

**PRAKTIKUM IZ MIKROBIOLOGIJE**  
**za studente stočarstva**

Skripta

Dr Mirjana Bojanić Rašović

Podgorica, februar, 2016. g.

## Sadržaj

## Strana

1. Rad u mikrobiološkoj laboratoriji. Mikroskop i rukovanje. mikroskopom.....	1
2. Laboratorijsko posuđe, pribor i aparati. Pranje i priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju. Primjena sterilizacije u mikrobiologiji.....	15
3. Vrste i tehnika izrade mikroskopskih preparata.....	22
4. Morfologija bakterija, gljiva (plijesni i kvasaca), protozoa i virusa.....	29
5. Hranljive podloge. Kultivisanje mikroorganizama.....	37
6. Izdvajanje čistih kultura mikroorganizama.....	45
7. Određivanje nekih biohemijskih karakteristika mikroorganizama.....	50
8. Serološka dijagnostika bakterijskih oboljenja.....	63
9. Mikroorganizmi buraga.....	74
10. Mikroorganizmi silaže.....	77
11. Mliječno-kisjela fermentacija.....	79
12. Mikrobiološko ispitivanje stočne hrane. Mikrobiološko ispitivanje namirnica animalnog porijekla.....	81

## I Vježba

### **Rad u mikrobiološkoj laboratoriji. Mikroskop i rukovanje mikroskopom**

#### **Pitanja**

1. Koje se aktivnosti obavljaju u mikrobiološkoj laboratoriji?
2. Koje prostorije treba da ima mikrobiološka laboratorija?
3. Koja su osnovna pravila kojih se moramo pridržavati tokom rada u mikrobiološkoj laboratoriji?
4. Šta je mikroskop i koje vrste mikroskopa postoje?
5. Koji su mehanički, a koji optički djelovi mikroskopa?
6. Šta čini sistem za osvetljavanje mikroskopa?
7. Opiši tehniku mikroskopiranja.
8. Koji su mogući razlozi nastanka mutne slike tokom mikroskopiranja?
9. Kako se mjere mikroorganizmi?

#### **Rad u mikrobiološkoj laboratoriji**

Mikrobiološke laboratorije su složene i dinamične sredine koje imaju određene specifičnosti u odnosu na druge vrste laboratorija. U mikrobiološkim laboratorijama se obavlja mikrobiološki pregled materijala porijeklom od životinja, biljaka, mikrobiološki pregled životnih namirnica, zemljišta, vode, vazduha, stočne hrane i dr. Cilj mikrobioloških pregleda je izolacija određenih vrsta mikroorganizama, kao i njihovo gajenje u cilju izučavanja morfologije njihovih ćelija, odgajivačkih, fiziološko-biohemijskih i genetičkih svojstava. Pošto je tokom rada u mikrobiološkoj laboratoriji moguće doći u kontakt sa patogenim mikroorganizmima, u mikrobiološkoj laboratoriji se moraju poštovati određena pravila i uputstva. Ljudska greška, loše laboratorijske tehnike pogrešna upotreba opreme mogu prouzrokovati većinu povreda i infekcija u laboratoriji. Nepravilno sakupljanje, transport i rukovanje uzorcima do laboratorije nose rizike od infekcija radnog osoblja.



Mikrobiološka laboratorija

<http://milmedika.com/services-list/mikrobioloska-laboratorija/>

### Uputstva za rad u mikrobiološkoj laboratoriji

Laboratorija treba da bude besprekorno uredna, čista i oslobođena predmeta i materijala koji nisu u direktnoj vezi sa poslom koji se obavlja. U slučaju kada se prozori otvaraju, oni moraju imati zaštitne mrežice od ulaska insekata i sl. U laboratoriju ne treba unositi nepotrebne predmete i garderobu, održavati besprekornu čistoću radnih prostorija i radnih površina. Radni sto prije početka i poslije završenog rada treba prebrisati dezinfekcionim sredstvom. Hranljive podloge, hemikalije, mikrobiološke kulture, pribor i aparati treba da budu uredno složeni i da imaju svoja određena mjesta u laboratoriji. Ulaz u laboratoriju je dozvoljen samo radnom osoblju. U laboratoriju treba ući čist i u čistom neoštećenom bijelom pamučnom mantilu. Nepoželjna su suvišna kretanja, nagli pokreti i suvišni razgovori u laboratoriji. Osoblje mora imati kratko podsječene nokte i vezanu kosu. Obavezno prati ruke toplom vodom i tečnim sapunom prije, kao i nakon mikrobioloških ispitivanja, a ruke brisati papirnim ili pamučnim peškirim. Ne razgovarati i ne kašljati za vrijeme inokulacije materijala na ploče i epruvete. Ne dozvoliti rad u laboratoriji osoblju sa infekcijom ili povredom ruku ili lica. Vrata laboratorije treba držati zatvorena. Odgovarajuće rukavice moraju se obavezno koristiti tokom rada sa uzorcima krvi, tjelesnih tečnosti i drugih potencijalno zaraznih materijala, kao i tokom rada sa zaraženim životinjama. Poslije upotrebe, rukavice treba aseptički ukloniti i oprati ruke. Zaštitne naočare, maske za lice i druga zaštitna sredstva moraju se nositi kada je neophodno zaštititi lice i oči od prskanja tečnosti, čvrstih predmeta i izvora vještačkog ultraljubičastog zračenja. Zabranjeno je nositi zaštitnu laboratorijsku odjeću van laboratorije, tj. u kantinama, kafeterijama, kancelarijama, bibliotekama, drugim prostorijama za osoblje i toaletima. Zaštitna laboratorijska odjeća koja je korišćena u laboratoriji ne smije se odlagati u čiste ormariće zajedno sa odjećom koja se nosi na ulici. Iz bezbjedonosnih razloga u laboratoriji se ne smije nositi obuća otvorenih prstiju. Pipetiranje ustima strogo je zabranjeno. Ne stavljati u usta nikakve predmete za vrijeme rada u laboratoriji. Sve tehničke procedure treba sprovoditi na način koji maksimalno smanjuje stvaranje aerosola i kapljica. Zabranjeno je unositi hranu u laboratoriju, jesti, piti i pušiti. Tokom rada u laboratoriji ne dodirivati nos, oči i usta. Po stolovima ne ostavljati nečisto staklo, pribor, vatu, vatene zapušače, papir, nepotrebne i otvorene

kulture mikroorganizama itd. Sav otpadni materijal stavljati u posude ili korpe za otpatke. Kontaminirani materijal i predmete s mikroorganizmima odlagati u posebne sudove s dezinfekcionim sredstvom. Upotrijebljeni pribor i posude prije pranja staviti u žičane korpe i obavezno sterilisati u autoklavu. Upotrijebljene pipete, pločice, ljuspice i dr. stavljati u posebne sudove sa dezinfekcionim sredstvom. Zaprljana mjesta, kao i mjesta na kojima je prosuta kultura mikroorganizama, treba prelići dezinfekcionim sredstvom ili 70% alkoholom. Prije i poslije uzimanja kulture mikroorganizama, bakteriološke igle i Petlje (eze) treba sterilisati (opaliti) na plamenu. U slučaju da se petljom ili iglom zahvata materijal koji je sluzast, ezu sa materijalom treba osušiti prije sterilizacije na plamenu, jer u suprotnom, može doći do rasprskavanja i rasijavanja materijala, odnosno živih mikroorganizama. Posebnu pažnju treba obratiti na rukovanje butan bocama i autoklavom. Butan boce trebaju biti uvijek dobro zatvorene, a autoklav se nikad ne smije otvarati dok je pod pritiskom vodene pare. Kontaminirane tečnosti moraju se dekontaminirati (hemijski ili fizički) prije ispuštanja u sanitarnu kanalizaciju. Pisana dokumenta treba zaštititi od kontaminacije za vrijeme rada u laboratoriji. Osoblje uvijek treba da bude informisano o mogućim rizicima za unošenje patogenih mikroorganizama (udisanjem, preko kože, rana na koži itd.). Poznavanje dezinfekcije i sterilizacije je od izuzetne važnosti za biološku bezbjednost u laboratoriji. Dezinfekciju vazduha i površina treba dodatno vršiti UV lampom. Neophodno je poznavati značaj čišćenja pribora, opreme i sl. prije dezinfekcije. Poznavati toksične efekte hemikalija sa kojima se radi u laboratoriji (moguće trovanje udisanjem, kontaktom, unošenjem, iglom, kroz oštećenu kožu.). Samo potrebne količine hemikalija za dnevnu upotrebu treba držati u laboratoriji, a veće u specijalno određenim prostorijama ili zgradama. Zbog mogućnosti izbijanja požara u laboratoriji redovno kontrolisati ispravnost protivpožarnih aparata itd.

### **Djelovi mikrobiološke laboratorije**

Mikrobiološka laboratorija se sastoji od:

1. radne prostorije i
2. pomoćnih prostorija.

**U radnoj prostoriji** se vrši zasijavanje ispitivanih uzoraka, odnosno izolovanih kultura mikroorganizama, inkubacija i determinacija mikroorganizama (morfološka, biohemijska i druga ispitivanja mikroorganizama). U zavisnosti od vrste mikrobioloških analiza koje se rade, radne prostorije mogu biti namijenjene za: bakteriološke analize, mikološke analize i virusološke analize.

**Pomoćne prostorije** u mikrobiološkoj laboratoriji su:

- prostorija za prijem uzoraka, vođenje i čuvanje dokumentacije
- prostorija za pripremu uzoraka
- prostorija za pranje laboratorijskog posuđa
- prostorija za sterilizaciju posuđa
- prostorija za pripremu i sterilizaciju hranljivih podloga
- prostorija za čuvanje potrošnog materijala itd.

Laboratorije mogu imati 4 nivoa biološke bezbjednosti: od 1-4, pri čemu je nivo 1 osnovni, a nivo 4 maksimalni nivo biološke bezbjednosti. Sve dijagnostičke laboratorije moraju imati najmanje nivo 2 biološke bezbjednosti ili viši. Međunarodni simbol i znak za biološku opasnost mora biti postavljen na vrata prostorija gdje se rukuje mikroorganizmima rizične grupe 2 ili višeg nivoa (slika 1).

Slika 1. Znak upozorenja na biološku opasnost za laboratorijska vrata



Ovlašćenje za ulaz mora da odobri odgovorni istraživač naveden gore:

Slika 1. Međunarodni znak za biološku opasnost

## Mikroskop i tehnika mikroskopiranja

Mikroskop je instrument pomoću kojeg je moguće dobiti uveličanu sliku nekog objekta. Mikroskop omogućava posmatranje i izučavanje mikroorganizama. U zavisnosti od izvora svjetlosti koji koriste, postoje:

- svjetlosni mikroskopi koji kao izvor svjetlosti koriste svjetlost i
- elektronski mikroskopi, koji umjesto izvora svjetlosti koriste snop elektrona

U svjetlosne (optičke) mikroskope se ubrajaju:

- Mikroskop sa svijetlim poljem (običan svjetlosni mikroskop)
- mikroskop sa tamnim poljem
- fluorescentni mikroskop i
- fazno-kontrastni mikroskop.



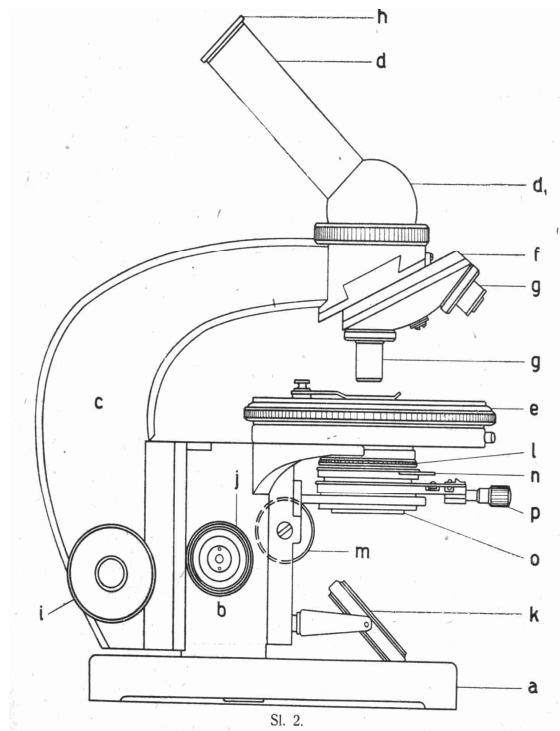
**Slika 2.** Svjetlosni mikroskop  
( <http://www.conrad.si/?websale8=conrad-slowenien&pi=1174475>)

### **Mikroskop sa svjetlim poljem**

Ovaj mikroskop se najčešće koristi u mikrobiološkim laboratorijama. On omogućava određivanje oblika, veličine, boje, pokretljivosti, prisustvo kapsule i oblika za konzervaciju mikroorganizama, a kod krupnijih, kao što su gljive, alge i protozoe i izučavanje građe ćelije. Običan svjetlosni mikroskop se sastoji iz: optičkih i mehaničkih dijelova (slika 3).

**Mehanički dijelovi su:** postolje, ručica, stočić sa mehanizmom za pomjeranje preparata, tubus, rotor (revolver), zavrtnaj kondenzora, mikrometerski zavrtnaj i makrometerski zavrtnaj.

**Optički dijelovi mikroskopa su:** okulari, objektiv, kondenzor i sistem za osvjetljenje



**Slika 3. Šema svjetlosnog mikroskopa:**

a - postolje, b – stalak, c – ručica, d – tubus, e – stočić, f - "revolver" za objektiv, g – objektiv, h – okular, i - veliki ili makrometarski zavrtnaj, j - mali ili mikrometarski zavrtnaj, k - ogledalo (ili drugi izvor svjetla), l - kondenzor, m – zavrtnaj za vertikalno pomjeranje kondenzora, n - dijafragma (iris-zaslon), o - okvir za filtere, p - zavrtnaj za horizontalno pomjeranje kondenzora <http://e-skola.biol.pmf.unizg.hr/odgovori23.htm>

### **Funkcija mehaničkih dijelova mikroskopa**

Postolje omogućava stabilan položaj mikroskopa. U postolje je ugrađen sistem za osvjetljenje. Ručica ili stativ služi za prenošenje mikroskopa. Na donjem kraju je povezana sa postoljem, a za gornji kraj ručice je pričvršćen tubus. Stočić služi za postavljanje mikroskopskih preparata. Može se pomjerati gore-dolje, lijevo-desno i naprijed–nazad. Tubus je cijev na čijim krajevima se nalaze optički dijelovi. Na gornjem dijelu se nalaze okulari, a na donjem rotor sa objektivima. Zavrtnaj kondenzora služi za podizanje i spuštanje kondenzora, čime se reguliše intenzitet osvijetljenosti preparata. Ram za svjetlosni filter - u njemu se prema potrebi stavlja odgovarajući filter.

### **Funkcija optičkih dijelova mikroskopa**

Okulari su smješteni u gornjem dijelu tubusa. Obično su izgrađeni iz dva sočiva, gornjeg okularnog i donjeg sabirnog. Sposobnost uveličanja naznačena je na samom okularu sa arapskim brojevima. Objektivi su smješteni u ležištima na rotoru. Okretanjem rotora objektiv dolazi u pravilan položaj koji omogućava prodiranje svjetlosti. Pri okretanju rotora čuje se lagani pucanj, pa se zbog toga rotor zove i revolver. Objektivi se sastoje iz



sistema slijepljenih sočiva koja omogućavaju uveličavanje posmatranog objekta. Sposobnost uveličavanja je označena na svakom objektivu. U odnosu na način korištenja postoje objektivi suvog sistema i imerzioni objektivi. **Objektivi suvog sistema** imaju veće frontalno sočivo i manju sposobnost uveličavanja. Između sočiva i preparata nalazi se vazduh, a prolaskom kroz vazduh svjetlost se djelimično gubi, pa slika nije dovoljno jasna. Ovi objektivi se koriste za posmatranje krupnijih mikroorganizama. **Imerzioni objektivi** imaju malo frontalno sočivo, a prilikom posmatranja objektiv se nalazi na veoma maloj razdaljini od preparata. Da bi se smanjio gubitak svjetlosti, na preparat se stavlja tečnost koja ima indeks prelamanja svjetlosti približno staklu. To je npr. kedrovo ulje. Imerzioni objektivi se koriste za posmatranje bakterija i drugih sitnijih mikroorganizama. **Kondenzor** predstavlja niz sočiva koji služe da sakupe svjetlosne zrake i usmjere ih na objekat, tj. preparat. Pomoću kondenzora se može regulisati intenzitet svjetlosti njegovim podizanjem i spuštanjem, kao i otvaranjem i zatvaranjem dijafragme koja je ugrađena u kondenzor. **Dijafragma** se nalazi između izvora svjetlosti i kondenzora. Sastoji se iz polukružnih ljuspica koje se pomjeranjem odgovarajuće poluge skupljaju ili šire, praveći u centralnom dijelu manji ili veći otvor za prolaz svjetlosti. **Pribor za osvetljenje** sastoji se od sijalice i ogledala i ugrađeni su u postolje mikroskopa. Ogledalo je fiksirano u položaj koji omogućava najbolju refleksiju.

**Mikroskop sa tamnim poljem** ima ugrađen kondenzor sa tamnim dnom, tako da svjetlost ne prolazi kroz kondenzor, nego sa strane osvetljava preparat. Na taj način se dobija slika sa potpuno tamnim vidnim poljem na kome su osvijetljeni samo posmatrani objekti.

**Fluorescentni mikroskop** kao izvor svjetlosti koristi ultravioletne zrake. Posmatrani objekti prilikom izlaganja ovim zracima fluoresciraju. Ako objekat nema mogućnost fluorescencije, tretira se odgovarajućim fluorescentnim bojama fluorohromima.



Slika 4. Fluorescentni mikroskop (<http://metron.hr/proizvod/mikroskopi-8/>)

**Fazno-kontrastni mikroskop** ima objektivne u koje je ugrađena pločica na koju je u obliku prstena nanijet sloj plemenitog metala, a na dijafragmi kondenzora se nalazi prsten kroz koji prolazi svjetlost. Kad svjetlost kroz prsten na dijafragmi dođe do posmatranog objekta, ona skreće i stvara kontrast između objekta i okoline. Pomoću ovog mikroskopa se posmatraju neobojeni mikroorganizmi i njihovi strukturni elementi.

**Invertni mikroskopi** se koriste za posmatranje kulture tkiva. Čelije kulture tkiva se nalaze u specijalnoj posudi za kulturu i nemoguće im je objektivom običnog mikroskopa prići dovoljno blizu. Kod invertnog mikroskopa objektiv se nalaze ispod objekta, a izvor svjetlosti iznad. Na taj način objektiv mogu prići odozdo dovoljno blizu objektu koji se nalazi na dnu neke posude.



**Slika 5.** Invertni mikroskop [http://mss.svarog.si/biologija/index.php?page\\_id=7573](http://mss.svarog.si/biologija/index.php?page_id=7573)

**Elektronski mikroskop** za stvaranje slike posmatranog objekta koristi kretanje elektrona iz katodne cijevi. Kad elektroni dospiju na preparat, mijenjaju pravac kretanja te se na osnovu stepena rasipanja zraka dobije kontrastna slika. Pomoću elektronskog mikroskopa mogu se posmatrati čestice veličine i do 0,5nm, pa se koristi za posmatranje strukture ćelije i za posmatranje virusa. Pomoću elektronskog mikroskopa može se postići uveličanje slike 100 000 do 200 000 puta.

Postoje dvije vrste elektronske mikroskopije: **skenirajuća elektronska mikroskopija** (SEM), koja omogućava posmatranje površine ispitivanog objekta. Ovaj vid mikroskopije ne omogućava uočavanje unutrašnje strukture objekta. Elektroni se odbijaju od preparata ili prolaze kroz njega i padaju na ekran, dajući sliku ispitivanog objekta. **Transmisiona elektronska mikroskopija** (TEM, slika 6) neophodna je pri proučavanju unutrašnje strukture objekta. Objekat se priprema sječenjem na vrlo tanke listove i tretiranjem specijalnim bojama u cilju povećanja kontrasta. Slika se stvara prolaskom elektrona kroz preparat i njihovim padanjem na ekran.



**Slika 6.** Transmisioni elektronski mikroskop  
<http://www.bio.bg.ac.rs/cem/styled/styled-2/index.html>

#### **Tehnika mikroskopiranja (slika 8)**

1. Uključiti sistem za osvetljenje
2. Kondenzor se podigne do stočića i otvori dijafragma
3. Iznad otvora na stočiću centriraju se objektiv sa najmanjim uvećanjem
4. Pomoću makrometarskog zavrtnja stočić se podigne na udaljenost oko 1cm od objektiva.
5. Posmatranjem kroz okular treba da se vidi pravilan i dobro osvijetljen krug
6. Preparat se stavi iznad otvora na stočiću i podizanjem i spuštanjem stočića pomoću makrometarskog zavrtnja pronade se slika posmatranog objekta.
7. Izoštavanje slike vrši se okretanjem mikrometarskog zavrtnja, podizanjem ili spuštanjem kondenzora i zatvaranjem i otvaranjem dijafragme na kondenzoru.
8. Pronalaženje slike treba vršiti veoma pažljivo da ne dođe do lomljenja preparata i oštećenja sočiva na objektivu.
9. Da bi se dobila krupnija slika objekta, okrene se objektiv sa većim uvećanjem
10. Ako se koristi imerzioni objektiv, na preparat se stavi imerziona tečnost.
11. Nakon završenog mikroskopiranja, optičke djelove (objektiv, okular) treba očistiti ksilolom, a ostale djelove čistom maramicom.



**Slika 7. Mikroskopiranje**

<http://www.zjz.org.rs/foto-galerija-centar-za-mikrobiologiju/>

**Smetnje koje se mogu pojaviti tokom mikroskopiranja:**

U toku mikroskopiranja se mogu javiti određene smetnje, kao što su:

- mutna, nejasna slika
- sjenke
- mjehurovi
- mrlje i strana tijela u vidnom polju
- vibriranja slike itd.

**Mutna slika** može da nastane usljed:

- upotrebe suvog objektiva umjesto vlažnog,
- nedovoljno čistog objektiva na kome se nalazi sasušeno ulje
- pogrešno postavljenog preparata (razmaz okrenut na dolje, a ne prema objektivu)
- oštećenja frontalnog sočiva što je prouzrokovalo ulazak ulja u objektiv

**Sjenke i mjehurići u vidnom polju se javljaju:**

- ako se na preparat stavi suviše velika kap ulja,
  - ako se preparat mikroskopira nedovoljno osušen, pa dolazi do miješanja ulja i vode
- Nečistoća, mrlje i strana tijela koja se javljaju u vidnom polju mogu se nalaziti na:
- okularu, što se provjerava okretanjem okulara u tubus; pokretanje mrlje pri tome je znak da okular treba očistiti;
  - samom preparatu, odnosno staklu, što se pomjeranjem preparata takođe može utvrditi;
  - na objektivu ili kondenzoru, pri čemu se one ne kreću prilikom pomjeranja okulara ili preparata.

**Vibriranje slike** može da nastane usljed:

- nedovoljno fiksiranog preparata ili nepravilnog položaja objektiva u odnosu na optičku osu mikroskopa. Navedene smetnje moguće je otkloniti. Ukoliko je u pitanju nečistoća, objektiv i okulare treba očistiti mekanom krpom ili specijalnom hartijom za čišćenje objektiva. Mrlje od ulja se skidaju krpicom natopljenom u ksilolu. Međutim, treba imati u vidu da prekomjerna upotreba ksilola može oštetiti objektiv. Poslije skidanja ulja objektiv se moraju obrisati suvom krpom itd.

## Čuvanje mikroskopa

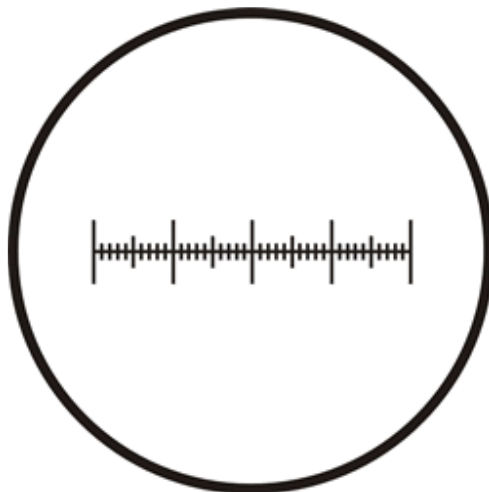
Mikroskop je fini i veoma precizan instrument koji zahtijeva pažljivo rukovanje i čuvanje. Kada se s mikroskopom ne radi, mora se zaštititi od nakupljanja prašine, djelovanja vlage i sl. Nakon završetka rada, mikroskop se očisti mekom krpom, a optički djelovi mekim, specijalnim papirom ili mekom, čistom platnenom krpom. Treba izbjegavati potrese koji mogu dovesti do njegovog oštećenja. Prenosanje mikroskopa, pomjeranje kondenzora, okretanje revolvera, podizanje i spuštanje tubusa treba da se obavlja što pažljivije.

## Mjerenje veličine mikroorganizama:

Ćelije mikroorganizama se mjere pod mikroskopom pomoću okularnog mikrometra. Za mjerenje je najbolje koristiti žive, a ne fiksirane ćelije, jer fiksacija i bojenje ćelija dovodi do određene promjene njihove prave veličine. Veličina ćelija se izražava u mikrometrima.

## Mjerenje veličine mikroorganizama pod mikroskopom

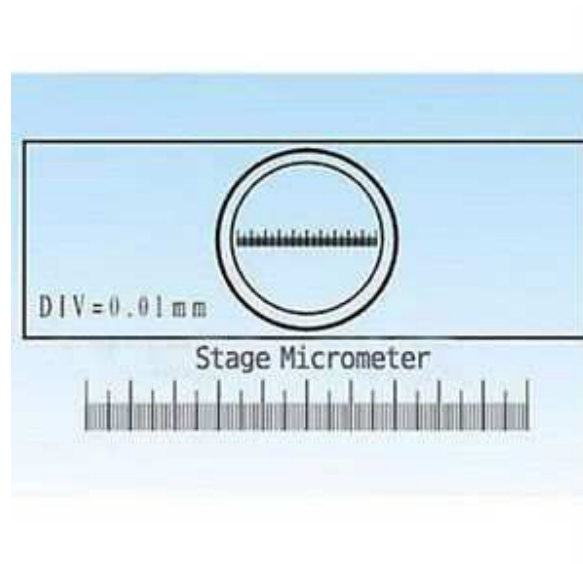
Za mjerenje veličine mikroorganizama mikroskopom potreban je okularni mikrometar (slika 8) i objektni (objektiv) mikrometar. Okularni mikrometar je okrugla staklena pločica, u čijem centru je ugravirana skala dužine 5mm. Skala je podijeljena na 50 dijelova.



**Slika 8.** Okularni mikrometar <http://physics.mef.hr/Praktikum/Mikroskop/13.htm>

Okularni mikrometar se postavlja u okular. Prije nego što se pristupi mjerenju veličine ćelija, potrebno je odrediti **vrijednost podeoka okularnog mikrometra za dato uvećanje mikroskopa**, što se postiže pomoću objektnog mikrometra. Dakle, za svaki objektiv treba baždariti skalu u okularu, kako bi se odredila njena mikrometerska

vrijednost (razmak između dva podeoka u  $\mu\text{m}$ ). Objektivi mikrometar je staklena pločica na koju je ugravirana skala. Skala je podijeljena na 100 dijelova, tj. podeok objektnog mikrometra iznosi 0,01mm ili **10 $\mu\text{m}$** .



**Slika 9.** Objektivi mikrometar

<http://www.ebay.ie/itm/0-01mm-Microscope-Stage-Micrometer-Calibration-Slide-/191605143023?hash=item2c9c8e75ef:g:hn0AAOSwPcVVtYC9>

Za određivanje veličine podeoka okularnog mikrometra, objektivi mikrometar se postavlja na stočić mikroskopa i fokusira pri malom uvećanju. Skala se dovodi u centar vidnog polja i tek nakon toga mijenja objektiv sa kojim će se mjeriti veličina ćelija. Pomjerajući stočić mikroskopa i okrećući okular, mikrometri se postavljaju tako da im skale budu paralelne i da se prekrivaju. Poklopiti po jedan od podeoka iz skale okularnog i objektnog mikroskopa i naći dva sledeća podeoka koja se poklapaju. Utvrditi koliko podeoka objektnog mikrometra odgovara jednom podeoku okularnog mikrometra. Dakle, treba utvrditi broj podeoka skale na objektiv mikrometru koji prekriva određen broj podeoka skale okular mikrometra. Budući da jedan razmak između podeoka objektnog mikrometra iznosi tačno 10  $\mu\text{m}$ , lako je odrediti mikrometarsku vrijednost.

Na primjer, 2 podeoka objektnog mikrometra ( $2 \times 10 \mu\text{m} = 20\mu\text{m}$ ) odgovara 5 podeoka okular-mikrometra. Dakle, 1 podeok okular mikrometra iznosi 4  $\mu\text{m}$  (20:5). Veličina mikroorganizma koji budemo mjerili će odgovarati broju podeoka okularnog mikrometra pomnoženo sa veličinom podeoka okularnog mikrometra (4  $\mu\text{m}$ ).

## II vježba

### Laboratorijsko posuđe, pribor i aparati - Pranje i priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju - Primjena sterilizacije u mikrobiologiji

#### Pitanja

1. Nacrtaj i označi osnovne vrste laboratorijskog posuđa.
2. Kako se vrši pranje laboratorijskog posuđa?
3. Kako se priprema laboratorijsko posuđe za sterilizaciju?
4. Šta je sterilizacija?
5. Na koji način se vrši sterilizacija suvom toplotom?
6. Na koji način se može vršiti sterilizacija vlažnom toplotom?
7. Kako se vrši sterilizacija filtracijom i kada se ona primjenjuje?
8. Koji zraci se upotrebljavaju u postupku sterilizacije?
9. Šta je dezinfekcija?
10. Koji se dezinficijensi najčešće koriste u laboratorijskom radu?

Vrste laboratorijskog posuđa su: epruvete, pipete, menzure, Petrijeve šolje, mikropipete, Erlen majerove tikvice, birete, stalci za epruvete, predmetna stakla, mikrobioloska eza i dr.



Slika 10. Pipete



Slika 11. Mikropipete

<http://g2labor.com/pages/pribor-za-filtraciju.php>



**Slika 12.** Laboratorisjke čaše, Erlenmajerove tikvice, menzure  
[https://www.google.me/imgres?imgurl=http://g2labor.com/media/h2.jpg&imgrefurl=http://g2labor.com/pages/staklo-i-plastika.php&h=227&w=327&tbnid=Q\\_UVwe84Kk-SQM:&docid=dqvy0LiwHeUgLM&ei=naW8VsDwEua26ASSq7jIDw&tbn=isch&ved=0ahUKEwiAs86wgPDKAhVmG5oKHZIVDvk4ZBAzCBAoDTAN](https://www.google.me/imgres?imgurl=http://g2labor.com/media/h2.jpg&imgrefurl=http://g2labor.com/pages/staklo-i-plastika.php&h=227&w=327&tbnid=Q_UVwe84Kk-SQM:&docid=dqvy0LiwHeUgLM&ei=naW8VsDwEua26ASSq7jIDw&tbn=isch&ved=0ahUKEwiAs86wgPDKAhVmG5oKHZIVDvk4ZBAzCBAoDTAN)



**Slika 13.** Bakteriološke eze  
<http://www.argos-tech.com/c-5-p-35-id-5.html>



### **Pranje laboratorijskog posuđa**

Svi sudovi koji se koriste u mikrobiologiji se prije upotrebe moraju oprati i sterilisati. Novo posuđe se može odmah prati. Korišćeno posuđe se prethodno sterilise u autoklavu na 120<sup>0</sup>C, pa tek onda pere. Prije pranja se prethodno otklone ostaci podloga ili drugog materijala, a zatim se sudovi potope u hladnu vodu do sljedećeg dana. Dalje se sudovi peru hladnom i toplom vodom, deterdžentima, upotrebom četki.

### **Pranje laboratorijskog posuđa**

Sudovi, koji se na ovaj način ne mogu dobro oprati, potapaju se u rastvor kalijum bihromata i sumporne kisjeline u destilovanoj vodi, najmanje 24h.

**Rastvor kalijum bihromata:** 100g K-bihromata se uz zagrijavanje rastvori u 1000ml destilovane vode. Kada se rastvor ohladi, oprezno i polagano mu se doda 100ml konc. sumporne kisjeline.

### **Priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju**

Svaki sud koji se sterilise, prethodno se uvija u čisti bijeli, tanak papir. Epruvete, boce i menzure prije sterilisanja zapuštavaju se zapušačima od papirne ili pamučne vate. Epruvete se pakuju u pakete od po 20 kom. Boce se povezuju preko zapušača dvostrukim papirom, čiji se krajevi odsiječu makazama. Pipete pripremamo na taj način, što dio koji se stavlja u usta, zapušimo sa malo vate. Uvijaju se spiralno u dugačko isječene trake papira. Uvijene pipete se grupišu prema veličini, u snopove od 10 komada i povezuje tankim papirom. Petrijeve šolje se pakuju svaka posebno ili u pakete od nekoliko komada.

### **Sterilizacija**

Sterilizacija je postupak kojim se uništavaju sve bakterije i njihove spore u određenoj sredini. Izvodi se fizičkim metodama: suvom toplotom i vlažnom toplotom.

Primjena suve toplote:

1. Spaljivanje
2. Opaljivanje na plamenu (žarenje, opaljivanje)
3. Sterilizacija vrućim vazduhom (u suvom sterilizatoru, na temperaturi 160-180<sup>0</sup>C 1-2 sata)



**Slika 14. Suvi sterilizator**

<http://www.enc.co.rs/suvi-sterilizator-shfa120/>

Sterilizacija vlažnom toplotom:

- grijanje vode do  $100^{\circ}\text{C}$ , 3 dana na  $T 56^{\circ}\text{C}$ , frakciona sterilizacija ili tindalizacija, u vodenom kupatilu ili Kohovom loncu
- kuvanje (20min od početka ključanja vode)

Sterilizacija vodenom parom bez pritiska zagrijanom do  $100^{\circ}\text{C}$  - vrši se u Kohovom loncu. Kohov lonac je šuplji metalni cilindar s duplim dnom i uređajem za električno zagrijavanje. Dvije trećine prostora između gornje i donje ploče dna ispunjeno je vodom. Gornja ploča dna je rešetkasta i na nju se stavlja materijal koji se sterilizuje. Zagrijavanjem, voda koja se nalazi ispod rešetke isparava, pri čemu vodena para struji prema poklopcu. Na poklopcu aparata smješten je termometar i postoji otvor za izlazak pare. Kohov lonac se primjenjuje za sterilizaciju rastvora i hranljivih podloga koji ne mogu izdržati temperaturu preko  $100^{\circ}\text{C}$ , kao što su npr. hranljivi želatin i podloge sa ugljenim hidratima. Sterilizacija se vrši 30-60 minuta tri dana uzastopno (frakciona sterilizacija - tindalizacija). U međuvremenu, dakle u periodu do sledećeg zagrijavanja, podloga se stavlja u termostat da bi spore koje nisu uništene proključale do sledećeg dana. Sterilizacija vodenom parom pod pritiskom je veoma efikasan način uništavanja svih vrsta i oblika mikroorganizama. Izvodi se u specijalnom aparatu- **autoklavu**, pritisak od 1 atmosfere ( $98,066\text{kPa}$ ) i  $T 120^{\circ}\text{C}$ .



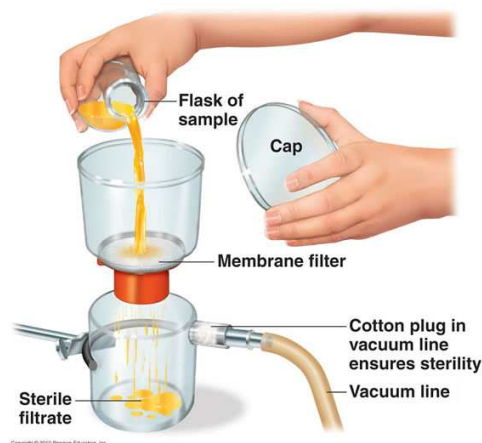
**Slika 15. Vertikalni autoklav**  
<http://devana.co.rs/ravpa.html>

Autoklav je cilindrični uređaj postavljen vertikalno ili horizontalno, sa dvostrukim zidovima od čelika i masivnim poklopcem koji se zatvara zavrtnjima. Na taj način on se hermetički zatvara, čime se sprečava izlazak vodene pare, tj. obezbjeđuju se uslovi za razvijanje potrebnog pritiska. Unutrašnjost cilindra je komora u koju se stavljaju predmeti koji se sterilišu. Ispod dna komore nalazi se prostor za vodu, koja se zagrijava pomoću električnog grijača. Svaki autoklav ima termometar i manometar, koji su u vezi sa komorom, koji omogućuju praćenje promjene temperature i pritiska prilikom sterilizacije. Autoklav posjeduje i ventil sigurnosti, koji se u slučaju stvaranja pritiska većeg od predviđenog, automatski otvara i smanjuje ga. Materijal koji se steriliše stavi se u komoru i zatim zatvori poklopac ,zatvarajući istovremeno po dva naspramna zavrtnja. Da bi se omogućila sterilizacija vlagom i spriječilo pregorijevanje grijača, neophodno je uvijek provjeriti nivo vode u autoklavu. Ako je on ispod označene granice, neophodno je sipati destilovanu vodu u aparat. Pri otvorenoj slavini za ispuštanje pare uključi se grijač i čeka se dok iz slavine ne počne da izlazi gust mlaz pare. To je znak da je prostor gdje su bili vazdušni džepovi sada ispunjen parom i da sterilizacija može da počne (vazdušni džepovi ometaju sterilizaciju). Slavina za ispuštanje pare se zavrne i čeka da se temperatura i pritisak popnu na željeni nivo. Sterilizacija počinje od momenta kad se postigne željena temperatura u aparatu, a traje obično 15-20 minuta, nekad i duže, na temperaturi od 120<sup>0</sup>C i pritisku od 1 atmosfere. Kada je vrijeme za sterilizaciju isteklo, isključuje se grijač i čeka da pritisak i temperatura opadnu. Zatim se otvara slavina za ispuštanje pare. Kad je sva para istekla, pažljivo se odvrću zavrtnji poklopca (naizmjenično) i sačeka par minuta.

Nakon toga se poklopac pažljivo otvara, pošto para koja je zaostala u komori može da izazove opekotine. Kada se sterilisani materijal prohladi, može se izvaditi iz aparata.

## Sterilizacija filtracijom

Koristi se za sterilizaciju raznih tečnosti koje se ne mogu sterilisati toplotom (termolabilne komponente). Filtracija predstavlja procjeđivanje tečnosti kroz različite filtre koji imaju tako male pore da kroz njih ne mogu prolaziti bakterije. Filtracija ne predstavlja samo mehaničko procjeđivanje. Ona je fizičko-hemijski proces, pri kome, zbog razlike u naboju suspendovanih čestica u tečnosti koja se filtruje i filtra dolazi do adsorpcije tih čestica na filtre. Za ovaj način sterilizacije najčešće se koriste: azbestni filtri, stakleni filtri, membranski filtri. Montiraju se u specijalni uređaj: Seitz uređaj. Azbestni filtri su ploče debljine 3-5mm i prečnika 35 i 140mm. Membranski filtri se prave od acetata, celuloze ili nitroceluloze. Nitrocelulozni filtri su građeni od gusto isprepletenih nitroceluloznih vlakana. U zavisnosti od veličine pora označavaju se rednim brojevima od 1-5.



Slika 16. Seitzov uređaj (filtracija upotrebom vakuuma)

[https://www.google.me/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjx9a3oifDKAhWrAJokHUPOAqwQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fclasses.midlandstech.edu%2Fcarterp%2FCourses%2Fbio225%2Fchap07%2Flecture4.htm&psig=AFQjCNFL\\_IffArq41Q38tHr6b\\_qjnpaqQ&ust=1455292667567632](https://www.google.me/url?sa=i&rct=j&q=&esrc=s&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjx9a3oifDKAhWrAJokHUPOAqwQjRwIBw&url=http%3A%2F%2Fclasses.midlandstech.edu%2Fcarterp%2FCourses%2Fbio225%2Fchap07%2Flecture4.htm&psig=AFQjCNFL_IffArq41Q38tHr6b_qjnpaqQ&ust=1455292667567632)

## Sterilizacija zračenjem

UV-zraci ( mogu dovesti do zapaljenja rožnjače oka, pa treba koristiti zaštitne naočare) Zbog slabe prodorne moći, UV zraci se koriste za djelimičnu sterilizaciju površina i vazduha prostorija ( hirurška odjeljenja, porodilišta, laboratorije).



**Slika 17.** UV lampa

<http://shop.regina.sk/Portal/Images/share5/lampa-uv-bez-svetla.jpg>

## **Dezinfekcija**

Dezinfekcija je postupak djelimičnog uništavanja mikroorganizama, odnosno do broja koji ne predstavlja opasnost za zdravlje. Najznačajniji dezinficijensi su: halogeni i njihovi proizvodi (hlor, jod i njihovi proizvodi - Na-hipohlorit, hloramini, tinktura joda (alkoholni rastvor), jedinjenja teških metala (žive, srebra, bakra, toksični), fenolna jedinjenja - fenol (neprijatan miris), alkoholi (70%) - ne djeluju na spore, etil alkohol, izopropilni alkoholi, mikrobicidni gasovi (formaldehid, etilenoksid, propiolakton). Formaldehid ima izraženu sporicidnu aktivnost.

### III vježba

## Vrste i tehnika izrade mikroskopskih preparata

### Pitanja

1. Kako se priprema mikroskopski preparat iz tečnosti?
2. Kako se priprema mikroskopski preparat sa čvrste podloge?
3. Kako se fiksiraju mikroskopski preparati?
4. Kako se pravi običan nativni mikroskopski preparat?
5. Kako se pravi mikroskopski preparat „viseća kap“?
6. Koje su najpoznatije boje za bojenje mikroskopskih preparata?
7. Koje vrste bojenja mikroskopskih preparata postoje?
8. Koja su osnovna prosta bojenja?
9. Koje je najvažnije složeno bojenje za bojenje bakterija?
10. Opiši postupak pripreme preparata i bojenja bakterija po Gramu.
11. Zašto se bakterije različito boje po Gramu?

Za mikroskopsko posmatranje bakterija mogu se pripremiti preparati:

- **iz tečnosti**
- **sa čvrste podloge**
- **iz materijala**

#### **Preparat iz tečnosti:**

Na mikroskopsku pločicu se prenese ezom kap kulture i kružnim pokretima razvlači po pločici, kako bi razmaz bio što tanji. Preparat se zatim suši na vazduhu.

#### **Preparat sa čvrste podloge**

Prvo se na mikroskopsku pločicu stavi jedna do dvije kapi fiziološkog rastvora, a zatim se ezom uzme malo kulture i suspenduje u fiziološkom rastvoru. Kružnim pokretima eze suspenzija se razvuče po ploči, vodeći računa da razmaz bude što tanji. Tako pripremljen razmaz se suši na vazduhu.

#### **Preparat iz materijala**

Materijal može biti različit, kao što su: gnoj, sekret, mlijeko, mokraćna, krv, organi. Materijal koji se lako može razmazati pravi se bez fiziološkog rastvora, a u drugim slučajevima postupak je isti kao kod pravljenja preparata sa čvrstih podloga.

## **Fiksiranje mikroskopskih preparata**

Fiksiranje je postupak koji se primjenjuje u izradi mikroskopskih preparata, kako bi razmaz prionuo za staklo. Ovim postupkom se i ubijaju neki mikroorganizmi, pa preparati bivaju bezbjedni za rukovanje. Većina preparata, osim krvnih, fiksiraju se toplotom, odnosno plamenom. Preparat se fiksira na plamenu tako što se tri puta prevuče preko plamena, praveći pri tome luk od oko 25cm. Mikroskopska ploča se drži pincetom. Krvni preparati se fiksiraju obično metil alkoholom 3-5 minuta, koji se zatim odlije i ostavi da ispari. Za fiksiranje se mogu koristiti još i aceton, etar, etaralkohol ili apsolutni alkohol.

## **Nativni preparat**

Nativni preparat služi za dokazivanje pokretljivosti bakterija. Nebojene žive bakterije mogu se posmatrati na dva načina:

1. U običnom nativnom preparatu ili tzv. istanjenoj kapi i
2. Preparatu koji je poznat kao „viseća kap“

Običan nativni preparat se pravi tako što kulturu bakterija prenesemo na mikroskopsku ploču, a zatim se prekrije pokrovnom pločicom. Ako se koristi kultura sa čvrste podloge, prethodno se bakterije suspenduju u malo fiziološkog rastvora. Preparat se posmatra pomoću velikog ili imerzionog objektiva u nešto zamračenom vidnom polju. Za posmatranje bakterija u visećoj kapi upotrebljavaju se specijalne predmetne pločice sa udubljenjem. Oko udubljenja se nanosi vazelin u obliku kvadrata – veličine pokrovnog stakalca. Kap kulture iz tečne podloge ili kap bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru se stavi na pokrovno stakalce, koje se zatim okrene tako da kap bude sa donje strane. Stakalce se namjesti iznad udubljenja na predmetnoj pločici, pri čemu kap visi u udubljenju. Stakalce se pri tome zalijepi na mikroskopsku ploču pomoću nanesenog vazelina. Pored toga, tako se dobije zatvorena komorica u kojoj je onemogućeno sušenje preparata. Laganim pokretima ploča se okrene, tako da je sada pločica sa gornje strane ploče. Na ovaj način se postiže da suspenzija bakterija slobodno visi na staklenoj pločici. Mikroskopira se u nešto zamračenom vidnom polju sa velikim i imerzionim objektivom pri čemu treba voditi računa da se pokretanjem tubusa ne slomi pločica.

## **Bojenje mikroskopskih preparata**

Bojenjem mikroskopskih preparata moguće je detaljnije upoznati građu bakterija. Boje za bojenje mikroskopskih preparata mogu biti bazne, kisjele ili neutralne reakcije. Najpoznatije su:

Plave boje: metilensko plavo, azur plavo

Crvene boje: fuksin i safranin

Ljubičaste boje: gencijana violet, metilviolet

Zelene boje: metil zeleno, malahit zeleno

Za bojenje bakterija koriste se rastvori boja. Obično se prvo boja rastvori u alkoholu, a zatim se priprema rastvor željene koncentracije sa destilovanom vodom. Boja se u finalnom rastvoru nalazi u niskoj koncentraciji, oko 1%. U toku procesa bojenja, pored pravih boja, koriste se i materije koje potpomažu bojenje (tzv. štavovi). One stvaraju

nerastvorljiva jedinjenja sa bojom i na taj način ih fiksiraju za bakteriju. U početku su korišćeni kao posebni rastvori, dok se sada dodaju rastvorima boja. Štavovi koji se najčešće upotrebljavaju su: fenol, taninska kiselina, amonijumoksalat, soli gvožđa, olova, cinka, bakra i hroma.

### **Vrste bojenja mikroskopskih preparata:**

Postoji prosto i složeno bojenje bakterija.

Kod prostog bojenja koristi se samo jedna boja, dok se kod složenog (diferencijalnog) koriste dvije ili više boja, da bi kontrast bio što bolji.

### **Prosta bojenja**

Osnovna prosta bojenja su sa: metilenskim plavim, karbol-fuksinom i kristalviolet bojom.

### **Bojenje metilensko plavim:**

#### **• Rastvor A:**

- Metilensko plavo.....0,3g
- 96% etilalkohol.....30ml

#### **• Rastvor B:**

- 0,1% vodeni rastvor kalijum hidroksida (KOH).....100ml

Rastvor A se pomiješa sa rastvorom B i dobro promućka. Preparat se prelije bojom i ostavi da djeluje 45-60 sekundi. Citoplazma se oboji svijetloplavo, jedro tamnoplavo a sluz ružičasto.

### **Bojenje karbolfuksinom:**

#### **Rastvor A:**

- Bazni fuksin.....0,3g
- 96% etanol.....10ml

#### **Rastvor B:**

- Fenol.....5g
- Destilovana voda.....95ml

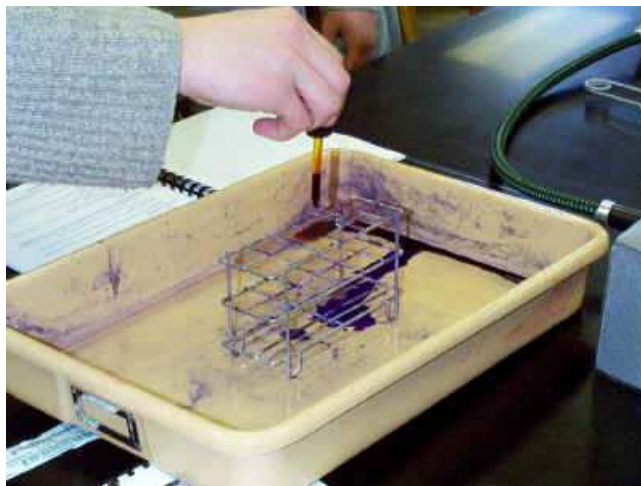
Jednake količine rastvora A i rastvora B se pomiješaju i dobro promućkaju. Fiksirani preparat se boji 45-60 sekundi, nakon čega se ispira destilovanom vodom i suši na sobnoj temperaturi. Cio preparat se oboji u raznim nijansama crvene boje.



## Složena bojenja

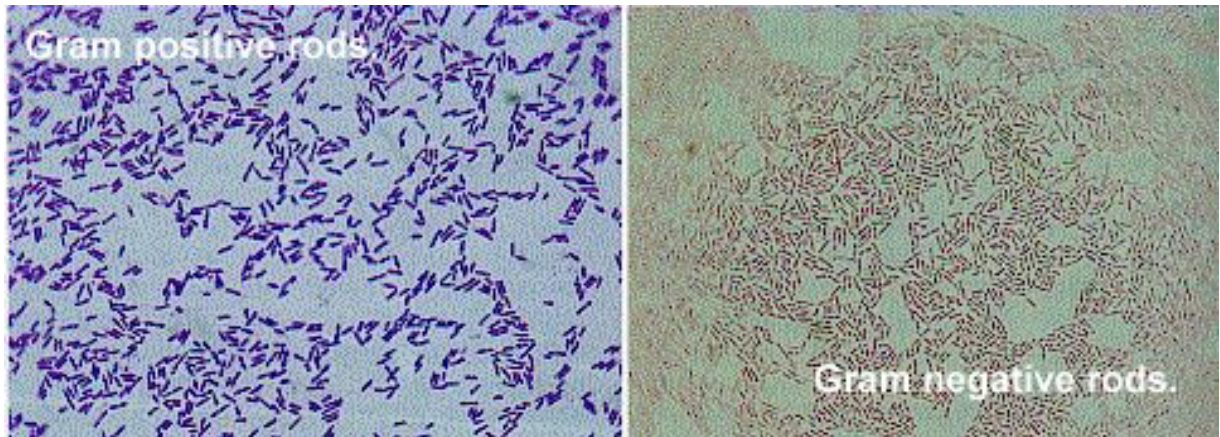
### Bojenje po Gramu

Od složenih bojenja najčešće se koristi bojenje po Gramu. Ono predstavlja najvažnije bojenje bakterija. Izvodi se na sljedeći način: rastvor karbol-gencijane violet se prelije preko preparata i ostavi da djeluje 3 minuta. Zatim se boja odlije bez ispiranja vodom. Preparat se zatim prelije rastvorom lugola, ostavi da djeluje 2 minuta, a zatim se odlije sa preparata. Odbojavanje se vrši 96% alkoholom, uz lagano pomjeranje preparata, sve dok se pojavljuje boja. Diferencijalno bojenje se vrši karbolfuksinom (razrijeđenim 1:10 destilovanom vodom) i preparat se dobro opere i osuši. Gram pozitivne bakterije su ljubičasto plave, a gram negativne crvene. Treba imati u vidu da se Lugolov rastvor raspada u prisustvu svjetlosti i na povišenim temperaturama, pa se mora čuvati u tamnim bocama i na sobnoj temperaturi. Ako se upotrebljava neispravan Lugolov rastvor, mogu se u alkoholu odbojiti i gram pozitivni mikroorganizmi. Najdelikatniji proces je odbojavanje alkoholom, jer se pri tome mikroorganizmi mogu previše odbojiti, kada se gram pozitivne bakterije boje kao gram negativne, ili se mogu nedovoljno odbojiti, kada se gram negativne bakterije boje kao gram pozitivne.



**Slika 18.** Stalak za bojenje mikroskopskih preparata

Gram pozitivne bakterije imaju ćelijski zid građen od debelog sloja peptidoglikana, koji je sposoban da zadrži cristal violet-jodni kompleks koji se stvara tokom bojenja, dok gram negativne bakterije imaju u sastav ćelijskog zida tanak sloj peptidoglikana i lipopolisaharidnu membranu. Dakle, gram pozitivne bakterije se ne obezbojavaju etanolom, dok gram negativne obezbojavaju. Ovo obezbojavanje omogućava primanje kontrastne boje, karbolfuksina ili safranina. Gram pozitivne bakterije se boje plavo, a gram negativne roze do crveno.



**Slika 19.** Gram pozitivni štapići (lijevo) i gram negativni štapići (desno)

### **Rastvor karbolgencijane violet**

Zasićeni rastvor karbol-gencijane violet.....	10ml
2% rastvor karbolne kiseline u destil.vodi.....	1ml
Destilovana voda.....	100ml

### **Zasićeni rastvor karbol-gencijane violet**

Gencijana violet u prahu.....	5-6g
96% etanol.....	100ml

### **Rastvor lugola**

1g joda,  
2 g kalijum jodida i  
300ml destilovane vode.  
Destilovanoj vodi se prvo doda kalijum jodid, a zatim jod.

### **Bojenje acido-alkoholno rezistentnih bakterija po Ziehl-Neelsenu**

Bojenje se koristi za acidoalkoholorezistentne bakterije (*Mycobacterium*). One u spoljašnjem omotaču imaju jednu voštanu materiju, koja kad primi boju teško je otpušta ako se za odbojavanje koristi i alkohol sa hlorovodoničnom kiselinom. Zbog toga se takve bakterije i nazivaju acidoalkoholorezistentnim, jer su otporne na odbojavanje ne samo na alkohol, već i na kiselinu. Bojenje se izvodi na sledeći način: preparat se prelije karbolfuksinom (priprema se od 10ml konc. rastvora fuksina u 100ml karbolne vode), a zatim se zagrijava plamenom, sve dok se iznad preparata ne pojavi para. Zagrijavanje traje 3-5 minuta (boja ne smije da proključa). Preparat se opere vodovodnom vodom, a zatim odbojava kiselim alkoholom (3ml conc. HCl i 97ml 96% alkohola), sve dok razmaz otpušta crvenu boju. Preparat se ponovo opere vodovodnom vodom, zatim se prelije kontrastnom bojom - metilenskim plavim i boji 3-5 minuta. Zatim se preparat

opere vodovodnom vodom i osuši. Acidoalkoholorezistentne bakterije se boje crvenom bojom, a sve ostale bakterije i tkivo plavom bojom.

### **Bojenje po Giemsi**

Ovo bojenje je univerzalno i koristi se za bojenje bakterija koje se teško boje drugim metodama. Najčešće se koristi za bojenje spiroheta i protozoa. Ovaj metod je vrlo osjetljiv i daje dobre rezultate jedino ako se tačno ispoštuje procedura bojenja. Upotrební rastvor za svako bojenje mora biti svjež.

Upotrební rastvor Giemse:

Osnovni rastvor Giemse.....1kap

Destilovana voda.....1kap

Bojenje ovako pripremljenim rastvorom traje 30 minuta, nakon čega se preparat ispira destilovanom vodom i suši na vazduhu. Dobro obojen preparat ima lako ružičastoljubičastu boju. Ukoliko bojene bakterije imaju kapsulu, one će se obojiti crveno, a tijelo plavo.

### **Bojenje po Neisseru**

Fiksiran preparat prelići rastvorom Neisser I i držati 2-3 minuta, a zatim ga oprati vodom. Na opran preparat sipati rastvor Neisser II i držati 5-10sekundi. Preparat oprati vodom i osušiti. Rastvori Neisser I i Neisser II se prave od rastvora A, B i C.

#### **Rastvor A**

- Metilensko plavo.....1g
- 96% alkohol.....20ml
- Destilovana voda.....950ml
- Glacijalna sirćetna kiselina.....50ml

#### **Rastvor B**

- Kristal violet.....1g
- 96% alkohol.....10ml
- Destilovana voda .....300ml

#### **Rastvor C**

- Hrizoidin .....2g
- Destilovana voda.....100ml

Neisser I se dobija kada se pomiješa 2 dijela rastvora A i jedan dio rastvora B. Rastvor C je Neisser II. Ovo bojenje se koristi za bojenje bakterija iz roda *Corynebacterium*. Bakterije se oboje žuto, a metahromatična zrna tamnoplavo.

## **Bojenje bakterijskih spora**

### **Bojenje spora po Schäfferu i Fultonu**

5% rastvor malahit zelenog se ostavi 1-2 minuta na preparatu, a zatim zagrijava 0,5-1 minut do pojave pare. Preparat se ispere vodom i prelije 0,5% rastvorom safranina koji treba da djeluje 0,5-1 minut. Preparat se ponovo opere vodom i osuši. Spore se oboje zeleno, a bakterijska tijela crveno. Spore, zbog svoje građe teško primaju boju, pa se zato za njihovo bojenje koriste koncentrovane boje uz zagrijavanje, kako bi boja difundovala u spore.

### **Bojenje bakterijskih kapsula**

#### **Bojenje po Oltu**

Preparat osušiti na vazduhu, fiksirati na plamenu, a zatim prelići 2-3% rastvorom safranina. Boju zagrijavati do pojave para, a zatim ostaviti da boja djeluje još 2-3 minuta. Oprati vodom, osušiti i mikroskopirati. Bakterijska kapsula se boji žuto, a tijelo crveno.

#### **Bojenje po Foth-u**

Preparat se osuši na vazduhu i prelije sa 2 kapi osnovnog rastvora po Giemsi. Poslije 1-2 minuta dodati oko 20 kapi (1ml) neutralne destilovane vode i blago promiješati. Boja treba da djeluje 2-5 minuta. Ovo bojenje se koristi za dokazivanje kapsula *Bacillus anthracis*. Kapsule se boje crvenkasto, a tijelo plavo.

## IV vježba

### Morfologija bakterija, gljiva (plijesni i kvasaca), protozoa i virusa

#### Pitanja

1. Kako se dijele bakterije prema bojenju po Gramu?
2. Nacrtaj sledeće bakterije bojene po Gramu:

1. *Staphylococcus aureus*
2. *Streptococcus agalactiae*
3. *Escherichia coli*

3. Šta su hife?
4. Šta je micelijum?
5. Nacrtaj kvasce iz sledećih rodova:  
*Candida*  
*Saccharomyces*

6. Nacrtaj šematski plijesni iz rodova:

1. *Aspergillus*
2. *Penicillium*
3. *Fusarium*
4. *Rhizopus*
5. *Mucor*

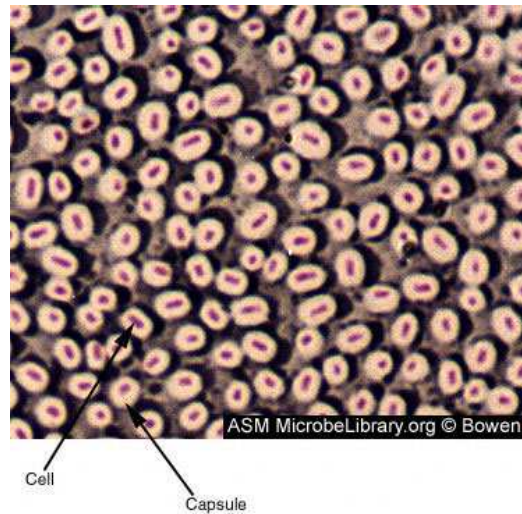
i označi pojedine njihove strukture

7. Nacrtaj bakteriofag

#### Grada bakterija

Grada bakterije se može predstaviti gradom prokariotske ćelije.

Bakterijske ćelije posjeduju: **ćelijski zid**, **citoplazminu membranu** sa njenim ulegnućima u vidu vezikula, tubula i lamela (mezozomi), **citoplazmu** u kojoj se nalaze ribozomi i nukleoid. Neke bakterije ne posjeduju ćelijski zid (mikoplazme, rikecije). Pored navedenih, pojedine vrste bakterija mogu da imaju i sledeće strukture: **kapsulu**, **flagele**, **fimbrije**, **pile**, **tilakoide** i **plazmide**. **Kapsula** je sluzavi, spoljašnji omotač koji stvara sama bakterija. Bakterijska kapsula ima zaštitnu ulogu od dejstva različitih uticaja spoljašnje sredine, kao i od dejstva odbrambenog sistema organizma u koji je dospjela. Izgrađena je najčešće od polisaharida.

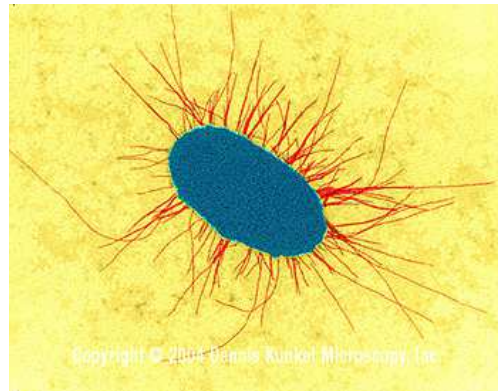


**Slika 20.** Bakterijska kapsula

Oštećenje ćelijskog zida dovodi do smrti bakterije. Prema sastavu ćelijskog zida i bojenju po Gramu (metoda koju je predložio naučnik Hans Kristian Gram 1884 g.) bakterije se dijele na: Gram-pozitivne i Gram-negativne. Gram-negativne bakterije imaju sloj lipopolisaharida u sastav ćelijskog zida, dok Gram-pozitivne nemaju taj sloj, usled čega se prve boje crveno, a druge ljubičasto. **Flagele** ( bičevi) su dugi, tanki izraštaji izgrađeni od proteina flagelina, kojima se bakterije kreću. Gubitkom bičeva bakterije postaju nepokretne. **Fimbrije** su končasti izraštaji raspoređeni oko tijela bakterije i ima ih na stotine. Proteinske su prirode. Njihova uloga je u pričvršćivanju bakterije za podlogu. **Pile** su takođe končasti izraštaji, ali koji imaju ulogu u pripajanju dvije ćelije i razmjeni genetskog materijala pri razmnožavanju.

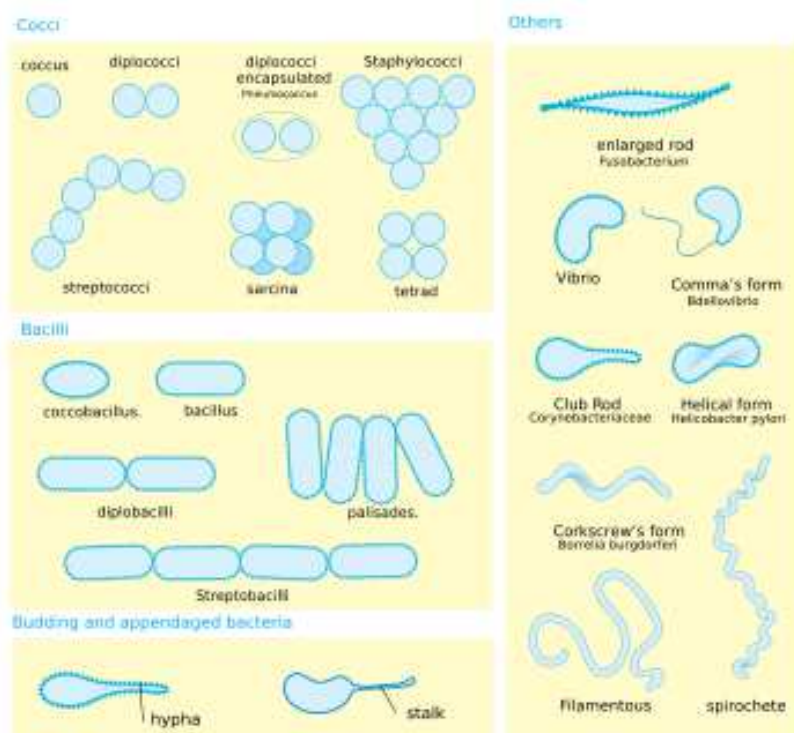


**Slika 21.** Bakterijske flagele



**Slika 22.** Fimbrije *E. coli*

**Osnovni oblici bakterija** su: okrugao, štapičast, spiralani, končasti



**Slika 23.** Osnovni oblici bakterija

Oblici i veličine bakterija znatno variraju zavisno od starosti kulture, sastava sredine i njenih osmotskih svojstava, temperature i drugih faktora. Pleomorfizam je pojava kod nekih mikroorganizama da u toku života mijenjaju oblik.

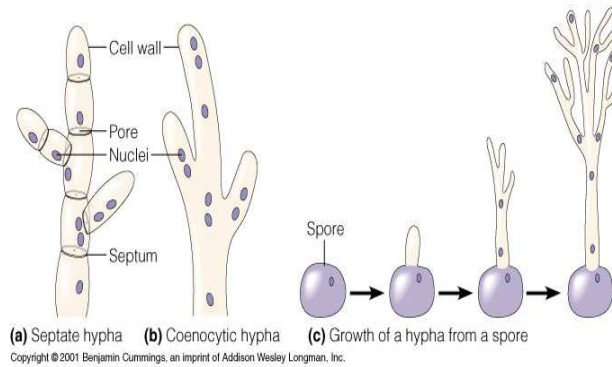
### **Ponašanje bakterija u nepovoljnim uslovima životne sredine**

Kada su spoljašnji uslovi nepogodni za rast i razmnožavanje, neke bakterije stvaraju spore. Proces stvaranja spora naziva se sporulacija, a bakterije sa tom sposobnošću sporogene bakterije. Spore se obrazuju u cilju preživljavanja u nepovoljnim uslovima sredine, odnosno zaštite genetičkog materijala bakterije. Imaju debele zidove i veoma su otporne na nepovoljne uslove. Pomoću njih bakterije preživljavaju nepovoljne uslove i raznose se na nova, udaljena mjesta. Kada u spoljašnjoj sredini nastanu povoljni uslovi, iz spore ponovo nastaje vegetativni oblik bakterije.

### **Grada gljiva**

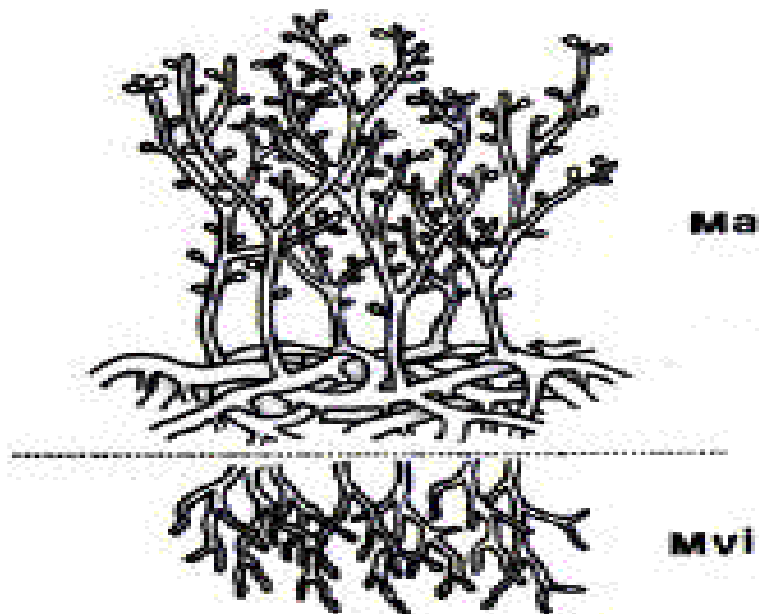
Gljive su eukariotski mikroorganizmi. Morfološki se veoma razlikuju, što je rezultat velike brojnosti njihovih vrsta. Končaste ćelije gljiva zovu se hife, a splet hifa čini

micelijum. Hife nastaju iz spora klijanjem. Hife mogu biti neseptirane, što je karakteristično za klasu *Zygomycotina*, ili septirane, što je karakteristično za klase *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* i *Deuteromycotina*.



**Slika 25.** Septirane i neseptirane hife plijesni

Kod plijesni postoje dva tipa micelijuma. Jedan se nalazi na podlozi na kojoj gljiva raste i prodire u nju. On služi gljivi za primanje hrane iz okoline. Naziva se *bazalni* ili *vegetativni micelijum*. Drugi micelijum se diže u vazduh iznad podloge na kojoj gljiva raste. To je *vazdušni micelijum*. Ako taj micelijum stvara reproduktivne organe naziva se *reproduktivni micelijum*. Splet razgranatih pseudohifa obrazuje *pseudomicelijum*, što je karakteristično za neke kvasce (*Candida albicans*).



**Slika 26.** Aeralni micelijum (Ma) i vegetativni micelijum (Mvi)

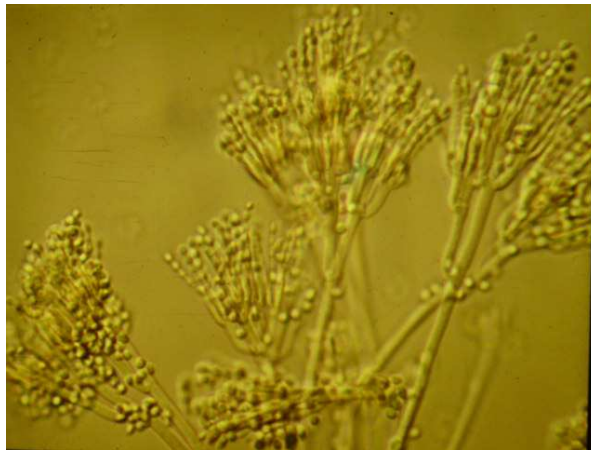


**Spore** su rasplodne ćelije gljiva, preko njih se gljive razmnožavaju, održavaju i šire u prirodi. One mogu nastati aseksualnim putem ili seksualnom konjugacijom muških i ženskih rasplodnih elemenata. Prve su *aseksualne (bespolne) spore* a druge su *seksualne (polne) spore*.

Gljive se razmnožavaju **bespolno** (vegetativno i putem bespolnih spora) i **polno** (polnim sporama)

**Vegetativno** se razmnožavaju fragmentacijom, tj. odvajanjem djelova hife. Hife gljiva i aktinomiceta se izdijele na veće ili manje fragmente. Po potrebi talus može stvarati posebne tvorevine za vegetativno razmnožavanje: sklerocije (formiraju se zadebljanjem spleta hifa), hlamidospore, artrospore (nastaju segmentacijom hifa), blastospore.

**Bespolno razmnožavanje putem spora** vrši se putem: zoospora, konidija (Ascomycotina, Deuteromycotina), sporangiospora (Zygomycotina). Polno razmnožavanje gljiva odvija se spajanjem polnih ćelija - gameta, koje mogu biti morfološki iste (izogamija) ili različite (heterogamija).



**Slika 27.** *Penicillium* - konidije

Polno razmnožavanje gljiva odvija se spajanjem polnih ćelija - gameta, koje mogu biti morfološki iste (izogamija) ili različite (heterogamija). Na taj način nastaje zigot. Za poljoprivrednu proizvodnju i za kruženje materija u prirodi najznačajnije su gljive iz klase:

- *Zygomycetes*
- *Ascomycetes*
- *Basidiomycetes*
- *Deuteromycetes*

Predstavnici klase *Zygomycetes* imaju neseptirane hife, bespolno se razmnožavaju sporangiosporama, a polno izogamijom. Veoma su brojne u zemljištu i na prehrambenim proizvodima. Najvažniji rodovi su *Mucor* i *Rhizopus*. Klasa *Ascomycetes* obuhvata končaste gljive sa septiranom hifom i okruglaste gljive koje ne formiraju pravu hifu (kvasci). Končaste gljive se bespolno razmnožavaju sporulacijom - konidijama, a vegetativno fragmentacijom. Okruglaste gljive - kvasci se bespolno razmnožavaju pupljenjem. Sve gljive iz ove klase se polno razmnožavaju heterogamijom pri čemu se

formiraju polne spore - askospore. Najvažniji predstavnici končastih gljiva su *Aspergillus* i *Penicillium*, a od kvasaca rodovi: *Sacharomyces*, *Hansenula*, *Torula* i dr. Klasa *Basidiomycetes* obuhvata najsavršenije višćelijske gljive koje imaju septiranu hifu, a neke formiraju izrazito velika plodonosna tijela. Značajni su razlagači organskih materija. Bespolno se razmnožavaju konidijama, a polno gametangijom, pri čemu nastaju

bazidiospore. U ovu grupu spadaju jestive gljive: *Agaricus* (šampinjon), *Boletus* (vrganj) i *Pleurotus* (bukovača).

Klasa *Deuteromycetes* ima vegetativno tijelo izgrađeno od septiranih hifa. Bespolno se razmnožavaju konidijama, vegetativno fragmentacijom, polno se ne razmnožavaju. Brojne su u zemljištu i na prehrambenim proizvodima. Najvažniji predstavnici iz ove klase su: *Fusarium*, *Alternaria*, *Trichoderma*, koji su u najvećem broju saprofiti, ali ima i fitopatogenih i toksikogenih vrsta.

### Morfologija kvasaca

Ćelija jednoćelijskih gljiva-kvasaca naziva se **blastospora**. Ona je okrugla, ovalna ili izdužena ćelija veličine 4-15 $\mu$ m, koja se razmnožava pupljenjem ili dijeljenjem. Blastospore nekih kvasaca u posebnim uslovima se izduže i tako nastaju izdužene, međusobno spojene ćelije koje liče na hife i zato se zovu *pseudohife*. Skup pseudohifa se naziva pseudomicelijum.



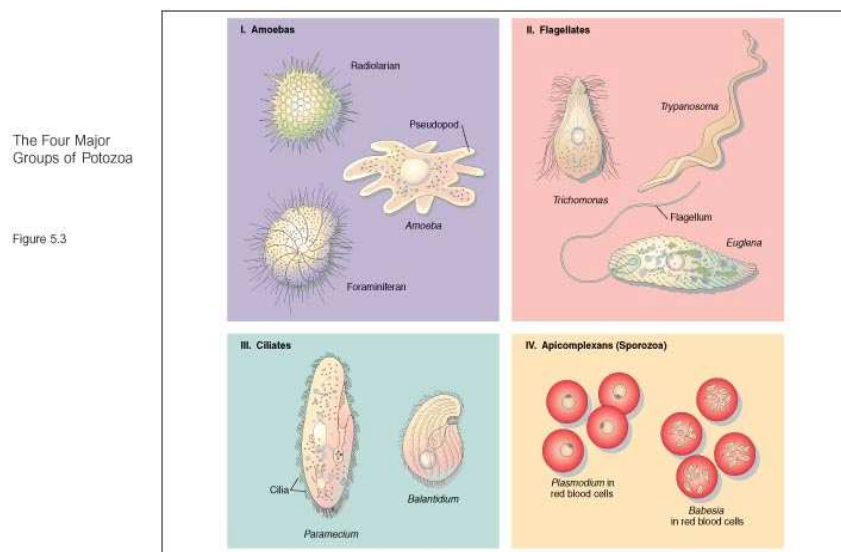
Slika 28. *Candida albicans* – pseudohife

### Praživotinje (Protozoa)

Protozoe su eukariotski mikroorganizmi. Tijelo praživotinja izgrađeno je od jedne ćelije, koja svoje funkcije obavlja raznovrsnim organelama. Od morfoloških osobina, kod protozoa se određuje: oblik, veličina, građa ćelije, zatim se izučava razmnožavanje, stvaranje cista i pokretljivost.

Na osnovu načina kretanja protozoe su svrstane u tri razdjela:

- **Sarcomastigofora**, razdio koji se dijeli na dva podrazdjela:
- **Sarcodina (Rhizopoda)** - kreću se pseudopodijama ili lažnim nožicama. U ovu grupu spada *Amoeba* čija ćelija je potpuno bez ćelijskog zida.
- **Mastigophora (Flagellata)** - kreću se pomoću flagela. Broj flagela je najčešće 2-8. O d parazitnih predstavnika najpoznatiji su *Trichomonas* i *Tripanosoma*.
- **Ciliophora** - kreću se nešto tanjim izraštajima od flagela, koje se zovu cilije. Spadaju u najsavršenije protozoe.
- **Apicomplexa** - sadrži samo klasu *Sporozoa*. Neke nemaju organele za kretanje, a neke ih izgube u toku života. Stvaraju spore i većina su patogene za ljude i životinje.



**Slika 29.** Protozoe: 1: *Amaeba*, 2: *Flagellata*, 3: *Ciliata* i 4: *Apicomplexa*

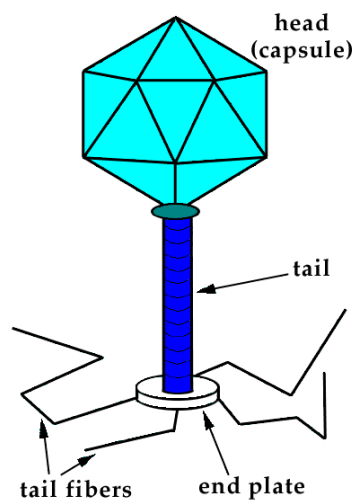
Protozoe u nepovoljnim uslovima formiraju ciste kao oblike za konzervaciju. Razmnožavaju se bespolno i polno. **Načini bespolnog razmnožavanja** su :

- **binarna deoba** – podjela roditeljske jedinice na dvije;
- **multipna (višestruka) deoba** – podjela na veći broj ćelija;
- **plazmotomija** – deoba višejedarnih protozoa, pri kojoj se dijeli samo citoplazma;
- **pupljenje** – obrazuju se spoljašnji (egzogeno pupljenje) ili unutrašnji (endogeno pupljenje) izraštaji; ako se ti pupoljci ne odvoje od roditeljskog tijela, onda nastaju kolonijalne protozoe.

**Polno razmnožavanje** obuhvata mejozu kojom se formira haploidan broj hromozoma u polnim ćelijama, koje se zatim spajaju i ponovo obrazuju diploidan broj hromozoma.

## Građa virusa

Nukleinska kiselina čini jezgro virusa ili nukleoid. Oko nukleinske kiseline nalazi se proteinski omotač koji se zove kapsid. Kapsomere - identične proteinske subjedinice. Peplops - još jedna opna kojom su neki virusi obavijeni, građena iz glikoproteina i lipida. Virusi mogu biti štapićasti virusi, nitasti, loptasti, kockasti, topuzasti. Veličina virusa: 15-400 nm



**Slika 30.** Bakteriofag-bakterijski virus

## V vježba

### Hranljive podloge. Kultivisanje mikroorganizama.

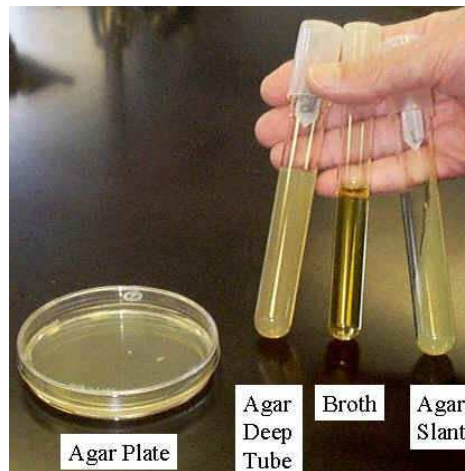
#### Pitanja

1. Šta su hranljive podloge?
2. Kakve mogu biti hranljive podloge zavisno od vrste materija koje se koriste za njihovu pripremu?
3. Kako se dijele hranljive podloge u odnosu na njihovu namjenu?
4. Šta je agar-agar?
5. Šta su peptoni?
6. Kako se pripremaju čvrste hranljive podloge?
7. Koje su najvažnije osobine hranljivih podloga?
8. Za koju namjenu se koriste selektivne, a za koju diferencijalne hranljive podloge?
9. Kako se vrši izolacija mikroorganizama iz neke sredine?
10. Koje se metode koriste za određivanje broja mikroorganizama u nekom supstratu?
11. Kako se određuje broj mikroorganizama direktnim, a kako indirektnim metodama?

#### Hranljive podloge

Hranljive podloge predstavljaju čvrste, polučvrste ili tečne sredine koje služe za izolaciju, gajenje i determinaciju mikroorganizama. Zavisno od materija iz kojih se pripremaju, podloge mogu biti **prirodne i vještačke**. Prirodne podloge se dobijaju iz biljnog materijala (kupus, paradajz, pasulj, krompir) ili od materija životinjskog porijekla kao što su mlijeko, krv, žuč. **Vještačke podloge** imaju poznat hemijski sastav i za njihovo spremanje koriste se razna neorganska i organska jedinjenja (soli ili pojedinačni elementi, šećeri, proteini, aminokiseline, alkoholi). **Polusintetičke podloge** imaju složen i neodređen sastav (mesni ekstrakt, peptoni). **Mesni ekstrakt** se priprema kuvanjem seckanog goveđeg mesa bez masnoća, nakon čega se ekstrakt odlije, ohladi i procijedi. Dobijena bistra tečnost se uparava (u vakuumu) do praha i u tom obliku se može naći na tržištu. Koristi se za pripremu podloga za rast velikog broja bakterijskih vrsta. Predstavlja izvor azotnih materija, bezazotnih materija i vitamina. **Peptoni** su proteinski hidrolizati (međuproizvodi hidrolize nativnih bjelančevina). Proizvode se od strogo odabranih i očišćenih životinjskih proteina (najčešće goveđeg buta ili srca) enzimskom digestijom (pomoću tripsina, pankreatina, papaina itd) u kontrolisanim pH uslovima. Peptoni su dakle mješavine sekundarnih derivata hidrolize proteina (peptoni, polipeptidi, dipeptidi i slobodne aminokiseline), a mikroorganizmi ih lako usvajaju kao hranu bogatu azotom. U zavisnosti od načina proizvodnje (razlika u odnosu prisutnih derivata hidrolize), na tržištu se nalaze u vidu praha sa oznakama: pepton 1, pepton 2, pepton 3, pepton 4 i koriste se prema recepturi za pripremu hranljivih podloga. Čvrste hranljive podloge se pripremaju od tečnih podloga, uz dodavanje agar-agara, silikatnog gela ili želatina. Najbolje sredstvo za formiranje gela je agar-agar koji se dodaje tečnim

podlogama u koncentraciji od 2%, a dobija se od crvenih algi (najčešće *Gelidium corneum*). To je složeni polisaharid koji stvara gel, s tačkom topljenja 80-100<sup>0</sup>C i temperaturom stvrdnjavanja oko 40-45<sup>0</sup>C.



**Slika 31.** Čvrste i tečne hranjive podloge za rast mikroorganizama

**Želatin** je bjelančevina koja se dobija prokuvavanjem kostiju, kože, tetiva ili ligamenata. Dodaje se podlogama u količini od 10-20%. Koristi se uglavnom za otkrivanje proteolizne aktivnosti mikroorganizama. Podloge se danas uglavnom proizvode na industrijski način u obliku praškova. Prednost takvih podloga je u njihovoj standardnosti, stabilnosti, jednostavnosti pripreme i pogodnijem transportu. Hranjive podloge se sterilizuju odmah nakon pripreme. Hranjive podloge se čuvaju u prohladnoj i od svjetlosti i suvišne vlage zaštićenoj prostoriji. U vlažnim uslovima čepovi se ovlaže i kroz njih prorasta micelijum gljiva. Prema namjeni, podloge se dijele na:

#### 1. Podloge opšte namjene.

- Na ovim podlogama se akumulira biomasa mikroorganizama. Takve podloge su:
- MPA (mesopeptonski agar)
- MPB (meso-peptonski bujon)
- MPŽ (mesopeptonski želatin)

#### 2. • Specijalne podloge:

- Mogu biti:
- **selektivne i**
- **diferencijalne**

Selektivne podloge obezbjeđuju najpovoljnije uslove za gajenje određenih mikroorganizama. U njih se mogu dodavati materije koje selektivno suzbijaju razvoj sporednih mikroorganizama. Ove podloge se primjenjuju za izdvajanje mikroorganizama iz njihovih prirodnih staništa ili za dobijanje kultura nakupljanja. Diferencijalne podloge se koriste za određivanje vrste ispitivanog mikroorganizma, zasnivajući se na osobenostima njegove razmjene materija. Sastav tih podloga omogućava da se jasno ispolje najkarakterističnija svojstva izučavanog mikroorganizma. U takve podloge se ubrajaju podloge s mlijekom, krvlju i želatinom, na kojima se ispoljavaju proteolizna i hemolizna svojstva mikroorganizama. U sastav diferencijalno-dijagnostičkih podloga,

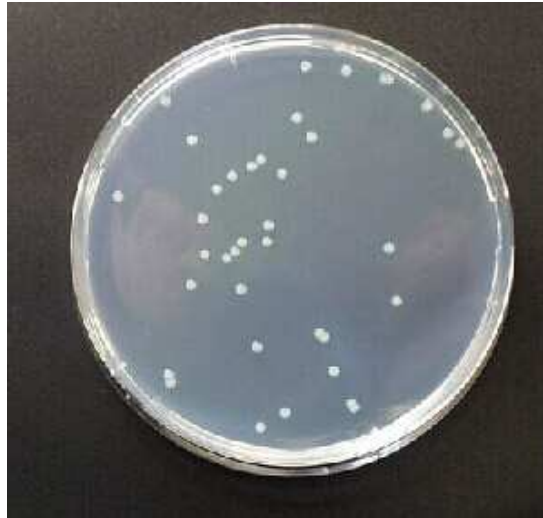
namijenjenih za otkrivanje oksidoredukcionih enzima, dodaju se indikatori, kao što su neutralno crveno, fenolno crveno, metilensko plavo, lakmusova tinktura i dr koji mijenjaju boju zavisno od pH vrijednosti.

Svi potrebni sastojci se prilikom pripreme podloge rastvaraju u određenoj količini destilovane vode. Dodavanjem različitih količina agara dobije se podloga različite čvrstine, a ukoliko se agar uopšte ne dodaje dobije se tečna podloga. Najvažnije osobine hranljive podloge su: hranljivost, vlažnost, pH reakcija i sterilnost. Da bi podloga bila hranljiva, mora da sadrži sve neophodne hranljive elemente u organskom ili neorganskom obliku koji su potrebni za rast određene grupe ili vrste mikroorganizama. Vlažnost podloge reguliše se dodavanjem agara koji podlozi daje čvrstinu. pH reakcija podloge podešava se prema zahtjevima mikroorganizama, a obezbjeđuje se samim sastojcima i uz korekciju pomoću baza (najčešće KOH) ili kisjelina (najčešće HCl). Sterilnost podrazumijeva da podloga prije primjene ne sadrži mikroorganizme. Sterilnost podloga se postiže sterilizacijom (zagrijanom vodenom parom, zagrijanom vodenom parom pod pritiskom ili filtracijom kroz mikrobiološke filtre).



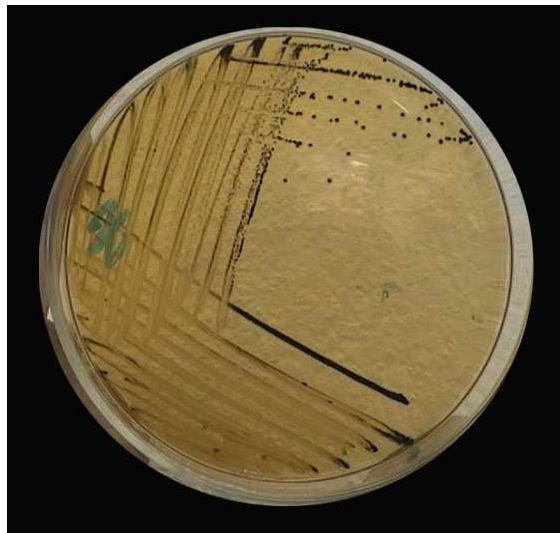
**Slika 32.** Podloge pripremljene za sterilizaciju

**Hranljivi agar** je visoko hranljiva podloga za kultivisanje velikog broja mikroorganizama. Od ove podloge sa i bez dodatka drugih supstanci može da se pripremi: kosi agar, duboki agar, agar u pločama, krvni agar, mlečni agar itd.



**Slika 34.** Bakterijske kolonije na hranljivom agaru

**SS (*Salmonella-Shigella*) agar** je visoko selektivna podloga za izolovanje bakterija iz rodova *Salmonella* i *Shigella*. Ova podloga maksimalno inhibira rast gram pozitivnih i koliformnih bakterija prisutnih u uzorku za ispitivanje, a ne ograničava rast patogenih gram negativnih bakterija. U isto vrijeme ova podloga daje jasnu diferencijaciju između laktoza negativnih i laktoza pozitivnih enterobakterija. Laktoza pozitivne kolonije su roze do crvene boje, dok su laktoza negativne bakterije bez boje. Salmonele su na SS agaru bez boje, sa crnim centrom, usled stvaranja H<sub>2</sub>S.



**Slika 35.** Kolonije salmonela na SS agaru





**Slika 36.** Rast *Streptococcus dysgalactiae* na krvnom agaru



**Slika 37.** Diferencijalna podloga - *Christensenova ureja*, naročito se koristi u identifikaciji bakterija iz familije *Enterobacteriaceae*. Lijevo - rast bakterijske vrste koja ne razlaže ureju, desno-rast bakterijske vrste koja razlaže ureju.



**Slika 38.** Sabouraud maltozni agar-podloga za izolovanje plijesni i kvasaca (na slici: kolonije *Candida albicans* na Sabouraud maltoznom agaru)

## Izolacija mikroorganizama

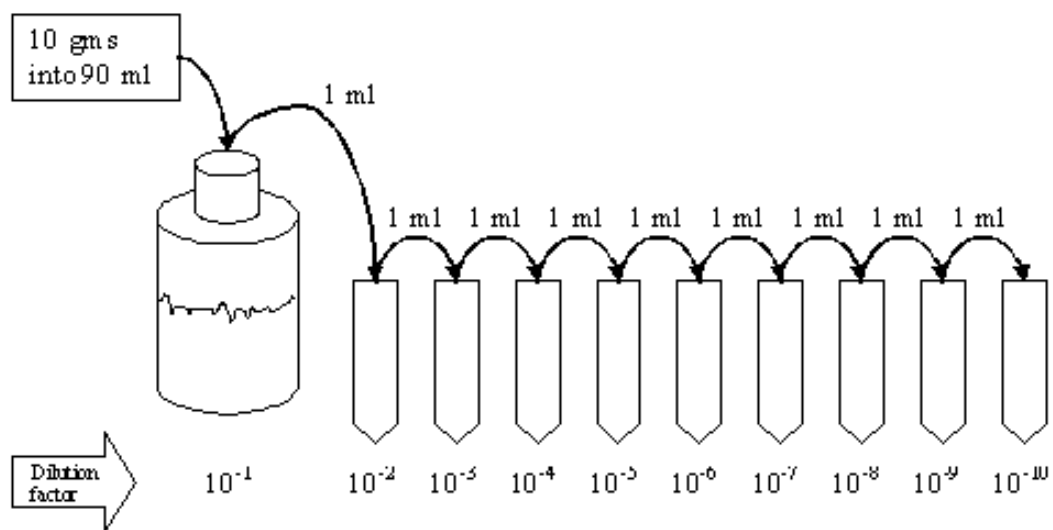
Izolacija mikroorganizama može se vršiti direktno iz ispitivanog supstrata ili iz supstrata koji se prethodno razblaži sterilnom destilovanom vodom ili fiziološkim rastvorom (0,85% NaCl). Direktna izolacija mikroorganizama iz zemljišta, stočne hrane ili prehrambenih proizvoda vrši se tako što se na razlivenu sterilnu podlogu pomoću sterilne pincete stavljaju čestice ispitivanog supstrata. Nakon inkubacije na odgovarajućoj temperaturi, oko zasijanih čestica supstrata se formiraju kolonije mikroorganizama. Zbog velike brojnosti mikroorganizama u prirodnim supstratima češće se koristi izolacija mikroorganizama iz razblaženog materijala. U epruvetu se unese razblažen supstrat iz koga će se vršiti izolacija mikroorganizama. Podloge u epruvetama se na rešou otope i ohlade na temperaturu do 50<sup>0</sup>C. Zatim se eza sterilise na plamenu i jedna kap iz razblaženog supstrata se prenese u prvu epruvetu sa otopljenom podlogom. Sadržaj epruvete se izmiješa blagim mućkanjem ili okretanjem između dlanova, nakon čega se ezom kap ove smješe prenese u drugu epruvetu. Postupak se ponavlja dok se ne inokilišu sve pripremljene epruvete. Nakon toga se sadržaj svake epruvete prenese u sterilnu i obilježenu petri kutiju. Petri kutije se inkubiraju u termostatu na odgovarajućoj temperaturi. Nakon isteka vremena inkubacije, na zasijanim Petri kutijama izrastu kolonije mikroorganizama.

## Određivanje broja mikroorganizama

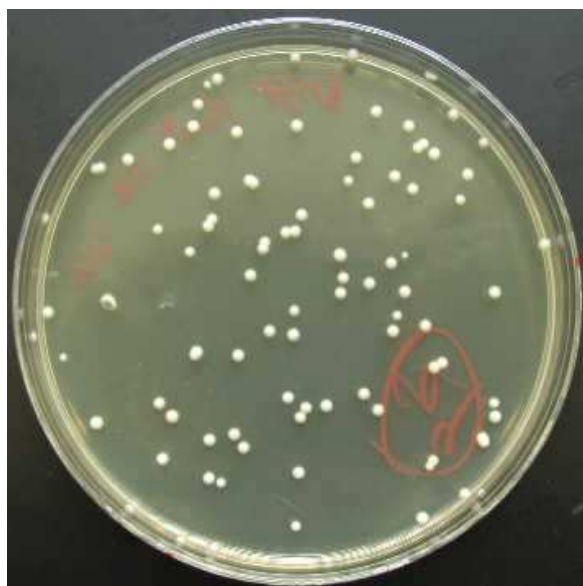
Broj mikroorganizama može se određivati direktnim i indirektnim metodama. Direktnim metodama broj mikroorganizama u supstratu određuje se pomoću posebnih predmetnih pločica na kojima su izgravirane mrežice određene površine, pomoću membranskih filtera na kojima je ucrtana mrežica kvadrata poznate površine, u komoricama poznate zapremine itd. Obično se mrežica sastoji iz 64 kvadrata. Poznata količina razblaženog supstrata se nanese na izgravirani dio pločice, preparat se osuši, fiksira i oboji nekom mikrobiološkom bojom. Nakon ispiranja boje vodom, preparat se osuši i posmatra objektivom uljane imerzije. Mikroskopiranje se vrši određenim redosledom tako da se ćelije mikroorganizama broje prateći kvadratiće na ugraviranoj mrežici. Broj ćelija se sabere i preračuna na količinu nanijete suspenzije. Indirektna metode za određivanje broja mikroorganizama podrazumijevaju određivanje broja živih ćelija mikroorganizama putem zasijavanja ispitivanog supstrata na odgovarajuću hranljivu podlogu. Najčešće se koriste **metoda razrjeđenja** (zasijavanje razrijeđene suspenzije na hranljivu podlogu) i **turbidimetrijska metoda**.

### Metoda razrjeđenja

Supstrat se prije zasijavanja razređuje u određenoj količini destilovane vode ili fiziološkog rastvora. U tu svrhu se koriste decimalna razblaženja. Zasijavanje se obično vrši sa 0,5 ili 1ml odgovarajućeg razrjeđenja u praznu petri kutiju (po 20ml podloge se razliva naknadno) ili na već razlivenu hranljivu podlogu. Nakon toga, zasijane podloge se prenose u termostat kako bi se razvili mikroorganizmi. Ispravno urađeno zasijavanje je ukoliko se u petri kutijama razvije 30-300 kolonija. Kolonije se broje i broj se preračuna na mililitar ispitivanog supstrata.



**Slika 39.** Priprema decimalnih razređenja iz neke namirnice



**Slika 40.** Pojedinačne kolonije mikroorganizama izrasle na hranljivom agaru

### **Turbidimetrijska metoda**

Zasniva se na mjerenju gustine izraslih mikroorganizama u tečnoj hranljivoj podlozi. Određena količina izrasle kulture mikroorganizama prenese se u prozirne staklene ili plastične kivete koje se stave u spektrofotometar. Zatim se kroz njih propušta svjetlost. Količina apsorbirane svjetlosti je u korelaciji sa brojem mikroorganizama.

### **Gajenje mikroorganizama**

Dobijene čiste kulture mikroorganizama uzgajaju se na odgovarajućim hranljivim podlogama, pri čemu se vodi računa o optimalnoj temperaturi kao i o prisustvu ili odsustvu slobodnog kiseonika. Prema zahtjevima za slobodnim kiseonikom mikroorganizmi se dijele na aerobe, anaerobe, fakultativne anaerobe i mikroaerofile.

### **Presijavanje i čuvanje čistih kultura mikroorganizama**

Presijavanje je postupak prenošenja mikroorganizama sa jedne podloge na drugu radi održavanja vitalnosti kulture, ispitivanja rasta kulture na različitim podlogama, proizvodnje biomase itd. Za presijavanje se koristi eza koja se prije i poslije prenošenja čiste kulture mikroorganizama sterilize na plamenu. Ako se presijavanje vrši iz tečne kulture, može koristiti i sterilna pipeta. Čuvanje čistih kultura mikroorganizama vrši se na temperaturama 4-5<sup>0</sup>C uz povremeno presijavanje. Učestalost presijavanja zavisi od vrste mikroorganizama. Jedna od mogućnosti dugog čuvanja mikroorganizama je postupak liofilizacije.

## VI vježba

### Izdvajanje čistih kultura mikroorganizama

#### Pitanja

1. Šta je čista kultura?
2. Šta je kolonija?
3. Koje su metode izdvajanja čistih kultura?
4. Kako se izdvaja čista kultura metodom razređenja?
5. Kako se izdvaja čista kultura metodom iscrpljenja?
6. U čemu je značaj dobijanja čistih kultura?
7. Kako se čuvaju kulture mikroorganizama?
8. Koje osobine karakterišu bakterijske kolonije?
9. Kakve kolonije bakterija mogu biti po obliku, veličini, boji, izgledu ivica, profilu, konzistenciji itd?

Da bi se mikroorganizmi mogli proučavati, moraju se izolovati u čistoj kulturi. Izdvajanje čistih kultura mikroorganizama predstavlja osnovu mikrobiološkog rada. Čista kultura nekog mikroorganizma predstavlja potomstvo mikroorganizma nastalo **razmnožavanjem jedne jedine ćelije**. Potomstvo jedne ćelije nastalo njenim razmnožavanjem na čvrstoj hranljivoj podlozi predstavlja **koloniju**.

#### Izdvajanje čistih kultura

Dobijanje čistih kultura mikroorganizama je neophodno u cilju proučavanja njihovih kulturnih, morfoloških i fizioloških svojstava, odnosno njihove determinacije. U procesu izolacije nekog mikroorganizma postoje tri faze:

1. dobijanje nakupljene kulture mikroorganizama (ne sprovodi se uvijek)
2. izdvajanje čiste kulture iz nakupljene
3. provjera čistoće izdvojene kulture

#### Dobijanje nakupljene kulture

Nakupljene kulture predstavljaju zajednice mikroorganizama u kojima dominira određena grupa mikroorganizama. Da bi se dobile nakupljene kulture nekog mikroorganizma, stvaraju se uslovi koji odgovaraju njegovom razvoju. U te svrhe se koriste **selektivne hranljive podloge**. Sastav podloge treba da bude takav da željenim mikroorganizmima obezbijedi najbrži rast, a spriječi rast ostalih, neželjenih mikroorganizama. Rast mnogih mikroorganizama, posebno patogenih, stimulišu: krv, žuč, serum, životinjska tkiva i dr. i dodaju se hranljivim podlogama u određenim koncentracijama. Rast određenih mikroorganizama suzbijaju antibiotici, fenol, citrat, NaCl itd. Visoka kisjelost sredine (pH ispod 4) zaustavlja rast većine bakterija, dok ne ometa rast gljiva. U procesu dobijanja nakupljene kulture, vrši se često višestruko presijavanje mikroorganizma u

tečne podloge, a na kraju presijavanje na odgovarajuću čvrstu podlogu. Često presijavanje doprinosi zaustavljanju rasta nepoželjnih mikroorganizama. Pri dužoj kultivaciji ovi mikroorganizmi mogu koristiti proizvode metabolizma željenih bakterija i tako aktivno rasti.

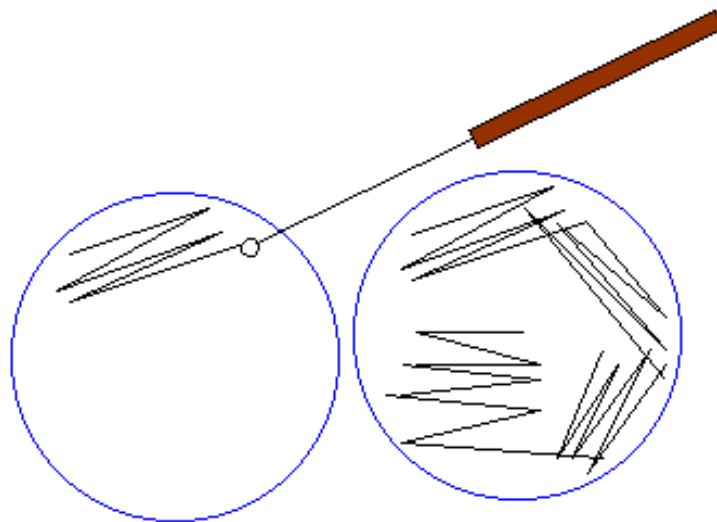
## **Metode za izdvajanje čiste kulture mikroorganizama**

### **Metoda razrjeđenja**

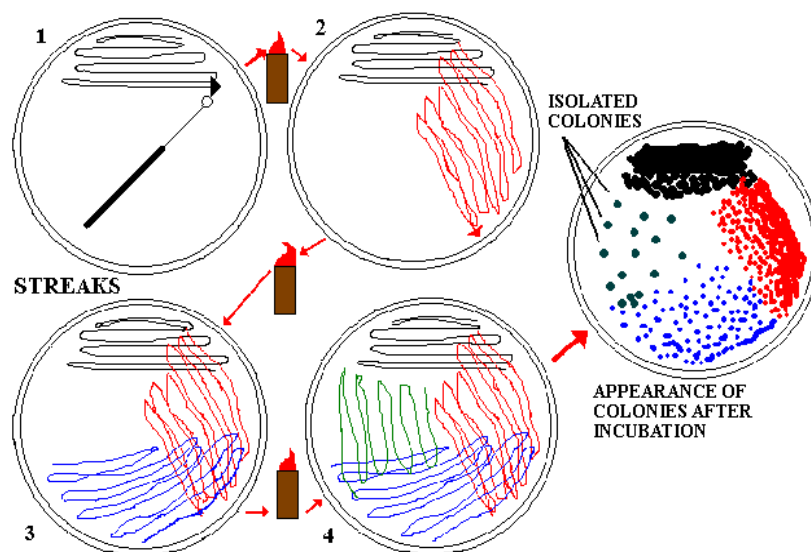
Postupak se sastoji u tome što se materijal iz koga se želi izdvojiti čista kultura razrijedi više puta u fiziološkom rastvoru ili hranljivom bujonu, a zatim se određena količina prenese u praznu petrijevu ploču. Preko toga se razlije rastopljena i na 45<sup>0</sup>C ohlađena čvrsta podloga. Zatim se sadržaj ploče izmiješa, ostavi da se stegne, a zatim inkubira na odgovarajuću temperaturu. Nakon 1-3 dana, na površini podloge pojaviće se vidljive zajednice – kolonije mikroorganizama. Pretpostavlja se da su izrasle kolonije čiste. Ezom se zahvata dio kolonije i zasije kosa površina agara. Kada se kultura razvije, mikroskopski se provjeri njena čistoća. Čelije u preparatu, ako je kultura čista, ujednačenog su oblika i veličine. Kap razrijeđenog materijala u fiziološkom rastvoru može se razmazati staklenim štapićem i po površini razlivenene čvrste podloge u petri ploči.

### **Metoda iscrpljenja**

Zahvati se ezom dio kolonije izrasle na čvrstoj hranljivoj podlozi i zasije cik - cik pokretima na više čvrstih podloga. Na taj način će na poslednje zasijanoj podlozi izrasti pojedinačne kolonije. Ova metoda se može izvoditi i na taj način što se nakon nekoliko cik cak poteza zasijavanja ezom na čvrstoj podlozi eza spali, ohladi, a zatim nastavi cik cak razmazivanje prethodno nanesenog materijala na preostali dio podloge. Ovaj postupak se ponovi 3 puta. Nakon inkubacije podloge, na zadnjim potezima zasijavanja će izrasti pojedinačne kolonije.



**Slika 41.** Zasijavanje materijala metodom iscrpljivanja



Slika 42. Metoda iscrpljivanja

### Održavanje čistih kultura mikroorganizama

Čiste kulture za svakodnevnu upotrebu održavaju se na tečnim i čvrstim hranljivim podlogama, na tamnom mjestu na temperaturi od  $4-6^{\circ}\text{C}$ . Međutim, na ovaj način hranjiva podloga se mijenja, koriste je mikroorganizmi, suši se i mikroorganizmi mogu uginuti. Zato se moraju češće presijavati. Najveći broj vrsta se presijava svake druge do svake četvrte nedelje. Manje osjetljive vrste (sporogene bakterije) se presijavaju svakih 4-6 mjeseci, a osjetljive vrste (bakterije mliječne kisjeline) svakih 7-15 dana. Za ovakav način čuvanja kultura treba dosta vremena i sredstava. Zato se primjenjuju drugi postupci za čuvanje mikroorganizama u obliku trajnih kultura (preko godinu dana). Najčešći načini trajnog čuvanja su: u epruvetama pod slojem parafinskog ulja, u hermetički zatvorenim sudovima (otvor epruvete sa zapašaćem zaliva se parafinom), čuvanje pomoću liofilizacije (odstranjivanje vode iz mikroorganizama) itd. Čuvanje kultura u liofilizovanom stanju se dosta primjenjuje. Liofilizacija se izvodi u posebnim aparatima **liofilizatorima**, tako što se kultura u tečnom stanju naglo smrzne na  $-78^{\circ}\text{C}$  i pod negativnim pritiskom (u vakuumu) suši. Voda se odstranjuje prelaskom leda direktno u paru, pri čemu tečna faza izostaje. Liofilizirane kulture se čuvaju u zalivenim staklenim ampulama više godina.

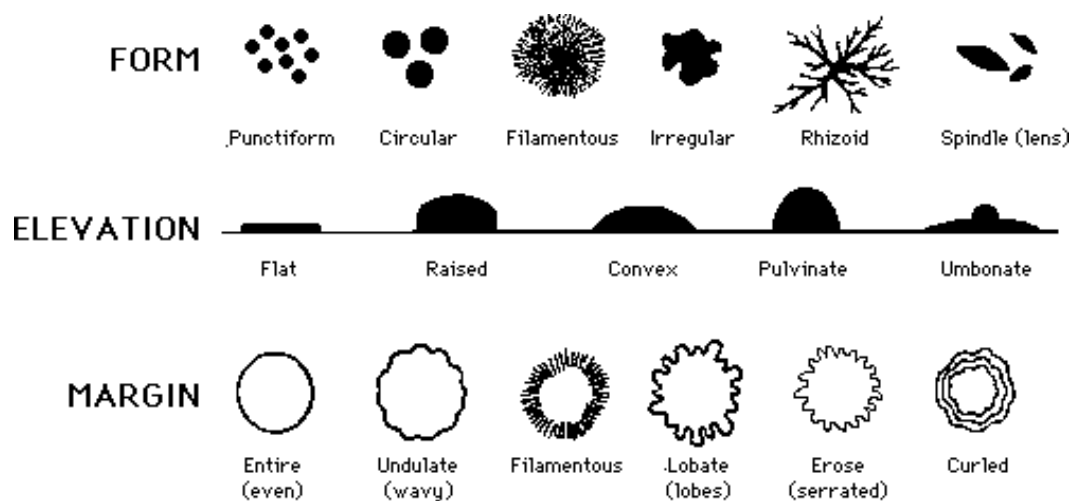


**Slika 43.** Miješana kultura

### **Određivanje karakteristika porasta bakterija na čvrstim hranljivim podlogama**

Na čvrstim hranljivim podlogama bakterije formiraju vidljive zajednice koje se nazivaju **kolonije**. Kolonije nastaju razmnožavanjem pojedinih bakterijskih ćelija. Svaka bakterijska vrsta stvara karakteristične kolonije. U određenim uslovima, taj karakterističan izgled se može promijeniti. Kod opisivanja bakterijskih kolonija uzima se u obzir: vrijeme porasta, oblik, veličina, boja, izgled ivica i površine, profil, konzistencija kolonija itd. Vrijeme porasta kolonija zavisi od vrste bakterija, hranjive podloge i temperature. Oblik bakterijskih kolonija može biti **tačkast, okrugao, sočivast, nepravilan, korenolik, končast, ameboidan itd.** Kolonije po veličini mogu biti: sitne (do 3mm), srednje (do 5mm) i krupne (preko 5mm) u prečniku. Boja kolonija može biti različita, kao što su: **bijela, žuta, crna, narandžasta, crvena, ružičasta, zelena, plava itd.** Iвица kolonija može biti **ravna, talasasta, testerasta i končasta**. Površina kolonija može biti **glatka, sjajna i naborana**. Profil kolonija može biti **ravan, ispupčen i udubljen**. Konzistencija kolonija može biti sluzasta, zrnasta, praškasta, kompaktna itd. Položaj kolonija u podlozi može biti površinski i dubinski.





**Slika 44. Različiti oblici, profili i ivice kolonija**

### **Određivanje karakteristika porasta bakterija na tečnim hranljivim podlogama**

Razmnožavanje bakterija u tečnim hranljivim podlogama se zapaža u vidu zamućenja podloge, stvaranja taloga, skrame na površini, promjene boje, mirisa itd. Zamućenost tečne podloge može biti prolazno ili trajno, a po svom intenzitetu jako, slabo i umjereno izraženo. Skrame na površini tečnih podloga mogu biti slabo izražene, opnaste, pahuljaste, prstenaste, glatke, naborane, kožaste itd. Talog koji se javlja usled razmnožavanja bakterija u tečnim hranljivim podlogama može biti obilan ili slabo izražen. Po svom izgledu talog može biti kompaktan i čvrsto vezan za dno epruvete, pahuljast, praškast, sluzast, zrnast itd.

## VII vježba

### Određivanje nekih biohemijskih karakteristika mikroorganizama

#### Pitanja

1. Zašto je važno poznavati biohemijske osobine mikroorganizama?
2. Koje su važnije biohemijske reakcije koje se koriste u identifikaciji mikroorganizama?
3. Kako se izvodi katalaza test i kada se koristi u identifikaciji mikroorganizama?
4. Kako se izvodi test koagulaze plazme i kada se koristi u identifikaciji mikroorganizama?
5. Kako se izvodi oksidaza test i kada se koristi u identifikaciji mikroorganizama?

Mikroorganizmi se razlikuju po svojim biohemijskim osobinama, pa je zato dokazivanje ovih osobina značajno u njihovoj identifikaciji. Neke od tih osobina su:

- hidroliza skroba,
- hidroliza kazeina,
- otapanje (likvefakcija želatina),
- stvaranje indola,
- stvaranje sumporvodonika,
- redukcija nitrata,
- redukcija vodonik-peroksida,
- fermentacija ugljenih hidrata,
- razlaganje ureje
- stvaranje koagulaze,
- stvaranje oksidaze,
- razlaganje citrata itd.

#### Hidroliza skroba

Neke bakterije i plijesni stvaraju enzim **amilazu** kojim razlažu skrob. Za dokazivanje hidrolize skroba od strane mikroorganizama koristi se skrobni agar.

#### Postupak

Na čvrstom skrobnom agaru razlivenom u Petri ploče ezom se zasije kultura ispitivanog mikroorganizma. Tako zasijane Petri ploče se stavljaju u termostat na inkubaciju 48h na 37<sup>0</sup>C. Vrijeme i temperatura inkubiranja mogu biti različiti, što zavisi od vrste mikroorganizma. Nakon inkubiranja, površina zasijanog skrobnog agara se prelije rastvorom lugola, ostavi malo da stoji, a zatim odlije. Ako nije došlo do razlaganja skroba u podlozi, cijela površina podloge biće **plavo obojena**. Ako je došlo do razlaganja skroba, javiće se **neobojena zona**. U toj zoni mogu se uočiti razne boje, kao što su **žuta**,

**crvenkasta, smeđa**, koje su rezultat različitog stepena hidrolize skroba. Rezultati se moraju odmah očitati, jer poslije kraćeg vremena plava boja nestaje.

### Priprema skrobnog agara

Hranljivom agaru se doda 1-2% rastvora skroba u toploj vodi, a zatim se dobijena smjesa sterilizuje.



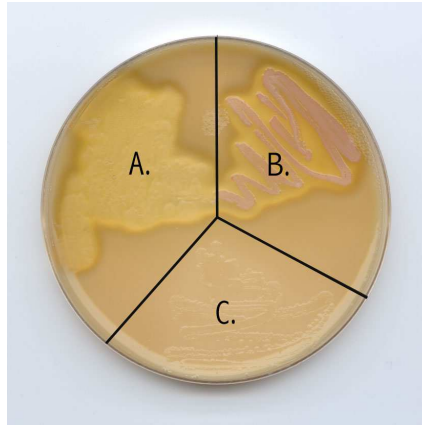
**Slika 45.** Hidroliza skroba (negativna reakcija lijevo, pozitivna reakcija desno)

### Hidroliza kazeina

Za dokazivanje hidrolize bjelančevine mlijeka, kazeina, od strane mikroorganizama, koristi se mliječni agar.

#### Postupak

Kultura ispitivanog mikroorganizma se ezom zasije **na čvrsti mliječni agar** razliven u petri ploče. Tako zasijane podloge se inkubiraju 48h na 37<sup>0</sup>C ili na nekoj drugoj temperaturi, zavisno od vrste ispitivanog mikroorganizma. Ukoliko je ispitivani mikroorganizam razložio kazein, oko kolonije se formira **providna, prosvjetljena zona**. **Mlečni agar** se dobija se miješanjem jednog dijela sterilisanog mlijeka sa 1-5 dijelova rastopljenog 3% agara.



**Slika 46.** Hidroliza kazeina (A i B: pozitivne reakcije, C: negativna reakcija)

### Otapanje - likvefakcija želatina

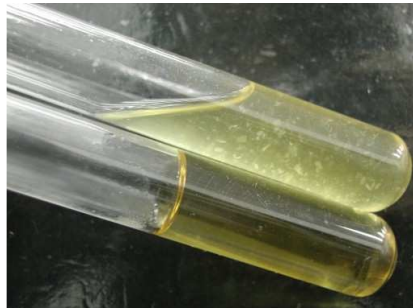
Neke bakterije stvaraju proteolitički enzim **želatinazu** kojim razlažu želatin. Jedinjenja koja nastaju razlaganjem želatina, na nižim temperaturama ostaju u tečnom stanju.

#### Postupak

Podloga sa želatinom u epruvetama se zasije ispitivanom kulturom. ubodom po dubini. Kontrolna epruveta koja nije zasijana i zasijana epruveta se inkubiraju 48-72h na 37<sup>0</sup>C. Nakon toga epruvete se stavljaju u frižider da bi se eventualno nerazloženi želatin stegao. Ukoliko i nakon hlađenja podloga ostane u tečnom stanju, došlo je do razlaganja želatina.

#### Priprema podloge sa želatinom

Na 1000ml hranljivog bujona dodaje se 150g želatina i zagrijava dok se želatin ne rastopi. Dotjera se pH na 7,1. Sterilizacija se vrši u autoklavu 15 minuta na 120<sup>0</sup>C ili tinalizacijom u Kohovom loncu. Poslije sterilizacije podloga se odmah ohladi u vodi, jer produžena visoka temperatura može dovesti do toga da se želatin ne steže na nižim temperaturama (normalno se steže na temperaturama ispod 23<sup>0</sup>C).



**Slika 47.** Otapanje želatina (gornja epruveta: pozitivna reakcija, donja epruveta: negativna reakcija)

## Stvaranje indola

Neke bakterije razlažu aminokiselinu **triptofan** pri čemu kao krajnji proizvod nastaje **indol**. Za dokazivanje ove osobine koristi se hranljiva podloga (pepton) koji sadrži triptofan. Podloga ne smije sadržati šećer, jer šećer ometa reakciju stvaranja indola. Podloga zasijana ispitivanim mikroorganizmom se inkubira 24-48h. Nakon perioda inkubacije podlozi se dodaje 1ml ksilola i snažno promućka, da se izdvoji indol. Epruveta se ostavi da se ksilol izdvoji na površini, pa se polako niz zid doda 1ml rastvora A. Ako u podlozi ima indola, na granici ksilola i podloge pojaviće se crveni prsten. Da je crveni prsten zaista rezultat stvorenog indola, dokazuje se dodavanjem nekoliko kapi rastvora B koji boju pojačava.



**Slika 48.** Stvaranje indola (lijevo: pozitivna reakcija, desno: negativna reakcija)

Umjesto rastvora A i B može se koristiti Kovačev reagens, pri čemu je rezultat pozitivne reakcije takođe stvaranje crvenog prstena. *E. coli* je izraziti stvaralac indola, pa se standardni soj ovog mikroorganizma može koristiti kao kontrola.

### • Reagens A (Erlichov reagens)

- Paradimetilaminobenzaldehid (PMAB).....1g
- Alkohol 96%.....95ml
- Koncentrovana hlorovodonična kisjelina.....20ml

U alkoholu se mućkanjem otopi PMAB, a poslije toga hlorovodonična kisjelina.

### • Reagens B: kalijum persulfat (zasićeni vodeni rastvor pri sobnoj temperaturi)

### • Kovačev reagens:

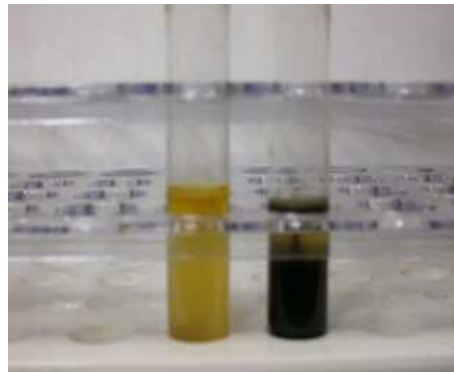
- Paradimetilaminobenzaldehid.....5g
- Amilalkohol.....75ml
- Koncentrovana hlorovodonična kisjelina.....25ml

## Stvaranje sumporvodonika

Neke bakterije svojim enzimima razlažu aminokisjeline koje sadrže sumpor pri čemu nastaje **sumporvodoni** (**vodoniksulfid**). Ovaj gas se može dokazati solima teških metala (npr. **olovoacetatom**) s kojima sumporvodoni reaguje i daje jedinjenja koja se nazivaju **sulfidi i crno su ili mrko obojena**.

### Postupak

Epruvete s peptonskom vodom zasiju se kulturama. Između zatvarača i zida epruvete umetne se traka filter papira natopljena olovo acetatom na udaljenosti oko 0,5cm iznad površine podloge. Zasijana podloga sa filter papirom inkubira se 2-4 dana na 37<sup>0</sup>C. Ako nakon tog vremena filter papir pocrni, došlo je do izdvajanja sumporvodonika iz podloge dejstvom bakterija.



**Slika 49.** Stvaranje sumporvodonika: lijevo - negativna reakcija, desno - pozitivna reakcija

Za dokazivanje stvaranja vodoniksulfida mogu se koristiti i čvrste hranljive podloge u čiji sastav ulaze soli kobalta, nikla, olova i gvožđa. Ukoliko bakterije na ovim podlogama stvaraju sumporvodoni, on će reagovati sa ovim solima, nagradiće se sulfid, usljed čega će podloga potamnjeti.

Neke od čvrstih podloga koje se koriste za dokazivanje vodonik sulfida su Kliglerov dvostruki šećer i trostruki šećer. Ove podloge sadrže dvovalentno gvožđe u obliku soli (ferosulfat) i natrijum tiosulfat. Zasijavanje ispitivane kulture mikroorganizma se vrši ubodom u stub kosog agara i po površini. Nakon inkubacije od 24h vrši se očitavanje rezultata. Ako bakterija stvara vodoniksulfid redukcijom tiosulfata koji je dodat podlozi, na mjestu uboda u podlozi se javlja crna boja usljed stvaranja gvožđe sulfida.

## Redukcija nitrata

Neke bakterije imaju sposobnost da redukuju nitrata do nitrita. Za ispitivanje ove osobine bakterija koristi se podloga sledećeg sastava:

- Kalijum nitrat .....0,2g
- Pepton.....5g
- Destilovana voda.....1000ml
- pH.....7,4

Pripremljena podloga se sterilise u autoklavu.

Epruvete sa nitratnim bujonom zasiju se ispitivanim kulturama i inkubiraju 24-48h na 37°C. Takođe se pod istim uslovima inkubira i kontrolni, tj nezasijani nitratni bujon. Nakon tog vremena, otpipetira se po 1ml iz zasijane i 1ml iz nezasijane epruvete i doda po dvije kapi rastvora I (rastvor sulfanilne kisjeline), a zatim dvije kapi rastvora II (rastvor alfa-naftilamina). Ukoliko je zasijana bakterijska kultura redukovala nitrata u nitrite, javiće se **crvena boja**. U kontrolnoj epruveti ne dolazi do promjene boje.



**Slika 50.** Redukcija nitrata u nitrite (crvena boja - pozitivna reakcija, žuta boja – negativna reakcija)

### Rastvor I

- sulfanilna kisjelina.....8g
- n/5 glacijalna sirćetna kisjelina.....1000ml

### Rastvor II

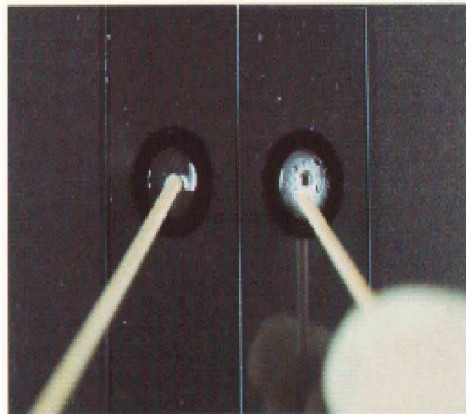
- Alfa-naftilamin.....5g
- n/5 glacijalna sirćetna kisjelina.....1000ml

## Razlaganje vodonik peroksida

Neki mikroorganizmi stvaraju enzim **katalazu** koji razlaže **vodonik peroksid** na vodu i molekularni kiseonik.

### Postupak

Ispitivana kultura mikroorganizma se zasijava na hranljivi agar i u hranljivi bujon i inkubira se 48h na 37<sup>0</sup>C. Nakon toga se uzima dio kolonije i prenosi na staklenu pločicu u kap fiziološkog rastvora. U tako formiranu kap se dodaje kap **3% vodonik peroksida (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)**. Ukoliko ispitivani mikroorganizam posjeduje enzim katalazu, razložiće dodati vodonik peroksid, što se ispoljava izdvajanjem gasa **u vidu mjehurića**.



**Slika 51.** Razlaganje vodonik peroksida: lijevo: negativna reakcija, desno-pozitivna reakcija (stvaranje mjehurića gasa)

Do iste reakcije dolazi i ako se nekoliko kapi vodonik peroksida direktno nakapa na izraslu koloniju.



**Slika 52.** Izdvajanje gasa u vidu mjehurića nakon dodavanja 3% vodonik peroksida direktno na kolonije katalaza pozitivnih bakterija



## Fermentacija ugljenih hidrata

Sposobnost mikroorganizama da fermentuju ugljene hidrate je našla veliku primjenu u identifikaciji mikroorganizama. U tu svrhu osnovnim podlogama se dodaju različite vrste ugljenih hidrata: pentoze (ksiloza, arabinoza, ramnoza), heksoze (glukoza, galaktoza, manosa), disaharidi (saharoza, laktoza, maltoza), trisaharidi (rafinoza), polisaharidi (inulin, dekstrin, skrob, celuloza) i indikator. Ugljeni hidrati se dodaju podlogama najčešće u koncentraciji 0,5 do 1%.

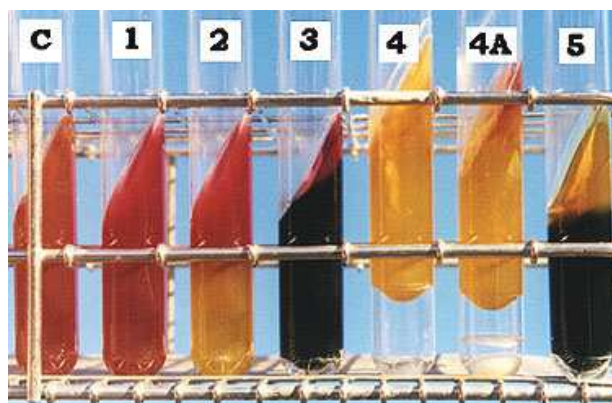
Ispitivanje fermentacije ugljenih hidrata se može vršiti u tečnim i čvrstim podlogama.

Ukoliko se koriste tečne podloge, kao indikator se koristi Andrade reagens (kisjeli fuksin).

Ovaj reagens se priprema na sljedeći način:

- Kiseli fuksin.....0,5g
- 1N NaOH.....16ml
- Destilovana voda.....1000ml

Ovaj reagens je u neutralnoj i baznoj sredini bezbojan, a u kisjeloj sredini crven. To znači, ukoliko ispitivani mikroorganizam fermentiše dodati ugljeni hidrat, podloga će dobiti crvenu boju. Da bi se dokazalo oslobađanje gasa, u epruvete sa tečnom podlogom se prije sterilizacije uranjaju Durham-ove cjevčice. Ukoliko ispitivana kultura mikroorganizma stvara gas, on se registruje u cjevčicama u vidu mjehura. Ovi testovi su naročito značajni za identifikaciju enterobakterija. Od čvrstih podloga se koristi Kliglerov agar (dvostruki šećer) i trostruki šećer. Kliglerov agar se koristi za dokazivanje fermentacije glukoze i laktoze. Podloga sadrži indikator fenol crveno, koji je u kisjeloj sredini žut, a u baznoj crven. Ako je ukošeni dio podloge ostao crven, a dubina podloge žuta, mikroorganizam fermentiše samo glukozu. Ako je žuta i kosina i dubina podloge, ispitujući mikroorganizam fermentuje i glukozu i laktozu. Stvaranje gasa se manifestuje pucanjem podloge i odvajanjem od zidova epruvete.



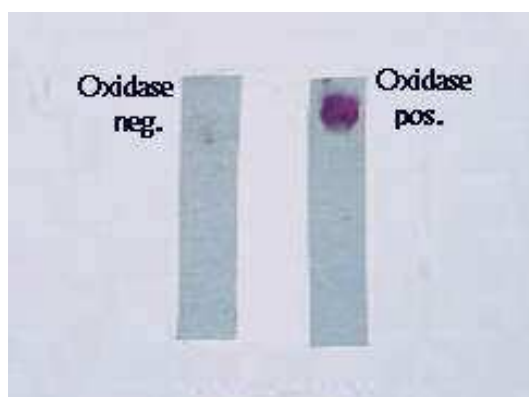
**Slika 53.** Test razlaganja glukoze

## Oksidaza test

Oksidaza je enzim koji aktivira atmosferski kiseonik i veže ga za supstrat.

### Dokazivanje oksidaze

Na komadić papira položenog na predmetnicu stavi se kap reagensa (1% vodeni rastvor paminodimetil anilin oksalata). Svježu kulturu razmazati u reagensu ezom. Kod pozitivne reakcije koja se pojavi za nekoliko minuta, kultura se oboji **ljubičasto**, a kod negativne reakcije nema promjena u boji.



**Slika 54.** Oksidaza test, negativan test - lijevo, pozitivan test – desno

## Ureaza test

Hranljivi agar sa dodatkom 2% ureje se zasije ispitivanim mikroorganizmom i stavi na inkubaciju 24h. Ako se nakon tog perioda boja podloge promijeni u **rozu-pink**, znak je da je došlo do razlaganja ureje.



**Slika 55.** Razlaganje ureje: negativan test (gore), pozitivan test (dolje)

## Koagulaza test

Na osnovu koagulaza testa može se *S. aureus* razlikovati od *S. epidermidisa*. Koagulaza se dokazuje uz pomoć krvne plazme.

### Postupak dobijanja plazme kunića za koagulaza test

Na 10 ml plazme kunića se doda 1ml 10% natrijum citrata. Poslije centrifugovanja odvoji se bistar sloj iznad staloženih eritrocita koji predstavlja plazmu.

### Dokazivanje koagulaze

Plazma se razblaži fiziološkim rastvorom u odnosu 1:15. Od toga se uzme 0,5ml i sipa u epruvetu, a zatim se ezom doda djelić kolonije koja se ispituje. Nakon toga se epruveta stavi u termostat na 37<sup>0</sup>C. Poslije 2h kontroliše se da li je došlo do koagulacije plazme. Ako nije došlo, reakcija se čita nakon 4, 6 i 24h inkubacije. Za negativnu kontrolu se uzima 0,5ml plazme koja ne smije da koaguliše poslije određenog vremena, a za pozitivnu kontrolu plazma zasijana sa već provjerenim pozitivnim sojem *S. aureus*.



**Slika 56.** Pozitivan test koagulaze - gore, negativan test koagulaze-dolje

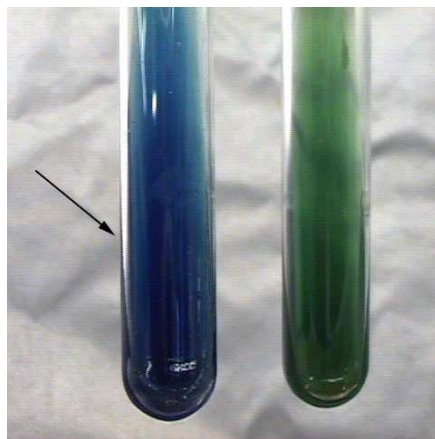
Aglomeracija stafilokoka u plazmi može da se dokaže brzim testom na mikroskopskoj ploči (clumping test).

#### • Postupak izvođenja testa:

Na mikroskopskoj ploči se nanese kap plazme i dio ispitivane kolonije stafilokoka, a zatim izmiješa. Pojava pahuljica u roku od dva minuta označava pozitivnu reakciju, dok kod negativne tečnost ostaje homogeno zamućena. Ovaj test je obično u korelaciji sa testom koagulaze plazme, ali ne uvijek, pa nije tako pouzdan za dokazivanje *S. aureus* kao test koagulaze plazme.

## Citratni test

Neki mikroorganizmi mogu da koriste citrate kao izvor ugljenika, pa se ta njihova osobina može koristiti u njihovoj identifikaciji. Najčešće se u ove svrhe koristi Simmonsov citratni agar. Ako bakterije koriste citrate iz podloge, boja podloge se iz zelene mijenja u plavu. Ukoliko boja ostane nepromijenjena, reakcija je negativna. Pri zasijavanju podloga sa citratom treba voditi računa da se metalnom omčom (ezom) ne zahvati i dio hranljive podloge sa koje se presijava, jer se u tom slučaju javlja lažna reakcija, odnosno bakterije koriste hranljive materije iz prenijetog materijala.



Slika 57. Pozitivan citratni test – lijevo, negativan citratni test – desno

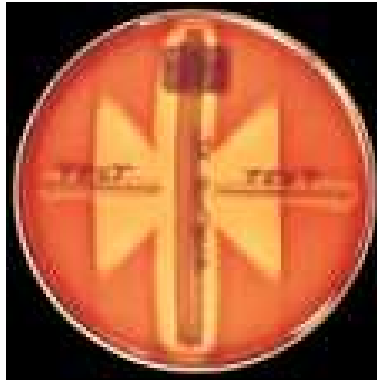
## CAMP test

Pojava da beta toksin stafilokoka u sadejstvu sa *S. agalactiae* potpuno liziraju eritrocite zapazili su naučnici *Christie, Atkins i Munch Petersen* po kojima je dokazivanje *S. agalactiae* ovim postupkom dobilo naziv CAMP test.

## Postupak

Soj *S. aureus* koji stvara široku zonu beta hemolize se zasije preko polovine podloge za CAMP test (krvni agar sa dodatkom 0,1% eskulina i 0,01 % gvožđe citrata).

Kolonije označene kao streptokoke na krvnom agaru se pikiraju omčicom i zasiju pod pravim uglom na liniju zasijavanja *S. aureus*, na rastojanju od linije 2-3mm. Na svaku ploču treba zasijati jedan poznati soj *S. agalactiae* kao pozitivnu CAMP kontrolu. Zasijane podloge se inkubiraju 18-24h na 37°C. Pozitivan CAMP test se ispoljava prosvjetljenjem u obliku lijevka u zoni beta hemolizina stafilokoka.



**Slika 58.** Pozitivan Camp test - prosvetljenje u vidu lijevka

### **Hidroliza eskulina**

Bujonskoj kulturi staroj 24h doda se 0,5ml 7%  $\text{FeCl}_3$ . Crna boja označava pozitivnu reakciju, odnosno znak da je dejstvom bakterija došlo do razlaganja eskulina, pri čemu se  $\text{FeCl}_3$  redukuje u  $\text{FeCl}_2$ .

### **Hidroliza hipurata**

Ferment hipuraza razgrađuje hipurnu kiselinu na benzoevu kiselinu i glikokol.

#### **Priprema podloge**

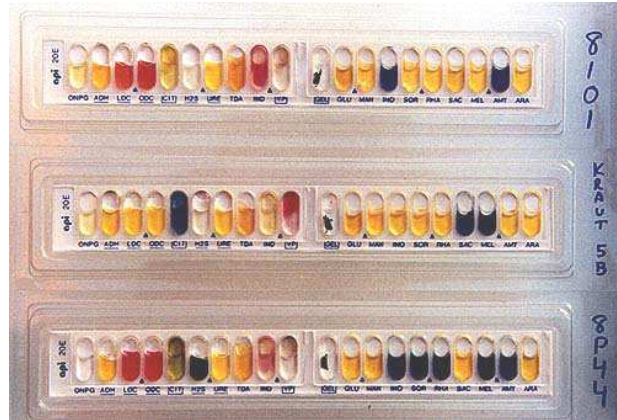
Hranljivi bujon sa 0,5% glukoze i 1% natrijum hipurata, pH 7,3-7,5 se sterilise u autoklavu.

#### **Izvođenje testa**

Pripremljena podloga se inkubira ispitivanim mikroorganizmom i inkubira 24h. Nakon toga se uzima 1ml bujionske culture i dodaje joj se 0,25ml 50%  $\text{H}_2\text{SO}_4$ . Pojava **bijelog kristalnog taloga** označava pozitivnu reakciju.

#### **API sistem** – sistem za identifikaciju mikroorganizama

Ovaj sistem čini niz mini epruveta u kojima se nalaze podloge za dokazivanje biohemijskih osobina mikroorganizama.



Slika 59. API sistem

## Vježba VIII

### Serološka dijagnostika bakterijskih oboljenja

#### Pitanja

1. Šta su serološke reakcije?
2. Koji je značaj seroloških reakcija?
3. Kako se dobija krvni serum?
4. Šta je aglutinacija i kako se izvodi?
5. Šta je precipitacija i kako se izvodi?
6. Šta je komplement i koja je suština reakcije vezivanja komplementa?
7. U kojim testovima se koriste obilježena antitijela?
8. Opiši testove fluorescentne mikroskopije.
9. Opiši ELISA test.
10. Koja je suština radioimunoloških metoda?
11. Šta je PCR reakcija?

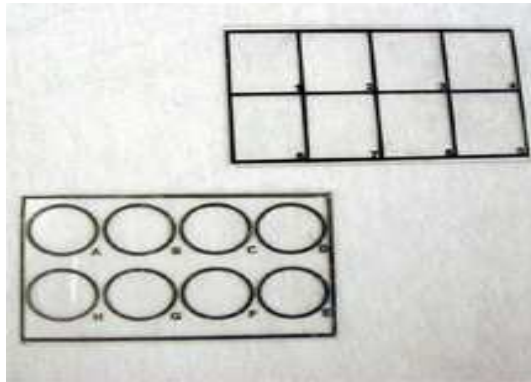
#### Serološke reakcije

Serološke reakcije su vidljivi rezultati vezivanja antigena (Ag) i antitijela (Ab). U osnovne serološke reakcije spadaju: **aglutinacija, precipitacija, neutralizacija, reakcija vezivanja komplementa (RVK), inhibicija hemaglutinacije, testovi koji koriste obilježena antitijela ili antigene**. U bakteriološkoj dijagnostici se najčešće primjenjuju aglutinacija, precipitacija, RVK i testovi koji koriste obilježena antitijela ili antigene. Ovi testovi se koriste kako u dijagnostici bakterijskih oboljenja, tako i u detekciji i identifikaciji bakterija.

#### Aglutinacija

Aglutinacija je reakcija koja nastaje miješanjem korpuskularnog antigena sa specifičnim antiserumom (koji sadrži antitijela na određeni antigen), pri čemu se stvara **mreža - aglutinat**. Antigeni u ovoj reakciji nazivaju se aglutinogeni, a antitijela aglutinini. Ako su korpuskule u aglutinaciji bakterijske ćelije, gljive, eritrociti i sl., sa sopstvenim antigenom na površini, aglutinacija se naziva direktna, a ako su korpuskule inertni (npr. eritrociti isl.) za koje su vezani solubilni antigeni, aglutinacija je označena kao indirektna. Za reakciju aglutinacije veoma je važan odnos količine Ag i Ab, jer samo pri optimalnom odnosu dolazi do pojave aglutinata. U prisustvu velike količine Ag stvaraju se veoma mali aglutinati, kao i u prisustvu velike količine Ab. Pored ovoga, važni faktori su pH, temperatura, koncentracija elektrolita i sl. Takođe, važna je i klasa antitijela koja učestvuju u reakciji (IgM klase vezuju oko 800x više Ag nego IgG klase.) Aglutinacija se može izvoditi na predmetnoj pločici, u epruvetama ili plastičnim pločama sa malim udubljenjima. Prema vremenu pojavljivanja aglutinata razlikujemo brzu i sporu aglutinaciju. Brza aglutinacija izvodi se tako što se na predmetno staklo stavi kap

ispitivanog seruma, a zatim kap uzorka sa Ag (npr. suspenzija bakterija). Kapi se pomiješaju laganim pomjeranjem pločice. Nakon 1-2 minuta očitava se reakcija: U slučaju pozitivne reakcije javlja se aglutinat **u vidu pahuljica**.



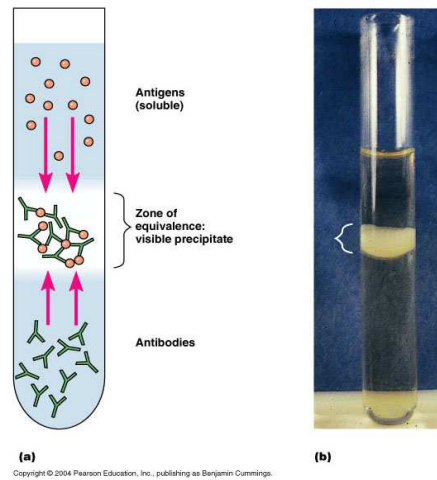
**Slika 60.** Ploče za izvođenje aglutinacije

**Spora aglutinacija** izvodi se u epruветama, tako što se naprave dvostruka stepenasta razređenja seruma u fiziološkom rastvoru i u svaku od njih se doda standardna količina antigena. Epruvete se promućkaju i inkubiraju u termostatu na 37<sup>0</sup>C tokom 24h. Nakon ovog perioda se očitavaju rezultati: ako je tečnost u epruveti mutna, a talog sa dna se razbija prilikom mućkanja, reakcija je negativna i označava se sa – (minus). Ako je tečnost iznad taloga bistra, a talog se ne razbija mućkanjem, reakcija je pozitivna i označava se sa ++++. Prelazne reakcije između ova dva ekstrema se označavaju kao +, odnosno ++. Recipročna vrijednost seruma u epruveti u kojoj je još primjetna aglutinacija (++) predstavlja titar antitijela.

### **Precipitacija**

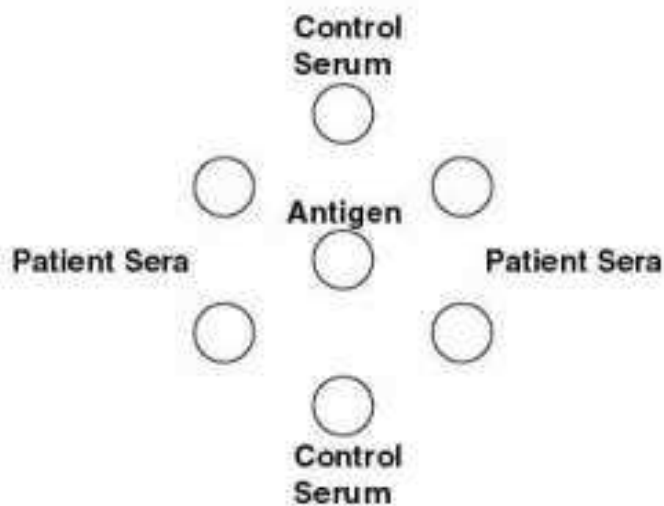
Precipitacija je vrlo slična aglutinaciji, ali je razlika u tome što antigeni nisu vezani za partikule, već su dispergovani u tečnosti. Antigeni koji učestvuju u ovoj reakciji nazivaju se precipitinogeni, a antitijela precipitini. Nastali talog - precipitat je rezultat reakcije antigen - antitijelo koji se taloži zahvaljujući elektrolitima u rastvoru. Da bi precipitacija bila uspješna, važno je ispuniti uslove koji važe i za aglutinaciju. Prema načinu izvođenja, razlikujemo precipitaciju u tečnom medijumu i precipitaciju na polučvrstom (na gelu). U tečnom medijumu najčešće se izvodi precipitacija u prstenu. Ova precipitacija može se koristiti za dokazivanje Ag ili Ab. Ako se dokazuju Ab, potrebno je u epruvetu naliti ispitivani serum, a preko njega suspendovani Ag (u jednakim odnosima). Tečnosti se ne smiju izmiješati, već granica između njih mora ostati jasna. Ako u serumu ima Ab, na mjestu dodira dvije tečnosti nakon par minuta javiće se precipitat u vidu prstena. Ova metoda koristi se npr. dokazivanje antraksa itd.





**Slika 61.** Reakcija precipitacije

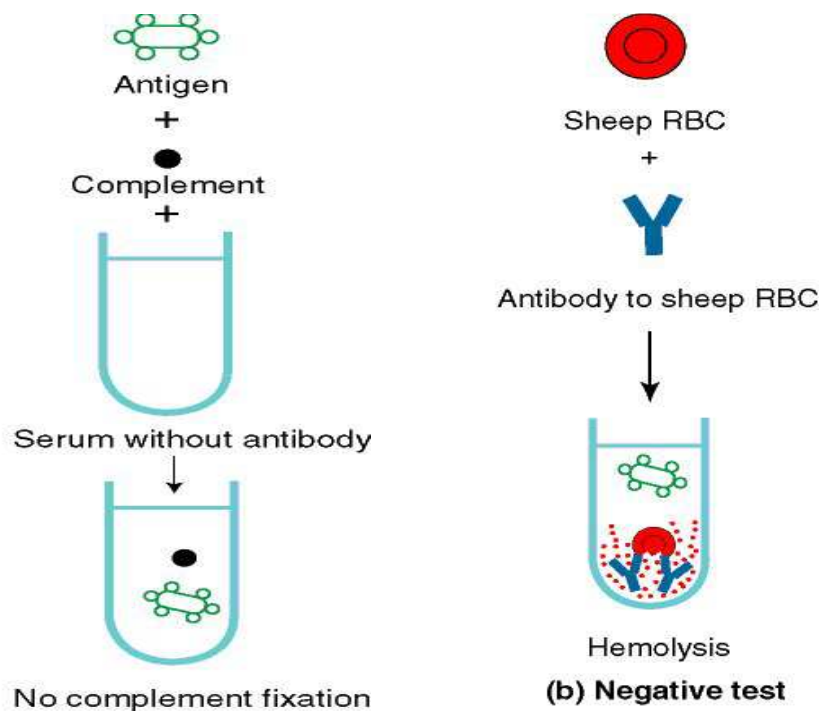
Precipitacija na gelu podrazumijeva difuziju Ag ili Ab, spontano (imunodifuzija), ili pod dejstvom električne struje (imuno elektroforeza). Na mjestu gdje je koncentracija Ag i Ab u gelu optimalna, javlja se precipitat. Među ovim metodama najčešće se primjenjuje dvostruka imunodifuzija u gelu ( u jednu rupicu na gelu stavi se Ag, a u drugu Ab, koji potom difunduju i stvaraju precipitat.



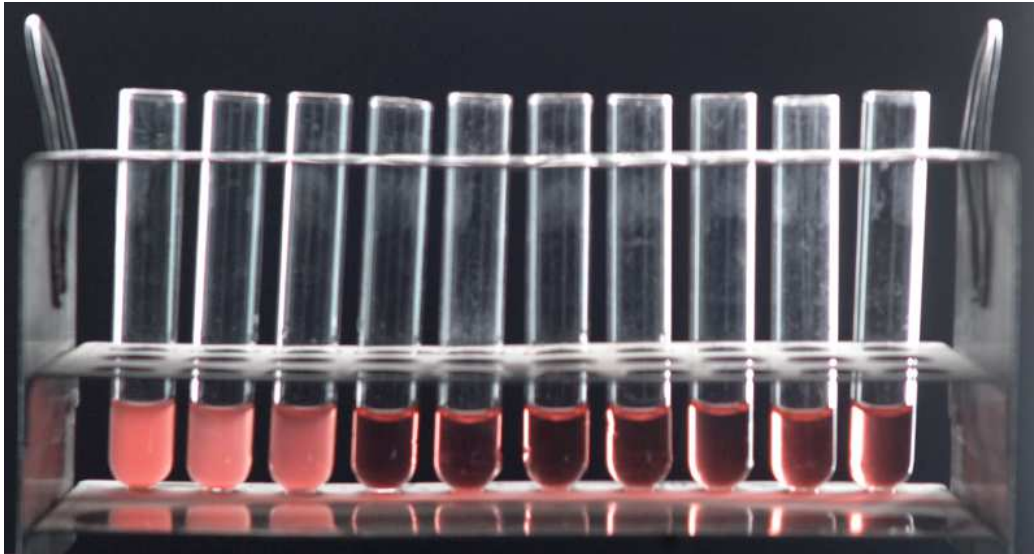
**Slika 62.** Precipitacija u gelu

## Reakcija vezivanja komplementa

Komplement je kompleksni enzimski sistem koji se nalazi u serumu životinja i ima više komponenata od kojih su najbitnije C1, C2.....C9. Njega aktivira kompleks Ag-Ab. Komplement je termolabilan i može se inaktivirati zagrijavanjem seruma na 56<sup>0</sup>C tokom 30 minuta. Aktivirani komplement ima sposobnost lize bakterija (bakterioliza) i eritrocita (hemoliza). Reakcija hemolize nastaje u epruveti kada se pomiješaju ovčiji eritrociti (Ag), Ab na eritrocite (dobijena imunizacijom kunića) i komplement. Poslije inkubiranja 30 minuta na 37<sup>0</sup>C očitava se reakcija. Ukoliko je došlo do hemolize eritrocita, suspenzija u epruveti se boji svijetlo crveno, pri čemu nestaje замуćenje koje je poticalo od suspendovanih eritrocita. U seriju dvostepenih razređenja seruma koji se ispituje i u kome je inaktivisan komplement, dodaje se virus i komplement. Nakon inkubiranja na 37<sup>0</sup>C tokom 90 minuta dodaju se senzibilisani eritrociti ovce. Ako u uzorku seruma postoje Ab na upotrijebljeni virus, doći će do formiranja kompleksa Ag-At, koji će vezati komplement. Pošto je komplement potrošen, neće doći do reakcije hemolize eritrocita.



Slika 63. Reakcija vezivanja komplementa



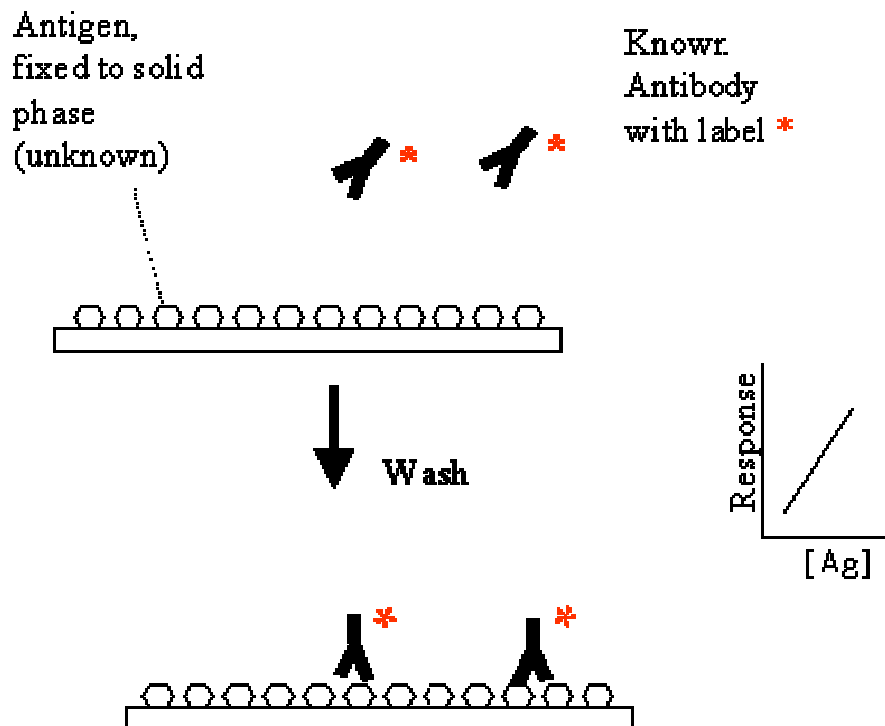
**Slika 64.** Rezultat reakcije vezivanja komplementa RVK (prve tri epruvete-hemoliza eritrocita, negativna RVK. Ostale epruvete - nema hemolize eritrocita, pozitivna RVK reakcija)

### **Testovi koji koriste obilježena antitijela**

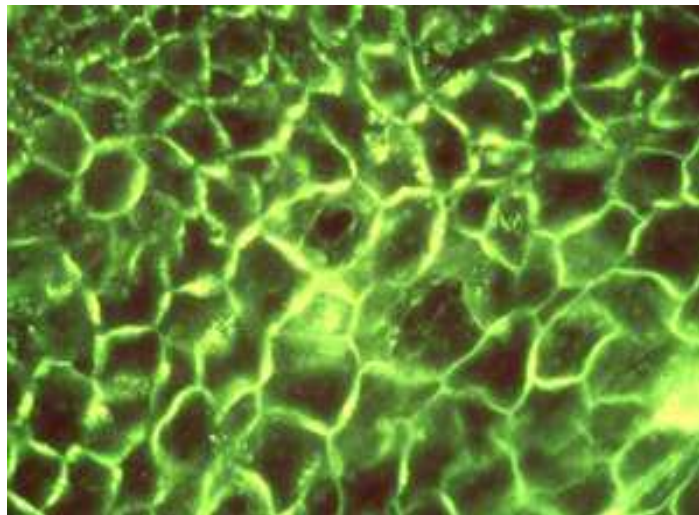
Ovi testovi su među najosjetljivijim od svih seroloških reakcija, a među njima su: **testovi fluorescentne mikroskopije**. U ovim testovima koriste se monoklona antitijela koja su obilježena fluorohromima, odnosno specijalnim bojama koje fluoresciraju kada se osvijetle ultravioletnim zracima. Testovi se izvode kao direktni, indirektni i antikomplementarni.

### **Direktna imunofluorescentna tehnika**

Podrazumijeva djelovanje obilježenih Ab na razmaz ili presjek tkiva, nakon čega se vrši ispiranje. Ako u uzorku postoji traženi antigen, obilježena antitijela će se vezati za njega i pri fluorescentnoj mikroskopiji će fluorescirati.

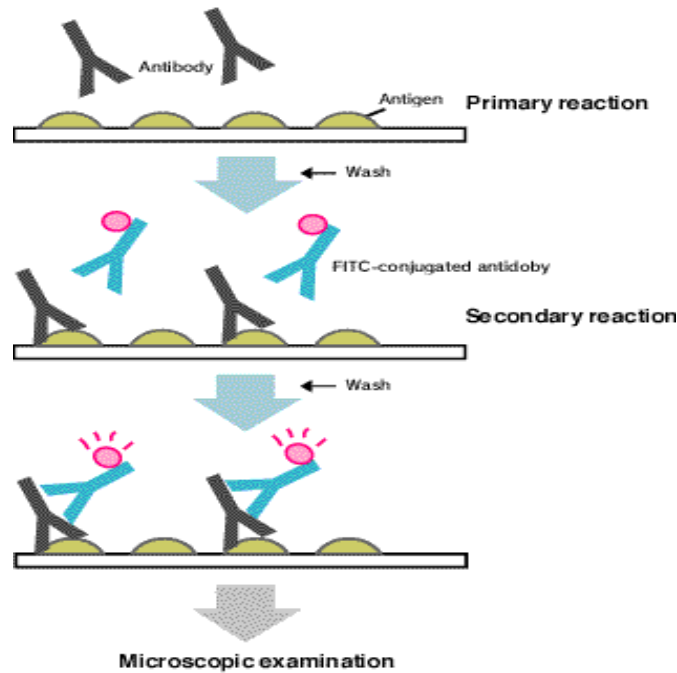


Slika 65. Test direktne imunofluorescencije



Slika 66. Preparat posmatran fluorescentnim mikroskopom - test direktne imunofluorescencije

**Indirektna tehnika je slična**, a razlika je u tome što se za Ag u uzorku vezuju neobilježena Ab, a zatim se djeluje obilježenim Ab na antitijela (koja su antigen za obilježena Ab).

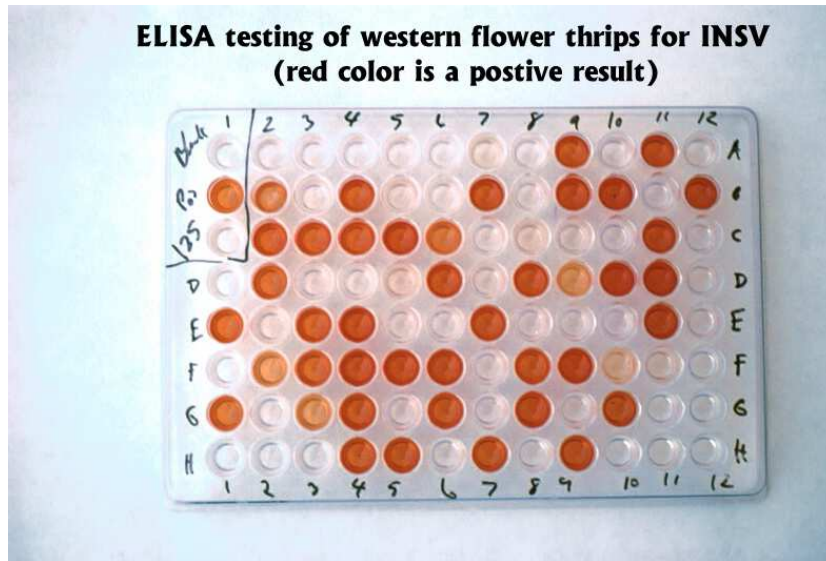


**Slika 67.** Test indirektna imunofluorescencije

**Antikomplementarna imunofluorescentna metoda** podrazumijeva vezivanje neobilježenih Ab za Ag, za koje se zatim vezuje komplement, a zatim se djeluje obilježenim Ab na komplement.

### **Imunoenzimski test - ELISA test (ELISA -Enzyme-linked Immunosorbent Assay)**

Imunoenzimski testovi zasnivaju se na reakciji Ag-Ab i reakciji između enzima koji je vezan za Ab (npr. peroksidaze) i supstrata. Pri ovoj reakciji dolazi do promjene supstrata, koji je obično bezbojan, u obojeni ili fluorescentni produkt. U ovim testovima Ag ili Ab su najčešće vezani za površinu specijalnih plastičnih ploča sa malim oknima. Test se može koristiti za dokazivanje Ag ili Ab. Za tu svrhu neophodno je vezati monoklonalna Ab za ploču, potom dodati serum koji se ispituje i ploču isprati. Ako u serumu postoje Ag, oni se vezuju sa Ab i ostaju na ploči nakon ispiranja. Zatim se djeluje Ab vezanim sa enzimom, koja se vezuju za Ag. Zatim se dodaje supstrat koji u slučaju prisustva enzima, tj. Ag, biva promijenjen u obojeni produkt.



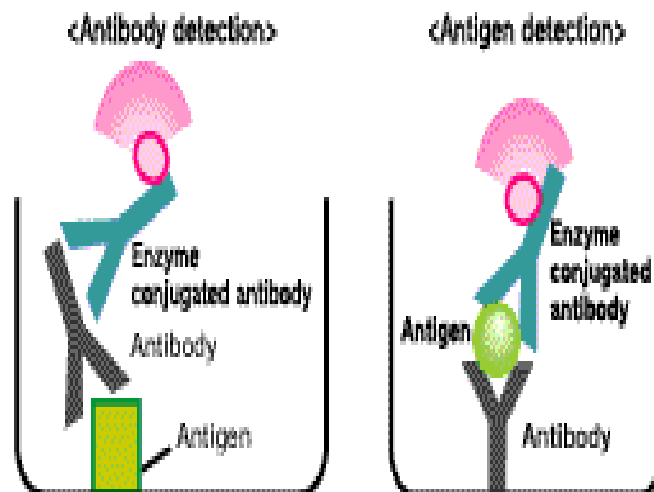
**Slika 68.** Rezultati ELISA testa - crvena boja- pozitivna reakcija



**Slika 69.** Elisa reagensi



**Slika 70.** ELISA čitač



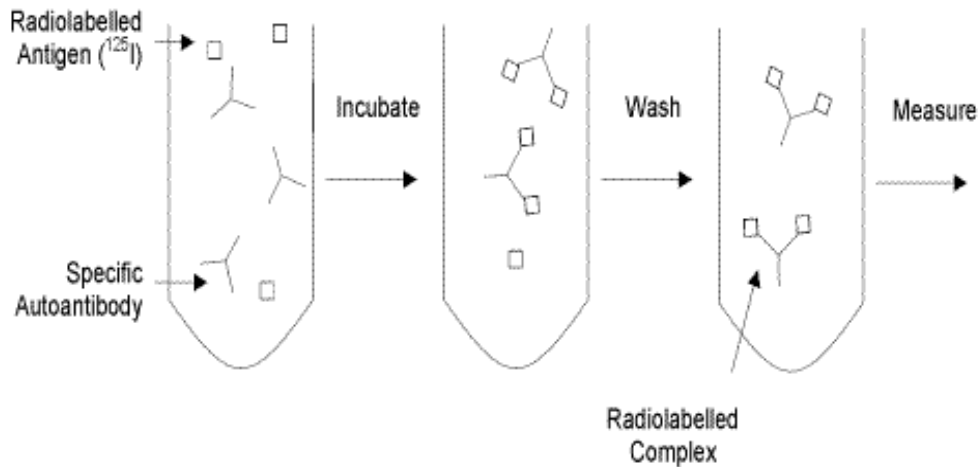
**Slika 71.** Elisa test- Enzyme-linked immunosorbent assay

Promjena boje u oknu test ploče ukazuje na pozitivnu reakciju. Za dokazivanje Ab u serumu potrebno je vezati Ag za ploču, a potom dodati serum. Nakon ispiranja djeluje se enzimom obilježenim Ab na Ab iz seruma. Zatim se dodaje supstrat koji u prisustvu Ab mijenja boju, prelazeći u produkt. Elisa metoda je osjetljivija od RVK i reakcije hemaglutinacije.

### **Radioimunološke metode (RIA)**

Ove metode podrazumijevaju upotrebu Ab koja su obilježena radioaktivnim izotopima,

najčešće J125. Samo izvođenje testa zasniva se na reakciji Ag sa radioaktivnim Ab, a prisustvo kompleksa Ag-At, poslije odvajanja od nevezanih Ab, utvrđuje se mjerenjem radioaktivnosti gama brojačem.



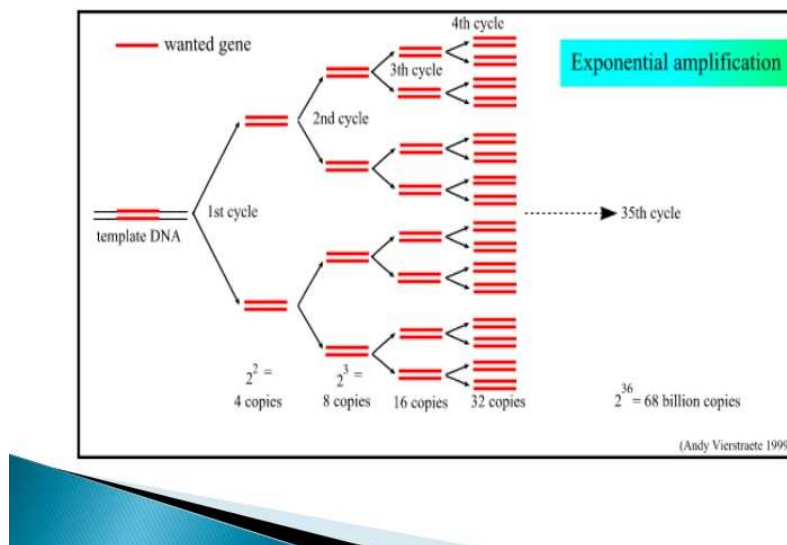
Slika 72. Radioimunološka metoda

## PCR reakcija

PCR (Polymerase Chain Reaction – lančana reakcija polimeraze DNK) je *in vitro* amplifikacija (umnožavanje, replikacija) definisane DNK sekvence. Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmera) koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i koji su međusobno suprotno orijentisani. Sinteza DNK je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom. Region koji se umnožava je određen izborom prajmera. Prajmeri su kratki lanci oligonukleotida (obično 20-30) čija sekvenca odgovara krajevima regiona od interesa. Amplifikacija se dešava tokom većeg broja ciklusa (30-40). Jedan ciklus PCR reakcije čine: faza denaturacije DNK matrice (razdvajanje dvostrukog DNK lanca), faza hibridizacije (vezivanja) prajmera i faza elongacije (produžavanja) komplementarnih lanaca DNK ciljne sekvence. Za vrijeme svakog ciklusa, u prvoj fazi PCR, dvolančana DNK – matrica se denaturiše zagrijavanjem i stvaraju se jednolančane DNK. Ovo obezbjeđuje aktivno mjesto za DNK polimerazu koja vrši sintezu komplementarnog lanca, stvarajući ponovo dvolančanu DNK. Najčešće korišćen od ovih enzima je Taq DNK polimeraza porijeklom iz bakterije *Thermus aquaticus*. Termostabilnost enzima je neophodna, jer se na početku svakog PCR ciklusa dvostruki lanac DNK denaturiše do jednolančane forme primjenom visoke temperature od 93 do 96<sup>0</sup>C u reakcionoj tubi. Nakon hlađenja, nastupa druga faza PCR ciklusa koja se sastoji u vezivanju prajmera za specifične komplementarne sekvence, sada jednolančanog, ciljnog dijela DNK molekula. Prajmeri omogućavaju DNK polimerazi da



započne sintezu novog lanca. Ovo je faza vezivanja prajmera i odvija se na temperaturi od 65 do 75<sup>0</sup>C. Treća faza ciklusa je faza produženja lanca ili elongacija pri temperaturi oko 72<sup>0</sup>C kod koje dolazi do vezivanja baza iz reakcione smješe, komplementarnih ciljnoj sekvenci. Nakon ove faze, dolazi do odvajanja prajmera i obustavljanja produžetka lanca, a kao rezultat dobijaju se dvije kopije željenog segmenta DNK. U sljedećim ciklusima prajmeri će se vezivati i za originalnu i za novosintetizovanu DNK, što rezultira u eksponencijalnom povećanju broja kopija. Broj umnoženih fragmenata u PCR-u eksponencijalno raste, jer svaki novosintetisani lanac u sljedećem ciklusu služi kao matrica za sintezu DNK. Za približno dva sata dobija se 10<sup>6</sup> do 10<sup>9</sup> kopija određenog DNK fragmenta. PCR metoda se izvodi u mikrotubi zapremine 0,2 – 0,5ml u PCR mašinama – termosajklerima. Rezultati PCR-a se detektuju na agaroznom gelu elektroforezom i bojenjem. Osnovni zahtjev koji se postavlja za prajmere je da su specifični za organizme koji su od interesa. To znači da se sekvence gena nalaze samo u ciljnom organizmu i da pod datim uslovima eksperimenta ne daju nespecifičnu reakciju. Detekcija ciljne sekvence PCR metodom može se obaviti za jedan dan, što je velika prednost u identifikaciji onih infektivnih agenasa kojima je potrebno dugo vremena za rast na odgovarajuću podlogu. PCR metodom najčešće se vrši detekcija virusa, nekih bakterija (*Mycobacterium tuberculosis*, hlamidije) i dr. Nedostatak PCR metode je nemogućnost razlikovanja DNK molekula živih i mrtvih ćelija.



**Slika 73.** Prikaz PCR reakcije

<http://image.slidesharecdn.com/pcr-120401050309-phpapp02/95/polymerase-chain-reaction-19-728.jpg?cb=1333257489>

## Vježba IX

### Mikroorganizmi buraga

#### Pitanja

1. Koju ulogu imaju mikroorganizmi buraga?
2. Kako se uzima tečnost buraga za ispitivanje?
3. Kako se priprema tečnost buraga za ispitivanje?
4. Kako se priprema mikroskopski preparat iz tečnosti buraga za posmatranje protozoa?
5. Kako se priprema mikroskopski preparat iz tečnosti buraga za posmatranje bakterija?

U buragu se formira specifična zajednica mikroorganizama. Osnovni mikroorganizmi buraga su bakterije, infuzorije i kvasci. U 1g sadržaja buraga nalazi se do  $10^{10}$  - $10^{11}$  bakterija i do  $10^6$  protozoa. Bakterijska masa buraga čini oko 10 % suvog sadržaja. Bakterije mliječne kisjeline su iz rodova:

*Lactobacillus* (*L. fermenti*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*) i *Bifidobacterium* (*B. bifidus*).

Celulolizne bakterije u buragu pripadaju rodovima:

- *Ruminococcus* (*R. flavefaciens* i *R. albus*).
- *Bacteroides* (*B. succinogenes*)
- *Butyrivibrio* (*B. fibrisolvens*)
- *Clostridium* (*C. cellobioparum*, *C. longisporum*)
- *Eubacterium* (*E. cellulosolvens*, čini oko 50% ukupnog broja celuloliznih bakterija u buragu)

Skrob i dekstrine u buragu najaktivnije razgrađuju *Bacteroides amilophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amyloplitica*, *Selenomonas dextrinosolvens*. Stvaranje metana vrše uglavnom *Methanobacterium ruminantium* i *Methanobacterium mobilis*. Oni vrše redukciju CO<sub>2</sub> do metana. Stvaranje metana u buragu je nepoželjna pojava, jer se 8-10 % ukupne energije hrane troši na stvaranje metana.

Gotovo sve bakterije buraga imaju proteoliznu aktivnost, a najaktivnije su:

- *Butyrivibrio* spp.,
- *Succinivibrio* spp.,
- *Selenomonas ruminantium*,
- *Borrelia* spp i
- *Bacteroides* spp.

U buragu se populacije mikroorganizama ili pričvršćuju - lijepe za zid buraga, ili čvrsto fiksiraju na čvrstim česticama hrane, stvarajući sa njima strukturno jedinstvo, ili slobodno plivaju u tečnosti.



**Slika 74.** Papile rumena

Poznato je oko 50 vrsta protozoa koje žive u buragu. Između populacije mikroorganizama u buragu i organizma životinje postoji tijesan simbiotski odnos. Mikroorganizmi buraga imaju važnu ulogu u metabolizmu bjelančevina, ugljenih hidrata i masti kod preživara. Celuloza (osnovna komponenta grubih krmiva) se usvaja zahvaljujući aktivnosti celuloliznih bakterija koje žive u buragu. Svoje energetske potrebe preživari zadovoljavaju uglavnom na račun isparljivih masnih kisjelina, koje se stvaraju u toku fermentacije u buragu. Potrebe za ugljenim hidratima djelimično zadovoljavaju polisaharidima iz ćelija bakterija i protozoa. Veći dio biljnih bjelančevina se hidrolizuje pod uticajem mikrobnih enzima. Aminokisjeline nastale u tom procesu se dezaminiraju. Mikrobiološke bjelančevine su vrednije od biljnih, jer sadrže sve esencijalne aminokisjeline. Potrebe za vitaminima grupe B i K preživari zadovoljavaju na račun mikroorganizama. Kod mladunčadi ovi vitamini se sintetizuju u mjeri formiranja mikrobne zajednice buraga. Mikroorganizmi buraga učestvuju u lipidnoj razmjeni, redukuju sulfate i nitrate. Karbamid, koji se koristi kao dodatak stočnoj hrani, usvajaju mnoge vrste bakterija buraga, sintetizujući iz njega bjelančevine visoke biološke vrijednosti, koje na kraju usvajaju životinje.

### **Ispitivanje mikroorganizama koji se nalaze u tečnosti buraga**

#### **Uzimanje tečnosti buraga**

Tečnost buraga se može uzimati sondom. U laboratoriji se tečnost filtrira kroz sito (prečnik oko 0,4mm) i filtratu dodaje 4-5%-ni formaldehid u odnosu 1:1.

#### **Priprema preparata**

Na čisto predmetno staklo nanose se 1-3 eze tečnosti buraga, jedna eza rastvora lugola i prekriva pokrovnim staklom. U početku se preparat posmatra malim uveličanjem objektiva pri djelimično zatvorenom kondenzoru. Na preparatu se traže ćelije protozoa. Mnogo ih je i dosta su krupne (približno 10 $\mu$ m u prečniku). Pod tim uveličanjem, bakterije se ne vide. Za posmatranje bakterija priprema se fiksirani i obojeni preparat, uz

primjenu imerzionog objektiva. Na preparatu se mogu upoređivati veličine bakterija i protozoa. Može se utvrditi broj protozoa i bakterija, tako što će se izbrojati ovi mikroorganizmi na 10-15 vidnih polja. Rezultati treba da pokažu da su bakterije mnogo puta brojnije u odnosu na protozoe.

## Vježba X

### Mikroorganizmi silaže

#### Pitanja

1. Koji je biohemijski proces u osnovi proizvodnje silaže?
2. Kako se uzorkuje silaža za laboratorijsko ispitivanje?
3. Kako se priprema mikroskopski preparat iz uzorka silaže?
4. Kako se određuje ukupna kiselost silaže?
5. Kako se određuje pH silaže?

Osnovu siliranja čini mliječnokisjela fermentacija. Bakterije mliječne kisjeline koje žive na biljkama imaju značajnu ulogu u siliranju stočne hrane. One fermentišu šećere siliranih biljaka u mliječnu kisjelinu, koja suzbija razvoj nepoželjnih bakterija - koje kvare stočnu hranu. Bakterije mliječne kisjeline snižavaju pH stočne hrane na 4,2-4,0. Ako se kiselost silaže iz nekog razloga snizi (pH bude viši od 4,5-4,7), stvaraju se uslovi pogodni za život nepoželjnih mikroorganizama koji kvare stočnu hranu. Da bi se osigurao optimalan razvoj bakterija mliječne kisjeline u procesu siliranja, potrebno je da silažne biljke sadrže dovoljnu količinu šećera i da se stvore anaerobni uslovi. Sniženje pH ne zavisi samo od količine mliječne kisjeline, već i od puferske sposobnosti biljne mase. Što je ta sposobnost veća, to je potrebno više kisjeline za snižavanje pH silaže. Puferska sposobnost biljnog materijala se određuje titracijom izmacerirane biljne mase 0,1M rastvorom mliječne kisjeline. Određuje se koja je količina mliječne kisjeline potrebna za sniženje pH do 4,0. U dobroj silaži se često u manjem broju nalaze i kvasci. Oni stvaraju estre koji silaži daju prijatan miris i obogaćuju stočnu hranu bjelančevinama i vitaminima. Međutim, kvasci u većem broju slabe kvalitet silaže, snižavajući njenu kiselost.

#### Proučavanje mikroorganizama silaže

##### Uzimanje uzorka silaže

Prosječni uzorak silaže se uzima iz čelnog dijela rova, jame ili nadzemne kamare. Pri tome se sterilnim nožem skida površinski sloj silaže, isjecaju kockice po srednjoj liniji kamare u razmacima od 1m. Kockice se stavljaju u staklene posude zapremine 1-2dm<sup>3</sup> sa šlifovanim zapušačem, tako da silaža bude složena gusto i do vrha. Uzorci se miješaju, sitne sterilnim makazama i uzimaju uzorci za analize. Ispitivanje treba izvršiti najkasnije jedan dan po uzimanju uzoraka.

##### Priprema mikroskopskih preparata

Radi posmatranja mikroorganizama silaže, pincetom se uzme silaža, bez dodavanja vode, njom se pritisne predmetno staklo, kako bi ostao otisak. Preparat se suši na vazduhu,

fiksira na plamenu i boji metilenskim plavim (2-3minuta). Višak boje se ispira vodom, preparat osuši filter papirom, na njega nanese kedrovo ulje i posmatra imerzijom. Na preparatu obično dominiraju *Lactobacillus plantarum* - homofermentativni mezofilni kratki štapići, koji se često raspoređuju u paralelne redove i mlačnokisele streptokoke. Ponekad se mogu naći ćelije kvasaca sa pupoljcima. U silaži slabog kvaliteta nalaze se bacili i plijesni.

Za izolaciju bakterija mliječne kisjeline iz silaže koriste se šira - agar sa CaCO<sub>3</sub> ili kupusni agar sa CaCO<sub>3</sub>. Usljed nakupljanja mliječne kisjeline, oko kolonija bakterija mliječne kisjeline stvaraju se zone razlaganja CaCO<sub>3</sub>. Ukupna kisjelost silaže se određuje titracijom ekstrakta silaže u destilovanoj vodi sa 0,1M rastvorom NaOH u prisustvu fenolftaleina do pojave blijedoružičaste boje.

### **Određivanje pH u silaži**

U epruvetu staviti malo silaže i doliti malo destilovane vode, da bi se silaža prekrila. Sadržaj dobro izmiješati štapićem i pH odrediti pomoću indikatora. U porcelansku šolju pipetom unijeti 2ml ekstrakta silaže i dodati 2 kapi indikatora (smjesa istih količina bromtimol-plavog i metil-crvenog). Upoređujući boju u šolji sa podacima datim u tabeli, odrediti koncentraciju vodonikovih jona prema podacima u sledećoj tabeli:

Boja indikatora	pH
zeleno-plava	7,2-7,6
zelena	6,4-7,2
zuto-zelena	6,1-6,4
zuta	5,2-6,1
naranzasta	4,6-5,2
Crveno-narandzasta	4,2-4,6
Crvena	4,2 i niže

## Vježba XI

### Mliječno-kisjela fermentacija

#### Pitanja

1. Koju ulogu imaju bakterije mliječno-kisjele fermentacije u proizvodnji silaže, mliječno-kisjelih proizvoda, kisjeljenju povrća?
2. Kako se priprema mikroskopski preparat iz ukisjeljenog mlijeka za posmatranje bakterija mliječne kisjeline?
3. Koje se bakterije mliječne kisjeline najčešće uočavaju na preparatu napravljenom iz ukisjeljenog mlijeka i nacrtajte ih?

Mlečnokisela fermentacija predstavlja osnovu proizvodnje silaže, kisjeljenja povrća, dobijanja mlečnokiselih proizvoda, sira, maslaca i dr. Bakterije mliječne kisjeline se nalaze na površini biljaka, u mlijeku, na prehrambenim proizvodima, u crijevu životinja i čovjeka. Ove bakterije imaju mnogo zajedničkih svojstava: sintetišu mliječnu kisjelinu, boje se gram pozitivno, obično ne stvaraju spore, nepokretne su, neophodni su im izvori azota i faktori rasta, što znači da mnoge ne rastu na jednostavnim podlogama.

#### Bakterije mliječne kisjeline mogu biti:

- Homofermentativne, što znači da metabolišu šećer do mliječne kisjeline i
- Heterofermentativne, koje uporedo sa mliječnom kisjelinom stvaraju i druge proizvode kao što su sirćetna kisjelina, etanol, glicerol, diacetil, acetilmetilkarbinol i dr.

Većina bakterija mliječne kisjeline raste na temperaturama između 10 do 42<sup>0</sup>C, sa optimumom između 25-30<sup>0</sup>C. Bakterije mliječne kisjeline su anaerobi ili mikroaerofili. Kokoidni oblici pripadaju rodovima: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Štapićasti oblici pripadaju rodovima: *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*.

Pri izučavanju mliječnokisjele fermentacije najbolje je koristiti mlijeko kao hranljivu podlogu. U njemu se nalaze svi potrebni hranljivi elementi za razvoj bakterija mliječne kisjeline. Nakon inkubacije svježeg mlijeka na 30<sup>0</sup>C 10-12h, dolazi do njegovog ukišeljavanja i stvaranja glatkog čvrstog gruša. Gruš nastaje tako što mliječna kisjelina reaguje sa kalcijum kazeinatom, pri čemu se taloži kazein.

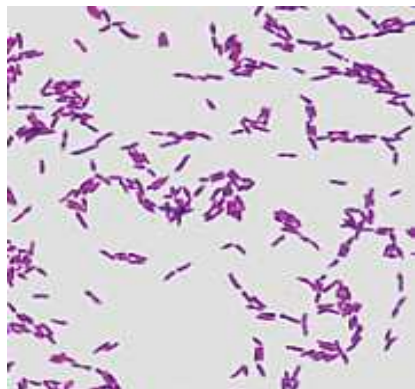
#### Mikroskopsko ispitivanje bakterija mliječne kisjeline

Za mikroskopsko proučavanje bakterija mliječne kisjeline priprema se preparat iz ukišelnog mlijeka. Bakteriološka petlja (eza) se unosi u gruš i obrtanjem oko ose izvlači. Gruš razmazati na predmetnom staklu u tankom sloju bez dodavanja vode. Preparat osušiti na vazduhu ili u blizini plamenika. Smješom etanola i etra (u odnosu 1:1) izvršiti fiksiranje preparata. U toku ovakve fiksacije bakterije uginu, vezujući se za staklo, a uporedo s tim, etrom se izvlači i uklanja mast. To je neophodno zato što kapljice

masti na preparatu ometaju bojenje i mikroskopiranje. Fiksirani preparat obojiti metilenskim plavim u trajanju 2-3 minuta, isprati vodom, osušiti i posmatrati uz pomoć imerzije. Metilensko plavo je veoma dobra boja za bakterije mliječne kisjeline u mlijeku, jer on slabo boji kazein, a dobro boji ćelije. Tako se dobijaju jasni preparati. Na preparatu dominiraju sitne okrugle ćelije *Lactococcus lactis*, povezane u kratke lance. Ova bakterija je izazivač prirodnog kišljenja mlijeka. Često se na preparatu zapažaju tanki štapići roda *Lactobacillus* različite veličine. Često se nalazi *Lactobacillus bulgaricus* izazivač prirodnog kišljenja mlijeka u južnim geografskim širinama. Optimalna temperatura za rast ove vrste bakterija je 40<sup>0</sup>C. Kada se na površini ukišljenog mlijeka nađe navlaka koju stvara mlečna plijesan *Geotrichum candidum* (*Oidium lactis*), u razmazu se uočavaju i micelarne niti i četvorougone okrugle ćelije (oidije).



**Slika 75.** *Streptococcus thermophilus*(koke) i *Lactobacillus bulgaricus* (štapići)



**Slika 76.** *Lactobacillus acidophilus*



## Vježba XII

### Mikrobiološko ispitivanje stočne hrane

#### Pitanja

1. Zašto je potrebno vršiti mikrobiološka ispitivanja stočne hrane?
2. Koji mikroorganizmi se prema važećim zakonskim propisima ne smiju naći u 50g stočne hrane?
3. Kako se vrši ispitivanje stočne hrane na prisustvo salmonela?
4. Kako se ispituje ukupan broj aerobnih mezofilnih mikroorganizama u stočnoj hrani?

Subjekat u poslovanju hranom za životinje dužan je da obezbijedi usaglašenost hrane za životinje sa posebnim mikrobiološkim kriterijumima za hranu za životinje i preduzima mjere i primjenjuje postupke kojima se garantuje bezbjednost hrane za životinje. Na tržište se može stavljati samo hrana za životinje koja je bezbjedna i koja nema negativan uticaj na životnu sredinu ili dobrobit životinja. Često su krmne smješe kontaminirane mikroorganizmima koji izazivaju bolesti životinja, a samim tim predstavljaju i opasnost po zdravlje ljudi. Nije rijetka pojava obolijevanja ljudi od salmoneloze kao posljedice korišćenja mesa živine ili jaja kontaminiranih salmonelom iz stočne hrane. Stočna hrana i sirovine koje služe za proizvodnju krmnih smješa, prema *Pravilniku o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani (Službeni list SFRJ broj 2/90)*, može najviše da sadrži:

Stočna hrana	Broj bakterija/g	Broj kvasaca/g
Krmne smješe za odrasle životinje	100.000.000	300.000
Krmne smješe za mlade životinje	10.000.000	50.000
Hraniva animalnog porijekla	50.000.000	10.000
Hraniva biljnog porijekla	100.000.000	300.000

Prema članu 9 ovog pravilnika broj patogenih mikroorganizama u stočnoj hrani može biti:

Stočna hrana	Patogeni mikroorganizmi	Broj mikroorganizama
Hraniva i krmne smješe	Sulfitoredujuće klostridije	1000/g
Hraniva i krmne smješe	Salmonele	0/50g
Hraniva i krmne smješe		0/50g

Stočna hrana takođe ne smije sadržati toksine toksigenih bakterija u 1g (*Clostridium botulinum*, *Clostridium perfringens* i *Staphylococcus aureus*, član 10 Pravilnika). Ovim

pravilnikom takođe su propisane maksimalno dozvoljene količine toksina toksigenih plijesni u stočnoj hrani (aflatoksin, zearalenon, ohratoksin, trihoteceni, član 11 Pravilnika). Maksimalne količine ostataka pesticida, zatim količine neorganskih materija, prirodnih organskih otrova, otrovnih biljaka i dr. koje se smiju naći u stočnoj hrani takođe su propisane ovim pravilnikom.

### **Uzimanje uzoraka stočne hrane za mikrobiološko ispitivanje**

Najmanja količina uzorka stočne hrane koji se šalje na mikrobiološko ispitivanje treba da iznosi 500g, odnosno 1000g ako se sumnja da je hrana izazvala oboljenje.

### **Pakovanje uzoraka stočne hrane**

Uzorke staviti u sterilne, zatvorene staklene posude ili u sterilne plastične kese. Uzorke označiti kartonskim privescima, sa podacima, kao što su:

- naziv i ukupna količina hrane za stoku,
- datum proizvodnje
- proizvođač
- vlasnik
- svrha ispitivanja itd.

Kod sumnje da je hrana izazvala oboljenje dati još i anamnestičke i druge podatke o oboljeloj životinji.

### **Slanje uzoraka stočne hrane**

Uzorke hrane za stoku poslati u laboratoriju po kuriru.

### **Utvrđivanje broja aerobnih mezofilnih bakterija**

Uzorak stočne hrane se dobro izmiješa, odvoji 10g u sterilnu erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima. Pripremiti osnovno razređenje  $10^{-1}$  sa 90ml sterilnog fiziološkog rastvora. Osnovno razređenje homogenizirati 10 minuta ručno ili mašinski. Od osnovnog razređenja pripremiti decimalna razređenja do  $10^{-5}$  ili više, uzimajući 1ml razređenja i 9ml fiziološkog rastvora. Za svako razređenje uzeti sterilnu petrijevu ploču i zaliti otopljenim i na  $45^{\circ}\text{C}$  ohlađenim tripton glukoza agarom. Sadržaj zasijanih petrijevih ploča promiješati sa 20 kružnih i 20 unakrsnih pokreta, a zatim ploče ostaviti da podloga očvrсне. Zasijane podloge inkubirati 48h na  $37^{\circ}\text{C}$ . Nakon inkubiranja, aparatom za brojanje s lupom izbrojati kolonije na pločama u kojima je izraslo 30-300 kolonija.

Dobijeni broj pomnožiti sa decimalnim razređenjem i izraziti ga kao **ukupan broj aerobnih mezofilnih bakterija u 1g uzorka**.

### **Utvrđivanje koliformnih bakterija**

Prisutnost i broj koliformnih bakterija u uzorku se utvrđuje zasijavanjem po 1ml osnovnog razređenja  $10^{-1}$  i sledećih decimalnih razređenja u epruvetama s brilijant

zelenim laktoza žučnim bujonom. Zasiјane podloge u koje su umetnute durhamove cjevčice inkubirati 48h na 37<sup>0</sup>C. Stvaranje gasa više od 1/3 durhamove cjevčice izražavamo kao titar koji pokazuje broj koliformnih bakterija u uzorku.

Izolovanje i identifikacija koliformnih bakterija obavlja se presijavanjem sadržaja epruveta u kojima je stvoren gas ezom, na brilijant zeleni agar. Izolovane kolonije se presijavaju na trostruki šećer i dalje determinišu biohemijskim nizom (IMVC: indol-metilredvogesproskauer-citrat) i na osnovu drugih svojstava.

### **Utvrđivanje sulfitoredukujućih klostridija**

Po 1ml osnovnog razređenja 10<sup>-1</sup> i sledećih decimalnih razređenja stavi se pipetom u 2 epruvete veličine 16x160mm. Jedna epruveta se zagrijava u vodenom kupatilu 10min na 80<sup>0</sup>C, a zatim se u obadvije nalije otopljeni i na 45<sup>0</sup>C ohlađeni sulfitni agar. Stub nalivene podloge ne smije biti niži od 140mm. Sadržaj epruvete promiješati blagim okretanjem među dlanovima, zatim brzo ohladiti pod mlazom vode i inkubirati 48h na 37<sup>0</sup>C. Karakteristične crne kolonije izrasle u anaerobnim uslovima se pregledaju mikroskopski. Za dokazivanje anaerobioze, crne kolonije sa dna epruvete se prenesu na krvni agar i inkubiraju 24h na 37<sup>0</sup>C.

### **Utvrđivanje salmonela**

U sterilnu erlenmajerovu tikvicu se stavi 50g uzorka i prelije sa 250ml tetracionat ili selenit bujona. Bujon mućkati ručno ili mašinski 10 minuta, a zatim inkubirati 18-24h na 37<sup>0</sup>C. Dobijenu bujonsku kulturu dobro promućkati i po 1 ezu bujonske kulture razmazati po površini dviju čvrstih podloga za salmonele: SS (salmonela-šigela agar) i bizmut sulfitni agar. Podloge inkubirati 24h na 37<sup>0</sup>C. Nakon inkubiranja, po nekoliko kolonija sumnjivih na salmonele presijati na trostruki šećer i inkubirati 24h na 37<sup>0</sup>C. Kulture koje i na trostrukom šećeru rastu poput salmonela se dalje biohemijski i serološki determinišu.

### **Postupak sa uzorcima stočne hrane nakon ispitivanja**

U laboratoriji se sa uzorkom hrane preduzimaju uobičajene mjere opreza. Nakon završenog rada očistiti i dezinfikovati radne površine. Uzorke hrane čuvati na suvom mjestu i sobnoj temperaturi u plastičnim kesama ili kartonskim kutijama u periodu od 3 mjeseca od momenta prihvatanja uzorka u laboratoriju. Nakon tog perioda se sterilišu u autoklavu.

## Mikrobiološko ispitivanje namirnica animalnog porijekla

### Pitanja

1. Koje vrste namirnica ubrajamo u namirnice animalnog porijekla?
2. Koja su mikrobiološka ispitivanja obavezna za namirnice animalnog porijekla (prema našim zakonskim propisima)?
3. Kako se tumače rezultati mikrobioloških ispitivanja prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima i Vodiču za mikrobiološke kriterijume?

Namirnice animalnog porijekla su: meso i proizvodi od mesa, mlijeko i proizvodi od mlijeka, jaja i proizvodi od jaja, riba, druge vodene životinje i proizvodi od njih, med i drugi pčelinji proizvodi. Zakonom o bezbjednosti hrane je definisano da je subjekat u poslovanju hranom ili hranom za životinje, odgovoran za bezbjednost hrane ili hrane za životinje u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije. Subjekti koji proizvode hranu su dužni da uspostave sistem analize opasnosti i kritičnih kontrolnih tačaka (engl. Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP), koji omogućuje prepoznavanje mikrobioloških, hemijskih i fizičkih činilaca koji mogu biti štetni za zdravlje ljudi.

Mikrobiološki kriterijumi o dozvoljenim vrstama i broju mikroorganizama, bakterijskih toksina i histamina u hrani opasnih po zdravlje i mikrobiološki kriterijumi za higijenu procesa proizvodnje, metode određivanja i procjenu, propisani su **Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane ("Sl. List CG", br. 53/2012)**. U objektima za klanje životinja ili u objektima u kojima se proizvodi mljeveno meso, mesne preradevine, mehanički odvojeno meso ili svježe meso uzimaju se uzorci za mikrobiološka ispitivanja **najmanje jednom nedjeljno**. Pored uzorkovanja hrane, Pravilnikom je propisano da proizvođač hrane mora obavezno da uzima uzorke s proizvodnih površina i opreme (briseve) u objektima u kojima se proizvodi gotova hrana koja pogoduje rastu i razvoju bakterija *L. monocytogenes*.

### Uzimanje uzoraka za mikrobiološko ispitivanje

Pri uzorkovanju se moraju uvažavati načela dobre higijenske prakse. Obavezna je higijena ruku, pranje i dezinfekcija, nošenje radne odjeće. Pribor i posude za uzorkovanje moraju biti sterilne. Uzorak mora biti reprezentativan u odnosu na seriju hrane od koje se uzima. Prilikom uzorkovanja, uzorkovač mora uzeti broj elementarnih jedinica uzorka koji je propisan Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu. Osim uzetog broja jedinica potrebno je voditi računa i o količini uzetog uzorka, odnosno količini jedne elementarne jedinice. Preporučena minimalna količina uzorka (jedna elementarna jedinica uzorka) za mikrobiološko ispitivanje je **250g ili ml** ili jedinično pakovanje.

### Čuvanje i transport uzorka

U postupcima uzorkovanja se mora definisati vrijeme od trenutka uzimanja uzoraka, dolaska u laboratoriju, vrijeme do početka ispitivanja (koje bi po pravilu trebalo da bude do 6 h, a ne bi smjelo biti duže od 24 h) i uslovi čuvanja (temperatura, izlaganje sunčevoj svjetlosti i dr.). Vrijeme od trenutka uzimanja uzoraka do početka ispitivanja za

različitu hranu je navedeno u normi standarda MEST EN ISO 7218. Uzimanje uzoraka se vrši u skladu sa normama standarda MEST EN ISO 17604 i MEST EN ISO 7218.

- Uzorci moraju da budu dostavljeni u laboratoriju u što kraćem vremenu od trenutka uzimanja uzoraka.
- Uzorak hrane za koju je temperatura čuvanja definisana, mora se čuvati na toj temperaturi.
- Uzorak se mora transportovati u temperaturnim uslovima koji ne dovode do mikrobioloških promjena uzorka.
- Ohlađene uzorke treba čuvati i transportovati pri određenoj temperaturi (ne zamrzavati), usklađenoj sa preporučenom temperaturom, koja je navedena u originalnoj ambalaži hrane.
- Zamrznute uzorke čuvati i transportovati pri temperaturi i uslovima koji sprječavaju otapanje.

### **Ispitivanje uzorka**

Laboratorije ovlašćene za mikrobiološka ispitivanja hrane za potrebe inspeksijskog nadzora, moraju da budu akreditovane u skladu sa standardom MEST ISO/IEC 17025 - "Opšti zahtjevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje" i moraju da rade ispitivanja akreditovanim metodama.

### **Interpretacija rezultata mikrobioloških ispitivanja**

U skladu sa mikrobiološkim kriterijumima, postoje dva načina tumačenja rezultata sprovedenih mikrobioloških ispitivanja uzoraka hrane. Prvi način je kada je u mikrobiološkom kriterijumu data **jedna granična vrijednost** ( $m=M$ ) pa će rezultati ispitivanja biti **zadovoljavajući** ili **nezadovoljavajući**. Ovakva granična vrijednost i interpretacija rezultata uglavnom se primjenjuje za Kriterijume bezbjednosti hrane.

Primjer uzet iz Pravilnika:

	Kategorija hrane	Mikroorganizam	Plan uzimanja uzoraka		Gran. vrijednosti		Ispitna ref. metoda	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje
			n	c	m	M		
1.9	Mesni proizvodi od živinskog mesa, namijenjeni za konzumiranje poslije kuvanja	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne smije biti u 25g  m=M	MEST EN ISO 6579	Proizvodi U prometu tokom njegovog roka upotrebe	

*(Značenje oznaka u tabelama Pravilnika:*

*n= broj elementarnih jedinica uzorka koji čine uzorak,*

*c= broj jedinica uzorka, u kojima se dobijene vrijednosti ispitivanja mogu nalaziti između "m" i "M", pri čemu se uzorak smatra prihvatljivim, ukoliko je dobijena vrijednost ispitivanja u ostalim jedinicama uzorka jednaka "m" ili manja od "m"*

*m= granična vrijednost ispod koje se svi rezultati smatraju zadovoljavajućim*

*M= granična dopuštena vrijednost iznad koje se rezultati smatraju nezadovoljavajućim.*

*Ukoliko samo jedan rezultat prelazi tu vrijednost, uzorak je nezadovoljavajući.*

*n.n.= nije nađeno)*

U ovom slučaju rezultati sprovedenih mikrobioloških ispitivanja interpretiraju se na sljedeći način:

**Zadovoljavajući:** Ako svih 5 (n) uzoraka pokaže odsustvo *Salmonella* u 25g;

**Nezadovoljavajuće:** Ako je ustanovljena *Salmonella* u 25g u bilo kojoj elementarnoj jedinici uzorka.

Drugi način je kada su u mikrobiološkom kriterijumu date dvije granične vrijednosti (**m i M**) pa se dobijeni rezultati ispitivanja mogu interpretirati kao **zadovoljavajući, prihvatljivi ili nezadovoljavajući**. Dvije granične vrijednosti i tri moguće interpretacije rezultata uobičajene su za Kriterijume higijene u procesu proizvodnje.

Primjer uzet iz Pravilnika:

	Kategorija hrane	Mikroorganizam	Plan uzimanja uzoraka		Gran. vrijednosti		Ispitna ref. metoda	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
			n	c	m	M			
2.1.8.	Mesne preradevine	<i>E. coli</i>	5	2	500 cfu/g ili cm <sup>2</sup>	5000 cfu/g ili cm <sup>2</sup>	MEST EN ISO 16649-1 ili MEST ISO 16649-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje, izbora i/ili porijekla sirovina

U ovom slučaju rezultati sprovedenih mikrobioloških ispitivanja interpretiraju se na sljedeći način:

**Zadovoljavajuće:** Ako su sve ustanovljene vrijednosti manje od 500 cfu/g ili cm<sup>2</sup> (<m).

**Prihvatljivo:** Ako su maksimalno 2 (c) od 5 (n) dobijenih vrijednosti između 500 i 5000 cfu/g ili cm<sup>2</sup> (između m i M), a ostale dobijene vrijednosti manje ili jednake 500cfu/g (≤m).

**Nezadovoljavajuće:** Ako je jedna ili više vrijednosti veća od 5000 cfu/g ili cm<sup>2</sup> (>M), ili ako je više od 2 (c) od ispitivanih 5 (n) vrijednosti između 500 i 5000 cfu/g ili cm<sup>2</sup> (između m i M).

Primjeri mikrobioloških kriterijuma za neke namirnice prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane

**1. MESO I MESNE PRERAĐEVINE**

**1.1. Sirovo meso i meso živine, proizvodi od sirovog mesa i mesa živine, svježe i smrznuto**

	Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriterijumi
			n	c	
<b>1.1.1.</b>	Sirovo meso trupova, polovina i četvrtina (najmanje jedan cm ispod površine)	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25g
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 g
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	n.n. u 1g
		Sulfitoredukujuće klostridije	5	0	n.n. u 1g
		Koagulaza pozitivni stafilocoki / <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	n.n. u 1g
		Aerobne mezofilne bakterije	5	2	m=103cfu/g M=10 <sup>4</sup> cfu/g

**3. Mlijeko i mliječni proizvodi**

**3.1. Mlijeko i mliječni napici**

	Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriterijumi
			n	c	
<b>3.1.1.</b>	Pasterizovano mlijeko i mliječni napici	<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25ml
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 ml
		Koagulaza pozitivni stafilocoki / <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	M = 10cfu/ml
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	m < 1cfu/1ml M=10cfu/ml
		Aerobne mezofilne bakterije	5	1	m=10 <sup>3</sup> cfu/g M=10 <sup>4</sup> cfu/g



## NORMATIVI MIKROBIOLOŠKE ČISTOĆE ZA PREDMETE, POVRŠINE I RUKE KOJI DOLAZE U DODIR S HRANOM

Normativi mikrobiološke čistoće za predmete, površine i ruke koji dolaze u dodir s hranom određuju se u skladu s normom ISO 18593- Mikrobiologija hrane i hrane za životinje - Horizontalne metode za postupke uzorkovanja s površina upotrebom kontaktnih ploča i briseva:

PREDMETI, POVRŠINE, RUKE	Aerobne mezofilne bakterije		<i>Enterobacteriaceae</i>	
	odgovara	ne odgovara	odgovara	ne odgovara
Porculanske, staklene, glatko metalne površine cfu*/cm <sup>2</sup>	≤10 (≤1)	>10 (>1)	0-1	< 1
Ostale površine (drvene, plastične, kamene i sl.) cfu*/cm <sup>2</sup>	≤10 (≤1)	>10 (>1)	0-1	>1
Tanjiri, zdjelice, pribor za jelo i manje posune cfu*/ml ili cm <sup>2</sup>	≤100 (≤1)	>100 (>1)	0-1	>1
Boce ili ambalaža za tečnosti cfu*/ml	0-1	≥1	0-1	>1
Ruke lica u dodiru s hranom cfu*/ml ili cm <sup>2</sup>	≤200 (≤2)	>200 (>2)	0-1	>1

\* cfu – broj kolonija bakterija

Ispitivana površina za detekciju specifičnih (npr. *Listeria monocytogenes* ili *Salmonella* spp.) i drugih patogenih mikroorganizama, mora iznositi 100 cm<sup>2</sup> do 1000 cm<sup>2</sup>. Kontaktne i otisne pločice ne mogu se koristiti za detekciju patogena. U slučaju vidljivih nečistoća potrebno je provesti čišćenje i dezinfekciju prije mikrobiološke evaluacije. Vrijednosti navedene u zagradama odnose se na otisak. Normativi u tablici obavezni su za objekte pod nadzorom sanitarne inspekcije.

**Vrijednosti mikrobioloških parametara hrane koja nije bezbjedna prema Zakonu  
o bezbjednosti hrane Crne Gore**

PARAMETAR/TOKSIN	Potencijalan rizik u pogledu prisutnosti/broja bakterija	Potencijalan rizik u pogledu toksina
<i>Salmonella</i>	pozitivno u 25g uzorka	
<i>Listeria monocytogenes</i>	$> 10^2$ cfu/g	
<i>Bacillus cereus</i>	$> 10^5$ cfu/g, ml	
<i>Bacillus cereus</i>	$> 10^3$ cfu/g, ml	Potvrđena sposobnost stvaranja dijarealnog ili emetičkog toksina pri izoliranoj skupini
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	$> 10^3$ cfu/g	
<i>Campylobacter spp.</i>	pozitivno u 25g uzorka	
Koagulaza pozitivni stafilokoki <i>Staphylococcus aureus</i>	$> 10^4$ cfu/g, ml	Potvrđena sposobnost stvaranja stafilokoknog enterotoksina
Stafilokokni enterotoksini	pozitivno u uzorku	Potvrđena prisutnost stafilokoknog enterotoksina u uzorku hrane
<i>Yersinia enterocolitica</i>	pozitivno u 25g uzorka	
<i>Clostridium perfringens</i>	$> 10^4$ cfu/g, ml	
<i>Clostridium botulinum</i>	pozitivno u 1g uzorka	Potvrđena sposobnost stvaranja toksina pri izolovanoj skupini
<i>E.coli (VTEC)</i>	pozitivno u 25g uzorka	Potvrđena sposobnost stvaranja verotoksina pri izoliranoj skupini

Za mikrobiološka ispitivanja hrane primjenjuju se sljedeće ISO metode:

Mikroorganizam	Metoda
<i>Salmonella</i>	MEST EN ISO 6579
<i>Listeria monocytogenes</i>	MEST EN ISO 11290-1 i 2.
<i>E. coli</i>	ISO 16649 -1, 2 i 3
Broj aerobnih kolonija	MEST EN ISO 4833
Enterobacteriaceae	MEST EN ISO 21528-1 i 2
<i>Bacillus cereus</i>	MEST EN ISO 7932
Koagulaza pozitivne stafilokoke <i>Staphylococcus aureus</i>	EN ISO 6888-1 i 2
<i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937
<i>Clostridium botulinum</i>	ISO/TS 17919
<i>Yersinia enterocolitica</i>	ISO 10273:2003I, SO/TS 18867
<i>Cronobacter spp.</i>	ISO/TS 22964:2006
<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	ISO/DIS 21872
<i>Campylobacter spp.</i>	ISO 10272-1

### Priprema namirnica za mikrobiološko ispitivanje

Obuhvata:

- pripremanje uzorka za ispitivanje - homogenizacija
- priprema početne suspenzije (osnovnog razrjeđenja) i
- priprema decimalnih razblaženja za mikrobiološko ispitivanje, prema ISO 6887-1: 2008.

Odmjerena količina uzorka za osnovno razrjeđenje se prethodno homogenizuje. Homogenizacija se može vršiti uz pomoć tarionika i tučka i stomahera. Nakon homogenizacije u tarioniku, u Erlenmajeru se priprema osnovno razrjeđenje mućkanjem ili vibriranjem u toku 15 minuta. U stomaheru se homogenizacija vrši u sterilnoj "stomaher kesi" u trajanju 1-2 min.



Slika 77. Homogenizacija uzorka u tarioniku

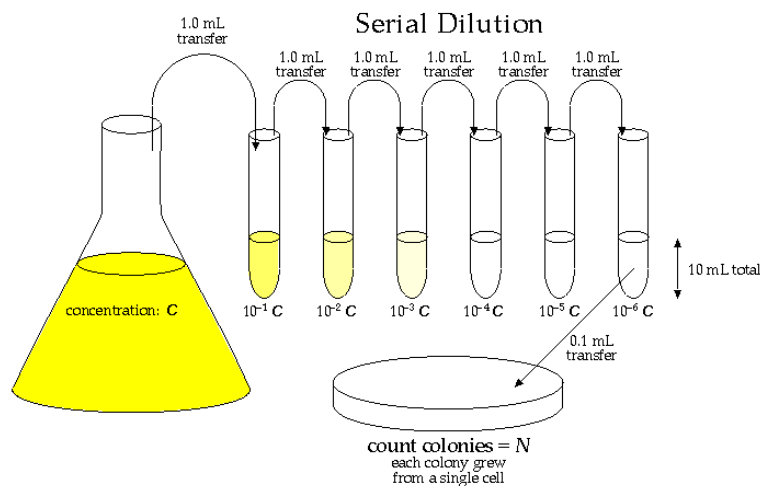


Slika 78. Stomaher za homogenizaciju uzoraka

Početna suspenzija (**osnovno razblaženje**) je suspenzija, rastvor, ili emulzija dobijena pošto se izmjerena količina proizvoda koji se ispituje, izmiješa sa devetostrukom količinom sredstva za razblaživanje (20ml ili g uzorka u 180ml, 10ml/g u 90ml ili 1ml/g u 9ml sredstva za razblaživanje (peptonski slani rastvor ili puferisana peptonska voda).

Sastav peptonskog slanog rastvora je: proizvod enzimskog razlaganja kazeina 1,0 g, NaCl 8,5 g, voda 1000 ml. Sastav puferisane peptonske vode je : proizvod razlaganja životinjskog tkiva 10,0 g, NaCl 5,0 g, dinatrijum-hidrogen fosfat-dodekahidrat ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12\text{H}_2\text{O}$ ) 9,0 g, kalijum-dihidrogen-fosfat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 1,5 g, voda 1000 ml. Temperatura sredstva za razblaživanje treba da bude približno ista kao i temperatura okoline da bi se izbjeglo oštećenje mikroorganizama. Priprema početne suspenzije omogućava ravnomjernu raspodjelu mikroorganizama, koji se nalaze u dijelu uzorka za ispitivanje.

**Dalja decimalna razblaženja** su suspenzije ili rastvori dobijeni miješanjem izmjerene zapremine početne suspenzije sa devetostrukom zapreminom sredstva za razblaživanje i ponavljanjem ove operacije sa daljim razblaženjima, sve dok se ne dobije niz decimalnih razblaženja podesean za inokulaciju podloga. Cilj pravljenja daljih razblaženja je da se smanji broj mikroorganizama po jedinici zapremine, što poslije inkubacije omogućava: **posmatranje rasta** (u epruветama, bocama) i **brojanje kolonija** (na petri pločama).



Osnovno razblaženje  
20 g uzorka + 180 ml  
FR / PPS / 2% Na-citrat

**Slika 79.** Priprema serije razređenja

## **Redosljed postupaka pri izolaciji i identifikaciji mikroorganizama iz namirnica**

- Predobogaćenje: koristi se neselektivni tečni medijum u cilju oporavka subletalno oštećenih ćelija
- Obogaćenje – koristi se selektivni tečni medijum u cilju povećanja broja “target” mikroorganizama
- Izolacija – koristi se selektivni čvrsti medijum za dobijanje pojedinačnih kolonija
- Identifikacija - makro i mikromorfologija, fenotipizacija, serologija, PCR metode

SALMONELLA VRSTE - ISO standard EN ISO 6579

**Predobogaćenje:** koristi se puferisana peptonska voda (Buffered peptone water - BPW)

### **Podloge za obogaćenje**

- Rappaport Vassiliadis bujon;
- Muller-Kaufman tetratonat bujon;

Ove podloge inhibišu aktivnost kompetitivne mikroflore i stimulišu rast salmonela.

### **Selektivno diferencijalne podloge**

XLD agar (Xylose Lysine Desoxyholate agar)

BG-agar (Briliant green agar –modifikovani)

*Podloge za ispitivanje biohemijskih karakteristika (identifikacija):* dvostruki šećer po Kligleru, kosi agar sa ureom po Christensenu (-), Indol (-), Metil crveno (+), Voges Proskauer (-), Simons citrat (+), Fenil alanin (-), KCN (-) (oznake u zagradi se odnose na reakciju salmonela)

**LISTERIA MONOCYTOGENES - ISO standard EN ISO 11290-1 i EN ISO 11290-2**

- Za obogaćenje se koriste tečne podloge
- **Half Fraser bujon** – koristi se za primarno obogaćenje (inhibiše se rast drugih mikroorganizama)
- Fraser bujon** – koristi se za sekundarno obogaćenje

### **Selektivno diferencijalne podloge:**

- **Palcam agar;**
- **ALOA (Agar Listeria according to Ottaviani and Agosti)**

- Na aloa agaru kolonije *L. monocytogenes* su karakterističnog izgleda: sivo plave, okrugle, sa zonom prosvjetljenja (slika 80).



**Slika 80.** Rast kolonija *L. monocytogenes* na Aloa agaru (plave, okrugle, sa zonom prosvjetljenja)

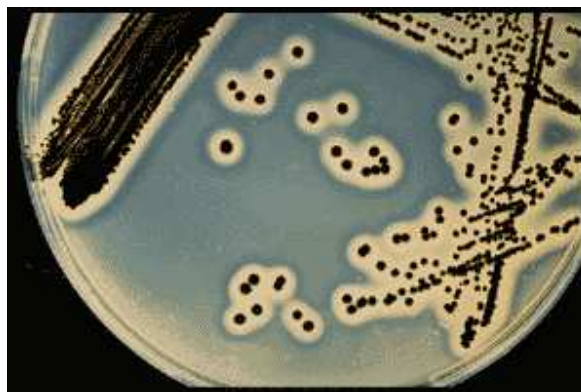
- **Krvni agar** - hemoliza - CAMP test
- **Polutečni hranljivi agar** – pokretljivost – “kišobran”

#### BROJ AEROBNIH KOLONIJA

Za određivanje broja kolonija aerobnih bakterija koristi se podloga za ukupan broj bakterija (sadrži tripton, ekstrakt kvasca, dekstrozu). Zasijanje se vrši iz pripremljenih decimalnih razrjeđenja.

#### *STAPHYLOCOCCUS AUREUS*

Iz pripremljenih decimalnih razrjeđenja zasijava se selektivno diferencijalna podloga, agar po **Baird Parkeru** (ETPGA, sa dodatkom žumanceta).



**Slika 81.** Izgled kolonija *S. aureus* na Baird parker agaru

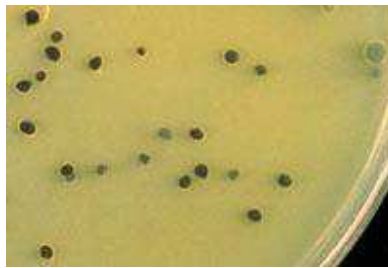
## *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

**Predobogaćenje** – koriste se tečne podloge:

**Tioglikolatni bujon**, 7 dana;  $35 \pm 2^{\circ}\text{C}$ , zamućenje podloge, površina bistra

**Selektivno diferencijalne podloge**

**TSC agar (triptosa sulfid cikloserin)** - inkubacija na  $37^{\circ}\text{C}$ , anaerobno,  $20 \pm 2\text{h}$   
– crne kolonije



**Slika 82.** Kolonije *C. perfringens* na TSC agaru

*ESCHERICHIA COLI* - ISO Standard 16649

**Selektivna podloga**

Brilijantzeleni laktoza žučni bujon (BZLŽ bujon) , sa Durhamovim cjevčicama

**Selektivno -diferencijalne podloge**

Ljubičasto crveni žučni agar (VRB –Violet Red Bile)

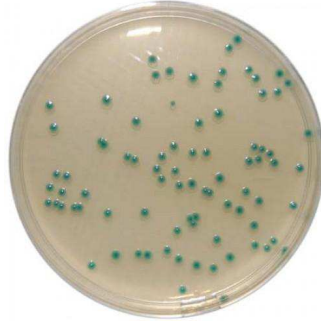


**Slika 83.** BZLŽ bujon



**Slika 84.** Izgled kolonija *E. coli* na VRB agaru

TB X AGAR (Chromogenic Tryptone Bile X Glucuronide Agar TBX, slika 85. )



Slika 85. Plavozeleno obojene kolonije *E. coli* na TBxAGARU

### Podloge za izvođenje biohemijskog niza

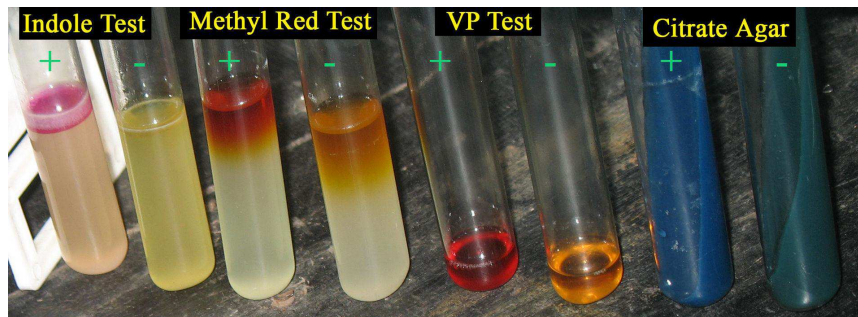
Za biohemijsku identifikaciju *E. coli* koristi se dvostruki šećer po Kligleru, podloge za dokazivanje indola, redukciju metilcrvenog, dokazivanje acetilmetilkarbinola (Voges-Proskauer reakcija) i podloga za dokazivanje razlaganja citrata.



Slika 86. Dvostruki šećer po Kligleru



Slika 87. Promjena boje dvostrukog šećera usljed rasta *E. coli*



Slik 88. Biohemijske reakcije *E. coli* (indol +, metilcrveno +, VP -, citrat -)



**Kvasci i plijesni:** izoluju se na selektivnoj podlozi - Sabouraud agaru  
**Bakterije mliječne kisjeline** – laktokoke (*Lactococcus* spp.) se izoluju na M-17 bujonu i M17 agaru, a laktobacili (*Lactobacillus* spp) na MRS bujonu i MRS agaru.

### Literatura

1. Ašanin R., Krnjaić D., Milić N.: Priručnik sa praktičnim vežbama iz mikrobiologije sa imunologijom, BMG-NM d.o.o., Beograd, 2008.
2. Karakašević B.(1966): Priručnik standardnih metoda za mikrobiološki rutinski rad, Grafički zavod Hrvatske, Zagreb
3. Katić V. (2007): Praktikum iz higijene mleka, Veterinarska komora Srbije, Beograd
4. Miljković V., Katić V. (1995): Priručnik laboratorijskih analiza mleka i proizvoda od mleka, Veterinarska komora Srbije, Beograd
5. Mihajlović B., Marković B.(1987): Praktikum – praktične vežbe iz mikrobiologije, Naučna knjiga, Beograd
6. Mihajlović B.(1983): Priručnik za identifikaciju bakterija, kvasaca i plesni, Savez veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Beograd
7. Đukić D., Mandić L., Stanojković A.(2010): Praktikum iz mikrobiologije, Budućnost, Novi Sad
8. Pešić Mikulec D. (2005): Mikrobiološke analize namirnica u odnosu na evropsku zakonsku regulativu, Makarije, Beograd
9. Priručnik za laboratorijsku dijagnostiku, Savez veterinara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Beograd, 1984. (Standardizacija dijagnostičkih metoda za bakterijske, virusne i parazitske bolesti životinja čije je suzbijanje propisano zakonom).
10. Sarić Z. (1992): Praktikum iz mikrobiologije, Nauka, Beograd
11. Stilinović B., Hrenović J.(2010): Praktikum iz bakteriologije, Kugler, Zagreb
12. Škrinjar M. (1994): Metodi mikrobiološke kontrole životnih namirnica, Futura, Novi Sad
13. Todorović J., Bojanić Rašović M.(2009): Mikrobiologija, centar za stručno obrazovanje, Podgorica