



Mirjana Bojanić Rašović

**PRAKTIKUM IZ
MIKROBIOLOGIJE
ZA STUDENTE
ANIMALNE PROIZVODNJE**



UCG

Univerzitet Crne Gore

Prof. dr Mirjana Bojanić Rašović
PRAKTIKUM IZ MIKROBIOLOGIJE
ZA STUDENTE ANIMALNE PROIZVODNJE
Prvo izdanje

Izdavač
Univerzitet Crne Gore
Cetinjska br. 2, Podgorica
www.ucg.ac.me

Za izdavača
Prof. dr Vladimir Božović, rektor

Glavni i odgovorni urednik
Prof. dr Stevo Popović

Urednik izdanja
Prof. dr Anđelka Šćepanović

Recenzije
Prof. dr Dragutin Đukić
Prof. dr Aleksandra Martinović
Prof. dr Svetlana Perović

Lektura
mr Bosiljka Cicmil

Slog
Dalibor Vukotić

Tehnički urednik
Ivan Živković

Objavlјivanje ove univerzitetske publikacije odobrio je Senat Univerziteta Crne Gore odlukom br. 03-2692/1 od 22. decembra 2022. godine.

© Univerzitet Crne Gore, 2023.

Sva prava zadržana. Zabranjeno je svako neovlašćeno umnožavanje, fotokopiranje ili reprodukovanje publikacije, odnosno njenog dijela, bilo kojim sredstvom ili na bilo koji način.

CIP - Каталогизација у публикацији
Национална библиотека Црне Горе, Цетиње

ISBN 978-86-7664-241-0
COBISS.CG-ID 26188804



Mirjana Bojanić Rašović

PRAKTIKUM IZ MIKROBIOLOGIJE
ZA STUDENTE ANIMALNE PROIZVODNJE

Podgorica, 2023.

SADRŽAJ

PREDGOVOR	7
RAD U MIKROBIOLOŠKOJ LABORATORIJI	9
MIKROSKOP I RUKOVANJE MIKROSKOPOM	9
LABORATORIJSKO POSUĐE, PRIBOR I APARATI	27
PRANJE I PRIPREMA LABORATORIJSKOG POSUĐA ZA STERILIZACIJU ...	27
PRIMJENA STERILIZACIJE U MIKROBIOLOGIJI	27
VRSTE I TEHNIKA IZRADE MIKROSKOPSKIH PREPARATA.....	77
MORFOLOGIJA BAKTERIJA, GLJIVA, PROTOZOA I VIRUSA	95
HRANLJIVE PODLOGE	113
IZOLACIJA I GAJENJE MIKROORGANIZAMA.....	113
IZDVAJANJE ČISTIH KULTURA MIKROORGANIZAMA	129
ODREĐIVANJE NEKIH BIOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA MIKROORGANIZAMA	139
SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA ZARAZNIH BOLESTI	159
MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA ZARAZNIH BOLESTI - PCR METODA ...	169
MIKROORGANIZMI BURAGA.....	177
MIKROORGANIZMI SILAŽE.....	187
MLIJEČNA FERMENTACIJA.....	195
MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE HRANE ANIMALNOG PORIJEKLA.....	199
MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE HRANE ZA ŽIVOTINJE.....	217
SAŽETAK.....	221
ABSTRACT.....	221
BIBLIOGRAFIJA	223
INDEKS	225

PREDGOVOR

Ovaj praktikum je namijenjen studentima osnovnih studija studijskih programa Stočarstvo i Animalna proizvodnja, kao i studentima master interdisciplinarnih studija Bezbjednost hrane Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore. S obzirom na tematiku, praktikum može koristiti i studentima i stručnjacima srodnih fakulteta i zanimanja. Praktikum obuhvata ukupno 18 poglavlja: Rad u mikrobiološkoj laboratoriji; Mikroskop i rukovanje mikroskopom; Laboratorijsko posuđe, pribor i aparati; Pranje i priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju; Primjena sterilizacije u mikrobiologiji; Vrste i tehnika izrade mikroskopskih preparata; Morfologija bakterija, gljiva, protozoa i virusa; Hranljive podloge; Kultivisanje mikroorganizama; Izdvajanje čistih kultura mikroorganizama; Određivanje nekih biohemijskih karakteristika mikroorganizama; Serološka dijagnostika zaraznih bolesti; PCR dijagnostika zaraznih bolesti; Mikroorganizmi buraga; Mikroorganizmi silaže; Mliječna fermentacija; Mikrobiološko ispitivanje namirnica animalnog porijekla; Mikrobiološko ispitivanje stočne hrane. Cilj praktikuma je da pruži praktično znanje studentima vezano za osnovne tehnike i metode rada u mikrobiološkoj laboratoriji, koje je neophodno radi izolacije, ispitivanja i identifikacije kako korisnih, tako i patogenih mikroorganizama.

Najtoplije zahvaljujem prof. dr Veri Katić na podršci, korisnim sugestijama i recenziji praktikuma. Zahvaljujem recenzentima na korisnim sugestijama kojima su doprinijeli poboljšanju kvaliteta ovog praktikuma.

Unaprijed zahvaljujem uvažanim studentima i kolegama na sugestijama, koje će doprinijeti da sljedeće izdanje bude još bolje.

Podgorica, jul 2021.

Autor
Prof. dr Mirjana Bojanić Rašović

VJEŽBA I

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 osvjetljavanje 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 (slika 1) imaju određene specifičnosti u odnosu na druge vrste laboratorija. U njima se obavlja mikrobiološki pregled uzoraka porijeklom od životinja, biljaka, ljudi, hrane, zemljišta, vode, vazduha i dr. U mikrobiološkoj laboratoriji se izoluju i kultiviraju mikroorganizmi u cilju izučavanja njihove građe, rasta, fiziološko-biohemijskih i genetičkih svojstava. Prilikom rada u mikrobiološkoj laboratoriji često se radi sa patogenim mikroorganizmima, zbog čega se moraju poštovati određena pravila i uputstva. Greške u radu, primjena neodgovarajućih tehnika i pogrešno rukovanje opremom mogu dovesti do povreda i infekcija. Nepravilno postupanje sa uzorcima tokom transporta do laboratorije takođe može dovesti do infekcije radnog osoblja.



Slika 1. Mikrobiološka laboratorija (Bojanić Rašović, 2020)

Uputstvo za rad u mikrobiološkoj laboratoriji

Laboratorija treba da bude besprekorno čista i oslobođena predmeta, pribora i materijala koji nijesu potrebni za rad. Ukoliko se prozori otvaraju, treba da imaju zaštitne mrežice od ulaska insekata i dr. Radni sto prije i poslije rada treba prebrisati dezinfekcionim sredstvom. Hranljive podloge, hemikalije, mikrobiološke kulture, pribor i aparati treba uvijek da se ostavljaju na određenim mjestima u laboratoriji. Ulaz u laboratoriju je dozvoljen samo radnom osoblju odjevenom u čiste i neoštećene bijele pamučne mantile. Nepotrebna kretanja i suvišni razgovori su nepoželjni i ometaju rad u laboratoriji. Osoblje treba da ima kratke i uredne nokte i vezanu kosu. Prije i nakon mikrobioloških ispitivanja ruke se obavezno peru toplom vodom i tečnim sapunom i brišu papirnim ubrusima. Prilikom inokulacije materijala na hranljive podloge u pločama ili epruvetama, ne smije se razgovarati ili kašljati. U laboratoriji ne mogu da rade osobe koje imaju neku infekciju ili povrede ruku i lica. Vrata laboratorije treba uvijek da su zatvorena. U toku rada sa potencijalno zaraznim i zaraznim materijalom, treba obavezno nositi zaštitne rukavice. U situacijama kada treba zaštititi lice i oči od prskanja tečnosti ili izvora UV zračenja stavljaju se zaštitne naočare i maske. Radne mantile ne treba nositi van laboratorije. Radna odjeća se odlaže u ormariće odvojeno od odjeće koja se nosi van laboratorije. Radi bezbjednosti, u laboratoriji se ne smije nositi obuća otvorenih prstiju. Pipetiranje ustima je zabranjeno. Tokom rada u laboratoriji ne treba jesti i piti. Sve radnje u laboratoriji treba sprovoditi tako, da se što je moguće više smanji mogućnost stvaranja aerosola i kapljica. U laboratoriji se ne smije jesti, piti i pušiti. Tokom rada ne treba dodirivati nos, oči i usta. Na radnim stolovima se nakon završenog posla ne smije ostavljati prljavo posuđe, pribor, kulture mikroorganizama i sl. Sav otpadni materijal se odlaže u posebne posude ili korpe za otpatke. Kontaminirani pribor se odlaže u posebne sudove sa dezinfekcionim sredstvom. Upotrijebljene pipete, mikroskopske pločice (pred-

metne ploče), ljuspice (pokrovna stakla) i dr. se stavljaju u rastvore dezinficijenas. Korišćeni pribor i posuđe se prije pranja sterilišu u autoklavu. Mjesta koja su došla u kontakt sa kulturom mikroorganizama treba natopiti dezinfekcionim sredstvom (70% alkoholom). Bakteriološke igle i eze (petlje, omče) se sterilišu (opaljuju, žare) na plamenu prije i nakon upotrebe. Ukoliko se radi sa sluzavim kolonijama nekog mikroorganizma, eza prije žarenja treba da se osuši, kako ne bi došlo do prskanja materijala. Posebno treba biti obazriv u radu sa butan bocama i autoklavom. Nakon upotrebe butan boce treba dobro zatvoriti. Autoklav se nikada ne smije otvarati dok je pod pritiskom vodene pare. Prije ispuštanja u kanalizaciju kontaminirane tečnosti se moraju dekontaminirati (hemijski ili fizički). Za vrijeme rada u laboratoriji treba voditi računa da ne dođe do kontaminacije dokumenata.

Radno osoblje treba da bude upoznato sa mogućim rizicima od unošenja patogenih mikroorganizama (udisanjem, preko kože, rana na koži itd). Sprovođenje dezinfekcije i sterilizacije je od izuzetne važnosti za rad i bezbjednost osoblja u laboratoriji. Dezinfekcija vazduha i površina se dodatno vrši UV lampom. Prije dezinfekcije je veoma važno sprovesti čišćenje i pranje pribora, opreme i sl.

Zbog toksičnosti hemikalija sa kojima se radi, treba biti vrlo oprezan i držati se uputstva za rad. Do trovanja toksičnim hemikalijama najčešće dolazi prilikom njihovog udisanja, kontaktom ili preko oštećenja na koži. Hemikalije u laboratoriju treba unositi samo u količini koja je potrebna u toku dana; ostale količine treba čuvati u drugim prostorijama koje su za to određene (slika 2). Zbog rizika od požara, u laboratoriji treba imati dostupne protivpožarne aparate.



Slika 2. Unutrašnjost ormara za čuvanje hemikalija i reagenasa (drži se zatvoren) (Bojanić Rašović, 2020)

Djelovi mikrobiološke laboratorije

Mikrobiološka laboratorija se sastoji od radne prostorije i pomoćnih prostorija.

U radnoj prostoriji se vrši izolacija i identifikacija - determinacija mikroorganizama iz različitih uzoraka, gajenje mikroorganizama i ispitivanje njihovih različitih osobina (morfoloških, biohemijskih i drugih) u različite svrhe. U zavisnosti od vrste mikrobioloških analiza koje se u njima rade, radne prostorije mogu biti namijenjene za: bakteriološke, mikološke, parazitološke 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 četiri nivoa biološke bezbjednosti, od jedan do četiri. Nivo jedan je osnovni, a nivo četiri maksimalni nivo biološke bezbjednosti. Sve dijagnostičke laboratorije moraju imati najmanje nivo dva biološke bezbjednosti. Međunarodni znak za biološku opasnost se stavlja na vrata laboratorija u kojima se radi sa mikroorganizmima rizične grupe dva ili višeg nivoa (slika 3).



Slika 3. Međunarodni znak za biološku opasnost (Čogurić, 2020)

Mikroskop i tehnika mikroskopiranja

Mikroskop je instrument koji daje uveličanu sliku nekog objekta. Zahvaljujući tome mikroskop nam omogućava posmatranje i izučavanje mikroorganizama. U zavisnosti od sistema koji se koristi za stvaranje slike posmatranog objekta postoje:

- svjetlosni mikroskopi kod kojih se za posmatranje mikroorganizama koristi vidljiva svjetlost (slika 4) i
- elektronski mikroskopi, kod kojih se za posmatranje mikroorganizama koristi snop elektrona.

Svjetlosni mikroskopi

U svjetlosne (optičke) mikroskope se svrstavaju:

- mikroskop sa svijetlim poljem,
- mikroskop sa tamnim poljem,
- fluorescentni mikroskop i
- fazno-kontrastni mikroskop.

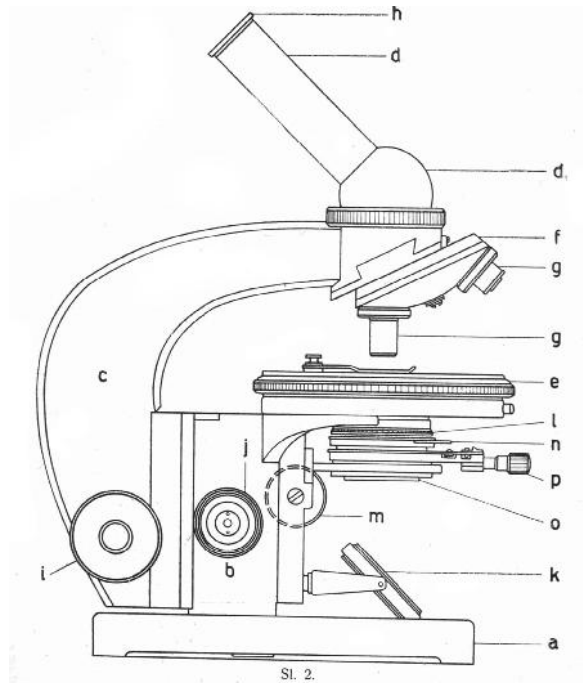


Slika 4. Svjetlosni mikroskop (Bojanić Rašović 2020)

Mikroskop sa svjetlim poljem

Ovaj mikroskop se najčešće koristi u mikrobiološkim laboratorijama. Pomoću njega se može posmatrati oblik, veličina, boja, pokretljivost mikroorganizama, kao i prisustvo kapsule i oblika za konzervaciju mikroorganizama (spore, ciste). Kod krupnijih mikroorganizama, kao što su gljive, alge i protozoe mikroskop sa svjetlim poljem omogućava i posmatranje građe njihovih ćelija.

Svjetlosni mikroskop se sastoji iz optičkih i mehaničkih djelova (slika 5). Mehanički djelovi mikroskopa su: postolje, ručica, pokretni stočić, tubus, rotor (revolver), zavrtanj kondenzora, mikrometarski zavrtanj i makrometarski zavrtanj. Optički djelovi mikroskopa su: okulari, objektivni, kondenzor i sistem za osvjetljenje.



Slika 5. 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 zavrtanj, **j** - mali ili mikrometarski zavrtanj, **k** - ogledalo (ili drugi izvor svjetla), **l** - kondenzor, **m** - zavrtanj za vertikalno pomjeranje kondenzora, **n** - dijafragma (iris- zaslon), **o** - okvir za filtere, **p** - zavrtanj za horizontalno pomjeranje kondenzora

(www.e-skola.biol.pmf.unizg.hr)

Funkcija mehaničkih djelova mikroskopa

Postolje omogućava stabilan položaj mikroskopa. U postolje je ugrađen sistem za osvjetljenje. Ručica ili stativ služi za prenošenje mikroskopa. Ručica je donjim krajem povezana sa postoljem, a gornjim krajem je pričvršćena za 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 djelovi. Na gornjem dijelu se nalaze okulari, a na donjem rotor sa objektivima. Zavrtnaj kondenzora služi za podizanje i spužtanje kondenzora, čime se reguliše intenzitet osvjetljenosti preparata. U ram za svjetlosni filter se, prema potrebi, stavlja odgovarajući filter.

Funkcija optičkih djelova 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 arapskim brojevima (slika 6).



Slika 6. Okulari koji daju uveličanje 10x (Bojanić Rašović, 2020)

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, zbog čega se 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 korišćenja, postoje objektivi suvog sistema i imerzioni objektivi (slika 7).



*Slika 7. Suvi objektiv (uveličanja 4x, 10x, 40x) i imerzioni objektiv (100x)
(Bojanić Rašović, 2020)*

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 objektiv se koriste za posmatranje krupnijih mikroorganizama. **Imerzioni objektiv** 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 objektiv se koriste za posmatranje bakterija i drugih sitnijih mikroorganizama.

Uveličanje posmatranog predmeta (mikroorganizma) se dobija kada se uveličanje koje daju okulari pomnoži sa uveličanjem koje daju objektiv. Na primjer, uveličanje (10x), koje daju okulari, kada se pomnoži sa uveličanjem koje daje suvi objektiv 40x, dobija se ukupno uveličanje posmatranih mikroorganizama (400x); kada se uveličanje (10x) koje daju okulari pomnoži sa uveličanjem koje daje imerzioni objektiv (100x), dobija se uveličanje mikroorganizama 1000x itd.

Kondenzor predstavlja niz sočiva koja služe da sakupe svjetlosne zrake i usmjere ih na objekat, tj. preparat. Pomoću kondenzora se, njegovim podizanjem i spuštanjem, kao i otvaranjem i zatvaranjem dijafragme koja je u njega ugrađena, može regulisati intenzitet svjetlosti. **Dijafragma** se nalazi između izvora svjetlosti i kondenzora. Sastoji se iz polukružnih ljušpica koje se pomjeranjem odgovarajuće poluge skupljaju ili šire, praveći u centralnom dijelu manji ili veći otvor za prolaz svjetlosti. **Pribor za osvjetljenje** sastoji se od sijalice i ogledala, koji su ugrađeni u postolje mikroskopa. Ogledalo je fiksirano u položaj koji omogućava najbolju refleksiju.

Mikroskop sa tamnim poljem

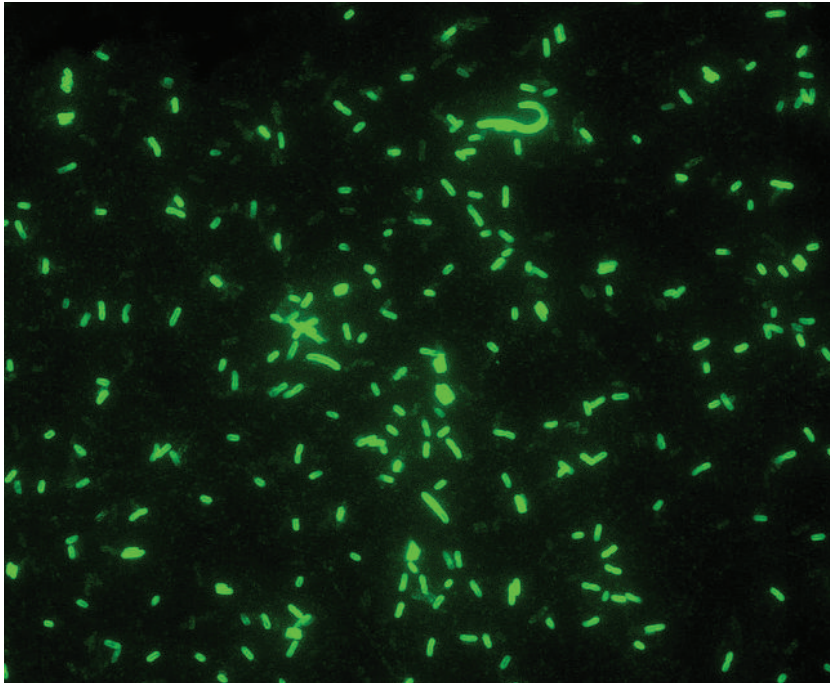
Mikroskop sa tamnim poljem ima kondenzor sa tamnim dnom, tako da svjetlost ne prolazi kroz kondenzor, nego sa strane osvjetljava preparat. Zbog toga se dobija potpuno tamno vidno polje, na kojem su osvijetljeni samo posmatrani objekti.

Fluorescentni mikroskop

Fluorescentni mikroskop (slika 8) kao izvor svjetlosti koristi ultraviolettne zrake. Posmatrani objekti prilikom izlaganja ovim zracima fluoresciraju. Ako objekat nema mogućnost fluorescencije, tretira se odgovarajućim fluorescentnim bojama – fluorohromima (slika 9).



Slika 8. Fluorescentni mikroskop (Bojanić Rašović 2020)



Slika 9. *Yersinia pestis* vezana fluorohrom obojenim antitijelima na kapsularni antigen, (fluorescentna mikroskopija, uvećanje 40x)
https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/8c/Yersinia_pestis_fluorescent_-_PHIL_1917.jpg

Fazno-kontrastni mikroskop

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. Kada svjetlost kroz prsten na dijafragmi dođe do posmatranog objekta, ona skreće i stvara kontrast između objekta i okoline. Pomoću ovog mikroskopa posmatraju se neobojeni mikroorganizmi i njihovi strukturni elementi.

Invertni mikroskop

Invertni mikroskop (slika 10) se koristi 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 objektivni se nalaze ispod objekta, a izvor svjetlosti iznad. Na taj način objektivni mogu prići odozdo dovoljno blizu objektu koji se nalazi na dnu neke posude.



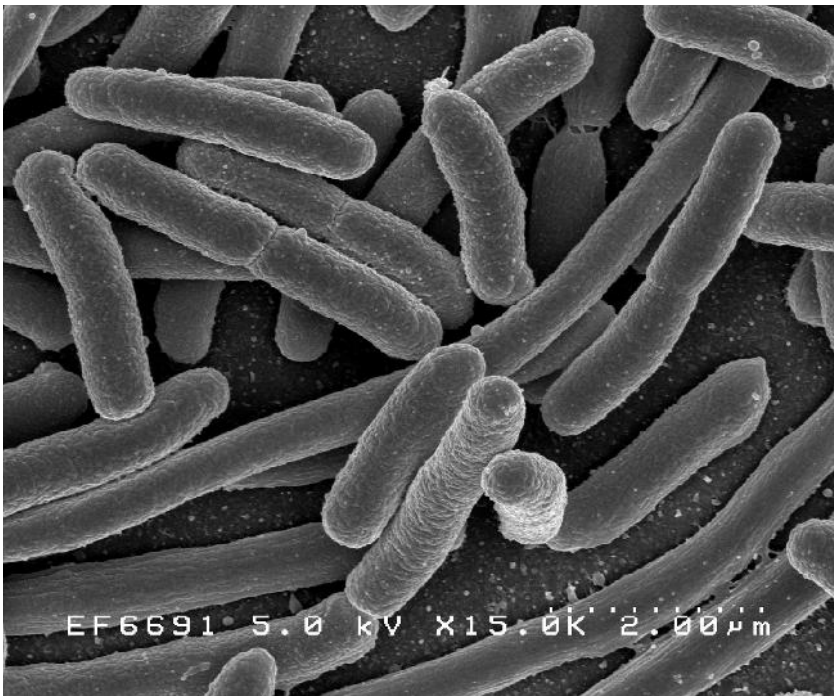
Slika 10. Invertni mikroskop
<https://microscopeinternational.com/optika-im-3-trinocular-inverted-phase-microscope/>

Elektronski mikroskop

Elektronski mikroskop za stvaranje slike posmatranog objekta koristi kretanje elektrona iz katodne cijevi. Kada elektroni dopiju na preparat, oni mijenjaju pravac kretanja, a na osnovu stepena rasipanja zraka se dobije kontrastna slika. Pomoću elektronskog mikroskopa se mogu posmatrati čestice veličine i do 0,5 nm, pa se on koristi za posmatranje ćelijske strukture i strukture virusa. Pomoću elektronskog mikroskopa može se postići uveličanje slike 100 000 do 200 000 puta. Postoje dvije vrste elektronske mikroskopije: skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM, slika 11), koja omogućava posmatranje površine ispitivanog objekta. Slika se stvara detekcijom elektrona koji se odbijaju od spoljašnje površine preparata, što daje utisak trodimenzionalnosti. Ovim vidom mikroskopije se ne mogu uočiti unutrašnje strukture objekta (slika 12). Transmisiona elektronska mikroskopija (TEM, slika 13) se koristi za proučavanje unutrašnje strukture objekta (slika 14). 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.



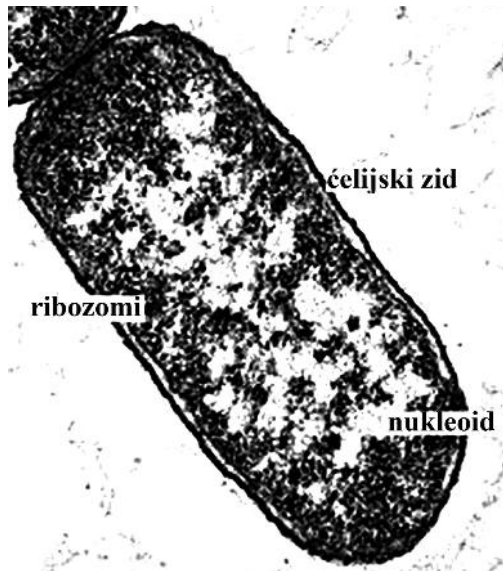
Slika 11. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 12. E. coli (SEM)
www.bacteriainphotos.com



Slika 13. Transmisioni elektronski mikroskop (TEM) (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 14. E. coli (TEM)

*Unutrašnja struktura prokariotske ćelije (E. coli, TEM)
(<http://www.ucmp.berkeley.edu/bacteria/bacteriamm.html>)*

Tehnika mikroskopiranja

Tehnika mikroskopiranja (slika 15) obuhvata nekoliko koraka:

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



Slika 15. Mikroskopiranje (Bojanić Rašović, 2020)

Smetnje koje se mogu pojaviti tokom mikroskopiranja

U toku mikroskopiranja se mogu javiti određene smetnje, kao što su: mutna i 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 nadolje, 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, ili 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;
- objektivu ili kondenzoru, pri čemu se ona ne kreće 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 specijalnim mekim papirom 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.

Čuvanje mikroskopa

Mikroskop je osjetljiv 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 čisti mekom krpom, a optički djelovi mekim, specijalnim papirom ili mekom, čistom platnenom krpom. Da bi ga zaštitili od djelovanja spoljnih faktora, prašine, vlage i slično, kada se ne koristi, mikroskop treba pokriti platnenim ili plastičnim pokrivačem (slika 16).

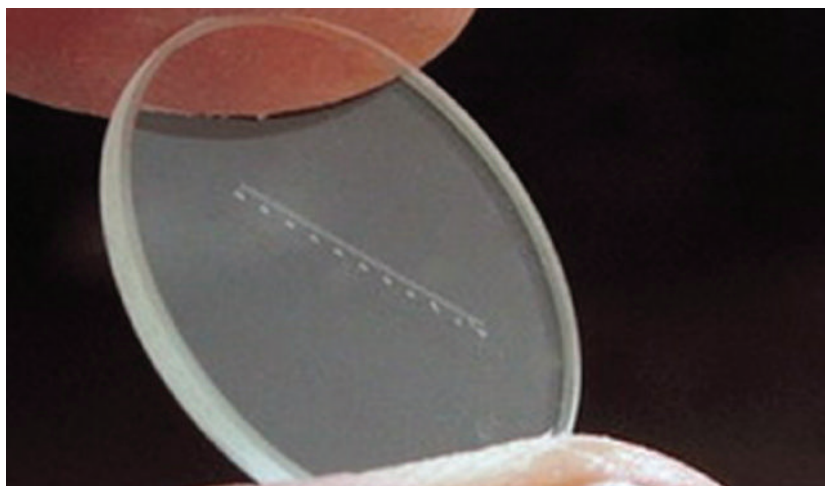
Treba izbjegavati potresanje mikroskopa, jer to dovodi do njegovog oštećenja. Prenosanje mikroskopa, pomjeranje kondenzora, okretanje revolvera, podizanje i spuštanje tubusa treba da se obavlja što pažljivije.



Slika 16. Čuvanje mikroskopa do upotrebe (Bojanić Rašović 2020)

Mjerenje veličine mikroorganizama

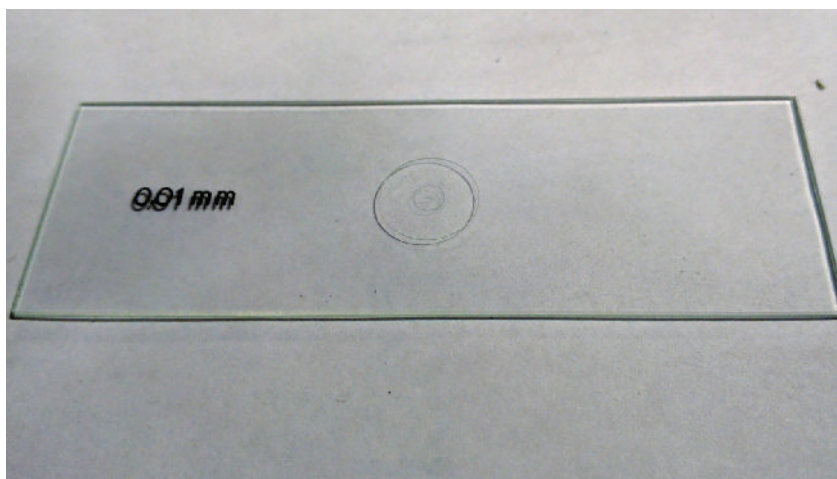
Ćelije mikroorganizama se mjere pod mikroskopom pomoću okularnog mikrometra (slika 17). Okularni mikrometar je staklena okrugla pločica, u kojoj je u sredini ugravirana skala dužine 5 mm. Skala je podijeljena na 50 djelova (mjerna jedinica podeoka je „dio”).



Slika 17. Okularni mikrometar

<https://www.amazon.in/Ocular-Micrometer-19-diameter-eyepieces/dp/B01LYNTP14>

Okularni mikrometar se stavlja u okular. Za mjerenje je najbolje koristiti žive, a ne fiksirane ćelije, jer fiksacija i bojenje ćelija dovode do promjene njihove prave veličine. Vrijednost podeoka okularnog mikrometra za svaku kombinaciju objektiv i okulara je različita. Da bi se pristupilo mjerenju veličine mikroorganizama, potrebno je odrediti vrijednost jednog podeoka okularnog mikrometra (u mikrometrima) za svako uvećanje, tj. objektiv mikroskopa. To se postiže pomoću objektiv mikrometra. Objektiv mikrometar je staklena pločica na koju je ugravirana skala. Skala je podijeljena na 100 djelova, što znači da podeok objektiv mikrometra iznosi 0,01 mm ili 10 μm (slika 18).



Slika 18. Objektiv mikrometar

<https://publiclab.org/notes/partsandcrafts/02-26-2018/5-testing-and-calibrating-your-microscope>

Za određivanje veličine podeoka okularnog mikrometra, objektiv mikrometar se postavlja na stočić mikroskopa i posmatra prvo pri malom uvećanju. Skala se dovede u centar vidnog polja i tek nakon toga mijenja objektiv sa kojim će se mjeriti veličina ćelija. Pomjeranjem stočića mikroskopa i okretanjem okulara, skale okularnog i objektiv mikrometra se dovedu u paralelan položaj. Zatim treba poklopiti podeoke iz skale okularnog i objektiv mikroskopa i naći dva sljedeća podeoka koja se poklapaju. Treba odrediti koliko podeoka objektiv mikrometra odgovara jednom podeoku okularnog mikrometra. Pošto jedan razmak između podeoka objektiv mikrometra iznosi 10 μm , preračunava se mikrometerska vrijednost podeoka okular mikrometra. Na primjer, 2 podeoka objektiv mikrometra ($2 \times 10 \mu\text{m} = 20 \mu\text{m}$) obuhvataju 5 podeoka okularnog mikrometra. To znači da jedan podeok skale okularnog mikrometra iznosi 4 μm (20:5). Veličina mikroorganizma se dobija kada se broj podeoka okularnog mikrometra pomnoži sa izračunatom vrijednošću jednog podeoka okularnog mikrometra za dato uvećanje (u ovom slučaju se množi sa 4 μm).

VJEŽBA II

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 tip zračenja se koristi u postupku sterilizacije?
9. Šta je dezinfekcija?
10. Koji se dezinficijensi najčešće koriste u laboratorijskom radu?

Laboratorijsko posuđe, pribor i aparati

Vrste laboratorijskog posuđa

Vrste laboratorijskog posuđa su: epruvete, pipete, birete, menzure, Erlenmajerove tikvice (Erlenmajerove boce, erlenmajeri), laboratorijske čaše, lijevci, normalni sudovi, baloni, laboratorijske boce, Petrijeve ploče (Petrijeve šolje, Petrijeve kutije), stakleni štapići, sahatna stakla, reagens boce, avani s tučkom, kašike za odmjeravanje podloga i reagenasa i dr. (slike 19-33).



Slika 19. Epruvete u metalnom stalku (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 20. Pipete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 21. Bireta (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 22. Menzure (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 23. Erlenmajerove tikvice širokog i uskog grla (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 24. Laboratorijske čaše (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 25. Stakleni lijevci (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 26. Normalni sud (Bojanić Rašović, 2020)



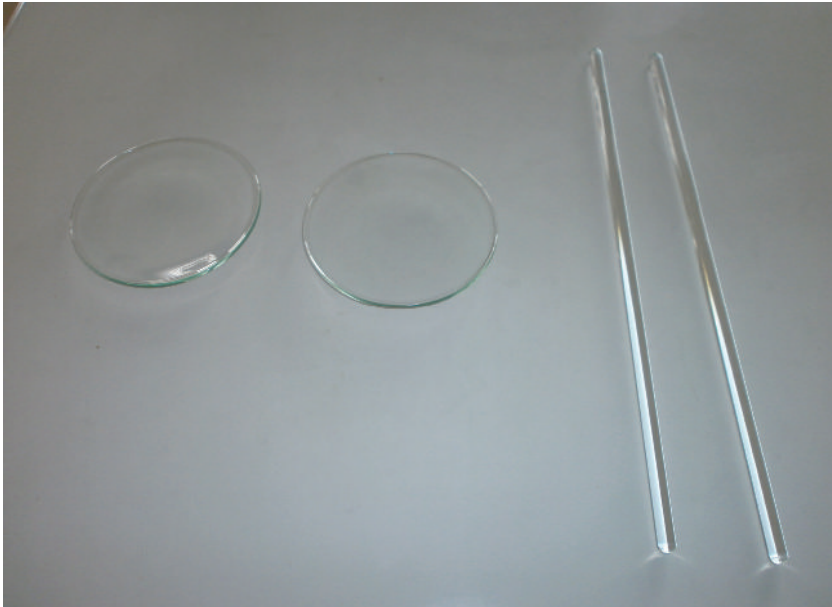
Slika 27. Balon (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 28. Laboratorijske boce (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 29. Petrijeve ploče (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 30. Sahatna stakla i stakleni štapići (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 31. Boce kapalice za čuvanje boja i reagenasa (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 32. Avan s tučkom (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 33. Kašika za odmjeravanje podloga i hemikalija (Bojanić Rašović, 2020)

Laboratorijski pribor

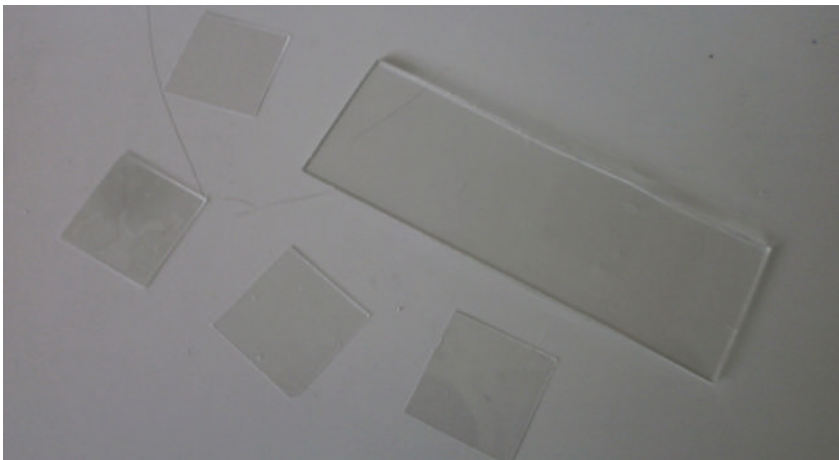
U laboratorijski pribor spadaju: bakteriološke eze, predmetna stakla - predmetnice, mikroskopske pločice, predmetna stakla sa udubljenjem, pokrovna stakla (ljustice), kutije za čuvanje pokrovnih stakala, kutije za čuvanje mikroskopskih preparata, sistem za membransku filtraciju tečnosti, posuda za kultivaciju anaerobnih mikroorganizama, pipetor, mikropipetor, stalak za epruvete, korpe za sterilizaciju podloga, čepovi za epruvete, četke za pranje laboratorijskog posuđa, indikator papir za kontrolu temperature sterilizacije, pH indikator papir, plavi i crveni lakmus papir, plamenik, Durhamove cjevčice, staklene perle za homogenizaciju uzoraka, membranski filter za filtraciju tečnosti, sterilni brisevi, filter papir, metalni cilindri za sterilizaciju pipeta, ručni frižider (slike 34 – 63).



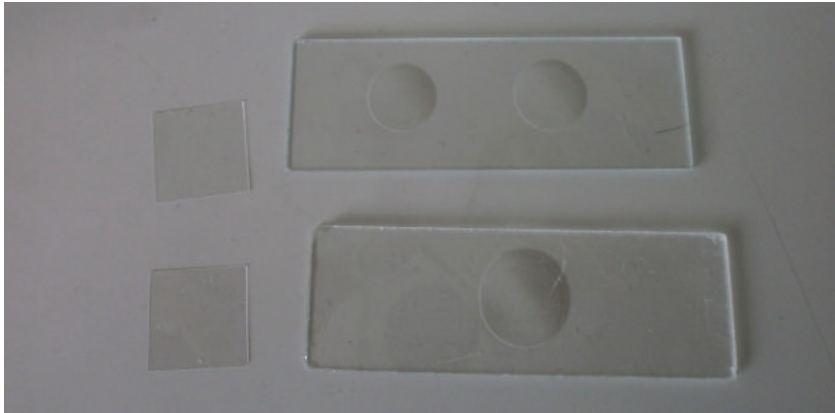
Slika 34. Bakteriološke eze (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 35. Nastavci za eze (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 36. Pokrovna stakla i predmetno staklo (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 37. Pokrovna stakla i predmetna stakla sa udubljenjem - za pravljenje preparata "viseća kap" (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 38. Kutija za čuvanje pokrovnih stakala - pokrovnih ljuspica (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 39. Kutija za čuvanje mikroskopskih preparata (Bojanić Rašović, 2020)



*Slika 40. Uređaj za sterilizaciju tečnosti membranskom filtracijom
(Bojanić Rašović, 2020)*



*Slika 41. Posuda za kultivaciju mikroorganizama u anaerobnim uslovima
(Bojanić Rašović, 2020)*



Slika 42. Pipetor (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 43. Mikropipetor (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 44. Metalne korpe za stavljanje podloga na sterilizaciju u autoklavu (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 45. Četke za pranje laboratorijskog posuđa (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 46. Indikator papir za određivanje pH podloga i rastvora (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 47. Plavi lakmus papir za određivanje pH (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 48. Crveni lakmus papir za određivanje pH (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 49. Indikator papir za kontrolu temperature sterilizacije (ukoliko zelena boja nakon završene sterilizacije pocrni, znak je da je sterilizacija uspješno završena) (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 50. Metalni čepovi za epruvete (Bojanić Rašović, 2020)



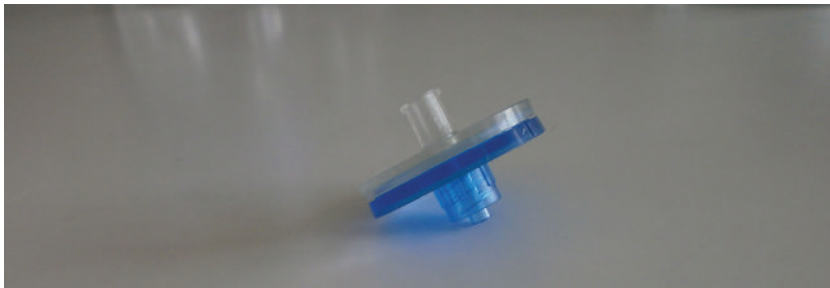
*Slika 51. Plamenik za rad u mikrobiološkoj laboratoriji
(Bojanić Rašović, 2020)*



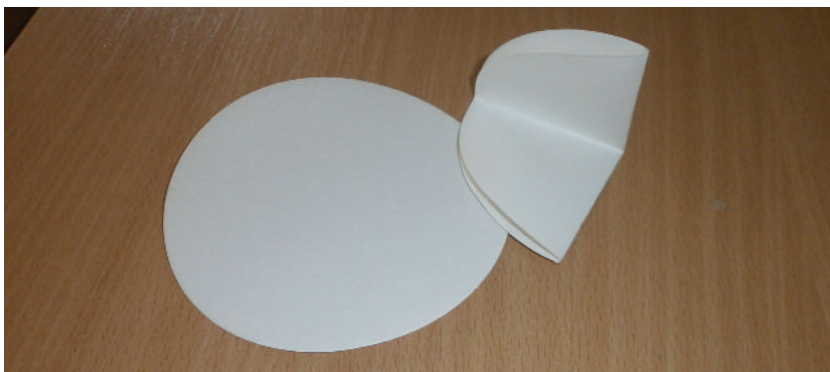
Slika 52. Durham cjevčice (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 53. Staklene perle (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 54. Membranski filter za filtraciju tečnosti uz pomoć šprica (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 55. Filter papir (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 56. Sterilni brisevi (Bojanić Rašović, 2020)



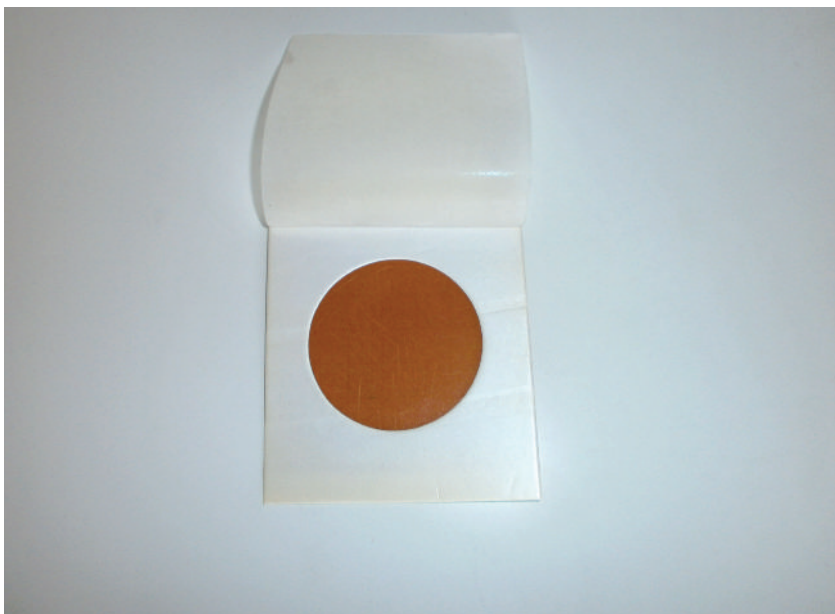
Slika 57. Kesica za stvaranje anaerobnih uslova za rast mikroorganizama (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 58. Metalni cilindar za sterilizaciju pipeta (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 59. Sterilni štapići (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 60. Petri film – na koji je nanescena hranljiva podloga za rast mikroorganizama (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 61. Pincete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 62. Plastični stalak za bojenje mikroskopskih preparata (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 63. Ručni frižider za transport uzoraka (Bojanić Rašović, 2020)

Plastično laboratorijsko posuđe i pribor

U plastično laboratorijsko posuđe i pribor spadaju: plastična Pasterova pipeta, plastične eze, plastične epruvete za centrifugovanje, plastične Petrijeve ploče, plastične sterilne posude za pakovanje i transport uzoraka, plastična boca sisaljka, plastične epruvetice za čuvanje zamrznutih bakterijskih kultura, plastični čepovi za epruvete, plastični stalak za epruvete, čaše za sedimentaciju, plastične posude za destilovanu vodu i dr. (slike 64 – 81).



Slika 64. Plastična Pasterova pipeta (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 65. Plastične eze – za jednokratnu upotrebu (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 66. Plastične eze i plastične Pasterove pipete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 67. Plastične epruvete za centrifugovanje (Bojanić Rašović, 2020)



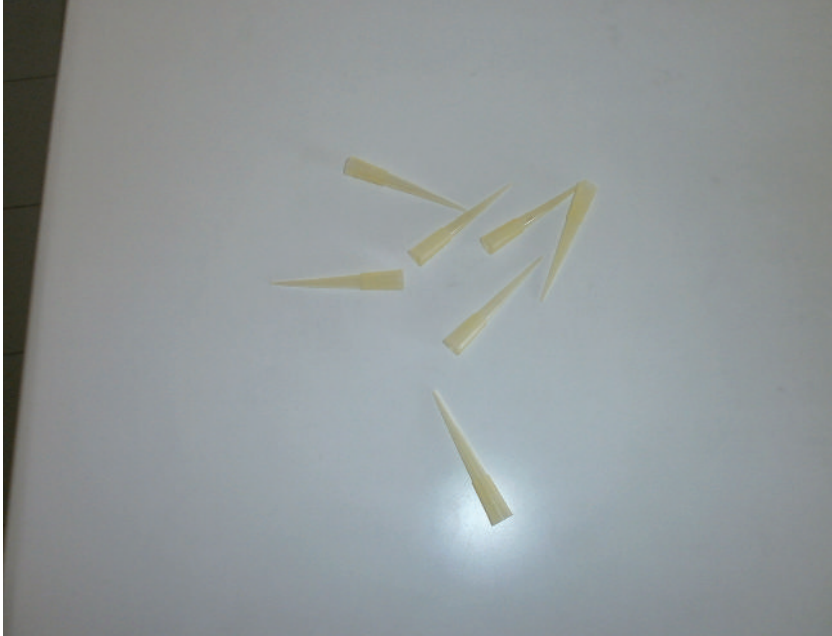
Slika 68. Plastične Petrijeve ploče za jednokratnu upotrebu (Bojanić Rašović, 2020)



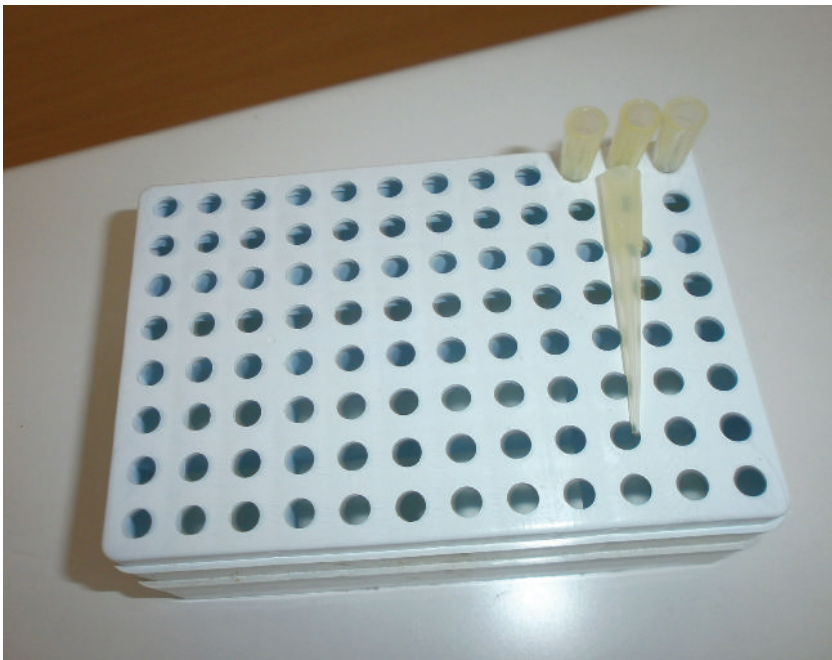
Slika 69. Plastične pipete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 70. Plastični štapići (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 71. Nastavci za mikropipetor (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 72. Nastavci za mikropipetor u plastičnom stalku (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 73. Plastične sterilne posude za pakovanje i transport uzoraka (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 74. Plastična boca sisaljka (Bojanić Rašović, 2020)



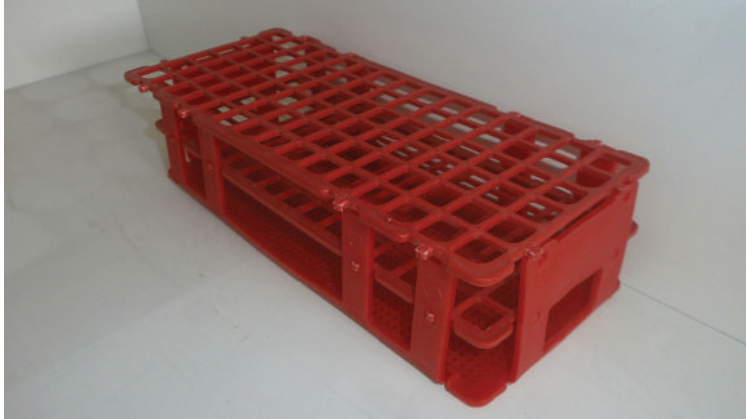
Slika 75. Plastične epruvetice za čuvanje zamrznutih bakterijskih kultura (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 76. Plastične epruvetice za čuvanje zamrznutih kultura mikroorganizama (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 77. Plastični čepovi za epruvete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 78. Plastični stalak za epruvete (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 79. Čaša za sedimentaciju (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 80. Plastične kese za homogenizaciju uzoraka u stomaheru (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 81. Plastične posude za destilovanu vodu (Bojanić Rašović, 2020)

Osnovni aparati u mikrobiološkoj laboratoriji

Neophodni aparati i instrumenti u mikrobiološkoj laboratoriji su: mikroskop, autoklav, Kohov lonac, inkubator, suvi sterilizator, biosigurnosni kabinet (laminarna komora), vodeno kupatilo, frižider, zamrzivač, homogenizator, vorteks, pH metar, šejker, spektrofotometar, aparat za brojanje kolonija mikroorganizama, tehnička vaga, analitička vaga, centrifuga, rešo (električni štednjak) i dr. (slike 82 – 104).



Slika 82. Svjetlosni mikroskop sa fotoaparatom (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 83. Stereo mikroskop – binokularna lupa (Bojanić Rašović, 2017)



Slika 84. Mali autoklavi (mogu da posluže i kao Kohov lonac, ukoliko se poklopac ne zatvori hermetički)



Slika 85. Termostati - inkubatori za inkubaciju zasijanih hranljivih podloga na određenim temperaturama (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 86. Unutrašnjost inkubatora za rast mikroorganizama na određenoj temperaturi (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 87. Politermostat (višeomorni inkubator) (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 88. Suvi sterilizator (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 89. Biosigurnosni kabinet (laminarna komora) za rad u aseptičnim uslovima (Bojanić Rašović, 2020)



Slike 90 i 90a: Vodeno kupatilo (Bojanić Rašović, 2019)



Slika 91. Frižider sa zamrzivačem na -20 °C (Bojanić Rašović, 2020)



*Slika 92. Frižideri za čuvanje podloga i kultura mikroorganizama
(Bojanić Rašović, 2019)*



*Slika 93. Zamrzivač za duboko zamrzavanje (na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$)
(Bojanić Rašović, 2019)*



Slika 94. Laboratorijska digitalna vaga (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 95. Homogenizator uzoraka - stomaher (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 96. Vorteks (mućkalica) bakterijskih suspenzija i drugih tečnosti (Bojanić Rašović, 2020)



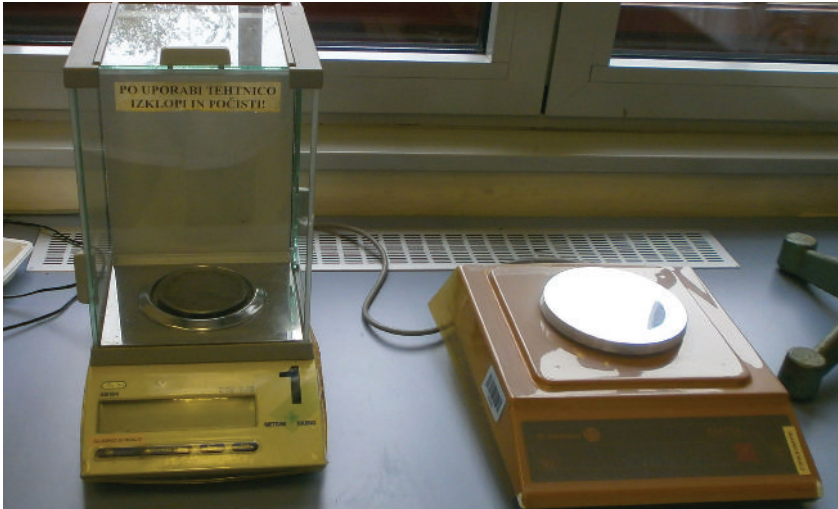
Slika 97. Šejker (Čogurić, 2020)



Slika 98. Laboratorijski pH metar (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 99. Ubodni terenski pH metar (Bojanić Rašović, 2020)



*Slika 100. Analitička vaga (levo) i tehnička vaga (desno)
(Bojanić Rašović, 2020)*



Slika 101. Laboratorijska centrifuga (Bojanić Rašović, 2019)



Slika 102. Destilator (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 103. Spektrofotometar (Bojanić Rašović, 2019)



Slika 104. Električni rešo za pripremanje hranljivih podloga (Bojanić Rašović)

Pranje i priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju

Pranje laboratorijskog posuđa

Pranje laboratorijskog posuđa se vrši u posebnoj prostoriji (slika 105).



*Slika 105. Prostorija za pranje laboratorijskog posuđa
(Bojanić Rašović, 2020)*

Svi sudovi koji se koriste u mikrobiologiji se prije upotrebe moraju oprati i sterilisati. Novo posuđe se može odmah prati. Korišćeno posuđe se prethodno sterilizuje u autoklavu na 120°C, pa tek onda pere. Prije pranja se prethodno uklone 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. Sudovi koji se na ovaj način ne mogu dobro oprati potapaju se u rastvor kalijum bihromata i sumporne kisjeline u destilovanoj vodi – hromsumpornoj kisjelinu najmanje 24h (slika 106). Ovaj rastvor se priprema na sljedeći način: 100 g kalijum bihromata se uz zagrijavanje rastvori u 1000 ml destilovane vode. Kada se rastvor ohladi, oprezno i polagano mu se doda 100 ml koncentrovane sumporne kisjeline.

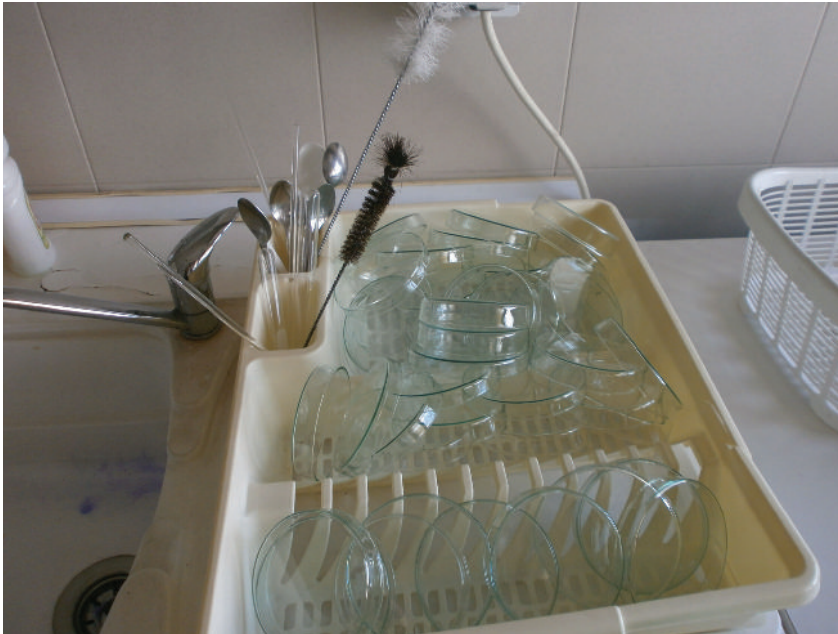


Slika 106. Rastvor hromsumporne kisjeline (Bojanić Rašović, 2020)

Nakon pranja, laboratorijsko posuđe se ispira nekoliko puta destilovanom vodom, cijedi i suši na sobnoj temperaturi (slike 107 i 108).



Slika 107. Stalak za cijedenje laboratorijskog posuđa (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 108. Cijeđenje opranog laboratorijskog posuđa (Bojanić Rašović, 2020)

Tako oprano i osušeno posuđe (slika 109) se može dalje pripremati za sterilizaciju u suvom sterilizatoru.



Slika 109. Oprane i osušene Petri ploče (Bojanić Rašović, 2020)

Priprema laboratorijskog posuđa za sterilizaciju

Svaki sud se prije sterilizacije umotava u čisti bijeli, tanki papir. Epruvete, boce i menzure se prije sterilizacije zatvaraju zapašaćima od papirne ili pamučne vate. Epruvete za sterilizaciju se pakuju u pakete od po 20 komada. Boce se zatvaraju zapašaćem koji se prekriva dvoslojnim papirom čiji krajevi se skrate makazama. Pipete se prije sterilizacije zapašavaju vatom – na kraj koji ide prema ustima, a zatim umotavaju u dugačko isječene trake papira. Pipete se prije sterilizacije mogu grupisati prema veličini, u snopove od 10 komada i zatim se povezuju tankim bijelim papirom. Petrijeve ploče se pakuju svaka posebno ili u pakete od 3-4 komada (slike 110-113).



Slika 110. Petri ploče (po 4 komada) umotane u bijeli papir - pripremljene za sterilizaciju (Bojanić Rašović)



Slika 111. Epruvete sa papirnim čepovima (Bojanić Rašović)



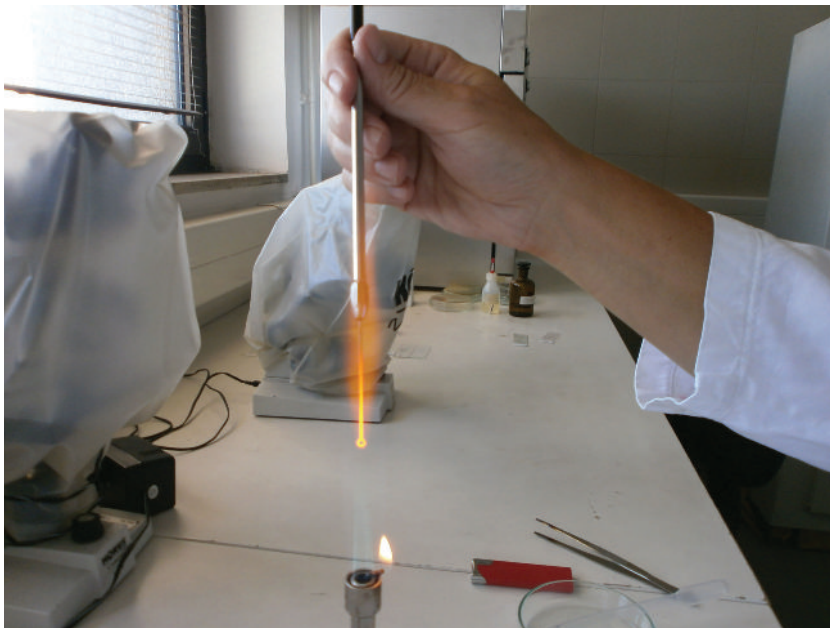
Slika 112. Epruvete (20 epruveta) umotane u bijeli papir - pripremljene za sterilizaciju (Bojanić Rašović)



Slika 113. Laboratorijsko posuđe umotano u bijeli papir – pripremljeno za sterilizaciju (Bojanić Rašović)

Metode sterilizacije u mikrobiološkoj laboratoriji

Sterilizacija je postupak kojim se uništavaju svi mikroorganizmi i njihove spore. Izvodi se fizičkim metodama - suvom toplotom i vlažnom toplotom. Primjena suve toplote obuhvata: spaljivanje, opaljivanje na plamenu (žarenje, slika 114) i sterilizaciju vrućim vazduhom (u suvom sterilizatoru, na temperaturi 160-180 °C, 1-2 sata, slika 115).



Slika 114. Žarenje eze na plamenu (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 115. Sivi sterilizator (Bojanić Rašović, 2020)

Sterilizacija vlažnom toplotom - **bez pritiska** vodene pare se zove tindalizacija ili frakciona sterilizacija i vrši se vodom zagrijanom na temperaturi do 100°C, u trajanju od 30 min i ponavljanjem u toku 3 dana. Izvodi se u vodenom kupatilu ili 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 se nalazi termometar i otvor za izlazak pare. Kohov lonac se primjenjuje za sterilizaciju rastvora i hranljivih podloga koji ne mogu izdržati temperaturu preko 100°C, kao što su npr. hranljivi želatin i podloge sa ugljenim hidratima. Sterilizacija se vrši 30-60 minuta tri dana uzastopno (frakciona sterilizacija - tindalizacija). Do sljedećeg zagrijavanja, podloga se stavlja u termostat, da bi spore koje nijesu uništene do sljedećeg dana prokljale.

Sterilizacija vlažnom toplotom **pod pritiskom** vodene pare izvodi se u **autoklavu**, pod pritiskom vodene pare od jedne atmosfere (98,066 kPa) i na temperaturi od 120 °C. Autoklav je cilindrični uređaj, postavljen vertikalno (slike 116 i 117) ili horizontalno (slika 118) sa dvostrukim zidovima od čelika i teškim poklopcem koji se zatvara zavrtnjima.



Slika 116. Vertikalni autoklav (Bojanić Rašović, 2013)



Slika 117. Vertikalni autoklav (Čogurić)



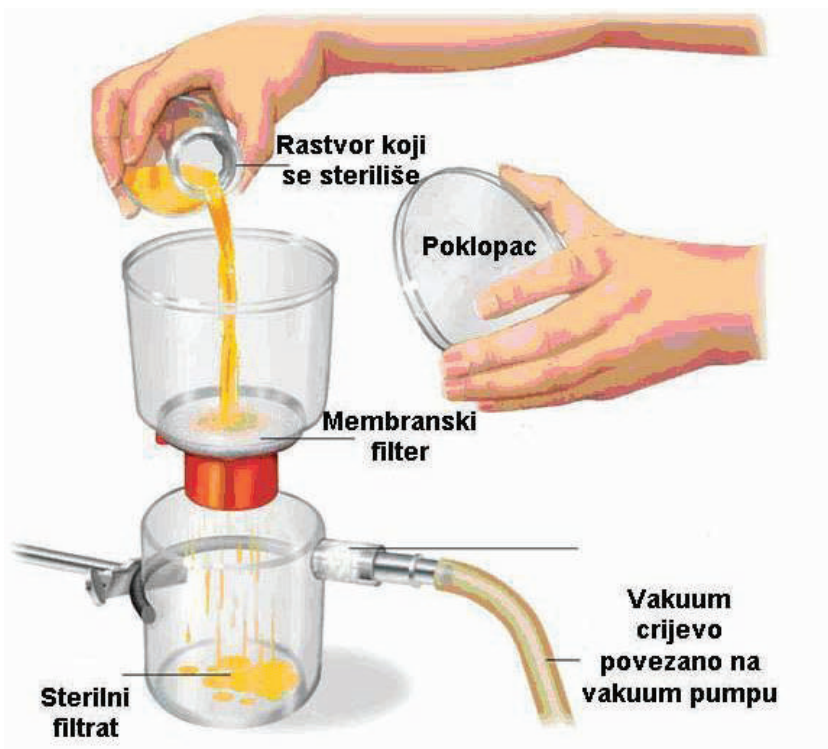
Slika 118. Horizontalni autoklav (Bojanić Rašović, 2019)

Autoklav se poklopcem hermetički zatvara, tako da vodena para ne može da izađe. Tako se obezbjeđuju uslovi za stvaranje pomenutog pritiska vodene pare. Unutar cilindra koji ima izgled komore stavljaju se predmeti koji se sterilišu. Ispod dna komore se nalazi prostor u koji se sipa destilovana voda, koja se zagrijava pomoću električnog grijača. Pomoću termometra i manometra ugrađenim na autoklavu, prate se promjene temperature i pritiska vodene pare u komori tokom sterilizacije.

Na autoklavu je ugrađen i sigurnosni ventil, koji se, u slučaju porasta pritiska vodene pare iznad zadanog, automatski otvara, što dovodi do smanjenja pritiska. Nakon što se stavi materijal koji se sterilise u komoru, zatvara se poklopac, istovremeno zavrtanjem po dva naspramna zavrtnja. Da bi sterilizacija bila uspješna i da ne bi došlo do pregorijevanja električnog grijača, prethodno uvijek treba provjeriti nivo destilovane vode u prostoru ispod komore autoklava. Ako je nivo vode ispod označene granice, neophodno je sipati destilovanu vodu u aparat. Zatim se otvara slavina za ispuštanje vodene pare, uključi se grijač i sačeka dok iz slavine ne počne da izlazi gusta para. To ukazuje da je vazdušni prostor ispunjen vodenom parom i da sterilizacija može da počne. Ukoliko bi bili prisutni vazdušni prostori koji nisu ispunjeni vodenom parom - tzv. vazdušni džepovi, sterilizacija neće biti uspješna. Nakon što je došlo do ispuštanja gustog mlaza vodene pare iz slavine, slavina se zavrne - zatvori i sačeka da temperatura i pritisak dostignu željeni nivo. Sterilizacija počinje od momenta kada se postigne željena temperatura i pritisak vodene pare i najčešće traje 15-20 minuta, nekad i duže, na temperaturi od 120 °C i pod pritiskom od 1 atmosfere. Kada istekne vrijeme za sterilizaciju, isključuje se grijač i, nakon što se pritisak i temperatura spuste, otvara se slavina za ispuštanje pare. Kada sva para izađe, pažljivo se odvrću zavrtnji poklopca (naizmjenično) i nakon par minuta poklopac se pažljivo otvara - jer para koja je zaostala u komori može da izazove opekotine. Kada se sterilisani materijal prohladi, može se izvaditi iz autoklava.

Sterilizacija filtracijom

Metoda sterilizacije filtracijom koristi se za sterilizaciju raznih tečnosti koje se ne mogu sterilisati toplotom (termolabilne komponente). Sterilizacija filtracijom se vrši procjeđivanjem tečnosti kroz različite filtre koji imaju pore kroz koje ne prolaze bakterije. Ova filtracija nije 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 sterilizaciju filtracijom najčešće se koriste azbestni, stakleni i membranski filtri. Filtri se montiraju u specijalni uređaj – Seitz (Sajc) uređaj (slike 119, 120, 121). Azbestni filtri su ploče debljine 3-5 mm i prečnika 35 i 140 mm. Membranski filtri se prave od acetata, celuloze ili nitroceluloze (slika 122). Nitrocelulozni filtri su građeni od gusto isprepletenih nitroceluloznih vlakana. U zavisnosti od veličine pora označavaju se rednim brojevima od 1 do 5.



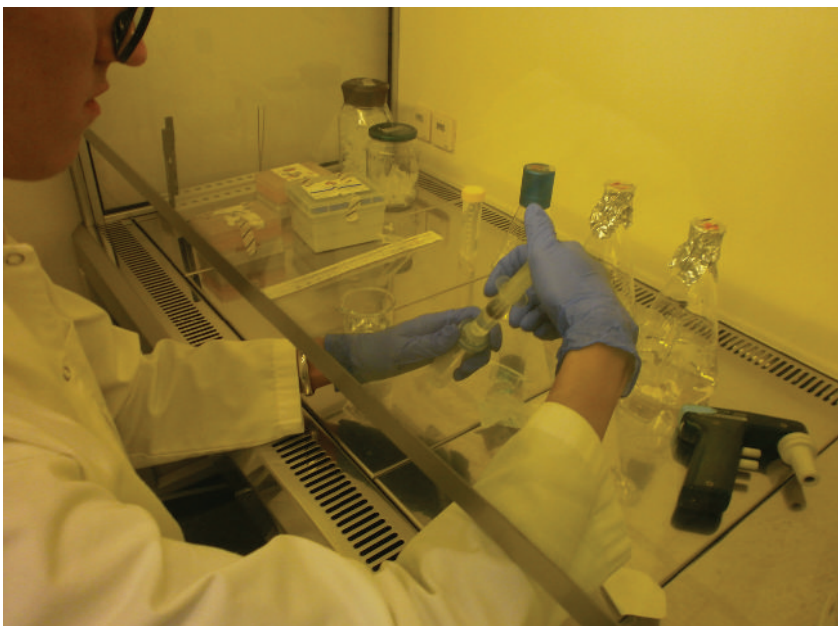
Slika 119. Seitzov uređaj (filtracija upotrebom vakuuma)



Slika 120. Uređaj za membransku filtraciju (Bojanić Rašović, 2019)



Slika 121. Filtracija tečnosti uz pomoć uređaja za membransku filtraciju (Seitz filter) (Bojanić Rašović, 2019)



Slika 122. Filtracija tečnosti kroz membranski filter uz pomoć šprica (Bojanić Rašović, 2020)

Sterilizacija zračenjem

Za sterilizaciju zračenjem koriste se UV (ultravioletni, ultraljubičasti zraci, slika 123). Prilikom njihove primjene treba biti vrlo oprezan i koristiti zaštitne naočare, jer mogu da dovedu do zapaljenja rožnjače oka. UV zraci takođe mogu da dovedu do steriliteta. Zato ne treba boraviti u prostoriji u kojoj djeluju UV zraci. Zbog slabe prodorne moći, UV zraci se koriste za djelimičnu sterilizaciju površina i vazduha prostorija (hirurška odjeljenja, porodilišta, laboratorije).



Slika 123. UV lampa (Bojanić Rašović)

Dezinfekcija

Dezinfekcija je postupak uništavanja mikroorganizama, koji ima za cilj da smanji broj mikroorganizama do broja koji ne predstavlja opasnost za zdravlje. Najznačajniji dezinficijensi su: halogeni i njihova jedinjenja: hlor i jedinjenja hlora (Na-hipohlorit, hloramini), jod i jedinjenja joda (tinktura joda), jedinjenja teških metala - žive, srebra, bakra, koja su toksična, fenolna jedinjenja - fenol (ima neprijatan miris), etil alkohol 70% (ne djeluje na spore), mikrobicidni gasovi (formaldehid, etilenoksid, propiolakton). Formaldehid ima izraženu sporocidnu aktivnost – uništava spore mikroorganizama.

VJEŽBA III

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 tehnike postoje za bojenje mikroskopskih preparata ?
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?

Priprema preparata za mikroskopsko posmatranje

Za mikroskopsko posmatranje bakterija mogu se pripremiti preparati iz kultura iz tečnih i čvrstih hranljivih podloga, kao i direktno iz ispitivanog materijala. Nakon nanošenja tečne ili čvrste kulture mikroorganizama na predmetno staklo, dalji postupci zavise od toga da li se priprema bojeni ili nativni mikroskopski preparat. Ukoliko se pravi bojeni mikroskopski preparat, kap kulture se ezom nanese na predmetno staklo i kružnim pokretima razvuče u što tanjem sloju. Što je preparat tanji, to je i njegova vidljivost posmatranjem pod mikroskopom veća. Nakon toga se preparat suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji. Ukoliko se priprema nativni preparat, kap kulture se nanese na predmetno staklo i pokriva pokrovnim staklom. Tako pripremljen nativni preparat je spreman za posmatranje pod mikroskopom.

Bojeni preparat od bakterijske kulture iz tečne hranljive podloge

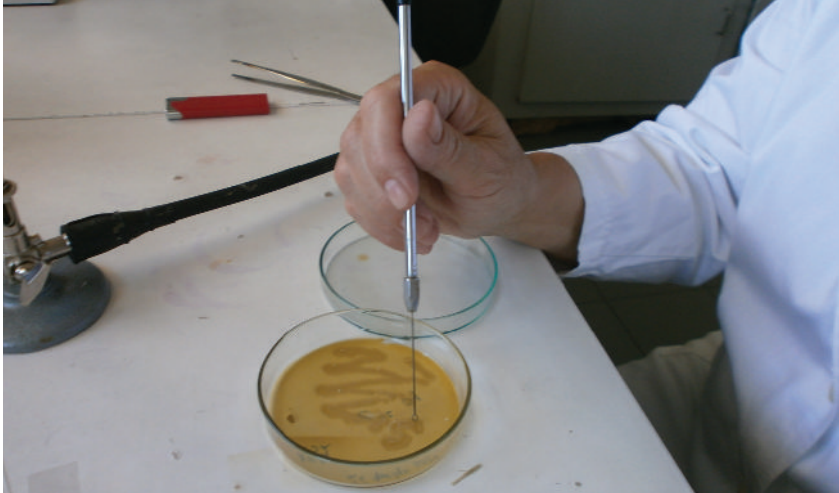
Bojeni preparat iz tečne hranljive podloge se priprema tako što se kap tečne kulture mikroorganizma ezom prenese na mikroskopsku pločicu i kružnim pokretima razvuče po pločici, kako bi razmaz bio što tanji (slika 124). Preparat se zatim suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji. Nakon bojenja preparat se ispira vodom, suši na vazduhu, a zatim posmatra pod mikroskopom imerzionim objektivom.



Slika 124. Tečna kultura mikroorganizama, materijal se uzima ezom i stavlja na mikroskopski preparat (Bojanić Rašović, 2020)

Bojeni preparat sa čvrste hranljive podloge

Preparat sa čvrste hranljive podloge se priprema tako što se prvo na mikroskopsku pločicu stavi jedna do dvije kapi fiziološkog rastvora, a zatim se dio kolonije ispitivanog mikroorganizma sa čvrste hranljive podloge uzet ezom suspenduje u tom fiziološkom rastvoru (slika 125). Kružnim pokretima eze suspenzija se razvuče po mikroskopskoj pločici u što tanjem sloju. Dobijeni razmaz se suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji. Nakon bojenja preparat se osuši na vazduhu i posmatra pod mikroskopom imerzionim objektivom.

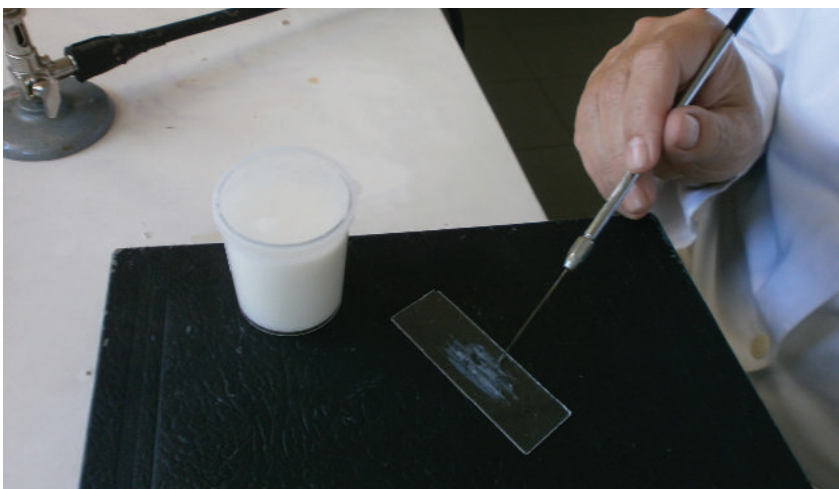


Slika 125. Uzimanje dijela kolonije za pripremu mikroskopskog preparata (Bojanić Rašović, 2020)

Bojeni preparat iz materijala

Materijal koji se ispituje može biti različit - gnoj, sekret, mlijeko, mokraća, krv, organi. Bojeni preparat iz materijala koji se lako razmazuje (mlijeko, krv, mokraća) pravi se razvlačanjem materijala na mikroskopskoj pločici bez upotrebe fiziološkog rastvora (slika 126).

Dobijeni razmaz se suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji. Nakon bojenja preparat se suši na vazduhu i posmatra imerzionim objektivom mikroskopa.



Slika 126. Pravljenje mikroskopskog preparata - razmaza iz kapi mlijeka (Bojanić Rašović, 2020)

Ako se preparat pravi iz čvrstog materijala – koji se teško razmazuje, postupak je isti kao kod pravljenja preparata iz kulture mikroorganizama sa čvrstih hranljivih podloga, koji je prethodno opisan. Na mikroskopsku pločicu, se, dakle, stavi jedna do dvije kapi fiziološkog rastvora, a zatim se dio čvrstog materijala uzme ezom i suspenduje u fiziološkom rastvoru. Kružnim pokretima eze suspenzija se razvuče po mikroskopskoj pločici u što tanjem sloju. Dobijeni razmaz se suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji. Nakon bojenja preparat se osuši na vazduhu i posmatra imerzionim objektivom.

Fiksiranje bojenih mikroskopskih preparata

Fiksiranje je postupak koji se primjenjuje u pripremi bojenih mikroskopskih preparata, kako bi razmaz prionuo za staklo. Ovim postupkom se mikroorganizmi i ubijaju, pa preparati postaju bezbjedni za rukovanje. Većina preparata, osim krvnih, fiksiraju se toplotom, odnosno plamenom. Preparat se fiksira na plamenu tako što se tri puta provuče kroz sredinu plamena, praveći pri tome luk, tj. razmak od plamena od oko 25 cm. Mikroskopska pločica se prilikom fiksacije drži pincetom (slika 127). Krvni preparati se fiksiraju obično metil alkoholom 3-5 minuta, koji se zatim odlije i ostavi da ispari. Za fiksiranje se mogu koristiti i aceton, etar, etaralkohol ili apsolutni etanol.



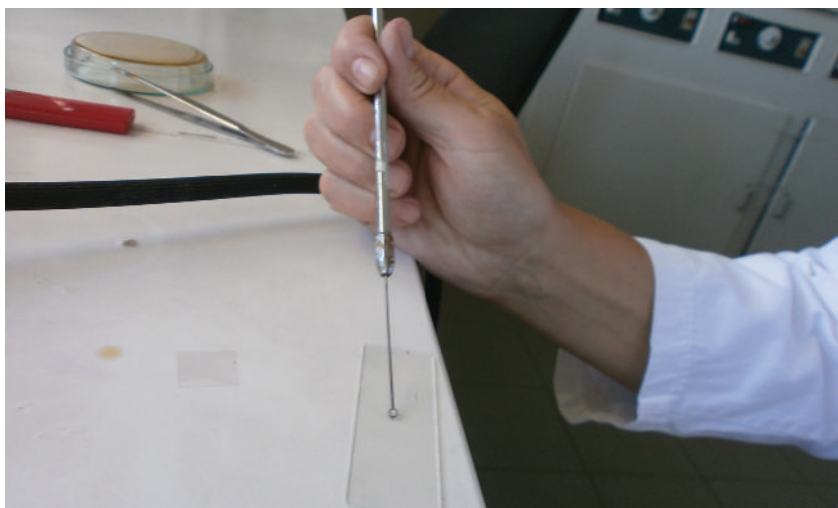
*Slika 127. Fiksacija mikroskopskog preparata na plamenu
(Bojanić Rašović, 2020)*

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,
2. U preparatu koji je poznat kao „viseća kap“

Običan nativni preparat se pravi tako što se kap tečne bakterijske kulture prenese na mikroskopsku pločicu, a zatim prekrije pokrovnom pločicom (slike 128, 129, 130 i 131).



Slika 128. Pravljenje nativnog preparata (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 129. Stavljanje pokrovnog stakla na naneseu kap materijala na mikroskopskoj pločici (Bojanić Rašović, 2020)

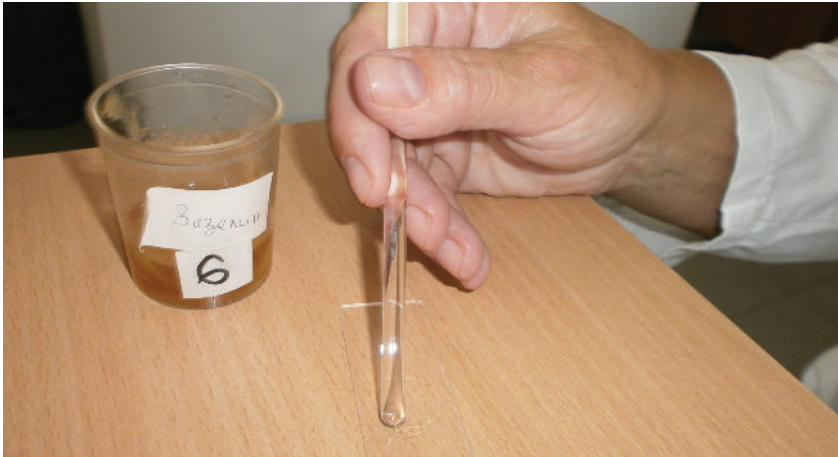


Slika 130. Nativni preparat (Bojanić Rašović, 2020)

Ako se za pravljenje preparata koristi kultura sa čvrste podloge, prethodno se djelić kolonije uzete ezom suspenduje u par kapi fiziološkog rastvora. Za pravljenje preparata „viseća kap” upotrebljavaju se specijalna predmetna stakla koja imaju udubljenje i pokrovne ljustpice. Kap kulture iz tečne podloge ili kap bakterijske suspenzije u fiziološkom rastvoru se stavi na pokrovnu ljustpicu, a zatim se ljustpica okrene tako da kap sada bude sa donje strane ljustpice. Tako okrenuta ljustpica se stavi iznad udubljenja na predmetnom staklu, pri čemu kap treba da visi u udubljenju (slika 131). Kako bi se ljustpica zalijepila, površina oko udubljenja se prethodno namaže vazelinom. Vazelin se oko udubljenja staklenim štapićem nanosi u obliku kvadrata veličine ljustpice (pokrovnog stakla) (slika 132). Na taj način se dobije zatvorena komorica u kojoj ne dolazi do sušenja kapi. Ovako pripremljen preparat „viseća kap” (slika 133) se posmatra pod mikroskopom, u malo zamračenom vidnom polju, uz pomoć velikog ili imerzionog objektiv



Slika 131. Stavljjanje pokrovnog stakla iznad udubljenja na mikroskopskoj pločici (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 132. Nanošenje vazelina oko udubljenja na mikroskopskoj pločici (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 133. Preparat viseća kap (Bojanić Rašović, 2020)

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, metil violet,
- zelene boje: metil zeleno, malahit zeleno.

Za bojenje bakterija koriste se rastvori boja (slika 134). Obično se prvo boja rastvori u alkoholu, a zatim se priprema rastvor željene koncentracije sa destilovanom vodom. Boja se u konačnom - radnom 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.



Slika 134. Rastvori boja za bojenje mikroorganizama (Bojanić Rašović, 2020)

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 bojenja: metilensko plavim, karbol-fuksinom i kristal violet (gencijana violet, gencijana ljubičastom) bojom.

Bojenje metilensko plavim

Priprema boje i bojenje

Rastvor A:

metilensko plavo.....0,3 g
96% etilalkohol.....30 ml

Rastvor B:

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

Rastvor A se pomiješa sa rastvorom B i dobro promućka. Osušeni i fiksirani mikroskopski preparat se prelije ovako pripremljenom bojom i ostavi da djeluje 45-60 sekundi. Ovim bojenjem citoplazma mikroorganizama se oboji svijetloplavo, jedro eukariotskih mikroorganizama tamnoplavo, a sluz ružičasto.

Bojenje karbolfuksinom

Rastvor A:

bazni fuksin.....0,3 g
96% etanol.....10 ml

Rastvor B:

fenol.....5 g
destilovana voda.....95 ml

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. Preparat se oboji različitim nijansama crvene boje.

Složena bojenja

Bojenje po Gramu

Od složenih bojenja najčešće se koristi bojenje po Gramu. Bojenje je dobilo naziv po danskom ljekaru i bakteriologu Hansu Christianu Gramu (1853 -1938), koji je 1884. godine izumio i razvio ovu tehniku bojenja. Bojenje po Gramu je najznačajnije bojenje bakterija. Za ovo bojenje je potrebno nekoliko boja, a to su: karbol gencijana violet (rastvor gencijane violet u karbolnoj kisjelinu - fenolu, slika 135), rastvor lugola i karbolfuksin. Za bojenje se koriste radni rastvori boja, koji se pripremaju iz zasićenih rastvora boja.

Zasićeni (matični) rastvor gencijane violet (kristal violet):

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

Radni rastvor karbol gencijane violet:

zasićeni rastvor gencijane violet.....10 ml
2% rastvor karbolne kisjeline (fenol) u destilovanoj vodi.....1 ml
destilovana voda.....100 ml

Ovako pripremljeni rastvor se koristi za bojenje mikroskopskih preparata.



*Slika 135. Radni rastvor karbol gencijana violet (kristal violet)
(Bojanić Rašović, 2020)*

Lugolov rastvor:

jod..... 1 g,
kalijum jodid..... 2 g,
destilovana voda.....300 ml

Napomena: Prilikom pripreme lugolovog rastvora, destilovanoj vodi se prvo dodaje kalijum jodid, a zatim jod, kako bi se jod rastvorio.

Zasićeni rastvor karbol fuksina:

bazni fuksin.....8 g
96% etanol.....100 ml

Radni rastvor karbol fuksina:
zasićeni rastvor karbol fuksina10 ml
5% rastvor karbolne kisjeline u destilovanoj vodi.....100ml

Od ovog rastvora za bojenje se priprema 1% vodeni rastvor.

Postupak bojenja po Gramu

Bojenje po Gramu izvodi se na sljedeći način: rastvor karbol-gencijane violet se prelije preko fiksiranog preparata i ostavi da djeluje 3 minuta (slika 136).

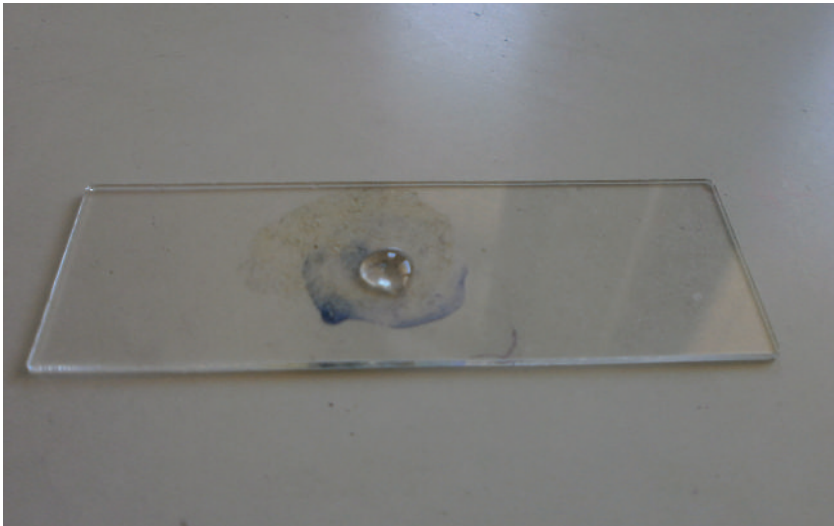


Slika 136. Bojenje po Gramu - prelivanje mikroskopskog preparata gencijana violet bojom (Bojanić Rašović, 2020)

Zatim se boja odlije, bez ispiranja vodom. Nakon toga preparat se prelije rastvorom lugola, koji se ostavi da djeluje 2 minuta, a zatim se odliva sa preparata. Odbojavanje se vrši 96% etanolom, kap po kap, sve dok je boja prisutna u kapima koje se slivaju niz preparat. Nakon odbojavanja alkoholom, preparat se ispire vodom. Diferencijalno bojenje se vrši karbolfuksinom u trajanju od 30 sekundi. Nakon bojenja karbolfuksinom, preparat se dobro ispere vodom i osuši na vazduhu. Osušeni mikroskopski preparat se posmatra imerzionim objektivom mikroskopa (koji daje uveličanje 100x). Prije posmatranja ovim objektivom, neophodno je na mikroskopski preparat nanijeti kap imerzionog (kedrovog) ulja (slike 137 i 138).



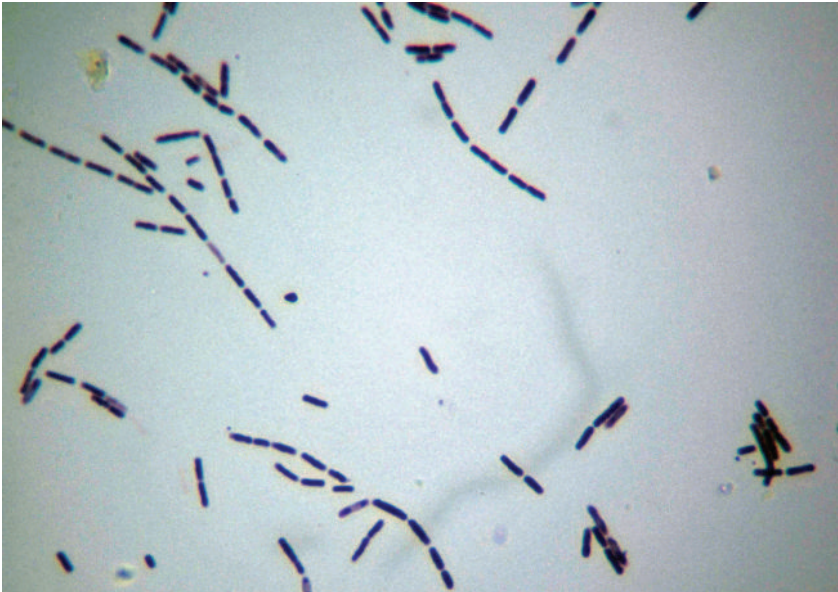
Slika 137. Stavljjanje kapi kedrovog ulja na mikroskopski preparat (Bojanić Rašović, 2020)



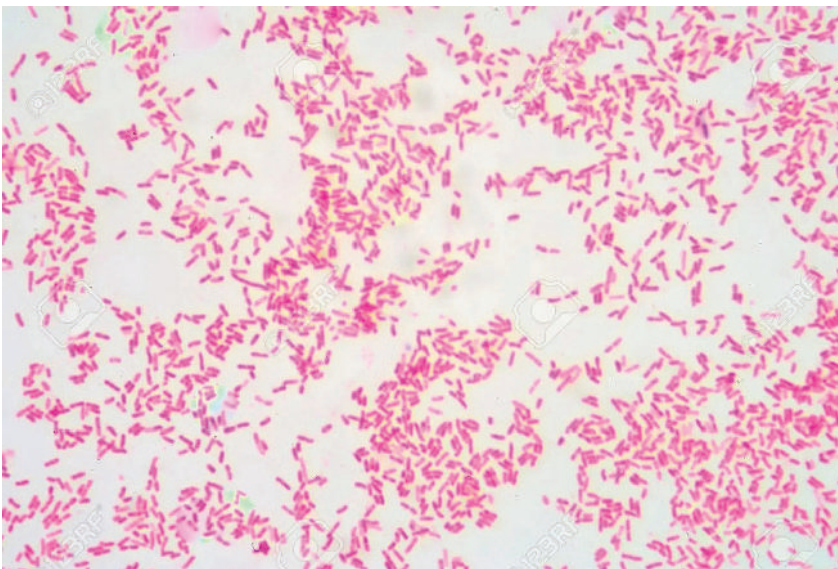
Slika 138. Mikroskopski preparat pripremljen za posmatranje imerzionim objektivom – nanescena kap kedrovog ulja (Bojanić Rašović, 2020)

Gram pozitivne bakterije se boje plavo do plavo ljubičasto, a gram negativne roze do crveno i tako se vide pod mikroskopom (slike 139 i 140). Ove razlike su zbog toga što Gram pozitivne bakterije imaju ćelijski zid građen od debelog sloja peptidoglikana, koji zadržava kristal violet-jodni kompleks koji se stvara tokom bo-

jenja, dok gram negativne bakterije u sastavu ćelijskog zida imaju tanak sloj peptidoglikana i lipopolisaharidnu membranu i ne zadržavaju kristal violet-jodni kompleks nakon odbojavanja etanolom. Nakon što se odboje etanolom, gram negativne bakterije mogu da prime kontrastne – crvene boje, kao što su karbolfuksin ili safranin.



Slika 139. Gram pozitivne bakterije - bojenje po Gramu (Bojanić Rašović)



Slika 140. Gram negativne bakterije (1000 x)

https://www.123rf.com/photo_38484916_gram-staining-gram-negative-bacilli.html

Važne napomene koje treba imati u vidu prilikom bojenja po Gramu: pošto se lugolov rastvor raspada u prisustvu svjetlosti i na povišenim temperaturama, mora se čuvati u tamnim bocama i na sobnoj temperaturi. Ukoliko se primijeni neispravan lugolov rastvor, alkoholom se odboje i gram pozitivne bakterije. Najosjetljiviji proces prilikom bojenja po Gramu je odbojavanje alkoholom, jer se pri tome bakterije mogu previše odbojiti, tako da se gram pozitivne bakterije oboje crveno - kao što se boje gram negativne bakterije. S druge strane, u procesu odbojavanja alkoholom bakterije se mogu i nedovoljno odbojiti, kada se gram negativne bakterije oboje lju-bičasto-plavo - kao što se boje gram pozitivne bakterije.

Bojenje acidoalkoholo rezistentnih bakterija po Ziehl-Neelsenu

Bojenje se koristi za otkrivanje i posmatranje acidoalkoholo rezistentnih bakterija (bakterije iz roda *Mycobacterium*). One u spoljašnjem omotaču imaju jednu voštanu materiju, koja teško otpušta primljenu boju, čak i ako se za odbojavanje koristi alkohol sa dodatkom hlorovodonične kisjeline. Zbog toga se takve bakterije i nazivaju acidoalkoholo rezistentnim, jer su otporne na odbojavanje ne samo alkoholom, već i kisjelinom. Za ovo bojenje potrebne su sljedeće boje: karbolfuksin po Ziehl-Neelsenu i metilensko plavo po Ziehl-Neelsenu.

Karbol fuksin po Ziehl-Neelsenu:

Rastvor A:
bazni fuksin.....0,3 g
96% etanol.....10 ml

Rastvor B:
fenol.....5 g
destilovana voda.....95 ml

Jednake količine rastvora A i rastvora B se pomiješaju i dobro promućkaju.

Metilensko plavo po Ziehl-Neelsenu:

Rastvor A:
Metilensko plavo.....0,3 g
96% etilalkohol.....30 ml

Rastvor B:
0,1% vodeni rastvor kalijum hidroksida (KOH).....100 ml

Rastvor A se pomiješa sa rastvorom B i dobro promućka.

Postupak bojenja po Ziehl-Neelsenu:

Bojenje po Ziehl-Neelsenu se izvodi na sljedeći način: preparat se prelije karbolfuksinom po Ziehl-Neelsenu, a zatim se zagrijava na plamenu, 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 (3 ml koncentrovane HCl i 97 ml 96% etanola), sve dok razmaz otpušta crvenu boju. Preparat se ponovo opere vodovodnom vodom, a zatim prelije kontrastnom bojom - metilensko plavim po Ziehl-Neelsenu i boji 3-5 minuta. Nakon toga preparat se opere vodovodnom vodom i osuši. Acidoalkoholo rezistentne bakterije se boje crvenom, a sve ostale bakterije i tkivo plavom bojom.

Bojenje po Giemsi

Bojenje po Giemsi se koristi za bojenje bakterija koje se teško boje drugim metodama. Bojenje je dobilo naziv po njemačkom hemičaru i bakteriologu Gustavu Gimzi (Gustav Giemsa, 1867 – 1948), koji ga je prvi primijenio. Najčešće se koristi za bojenje spiroheta i protozoa. Ovaj metod je vrlo osjetljiv i daje dobre rezultate jedino ako se sasvim ispoštuje procedura bojenja. Osnovni rastvor Giemse je mješavina boja azura, eozina i metilensko plavog (slika 141).



Slika 141. Osnovni rastvor Giemse (Bojanić Rašović, 2020)

Azur II je mješavina metilensko azur (azur I, azur B, trimetiltionin hlorid) i metilensko plavog u jednakim količinama. Eozin je sjajno crvena boja - kalijumova ili natrijumova so tetrabromfluoresceina.

Osnovni rastvor Giemse:

Azur II eozin.....	3 g
Azur II.....	0,8 g
Glicerol.....	250 ml
Metanol.....	250 ml

Upotrební rastvor Giemse:

osnovni rastvor Giemse.....	1 kap
destilovana voda.....	1 ml

Upotrební - radni rastvor za svako bojenje se priprema svjež.

Postupak bojenja po Giemsi:

Bojenje ovako pripremljenim rastvorom traje 30 minuta, nakon čega se preparat ispira destilovanom vodom i suši na vazduhu. Pravilno obojen preparat ima ružičastoljubičastu boju. Ukoliko bakterije imaju kapsulu, kapsule se boje crveno, a bakterijska ćelija plavo.

Bojenje po Neisseru

Ovo bojenje se koristi za posmatranje bakterija iz roda *Corynebacterium*. Za ovo bojenje potrebni su rastvori boja Neisser I i Neisser II. Rastvori Neisser I i Neisser II se prave od rastvora A, B i C.

Rastvor A:

metilensko plavo.....	1 g
96% alkohol.....	20 ml
destilovana voda.....	950 ml
glacijalna sirćetna kisjelina.....	50 ml

Rastvor B:

kristal violet.....	1 g
96% alkohol.....	10 ml
destilovana voda.....	300 ml

Rastvor C:

hrizoidin.....2 g

destilovana voda.....100 ml

Neisser I se dobija kada se pomiješaju dva dijela rastvora A i jedan dio rastvora B. Rastvor C je Neisser II.

Postupak bojenja po Neisseru:

Fiksirani mikroskopski preparat se prelije rastvorom Neisser I i ostavi 2-3 minuta, a zatim se ispere vodom. Isprani preparat se prelije rastvorom Neisser II i ostavi 5-10 sekundi. Preparat se zatim ispere vodom i osuši na vazduhu. Bakterije iz roda *Corynebacterium* se ovim bojenjem oboje žuto, a metahromatična zrna koja se nalaze u citoplazmi korinebakterija tamnoplavo.

Bojenje bakterijskih spora

Bojenje spora po Schäfferu i Fultonu

Fiksirani mikroskopski preparat se prelije 5% vodenim rastvorom malahit zelenog i ostavi da djeluje 1-2 minuta, a zatim se zagrijava 0,5-1 minut - do pojave pare. Preparat se zatim ispere vodom i prelije 0,5% vodenim rastvorom safranina i ostavi da djeluje 0,5-1 minut. Preparat se ponovo ispere vodom i osuši na vazduhu. Bakterijske spore se oboje zeleno, a bakterijska tijela crveno. Bakterijske spore teško primaju boju, zato se za njihovo bojenje koriste koncentrovane boje, uz zagrijavanje, kako bi boja prodrila - difundovala u spore.

Bojenje bakterijskih kapsula

Bojenje po Oltu

Mikroskopski preparat se osuši na vazduhu, fiksira na plamenu, a zatim prelije 2-3% vodenim rastvorom safranina. Boju zagrijavati do pojave pare i ostaviti je da djeluje još 2-3 minuta. Preparat se opere vodom, osuši na vazduhu i posmatra pod mikroskopom - imerzionim objektivom. Ovim bojenjem bakterijska kapsula se boji žuto, a bakterijsko tijelo crveno.

Bojenje po Fothu

Mikroskopski preparat se osuši na vazduhu, fiksira na plamenu i prelije sa dvije kapi osnovnog - zasićenog rastvora po Giemsi. Poslije 1-2 minuta se doda oko 20 kapi (1 ml) neutralne destilovane vode i blago promiješa. Boja treba da djeluje 2-5 minuta. Ovo bojenje se koristi za dokazivanje kapsula *Bacillus anthracis*. Kapsule se oboje crveno, a bakterijsko tijelo plavo.

VJEŽBA IV

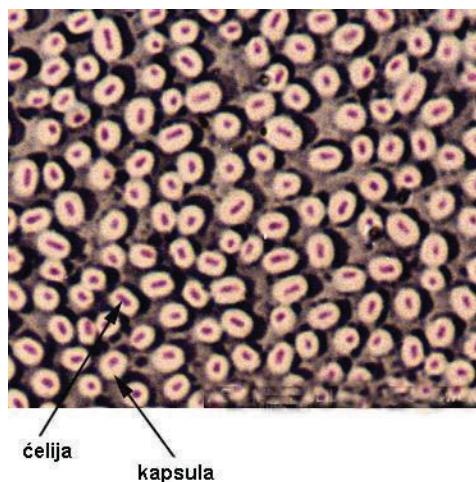
MORFOLOGIJA BAKTERIJA, GLJIVA, PROTOZOA I VIRUSA

Pitanja

1. Kako se dijele bakterije prema bojenju po Gramu?
2. Nacrtaj sljedeće bakterije bojene po Gramu: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus agalactiae* i *Escherichia coli*.
3. Šta su hife?
4. Šta je micelijum?
5. Nacrtaj kvasce iz rodova *Candida* i *Saccharomyces*.
6. Nacrtaj plijesni iz rodova: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Mucor* i označi pojedine njihove strukture.
7. Nacrtaj virus bakterija – bakteriofag.

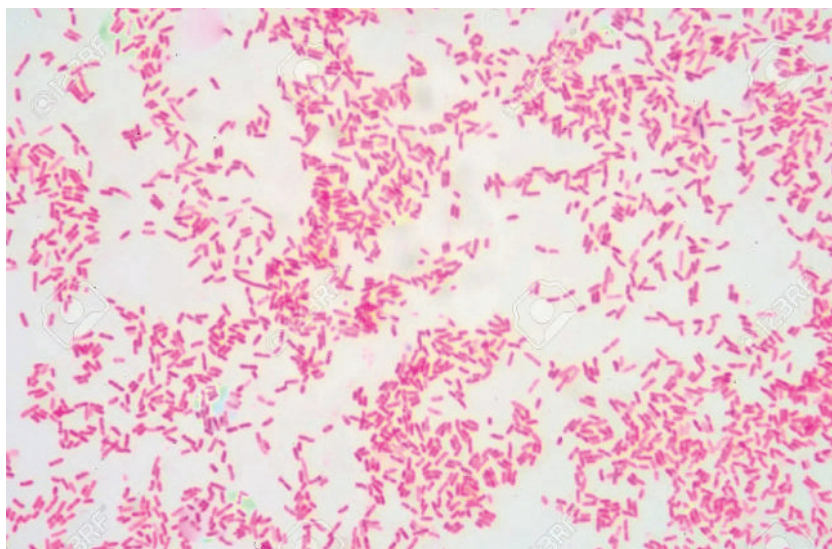
Građa bakterija

Bakterije imaju prokariotsku građu ćelije. Bakterije posjeduju: ćelijski zid, **citoplazmatsku membranu**, sa njenim ulegnućima u vidu vezikula, tubula i lamela (mezozomi), **citoplazmu**, u kojoj se nalaze ribozomi i nukleoid (primitivno jedro – bez jedarne membrane). Neke bakterije ne posjeduju ćelijski zid (mikoplazme, rikecije). Pored navedenih, pojedine vrste bakterija mogu da imaju i sljedeće strukture: **kapsulu**, **flagele**, **fimbrije**, **pile**, **tilakoide** i **plazmide**. **Kapsula** je spoljašnji, sluzavi omotač bakterije. Ona 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 142).

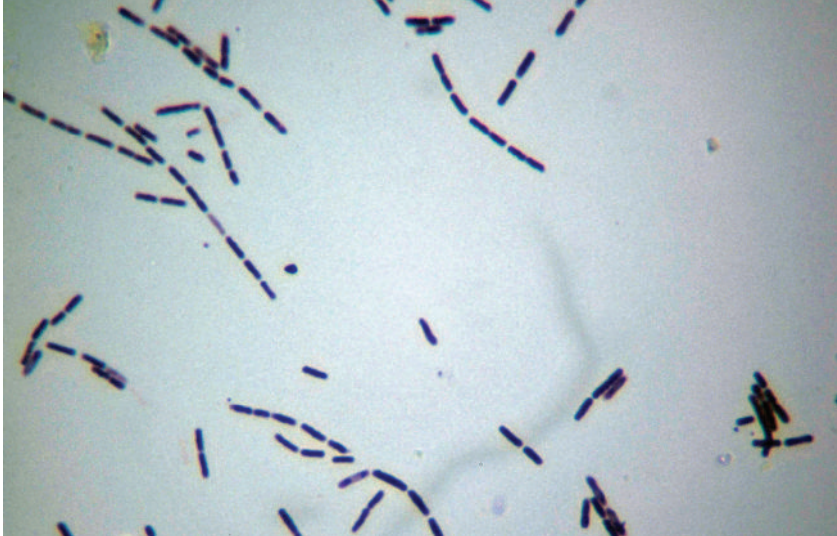


Slika 142. Kapsula – neobojena, svijetla zona oko bakterijske ćelije
<https://microbeonline.com/bacterial-capsule-structure-and-importance-and-examples-of-capsulated-bacteria>

Oštećenje ćelijskog zida dovodi do smrti bakterije. Prema sastavu ćelijskog zida i bojenju po Gramu, bakterije se dijele na: gram-pozitivne i gram-negativne. Gram-negativne bakterije imaju sloj lipopolisaharida u sastav ćelijskog zida, dok gram-pozitivne nemaju, usljed čega se prve boje crveno (slika 143, a druge ljubičasto (slika 144).

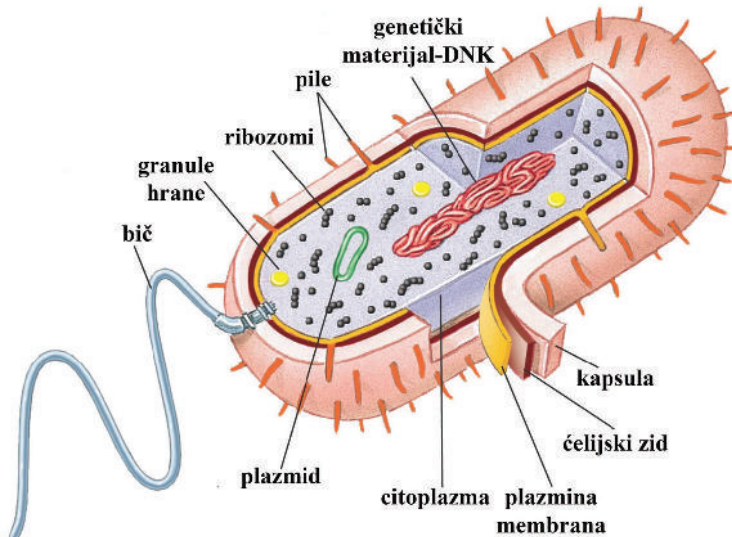


Slika 143. Gram negativne štapičaste bakterije (1000 x)
https://www.123rf.com/photo_38484916_gram-staining-gram-negative-bacilli.html



*Slika 144. Gram pozitivne sporogene bakterije - bacili (Bacillus spp.)
(Bojanić Rašović, 1000x)*

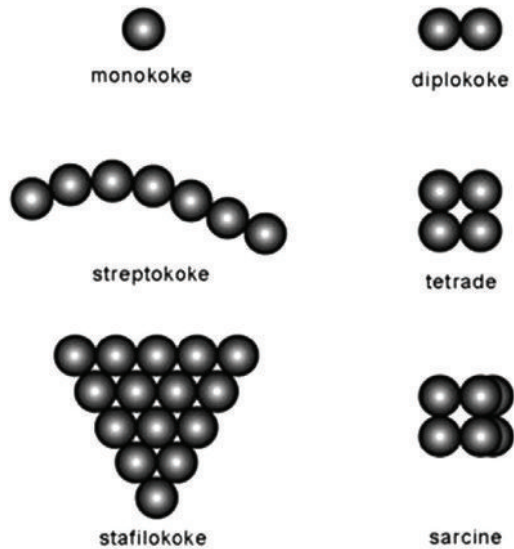
Flagele (bičevi) su dugi, tanki izraštaji kojima se bakterije kreću. Izgrađene su od proteina flagelina. Gubitkom bičeva bakterije postaju nepokretne. **Fimbrije** su končasti izraštaji raspoređeni oko tijela bakterije i ima ih na stotine. Proteinske su prirode. Njihova uloga je u pričvršćivanju bakterije za podlogu. **Pile** su takođe končasti izraštaji, ali koji imaju ulogu u pripajanju dvije ćelije i razmjeni genetskog materijala pri razmnožavanju (slika 145).



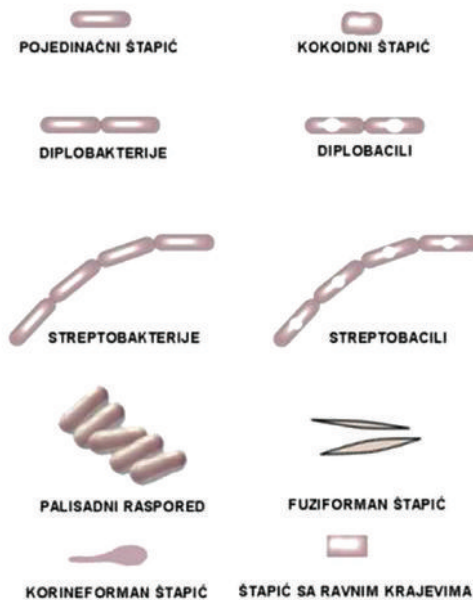
Slika 145. Šematski prikaz građe bakterijske ćelije

Osnovni oblici bakterija

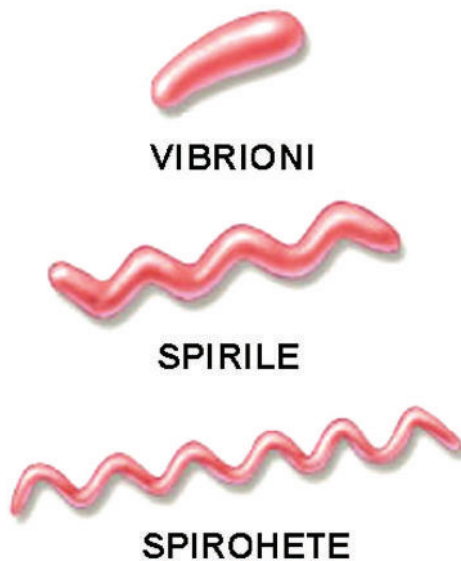
Osnovni oblici bakterija su: okrugao, štapićast, spiralan i končast (slike 146-148).



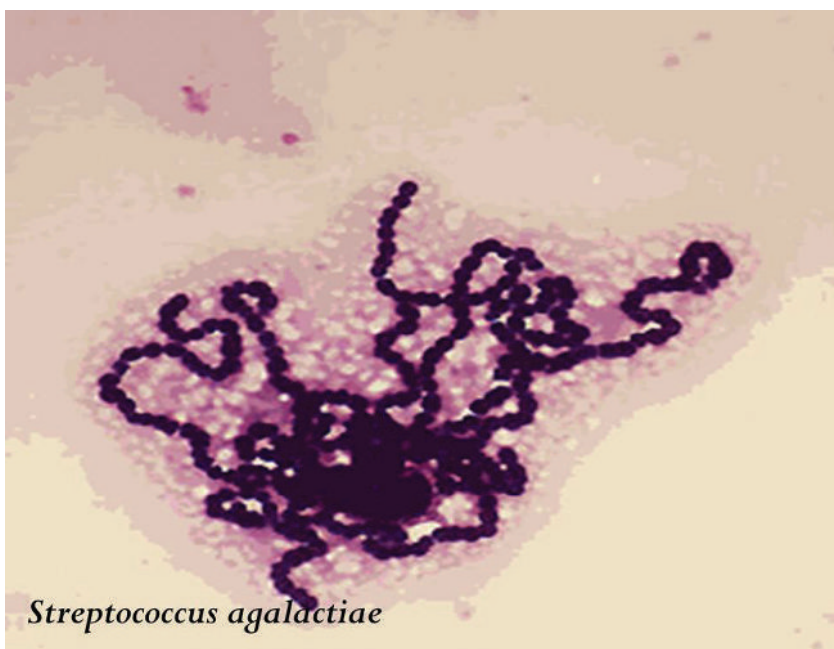
Slika 146. Šematski prikaz okruglih bakterija



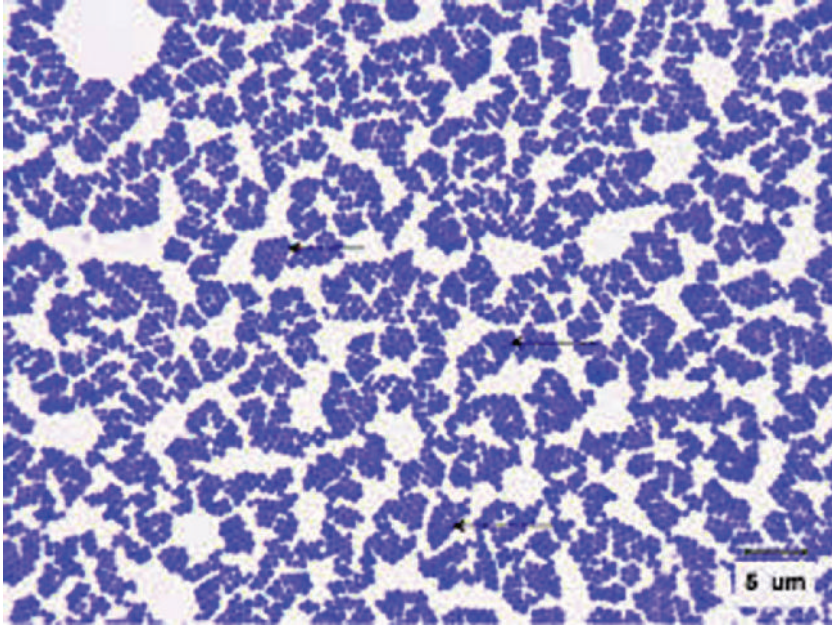
Slika 147. Šematski prikaz štapićastih bakterija
www.qph.is.quoracdn.net



Slika 148. Šematski prikaz spiralnih bakterija



*Slika 149. Streptococcus agalactiae, bojenje po Gramu, 1000x
(<https://microbiologiaudca.webnode.es/news/streptococcus-agalactiae>)*



Slika 150. *Staphylococcus aureus*, bojenje po Gramu, 1000x
(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK470553/figure/article-22388.image.f1>)

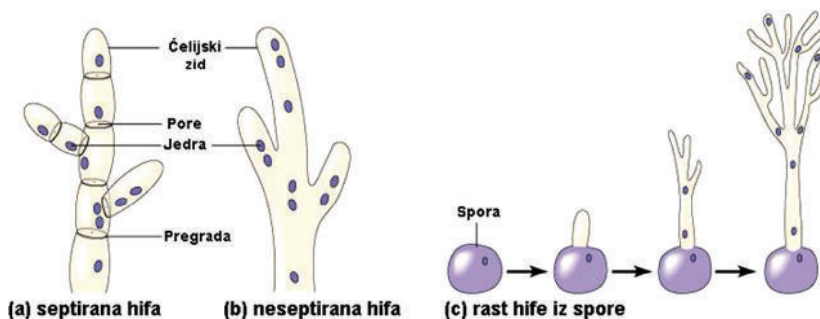
Oblici i veličina bakterija znatno variraju, što zavisi od starosti kulture, sastava sredine i njenih osmotskih svojstava, temperature i drugih faktora. Pleomorfizam je pojava kod nekih mikroorganizama da u toku života mijenjaju oblik. Polimorfizam je svojstvo nekih bakterija da se u istoj fazi životnog ciklusa javljaju u različitim oblicima. Javlja se kod bakterija koje nemaju ćelijski zid (mikoplazme, rikecije).

Ponašanje bakterija u nepovoljnim uslovima životne sredine

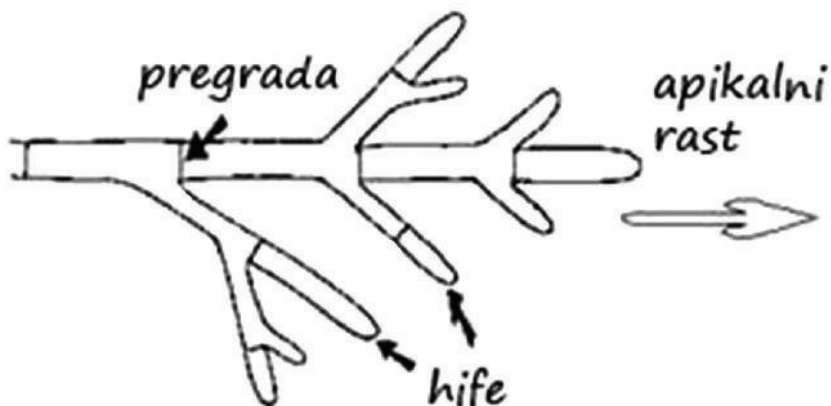
Kada su spoljašnji uslovi nepogodni za rast i razmnožavanje, neke bakterije stvaraju spore. Proces stvaranja spora naziva se sporulacija, a bakterije sa tom sposobnošću - sporogene bakterije. Spore se obrazuju u cilju preživljavanja u nepovoljnim uslovima sredine - odnosno zaštite genetičkog materijala bakterije. Spore imaju debele zidove i veoma su otporne na nepovoljne uslove. Kada nastupe povoljni uslovi, iz spore ponovo nastaje vegetativni oblik bakterije.

Grada gljiva (plijesni i kvasci)

Gljive su eukariotski mikroorganizmi. Morfološki se veoma razlikuju, što je rezultat velike brojnosti njihovih vrsta. Carstvu gljiva pripadaju plijesni i kvasci. Končaste ćelije plijesni zovu se hife, a splet hifa čini micelijum. Hife nastaju iz spora klijanjem. Hife mogu biti neseptirane (bez pregrada) što je karakteristično za klasu *Zygomycotina*, ili septirane (sa pregradama), što je karakteristično za klase *Ascomycotina*, *Basidiomycotina* i *Deuteromycotina* (slika 151). Hife rastu apikalno – od vrha (slika 152).



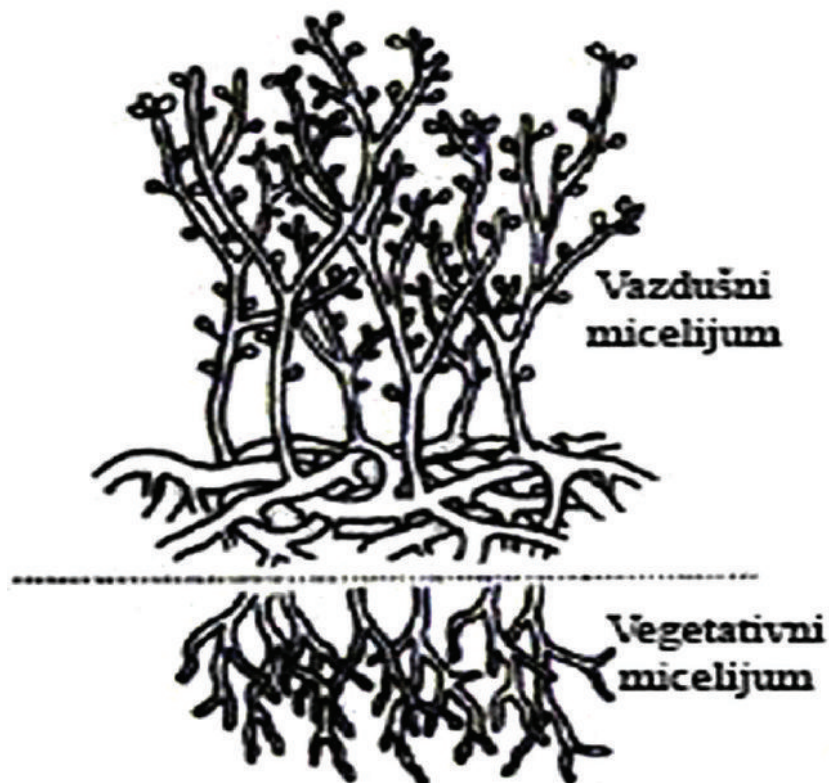
Slika 151. Šematski prikaz septiranih i neseptiranih hifa plijesni



Slika 152. Šematski prikaz apikalnog rasta hifa – od vrha

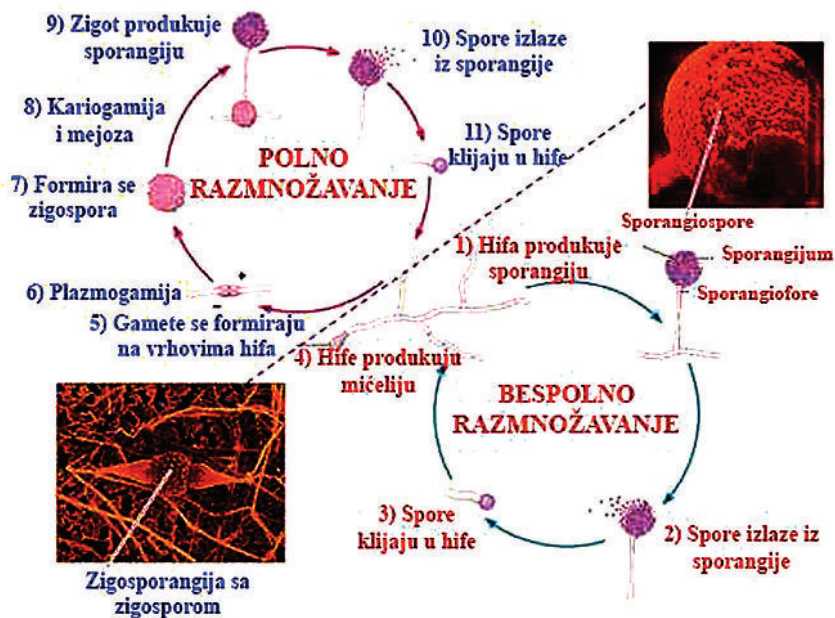
Kod plijesni postoje dva tipa micelijuma. Jedan se nalazi na podlozi na kojoj gljiva raste i prodire u nju. On služi gljivi za primanje hrane iz okoline. Naziva se bazalni ili vegetativni micelijum. Drugi micelijum se diže u vazduh iznad podloge na

kojoj gljiva raste. To je *vazdušni* ili *aeralni micelijum* (slika 153) Ako taj micelijum stvara reproduktivne organe, naziva se *reproduktivni micelijum*. Neki kvasci, kao što je *Candida albicans* obrazuju lažne hife (pseudohife) i lažni micelijum (pseudomicelijum). Pseudomicelijum predstavlja splet razgranatih pseudohifa. Lažne hife nastaju kada ćelije kvasca nakon razmnožavanja ostaju u zajednici. Lažne hife su izdužene tvorevine koje liče na hife, pa se zato zovu pseudohife.



Slika 153. Šematski prikaz aeralnog i vegetativnog micelijuma plijesni

Spore su rasplodne ćelije gljiva, pomoću kojih se one razmnožavaju, održavaju i šire u prirodi. One mogu nastati aseksualnim (bespolnim) putem ili seksualnom (polnom) konjugacijom muških i ženskih rasplodnih elemenata. Prve su *aseksualne* (bespolne) *spore*, a druge *seksualne* (polne) *spore* (slika 154).

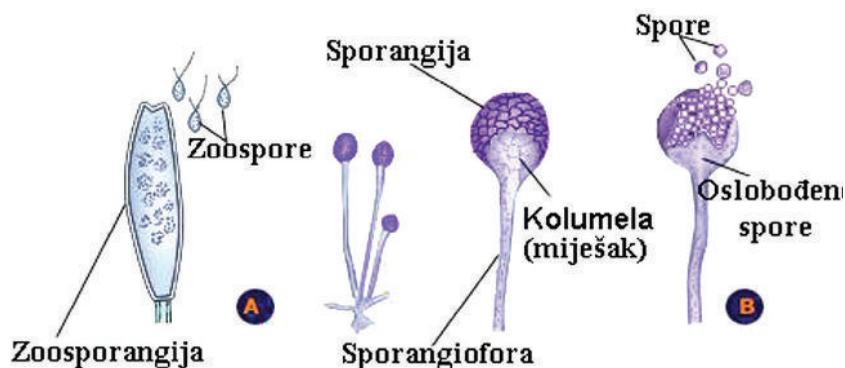


Slika 154. Šematski prikaz razmnožavanja plijesni putem bespolnih i polnih spora (Tiodorović i Bojanić-Rašović, 2009)

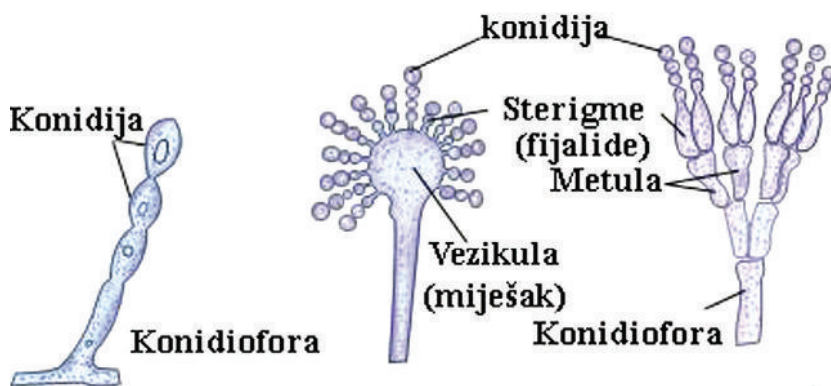
Gljive se razmnožavaju **bespolno** (fragmentacijom, vegetativno i bespolnim sporama) i **polno** (stvaranjem zigota i polnim sporama). Fragmentacijom se razmnožavaju tako što se najprije hife gljiva izdijele na veće ili manje fragmente. Iz svakog fragmenta se zatim razvija nova hifa, odnosno micelijum. Talus može stvarati tvorevine za vegetativno razmnožavanje: rizomorfe i sklerocije (formiraju se zadebljanjem spleta hifa). **Bespolno razmnožavanje putem spora** vrši se putem: zoospora, konidija (*Ascomycotina*, *Deuteromycotina*, slika 155), sporangiospora (slike 156 i 157, *Zygomycotina*), artrospora, hlamidospora, blastospora (kod kvasaca). Polno razmnožavanje gljiva odvija se spajanjem polnih ćelija - gameta, koje mogu biti morfološki iste (izogamija) ili različite (heterogamija). Na taj način nastaje zigot. Ukoliko za zigot ne postoje povoljni uslovi za rast, on se transformiše u sporu, u oblik u kome duže preživljava. Kada se stvore povoljni uslovi, spora klija u hifu. Za poljoprivrednu proizvodnju i za kruženje materije u prirodi najznačajnije su gljive iz klase: *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, *Basidiomycetes* i *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* (slike 158-160). Klasa *Ascomycetes* obuhvata končaste gljive sa septiranom hifom i okruglaste gljive koje ne formiraju pravu hifu (kvasci). Končaste gljive ove klase se bespolno raz-

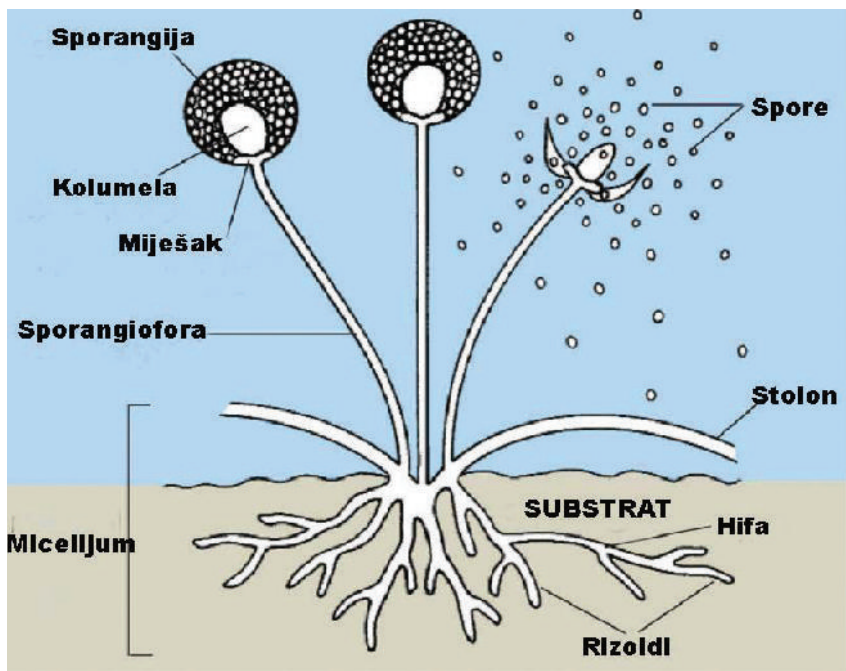
množavaju sporulacijom – konidijama i fragmentacijom. Okruglaste gljive - kvasci se bespolno razmnožavaju pupljenjem ili dijeljenjem. Sve gljive iz ove klase se polno razmnožavaju heterogamijom, pri čemu se formiraju polne spore - askospore. Najvažniji predstavnici končastih gljiva su *Penicillium* (slike 161 i 162) i *Aspergillus* (slike 163 i 164), a od kvasaca rodovi: *Saccharomyces* (slika 165), *Hansenula*, *Torula* i dr.



Slika 155. Šematski prikaz zoosporangija i sporangija kod plijesni



Slika 156. Šematski prikaz građe konidiofora i konidija kod plijesni



Slika 157. Šematski prikaz građe plijesni Rhizopus spp.



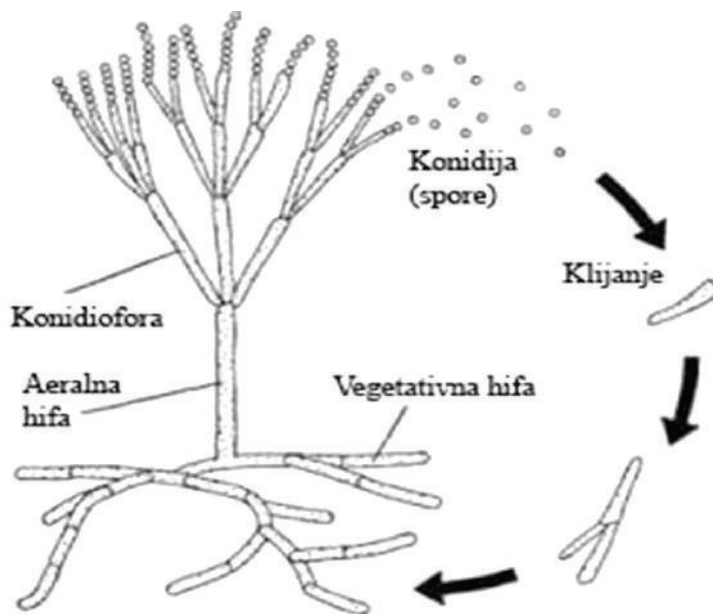
Slika 158. Rhizopus spp., nativni preparat (Bojanić Rašović i studenti studijskog programa Stočarstvo Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore)



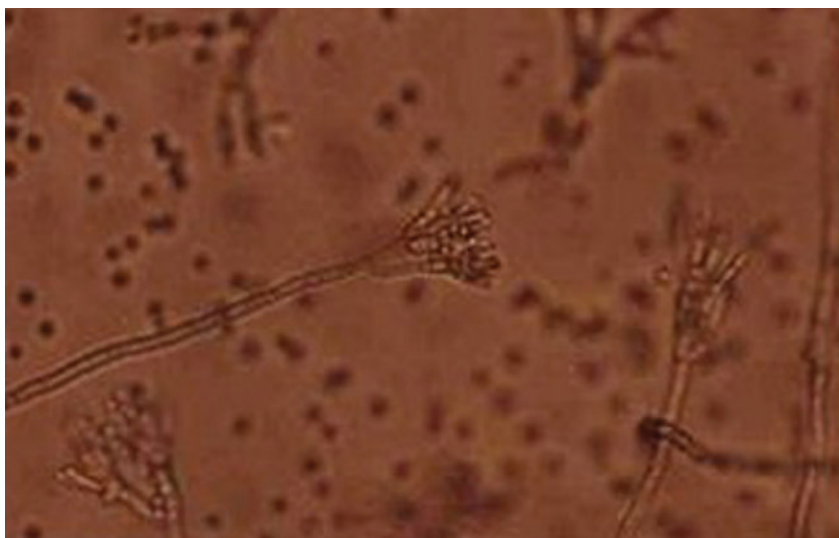
Slika 159. Rhizopus spp., nativni preparat, 20x (Bojanić Rašović i studenti studijskog programa Stočarstvo Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore)



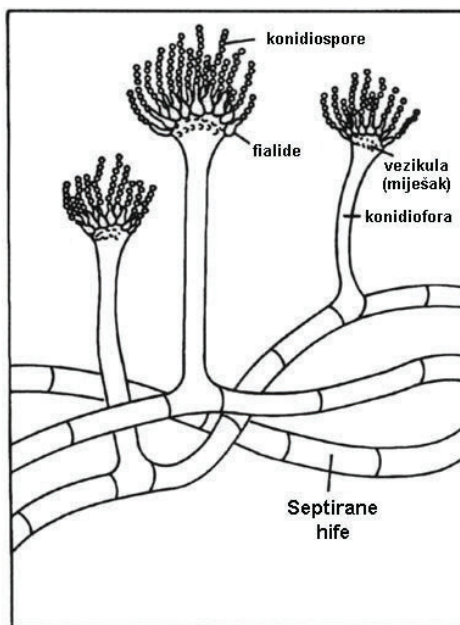
Slika 160. Rhizopus spp., supstratne, korjenolike hife, nativni preparat, 40x (Bojanić Rašović i studenti studijskog programa Stočarstvo Biotehničkog fakulteta Univerziteta Crne Gore)



Slika 161. Šematski prikaz građe reproduktivnih hifa kod plijesni roda *Penicillium*



Slika 162. *Penicillium* spp., nativni preparat (Bojanić Rašović)



Slika 163. Šematski prikaz građe Aspergillus spp.

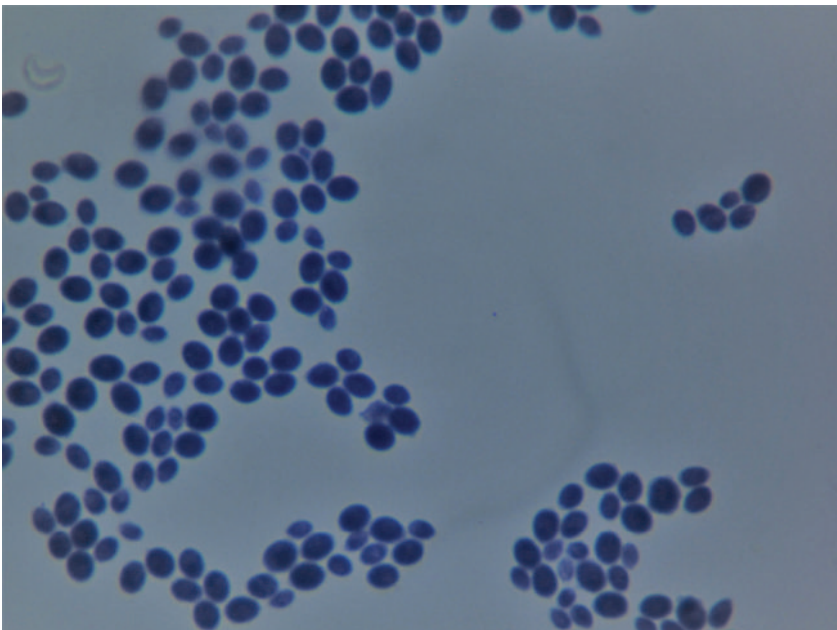


Slika 164. Kolonije plijesni (Bojanić Rašović)

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, dok se polno 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 kvasaca je okrugla, ovalna ili izdužena, veličine 4-15 μm , koja se razmnožava pupljenjem ili dijeljenjem (slika 165). 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. Ćelija jednoćelijskih gljiva u nepovoljnim uslovima može da sporuliše, pri čemu nastaje bespolna spora - **blastospora**.



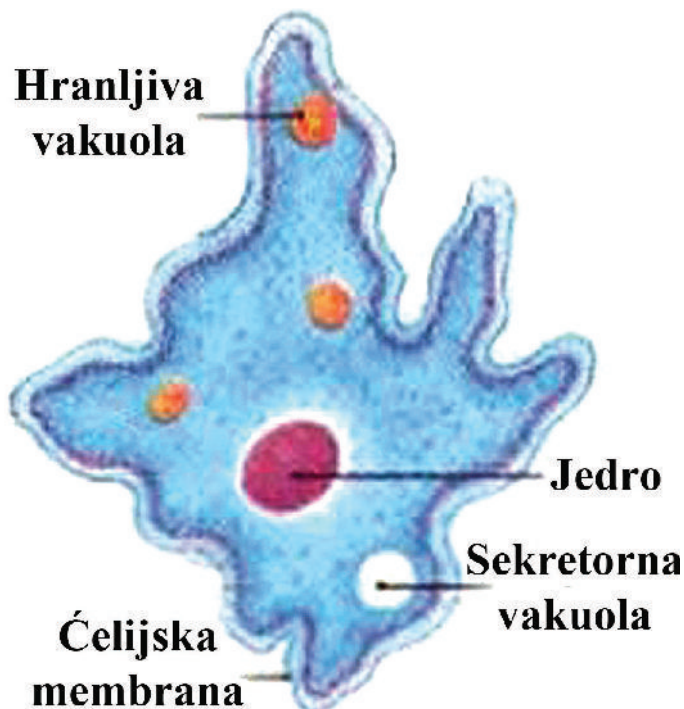
Slika 165. Pekarski kvasac, Saccharomyces cerevisiae, bojenje metilenskim plavim, uveličanje 1000x (Bojanić Rašović)

Praživotinje (Protozoa)

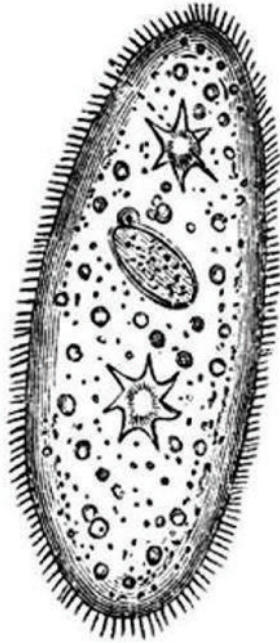
Protozoe su eukariotski mikroorganizmi. Tijelo praživotinja je izgrađeno od jedne ćelije, koja svoje funkcije obavlja raznovrsnim organelama. Od morfoloških osobina, kod protozoa se izučava: oblik, veličina, građa ćelije, razmnožavanje, stvaranje cista i pokretljivost.

Na osnovu načina kretanja protozoe su svrstane u tri razdjela:

1. ***Sarcomastigophora*** (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 (slika 166);
Mastigophora (Flagellata) - kreću se pomoću flagela. Broj flagela je najčešće 2-8. Od parazitskih predstavnika najpoznatiji su *Trichomonas* i *Tripanosoma*;
2. ***Ciliophora (Ciliata, trepljari)*** - kreću se nešto tanjim izraštajima od flagela, koje se zovu cilije (slika 167). Spadaju u najsavršenije protozoe.
3. ***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 166. Šematski prikaz građe amebe



Slika 167. Šematski prikaz građe protozoa cilijata

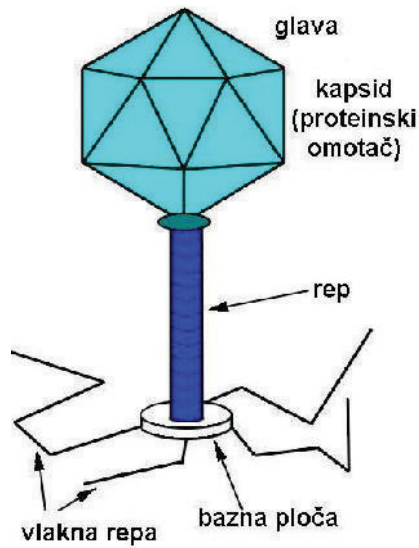
Protozoe u nepovoljnim uslovima formiraju ciste kao oblike za konzervaciju. Razmnožavaju se bespolno i polno. Načini bespolnog razmnožavanja su:

- binarna dioba – kada se roditeljska jedinka podijeli na dvije;
- multipna (višestruka) dioba – dioba roditeljske ćelije na veći broj ćelija;
- plazmotomija – predstavlja diobu višejedarnih protozoa, pri kojoj se dijeli samo citoplazma;
- pupljenje – stvaranjem izraštaja - pupoljaka koji se odvajaju od majke ćelije; ukoliko se pupoljci ne odvoje od roditeljskog tijela, nastaju kolonijalne protozoe.

Protozoe se polno razmnožavaju mejozom, pri kojoj se u polnim ćelijama formira haploidan broj hromozoma, zatim se one spajaju i obrazuju diploidan broj hromozoma.

Građa virusa

Nukleinska kisjelina čini DNK ili RNK genom virusa ili **nukleoid**. Oko nukleinske kisjeline nalazi se proteinski omotač koji se zove **kapsid**. Kapsomere su identične proteinske subjedinice kapsida. **Peplos** je dodatna opna kojom su neki virusi obavijeni, a građena je iz glikoproteina i lipida. Virusi mogu biti štapićasti, nita-
sti, loptasti, kockasti, topuzasti. Veličina različitih virusa se kreće od 15 do 400 nm. Virusi mikroorganizama se nazivaju fagi, a virusi bakterija bakteriofagi (slika 168).



Slika 168. Bakteriofag - bakterijski virus

VJEŽBA V

HRANLJIVE PODLOGE. IZOLACIJA I GAJENJE MIKROORGANIZAMA

Pitanja

1. Šta su hranljive podloge?
2. Kakve mogu biti hranljive podloge u zavisnosti 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?

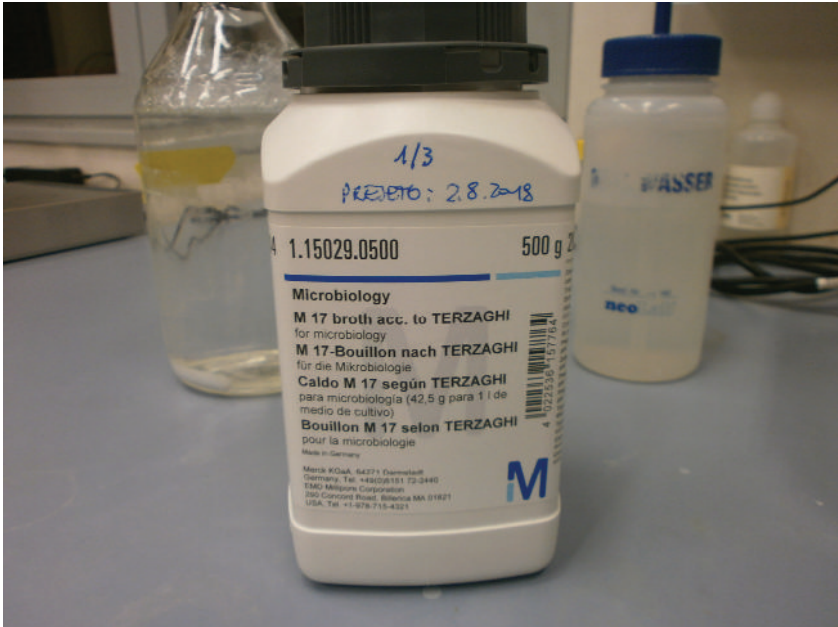
Hranljive podloge

Hranljive podloge predstavljaju čvrste, polučvrste ili tečne sredine koje služe za izolaciju, gajenje i determinaciju mikroorganizama. U zavisnosti 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 sjeckanog 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 proizvoda 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 na prisustvo 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 dobijaju kada se tečnim podlogama dodaju agar-agar, silikatni gel ili želatin. Najbolje sredstvo za formiranje gela je agar-agar, koji se dodaje tečnim podlogama u koncentraciji od 2%, a dobija se od crvenih algi (*Gelidium corneum*). Agar-agar je složeni polisaharid koji stvara gel, s tačkom topljenja 80-100 °C i temperaturom stvrdnjavanja oko 40-45 °C. Želatin je bjelančevina koja se dobija kuvanjem kostiju, kože, tetiva i ligamenata. Dodaje se podlogama u količini od 10 do 20%. Koristi se uglavnom za otkrivanje proteolizne aktivnosti mikroorganizama. Podloge se danas uglavnom proizvode na industrijski način u obliku praškova (slike 169-172).



Slika 169. Gotove podloge (Bojanić Rašović)



Slika 170. M17 bujon za izolaciju laktokoka (Bojanić Rašović)

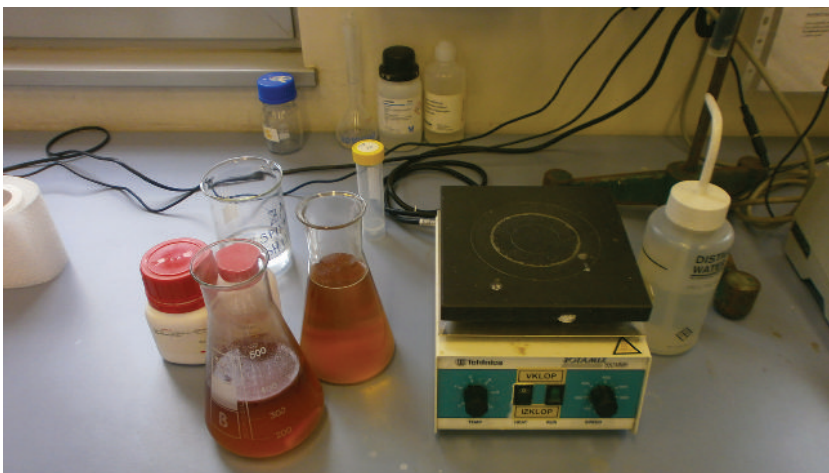


Slika 171. Čuvanje praškastih gotovih hranljivih podloga na tamnom i hladnom mjestu (Bojanić Rašović, 2020)



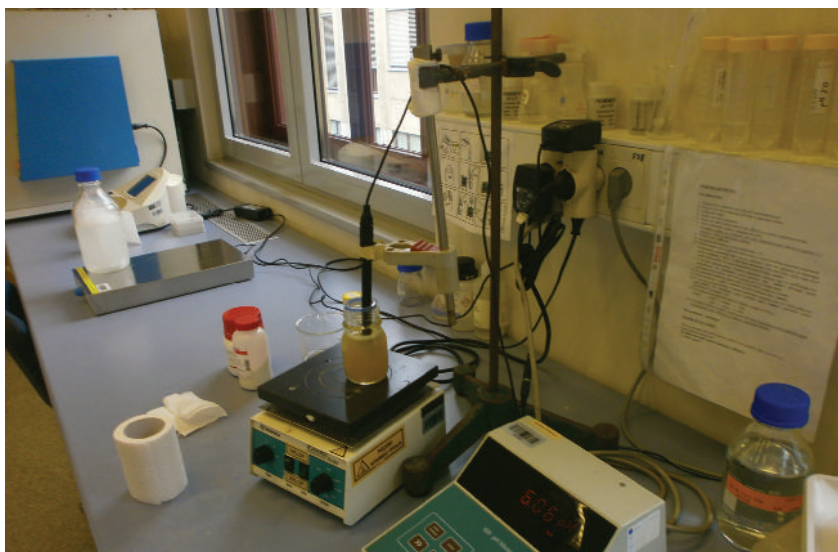
Slika 172. Odmjeravanje potrebne količine hranljivih podloga (Bojanić Rašović, 2020)

Prednost takvih podloga je u njihovoj stabilnosti, jednostavnosti pripreme i pogodnijem transportu. Hranljive podloge se nakon pripreme sterilišu, a nakon hlađenja se do upotrebe čuvaju u frižideru. U vlažnim uslovima čepovi kojima se zatvaraju gotove podloge postaju vlažni i kroz njih prorasta micelijum gljiva. Zato treba voditi računa o vlažnosti sredine u kojoj se čuvaju gotove podloge. Svi potrebni sastojci se prilikom pripreme podloge rastvaraju u određenoj količini destilovane vode (slika 173).



Slika 173. Rastvorene hranljive podloge pripremljene za sterilizaciju (Bojanić Rašović, 2020)

Dodavanjem različitih količina agara dobija 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, ona 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) (slika 174).



Slika 174. Mjerenje pH podloga (Bojanić Rašović, 2020)

Sterilnost podloga se postiže sterilizacijom (zagrijanom vodenom parom, zagrijanom vodenom parom pod pritiskom ili filtracijom kroz mikrobiološke filtre). Sterilizacijom se postiže uništavanje svih oblika mikroorganizama u hranljivoj podlozi. Prema namjeni, podloge se dijele na podloge **opšte namjene** i **specijalne podloge**.

Podloge opšte namjene

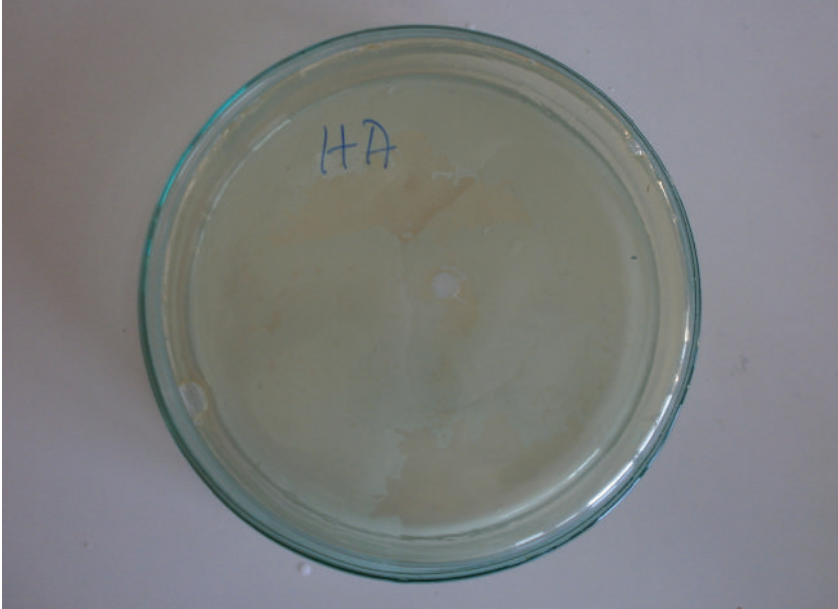
Na podlogama opšte namjene se akumulira biomasa svih mikroorganizama koji se nalaze u ispitivanom materijalu. Takve podloge su: mesopeptonski agar (hranljivi agar, slike 175 -178), meso-peptonski bujon (hranljivi bujon, slika 179), mesopeptonski želatin i dr. **Hranljivi agar** je visoko hranljiva podloga za kultivisanje velikog broja različitih mikroorganizama. Od ove podloge, sa i bez dodatka drugih supstanci, može da se pripremi: kosi agar, duboki agar, agar u Petri pločama, krvni agar, mliječni agar i dr.



Slika 175. Sterilisan i ohlađen hranljivi agar (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 176. Otapanje hranljivog agara (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 177. Hranljivi agar razliven u Petrijevoj ploči (Bojanić Rašović, 2020)



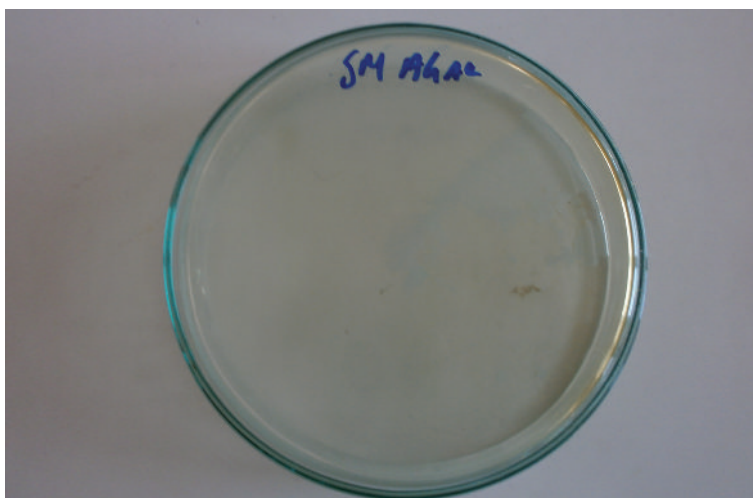
Slika 178. Hranljivi agar razliven u Petri pločama (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 179. Sterilisani hranljivi bujon (Bojanić Rašović, 2020)

Specijalne podloge

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 nakupljenih kultura (slike 180 i 181).

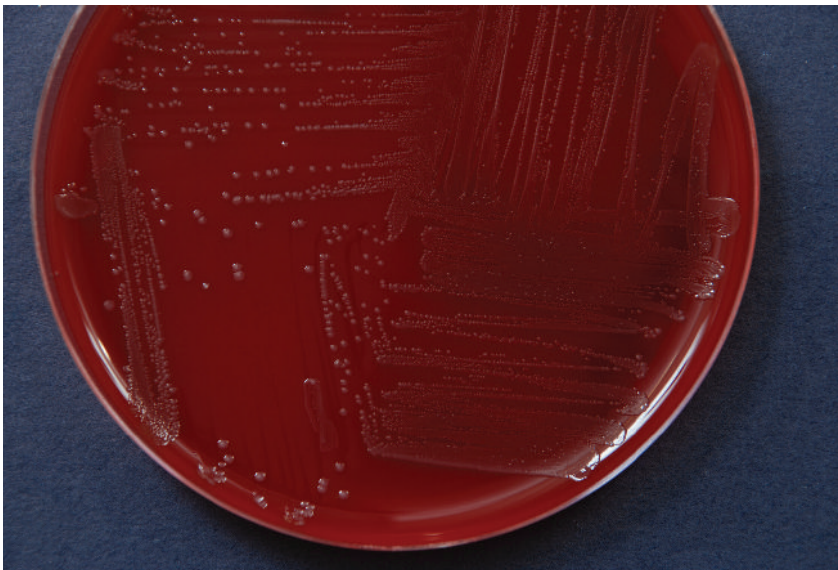


Slika 180. Sabouroud maltozni agar razliven u Petrijevoj ploči, selektivna podloga za plijesni i kvasce (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 181. Kolonija plijesni izrasla na Sabouroud maltoznom agaru (Bojanić Rašović, 2020)

Diferencijalne podloge se koriste za određivanje vrste ispitivanog mikroorganizma, a zasnivaju se na osobnostima njegovog metabolizma. 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 mogu uočiti proteolizna i hemolizna svojstva mikroorganizama (slike 182 i 183).

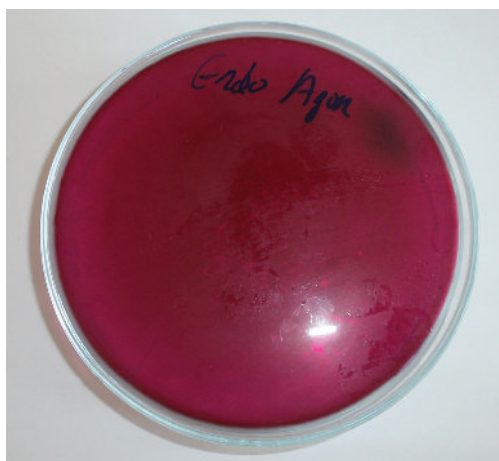


Slika 182. Bakterijske kolonije izrasle na krvnom agaru (Bojanić Rašović, 2013)

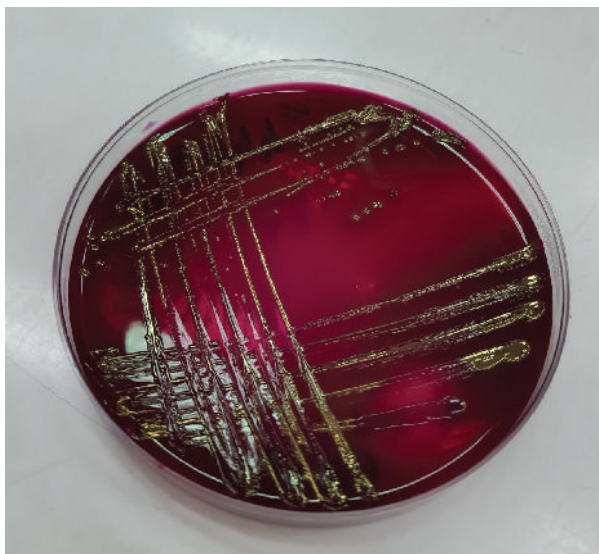


Slika 183. Kolonije *Arcanobacterium pyogenes* izrasle na krvnom agaru (Bojanić Rašović, 2013)

U sastav diferencijalno-dijagnostičkih podloga, namijenjenih za otkrivanje oksidoredukcionih enzima, dodaju se indikatori, kao što su neutralno crveno, fenolno crveno, fuksin, metilensko plavo, lakmusova tinktura i drugi, koji mijenjaju boju u zavisnosti od pH vrijednosti podloge. Tako na primjer, Endo agar je diferencijalna podloga koja se koristi za razlikovanje bakterija koje razlažu laktozu od onih koje ne razlažu laktozu (slika 184). Kolonije bakterija koje fermentišu laktozu se usljed prisustva fuksina boje ružičasto, dok bakterije koje ne razlažu laktozu ostaju bezbojne ili prozračne. Kolonije bakterija koje intenzivno i brzo fermentišu laktozu (kao što je bakterija *E. coli*) na Endo agaru imaju metalni sjaj - zbog kristalizacije fuksina na površini kolonija (slika 185).



Slika 184. Endo agar razliven u Petrijevoj ploči (Bojanić Rašović, 2020)



Slika 185. Izgled kolonija E. coli na Endo agaru – metalni sjaj (Čogurić)

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 otpe i ohlade na temperaturu do 50 °C. Zatim se eza sterilize 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 ploču. Petri ploče 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. Direktnne metode se baziraju na brojanju samih ćelija mikroorganizama, bilo da su one mrtve ili žive, dok se indirektnne metode baziraju na brojanju izraslih kolonija mikroorganizama na hranljivim podlogama, turbidimetriji i dr.

Direktnne metode za određivanje broja mikroorganizama

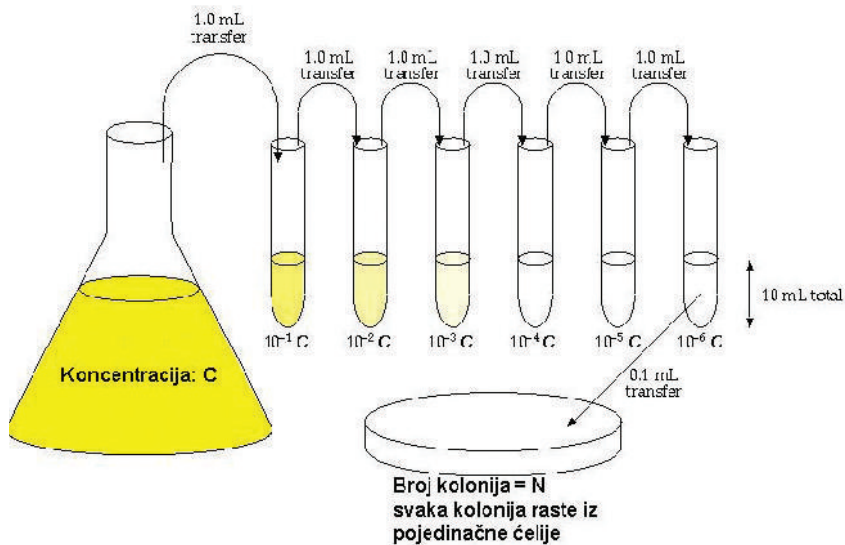
Direktnim metodama broj mikroorganizama u supstratu se može odrediti pomoću **bojenog razmaza** na predmetnom staklu. U tom cilju razmaz se pravi na ograničenoj površini predmetnice. Zbog toga se prije nanošenja suspenzije ispod predmetnice stavlja milimetarska hartija ili šablon oblika kvadrata površine 1cm^2 . Na predmetnicu se nanese $0,01\text{ ml}$ suspenzije, napravi razmaz na površini od 1 cm^2 , koji se zatim suši, fiksira i boji prostim bojenjem – na primjer metilenskim plavim. Nakon bojenja preparat se ispira vodom, osuši i posmatra imerzionim objektivom. Brojanje ćelija se vrši u 50 vidnih polja. Broj ćelija u svim poljima se sabere i preračuna njihov broj po jednom vidnom polju. Dobijeni broj mikroorganizama po jednom vidnom polju se množi sa 100 - kako bi se dobio broj mikroorganizama u jednom mililitru ispitivane suspenzije (pošto je brojanje vršeno u $0,01\text{ ml}$ suspenzije mikroorganizama). Dobijena vrijednost se zatim množi sa faktorom mikroskopa. Da bi se odredila vrijednost faktora mikroskopa, treba prethodno da se izračuna površina jednog vidnog polja mikroskopa. Površina vidnog polja zavisi od veličine objektiva, okulara i dužine tubusa. Da bi se izračunala površina vidnog polja, prvo se izmjeri njegov prečnik. Mjerenje se vrši pomoću objektiv mikrometra. Površina vidnog polja se zatim računa po formuli $r^2\pi$. Faktor mikroskopa, odnosno broj vidnih polja na površini razmaza od 1 cm^2 (100 mm^2) se dobija kada se 100 podijeli sa izračunatom površinom jednog vidnog polja. Na primjer, ako je prečnik vidnog polja $0,206$, faktor mikroskopa je 3000 ($FM = 100/r^2\pi = 100/(0,103)^2 = 3000,03$, odnosno 3000 (zaokruženo na cio broj). Faktor mikroskopa treba utvrditi za svaki mikroskop. Brojanje većih mikroorganizama (alge, kvasci, spore kvasaca i plijesni) se može vršiti uz pomoć **komorica za brojanje**. Komorica za brojanje se nalazi u debelim staklenim pločicama i podijeljena je u vidu mreže na 25 kvadrata. Svaki ovaj kvadrat je podijeljen na 16 manjih kvadrata, tako da je cijela komora podijeljena na 400 malih kvadrata. U komoru se sterilnom pipetom nanosi određena zapremina ispitivane suspenzije, pokrije pokrovnim staklom, a zatim pod mikroskopom broje mikroorganizmi. Brojanje mikroorganizama se najčešće vrši u 5-10 velikih kvadrata, a zatim se izračunava broj mikroorganizama po jednom kvadratu i jednom mililitru suspenzije. U komoricama se mogu brojati živi mikroorganizmi.

Indirektne metode za određivanje broja mikroorganizama

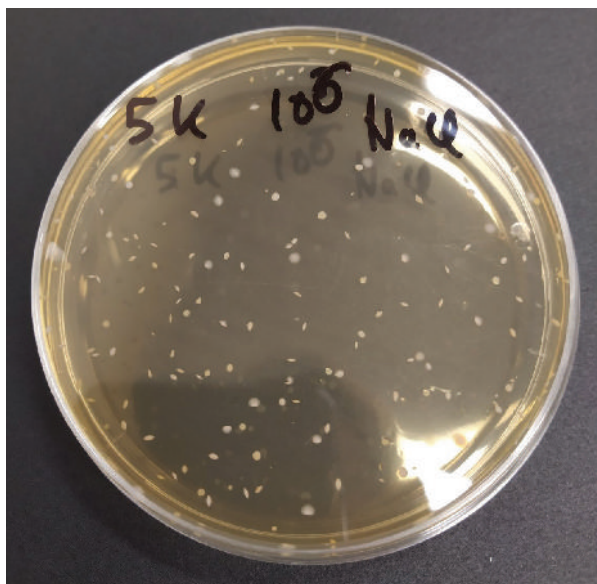
Indirektne metode za određivanje broja mikroorganizama podrazumijevaju određivanje broja živih ćelija mikroorganizama putem zasijavanja ispitivanog supstrata na odgovarajuću hranljivu podlogu. Najčešće se koriste **metoda razrjeđenja** (zasijavanje razrijeđene suspenzije na hranljivu podlogu) i **turbidimetrijska metoda**.

Metoda razrjeđenja

Supstrat se prije zasijavanja razređuje u određenoj količini destilovane vode ili fiziološkog rastvora. U tu svrhu se pripremaju decimalna razblaženja (slika 186). Obično se stavlja 0,5 ili 1 ml odgovarajućeg razrjeđenja u praznu Petri ploču i zaliva sa 20 ml podloge ili se razrjeđenje direktno zasijava na čvrstu hranljivu podlogu. Nakon toga, zasijane podloge se prenose u inkubator kako bi se razvili mikroorganizmi. Kolonije se broje na Petri pločama, na kojima je izraslo 30-300 kolonija, a zatim se računa broj kolonija po mililitru ispitivanog supstrata (slika 187). Za lakše i preciznije brojanje kolonija se koristi aparat za brojanje kolonija sa lupom i osvjetljenjem (slika 188).



Slika 186. Priprema serije decimalnih razrjeđenja



Slika 187. Pojedinačne kolonije laktokoka izrasle na M17 agaru (Bojanić Rašović)



Slika 188. Aparat za brojanje kolonija mikroorganizama - lupa (Bojanić Rašović, 2020)

Turbidimetrijska metoda

Zasniva se na mjerenju gustine suspenzije 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 se koristiti i sterilna pipeta. Čuvanje čistih kultura mikroorganizama vrši se na temperaturama 4-5°C, uz povremeno presijavanje. Učestalost presijavanja zavisi od vrste mikroorganizama. Kulture mikroorganizama se mogu čuvati i zamrznute na temperaturi od -20°C ili -80°C u podlogama sa dodatkom glicerola. Čuvanje mikroorganizama na duži period se postiže postupkom liofilizacije, kada se mogu čuvati i više godina.

VJEŽBA VI

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 razrjeđenja?
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?

Čista kultura mikroorganizama

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**. Dobijanje čistih kultura mikroorganizama je neophodno u cilju proučavanja njihovih kulturelnih, morfoloških i fizioloških svojstava, odnosno njihove determinacije. Potomstvo jedne ćelije nastalo njenim razmnožavanjem na čvrstoj hranljivoj podlozi predstavlja **koloniju**.

Izdvajanje čistih kultura

U procesu izolacije i dobijanja čiste kulture 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 sl., koji se dodaju 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, nepoželjni mikroorganizmi mogu da koriste proizvode metabolizma željenih bakterija.

Metode za izdvajanje čiste kulture mikroorganizama

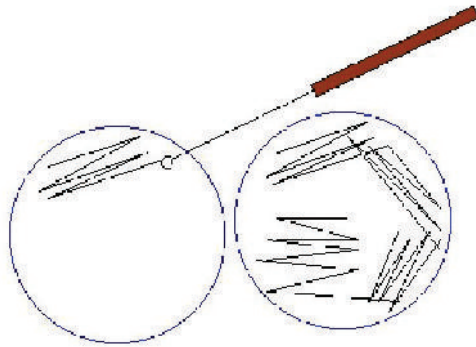
Metoda razrjeđenja

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°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 zasje 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 razlivena čvrste podloge u petri ploči.

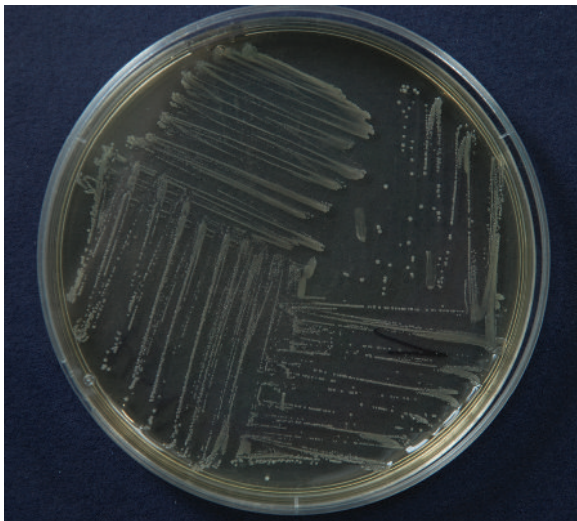
Metoda iscrpljenja

Dio kolonije sa čvrste hranljive podloge zahvati se ezom i zasije cik - cak pokretima na više čvrstih podloga. Na taj način će na poslednjoj 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 (slike 189 i 190).

- Zasijavanje materijala metodom iscrpljenja



Slika 189. Šematski prikaz zasijavanja materijala metodom iscrpljenja



*Slika 190. Kolonije *Lactococcus garviae*, metodom iscrpljenja u poslednjim potezima ezom, dobijene su pojedinačne kolonije (Bojanić Rašović, 2020)*

Održavanje čistih kultura mikroorganizama

Čiste kulture za svakodnevnu upotrebu održavaju se na tečnim i čvrstim hranljivim podlogama, na tamnom mjestu i na temperaturi od 4 do 6 °C (slika 191).



Slika 191. Čuvanje kultura mikroorganizama na 4-6 °C u frižideru (Bojanić Rašović, 2020)

Međutim, na ovaj način hranljiva 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 nedjelje. Manje osjetljive vrste (sporogene bakterije) se presijavaju svakih 4-6 mjeseci, a osjetljive vrste (bakterije mliječne kiseline) 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) i na temperaturi od 4 °C; zamrzavanjem na -20 °C (slika 204), -40 °C, -80 °C, na temperaturi tečnog azota -196 °C (slike 192-194), liofilizacijom itd.



Slika 192. Čuvanje kultura mikroorganizama na -20 °C (Bojanić Rašović)



Slika 193. Čuvanje ćelija u kontejnerima na temperaturi tečnog azota (Bojanić Rašović)



Slika 194. Unutrašnjost kontejnera sa tečnim azotom (Bojanić Rašović)

Čuvanje kultura u liofilizovanom stanju se dosta primjenjuje. Liofilizacija se izvodi u posebnim aparatima **lioofilizatorima**, tako što se kultura u tečnom stanju naglo smrzne na $-78\text{ }^{\circ}\text{C}$ i pod negativnim pritiskom (u vakuumu) suši. Voda se odstranjuje prelaskom leda direktno u paru, što znači da se preskače tečna faza. Liofilizirane kulture su u obliku praha i čuvaju se u zalivenim staklenim ampulama više godina.

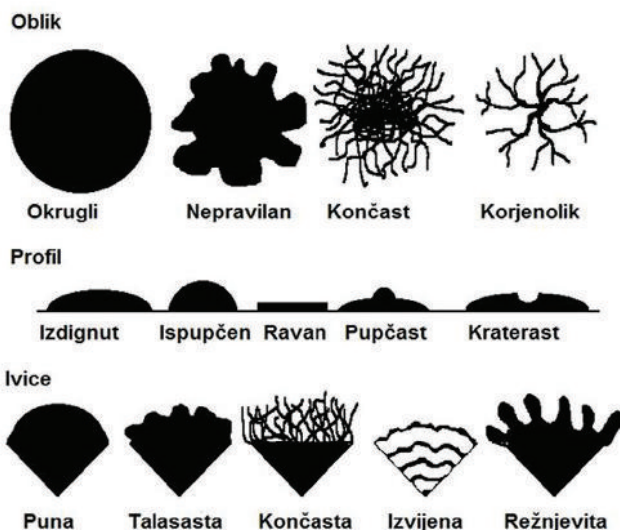
Određivanje karakteristika porasta bakterija na čvrstim hranljivim podlogama

Na čvrstim hranljivim podlogama bakterije formiraju vidljive zajednice koje se nazivaju **kolonije**. Kolonije nastaju razmnožavanjem pojedinih bakterijskih ćelija. Svaka bakterijska vrsta stvara karakteristične kolonije (slika 195).



Slika 195. Porast kolonija različitih mikroorganizama – različitog su oblika (Bojanić Rašović, 2019)

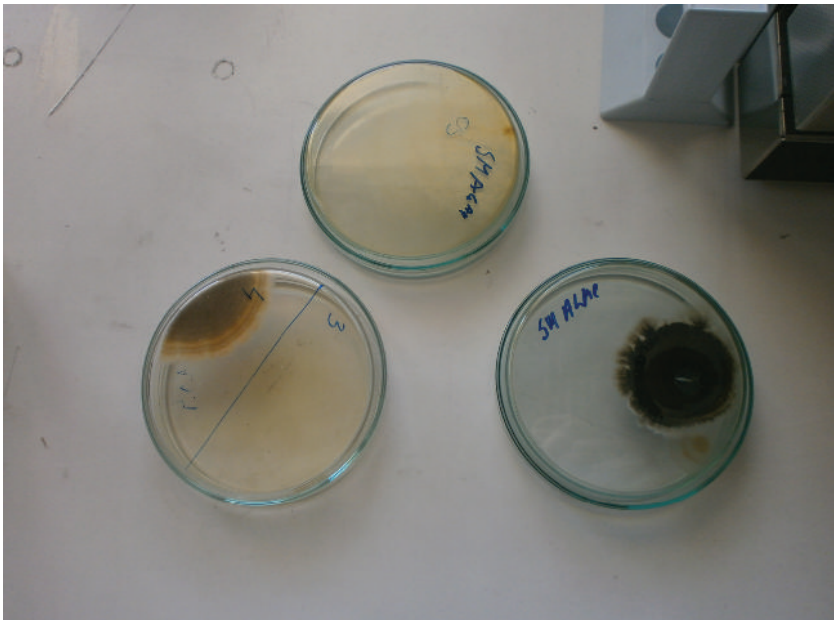
U određenim uslovima, karakterističan izgled kolonija se može promijeniti. Pri tome se posmatraju osobine kolonija kao što su: vrijeme porasta, oblik, veličina, boja, izgled ivica i površine, profil, konzistencija kolonija itd. Vrijeme porasta kolonija zavisi od vrste bakterija, hranljive podloge i temperature. Oblik bakterijskih kolonija može biti tačkast, okrugao, sočivast, nepravilan, korjenolik, končast, ameboidan itd. (slike 196-199).



Slika 196. Šematski prikaz različitih oblika, profila i ivica kolonija mikroorganizama



*Slika 197. Kolonije Bacillus spp. na hranljivom agaru
(Bojanić Rašović, 2020)*



*Slika 198. Različite kolonije plijesni na Sabouroud maltoznom agaru
(Bojanić Rašović, 2020)*



Slika 199. Posmatranje kolonija na čvrstim podlogama u Petri pločama (Bojanić Rašović, 2020)

Kolonije po veličini mogu biti: sitne (do 3 mm), srednje (do 5 mm) i krupne (preko 5 mm) u prečniku. Boja kolonija može biti različita, bijela, žuta, crna, narandžasta, crvena, ružičasta, zelena, plava itd. Ivica 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.

Određivanje karakteristika porasta bakterija na tečnim hranljivim podlogama

Razmnožavanje bakterija u tečnim hranljivim podlogama se zapaža u vidu zamućenja podloge (slika 200), stvaranja taloga, skrame na površini, promjene boje, mirisa itd. Zamućenost tečne podloge može biti prolazna ili trajna, a po svom intenzitetu jaka, slaba i umjereno izražena. Skrame na površini tečnih podloga mogu biti slabo izražene, opnaste, pahuljaste, prstenaste, glatke, naborane, kožaste itd. Talog koji se javlja usljed razmnožavanja bakterija u tečnim hranljivim podlogama može biti obilan ili slabo izražen. Po svom izgledu, talog može biti kompaktna i čvrsto vezan za dno epruvete, pahuljast, praškast, sluzast, zrnast itd.



Slika 200. Tečne kulture mikroorganizama (Bojanić Rašović, 2020)

VJEŽBA VII

ODREĐIVANJE NEKIH BIOHEMIJSKIH KARAKTERISTIKA MIKROORGANIZAMA

Pitanja

1. Zašto je važno poznavati biohemijske osobine mikroorganizama?
2. Koje su značajne biohemijske reakcije koje se koriste u identifikaciji mikroorganizama?
3. Kako se izvodi test razlaganja skroba od strane mikroorganizama?
4. Kako se izvodi test razlaganja kazeina od strane mikroorganizama?
5. Kako se izvodi katalaza test i kada se koristi u identifikaciji mikroorganizama?
6. Kako se izvodi test koagulaze plazme i kada se koristi u identifikaciji mikroorganizama?
7. Kako se izvodi test razlaganja ugljenih hidrata od strane mikroorganizama?
8. Kako se izvodi Voges - Proskauerov (VP) test?
9. Kako se izvodi test za dokazivanje indola?
10. Kako se izvodi test razlaganja želatina?

Najčešće korišćene biohemijske reakcije u identifikaciji mikroorganizama

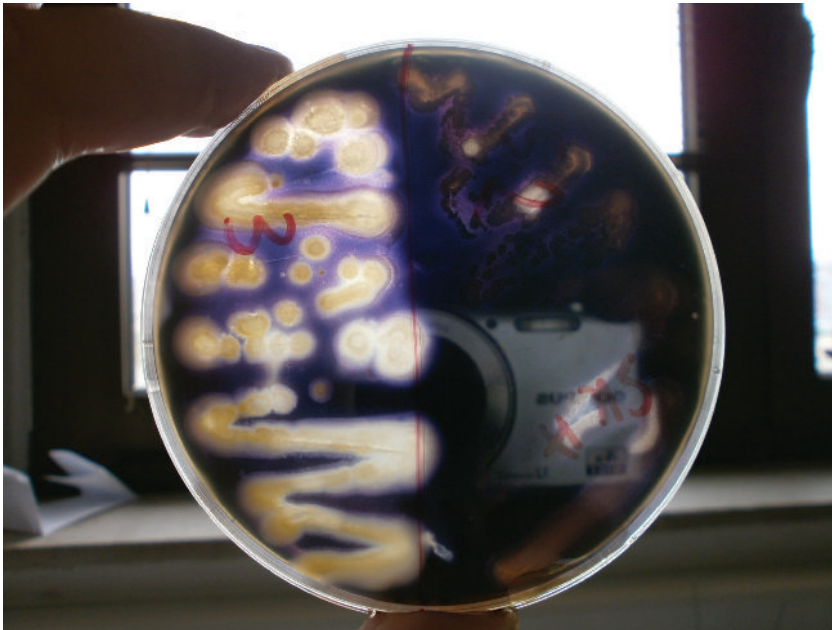
Mikroorganizmi se razlikuju po svojim biohemijskim osobinama, što se koristi prilikom njihove identifikacije. Neke od osobina koje se koriste u njihovoj identifikaciji su: hidroliza skroba, hidroliza kazeina, otapanje (likvefakcija želatina), stvaranje indola, stvaranje sumporvodonika, redukcija nitrata, redukcija vodonik-peroksida, fermentacija ugljenih hidrata, stvaranje acetil metil karbinola (Voges-Proskauer reakcija), 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

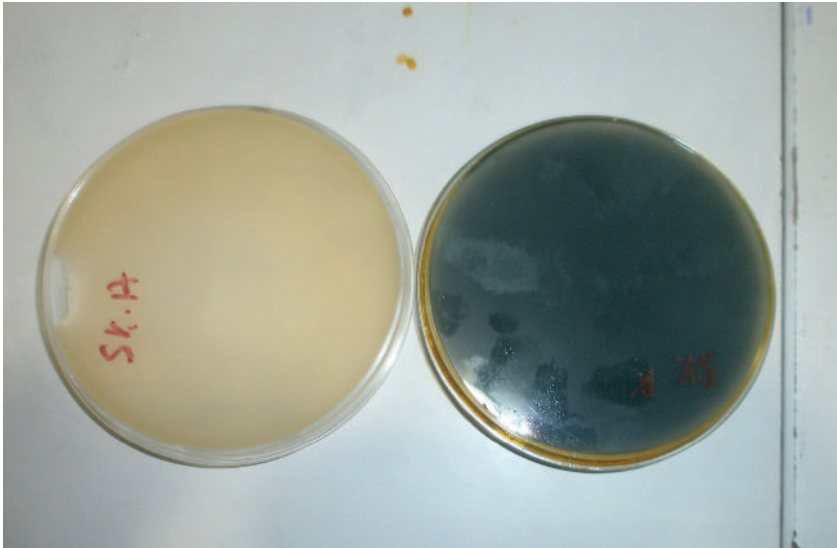
Na čvrstom skrobnom agaru razlivenom u Petri ploče ezom se zasije kultura ispitivanog mikroorganizma. Tako zasijane Petri ploče se stavljaju u termostat na inkubaciju 48 časova na 37 °C. Vrijeme i temperatura inkubiranja mogu biti različiti, što zavisi od vrste mikroorganizma. Nakon inkubiranja, površina 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 **nebojena zona**. U toj zoni mogu se uočiti razne boje, kao što su **žuta, crvenkasta, smeđa**, koje su rezultat različitog stepena hidrolize skroba (slika 201). Rezultati se moraju odmah očitati, jer poslije kraćeg vremena plava boja nestaje.



Slika 201. Hidroliza skroba (pozitivna reakcija lijevo, negativna reakcija desno) (Bojanić Rašović)

Priprema skrobnog agara

Hranljivom agaru se doda 1-2% rastvora skroba u toploj vodi, a zatim se dobijena smjesa sterilizuje. Nakon sterilizacije skrobni agar se razliva u Petri ploče (slika 202).



Slika 202. Lijevo - skrobni agar, desno - skrobni agar plavo obojen nakon preliivanja lugolom (Bojanić Rašović)

Hidroliza kazeina

Za dokazivanje hidrolize bjelančevine mlijeka - kazeina, koristi se mliječni agar.

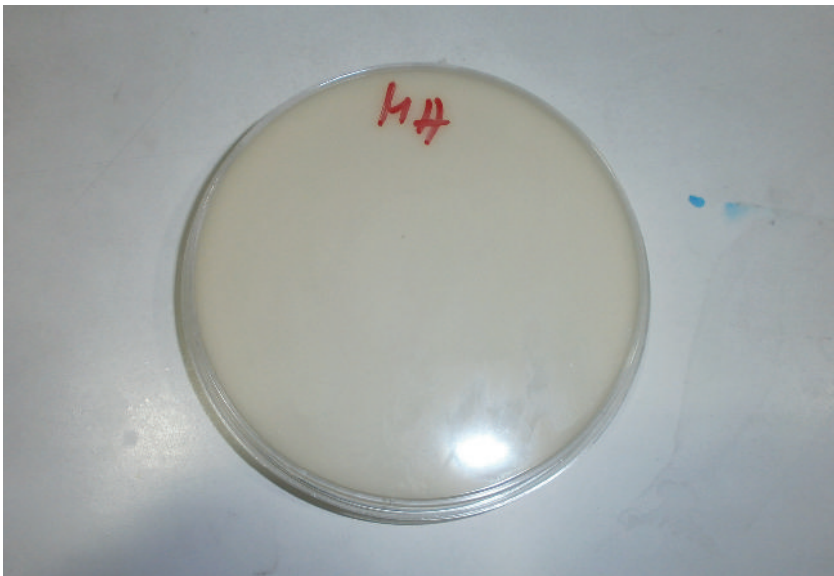
Postupak

Kultura ispitivanog mikroorganizma se zasije ezom na **mliječni agar** razliven i ohlađen u Petri pločama. Tako zasijane podloge se inkubiraju 48 časova na 37 °C ili na nekoj drugoj temperaturi, u zavisnosti od vrste ispitivanog mikroorganizma. Ukoliko je ispitivani mikroorganizam razložio kazein, oko kolonije se formira **providna, prosvijetljena zona** (slika 203).



Slika 203. Hidroliza kazeina (pozitivna reakcija, uočava se zona prosvjetljenja oko kolonija) (Bojanić Rašović)

Mliječni agar se dobija miješanjem jednog dijela sterilisanog mlijeka sa 1-5 dijelova rastopljenog 3% agara. Tako dobijena podloga se razliva u Petri ploče (slika 204).



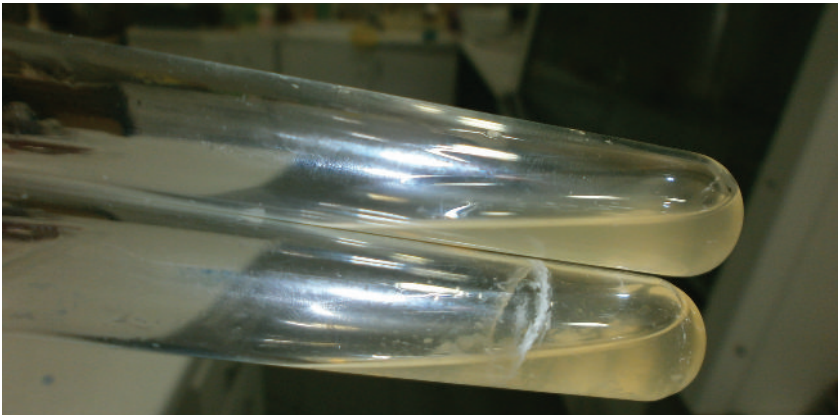
Slika 204. Mliječni agar (Bojanić Rašović)

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

U epruvetama sa podlogom sa želatinom se ubodom po dubini zasije kultura ispitivanog mikroorganizma. Kontrolna epruveta - koja nije zasijana i zasijana epruveta se inkubiraju 48-72 časa na 37 °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 (slika 205). Ukoliko nakon hlađenja želatin ostane čvrst, nije došlo do razlaganja želatina (slika 206).



Slika 205. Pozitivan test razlaganja želatina (Bojanić Rašović)



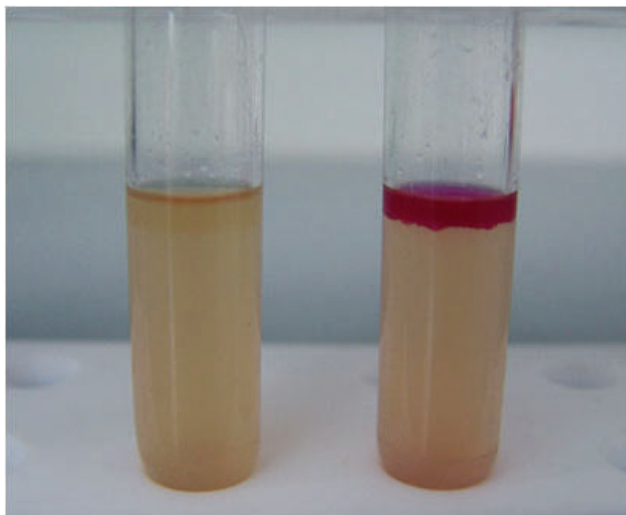
Slika 206. Negativan test razlaganja želatina – ostaje u čvrstom stanju (Bojanić Rašović, 2020)

Priprema podloge sa želatinom

Na 1000 ml hranljivog bujona dodaje se 150 g želatina i zagrijava dok se želatin ne rastopi. Dotjera se pH na 7,1. Sterilizacija se vrši u autoklavu 15 minuta na 120 °C ili tindalizacijom 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 temperaturi ispod 23 °C).

Stvaranje indola

Neke bakterije razlažu aminokiselinu **triptofan** do **indola**. Za dokazivanje ove osobine koristi se hranjiva podloga sa peptonom koji sadrži triptofan. Podloga ne smije sadržati šećer, jer šećer ometa reakciju stvaranja indola. Podloga zasijana ispitivanim mikroorganizmom se inkubira 24-48 časova. Nakon perioda inkubacije, podlozi se dodaje 1 ml ksilola i snažno promućka da se izdvoji indol. Kada se ksilol izdvoji na površini, polako se niz zid epruvete doda 1 ml rastvora A. Ako u podlozi ima indola, na granici ksilola i podloge pojaviće se crveni prsten (slika 207). Ukoliko je crveni prsten rezultat stvorenog indola, dodavanjem nekoliko kapi rastvora B, crvena boja se pojačava.



*Slika 207. Stvaranje indola (lijevo: negativna reakcija, desno pozitivna reakcija)
Stilinović i Hrenović, 2010)*

Umjesto rastvora A i B može se koristiti Kovačev reagens, pri čemu je rezultat pozitivne reakcije takođe stvaranje crvenog prstena. Za kontrolu se najčešće koristi bakterija *E. coli*, pošto intenzivno stvara indol.

Reagens A (Erlichov reagens):

paradimetilaminobenzaldehid (PMAB).....1 g
alkohol 96%.....95 ml
koncentrovana hlorovodonična kisjelina... 20 ml

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

Reagens B je kalijum persulfat (zasićeni vodeni rastvor pri sobnoj temperaturi)

Kovačev reagens:

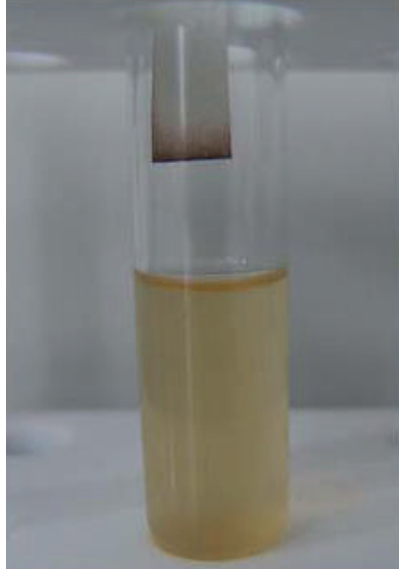
paradimetilaminobenzaldehid..... 5 g
amilalkohol..... 75 ml
koncentrovana hlorovodonična kisjelina.....25 ml

Stvaranje sumporvodonika

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

Postupak

Epruvete s peptonskom vodom zasiju se ispitivanim kulturama. Između zatvarača i zida epruvete umetne se traka filter papira natopljena olovo acetatom, na udaljenosti oko 0,5 cm iznad površine podloge. Zasijana podloga sa filter papirom inkubira se 2-4 dana na 37 °C. Ukoliko nakon ovog vremena filter papir pocrni, došlo je do izdvajanja sumporvodonika iz podloge dejstvom bakterija (slika 208). Stvaranje sumporvodonika se može dokazati i uz pomoć ferosulfata. Ukoliko se u zasijanoj peptonskoj vodi sa dodatkom ferosulfata nakon inkubacije stvorio gas vodoniksulfid, ona će dobiti mrku, odnosno crnu boju.



Slika 208. Stvaranje sumporvodonika - crna boja filter papira (Stilinović i Hrenović, 2010)

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 sumporvodonik, 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 24 časa, 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 sljedećeg sastava:

kalijum nitrat.....	0,2 g
pepton.....	5 g
destilovana voda.....	1000 ml
pH.....	7,4

Pripremljena podloga se sterilise u autoklavu.

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

Rastvor I:

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

Rastvor II:

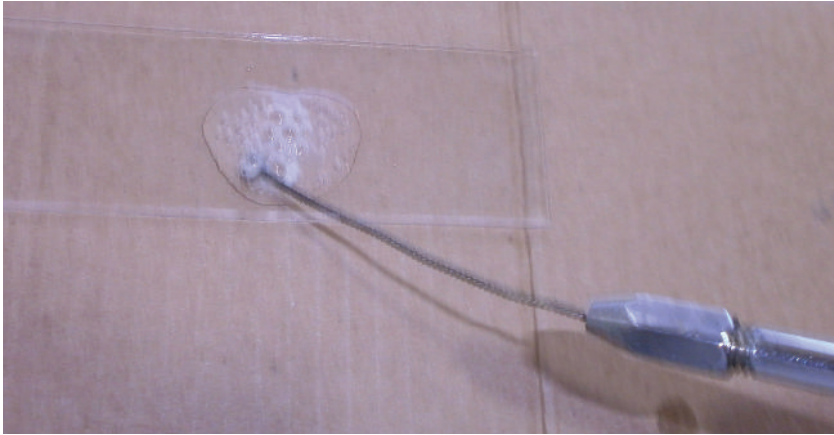
alfanaftilamin.....5 g
n/5 glacijalna sirćetna kisjelina.....1000 ml

Razlaganje vodonik peroksida

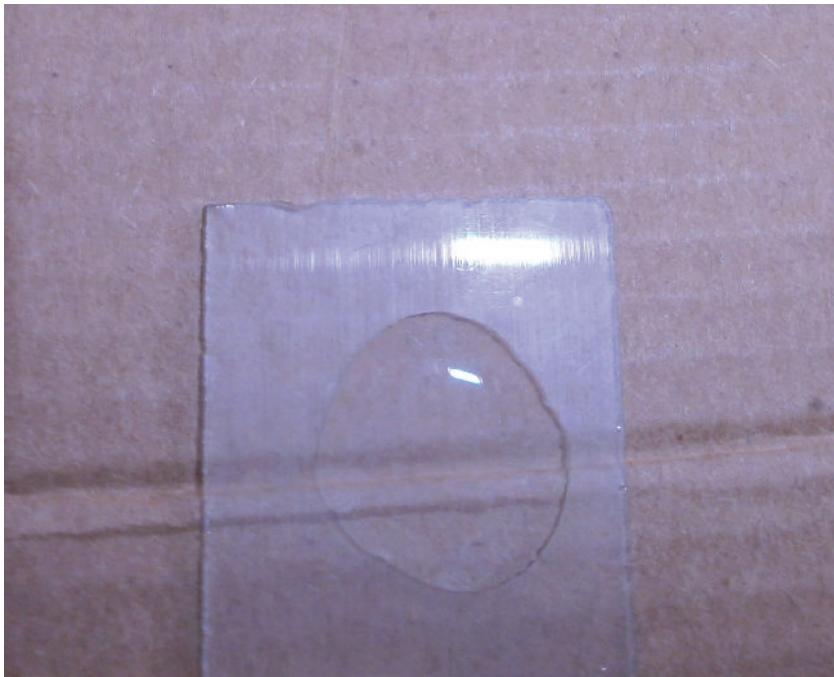
Neki mikroorganizmi stvaraju enzim katalazu, koji razlaže vodonik peroksid na vodu i molekulski kiseonik.

Postupak

Ispitivana kultura mikroorganizma se zasijava na hranljivi agar i inkubira 48 časova na 37 °C. Dio izrasle kolonije se ezom prenese na staklenu pločicu u kap fiziološkog rastvora. U tako formiranu kap se dodaje kap 3% vodonik peroksida (H_2O_2). Ukoliko ispitivani mikroorganizam posjeduje enzim katalazu, razložiće dodati vodonik peroksid, što se ispoljava izdvajanjem gasa **u vidu mjehurića** (slika 209). Do iste reakcije dolazi i ako se nekoliko kapi vodonik peroksida direktno nakapa na izraslu koloniju. Ukoliko je katalaza test negativan, nakon dodavanja 3% vodonik peroksida na ispitivanu bakterijsku koloniju mjehurići se neće pojaviti (slika 210).



Slika 209. Pozitivan katalaza test - uzdvajanje gasa u vidu mjehurića nakon dodavanja 3% vodonik peroksida na kulturu mikroorganizma (Bojanić Rašović)



Slika 210. Negativan katalaza test (Bojanić Rašović)

Fermentacija ugljenih hidrata

Test za ispitivanje sposobnosti mikroorganizama da fermentuju ugljene hidrate je našao značajnu primjenu u identifikaciji mikroorganizama. Za ova ispitivanja se koriste podloge sa dodatkom različitih ugljenih hidrata kao što su: pentoze (ksiloza, arabinoza, ramnoza), heksoze (glukoza, galaktoza, manoza), 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:

kisjeli fuksin.....	0,5 g
1N NaOH.....	16 ml
destilovana voda.....	1000 ml

Andrade 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 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 211).



Slika 211. Test razlaganja glukoze na Kliglerovom agaru (Stilinović i Hrenović, 2010)

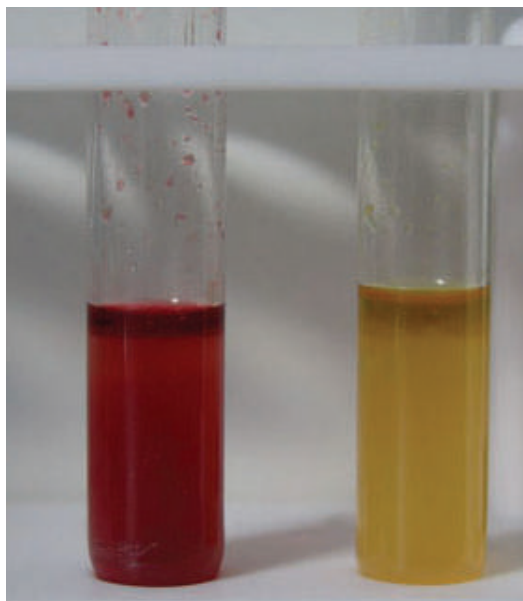
Reakcija s metil crvenim

Reakcijom s metil crvenim se ispituje sposobnost mikroorganizama da razlažu glukozu. Ispitivani mikroorganizam se zasije u bujon za reakciju s metil crvenim. Zasijana podloga se inkubira 24-48 časova pri 37 °C. Poslije završene inkubacije se na oko 10 ml bujonske kulture doda 5-6 kapi rastvora metil crvenog. Pojava crvene boje označava da je došlo do snižavanja pH podloge, usljed stvaranja kisjeline koja je proizvod fermentacije glukoze. Crvena boja je znak pozitivne metil crveno (metil red) reakcije (slika 212).

Reagens za reakciju s metil crvenim:

metil crveno.....	0,1 g
etanol (96%).....	250 ml
destilovana voda.....	250 ml

Metil crveno se najprije rastvori u etanolu, a zatim se doda destilovana voda.



Slika 212. Reakcija sa metil crvenim: crvena boja - pozitivna reakcija (Stilinović i Hrenović, 2010)

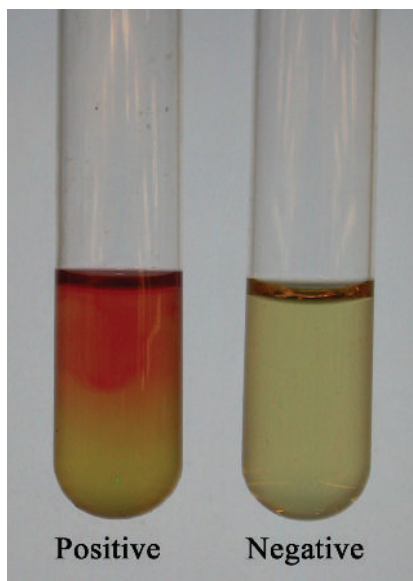
Voges-Proskauer reakcija

Voges-Proskauer reakcijom se dokazuje stvaranje acetil metil karbinola. Za ovo ispitivanje koristi se isti bujon kao za reakciju s metil crvenim. Na 2,5 ml zasijanog bujona doda se 0,6 ml reagensa A i 0,2 ml reagensa B, a zatim snažno protrese. Reakcija se očitava nakon 10-15 minuta, a zatim nakon dva i četiri časa. Ukoliko se stvorio acetil-metilkarbinol, pojaviće se crvena boja (slika 213).

Reagens A:

alfa naftol.....5 g
etanol (96%).....100 ml

Reagens B: 40% rastvor kalijum-hidroksida (KOH) u vodi.



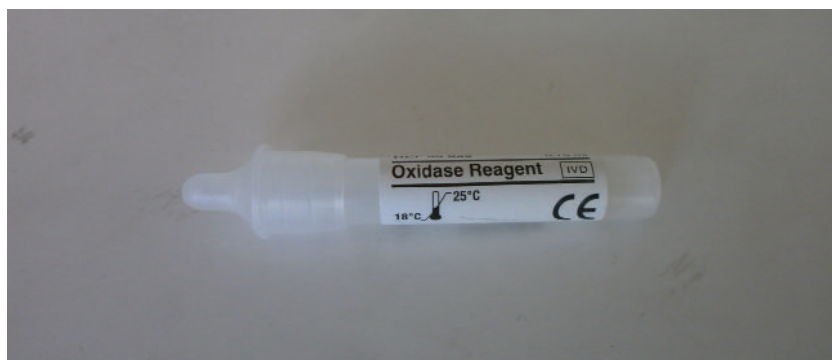
Slika 213. Voges - Proskauer reakcija: pozitivan test - crvena boja, negativan - žuta boja (Stilinović i Hrenović, 2010)

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 p-aminodimetil anilin oksalata, slika 214). 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 215).



Slika 214. Oksidaza reagens (Bojanić Rašović)



Slika 215. Pozitivan oksidaza test – pojava ljubičaste boje (Bojanić Rašović)

Ureaza test

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

Koagulaza test

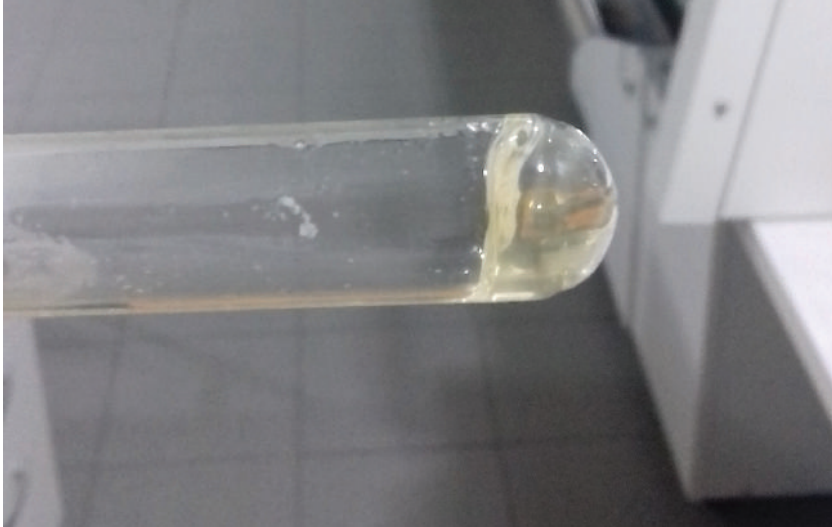
Na osnovu koagulaza testa može se *S. aureus* razlikovati od *S. epidermidisa*. Koagulaza se dokazuje uz pomoć krvne plazme.

Postupak dobijanja plazme kunića za koagulaza test

Na 10 ml krvi kunića se dodaje 1 ml 10% rastvora natrijum citrata, a zatim se centrifugovanjem izdvoji plazma kao bistri sloj iznad istaloženih eritrocita.

Dokazivanje koagulaze

Plazma se razblaži fiziološkim rastvorom u odnosu 1 : 15. Od toga se uzme 0,5 ml i sipa u epruvetu, a zatim se ezom doda djelić kolonije koja se ispituje. Nakon toga se epruveta stavi u termostat na 37 °C. Poslije 2 časa kontroliše se da li je došlo do koagulacije plazme (slika 216). Ako nije došlo, reakcija se čita i nakon 4, 6 i 24 časa inkubacije. Za negativnu kontrolu uzima se 0,5 ml plazme koja ne smije da koagulira poslije određenog vremena, a za pozitivnu kontrolu, plazma zasijana sa već provjerenim pozitivnim sojem *S. aureus*.



Slika 216. Pozitivan test koagulaze - koagulum plazme je pričvršćen za dno epruvete (Bojanić Rašović)

Test aglomeracije stafilokoka (*Clumping test*)

Test aglomeracije stafilokoka u krvnoj plazmi kunića se radi na mikroskopskoj pločici. Na mikroskopsku pločicu se izmiješa kap plazme sa dijelom ispitivane kolonije stafilokoka. Pojava pahuljica u roku od dva minuta označava pozitivnu reakciju, dok kod negativne reakcije tečnost ostaje homogeno zamućena. Ovaj test je obično u korelaciji sa testom koagulaze plazme, ali ne i uvijek. Zato je manje pouzdan za dokazivanje *S. aureus* u odnosu na 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. Podlozi se dodaje pH indikator bromtimol plavo. Mikroorganizmi koji razlažu citrate stvaraju bazne proizvode, pri čemu se boja indikatora mijenja iz tamno zelene u plavu. Ukoliko ispitivani mikroorganizam ne razlaže citrate, boja podloge ostaje nepromijenjena, tj. zelene boje (slika 217). Pri zasijavanju podloge 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, zato što bakterije koriste hranljive materije iz prenijetog materijala.



Slika 217. Negativan citratni test – lijevo, pozitivan citratni test - desno (Stilinović i Hrenović, 2010)

CAMP test

Pojava potpune lize eritrocita nakon zajedničkog dejstva beta toksina stafilokoka i hemolizina *S. agalactiae* zapazili su naučnici *Christie, Atkins, Munch* i *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 2-3 mm. Na svaku ploču treba zasijati jedan poznati soj *S. agalactiae* kao pozitivnu CAMP kontrolu. Zasijane podloge se inkubiraju 18-24 časa na 37 °C. Pozitivan CAMP test se ispoljava prosvjetljenjem u obliku lijevka u zoni beta hemolizina stafilokoka (slika 218).



Slika 218. Pozitivan Camp test - prosvetljenje u vidu lijevka (Čogurić)

Hidroliza eskulina

Bujonskoj kulturi staroj 24 časa doda se 0,5 ml 7% FeCl_3 . Crna boja označava pozitivnu reakciju, odnosno znak da je dejstvom bakterija došlo do razlaganja eskulina, pri čemu se FeCl_3 redukuje u 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 zasje ispitivanim mikroorganizmom i inkubira 24 časa. Nakon toga se uzima 1 ml bujonske kulture i dodaje joj se 0,25 ml 50% H_2SO_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 (slike 219-221). Kupuju se gotovi od proizvođača, zajedno sa reagensima.



Slika 219. API test za dokazivanje laktobacila (Bojanić Rašović)



Slika 220. API test za dokazivanje laktokoka (Bojanić Rašović)

B I O M É R I E U X

imprimé en France / Printed in France

REF. : _____

Origine / Source / Herkunft /
 Origen / Origen / Προέλευση /
 Ursprung / Oprindelse / Pochodzenie : _____

12138 A

CE

api® 50 CH

0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45	46	47	48	49
0	GLY	ERY	DARA	LARA	RIB	DXL	LXL	ADO	MDX	GAL	GLU	FRU	MNE	SBE	RHA	DUL	INO	MAN	SOR	MDM	MDG	NAG	AMY	ARB	ESC	SAL	CEL	MAL	LAC	MEL	SAC	THE	IND	MLZ	RAF	AMD	GLYG	XLT	GEN	TUR	LYX	TAG	DFUC	LFUC	DARL	LARL	GNT	SKG	SKG

48 h 24 h

Incub./Inok./Υλικό ενοφθαλμισμού :

Incub./Inkub./Θερμοκρασία επώασης :

Autres tests / Other tests / Andere Tests /
 Otras pruebas / Altri test / Outros testes /
 Άλλες εξετάσεις / Andra tester /
 Andre tests / Inne testy :

Ident. / Ταυτοποίηση :

Slika 221. Identifikacioni papir za API test za dokazivanje laktobacila (Bojanić Rašović)

VJEŽBA VIII (prvi dio)

SEROLOŠKA DIJAGNOSTIKA ZARAZNIH BOLESTI

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?

Serološke reakcije

Serološke reakcije su vidljivi rezultati vezivanja antigena (Ag) i antitijela (At, Ab). U osnovne serološke reakcije spadaju: aglutinacija, precipitacija, reakcija vezivanja komplementa (RVK), testovi koji koriste obilježena antitijela ili antigene, neutralizacija, inhibicija hemaglutinacije i dr. 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.

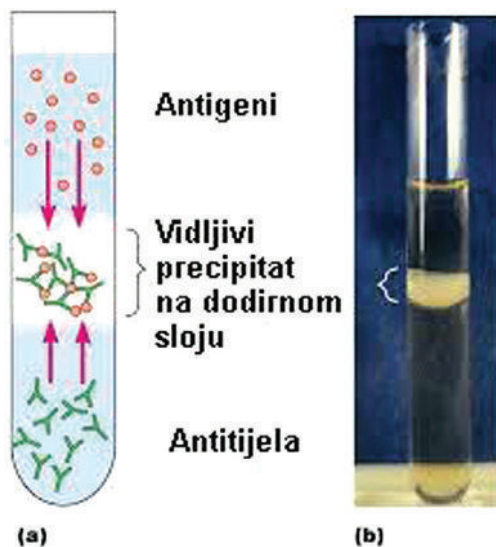
Aglutinacija

Do reakcije aglutinacije dolazi vezivanjem antitijela sa korpuskularnim antigenima. Ovi antigeni se zovu korpuskularni jer su vezani za neku ćeliju ili česticu (korpuskulu). Korpuskule u aglutinaciji su ćelije bakterija, gljiva, eritrociti i dr. Kao

produkt reakcije se stvara mreža - **aglutinat**. Zbog prirode reakcije, antigeni u ovoj reakciji se nazivaju aglutinogeni, a antitijela aglutinini. Za reakciju aglutinacije veoma je važan odnos količine antigena i antitijela, jer samo pri optimalnom odnosu dolazi do pojave aglutinata. U prisustvu veće količine antigena u odnosu na količinu antitijela stvaraju se veoma mali aglutinacijski kompleksi i obrnuto. Pored ovoga, važni faktori su pH, temperatura, koncentracija elektrolita i sl. Takođe je važna i klasa antitijela koja učestvuje u reakciji (antitijela IgM klase vezuju oko 800 x više antigena nego antitijela IgG klase). Postoje pet klasa antitijela, tj. imunoglobulina: IgG, IgM, IgA, IgD i IgE. Aglutinacija se može izvoditi na predmetnoj pločici, u epruvetama ili plastičnim pločama sa malim udubljenjima. Prema vremenu pojavljivanja aglutinata, razlikuje se brza i spora aglutinacija. **Brza aglutinacija** se izvodi tako što se na predmetno staklo stavi kap ispitivanog seruma, a zatim kap ispitivanog uzorka, odnosno antigena (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**. **Spora aglutinacija** izvodi se u epruvetama. Napravi se serija razrjeđenja seruma u fiziološkom rastvoru i u svako od njih se doda standardna količina antigena. Epruvete se promućkaju i inkubiraju u termostatu na 37 °C tokom 24 časa. Nakon ovog perioda se očitavaju rezultati. Ukoliko je tečnost u epruveti mutna i talog 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 nijesu 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, razlikuje se precipitacija u tečnom medijumu i precipitacija na polučvrstom medijumu (na gelu). U tečnom medijumu najčešće se izvodi precipitacija u prstenu. Ova precipitacija se može koristiti za dokazivanje antigena ili antitijela. Ako se dokazuju antitijela, potrebno je u epruvetu naliti ispitivani serum, a pažljivo preko njega suspendovani antigen, u istoj količini. Tečnosti se ne smiju izmiješati, već granica između njih mora ostati jasna. Ako su u serumu prisutna antitijela, na mjestu dodira dvije tečnosti, nakon par minuta, javiće se precipitat u vidu prstena (slika 222). Ova metoda se koristi, na primjer, za dokazivanje uzročnika antraksa.



Slika 222. Reakcija precipitacije

Precipitacija na gelu podrazumijeva difuziju antigena i antitijela kroz gel, spontano (imunodifuzija) ili pod dejstvom električne struje (imunoelektroforeza). Na mjestu gdje je koncentracija antigena i antitijela u gelu optimalna, javlja se precipitat u vidu bijele linije (slika 223). Test se izvodi tako što se u jednu rupicu na gelu stavi antigen, a u drugu rupicu antitijela (odnosno ispitivani serum), koji potom difunduju i stvaraju precipitat.



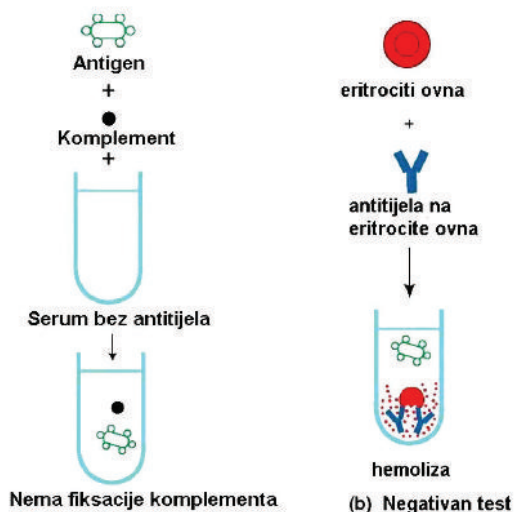
Slika 223. Rupice u gelu za izvođenje testa precipitacije (Bojanić Rašović)

Reakcija vezivanja komplementa

Komplement je kompleksni enzimski sistem koji se nalazi u serumu životinja i ljudi i ima više komponenata, od kojih su najbitnije C_1 , C_2do C_9 . Aktivira se nakon nespecifičnog vezivanja za kompleks Ag-At - preko Fc fragmenta antitijela. Komplement je termolabilan i može se inaktivirati zagrijavanjem seruma na $56\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 30 minuta. Aktivirani komplement ima sposobnost da lizira, tj. razgrađuje bakterije (bakterioliza) i eritrocite (hemoliza).

Postupak izvođenja reakcije

U seriju razrjeđenja ispitivanog seruma u kome je inaktiviran komplement, dodaje se poznati virus (antigen) i komplement. Nakon inkubiranja na $37\text{ }^\circ\text{C}$ tokom 90 minuta dodaju se eritrociti ovna i antitijela na eritrocite (antitijela su dobijena imunizacijom kunića, ubrizgavanjem eritrocita ovna). Ako u uzorku ispitivanog seruma ima antitijela na dodati virus, doći će do formiranja kompleksa Ag-At, za koji će se vezati komplement. U tom slučaju je komplement potrošen, pa neće doći do reakcije hemolize eritrocita. Poslije inkubiranja 30 minuta na $37\text{ }^\circ\text{C}$ očitava se da li je došlo do hemolize eritrocita. Reakcija hemolize nastaje kada se pomiješaju eritrociti ovna (antigeni), antitijela na eritrocite i komplement. Ukoliko dođe do hemolize, suspenzija u epruveti se boji svijetlocrveno i gubi se zamućenje koje je poticalo od suspendovanih eritrocita. Prema tome, ukoliko izostane hemoliza, reakcija ispitivanog seruma je pozitivna, jer se komplement vezao za kompleks koji se stvorio između antitijela prisutnih u serumu i virusa. Ukoliko dođe do pojave hemolize, reakcija je negativna, jer nije došlo do formiranja kompleksa antitijela i virusa, pa se komplement vezao za stvoreni kompleks antigen-antitijelo, tj. za kompleks eritrocita i antitijela na eritrocite (slika 224).



Slika 224. Negativna reakcija vezivanja komplementa - pojava hemolize

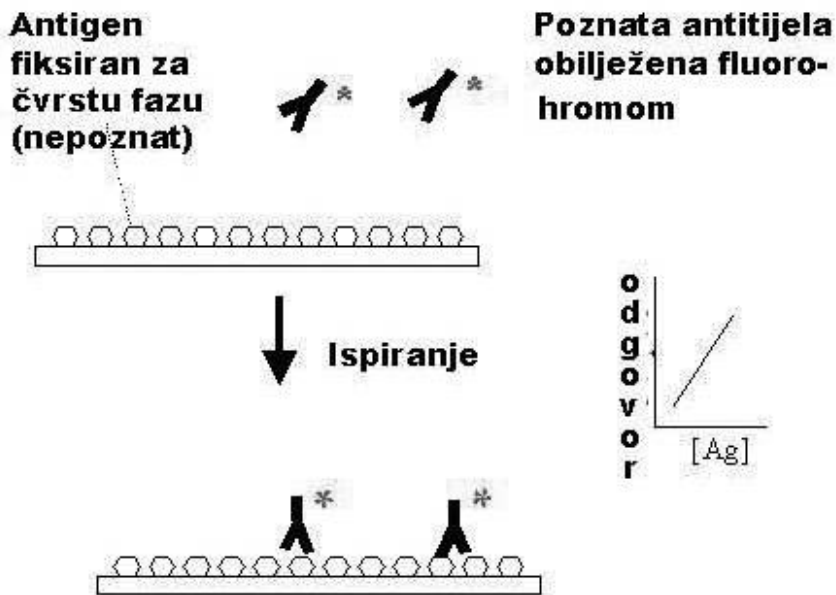
Testovi koji koriste obilježena antitijela

Testovi fluorescentne mikroskopije

U ovim testovima se koriste monoklonalna antitijela koja su obilježena fluorohromima - specijalnim bojama koje fluoresciraju kada se osvijetle ultravioletnim zracima. Testovi se izvode kao direktni, indirektni i antikomplementarni.

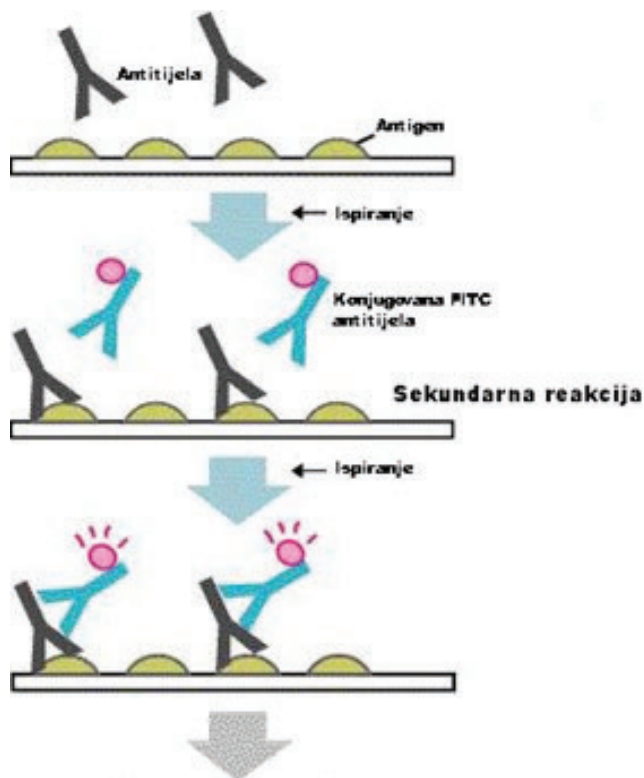
Direktna imunofluorescentna tehnika

Podrazumijeva djelovanje obilježenih antitijela 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 225).



Slika 225. Test direktne imunofluorescencije

Indirektna imunofluorescentna tehnika je slična direktnoj, 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 226).

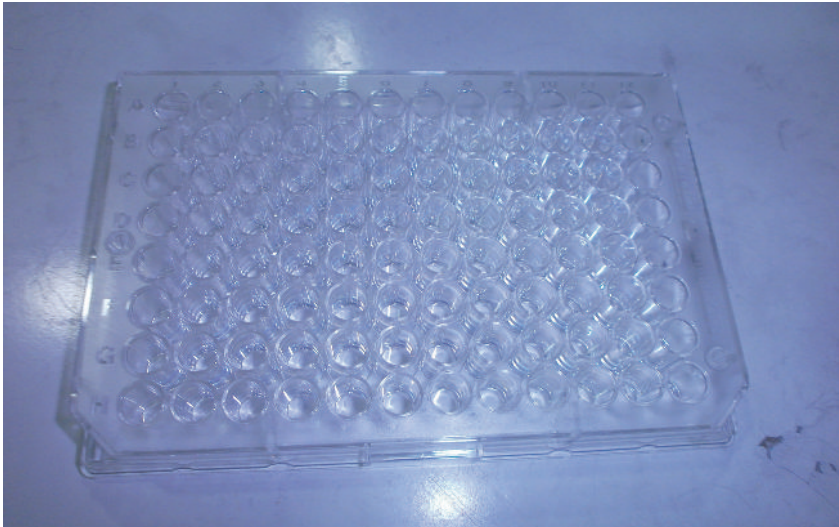


Slika 226. Test indirektne imunofluorescencije

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

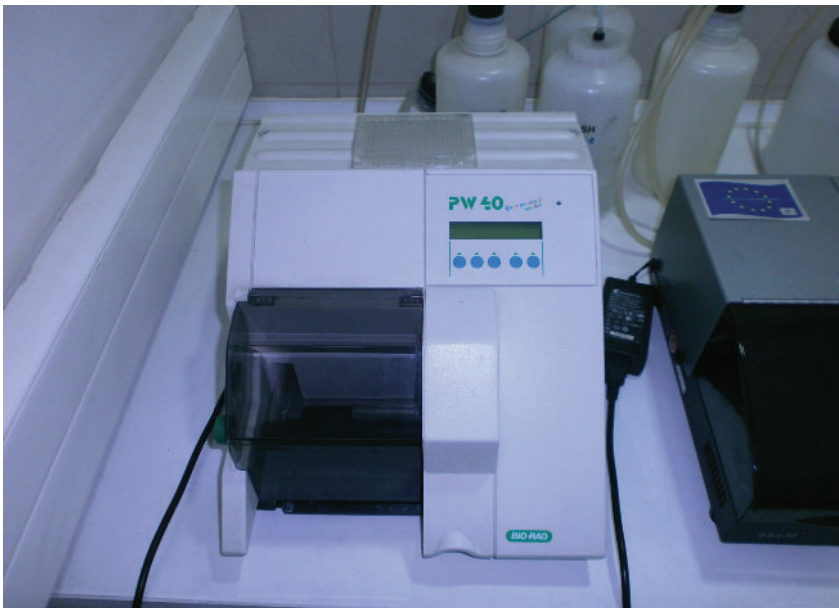
Imunoenzimski test - ELISA test (ELISA - *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*)

Imunoenzimski testovi zasnivaju se na reakciji Ag-Ab i reakciji između enzima koji je vezan za anti-antitijela (npr. enzim peroksidaza) 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 (slika 227).



Slika 227. Mikrotitarska ploča za Elisa test (ima 96 malih udubljenja - bunarčića)(Bojanić Rašović, 2021)

Test se može koristiti za dokazivanje Ag ili Ab. Za dokazivanje Ab u serumu potrebno je vezati Ag za ploču, a potom dodati serum. Mikrotitarsku ploču treba nakon određenog vremena inkubacije isprati. Ispiranje može da se vrši ručno, mikropipetom ili uz pomoć Elisa ispirača –Elisa washera (slika 228).

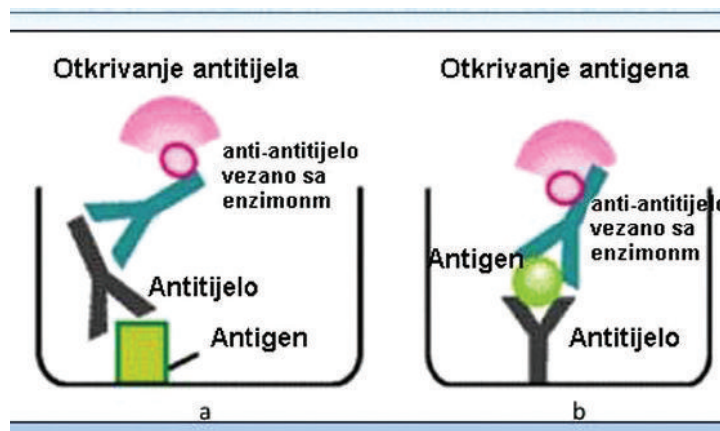


Slika 228. Elisa ispirač (Elisa washer) (Bojanić Rašović, 2021)

Ako u serumu postoje Ab, oni se vezuju sa Ag i ostaju na ploči i nakon ispiranja. Zatim se dodaju anti-antitijela vezana sa enzimom, koja će se vezati za antitijela, ukoliko su ona ostala vezana za antigene na ploči (slika 229). Nakon inkubacije i ispiranja, dodaje se supstrat za enzim, koji, u slučaju da su anti-antitijela prisutna, biva razložen dejstvom enzima, što se manifestuje promjenom boje rastvora. Promjena boje u oknu test ploče, dakle, ukazuje na pozitivnu reakciju (slika 230).



Slika 229. Elisa reagensi (Bojanić Rašović, 2021)



Slika 230. Šematski prikaz Elisa testa

Za čitanje rezultata Elisa testa koristi se Elisa čitač. Pomoću čitača se mjeri optička gustina uzoraka na osnovu intenziteta apsorbovane svjetlosti (određene talasne dužine) koja se propušta kroz ispitivani uzorak. Optička gustina je veća kod pozitivnih uzoraka (slike 231 i 232).



Slika 231. Elisa čitač (Bojanić Rašović, 2021)

biotehnicki institut
 Datum: 28/01/1904 Merenje optičke gustine
 Ploca# _____ od _____
 Delovodni brojevi: ! ! ! ! ! !
 Stanje uzoraka: ! ! ! ! ! !

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	0.167	0.892	0.171	0.179	0.148	0.189	0.147	0.179	0.174	0.140	0.138	0.16
B	0.176	0.167	0.163	0.194	0.164	0.190	0.152	0.191	0.172	0.184	0.177	0.17
C	0.179	0.185	0.187	0.179	0.159	0.191	0.153	0.173	0.161	0.195	0.143	0.18
D	0.162	0.238	0.177	0.204	0.178	0.162	0.149	0.207	0.145	0.157	0.133	0.15
E	0.137	0.166	0.149	0.178	0.145	0.150	0.163	0.185	0.144	0.168	0.138	0.17
F	0.129	0.165	0.159	0.164	0.148	0.189	0.170	0.171	0.153	0.196	0.151	0.16
G	0.154	0.166	0.164	0.170	0.201	0.157	0.190	0.176	0.150	0.167	0.152	0.17
H	0.136	0.201	0.160	0.161	0.143	0.156	0.144	0.151	0.145	0.165	0.145	0.18

Slika 232. Vrijednosti za optičku gustinu uzoraka očitane Elisa čitačem (čitanje mikrotitarske ploče sa 96 bunarčića) (Bojanić Rašović)

VJEŽBA VIII (drugi dio)

MOLEKULARNA DIJAGNOSTIKA ZARAZNIH BOLESTI - PCR METODA

Pitanja

1. Šta je PCR reakcija?
2. Koje su faze jednog ciklusa PCR reakcije?

PCR METODA

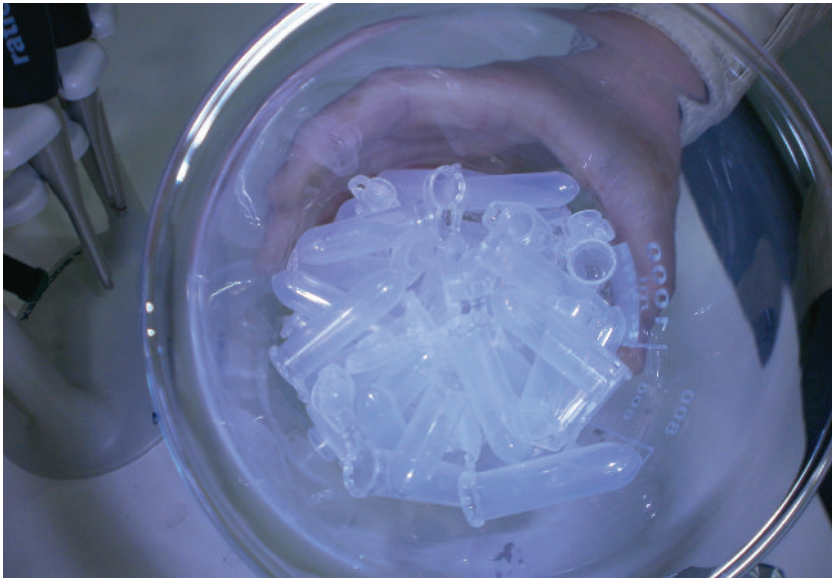
Lančana reakcija polimeraze (Polymerase Chain Reaction - PCR metoda) je molekularna metoda koja se danas značajno koristi u dijagnostici zaraznih bolesti. PCR metoda je veoma precizna, jer se zasniva na otkrivanju specifičnog segmenta DNK molekula, svojstvenog samo određenom mikroorganizmu - po kojem se on razlikuje od svih drugih organizama. Da bi se taj specifični segment DNK molekula mogao detektovati, potrebno ga je umnožiti u veći broj kopija - što se postiže PCR reakcijom.

PCR reakcija, dakle, predstavlja *in vitro* umnožavanje (amplifikacija, replikacija) definisane DNK sekvence (slika 82). Region koji se umnožava je određen izborom prajmera. Prajmeri su kratki lanci oligonukleotida (obično 20-30), čija sekvencija odgovara krajevima regiona od interesa. Reakcija koristi dva oligonukleotida (prajmera), koji su komplementarni krajevima sekvence koja se umnožava i koji su međusobno suprotno orijentisani. Sinteza specifičnih segmenata DNK je katalizovana termostabilnom DNK polimerazom.

Za odvijanje PCR reakcije neophodne su sljedeće komponente: DNK matrica - izolovana DNK čiji određeni fragment želimo da amplifikujemo, prajmeri, slobodni dezoksiribonukleotidi (dNTP), enzim DNK polimeraza (Taq polimeraza), $MgCl_2$. Smješa ovih komponenti priprema se u mikrotubama (mikroepurvice zapremine 0,2-0,5 ml). PCR reakcija se odvija u pomenutim mikrotubama u PCR mašinama - termosajklerima (slike 233-236).



Slika 233. Komponente za PCR reakciju (Bojanić Rašović, 2021)



Slika 234. Mikrotube (mikropruvetice) za izvođenje PCR reakcije (Bojanić Rašović)



Slika 235. Priprema smješe za izvođenje PCR reakcije (Bojanić Rašović)



Slika 236. Termosajkler za izvođenje PCR reakcije (Bojanić Rašović)

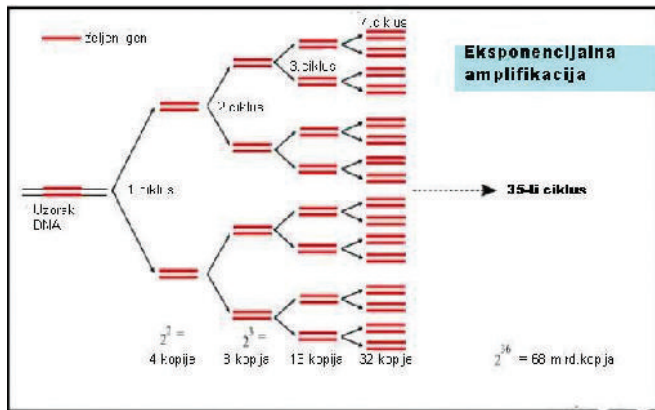
Postupak izolacije DNK

Za izvođenje PCR reakcije, potrebno je prethodno ekstrahovati - izolovati DNK iz biološkog materijala. Ekstrakcija DNK ćelije podrazumijeva oslobađanje DNK iz jedra ili organela ćelije eukariotskih mikroorganizama (mitohondrijalna ili plastidna DNK). Da bi došlo do ekstrakcije DNK, koristi se lizirajući rastvor koji ima ulogu da razloži: ćelijski zid (bakterija, biljaka, gljiva), ćelijsku membranu (animalnih ćelija i drugih ćelija), membrane organela (mitohondrija i plastida), zidove spora (sporogenih bakterija, protozoa) i druge vrlo čvrste tvorevine, kao što su: hitinska kutikula, kosti, rožne tvorevine, keratin. U sastav lizirajućeg rastvora ulaze deterdžent i enzim proteinaza K. Deterdžent ima ulogu da razbije citoplazmatsku i jedarnu membranu ćelije i tako oslobodi DNK. Pošto je DNK obavijena proteinima (histonima), proteinaza K ima ulogu da odvoji ove proteine i potpuno oslobodi DNK. Nakon ovog koraka, dodaje se koncentrovani rastvor soli, kako bi se proteini i drugi ostaci razbijenih ćelija grupisali. Nakon toga se epruveta centrifuguje, pri čemu se teški ugrušci proteina i ćelijskih ostataka stalože na dno epruvete, a DNK lanci ostaju difuzno raspoređeni u tečnom sadržaju epruvete. Tečni sadržaj u kojem se nalazi DNK se prenosi u čistu epruvetu (talog odbacujemo). Tečnom sadržaju dodajemo izopropil alkohol i zajedno promiješamo laganim ručnim okretanjem epruvete. Na taj način se postiže da se DNK, koja se ne rastvara u izopropil alkoholu, izdvoji iz rastvora u vidu ugrušaka koji se mogu vidjeti golim okom. Epruveta se centrifuguje, pri čemu se na dno taloži zgrušana DNK. Tečna faza (supernatant) se pipetom ukloni iz epruvete i odbacuje, a istaložena DNK čuva u zamrzivaču ili odmah koristi za PCR reakciju.

Faze jednog ciklusa PCR reakcije

Umnožavanje ciljne DNK sekvence u termosajklerima se dešava tokom većeg broja ciklusa (30-40). Jedan ciklus PCR reakcije se sastoji od: **faze denaturacije** DNK matrice (razdvajanje – rasplitanje dvostrukog DNK lanca), **faze hibridizacije** (vezivanja) prajmera i **faze elongacije** (produžavanja) komplementarnih lanaca ciljne DNK sekvence. Za vrijeme svakog ciklusa, u prvoj fazi PCR, dvolančana DNK - matrica se denaturiše, razdvaja na dva lanca na temperaturi od 93 do 96 °C. Nakon hlađenja, nastupa druga faza PCR ciklusa, koja se sastoji u vezivanju prajmera za komplementarne sekvence, sada jednolančanog, DNK molekula. Vezivanje prajmera se odvija na temperaturi od 65 do 75 °C. Vezivanje prajmera će omogućiti aktivaciju enzima DNK polimeraze, koji katalizuje reakciju polimerizacije, tj. sinteze ciljane sekvence DNK lanca. Najčešće korišćeni enzim je termostabilna Taq DNK polimeraza, porijeklom iz bakterije *Thermus aquaticus*. DNK polimeraza vrši sintezu određene sekvence dvolančane DNK. Aktivacijom DNK polimeraze počinje treća

faza ciklusa - faza produženja lanca ili elongacija. Ona se odvija pri temperaturi oko 72 °C, pri čemu dolazi do vezivanja nukleotida iz reakcione smješe. 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 nosintetizovanu DNK, što rezultira u eksponencijalnom povećanju broja kopija. Broj umnoženih fragmenata u PCR reakciji eksponencijalno raste, jer svaki nosintetisani lanac u sljedećem ciklusu služi kao matrica za sintezu DNK. Za približno dva sata dobija se 10^6 do 10^9 kopija određenog DNK fragmenta (slika 237). Umnoženi ciljani fragmenti DNK se zovu amplikoni ili PCR produkti.

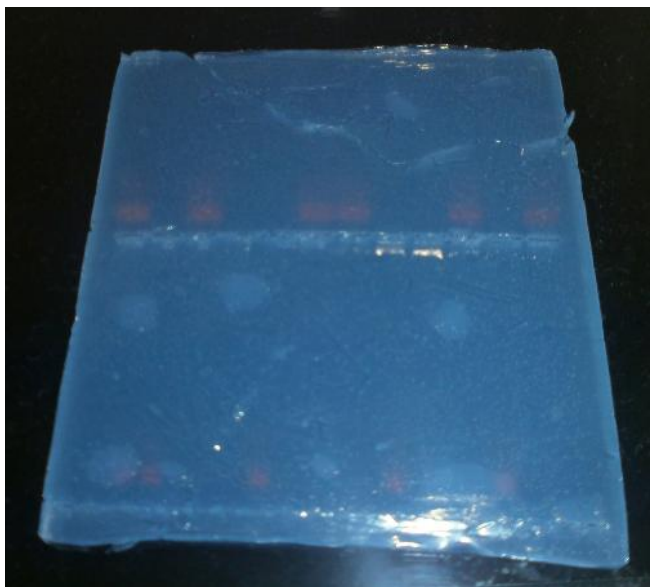


Slika 237. Šematski prikaz PCR reakcije

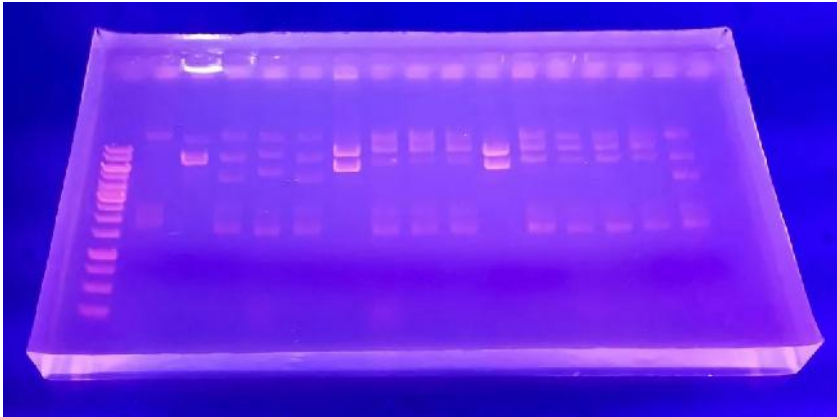
Nakon izvođenja PCR reakcije, potrebno je uraditi identifikaciju amplifikovanog fragmenta, a to se postiže nakon elektroforeze proizvoda PCR reakcije na agaroznom gelu. Elektroforeza omogućava razdvajanje molekula DNK različite dužine pod uticajem električnog polja prilikom njihovog kretanja kroz agarozni gel potopljen u rastvor slabog elektrolita. Fragmenti DNK različite dužine imaju različitu elektropokretljivost, pa kroz gel putuju različitom brzinom (od – ka + polu). Pri svakoj elektroforezi, osim uzoraka koji se ispituju, nanosi se i DNK marker koji predstavlja mješavinu fragmenata tačno određene dužine (npr. 100, 200, 300, 500, 1000 bp) i služi za upoređivanje sa ispitujućim fragmentima. Nakon elektroforeze, fragmenti različite veličine su razdvojeni, ali nijesu vidljivi. Zbog toga se gel boji rastvorom etidijum bromida, nakon čega DNK fragmenti postaju vidljivi pod UV svjetlom i mogu se fotografisati (slike 238-241).



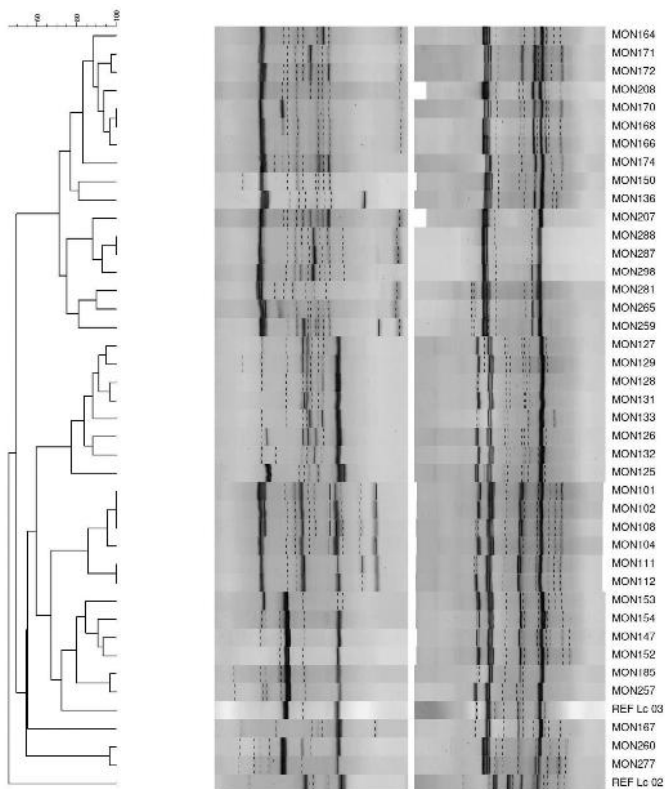
Slika 238. Priprema proizvoda PCR reakcije za elektroforezu – nanošenjem u male rupice u gelu (Bojanić Rašović)



Slika 239. Agarozni gel nakon elektroforeze obojen etidijum bromidom (Bojanić Rašović)



Slika 240. Agarozna gel nakon elektroforeze obojen etidijum bromidom i posmatran pod UV svijetlom - uočavaju se razdvojeni fragmenti DNK <https://www.technologynetworks.com/analysis/articles/agarose-gel-electrophoresis-how-it-works-and-its-uses-358161>



Slika 241. Rezultati elektroforeze PCR produkata – odvojeni su fragmenti DNK različite dužine (Bojanić Rašović, identifikacija bakterija mliječne kiseline)

Osnovni zahtjev koji prajmeri trebaju da ispune jeste da su specifični za organizme koji se identifikuju. To znači da su prajmeri komplementarni sa sekvencama DNK koje se nalaze samo u ciljnom organizmu i 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 odgovarajućoj podlozi. PCR metodom najčešće se vrši detekcija virusa, nekih bakterija (*Mycobacterium tuberculosis*, hlamidije) i dr. Nedostatak PCR metode je što se njom ne može ustanoviti da li umnoženi specifični DNK molekul potiče od živih ili mrtvih mikroorganizama.

VJEŽBA IX

MIKROORGANIZMI BURAGA

Pitanja

1. Koji je značaj mikroorganizama buraga?
2. Koji se mikroorganizmi nalaze u buragu?
3. Koji su uslovi za rast mikroorganizama u buragu?
4. Kako se uzima tečni sadržaj buraga za ispitivanje?
5. Kako se priprema tečnost buraga za posmatranje bakterija i protozoa?

Vrste mikroorganizama u buragu i uslovi za njihov rast

Mikroorganizmi naseljavaju burag u velikom broju. Oni se nalaze vezani za sluzokožu buraga (slika 242), kao i u njegovom sadržaju.



Slika 242. Izgled sluzokože buraga – papile (Bojanić Rašović)

Bakterijska masa čini oko 10% suvog sadržaja buraga. Pored bakterija, u buragu se u velikom broju nalaze i protozoe iz grupe *Ciliata* (oko $10^6/g$) i u vrlo malom broju kvasci. Uslovi, kao što su stalno prisustvo hranljivih materija i tečnosti, temperatura 38-42 °C, pogoduju razvoju mikroorganizama u buragu. Između populacije mikroorganizama u buragu i organizma životinje postoji tijesan simbiotski odnos. U ovoj specifičnoj sredini zastupljeni su svi oblici interakcije mikroorganizama. Mikroorganizmi koji žive u buragu su: anaerobni, neutrofilni i termofilni.

Bakterije buraga

U buragu su najbrojnije bakterije koje se zajedničkim imenom zovu rumino-bakterije. Broj im se kreće i do 10^{10} - $10^{11}/g$. U zavisnosti od supstrata koje koriste, u buragu su zastupljeni mikroorganizmi: razlagači celuloze, hemiceluloze, pektina, skroba, prostih šećera, proteina, lipida, bakterije koje koriste kisjeline i bakterije koje proizvode vodonik i metan (slika 243).



Slika 243. Kolonije mikroorganizama iz uzorka sadržaja buraga (Bojanić Rašović)

Osnovna uloga mikroorganizama koji žive u buragu je digestija i fermentacija celuloze i hemiceluloze. Mikrobiološke bjelančevine su vrednije od biljnih, jer sadrže sve esencijalne aminokisjeline. Potrebe za vitaminima grupe B i K preživari zadovoljavaju na račun mikroorganizama. Mnoge vrste bakterija buraga koriste ureju (karbamid) i sintetišu iz nje bjelančevine visoke biološke vrijednosti, koje na kraju usvajaju životinje. Zato se karbamid može koristiti kao dodatak hrani za preživare. Pored izuzetno korisne uloge mikroorganizama u organima za varenje, neki mogu

biti i patogeni. To su npr. bakterije: *Clostridium perfringens*, *Clostridium botulinum*, *Salmonella*, *Escherichia coli*, plijesni iz rodova *Aspergillus*, *Fusarium*, virusi itd.

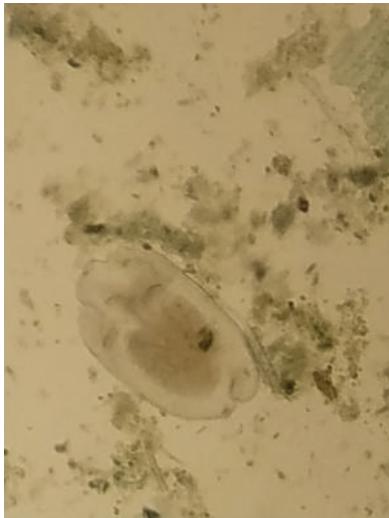
Bakterije mliječne kisjeline koje se mogu naći u buragu pripadaju rodovima: *Lactobacillus* (*L. fermenti*, *L. acidophilus*, *L. lactis*, *L. buchneri*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. brevis*) i *Bifidobacterium* (*B. bifidus*).

Celulolitičke 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*).

Skrob i dekstrine u buragu najaktivnije razgrađuju *Bacteroides amilophilus*, *Streptococcus bovis*, *Succinomonas amylolitica*, *Selenomonas dextrinosolvens*. Stvaranje metana vrše uglavnom *Methanobacterium ruminantium* i *Methanobacterium mobilis*. Oni vrše redukciju CO₂ do metana. Stvaranje metana u buragu je nepoželjna pojava, jer se 8-10% ukupne energije hrane troši na stvaranje metana. Najveću proteolitičku aktivnost u buragu imaju: *Butyrivibrio* spp., *Succinivibrio* spp., *Selenomonas ruminantium*, *Borrelia* spp. i *Bacteroides* spp.

Protozoe buraga

U buragu živi oko 50 vrsta protozoa. Broj protozoa u buragu je veći kada se životinja hrani kvalitetnom hranom. Protozoe predstavljaju punovrijednu bjelančevinastu hranu za domaćina. Hrane se bakterijama, manjim protozoama, skrobom i drugim sastojcima stočne hrane. Oko 80% svih protozoa u buragu su cilijate (infuzorije), koje pripadaju vrstama iz rodova *Diplodinium* i *Entodinium*. Takođe se često nalaze i cilijate iz rodova *Isotricha*, *Dasytricha* i dr. (slika 244).



Slika 244. *Entodinium* spp. iz sadržaja buraga goveda, označen crvenoom strelicom (nativni preparat, 400x, Bojanić Rašović)

Ispitivanje mikroorganizama koji se nalaze u tečnosti buraga

Uzimanje tečnog sadržaja buraga

Tečni sadržaj buraga (slika 245) se može uzimati sondom. U laboratoriji se tečnost filtrira kroz sito (prečnik oko 0,4 mm) i filtratu dodaje 10% formalin (ili 4-5% formaldehid) u odnosu 1 : 1 (slika 246).



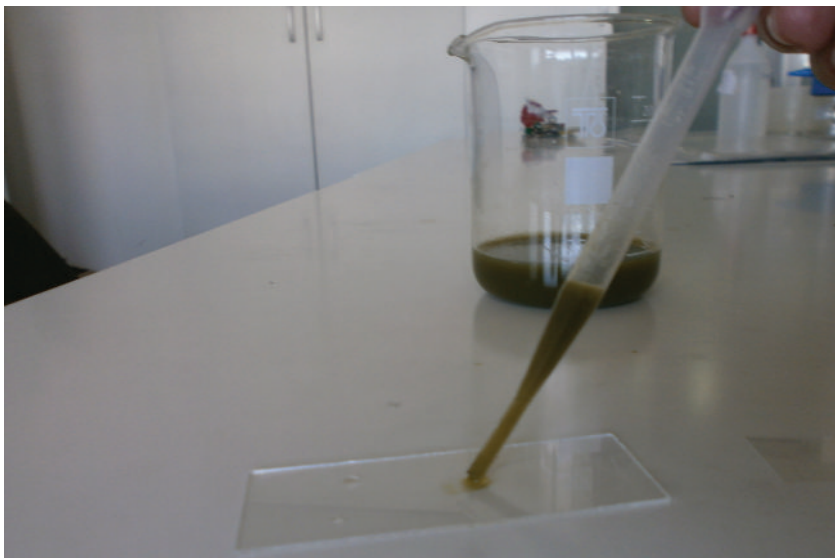
Slika 245. Tečni sadržaj buraga (Bojanić Rašović)



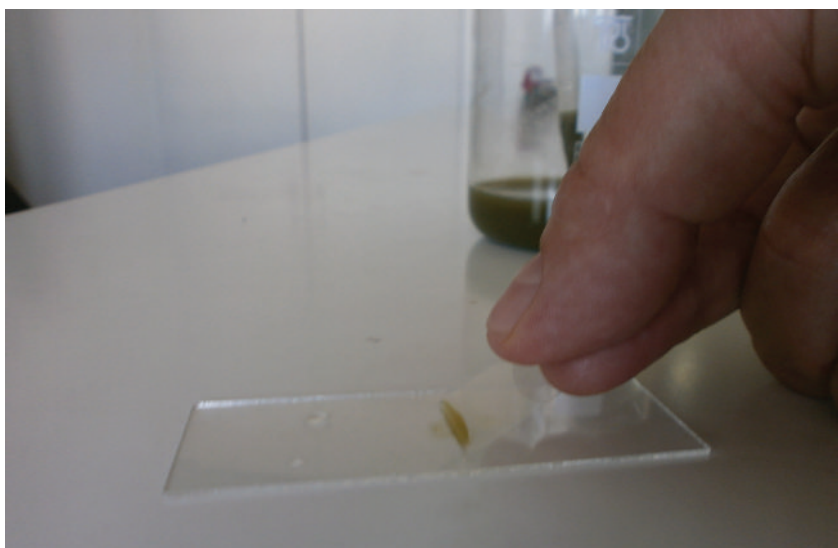
Slika 246. Filtracija sadržaja buraga (Bojanić Rašović)

Priprema mikroskopskih preparata iz tečnosti buraga

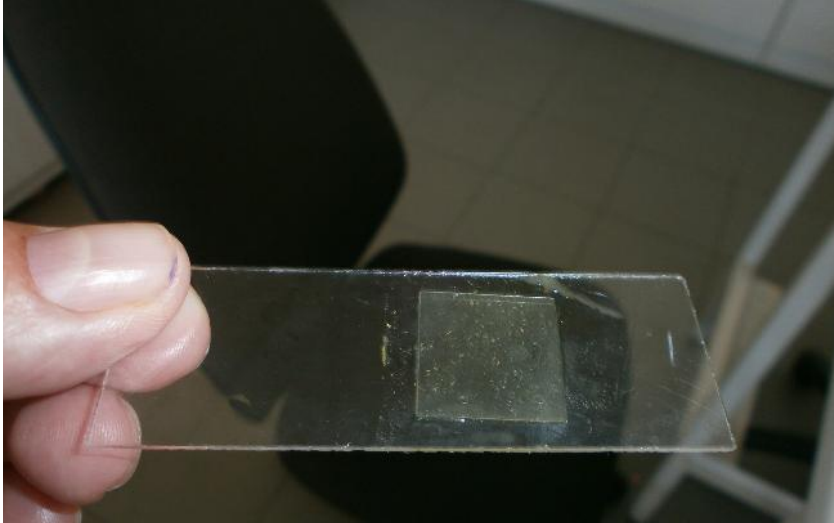
Na čisto predmetno staklo Pasterovom pipetom se nanese jedna kap pripremljene tečnosti buraga, jedna eza rastvora lugola i prekriva pokrovnim staklom (slike 247-249).



*Slika 247. Nanošenje kapi sadržaja buraga na predmetno staklo
(Bojanić Rašović)*

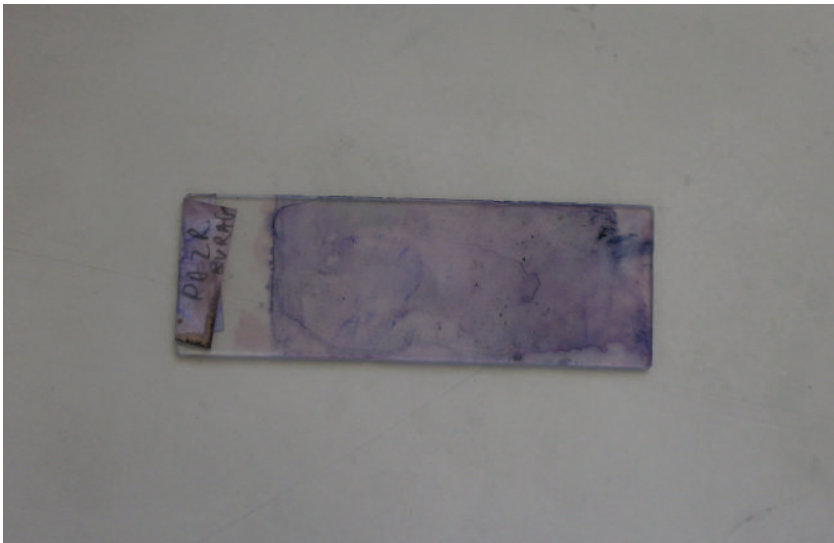


*Slika 248. Stavljanje pokrovnog stakla na mikroskopski preparat
(Bojanić Rašović)*



Slika 249. Pripremljen nativni preparat (Bojanić Rašović)

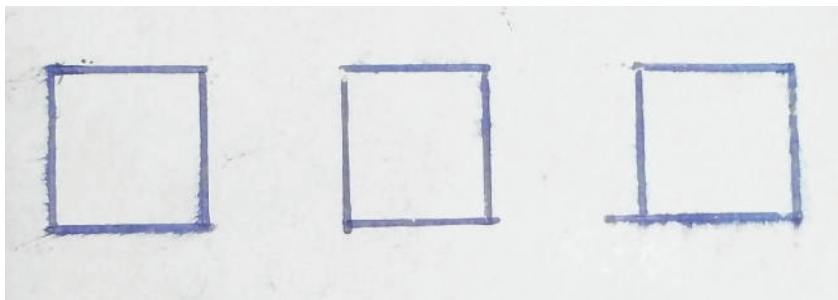
U početku se preparat posmatra malim uvećanjem objektiva, pri djelimično zatvorenoj dijafragmi kondenzora. Na preparatu se mogu uočiti protozoe u velikom broju, koje se veoma brzo kreću. Prečnika su oko 10 μm . S obzirom na to da se ovim uvećanjem ne mogu posmatrati bakterije jer su mnogo manje, za posmatranje bakterija pripremaju se fiksirani i obojeni preparati, koji se posmatraju imerzionim objektivom (slika 250).



Slika 250. Bojeni mikroskopski preparat iz sadržaja buraga, bojenje po Gramu (Bojanić Rašović)

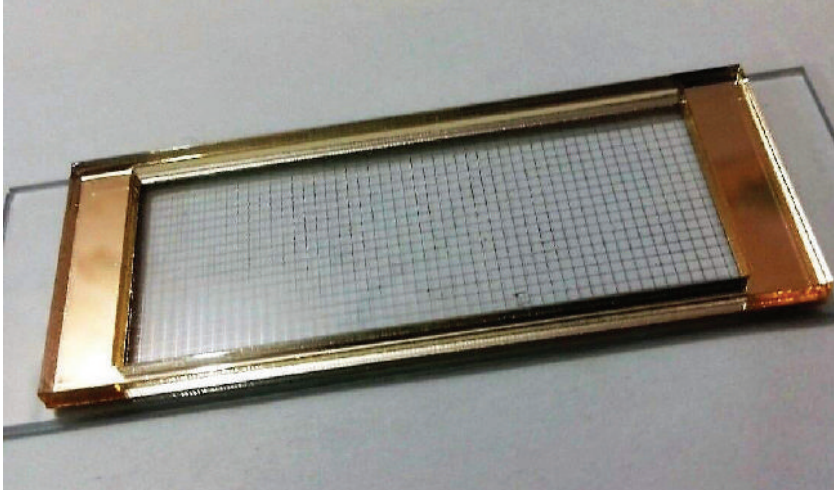
Brojanje protozoa buraga

Direktnom metodom broj protozoa se može odrediti pomoću bojenog razmaza na predmetnom staklu. Tečnost buraga u količini od 0,01 ml se nanese na 1 cm² površine predmetnog stakla u obliku kvadrata. Prije nanošenja tečnosti ispod predmetnog stakla se stavlja šablon oblika kvadrata površine 1cm² (slika 251).



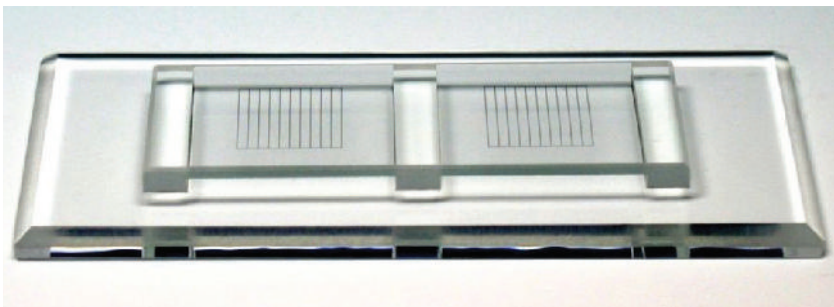
Slika 251. Šabloni oblika kvadrata površine 1 cm² koji se stavljaju ispod predmetnog stakla (Bojanić Rašović, 2020)

Razmaz se zatim suši, fiksira etanolom i boji po Gimzi ili metilenskim plavim. Nakon bojenja preparat se ispira vodom, osuši i posmatra imerzionim objektivom. Brojanje protozoa se vrši u 50 vidnih polja. Dobijeni broj protozoa u svim poljima se sabere i preračuna njihov broj po jednom vidnom polju, tako što se broj protozoa u svim vidnim poljima podijeli sa brojem pregledanih vidnih polja. Dobijeni broj protozoa po jednom vidnom polju se množi sa 100, kako bi se dobio broj mikroorganizama u jednom mililitru ispitivane tečnosti buraga (zato što je brojanje vršeno u 0,01 ml tečnosti buraga). Dobijeni broj protozoa se zatim množi sa dva, jer je početni uzorak tečnosti buraga razblažen istom zapreminom 10% rastvora formalina. Pošto pri određivanju broja protozoa treba uzeti u obzir i faktor mikroskopa, formula za izračunavanje broja protozoa bi bila: $FM \times X \times 102$, gdje je FM – faktor mikroskopa, X – srednji broj protozoa po jednom vidnom polju i 102 broj razblaženja ispitivane tečnosti buraga. Brojanje se može vršiti i uz pomoć komorica za brojanje, kao što su komorica za brojanje eritrocita – hemocitometar i specijalne komorice, kao što su Sedgewick Rafter (slika 252), McMaster (slika 253), Fuchs–Rosenthal komorica i dr. Sedgewick Rafter komorica ima dubinu 2 mm i zapreminu 1 ml. Dno komorice je podijeljeno na 1000 malih jednakih kvadrata. Preko komorice se stavlja pokrovno staklo, koje obezbjeđuje da zapremina komorice bude tačno 1 ml. Broj protozoa po jednom mililitru se računa tako što se srednji broj protozoa po jednom kvadratu pomnoži sa 1000 i sa dilucionim faktorom (brojem razrjeđenja). Protozoe se broje na najmanje 25 kvadrata i računa srednji broj. Sedgewick Rafter komorica ima prednost u odnosu na hemocitometar jer ima veću zapreminu, što smanjuje grešku vezanu za uzorkovanje.



Slika 252. Sedgewick Rafter komorica za brojanje protozoa buraga
<https://www.amazon.com/Yantra-Gridded-Sedgewick-Rafter-Counting-Cover/dp/B07MYQ158K>

McMaster komorica za brojanje protozoa (slika 253) se sastoji od dvije komorice koje imaju oblik kvadrata sa dužinom strane 10 mm i dubinom 1,5 mm. To znači da je zapremina komorica po 0,15 ml, odnosno zajedno 0,30 ml. Komorice se pokrivaju pokrovnim stakalcem kojim se ograničava zapremina komorica na 0,15 ml. Dno komorica je jednakomjerno izdijeljeno sa 5-9 paralelnih linija, što omogućava mikroskopski pregled cijele komorice. Postupak se izvodi tako što se Pasterovom pipetom prethodno homogenizovana suspenzija pod pravim uglom stavlja u obje komorice. Pri tome treba voditi računa da se ne stvore mjehurići vazduha, jer oni smanjuju zapreminu komorice i ometaju posmatranje protozoa. Sadržaj komorica se posmatra pod malim uveličanjem mikroskopa.



Slika 253. Komorica po McMasteru za brojanje protozoa buraga
<https://www.assistent.eu/en/product/counting-chambers-according-to-mcmaster/>

Ispitivanje pH sadržaja buraga

Normalna pH vrijednost buragovog sadržaja se kreće od 6 do 7,4. Ona je najniža 2 sata nakon hranjenja. Vrijednosti pH tokom dana variraju, u zavisnosti od vrste hrane. Za približno određivanje pH vrijednosti koristi se lakmus papir, a za preciznija mjerenja pH-metar (slika 254).



Slika 254. Mjerenje pH sadržaja buraga ručnim pH metrom (Bojanić Rašović)

Sadržaj buraga je jako kisjeo pri ishrani životinje velikim količinama veoma kisjele silaže i koncentrovanih ugljenohidratnih hraniva. Ukoliko u buragovom sadržaju preovlađuju truležni procesi ili se usljed razgradnje hrane bogate proteinima oslobađa velika količina amonijaka, elektrohemijaska reakcija buraga je alkalna.

Metoda određivanja pH buraga lakmus papirom

U tečnost buraga se stavi komadić trake crvenog ili plavog lakmus papira. Nakon 5-7 minuta se očitava reakcija. Ako ne dođe do promjene boje lakmus papira, reakcija je neutralna; ako crveni lakmus dobije plavu boju, reakcija je bazna – alkalna, a ako plavi lakmus pocrveni, reakcija je kisjela. Pošto je u našem ispitivanom uzorku crveni lakmus papir dobio plavu boju (slika 255), a plavi lakmus papir je ostao plav (slika 256), znači da je ispitivani sadržaj buraga bio alkalan.



Slika 255. Promjena boje crvenog lakmus papira u plavu – bazna pH reakcija sadržaja buraga (Bojanić Rašović)



Slika 256. Plavi lakmus je zadržao plavu boju – znak bazne pH reakcije sadržaja buraga (Bojanić Rašović)

VJEŽBA X

MIKROORGANIZMI SILAŽE

Pitanja

1. Koji se osnovni biohemijski proces odvija tokom proizvodnje silaže?
2. Kako se uzorkuje silaža za laboratorijsko ispitivanje?
3. Koji se mikroorganizmi mogu naći u silaži?
4. Kako se priprema mikroskopski preparat iz uzorka silaže?
5. Kako se određuje ukupna kisjelost silaže?
6. Kako se određuje pH silaže?

Biohemijski procesi koji se odvijaju tokom proizvodnje silaže

Osnovni biohemijski proces koji se odvija tokom siliranja zelene biljne mase je mliječna fermentacija. Tokom ovog procesa kao krajnji proizvod se stvara mliječna kisjelina. Bakterije mliječne kisjeline koje žive na biljkama imaju značajnu ulogu u siliranju stočne hrane. One fermentišu šećere siliranih biljaka u mliječnu kiselinu, koja suzbija razvoj nepoželjnih bakterija - koje kvare stočnu hranu, kao i rast patogenih bakterija. Bakterije mliječne kisjeline snižavaju pH stočne hrane na 4,2-4,0. Ako je kisjelost silaže manja (pH je iznad 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 mliječne kisjeline za snižavanje pH silaže. Puferska sposobnost biljnog materijala se određuje titracijom izmacerirane biljne mase 0,1 M rastvorom mliječne kisjeline. Određuje se koja je količina mliječne kisjeline potrebna za sniženje pH do 4,0. U dobroj silaži se u manjem broju mogu naći i kvasci. Oni stvaraju estre, koji silaži daju prijatan miris i obogaćuju stočnu hranu bjelančevinama i vitaminima. Kada se kvasci nalaze u većem broju, oni umanjuju kvalitet silaže, jer snižavaju njenu kisjelost.

Proučavanje mikroorganizama silaže

Uzimanje uzorka silaže

Prosječni uzorak silaže se uzima iz čelnog dijela rova, jame ili nadzemne kamare – silo trenča, ili iz plastičnih folija (slike 257 i 258).



Slika 257. Silo – trenč (Bojanić Rašović, 2003, Sicilija)



Slika 258. Silaža u plastičnoj foliji (Bojanić Rašović)

Pri tome se sterilnim nožem skida površinski sloj silaže, a zatim isijecaju kockice silaže po srednjoj liniji kamare u razmacima od 1 m. Kockice se stavljaju u staklene posude sa šlifovanim zapušačem, zapremine 1-2 dm³, tako da silaža bude složena gusto i do vrha (slika 259). U laboratoriji se uzorci pomiješaju, sitne sterilnim makazama i uzima određena količina za analizu. Ispitivanje treba izvršiti najkasnije jedan dan po uzimanju uzoraka.



Slika 259. Uzorak silaže uzet za laboratorijsko ispitivanje (Bojanić Rašović, 2020)

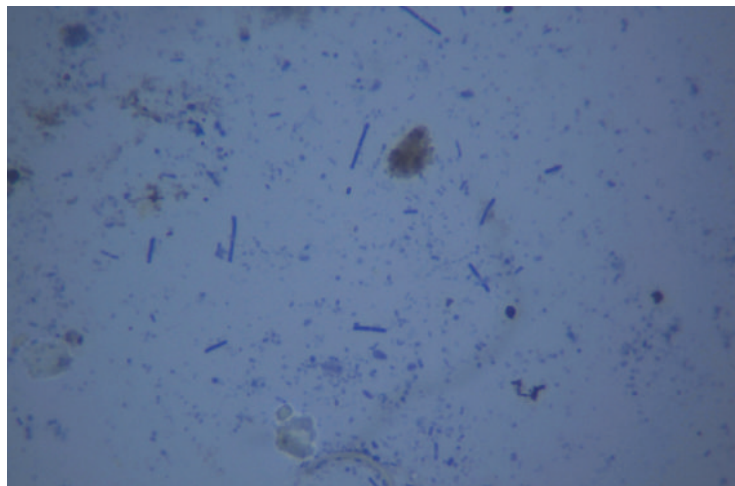
Priprema mikroskopskih preparata

Mikroskopski preparat iz silaže se pravi tako što se pincetom uzmu komadići silaže i njima pritisne predmetno staklo, kako bi ostao otisak (slika 260).

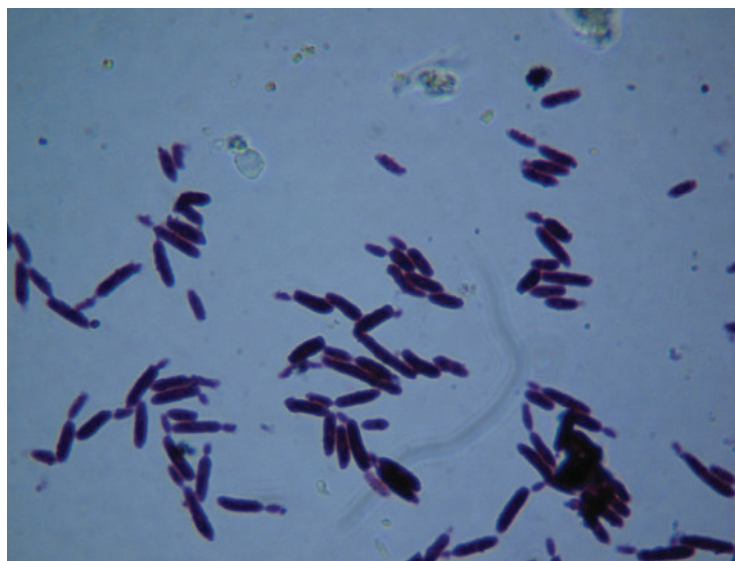


Slika 260. Priprema preparata iz uzorka silaže (Bojanić Rašović)

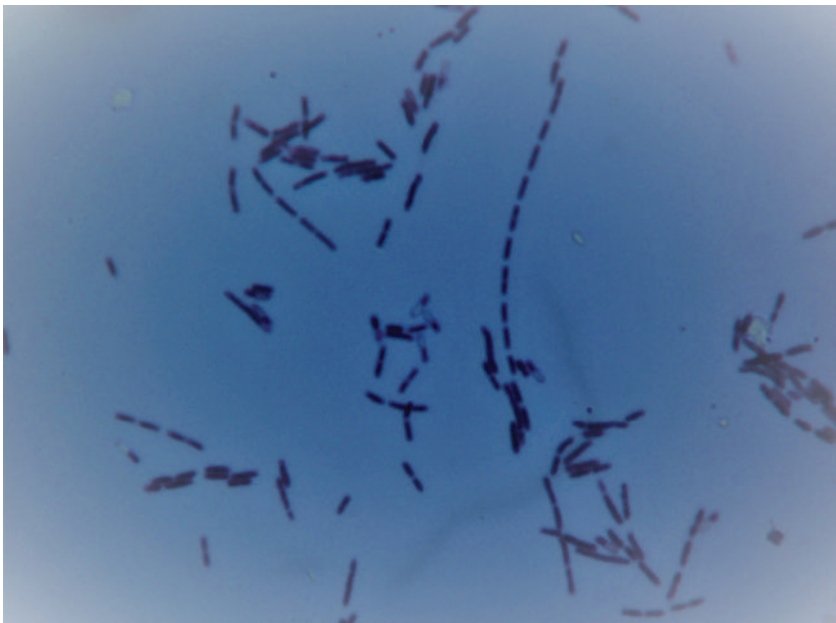
Preparat se zatim suši na vazduhu, fiksira na plamenu i boji metilenskim plavim (2-3minuta). Višak boje se ispira vodom, preparat osuši filter papirom, na njega nanese kedrovo ulje i posmatra imerzionim objektivom. Na preparatu obično dominiraju homofermentativni mezofilni kratki štapići koji pripadaju vrsti *Lactobacillus plantarum*, koji se često raspoređuju u paralelne redove, kao i laktokoke. Ponekad se mogu naći ćelije kvasaca u fazi razmnožavanja pupljenjem. U silaži slabog kvaliteta nalaze se bacili i plijesni (slike 261-263).



Slika 261. Lactobacillus spp. u silaži - tanki Gram pozitivni štapići (Bojanić Rašović)



Slika 262. Kvasci u silaži, bojenje metilenskim plavim (Bojanić Rašović, 1000x)



Slika 263. Bacillus spp. u silaži, bojenje po Gramu (Bojanić Rašović, 1000x)

Izolacija bakterija mliječne kisjeline iz silaže

Za izolaciju bakterija mliječne kisjeline iz silaže koriste se šira - agar sa CaCO_3 ili kupusni agar sa CaCO_3 . Usljed nakupljanja mliječne kisjeline, oko kolonija bakterija mliječne kisjeline izraslih na pomenutim podlogama stvaraju se zone razlaganja CaCO_3 .

Određivanje ukupne kisjelosti silaže

Ukupna kisjelost silaže se određuje titracijom ekstrakta silaže u destilovanoj vodi sa 0,1 M rastvorom NaOH u prisustvu fenolftaleina do pojave blijedoružičaste boje.

Određivanje pH silaže

U epruvetu se stavi malo silaže i dolije malo destilovane vode - da se silaža prekrije. Sadržaj se dobro izmiješa štapićem i pH odredi pomoću pH indikatora. U porcelansku šolju pipetom se prenesu 2 ml ekstrakta silaže i dodaju 2 kapi indikatora (smjesa istih količina bromtimol-plavog i metil-crvenog). Poređenjem boje u šolji sa podacima u tabeli 1, određuje se koncentracija vodonikovih jona (pH):

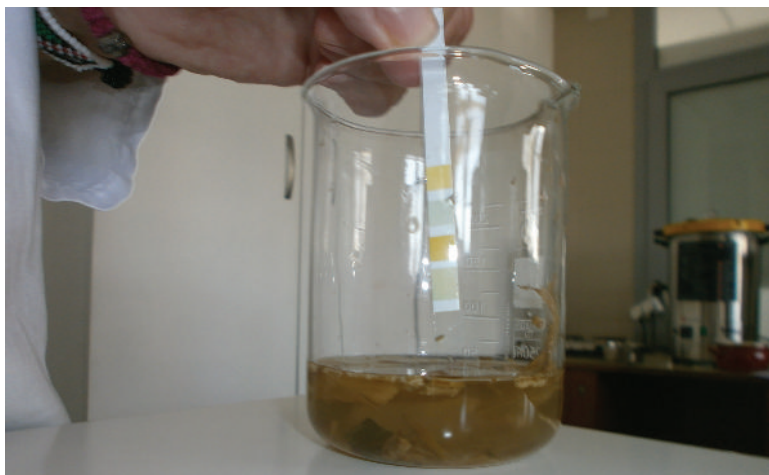
Tabela 1. Određivanje pH silaže prema promjeni boje indikatora

Boja indikatora	pH
zeleno-plava	7,2-7,6
zeleno	6,4-7,2
žuto-zelena	6,1-6,4
žuta	5,2-6,1
narandžasta	4,6-5,2
Crveno-narandžasta	4,2-4,6
Crvena	4,2 i niže

Reakcija pH silaže se može odrediti i pH indikator papirom, crvenim ili plavim lakmus papirom i uz pomoć pH-metra (slike 264-267).



Slika 264. Određivanje pH silaže plavim lakmus papirom (u kisjeloj sredini dobija crvenu boju) (Bojanić Rašović)



Slika 265. Određivanje pH silaže pH indikator papirom (Bojanić Rašović)



Slika 266. Određivanje pH silaže pH metrom (Bojanić Rašović)



Slika 267. Određivanje pH silaže ručnim pH metrom (Bojanić Rašović)

VJEŽBA XI

MLIJEČNA FERMENTACIJA

Pitanja

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

Bakterije mliječne kisjeline

Bakterije mliječne kisjeline se nalaze na površini biljaka, u mlijeku, na prehrambenim proizvodima, u crijevima životinja i ljudi. Ove bakterije imaju mnogo zajedničkih svojstava: sintetišu mliječnu kisjelinu, boje se gram pozitivno, ne stvaraju spore, nepokretne su, neophodni su im izvori azota i faktori rasta, što znači da ne rastu na jednostavnim hranljivim podlogama. Prema tipu fermentacije, one mogu biti homofermentativne i heterofermentativne. Homofermentativne bakterije mliječne kisjeline metabolišu šećer samo do mliječne kisjeline, dok heterofermentativne, pored mliječne kisjeline stvaraju i druge proizvode, kao što su sirćetna kisjelina, etanol, glicerol, diacetil, acetil metil karbinol i dr. Većina bakterija mliječne kisjeline raste na temperaturama od 10 do 42 °C, sa optimumom između 25-30 °C. Bakterije mliječne kisjeline su anaerobi ili mikroaerofili. Kokoidni oblici pripadaju rodovima: *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc*. Štapićasti oblici pripadaju rodovima: *Lactobacillus* i *Bifidobacterium*. Mliječna fermentacija predstavlja osnovu proizvodnje silaže, kisjeljenja povrća, dobijanja fermentisanih proizvoda od mlijeka (jogurta, sira, maslaca i dr).

Postupak pripreme mlijeka za odvijanje mliječne fermentacije

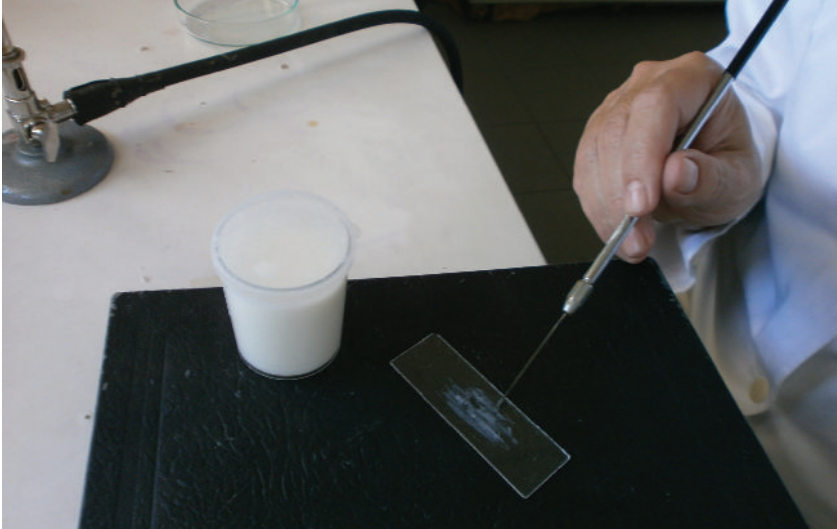
U mlijeku se nalaze svi potrebni hranljivi elementi za razvoj bakterija mliječne kiseline. Zato je pri izučavanju mliječne fermentacije najbolje koristiti mlijeko kao hranljivu podlogu za rast bakterija mliječne kiseline. Nakon inkubacije svježeg, nepasterizovanog mlijeka na 30 °C tokom 10-12 časova, dolazi do njegovog ukisjeljavanja i stvaranja glatkog čvrstog gruša (slika 268). Gruš nastaje tako što mliječna kisjelina reaguje sa kalcijum kazeinatom, pri čemu se taloži kazein.



Slika 268. Sirovo kravlje mlijeko koagulirano (zgrušano) na sobnoj temperaturi pod dejstvom bakterija mliječne kiseline (Bojanić Rašović)

Mikroskopsko ispitivanje bakterija mliječne kiseline

Za mikroskopsko proučavanje bakterija mliječne kiseline priprema se preparat iz ukisjeljenog, zgrušanog mlijeka. Sadržaj uzet ezom se razvlači u tankom sloju na predmetno staklo (slika 269).



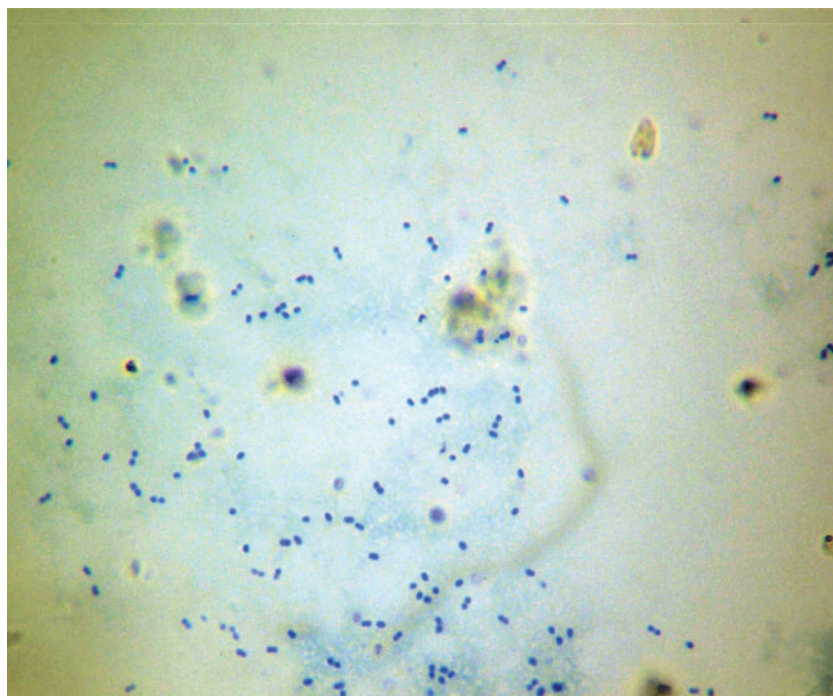
Slika 269. Pravljenje mikroskopskog preparata iz koagulisiranog mlijeka (Bojanić Rašović)

Nakon toga preparat se osuši na vazduhu i fiksira smješom ksilola i etanola (slika 270).



Slika 270. Fiksacija preparata etanolom (Bojanić Rašović)

Postupkom fiksacije ovom smješom bakterije se ubijaju i vežu za staklo, a takođe se izdvaja i uklanja masnoća. Uklanjanje masnoće je neophodno, zato što kapljice masti na preparatu ometaju bojenje i mikroskopiranje. Fiksirani preparat se boji metilensko plavim u trajanju 2-3 minuta, ispira vodom, osuši, a zatim posmatra uz pomoć imerzionog objektiva (100 x). Metilensko plavo je veoma dobra boja za bakterije mliječne kisjeline u mlijeku, jer slabo boji kazein, a dobro boji ćelije. Tako se dobijaju jasni preparati. Na preparatu dominiraju sitne okrugle ćelije *Lactococcus lactis*, povezane u kratke lance (slika 271). Ova bakterija je izazivač prirodnog kisjeljenja mlijeka. Često se na preparatu zapažaju i tanki štapići roda *Lactobacillus*, različite veličine, najčešće vrsta *Lactobacillus bulgaricus*, izazivač prirodnog kisjeljenja mlijeka u južnim geografskim širinama. Optimalna temperatura za rast ove vrste bakterija je 40 °C.



Slika 271. Lactococcus lactis iz jogurta, bojenje metilenskim plavim (Bojanić Rašović, 1000x)

Mikroskopski nalaz mliječne plijesni

Mliječna plijesan *Oidium lactis* može da formira navlaku na površini ukisjelenog mlijeka, pri čemu se na mikroskopskom preparatu, pored bakterija mliječne kisjeline, uočavaju hife i četvorougaoe ćelije (oidije).

VJEŽBA XII

(prvi dio)

MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE HRANE ANIMALNOG PORIJEKLA

Pitanja

1. Koji je redosljed postupaka pri izolaciji i identifikaciji mikroorganizama iz hrane?
2. Kako se vrši priprema uzorka i osnovnog razrjeđenja nekog uzorka hrane?
3. Koja su mikrobiološka ispitivanja obavezna za hranu animalnog porijekla (prema našim zakonskim propisima)?
4. Kako se tumače rezultati mikrobioloških ispitivanja prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima i Vodiču za mikrobiološke kriterijume?

Zakonske obaveze subjekata u poslovanju hranom

U hranu animalnog porijekla spadaju: 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.

Prema Zakonu o bezbjednosti hrane (*Sl. list Crne Gore br. 57/2015*) subjekat u poslovanju hranom ili hranom za životinje je odgovoran za bezbjednost hrane ili hrane za životinje u svim fazama proizvodnje, prerade i distribucije. Subjekti koji proizvode hranu su obavezni da primjenjuju sistem analize opasnosti i kritičnih kontrolnih tačaka (*engl. Hazard Analysis and Critical Control Points, HACCP*), koji omogućuje prepoznavanje mikrobioloških, hemijskih i fizičkih opasnosti za bezbjednost hrane.

Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane (*Sl. list CG, br. 53/2012*) propisani su mikrobiološki kriterijumi o dozvoljenim vrstama i broju mikroorganizama, bakterijskih toksina i histamina u hrani opasnih po zdravlje i mikrobiološki kriterijumi za higijenu procesa proizvodnje. U objektima za klanje životinja, kao i u objektima za proizvodnju mljevenog mesa, mesnih prerađevina,

mehanički odvojenog mesa uzimaju se uzorci za mikrobiološka ispitivanja najmanje jednom nedjeljno. Proizvođač hrane je obavezan da uzima i uzorke, tj. briseve s proizvodnih površina i opreme u objektima u kojima se proizvodi hrana koja je pogodna za rast bakterije *L. monocytogenes*.

Uzimanje uzoraka za mikrobiološko ispitivanje

Pri uzorkovanju se moraju uvažavati načela dobre higijenske prakse. Obavezna je higijena ruku - pranje i dezinfekcija, nošenje čiste 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 kriterijumima za bezbjednost hrane. 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 **250 g 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 časova, a ne bi smjelo biti duže od 24 časa) 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 vremenskom periodu i da se transportuju i čuvaju na propisanoj temperaturi na kojoj neće doći do mikrobioloških promjena.

Ispitivanje uzorka

Laboratorije ovlašćene za mikrobiološka ispitivanja hrane za potrebe inspekcijuskog nadzora, moraju da budu akreditovane u skladu sa standardom MEST ISO/IEC 17025 - *Opšti zahtjevi za kompetentnost laboratorija za ispitivanje i laboratorija za etaloniranje*, tj. 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.

U tabeli 1. dat je primjer kriterijuma za bezbjednost proizvoda od živinskog mesa prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane, vezano za plan uzimanja uzoraka, granične vrijednosti za ispitivani mikrobiološki parametar i tumačenje rezultata.

Tabela 1. Primjer kriterijuma za bezbjednost živinskog mesa prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane

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:

Zadovoljavajuće: ako svih 5 (n) uzoraka pokaže odsustvo *Salmonella* u 25 g;

Nezadovoljavajuće: ako je ustanovljena *Salmonella* u 25 g 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**.

Za kriterijume higijene u procesu proizvodnje uobičajene su dvije granične vrijednosti i tri moguće interpretacije rezultata. U tabeli 2. je prikazan primjer kriterijuma higijene u procesu proizvodnje hrane prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane vezano za plan uzimanja uzoraka, granične vrijednosti ispitivanog mikrobiološkog parametra, tumačenje rezultata, kao i mjere koje treba sprovesti u slučaju da su rezultati ispitivanja nezadovoljavajući.

Tabela 2. Primjer kriterijuma higijene u procesu proizvodnje mesnih prerađevina prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane

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 prerađevine	<i>E. coli</i>	5	2	500 cfu/g ili cm ²	5000 cfu/g ili cm ²	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 cm² (<m);

Prihvatljivo: ako su maksimalno 2 (c) od 5 (n) dobijenih vrijednosti između 500 i 5000 cfu/g ili cm² (između m i M), a ostale dobijene vrijednosti manje ili jednake 500 cfu/g (≤m);

Nezadovoljavajuće: ako je jedna ili više vrijednosti veća od 5000 cfu/g ili cm² (>M), ili ako je više od 2 (c) od ispitivanih 5 (n) vrijednosti između 500 i 5000 cfu/g ili cm² (između m i M).

Mikrobiološki kriterijumi za hranu

Primjeri kriterijuma bezbjednosti hrane - prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane (*Sl. list CG*, br. 53/2012) su prikazani u tabeli 3.

Tabela 3. Primjeri kriterijuma bezbjednosti hrane prema Pravilniku (dio 1. Pravilnika).

Kategorija hrane		Mikroorganizmi njihovi toksini, metaboliti	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentna metoda ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje
			n	c	m	M		
1.1.	Hrana spremna za konzumiranje za novorođenčad i hrana za posebne medicinske namjene	<i>Listeria monocytogenes</i>	10	0	Ne smije biti u 25 g		MEST EN ISO 11290-1	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
1.2.	Hrana spremna za konzumiranje koja omogućava rast bakterije <i>L. monocytogenes</i> , osim one koja je namijenjena novorođenčadima i za posebne medicinske namjene	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100 cfu/g		MEST EN ISO 11290-2	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Ne smije biti u 25g		MEST EN ISO 11290-2	Prije nego što subjekat u poslovanju hranom koji je proizveo prestane da bude direktno odgovaran za istu
1.4	Mljeveno meso i mesne prerađevine koje se konzumiraju u sirovom stanju	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne smije biti u 25g		MEST EN ISO 6579	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
1.5	Mljeveno meso i mesne prerađevine živinskog mesa koje se konzumiraju nakon kuvanja	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne smije biti u 25 g		MEST EN ISO 6579	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
1.7.	Mehanički odvojeno meso (MOM)	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne smije biti u 10 g		MEST EN ISO 6579	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
1.11	Sirevi, maslac i pavlaka proizvedeni od sirovog mlijeka ili mlijeka koje je obrađeno temperaturom nižom od temperature pasterezacije	<i>Salmonella</i>	5	0	Ne smije biti u 25 g		MEST EN ISO 6579	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe
1.28.	Svježe meso živine	<i>Salmonella typhimurium</i> , <i>Salmonella enteritidis</i>	5	0	Ne smije biti u 25 g		MEST EN ISO 6579 (za detekciju) Wite-Kaufman-LeMinor Shema (za serotipizaciju)	Proizvod u prometu tokom njegovog roka upotrebe

Primjeri kriterijuma higijene u procesu proizvodnje hrane prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane (dio 2. Pravilnika) prikazani su u tabelama 4 – 7.

Tabela 4. Primjeri kriterijuma higijene u procesu proizvodnje mesa i proizvoda od mesa prema Pravilniku

Kategorija hrane		Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
			n	c	m	M			
2.1.1.	Trupovi goveda, ovaca, koza i konja	Broj aerobnih kolonija			3,5 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	5,0 log cfu/cm ² dnevna srednja log vrij.	MEST EN ISO 4833	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa
		<i>Enterobacteriaceae</i>			1,5 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	2,5 log cfu/cm ² dnevna srednja log vr.	MEST EN ISO 21528 -2	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa
2.1.2.	Trupovi svinja	Broj aerobnih kolonija			4,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	5,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	MEST EN ISO 4833	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa
		<i>Enterobacteriaceae</i>			2,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	3,0 log cfu/cm ² dnevne srednje log vr.	MEST EN ISO 21528 -2	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa
2.1.3.	Trupovi goveda, ovaca, koza i konja	<i>Salmonella</i>	50	2	Ne smije biti na ispitivanom području		MEST EN SO 6579	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa i porijekla životinja
2.1.4.	Trupovi svinja	<i>Salmonella</i>	50	5	Ne smije biti na ispitivanom području trupa		MEST EN ISO 6579	Trupovi poslije obrade, ali prije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa i porijekla životinja i biosigurnosnih mjera na farmama porijekla
2.1.5.	Trupovi živine, brojlera i ćuraka	<i>Salmonella</i>	50	5	Ne smije biti u 25g zbirnog uzorka kože vrata		MEST EN ISO 6579	Trupovi poslije hlađenja	Poboljšanje higijene klanja i preispitivanje kontrola procesa i porijekla životinja i biosigurnosnih mjera na farmama porijekla

2.1.6.	Mljeveno meso	Broj aerobnih kolonija	5	2	5x10 ⁵ cfu/g	5x10 ⁶ cfu/g	MEST EN ISO 4833	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje i poboljšanje izbora i/ili porijekla sirovina
		<i>E.coli</i>	5	2	50 cfu/g	500 cfu/g	ISO 16649-1 ili ISO 16649-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje i poboljšanje izbora i/ili porijekla sirovina

Tabela 5. Primjeri kriterijuma higijene u procesu proizvodnje mlijeka i mliječnih proizvoda prema Pravilniku

Kategorija hrane		Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
			n	c	m	M			
2.2.1.	Pasterizovano mlijeko i drugi pasterizovani tečni mliječni proizvodi	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10 cfu/ml		MEST ISO 21528-2	Kraj proizvodnog procesa	Provjera efikasnosti termičke obrade i sprječavanje ponovne kontaminacije, kao i kvaliteta sirovina
2.2.2.	Sirevi proizvedeni od mlijeka ili surutke koji su termički obrađeni	<i>E.coli</i>	5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g	ISO 16649-1 ili ISO 16649-2	Za vrijeme proizvodnog procesa, u vrijeme kada se očekuje da će broj kolonija bakterije <i>E.coli</i> biti najveći	Poboljšanje higijene proizvodnje i izbora sirovina
2.2.3.	Sirevi proizvedeni od sirovog mlijeka	Koagulaza pozitivne stafiločke	5	2	10 ⁴ cfu/g	10 ⁵ /cfu/g	EN ISO 6888-2		
2.2.4.	Sirevi proizvedeni od mlijeka koje je termički obrađeno na temp.nižoj od temp. pasterizacije, zreli sirevi proizvedeni od mlijeka ili surutke koji su pasterizovani ili obrađeni jačim termičkim režimom	Koagulaza pozitivne stafiločke	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	MEST EN ISO 6888-1 ili MEST EN ISO 6888-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje. Ako se utvrde vrijednosti >10 ⁵ cfu/g, ta proizvodna partija sira mora se ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina

2.2.6.	Maslac i pavlaka proizvedeni od sirovog mlijeka ili mlijeka koje je termički obrađeno na temp. nižoj od temp. pasterezacije	<i>E.coli</i>	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	ISO 16649-1 ili ISO 16649-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje i izbora sirovina
2.2.7.	Mlijeko u prahu i surutka u prahu	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	10 cfu/g		MEST ISO 21528-2	Kraj proizvodnog procesa	Provjera efikasnosti termičke obrade i sprječavanje ponovne kontaminacije
2.2.7.	Mlijeko u prahu i surutka u prahu	<i>Koagulaza pozitivne stafilokoke</i>	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	MEST EN ISO 6888-1 ili MEST EN ISO 6888-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje. Ako se utvrde vrijednosti > 10 ⁵ cfu/g, ta proizvodna partija se mora ispitati na prisustvo stafilokoknih enterotoksina
2.2.11.	Dehidrirana hrana za novorođenčad i dehidrirana dijetetska hrana za posebne medicinske namjene za novorođenčad do šest mjeseci	<i>Pretpostavka prisustva Bacillus cereus</i>	5	1	50 cfu/g	500 cfu/g	MEST EN ISO 7932	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje. Prevencija ponovne kontaminacije Izbor sirovina

Tabela 6. Primjer kriterijuma higijene u procesu proizvodnje za proizvode od jaja prema Pravilniku

Kategorija hrane	Mikroorganizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
		n	c	m	M			
2.3.1.	Proizvodi od jaja	<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	10 cfu/g	100 cfu/g	MEST ISO 21528-2	Kraj proizvodnog procesa Provjera efikasnosti termičke obrade i sprječavanje ponovne kontaminacije

Tabela 7. Primjeri kriterijuma higijene u procesu proizvodnje proizvoda ribarstva prema Pravilniku

Kategorija hrane		Mikro-organizmi	Plan uzorkovanja		Granične vrijednosti		Referentni metod ispitivanja	Faza u kojoj se kriterijum primjenjuje	Mjera u slučaju nezadovoljavajućih rezultata
			n	c	m	M			
2.4.1.	Proizvodi od termički obrađenih rakova i mekušaca sa ili bez oklopa ili ljuske	<i>E.coli</i>	5	2	1/g	10/g	ISO/TS 16649-3	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje
2.4.1.	Proizvodi od termički obrađenih rakova i mekušaca sa ili bez oklopa ili ljuske	Koagula za pozitivne stafiloke	5	2	100 cfu/g	1000 cfu/g	MEST EN ISO 6888-1 ili MEST EN ISO 6888-2	Kraj proizvodnog procesa	Poboljšanje higijene proizvodnje

***Ispitivanje hrane na preporučene mikroorganizme
(prema Vodiču za mikrobiološke kriterijume za bezbjednost hrane)***

Subjekt u poslovanju hranom (SPH), pored obaveznih mikroorganizama navedenih u Dijelu 2. Pravilnika o mikrobiološkim kriterijumima za hranu, može ispitivati i druge mikroorganizme. Ispitivanje drugih mikroorganizama u skladu s odredbama člana 7 Pravilnika dozvoljeno je samo za Kriterijume higijene u procesu proizvodnje. Ukoliko SPH ispituje druge mikroorganizme, mora ih uvrstiti u plan samokontrole i navesti sve elemente koji čine mikrobiološki kriterijum: kategoriju hrane na koju se odnosi; mikroorganizam ili toksin/metabolit koji se ispituje; plan uzimanja uzoraka (s brojem i veličinom elementarnih jedinica koje sačinjavaju uzorak); granične vrijednosti; ispitnu metodu; fazu u kojoj se kriterijum primjenjuje; korektivne mjere u slučaju nezadovoljavajućih rezultata. Preporučeni mikroorganizmi se ispituju na kraju proizvodnje, kao i za vrijeme roka trajanja proizvoda.

U tabelama 8. i 9. dati su primjeri kriterijuma koji se primjenjuju prilikom ispitivanja hrane na preporučene mikroorganizme prema Pravilniku o mikrobiološkim kriterijumima za hranu.

Tabela 8. Primjer kriterijuma koji se primjenjuju prilikom ispitivanja mesa i mesnih prerađevina na preporučene mikroorganizme prema Pravilniku

	Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriterijumi
			n	c	
1.1.1.	Sirovo meso trupova, polovina i četvrtina (najmanje jedan cm ispod površine)	Preporučeni			
		<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25 g
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 g
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	0	n.n. u 1 g
		Sulfitoredujuće klostridije	5	0	n.n. u 1 g
		Koagulaza pozitivni stafilocoki <i>Staphylococcus aureus</i>	5	0	n.n. u 1 g
		Aerobne mezofilne bakterije	5	2	m=10 ³ cfu/g M=10 ⁴ cfu/g

Tabela 9. Primjer kriterijuma koji se primjenjuju prilikom ispitivanja pasterizovanog mlijeka i mliječnih napitaka na preporučene mikroorganizme prema Pravilniku

	Hrana	Mikroorganizmi/njihovi toksini i metaboliti	Plan uzorkovanja		Kriterijumi
			n	c	
1.1.1.	Pasterizovano mlijeko i mliječni napici	Preporučeni			
		<i>Salmonella spp.</i>	5	0	n.n. u 25ml
		<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	n.n. u 25 ml
		Koagulaza pozitivni stafilocoki	5	0	M = 10cfu/ml
		<i>Enterobacteriaceae</i>	5	2	m < 1cfu/ 1 ml M=10cfu/ml
		Aerobne mezofilne bakterije	5	1	m=10 ³ cfu/g M=10 ⁴ cfu/g
		Obavezni			
		Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane	Kriterijum 2.2.1.		

Normativi mikrobiološke čistoće za predmete, površine i ruke koji dolaze u dodir s hranom (prema Vodiču za mikrobiološke kriterijume za bezbjednost hrane)

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 su prikazani u tabeli 10:

Tabela 10. Normativi mikrobiološke čistoće za predmete, površine i ruke koji dolaze u dodir s hranom u skladu s normom ISO 18593

PREDMETI, POVRŠINE, RUKE	Aerobne mezofilne bakterije		<i>Enterobacteriaceae</i>	
	odgovara	ne odgovara	odgovara	ne odgovara
Porculanske, staklene, glatko metalne površine cfu*/cm ²	≤10 (≤1)	>10 (>1)	0-1	>1
Ostale površine (drvene, plastične, kamene i sl) cfu*/cm ²	≤10 (≤1)	>10 (>1)	0-1	>1
Tanjiri, zdjelice, pribor za jelo i manje posude cfu*/ml ili cm ²	≤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 ²	≤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 cm² do 1000 cm². Kontaktne i otisne pločice se ne koriste za detekciju patogena. U slučaju vidljivih nečistoća potrebno je provesti čišćenje i dezinfekciju prije mikrobiološkog ispitivanja. Vrijednosti navedene u zagradama odnose se na otisak. Normativi u tabeli obavezni su za objekte pod nadzorom sanitarne inspekcije.

Parametri za ocjenjivanje zdravstvene bezbjednosti hrane

Hrana se ne smije stavljati na tržište ukoliko nije zdravstveno bezbjedna. Kada se utvrdi zdravstvena neispravnost uzorka, hrana se mora povući s tržišta ili opozvati. Vrijednosti parametara koji hranu čine zdravstveno nebezbjednom - u skladu sa Zakonom o bezbjednosti hrane (*Sl. list Crne Gore, br. 57/2015*) prikazane su u tabeli 11.

Tabela 11. Vrijednosti parametara koji hranu čine zdravstveno nebezbednom - u skladu sa Zakonom o bezbjednosti hrane

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 pozitivne stafilokoke <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 1 g uzorka	Potvrđena sposobnost stvaranja toksina pri izolovanoj skupini
<i>E. coli (VTEC)</i>	pozitivno u 25g uzorka	Potvrđena sposobnost stvaranja verotoksina pri izoliranoj skupini

Mikroorganizmi i ISO metode koje se koriste za njihovo ispitivanje u hrani su prikazani u tabeli 12:

Tabela 12. Mikroorganizmi i metode koje se koriste za njihovo ispitivanje u hrani

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 hrane za mikrobiološko ispitivanje

Priprema hrane za mikrobiološko ispitivanje obuhvata:

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

Postupak:

Odmjerena količina uzorka se prethodno homogenizuje. Homogenizacija se može vršiti uz pomoć tarionika i tučka ili stomahera (slika 272). Nakon homogenizacije u tarioniku, u Erlenmajerovoj tikvici 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.

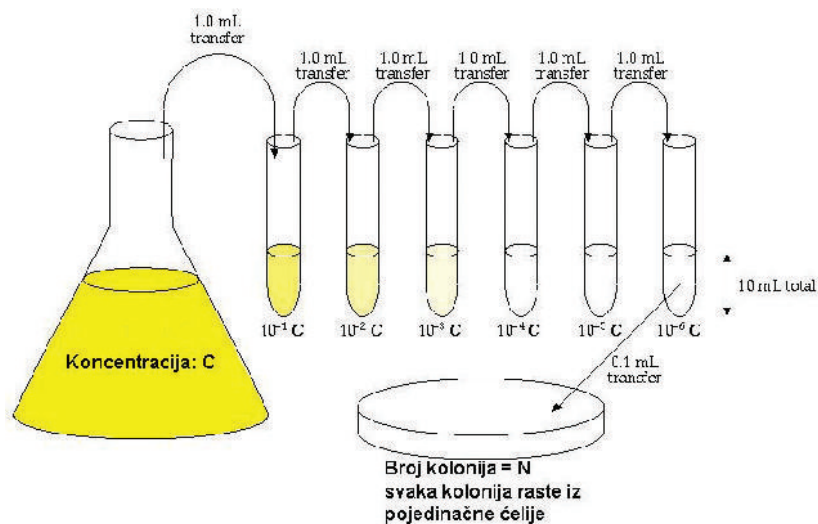


Slika 272. Stomaher za homogenizaciju uzoraka (Bojanić Rašović, 2020)

Da bi se omogućila ravnomjerna raspodjela mikroorganizama koji se nalaze u ispitivanom uzorku, pravi se osnovno decimalno razrjeđenje. Osnovno razrjeđenje je rastvor koji se dobija kada se određena količina uzorka izmiješa sa devet puta većom količinom sredstva za razrjeđivanje (20 ml ili 20 g uzorka u 180 ml, 10 ml ili 10 g u 90 ml odnosno 1 ml ili 1 g uzorka u 9 ml tečnosti za razblaživanje). Kao tečnost za razblaživanje se koristi peptonski slani rastvor ili puferisana peptonska voda.

Ukoliko se ispituje sir, kao tečnost za razblaživanje se koristi 2% rastvor natrijum citrata ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) u destilovanoj vodi. (Sastav peptonskog slanog rastvora: proizvod enzimskog razlaganja kazeina 1,0 g, NaCl 8,5 g, voda 1000 ml. Sastav puferisane peptonske vode: proizvod razlaganja životinjskog tkiva 10,0 g, NaCl 5,0 g, dinatrijum-hidrogen fosfat-dodekahidrat ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 9,0 g, kalijum-dihidrogen-fosfat (KH_2PO_4) 1,5 g, voda 1000 ml. Temperatura sredstva za razblaživanje treba da bude približno ista kao i temperatura okoline, da ne bi došlo do oštećenja mikroorganizama.

Sljedeće decimalno razrjeđenje se pravi miješanjem 1 ml osnovnog razrjeđenja sa 9 ml tečnosti za razrjeđenje, od njega se pravi sljedeće decimalno razrjeđenje i tako redom, sve dok se ne dobiju decimalna razrjeđenja podesna za inokulaciju hranljivih podloga (slika 273). Cilj pravljenja daljih razblaženja je da se smanji broj mikroorganizama/ml, kako bi bilo moguće brojanje pojedinačnih kolonija mikroorganizama na čvrstim podlogama.



Slika 273. Priprema serije decimalnih razrjeđenja

Osnovno razblaženje (10^{-1}): 20 g uzorka + 180 ml - FR / PPS / 2% Na-citrat

Izolacija i identifikacija mikroorganizama iz hrane

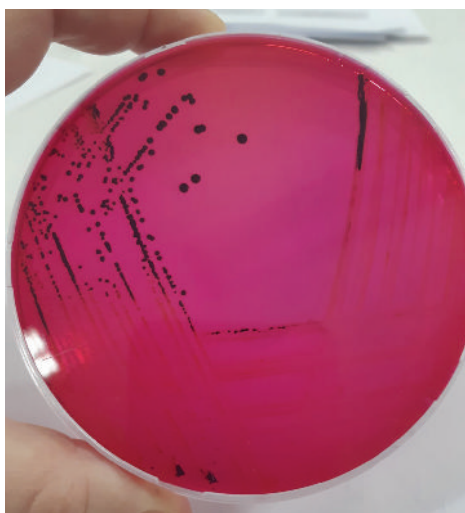
Redosljed postupaka pri izolaciji i identifikaciji mikroorganizama iz hrane je:

- Predobogaćenje (koristi se neselektivni tečni medijum u cilju oporavka subletalno oštećenih ćelija mikroorganizama);
- Obogaćenje (koristi se selektivna tečna hranljiva podloga radi povećanja broja ciljanih mikroorganizama);
- Izolacija mikroorganizama (koristi se selektivna čvrsta hranljiva podloga za dobijanje pojedinačnih kolonija);
- Identifikacija mikroorganizama (ispitivanje morfologije, fenotipizacija, serološka ispitivanja, PCR metode).

Izolacija i identifikacija bakterija *Salmonella* vrsta

Bakterije roda *Salmonella* se ispituju metodom MEST EN ISO 6579. Za predobogaćenje se koristi puferisana peptonska voda (Buffered peptone water - BPW), a za obogaćenje Rappaport Vassiliadis bujon i Müller-Kauffmann tetratonat bujon. Podloge za obogaćenje stimulišu rast salmonela, a sprečavaju rast ostale mikroflora.

Za izolaciju salmonela se koriste selektivno diferencijalne podloge: XLD agar (Xylose Lysine Desoxyholate agar, slika 274) i BG-agar (Brilliant Green Agar - modifikovani). Za ispitivanje biohemijskih karakteristika (identifikaciju) salmonela se koriste: dvostruki šećer po Kligleru, kosi agar sa urejom po Christensenu, tečne podloge za dokazivanje indola, podloga za reakciju sa metil crvenim i Voges Proskauer reakciju, Simmons citratni agar za dokazivanje razlaganja citrata i dr.



Slika 274. Kolonije Salmonella enteritidis na XLD agaru (Čogurić, 2020)

Izolacija i identifikacija *Listeria monocytogenes*

Dokazivanje ove bakterijske vrste u hrani se vrši prema metodi MEST EN ISO 11290-1 i MEST EN ISO 11290-2. Za obogaćenje se koriste tečne podloge: Half Fraser bujon - za primarno obogaćenje (sprečava rast drugih mikroorganizama) i Fraser bujon - za sekundarno obogaćenje. Za izolaciju listerije se koriste selektivno diferencijalne podloge: Palcam agar, Aloa agar (Agar *Listeria* according to Ottaviani and Agosti), krvni agar i polutečni hranljivi agar. Na aloa agaru kolonije *L. monocytogenes* su karakterističnog izgleda: sivoplave, okrugle, sa zonom prosvjetljenja (slika 275).



*Slika 275. Rast kolonija L. monocytogenes na Aloa agaru (Čogurić, 2020)
(plave, okrugle, sa zonom prosvjetljenja)*

Na krvnom agaru se radi CAMP test, a na polutečnom hranljivom agaru test pokretljivosti (*L. monocytogenes* raste karakteristično u vidu kišobrana).

Određivanje broja aerobnih kolonija

Određivanje broja aerobnih kolonija u hrani se vrši u skladu sa standardom *MEST EN ISO 4833*. Za određivanje broja kolonija aerobnih bakterija koristi se agar za ukupan broj bakterija (sadrži tripton, ekstrakt kvasca, dekstrozu, kazein, agar). Kada se ispituju proizvodi od mlijeka, ovoj podlozi se dodaje 1,0 g obranog mlijeka u prahu/L podloge. Obrano mlijeko u prahu treba da bude bez inhibitornih supstanci.

Postupak:

Sterilnom pipetom se vrši prebacivanje 1 ml tečnog uzorka, kao i decimalnih razrjeđenja tečnog uzorka, odnosno 1 ml osnovnog razrjeđenja i ostalih decimalnih razrjeđenja čvrstog uzorka u po dvije Petrijeve ploče. Zatim se u Petrijeve ploče dodaje po 12-15 ml agara za ukupan broj, čija je temperatura 44-47 °C. Vrijeme između pripreme osnovnog razrjeđenja i momenta razlivanja agara u Petrijeve ploče ne treba da bude duže od 45 minuta. Treba pažljivo miješati inokulum sa dodatim agarom rotiranjem Petrijevih ploča, a zatim dopustiti mješavini da očvrstne, ostavljajući ih na hladnoj vodoravnoj površini. Poslije potpunog očvršćavanja, Petrijeve ploče treba okrenuti i staviti u inkubator na 30 °C u trajanju od 72h. Ne treba slagati više od šest Petrijevih ploča jednu na drugu. Grupe naslaganih Petrijevih ploča treba međusobno odvojiti, kao i od zidova inkubatora, kako bi mogao ravnomjerno da cirkuliše vazduh. Nakon isteka perioda inkubacije, izrasle kolonije mikroorganizama se broje aparatom za brojanje kolonija. Pouzdani podaci se dobijaju na Petri pločama, u kojima je izraslo više od 15 i manje od 300 kolonija.

Izolacija i identifikacija *Staphylococcus aureus*

Staphylococcus aureus se izoluje i identifikuje u skladu sa standardom EN ISO 6888-1 i 2. Iz pripremljenih decimalnih razrjeđenja zasijava se selektivno diferencijalna podloga - agar po Baird Parkeru (ETPGA), sa dodatkom žumanceta.

Izolacija i identifikacija *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens se izoluje i identifikuje u skladu sa međunarodnim standardom ISO 7937. Za predobogaćenje se koristi tečna podloga tioglikolatni bujon (inkubacija 7 dana; 35 °C; javlja se zamućenje podloge, pri čemu je površinski sloj podloge bistar). Selektivno diferencijalna podloga za izolaciju i identifikaciju *Cl. perfringens* je TSC agar (triptozna sulfid cikloserin). Zasijane podloge se inkubiraju na 37°C, anaerobno, 20 časova. Kolonije *Cl. perfringens* su na ovoj podlozi crne boje.

Izolacija i identifikacija *Escherichia coli*

Ova bakterija se izoluje i identifikuje prema metodi ISO 16649. Selektivna podloga za izolaciju *E. coli* je brilijant zeleni laktoza žučni bujon (BZLŽ bujon) sa Durham cjevčicama. Selektivno - diferencijalne podloge za rast i identifikaciju *E. coli* su ljubičastocrveni žučni agar (VRB - Violet Red Bile, slika 96) i TBX Chromogenic Agar. TBX Chromogenic Agar (tripton žučni slani agar sa dodatkom x-β-D-glukuronida) omogućava detekciju enzima glukuronidaze, koji je visoko specifičan za *E. coli*. Ovaj agar inhibira rast drugih koliformnih bakterija i rast gram pozitivnih bakterija.

Podloge za izvođenje biohemijskih reakcija za dokazivanje *E. coli*

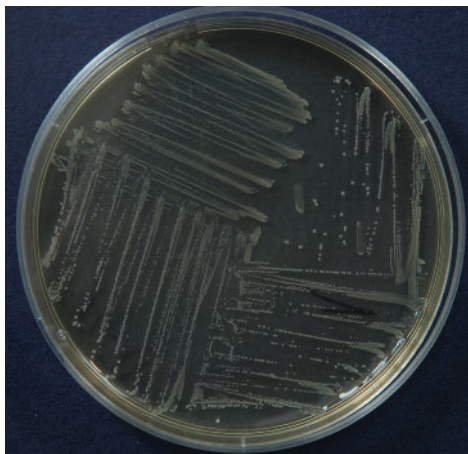
Za biohemijsku identifikaciju *E. coli* koriste se: dvostruki šećer po Kligleru, podloge za dokazivanje indola, redukciju metilcrvenog, dokazivanje acetil metil karbinola (Voges-Proskauer reakcija) i podloga za dokazivanje razlaganja citrata.

Izolacija kvasaca i plijesni

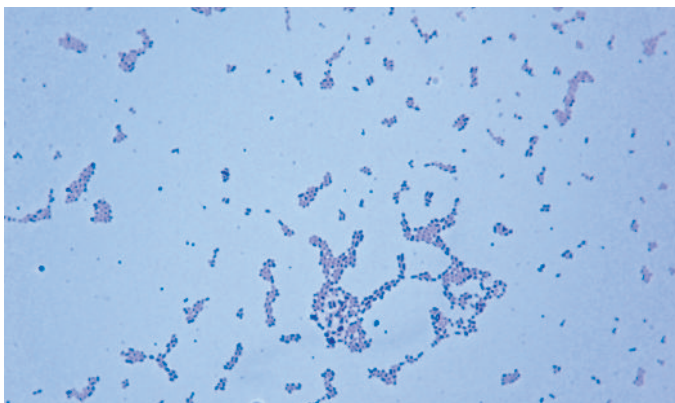
Kvasci i plijesni izoluju se na selektivnoj podlozi - Sabouraud agaru.

Izolacija bakterija mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline - laktokoke (*Lactococcus spp.*) se izoluju na M-17 bujonu i M17 agaru (slike 276 i 277), a laktobacili (*Lactobacillus spp.*) na MRS bujonu i MRS agaru.



Slika 276. Kolonije Lactococcus lactis na M17 agaru (Bojanić Rašović)



Slika 277. Laktokoke bojene bo Gramu (Bojanić Rašović)

VJEŽBA XII (drugi dio)

MIKROBIOLOŠKO ISPITIVANJE HRANE ZA ŽIVOTINJE

Pitanja

1. Koji je značaj mikrobiološkog ispitivanja hrane za životinje?
2. Koji mikroorganizmi se prema važećim zakonskim propisima ne smiju naći u 50 g hrane za životinje?
3. Kako se vrši ispitivanje hrane za životinje na prisustvo salmonela?
4. Kako se ispituje ukupan broj kolonija aerobnih mikroorganizama u hrani za životinje?
5. Kako se određuje ukupan broj kolonija kvasaca i plijesni u hrani za životinje?

Značaj mikrobiološkog ispitivanja hrane za životinje

Mikrobiološka ispravnost hrane za životinje je osnovni preduslov za očuvanje zdravlja životinja i njihove produktivnosti. 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. Glavni patogeni uzročnici, prisutni u hrani za životinje, su prvenstveno bakterije iz roda *Salmonella*, zatim enterobakterije, sulfitoredujuće klostridije, koagulaza pozitivne stafilokoke, bacili i različite vrste plijesni. Najčešći problem u hrani za životinje je prisustvo bakterija iz roda salmonela. Nije rijetka pojava obolijevanja ljudi od salmoneloze, usljed ishrane kontaminiranim mesom i jajima živine. Plijesni, osim što utiču na kvalitet hrane, mogu proizvoditi mikotoksine, čije se štetno dejstvo ispoljava smanjenom iskoristivošću hrane, slabijim prirastom, kao i drugim simptomima trovanja u životinja. Maksimalno dozvoljeni broj mikroorganizama u stočnoj hrani i sirovinama koje služe za proizvodnju krmnih smješa, prema Pravilniku o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani (*Sl. list SFRJ br: 2/90*), prikazan je u tabeli 13.

Tabela 13. Maksimalno dozvoljeni broj mikroorganizama u stočnoj hrani prema Pravilniku

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

Dozvoljeni broj patogenih mikroorganizama u stočnoj hrani prema istom Pravilniku je prikazan u tabeli 14.

Tabela 14. Dozvoljeni broj patogenih mikroorganizama u stočnoj hrani prema Pravilniku

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

Hrana za životinje takođe ne smije sadržati toksine toksigenih bakterija u 1 g (*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).

Do kontaminacije hrane za životinje može doći u svim fazama njene proizvodnje, skladištenja, distribucije, kao i tokom hranjenja životinja.

Uzimanje uzoraka stočne hrane za mikrobiološko ispitivanje

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

Pakovanje i slanje uzoraka stočne hrane

Uzorke staviti u sterilne, zatvorene staklene posude ili u sterilne plastične kese. Uzorke označiti kartonskim privjescima, 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, potrebno je zapisati i anamnestičke i druge podatke o oboljeloj životinji. Uzorke stočne hrane poslati u laboratoriju po kuriru.

Vrste mikroorganizama i metode mikrobiološkog ispitivanja hrane za životinje su prikazane u tabeli 15.

Tabela 15. Vrste mikroorganizama i metode mikrobiološkog ispitivanja hrane za životinje (koriste se iste metode kao za mikrobiološko ispitivanje hrane)

Vrsta ispitivanja	Metoda ispitivanja
Detekcija <i>Salmonella spp.</i>	ISO 6579:2005
Detekcija i brojanje <i>Listeria monocytogenes</i>	ISO 11290:2005
Detekcija i brojanje <i>Bacillus cereus</i>	ISO 7932:2007
Detekcija i brojanje <i>Staphylococcus aureus</i> i drugih vrsta stafilokoka	ISO 6881-1:2005
Detekcija i brojanje <i>E.coli</i>	ISO 16649-1:2001
Ukupan broj aerobnih kolonija	ISO 4833:2006
Identifikacija i brojanje sulfitoredujućih klostridija	ISO 15213:2003
Identifikacija i brojanje <i>Clostridium perfringens</i>	ISO 7937:2004
Detekcija <i>Enterobacteriaceae</i>	ISO 21528-1:2008
Detekcija i brojanje kvasaca i plijesni	21527-1:2011
Detekcija i brojanje <i>Cronobacter sakazakii</i>	ISO 22964:2007

Priprema decimalnih razblaženja (razrjeđenja) za mikrobiološko ispitivanje vrši se prema istom standardu kao za hranu (ISO 6887-1 : 2008).

Određivanje broja kolonija kvasaca i plijesni

Određivanje broja kolonija kvasaca i plijesni se radi prema metodi ISO 21527-1:2011. Kao sredstvo za razrjeđenje za pripremu osnovnog i decimalnih razrjeđenja koristi se 0,1% peptonski bujon. Sastav peptonskog bujona: enzimski digest životinjskog ili biljnog tkiva 1 g i voda 1000 ml. Kao podloga za zasijavanje decimalnih razrjeđenja i rast kolonija koristi se dichloran–rose bengal chloramphenicol agar (DRBC).

Postupak rada:

Na DRBC agaru, razlivenom u Petri ploči sterilnom pipetom se nanese 0,1 ml razrjeđenja ispitivanog uzorka. Ukoliko se očekuje mali broj kolonija, može se nanijeti 0,3 ml razblaženja. Zatim se nanosena tečnost razvuče po cijeloj površini agara. Zasijani agar se inkubira 5 dana na temperaturi 25 °C. Nakon inkubacije, za brojanje kolonija se uzimaju Petri ploče koje imaju manje od 150 kolonija. Brojanje kolonija se vrši prvi put poslije 2 dana, a zatim nakon 5 dana inkubacije. Kolonije kvasaca i

plijesni se mogu brojati i posebno. Treba imati u vidu da razblaženje 10 puta često ne daje rezultat smanjenja broja kolonija 10 puta, zbog fragmentacije micelijuma i rasipanja spora iz plodonosnih tijela tokom pravljenja razrjeđenja. Takođe se javlja kompetitivna inhibicija rasta, ukoliko je broj kolonija na ploči veliki.

Postupak sa uzorcima stočne hrane nakon ispitivanja

Uzorke stočne hrane treba čuvati na suvom mjestu i sobnoj temperaturi u plastičnim kesama ili kartonskim kutijama najmanje 3 mjeseca od momenta prihvatanja uzorka u laboratoriju. Nakon tog perioda uzorci se sterilisu u autoklavu.

Sažetak

Da bi studenti i budući stručnjaci iz oblasti poljoprivrede mogli da izoluju, gaje, izučavaju i primjenjuju korisne mikroorganizme, kao i da izučavaju osobine štetnih mikroorganizama, neophodno je da ovladaju osnovnim mikrobiološkim metodama. U tom cilju, ovaj praktikum treba da pruži praktično znanje studentima vezano za osnovne tehnike i metode rada u mikrobiološkoj laboratoriji, u cilju izolacije, ispitivanja i identifikacije kako korisnih, tako i štetnih mikroorganizama. Kroz ukupno 18 poglavlja, odnosno 12 vježbi, u praktikumu su opisani zahtjevi i uslovi koje treba da ispuni jedna mikrobiološka laboratorija u pogledu prostora, opreme, pribora, posuđa, hranljivih podloga, zahtjevi u pogledu ponašanja radnog osoblja, načina održavanja higijene, sterilnosti prostora i posuđa, tehnike mikroskopiranja i rukovanja mikroskopom, metoda mjerenja veličine mikroorganizama, pripreme mikroskopskih preparata, metoda za kultivaciju i izdvajanje čistih kultura mikroorganizama, metoda za određivanje ukupnog broja mikroorganizama, ispitivanja biohemijskih osobina mikroorganizama, metoda serološke i molekularne dijagnostike zaraznih bolesti (PCR metoda). Takođe su opisane metode za uzorkovanje i ispitivanje mikroorganizama iz sadržaja buraga, silaže, hrane, kao i mikroorganizama koji se mogu naći u hrani za životinje. Tekst je potkrijepljen sa ukupno 277 slika, što će značajno olakšati studentima savladavanje ove materije.

Abstract

In order for students and future experts in the field of agriculture to be able to isolate, cultivate, study and apply useful microorganisms, as well as to study the properties of harmful microorganisms, it is necessary for them to master basic microbiological methods. To this end, this practicum should provide students with practical knowledge related to basic techniques and methods of work in the microbiological laboratory, in order to isolate, test and identify both beneficial and harmful microorganisms. Through a total of 18 chapters, ie 12 exercises, the practicum describes the requirements and conditions to be met by a microbiological laboratory in terms of space, equipment, utensils, nutrient media, requirements for the behavior of staff, hygiene, sterility of laboratory and utensils, microscopy techniques and microscope handling, method of measuring the size of microorganisms, preparation of microscopic preparations, methods for cultivation and isolation of pure cultures of microorganisms, methods for determining the total number of microorganisms, testing biochemical properties of microorganisms, methods of serological and molecular diagnostics of infectious diseases. Methods for sampling and testing microorganisms from rumen, silage, food, as well as microorganisms found in animal feed are also described. The text is supported by a total of 277 images, which will significantly facilitate students' mastery of this subject.

BIBLIOGRAFIJA

- Ašanin R., Krnjaić D., Milić N. (2008): Priručnik sa praktičnim vežbama iz mikrobiologije sa imunologijom, BMG-NM d.o.o., Beograd.
- Baraka, T. A. (2012): Comparative Studies of Rumen pH, Total Protozoa Count, Generic and Species Composition of Ciliates in Camel, Buffalo, Cattle, Sheep and Goat in Egypt, *Journal of American Science*, 8(2), p 448-462.
- Bojanić Rašović M. (2020). Mikrobiologija za studente animalne proizvodnje, Univerzitet Crne Gore
- Boyne A. W., Eadie J., Raittk M. (1957). The Development and Testing of a Method of Counting Rumen Ciliate Protozoa, *J. Gen. Microbiol.* 17, p 414-423.
- Dehority B.A. (1984): Evaluation of Subsampling and Fixation Procedures Used for Counting Rumen Protozoa, *Applied and environmental microbiology*, 48 (1), p 182-185.
- Dimitrijević S. (1999): Dijagnostika parazitskih bolesti, Fakultet veterinarske medicine, Beograd, p 1-134.
- Đukić D., Mandić L., Stanojković A.(2010): Praktikum iz mikrobiologije, Budućnost, Novi Sad, p 1-428.
- ISO standardi za mikrobiološko ispitivanje hrane.
- Kanački Z. (2015): Praktikum iz fiziologije, Univerzitet u Novom Sadu, Poljoprivredni fakultet
- Karakašević B.(1966): Priručnik standardnih metoda za mikrobiološki rutinski rad, Grafički zavod Hrvatske, Zagreb
- Katić V. (2007): Praktikum iz higijene mleka, Veterinarska komora Srbije, Beograd
- Kennedy M.J. (1979): Basic methods of specimen preparation in parasitology, IDRC-MR8, Canada, p 1-50.
- Mihajlović B.(1983): Priručnik za identifikaciju bakterija, kvasaca i plesni, Savez veterinarara i veterinarskih tehničara Jugoslavije, Beograd
- Mihajlović B., Marković B.(1987): Praktikum - praktične vežbe iz mikrobiologije, Naučna knjiga, Beograd

- Miljković V., Katić V. (1995): Priručnik laboratorijskih analiza mleka i proizvoda od mleka, Veterinarska komora Srbije, Beograd
- Nguyen S.H., Hegarty R. S. (2019): Distribution of ciliate protozoal populations in the rumen, reticulum and omasum of angus heifers offered lucerne cereal mix, *Livestock Research for Rural Development* 31 (9).
- Pešić Mikulec D. (2005): Mikrobiološke analize namirnica u odnosu na evropsku zakonsku regulativu, Makarije, Beograd
- 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).
- Pravilnik o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane Sl. RCG br. 53/12.
- Pravilnik o maksimalnim količinama štetnih materija i sastojaka u stočnoj hrani Sl.list SFRJ br. 2/90.
- Sarić Z. (1992): Praktikum iz mikrobiologije, Nauka, Beograd.
- Stilinović B., Hrenović J.(2010): Praktikum iz bakteriologije, Kugler, Zagreb.
- Tchan Y. T., Bunt J. S. (1954): Direct Microscopy for Study and Count of Soil Protozoa, *Nature*, Vol. 174, p 656.
- Todorović J., Bojanić Rašović M. (2009): Mikrobiologija, Centar za stručno obrazovanje, Podgorica
- Šibalić S., Cvetković Lj. (1990): Osnovi dijagnostike parazitskih bolesti, Univerzitet u Beogradu, p 1-175.
- Škrinjar M. (1994): Metodi mikrobiološke kontrole životnih namirnica, Futura, Novi Sad
- Uredba o mikrobiološkim kriterijumima za bezbjednost hrane, Sl. list RCG 26/2016.
- Vadlejch J., Petrtyl M., Zaichenko I., Čadková Z., Jankovská I., Langrová I., Moravec M. (2011). Which McMaster egg counting technique is the most reliable?, *Parasitol. Res.* 109:1387–1394.
- Vodič za mikrobiološke kriterijume za bezbjednost hrane (2013), Vlada Crne Gore
Zakon o bezbjednosti hrane Sl. List RCG 57/15.

INDEKS

- Aglutinacija 159, 160
Autoklav 54, 65, 71, 73, 144
Bakterije 73, 81, 88, 90, 91, 95, 96, 97, 100
Bakteriofag 95, 112
Bojenje po Gramu 85, 87
Bojeni preparat 78, 79,
Brojanje mikroorganizama 119
CAMP test 155
Čista kultura 129
Čuvanje mikroorganizama 127, 132
Dezinfekcija 11, 27, 76, 200
Diferencijalne podloge 213, 214, 215
Elektronski mikroskop 13, 19
Elisa test 159, 164
Fiksacija mikroskopskih preparata 197
Gljive 101, 103, 104, 109,
Hidroliza skroba 139, 140
Hidroliza kazeina 139, 141
Hranljivi agar 117, 147, 153, 214
Katalaza test 139, 147
Koagulaza test 153
Metoda iscrpljenja 131
Metoda razrjeđenja 125, 130
Mjerenje veličine mikroorganizama 24
Mikrobiološka laboratorija 9, 12, 221
Mikroorganizmi buraga 177
Bakterije mliječne kisjeline 179, 187, 195, 198, 216
Mikrobiološko ispitivanje hrane 199, 217, 219
Mikroorganizmi silaže 187
Nativni preparat 77, 81
PCR metoda 169, 221
Pranje laboratorijskog posuđa 12, 27, 34, 65
Precipitacija 159, 160, 161
Protozoe 14, 110, 111, 178, 179, 182, 183
Reakcija vezivanja komplementa 159, 162
Razlaganje želatina 139, 143
Selektivne podloge 120
Sterilizacija 27, 69, 71, 73, 76, 144
Stvaranje indola 139, 144
Svjetlosni mikroskop 13, 14
Tehnika mikroskopiranja 13, 22
Virusi 112, 179

ISBN 978-86-7664-241-0



9 788676 642410 >

Mirjana Bojanić Rašović

PRAKTIKUM IZ MIKROBIOLOGIJE
ZA STUDENTE ANIMALNE PROZVODNJE