

**PREHRAMBENO - BIOTEHNOLOŠKI FAKULTET
SVEUČILIŠTA U ZAGREBU**

"MIKROBIOLOGIJA"

INTERNA SKRIPTA ZA STUDENTSKI PRAKTIKUM

Pripremili:

Red. prof. dr. sc. Frane Delaš

Izv. prof. dr. sc. Ksenija Markov

Izv. prof. dr. sc. Jadranka Frece

Zagreb, 2013.



STUDENT:
MATIČNI BROJ:

SKUPINA:
AKADEMSKA GODINA:

VJEŽBA 1.

Datum održavanja vježbe:

1. Upoznavanje laboratorijskog posuđa i pribora za rad umikrobiološkom laboratoriju
2. Dokazivanje mikroorganizama u našoj sredini
3. Mikroskop (opis, karakteristike i rad sa svjetlosnim mikroskopom)
4. Priprava nativnih (vlažnih) mikroskopskih pripravaka i mikroskopiranje
* Nativni pripravak kvasca

Ad 1/

Laboratorijsko posuđe i pribor

Mikrobiološka ušica, mikrobiološka igla, histološka i Cornet-ova pinceta, drvena štupaljka, štapić po Drigalskom, Erlenmeyer-ova tikvica, mikrobiološke epruvete, mikrobiološke pipete, Durhamova epruveta, skalpel, žlica, Petrijeva zdjelica, predmetno i pokrovno stakalce, Thomina komorica, Petroff-Hauser komorica, predmetnica s udubljenjem; Mikroskop, termostat, autoklav, vibro mikser, brojač kolonija, Bunsenov plamenik

PRAKTIČAN RAD

Ad 2/

a) *Dokazivanje mikroorganizama oko nas*

POTREBNO:

Petrijeva zdjelica s hranjivom podlogom, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Petrijevu zdjelicu u kojoj se nalazi čvrsta hranjiva podloga otvorite tako da poklopac prislonite uz rub Petrijeve zdjelice, te ju ostavite otvorenu cijelo vrijeme trajanja vježbe. Mikroorganizmi koji se nalaze u stupcu zraka iznad zdjelice past će na podlogu.
2. Prije odlaska iz laboratorija zatvorite Petrijevu zdjelicu.
3. Na poklopac napišite broj skupine/broj stola i stavite na inkubaciju u termostat pri 28°C.

b) *Dokazivanje mikroorganizama na nama i u nama*

POTREBNO:

Petrijeve zdjelice (Fortnerova ploča) s hranjivom podlogom, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na poleđini Petrijevih zdjelica (Fortnerove ploče) markerom napišite: prst, kosa, ispljuvak.
2. Tamo gdje ste napisali riječ prst, lagano dodirujući podlogu ostavite otisak prsta.
3. Na mjestu gdje ste napisali riječ kosa, položite jednu vlas kose.
4. Na mjestu gdje ste napisali riječ ispljuvak (sputum), stavite malo pljuvačke.
5. Zatvorite Petrijeve zdjelice (Fortnerovu ploču).
6. Na poklopac napišite broj vaše skupine i broj stola te stavite na inkubaciju u termostat pri 37°C.

Ad 3/*Mikroskop i tehnika mikroskopiranja*

1. Mekanom (lanenom) krpicom dobro obrišite sve optičke dijelove mikroskopa.
2. Uključite mikroskop te pomicanjem vijka spustite do kraja stolić mikroskopa.
3. Pripravak koji mikroskopirate stavite na stolić mikroskopa i učvrstite ga.
4. Na revolveru odaberite objektiv s najmanjim povećanjem (10×).
5. Gledajući sa strane (ne kroz okular), okrećući makrovijak, podignite stolić mikroskopa do kraja. Mikroskop ima graničnik te ne može doći do oštećenja pripravka s lećom objektiva.
6. Gledajući kroz okular, s pomoću makrovijka podižite tubus sa odabranim objektivom i pronađite mikroskopsku sliku pripravka te je potom izoštrite mikrovijkom. Ako niste sigurni dali je pronađena slika uistinu mikroskopska slika, to možete provjeriti pomičući stolić mikroskopa. Ako se nađena slika također pomiče, onda je to mikroskopska slika. Ako se slika ne pomiče, onda je riječ o nekoj prljavštini ili ogrebotini na okularu ili objektivu te trebate nastaviti sa traženjem slike.
7. Nakon što ste pronašli sliku, okrenite revolver sa objektivima na objektiv s većim povećanjem i koristeći samo mikrovijak izoštrite sliku.

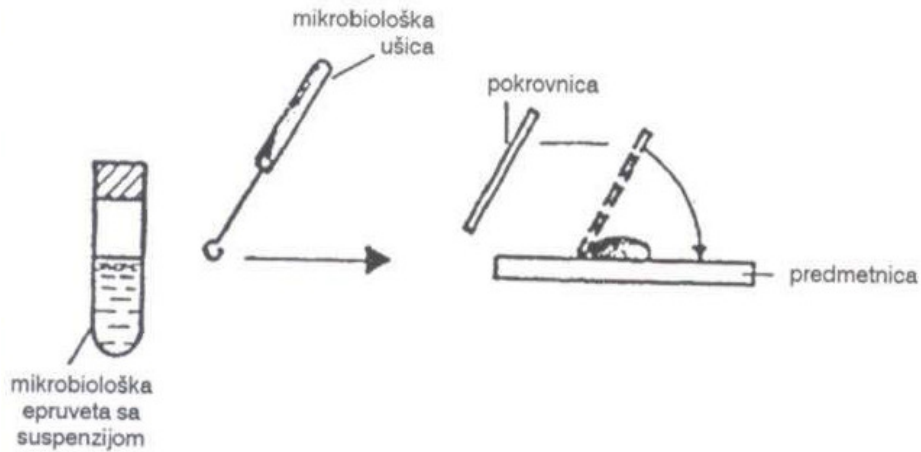
Ad 4/*Priprava vlažnih (nativnih) mikroskopskih pripravaka i mikroskopiranje***POTREBNO:**

Mikrobiološka ušica, epruveta sa suspenzijom kvasaca, vibro mikser, predmetno i pokrovno stakalce

POSTUPAK:

1. Epruvetu sa suspenzijom kvasaca protresite udaranjem o dlan ruke ili na vibro mikseru. **Palcem čvrsto držite čep epruvete!**
2. Mikrobiološkom ušicom pažljivo, bez protresanja, uzmite kap suspenzije kvasca te ju stavite na sredinu dobro očišćene i na plamenu odmašćene predmetnice.
3. Uzмите pokrovno stakalce i pažljivo ga, pod kutom od 45°, jednim bridom prislonite na predmetnicu, a potom pomičite po predmetnici do ruba kapljice.

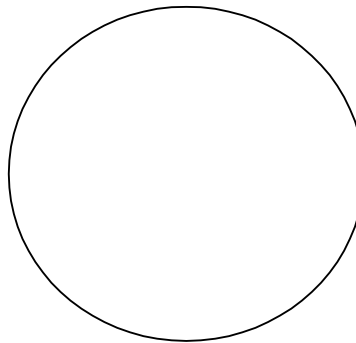
4. Stakalce polagano spustite na kap suspenzije (Slika. Ad 1.4). Pazite da vam u pripravku ne ostanu mjehurići zraka.
5. Pripravak stavite na stolić mikroskopa i mikroskopirajte.
6. Koristeći objektiv povećanja 10× nađite sliku pripravka, a zatim na revolveru okrenite objektiv na povećanje 40× i mikroskopirajte.
7. U dnevnik rada nacrtajte mikroskopsku sliku sa nekoliko stanica kvasaca. Napišite naslov mikroskopske slike i ukupno povećanje pri kojem ste mikroskopirali tj. gledali sliku.



Slika Ad 1.4

REZULTATI I ZAPAZANJA

Mikroskopska slika nativnog pripravka



P = **×**

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 2.

Datum održavanja vježbe:

1. Pregled materijala s prošle vježbe

1.1. Dokazivanje mikroorganizama u našoj sredini

2. Mikrobiološke hranjive podloge i sastavni dijelovi hranjivih podloga

3. Sterilizacija i priprema posuđa i pribora za sterilizaciju

4. Precjepeljivanje mikroorganizama s jedne hranjive podloge na drugu pomoću mikrobiološke ušice

5. Izolacija čiste kulture mikroorganizama na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici

6. Utjecaj pH vrijednosti na rast i razmnožavanje mikroorganizama

Ad 1/

Pregled materijala sa prošle vježbe

Ad 1.1./

Uzmite Petrijevu zdjelicu i Fortner-ovu ploču s prošle vježbe. U dnevniku rada opišite porasle kolonije mikroorganizama, i to posebno na podlozi u Petrijevoj zdjelici, a posebno one porasle na podlozi u Fortnerovoj ploči (otisak prsta, vlas kose, uzorak pljuvačke). Opišite oblik, veličinu, boju, reljefnost, rubove i ostale morfološke karakteristike poraslih kolonija.

PRAKTIČAN RAD

Ad 2/

Mikrobiološke hranjive podloge

Ad 3/

Sve što radite u mikrobiološkom laboratoriju trebate raditi u sterilnim uvjetima kako bi se spriječila mogućnost onečišćenja (kontaminacije). Otvorite dovod plina. Držeći stisnuto pipac na Bunsenovom plameniku, upalite plamenik te polagano otpuštajte pipac. Prostor oko plamenika

je sterilan pa ga za vrijeme rada ne smijete napuštati.

Prije korištenja mikrobioloških ušica i igala obavezno ih sterilizirajte. One se steriliziraju u plamenu Bunsenova plamenika. Vrh ušice držite u plamenu (u oksidacijskom dijelu) dok se žica ne užari, a zatim kroz plamen kratko provucite i metalni dio držala ušice. Izvadite potom ušicu iz plamena te ju, prije uzimanja uzorka mikroorganizma ohladite na dijelu hranjive podloge. Nakon korištenja, mikrobiološku ušicu potrebno je na isti način ponovo sterilizirati u plamenu.

Grlo epruveta, tikvica, boca također se steriliziraju u plamenu Bunsenova plamenika. Nakon skidanja čepa grlo provucite kroz plamen. Prije zatvaranja ponovite opisani postupak sterilizacije.

Ad 4/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Petrijeva zdjelica s prošle vježbe (sa poraslim mikroorganizmima), Petrijeva zdjelica s hranjivom podlogom za vježbu

POSTUPAK:

1. Upalite plamenik i sterilizirajte mikrobiološku ušicu.
2. Uzmite Petrijevu zdjelicu s prošle vježbe te ju položite na radnu plohu poklopcem okrenutim prema dolje.
3. Obuhvatite je vrhovima prstiju, podignite tako da poklopac bude okrenut prema gore.
4. Petrijevu zdjelicu polagano ispustite u dlan ruke, a poklopac pridržavajte palcem tako da se pojavi mali otvor kroz koji možete provući mikrobiološku ušicu.
5. Ušicu držite u drugoj ruci i to s 3 prsta (kao običnu olovku), a preostala 2 (prstenjak i mali prst) su vam slobodna.
6. Ušicom lagano zahvatite malo uzorka s jedne kolonije porasle na hranjivoj podlozi.
7. Nakon toga odložite Petrijevu zdjelicu i uzmite drugu na kojoj piše vježbanje te je na prije opisani način otvorite.
8. Ušicom lagano dodirnite hranjivu podlogu i u dugačkim cik-cak potezima od jednog unutarnjeg ruba Petrijeve zdjelice do drugoga prenesite materijal s ušice na hranjivu podlogu. Pazite da to učinite tako da ne oštetite hranjivu podlogu.
9. Petrijevu zdjelicu odložite, a ušicu sterilizirajte u plamenu.

Postupak nekoliko puta ponovite kako bi ga dobro izvježbali. Koristite istu Petrijevu zdjelicu namijenjenu za vježbanje.

Ad 5/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Petrijeva zdjelica s prošle vježbe, Petrijeva zdjelica s hranjivom podlogom.

POSTUPAK:

1. Postupak izolacije opisan je pod točkom 4.
2. Na podlozi u Petrijevoj zdjelici, (materijal s prošle vježbe), odaberite jednu koloniju koja je malo izdvojena od ostalih, te ju precijepite na hranjivu podlogu u Petrijevoj zdjelici na kojoj piše izolacija.
3. Na poklopac napišite broj skupine/broj stola te potom Petrijevu zdjelicu stavite na inkubaciju u termostat pri 28°C ili 37°C, ovisno o izoliranoj mikrobnjoj kulturi. (Izolaciju radi samo jedan student za stolom.)

Ad 6/**POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, epruveta sa suspenzijom kvasaca, epruveta sa suspenzijom bakterija, 2 serije od po 5 epruveta u kojima se nalazi tekuća podloga sa različito podešenim pH-vrijednostima (3, 5, 7, 9), vibro mikser

POSTUPAK:

1. Upalite plamenik i uzmite epruvetu sa suspenzijom kvasca koju prije upotrebe treba protresti laganim udaranjem o dlan ruke ili na vibro mikseru. Sterilizirajte mikrobiološku ušicu.
2. Ušicu držite u ruci s 3 prsta. Vrh epruvete prislonite na dlan ruke u kojoj držite ušicu i sa slobodna 2 prsta obuhvatite čvrsto čep. Okretanjem epruvete izvucite čep. Sterilizirajte vrh epruvete.
3. Ušicu uvucite u epruvetu i ohladite na njezinoj unutarnjoj stjenici. Uronite je zatim u suspenziju kvasaca i ne protresajući uzmite kap suspenzije.
4. Vrh epruvete prije zatvaranja sterilizirajte, a zatim ga zatvorite čepom koji držite u ruci u kojoj vam je ušica.
5. Uzmite drugu epruvetu, s hranjivom podlogom (sladovina) čiji je pH podešen na 3. Na prethodno opisani način skinite čep s epruvete i sterilizirajte njezin vrh.
6. Ušicu s kapljicom suspenzije kvasaca uronite u hranjivu podlogu i protresite je kako bi stanice prenijeli u podlogu.
7. Vrh epruvete sterilizirajte, zatvorite čepom i odložite na stalak, a mikrobiološku ušicu sterilizirajte u plamenu.

Postupak provedite prilikom naciepljivanja suspenzije kvasaca u hranjive podloge (sladovine) s pH vrijednostima 5, 7 i 9, te također pri naciepljivanju suspenzije bakterija u hranjive podloge (hranjivi bujoni) s pH vrijednostima 3, 5, 7 i 9.

Prije svakog uzimanja uzorka iz epruvete sa suspenzijom kvasca ili bakterije, epruvetu lagano protresite udaranjem o dlan ruke ili na vibro mikseru.

Na jednu epruvetu na stalku, iz svake serije s hranjivom podlogom, napišite broj skupine/broj stola. Seriju epruveta s hranjivom podlogom (sladovina), u koju ste naciepili suspenziju kvasaca, stavite na inkubaciju u termostat pri 28°C. Drugu seriju epruveta s hranjivom podlogom (hranjivi bujon), gdje ste naciepili suspenziju bakterija, stavite na inkubaciju u termostat pri 37°C.

REZULTATI ZAPAŽANIA

Ad 1.1/

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 3.

Datum održavanja vježbe:

1. Pregled materijala s prošle vježbe

- 1.1. Izolacija čiste kulture mikroorganizama
- 1.2. Utjecaj pH vrijednosti na rast i razmnožavanje mikroorganizama

BAKTERIJE - Sistematika, morfologija i mikroskopiranje pripravaka

2. Jednostavno bojanje

- 2.1. *Staphylococcus aureus* (3048) → kristal violet – 1 minuta
 - 2.2. *Sarcina* sp. (3060) → nativni pripravak
 - 2.3. *Streptococcus thermophilus*
 - 2.3. *Lactobacillus bulgaricus*
 - 2.4. *Streptomyces rimosus*
- } JOGURT - metilensko modrilo -5 minuta
- } kristal violet - 1 minuta

3. Složeno (diferencijalno) bojanje po Gram-u

- 3.1. **3014** – *Escherichia coli*
- 3.2. **3045** – *Bacillus subtilis*
- 3.3. **3048** – *Staphylococcus aureus*

4. Postupak za dokazivanje gram-negativnih bakterija - kalijev hidroksid-test

Ad 1/

PREGLED MATERIJALA S PROŠLE VJEŽBE

Ad 1.1/

Uzmite Petrijevu zdjelicu s prošle vježbe na kojoj piše izolacija i očitajte rezultat. Ako su nakon inkubacije na hranjivoj podlozi porasle sve jednake kolonije, znači da je izolacija čiste kulture bila uspješna te to zapišite u dnevnik rada. Ako su porasle različite kolonije izolacija nije bila uspješno provedena što također zapišite u dnevnik rada.

Ad 1.2/

Uzmite stalak s dvije serije epruveta s tekućom hranjivom podlogom za uzgoj kvasaca i bakterija. U podlogama gdje se pojavilo zamućenje došlo je do porasta kvasaca odnosno bakterija. Očitavanja rezultata zapišite u tablicu (ad 1.2.) i izvedite zaključak o utjecaju pH vrijednosti na rast i razmnožavanje istraživanih mikroorganizama.

Ad 2/**Jednostavno bojanje****POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetno stakalce, epruvete s bakterijskim kulturama, bojila: kristal violet i metilensko modri, komadići filter papira, marker za pisanje po staklu.

POSTUPAK:

1. Predmetnicu dobro operite i osušite na zraku.
 2. Upalite plamenik te predmetnicu odmastite provlačeći je par puta sa svake strane kroz plamen.
 3. Pustite je da se malo ohladi i u kut predmetnice napišite broj mikrobne kulture koju ćete bojati.
 4. Uzmite epruvetu s bakterijskom kulturom koju ste odlučili obojati i sterilnom mikrobiološkom ušicom formirajte veću kapljicu na sredini predmetnice.
 5. Mikrobiološkom ušicom razvucite po predmetnici kap u što tanjem sloju i ostavite pripravak da se osuši na zraku.
- Pripravak fiksirajte i stavite na mjesto pripremljeno za bojanje.
6. Po pripravku nanesite određeno bojilo koje je naznačeno uz bakterijsku kulturu koju bojite te ostavite da stoji onoliko vremena koliko piše.
 7. Nakon toga pripravak operite pod mlazom vodovodne vode i posušite filter papirom.
 8. Mikroskopirajte imerzionim objektivom uz upotrebu imerzionog sredstva (anisol).

U dnevniku rada nacrtajte mikroskopsku sliku bakterijskih stanica. Uz mikroskopsku sliku naznačite ime bakterije i ukupno povećanje.

Za bakterijsku kulturu 3060, *Sarcina* sp., napravite nativni pripravak.

1. Čistu-opranu predmetnicu ne trebate odmastiti nego samo na sredinu nanesite kap bakterijske kulture i pokrijte pokrovnicom.
 2. Pripravak stavite na stolić mikroskopa te na pokrovnicu položite kap imerzionog sredstva i mikroskopirajte imerzionim objektivom.
- U dnevnik rada nacrtajte mikroskopsku sliku, te uz nju napišite ime bakterije i ukupno povećanje.

Bakteriju *Streptomyces rimosus* (dobit ćete gotov pripravak) mikroskopirajte imerzionim objektivom. U dnevniku rada nacrtajte mikroskopsku sliku i navedite ukupno povećanje.

Ad 3/**Složeno (diferencijalno) bojanje po Gram-u****POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetno stakalce, epruvete s bakterijskim kulturama (3014, 3045, 3048, mješovita bakterijska kultura), kristal violet, lugol, etanol,

safranin, komadići filtrir papira, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Predmetnicu dobro operite i osušite na zraku.
2. Upalite plamenik. Predmetnicu odmastite provlačeći je par puta sa svake strane kroz plamen. Pustite da se predmetnica malo ohladi.
3. Markerom u kutu predmetnice napišite broj bakterijske kulture koju ćete bojati.
4. Uzmite epruvetu s odabranom kulturom te ju protresite. Sterilizirajte mikrobiološku ušicu i vrh epruvete. Mikrobiološkom ušicom zahvatite malo bakterijske kulture i formirajte veću kap na sredini pripremljene predmetnice. Ušicom razvucite kapljicu po predmetnici u što tanjem sloju, te predmetnicu ostavite na zraku da se preparat osuši.
5. Pripravak fiksirajte držeći predmetnicu par sekundi iznad plamena (iznad plamena treba biti ona strana predmetnice **na kojoj se ne nalazi pripravak**).
6. Predmetnicu stavite na mjesto pripremljeno za bojanje i pustite da se malo ohladi. Nanesite prvo bojilo, kristal violet. Bojilo nanesite po cijelom pripravku i ostavite da stoji 1 minutu.
7. Nakon toga nanesite preko cijelog pripravka lugolovu otopinu te ostavite da stoji 1 minutu.
8. Predmetnicu uhvatite drvenom štikaljkom, ukosite je i pripravak isperite 95%-tnim etanolom gotovo do čistog ispirka (dok boja ne prestane kapati s pripravka).
9. Operite pripravak pod mlazom vodovodne vode.
10. **Na vlažni pripravak** dodajte safranin i ostavite da bojilo reagira 3-5 minuta.
11. Nakon toga pripravak operite pod mlazom vodovodne vode i posušite filtrir papirom.
12. Mikroskopirajte imerzionim objektivom uz primjenu imerzionog sredstva na slijedeći način:
 - a. Pripravak stavite na stolić mikroskopa i učvrstite ga.
 - b. Na sredinu nanesite kap imerzionoga sredstva.
 - c. Na revolveru odaberite imerzioni objektiv (100×) te, gledajući sa strane, pomoću makrovijka podižite stolić mikroskopa tako da se leća objektiva uroni u kapljicu imerzionog sredstva.
 - d. Nakon toga, gledajući kroz okular, okrećući makrovijak nađite sliku koju potom izoštrite mikrovijkom. **Tijekom mikroskopiranja leća imerzionog objektiva mora stalno biti uronjena u imerziono sredstvo.**
13. U dnevnik rada nacrtajte mikroskopske slike pripravaka i navedite ukupno povećanje.

Za stolom sami između sebe odaberite koju će bakterijsku kulturu tko bojati, ali u dnevniku rada svi morate imati nacrtane mikroskopske slike svih pripravaka, te uz njih napisati ime bakterije i ukupno povećanje.

Ad 4/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, pokrovno stakalce, Petrijeve zdjelice s poraslim bakterijskim kulturama, 3%-tna otopina KOH.

POSTUPAK:

1. Na pokrovnici stavite 2 kapi 3%-tne otopine KOH.

2. Sterilnom mikrobiološkom ušicom zahvatite s kolonije čiste bakterijske kulture porasle na čvrstoj podlozi jednu punu mikrobiološku ušicu mikroorganizma kojemu istražujete reakciju na bojanje po Gramu.
3. Mikrobnu kulturu dodajte u nanesenu kap KOH i miješajte mikrobiološkom ušicom (bez razvlačenja) 30-60 sekundi.
4. Za vrijeme miješanja podižite mikrobiološku ušicu 1 do 2 cm iznad površine mikrobne kulture kako bi vidjeli da li nastaju vlakna u materijalu koji visi na ušici.

Ukoliko je bakterija gram-negativna - tvorit će vlakna, a ako je gram-pozitivna, do pojave vlakana neće doći. U tablici (ad 4.) upišite koja je od istraživanih bakterijskih kultura gram-pozitivna, a koja gram-negativna.

REZULTATI I ZAPAZANJA

Ad 1.1/

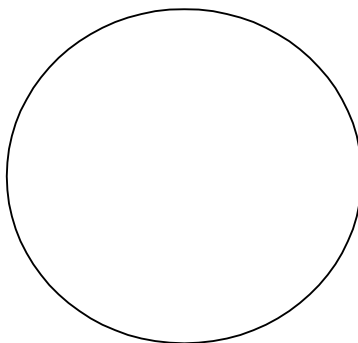
Ad 1.2/

pH	3	5	7	9
Mikroorganizam				
BAKTERIJE				
KVASCI				

Legenda: Ø → nema rasta ; + → dobar rast ; ++ → izrazit rast

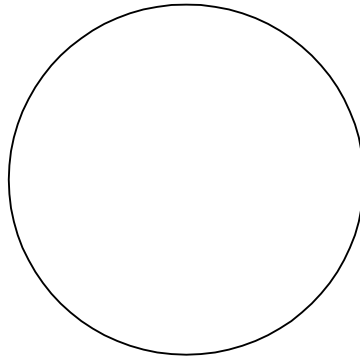
Ad 2/

2.1. Mikroskopska slika obojanog pripravka



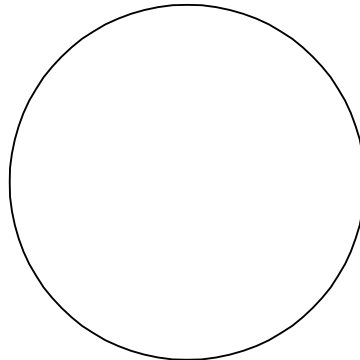
P = ×

2.2. Mikroskopska slika obojanog pripravka



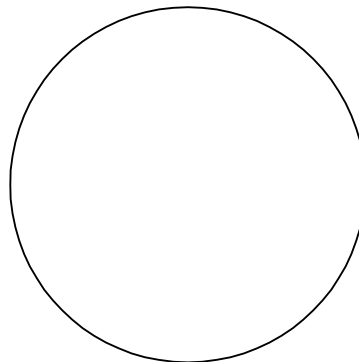
P = ×

2.3. Mikroskopska slika obojanog pripravka



P = ×

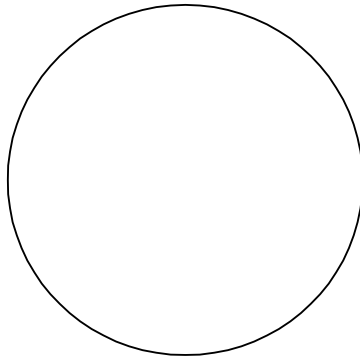
2.4. Mikroskopska slika obojanog pripravka.....



P = ×

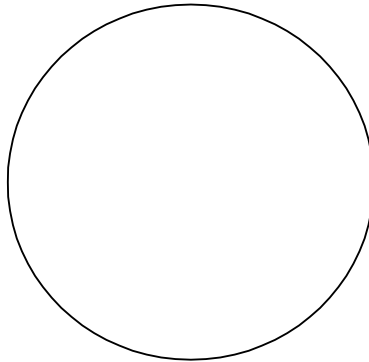
Ad 3/

3.1. Mikroskopska slika obojanog pripravka.....



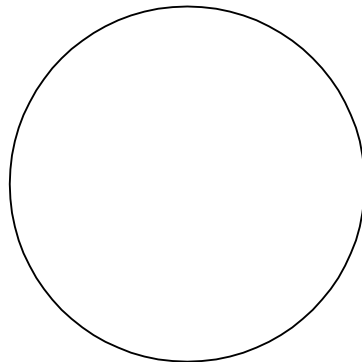
P = ×

3.2. Mikroskopska slika obojanog pripravka.....



P = ×

3.3. Mikroskopska slika obojanog pripravka.....



P = ×

Ad 4/

Bakterijska kultura	gram-pozitivna ili gram-negativna bakterija
<i>Escherichia coli</i>	
<i>Bacillus subtilis</i>	
<i>Staphylococcus aureus</i>	

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 4.

Datum održavanja vježbe:

1. **Bojanje bakterijskih endospora po Schaeffer-Fulton**
Bacillus subtilis (3045)
2. **Odvajanje sporogenih od nesporogenih bakterija**
Bacillus subtilis (3045)
Staphylococcus aureus (3048)
3. **Biokemijska aktivnost bakterija**
 - 3.1. Hidroliza želatine (3001, 3014, 3060)
 - 3.2. Hidroliza škroba (3001, 3060)
 - 3.3. Hidroliza kazeina (3001, 3014)
 - 3.4. Katalaza test (3001, 3014, 3024, 3048, 3060)

3001 – *Bacillus subtilis*;
3014 – *Escherichia coli*;
3024 – *Pseudomonas aeruginosa*;
3048 – *Staphylococcus aureus*;
3060 – *Sarcina* sp.
4. **Pokretljivost bakterija**
 - 4.1. Izravna metoda - "Viseća kap"
 - a) 3024 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - b) suspenzija zemlje
 - 4.2. Neizravna metoda - "Ubod u duboki agar"
 - a) 3024 - *Pseudomonas aeruginosa*
 - b) 3060 – *Sarcina* sp.
5. **Uzgoj anaerobnih bakterija**
6. **Neizravno određivanje broja živih bakterija u mlijeku pokusom na reduktazu (Određivanje vremena redukcije metilenskog modrila)**

PRAKTIČAN RAD

Ad 1/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetno stakalce, epruveta s bakterijskom kulturom 3045, bojila: malahitno zelenilo i safranin, komadići filtrir papira, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Predmetnicu dobro operite i osušite.
2. Upalite plamenik te predmetnicu odmastite provlačeći je par puta sa svake strane kroz plamen. Pustite je da se malo ohladi.
3. U desnom kutu predmetnice napišite broj bakterijske kulture 3045.
4. Uzmite epruvetu s bakterijskom kulturom 3045 i sterilnom mikrobiološkom ušicom formirajte veću kapljicu na sredini predmetnice.
5. Ušicom razvucite kap u što tanjem sloju i ostavite pripravak na zraku da se osuši.
6. Pripravak fiksirajte držeći predmetnicu par sekundi iznad plamena (suprotnu stranu od one na kojoj se nalazi pripravak), predmetnicu zatim stavite na mjesto pripremljeno za bojanje i pustite da se malo ohladi.
7. Uхватite predmetnicu drvenom štipaljkom i nanesite po čitavom pripravku malahitno zelenilo.
8. Zagrijavajte pripravak s donje strane iznad plamena dok bojilo ne počne isparavati, a zatim ga odmaknite u stranu i pustite da se ohladi.
9. Ponovite postupak zagrijavanja još 2 puta (dakle ukupno tri puta – trokratno zagrijavanje tijekom 1 minute). **PAZITE!** Bojilo na pripravku se ne smije osušiti. Ukoliko se počne sušiti, odmah dodajte svježeg bojila.
10. Pripravak operite pod mlazom vodovodne vode
11. **Na vlažni pripravak** nanesite safranin i ostavite da na njemu odstoji 3-5 minuta.
12. Preparat operite pod mlazom vodovodne vode i posušite filtrir papirom.
13. Mikroskopirajte imerzionim objektivom uz primjenu imerzionog sredstva.

U dnevniku rada nacrtajte mikroskopsku sliku te na slici označite vegetativne stanice i bakterijske endospore; napišite ime bakterije i ukupno povećanje.

Ad 2/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, epruveta s bakterijskom kulturom 3045, epruveta s bakterijskom kulturom 3048, 2 epruvete s hranjivim bujonom, vodena kupelj zagrijana na 80°C

POSTUPAK:

1. Upalite plamenik i uzmite 2 epruvete s hranjivim bujonom te na jednoj napišite broj bakterijske kulture 3045, a na drugu 3048.
2. Uzmite epruvetu s bakterijskom kulturom 3045.

3. Sterilnom mikrobiološkom ušicom precijepite bakterijsku kulturu u epruvetu u kojoj se nalazi hranjivi bujon, a na kojoj piše 3045. Na epruveti označite broj skupine i broj stola.
 4. Isto učinite s bakterijskom kulturom 3048 te je precijepite u drugu epruvetu s hranjivim bujonom na kojoj piše broj 3048. Na epruveti označite broj skupine i broj stola.
 5. Obje epruvete stavite tijekom 10 minuta u vodenu kupelj zagrijanu na 80°C.
 6. Nakon isteka tog vremena, epruvete izvadite i ostavite na stalku.
- Prije stavljanja u termostat na njima označite broj vaše skupine i broj vašeg stola.

Ad 3/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Petrijeve zdjelice s hranjivim podlogama (želatina, škrob i kazein), epruvete sa suspenzijama bakterijskih kultura, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na vanjski, donji dio Petrijevih zdjelica napišite (prema prikazu na shemi) brojeve bakterijskih kultura na odabranim razmacima.
2. Epruvete s bakterijskim kulturama prije nacjepljivanja homogenizirati laganim protresanjem o dlan ruke ili na vibro mikseru.
3. Sterilnom i ohlađenom mikrobiološkom ušicom na sterilan način nacijepite bakterijsku kulturu u cik-cak potezima na obilježenom mjestu na hranjivoj podlozi.
4. Nacijepljene podloge inkubirajte pri 37 °C tijekom 24 do 48 sati.

Ad 4/

a) Izravna metoda - "Viseća kap"

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetnica s udubljenjem, pokrovno stakalce, suspenzija bakterija, suspenzija zemlje, mikroskop, laboratorijska mast

POSTUPAK:

1. Nanesite tanak sloj laboratorijske masti pomoću štapića samo po rubu udubljenja na predmetnici.
2. U sredinu dobro očišćene pokrovnice (položene na stolu) stavite sterilnom mikrobiološkom ušicom jednu kap suspenzije bakterija, odnosno suspenzije zemlje (suspenziju zemlje **NE homogenizirati**).
3. Podignite predmetnicu, potom plohu predmetnice sa udubljenjem okrenite za 180°, a nakon toga lagano ju položite na pokrovnicu, tako da kapljica suspenzije (nakon što se predmetnica zalijepi za pokrovnicu) ostane u sredini udubljenja.
4. Pripravak podignite te ga polagano okrenite za 180°. Na pokrovnici će visiti kap iznad udubljenja u predmetnici.
5. Pripravak ostavite na stoliću mikroskopa nekoliko minuta da se umiri, a potom na pokrovnicu stavite kap imerzionog sredstva, namjestite imerzioni objektiv (100×) i mikroskopirajte tako da leća bude stalno uronjena u imerziju.
6. Nacrtajte mikroskopske slike, naznačite ime pripravka i ukupno povećanje.

7. Po završetku mikroskopiranja operite predmetnicu s udubljenjem u toploj vodi sa deterdžentom, obrišite ju i odložite na prikladno mjesto.

a) **Neizravna metoda - "Ubod u duboki agar"**

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica (izravnana, bez petlje), epruvete s dubokim agarom, suspenzija bakterija, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na svaku od epruveta s agarom napišite broj bakterijske kulture (3024 i 3060).
2. Suspenzije bakterija homogenizirajte laganim protresanjem epruvete o dlan ruke ili na vibro mikseru.
3. Sterilnom i ohlađenom izravnanim mikrobiološkom ušicom nacijepite bakterijsku kulturu u duboki agar tako da okomito ubodete u agar do dna podloge, a potom istim putem ušicu izvučete iz hranjive podloge.
4. Nacijepljene podloge inkubirajte pri 37 °C tijekom 24 do 48 sati.

Ad 5/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, Petrijeva zdjelica s hranjivom podlogom u kojoj je suspendirana anaerobna bakterijska kultura, paketić od filtrir papira s reaktivnom smjesom, keramička zdjelica s parafinom, ljepljiva traka, škare.

POSTUPAK:

1. Keramičku zdjelicu s parafinom zagrijte na plamenu da se parafin otopi.
2. Na površinu vanjskog dijela poklopca Petrijeve zdjelice zalijepiti paketić s reaktivnom smjesom.
3. Okrenuti poklopac tako da se paketić s reaktivnom smjesom nađe iznad hranjive podloge.
4. Dno i poklopac Petrijeve zdjelice po obodu zalijepite ljepljivom trakom, a potom zalijepljene rubove uronite u otopljeni parafin.
5. Inkubirajte pri 37 °C tijekom 24 do 48 sati.

Ad 6/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, čista prazna epruveta, mikrobiološka pipeta od 1mL i 10 mL, uzorak mlijeka, gumeni čep, metilensko modrilo za reduktazu.

POSTUPAK:

1. Pipetom od 10 mL, sterilno, uz upaljeni plamenik prenesite 9 mL mlijeka u praznu epruvetu.
2. Pipetom od 1 mL u mlijeko dodajte 1 mL metilenskog modrila.
3. Začepite epruvetu gumenim čepom.
4. Epruvetu uzmite u ruku te palcem čvrsto pridržavajte čep. Epruvetu potom okrećite

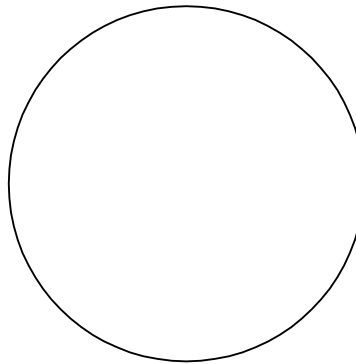
nekoliko puta za 180° kako bi se mlijeko sa metilenskim modrilom jednolično obojilo u plavo.

5. Epruvetu s uzorkom mlijeka stavite u termostat pri 37 °C i u određenim vremenskim intervalima (nakon 30, 90, 150, 210 i 240 minuta) pratite vrijeme odbojavanja mlijeka.

REZULTATI I ZAPAZANJA

Ad 1/

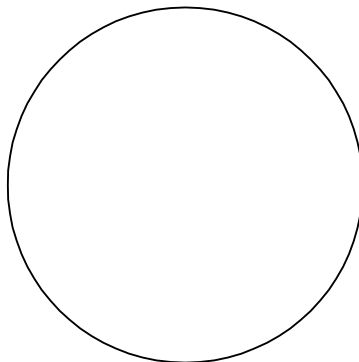
Mikroskopska slika priprema bakterije obojanog po Schaeffer-Fulton



P = ×

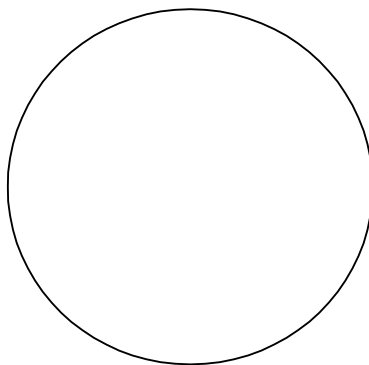
Ad 4.1./

**a) Mikroskopska slika priprema bakterije
(3024)**



P = ×

b) Mikroskopska slika pripravka suspenzije zemlje



P = **×**

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 5.

Datum održavanja vježbe:

1. Pregled materijala s prošle vježbe

- 1.1. Odvajanje sporogenih od nesporogenih bakterija
- 1.2. Biokemijska aktivnost bakterija
 - a) Hidroliza želatine (3001, 3014, 3060)
 - b) Hidroliza škroba (3001, 3060)
 - c) Hidroliza kazeina (3001, 3014)
 - d) Katalaza test (3001, 3014, 3024, 3048, 3060)
3001 – *Bacillus subtilis*
3014 – *Escherichia coli*
3024 – *Pseudomonas aeruginosa*
3048 – *Staphylococcus aureus*
3060 – *Sarcina* sp.
- 1.3. Pokretljivost bakterija
Neizravna metoda - "Ubod u duboki agar"
 - a) 3024 – *Pseudomonas aeruginosa*
(suspenzija zemlje)
 - b) 3060 – *Sarcina* sp.
- 1.4. Neizravno određivanje broja živih bakterija u mlijeku pokusom na reduktazu
(Određivanje vremena redukcije metilenskog modrila)
- 1.5. Uzgoj anaerobnih bakterija

2. Mikrobiocidno djelovanje

- 2.1. Soli teških metala
(Ag, Cu, Hg) (3014, 3048)
- 2.2. Antibiotika
(_____, _____, _____) (3014, 3048)
3014 – *Escherichia coli* (gram-negativna bakterija)
3048 – *Staphylococcus aureus* (gram-pozitivna bakterija)

Ad 1/**PREGLED MATERIJALA S PROŠLE VJEŽBE****1.1. Odvajanje sporogenih od nesporogenih bakterija**

Inkubirane epruvete, s prošle vježbe, podignite prema izvoru svjetlosti i zabilježite u kojoj epruveti je došlo do zamućenja podloge, što je dokaz prisutnosti porasle sporogene bakterijske kulture *Bacillus subtilis* (3045). U epruveti u kojoj nije došlo do zamućenja, nacijepljena je nesporogena bakterijska kultura *Staphylococcus aureus* (3048).

1.2. Biokemijska aktivnost bakterija**a) Hidroliza želatine****POTREBNO:**

Petrijeve zdjelice s poraslim bakterijskim kulturama, otopina HgCl_2

POSTUPAK:

1. Prelijte otopinom HgCl_2 hranjivu podlogu s poraslim bakterijama u Petrijevim zdjelicama i ostavite kratko vrijeme da HgCl_2 izreagira sa želatinom u podlozi (dio podloge će se obojati sivo).
2. Odlijte suvišak otopine.
3. Pogledajte da li je oko porasle bakterijske kulture na podlozi sa želatinom prisutna ili odsutna svjetla-prozirna zona (dokaz hidrolize želatine, odnosno sposobnost bakterijske kulture da sintetizira enzim želatinazu).
4. U dnevnik rada zabilježite rezultate.

b) Hidroliza škroba**POTREBNO:**

Petrijeve zdjelice s poraslim bakterijskim kulturama, lugol (otopina I_2 u KI)

POSTUPAK:

1. Prelijte lugolom hranjivu podlogu s poraslim bakterijskim kulturama u Petrijevim zdjelicama i ostavite kratko vrijeme da jod izreagira sa škrobom u podlozi (dio podloge će se obojati modro do ljubičasto).
2. Odlijte suvišak lugola.
3. Pogledajte da li je u oko porasle bakterijske kulture na podlozi sa škrobom prisutna ili odsutna modra (ljubičasta) boja podloge (prisutnost svjetle zone u okolišu porasta bakterije dokaz je da došlo do hidrolize škroba, odnosno sposobnost bakterijske kulture da sintetizira enzim amilazu).
4. U dnevnik rada zabilježite rezultate.

c) Hidroliza kazeina**POTREBNO:**

Petrijeve zdjelice s poraslim bakterijskim kulturama

POSTUPAK:

Nakon inkubacije pogledajte Petrijevu zdjelicu s poraslom bakterijskom kulturom na podlozi sa kazeinom te u dnevnik rada zabilježite: oko koje bakterijske kulture se vidi svijetla zona (mjesto gdje u podlozi više nema kazeina). Ta bakterijska kultura sintetizira enzim kazeinazu.

d) Katalaza test**POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetnica, pipeta, bakterijske kulture, 3%-tni H₂O₂

POSTUPAK:

1. Pomoću mikrobiološke ušice prenesite uzorak bakterijske kulture na predmetnicu.
2. Jednu kap 3%-tnog H₂O₂ kapnite na nanesenu bakterijsku kulturu. Burna reakcija - pojava šuma i mjehurića plina (kisik), pjenjenje - potvrda je pozitivnog testa.
3. Rezultate upišite u tablicu (Ad. 1.2. d).

1.3. Pokretljivost bakterija Neizravna metoda - "Ubod u duboki agar"

Inkubirane epruvete s nacijepjenim bakterijskim kulturama (3024 i 3060) podignite prema izvoru svjetla i zabilježite u dnevnik u kojoj epruveti se oko mjesta uboda u duboki agar vidi široka zona rasta. Širok rast bakterije oko mjesta uboda dokaz je pokretljivosti stanica te bakterije, dok je uska zona rasta bakterije oko uboda dokaz su bakterijske nepokretljivosti.

1.4. Određivanje vremena redukcije metilenskog modrila

Na osnovi vremena obezbojenja mlijeka (metilenskog modrila) procijenite kvalitetu vašeg istraživanih uzorka mlijeka. Rezultat upišite u dnevnik.

1.5. Uzgoj anaerobnih bakterija

Ako su na hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici porasle kolonije mikroorganizma i ako je paketić s reaktivnom smjesom potamnio, u Petrijevoj zdjelici su stvoreni anaerobni uvjeti i porasle su kolonije anaerobne bakterijske kulture.

PRAKTIČAN RAD**Ad 2/****Mikrobiocidno djelovanje****a) Soli teških metala****POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom u kojima su suspendirane kulture bakterija, epruvete sa solima teških metala, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na vanjsku površinu donjeg dijela Petrijevih zdjelica napišite u odabranim razmacima kratice za soli teških metala (sukladno prikazu na shemi).
2. Na čvrstu hranjivu podlogu (na obilježeno mjesto) pažljivo mikrobiološkom ušicom nanesite malo soli teškog metala. (**Ne istresati ili razmazivati!**)
3. Inkubirajte pri 37 °C tijekom 24 do 48 sati.

b) Antibiotika**POTREBNO:**

Bunsenov plamenik, diskovi od filter papira sa antibioticima, pinceta, boca s alkoholom, Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom u kojima su suspendirane odabrane kulture bakterija, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na površinu donjeg, vanjskog dijela Petrijevih zdjelica napišite u odabranim, pravilnim razmacima kratice istraživanih antibiotika (kao u prikazu na shemi).
2. Sterilizirajte metalnu pincetu na način da je uronite u etanol i provučete kroz plamen.
3. Sterilnom pincetom uzmete disk na kojem se nalazi istraživani antibiotik, a potom ga unesite u Petrijevu zdjelicu i položite na površinu čvrste hranjive podloge na udaljenosti oko 1 cm od unutarnjeg ruba Petrijeve zdjelice, te potom lagano pritisnite pincetom na označeno mjesto da čvrsto prione na hranjivu podlogu.
4. Inkubirajte pri 37 °C tijekom 24 do 48 sati.

REZULTATI I ZAPAZANJA

Ad. 1.1 Odvajanje sporogenih od nesporogenih bakterija

Ad. 1.2 Biokemijska aktivnost bakterija

a) Hidroliza želatine

b) Hidroliza škroba

c) Hidroliza kazeina

d) Katalaza test

Bakterija	3001	3014	3024	3048	3060
Katalaza test					

Legenda:

Ø → nema reakcije ; + → primjetna reakcija ; ++ → burna reakcija ; +++ → jako burna reakcija

Ad. 1.3 Pokretljivost bakterija: Neizravna metoda - "Ubod u duboki agar"

Ad. 1.4 Određivanje vremena redukcije metilenskog modrila

Ad. 1.5 Uzgoj anaerobnih bakterija

Potpis voditelja vježbe

--

VJEŽBA 6.

Datum održavanja vježbe:

1. Pregled materijala s prošle vježbe

1.1. Mikrobiocidno djelovanje (soli teških metala i antibiotika)

2. Izravno određivanje broja mikroorganizama brojanjem u Thominoj komorici (Ukupan broj mikroorganizama)

Ad 1.

PREGLED MATERIJALA S PROŠLE VJEŽBEMikrobiocidno djelovanje (soli teških metala i antibiotika)

Uzmite Petrijeve zdjelice s prošle vježbe i pogledajte na čvrstoj hranjivoj podlozi obilježena mjesta na kojima ste nanijeli soli teških metala i mjesta gdje ste stavili diskove filtrir papira s odabranim i istraživanim antibioticima.

Ukoliko je došlo do mikrobiocidnog djelovanja soli teških metala ili antibiotika, oko tih mjesta pojavit će se prozirne zone, tj. na tim mjestima na hranjivoj podlozi neće biti prisutan porast kolonija istraživane bakterijske kulture. Prema veličini (izmjerenom promjeru) nastale zone inhibicije, procijenite intezitet mikrobiocidnog djelovanja soli teških metala i antibiotika, te potom rezultate upišite u priloženu tablicu sukladno oznakama u legendi.

Mikrobiocidni agens (sol teškog metala; antibiotik)	Pozitivan rezultat inhibicije	Negativan rezultat inhibicije	Pozitivan rezultat inhibicije	Negativan rezultat inhibicije	Promjer zone inhibicije (mm)	Promjer zone inhibicije (mm)
2.1.	3014	3014	3048	3048	3014	3048
Ag						
Cu						
Hg						
2.2.						

Legenda:

0 → Nema inhibicije; + → Inhibitor; ++ → Jak inhibitor; +++ → Najjači inhibitor

PRAKTIČAN RAD

Ad 2./

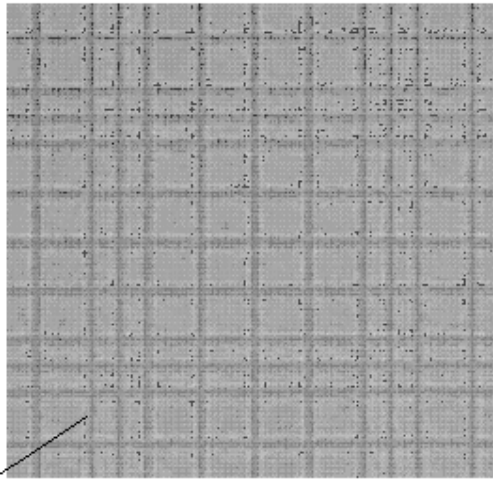
POTREBNO:

Bunsenov plamenik, vibro mikser, Thomina komorica, vata, HCl, destilirana voda, etanol, aceton, epruveta sa suspenzijom kvasaca, pipeta od 1 mL

Uzmite Thominu komoricu i njenu pokrovnicu. Makroskopski, gledajući na komoricu, uočite na središnjem polju mali ugravirani križić (mrežicu). Komoricu stavite na stolić mikroskopa i mikroskopirajte objektivom povećanja 10× dok u vidnom polju ne vidite cijelu mrežicu koja se sastoji od 16 velikih kvadrata (4×4), a svaki veliki kvadrat podijeljen je na 25 malih kvadratića (5×5). Okrenite na revolveru objektiv povećanja 40× i pogledajte jedan veliki kvadrat na mrežici.

POSTUPAK:

1. Thominu komoricu i njezinu pokrovnicu prije pripreme pripravka dobro operite na slijedeći način:
 - a. Namočite vatu u HCl i prebrišite predmetnicu i pokrovnicu.
 - b. Isperite ih destiliranom vodom, potom etanolom, a na kraju acetonom.
2. Thominu komoricu stavite na stol pored upaljenog plamenika.
3. Iz tuljca uzmite sterilnu pipetu te pomoću nje kap pripremljene suspenzije kvasaca prenesite točno na površinu mrežice.
4. Uzmite pokrovnicu, te ju jednim bridom pristonite na lijevo ili desno polje koja se nalaze uz centralno polje (na kojem je ugravitirana mrežica), te ju pažljivo spustite preko kapljice.
5. Komoricu primite s obje ruke tako, da kažiprstima pridržavate komoricu. Palčevima lagano utrljavajte pokrovnicu povlačeći je naprijed-nazad sve dok se na oba susjedna polja ne pojave Newtonovi kolobari (pokrovnica je čvrsto priljubljena i više se ne može pomicati).
6. Kad se pojave Newtonovi kolobari znači da je pripravak dobro pripremljen te možete pristupiti mikroskopiranju i brojanju stanica kvasca.
7. Ako su u pripravku prisutni mjehurići zraka, pomicanjem pokrovnice istjerajte ih u susjedne žlijebove, jer u dobro pripremljenom pripravku ne smije biti mjehurića zraka.
8. Nakon što je pripravak pripremljen, položite ga na stolić mikroskopa i mikroskopirajte prvo pod objektivom povećanja 10×.
9. Zatim mikroskopirajte objektivom povećanja 40×, pri kojem izbrojite stanice kvasca u jednom velikom kvadratu. (Svaki 5-ti stupac malih kvadratića na desnoj strani i 5-ti redak malih kvadratića na donjem rubu podijeljeni su ugraviranom crtom po sredini, koja označava granicu jednog velikog kvadrata i prelazak na drugi kvadrat). Broj izbrojanih stanica kvasca zapišite u dnevnik rada.
10. Nakon što svi za stolom izbroje stanice kvasca u jednom velikom kvadratu, izračunajte srednju vrijednost broja stanica u jednom velikom kvadratu, a zatim taj rezultat izrazite kao broj stanica kvasca/mL suspenzije.
11. Nakon provedenog brojanja, komoricu i pokrovnicu isperite destiliranom vodom i odložite na predviđeno mjesto.

REZULTATI I ZAPAZANJA

1 veliki kvadrat ($P=400\times$)

Izbrojani broj stanica kvasca u 1 velikom kvadratu (broji svaki student):

Srednja vrijednost broja stanica kvasca u 1 velikom kvadratu (zbroj rezultata svih studenata za stolom podijeljen sa brojem studenata):

Broj stanica kvasca u cijeloj mrežici:

Ukupan broj stanica kvasca u 1 mL suspenzije:

Broj decimalnih razrjeđenja:

Optimalno decimalno razrjeđenje:

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 7.

Datum održavanja vježbe:

1. Neizravno određivanje broja mikroorganizama brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici (Broj živih mikroorganizama)

Ad 1/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, vibro mikser, epruveta sa suspenzijom kvasca, epruvete s po 9 mL fiziološke otopine, pipete od 1 mL, Petrijeve zdjelice, rastaljeni sladni agar

Broj živih stanica kvasca odredit ćete brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici. Suspenziju stanica kvasca razrijedit ćete u omjerima 1:10 tako da broj stanica svedete u granice između 30 i 300 po mL. To decimalno razrjeđenje kod kojega je broj stanica između 30 i 300 / 1 mL zove se **optimalno decimalno razrjeđenje**.

POSTUPAK:

1. Postupak razrjeđivanja je slijedeći:

a. Na stalak stavite onoliko epruveta sa po 9 mL fiziološke otopine koliko ćete razrjeđenja napraviti. Označite ih brojevima razrjeđenja (1, 2, ...).

b. Uzmite suspenziju stanica kvasca i dobro je homogenizirajte. Sterilnom pipetom prenesite sterilno 1 mL suspenzije kvasca u epruvetu s brojem 1. Tako ste suspenziju kvasca razrijedili 10 puta i dobili decimalno razrjeđenje 10^{-1} .

c. Homogenizirajte sadržaj epruvete s brojem 1 te iz nje novom sterilnom pipetom prenesite 1 mL suspenziju u epruvetu s brojem 2 (razrjeđenje 10^{-2}).

d. Postupak razrjeđivanja ponavljajte sve dok ne napravite potreban broj decimalnih razrjeđenja.

e. Izvadite iz tuljca 3 prazne sterilne Petrijeve zdjelice i na poklopac svake napišite koje ćete decimalno razrjeđenje u nju staviti (stavljate 3 posljednja, prethodno pripremljena decimalna razrjeđenja i to: optimalno, jedno veće i jedno manje razrjeđenje od optimalnog).

2. Od tri odabrana decimalna razrjeđenja uzmite epruvetu s najvećim i dobro homogenizirajte. Novom sterilnom pipetom prenesite 1 mL tog razrjeđenja u praznu Petrijevu zdjelicu na čiji ste poklopac napisali taj broj razrjeđenja.

3. Ponovite taj postupak i sa ostala 2 decimalna razrjeđenja. Ako pipetirate počevši od najvećeg razrjeđenja pa prema najmanjem možete koristiti istu pipetu. U suprotnom trebate prije svakog pipetiranja uzeti novu sterilnu pipetu od 1 mL. Petrijeve zdjelice otvorite samo toliko da kroz taj otvor možete provući pipetu.

4. Nakon toga u Petrijeve zdjelice dodat ćete rastaljeni sladni agar (ohlađen na temp. od 45 °C), a nakon što se agar skrutne, stavite ih na inkubaciju u termostat pri 28°C. Brojanje poraslih kolonija i izračun broja mikroorganizama, odnosno CFU vrijednosti (CFU, *colony forming units*) prema priloženoj formuli (Ad 1.), napraviti ćete na narednoj vježbi.

Ad 1./

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja} \quad (\text{jed/mL})$$

CFU => Colony Forming Units (jedinice koje tvore kolonije)

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 8.

Datum održavanja vježbe:

1. **Pregled materijala s prošle vježbe**
 - 1.1. Određivanje broja živih mikroorganizama (Neizravni postupak)

2. **KVASCI - Sistematika, morfologija i mikroskopiranje pripravaka**
 - a) *Saccharomyces cerevisiae* (5)
 - b) *Saccharomyces uvarum* (20)
 - c) *Schizosaccharomyces pombe* (169)
 - d) *Candida utilis* (11)
 - e) *Hansenula anomala* (195)
 - f) *Rhodotorula* sp. (74)

3. **Sporulacija kvasca**
 - a) Gorodkova agar (5 – *Saccharomyces cerevisiae*)
 - b) Kriška mrkve (195 – *Hansenula anomala*)
 - c) Kriška krumpira (169 – *Schizosaccharomyces pombe*)

4. **Tvorba pseudomicelija u kvasca**
* Dalmau ploča (11 – *Candida utilis*)

5. **Oksidativno i fermentativno iskorištavanje C-spojeva**
(Glu – glukoza, Gal – galaktoza, S – saharoza, L – laktoza, M - maltoza)

6. **Iskorištavanje N-spojeva**
(KNO₃, pepton)

Ad 1/

PREGLED MATERIJALA S PROŠLE VJEŽBE

Uzmite Petrijeve zdjelice s poraslim kolonijama mikroorganizama s prošle vježbe. Procijenite na kojoj je poraslo između 30 i 300 kolonija, te na njoj izbrojite porasle kolonije. Brojati možete na svom mjestu točkanjem markerom s donje strane Petrijeve zdjelice ili upotrebom brojila kolonija (Colony counter). Iz izbrojanog broja poraslih kolonija odredite CFU vrijednost prema formuli (Ad 1.1).

PRAKTIČAN RAD

Ad 2/

KVASCI - Priprava nativnih (vlažnih) pripravaka

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetno i pokrovno stakalce, kulture kvasaca, mikroskop, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na dobro očišćenu predmetnicu kapnite kap destilirane vode i sterilnom mikrobiološkom ušicom prenesite uzorak kvasca s čvrste hranjive podloge u kapljicu vode.
2. Pokrovno stakalce jednim bridom položite na predmetnicu pod kutom od približno 45° i pomičite po predmetnici do kapljice. Kada je predmetnica dotakne kapljicu, lagano je spustite da nalegne na predmetnicu.
3. Pripravak stavite na stolić mikroskopa, pričekajte nekoliko minuta da se preparat umiri, na revolveru mikroskopa namjestite objektiv s najmanjim povećanjem (10×) da nađete sliku, a potom objektiv povećanja 40× i mikroskopirajte.
4. Nacrtajte mikroskopske slike i uz njih napišite ime kvasca i ukupno povećanje.

Ad 3/

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, epruvete s hranjivom podlogom (kriška mrkve, kriška krumpira, Gorodkova agar), kulture kvasaca - *Saccharomyces cerevisiae* (5), *Hansenula anomala* (195) i *Schizosaccharomyces pombe* (169), marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Sterilnom i ohlađenom mikrobiološkom ušicom uzmite malo kvasca s čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici.
2. Otvor epruvete u kojoj se nalazi podloga za sporulaciju sterilizirajte provlačenjem kroz plamen.
3. Nacijepite kvasac (5) mikrobiološkom ušicom u isprekidanim (cik-cak) potezima na površinu kosog dijela podloge (Gorodkova agar), a na krišku mrkve, kvasac (195) i na krišku krumpira, kvasac (169), povlačeći ušicu sa uzorkom kvasca u pravocrtnom potezu po jednoj od ploha, počevši od donjeg dijela plohe kriške prema gore.
4. Sve podloge s nacijepljenim kvascima inkubirajte pri 28 °C tijekom 24 do 48 sati.

Ad 4./

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Dalmau ploča, kultura kvasca *Candida utilis* (11), marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Sterilnom i ohlađenom mikrobiološkom ušicom uzmite kvasac s čvrste hranjive podloge u Petrijevoj zdjelici.

2. Na površinu hranjive podloge na Dalmau ploči (predmetnica sa agarom) pravocrtno u jednom potezu nanosite mikrobiološkom ušicom istraživani uzorak kvasca.
3. Potom na površinu hranjive podloge s nacijepljenim kvascem pažljivo položite pokrovnicu i lagano ju pritisnite kao bi što bolje prionila za podlogu.
4. Nacijepljenu podlogu (Dalmau ploču) inkubirajte pri 28 °C kroz 24 do 48 sati.

Ad 5./ i Ad 6./

a) Fermentativno iskorištavanje C-spojeva

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, kultura kvasca (5), serija epruveta sa sladovinom, određenim šećerom i Durhamovom epruveticom, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Sterilnom i ohlađenom mikrobiološkom ušicom na sterilan način nacijepite uzorak kvasca u svaku od označenih epruveta sa sladovinom i šećerom, u kojima se nalazi Durhamova epruvetica otvorom okrenutim prema dolje (radi hvatanja stvorenog plina CO₂).
2. Unesite ušicu u epruvetu i nekoliko puta protresite da se stanice s nje skinu i prenesu u podlogu.
3. Set epruveta sa hranjivom podlogom i kvascem nacijepljenim u tu podlogu inkubirajte pri 28 °C tijekom 24 do 48 sati.

b) Oksidativno iskorištavanje C- i N- spojeva

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, Petrijeve zdjelice s hranjivom podlogom u kojoj je suspendiran kvasac, epruvete sa šećerima, epruvete s dušikovim spojevima, marker za pisanje po staklu

POSTUPAK:

1. Na vanjski, donji dio Petrijevih zdjelica napišite kratice šećera na odabranim razmacima (prema prikazu na shemi), odnosno simbole istraživanih spojeva s dušikom.
2. Pažljivo prenesite određeni šećer, odnosno dušikov spoj na obilježeno mjesto (**Ne istresati ili razmazivati !**) na hranjivu podlogu.
3. Inkubirajte pri 28 °C tijekom 24 do 48 sati.

REZULTATI I ZAPAZANJA

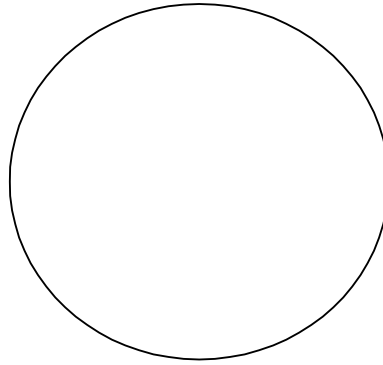
Ad 1.1./

$$\text{CFU} = \frac{\text{broj poraslih kolonija}}{\text{volumen upotrijebljenog uzorka}} * \text{recipročna vrijednost decimalnog razrijeđenja} \quad (\text{jed/mL})$$

CFU => Colony Forming Units (jedinice koje tvore kolonije)

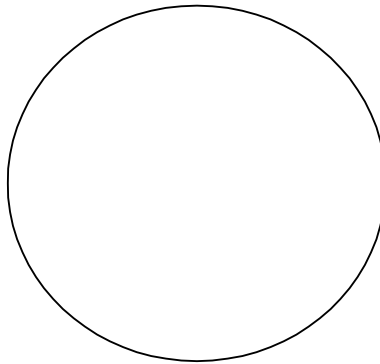
Ad 2./

a) Mikroskopska slika nativnog pripravka



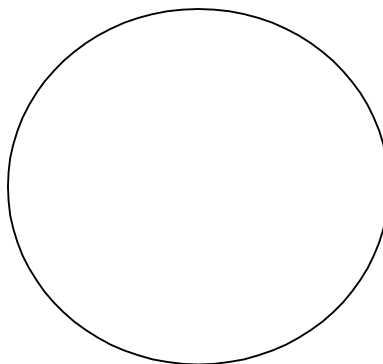
P = ×

b) Mikroskopska slika nativnog pripravka



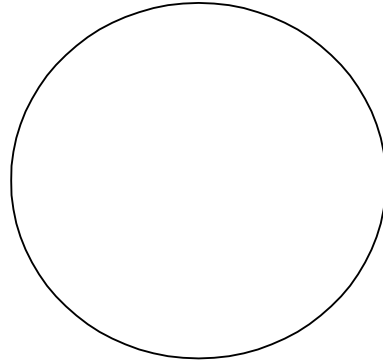
P = ×

c) Mikroskopska slika nativnog pripravka



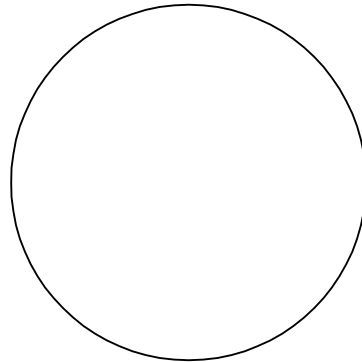
P = ×

d) Mikroskopska slika nativnog pripravka



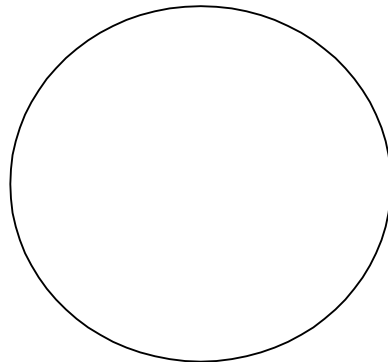
P = ×

e) Mikroskopska slika nativnog pripravka



P = ×

f) Mikroskopska slika nativnog pripravka



P = ×

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 9.

Datum održavanja vježbe:

1. Pregled materijala s prošle vježbe

1.1. Sporulacija kvasaca

Mikroskopiranje pripravaka kvasaca obojanih po Schaeffer-Fulton

- a) Gorodkova agar (5 - *Saccharomyces cerevisiae*)
- b) Kriška mrkve (195 - *Hansenula anomala*)
- c) Kriška krumpira (169 - *Schizosaccharomyces pombe*)

1.2. Tvorba pseudomicelija

Mikroskopiranje kvasca *Candida utilis* (11) – Dalmau ploča

- 1.3. Oksidativno i fermentativno iskorištavanje C-spojeva
- 1.4. Iskorištavanje N-spojeva

2. Određivanje broja živih i mrtvih stanica kvasca *Saccharomyces cerevisiae* (5) bojanjem puferiranom otopinom metilenskog modrila

3. Mikrometrija

* Određivanje veličine stanica kvasca

Ad 1/

PREGLED MATERIJALA S PROŠLE VJEŽBE

1.1. Sporulacija kvasaca

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetnice, kulture kvasaca, destilirana voda, malahitno zelenilo, safranin, mikroskop

POSTUPAK:

1. Predmetnicu dobro operite i odmastite u plamenu.
 2. Na sredinu predmetnice kapnite kap destilirane vode i sterilnom mikrobiološkom ušicom prenesite kulturu kvasca s hranjive podloge u kapljicu vode.
 3. Pomoću mikrobiološke ušice razvucite uzorak kvasca u što tanjem sloju po čitavoj površini predmetnice.
 4. Pripravak osušite na zraku, a zatim ga fiksirajte u plamenu (provlačite kroz plamen donju površinu predmetnice).
 5. Pripravak uhvatite drvenom štipaljkom i preko čitava (fiksiranog i ohlađenog) pripravka nanosite malahitno zelenilo.
 6. Držite pripravak iznad plamena i zagrijavajte ga dok bojilo ne počne isparavati.
- PAZITE!** Bojilo na pripravku se ne smije osušiti. Ukoliko do toga dođe odmah dodati još svježeg bojila.
7. Odmaknite pripravak ustranui postupak ponovite još dva puta (ukupno tri puta – trokratno zagrijavanje tijekom 1 minute).

8. Ohlađeni pripravak operite pod mlazom vodovodne vode.
9. **Na vlažni (oprani)** pripravak nakapajte kontrastno bojilo safranin i ostavite ga 3-5 minuta.
10. Operite pripravak pod mlazom vodovodne vode.
11. Kapljice vode posušite filtrir papirom, a potom na zraku.
12. Mikroskopirajte pripravak imerzionim objektivom (100x) uz upotrebu imerzione tekućine.
13. Nacrtajte mikroskopske slike, uz njih napišite ime mikroskopiranog kvasca i ukupno povećanje.

1.2. Tvorba pseudomicelija

Na stolić mikroskopa stavite Dalmau ploču (predmetnica s hranjivom podlogom i poraslim kolonijama kvasca). Na mikroskopu namjestite objektiv povećanja 10x, a potom povećanja 40x. Mikroskopirajte pripravak s poraslim kvascem u aerobnim uvjetima (mjesto na predmetnici bez pokrovnice), a potom kvasac porastao u anaerobnim uvjetima (mjesto na predmetnici koje je pokriveno pokrovnicom). Nacrtajte mikroskopske slike stanica kvasca poraslog u aerobnim i anaerobnim uvjetima, uz sliku stavite naziv kvasca i ukupno povećanje.

1.3. Fermentativno iskorištavanje C-spojeva

Pogledajte nakon inkubacije seriju epruveta s otopinama šećera i naciyepljenim kulturama kvasca. Vidljiv mjehurić plina (CO₂) u Durhamovim epruveticama je dokaz pozitivne reakcije (kvasac koji fermentira šećer). U epruvetama u kojima nema plina, reakcija je negativna (naciyepljeni kvasci ne fermentiraju šećere).

Rezultate upišite u tablicu Ad.1.3/1.4.

1.4. Oksidativno iskorištavanje C- i N- spojeva

Porast stanica kvasca na mjestu nanesenog šećera (C-spoj), odnosno N-spoja na hranjivoj podlozi je pozitivan test (kvasci mogu iskoristiti šećere, odnosno N-spojeve za rast i razmnožavanje). Izostanak porasta stanica kvasca je negativan test.

Rezultate zabilježite u tablicu Ad.1.3./1.4.

PRAKTIČAN RAD

Ad 2/

Određivanje broja živih i mrtvih stanica kvasca

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, predmetno i pokrovno stakalce, kultura kvasca (5 - *Saccharomyces cerevisiae* s Gorodkove agar), puferirana otopina metilenskog modrila, mikroskop

POSTUPAK:

1. Na dobro očišćenu predmetnicu kapnite kap puferirane otopine metilenskog modrila i sterilnom mikrobiološkom ušicom prenesite u tu kapljicu uzorak kvasca s čvrste hranjive podloge.
2. Na pripravak položite pokrovnicu i ostavite 5 minuta da preparat odstoji.
3. Pripravak stavite na stolić mikroskopa, namjestite objektiv s najmanjim povećanjem (10x) i pronađite sliku, a potom isto napravite sa objektivom povećanja 40x.

- U vidnom polju izbrojite sve mrtve stanice (obojane plavo) i sve žive stanice (nebojane).
- Nacrtajte mikroskopsku sliku i strelicom označite jednu mrtvu i živu stanicu, napišite Ime kvasca i ukupno povećanje, te potom izračunajte % živih stanica kvasca prema priloženoj formuli.

$$\% \text{ živih stanica kvasca} = \frac{\text{broj živih stanica}}{\text{ukupan broj}} \times 100$$

Ad 3/

Mikrometrija

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka pipeta, objektni i okularni mikrometar, suspenzija kvasca, predmetno i pokrovno stakalce, mikroskop

POSTUPAK:

- Izvadite okular iz mikroskopa i odvrnite gornji dio okulara, te u ležište okulara pažljivo stavite okularni mikrometar sa ugraviranom skalom (okrugla staklena pločica), tako da skala bude okrenuta prema gore.
- Okular vratite u mikroskop i pogledajte kroz okular kako bi uočili okularnu skalu.
- Na stolić mikroskopa stavite objektni mikrometar (predmetnica sa ugraviranom skalom).
- Pomoću objektiva povećanja 10×, a potom 40× nađite u vidnom polju sliku skale objektnog mikrometra. Svaki student treba vidjeti sliku!
- Okrećite okular sve dok skala okularnog mikrometra ne bude paralelna sa skalom objektnog mikrometra.
- Pomicanjem stolića mikroskopa dovedite objektnu skalu do okularne, tako da im se prve crtice preklape. Potom poradi baždarenja okularnog mikrometra na skalama potražite prvo mjesto gdje se preklapaju slijedeće dvije crtice okularnog i objektnog mikrometra. (**Radi svaki student!**)
- Zapišite pripadni broj podjeljaka objektna (a) i okularne (b) skale određen pri ukupnom povećanju 400×, te izračunajte f vrijednost, tj. faktor povećanja okularnog mikrometra prema formuli Ad 3. (**Radi svaki student!**)
- Sa stolića mikroskopa skinite objektni mikrometar i spremite ga u njegovu kutijicu.
- Iz suspenzije kvasca načinite nativni pripravak i stavite ga na stolić mikroskopa te nađite mikroskopsku sliku (objektiv povećanja 40×).
- U pripravku kvasca proizvoljno odaberite jednu stanicu kvasca i odredite broj podjeljaka koji zauzima ta stanica na okularnoj skali. Taj se broj pomnoži sa prethodno izračunatim faktorom povećanja i dobije se veličina odabrane stanice kvasca u mikrometrima (μm).

Primjer izračuna stvarne veličine stanice kvasca:

Ako stanica kvasca zauzima 2 podjeljka na okularnoj skali, a $f(400) = 2,5 \mu\text{m}$;
veličina stanice kvasca = $f(400) \times$ broj podjeljka okularne skale (μm)

Svaki student određuje broj podjeljaka za svoju odabranu stanicu kvasca i izračuna njenu stvarnu veličinu.

Potom se rezultati svih studenata za stolom za veličinu izmjerenih stanica kvasca zbroje, a zbroj podijeli sa brojem mjeritelja, te se dobije prosječna veličina stanica u istraživanoj suspenziji kvasca.

11. Iz okulara izvadite okularni mikrometar i spremite ga u kutijicu.

$$f = \frac{a \times 10}{b} \quad (\mu\text{m})$$

f - faktor povećanja okularnog mikrometra (μm)

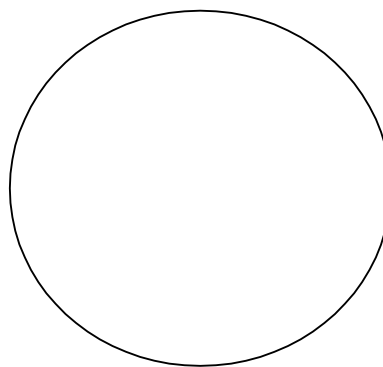
a - broj podjeljaka objektne skale

b - broj podjeljaka okularne skale

REZULTATI I ZAPAZANJA

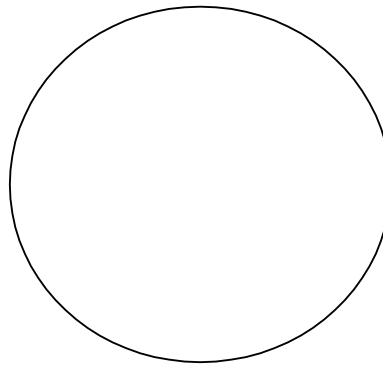
Ad 1.1./

a) Mikroskopska slika priprema kvasca uzetog sa Gorodkove agar, obojanog po Schaeffer-Fulton



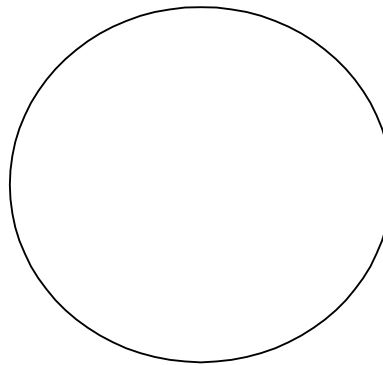
P = ×

b) Mikroskopska slika pripravka kvasca uzetog sa kriške mrkve, obojanog po Schaeffer-Fulton



P = ×

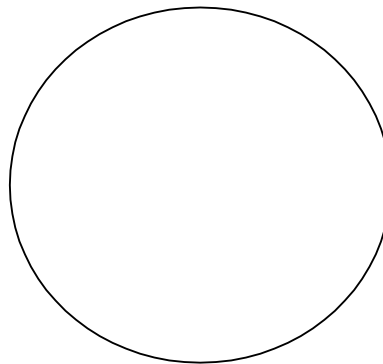
c) Mikroskopska slika pripravka kvasca uzetog sa kriške krumpira, obojanog po Schaeffer-Fulton



P = ×

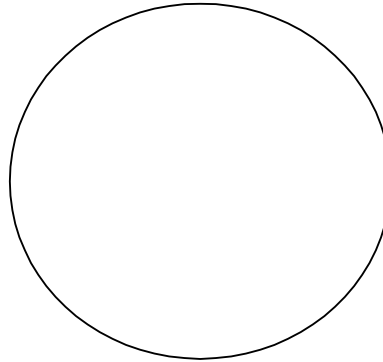
Ad 1.2./

Mikroskopska slika pripravka kvasca poraslog na Dalmau ploči - Aeroban rast



P = ×

Mikroskopska slika pripravka kvasca poraslog na Dalmau ploči - Anaeroban rast



P = ×

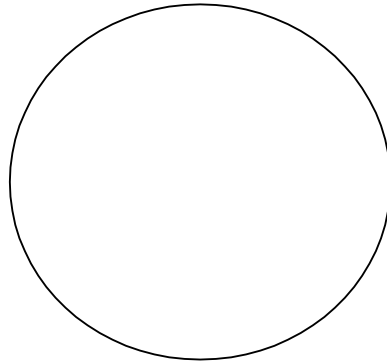
Ad 1.3/ i Ad 1.4/

ŠEĆERI; SPOJEVI S DUŠIKOM	OKSIDATIVNO ISKORIŠTAVANJE C-SPOJEVA	FERMENTATIVNO ISKORIŠTAVANJE C-SPOJEVA	ISKORIŠTAVANJE N-SPOJEVA
glukoza (Glu)			////////////////////////////////////
galaktoza (Gal)			////////////////////////////////////
saharoza (S)			////////////////////////////////////
laktoza (L)			////////////////////////////////////
maltoza (M)			////////////////////////////////////
KNO ₃	////////////////////////////////////	////////////////////////////////////	
Pepton	////////////////////////////////////	////////////////////////////////////	

Legenda: + → prisutan rast stanica kvasca ; - → nema rasta stanica kvasca

Ad 2.

Mikroskopska slika pripravka živih i mrtvih stanica kvasca
(Bojanje puferiranom otopinom metilenskog modrila)



P = ×

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 10.

Datum održavanja vježbe:

1. PLIJESNI - Sistematika, morfologija i mikroskopiranje nativnih pripravaka plijesni

Razdjel *Eumycota*

Podrazdjeli:

A) *Zygomycotina*

1) *Mucor* sp.*

2) *Rhizopus* sp.*

B) *Ascomycotina*

1) *Aspergillus* sp.*

2) *Penicillium* sp.*

C) *Deuteromycotina*

1) *Alternaria* sp.*

2) *Cladosporium* sp.

3) *Geotrichum* sp.

4) *Trichoderma* sp.

2. Mucorov kvasac

Ad 1.

PRAKTIČAN RAD

PLIJESNI - Priprema nativnog (vlažnog) pripravka (vidi priloženu shemu postupka).

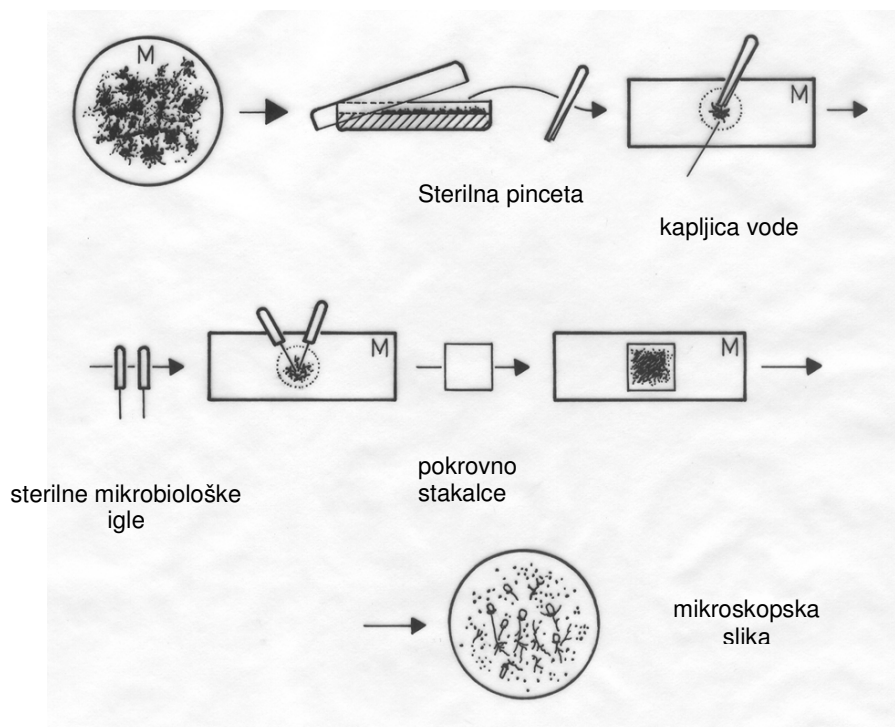
POTREBNO:

Bunsenov plamenik, pinceta, dvije mikrobiološke igle, predmetno i pokrovno stakalce, kulture plijesni, destilirana voda, mikroskop, zaštitna maska

POSTUPAK:

1. Stavite zaštitnu masku na lice.
2. Na dobro očišćenu predmetnicu, položenu na radni stol, stavite kap destilirane vode.
3. Uz upaljeni plamenik uzmite Petrijevu zdjelicu sa poraslom plijesni i pažljivo otvorite poklopac samo onoliko koliko je potrebno da s pomoću sterilne pincete (prethono uronjene u alkohol i spaljena u plamenu) uzmete (istrgnete) dio micelija plijesni sa čvrste hranjive podloge.

4. Nakon uzimanja micelija sterilnom pincetom odmah zatvorite Petrijevu zdjelicu.
5. Pažljivo prenesite uzorak micelija plijesni u kapljicu vode na predmetnici te sa dvije, prethodno u plamenu sterilizirane mikrobiološke igle, razvucite (macerirajte) micelij u što tanjem sloju, a potom igle ponovno sterilizirajte u plamenu i odložite.
6. Pripravak poklopite pokrovnicom, a potom drškom igle lagano pritisnite pokrovno stakalce da se micelij još više razvuče ispod pokrovnice.
7. Pripravak stavite na stolić mikroskopa i mikroskopirajte na način da mikroskopsku sliku prvo nađete pod objektivom najmanjeg povećanja (10×), a potom tu sliku gledate pod objektivom povećanja 40×.
8. Nacrtajte mikroskopske slike, uz njih napišite ime mikroskopirane plijesni i ukupno povećanje.



Postupak pripreve nativnog pripravka plijesni

Ad 2/

Mucorov kvasac

POTREBNO:

Bunsenov plamenik, mikrobiološka ušica, epruveta sa sladovinom (tekuća hranjiva podloga) i nacijepljenom kulturom plijesni (*Mucor* sp.)

POSTUPAK:

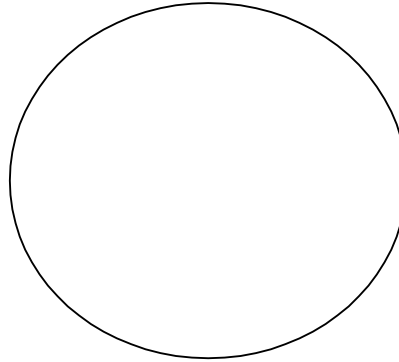
1. Na dobro očišćenu predmetnicu na koju je dodana kapljica vode, sterilnom mikrobiološkom ušicom nanosite malo uzorka kvasca, uzetog iz epruvete u kojoj se nalazi tekuća podloga sa submerzno poraslim Mucorovim kvascem.

2. Poklopite pokrovnicom i mikroskopirajte uz objektiv povećanja 40×.
3. Nacrtajte mikroskopsku sliku, uz nju naznačite ime pripravka i ukupno povećanje.

REZULTATI I ZAPAZANJA

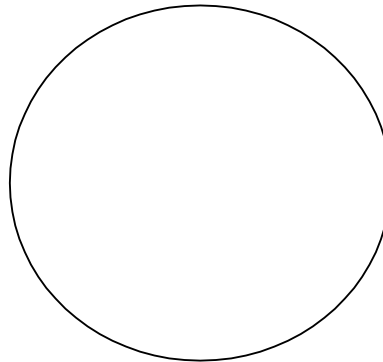
Ad 1./

A 1/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



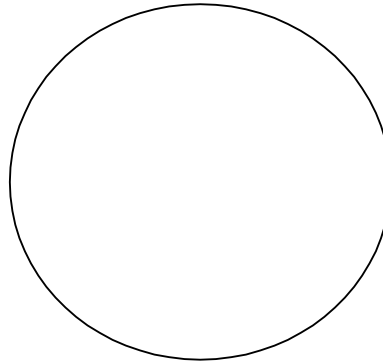
P = ×

A 2/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



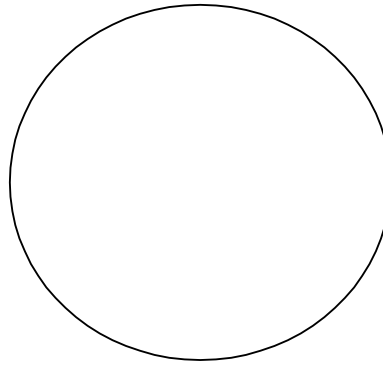
P = ×

B 1/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni.....



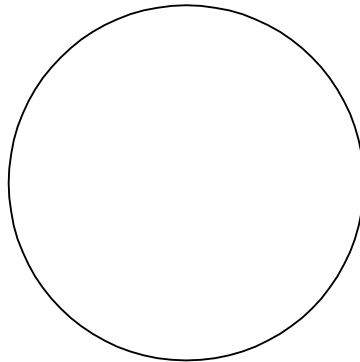
P = x

B 2/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



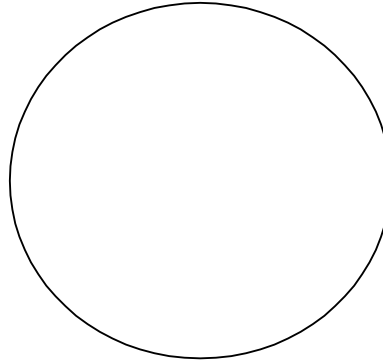
P = x

C 1/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



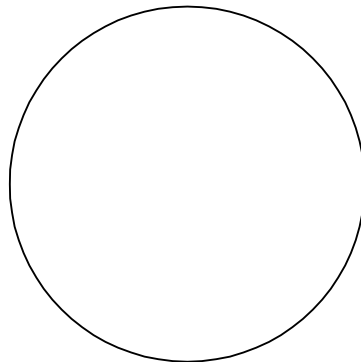
P = x

C 2/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



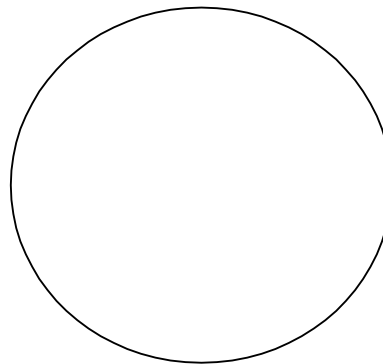
P = ×

C 3/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



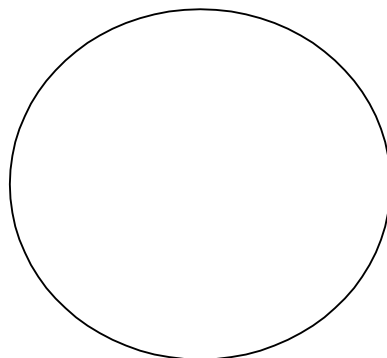
P = ×

C 4/ Mikroskopska slika nativnog pripravka plijesni



P = ×

Ad 2/ Mikroskopska slika pripravka Mucorovog kvasca



P = ×

Potpis voditelja vježbe

VJEŽBA 11.

Datum održavanja vježbe:

PRAKTIČAN RAD

**Prepoznavanje nativnih i obojanih mikroskopskih pripravaka mikroorganizama:
bakterija, kvasaca i plijesni**

ZAVRŠNI KOLOKVIJ

Potpis voditelja vježbe

--

BILJEŠKE:

BILJEŠKE: