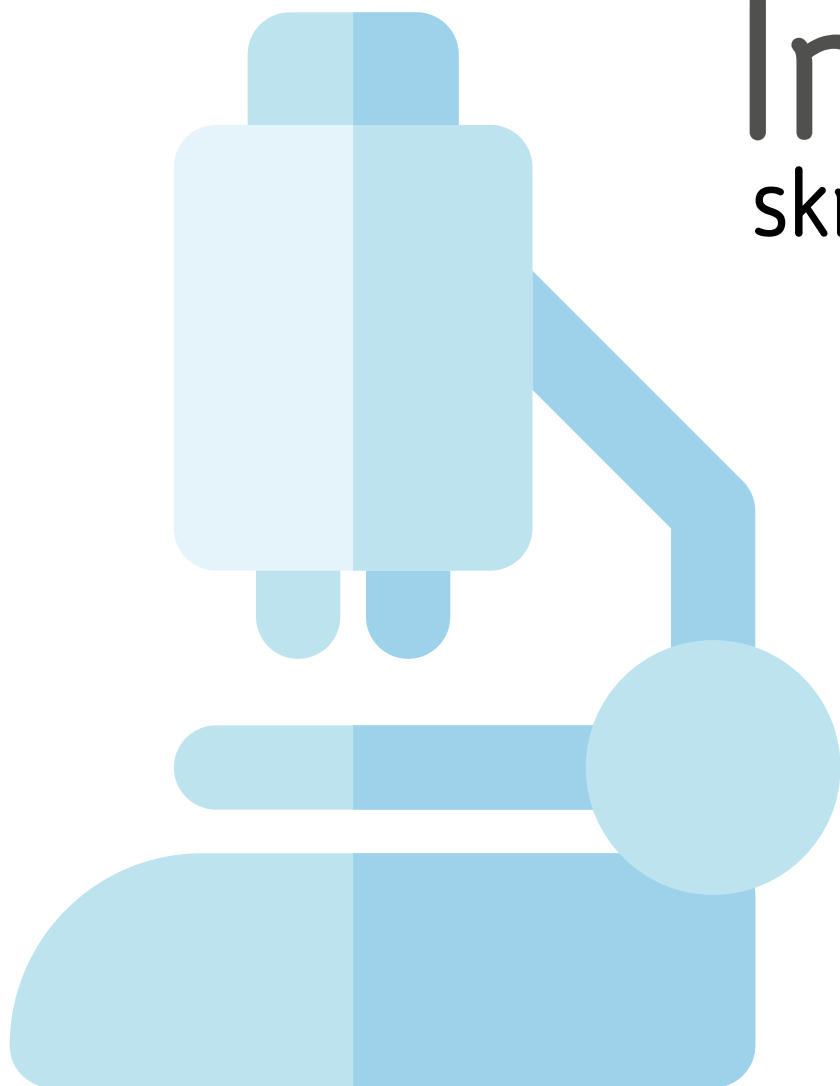


**MKMG**

moderne kompetencije za modernu gimnaziju

# In vitro skripta



[www.moderna-gimnazija.eu](http://www.moderna-gimnazija.eu)



Fond: Europski socijalni fond  
 Operativni program: Razvoj ljudskih potencijala 2007.-2013.  
 Tip natječaja: Otvoreni poziv na dostavu projektnih prijedloga  
 (bespovratna sredstva)  
 Nadležno tijelo: Ministarstvo znanosti, obrazovanja i sporta  
 Područje: obrazovanje, vještine i cjeloživotno učenje

#### INFO O PROJEKTU

Naziv projekta: Moderne kompetencije za modernu gimnaziju  
 Naziv poziva za Promocija kvalitete i unaprjeđenje sustava odgoja i obrazovanja na  
 dostavu projektnih srednjoškolskoj razini  
 prijedloga:  
 Broj ugovora HR.3.1.20 – 0027

#### OPĆI PODACI O NOSITELJU PROJEKTA

Naziv prijavitelja IV. gimnazija "Marko Marulić"  
 OIB 79378469023  
 Adresa Zagrebačka 2, Split, [www.gimnazija-cetvrta-mmarulic-st.skole.hr](http://www.gimnazija-cetvrta-mmarulic-st.skole.hr)

#### ODGOVORNA OSOBA NOSITELJA PROJEKTA

Ime i prezime Ninočka Knežević, prof.  
 Kontakt telefon +385 21 348 380  
 Kontakt mail [ninocka.knezevic@skole.hr](mailto:ninocka.knezevic@skole.hr)

#### PROJEKTNI PARTNERI

Naziv pravne osobe	OIB	Mjesto
Sveučilište u Splitu, Prirodoslovno-matematički fakultet	20858497843	Split
Sveučilište u Splitu, Medicinski fakultet	02879747067	Split
Sveučilište u Splitu, Sveučilišni odjel za stručne studije	29845096215	Split

Autori: Maja Antolić, prof. Višnja Banić, prof., Mirjana Boban, prof. Ninočka Knežević, prof.,  
 Ojdana Barčot, prof., Ivana Vuletić, prof., Marina Podrug, prof., Gorjana Karaman, prof.,  
 Mercedes Knežević, prof. Maša Rajević, prof.

*Izrada skripte "In vitro" fakultativniog predmeta: In Vitro financirana je sredstvima projekta „Moderne kompetencije za modernu gimnaziju“ dodijeljenih iz Operativnog programa Razvoj ljudskih potencijala 2007.-2013., iz Europskog socijalnog fonda i odražava stavove autora*

## UVOD

Živimo u razdoblju velikih znanstvenih otkrića. Izloženi smo brojnim i ponekad kontradiktornim informacijama, a treba odlučiti o vlastitim postupcima ili prosuditi pouzdanost podataka koji su nam na raspolaganju. Svatko od nas stoga treba temeljno biološko znanje kako bi izgradio vlastite stavove. Svrha i cilj poučavanja predmeta In vitro je razvijati prirodoslovnu pismenosti i kritičko mišljenje kroz kontekst eksperimentalne biologije kao znanstvene discipline koja se temelji na promatranju, mjerenju, opisivanju i tumačenju pojava i procesa u živome svijetu. Cilj je učenike potaknuti na suradnju, komunikaciju, uvažavanje tuđeg mišljenja, kritički odnos prema informacijama i argumentirano iznošenje ideja. Kroz predmet će se razvijati svijest o potrebi osobnog doprinosa očuvanju bioraznolikosti i prirodne baštine Hrvatske. Razvijanjem empatije prema drugim živim bićima učenik će usvojiti poštovanje prema životu i odgovornost za očuvanje prirode.

U kurikulu nastavnoga predmeta In vitro definirana su tri koncepta:

1. Procesi i međuovisnosti u živome svijetu;
2. Oblici rada i korištenje laboratorijskih alata;
3. Prirodoznanstveni pristup.

Određeni su kao „velike ideje“ ključne za stjecanje znanja, vještina i stavova koje svaki građanin treba ponijeti u život i njima se služiti.

## 1. PROCESI I MEĐUOVISNOSTI U ŽIVOM SVIJETU

Istraživanje i uočavanje međusobnog odnosa živih bića i načina njihova funkcioniranja u promjenjivim uvjetima okoliša rezultira konceptualnim razumijevanjem procesa i međudjelovanja u prirodi. Razumijevanje postojeće ravnoteže u prirodi usmjerava učenika na promišljanje o čovjekovoj povezanosti s okolišem, opasnosti od nepromišljenog djelovanja i ljudskoj odgovornosti u održavanju uravnoteženog stanja u prirodi. Održivi razvoj teži očuvanju biosfere što zahtijeva promišljeno i inovativno djelovanje u zaštiti prirode uz razvoj prihvatljive tehnologije i racionalne potrošnje.

## 2. OBLICI RADA I KORIŠTENJE LABORATORIJSKIH ALATA

Ovaj koncept omogućava stjecanje teoretskih znanja i praktičnih vještina potrebnih za sigurno i precizno izvođenje laboratorijskih vježbi. Vještine se stječu radom u laboratoriju koji obuhvaća sljedeće segmente:

- › upoznavanje laboratorijskog pribora
- › pravila ponašanja i mjera sigurnosti tijekom eksperimenta
- › preciznu primjenu protokola pri izvođenju vježbe

## 3. PRIRODOZNAVSTVENI PRISTUP

Prirodnoznanstveni pristup se temelji na načelima i pravilima znanstvenog istraživanja. Utvrđenim znanstvenim metodologijama propituju se postojeća znanja ili se dolazi do novih spoznaja kroz traženje odgovora na novopostavljena pitanja. Planiranje učenja i razumijevanje provodi se opažanjem, postavljanjem istraživačkih pitanja, analizom usvojenih znanja, postavljanjem eksperimentalnog okvira za dokazivanje istraživačkog pitanja, mjerenjem, analizom izmjerenih podataka i njihovom interpretacijom kroz raspravu te zaključivanjem. Kroz ovu domenu učenik će unaprijediti svoje sposobnosti opažanja, analiziranja, grafičkog i tabelarnog prikazivanja dobivenih rezultata te bolje upoznati laboratorijske i informacijsko - komunikacijske tehnologije i opremu. Predmet In vitro tematski i sadržajno povezuje prirodoslovno, društveno-humanističko i tehničko područje kurikula.

Vaši autori

## ŠTO JE IN VITRO UZGOJ?

U početku znanstvenih istraživanja procesa u živim bićima pokusi su se odvijali na živim organizmima (biljnim, životinjskim ili ljudskim) in vivo metodom (lat. unutar živog). Kasnije su se počeli koristiti biološki eksperimenti kultiviranja tkiva izvan živućeg organizma. Kako su se provodili u staklenim posudama – čašama, epruvetama ili Petrijevim zdjelicama uveden je pojam in vitro (lat. u staklu). Danas pojam in vitro ima vrlo široko značenje i koristi se za biološku proceduru koja se odvija izvan organizma za razliku od in vivo procedure koja se odvija unutar živog organizma.

In vitro kultura stanica, tkiva i organa je metoda uzgoja stanica i tkiva izvan organizma u posudama s hranidbenom podlogom u sterilnim uvjetima. Hranidbena podloga treba sadržavati mikro i makro elemente, šećer kao izvor energije, vitamine, hormone rasta, pojedine aminokiseline i često agar kao inertni materijal. Uspješnost kulture stanica, tkiva ili organa ovisi o izboru sastava hranidbene podloge što otvara mogućnosti istraživanja najpogodnije podloge za istraživanu vrstu.

Robert Koch (1843 – 1910.,) njemački bakteriolog, uveo je laboratorijski uzgoj bakterija u staklenim, Petrijevim posudama s hranidbenom podlogom. Bakterije su vrlo rašireni organizmi no u prirodnoj sredini, in vivo (uživo), teško se može pouzdano pratiti njihovo razmnožavanje i druge osobine. Hranidbene podloge trebaju bakterijama osigurati uvjete slične uvjetima u kojima žive kada su u svojoj sredini, kako bi mogle obavljati sve životne funkcije i razmnožavati se. Ovaj uzgoj omogućava i istraživanje djelovanja različitih tvari (poput antibiotika) na životne funkcije bakterija.

Antibiotici su kemijski spojevi koji na mikroorganizme djeluju tako da ih ubijaju ili sprječavaju njihovo razmnožavanje. Neracionalna potrošnja antibiotika dovela je do razvoja rezistencije bakterija na antibiotike. Bakterije su rezistentne na antibiotike kada su određeni antibiotici izgubili svoju sposobnost da ubiju ili zaustave rast pojedine bakterije. Rezistentne bakterije preživljavaju u prisutnosti antibiotika i nastavljaju umnožavanje. Razvoj rezistencije razmjern je potrošnji antibiotika u određenoj sredini i brži je od otkrivanja novih antibiotika. Za mnoge prirodne tvari u literaturi se navodi da imaju antibiotsko djelovanje. Naš cilj bio je istražiti antibiotsko djelovanje prirodnih tvari poput eteričnih ulja, češnjaka, sjemenki grejpa, propolisa ili alga. Preduvjet za izvođenje eksperimentalnog dijela našeg istraživačkog rada je poznavanje temeljnih mikrobioloških metoda.

**VAŽNO**

Prije nego se upustimo u laboratorijski rad, potrebno je poznavati određena pravila koja će nam pomoći u zaštiti samoga sebe, ali i ostalih suradnika unutar laboratorija.

## **PRAVILA PONAŠANJA U LABORATORIJU I SIGURNOSNE MJERE**

### **PRAVILA PONAŠANJA**

- › Rad u laboratoriju započnite tek nakon dobivanja uputa.
- › Tijekom rada surađujte s nastavnikom i međusobno.
- › Budite oprezni i disciplinirani pri radu.
- › Pomagalima, priborom i materijalom rukujte vrlo oprezno (posebice s kemikalijama).
- › Za vrijeme rada pravite bilješke i izradite crteže.
- › Na kraju rada operite i pospremite pribor, bacite otpatke i obrišite radnu površinu.

### **SIGURNOSNE MJERE PRI RADU**

- › U laboratoriju nemojte jesti, piti ni pušiti.
- › Dugu kosu treba povezati vrpcom.
- › Ne pokušavajte izvesti pokuse koji nisu predviđeni.
- › U laboratoriju nemojte raditi sami, bez nazočnosti profesora.
- › O svakoj nezgodi koja se dogodi obavijestite profesora.
- › Ako ne znate točno kako izvesti pokus, pitajte profesora.
- › **NIKAD NEMOJTE IMPROVIZIRATI!**
- › Kad zagrijavate sadržaj epruvete, nikad njezin otvor ne okrećite prema sebi ili drugoj osobi.
- › Ne bacajte u slivnik krute otpatke.
- › Nakon bacanja tekućih otpadaka slivnik uvijek isperite velikom količinom vode.
- › Ako prolijete neku kemikaliju, odmah to počistite kako biste spriječili moguću nezgodu.
- › Ako prolijete kemikaliju po koži, odmah je dobro operite velikom količinom vode i o tome obavijestite profesora.
- › Prije napuštanja laboratorija ruke dobro operite sapunom

## 1. SKUPINA RADIONICA – TEME

- 1.1. Priprema hranidbene podloge
- 1.2. Nacjepljivanje čvrste hranidbene podloge (rasprostranjenost mikroorganizama)
- 1.3. Čista kultura
- 1.4. Izrada antibiograma
- 1.5. Obrada antibiograma



## VJEŽBE

### 1.1. Priprema hranidbene podloge

#### MATERIJAL:

1. dehidrirana hranjiva podloga (agarna podloga)
2. žlica
3. tehnička vaga
4. plastična čaša za vaganje podloge
5. destilirana voda
6. menzura od 100 ml
7. Erlenmeyerova tikvica od 250 ml
8. boca za skuhanu podlogu
9. električno kuhalo
10. lonac



#### POSTUPAK:

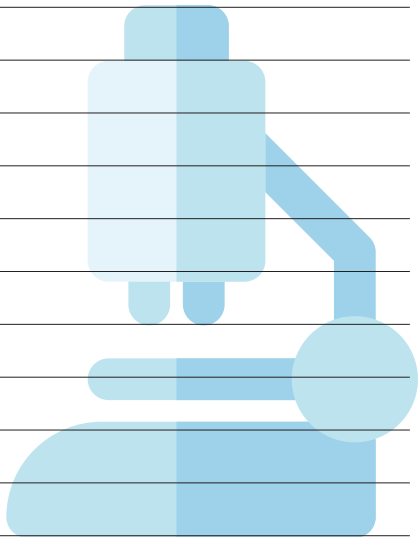
1. Uključite električno kuhalo i stavite na njega lonac s otprilike 4 cm vode.
2. Odvažite na tehničkoj vagi praškastu dehidriranu podlogu potrebnu za pripremu 150 ml hranjive podloge.
3. U Erlenmeyerovoj tikvici suspendirajte potrebnu količinu agarne podloge u 150 ml destilirane vode.
4. Kada je voda u loncu prokuhala stavite u nju tikvicu sa suspendiranom podlogom. Tijekom 10 minuta kuhanja povremeno promiješajte sadržaj u tikvici.
5. Nakon kuhanja otopljenu podlogu prelijte u za to predviđenu bocu. Ovako pripremljenu podlogu je prije upotrebe potrebno sterilizirati prema uputama proizvođača. Izlijte čvrstu hranjivu podlogu (unaprijed pripremljenu i steriliziranu) u sterilne petrijevke.

S OBZIROM NA NEDOSTATNU OPREMLJENOST VEĆINE NAŠIH ŠKOLA, PREPORUČAMO UZETI GOTOVU HRANIDBENU PODLOGU (NPR. IZ ZAVODA ZA ZAŠTITU ZDRAVLJA ILI NEKOG MIKROBIOLOŠKOG LABORATORIJA)





## BILJEŠKE



A series of horizontal lines for taking notes, with a blue microscope icon overlaid on the right side.

## 1.2. Nacjepivanje čvrste hranidbene podloge (rasprostranjenost mikroorganizama)



Mikroorganizmi su široko rasprostranjeni. U zraku, vodi, na površini tijela čovjeka, životinja, biljaka i drugih predmeta koji nas okružuju, mnoge vrste mikroorganizama su redovni stanovnici. Želite li to provjeriti na hranidbene podloge možete nacijepiti mikroorganizme. Sami odaberite hoćete li nacijepiti mikroorganizme koji lebde u zraku, nalaze se na jagodicama prstiju, usnicama, kosi ili negdje drugo.

### POSTUPAK

Pripremljenu čvrstu hranjivu podlogu u petrijevki nacijepite/inokulirajte mikroorganizmima.

### MATERIJAL:

petrijevke s hranidbenim podlogama

### POSTUPAK:

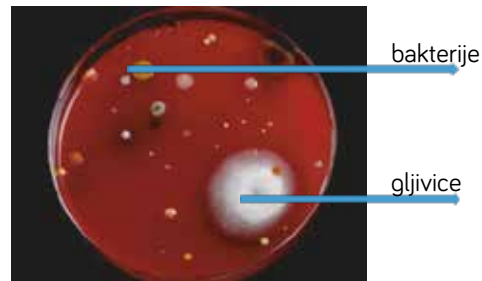
1. Petrijevku s hranjivom podlogom nacijepite zrakom tako da je ostavite otklopljenu tijekom 15 minuta. Mjesto (prostoriju) na kojem želite obaviti kvalitativno ispitivanje kakvoće zraka odaberite sami.
2. Jagodicu neoprano prsta lagano pritisnite na hranjivu podlogu. Postupak ponovite s jagodicom prsta oprane ruke.
3. Poljubite hranidbenu podlogu (bez straha, podloga je sterilna)
4. Inkubirati tijekom 48 h pri 25 °C.
5. Rezultate očitajte na način da izbrojite razvijene kolonije bakterija.
6. Uz pomoć nastavnika naučite razlikovati bakterijske kolonije od plijesni. (slike 1.,2.,3.)



Slika 1. Bakterije na hranidbenoj podlozi (mješovita kultura)



Slika 2. Bakterije s ruke osmogodišnjeg djeteta nakon igre vani



Slika 3. Podloga s bakterijama i gljivicama





### 1.3. Izolacija čiste kulture

Presaðivanje/precjepljivanje je sterilno prenošenje mikroorganizama s jedne hranidbene podloge na drugu. Služi pripravi i održavanju kultura mikroorganizama na krutim ili tekućim hranidbenim podlogama. S obzirom da mikroorganizmi u okolišu žive u zajednicama, za potrebe laboratorijskog uzgoja razvijeni su postupci izolacije čistih kultura. Takva kultura se sastoji od samo jedne vrste stanica. Zbog toga su takve kulture pogodne za istraživanje uzgojnih, morfoloških i biokemijskih osobina. Čista kultura se dobiva izolacijom pojedinačnih kolonija iz mješovite kulture razvijene na agaru. Na ovaj način je izolirana čista kultura koja se sastoji od samo jedne bakterijske vrste.

#### MATERIJAL:

1. bakterijske kolonije razvijene na podlozi
2. sterilan hranjivi agar
3. stalak za epruvete
4. mikrobiološka ušica
5. špiritna lampa, šibice
6. 70%-tni etanol

#### POSTUPAK:

1. Prebrišite radnu površinu vatom/ubrusom natopljenim 70%-tnim etanolom i kada se osuši upalite špiritnu lampu.
2. U desnu ruku uzmete mikrobiološku ušicu i sterilizirajte je u plamenu špiritne lampe.
3. Lijevom rukom odignite poklopac petrijevke s kolonijama. Mikrobiološkom ušicom zahvatite malo od jedne jasno izolirane kolonije, vratite poklopac na petrijevku.
4. U jednom potezu povucite cik-cak trag po površini agara. Sterilizirajte mikrobiološku ušicu.
5. Inkubirati tijekom 48 h, pri 25°C



Slika 4. Čista kultura



## 1.4. Izrada antibiograma

Difuzijskim testom odrediti otpornost čiste bakterijske kulture prema antibioticima.

### MATERIJAL:

1. čista kultura
2. sterilna hranjiva podloga
3. sterilna petrijevka
4. sterilna epruveta
5. stalak za epruvete
6. sterilna pipeta od 1 ml
7. propipeta
8. sterilna fiziološka otopina
9. mikrobiološka ušica
10. špiritna lampa, šibice
11. 70%-tni etanol
12. pinceta
13. diskovi s različitim antibioticima (po izboru)



### POSTUPAK:

1. Prebrišite radnu površinu vatom/ubrusom natopljenim 70%-tnim etanolom i upalite špiritnu lampu.
2. Označite petrijevku inicijalima i grupom, te naznačite tri pozicije (a, b i c) za kasniju montažu diska impregniranog antibiotikom. Naznačite ih tako da budu podjednako udaljeni među sobom te od ruba petrijevke
3. Izlijte sterilnu hranjivu podlogu u sterilnu petrijevku i ostavite da se skrutne.
4. Pomoću dozatora prebacite 1 ml sterilne fiziološke otopine u praznu epruvetu.
5. Sterilizirajte mikrobiološku ušicu.
6. Zahvatite dio bakterijske kolonije sterilnom mikrobiološkom ušicom i prebacite u epruvetu s fiziološkom otopinom. Napravite suspenziju.
7. Sterilizirajte mikrobiološku ušicu.
8. Pomoću pipete prenesite 0.2 ml suspenzije na površinu hranjive podloge pa je razmažite sterilnim štapićem po Drigalskom. Štapić spalite poslije upotrebe.
9. Sterilnom pincetom postavite na površinu nasadene podloge tri diska od filter papira natopljena različitim antibioticima. Postavite ih tako da budu podjednako udaljeni među sobom te od ruba petrijevke. U radni materijal zabilježite koji antibiotik se nalazi na kojoj poziciji.
10. Inkubirati 48 h na 37°C. Nakon inkubacije odrediti zone inhibicije u milimetrima.



## 1.5. Obrada antibiograma

Zona gdje nema vidljivog rasta bakterija naziva se zona inhibicije. Osjetljivost bakterija je upravo proporcionalna s promjerom zone inhibicije koja se očitava u milimetrima.

Među primijenjenim antibioticima odredite onaj na koji je bakterijska kultura najosjetljivija.

### MATERIJAL:

1. antibiogram
2. ravnalo



### POSTUPAK:

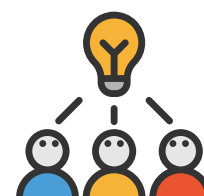
1. Proučiti zone inhibicije i izmjeriti promjer svake zone u milimetrima
2. Odrediti antibiotik na koji je bakterija najosjetljivija



Slika 5. Gotovi antibiogram

*Prijedlog za istraživački rad*

**ISTRAŽIVANJE ANTIBIOTSKOG DJELOVANJA ETERIČNIH ULJA (ili neke druge tvari poput propolisa, soka češnjaka, ekstrakta koprive, ekstrakta alga i sl.) NA ODABRANE MIKROORGANIZME**







## 2. SKUPINA RADIONICA – TEME

### UVOD

Posljednjih pola stoljeća metoda uzgoja u posudama s hranidbenim podlogama koristi se i za uzgoj biljnih i životinjskih stanica i tkiva pri čemu možemo proučavati različite životne pojave u stanicama i tkivima i njihovu reakciju na različita djelovanja izvana pod strogo kontroliranim uvjetima. Metodom in vitro mogu se proučavati i biološki aktivne molekule.

- 2.1. In vitro određivanje antioksidacijskog učinka biološki aktivnih molekula
- 2.2. In vitro uzgoj pšeničnih klica
- 2.3. In vitro uzgoj sjemenki biljaka roda *Centaurea*
- 2.4. In vitro uzgoj iz tkiva – mikrorazmnožavanje (demonstracija)



## 2.1. In vitro određivanje antioksidacijskog učinka biološki aktivnih molekula

### UVOD

Denham je 1956. godine opisao slobodne radikale kao Pandorinu kutiju zla kojoj se može pripisati većina staničnih oštećenja.

Što su slobodni radikali? Slobodni radikali su vrlo nestabilne molekule ili atomi koji u vanjskoj ljusci imaju jedan ili više nesparenih elektrona pa daju ili oduzimaju elektrone drugim molekulama što ih čini visoko reaktivnim.

U organizmu se proizvode u normalnim fiziološkim procesima poput procesa dobivanja energije u mitohondrijima u reakciji glukoze s kisikom. Slobodni radikali dolaze i iz okoliša. Najčešći čimbenici koji dovode do stvaranja slobodnih radikala su npr. teški fizički napor (intenzivan trening), intenzivno sunčanje, konzumiranje prerađene hrane (bijeli šećer, bijelo brašno), aditiva i boja u hrani, stres, duhanski dim, konzumiranje alkohola, zagađeni okoliš.

Organizam ima mehanizam obrane. Antioksidansi su tvari koje štite stanice djelujući kao čistači slobodnih radikala. Time sprječavaju i popravljaju štetu koju nanose slobodni radikali. Djeluju na način da održavaju ravnotežu prooksidans/antioksidans u organizmu.

OKSIDACIJSKI STRES je stanje prekomjernog stvaranja slobodnih radikala kisika, pri čemu dolazi do neravnoteže u stvaranja slobodnih radikala i mogućnosti stanice da ih razgradi. Narušavanja ravnoteže dovodi do pojave različitih bolesti.

Sustav obrane organizma uvjetovan je dobrim dijelom primjerenom prehranom, (npr. vitamin E, vitamin C, beta-karoten i selen). Voće, povrće, aromatsko i začinsko bilje uglavnom su bogat izvor vitamina E, vitamina C, karotenoida. Začini poput klinčića, cimeta, kadulje, ružmarina i origana pokazuju visoka antioksidacijska svojstva, najviše zbog prisustva fenolne grupe spojeva.

Premda su do sada provedene mnoge studije u cilju određivanja preporučene dnevne doze antioksidansa iz hrane, na ovom području postoje još uvijek brojna neslaganja.

## Određivanje antioksidacijske aktivnosti biološki aktivnih molekula reakcijom Briggs-Raucher



Briggs – Rauscher reakcija složeni je sklop kemijskih reakcija prilikom kojih dolazi do promjene boje iz žute u plavu. Reakcije se odvijaju uzastopce kroz nekoliko minuta i nazivamo ih još i oscilirajućim reakcijama. Reakcijska smjesa sastoji se od 3 otopine koje pomiješane daju reakcijsku smjesu u kojoj dolazi do oscilirajućih reakcija i promjene boje iz žute u plavu.

### MATERIJAL:

30%  $H_2O_2$

$KIO_3$

1 M  $H_2SO_4$

$MnSO_4 \cdot H_2O$

malonska kiselina, otopina škroba, destilirana voda, kuhalo, lijevak i cjedilo, pipeta, čašica, stakleni štapić

### POSTUPAK:

Pripremiti sljedeće otopine:

*Otopina A*

pripremiti 100 ml 9%  $H_2O_2$  na način da se 30 ml 30%  $H_2O_2$  doda u 70 ml destilirane  $H_2O$ .

*Otopina B*

pripremiti kiselu otopinu  $0,2$  M  $KIO_3$  dodavanjem 10 ml 1.0 M  $H_2SO_4$  u 80 ml destilirane vode.

Otopiti 4.3 g  $KIO_3$  u ovoj otopini i nadopuniti do 100 ml

*Otopina C*

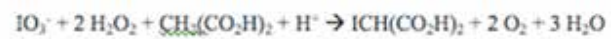
pripremiti otopinu škroba na način da se otopi 0.1 g škroba u 90 ml kipuće destilirane vode. Kad se ohladi dodati 1.5 g malonske kiseline, 0.4 g  $MnSO_4 \cdot H_2O$  procijediti i nadopuniti do 100 ml.

U čistu posudu za reakcijsku smjesu dodati 50 ml otopine A, zatim dodati 50 ml otopine B i dobro promiješati. Dodati 50 ml otopine C i pustiti da se reakcija odvija. Nakon dodatka zadnje otopine trebaju se pojaviti mjehurići.

Otopina će mijenjati boju iz žute u plavu pa nazad u žutu i opet u plavu te se u potpunosti zaustaviti nakon osciliranja od 5-10 minuta.

Oscilirajuće reakcije sastoje se od složenih redoks-reakcija koje mogu biti privremeno zaustavljene dodatkom dobrog antioksidansa. Oscilacije se, ovisno o vrsti i količini antioksidanata privremeno prekidaju. Vrijeme prekida oscilacijskih reakcija naziva se vremenom inhibicije (engl. Inhibition Time, IT), a izražava se u sekundama. Vrijeme potrebno da oscilirajuće reakcije ponovno krenu određuje jačinu antioksidansa - što je vrijeme duže, za antioksidans kažemo da je „jači“





*Briggs Rauscher oscilirajuće reakcije*



*Slika 6. Upoznavanje s potrebnim materijalom za Briggs Rauscher oscilirajuće reakcije*



*Slika 7. Demonstracija pokusa*

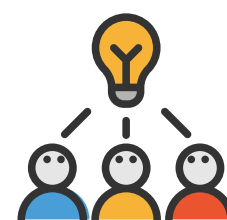


Slika 8. Izvođenje pokusa



Slika 9. Učenci, edukatorica i profesori koji su sudjelovali u radionici

Prijedlog za istraživački rad  
**ISTRAŽIVANJE** antioksidacijskog **DJELOVANJA RAZLIČITIH**  
prirodnih tvari (sok limuna, nara, špinata i sl.)



## Uvod za vježbe 2.2, 2.3, 2.4

Metoda in vitro uzgoja temelji se na činjenici da je u strogo kontroliranim uvjetima iz sjemenki, komadića tkiva izrezanih iz roditeljske biljke (eksplantat) ili čak iz pojedinačnih stanica moguće regenerirati čitavu biljku. Eksplantati se uzgajaju na krutim ili tekućim hranidbenim podlogama koje sadržavaju mineralne soli, organske dodatke (ugljikohidrate, vitamine, aminokiseline i biljne hormone).

### PREDNOSTI UZGOJA IN VITRO

- razmnožavanje in vitro je puno brže i dobije se veliki broj klonova
- moguće je razmnožavati ugrožene biljne vrste čime se pomaže očuvanju bioraznolikosti
- u kulturi in vitro razmnožavaju se samo zdrave biljke
- kultura in vitro posebno je korisna za osnivanje banke gena koja čuva zdravstveno ispravan, od virusa oslobođen, biljni materijal

Metodom razmnožavanja biljaka, koje su dobivene izoliranjem meristemskog tkiva iz vršnih pupova, moguća je proizvodnja sadnog materijala oslobođenog patogenih klica, posebice virusa koji su danas vrlo veliki problem u npr. voćarstvu ili vrtlarstvu.

Posebno je zanimljivo što se na ovaj način mogu uzgojiti mnoge biljne vrste kojima u prirodi prijete izumiranje, čime bi se moglo pridonijeti očuvanju biološke raznolikosti ukoliko bi to dozvolile i potaknule nadležne institucije.

Metoda kulture tkiva i biljnih stanica "in vitro", koristi se za vegetativno razmnožavanje brojnih biljnih vrsta, posebno onih koje stvaraju malu količinu sjemena, čije sjeme ima slabu klijavost ili onih koje se teško razmnožavaju vegetativnim putem. Primjerice, orhideje je umjetno moguće razmnožiti jedino na ovaj način (iz sjemena). One stvaraju velike količine sjemena ali u prirodi njihovo sjeme može klijati samo u simbiozi s gljivama. Simbioza im je potrebna zbog toga što sjeme orhideja nema ili ima vrlo mali endosperm te pomoću gljiva dobivaju hranjive tvari potrebne za klijanje. In vitro metodom im potrebne hranjive tvari može osigurati hranidbena podloga.



## 2.2. In vitro uzgoj pšeničnih klica



Klice blagotvorno djeluju na zdravlje, bogate su proteinima, mineralima, prirodni su alkalizatori. Spadaju u skupinu najkvalitetnijih namirnica s iznimno blagotvornim djelovanjem na organizam. Klice, odnosno sjemenke u fazi proklijavanja (germinacije) jednostavno je proizvesti i kod kuće. Nisu im potrebni tlo ili zemlja već je važno prirediti odgovarajuće uvjete temperature i vlažnosti. Za klijanje se mogu koristiti najraznovrsnije biljne vrste poput grahorica soje, graha, alfa (lucerna) i sl., zatim žitarica pšenice, kukuruza i ječma, također i kupusnjače brokula, rotkvice i gorušica, te biljke iz obitelji luka kao što su luk i vlasac.

### MATERIJAL I PRIBOR:

Sjemenke nekih od sljedećih biljaka: soje, graha, pšenice, kukuruza, ječma, brokule, rotkvice, gorušice, luka i vlasca, posuda za uzgoj, papir za filtriranje ili pamuk, voda

### POSTUPAK RADA:

1. Nabaviti željene sjemenke, staviti ih u staklenku i namočiti u vodi nekoliko sati. Pohraniti ih na mračnom i toplom mjestu. Važno je imati na umu da predugo namakanje, duže od 8 sati, nije preporučljivo zbog opasnosti od gnijiljenja.
2. Nakon namakanja isprati sjemenke i istresi ih na posudu za uzgoj te ravnomjerno rasporediti po dnu u tankom sloju. Nekoliko dana dnevno potrebno je prskati sjemenke vodom. Važno ih je stalno održavati vlažnima, ali ne i mokrima. Za klijanje je potrebno dva do sedam dana, ovisno o vrsti sjemenke koja se koristi.
3. Zadnji dan klijanja klice se može staviti na prozor, ali ih nije poželjno izlagati izravnom suncu. Prije konzumacije klice je uvijek potrebno isprati pod vodom zbog uklanjanja potencijalno štetnih mikroorganizama. Mogu se čuvati u hladnjaku radi duže svježine no ukoliko se pojave plijesni ne smiju se konzumirati.



Slika 10. Postavljanje namočenih sjemenki u posudu



Slika 11. Proklijale sjemenke



## Vježba 2. 3. In vitro uzgoj sjemenki biljaka roda *Centaurea*



Na području Republike Hrvatske živi 80 vrsta roda *Centaurea*. Neke vrste koriste se u hortikulturi pa su široko rasprostranjene, mnoge vrste roda *Centaurea* imaju ljekovita svojstva. *Centaurea* vrste često su endemične vrste i za njihovo korištenje u svrhe znanstvenih istraživanja moguće ih je uzgojiti u in vitro uvjetima. Naša endemična vrsta je *Centaurea ragusina* (dubrovačka zečina). Klice je moguće uzgojiti na umjetnim i prirodnim podlogama i istražiti kako podloge utječu na razvoj sjemenki. Istraživanja s umjetnim hranidbenim podlogama moguće je obavljati u opremljenim laboratorijima. U školskim kabinetima moguće je potaknuti sjemenke na klijanje i istraživati utjecaj različitih čimbenika (vrsta tla, količina svjetla, količina vode, temperatura) na brzinu i uspješnost klijanja.

### Potrebno za rad:

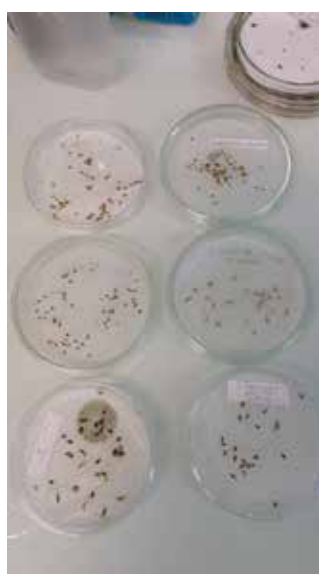
sjemenke neke vrste iz roda *Centaurea*, posuda za uzgoj, papir za filtriranje ili pamuk, zemlja za cvijeće, voda, otopina za dezinfekciju sjemenki

Otopina za dezinfekciju sjemenki:

Otopiti 12g kalcijevog hipoklorita  $[Ca(OCl)_2]$  u 1L destilirane vode. Za ispiranje od početne otopine napraviti 10% otopinu.

### Postupak rada:

1. Nabaviti sjemenke neke vrste roda *Centaurea*, isprati ih otopinom za dezinfekciju sjemenki, najprije sa koncentriranom, a zatim 10% otopinom.
2. Nakon namakanja isprati sjemenke destiliranom vodom i istresi ih na posudu za uzgoj te ravnomjerno rasporediti po dnu u tankom sloju. Nekoliko dana dnevno potrebno je prskati sjemenke vodom. Važno ih je stalno održavati vlažnima, ali ne i mokrima. Za klijanje je potrebno dva do četrnaest dana.
3. Pred kraj klijanja klice se može staviti na prozor, ali ih nije poželjno izlagati izravnom suncu.



Slika 12. prokljale sjemenke roda *Centaurea*

**ZADATAK**

Objasni što se dogodilo pri uzgoju in vitro prikazanom na slici 13. Pažljivo pogledaj sliku pa zaključi smeta li ova pojava rastu klica. Što misliš zašto? Imenuj sliku 13.



Slika 13.

**BILJEŠKE**


---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

---

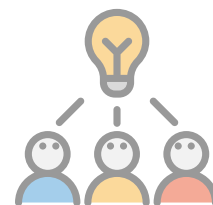
---

---

---

---

Prijedlog za istraživački rad

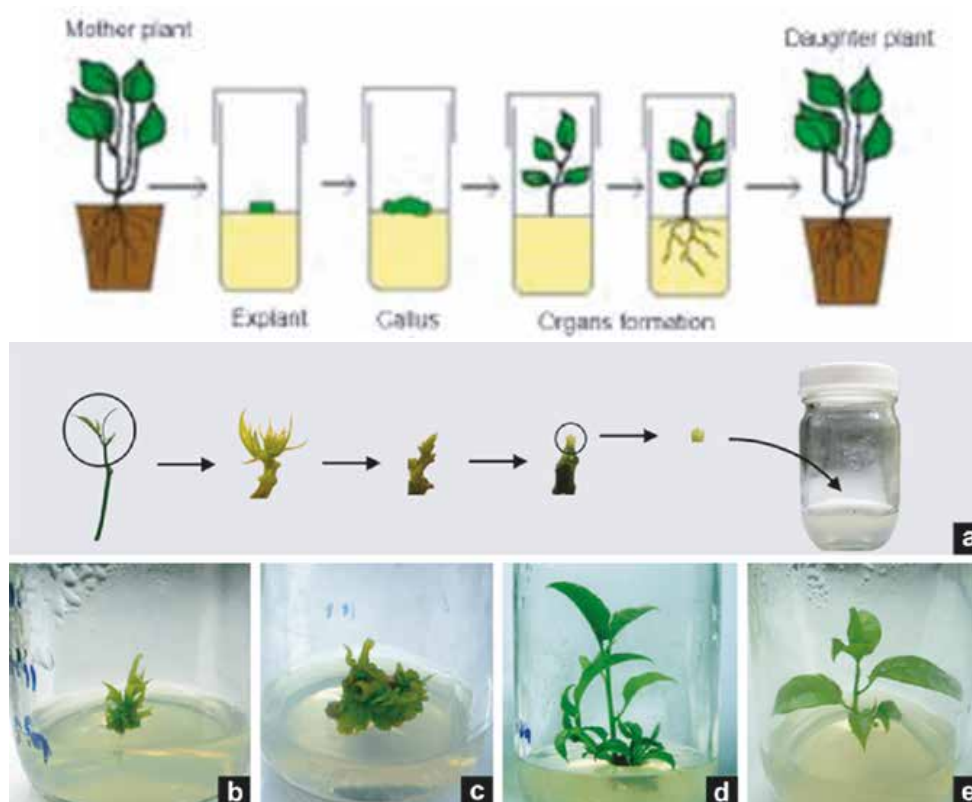


## ISTRAŽIVANJE DJELOVANJA RAZLIČITIH VRSTA PODLOGA NA ODABRANU BILJNU VRSTU

### Vježba 2. 4. In vitro uzgoj iz tkiva - mikrorazmnožavanje (DEMONSTRACIJA)

#### Opis postupka:

Prvo se pripremi hranidbena podloga za razmnožavanje budućih presadnica. Kemijski sastav podloge se razlikuje ovisno o biljnoj vrsti. Hranidbena podloga sadrži u pravilu: makro i mikroelemente, organske tvari (npr. saharozu), vitamine, biljne hormone i agar. Omjer biljnih hormona bitan je, jer utječe na oblikovanje i razvoj stanica izdanka, korijena ili kalusnog tkiva. Sastojke se miješa prema određenoj recepturi te ih se zagrije do temperature 95-98 ° C. Mjeri se pH vrijednost otopine. Pripremljenu otopinu razlije se u dno staklenki, te se staklenke složi u uređaj za sterilizaciju (autoklav). Nakon provedene sterilizacije priprema se majčinska biljke za uvođenje u kulturu "in vitro". Odabiru se sortno čiste i zdrave biljke te priprema početni materijal za razmnožavanje (eksplantat). Izdvojen eksplantat brzo se prebacuje na pripremljenu hranjivu podlogu, kako bi se izbjeglo isušivanje tkiva. Staklenke se slažu u klima komoru u kontrolirane uvjete (temperature, vlage i svjetlosti) te u njoj započinje proces razmnožavanja.



Slika 14. Postupak dobivanja biljke iz tkiva



### 3. SKUPINA RADIONICA

#### Radionice za razvoj kritičkog mišljenja kod učenika

Nekoliko primjera:

IN VITRO ODREĐIVANJE ANTIOKSIDACIJSKOG UČINKA BIOLOŠKI AKTIVNIH MOLEKULA

Kako tumačiti rezultate znanstvenih istraživanja dobivene in vitro, jesu li relevantni za živi organizam?

IN VITRO UZGOJ ORGANIZAMA

Uzgoj biljaka, voća i povrća u sterilnim uvjetima i uvjetima okoliša - koje su prednosti, a koji nedostaci?

Kako ovakav uzgoj utječe na zdravlje pojedinca, a kako na ekonomiju?

Poveži uzgoj in vitro i zaštitu bioraznolikosti?

Biljka dubrovačka zečina je endemska i zaštićena vrsta, a ima ljekovita svojstva. Kako in vitro uzgoj može pomiriti te dvije stvari?

Uzgoj staničnih kultura za biološka testiranja - može li in vitro uzgoj životinjskih tkiva uvijek nadomjestiti pokusne životinje? Mogu li istraživanja životinjskih stanica uvijek biti relevantna za čovjeka?

#### Radionice - znanstveni trendovi današnjice

- GDJE SE KORISTI IN VITRO I IZAZOVI KOJE TO NOSI
- IN VITRO PROIZVODNJI INZULINA
- IN VITRO OPLODNJA
- IN VITRO GENETSKE MODIFIKACIJE (GMO)
- IN VITRO DIJAGNOSTIKA
- ETIČKA PITANJA KOD IN VITRO OPLODNJE, UZGOJA STANIČNIH LJUDSKIH KULTURA I ORGANA

## LITERATURA

S. Jelaska: Kultura biljnih stanica i tkiva, Školska knjiga, Zagreb, 1994.

[biologija.unios.hr/webbio/wp-content/uploads/.../mikrobiologija-bakteriologija.pdf](http://biologija.unios.hr/webbio/wp-content/uploads/.../mikrobiologija-bakteriologija.pdf)

[www.scribd.com/doc/161625259/Uzgoj-bakterija-i-metoda-antibiograma](http://www.scribd.com/doc/161625259/Uzgoj-bakterija-i-metoda-antibiograma)

[www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763](http://www.belupo.hr/Default.aspx?sid=4763)

[www.coolinarika.com/magazin/clanak/antioksidansi-i-oksidacijski-stres](http://www.coolinarika.com/magazin/clanak/antioksidansi-i-oksidacijski-stres)

[www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/357/](http://www.vasezdravlje.com/printable/izdanje/clanak/357/)

[www.unizg.hr/rektorova/upload\\_2013/](http://www.unizg.hr/rektorova/upload_2013/)

[zdravakrava.24sata.hr/hrana/kako-uzgajati-i-konzumirati-klice-4466](http://zdravakrava.24sata.hr/hrana/kako-uzgajati-i-konzumirati-klice-4466)

[www.jutarnji.hr/domidizajn/savjeti/izradi-mini-platenik-u-svojoj-sobi-i-uzgoji-klice/3435263/](http://www.jutarnji.hr/domidizajn/savjeti/izradi-mini-platenik-u-svojoj-sobi-i-uzgoji-klice/3435263/)

[www.horti-kultura.hr/biljke-iz-staklenke-kultura-tkiva-i-stanica-in-vitro/](http://www.horti-kultura.hr/biljke-iz-staklenke-kultura-tkiva-i-stanica-in-vitro/)

[www.hirc.botanic.hr/vrt/hrv/Laboratorij.htm](http://www.hirc.botanic.hr/vrt/hrv/Laboratorij.htm)

[www.pfos.hr/upload/documents/PRINCIPI%20FLORIKULTURE.pdf](http://www.pfos.hr/upload/documents/PRINCIPI%20FLORIKULTURE.pdf)

[www.krs.hr/projekti/arh/0093015h.pdf](http://www.krs.hr/projekti/arh/0093015h.pdf)

[www.plivazdravlje.hr](http://www.plivazdravlje.hr) > Žensko zdravlje

[www.youtube.com/watch?v=hgOqTyil\\_30](http://www.youtube.com/watch?v=hgOqTyil_30) (7:48min)

[www.youtube.com/watch?v=6y13hYGPi8Q](http://www.youtube.com/watch?v=6y13hYGPi8Q)

[www.youtube.com/watch?v=yNQrmZrhoyM](http://www.youtube.com/watch?v=yNQrmZrhoyM)

[www.youtube.com/watch?v=bi755vQVNx8](http://www.youtube.com/watch?v=bi755vQVNx8)

[www.youtube.com/watch?v=TORRxwbz7aY](http://www.youtube.com/watch?v=TORRxwbz7aY)