



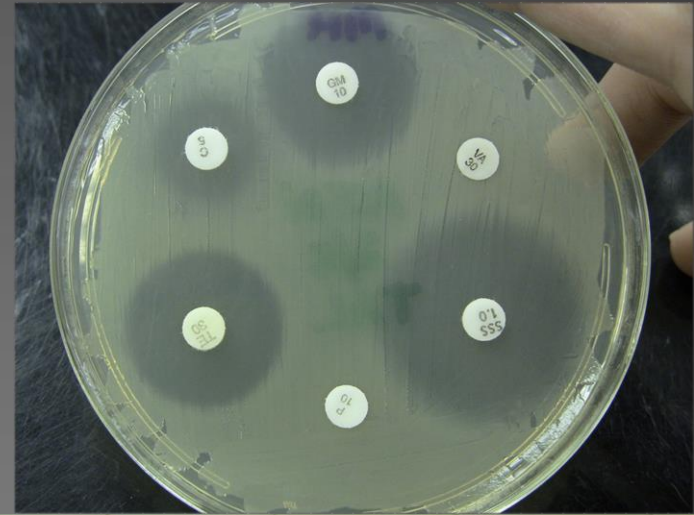
**FAKULTET VETERINARSKE MEDICINE  
UNIVERZITETA U BEOGRADU**

**Katedra za higijenu i tehnologiju namirnica animalnog porekla**

**▶ METODE MIKROBIOLOŠKOG  
ISPITIVANJA**

# Svrha kultivisanja mikroorganizama:

- ← Izolacija i identifikacija
- ← Određivanje broja bakterija
- ← Kontrola sterilnosti
- ← Kultivisanje kontrolnih sojeva
- ← Antibiogram



# FAKTORI POTREBNI ZA RAST I RAZMNOŽAVANJE MIKROORGANIZAMA

- ▶ Odgovarajući sastav podloge
- ▶ Faktori rasta
- ▶ Voda
- ▶ pH podloge
- ▶ Temperatura inkubacije (termostata)
- ▶ Sastav atmosfere u kojima se gaje MO (O<sub>2</sub>)
- ▶ Osmotski pritisak



Hranljive podloge - služe za kultivisanje mo u laboratorijskim uslovima i izvori su materija za njihov rast i razmnožavanje

## SASTOJCI HRANJIVIH PODLOGA

- ▶ Voda
- ▶ Agar (*Gelidium corneum*)-sastojak čvrstih podloga
- ▶ Mineralne soli (utiču na pH, imaju puferske karakteristike, obezbeđuju adekvatan osmotski pritisak, aktiviraju enzime...)
- ▶ Peptoni (kompleksne smeše polipeptida, peptida i aminokiselina)
- ▶ Boje i indikatori
- ▶ Pufferi
- ▶ Agensi kojima se postiže selektivnost
- ▶ Dodaci za obogaćenje - krv
- ▶ Redukujuće supstance - tioglikolat

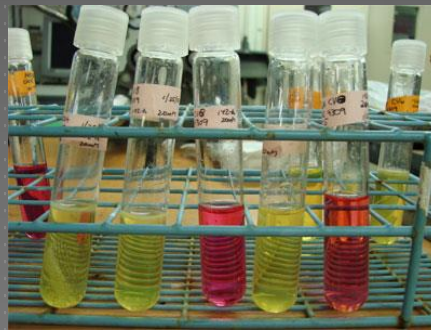


# PODELA PODLOGA

Prema čvrstini



čvrste, tečne i polučvrste



Prema nameni



jednostavne i složene

Prema poreklu



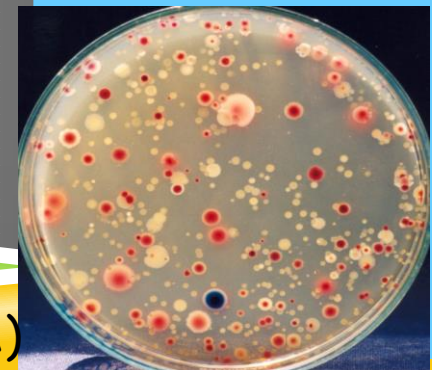
prirodne, sintetičke, polusintetičke

## Jednostavne

podloga koja omogućava rast velikom broju mikroorganizama. Primer su peptonska voda, hranljivi agar, hranljivi bujon.

## Složene

- ❑ **selektivne** – stimulacija jedne vrste, a inhibicija rasta ostalih (npr. Selenit F bujon koji omogućava rast bakterijama roda *Salmonella* i *Shigella*).
- ❑ **elektivne** – daju prednost jednoj vrsti, a ostali MO rastu sa zadržkom
- ❑ **diferencijalne, indikatorske** - mogućnost prepoznavanja određene vrste
- ❑ **podloge za obogaćenje rasta** – selektivni tečni medijum u cilju povećanja broja “target” MO (krv, serum, jaja)
- ❑ **biohemijske** – ispitivanje biohemijske aktivnosti



Mesnopeptonski agar (MPA)



# SLED POSTUPAKA PRI IZOLACIJI I IDENTIFIKACIJI MO IZ NAMIRNICA

- ▶ **Predobogaćenje** – neselektivni tečni medijum u cilju oporavka subletalno oštećenih ćelija
- ▶ **Obogaćenje** – selektivni tečni medijum sa svrhom povećanja broja “target” MO
- ▶ **Izolacija** – selektivni čvrsti medijum - dobijanje pojedinačnih kolonija
- ▶ **Identifikacija** – makro i mikromorfologija, fenotipizacija, serologija, PCR metode

### Skraćenice:

BPW – Buffered Peptone Water

(Pufferisna peptonska voda)

RVB - Rappaport Vassiliadis Broth

MKKT-Müller Kauffmann

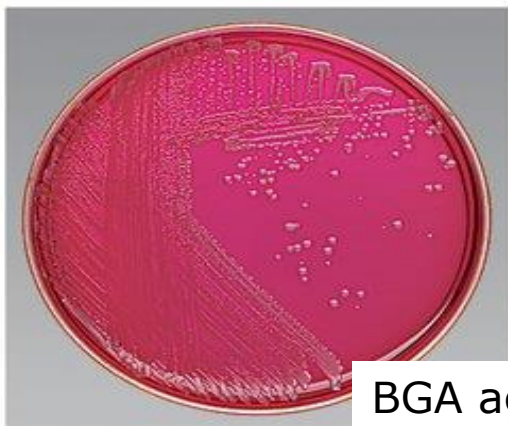
Tetratonate/novobiocin Broth

XLD - Xylose Lysine Desoxycholate Agar

BGA - Brilliant Green Agar Modified

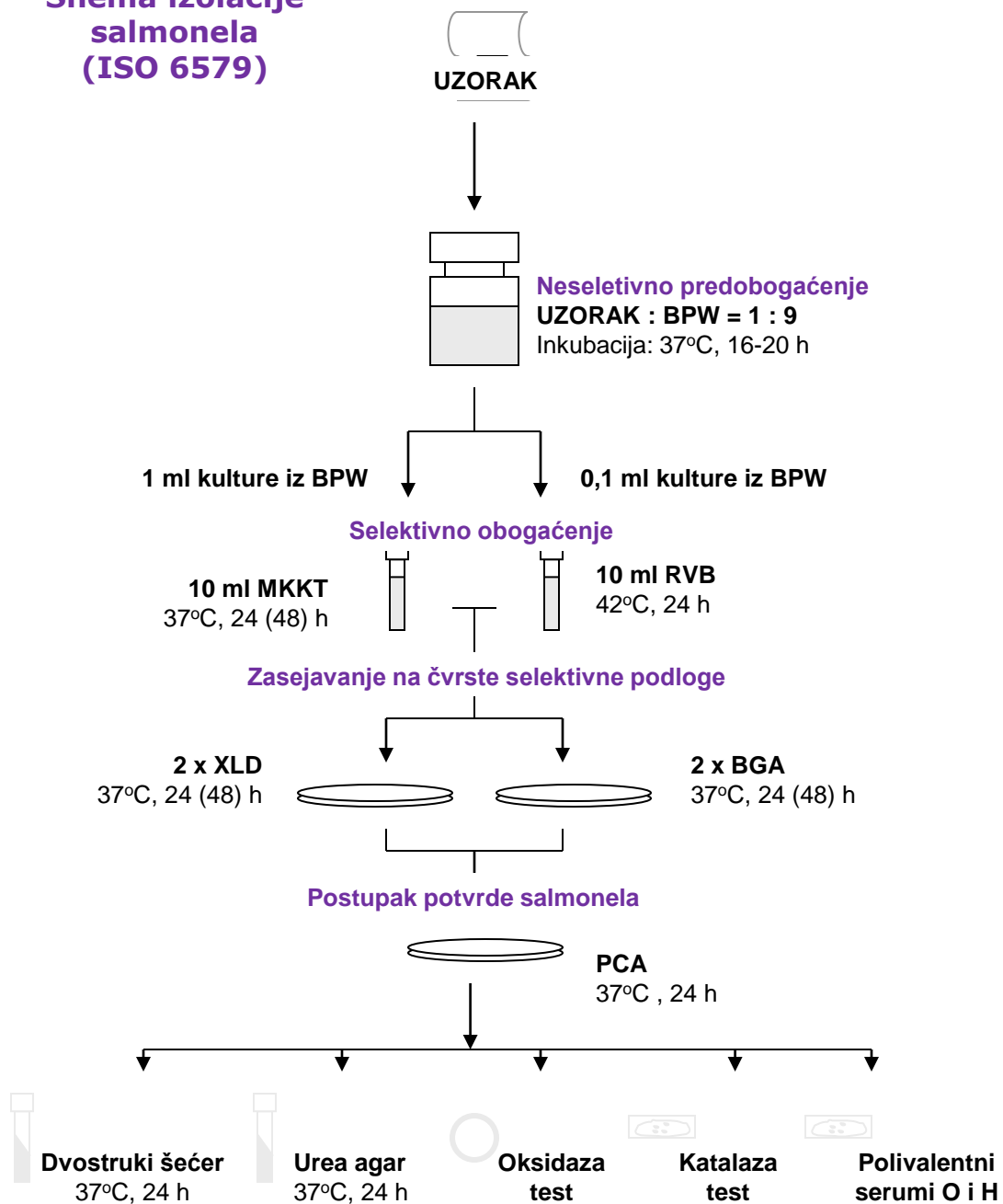
PCA - Plate Count Agar

XLD agar  
(salmonela)



BGA agar  
(salmonela)

### Shema izolacije salmonela (ISO 6579)





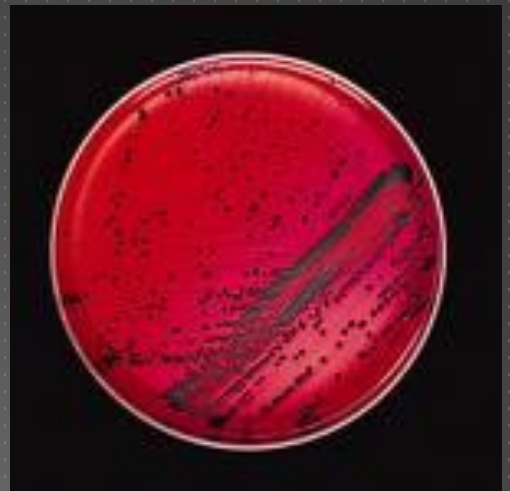
# SALMONELLA VRSTE

## **Podloga za obogaćenje**

- ↯ **Rappaport Vassiliadis bujon , Muller-Kaufman tetracionat bujon**
- ↯ inhibiše aktivnost kompetitivne mikroflore i stimuliše rast salmonela
- ↯ visok osmotski pritisak ( $\text{MgCl}_2$ ), nizak pH, malahit zeleno



# SALMONELLA VRSTE



## ↯ **XLD agar (Xylose Lysine Desoxycholate agar)**

- ↯ Natrijum-dezoksiholat: inhibiše Gram+ bakterije
- ↯ Fenol crveno: pH indikator (alkalna sredina-crveno - salmonele)
- ↯ Fe-amonijum citrat: označava produkciju H<sub>2</sub>S
- ↯ Tiosulfat – redukcija do H<sub>2</sub>S (crvene kolonije sa crnim centrom usled precipitacije Fe-sulfida)
- ↯ Lizin- dekarboksilacija

## ↯ **BG-agar (Briliant green agar – modifikovani)**

- ↯ Sukroza i laktoza-izvor fermentacije ugljenih hidrata
- ↯ Briliant zeleno – inhibira rast Gram+ mikroorganizama, favorizuje Salmonelle
- ↯ Bogata hranljivim sastojcima i puferisana fosfatnim solima

# SALMONELLA VRSTE

## ▶ *Podloge za ispitivanje biohemijskih karakteristika (identifikacija)*

- ↻ Dvostruki šećer po Kligleru
- ↻ Kosi agar sa ureom po Christensenu
- ↻ Indol
- ↻ Metil crveno
- ↻ Voges Proskauer
- ↻ Simons citrat
- ↻ Fenil alanin
- ↻ KCN

# LISTERIA MONOCYTOGENES

Primarno obogačenje

25 g uzorka  
↓  
225 ml Halt - Fraser bujona

24 h pri 30 C

Sekundarno obogačenje

0.1 ml  
↓  
10 ml Fraser bujora

24 h pri 35 C

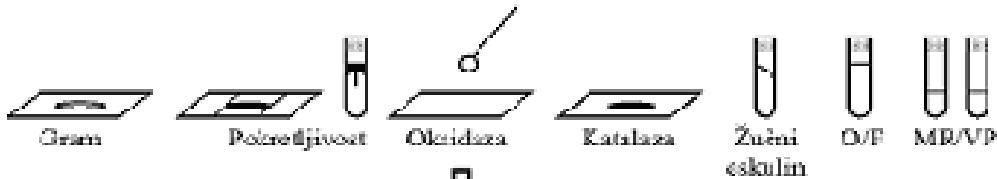
Zasejavanje na čvrste selektivne podloge

PALCAM agar  


24-48 h pri 35 C

ili ALOA agar

Identifikacija *Listeria spp.*



Identifikacija *Listeria monocytogenes*



# LISTERIA MONOCYTOGENES

↪ **ISO standard EN ISO 11290-1 i EN ISO 11290-2**

Obogaćenje – tečne podloge



↪ **Half Fraser** – primarno obogaćenje

- Akriflavin, cikloheksamid i nalidiksična kiselina inhibišu rast drugih mikroorganizama
- Na-piruvat – oporavlja listerije
- Eskulin (glukoza + eskulitin sa  $Fe^{+++}$  daju zeleno crni kompleks)

- **Fraser bujon** – sekundarno obogaćenje (puna koncentracija selektivnih agenasa)

# *LISTERIA MONOCYTOGENES*

## Selektivno diferencijalne podloge

### Palcam agar

- ↪ Inhibiše Gram- i većinu Gram+ bakterija
- ↪ Selektivnost potiče od: polimiksina, akriflavina, ceftazidima i litijum hlorida
- ↪ Eskulin (glukoza + eskulitin sa  $\text{Fe}^{+++}$  daju zeleno crni kompleks)





## *LISTERIA MONOCYTOGENES*



### **ALOA (Agar Listeria according to Ottavani and Agosti)**

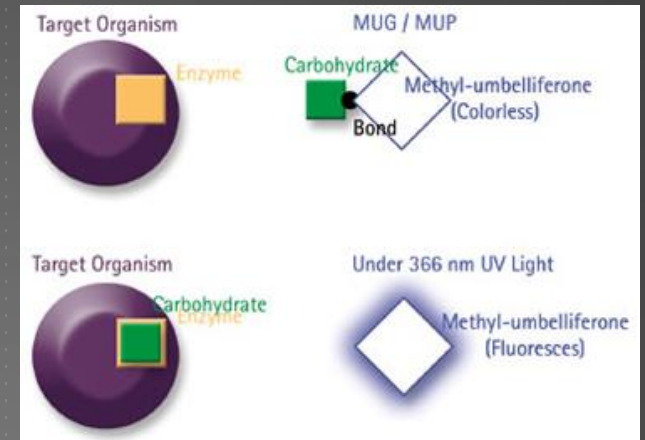
- Sivo plave okrugle kolonije - detekcija beta glukozidaze korišćenjem specifičnih **hromogenih supstrata**

↪ prosvetljenje – ativnost fosfolipaze

- **Selektivni agensi** - nalidiksična kiselina, cefazidimin, cikloheksamin, polimiksin B, L-alfa-fosfatidilinozitol

# FLUROGENI I HROMOGENI SUPSTRATI U BAKTERIOLOŠKIM PODLOGAMA

- ▶ 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-glucuronide (MUG)
- ▶ 4-methylumbelliferyl- $\beta$ -D-galactoside (MUGal)
- ▶ O-nitrophenyl-  $\beta$ -D-galactopyranoside (ONPG)
- ▶ L-alanine-p-nitroanilide (LAPN)
- ▶ Indoxyl-  $\beta$ -D-glucuronide (IBDG)



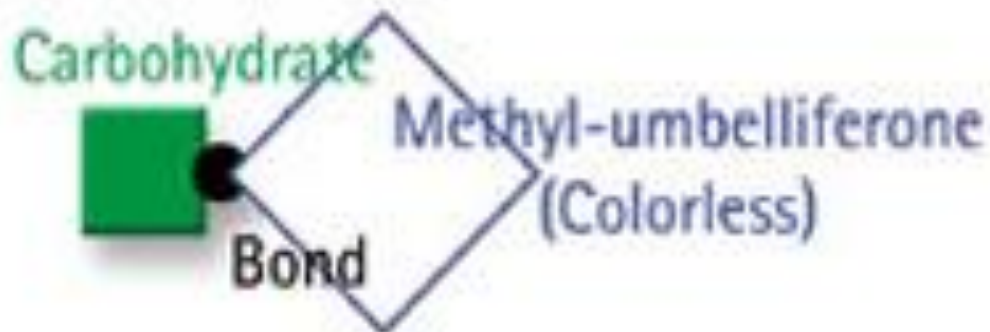
- ▶ Dodaju se na različite načine u podloge, bujone, kao i u membranske filtrate.
- ▶ MUG – hidrolizuje ga  $\beta$ -D-glucuronidase (GUD) i stvara se fluorescentni 4-methyl-umbelliferyl koji se detektuje UV zracima.
- ▶ GUD+: E.coli, neke salmonele, šigele i korinebakterije

Target Organism



Enzyme

MUG / MUP



Target Organism



Carbohydrate  
Enzyme

Under 366 nm UV Light



# LISTERIA MONOCYTOGENES

↪ Test pokretljivosti u polutečnom hranljivom agaru:

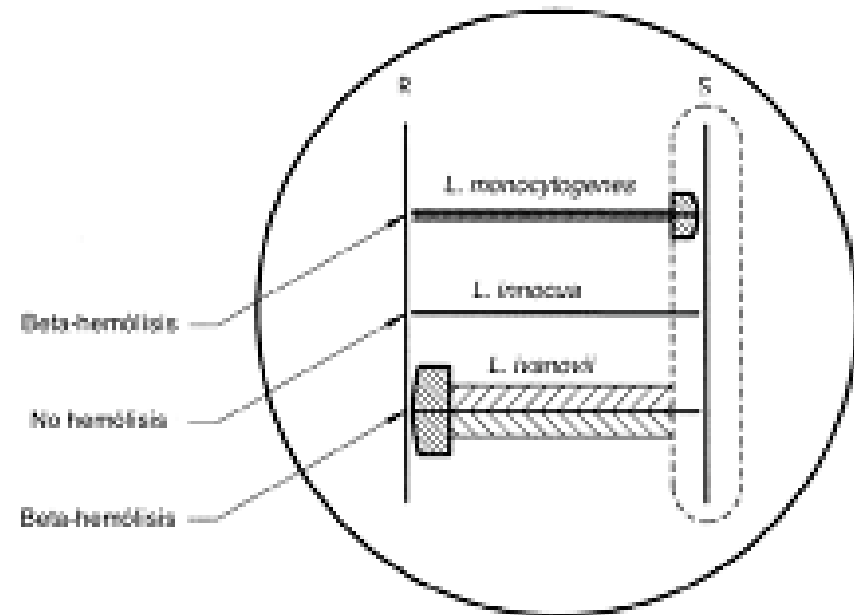
*Listeria spp.* raste ne samo na mestu uboda, već u celoj podlozi stvarajući tipičan “kišobran efekat”

CAMP test - hemoliza - paralelno se zasejavaju *Rodococcus equi* i *Staphylococcus aureus* kao i kontrolni sojevi *Listerie*

## Krvni agar

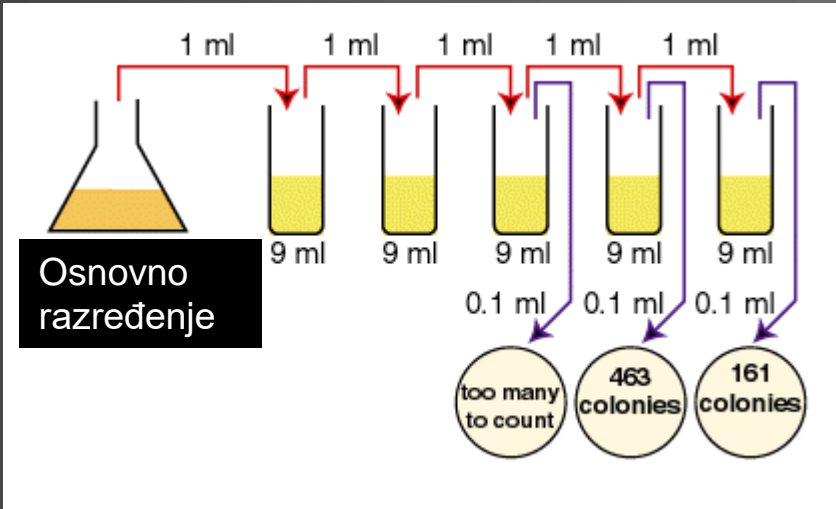


ASM MicroLibrary.org © Hanson



# BROJ AEROBNIH KOLONIJA

- ▶ Tehnika brojanja kolonija - MRD pufer
- ▶ Podloga za ukupan broj bakterija – tripton, ekstrakt kvasca, dekstroza



# STAPHYLOCOCCUS AUREUS

*Baird Parker agar* (BPA - ETPGA)

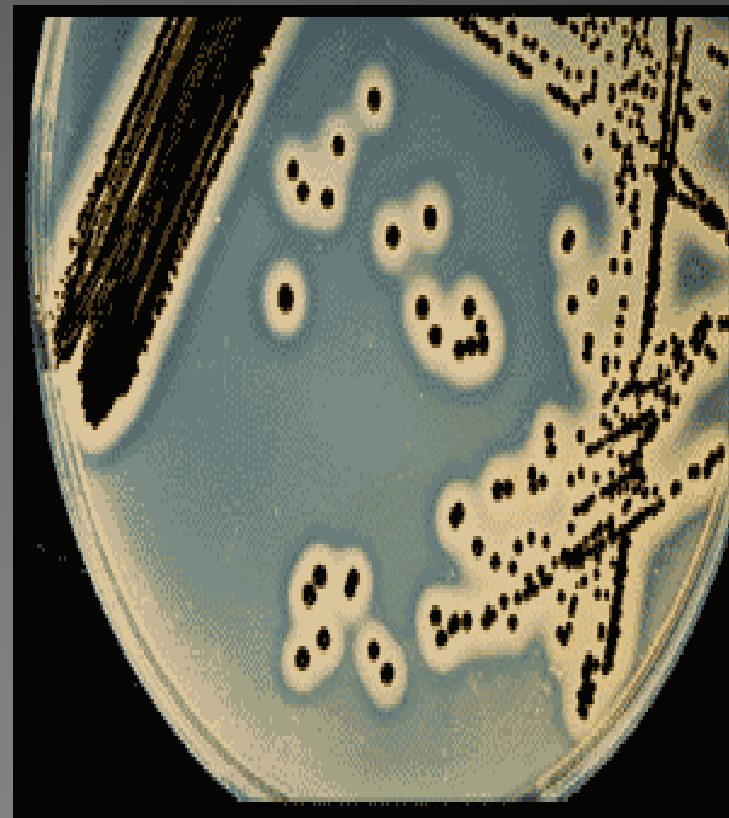
**E** – egg yolk, žumance jajeta (obogaćenje i aktivnost lecitinaze, lipaze)

**T** – Kalijum-telurit, selektivni agens, inhibira G -, redukcija do telurida- kolonije tipične crne boje

**P**- Na-piruvat, faktor rasta, neutrališe toksične perokside

**G**- glikokol, faktor rasta

LiCl – inhibicija popratne mikroflore





# *Clostridium perfringens*

- IZOLACIJA I IDENTIFIKACIJA

Rosenow-a podloga 3-5 dana; 37°C

Stvaranje gasa

Po 1ml u dve prazne epruvete; Termički tretman 80°C 10 min

Preliti sulfitnim agarom; 3-5 dana; 37°C

Crne okrugle kolonije

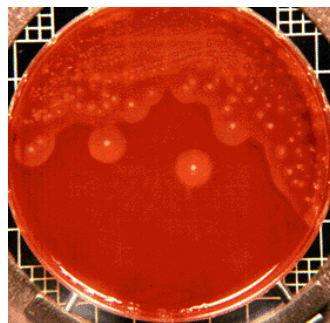
Krvni agar

preparat po Gramu

(Gram pozitivni sporogeni štapići)

aerobno  
(nema rasta)

anaerobno 24h; 37°C  
(ima rasta)



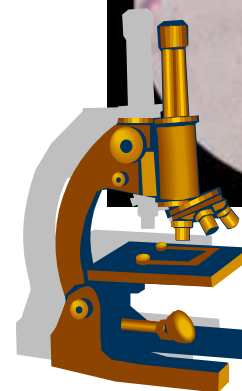
*Clostridium perfringens*  
Sheep blood trypticase soy (STSA) agar



Sulfitni agar



Klostridije



# ESCHERICHIA COLI

## Brilijant zeleni laktoza žučni bujon

- brilijant zeleno i žuč – selektivni agensi, inhibicija G+ mikroflore
- laktoza – fermentacija i stvaranje gasa
- Selektivnost podloge povećavamo i uslovima kultivacije, T 42-44°C

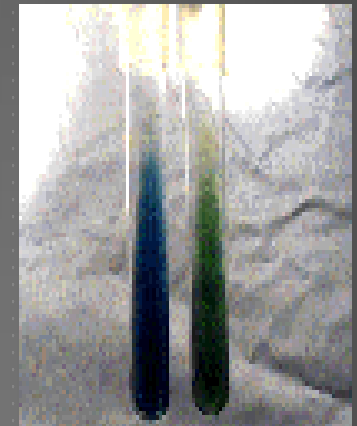
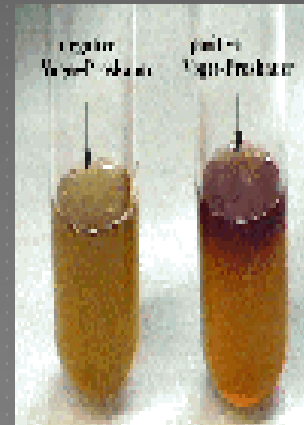
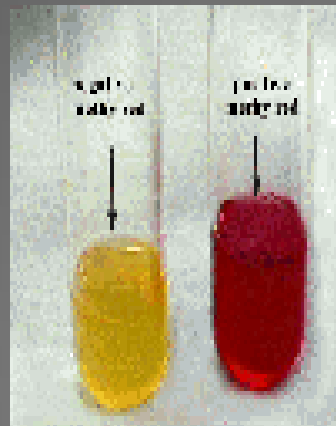
## Ljubičasto crveni žučni agar (VRB – Violet Red Bile)

- žučne soli i kristal violet – selektivni agensi, inhibicija većine G+
- Neutral crveno je indikator



# BIOHEMIJSKI NIZ

- ▶ dvostruki šećer po Kligleru, indol, metil crveno, VP, citrat - potvrda



# KVASCI I PLESNI

## Sabouraud agar

- selektivnost se postiže niskim pH (5,6) – inhibicija većine vrsta bakterija
- dodatna selektivnost – kloramfenikol, ali i uslovi kultivacije, inkubacija pri sobnoj T
- dve varijante, maltoza i dekstroza



# STARTER KULTURE

- ▶ **Bakterije mlečne kiseline-  
*Lactococcus* spp. i *Lactobacillus*  
spp.**

## M-17 bujon i agar- laktokoke

- ❑ dinatrijum  $\beta$ -glicerofosfat-povećanje puferskog kapaciteta podloge
- ❑ askorbinska kiselina-stimuliše rast
- ❑  $MgSO_4$ -obezbeđuje esencijalne jone za rast

## MRS bujon i agar - laktobacili

- ❑ zahtevni u pogledu hranjivih materija:polisorbit, acetat, Mn i Mg-sulfat kao specifični faktori rasta
- ❑ selektivnost podloge - niski pH podloge 5,7, ali i mikroaerofilni uslovi inkubacije

