с кодом студента к камере для электрофореза.*

2. Внесите по 20  $\mu$ л каждого образца в лунки SDS-PAGE геля Образцы надо наносить в порядке от пробирки 1 до 6. Для нанесения образца используйте микропипетку P20 с наконечником на 20  $\mu$ л, чтобы набрать и аккуратно внести его сверху в соответствующую лунку. (**Рис.1.2**).



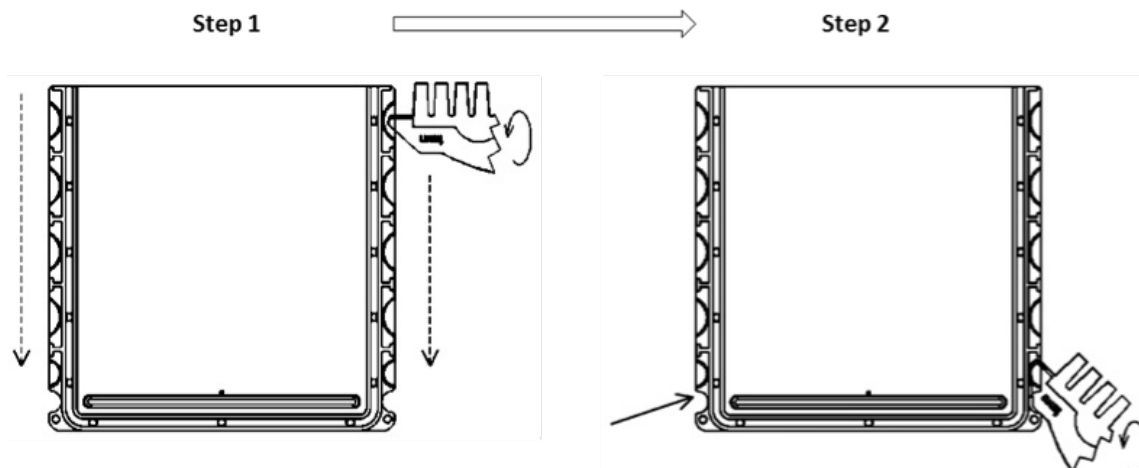
**Рис.1.2. Нанесение образцов на гель для SDS-электрофореза**

3. Лаборант включит прибор для электрофореза на 20 минут и сообщит вам о необходимости включения таймера на 20 минут.

*Во время проведения электрофореза выполняйте другие задания. Через 20 минут поднимите пожалуйста вашу Зеленую карточку, чтобы лаборант вернул вам ваш SDS-PAGE гель.*

4. Выньте SDS-PAGE гель из кассеты при помощи гребенки для геля, как показано на рисунке ниже (**Рис.1.3**) и поместите гель в предназначенный контейнер (ванночку).





**Рис.1.3. Извлечение геля из пластиковой кассеты**

**Шаг 1.** Разомкните верхнюю открытую сторону кассеты, введя верхушки гребенки в каждую выемку по периметру кассеты и аккуратно поворачивая гребенку. Начните с верхней части, а затем двигайтесь вниз по каждой стороне кассеты.

**Шаг 2.** После того, как вы откроете кассету, поместите скошенный край гребенки под углом 45 градусов между пластинкой и каждым нижним концом и легко поверните.

**Шаг 3.** Осторожно разделите две половинки кассеты.

5. Добавьте 40 мл раствора красителя (**STAIN**) в контейнер с гелем и поставьте качаться на качалку на 10 мин.
6. Слейте краситель из контейнера для геля и промойте гель 3 раза деионизированной водой.

*После окончания, поднимите зеленую карточку, чтобы ассистент сфотографировал ваш гель.*

### **Q.1.2. РЕЗУЛЬТАТЫ SDS-PAGE (10 БАЛЛОВ)**

После того, как ваш SDS-PAGE гель был сфотографирован, приклейте фотографию в отведенное для этого место место в **Листе ответов**.

### **Q.1.3. (4 БАЛЛА)**

На основании информации, представленной на **Рис.1.4А** ниже, постройте на предоставленной миллиметровой бумаге в **Листе ответов** график зависимости молекулярных весов, как минимум, пяти белков-маркеров от величин их относительного пробега  $R_f$ . ( $R_f$ : отношение расстояния, пройденного белком, к расстоянию, пройденному красителем).

#### Q.1.4. (4 БАЛЛА)

При помощи графика из Q.1.3 и геля SDS-PAGE определите молекулярный вес белков H и B.

#### Q.1.5. (4 БАЛЛА)

На основании результатов SDS-PAGE, укажите, является ли каждое из следующих утверждений правильным или неправильным. Обозначьте знаком “√” Правильные или Неправильные утверждения в **Листе ответов**.

- A На среде LB с IPTG наблюдается суперэкспрессия белка H.
- B Белок B полностью растворим в никель-связывающем буфере.
- C Белки H и B взаимодействуют друг с другом
- D Большинство рекомбинантных белков связывалось с никелевой колонкой.

## Q.1.6. (4 БАЛЛА)

На основании детальной рестрикционной карты вектора экспрессии p1 (Рис.1.5), укажите, являются приведенные ниже утверждения Правильными или Неправильными. Отметьте значком “√” Правильные или неправильные утверждения в Листе Ответов.

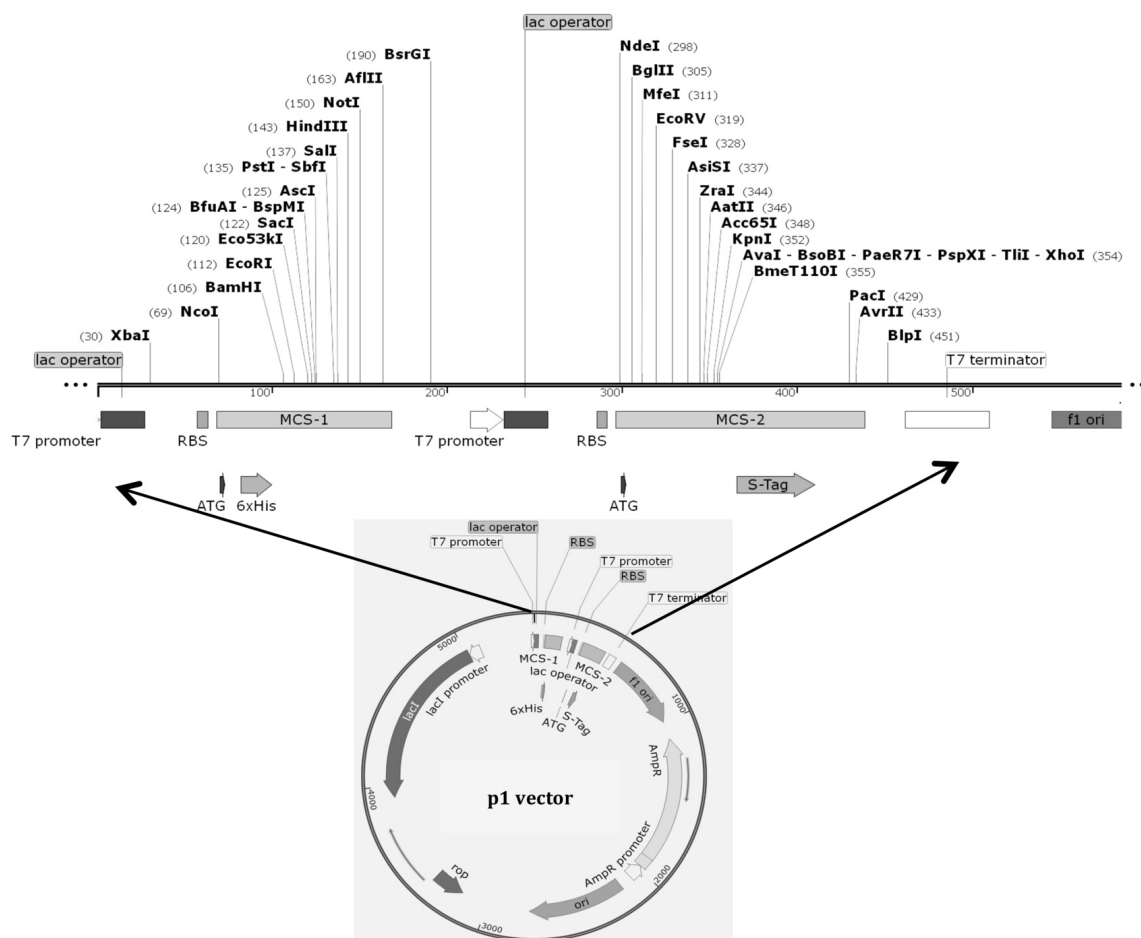
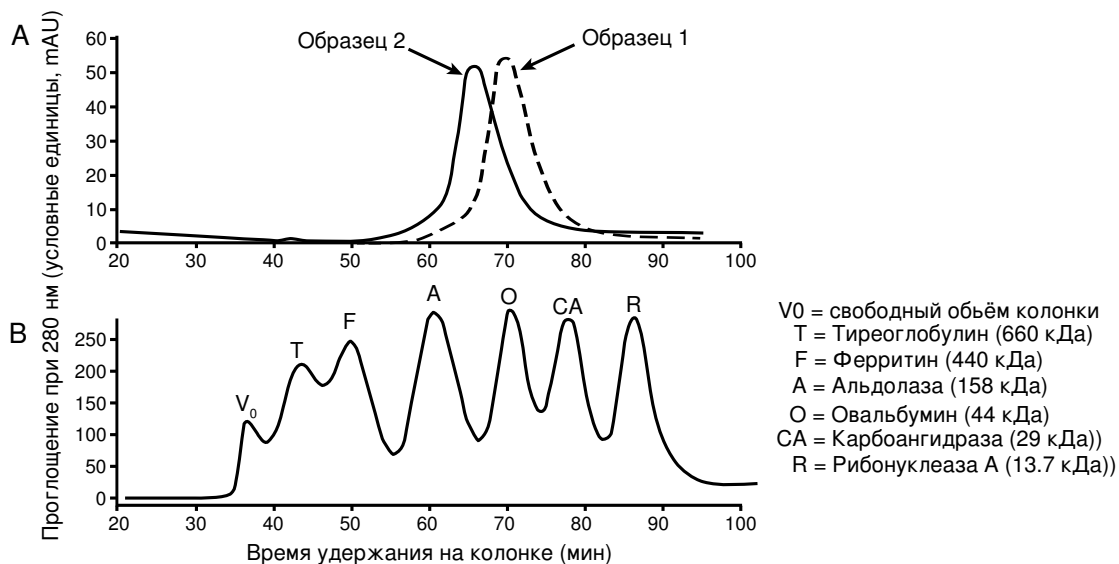


Рис.1.5. Детальная рестрикционная карта вектора экспрессии p1 (RBS: сайт связывания рибосомы)

- A** Для введения гена *b* в MCS-1, можно использовать как *SalI*, так и *BamHI*.
- B** Гены *h* и *b* должны клонироваться в одинаковой ориентации, чтобы их можно было экспрессировать одновременно.
- C** Гены *h* и *b* должны находиться в одной рамке считывания, чтобы их можно было экспрессировать одновременно.
- D** Для сохранения плазмиды в культуральную среду должен быть добавлен ампициллин.

Для характеристики олигомерного состояния белков H и B, были приготовлены 3 образца белков: (1) белок H; (2) белки H и B, полученные в вышеописанном эксперименте; (3) белок B. Оказалось, что бразцы 1 и 2 были прозрачными, но в образце 3 большая часть белка выпадала в осадок. Затем образцы 1 и 2 были нанесены на колонку для гель-фильтрации. На рисунке **Рис.1.6А** представлены соответствующие пофилы элюции. Размеры эталонных белков-маркеров для гель-фильтрации на колонке показаны на **Рис.1.6В**.



**Рис.1.6. Гель-фильтрация белков Н и В**

(А) Хроматограмма образца 1 (пунктирная линия) и образца 2 (сплошная линия)

(В) Хроматограмма белков с известной молекулярной массой

### Q.1.7. (4 БАЛЛА)

Расчитайте и запишите относительный размер белков согласно результатам гель-фильтрации для образца 1 и 2 в таблицу в **Листе ответов**.

### Q.1.8. (4 БАЛЛА)

Отметьте значком “√” в **Листе Ответов**., являются ли приведенные ниже утверждения Правильными или Неправильными,

**А** Белок Н существует в виде мономера.

**В** Белки Н и В вероятно существуют в виде гетеродимеров.

**С** Белок Н способствует стабилизации белка В.

**Д** При гель-фильтрации в нативных условиях время удержания белка пропорционально его молекулярному весу.

## ЭКСПЕРИМЕНТ 2

### АНТИОКСИДАНТНАЯ АКТИВНОСТЬ ЭКСТРАКТА КОФЕ (30 БАЛЛОВ)

#### Введение

Биологическое окисление приводит к возникновению активных радикалов кислорода, которые могут вызывать серьезные поражения клеток. Антиоксиданты - это молекулы, способные связывать радикалы и ингибировать реакции окисления. В эту группу входят такие вещества, как тиолы, аскорбиновая кислота и полифенолы. Кофе, приготовленный из поджаренных кофейных зерен, является потенциальным источником антиоксидантов.

В этом эксперименте был проведен анализ антиоксидантной активности 2,2-дифенил-1-пикрилгидразила (DPPH), в котором это соединение восстанавливается, что сопровождается потерей розовой окраски. Для описания антиоксидантной активности применяется коэффициент  $SC_{50}$ , который представляет собой концентрацию образца, которая связывает 50% радикалов DPPH. Поглощение раствора DPPH измеряется при 517 нм. Поглощением растворителя можно пренебречь. Поглощение контрольного образца (в отсутствие антиоксиданта,  $A_c$ ) и опытного образца ( $A_s$ ) используется для расчета процента ингибирования ( $SC\%$ ) для каждой концентрации образца по следующей формуле:

$$SC\% = (A_c - A_s) \times 100 / A_c ,$$

На основании логарифмов концентраций серии образцов и соответствующего процента ингибирующего действия антиоксиданта строится график, по которому будет определяться величина  $SC_{50}$ .

В этом опыте исследовалась антиоксидантная активность зерен вьетнамской разновидности кофе (*Coffea canephora*). Порошок кофейных зерен (1г) суспендировали в деионизированной воде и инкубировали при 80 °C в течение 30 минут, затем профильтровали и довели объем водой для получения 200 мл экстракта.

#### Ход работы и вопросы

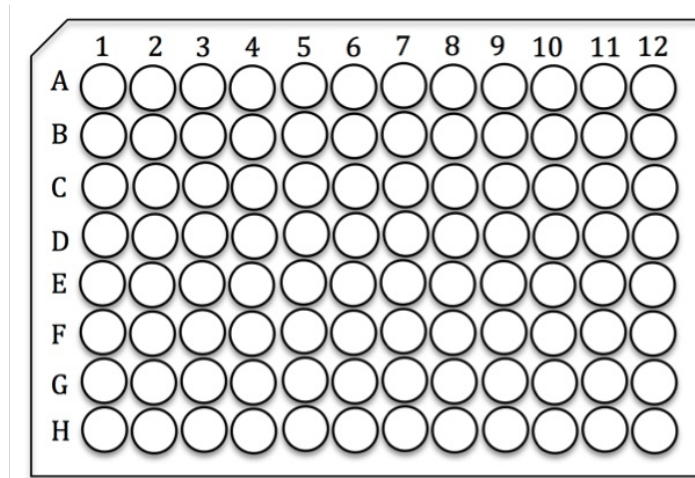


Рис.2.1. 96-луночный микропланшет

Микропланшет с 96-лунками может быть использован для серийного разведения. Положение лунок по вертикали на микропланшете обозначено номерами (1-12), тогда как буквы (A-H) указывают на ряды по горизонтали

1. Приготовьте при помощи микропипетки 4 раствора аскорбиновой кислоты (AA1 - AA4 в лунках A1 - A4 96-луночного микропланшета) и 4 раствора экстракта кофе (CC1 - CC4 в лунках A6 - A9 96-луночного микропланшета), **последовательно разводя** растворы в 2 раза.. Необходимо сделать минимальные концентрации аскорбиновой кислоты и экстракта кофе равными 0.025 мг/мл и 0.625 мг/мл, соответственно. Объем каждого раствора должен составлять 200  $\mu$ l перед началом следующего разведения. Обратите внимание, что если вы сделаете ошибку в любом из этих разведений, используйте лунки H1 - H4 для растворов аскорбиновой кислоты AA1 - AA4 и/или лунки H6 - H9 для растворов экстракта кофе.

### Q.2.1 (4 БАЛЛА)

Впишите в таблицу в **Листе ответов** ваши расчеты для приготовления разведений аскорбиновой кислоты и экстракта кофе.

2. Наберите пипеткой по 20 мкл растворов аскорбиновой кислоты и/или экстракта кофе из лунок в ряду A перенесите их в соответствующие лунки в рядах B, C и D. Если на этой стадии вы сделаете ошибку, действие можно повторить, используя соответствующие лунки в рядах E, F и G.
3. Внесите пипеткой 20  $\mu$ l H<sub>2</sub>O в лунки B11, C11 и D11.
4. Внесите пипеткой по 180  $\mu$ l раствора DPPH в каждую из лунок, приготовленных в шагах 2 и 3.
5. Закройте микропланшет крышкой и оставьте при комнатной температуре на 10 минут. Включите таймер.

*После завершения этого шага поднимите зеленую карточку, чтобы ассистент измерил поглощение на спектрофотометре и вернул вам распечатку результатов.*

### Q.2.2. (5 БАЛЛОВ)

Рассчитайте логарифмы концентраций ( $\log_{10}$ ) растворов аскорбиновой кислоты и экстракта кофе и внесите их в таблицу в **Листе ответов** (с точностью до двух знаков после запятой). Используйте калькулятор для вычисления логарифма следующим образом;

- Нажмите клавишу **ON** для включения калькулятора
- Нажмите клавиши **SHIFT**, **CLR**, **2** и **=** для возврата в режим вычислений
- Нажмите клавишу **log**
- Введите число
- Нажмите клавишу **=**

Рассчитайте средние значения поглощения для каждого разведения и внесите данные в таблицу в **Листе ответов**.

### Q.2.3. (5 БАЛЛОВ)

Используя рассчитанные вами значения, постройте график зависимости процента ингибирования от логарифма концентрации ( $\log_{10}$ ) аскорбиновой кислоты на бумаге для графиков в **Листе ответов**.

### Q.2.4. (5 БАЛЛОВ)

Рассчитайте значения  $SC_{50}$  для аскорбиновой кислоты и экстракта кофе и внесите ответы в таблицу в **Листе ответов**. (Вы можете нарисовать соответствующий график для экстракта кофе на координатной бумаге, предоставленной в Q.2.3, но этот график не будет оцениваться).

### Q.2.5. (3 БАЛЛА)

С использованием такого же метода были определены следующие значения  $SC_{50}$  экстрактов некоторых разновидностей кофе:

Экстракт кофе	$SC_{50}$
X	3,8 мг/мл
Y	2,6 мг/мл

Сравните антиоксидантную активность разных сортов кофе, включая данные вашего опыта (Z), и расположите сорта кофе в порядке убывания антиоксидантной активности от самого сильного до самого слабого и внесите результаты в соответствующие клетки в **Листе ответов**.

### Q.2.6. (4 БАЛЛА)

Будем считать, что в вашем эксперименте поглощение всех смесей растворов различных разведенных экстрактов кофе и DPPH было одинаковым и незначительным. Укажите, является ли каждое из приведенных ниже утверждений правильным или неправильным.

Для каждого утверждения отметьте значком “√” в **Листе ответов**, является ли оно Правильным или Неправильным.

- A** Антиоксидантная активность разведенных экстрактов кофе является незначительной.
- B** Для более точного определения антиоксидантной активности необходимо провести другой опыт с более высокой концентрацией образцов.
- C** Полученные результаты объясняются активностью антиокислительных ферментов в экстрактах кофе.
- D** Если бы в лунки был добавлен NADH, полученные значения поглощения не изменились бы.

## Q2.7. (4 БАЛЛА)

Студент определил антиоксидантную активность по той же методике, как вы (Протокол А) и по видоизмененной методике (Протокол А\*). Результаты представлены в таблице ниже.

	Протокол А	Протокол А*
SC <sub>50</sub> (мг/мл)	1,95	3,9

Какие из следующих изменений могли бы привести к более высокому значению SC<sub>50</sub>?

Для каждого утверждения обозначьте знаком “√” в **Листе ответов**, Правильное оно или Неправильное.

**А** В Протоколе А\* студент использовал 0.1 мМ раствор DPPH.

**В** В Протоколе А\* студент вносил в каждую лунку по 10 мл образца.

**С** После добавления DPPH студент инкубировал микропланшет более короткое время, чем в Протоколе А.

**Д** Студент использовал более хороший растворитель для антиоксидантов.



## ЭКСПЕРИМЕНТ 3. МОЛОЧНОКИСЛОЕ БРОЖЕНИЕ (30 БАЛЛОВ)

### Введение

Недавно ученый выделил гомоферментный штамм молочнокислой бактерии *Lactobacillus* sp. VN156 из широко используемой во Вьетнаме сброженной горчицы.. В данном опыте *Lactobacillus* sp. VN156 выращивали на среде MRS, Исходная кислотность (pH) культуральной среды составила 5.6. Во время культивирования были взяты пробы для измерения оптической плотности (OD) бактериальных клеток при 600 нм (**Рис.3.1**). Значение OD<sub>600</sub> равное 1 соответствует  $2 \times 10^8$  клеток/мл. Пробы A0, A2, A3 и A5 представляют собой супернатант образцов, который будет использован для анализа продукции молочной кислоты.

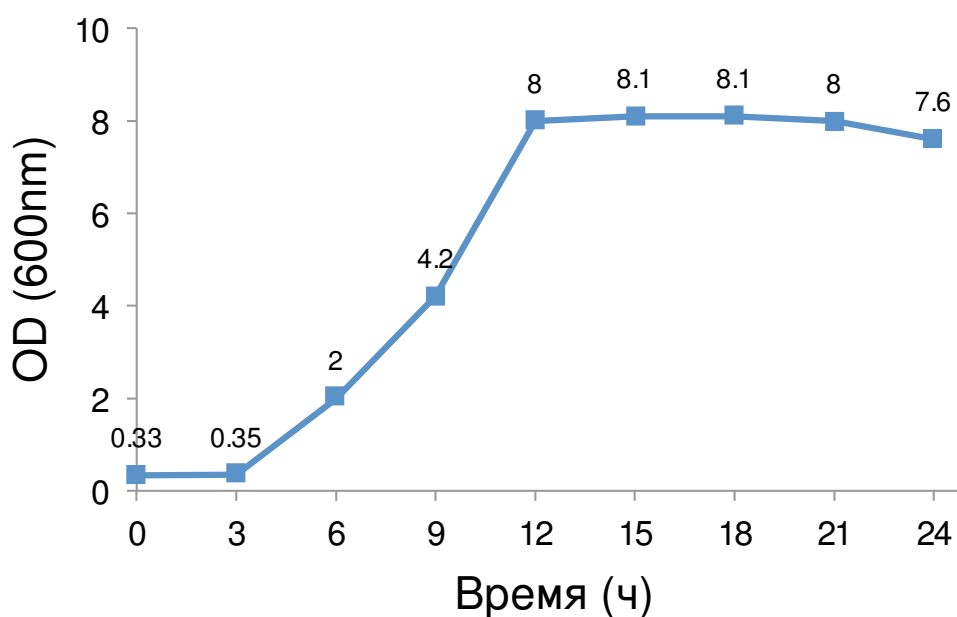


Рис.3.1. Кривая роста *Lactobacillus* sp. VN156

### Q.3.1. (3 БАЛЛА)

Считая, что на **Рис.3.1**, приведена реальная кривая роста, рассчитайте время удвоения (ч) числа клеток для *Lactobacillus* sp. VN156 во время экспоненциальной фазы роста и внесите это значение в **Лист ответов**.

### Q.3.2. (3 POINTS)

1 мл культуры после 9 ч культивирования разбавили свежей средой MRS. Рассчитайте и запишите в **Листе ответов** каким будет количество бактериальных клеток через 6 ч культивирования.

### Калибровка pH-метра

Используйте портативный pH-метр Hanna (**Рис 3.2**) для измерения pH следующим образом:



**Рисунок 3.2. Hanna портативный pH - метр**

Проведите калибровку pH-метра согласно **Рис 3.3.**

- Включите pH-метр нажатием кнопки ON / OFF.
- Снимите защитный колпачок и промойте кончик электрода водой, аккуратно протрите бумажной салфеткой.
- Погрузите кончик электрода в буферный раствор с pH 7,01. Убедитесь, что электрод полностью погружен в раствор (около 2 см от конца электрода должно находиться в растворе). Дождитесь стабилизации показаний.
- С помощью отвертки отрегулируйте регулятор pH 7 , чтобы на дисплее появилось значение pH **7,01**
- Промойте pH-электрод водой, аккуратно протрите бумажной салфеткой.
- Погрузите кончик электрода в буферный раствор с pH 4,01. Дождитесь стабилизации показаний.
- С помощью отвертки, отрегулируйте переключатель pH 4, чтобы на дисплее появилось значение pH **4,01**
- *Калибровка завершена.*
- **Примечание:** Если вы выключили pH-метр, вам необходимо будет снова провести калибрование.

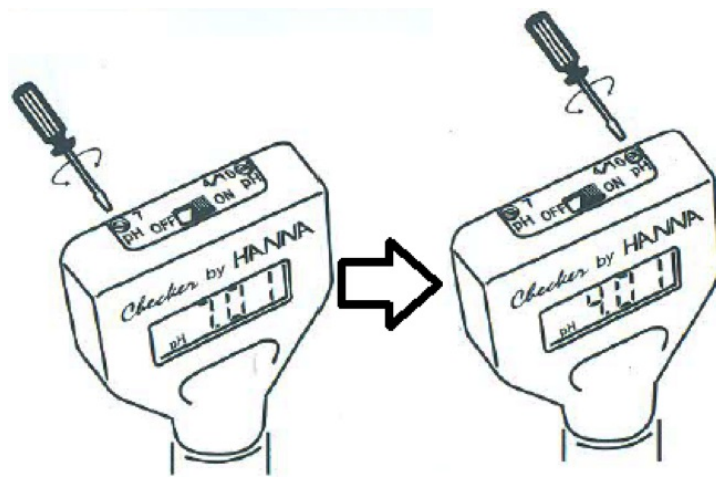


Рис.3.3. Калибрование рН-метра

### Титрование молочной кислоты

Титрование – это аналитический метод, позволяющий количественно определить содержание анализируемого вещества в растворе. Метод основывается на полной химической реакции между анализируемым веществом и реагентом (титрантом) известной концентрации, который добавляется к раствору. В этой работе метод титрования будет использован для определения концентрации молочной кислоты при помощи раствора гидроксида натрия (0,1 М), как показано на **Рис.3.4**.

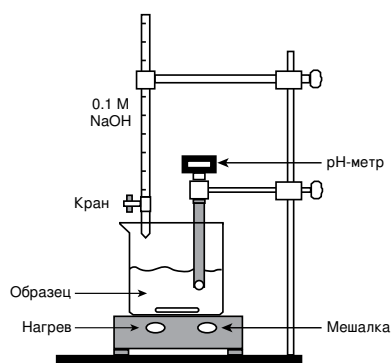


Рис.3.4. Установка для титрования

### Q.3.3. (2 БАЛЛА)

Рассчитайте объёмы образца (мл) и воды (мл) , которые необходимо использовать согласно данным **таблицы Q.3.2**, и запишите значения в таблицу в **Листе Ответов**.

1. На основании ваших расчетов проведите разведение каждого образца в мерном стакане на 100 мл. Приготовьте для каждого образца два повтора при помощи цилиндра объемом 25 мл для деионизованной воды, микропипетки и цилиндра объемом 10 мл для образцов.
2. Осторожно опустите магнит в разведенный образец и опустите рН метр достаточно глубоко в раствор (около 2 см от верхушки электрода погружены в раствор). Закрепите рН электрод таким образом, чтобы при перемешивании магнит не повредил его. Начните перемешивание медленно и запишите начальный объем раствора 0,1М NaOH.
3. Откройте закрыватель бюретки (кран), чтобы титровальный раствор медленно капал в стакан с образцом. Прекратите добавлять основание (NaOH) при изменении значения рН образца до нейтрального (6,95-7,05). Запишите конечный объем раствора 0,1М NaOH.
4. После каждого титрования осторожно выньте рН электрод из раствора и промойте его водой. Выньте магнит пинцетом и промойте водой.
5. Повторите шаги 2–4 с каждым образцом.

### Q.3.4. (9 БАЛЛОВ)

Запишите объем раствора 0.1 М NaOH, использованного для титрования каждого образца в таблицу, предоставленную в **Листе ответов**.

### Q.3.5. (10 БАЛЛА)

Рассчитайте среднее значение объема 0,1 М NaOH, необходимое для титрования 30 мл каждого исходного образца, и концентрацию молочной кислоты в каждом образце. Запишите значения в таблицу в **Листе ответов**.

Примечание: Молекулярная масса NaOH = 40, молочной кислоты C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O<sub>3</sub> = 90

### Q.3.6. (3 БАЛЛА)

Используя **Рис. 3.1** и считая, что значение оптической плотности OD<sub>600</sub> равное 1.0 соответствует плотности бактериальных клеток 2 x 10<sup>8</sup> клеток/мл, можно считать, что концентрация молочной кислоты будет увеличиваться на 1 г/л, если число бактериальных клеток возрастает на 2 x 10<sup>8</sup> клеток/мл. Рассчитайте плотность бактериальных клеток (клетки/мл), если через 11 часов культивирования концентрация молочной кислоты составляет 6 г/л, и запишите это значение в **Лист ответов**.

Запишите значение в **Лист ответов**.

**КОНЕЦ ПРАКТИЧЕСКОГО ТЕСТА 3**