



УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

МИКРОБИОЛОГИЈА – ПРАКТИКУМ



# МИКРОБИОЛОГИЈА

## практикум

Доц. др Драгана Стаменов  
Проф. др Тимеа Хајнал Јафари  
Проф. др Симонида Ђурић



# УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

Доц. др Драгана Стаменов  
Проф. др Тимеа Хајнал Јафари  
Проф. др Симонида Ђурић

## МИКРОБИОЛОГИЈА - практикум



ПОЉОПРИВРЕДНИ  
ФАКУЛТЕТ  
УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ

УНИВЕРЗИТЕТ У НОВОМ САДУ  
ПОЉОПРИВРЕДНИ ФАКУЛТЕТ

---

Нови Сад, 2023.

## **ЕДИЦИЈА ПОМОЋНИ УЦБЕНИК**

### **Оснивач и издавач едиције**

Универзитет у Новом Саду

Пољопривредни факултет Нови Сад  
Трг Доситеја Обрадовића 8, Нови Сад

### **Година оснивања**

1954.

### **Главни и договорни уредник едиције**

Др Недељко Тица, редовни професор  
Декан Пољопривредног факултета у Новом Саду

### **Чланови Комисије за издавачку делатност**

Проф. др Бранислав Влаховић, председник  
Проф. др Ивана Давидов, члан  
Проф. др Ксенија Мачкић, члан  
Доц. др Дејан Беуковић, члан

СР – Каталогизација у публикацији  
Библиотеке Матице српске, Нови Сад

**СТАМЕНОВ**, Драгана, 1978-  
Микробиологија – практикум / Драгана Стаменов, Тимеа Хајнал Јафари, Симонида  
Ђурић. – Нови Сад: Пољопривредни факултет, 2023.(штампа ). -187 стр.: илустр.  
73; 30см. – (Едиција Помоћни уцбеник / Пољопривредни факултет, Нови Сад)

Тираж 20. – Библиографија

ISBN 978-86-7520-598-2

1. Хајнал Јафари, Тимеа, 1973- [аутор] 2. Ђурић, Симонида, 1967-[аутор]  
а) Микробиологија - практикум

COBISS.SR-ID

## **Аутори**

Др Драгана Стаменов, доцент  
Др Тимеа Хајнал Јафари, ванредни професор  
Др Симонида Ђурић, редовни професор

## **Главни и одговорни уредник**

Др Недељко Тица, редовни професор  
Декан Пољопривредног факултета у Новом Саду

## **Технички уредник**

Др Драгана Стаменов, доцент

## **Рецензенти**

Др Весна Лалошевић, редовни професор  
Пољопривредни факултет, Нови Сад

Др Сунчици Коцић-Танацков, ванредни професор  
Технолошки факултет, Нови Сад

## **Издавач**

Универзитет у Новом Саду  
Пољопривредни факултет, Нови Сад

Забрањено прештампавање и фотокопирање. Сва Права задржава издавач.

Штампа:

Штампање одобрила Комисија за издавачку делатност, Пољопривредни факултет,  
Нови Сад

Тираж: 20

Место и година штампања: Нови Сад, 2023.

## ПРЕДГОВОР

Овај практикум је резултат нашег вишегодишњег педагошког и научноистраживачког рада, али и плод наше љубави према микроорганизмима и њиховом чудесном микро свету.

Практикум Микробиологија је настао због потребе студената основних студија Пољопривредног факултета за новијом литературом из области микробиологије. Написан је према акредитованим плановима и програмима за предмет Микробиологија за студенте прве године студијских програма биљне производње (Ратарство и повртарство, Воћарство и виноградарство, Фитомедицина, Органска производња), као и за студенте прве године студијског програма Анимална производња.

Жеља нам је била да студентима на једноставан и јасан, а ипак академски начин приближимо тајне живота микроорганизама и објаснимо како се са њима безбедно рукује у лабораторији. Практикум је конципиран тако да студенти добију сва потребна теоријска и практична знања која су им неопходна да савладају основне принципе и технике за проучавање микроорганизама.

Практикум се састоји из три дела. У првом делу практикума су детаљно приказане и објашњене теоријске основе у 11 наставних поглавља. Описане су бројне методе, протоколи и технике које се користе у лабораторији приликом испитивања и описивања микроорганизама. Систематизована су досадашња сазнања из области таксономије микроорганизама, са посебним освртом на значајне представнике корисних и штетних микроорганизама. Посебна пажња посвећена је микробиологији земљишта, сточне хране, меса, млека и испитивању квалитета микробиолошких ђубрива. Коришћен је велики број илустрација и слика, а оне које су преузете из одговарајућих литературних и интернет извора, су измењене и прилагођене и служе само и искључиво у едукативне сврхе.

У другом делу практикума у оквиру лабораторијског дневника, припремљена је 21 вежба са детаљним упутством за самосталан рад. Приликом одабира огледа које ће студенти изводити, било нам је важно да огледи буду едукативни, занимљиви и лако изводљиви у условима у којима се изводи практична настава на факултету. На крају сваке вежбе, постављено је неколико питања. Одговарајући на ова питања, студенти ће моћи да провере своје знање.

У трећем делу практикума у оквиру микробиолошког речника, детаљно је описано 250 микробиолошких термина. Практикум на тај начин представља драгоцену и свеобухватну литературу за спремање испита из микробиологије.

Поред студената, за које се надамо да ће им користити у стицању практичног знања из микробиологије и успешном полагању испита, верујемо да ће практикум наћи примену и бити корисно штиво свима који се баве микробиологијом.

Искрено се захваљујемо рецензентима овог уџбеника, др Весни Лалошевић, редовном професору на Пољопривредном факултету у Новом Саду и др Сунчици Коцић-Танацков, ванредном професору на Технолошком факултету у Новом Саду, које су својим сугестијама и примедбама битно допринеле побољшању основног текста.

*Ауторке*

## САДРЖАЈ

1.	МИКРОБИОЛОШКА ЛАБОРАТОРИЈА .....	1
1.1.	СИГУРНОСНЕ МЕРЕ У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ .....	9
1.2.	АСЕПТИЧНЕ ТЕХНИКЕ У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ.....	9
1.2.1.	Опрема која се користи током спровођења асептичних техника .....	11
2.	ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ, ДЕЗИНФЕКЦИЈА И СТЕРИЛИЗАЦИЈА, ИЗОЛАЦИЈА И БРОЈНОСТ МИКРООРГАНИЗАМА, ДОБИЈАЊЕ ЧИСТЕ КУЛТУРЕ, ПРЕСЕЈАВАЊЕ, ГАЈЕЊЕ И ЧУВАЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА ...	13
2.1.	ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ .....	13
2.2.	ДЕЗИНФЕКЦИЈА И СТЕРИЛИЗАЦИЈА .....	14
2.3.	ИЗОЛАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА .....	18
2.4.	ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА .....	19
2.5.	ДОБИЈАЊЕ ЧИСТЕ КУЛТУРЕ МИКРООРГАНИЗАМА .....	22
2.6.	ПРЕСЕЈАВАЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА .....	24
2.7.	ГАЈЕЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА .....	25
2.8.	ЧУВАЊЕ ЧИСТИХ КУЛТУРА МИКРООРГАНИЗАМА.....	27
3.	МИКРОБИОЛОШКЕ БОЈЕ И ПРЕПАРАТИ.....	28
3.1.	МИКРОБИОЛОШКЕ БОЈЕ .....	28
3.2.	МИКРОБИОЛОШКИ ПРЕПАРАТИ .....	30
3.2.1.	Нативни препарати .....	30
3.2.2.	Фиксирани препарати .....	32
3.3.	МЕТОДЕ БОЈЕЊА .....	32
3.3.1.	Просто бојење .....	32
3.3.2.	Сложено бојење .....	33
3.3.3.	Специјална бојења .....	35
4.	МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА.....	37
4.1.	СВЕТЛОСНИ МИКРОСКОПИ.....	37
4.1.1.	Микроскоп са светлим пољем (обичан светлосни микроскоп) .....	39
4.1.2.	Микроскоп са тамним пољем.....	41
4.1.3.	Фазно-контрастни микроскопи .....	43
4.1.4.	Флуоресцентни микроскопи .....	43
4.2.	ЕЛЕКТРОНСКИ МИКРОСКОП .....	44
4.3.	ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА .....	45
4.3.1.	Микроскопирање објективима сувог система .....	45
4.3.2.	Микроскопирање са имерзионим објективом .....	46
4.4.	ПОСМАТРАЊЕ ОБЛИКА И ВЕЛИЧИНЕ МИКРООРГАНИЗАМА .....	47
4.5.	МИКРОСКОПСКА МЕРЕЊА.....	48
5.	СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗАМА.....	50
5.1.	ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПРОТОЗОА .....	51
5.1.1.	Грађа ћелије.....	52
5.1.2.	Исхрана.....	52
5.1.3.	Размножавање .....	52
5.1.4.	Распрострањеност.....	53
5.1.5.	Таксономија.....	53
5.2.	ИДЕНТИФИКАЦИЈА АЛГИ .....	56
5.2.1.	Грађа ћелије и талуса .....	56
5.2.2.	Исхрана.....	58
5.2.3.	Размножавање .....	59

5.2.4. Распрострањеност .....	60
5.2.5. Таксономија .....	60
5.3. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ГЉИВА.....	63
5.3.1. Грађа ћелије .....	63
5.3.2. Исхрана.....	63
5.3.3. Размножавање .....	63
5.3.4. Распрострањеност .....	63
5.3.5. Таксономија .....	63
5.4. ИДЕНТИФИКАЦИЈА БАКТЕРИЈА.....	73
5.4.1. Грађа ћелије и колоније .....	74
5.4.2. Исхрана.....	76
5.4.3. Размножавање .....	76
5.4.4. Распрострањеност .....	77
5.4.5. Таксономија .....	77
6. МИКРОБИОЛОГИЈА ЗЕМЉИШТА .....	83
6.1. УЗИМАЊЕ И ЧУВАЊЕ УЗОРАКА ЗЕМЉИШТА .....	83
6.2. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ .....	83
6.3. ЕНЗИМАТСКА АКТИВНОСТ ЗЕМЉИШТА .....	85
7. ПРОВЕРА КВАЛИТЕТА МИКРОБИОЛОШКИХ ЂУБРИВА .....	86
8. МИКРОБИОЛОГИЈА СТОЧНЕ ХРАНЕ.....	89
9. МИКРОБИОЛОГИЈА МЕСА И ПРОИЗВОДА ОД МЕСА .....	91
10. МИКРОБИОЛОГИЈА МЛЕКА.....	93
11. ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЗНАЧАЈНИХ ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА У СТОЧНОЈ ХРАНИ, МЕСУ И МЛЕКУ .....	96
ЛАБОРАТОРИЈСКИ ДНЕВНИК.....	101
РЕЧНИК МИКРОБИОЛОШКИХ ПОЈМОВА.....	161
ПРИЛОГ .....	177
ЛИТЕРАТУРА.....	180

# 1. МИКРОБИОЛОШКА ЛАБОРАТОРИЈА

Микробиолошке лабораторије се разликују од хемијских, биохемијских и лабораторија за испитивање земљишта и биљног материјала. У микробиолошкој лабораторији се, с обзиром да особље и студенти раде и са живим микроорганизмима, морају поштовати опште али и специфичне мере безбедности да би се смањило ризик од изложености микроорганизмима. Када се ступи у микробиолошку лабораторију прво се у посебној просторији одложе личне ствари, као што су јакне, торбе, књиге, а у лабораторију се уносе само оне ствари које су неопходне за рад.

Постоје четири потенцијална начина заразе микроорганизмима и то путем:

- контакта преко коже и слузокоже – зато се препоручује ношење мантила, заштитних рукавица, маске, наочара;
- гутања микроорганизма – из тог разлога, забрањено је конзумирање хране и пића, као и шминкање;
- удисања микроорганизма – потребно је онемогућити стварање аеросола током рада;
- инокулације – неопходно је поштовати протокол за одлагање предметних плочица, игала, поломљеног стакленог посуђа итд.

Када се у микробиолошким лабораторијама ради са сапрофитним, непатогеним микроорганизмима, ипак треба обратити пажњу и на могућност присуства патогених микроорганизма. Уколико се они констатују, тај материјал треба затворити у посебне посуде и стерилисати у аутоклаву како би се уништили патогени микроорганизми.

Микроорганизми су класификовани у 4 групе ризика (Табела 1).

Табела 1. Класификација микроорганизма на ризичне групе

---

## Ризична група 1

- не носи никакав или низак ризик по појединца и заједницу
- мало вероватно да ће микроорганизам изазвати болест код људи или животиња
- пример: непатогени лабораторијски сојеви *Escherichia coli*,

*Staphylococcus xylosus*, *Bacillus megaterium*

---

## Ризична група 2

- умерен ризик по појединца, низак ризик за заједницу
- микроорганизам може да изазове болест код људи или животиња, али који мало вероватно може бити озбиљан ризик за лабораторијске раднике, заједницу, стоку или животну средину
- пример: *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* sp.

---

## Ризична група 3

- висок ризик по појединца, низак ризик за заједницу
  - микроорганизам изазива озбиљну болест код људи или животиња, али се обично не шири са једне заражене јединке на другу. Постоје превентивне
-



---

мере и ефикасно лечење

- пример: *Mycobacterium tuberculosis* и *Bacillus anthracis*
- 

#### Ризична група 4

- висок ризик по појединца и заједницу
  - микроорганизам изазива озбиљну болест код људи или животиња и лако се преноси са једне на другу јединку, директно или индиректно. Ефикасно лечење и превентивне мере обично нису доступни.
  - пример: *Ebola virus*, *Marburg virus*, *Lassa virus*
- 

Микробиолошке лабораторије могу имати различити ниво биолошке безбедности (BSL, *Biological Safety Level*):

- ниво 1 - основни ниво
- ниво 2 - основни ниво
- ниво 3 - чување (контролисање)
- ниво 4 - максимално чување

Одређивање нивоа биолошке безбедности узима у обзир расположиве капацитете, опрему, поступке и процедуре потребне за рад са микроорганизмима различитих ризичних група. Микробиолошка лабораторија на Пољопривредном факултету у Новом Саду има основни ниво 2 биолошке безбедности.

У микробиолошким лабораторијама обављају се специфичне анализе па оне морају бити и адекватно опремљене. Пожељно је да подови и зидови до 1,70m висине буду обложени са плочицама отпорним на хемикалије како би се лако прали. Просторије треба да буду довољно велике како би се у њих сместили лабораторијски столови, апарати, ормани за хемикалије и посуђе.

За најосновније микробиолошке анализе потребне су најмање четири микробиолошке просторије: припремна, лабораторија за прање посуђа, лабораторија за изолацију и гајење микроорганизама, лабораторија за микроскопирање и чување микроорганизама.

**Припремна лабораторија** се користи за припремање храњивих подлога за микроорганизме, те сходно томе треба да садржи орман са хемикалијама, прецизну вагу, орман са стакленим посуђем (епрувете, ерленмајер боце, Петри кутије, мензуре), апарат за дестилацију, решо, лабораторијски сто са керамичким плочицама, аутоклав, суви стерилизатор и др.







**Лабораторија за прање посуђа** мора да има топлу и хладну проточну воду, најмање два лавабоа, лабораторијске столове, машину за прање лабораторијског посуђа, посуду са киселином за прање стакленог посуђа, посуду са дестилованом водом за испирање посуђа и орман за сушење посуђа.

**Лабораторија за изолацију и гајење микроорганизама** треба да има велике лабораторијске столове, стерилну комору, центрифугу, мућкалице, термостате, ферментор, фрижидер, замрзивач и др.

**Лабораторија за микроскопирање и чување чистих култура микроорганизама** треба да има лабораторијске столове, проточну воду, прибор и материјал за бојење микроорганизама, лиофилизатор, затим фрижидер и замрзивач за чување чистих култура микроорганизама и квалитетне микроскопе, од којих бар један са уграђеним прибором за фотографисање.

Најосновнија опрема, апарати и прибор који се користе у микробиолошкој лабораторији, као и њихова намена, приказани су у табели 2.

Табела 2. Прибор и апарати у микробиолошкој лабораторији

Посуђе, ситна опрема и апарати	Намена	Изглед
<b>Петри кутије</b>	Пластичне и стаклене: изолација и гајење микроорганизама на чврстој подлози.	
<b>Епрувете</b>	Мале запремине (са. 5–10 cm <sup>3</sup> ) за течне подлоге, коси агар, стерилне растворе; ватени запушачи или пластичне капе штите од контаминације.	
<b>Ерленмајер боце</b>	Користи се за припрему раствора, чување и мерење супстанци, мешање, загревање, хлађење, растварање, таложење и извођење хемијских реакција.	
<b>Еза (бактериолошка петља/омча)</b>	Инокулација/пресејавање на чврсте и у течне подлоге; прављење размаза приликом микроскопирања.	
<b>Аутоматске пипете</b>	Трансфер одређене запремине суспензије микроорганизама или стерилног раствора.	
<b>Пинцета</b>	Трансфер стерилног папира/дискова; семенског и биљног материјала као и честица земљишта.	

---

**Шпиритусна лампа**

Стерилизација металних  
форцепса, еза и слично.



**Пламеник -  
Бунсенов горионик**

Да обезбеди стерилно  
окружење на  
лабораторијском столу, за  
стерилизацију ези, грла  
стаклених тиквица, врха  
епрувета и слично.



**Микроскоп**

Посматрање и изучавање  
микроорганизама.



**Центрифуга**

Омогућава раздвајање фаза,  
чврсте од течне.



**Аналитичка вага**

Мерење хемикалија, биљног  
материјала и земљишта.



---

**pH метар**

Мерење pH вредности  
подлога и раствора.



**Магнетна  
мешалица**

За мешање течне супстанце  
применом обртног магнетног  
поља испод суда.



**Вортекс мешалица**

За мешање течне супстанце у  
епруветама, епендорф  
епруветама и сл.



**Апарат за  
мембранску  
филтрацију**

Стерилизација раствора  
осетљивих на високе  
температуре.



**Аутоклав**

Стерилизација хранљивих  
подлога, раствора, земљишта  
и ситног потрошног  
материјала;  
топљење чврсте подлоге;  
уништавање патогених  
микроорганизама пре  
одлагања.



---

**Кохов лонац**

Стерилизација хранљивих подлога осетљивих на високе температуре (подлоге које садрже витамине, шећере, аминокиселине и сл.).



**Суви стерилизатор**

Стерилизација стакленог посуђа као што су Петри кутије, епрувете, ерленмајер боце и сл.



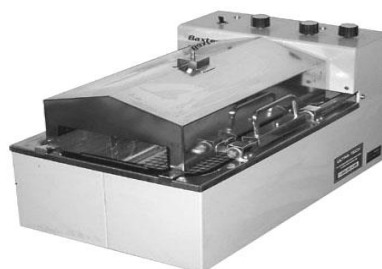
**Ламинарна комора (ламинар)**

Стерилна комора за пресејавање микроорганизама.



**Водено купатило**

Инкубација микроорганизама на нижим температурама, раздвајање спорогених од аспорогених бактерија, ензимске анализе и сл.



**Инкубатор (термостат)**

Инкубација микроорганизама на одређеној температури (28°C до 44°C)



---

**Шејкер инкубатор** Узгајање микроорганизама.



**Фрижидер** Чување чистих култура микроорганизама.



**Замрзивач** Дуже чување узорака, ензима, специјалних хемикалија, култура микроорганизама, и сл.



**Микроталасна рерна** Отапање чврсте хранљиве подлоге; није за стерилизацију.



**Ултразвучно купатило** Ултразвучно чишћење прибора направљених од различитих материјала (метала, пластике, стакла и др.).



---

**Спектрофотометар**

Мери интензитет светлости која пролази кроз раствор. Количина светлости која прође кроз раствор показатељ је концентрације хемикалије или броја микроорганизама у том раствору.

**PCR thermocycler и опрема за генетска испитивања**

Умножаваће полазне количине ДНК молекула.

**Анаеростат**

Ствараће анаеробних услова за узгајање анаеробних микроорганизама.

**Ексикатор**

За постизање анаеробних услова са циљем узгајања анаеробних микроорганизама.

**Лиофилизатор**

Истовремено замрзавање и издвајање воде из микроорганизама, са циљем дугог чувања микроорганизама.



Микробиолошка лабораторија је дизајнирана да омогући студентима да изолују, посматрају, узгајају, карактеришу и идентификују многе микроорганизме. Рад у лабораторији вас може изложити потенцијално патогеним микроорганизмима, па је неопходно потпуно поштовати сигурносне мере и правила понашања у микробиолошкој лабораторији, како би се сваки ризик по здравље отклонио.

Уколико то ваше здравствено стање захтева, консултујте се са својим лекаром и ако је потребно обавестите професора или асистента како би се предузеле одговарајуће мере да се рад у лабораторији прилагоди вашој здравственој ситуацији.

## 1.1. СИГУРНОСНЕ МЕРЕ У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ

Правила понашања и мере сигурности у микробиолошкој лабораторији треба стриктно спроводити и поштовати.

Сви микроорганизми са којима раде студенти у вежбаоници или у лабораторији су сапрофити, али са њима треба руковати као да су патогени, примењујући универзалне мере опреза и асептичне технике.

### Универзалне мере опреза

- Оперите руке сапуном и водом пре уласка и при изласку из лабораторије.
- Одложите капуте и ранчеве тамо где вам неће сметати.
- Дуга коса мора бити везана у реп.
- Немојте јести, пити или жвакати жваку у лабораторији.
- Не стављајте папирне убресе који се користе за брисање столова ван корпе за отпатке.
- Пламенике или шпиритусне лампе никада не треба остављати без надзора.
- На радном месту у лабораторији држите само оно што вам је потребно за извођење вежби.
- Одложите отпад према упутствима.
- Односите се једни према другима с поштовањем, сви сте ту да учите, сви ћете правити много грешака, будите стрпљиви једни са другима.
- Несреће или повреде морате пријавити свом асистенту што је пре могуће.

## 1.2. АСЕПТИЧНЕ ТЕХНИКЕ У МИКРОБИОЛОШКОЈ ЛАБОРАТОРИЈИ

**АСЕПТИЧНЕ ТЕХНИКЕ** су рутински поступци који се предузимају како би се спречила контаминација култура, стерилних подлога и раствора, као и околине нежељеним микроорганизмима.

Треба увек имати на уму да потпуно стерилно радно окружење не постоји. Међутим, постоји низ једноставних, здраворазумских процедура које ће смањити ризик од контаминације културе. Пошто је циљ микробиолога да узгаја микроорганизме без уношења страних организама, **асептичне технике** су кључне за тачан и смислен лабораторијски рад.

Асептичне технике контролишу могућности контаминације култура микроорганизмима из околине, као и контаминацију околине микроорганизмима којима се рукује.

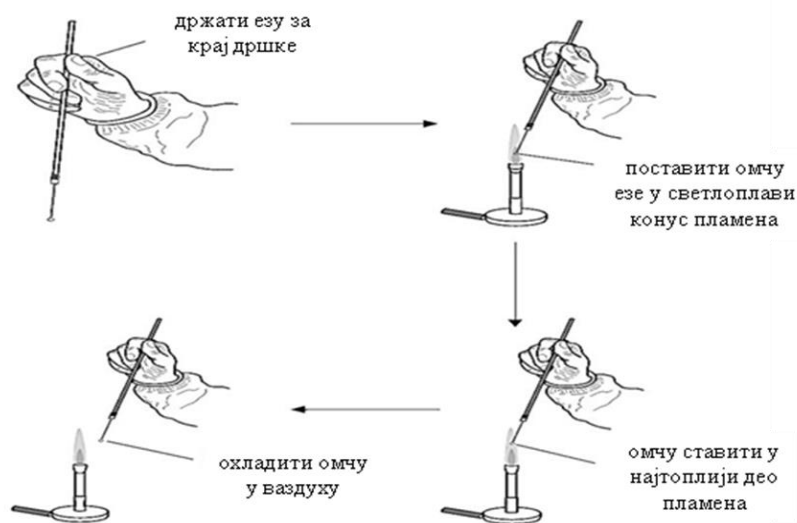


## Општа правила

- Затворите прозоре и врата да бисте смањили промају и спречили изненадно нежељено струјање ваздуха.
- Дезинфикујте радне површине. Због брзог деловања (око 5 минута), препоручује се дезинфекција етанолом (70%). Могу се користити и други облици стерилизације радног простора (UV лампама).
- Препоручује се ношење рукавица. Ако се не користе рукавице, потребно је опрати руке пре и после рада.
- Започните рад само када су сви уређаји и материјали на дохват руке.
- Микробиолошко посуђе може бити отворено најкраће могуће време.
- Док су посуде отворене, сви радови се морају обављати близу пламена пламеника где се ваздушне струје повлаче нагоре.
- Уколико је неопходно да се поклопац Петри кутије спусти на радну површину, поставите поклопац тако да отвор буде окренут надоле.
- Приликом отварања епрувете или тиквице, врат се мора одмах стерилисати загревањем на пламену. Потребно је да посуда буде што је могуће ближе хоризонтално, тако да свако кретање ваздуха буде напоље из посуде.
- Делови стерилних пипета који ће се стављати у културе или стерилне посуде не смеју додиривати нестерилне површине, као што су одећа, површина радног стола или спољашња страна тиквице, епрувете итд.
- Док изводите стерилне процедуре, немојте причати, певати или звиждати.
- Изведите експерименте што је брже могуће како бисте свели контаминацију на минимум.

## Кораци при стерилизацији езе на пламену

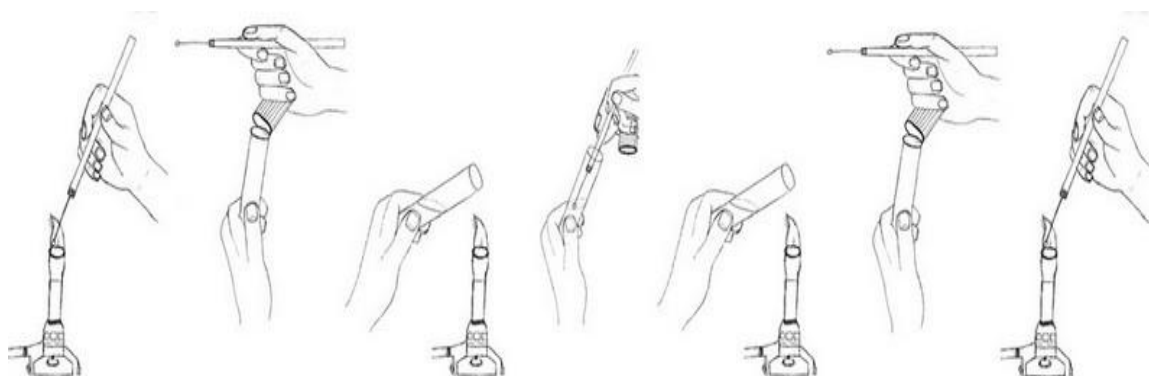
- Еза је инструмент који се састоји од дршке (направљен од изолатора топлоте) и саме езе (метална жица). Док користите езу, држите је за дршку близу врха, као на слици 1.
- Стерилишите езу загревањем до јарко наранџасте боје на пламенику.
- Уверите се да цела дужина езе добије адекватно загревање.
- Охладите је неколико секунди на ваздуху, а затим одмах употребите.
- Не спуштајте езу и не машите с њом.
- Након употребе, поново стерилишите езу и вратите је на њено место.



Слика 1. Кораци при стерилизацији езе на пламену

### Кораци при стерилизацији грла тиквице, врха епрувете и чепа

- Левом руком подигните тиквицу/епрувету.
- Скините метални чеп/чеп од памучне вате са тиквице/епрувете са малим прстом савијеним према длану ваше десне руке. Не спуштајте чеп. Загрејте грлић тиквице или врх епрувете тако што ћете врат, односно врх провући напред и назад кроз врућ пламен пламеника. Врући део пламена је изнад унутрашњег светлоплавог „конуса“. Пролазак отвора тиквице кроз пламен ствара конвекцијску струју даље од отвора и помаже у спречавању контаминације. Ово осигурава да ниједан микроорганизам не уђе у отвор посуде који би контаминирао културу или подлогу.
- Приликом враћања чепа, малим прстом ставите чеп на грло тиквице, односно врх епрувете. Да би чеп добро налегао на место, okreћите тиквицу или епрувету, а не чеп (Слика 2). Док радите ово будите веома пажљиви јер су грлић тиквице и врх епрувете врући.



Слика 2. Кораци при стерилизацији отвора епрувете и чепа на пламену

### Пресејавање микроорганизама

- Пресејавање микроорганизама се врши што је брже могуће. Епрувете и Петри кутије, које се том приликом користе, могу бити отворене и изложене ваздуху само током најкраћег временског периода.
- Петри кутија са подлогом на коју се преноси микроорганизам, се отвара тако што се поклопац подиже даље од тела и то без потпуног скидања са базе.
- У случајевима када Петри кутија мора бити дуже време отворена, онда се мора радити веома близу пламеника да би се смањила шанса за контаминацију.
- Приликом пресејавања микроорганизама морају се поштовати општа правила стерилног рада као и кораци стерилизације езе, грлића тиквице и врха епрувете.

#### 1.2.1. Опрема која се користи током спровођења асептичних техника

За спровођење асептичних техника неопходно је обезбедити одговарајућу опрему, од којих су ламинар и пламеник на првом месту.

### Ламинарна комора (ламинар)

Ламинарна комора (или беспрашна комора) је уређај у коме се помоћу УВ зрака стерилише ваздух и радна површина стола. Осим тога, има уграђен високоефикасни филтер тј. ХЕПА филтер (*High Efficiency Particulate Air*) који служи за уклањање спора и честица из ваздуха радног простора коморе. Сертификовани ХЕПА филтер мора да ухвати најмање 99,97% прашине, полена, буђи, бактерија и свих честица у ваздуху величине веће од 0,3 $\mu$ m.

Ламинарна комора са протоком ваздуха је основна компонента многих лабораторија које имају ниво биолошке безбедности 2.

### Пламеник (Бунсенов горионик)

Вероватно најлакши начин да се створи релативно стерилно окружење на лабораторијском столу је коришћење пламеника - горионика на гас. Горионик на гас се назива још и Бунсенов горионик, јер га је пре скоро 150 година направио немачки хемичар Роберт Вилхелм Бунзен (*Robert Wilhelm Bunsen*). То је инструмент помоћу кога се добија отворен, чист и врућ пламен, чији се интензитет може регулисати и контролисати.

Главна сврха отвореног пламена у асептичкој техници је стварање конуса топлог ваздуха изнад лабораторијског стола (Слика 3). На овај начин се обезбеђује стерилна зона за рад. Осим тога, пламен Бунсеновог горионика може веома брзо да загрева, што га чини идеалним избором за стерилизацију ези, грла стаклених тиквица, епрувета, чепова и сл. Бунсенов горионик се не користи у ламинарној комори јер ће топлота пореметити проток ваздуха.



Слика 3. Зона стерилне површине ( $\varnothing$  око 40 cm) и стерилног простора око пламеника

## 2. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ, ДЕЗИНФЕКЦИЈА И СТЕРИЛИЗАЦИЈА, ИЗОЛАЦИЈА И БРОЈНОСТ МИКРООРГАНИЗАМА, ДОБИЈАЊЕ ЧИСТЕ КУЛТУРЕ, ПРЕСЕЈАВАЊЕ, ГАЈЕЊЕ И ЧУВАЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА

Да би се микроорганизми гајили у лабораторијским условима (*in vitro*) потребно им је створити сличне услове као и у природној средини (*in vivo*) из које се врши њихова изолација. Различите потребе микроорганизма према хранљивим материјама и условима спољне средине се задовољавају припремањем хранљивих подлога и обезбеђивањем одговарајућих абиотичких услова, као што су присуство или одсуство кисеоника, рН реакција подлоге, садржај воде, температура, светлост и др.

### 2.1. ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ

Хранљиве подлоге представљају вештачке средине које могу бити чврсте, получврсте или течне, а користе се за изолацију, гајење и чување микроорганизма.

Најважније особине хранљиве подлоге су **хранљивост, влажност, рН реакција и стерилност.**

Хранљивост се обезбеђује додавањем свих хранљивих елемената у органском или неорганском облику који су потребни за раст одређене групе или врсте микроорганизма. Влажност подлоге регулише се додавањем агара који подлози даје чврстину. рН реакција подлоге се обезбеђује већ и самим саставом подлоге, а уколико је потребно врши се додатно подешавање или корекција помоћу база (најчешће КОН) или киселина (најчешће НСI). Стерилност подразумева одсуство свих облика микроорганизма у подлози, а постиже се стерилизацијом.

Подлоге се могу поделити према **пореклу материјала из којих се припремају, према саставу, намени и чврстини.**

1. Према **пореклу материјала**, подлоге су подељене на природне и вештачке.
  - Природне подлоге се добијају кувањем или додавањем биљног (купус, мрква, парадајз, пасуљ, кромпир) или животињског материјала (млеко, крв, жуч).
  - Вештачке подлоге имају познат хемијски састав и припремају се од неорганских и/или органских једињења одређене количине. Сви одмерени састојци се приликом припреме подлоге растворе и уколико је потребно кувају у дестилованој или водоводној води.
2. Према **саставу**, подлоге се деле на синтетичке и несинтетичке.
  - Синтетичким хранљивим подлогама зна се тачан хемијски састав.
  - Несинтетичким подлогама хемијски састав је само оријентационо познат.
3. Према **намени** се деле на основне, специјалне-селективне и диференцијалне подлоге.
  - Основне подлоге служе за проучавање карактеристика основних систематских и физиолошких група микроорганизма.
  - Специјалне-селективне подлоге се користе за раст и изолацију специфичне групе или једног рода/врсте микроорганизма. Састав подлоге је такав да он

фаворизује раст жељеног микроорганизма, а раст других микроорганизма је инхибиран.

- Диференцијалне подлоге се користе за визуелно разликовање колонија микроорганизма (нпр. различита боја колонија на истој подлози указује на различите врсте микроорганизма).

Постоји и група тзв. избирљивих микроорганизма (*fastidious microorganism*) који имају веома комплексне или врло специфичне захтеве да би расли на хранљивој подлози. Углавном се ради о некој врло специфичној хранљивој материји или више нутријената, који морају да се додају у подлогу. Често је потребно обезбедити и анаеробну или микроаерофилну атмосферу (повећан % CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>). У подлоге се додају и антибиотици да би се онемогућио раст непожељних микроорганизма. Најзначајнији представници ове групе микроорганизма припадају родовима *Neisseria*, *Campylobacter*, *Lactobacillus*, *Helicobacter*.

4. Према **чврстини**, подлоге се деле на:

- чврсте (садрже 1,5-2% агара),
- полутечне (садрже до 1% агара),
- течне (без агара).

Додавањем различитих количина агара добије се подлога различите чврстине, а уколико се агар уопште не додаје добије се течна подлога. Агар је полисахарид (полимер галактозе), који улази у састав ћелијског зида црвених алги (*Rhodophyta*), род *Gelidium*, *Gracilaria*, *Eucheama* и др. Прашката је супстанца, беле или бледо жућкасте боје, не мења хранљиву вредност подлоге. Агар очвршњава на око 38-40°C, а топи се на 80-90°C.

Најчешће коришћене подлоге у микробиологији, као и њихова намена, приказане су у табели број 3.

Табела 3. Најчешће коришћене хранљиве подлоге

Хранљива подлога	Тип подлоге	Микроорганизми који се изолују
Хранљиви агар	Основна	Бактерије
Триптон соја агар	Основна	Бактерије
Кромпир декстрозни агар	Основна	Гљиве
Квашчев манитол агар	Основна	Квасци и гљиве
BG11 агар	Основна	Цијанобактерије и алге
Манитол слани агар	Селективна	<i>Staphylococci</i> ; <i>Micrococci</i>
Еозин метилен плава агар	Селективна	G- цревне бактерије
Симонсов цитратни агар	Селективна	Бактерије које могу да користе цитрате као извор угљеника
Ендо агар	Диференцијална	Бактерије које користе/не користе лактозу
Крвни агар	Диференцијална	Хемолитичне бактерије
MacConkey агар	Диференцијална	G- цревне бактерије
Чоколадни агар	Обогаћена	Избирљиви м.о.; <i>Neisseria</i> , <i>Haemophilus</i>

## 2.2. ДЕЗИНФЕКЦИЈА И СТЕРИЛИЗАЦИЈА

Примена основних принципа дезинфекције и стерилизације је веома важна за рад и безбедност у микробиолошкој лабораторији. Рад у микробиолошкој лабораторији се не може одвијати уколико се целокупан стаклени прибор, хранљиве

подлоге и инструменти који долазе у контакт са материјалом или микроорганизмима које испитујемо, предходно не стерилишу. Постоје протоколи, процедуре, опрема и средства која се примењују са циљем уништавања, односно уклањања свих познатих класа микробних агенаса.

**ДЕЗИНФЕКЦИЈА** се односи на све процесе који резултирају убијањем микроорганизма, али не и спора, док је **СТЕРИЛИЗАЦИЈА** поступак уништавања свих облика микроорганизма.

Осим ова два појма, у употреби је и појам деконтаминација, који такође означава сваки процес за уклањање и/или убијање микроорганизма. Овај израз се користи и за одстрањивање или неутралисање опасних хемикалија и радиоактивних материјала.

Дезинфекција и стерилизација могу се вршити применом различитих метода. Избор методе зависи од врсте материјала који се дезинфикује односно стерилише. Методе стерилизације можемо разврстати у четири групе: физичка, зрачна, хемијска и механичка стерилизација.

### **1. Физичка стерилизација**

Физичка стерилизација подразумева коришћење топлоте, односно високе температуре. Овде спадају следећи облици стерилизације:

- Стерилизација на пламену (фламбирање или инсинерација) - На овај начин се стерилишу езе, пинцете, скалпели, тако што се пре и после употребе држе на пламену до усијања како би се уништили сви микроорганизми.

- Стерилизација применом високе температуре у сувом стерилизатору - На овај начин се стерилише посуђе од стакла и порцелана на температури од 180°C у сувим стерилизаторима у трајању од 2 сата. Апарат се не сме користити за стерилизацију гуменог, памучног материјала и хранљивих подлога.

- Стерилизација високом температуром и воденом паром под притиском - Овај вид стерилизације врши се у специјално конструисаном апарату, аутоклаву. Ово је најефикаснији начин стерилисања. Вода, термостабилни раствори и већина хранљивих подлога се стерилише на температурама од 120 до 130°C, под притиском од 1,0 до 1,5 атмосфере (101,325 – 151,988 кРа) у трајању 15 до 20 минута. На овај начин се добије потпуно стерилан материјал.

- Стерилизација са високом температуром и воденом паром без притиска - Овај вид стерилизације се врши у воденом купатилу или у Коховом лонцу. На овај начин се стерилишу подлоге, раствори шећера, желатина, млеко, крв и сл., који могу поднети температуре водене паре до 100°C, али не и више.

- Стерилизација грејањем испод тачке кључања - Ова метода служи за стерилизацију подлога и раствора осетљивих на високе температуре. Овим путем се уништавају само вегетативни облици микроорганизма. Метода се назива још и **пастеризација**.

**ПАСТЕРИЗАЦИЈА** се дефинише као процес који се примењује с циљем уништавања патогених микроорганизма, а да су при том промене хемијских, физичких и сензорних особина пастеризованог продукта минималне.

Овај процес уништавања микроорганизма је нашао широку примену у свим областима прехранбене индустрије. Пастеризација се врши на температури 63°C до

65°C у трајању 30 минута (ниска пастеризација), 72 до 76°C у трајању 15 - 20 секунди (краткотрајна пастеризација) или 82°C у трајању 1 до 5 секунди (висока пастеризација), након чега се супстрат одмах хлади на температуру до 5°C.

**Тиндализација или испрекидана стерилизација** је процес који траје три дана. Наизменичним грејањем (до 56°C) и инкубацијом материјала у термостату, уништавају се сви вегетативни облици микроорганизама, и оних који су већ били присутни, као и они који су настали у међувремену клијањем спора.

## 2. Механичка стерилизација

Механичка стерилизација подразумева филтрирање раствора који садрже витамине, аминокиселине, антибиотике и сл., и подлога осетљивих на високе температуре, кроз микробиолошке филтере. Овакав вид стерилизације назива се још и хладна стерилизација. Микробиолошки филтери имају поре чији је промер мањи него што је величина микроорганизама, тако да се филтрацијом добије потпуно стерилни раствор, односно подлога. Филтери који се користе су: Сајц-ов филтер (азбест), Чемберлен-ов филтер (порцелан), Беркфелд-ов филтер (дијатомејска земља), мембрански ултра филтри (нитроцелулоза).

## 3. Зрачна стерилизација

Зрачна стерилизација обухвата следеће облике стерилизације:

- Стерилизација УВ-зрацима - За дезинфекцију просторија користе се УВ-лампе које емитују УВ-зраке таласних дужина 10 до 400 nm. Највећи микробицидни ефекат има зрачење таласне дужине 265 nm, што одговара максималној апсорбцији ДНК. UV-зрачење индукује стварање фотопродуката (пиримидински димер-димер тиамина) што доводи до дисторзије молекула ДНК и инхибира репликацију. УВ-зрачење може да изазове оштећење слузокоже, коже и очију, па се зато овај вид стерилизације обавља само ако у просторији нема никог, најчешће ноћу.

- Стерилизација јонизујућим зрацима - Зрачење  $\gamma$  и X зрака (кратких таласних дужина  $< 10$  nm) која поседују велику енергију која проласком кроз материју изазивају промене у атомској структури и доводе до јонизације. Негативно дејство се заснива на оштећењу молекула ДНК које настаје директним цепањем фосфодиестарских веза и деструкцијом генетског материјала или дејство може бити индиректно, реакцијом са слободним радикалима. Најчешће коришћен емитер јонизујућих зрака јесте кобалт.

- Стерилизација ултразвучним таласима - Ултразвук је звук чија је фреквенција изнад горње границе чујности за нормално људско ухо, а која износи 20 kHz. Све примене ултразвука на бази искоришћења енергије у течностима, заснивају се на дејству кавитације (образовање мехурића услед вртложења и загревања). Термичко дејство ултразвука искоришћено је у медицини и ветерини. Оксидирајуће дејство има примену у стерилизацији млека и других прехранбених артикала, јер уништава микроорганлизме.

## 4. Хемијска стерилизација

Хемијска стерилизација користи се за стерилизацију чврстих предмета, посуђа и прибора од пластике и сл. Дејство хемијских једињења на микроорганлизме може бити микробистатично (спречава даље размножавање микроорганизама) и микробицидно (потпуно уништавање микроорганизама).

**МИКРОБИСТАТИЧНО** - спречава даље размножавање  
микроорганизама

**МИКРОБИЦИДНО** - потпуно уништавање микроорганизама

Уништавање микроорганизама различитим хемијским једињењима назива се дезинфекција. Она се постиже тако што примењена средства изазивају *алкилације* -СН, -СООН, -ОН и -NH<sub>2</sub> група протеина и нуклеинских киселина, *оксидације S-S* веза у протеинима ћелијског зида и ензимима, и доводе до *денатурације* протеина и *промене пермеабилности* ћелијског зида микроорганизама.

Сва хемијска средства која се користе за ову намену делимо на **дезинфицијенсе** и **антисептике**. Дезинфицијенси имају микробицидно дејство, док су антисептици средства блажег деловања, обично су микробистатици. Дезинфицијенси и антисептици су углавном иста хемијска једињења, само се примењују у различитим концентрацијама.

Осим ова два појма, у употреби су и следећи појмови као што су:

- антимикробни агенс, убија микроорганизме и потискује њихов раст и размножавање;
- биоцид, општи израз за било који агенс који убија микроорганизме;
- хемијски гермицид, хемикалија или мешавина хемикалија која се обично користи за убијање микроорганизама;
- микробиоцид, хемикалија или мешавина хемикалија која убија микроорганизме. Израз се често користи уместо “биоцида”, “хемијских гермицида”или “антимикробни”;
- спороцид, хемикалија или мешавина хемикалија која се користи за убијање микроорганизама и спора.

Различита хемијска средства се користе за стерилизацију радних површина. Радне површине се стерилишу тако што се пребришу растворима алкохола (најчешће 70% етил алкохол), киселина (2 до 5% HCl или H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), детерџентима и сл. За стерилизацију радних површина користи се и перокси-сирћетна киселина која у зависности од концентрације и дужине деловања, уништава све микроорганизме. Користи се на великом распону температуре и не ствара резистенцију код микроорганизама и није штетна по здравље људи.

Списак најчешће коришћених хемијских агенаса, као и механизми којим делују на микроорганизме, приказан је у табели 4.

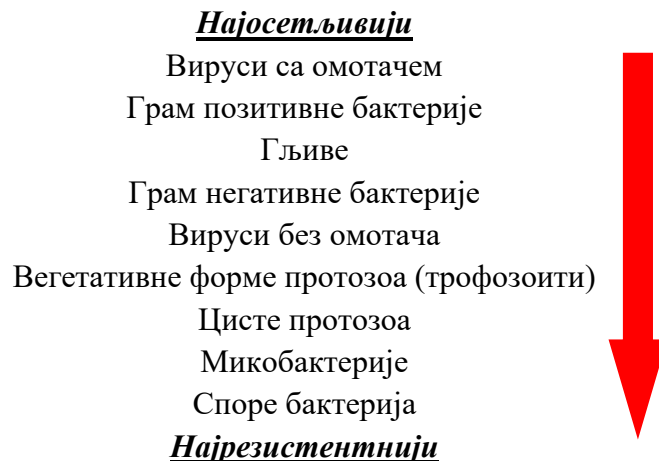
Табела 4. Хемијски агенси

<b>Антимикробна хемијска средства</b>	<b>Начин деловања</b>
Киселине и базе	Денатурација протеина
Сапуни, детерџенти	Смањују површински напон
Халогени (хипохлораста киселина, јод, хлор и њихова једињења)	Оксидација ћелијских компоненти
Тешки метали (соли сребра, живе, бакра)	Денатурација протеина
Феноли (лизол, крезол, хексахлорфен)	Оштећују ћелијску мембрану. Денатурација протеина, инактивација ензима
Алкилирајући агенси (етилен оксид, формалдехид)	Оштећују протеине и нуклеинске киселине
Микробиолошке боје	Метиленско плаво-инхибира раст бактерија; Кристал виолет-инхибира синтезу ћелијског зида
Оксидациона средства (водоник пероксид, К-хиперманган)	Разарање дисулфидних веза



Идеалан дезинфицијенс треба да је високо ефикасан и у разблаженом облику, нетоксичан, безбојан, без мириса, стабилан у било којој концентрацији, биоразградив и јефтин.

Фактори који утичу на ефикасност хемијске стерилизације су природа предмета који се дезинфикује, врста и концентрација дезинфицијенса, време деловања дезинфицијенса, температура, рН, присуство органских материја, врста и број микроорганизама (Слика 4).



Слика 4. Осетљивост микроорганизама на дејство дезинфицијенаса

### 2.3. ИЗОЛАЦИЈА МИКРООРГАНИЗАМА

Због своје мале величине, одсуства боје и присуства других састојака, микроорганизми се у њиховим природним стаништима (земљиште, вода, ваздух, сточна храна, прехранбени производи за људску исхрану, органи за варење и др.) тешко изучавају. Из тог разлога се врши њихова **изолација**.

**ИЗОЛАЦИЈА** је поступак издвајања микроорганизама из природног станишта или узорка на одговарајуће хранљиве подлоге.

Најбоље је да се изолација ради у стерилној комори у коју се унесе испитивани материјал, стерилна подлога, стерилне Петри кутије, пламеник, пипете, езе и фломастер.

Изолација микроорганизама може се вршити директно или индиректно.

Директна изолација микроорганизама из узетих узорка земљишта, сточне хране и прехранбених производа врши се тако што се на разливену хранљиву подлогу помоћу стерилне пинцете стављају честице испитиваног материјала. Након одређеног периода инкубације у термостату, око засејаних честица супстрата се формирају колоније микроорганизама.

Индиректна изолација микроорганизама врши се тако што се супстрат из ког се микроорганизми изолују прво разблажи стерилном водом или физиолошким раствором (0,85% NaCl), а тек потом пренесе на хранљиву подлогу. Након одређеног

периода инкубације у термостату, на подлози ће се појавити колоније микроорганизама.

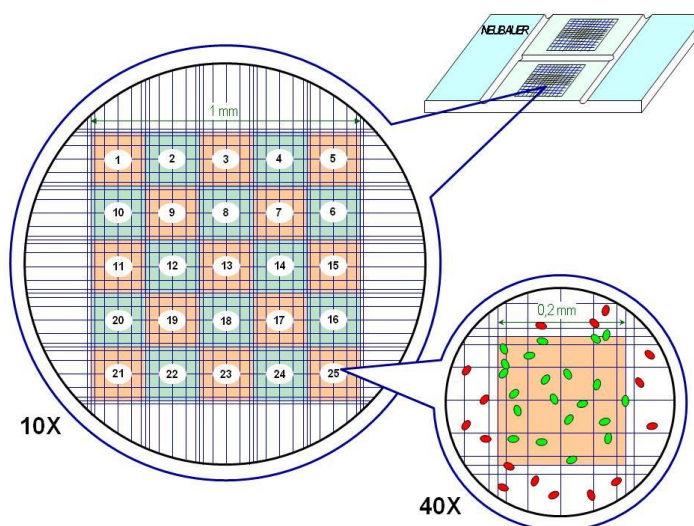
У пракси се чешће користи индиректна изолација микроорганизама, јер је бројност микроорганизама у природним стаништима велика. Међутим, у случајевима када постоји сумња на малу бројност микроорганизама у супстрату из којег их желимо изоловати, тада се користи директна метода.

## 2.4. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА

Приликом микробиолошких испитивања различитих супстрата, често је потребно одредити бројност одређених група микроорганизама. Бројност микроорганизама у неком супстрату може се одредити директним и индиректним методама.

### 1. Директне методе

Директне методе за одређивање бројности микроорганизама у супстрату се заснивају на бројању ћелија микроорганизама под микроскопом. У ту сврху користе се посебне предметне плочице на којима су изгравирани мрежице одређене површине, мембрански филтри, коморе за бројање познате запремине и сл. (Слика 5). Приликом микроскопирања броје се ћелије микроорганизама пратећи квадратиће на угравираној мрежици, односно пратећи коморице у коморама за бројање. Како би се избегло бројање ћелије два пута (ово се односи на ћелије које се налазе на граничној линији), поштује се правило бројања по ком се броје ћелије на левој и горњој граничној линији, док се ћелије на десној и доњој линији занемарују. Број ћелија се сабере и прерачуна на количину нанете суспензије. Недостатак ових метода је немогућност разликовања живих од мртвих ћелија.



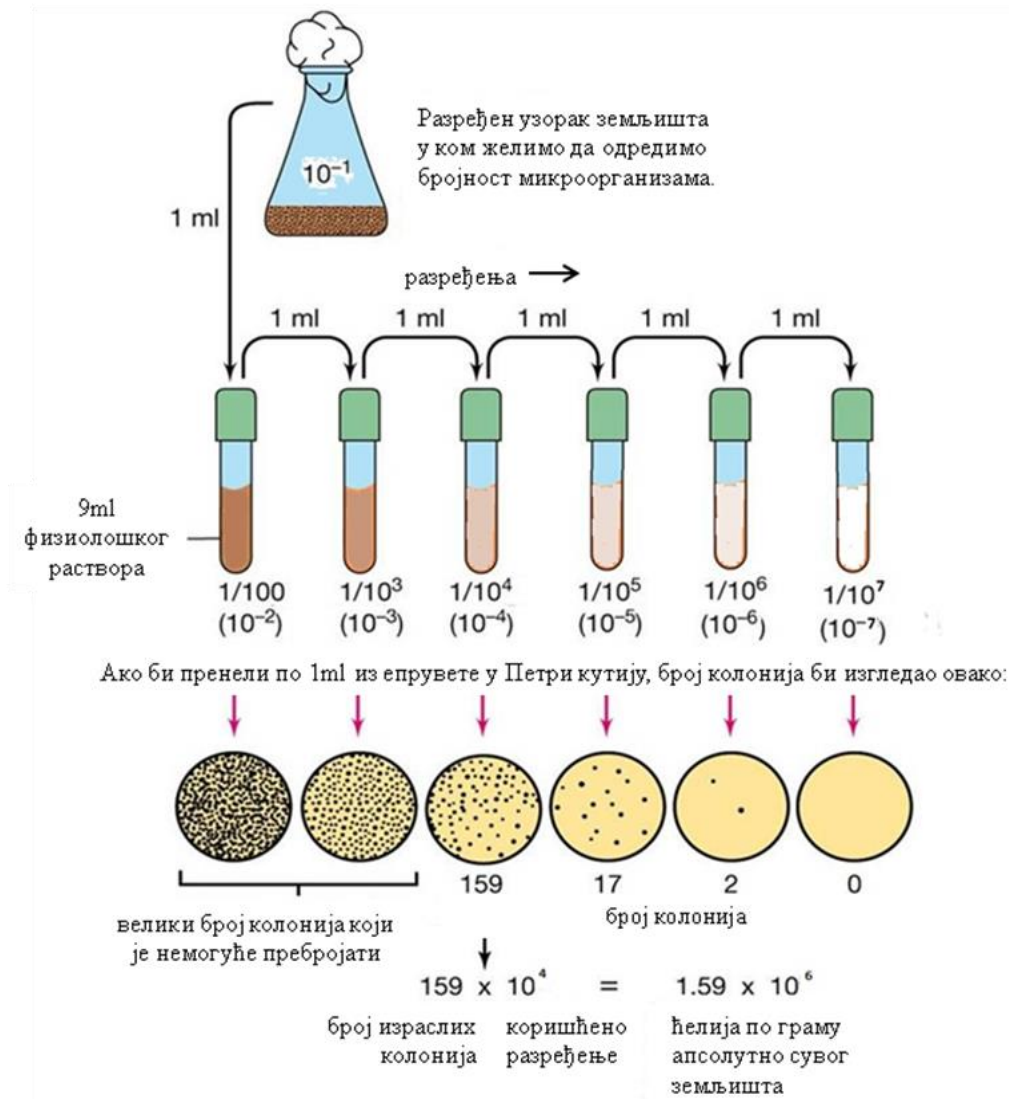
Слика 5. Шематски приказ директне методе бројања ћелија у Нойбауеровој (Neubauer) комори

### 2. Индиректне методе

Индиректним методама за одређивања бројности микроорганизама одређује се број живих ћелија микроорганизама. За потребе реализације ове методе врши се засејавање испитиваног супстрата на одговарајућу хранљиву подлогу и прати се број израслих колонија.

У индиректне методе спадају метода разређења и турбидиметријска метода.

- Метода разређења - Да би се одредио број микроорганизама овом методом, супстрат се пре засејавања мора разредити у одређеној количини стерилне воде или физиолошког раствора. Поступак прављења серије разређења приказан је на слици 6.



Слика 6. Шематски приказ методе разређења

Засејавање се обично врши са 0,5ml или 1ml одговарајућег разређења у празну Петри кутију (подлога се разлива накнадно преко засејане суспензије) или на већ разливену, охлађену хранљиву подлогу. Свако разређење се засејава са посебном пипетом. Уколико се користи једна пипета, засејавање увек почиње од највећег разређења.

Након засејавања, подлоге се преносе у термостат на инкубацију. Исправно урађено засејавање је уколико се у Петри кутијама развије 30 до 300 колонија. Уколико се у Петри кутији развије већи број колонија (преко 300), потребно је поновити поступак засејавања, али овог пута из епрувете са већим разређењем. У случају мањег броја колонија (мање од 30), потребно је поновити засејавање из мањег разређења, како би се добио већи број колонија.

Колоније се броје и број се прерачуна на милилитар испитиваног супстрата по формули:

$$B = a \times b \times c$$

где је:

- Б - број микроорганизама у ml
- а - просечан број колонија које су израсле на подлози
- б - коефицијент корекције за прерачунавање на 1ml
- ц - разређење којим је извршено засејавање

Ако се број прерачунава на један грам апсолутно сувог супстрата (што се често примењује код изучавања бројности микроорганизама у земљишту), онда се добијени резултат подели са апсолутно сувом масом једног грама испитиваног супстрата те формула има облик:

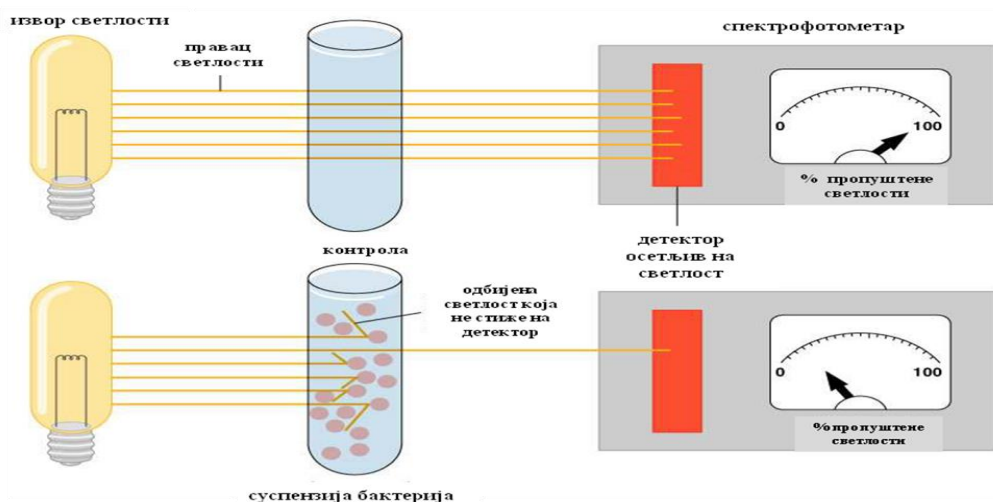
$$B = (a \times b \times c) / d$$

где је:

- Б - број микроорганизама у g апсолутно сувог земљишта
- а - просечан број колонија које су израсле на подлози
- б - коефицијент корекције за прерачунавање на 1ml
- ц - разређење којим је извршено засејавање
- д – сува маса земљишта

- Турбидиметријска метода - Ова метода подразумева употребу спектрофотометра. Метода се заснива на мерењу густине израслих микроорганизама у течној хранљивој подлози (Слика 7).

На спектрофотометру се налази скала која показује количину светлости која је прошла кроз узорак. Пошто се бактерије у течној хранљивој средини понашају као колоидни раствор, оне апсорбују светлост. Већа количина апсорбоване светлости значи да је у испитиваном узорку већи број микроорганизама. Да би се број микроорганизама тачно израчунао, потребно је да се претходно направи стандардна крива на којој су нанете различите вредности апсорбоване светлости којима одговара познат број микроорганизама.



Слика 7. Турбидиметријска метода

## 2.5. ДОБИЈАЊЕ ЧИСТЕ КУЛТУРЕ МИКРООРГАНИЗАМА

У својим природним стаништима, микроорганизми живе у заједницама које су сачињене из великог броја микроорганизма, који припадају различитим таксономским категоријама. Можемо рећи да се у природним стаништима микроорганизми налазе у виду мешовитих заједница. За потребе највећег броја истраживања у микробиологији, потребно је добити **чисту културу** микроорганизма.

**ЧИСТА КУЛТУРА** представља потомство једне ћелије.

Постоји неколико метода помоћу којих се могу добити чисте културе.

### 1. Метода разблажења

Циљ ове методе је да се засејавањем довољно разређене суспензије добију појединачне колоније које представљају чисту културу. Поступак се састоји у томе да се припреми серија епрувета у којима се налази стерилисан физиолошки раствор или вода. По потреби, у епрувете се могу ставити стаклене куглице, које ће помоћи да се касније суспензија боље измеша. Потом се пипетом узима кап матичног раствора (испитивани супстрат који је разређен у одређеној концентрацији) и преноси у прву епрувету, након чега се руком или на вортексу измеша. Након овог корака, кап суспензије из прве епрувете се пренесе у другу епрувету и поступак се наставља све док се не добије одговарајуће разређење. Засејавање суспензије се врши из одређеног разређења у празне Петри кутије, а потом се преко засејане суспензије разлије подлога. Засејавање се може урадити и директно на површину већ разливене охлађене подлоге. Након инкубације, уколико је засејавање извршено из доброг разређења, на чврстој подлози ће израсти појединачне колоније.

### 2. Кохова метода

Кохова метода се заснива на разређивању испитиваног материјала у растопљеној хранљивој подлози. Ова метода је врло слична методи разблажења, с том разликом што се у Коховој методи у епруветама налази растопљена стерилна подлога, а не стерилна вода или физиолошки раствор. Помоћу пипете се узме кап матичног раствора и унесе у прву епрувету. Окретањем епрувете између дланова кап се измеша са подлогом. Затим се езом узме кап материјала из прве епрувете и пренесе у другу. Поступак се понавља до последње епрувете. Након овог поступка, садржај сваке епрувете се излије у посебну Петри кутију и остави у термостат на инкубацију.

### 3. Метода селективних хранљивих подлога

Метода селективних хранљивих подлога се заснива на употреби селективних подлога. Селективне хранљиве подлоге су специфичног састава и прилагођене само за одређену врсту микроорганизма. Ове подлоге су веома погодне за изолацију и доказивање патогених микроорганизма у супстратима као што су сточна храна, млеко, месо и друге намирнице за људску исхрану. Ипак, може се десити да се сапрофитни микроорганизми из земљишта брзо адаптирају на различите хранљиве састојке и у оваквим подлогама, што упућује на опрезност при коришћењу ове методе. Селективност овим подлогама могу дати анилинске боје, антибиотици и др.

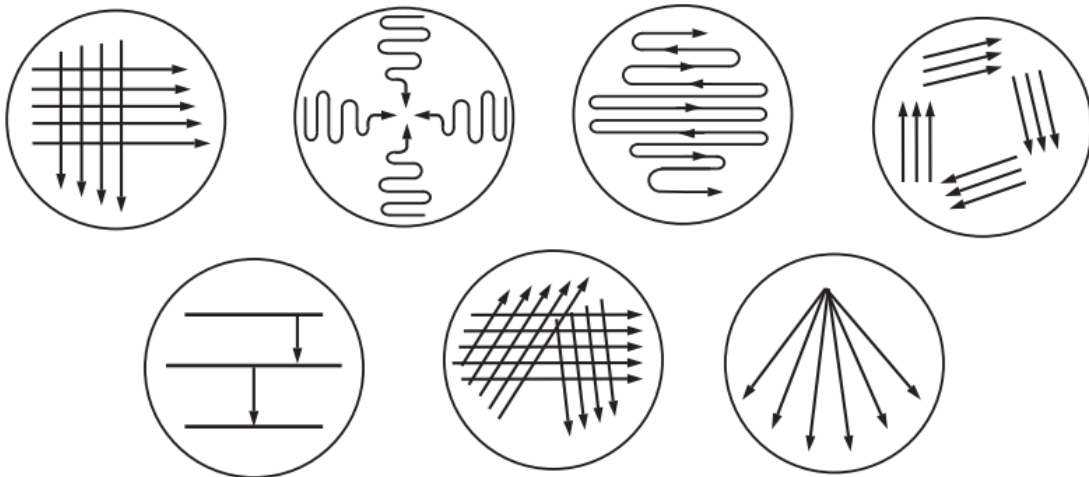
#### 4. Линднерова метода

У оквиру Линднерове методе користи се нативни препарат - висећа кап. На покровно стакалце се одређеним редом нанесе већи број капљица матичне суспензије које се потом постави тако да капљице буду изнад удубљења на предметној плочици. Микроскопом се пронађу капи које садрже само једну ћелију и обележе. Препарат се остави у термостат 24 до 48 сати и након тога се обележене капљице пренесу на одговарајућу хранљиву подлогу. Пошто је микроскопирањем било утврђено да је у капи била само једна ћелија микроорганизама, све колоније које су израсле на подлози пореклом су од те једне ћелије, односно ради се о чистој култури.

#### 5. Метода исцрпљења

Метода исцрпљења се изводи тако што се у неколико Петри кутија разлије одговарајућа хранљива подлога. Стерилном езом или пипетом се узме мало матичне суспензије. Затим се по површини подлоге повлаче паралелне или цик-цак линије прелазећи из једне Петри кутије у другу све док се материјал потпуно не исцрпи. Метода исцрпљења се може завршити и у оквиру само једне Петри кутије. У том случају је неопходно да се у оквиру те Петри кутије мењају потези шарања езом (Слика 8). Између две серије потеза шарања може се урадити стерилизација езе.

Засејане Петри кутије се потом стављају у термостат на инкубацију. У случају када се за методу исцрпљења користи неколико Петри кутија, раст засејаних микроорганизама у првим кутијама ће бити густ, док ће се у последњим кутијама добити појединачне колоније. Уколико је метода исцрпљења извршена само у оквиру једне Петри кутије употребом различитих потеза шарања, раст микроорганизама биће најгушћи на месту првог потеза, док ће се појединачне колоније најчешће јавити на самом крају последњег потеза.



Слика 8. Метода исцрпљења: различити начини засејавања

#### 6. Добијање чисте културе помоћу микроманипулатора

Микроманипулатор је уређај који се поставља на микроскоп. У себи има уграђене микропипете и микроигле помоћу којих се, посматрањем кроз микроскоп, из препарата могу издвојити појединачне ћелије микроорганизама. Издвојене ћелије се потом пренесу на одговарајућу хранљиву подлогу и ставља у термостат. Након одређеног периода инкубације, из ћелија ће израсти појединачне колоније.

Микроманипулатор се користи за добијање чистих култура крупнијих микроорганизама, као што су то нпр. алге, гљиве, протозое.

### **7. Добијање чистих култура спорогених бактерија**

Како су спорогене бактерије отпорне на повишену температуру, издвајање спорогених бактерија из матичног раствора може се вршити загревањем суспензије. У епрувету са стерилном водом, пипетом се унесе одређена количина суспензије матичног раствора. Епрувета се затим у воденом купатилу држи 15 минута на 80°C. Због високе температуре, угинуће све аспорогене, а преживеће спорогене и терморезистентне бактерије. Суспензија из епрувете се потом засеје на одговарајућу хранљиву подлогу и стави у термостат на инкубацију. Након одређеног периода инкубације, на подлози би требало да израсту само колоније спорогених бактерија.

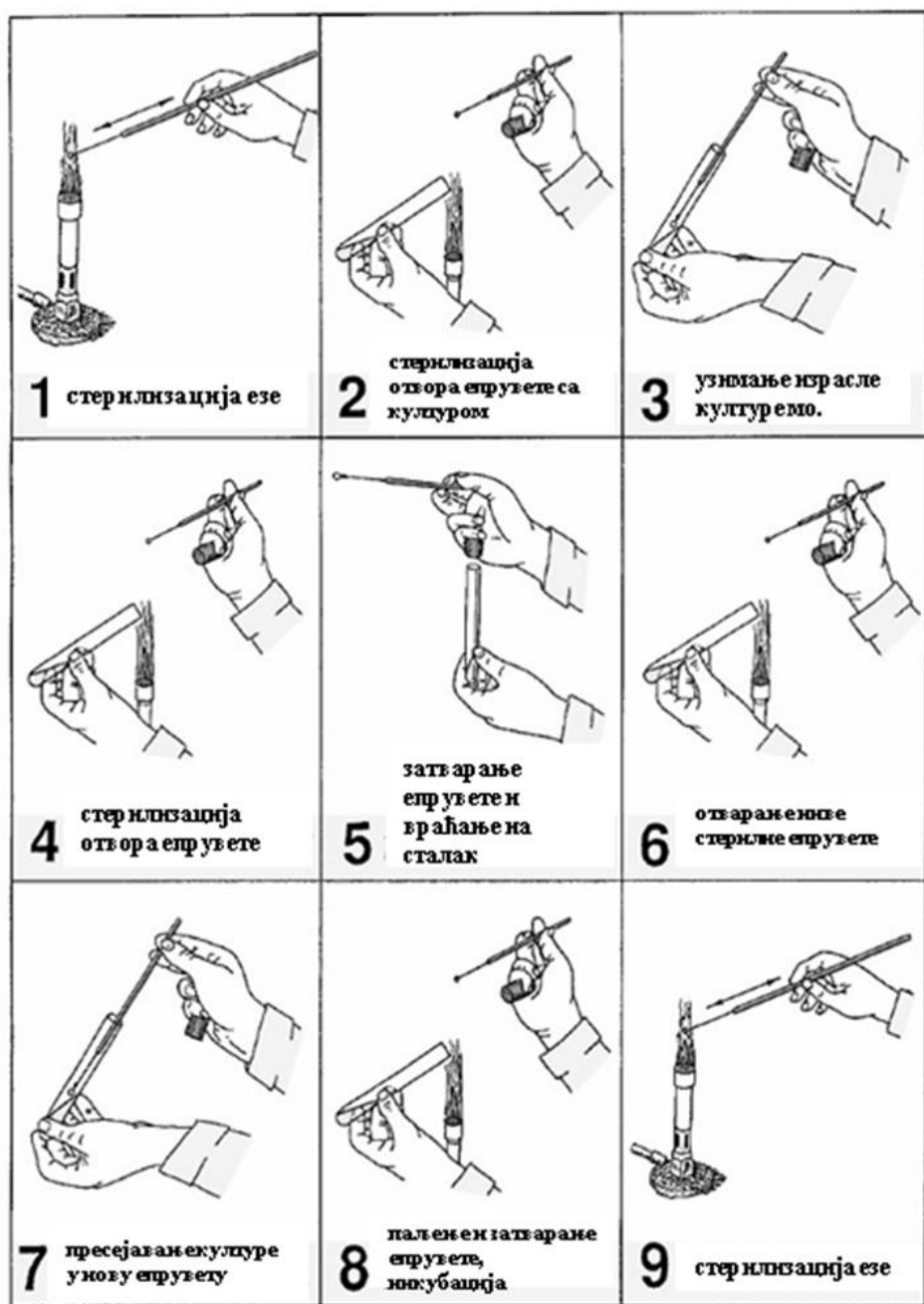
## **2.6. ПРЕСЕЈАВАЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА**

У току микробиолошких истраживања, често је потребно извршити пресејавање микроорганизама.

**ПРЕСЕЈАВАЊЕ** микроорганизама је поступак преношења микроорганизама са једне подлоге на другу ради одржавања вијабилности културе, испитивања раста културе на различитим подлогама, производње биомасе и слично.

Пресејавање се мора вршити у стерилним условима. За то служе стерилне коморе – ламинари, у којима се претходно, помоћу УВ зрака стерилише ваздух, а радни сто у ламинару пребрише неким дезинфекционим средством.

За пресејавање се користи еза која се пре и после преношења чисте културе микроорганизама стерилише на пламенику (Слика 9). Ако се пресејавање врши из течне културе, може се користити и стерилна пипета. Овом приликом за сваку културу микроорганизама мора се користити посебна стерилна пипета.



Слика 9. Пресејавање микроорганизама са чврсте на чврсту подлогу (коси агар)

## 2.7. ГАЈЕЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА

Након изолације и добијања чисте културе микроорганизама, неопходно умножити и узгајати микроорганизме. Микроорганизми се узгајају на одговарајућим хранљивим подлогама, при чему се води рачуна о стерилности подлоге, оптималној рН, температури као и о присуству или одсуству кисеоника. Према захтевима за кисеоником микроорганизми се деле на аеробе, факултативне анаеробе, микроаерофиле и праве анаеробе.



## 1. Гајење аеробних микроорганизама

Аеробни микроорганизми захтевају присуство кисеоника. Могу се гајити у течним или на чврстим хранљивим подлогама.

Гајење аеробних микроорганизама у течним подлогама најчешће се врши у епруветама, ерленмајер боцама и ферменторима.

Засејане епрувете и ерленмајер боце са течним подлогама се стављају у шејкер-инкубаторе, на којима се може регулисати висина температуре, брзина мешања, и дужина трајања инкубације. У случају да лабораторија нема шејкер-инкубатор, као замена могу послужити лабораторијске мешалице које омогућују мешање подлоге са ваздухом.

Ферментори су посебни апарати за узгајање микроорганизама у којима се аутоматски регулише висина температуре, количина кисеоника и киселост подлоге. Све промене се графички региструју, чиме је омогућено изучавање великог броја параметара.

Што се тиче гајења аеробних микроорганизама на чврстим подлогама, то се врши у Петри кутијама или у епруветама. У Петри кутије се сипа растопљена чврста подлога. Након хлађења на површину подлоге се засеје чиста култура микроорганизама, затвори са поклопцем и стави на инкубацију у термостат или ексикатор. Гајење у епруветама врши се на искошеној чврстој подлози. Епрувете се затварају са стерилним ватеним или металним запушачима и стављају на одређену температуру на инкубацију.

## 2. Гајење анаеробних микроорганизама

Анаеробни микроорганизми се гаје у условима потпуног одсуства кисеоника. Најчешће се узгајају у посебним апаратима – анаеростатима. Из анаеростата ваздух се извлачи вакуум-пумпом и на тај начин се обезбеђује средина где се анаеробни микроорганизми могу нормално развијати.

Осим вакуум-пумпом, стварање анаеробних услова у анаеростату или у ексикатору, може се постићи и *хемијским* и *биолошким* методама.

Стварање анаеробних услова хемијским методама заснива се на додавању редукционих материја које редукују кисеоник. Најчешће се користе материје као што су 0,5% натријум формијат, 0,1% натријум сулфит, аскорбинска киселине и др. Ове материје се додају у хранљиву подлогу. Осим у подлогу, редуктивне хемијске супстанце могу се додавати и у анаеростат поред засејаних петри кутија или епрувета. У посебну посуду се може ставити 1ml 20% раствора пирогалола и 1ml засићеног раствора NaOH. Ова средства редукују сав кисеоник када се ставе у затворену посуду запремине 220cm<sup>3</sup>. Веома ефикасно за уклањање кисеоника може се користити и елементарни фосфор, који у додиру са кисеоником гори и на тај начин га потроши.

У новије време користе се хемикалије у посебним паковањима које се стављају у анаеростат. Додавањем воде из ових паковања долази до издвајање водоника и угљен-диоксида. Водоник реагује са кисеоником и ствара воду а угљен-диоксид је ту да додатно стимулише развој анаеробних микроорганизама. Да би се утврдило да ли су постигнути анаеробни услови, као индикатор користи се трака која натопљена са метиленским плавим. У случају одсуства кисеоника трака ће се обезбојити.

Стварање анаеробних услова може се постићи и применом биолошких метода. Ова метода се заснива на истовременом и заједничком гајењу анаероба и аероба. У Петри-кутије се истовремено засеју и анаероби и аероби. Поклопац кутије

се за дно залепи са парафином да се спречи улазак ваздуха. У току инкубације прво се развијају аероби, који потроше кисеоник, а након тога се развијају анаероби.

Поред ексикатора и анаеростата, за гајење анаеробних микроорганизама користе се и епрувете у којима је подлога разливена у дебелом слоју, тзв. дубоки агар. У епрувете са подлогом, микроорганизми се помоћу стерилне игле убодом засеју у дубину подлоге. Подлога се затим залије са стерилним растопљеним парафином. На тај начин се спречава улазак кисеоника.

## **2.8. ЧУВАЊЕ ЧИСТИХ КУЛТУРА МИКРООРГАНИЗАМА**

Постоје различите методе чувања чистих култура микроорганизама. Избор методе зависи од захтева микроорганизама. Одабрана метода мора да обезбеди оптималне услове одрживости културе микроорганизама и генетску стабилност. Микроорганизми се могу чувати у метаболички неактивном или метаболички активном стању.

**1. Методе чувања микроорганизама у метаболички неактивном стању** обухватају две технике: криопрезервацију и сушење.

Криопрезервација је техника при којој се микроорганизми смрзавају и чувају на температури између  $-196^{\circ}\text{C}$  и  $-70^{\circ}\text{C}$  (смрзавање и температура чувања на  $-196^{\circ}\text{C}$ ; смрзавање и температура чувања испод  $-70^{\circ}\text{C}$ ), при чему се у одговарајућу подлогу додаје течни глицерол или диметилсулфооксид (DMSO).

Сушење или лиофилизација (лиофилизација-криодесикација) је техника конзервирања микроорганизама брзим сушењем на ниским температурама ( $-50^{\circ}\text{C}$ ) у вакуум-у. На овај начин остају очуване антигене структуре бактерија, биохемијске особине, сачувана сува материја у неразореној ћелији која се, додавањем воде враћа у активан живот. На овај начин се могу чувати гљиве 10 – 15 година, актиномицете 20 година и бактерије око 10 година.

**2. Методе чувања микроорганизама у метаболички активном стању** подразумева периодично пресејавање микроорганизама на чврсту или течну подлогу, као и одржавање културе микроорганизама на агару заливен минералним уљем. Чување микроорганизама врши се на температурама  $4 - 5^{\circ}\text{C}$  уз повремено пресејавање. Учесталост пресејавања зависи од врсте микроорганизама. Гљиве се пресејавају четири до пет пута годишње, актиномицете два пута годишње, спорогене бактерије једном годишње а млечне бактерије сваког месеца. Бактеријске културе се неколико месеци могу чувати и у стерилном тресету, песку и земљишту. Овај начин чувања примењује се у производњи микробиолошких ђубрива.

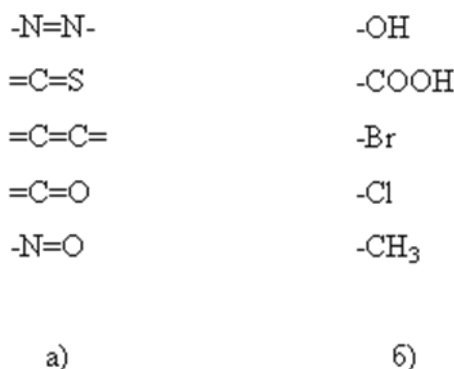
### 3. МИКРОБИОЛОШКЕ БОЈЕ И ПРЕПАРАТИ

Микроорганизми се посматрају помоћу микроскопа на микроскопским препаратима. Могу се посматрати на обојеним или необојеним препаратима, у живом или мртвом стању, што зависи од врсте микроорганизама који се посматра и онога шта желимо проучавати. Већина микроорганизама, а ово се највише односи на бактерије, је полупрозрачна, безбојна и веома малих димензија, и због тога се тешко уочавају светлосним микроскопом. Међутим, уколико се микроскопски препарати обоје адекватном бојом, тада је могуће и светлосним микроскопом проучавати грађу, облик, величину ћелије микроорганизама, као и њене унутрашње и спољашње структуре.

#### 3.1. МИКРОБИОЛОШКЕ БОЈЕ

**МИКРОБИОЛОШКЕ БОЈЕ** су органска једињења која садрже хромофорну и ауксихромну групу везане за ароматично језгро.

Хромофорна група даје обојеност, а ауксихромна група омогућава електролитичку дисоцијацију молекула боје, што даље даје могућност молекулима боје да реагују са молекулима ћелије микроорганизама (Слика 10).

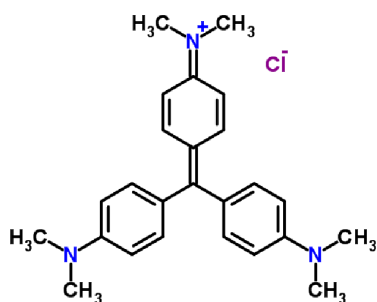


Слика 10. а) Хромофорне групе; б) Ауксихромне групе

Једињења која имају хромофорну и ауксихромну групу називамо и правим бојама. Многа органска једињења имају у својој грађи хромофорну групу, али су без ауксихромне групе и због тога не могу да обоје супстрат. За ова једињења кажемо да су обојена једињења (обојена супстанца).

У растворима, приликом електролитичке дисоцијације, боје се могу понашати као базе или као киселине, па их према томе делимо на базне и киселе боје. У микробиологији највише се користе базне боје, као што су кристал виолет, шафранин, метиленско плаво, малахит зелено, фуксин, а од киселих боја то су розе бенгал, нигрозин, еозин, кисели фуксин и друге.

**Базне боје** имају афинитет према негативно наелектрисаним компонентама ћелије микроорганизама, јер у воденом раствору, хромофорна група (обојени део молекула боје) носи позитивно наелектрисање (Слика 11).



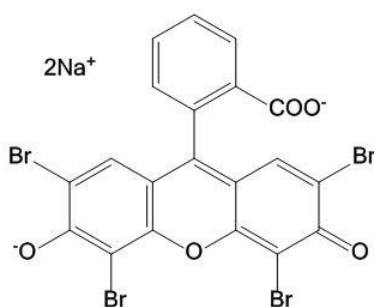
Слика 11. Кристал виолет (Базна боја)

Уколико се ради о нативном (живом) микробиолошком препарату, базна боја ће се везати за негативно наелектрисане компоненте ћелијског зида, и неће обојити унутрашњост ћелије. Код фиксираних микробиолошких препарата, где су ћелије микроорганизама мртве, базна боја ће дифундовати кроз ћелијски зид и везати се и за спољашње и за унутрашње негативно наелектрисане компоненте ћелије. Према томе, код фиксираних препарата цела ћелија је равномерно обојена, док се код нативних препарата боји само ћелијски зид (Слика 12).



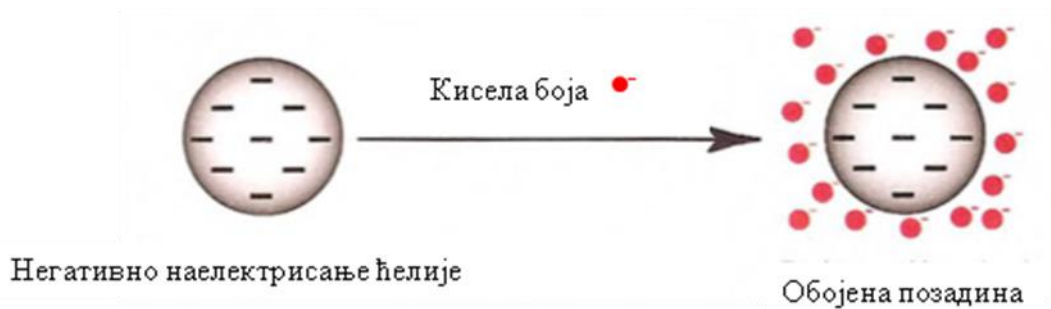
Слика 12. Бојење базном бојом

**Киселе боје** имају афинитет према позитивно наелектрисаним јонима, јер у воденом раствору, хромофорна група носи негативно наелектрисање (Слика 13).



Слика 13. Еозин (Кисела боја)

Како је ћелијски зид негативно наелектрисан, киселе боје се неће везати за негативно наелектрисану површину и неће дифундовати у ћелију, већ ће остати око ње. Из тог разлога, на препарату обојеном киселом бојом, ћелије се виде као необојене, док је позадина обојена. Овакво бојење назива се још и **негативно бојење** (Слика 14).



Слика 14. Бојење киселом бојом

Поред базних и киселих боја, постоје и **неутралне боје**. Неутралне боје се добијају мешањем базних и киселих боја. Од неутралних боја у употреби је најчешће неутрално црвено.

Микробиолошке боје се могу поделити још и према материјалу из кога се припремају, и то на природне и вештачке. **Природне боје** се праве из природних материјала који се добијају екстракцијом из биљака. Најчешће се користи шафранин који се добија екстракцијом из биљке шафрана (*Crocus sativus*) и лакмус који се добија екстракцијом из лишажјева. **Вештачке или анилинске боје** (угљенокатранске) добијају се из каменог угља и смоле.

Осим горе наведених група боја, у микробиолошкој литератури спомињу се и следећи термини за поједине групе боја: **леуко-боје** (једну боју показују када су редуковане а другу када су оксидоване; нпр. метиленско плаво), **дихроматске боје** (танки слој микроскопског препарата обоји једном а дебљи слој другом бојом; нпр. фуксин), **метахроматинске боје** (разне делове препарата или ћелије боје различитим бојама, што зависи од хемијског састава ћелије; нпр. метиленско плаво).

### 3.2. МИКРОБИОЛОШКИ ПРЕПАРАТИ

Посматрање под микроскопом захтева припрему микроскопских препарата за које се користе предметна и покривна стакла. Сва стакла морају бити савршено чиста. Чистоћа се проверава стављањем капи воде на суво стакло. Ако се вода разлије стакло је чисто, у супротном се формирају капљице.

Микробиолошки препарати могу бити **нативни** (необојени) или **фиксирани** (обојени).

#### 3.2.1. Нативни препарати

Нативни препарати су препарати на којима се микроорганизми посматрају у живом стању. Нативни препарати се користе за посматрање покретљивости, облика и боје микроорганизма. У групу нативних препарата спадају **обичан нативни препарат, viseћа кап и отисни препарат**.

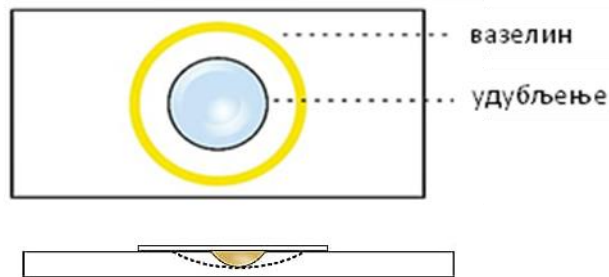
- Обичан нативни препарат - На чисту предметну плочицу стави се кап стерилне водоводне воде и помоћу езе се са чврсте подлоге скине мало израсле културе и унесе у кап. Уколико се микроорганизми гаје у течној подлози, онда се на предметну плочицу не ставља вода већ кап суспензије (Слика 15).



Слика 15. Обичан нативни препарат

Помоћу покровног стакалца (љуспице), кап се пажљиво прекрије водећи рачуна да се у препарату не задржи ваздух, јер он омета посматрање. Изузетак је при микроскопирању протозоа, где је пожељно да се у препарату нађу мехурићи ваздуха јер тако ометају кретање протозоа што олакшава њихово посматрање. Пошто је већина микроорганизама необојена, понекад се у препарат дода разблажен раствор фуксина или метиленског плавог при чему се ћелије обоје и због тога лакше уочавају. Препарат се затим посматра на микроскопу објективима сувог система.

- Висећа кап - За ову врсту препарата потребне су специјалне предметне плочице са удубљењем (Слика 16).



Слика 16. Висећа кап

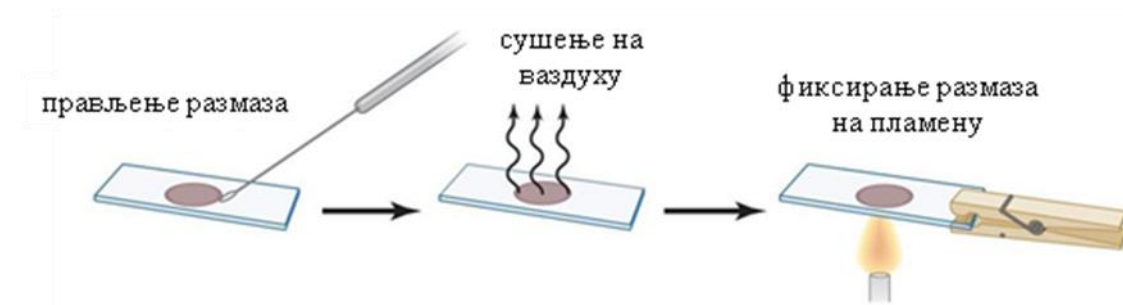
Око удубљења наноси се вазелин у облику квадрата или круга величине покровног стакалца. Кап културе из течне подлоге се стави на покровно стакалце које се затим окрене тако да кап буде са доње стране. Стакалце се намести изнад удубљења на предметној плочици при чему кап виси у удубљењу а стакалце се залепи на вазелин. Тако се добије затворена коморица у којој је спречено сушење препарата, те посматрање може да буде знатно дуже у односу на обичне нативне препарате. Приликом микроскопирања светло не треба да буде сувише јако како би се боље уочили необојени микроорганизми. Уколико се микроорганизми ипак не виде добро, могу се посматрати фазно-контрастним микроскопом, или се култури микроорганизама дода кап разблаженог раствора метиленског плавог, како би се ћелије микроорганизама обојиле и биле уочљивије. Ова врста препарата се најчешће користи за одређивање покретљивости, деобе, спорулације и др.

- Отисни препарат - На израслу колонију испитиваног микроорганизма лагано се притисне покровно стакалце или лепљива прозирна трака (селотејп). Пажљиво се подигне, тако да на њему остану залепљене ћелије микроорганизама као у природном стању. Стакалце се стави на предметну плочицу и посматра као и други нативни препарат.

### 3.2.2. Фиксирани препарати

Фиксирани препарати су препарати на којима се микроорганизми посматрају у фиксираном, мртвом стању. У односу на нативне препарате, фиксирани препарати трају знатно дуже. За потребе прављења трајних препарата, неопходно је на обојен и осушен препарат ставити кап канада балзама и преко тога прилепити покровно стакалце. Након неколико дана, колико је потребно да се канада балзам осуши, препарат је спреман за микроскопирање.

Фиксирање је поступак који се примењује у изради микроскопских препарата, како би размаз што боље прионуо за стакло (Слика 17).



Слика 17. Фиксирање микробиолошког материјала

Материјал течне културе се нанесе на плочицу помоћу езе и кружним покретима се размаже по плочици како би се добио што тањи размаз. Уколико су микроорганизми расли на чврстој подлози, прво се на плочицу стави мала кап воде или физиолошког раствора, а потом се у њу езом нанесе мало микробиолошког материјала који се прво ресуспендује у капљици течности, док се не добије млечно бела суспензија, а потом кружним покретима размаже по плочици. Размаз микробиолошког материјала се прво остави да се осуши на ваздуху. Суви размаз се потом фиксира брзим провлачењем плочице 4 до 5 пута изнад горњег дела пламена, при чему се мора водити рачуна да се плочица не загреје превише.

Осим пламеном, фиксирање се може урадити и преливањем метанола преко сувог размаза, који се одмах одлије. Препарат се потом осуши на ваздуху. Фиксирање метанолом се не практикује јер је метанол токсичан. Након фиксирања, препарат је спреман за бојење. Веома је важно обележити страну предметне плочице (маркером, налепницом) на којој се налази размаз микробиолошког материјала.

### 3.3. МЕТОДЕ БОЈЕЊА

Постоји велики број метода бојења микроорганизама, а одабир зависи од тога који микроорганизам посматрамо и шта желимо да изучавамо.

Методe бојења можемо разврстати у три групе:

- просто бојење
- сложено (диференцијално) бојење
- специјално бојење

#### 3.3.1. Просто бојење

Просто бојење је метода бојења у којој се користи само једна боја. Овај тип бојења ћелије микроорганизама омогућава посматрање облика, величине, начина груписања ћелија и њихове бројности.

На чисту предметну плочицу стави се кап суспензије микроорганизама или кап стерилне водоводне воде у коју се унесе мало културе микроорганизама. Кап се размаже помоћу езе на површини од око  $1\text{cm}^2$ , осуши на ваздуху и фиксира на пламенику или преливањем алкохолом. Фиксирани препарат се затим боји бистрим раствором боје. Дужина бојења зависи од методике, врсте и концентрације боје. Боја се после истека времена одлије, препарат се испере водом, вода се одлије, а заостала вода се упије филтер папиром (Слика 18). Посматрање препарата врши се имерзионим објективом уз максимално осветљење. Пример за просто бојење је бојење метиленским плавим по Лефлеру (*Löffler*).



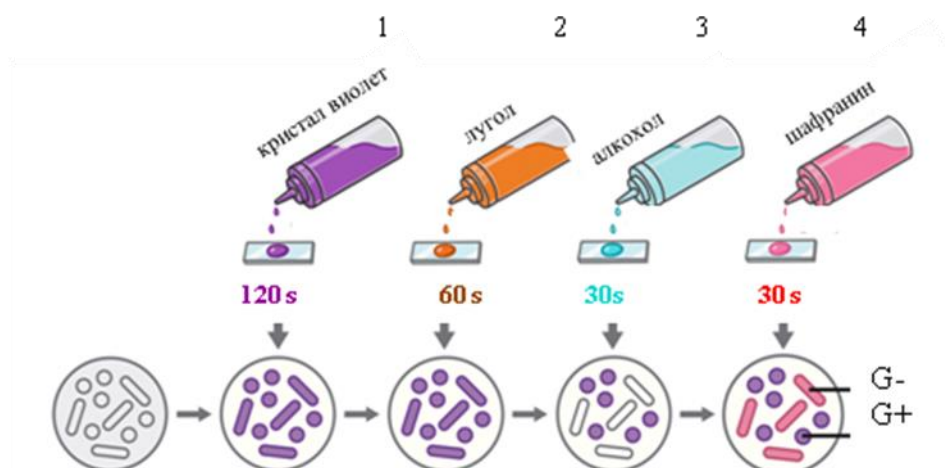
Слика 18. Просто бојење: 1. наношење боје 2. испирање 3. сушење

### 3.3.2. Сложено бојење

Сложено бојење је метода бојења у којој се користи више микробиолошких боја и реагенса. Уколико овакав поступак бојења различито обоји одређене типове бактерија и омогући диференцирање и идентификацију бактерија, тада се сложено бојење назива диференцијално бојење. У сложена, диференцијална бојења спадају **бојење по Граму** и **бојење по Цил-Нилсену** (*Ziehl-Neelsen*).

- Бојење по Граму се користи ради разликовања бактерија по грађи и хемијском саставу ћелијског зида, што је један од критеријума у систематици бактерија. Ову методу бојења развио је дански бактериолог Ханс Кристијан Грам (*Hans Christian Gram*).

Поступак бојења по Граму је следећи (Слика 19):



Слика 19. Сложено бојење (бојење по Граму):

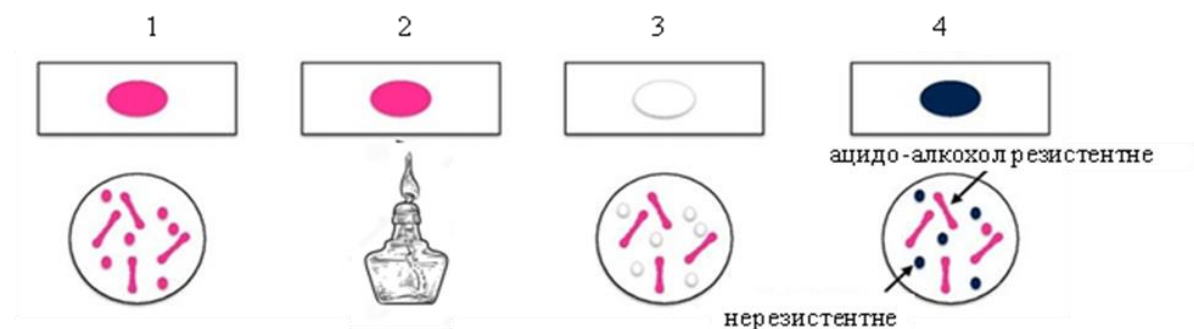
1. наношење кристал виолета
2. наношење лугола
3. наношење алкохола
4. наношење шафранина



Након фиксирања бактериолошког материјала, на размаз се наноси прва боја, раствор кристал виолета (познат још и као геницијан виолет) у трајању од 2 минута. Кристал виолет се везује за муреин (пептидогликан) из ћелијског зида бактеријске ћелије. Ћелијски зид се обоји љубичасто. Боја се затим испере са водом а на размаз се нанесе раствор лугола у трајању од 1 минута. Лугол је разблажени раствор јода и калијум јодида. Улога лугола је да учврсти везу између боје и ћелијског зида. Овај реагенс реагује са кристал виолет бојом и гради већи кристал који се тешко испира из ћелијског зида. До ове тачке све ћелије ће бити исто обојене. Лугол се потом испере са водом, а на размаз се стави кап 96% алкохола у трајању од 30 секунди. Улога алкохола је обезбојавање ћелијског зида Грам- негативних бактерија. У овом кораку разлике у грађи ћелијског зида ће постати видљиве. Алкохол ће обезбојити само оне бактерије које у свом ћелијском зиду имају танак слој муреина и липополисахаридну мембрану. Дакле, Грам-позитивне бактерије се не обезбојавају алкохолом и остају обојене првом бојом (љубичастом), док се негативне обезбојавају. Ово обезбојавање омогућава примање друге, контрастне, црвене боје (фуксин или шафранин). Алкохол се испере водом а на размаз се потом стави кап друге боје, базног фуксина или шафранина, који се остави 30 секунди. Улога друге боје је да сада обоји оне бактеријске ћелије које су деловањем алкохола биле обезбојене. Ћелије које су алкохолом биле обезбојене, сада су обојене црвеном бојом. Након тога препарат се испере са водом, осуши са филтер папиром и посматра преко капљице имерзионог уља са имерзионим објективом (100x). Бактерије које имају дебљи слој муреина у ћелијском зиду обоје се љубичасто и означене су као Грам-позитивне, а оне са мањим уделом муреина обоје се црвено и означене су као Грам-негативне.

Бојење по Граму даје најтачније резултате код култура које нису старије од 24 сати. Са старошћу ћелија Грам-позитивне бактерије губи способност задржавања љубичасте боје у свом ћелијском зиду, па према томе препарат неће показати тачан резултат.

- Бојење по Цил-Нилсену је техника бојења која се користи за идентификацију ацидо-алкохол резистентних бактерија. Ове бактерије имају у свом ћелијском зиду висок проценат липида (до 60%) што их чини веома отпорним према бојама. Зато се приликом бојења ових бактерија користи загревање како би боја дифундовала у ћелију. Када се ћелија ових бактерија једном обоји не може се лако обезбојити, управо због непропустљивог ћелијског зида. У бојењу по Цил-Нилсену примарна боја је концентровани карбол фуксин (црвена), која се загрева на препарату (Слика 20).



Слика 20. Бојење по Цил-Нилсену

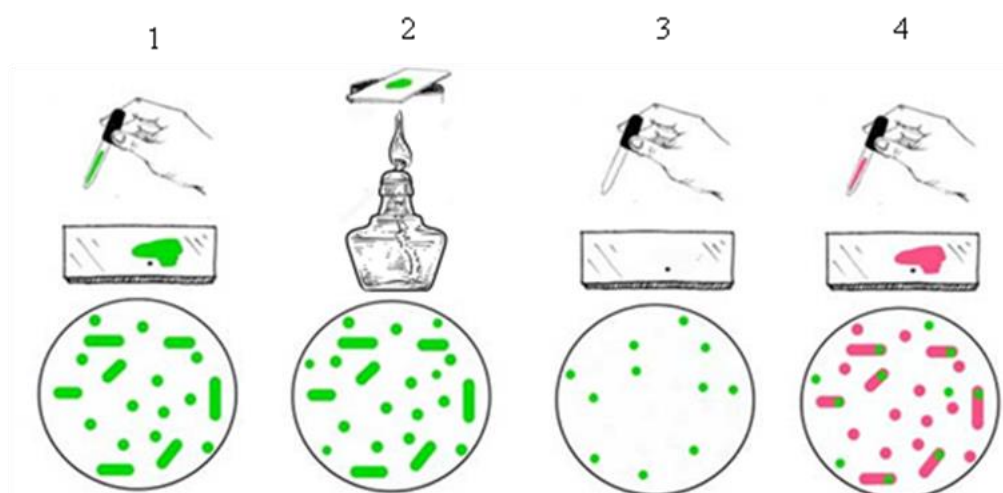
1. наносење карбол фуксина
2. загревање
3. наносење киселог алкохола
4. наносење метиленског плавог

Након хлађења и испирања водом, на размаз се ставља раствор киселог алкохола (3ml HCl и 97ml 96% етанола) у трајању од 2 до 5 минута. Кисели алкохол веома ефикасно обезбојава све бактерије осим ацидо-алкохол резистентних, које остају црвено обојене. Потом се препарат боји неком контрастном бојом, најчешће метиленским плавим, да би се обојиле бактерије које су киселим алкохолом биле обезбојене. Према томе, ацидо-алкохол резистентне бактерије на препарату имају црвену боју, док све остале имају плаву боју. У ацидо-алкохол резистентне бактерије спадају родови *Mycobacterium* и *Nocardia*.

### 3.3.3. Специјална бојења

Специјална бојења могу бити проста или сложена, а омогућавају проучавање специјалних ћелијских структура. Специјално бојење омогућава посматрање појединих делова ћелије као што су капсула, флагеле, метахроматска зрна, јдро, споре и др. У специјална бојења спадају **бојење по Шефер-Фултону** (*Schaeffer-Fulton*) (бојење спора), **бојење по Олту** (*Olt*) (бојење капсула) и друга.

- Бојење по Шефер-Фултону је пример за сложено бојење ендоспора. Ендоспоре се формирају у бактеријским ћелијама током неповољних услова у спољашњој средини. Обавијене су са неколико дебелих спориних омотача па због тога тешко примају боју приликом бојења. Зато се за бојење спора користе концентровани раствори уз загревање. Поступак бојења ендоспора по Шефер-Фултону је следећи: За бојење спора, потребно је користити културу спорогених бактерија старијих од 48 сати. Након фиксирања бактериолошког материјала на размаз се наноси прва боја, 5% раствор малахит зеленог, оставити да делује 2 минуте, а потом пажљиво загревати на пламенику 1 минут. Приликом загревања, боја несме да испари, па ако је потребно, током загревања додавати боју. Прва боја се затим испере и дода се друга боја, 0,5% раствор шафранина у трајању од 30 до 60 секунди. Након истека времена, испрати водом другу боју и оставити препарат да се суши на ваздуху (Слика 21). На овако припремљеном препарату, споре се виде као зелено обојене стуктуре, док је сама ћелија обојена црвено.



Слика 21. Бојење ендоспора по Шефер-Фултону  
 1. наношење малахит-зеленог 2. загревање 3. испирање водом 4. наношење шафранина

- Бојење по Олту је пример простог бојења капсуле бактеријске ћелије. Већина бактеријских капсула је полисахаридне природе, ређе протеинске. Због својих хемијских карактеристика, капсуле се тешко боје и на препаратима се уочавају као необојене зоне око ћелије. Како капсуле садрже висок проценат воде, фиксирање препарата се врши на ваздуху, да не би дошло до њиховог оштећења. Приликом бојења капсуле методом по Олту, неопходно је применити загревање препарата са бојом, како би боја дифундовала у ћелију. Загревање се врши до појаве прве паре, када се прекида даље загревање и оставља се да боја делује још 2 до 3 минута. Боја која се користи је шафранин. На препаратима обојеним овом методом, ћелије су обојене црвено, а капсула се уочава као необојена зона око ћелије. Технике које се још примењују за бојење капсула су углавном комбинација негативног бојења и простог бојења, чиме се повећава контраст између обојене ћелије и околине, па се необојене капсуле лакше уочавају (нпр. туш препарат по Бурију (*Burry*)).

## 4. МИКРОСКОП И ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА

Реч **микроскоп** је грчког порекла и настала је спајањем две речи, **mikron** - што знаћи мали и **scopos** - што значи циљање.

**Микроскоп** је уређај који омогућава увеличавање ситних, очима невидљивих предмета. Микроскопи су у могућности да увеличају микроорганизме, предмете и друге ствари од неколико стотина пута, па до више хиљада пута. Претеча микроскопа је лупа која је поседовала само једно сочиво. Сталним усавршавањем лупе и додавањем више сочива развијен је микроскоп.

Рани пионири микроскопије отворили су прозор у невидљиви свет микроорганизама. Међутим, микроскопија је наставила да напредује током више векова који су следили. Џозеф Листер (*Joseph Lister*) је 1830. године створио у суштини модеран светлосни микроскоп. Двадесети век развио је микроскопе који су користили невидљиву светлост, попут флуоресцентне микроскопије, која користи извор ултраљубичасте светлости, и електронске микроскопе, који користи електронске зраке кратких таласних дужина. Ова достигнућа довела су до великих побољшања увећања, резолуције и контраста. Поређења ради, релативно рудиментарни микроскопи Антони ван Левенхука (*Antonie Van Leeuwenhoek*, изумео је први микроскоп) и његових савременика били су далеко мање моћни од чак и најосновнијих микроскопа који се данас користе.

Микроскопи, као оптички инструменти за посматрање микроорганизама могу се поделити на различите начине. Према зрацима који се користе за посматрање објеката деле се на две основне врсте микроскопа, **светлосни** – користе светлосне зраке за посматрање објеката и **електронски** – користе сноп електрона (зраке мале таласне дужине) за посматрање.

На основу намене за коју се користе разликујемо **биолошке микроскопе** и **бинокуларне стереоскопске микроскопе**. Биолошки микроскопи су инструменти са увећањем у распону од 50 до 1500 пута (од 50× до 1500×), који се користе за посматрање препарата припремљених на предметним плочицама. Бинокуларни стереоскопски микроскопи имају бинокуларни систем који омогућава 3D посматрање узорака, попут инсеката или минерала, у њиховом природном стању, без потребе за претходном припремом. Увећање се креће од 10× до 50×.

На основу положаја препарата, објекта који се посматра, микроскопи се деле на **усправне** и **инвертне**. Код усправних микроскопа препарате посматрамо одозго. Ова врста микроскопа користи се за посматрање узорака на предметним плочицама. Инвертни микроскопи користе се за посматрање објекта одоздо. Ови микроскопи се користе за посматрање, на пример, израслих ћелија у хранљивој подлози у Петри кутији.

### 4.1. СВЕТЛОСНИ МИКРОСКОПИ

Многе врсте микроскопа спадају у категорију светлосних микроскопа који користе светлост за визуелизацију слике. Примери светлосних микроскопа и њихове основне карактеристике приказане су у табели 5. Ове различите врсте светлосних микроскопа могу се користити за допуњавање у истраживању и посматрању микроорганизама.

Табела 5: Подела светлосних микроскопа и њихове основне карактеристике

Тип	Опис
<b>Бинокларни стереоскопски микроскоп</b>	Микроскоп који омогућава лако посматрање 3D објеката при малом увећању.
<b>Светлосни микроскоп</b>	Типичан микроскоп који користи пропуштену светлост за посматрање објеката при великом увећању.
<b>Поларизујући микроскоп</b>	Микроскоп који користи различите карактеристике пропуштања светлости кроз материјале, попут кристалних структура - призми, за стварање слике.
<b>Фазно – контрасни микроскоп</b>	Микроскоп који визуализује ситне површинске неправилности помоћу светлосних сметњи. Обично се користи за посматрање живих ћелија без бојења.
<b>Контрастни микроскоп са диференцијалном интерференцијом</b>	Овај микроскоп, сличан фазном контрасту, користи се за посматрање ситних површинских неправилности, али у већој резолуцији.
<b>Флуоресцентни микроскоп</b>	Биолошки микроскоп који посматра флуоресценцију коју емитују узорци коришћењем посебних извора светлости као што су живине лампе. У комбинацији са додатном опремом, светлосни микроскопи такође могу да изврше флуоресцентно снимање.
<b>Унутар –рефлексионни флуоресцентни микроскоп</b>	Флуоресцентни микроскоп који користи пролазни талас да осветли само површине близу узорка. Регија која се посматра је углавном врло танка у поређењу са конвенционалним микроскопима.
<b>Ласерски микроскоп – Ласерски скенирајући конфокални микроскоп Мултифотонски импулсни микроскоп</b>	Овај микроскоп користи ласерске зраке за јасно посматрање дебелих узорака са различитим жижним даљинама. Коришћење ласера са више импулса смањује оштећења ћелија и омогућава посматрање дубоких подручја високе резолуције. Ова врста микроскопа користи се за посматрање нервних ћелија и проток крви у мозгу.
<b>Структурно осветљени микроскоп</b>	Микроскоп високе резолуције са напредном технологијом за превазилажење ограничене резолуције која је узрокована дифракцијом светлости.

#### 4.1.1. Микроскоп са светлим пољем (обичан светлосни микроскоп)

Микроскоп са светлим пољем, можда најчешће коришћени тип микроскопа, је сложени микроскоп са два или више сочива која производе тамну слику на светлој позадини. Неки микроскопи са светлим пољем су монокуларни (са једним окуларом), иако је већина новијих микроскопа са светлим пољем бинокуларна (са два окуларна) (слика 22). У оба случаја, сваки окулар садржи сочиво које се зове окуларно сочиво. Окуларна сочива обично увећавају слику  $10\times$  (десет пута). На другом крају цеви (тубуса) налази се сет објективних сочива на ротирајућем наставку. Увећање ових објектива обично се креће од  $4\times$  до  $100\times$ , при чему је увећање за свако сочиво назначено на металном кућишту сочива. Окуларна и објективна сочива раде заједно да би створили увећану слику.

**УКУПНО УВЕЋАЊЕ** микроскопа једнако је производу окуларног увећања и увећања објектива.  
**окуларно увећање  $\times$  увећање објектива = укупно увећање микроскопа**

На пример, ако је изабрано окуларно сочиво од  $10\times$ , а сочиво објектива од  $40\times$ , укупно увећање би било  $10 \times 40 = 400\times$ .

Светлосни микроскоп се најчешће користи у микробиолошким лабораторијама. Он даје тамну слику на светлој позадини и омогућава одређивање облика, величине, боје, покретљивости, присуство капсуле и облика за конзервацију код већине микроорганизама. Код крупнијих микроорганизама, као што су гљиве, алге и протозое, може се изучавати и грађа ћелије.

Обичан светлосни микроскоп се састоји из механичких и оптичких делова (слика 22).

**У механичке делове** спадају постоље, ручица, сточић са механизмом за померање препарата, тубус, ротор (револвер), завртањ кондензора, микрометарски завртањ и макрометарски завртањ.

- **Постоље** омогућава стабилан положај микроскопа. У постоље је уграђен систем за осветљење.

- **Ручица** или статив служи за преношење микроскопа. На доњем крају је повезана са постољем, а за горњи крај ручице је причвршћен тубус.

- **Сточић** служи за постављање микроскопских препарата. Може се померати горе-доле, лево-десно и напред-назад.

- **Тубус** је цев на чијим крајевима се налазе оптички делови. На горњем делу налазе се окулари, а на доњем **ротор** са објективима.

- **Завртањ кондензора** служи за подизање и спуштање кондензора са чиме се регулише осветљеност препарата.

- **Макрометарски и микрометарски завртњи** служе за подизање и спуштање сточића са чиме се препарат приближава или удаљава од објектива. Помоћу макрометарског завртња се проналази слика, а помоћу микрометарског се врши изоштравање слике.

**У оптичке делове** микроскопа спадају окулари, објективи, кондензор и систем за осветљење.

- **Окулар** је смештен у горњем делу тубуса. Обично је изграђен из два сочива – горњег окуларног и доњег – сабирног. Способност увеличања назначена је на самом окулару арапским бројевима.

- **Објективи** су смештени у тачно одређеним и прорачунатим лежиштима на ротору. Правилно намештање објектива постиже се окретањем ротора до момента

кад објектив дође у положај који омогућава продирање светлости са извора кроз кондензор, објектив и тубус до окулара. Кад објектив дође у правилан положај чује се лагани пуцањ па се ротор зато зове и револвер. Објективи се састоје из система слепљених сочива која омогућавају увеличавање посматраног објекта. Способност увеличања означена је на сваком објективу. На објективу је назначена и нумеричка апертура, која показује колика је раздвојна моћ објектива.

**Раздвојна моћ микроскопа (резолуција) је најмање растојање између две тачке на којем се оне виде раздвојено.**



Слика 22. Светлосни микроскоп

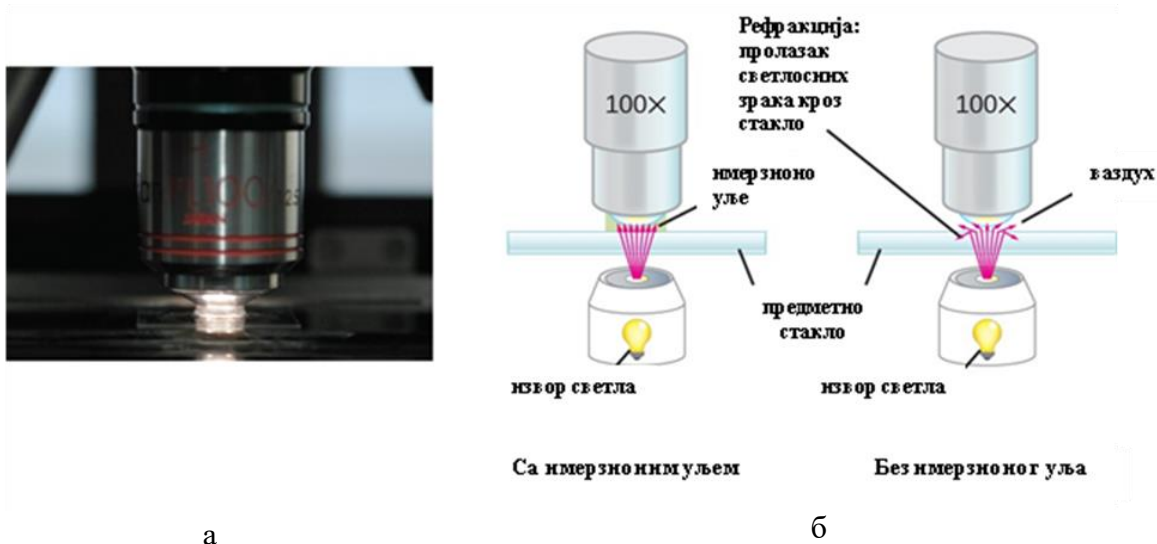
- **Кондензор** сакупља светлост са извора и шаље га на препарат. Помоћу кондензора се може регулисати интензитет светлости његовим подизањем и спуштањем, као и отварањем и затварањем дијафрагме која је уграђена у кондензор.

- **Прибор за осветљење** састоји се из сијалице и огледала и уграђени су у постоље микроскопа. Огледало је фиксирано у положај који омогућава најбољу рефлексију светлости а сијалица се по потреби може заменити.

У односу на начин кориштења постоје објективи сувог система и имерзиони објективи.

- **Објективи сувог система** имају веће фронтално сочиво и мању способност увеличања. Између сочива и препарата налази се ваздух а проласком кроз ваздух светлост која долази из система за осветљење се делимично губи и самим тим слика није толико јасна. Ови објективи се користе за посматрање крупнијих микроорганизама.

- **Имерزيونи објективи** имају мало фронтално сочиво, а приликом посматрања објектив се налази на веома малој раздаљини од препарата. Да би се смањио губитак светлости, на препарат се ставља течност која има индекс преламања светлости приближно стаклу (1,52). Течности које се користе у ову сврху су вода (1,33), кедрово уље (1,51), сандалово уље (1,50), балзам (1,53) (Слика 23). Имерزيونи објективи се користе за посматрање бактерија и других ситнијих микроорганизама.



Слика 23. а) Имерزيونи објектив уроњен у уље користи се за побољшање резолуције.

б) Шематски приказ микроскопирања са и без имерзионног уља (светлост се расипа док пролази кроз ваздух изнад препарата)

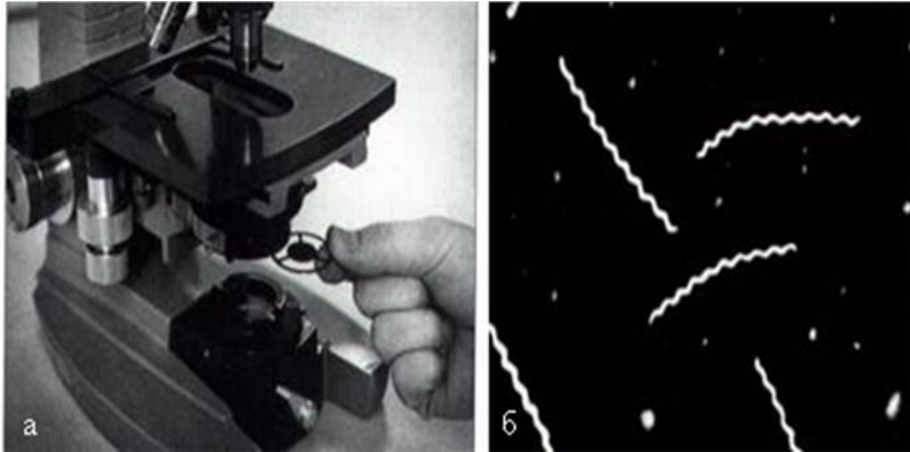
#### 4.1.2. Микроскоп са тамним пољем

Микроскоп са тамним пољем је микроскоп светлог поља који има малу, али значајну модификацију кондензора. Мали, непрозирни диск (пречника око 1cm) постављен је између извора светлости и кондензаторског сочива. Овај непрозирни светлосни граничник, диск, блокира већину светлосних зрака на свом путу до сочива објектива, стварајући шупљи конус светлости који је фокусиран на објекат гледања (Слика 24а).

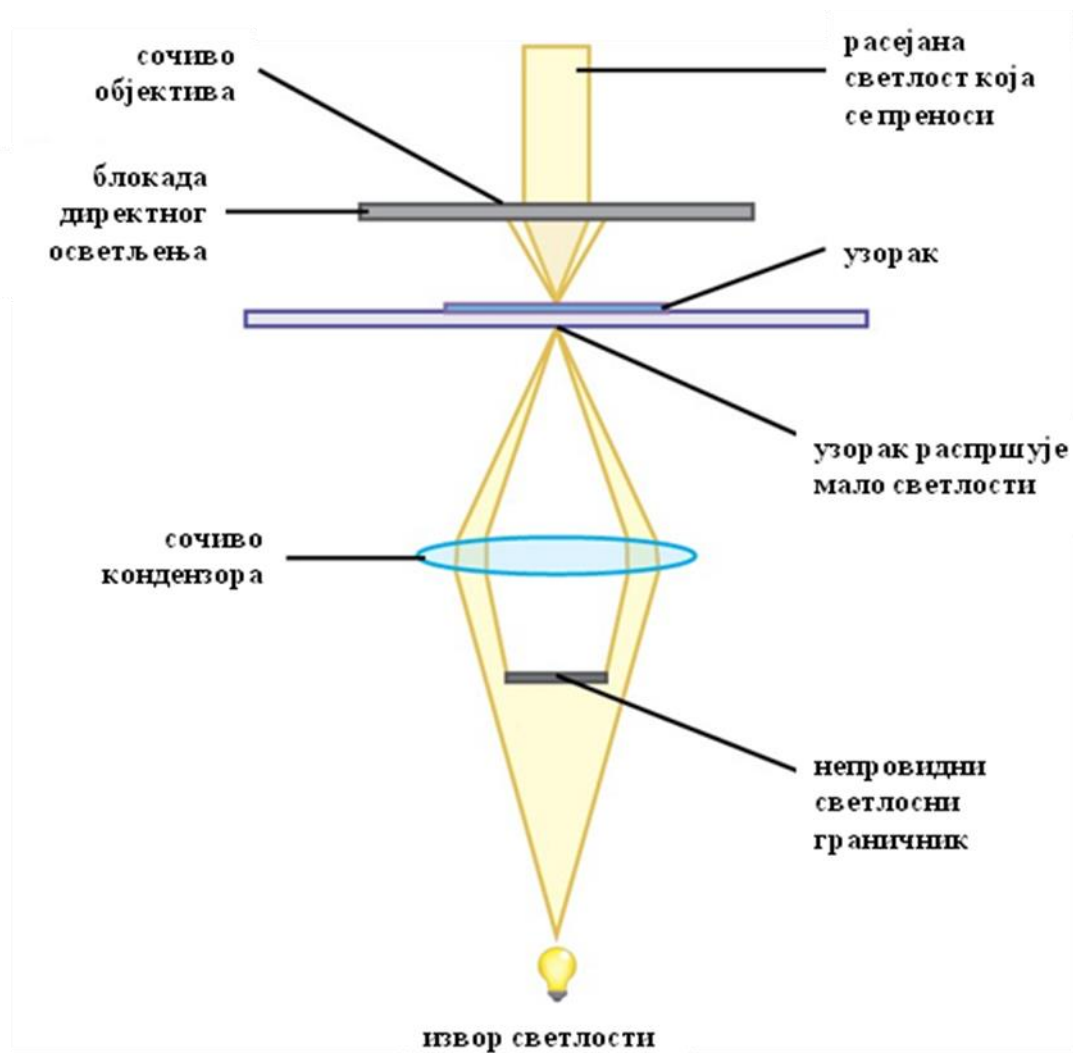
Једина светлост која стиже до ока је светлост која је преломљена или одбијена од посматраног објекта на препарату (слика 25). Добијена слика обично приказује светле објекте на тамној позадини.

Микроскопија тамног поља често може створити слике узорака високог контраста и високе резолуције без употребе микробиолошких боја, што је посебно корисно за гледање живих узорака који би бојењем могле бити убијене или на други начин угрожене. На пример, танке спирохете као што је *Treponema pallidum*, узročник сифилиса, најбоље се могу видети помоћу микроскопа у тамном пољу (Слика 24б).





Слика 24. Микроскоп са тамним пољем: а) кондензор са тамним дном; б) препарат спирохете



Слика 25. Непровидни светлосни граничник уметнут у микроскоп светлог поља користи се за производњу слике тамног поља.

### 4.1.3. Фазно-контрастни микроскопи

Фазно-контрастни микроскоп користи рефракцију и интерференцију светлосних таласа проузроковане разликама у дебљини посматраног објекта да би створиле слику високог контраста и високе резолуције без бојења. То је најстарији и најједноставнији тип микроскопа који ствара слику мењајући таласне дужине светлосних зрака који пролазе кроз посматрани објекат. За креирање измењених путања таласних дужина светлосних зрака, у кондензору се налази прстенасти граничник. Прстенаст граничник производи шупљи конус светлости који се фокусира на посматрани објекат пре него што стигне до сочива објектива. Објектив садржи фазну плочу која садржи фазни прстен од племенитог метала. Као резултат, светлост која путује директно из извора пролази кроз фазни прстен, док светлост која се рефлектује или одбија од посматраног објекта пролази кроз плочу. Посматрани препарати који преламају светлост тада изгледају тамни на светлој позадини.

Уопштеније, посматрани објекти који се разликују по дебљини, имаће различити индекс преламања светлости, и због тога ће се разликовати по нивоима осветљености.

Помоћу овог микроскопа посматрају се небојени микроорганизми и њихова унутарћелијска грађа (Слика 26).



Слика 26. Изглед протозое на фазно - контрастном микроскопу

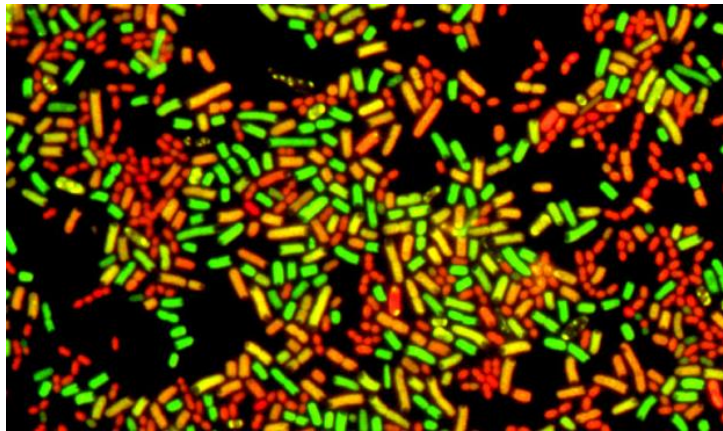
### 4.1.4. Флуоресцентни микроскопи

Флуоресцентни микроскоп као извор светлости користи лампу са кварцним колектором и ултраљубичастим филтром који на препарат пропушта ултраљубичасте зраке таласних дужина 10 до 400nm. Посматрани објекти флуоресцирају приликом излагања ултраљубичастим зрацима. Ово производи слику посматраног објекта у јарким бојама на тамној позадини. Овај микроскоп се користи за посматрање структурних елемената ћелије.

За потребе флуоресцентне микроскопије користе се флуоресцентне хромофоре назване флуорохроми. Флуорохроми имају способност да апсорбују енергију из извора светлости и затим да емитују ову енергију као видљиву светлост. У флуорохроме спадају боје као што су тексас црвена, флуоресцеин (FITC), боје нуклеинске киселине 4',6'-диамидино-2-фенилиндол (DAPI), акридин наранџаста, природне флуоресцентне супстанце као што су хлорофили, као и флуоресцентне боје које се додају микроскопским препаратима да би се створио контраст.

Флуоресцентни микроскопи су посебно корисни у клиничкој микробиологији. Могу се користити за идентификацију патогена, за проналажење одређених врста у окружењу или за проналажење локација одређених молекула и структура унутар ћелије. Такође су развијени приступи за разликовање живих од мртвих ћелија

помоћу флуоресцентне микроскопије на основу тога да ли оне преузимају одређене флуорохроме (Слика 27). Понекад се на истом узорку користи више флуорохрома да би се показале различите структуре или карактеристике.



Слика 27. Изглед бактеријских ћелија обојене флуоресцентном бојом која раздваја живе (зелена) и угинуле (црвена) ћелије.

## 4.2. ЕЛЕКТРОНСКИ МИКРОСКОП

Електронски микроскоп за стварање слике посматраног објекта користи кретање електрона из катодне цеви. Електрони, као и електромагнетно зрачење, могу да се понашају као таласи са таласним дужинама од  $0,005\text{nm}$ , и могу произвести много бољу резолуцију од видљиве светлости. Кад електрони доспеју на објекат посматрања, мењају правац кретања те се на основу степена расипања зрака добије контрастна слика. Помоћу електронског микроскопа могу се посматрати честице величине и до  $0,5\text{nm}$ , па се зато користи за изучавање грађе ћелије и вируса. Са електронским микроскопом могу се уочити субћелијске и неке молекуларне структуре, као што су то појединачни ланци ДНК. Међутим, електронска микроскопија се не може користити на живом материјалу због метода потребних за припрему узорака. Помоћу електронског микроскопа може се постићи увећање слике  $100000$  до 2 милиона пута.

Постоје два основна типа електронског микроскопа и то трансмисиони електронски микроскоп (ТЕМ) и скенирајући електронски микроскоп (СЕМ).

ТЕМ је донекле аналоган светлосном микроскопу светлог поља у смислу начина на који функционише. Међутим, у случају ТЕМ користи се електронски сноп који се фокусира помоћу магнетног сочива (уместо стакленог сочива) и пројектује кроз посматрани објекат на детектор, који снима слику (Табела 6).

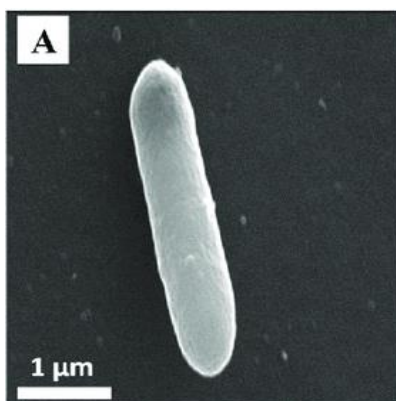
Табела 6: Врсте електронског микроскопа

Тип	Опис
<b>Трансмисиони електронски микроскоп (ТЕМ)</b>	Ови микроскопи емитују електроне, а не светлосне зраке ка објектима који се посматрају, да би их повећали.
<b>Скенирајући електронски микроскоп (СЕМ)</b>	Овај микроскоп скенира површину узорака сондом и та интеракција се користи за мерење финих облика површине или својстава посматраног објекта.

Да би електрони прошли кроз посматрани објекат у ТЕМ-у, он мора бити изузетно танак (дебљине од 20 до 100nm). ТЕМ захтева да сноп и узорак буду у вакууму и да објекат посматрања буде дехидриран. Потребни су специфични кораци за припрему препарата за посматрање под електроским микроскопом.

СЕМ формирају слике површина посматраног објекта, обично од електрона који су одбачени од површине. Ово може да створи веома детаљне слике са тродимензионалним изгледом које се приказују на монитору (Слика 28).

Типично, за потребе СЕМ, објекти који ће се посматрати се суше и припремају са фиксативима који смањују смежување, а потом се премазују танким слојем метала као што је злато. Док ТЕМ захтева веома танке резове и омогућава да се виде унутрашње структуре, као што су органеле и унутрашњост мембрана, СЕМ се може користити за преглед површина већих објеката (као што је поленово зрно), као и површине веома малих узорака.



Слика 28. Изглед ћелије бактерије, *Escherichia coli* код СЕМ

### 4.3. ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА

Приликом микроскопирања неопходно је придржавати се основних правила технике микроскопирања. Ово је изузетно важно имајући у виду да је микроскоп веома осетљив оптички инструмент који се при неправилном руковању може лако оштетити. Хватањем за ручицу микроскоп се поставља на жељено место на радном столу, тако да окулари буду окренути ка посматрачу. Сочива окуларна и објектива се обришу за то намењеним специјалним крпама. Сочива се никада не смеју брисати обичним марамицама или другим тканинама јер се таквим поступком сочива могу још више испрљати или чак оштетити.

#### 4.3.1. Микроскопирање објективима сувог система

Да би се објекат добро уочио, неопходно је правилно подешавање механичких и оптичких делова микроскопа.

- Прво се укључи систем за осветљење који у себи садржи сијалицу и кондензор са системом сочива и дијафрагмом.

- Кондензор се подигне до сточића уз помоћ завртња кондензора, а дијафрагма на кондензору се потпуно отвори.

- Изнад отвора на сточићу, окретањем ротора, центрира се објектив са најмањим увећањем (10×). Да је објектив центриран, познаје се по слабом удару – „пуцњу“, који се чује при улазу језичка са непокретног дела ротора у зарез „мењача“ објектива.

- Помоћу макрометарског завртња сточић се подигне на удаљеност око 1cm од објектива. Посматрањем кроз окулар треба да се види правилан и добро осветљен круг.

- Предмет који се посматра назива се препарат. На сточић микроскопа поставља се микроскопски препарат и доводи у оптичку осу постављањем изнад отвора на сточићу. При постављању препарата треба пазити да предметну плочицу не окренемо за 180° (са објектом посматрања на доле). Због тога је веома важно обележавање микроскопских препарата.

- Помоћу макрометарског завртња, гледајући објектив са стране, тубус се доведе ближе препарату (при томе се пази да објектив не дотакне предметно или покровно стакло микроскопског препарата).

- Погледамо кроз окулар (око не прислањати на сочиво окулара) и лагано макрометарским завртњем, окрећући макрометар ка себи, спуштамо сточић (подижемо тубус) доводећи објекат у фокус сочива.

- Уколико је потребно, ставимо објектив са већим увећањем пажљивим окретањем ротора. Микрометарским завртњем изоштравамо слику.

- Осветљење подешавамо померањем кондезора тако да видно поље буде равномерно осветљено.

- Отвор дијафрагме подесити за сваки објектив.

- Потребно је прегледати цео препарат и пронаћи репрезентативне делове објекта гледања.

#### 4.3.2. Микроскопирање са имерзионим објективом

Раздвојна моћ микроскопа се може повећати употребом имерзионих објектива. Из тог разлога се имерзиони објективи користе за посматрање и изучавање бактерија. Имерзиони објективи се од обичних објектива разликују по ознаци (oil) и по томе што је у њихов метални део урезан црни или црвени прстен (Слика 29). Ови објективи имају моћ увећања 100×.



Слика 29. Имерзиони објектив 100× увећање са урезаним црним прстеном

Приликом посматрања препарата објективима сувог система долази до расипања светлости јер се индекс преламања ваздуха (1,0) и индекс преламања стакла (1,52) разликују. Као последица расипања светлости, раздвојна моћ сувих објектива је мања. Да би се ово расипање светлости смањило или потпуно избегло, на препарат се ставља кап имерзионог (кедровог) уља чији је индекс

преламања исти као и за стакло (1,52). Урањањем имерзионог објектива у уље спречава се губитак светлости и тиме се повећава раздвојна моћ микроскопа.

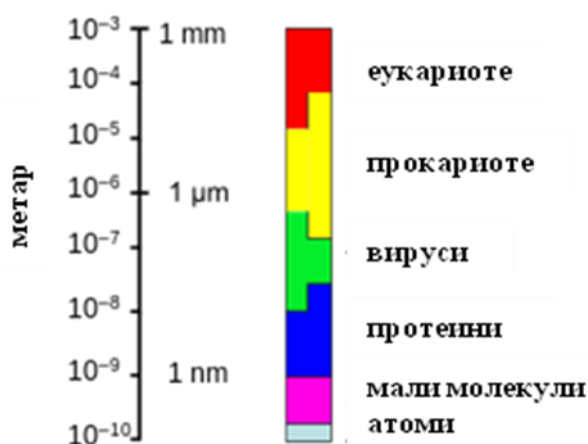
При микроскопирању имерзионим објективом потребно је бити веома опрезан, јер је имерзиони објектив веома близу предметне плочице, па постоји опасност од разбијања препарата и сочива на објективу. Да до овога не би дошло, потребно је савладати технику микроскопирања имерзионим објективима, која подразумева неколико корака.

- Проверити чистоћу окулара и сваког објектива, посебно имерзионог објектива.
- Поставити препарат на сточић, подесити објектив са малим увећавањем (10×) и помоћу макрометарског завртња пронаћи објекат посматрања.
- Подесити осветљење према потребама објекта гледања.
- На препарат ставити малу кап имерзионог уља.
- Окретањем ротора поставити имерзиони објектив у оптичку осу микроскопа.
- Микрометарским завртњем изоштрити слику.
- Након микроскопирања, имерзионо уље са имерзионог објектива се скида алкохолем (ксилолом), а са предметне плочице сувом и чистом марамицом.

#### 4.4. ПОСМАТРАЊЕ ОБЛИКА И ВЕЛИЧИНЕ МИКРООРГАНИЗАМА

Облици ћелије микроорганизама су округли (монококе, диплококе, тетраде, сарцине, стрептококе и стафилококе), штапићасти (бацили) (аспорогени, спорогени, појединачни, по два и у ланцима), у облику зареза (вибриони), у облику латиничног слова С (спириле), у облику више завоја (спирохете), неправилни и кончасти облици.

Микроорганизми се не виде голим оком. Њихова величина се изражава у микро ( $\mu\text{m}$ ) и нано ( $\text{nm}$ ) метрима. Најситнији су вируси (10 до 300  $\text{nm}$ ), затим бактерије (1 до 5  $\mu\text{m}$ ), гљиве (са пречником хифе 2 до 5  $\mu\text{m}$ ), квасци (1,5 до 20  $\mu\text{m}$ ), филаментозне алге са ширином филамента око 3 до 5  $\mu\text{m}$ , округле алге са пречником ћелије 5 до 10  $\mu\text{m}$ , штапићасте алге (диатомеје) су дужине 10 до 20  $\mu\text{m}$ , и најкрупније су протозое (4 до 400  $\mu\text{m}$ ) (Слика 30).



Слика 30. Однос величина појединих група микроорганизама

Крупнији микроорганизми се посматрају преко нативних и обојених препарата објективима сувог система, а ситнији микроорганизми се претходно обоје и

посматрају имерзионим објективом. Вириси се посматрају електронским микроскопом.

#### 4.5. МИКРОСКОПСКА МЕРЕЊА

За потребе микробиолошких истраживања, некада је неопходно урадити мерење величине ћелије микроорганизама. У ту сврху се користе окуларни и објективни микрометар (слика 31).



Слика 31. Окуларни микрометар (лево) и објективни микрометар (десно)

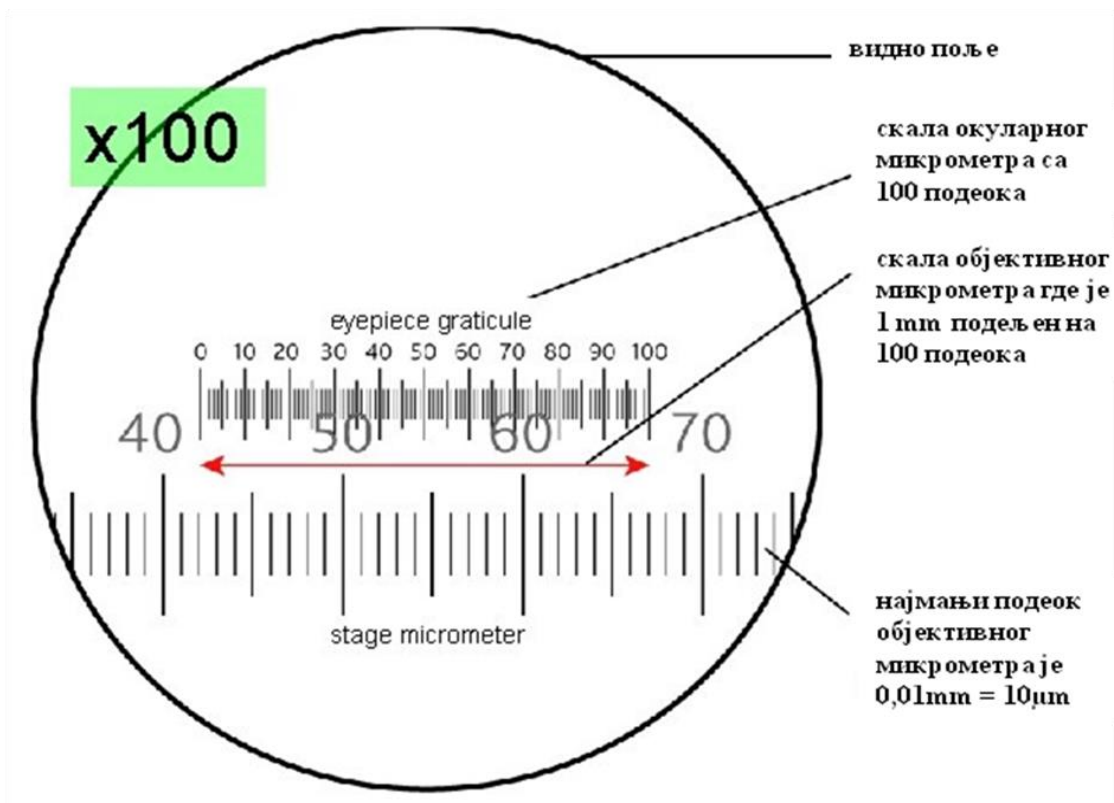
Окуларни микрометар је округла стаклена плочица на којој се налази скала издељена на 100 једнаких подеока, која се мора калибрисати за сваку комбинацију окулар-објектив. Ова округла стаклена плочица се поставља у унутрашњост окулар (изнад дијафрагме окулар). Калибрација окуларног микрометра врши се објективним микрометром. Циљ калибрисања окуларног микрометра је да се одреди микрометарска вредност (дужина) скале окуларног микрометра за свако појединачно увећање микроскопа.

Објективни микрометар је предметна стаклена плочица на којој се налази микрометарска скала дужине 1 mm (код неких 2 mm). Скала објективног микрометра подељена је на 100 једнаких подеока, што значи да је вредност једног подеока 0,01 mm, односно 10  $\mu\text{m}$ .

У видном пољу микроскопа пронађе се оштар лик скале објективног микрометра. Померањем објективног микрометра и окретањем окулар поставе се две скале да буду паралелне тако да се лева црта на објективном поклопи са првом левом цртом на окуларном микрометру. Након тога се скале прате у десно све док се не дође до места где су се поново потпуно поклопили подеоци на оба микрометра. Потом се одреди колико подеока објективног микрометра одговара одређеном броју подеока окуларног микрометра и израчуна вредност једног подеока на окуларном микрометру (слика 32).

Нпр. ако се поклопе 67. и 42. подеок на објективном микрометру са првим и последњим подеоком окуларног микрометра онда 25 подеока ( $67 - 42 = 25$ ) објективног микрометра одговара целој скали окуларног микрометра. Пошто је један подеок објективног микрометра дужине 10  $\mu\text{m}$  цела скала окуларног микрометра је дужине 250  $\mu\text{m}$  ( $25 \times 10 \mu\text{m}$ ). Када се 250  $\mu\text{m}$  подели са 100, колико има подеока на окулрном микрометру, добије се да је **један подеок окуларног микрометра дужине**

2,5  $\mu\text{m}$ , чиме је извршено баждарање окуларног микрометра при увећању микроскопа од 100 $\times$ . Сада можемо склонити објективни микрометар и приступити мерењу жељених објеката у препарату.



Слика 32. Окуларни микрометар и објективни микрометар у видном пољу микроскопа (при увећању микроскопа 100 $\times$ )



## 5. СИСТЕМАТИКА МИКРООРГАНИЗАМА

Систематика микроорганизама је научна дисциплина која се бави изучавањем разноликости микроорганизама и њиховом класификацијом у одређене систематске категорије. Систематска категорија представља ранг (ниво) у хијерархијској класификацији. У табели 7 су наведене систематске категорије које се најчешће користе у микробиологији.

Табела 7. Систематске категорије

Латински назив	Српски назив
Domain	Домен
Regnum	Царство
Divisio, Phylum	Раздео
Classis	Класа
Ordo	Ред
Familia	Фамилија
Genus	Род
Species	Врста
Subspecies	Подврста
Varietas	Варијетет
Subvarietas	Подваријетет

Осим поменутих, у микробиологији се користе и следећи појмови:

- **Сој**, обухвата ћелије исте врсте које се генетички разликују унутар врсте. Сваки сој се означава бројем или словом након назива. На пример, врста *Escherichia coli* је бактерија нормалне цревне флоре, а сој ове врсте је *Escherichia coli* 0157:H7, и има способност да продукује токсин који је патоген за људе.

- **Biovar**, сојеви који се разликују по биохемијским или физиолошким својствима.

- **Morfovar**, сојеви који се разликују по морфолошким својствима.

- **Serovar**, сојеви имају различита антигена својства.

Групе микроорганизама, утврђене класификацијом, називају се таксони. Таксономија је област систематике која обухвата теорију и праксу класификовања организама. Реч *таксономија* потиче од грчких речи *taxis*- "разврстати" и *nomos* – закон. Наука о биолошкој класификацији обезбеђује начин да идентификује микроорганизме и сврста их у групе са сличним карактеристикама. Састоји се од 3 дела, **класификације, идентификације и номенклатуре** микроорганизама.

**1. Класификација микроорганизама** представља распоређивање микроорганизама у групе (**taxa**) где је распоред организама у групи заснован на узајамној сличности или еволутивној повезаности, а систематско груписање извршено према одређеној функцији. У оквиру класификације разликујемо **фенотипску, генотипску** и **аналитичку** класификацију, које се са временом допуњују и по потреби мењају.

Фенотипска класификација заснива се на међусобној сличност микроорганизама где се упоређују морфолошке, физиолошке, биохемијске и серолошке карактеристике микроорганизама. Заснива се на претпоставци да укупна сличност одражава довољно добро повезаност организама. Она омогућава опис и класификацију родова и врста на основу квантитативних особина (могу се измерити или избројати) и квалитативних особина (облик, боја, покретљивост итд.).

Генотипска класификација заснива се на еволутивном принципу постојања заједничког претка. Она представља најпрецизнији начин за класификацију микроорганизама, а њен развој почиње усавршавањем молекуларних метода и генетских студија. Генетска таксономија односа нуклеотида се користе за одређивање сличности између врста.

Аналитичка класификација заснива се на детекцији структурних компоненти ћелије и њених метаболичких производа коришћењем хемијских методе као што су садржај масних киселина у ћелијском зиду, садржај укупних липида у ћелији - липидни профил, садржај укупних протеина у ћелији - протеински профил, садржај ензима. Аналитичка класификација има висок ниво објективности и брзе методе али су јој потребне специјализоване лабораторије и скупа опрема.

**2. Идентификација микроорганизама** је практична страна таксономије која обухвата процес одређивање специфичног идентитета изолата и постављање новог соја у претходно описану групу. Идентификација је рутински рад у микробиолошкој лабораторији. Обично почиње од добијања чисте културе од издвојених микроорганизама и наставља се идентификацијом одговарајућих особина. Испитивање својстава изолата обухвата утврђивање морфолошких, биохемијских, физиолошких, серолошких, патогених и молекуларних особина.

**3. Номенклатура микроорганизама** је грана таксономије која се бави додељивањем имена таксономским - систематским групама микроорганизама. Давање назива - имена микроорганизама врши се путем **БИНОМНЕ - двочлане** номенклатуре коју је у микробиолошку праксу увео шведски ботаничар и систематичар Karl Von Linee, 1753. године, где се назив микроорганизама састоји од имена рода и имена врсте. Већина назива су **латинског** порекла, док су грчког много мање.

*Bacillus subtilis*  
Име рода + име врсте  
"Презиме + име"

Латински називи микроорганизама често могу да указују на место њиховог открића (*Azospirillum brasiliensis*- Brazil), ко их је открио или описао (*Escherichia coli* - Theodor Escherich; *Legionella sp.* - American Legion), или на неко својство (*Staphylococcus aureus* - гроздови златне боје).

## 5.1. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПРОТОЗОА

Праживотиње (Protozoae) су еукариотски организми, грађени искључиво од једне ћелије. Назив Protozoa у буквалном преводу значи *прва животиња*.

Идентификација протозоа врши се најчешће на основу морфолошких особина. Посматрање морфолошких особина протозоа може бити преко нативног и преко фиксираног препарата, објективима сувог система.

У сврху посматрања величине и покретљивости протозоа, користи се нативни препарат. Посматрање у нативном препарату је отежано јер је већина протозоа покретна. Да би се спречило њихово кретање приликом микроскопирања, потребно је испод покровног стакалца оставити мехуриће ваздуха (што се постиже директним спуштањем покровног стакалца на кап воде за микроскопирање) или у капљици воде на предметној плочици ставити нит вате како би се успорило кретање протозоа. Кретање протозоа се такође може успорити и додавањем метиленског плавог који

делује као наркотик. За добијање мешане културе протозоа, најчешће се користи инфузум сена. Сено се уситни, потопа у водоводну воду и инкубира у термостату на 28°C током три недеље. Приликом припреме нативног препарата протозоа, капљком се узима кап инфузума са површине, јер су протозое аеробни организми, па се очекује да ће највећи број протозоа бити управо при површини.

Фиксирани препарати припремају се уобичајено као за све микроорганизме, а боје се са неком од микробиолошких боја.

### **5.1.1. Грађа ћелије**

Унутрашњост ћелије испуњава цитоплазма, која је подељена на спољашњи, гушћи и унутрашњи, ређи слој цитоплазме. Спољашњи слој назива се ектоплазма, а унутрашњи ектоплазма. У цитоплазми налазе се органеле карактеристичне за еукариотску грађу: једро, једарце, митохондрије, вакуоле (хранљиве и контрактилне), ектоплазматични ретикулум, Голџијев апарат и др. Протозое могу да имају једно или више једара.

На површини ћелије немају ћелијски зид, већ само задебљалу ћелијску мембрану - пеликулу. Одсуство ћелијског зида, омогућава им лакше кретање кроз воду и влажну средину. Неки представници протозоа формирају споља љуштину, која штити ћелију од повреда и спољашњих утицаја. Љуштина може бити грађена од органских или минералних материја. Облик, величина и грађа љуштине је индикатор у детерминацији врсте. Величина протозоа се креће од 4 до 400  $\mu\text{m}$ .

### **5.1.2. Исхрана**

Према начину исхране, протозое се сврставају у групу хетеротрофних организама, међу којима се разликују сапрофитне и паразитске протозое. Протозое се хране на два начина: пиноцитозом и фагоцитозом. Пиноцитоза је усвајање растворених органских материја из спољашње средине (вода, јони и мали молекули). Пиноцитозом се хране паразитске протозое. Фагоцитоза (ингестија) је активно узимање чврстих хранљивих честица или плена (нпр. бактерије, алге и друге праживотиње) при чему се формирају хранљиве вакуоле. Несварени остаци се избацују на било ком месту на телу код примитивнијих протозоа (егзоцитоза), док се код сложеније грађених избацују на одређеним местима на телу. Неки представници усвајају храну путем ћелијских уста (цитостома), а избацују остатке преко отвора (цитопиг).

### **5.1.3. Размножавање**

Протозое се размножавају бесполно и полно. Начини **бесполог размножавања** су:

- бинарна деоба - Ово је најчешћи облик размножавања, а подразумева поделу ћелије на две приближно једнаке нове ћелије. Бинарна деоба може бити уздужна (бичари) и попречна (трепљари).

- мултипла деоба - Код мултипле деобе прво се једро подели на већи број једара, а потом се дели цитоплазма на онолико делова колико има једара.

- плазмотомија - Плазмотомија је деоба вишеједарних протозоа. Прво се дели цитоплазма на онолико делова колико има једара, а потом се дели једро у свакој новонасталој ћелији, да би се постигла вишеједарност.

- пупљење - Приликом пупљења, образују се спољашњи и унутрашњи пупољци (израштаји), који се када достигну довољну величину одвоје и постану самостални. Неретко се дешава да се пупољци не одвоје од родитељске ћелије.

Већина протозоа су солитарне, односно живе самостално, док се код неких врста, након деобе или пупљења, јединке не одвајају, тако да долази до формирања колонија.

Начини **полног размножавања** су:

- коњугација - Ово је облик полног размножавања у ком се две јединке спајају путем цитоплазматичног мостића и размене микронуклеусе.

- изогамија - Подразумева спајање међусобно морфолошки истих гамета.

- хетерогамија - Полно размножавање у ком долази до спајања међусобно морфолошки различитих гамета.

- аутогамија - Облик полног размножавања у ком долази до спајања микронуклеуса једне исте јединке.

#### 5.1.4. Распрострањеност

Протозое живе у сланим и слатким водама, влажном земљишту и у органима за варење животиња. Већина су слободноживеће, али има и сесилних врста (које се не крећу). Поједини представници формирају колоније.

Значајне су јер у повољним условима убрзавају минерализацију органских остатака у води и земљишту. У органима за варење преживара регулишу бројност бактерија, извор су протеина (након угинућа) и помажу варење целулозе. Ако се протозое пренамноже, могу бити и штетне, јер смањују бројност корисних бактерија у органима за варење. Међу протозоама има и патогених врста које узрокују различите болести код животиња и људи.

#### 5.1.5. Таксономија

Друштво протозолога је 1985. године објавило таксономску шему, којом су све протозое разврстане у шест раздела. На овом месту биће издвојени и описани само поједини раздели, који су са аспекта биљне и сточарске производње најзначајнији.

За детерминацију протозоа најважније су морфолошке особине. Од морфолошких особина одређује се облик, величина, грађа ћелије, размножавање, стварање циста и покретљивост.

Приликом идентификације протозоа, посебно важан параметар је покретљивост, односно начин кретања. Код протозоа постоје три врсте органела за кретање: псеудоподије – ризоподије (лажне ножице), бичеви (флагеле) и цилије (трепље).

Све протозое се у односу на покретљивост деле у три раздела: **Sarcomastigophora**, **Ciliophora** и **Apicomplexa**.

##### 1. Раздео **Sarcomastigophora**

Овај раздео подељен је на два подраздела: **Sarcodina** и **Mastigophora**.

Подраздео **Sarcodina** обухвата амебоидне протозое. Крећу се псеудоподијама (лажним ножицама). Псеудоподије им служе и за прибављање хране. Облик, број и понашање ових органела могу бити веома различити. Постоје четири основна типа псеудоподија:

- лобоподије - дебеле и прстасте;

- филоподије - разгранате, али гране се међусобно не спајају;

- ретикулоподије - разгранате, али су гране међусобно спојене и чине мрежу;

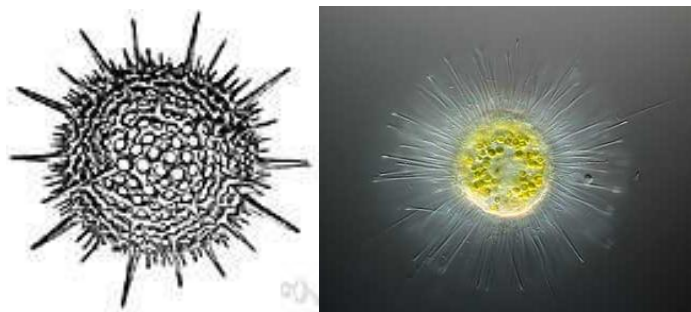
- аксоподије - равне и укочене, садрже у себи аксијални филамент.

Иако имају променљив облик тела, врсте овог подраздела се међусобно разликују по начину образовања и броја псеудоподија, поларности ћелије, као и форме и грађе љуштурице ако постоји. Подраздео **Sarcodina** се дели на две

суперкласе: **Rhizopoda**, са неправилно распоређеним псеудоподијама (Слика 33), без унутрашњег скелета и **Actinopoda** са правилно распоређеним псеудоподијама, које у себи имају скелетне елементе (Слика 34).



Слика 33. Представници суперкласе *Rhizopoda*



Слика 34. Представници суперкласе *Actinopoda*

У суперкласу Rhizopoda спада специфична група протозоа која формира љуштуре (кућице). Ова група протозоа назива се *Foraminifera*. Љуштуре протозоа могу бити различитог облика, величине, хемијског састава, са различитим бројем коморица и различитим распоредом отвора кроз које излазе псеудоподије (Слика 35).

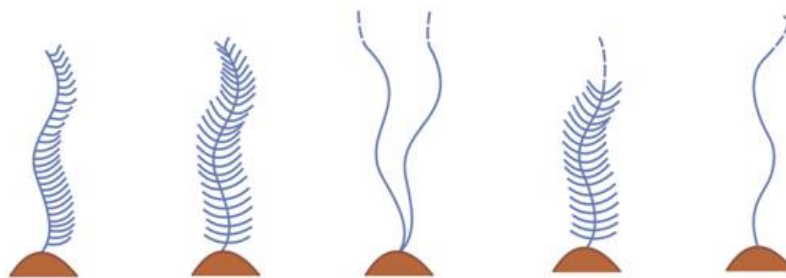


Слика 35. Љуштуре протозоа из реда *Foraminifera*

*Sarcodina* живе слободно у води и земљишту, а мањи број су патогене. За пољопривредну производњу из подраздела *Sarcodina* најважнији су родови *Amoeba* и *Diffugia*.

Подраздео **Mastigophora** обједињује протозое које се крећу помоћу бичева (флагела). Управо зато је овај подраздео познат и под именом *Flagellata* или бичари.

Број флагела варира од 2 до 8, најчешће 4. Флагеле могу бити различите дужине и различитог изгледа (Слика 36).



Слика 36. Различити изглед флагела

Бичари су ситни организми, чија величина не прелази 50  $\mu\text{m}$ . У својој ћелији имају једно једро. Размножавају се полно и бесполно. Већина бичара живи паразитским начином живота, али их има и слободноживећих врста.

Од слободноживећих представника, најзначајнији су родови *Bodo* (сапрофит), а од паразитских родови *Trichomonas*, *Giardia* и *Trypanosoma*.

## 2. Раздео Cilliothora

Раздео Cilliothora обједињује протозое које се крећу помоћу цилија (трепљи). Представници овог раздела познати су још и под именом трепљари или инфузорије. Осим за кретање, цилије им служе и за узимање хране. Трепљари су крупни организми, дужине од 50 до 300  $\mu\text{m}$ , па чак и до 2 mm. У цитоплазми ових протозоа уочавају се два типа једара- микронуклеус (генеративно једро-учествује у размножавању) и макронуклеус (соматично или вегетативно једро). Размножавају се бесполно (попречна деоба и пупљење) и полно (коњугација).

Број и распоред цилија има систематски значај, па се према томе сви трепљари деле на четири подраздела:

Подраздео **Holotricha** обухвата протозоа које имају равномерну цилијатуру односно цилије су равномерно распоређене по целој површини ћелије. Из подраздела Holotricha најважнији су родови *Paramecium* и *Coleps*.

Подраздео **Peritricha** карактеришу цилије које су распоређене око цистостома. Из подраздела Peritricha најзначајнији су родови *Vorticella* (Слика 37) и *Stentor*.

Подраздео **Hypotricha** има цилије на доњој страни ћелије. Најзначајнији је род *Stylonichia*.

Подраздео **Heterotricha** обухвата протозое које имају два типа цилија: кратке, које се налазе по површини целе ћелије и дуге у области цистостома. Кратке цилије имају локомоторну улогу, док дуге цилије имају улогу у привлачењу хране. Из подраздела Heterotricha најважнији је род *Blepharisma*.



Слика 37. Представници раздела *Ciliophora*

### 3. Раздео Apicomplexa (Sporozoa)

Овај раздео обухвата протозое које немају органеле за кретање или су их изгубиле у току живота. Представници овог раздела живе паразитским начином живота и имају сложен циклус развића, кога карактерише смена полног и бесполог начина размножавања. Назив Sporozoa, био је везан за чињеницу да ове протозое у свом животном циклусу пролазе кроз стадијум споре. Имају мали број врста и већина их је патогена за људе и животиње. Представници ове групе су *Toxoplasma gondii*, *Plasmodium* sp., кокцидије из рода *Eimeria* које наносе велике штете у сточарству.

## 5.2. ИДЕНТИФИКАЦИЈА АЛГИ

Алге су еукариотски организми, спадају у групу облигатно аеробних микроорганизама. Назив алга, потиче од латинске речи *algae*, што у преводу значи **морска трава**.

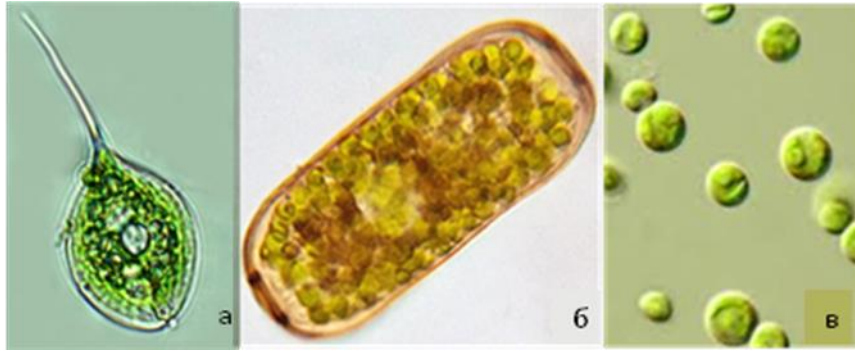
### 5.2.1. Грађа ћелије и талуса

Веgetативно тело алги назива се **талус**. Талус алги може бити различите величине, од свега неколико микрометара (микроталусне), па све до неколико десетина метара (макроталусне). Иако својим изгледом могу веома подсећати на више биљке, алге немају право ткиво и њихов талус никада није диференциран на корен, стабло и лист као што је то код копнених биљака.

Основни степени морфолошке организације алги су:

- једноћелијске
- колонијалне
- сифоналне
- вишећелијске.

Једноћелијске алге имају талус који је сачињен од само једне ћелије. У зависности од тога да ли имају способност да се крећу или не, све једноћелијске алге разврстане су у три групе: монадоидне, ризоподијалне и кокоидне алге (Слика 38). *Монадоидне* алге су покретне алге, и крећу се помоћу бичева. Облик ћелије им зависи од ћелијског омотача, који може бити чврст ћелијски зид или пеликула. *Ризоподијалне* алге немају чврст ћелијски зид, те имају несталан облик тела. Такође су покретне, али се крећу амебоидно, образујући псеудоподије. За разлику од предходне две групе, *кокоидне* једноћелијске алге немају способност кретања. У већини случајева, ове алге имају добро развијен ћелијски зид на коме се налазе различити израштаји.



Слика 38. Једноћелијске алге: а) Монадоидне, б) Ризоподијалне, в) Кокоидне

Колонијалне алге представљају мање или веће заједнице алгалних ћелија, у оквиру којих су појединачне ћелије задржале своју морфолошку и физиолошку самосталност (Слика 39). Уколико је број ћелија у оквиру једне колоније променљив, такву колонију називамо отворена колонија, за разлику од затворених колонија (ценобија), код којих је број ћелија сталан и непроменљив. Колонију могу чинити у морфолошком и физиолошком погледу исте ћелије, и такве колоније се називају *мономорфне* колоније. *Полиморфне* колоније изграђене су од ћелија које се међусобно разликују по грађи и функцији. Полиморфне колоније су на вишем развојном степену у односу на мономорфне.



Слика 39. Колонијалне алге

Сифоналне алге имају веома специфичну грађу талуса. Иако сифоналне алге могу бити великих димензија и својим изгледом веома подсећати на више биљке, њихов талус је увек изграђен од само једне вишеједарне ћелије (Слика 40). Приликом образовања репродуктивних органа или приликом повреде, код сложенијих представника сифоналних алги, формирају се попречни зидови да одвоје повређени део или репродуктивни орган од остатка талуса. Талус сифоналних алги може бити различитог облика, најчешће је кончаст, мехураст или кормоидан. Кормоидан талус алги изгледом подсећа на више биљке.



Слика 40. Сифоналне алге



Вишећелијске алге имају најсложеније грађен талус. Код вишећелијских алги разликујемо кончасте (трихални) и паренхиматични тип талуса (Слика 41). *Кончасте* тип талуса граде ћелије које су нанизане једна на другу. Ћелије се увек деле у једној равни и на тај начин омогућавају издуживање, односно раст кончастог талуса. Талус кончастих алги може бити гранат или негранат, изграђен од једног или већег броја удружених конаца, са морфолошки и функционално потпуно истим (хомоцитни талус) или различитим ћелијама (хетероцитни талус). Најсложенији облик кончастог талуса је хетеротрихални тип. Код овог типа талуса разликујемо конце који надкривају супстрат и врше функцију причвршћивања, док други конце расту вертикално навише и служе за размножавање. *Паренхиматични* тип талуса је најсложенији тип талуса. Настаје деобом ћелија у све три просторне равни. Код многих алги са паренхиматичном грађом, на талусу се разликују делови који веома подсећају на вегетативне органе биљака. Такав талус назива се кормоидан талус. Део кормоидног талуса који својим изгледом подсећа на лист назива се филоид, на стабло каулоид, а на корен ризоид.



Слика 41. Вишећелијске алге

### 5.2.2. Исхрана

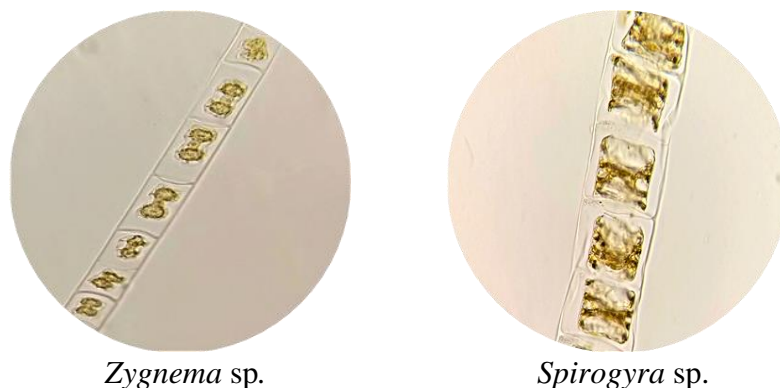
Алге могу бити фотоаутотрофни, миксотрофни (најчешће се јавља у измењеним условима спољашње средине), и само у ретким случајевима хетеротрофни организми (сапрофити и паразити).

Фотоаутотрофне алге имају способност да врше фотосинтезу, односно да уз помоћ хлорофила и сунчеве енергије, из угљен-диоксида и воде синтетишу органску материју. У ћелијама свих алги налазе се органеле које се називају пластиди. Хлоропласти су врста пластида у којима се налазе пигменти из групе хлорофила (хлорофил а, б, ц, д), каротеноида (каротин и ксантофил) и фикобилина (фикоеритрин и фикоцијанин). Хлорофил а је главни пигмент фотосинтезе, без кога се фотосинтеза не може одвијати. Хлорофил б, ц, д су помоћни (секундарни) фотосинтетички пигменти. Ове хлорофиле немају све алге. Помоћним пигментима припадају и каротеноиди (каротен и ксантофил) и фикобилини (фикоеритри и фикоцијанин). Сваки раздео карактерише присуство одређених пигмената.

Максимум апсорпције светлости хлорофила је у плавом и црвеном делу спектра. Помоћни пигменти апсорбују светлост оних таласних дужина које пропушта хлорофил и тиме повећавају ефикасност фотосинтезе преносећи ту апсорбовану енергију на хлорофил. Зависно од тога који пигмент доминира, боја алги може бити зелена, црвена, мрка или нека друга.

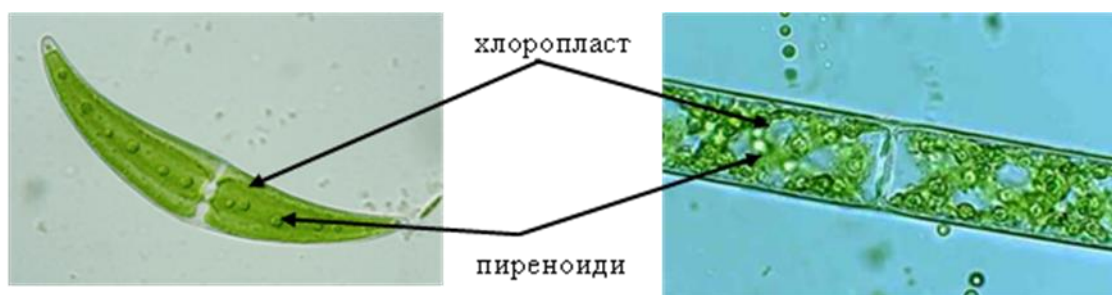
Хлоропласти могу бити различитог облика: звездаст, спирално увијен, прстенаст, пехараст, тракаст и др. (Слика 42). Облик хлоропласта је важан за детерминацију алги. Број и распоред хлоропласта у ћелији варира и представља карактеристично својство појединих раздела. Број хлоропласта у ћелији може бити од 1 до 300, а налазе се обично у централном делу ћелије или уз зид. У

унутрашњости хлоропласта налазе се тилакоиди, рибозоми, ДНК, липидне грануле и пиреноиди.



Слика 42. Различити облици хлоропласта (звездаст, спиралан)

Пиреноиди су телашца протеинске природе. Могу бити различитих облика (лоптасти, штапићасти, полиедарни) и различите величине (од 3 до 15  $\mu\text{m}$ ) (Слика 43). Најчешће се налазе у хлоропластима, али се код појединих црвених алги могу формирати и изван њих. Најновија истраживања су показала да су пиреноиди структуре у којима се врши фиксација и нагомилавање угљен-диоксида ( $\text{CO}_2$ ). Ово је веома важно за алге, имајући у виду да оне претежно живе у воденим срединама у којима је концентрација слободног  $\text{CO}_2$  ниска, а познато је да ниска концентрација овог гаса може представљати лимитирајући фактор за фотосинтезу.



Слика 43. Изглед хлоропласта и пиреноида

### 5.2.3. Размножавање

Алге се размножавају **вегетативно**, **спорулативно** и **полно**. Вегетативно размножавање подразумева размножавање деловима талуса. Начешћи облици *вегетативног* размножавања код алги су деоба (код једноћелијских алги) и фрагментација (појединачни делови талуса се регенеришу у целу алгу). *Спорулативно* размножавање подразумева формирање спора у посебно диференцираним ћелијама које се називају спорангије. *Полно* размножавање код алги одвија се по типу хологамије (јавља се код неких једноћелијских алги, где се у време размножавања читава јединка претвара у полну ћелију), изогамије (спајање морфолошки истих гамета), хетерогамије (гамети су покретни, а женски гамет је крупнији у односу на мушки гамет), оогамије (женски гамет је непокретан и крупнији од мушког гамета, који је покретан) и коњугације (формирањем коњугацијског моста на месту спајања две алге најчешће код кончастих алги).

#### 5.2.4. Распрострањеност

Алге су микроорганизми чије је природно станиште најчешће водена средина. Осим у сланим и слатким водама, алге се могу наћи и у површинским слојевима земљишта, на влажном бетону и камењу, као и на надземним деловима биљака (део епифитне микрофлоре). Алге имају веома важну улогу у процесу формирања и чувања плодности земљишта. Учествују у циклусу кружења материје, где се јављају као примарни органски продуценти.

#### 5.2.5. Таксономија

Велика разноликост алги, како по ступњу морфолошке организације, грађи ћелије, тако и по начину размножавања и циклусу развића, као и још увек непотпуно разумевање филогеније алги, довела је до постојања различитих система класификације и постојања различитог броја раздела (8-11) алги. Једна од највише коришћених класификација је она на основу морфолошких својстава талуса, по којој су алге разврстане у 7 раздела (Табела 8).

Табела 8. Преглед основних карактеристика по разделима

Раздео	Вегетативно тело	Хлорофил	Допунски пигменти *	Станиште	Родови
<b>Chlorophyta</b> зелене алге	једноћелијске колонијалне сифоналне вишећелијске	а,б	кр кс	слане, слатке воде земљиште	<i>Chlorella, Ulva,</i> <i>Acetabularia,</i> <i>Spirogyra,</i> <i>Zygnema</i>
<b>Euglenophyta</b> еугленофите	једноћелијске	а,б	кр кс	слатке воде	<i>Euglena,</i> <i>Phacus,</i> <i>Trachelomonas</i>
<b>Charophyta</b> пршљенчице	вишећелијске	а,б	кр кс	слатке, бракичне воде	<i>Chara,</i> <i>Nitella</i>
<b>Chysophyta</b> златне алге	једноћелијске вишећелијске	а,ц	кр кс	слатке, слане, бракичне воде; земљиште	<i>Hydrurus,</i> <i>Diatoma,</i> <i>Pinnularia,</i> <i>Fragilaria,</i> <i>Navicula,</i> <i>Pinnularia</i>
<b>Pyrrhophyta</b> ватрене алге	једноћелијске колонијалне вишећелијске	а,ц	кр кс фе фц	слане, слатке воде	<i>Peridinium,</i> <i>Ceartium,</i>
<b>Phaeophyta</b> мрке алге	вишећелијске	а,ц	кр кс	слане, слатке воде	<i>Dictyota,</i> <i>Padina,</i> <i>Fucus,</i> <i>Sargassum</i>

<b>Rhodophyta</b> <b>црвене алге</b>	једноћелијске колонијалне вишећелијске	а,д	кр кс фе фц	слане воде	<i>Bangia</i> , <i>Batrachospermu</i> , <i>Lemanea</i> , <i>Corallina</i>
---	--	-----	----------------------	------------	--

\*кр-каротен; кс-ксантофил; фе-фикоеритрин; фц- фикоцијанин

За земљиште, најзначајније су алге из раздела Chlorophyta и Chrysophyta, те ће на овом месту бити више речи о овим разделима.

### Раздео Chlorophyta

Основна карактеристика алги раздела Chlorophyta је зелена боја талуса која потиче од пигмената хлорофила а и хлорофила б.

Зелене алге се одликују великом морфолошком разноврсношћу. Најједноставнији облици су једноћелијски. Једноћелијске зелене алге могу бити без ћелијског зида, са два бича помоћу којих се крећу или са ћелијским зидом и непокретне. Зелене алге могу градити колоније отвореног и затвореног типа, које могу бити и покретне и непокретне. У оквиру овог раздела налазе се и сифоналне алге, крупне једноћелијске алге са великим бројем једара, као и вишећелијске алге са кончастим (гранате или негранате) или кормоидним типом талуса.

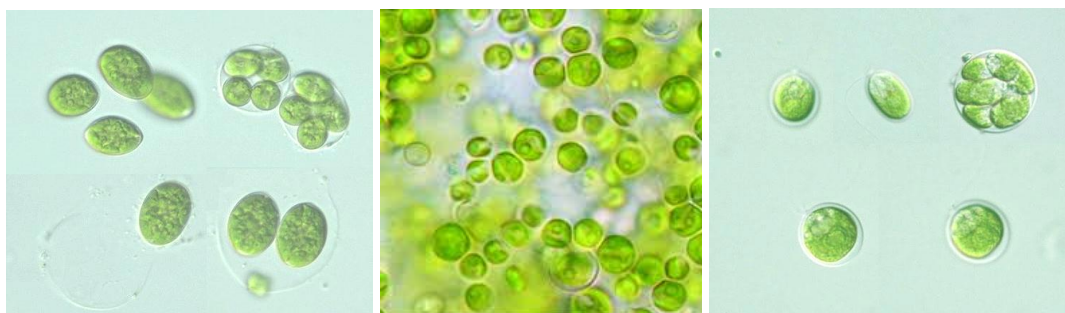
Код већине зелених алги, хлоропласти се налазе уз сам зид ћелије и могу бити различитог облика: пехарастог, прстенастог, спиралног, звездастог, плочастог, тракастог и сочивастог. Ћелијски зид грађен је од целулозе и пектина. Као резервна материја најчешће се јавља полисахарид скроб, али и други шећери, уља и масти.

Размножавају се вегетативним путем (деоба, фрагментација конца, деловима талуса), спорулативно (покретним и непокретним спорама) и полно (хологамија, изогоамија, хетерогоамија, оогоамија, коњугација).

Зелене алге су космополити. Већина их живи у слатким, а мањи број у сланим водама, али су се прилагодиле и животу у земљишту (на дубини до 20 cm), ваздушној средини, на влажним и сувим местима, као и у другим организмима (зоохлореле).

Представници раздела Chlorophyta значајни су за примарну продукцију органске материје, повољно утичу на структуру земљишта, а користе се и у фармаколошкој индустрији, као и у исхрани људи и животиња.

Најзаступљенији родови зелених алги у земљишту су *Chlorella*, *Chlorococcum* и *Chlamydomonas* (Слика 44).



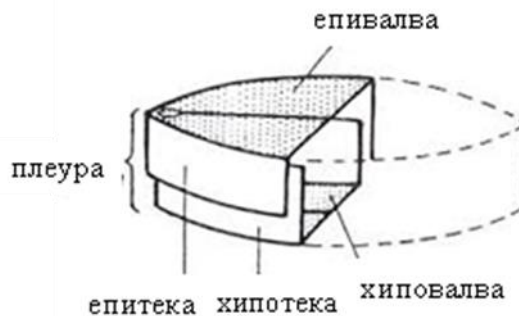
Слика 44. *Chlorella*, *Chlorococcum* и *Chlamydomonas* sp.

### Раздео Chrysophyta

Раздео Chrysophyta обухвата једноћелијске, колонијалне и вишећелијске кончасте, негранате алге. Њихове ћелије садрже обиље мрких пигмената (фикоксантин и специјални каротени), а од зелених пигмената хлорофил а и ц. У

зависности од количинских односа пигмената у хлоропластима, боја талуса ових алги може бити различита, али је најчешће златна до златно-мрка. За земљиште најзначајније златне алге припадају фамилији *Bacillariophyceae*, које су још познате под именом дијатомеје или силикатне алге.

Дијатомеје су искључиво микроскопске величине. Ћелијски зид дијатомеја је прожет  $\text{CaCO}_3$  или  $\text{SiO}_2$ , чврст и назива се панцир или тека. Тека даје облик телу ових алги и има изглед кутије на којој се разликује поклопац (епитека) и доњи део (хипотека). Ова два дела налажу један на другом. Епитека и хипотека имају валву (која је најчешће рељефно грађена) и плеуру (бочни део), при чему плеура епитеке преклапа плеуру хипотеке. Код неких алги се валве епитеке и хипотеке разликују, због чега једна иста алга има три изгледа - два са валвалне и један са плеуралне стране (Слика 45).



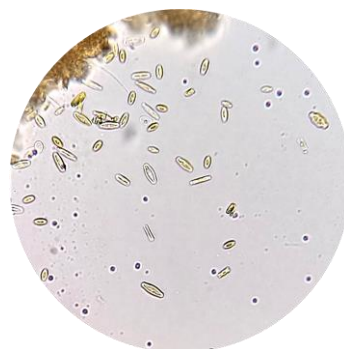
Слика 45. Ћелијски зид дијатомеја

У цитоплазми дијатомеја налазе се хлоропласти који могу бити плочастог или сочивастог облика. За дијатомеје је посебно карактеристичан ксантофил назван дијатомин. Размножавају се вегетативно или полно. Најчешће живе у слаткој и сланој води, али и у земљишту, па чак и у термама на температури од  $50^\circ\text{C}$ .

Исушивањем површинског дела земљишта, ове алге се премештају у дубље и влажније слојеве. Настањују слатке и слане воде, земљиште и биљке.

Значај златних алги огледа се у томе што се оне јављају као примарни продуценти органске материје, а учествују и у процесу биолошког чишћења загађених вода. Панцир угинулих дијатомеја ствара карактеристичан дијатомејски муљ, чије се наслаге, познате под називом дијатомит, користе у грађевинарству, хемијској и прехранбеној индустрији.

Најзаступљенији родови златних алги у земљишту су *Melosira*, *Tetracyclus* и *Navicula* (Слика 46).



Слика 46. Златно-мрке алге

### 5.3. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ГЉИВА

Гљиве обухватају велику групу еукариотских аеробних, ацидофилних, нефотосинтетичких микроорганизама, различитог облика и величине. Поједини представници су невидљиви голим оком, док су други огромних димензија.

#### 5.3.1. Грађа ћелије

Гљиве имају кончаст облик ћелије које се називају **хифе**. Оне могу бити несептиране и септиране. Углавном имају ригидан/чврст ћелијски зид богат полисахаридима. Пречник хифе у просеку износи око 5µm. Сплет хифа гради **вегетативно тело** гљива које се назива **мицелијум**.

#### 5.3.2. Исхрана

Гљиве спадају у групу **хетеротрофних микроорганизама**. Велик број представника су сапрофити, мутуалисти (живе у симбиози са другим организмима) или су патогени/паразитирајући организми.

#### 5.3.3. Размножавање

Гљиве се могу размножавати **бесполним** и **полним** путем (гаметангијама). Деоба, пупљење, спорулација, фрагментација и сегментација спадају у најзначајније типове бесполог размножавања.

#### 5.3.4. Распрострањеност

Гљиве су свеприсутни микроорганизми (космополити). Заступљени су у земљишту, води и ваздуху, на биљкама, а поједини представници могу живети у анаеробним условима, у бурагу животиња. Гљиве имају веома важну улогу у процесу одржавања плодности земљишта. Учествују у циклусу кружења материје, где се јављају као примарни разлагачи (минерализатори) органске материје.

#### 5.3.5. Таксономија

Детаљно је описано око 100000 врста, иако се процењује да постоји преко милион врста. На основу филогенетске анализе 18S рДНК и секвенце протеина утврђено је да су гљиве у ближем сродству са животињама него са биљкама или са алгама.

Гљиве припадају царству Eumycota. Класификација гљива на разделе се врши на основу молекуларне анализе, али су важни критеријуми и разлике у морфологији ћелије и репродуктивних структура, фазама размножавања и структури ћелијског зида.

Класификација и систематика гљива је веома динамична и компликована. Стално се откривају нове врсте, анаморфи односно телеоморфи гљива, предлажу се нови раздели (пример нови раздео Struтомycota, гљиве изоловане из воде). Све то указује на врло ограничена сазнања о комплексом животу гљива.

У литератури се, пре свега због њене једноставности, још увек користи класификација гљива по Ainsworth из 1973. године, са 4 раздела: **Zygomycota**, **Ascomycota**, **Basidiomycota** и **Deuteromycota (Fungi Imperfecti)**. Међутим, данас је призната и највише је у употреби систематика коју су предложили Hibbett и сарадници (2007) која класификује гљиве у 7 раздела: **Microsporidia** (једноћелијске, паразитске гљиве протозоа, животиња и људи), **Chitridiomycota** (микроскопске гљиве које имају способност да формирају зооспоре), **Neocallimastigomycota** (анаеробне гљиве), **Blastocladiomycota** (зооспорне гљиве које живе у земљишту и води), **Glomeromycota** (микоризне гљиве и несептиране гљиве), **Ascomycota** (гљиве које формирају плодносна тела и квасци) и **Basidiomycota** (печурке). Према овој

систематици се значајан број гљива (укључујући и представнике из раздела *Zygomycota*) означава као *incertae sedis*—убрајају се у царство гљива, али имају нејасан таксономски положај, односно не убрајају се ни у један од 7 дефинисаних раздела гљива. Новија таксономија по Naranjo-Ortiz и Gabaldon (2019) наводи систематику гљива у девет раздела. И у овој класификацији не постоји раздео *Zygomycota*.

С обзиром на значај гљива у биљној и сточарској производњи, у даљем тексту ће се детаљно описати шест раздела, на основу поменуте три систематике. У оквиру сваког раздела ће се навести и најзначајнији родови односно врсте сапрофитних и патогених кончастих гљива и квасаца.

### Раздео *Chytridiomycota*

Ове гљиве живе у води и на копну. Хифа им није септирана. Ћелијски зид садржи хитин ( $\beta$  1-4 N-ацетилглюкозамин). У току полног размножавања стварају зигоспоре, а у току бесполог размножавања формирају зооспоре које се крећу помоћу бичева. Многе су сапрофити, нпр. *Rhizophlyctis rosea*, која је значајан разлагач целулозе у земљишту. Најпознатије копнене врсте које су патогени су *Phytophthora infestans* која узрокује трулеж кромпира, *Phythium* која узрокује палез клијанаца репе и *Peronospora* која узрокује пламењачу репе, соје, дувана, винове лозе и др. Неке врсте из овог раздела паразитирају на воденим биљкама и алгама.

### Раздео *Neocallimastigomycota*

Анаеробне гљиве које се налазе у дигестивном тракту преживара (хербиворе: краве, овце, коњи). Могу се пронаћи у земљишту и води. Најзначајнији родови су *Saecomycetes*, *Cyllumycetes*, *Neocallimastix*, *Piromycetes*, *Orpinomyces* и *Anaeromyces*. Припадници овог раздела немају митохондрије, већ поседују хидрогенозоми. Хидрогенозоми садрже ензиме хидрогеназе. У њима настаје  $H_2$ ,  $CO_2$ , млечна киселина, етанол, формати и ацетати као нуспроизводи матаболизма. Формирају малу мицелију са несептираним хифама. Размножавају се бесполо, формирањем покретних зооспора са једном или више флагела. У румену, зооспоре се ослобађају из спорангија. Када се споре закаче за биљни материјал, одбацују флагеле и формирају цисту, иако се могу кретати и амебоидно (ретки случајеви). Затим се развија ризомицелијум са једном или више спорангија. Продукцијом ензима врши се разградња биљног материјала.

Бројна истраживања су потврдила позитивне ефекте примене анаеробних гљива као суплемената сточне хране. Њиховим додатком се повећала сварљивост и нутритивна вредност сточне хране, нарочито хране нижег/лошијег квалитета. Код животиња је примећен бољи унос хране, већи пораст животиња, продукција млека итд. Код непреживара, свиња и живине, је већа ефективност у искоришћавању хране постигнута додавањем ензима које продукују анаеробне гљиве.

### Раздео *Zygomycota* (*Mucoromycota*)

Припадници раздела *Zygomycota* имају несептирану хифу. Бесполо се размножавају спорангиоспорама које настају у затвореним плодноносним телима-спорангијама. Полно се размножавају изогамијом при чему стварају зигоспоре. Већина су сапрофити, али могу бити и опортунистички патогени. Најважнији представници су *Rhizopus*, *Mucor*, *Mortierella*, *Pilobolus*, *Endogone*.

*Rhizopus stolonifer* (Слика 47) је типичан представник ове групе кончастих гљива. Поред ове врсте, најзначајније врсте су *R. microspores*, *R. arrhizus* и *R. delemar*. Заступљене су у земљишту, а бројни представници су патогени биљака.

Поједине врсте се истичу у постжетвеном периоду, јављају се као велики проблем јер оштећују изглед и укус плодова, нарочито кромпира и јагода. *R. oligosporus* се користи у производњи ферментисаних производа од соје као што су темпех и раги.

Значајни су у производњи метаболита као што су млечна, фумарна, јабучна киселина, у синтези етанола, каротеноида и појединих хидролитичних ензима. *Rhizopus* може бити и опортунистички патоген на бројним кичмењацима, укључујући и људе (развијају се у плућима).

*Mucor* је род који броји око 50 врста. Углавном настањују земљиште, биљке, али се могу наћи и у дигестивном тракту животиња. Брзо се развијају, формирају беличасту, памучасту, растреситу колонију која са старењем мења боју у сивкасту-маслинасто зелену боју. Формира велики број округластих спорангиоспора (Слика 48) које се могу наћи у великом броју у затвореним просторијама и вентилацијама. Не могу расти на 37°C. Међутим, постоји неколико термотолератних врста које спадају у опортунистичке патогене и могу довести до инфекције људи и животиња.

*Mortierella* је род чији представници живе у пољопривредном и шумском земљишту и то највише као сапрофитне и ендофитне гљиве (Слика 49). Описано је око 150 врста, а најзначајније су *M. elongata*, *M. antarctica*, *M. verticillata*. Врсте овог рода могу позитивно утицати на раст биљака (спадају у PGP (*plant growth promoting*) микроорганизме). Продукују антибиотику, фитохормоне, а многе врсте су и веома ефикасни разлагачи хитина. Значајни су у обезбеђивању хранљивих материја, нарочито азота, за своје мутуалистичке партнере (интеракција између *M. elongata* и микроалге *Nannochloropsis oceanica*).

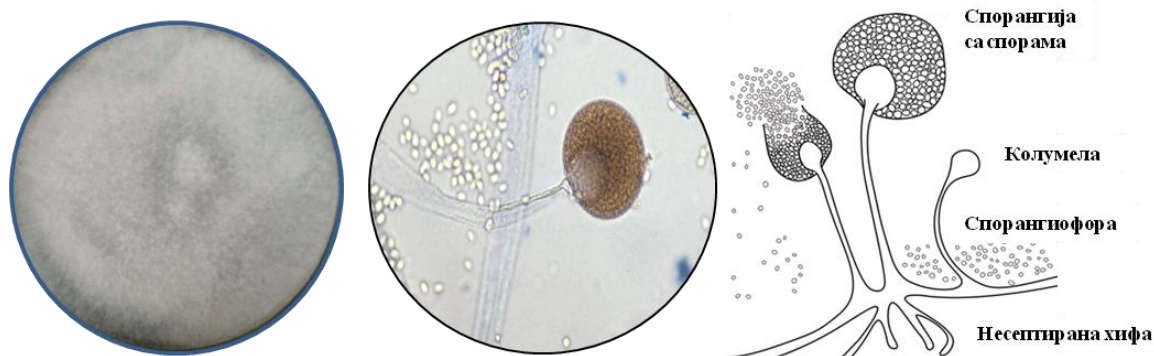
Поједине врсте рода *Mortierella* имају нематофагну природу, па се зато користе као биоконтролни агенси против штетних нематода. Те гљиве продукују ензиме који разлажу кутукулу нематода. Ретко се размножавају вегетативно, имају тенденцију ка стварању септи.

Припадници рода *Endogone* стварају типичне зооспоре у спорокарпу. Спорокарп је величине грашка и јестив је (спаде у тартуфне гљиве). *Endogone* sp. је типична гљива која живи у земљишту и ствара асоцијације са биљкама-ектомикоризну заједницу. Живи у симбиози са парадајзом, јагодама, кукурузом, петунијама.

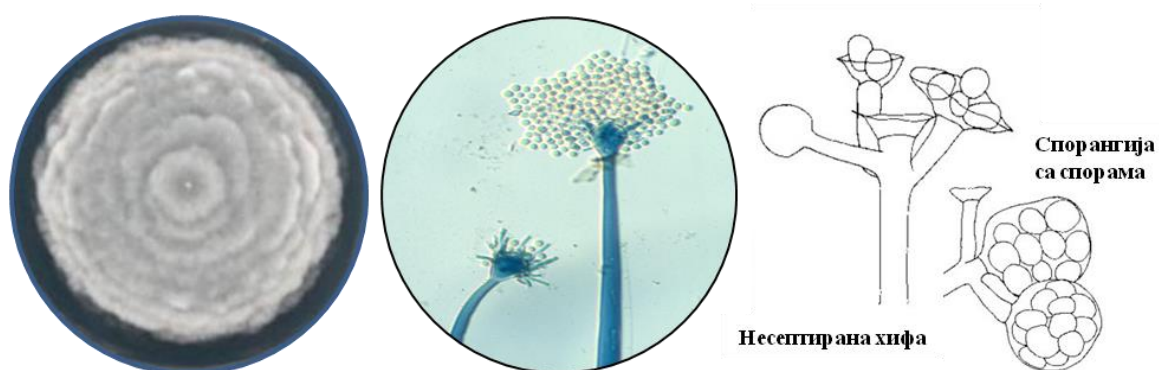




Слика 47. *Rhizopus* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



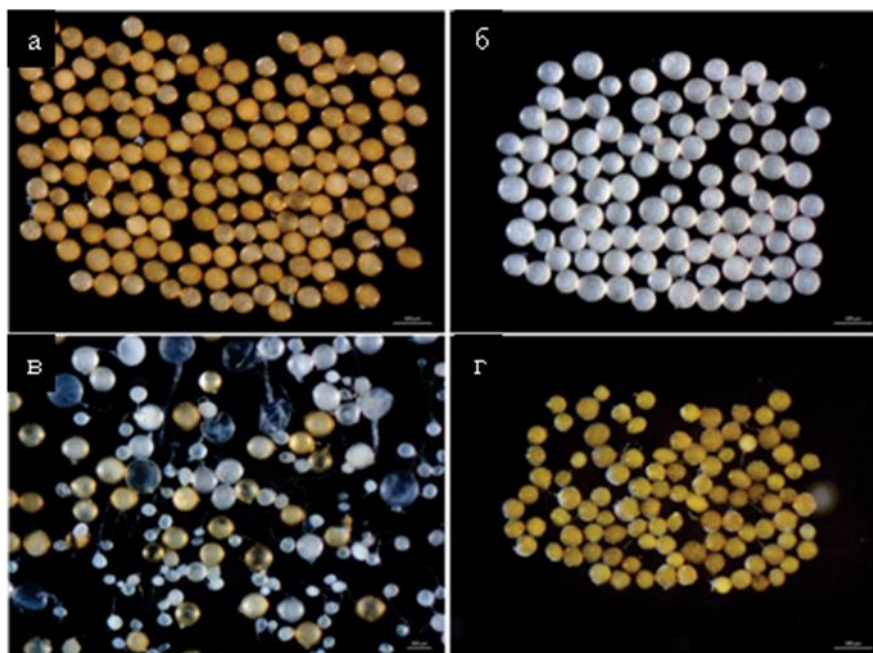
Слика 48. *Mucor* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



Слика 49. *Mortierella* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)

## Раздео *Glomeromycota*

Овај раздео је подељен на четири реда (*Paraglomerales*, *Archaeosporales*, *Diversisporales* и *Glomerales*) који броје 11 фамилија и око 230 морфоврста. Формирају крупне вишејадарне споре (неолико стотина једара који су често пореклом из генетички различитих популација), испуњене липидима и протеинским глобулама. Морфологија споре дефинише припадност различитим групама и врстама (Слика 50).



Слика 50. Споре најфреквентнијих микоризних гљива из раздела *Glomeromycota*: а) *Acaulospora mellea*, б) *Acaulospora scrobiculata*, в) *Ambispora leptoticha*, г) *Claroideoglonus etunicatum*

Готово сви познати припадници овог раздела живе у облигатној симбиотској заједници са биљкама, формирајући тзв. ендомикоризну заједницу. Мицелија гљива расте у корену биљака, улазе у ћелије домаћина. Мицелију чине несептиране хифе. Главни стерол у ћелијској мембране ових гљива је 24-етил-холестерол, уместо ергостерола.

Гљива помаже биљци у њеној исхрани (усвајање фосфора, азота и воде) у замену за метаболите које ствара биљка (продукти фотосинтезе).

Најзначајнији представници припадају родовима *Glomus*, *Rhizophagus*, *Gigaspora* и *Acaulospora*.

*Rhizophagus irregularis* (синоним *Glomus irregularis*, ранији назив *Glomus intraradices*) је најзначајнија врста ендомикоризне гљиве која се користи и у производњи микробиолошких ђубрива.

*Geosiphon pyriforme* (*Geosiphonaceae*, *Archaeosporales*) је једини представник овог раздела који не спада у микоризне гљиве. Он је симбионт цијанобактерија из рода *Nostoc*. Ова симбиотска мутуалистичка заједница је фотосинтетички активна и врши фиксацију елементарног азота.

## Раздео *Ascomycota*

Гљиве раздела *Ascomycota* имају септирану хифу. Бесполно се размножавају конидиоспорама. Полно се размножавају хетерогамидом при чему стварају

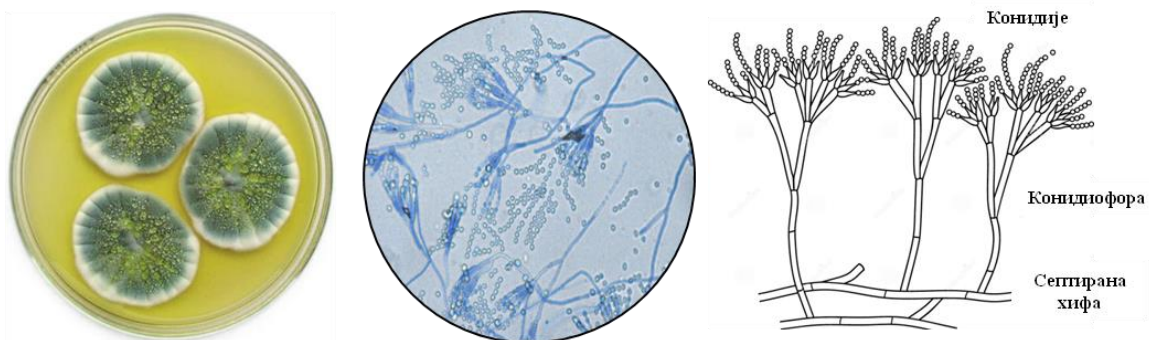
хаплоидне аскоспоре. Аскоспоре се налазе у акусима који су у плодноним телима (псеудотеције, клеистотеције, апотеције и перитеције).

Ascomycotina обухватају велики број сапрофитних, фитопатогених и токсикогених представника. Најзначајнији родови су: *Aspergillus*, *Penicillium*, *Trichoderma*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Claviceps*, *Cercospora*, *Erysiphe*, *Sclerotinia*, *Phomopsis*.

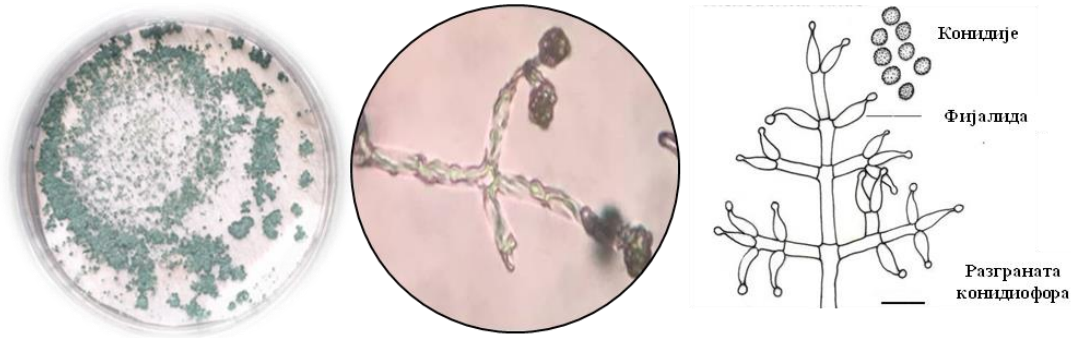
Врсте рода *Aspergillus* се у великом броју налазе у земљишту и веома су значајне за разлагање свеже органске материје и хумуса. Налазе се у намирницама, сточној храни и на зрну житарица у складиштима. Неке врсте узрокују трулеж плодова воћа, кварење уља, џемова, а неке, као што је *A. flavus*, производе микотоксине нпр. афлатоксин Б1. Колоније су различито обојене, што зависи од врсте гљиве али и од подлоге на којој расте (Слика 51). *Aspergillus niger* се користи за производњу лимунске киселине. *Aspergillus oryzae* се користи у прехранбеној индустрији за производњу ферментисаних производа од пиринча и соје, као и за добијање протеолитичких и амилотичких ензима.



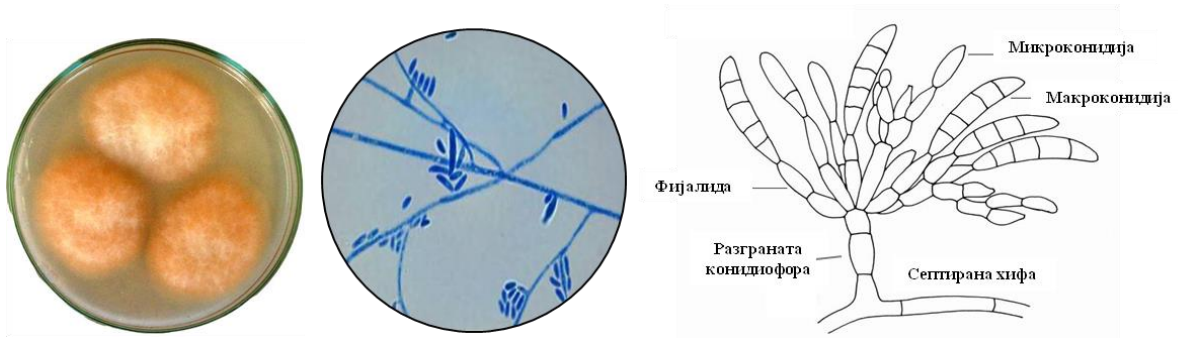
Слика 51. *Aspergillus* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



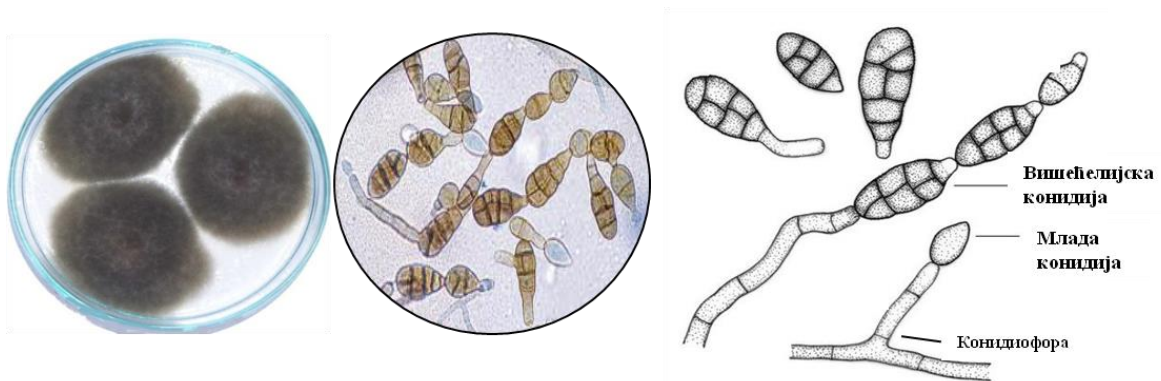
Слика 52. *Penicillium* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



Слика 53. *Trichoderma* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



Слика 54. *Fusarium* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)



Слика 55. *Alternaria* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ)

Припадници рода *Penicillium* стварају сиве, зелене и плавозелене колоније (Слика 52). У земљишту се налазе у великом броју где учествују у разлагању сложених органских материја. Једноћелијске округле конидије се веома лако шире и присутне су у ваздуху па често контаминирају културе других микроорганизама. Неке врсте се користе за производњу антибиотика пеницилина (*P. chrisogenum*). *Penicillium griseofulvum* је извор антибиотика грисеофулвин, који се даје за третирање гљивичне инфекције коже и ноктију. *Penicillium camemberti* и *Penicillium roqueforti* се користе у производњи специјалног сира – камамбера и рокфорта. Штетни представници као што су *Penicillium italicum* и *Penicillium digitatum* узрокују

трулеж плодова цитруса, *Penicillium expansum* узрокује мрку трулеж јабуке, док неки представници производе микотоксине као што је охратоксин А.

Врсте рода *Trichoderma* стварају зеленкаст мицелијум (Слика 53). Конидије су округле, скупљене у групама и личе на плод малине. Најзначајније врсте су *T. reesei*, *T. longibratum*, *T. harzianum*, *T. polysporum*. За земљиште су веома значајне јер интензивно разлажу целулозу. Комерцијални сојеви *Trichoderma* spp. у пољопривредној производњи првенствено се користе у функцији промоције биљног раста и као биофунгициди. *Trichoderma* spp. су високо ефикасни произвођачи многих екстрацелуларних ензима (целулазе, хемицелулазе, хитиназе, ксиланазе).

Врсте рода *Fusarium* стварају мицелијум сличан памуку који може бити бело, ружичасто или пурпурно обојен. Стварају српасте вишећелијске или округле једноћелијске конидије (Слика 54). Паразити су на јечму, пшеници и кукурузу а узрокују и трулеж плодова јужног воћа.

Врсте рода *Alternaria* стварају смеђе вишећелијске крушколике конидије (Слика 55). Узрокују трулеж плодова јабука, лимуна и наранџе, као и мрку пегавост сунцокрета.

*Claviceps purpurea* је фитопатогена гљива из рода *Claviceps*, која паразитира на ражи и на другим житарицама. Заражава плодник цвета и на месту где треба да се формира зрно, гљива формира творевине тамне боје – склероције у којима се налази аскус са аскоспорама. Гљива производи ерготоксин који узрокује нервна оболења, оболења органа за варење, а може изазвати и смрт људи и животиња.

Поједине врсте рода *Cercospora* узрокују пегавост листа шећерне репе, а рода *Erysiphe* пепелницу шећерне репе, житарица и дувана. Гљиве рода *Sclerotinium* узрокују белу трулеж сунцокрета, соје, детелине и луцерке, а врсте рода *Phomopsis* сиву и мрку пегавост сунцокрета и соје.

У раздео Ascomycota спада и већина **КВАСАЦА**. Граде колоније које су изграђене из великог броја густо збијених округлих или елипсастих ћелија. Формирају се на површини супстрата. Ћелије квасаца су округле, елипсасте и издужене, а понекад стварају лажну хифу или псеудохифу. Размножавају се бесполно, пушљењем.

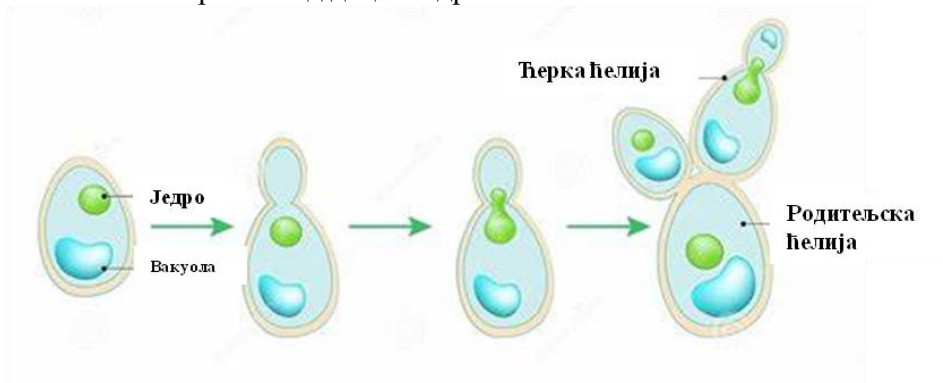
**Квасци су једноћелијске, амицеларне гљиве (не формирају мицелију).**

Квасци се класификују на основу (1) секвенце 18S рДНК и других молекуларних маркера, (2) облика/морфологије ћелија, (3) начина полног размножавања, (4) одређених физиолошких карактеристика (извори угљеника/тип полисахарида који ферментисе и потребе у нутријентима), и (5) биохемијских карактеристика (састав ћелијског зида, тип убихинона у митохондријалном респираторном транспортном ланцу).

Квасци имају значајну улогу у припреми ферментисане хране и напитака широм света. Хлеб и пекарски производи, пиво, вино, сиреви и млечни производи (јогурт, кисело млеко, кефир, кумис), ферментисано месо и кобасице, какао, кафа, силажа, и пробиотици се производе применом квасаца или у комбинацији квасаца са бактеријама.

Најзначајнији родови квасаца који се користе у производњи ферментисане хране и напитака су *Saccharomyces*, *Brettanomyces* (телеоморф *Dekkera*), *Debaryomyces*, *Geotrichum* (телеоморф *Galactomyces*), *Hanseniaspora* (анаморф *Kloeckera*), *Kluuyveromyces*, *Zygosaccharomyces*, *Schizosaccharomyces* и *Candida*.

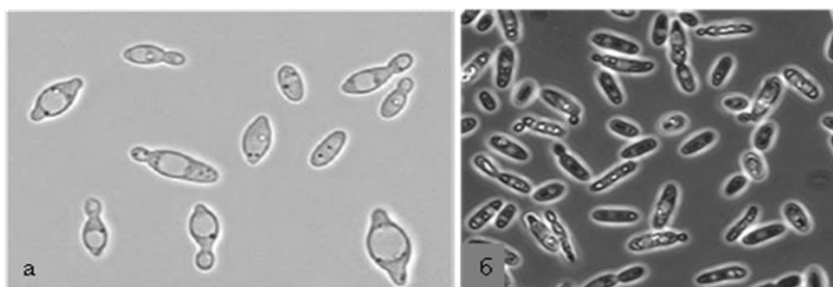
Врсте рода *Saccharomyces* формирају колоније које су сјајне, крем беж боје. Ћелије су округластог облика, док су бластоспоре елипсоидног или издуженог облика. Бесполно се размножавају пупљењем (Слика 56). Формирају псеудомицелију. Полно се размножавају аскоспорама (1 до 4 аскоспоре у акусима). Најпознатије врсте су *S. cerevisiae* (пекарски квасац), *S. paradoxus* (вински квасац) и *S. uvarum* (*carlsbergensis*) (пивски квасац). *Saccharomyces boulardii*, квасац који је први пут изолован у Индокини из воћа, се користи као пробиотик у лечењу болести гастроинтестиналног тракта код деце и одраслих.



Слика 56. Пупљење-вегетативно размножавање квасаца

Врсте рода *Hanseniaspora* (*Kloeckera* је анаморф) имају ћелије облика лимуна. Налазе се на зрелим плодовима воћа где ферментишу шећере (слика 57а).

Врсте рода *Brettanomyces* имају издужене оштре ћелије (Слика 57б). Ферментишу шећере до сирћетне киселине. *Brettanomyces bruxellensis* и *Brettanomyces anomalus* су најпознатији представници рода који узрокују кварење сокова и вина. Међутим, ове врсте су исто познате и по свом позитивном утицају у стварању препознатљивог киселкастог укуса Белгијског пива и “Kombucha”-ферментисаног напитка од чаја.



Слика 57. Квасци-микроскопски препарат:  
а) *Hanseniaspora* sp., б) *Brettanomyces* sp.

Врсте рода *Debaryomyces* расту у млечним производима, стварају слузави слој на вину, сурутки, кобасицама, узрокују кварење воћних сокова и јогурта.

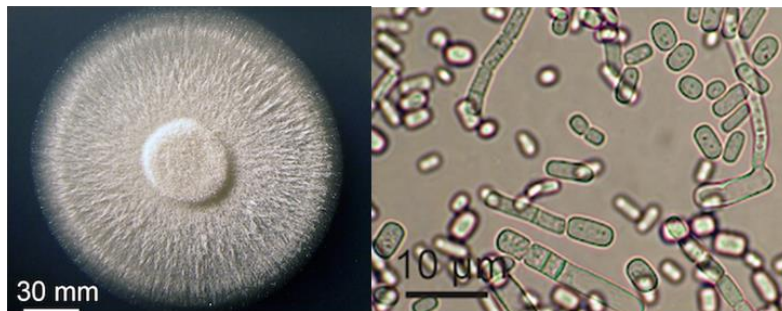
Врсте рода *Geotrichum* стварају мицелијум беле боје (Слика 58). Бесполно се размножавају артроспорама. Поједине врсте узрокују кварење плодова лимуна, брескве, млечних намаза и др. Неке врсте се користе у производњи сира дајући му карактеристичан укус (камембер).

Врсте рода *Kluyveromyces* су квасци млечних производа. Селекционисани сојеви се користе за производњу кумиса и ензима лактазе, а неки узрокују кварење сирева.

Врсте рода *Zygosaccharomyces* веома брзо ферментишу шећере, а поједине врсте узрокују кварење мајонеза.

За врсте рода *Schizosaccharomyces* карактеристично је да се бесполно размножавају деобом.

Врсте рода *Candida* имају ћелије округлог облика, а понекад стварају псеудомицелије. Живе у млевеном месу, кефиру, пиву, воћним соковима. *Candida pintolopesii* и *C. saitoana* се користе и као пробиотски адитиви у храни за животиње.

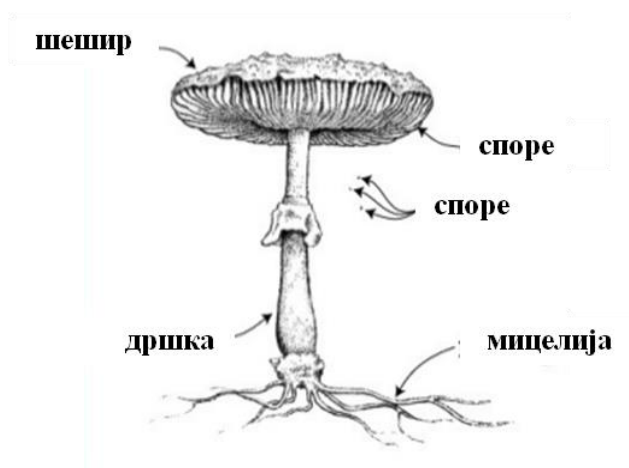


Слика 58. *Geotrichum* sp. (колонија и појединачне ћелије)

### Раздео Basidiomycota

Обухватају гљиве са септираном хифом које праше, печурке, чађавице, гљиве које живе на стаблу дрвета и гљиве које стварају рђу. Полно се размножавају базидиоспорама које се налазе на базидима, а базиди су у базидиокарпима (шеширима) (Слика 59). Бесполно се размножавају фрагментацијом.

Важни представници су *Agaricus bisporus* (шампињон), *Pleurotus ostreatus* (буковача), *Russula* sp., *Boletus* sp., *Puccinia* sp., *Ustilago* sp.. Гљиве *Pleurotus* sp. и *Agaricus* sp. су јестиве. *Russula* sp. и *Boletus* sp. живе на дрвећу и пањевима и разлажу лигнин и целулозу. *Puccinia* sp. и *Ustilago* sp. су фитопатогене. *Puccinia* sp. узрокује рђу на житарицама и сунцокрету, а *Ustilago* sp. узрокује гар пшенице, јечма, овса и кукуруза.



Слика 59. Грађа печурке

У овај раздео спадају и поједини једноћелијски **квасци**. Не могу да расту на целулози, хитину, арабиногалактану и ксантан гуми, али могу да разлажу скроб,

декстран, ксилан, галактоманан, и танинске киселине. Најзначајнији родови су *Cryptococcus*, *Rhodotorula* и *Trichosporon*.

*Rhodotorula sp.* је округлог до елипсастиг облика, бесполно се размножава пупљењем. Колоније су ружичасте. Неке врсте контаминирају храну. *Trichosporon sp.* има округле ћелије. Бесполно се размножавају пупљењем и артроспорама. Ствара праве мицелије. Узрокује кварење мяса. Непатогене врсте родова *Cryptococcus* и *Trichosporon* се користе као разлагачи полисахарида, фенолних једињења, комплексних органских киселина. Користе се и у биодеградацији органске биомасе и ремедијацији загађења пореклом од различитог индустријског отпада.

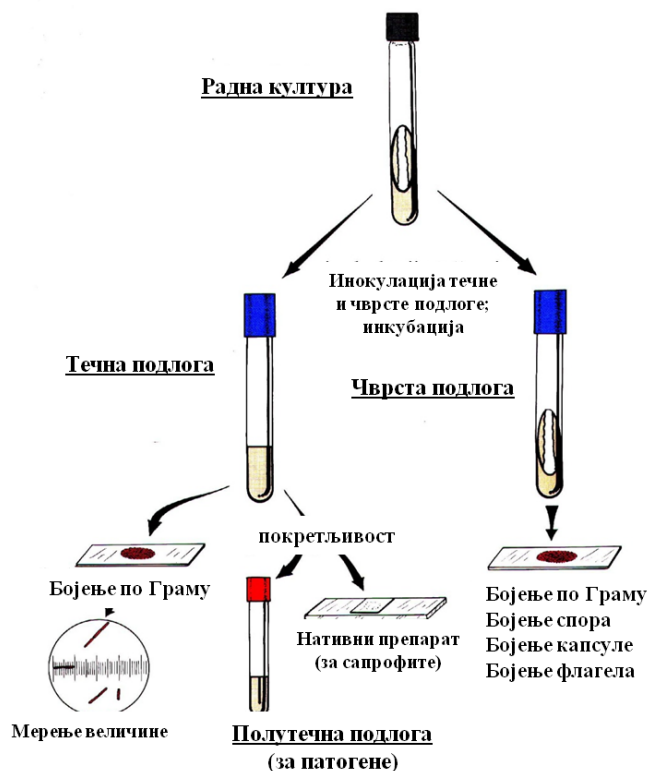
### Неформална таксономска категорија Deuteromycotina

У групу Deuteromycotina сврстане су све гљиве које нису могле да нађу систематско место у оквиру других раздела.

Веgetативна фаза код гљива сврстаних у ову категорију, карактеристична је по присуству септиране хифе и вишећелијских конидија које се формирају директно на хифи. У ћелијском зиду доминира глукан и хитин. Код многих гљива које су сврстане у раздео Deuteromycota или у тзв. групу “Fungi imperfecti”, када се утврди постојање полног начина репродукције, бивају сврстане у други раздео, најчешће у раздео Ascomycota или Basidiomycota.

## 5.4. ИДЕНТИФИКАЦИЈА БАКТЕРИЈА

Бактерије су велика група једноћелијских прокариотских микроорганизама. Приликом њихове идентификације одређује се велик број особина, а први корак је опис морфолошких особина ћелије и колоније. Поступак и својства која се одређују приказани су на слици 60.



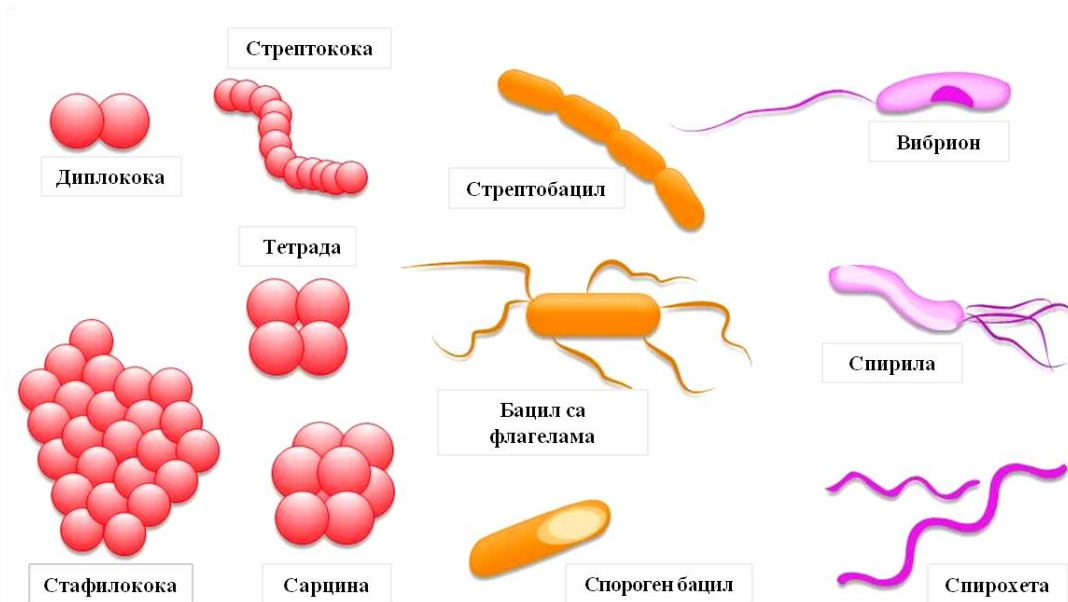
Слика 60. Поступак за одређивање морфолошких особина ћелије бактерије



### 5.4.1. Грађа ћелије и колоније

Морфолошке особине ћелије су облик, величина, покретљивост, грађа ћелијског зида, присуство капсуле, присуство споре, и одређују се одређеним редоследом.

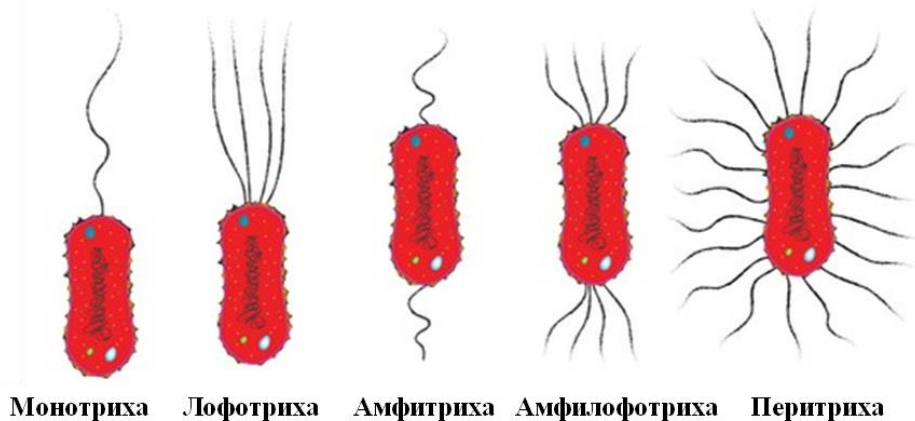
Облик бактерија може бити округлао (монококе, диплококе, тетраде, сарцине, стрептококе, стафилококе), штапићаст (спорогене и аспорогене), извијен (вибрион, спирила, спирохета), кончаст, четвртаст и звездаст (Слика 61).



Слика 61. Најчешћи облици бактерија: округли, штапићасте (бацил) и извијене

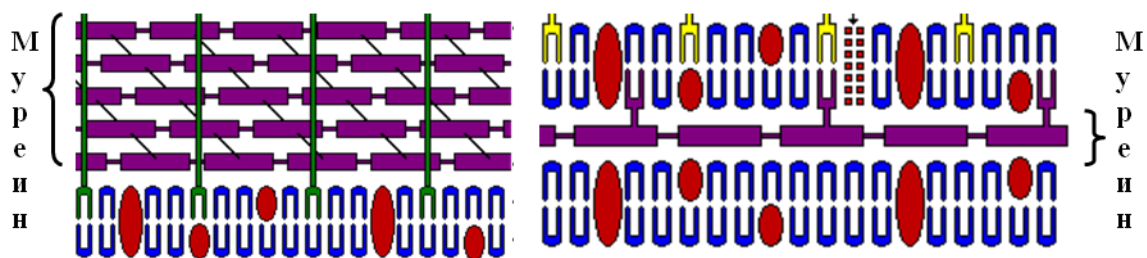
Величина бактерија изражава се у микрометрима ( $\mu\text{m}$ ) при чему се код округлих и звездастих мери пречник, код штапићастих и извијених ширина и дужина, а код кончастих ширина филамента.

Према *покретљивости* бактерије се деле на покретне и непокретне. Покретне бактерије крећу се флагеллама које могу имати различит положај на ћелији (слика 62). Покретљивост се одређује преко нативног препарата. Ако се ћелије крећу у свим правцима, то значи да оне поседују органеле за кретање. Уколико се крећу само у правцу кретања воде или као последица сударања са молекулима суспендованих у течности, то се означава као *пасивно кретање*, и значи да су непокретне.



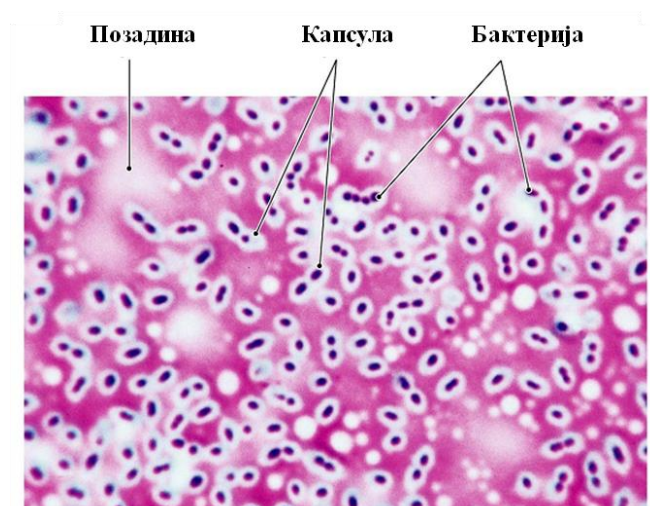
Слика 62. Бактерије са различитим распоредом флагела

Ћелијски зид бактерија је изграђен из муреина. Удео муреина је различит па су бактерије на основу овога својства сврстане у две групе: Грам-позитивне и Грам-негативне (Слика 63).



Слика 63. Ћелијски зид Грам-позитивних и Грам негативних бактерија

Капсула је слузаста слој који се налази око ћелије неких бактерија (Слика 64).

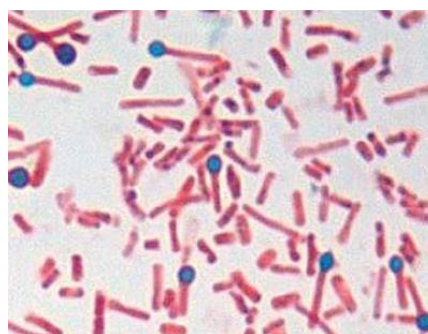


Слика 64. Капсула код бактерија (светао слој око ћелије )

Неке штапићасте бактерије у току развића у својој ћелији стварају облике за конзервацију – **споре**. Споре се могу формирати у центру ћелије а да не мењају ћелији облик (бациларни тип, слика 65), могу се формирати у центру при чему ћелија добије вретенаст облик (кlostридијални тип) или се формира на једном крају ћелије при чему ћелија добије облик чиоде (плектридијални тип, слика 66) .



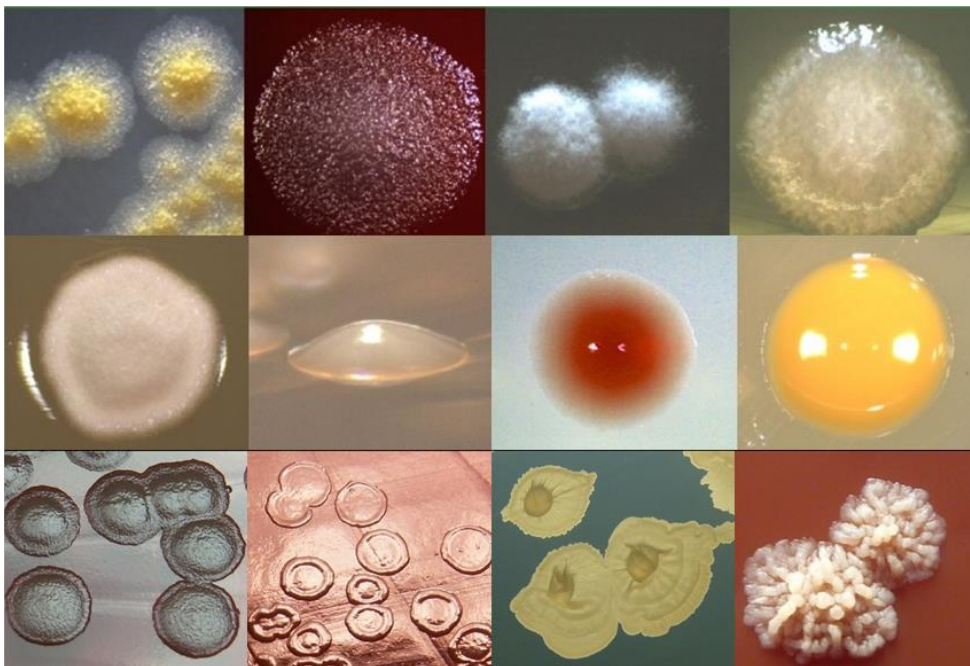
Слика 65. Бациларни тип споре



Слика 66. Плектридијални тип споре

**Морфолошке особине колоније** су облик, величина, профил, површина, положај, боја, ивице и структура. Све карактеристике колоније, осим ивице и структуре, одређују се макроскопски (голим оком).

- Облик колонија може бити тачкаст, округао, сочивасти, неправилан, ризоидан и кончаст.
- По величини колоније могу бити ситне (до 3 mm), средње (до 5 mm) и крупне (преко 1cm).
- Профил колоније може бити раван, испупчен и удубљен.
- Површина колоније може бити глатка, сјајна и наборана.
- Положај колоније у подлози може бити површински и дубински.
- Ивице колоније могу бити равне, таласасте, неправилне, тестерасте и кончасте.
- Структура колоније може бити зрнаста, ковцава и хомогена.
- Боја колоније зависи од врсте и веома је различита (Слика 67).



Слика 67. Примери различите морфологије бактеријских колонија

#### 5.4.2. Исхрана

Највећи број бактерија спада у хетеротрофне организме, дакле користе органска једињења као извор енергије и нутријената. Осим тога, постоје бактерије које спадају у групу хемолитотрофа односно користе неорганска једињења у свом метаболизму. Трећа група су фотоаутотрофне бактерије које спадају у групу продуцентата органске материје (у процесу фотосинтезе). Ту спадају бактерије из раздела цијанобактерија.

#### 5.4.3. Размножавање

Бактерије се размножавају бесполно деобом. Могу се размножавати и коњугацијом.

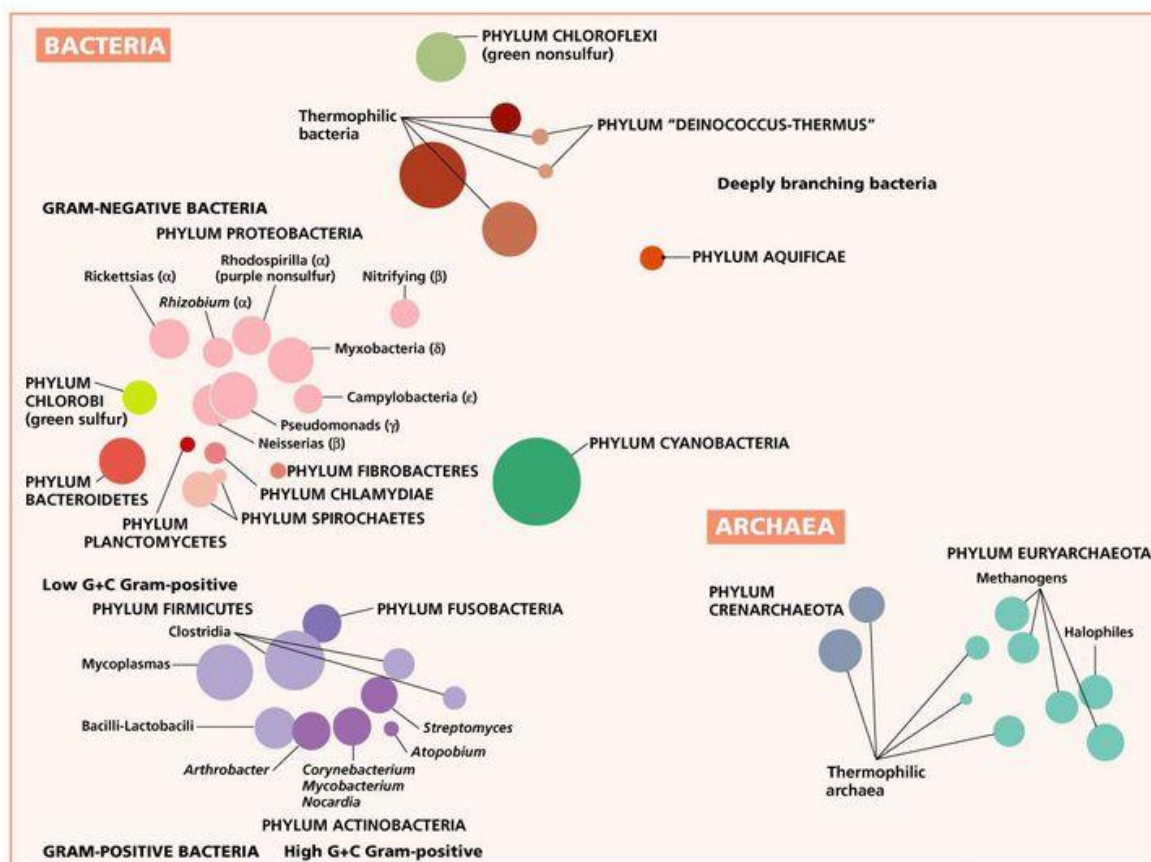
#### 5.4.4. Распрострањеност

Спадају у групу изузетно адаптабилних микроорганизама које настањују све еколошке нише наше планете. Заступљени су у земљишту, води и ваздуху, на биљкама, у бурагу животиња. Спадају у микроорганизме који могу да живе и у анаеробним условима. Имају веома важну улогу у процесу одржавања плодности земљишта. Хетеротрофне бактерије учествују у циклусу кружења материје, где имају улогу минерализатора органске материје. Аутотрофне бактерије су важне због синтезе органске материје. Бактерије такође могу да продукују бројна једињења која позитивно утичу на раст биљке (стимулатори раста), као што су хормони, сидерофоре, витамини итд.

#### 5.4.5. Таксономија

Бактерије обухватају велики број генетички различитих једноћелијских прокариотских микроорганизама. Имају једноставну ћелијску грађу. Међутим, у погледу физиолошких и генетских особина се веома разликују.

Раније класификације заснивале су се на лако уочљивим карактеристикама, као што су бојење по Граму, облик, покретљивост, грађа (споре, филаменти, капсула и сл.). Ова својства се и даље описују приликом детерминисања бактерија до нивоа врсте, али је усвојена нова класификација која се заснива на анализи редоследа нуклеотида у рибозомалној РНК (16S рРНК). На основу тога, прокариоти су подељени у две велике групе, односно у два **DOMEN-a**: **Bacteria** и **Archaea** (Слика 68)



Слика 68. Поједностављен приказ домена Bacteria и Archaea

## Domen Bacteria

У табели 9 је приказан Domen Bacteria са свим разделима и најзначајнијим родовима (Bergey Manual of Systematic Bacteriology, 2005; 2009; 2011; 2012)

Табела 9. Раздели бактерија са најзначајнијим родовима

Раздео	Род
<b>Aquificae</b>	<i>Aquifex, Hydrogenobacter</i>
<b>Thermotogae</b>	<i>Thermotoga, Fervidobacterium</i>
<b>Thermodesulfobacteria</b>	<i>Thermodesulfobacterium, Thermodesulfatator</i>
<b>Dienococcus-Thermus</b>	<i>Dienococcus, Thermus, Marinithermus</i>
<b>Chloroflexi</b>	<i>Chloroflexus, Oscillochloris, Herpetosiphon, Anaerolinea</i>
<b>Thermomicrobia</b>	<i>Thermomicrobium</i>
<b>Nitrospirae</b>	<i>Nitrospira, Leptospirillum</i>
<b>Deferribacteres</b>	<i>Deferribacter, Denitrovibrio</i>
<b>Cyanobacteria</b>	<i>Microcystis, Cyanocystis, Lyngbya, Oscillatoria, Spirulina, Anabaena, Nostoc, Scytonema, Calothrix,</i>
<b>Chlorobi</b>	<i>Chlorobium, Pelodictyon, Chlorobaculum</i>
<b>Proteobacteria</b>	<i>Rhodospirillum, Azospirillum, Rickettsia, Rhizobium, Agrobacterium, Nitrobacter, Xanthomonas, Pseudomonas, Vibrio, Escherichia, Klebsiella, Desulfovibrio, Desulfuromonas</i>
<b>Firmicutes</b>	<i>Bacillus, Lactobacillus, Enterococcus, Leuconostoc, Streptococcus, Lactococcus, Clostridium, Acetobacterium, Desulfotomaculum</i>
<b>Tenericutes</b>	<i>Mycoplasma, Phytoplasma, Spiroplasma</i>
<b>Actinobacteria</b>	<i>Actinomyces, Arthrobacter, Brevibacterium, Cellulomonas, Clavibacter, Corynebacterium, Mycobacterium, Nocardia, Actinoplanes, Propionibacterium, Streptomyces, Frankia</i>
<b>Planctomycetes</b>	<i>Planctomyces, Gemmata, Pirellula, Isosphaera</i>
<b>Chlamydias</b>	<i>Chlamydia</i>
<b>Spirochaetes</b>	<i>Spirochaeta, Borellia, Treponema, Leptospira</i>
<b>Fibrobacteres</b>	<i>Fibrobacter</i>
<b>Acidobacteria</b>	<i>Acidobacterium, Geothrix, Holophaga</i>
<b>Bacterioidetes</b>	<i>Bacteroides, Flavobacterium, Flexibacter, Cytophaga, Toxothrix</i>
<b>Fusobacteria</b>	<i>Fusobacterium, Leptotrichia, Cetobacterium</i>
<b>Verrucomicrobia</b>	<i>Verrucomicrobium, Prosthecobacter</i>
<b>Dictyoglomi</b>	<i>Dictyoglomus</i>

Већина бактерија које су значајне за пољопривредну производњу сврстане су у раздео **Cyanobacteria, Proteobacteria, Firmicutes, Actinobacteria, Fibrobacter** и **Bacterioidetes**.

### Раздео Cyanobacteria

Раздео Cyanobacteria су група фотосинтетичких бактерија великог диверзитета. Ови прокариоти су били први оксигени фототрофи на Земљи и били су задужени за конверзију/промену аноксичне атмосфере наше планете у оксичну. То су Грам-негативне бактерије које поседују хлорофил а, допунске пигменте типа фикоцијанина и фикоеритрина, као и фотосистеме I и II. Облик ћелија цијанобактерија може бити округлао (појединачан, у ланцима и групама) и кончаст

(Слика 69). Такође, неки родови цианобактерија формирају слузави омотач – капсулу око једне или више ћелија.

Боја ћелије, као и колоније, је плаво-зелена, црвена, жута (у зависности од допунских пигмената), а величина је 0,5 до 100  $\mu\text{m}$ . За разлику од већине других бактерија, не поседују ензим  $\alpha$ -кетоглутарат дехидрогеназу, те се ослањају на пентозо-фосфатни тип гликолизе.

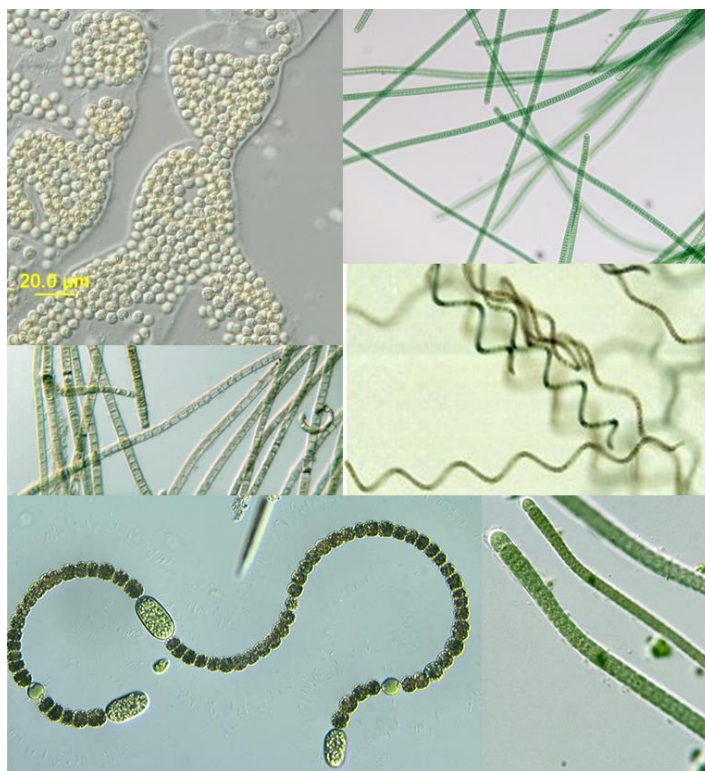
Поједини представници врше биолошку фиксацију атмосферског азота у специјализованим ћелијама дебелог ћелијског зида без хлоропласта. Те ћелије се називају хетероцисте. У хетероцистама се налази ензим нитрогеназа (одговоран за фиксацију атмосферског азота) и само фотосистем I, који је битан за продукцију АТФ-а. Фотосистем II се не налази у хетероцистама да би се спречило ослобађање  $\text{O}_2$  који инхибира ензим нитрогеназу.

Живе у слатким и сланим водама, у влажном земљишту и на надземним деловима биљке. Значајни родови су *Microcystis*, *Cyanocystis*, *Lyngbya*, *Oscillatoria*, *Spirulina*, *Anabaena*, *Nostoc*, *Scytonema*, *Calothrix*, *Tolypothrix* итд.

Таксономија раздела Cyanobacteria на основу Bergey's Manual (2015) групише све цијанобактерије у једну класу са пет редова (три реда за цијанобактерије које не формирају хетероцисте и два реда за цијанобактерије које формирају хетероцисте).

Ред Chroococcales	једноћелијске, размножавање деобом
Ред Pleurocapsales	једноћелијске, ћерке ћелије мање од родитељске
Ред Oscillatoriales	филаментозне, формирају трихоме
Ред Nostocales	филаментозне, имају хетероцисте, стварају хормогоније
Ред Stigonematales	филаментозне, имају хетероцисте, стварају хормогоније

Цијанобактерије из редова Chroococcales, Pleurocapsales и Oscillatoriales такође имају азотофиксирајуће представнике.



Слика 69. Различите цијанобактерије

Способност фиксације атмосферског азота је важно својство цијанобактерија које је нашло примену нарочито у пољопривреди. Одвија се у аеробним и анаеробним условима, а свој допринос различитим екосистемима остварују кроз различите механизме.

У земљишту цијанобактерије производе значајну количину полисахарида који су битни за агрегацију земљишних колоида и побољшање структуре земљишта. На тај начин се позитивно утиче на водно-ваздушни и топлотни режим земљишта. Цијанобактерије које живе у ризосфери биљке продукцијом хормона стимулишу њен раст али и активност других микроорганизама који живе у непосредној близини корена. Цијанобактерије продукују и материје антимикуробних својстава које су битне за сузбијање биљних патогена. Након угинућа, цијанобактерије представљају значајну органску биомасу односно извор нутријената за друге микроорганизме и биљке.

### Раздео *Proteobacteria*

Раздео *Proteobacteria* садржи пет класа: *Alfaproteobacteria*, *Betaproteobacteria*, *Gammaproteobacteria*, *Deltaproteobacteria*, и *Epsilonproteobacteria*. Ова подела је настала на основу анализе секвенце 16S рРНК. *Proteobacteria* броје преко 400 родова, све су Грам-негативне, аспорогене бактерије. Предпоставља се да су еволуирале од фотосинтетичког претка, али да су изгубиле ту способност услед адаптације на нове еколошке услове.

*Alphaproteobacteria* ( $\alpha$ -*proteobacteria*) су бактерије које могу расти у условима смањеног садржаја нутријената (пример: олиготрофни облици). Најзначајнији представници припадају родовима: *Rhodospirillum*, *Azospirillum*, *Rickettsia*, *Rhizobium*, *Agrobacterium*, *Nitrobacter*, *Hyphomicrobium*, *Methylobacterium* итд.

*Betaproteobacteria* ( $\beta$ -*proteobacteria*) користе једињења која настају минерализацијом органске материје у анаеробним условима. Поједини представници су патогени. Значајни родови су *Thermothrix*, *Bordetella*, *Leptothrix*, *Neissaria*, *Aquaspirillum*, *Nitrosomonas*, *Gallionella*, *Spirillum* итд.

*Gammaproteobacteria* ( $\gamma$ -*proteobacteria*) су хемоорганотрофи, већином факултативно анаеробне бактерије. Важни представници припадају родовима *Chromatium*, *Xanthomonas*, *Beggiatoa*, *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Photobacterium*. У ову групу спадају и тзв. колиформне бактерије из фамилије *Enterobacteriaceae* са врстама које припадају родовима *Escherichia*, *Shigella*, *Salmonella*, *Enterobacter*, *Proteus*, *Yersinia* итд. Иако већина ових бактерија спада у сапрофите, значајни су патогени сојеви који изазивају разна оболења и стања код људи и животиња.

*Deltaproteobacteria* ( $\delta$ -*proteobacteria*) су углавном анаероби из родова *Desulfovibrio*, *Desulfuromonas* итд. Поједини представници, као што су врсте из родова *Vdellovibrio* и *Bacteriovorax*, су предатори других бактерија. *Mухосoccus*, *Polyangium* и *Chondromyces* (Слика 70) имају способност формирања вишећелијских плодноносних тела/структура/творевина у условима стреса (сличне су спорангијама где настају споре) и такође спадају у групу предаторских бактерија.



Слика 70. Раст *Chondromyces crocatus* на хранљивој подлози

Epsilonproteobacteria (E- proteobacteria) су мала класа са представницима из родова *Helicobacter* и *Campylobacter*. Значајни су хумани и анимални (животињски) патогени.

### **Раздео Firmicutes**

Раздео Firmicutes су Грам-позитивне бактерије, са ниским G + C садржајем (мање од 50%) у својој ДНК. Већина бактерија су хемохетеротрофи. Најзначајније класе овог раздела су Clostridia и Bacilli.

Clostridia су бактерије различите морфологије, спадају у облигатне анаеробе. Постоје представници који не производе споре. Значајни родови су *Clostridium*, *Acetobacterium*, *Desulfotomaculum*, *Eubacterium*, *Heliobacterium*, *Syntrophomonas* итд.

Представници класе Bacilli су бактерије округлог или штапићастиг облика, аероби или факултативно анаероби. Могу формирати ендоспоре (врсте из родова *Bacillus*, *Sporosarcina*, *Paenibacillus*). Распрострањени су у земљишту, води, ваздуху, али и у биљкама, животињама, у хуманој популацији. Већина бацилуса су непатогени, неколико врста су изазивачи болести код животиња и људи, пре свега због продукције токсина (*Bacillus anthracis*).

### **Раздео Actinobacteria**

Раздео Actinobacteria садржи једну класу Грам-позитивних актинобактерија са високим G + C садржајем (од 50 до 55%). Актиномицете су хетеротрофне бактерије, у великом броју настањене у земљишту. Ћелије већине актиномицета су кончастог облика па подсећају на хифе гљива. Постоје врсте актиномицета које имају ћелије округлог или штапићастиг облика. Дебљина хифе се креће од 1 до 2,5  $\mu\text{m}$ . Спороносци су хифе на чијем крају се образују вегетативне споре. Спороносци могу бити равни, спирални, разгранати. Споре на спороносцима се образују фрагментацијом и сегментацијом, и то формирањем једне или две споре на врху спороносца или образовањем спора у микроспорангијама

Значајни родови обухватају *Actinomyces*, *Arthrobacter*, *Brevibacterium*, *Cellulomonas*, *Clavibacter*, *Corynebacterium*, *Mycobacterium*, *Nocardia*, *Actinoplanes*, *Propionibacterium*, *Streptomyces*, *Frankia* итд. Најзначајнији и најкомплекснији род је *Streptomyces* са преко 500 врста.

*Streptomyces* spp. су продуценти бројних биоактивних молекула односно секундарних молекула типа антибиотика и екстрацелуларних хидролитичких ензима. Значајни су и због стварања једињења која имају антиканцерогена својства. У пољопривредној производњи се користе као PGP микроорганизми, али и као биоконтролни агенс у борби против биљних фунгалних патогена.

### **Раздео Fibrobacteres**

Раздео Fibrobacteres садржи једну класу (Fibrobacteres) и један род (*Fibrobacter*). У ранијим класификацијама бактерије рода *Fibrobacter* су биле класификоване под раздео Bacteroidetes, али су издвојене у посебан раздео пре свега због физиолошких разлика са припадницима Bacteroidetes бактерија. *Fibrobacter* је целулолитичка, анаеробна, аспорогена, Грам-негативна, непокретна бактерија која настањује румен преживара где учествује у разградњи целулозе. У тим ферментативним процесима као главни продукт настаје сукцининска киселина, а у мањој количини се ствара сирћетна и мравља киселина. Изоловане су и описане само две врсте (*F. succinogenes* и *F. intestinalis*).



## Раздео Bacteroidetes

Раздео Bacteroidetes је такође познат и као *Cytophaga–Flexibacter–Bacteroides* група која обухвата велики број морфолошки и физиолошки различитих бактеријских врста. Раздео је подељен на три класе: Bacteroides, Flavobacteria и Sphingobacteria са најзначајнијим родовима као што су Bacteroides, Flavobacterium, Flexibacter, Cytophaga, Toxothrix итд.

*Flexibacter* и *Cytophaga* су покретне бактерије (*gliding movement*) већег еколошког значаја, заступљене у већем броју у земљишту, док су бројне врсте бактерија из класе Bacteroides углавном заступљене у гастроинтестиналном тракту животиња (преживари), мада настањују и земљиште, слатке и слане воде.

Bacteroides су значајне у процесима разградње органске материје у аеробним и анаеробним условима, иако постоје и патогене врсте које нападају разне биљке и животиње. *Flavobacterium johnsoniae* је опортунистички патоген који доводи до меке трулежи поврћа. Врсте из родова *Zobellia*, *Cellulophaga* и *Kordia* имају алгицидно дејство. *Elizabethkingia meningo-septica* је хумани опортунистички патоген који изазива менингитис код новорођенчади.

## Domen Archaea

Domen Archaea је подељен на свега два раздела. Најзначајнији представници су приказани у табели 10.

### Раздео Crenarchaeota

Раздео Crenarchaeota садржи једну класу *Thermoprotei*, која је подељена у три реда: *Thermoproteales*, *Desulfurococcales* и *Sulfolobales*. Морфолошки су веома различити, са представницима округлих, штапићастих, филаментозних до дискоидних облика ћелија. Грам-негативне су, покретљивост је забележена код само неколико родова. Спадају у групу облигатно термофилних бактерија, при чему расту на температурама између 70 и 113°C. Осим тога, бактерије овог раздела су и ацидофилни микроорганизми, аеробни, факултативно анаероби или стриктни анаероби, хемолитоаутотрофи или хемохетеротрофи.

### Раздео Euryarchaeota

Раздео Euryarchaeota садржи седам класа: Methanobacteria, Methanococci, Halobacteria, Thermoplasmata, Thermococci, Archaeoglobi и Methanopyri. Јављају се као штапићи, коке, неправилне коке, спирале, а постоје ћелије које су дискоидног, троугластог или квадратног облика. Могу бити Грам-позитивне или Грам-негативне, у зависности од присуства псевдомуреина у ћелијском зиду. По значају се могу издвојити пет великих физиолошких група археобактерија и то метаногене архее, екстремно халофилне архее, архее без ћелијског зида, сулфат редукујуће архее и екстремно термофилне.

Табела 10. Раздели археа са најзначајнијим родовима

Раздео	Род
Crenarchaeota	<i>Thermoproteus</i> , <i>Desulfurococcus</i> , <i>Pyrodictium</i> , <i>Sulfolobus</i>
Euryarchaeota	<i>Methanobacterium</i> , <i>Methanococcus</i> , <i>Halobacterium</i> , <i>Thermoplasma</i> , <i>Thermococcus</i> , <i>Archaeoglobus</i> , <i>Methanopyrus</i>

## 6. МИКРОБИОЛОГИЈА ЗЕМЉИШТА

Биогеност земљишта процењује се на основу бројности систематских и физиолошких група микроорганизама и ензиматске активности земљишта.

### 6.1. УЗИМАЊЕ И ЧУВАЊЕ УЗОРАКА ЗЕМЉИШТА

Да би се добили објективни и тачни резултати приликом микробиолошке анализе узорака земљишта, веома је важно обратити пажњу на начин узимања, транспорта и чувања самих узорака земљишта.

Узорци земљишта узимају се сондом, ашовом или ножем који се претходно стерилишу етил-алкохолем (70%). На сваких 100 m<sup>2</sup> површине, узима се узорак земљишта са 3 до 5 места, добро се измеша и за анализе остави око 0,5 kg просечног узорка. Са које дубине ће узорак бити узет зависи од циља истраживања. Узорци земљишта се могу узети из педолошких профила, ораничног слоја или из ризосфере. Узети узорци земљишта се стављају у стерилне полиетиленске врећице или у посуде које могу бити металне, стаклене или пластичне. Неопходно је у што краћем временском периоду пренети узорке у лабораторију. Уколико се локација узимања узорка земљишта налази далеко од лабораторије, узорци се стављају у ручне хладњаке и на тај начин транспортују до места анализе.

Након што су узорци земљишта донети у лабораторију, анализе се врше или у року од 24 сата или се узорци земљишта чувају на 4°C максимално три недеље. У зависности од методе која се користи у току анализе, узорци земљишта се могу осушити на собној температури, просејати и тако чувати највише до годину дана. Овако осушени узорци земљишта се углавном користе за ензиматску анализу земљишта.

Оно на шта треба обратити посебну пажњу током преношења, чувања и самог рада са узорцима земљишта, јесте стерилност. Веома је важно спречити контаминацију узорка из ваздуха, нестерилног прибора или другог земљишта. Контаминација из ваздуха је мање битна јер је број микроорганизама у ваздуху релативно мали, док је контаминација земљиштем из другог узорка веома значајна јер може утицати на коначни резултат истраживања.

### 6.2. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ

Приликом процењивања и одређивања биогености одређеног типа земљишта, од систематских група микроорганизама најчешће се одређује бројност правих и зракастих бактерија, цијанобактерија, укупан број гљива, алги и протозоа. Од физиолошких група микроорганизама, одређује се бројност микроорганизама који учествују у циклусу кружења азота (аминохетеротрофи, протеолитички, нитрификатори, азотофиксатори, денитрификатори), угљеника (целулолитски микроорганизми, целулолитске гљиве и бактерије, амилитски и пектинолитски микроорганизми), фосфора (фосфоминерализатори, фосфомобилизатори) и сумпора.

Бројност микроорганизама у земљишту може се одредити директним или индиректним методама.

#### 1. Директне методе за одређивање бројности микроорганизама у земљишту

Постоји неколико метода за директно одређивање бројности микроорганизама у земљишту, а најчешће су у употреби следеће:

- Одређивање броја микроорганизама светлосним микроскопом - Честица испитиваног узорка земљишта стави се стерилном пинцетом на предметну плочицу у кап воде и посматра. У неким случајевима се честица испитиваног земљишта утисне на агар на предметној плочици, а потом прекрије покровним стакалцем и посматра. Уколико је потребно, земљиште треба обојити да би се микроорганизми боље видели.

- Одређивање броја микроорганизама флуоресцентним микроскопом - Поступак је сличан као и у предходној методи, само што се за бојење земљишта користи флуоресцин-изотиоцијанат и за посматрање се користи флуоресцентни микроскопом. Микроорганизми у зависности од састава ћелијских протеина различито флуоресцирају.

- Одређивање бројности микроорганизама капиларном техником - Метода се заснива на примени специјалног капиларног прибора – педоскопа и светлосног или флуоресцентног микроскопа.

## **2. Индиректне методе за одређивање бројности микроорганизама у земљишту**

Индиректним методама број микроорганизама одређује се засејавањем честица земљишта или одређене количине суспензије земљишта на хранљиве подлоге. Засејане подлоге се стављају на инкубацију у термостат, а након истека времена инкубације одређује се број колонија. Том приликом могу се користити чврсте или течне хранљиве подлоге.

Постоји пет метода за индиректно одређивање бројности микроорганизама у земљишту:

- Метода фертилних зрнаца - За одређивање броја микроорганизама овом методом неопходно је предходно разлити подлогу у Петри кутије и оставити да се охладе. Испитивано земљиште се просеје кроз сито отвора 2 mm и стерилном пинцетом ставља се најчешће 25 зрнаца земљишта по површини очврсле подлоге. У зависности од типа земљишта, понекада се може поставити и већи број зрнаца. Након инкубације у термостату, око зрнаца земљишта формирају се колоније микроорганизама. Приликом израчунавања број засејаних зрнаца узима се као 100 % а број зрнаца око којих су се формирале колоније као X. На тај начин се добије % фертилних зрнаца који указује на заступљеност те групе микроорганизама у испитиваном земљишту.

- Метода земљишних плоча - Дно стерилне Петри кутије прекрије се танким слојем уситњеног дрвеног угља који служи за дренажу. Посебно се одмери одређена количина земљишта коме се додају хранљиви састојци за оне микроорганизме чији се број одређује. Земљишту се додаје вода до момента zasiћења. Припремљена земљишна паста се сипа у стерилне Петри кутије са слојем угља и шпатулом се изравна површина. У пасту се увуче стаклена цевчица дужине 2cm која обезбеђује аерацију. После инкубације на површини земљишне плоче израсту колоније микроорганизама које се изброје и број прерачуна на 1g земљишта.

- Метода агарних плоча - Метода агарних плоча се најчешће користи приликом одређивања бројности микроорганизама у земљишту. За ову методу је веома важно водити рачуна о избору правилног разређења. Различити типови земљишта својим физичким и хемијским својствима условљавају различит квантитативни и квалитативни састав микроорганизама, па се према томе одређује степен разређења узорка земљишта. Узорак земљишта из кога је извршено засејавање осуши се на 105°C, пошто се број микроорганизама обично израчунава на

1g апсолутно сувог земљишта. Формула за израчунавање броја микроорганизама гласи:

$$B = (a \times b \times c) / d$$

где је:

- Б - број микроорганизама у 1 g апсолутно сувог земљишта
- а - просечан број колонија које су израсле на засејаним Петри кутијама
- б - коефициент корекције на 1ml (2 - ако је засејавање вршено са 0,5ml, или 5- ако је засејавање вршено са 0,2 ml)
- ц - разређења којим је извршено засејавање
- д - маса једног грама апсолутно сувог земљишта из ког је извршено засејавање.

- Метода капи - Хранљива подлога се отопи и разлије у Петри кутије и остави да се охлади и стегне. Узорак испитиваног земљишта припреми се методом разређења. Стерилном пипетом се узме одређена количина (најчешће 0,2 ml) одговарајућег разређења. Из ког разређења ће се узети суспензија зависи од наше претпоставке о томе колика је бројност микроорганизама у испитиваном узорку земљишта. Узета количина суспензије се потом распореди у 25 до 50 једнаких малих капи по површини подлоге. Након одређеног периода инкубације у термостату, броје се колоније које су израсле на местима где су стављане капи. Број се прерачунава на 1g апсолутно сувог земљишта. Ова метода се углавном користи за одређивање броја микроорганизама чија је бројност у земљишту мала.

- Одређивање броја микроорганизама у течним хранљивим подлогама - За одређивање бројности микроорганизама у течним хранљивим подлогама користе се McCrady-eve таблице. Ова метода се базира на одређивању количине једињења насталих као продукти метаболизма. Друга могућност је одређивање броја преко количине биомасе која се формирала у подлози. Број се може одредити и микроскопски прављењем препарата из засејане хранљиве подлоге и бројањем ћелија.

### 6.3. ЕНЗИМАТСКА АКТИВНОСТ ЗЕМЉИШТА

Највећи део ензима у земљишту је пореклом од микроорганизама. Ензиматска активност земљишта добар је показатељ плодности земљишта. За пољопривредну производњу најважније је одредити активност ензима дисања (дехидрогеназе), потом ензима из циклуса азота (протеаза, уреаза, нитрат и нитрит редуктазе, нитрогеназа), угљеника (целулаза, амилаза, пектиназа) и фосфора (фосфатаза).

Постоји више метода за одређивање ензиматске активности земљишта, а највише се користе спектрофотометријске, титриметријске методе и методе гасне хроматографије.

## 7. ПРОВЕРА КВАЛИТЕТА МИКРОБИОЛОШКИХ ЋУБРИВА

Микробиолошка ђубрива углавном садрже микроорганизме из родова *Bacillus*, *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Azotobacter*, *Trichoderma*, *Saccharomyces*, *Glomus*. Највише препарата, моновалентних и поливалентних, садржи Грам-позитивну спорогену бактерију из рода *Bacillus*. Ћубрива са овом бактеријом често имају рок трајања око једне до две године, поједини произвођачи декларишу рок трајања и до три године.

Произвођачи микробиолошких ђубрива на декларацији наводе да ова ђубрива стимулишу раст биљака, смањују појаву штеточина и оболења, поспешују минерализацију органске материје или позитивно утичу на физичко-хемијска својства земљишта. Иако велика већина произвођача наводи вишеструке ефекте примене микробиолошких ђубрива, главни ефекат је стимулација биљног раста.

С обзиром да микробиолошка ђубрива садрже живе организме, неопходна је редовна контрола квалитета. Квалитет се најчешће односи на број микроорганизама у једном граму или милилитру биопрепарата. Број микроорганизама се може одредити директном методом (бројањем под микроскопом) и индиректном методом (засејавањем суспензије ђубрива одређеног разређења на одговарајуће хранљиве подлоге). Обе методе имају предности и недостатке, а одабир зависи од врсте анализе која се спроводи у циљу провере квалитета микробиолошког ђубрива. Када је битно утврдити број живих ћелија, ради се индиректна метода. Спецификације квалитета и који параметри се контролишу се разликују од државе до државе и дефинисане су правилницима које свака држава формулише. Осим врсте и броја микроорганизама, проверавају се и физичко-хемијска својства носача препарата, присуство контаминаната/загађивача, рН ђубрива, садржај воде и др.

Провера квалитета се мора спроводити у различитим фазама производње ђубрива као што су производња чисте културе микроорганизама, одабир и припрема носача, ферментација, паковање, складиштење (Слика 71).

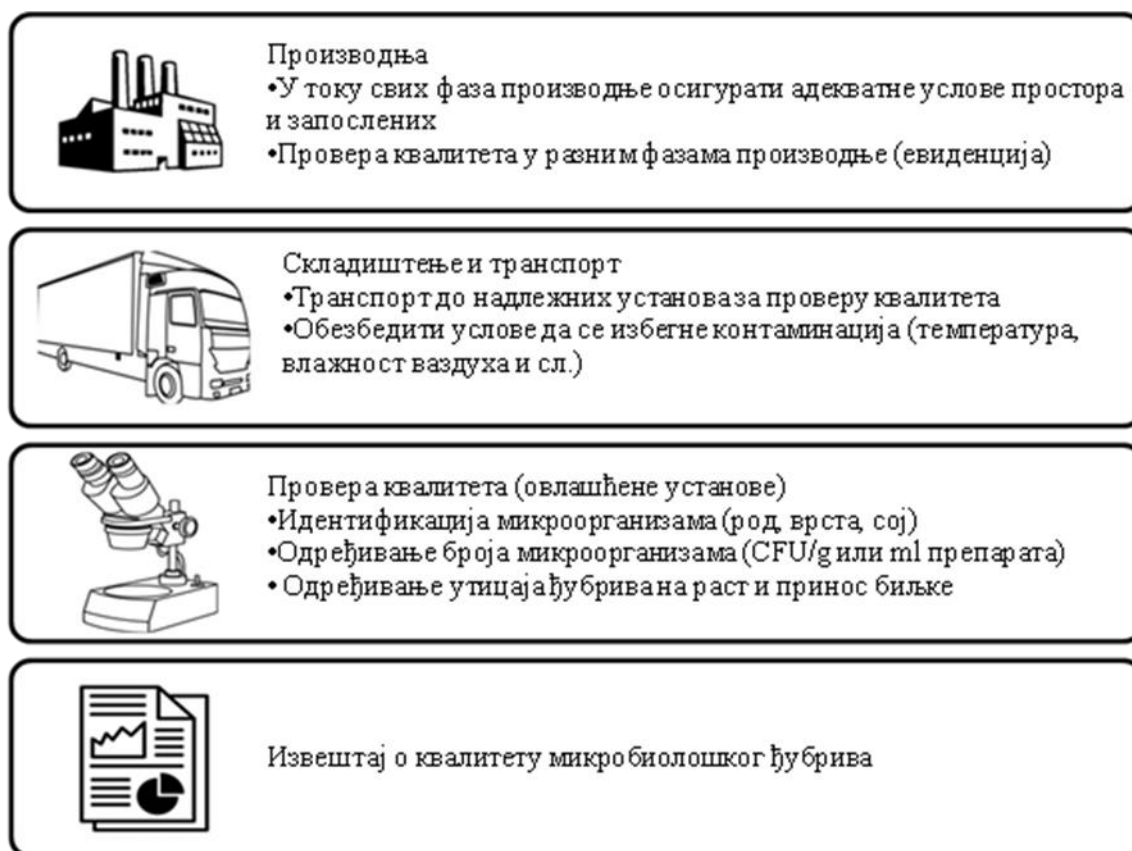
Уопштено, мере контроле квалитета микробиолошких ђубрива треба утврдити на основу следећих стандарда квалитета:

1. Инокулант треба да буде на чврстом носачу или да је у течности.
2. Инокулант треба да садржи најмање  $10^6$  до  $10^9$  ћелија микроорганизама (CFU/g или ml) (CFU од *colony-forming unit*, број израслих колонија) у зависности од типа и подтипа микробиолошког ђубрива, више од 10 спора и инфективних пропагула микоризних гљива на 1g препарата, када се чува на 25 до 30°C (Правилника о условима за разврставање и утврђивање квалитета средстава за исхрану биља, одступањима садржаја хранљивих материја и минималним и максималним вредностима дозвољеног одступања садржаја хранљивих материја и о садржини декларације и начину обележавања средстава за исхрану биља, («Сл. Гласник РС», бр.30/2017)).
3. Инокулант треба да има најмање 6 месеци рок трајања од датума производње.
4. рН инокуланта треба да буде између 6,0 и 7,5.
5. Инокулант треба да покаже ефикасност на одређеном усеву пре истека рока употребе.
6. Инокулант мора имати одговарајуће паковање (полиетиленске кесе, боце, канистри итд.).
7. Свако паковање треба да буде читко означено тако да садржи информације о комерцијалном називу производа, називу и броју микроорганизама, начину примене, врсти носача, називу и адреси произвођача, серијским и кодним бројевима, датуму

производње, датуму истека рока употребе, нето количини и упутства за складиштење.

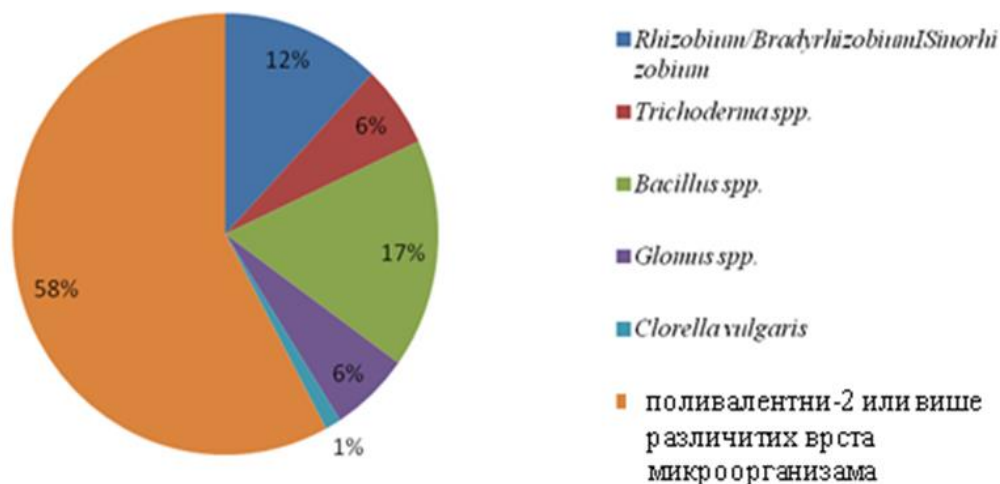
8. Треба да буде без загађивача/загађења другим микроорганизмима (максимално 1%).

Сама контрола квалитета микробиолошких ђубрива врши се на основу члана 17. став 3, члана 23. став 5. и члана 24. став 4. **Закон о средствима за исхрану биља и оплемењивачима земљишта** („Службени гласник РС”, број 41/09), и произилазећег ПРАВИЛНИКА о условима за разврставање и утврђивање квалитета средстава за исхрану биља, одступањима садржаја хранљивих материја и минималним и максималним вредностима дозвољеног одступања садржаја хранљивих материја и о садржини декларације и начину обележавања средстава за исхрану биља («Сл. Гласник РС», бр.30/2017) .



Слика 71. Фазе провере квалитета микробиолошког ђубрива

У нашој земљи, регистровано је више од 90 микробиолошких ђубрива (Извор: Листа регистрованих средстава за исхрану биља и оплемењивача земљишта који се могу користити у органској производњи, Министарство пољопривреде, шумарства и водопривреде Републике Србије, 2023 година). Највећи број препарата спада у групу поливалентних микробиолошких ђубрива који садрже више врста микроорганизама стимулатора биљног раста и који помажу мобилизацију хранљивих елемената из неприступачних органских и минералних једињења (Слика 72).



Слика 72. Процентуални удео микробиолошких ђубрива регистрованих у Републици Србији

Производњом, дистрибуцијом и продајом микробиолошких ђубрива може да се бави произвођач, дистрибутер и увозник који је регистрован у Регистар привредних субјеката и Регистар дистрибутера и увозника у складу са законом којим се уређује регистрација привредних субјеката, дистрибутера и увозника.

Ђубрива морају бити декларисана и обележена. Квалитет мора одговарати подацима о квалитету који су наведени у декларацији. Подаци о квалитету који су наведени у декларацији морају бити написани јасно и читљиво, на начин да се не могу избрисати или одстранити.

Произвођач је дужан да врши контролу квалитета сваке партије произведених производа пре стављања у промет и да о томе води евиденцију.

Такође, законом је регулисан увоз, дистрибуција и продаја микробиолошких ђубрива из иностранства. Та ђубрива морају прво да се региструју у нашој земљи (регистар у Министарству пољопривреде), испуњавајући одређене услове. Одређују се основне физичко хемијске особине ђубрива, врши се идентификација микроорганизама, одређује титар и спроводе експерименти за проверу ефективности микробиолошког ђубрива. Такође се врше испитивања о штетности препарата (утицај на друге организме, животну средину итд).

Приликом увоза микробиолошких ђубрива, на граничном прелазу фитосанитарна служба изврши узорковање и шаље узорак на проверу у надлежне овлашћене установе. Проверава се титар односно број микроорганизама (CFU/g или ml узорка) у микробиолошком ђубриву. Након позитивног извештаја се одобрава увоз у земљу.

## 8. МИКРОБИОЛОГИЈА СТОЧНЕ ХРАНЕ

Микроорганизми доспевају у сточну храну биљног порекла првенствено са биљака и семена, а у мањем броју са машина за сецкање, са алата за убацивање исецкане биљне масе и набијање силаже, са зидова и подова силоса и из ваздуха. Микроорганизми у сточну храну доспевају током процеса производње, прераде, складиштења, транспорта или употребе.

Микроорганизми у производњи сточне хране могу имати корисну и штетну улогу. Позитиван утицај микроорганизама базира се на:

- способности микроорганизама да производе различите витамине, киселине, антибиотике и ензиме;
- хемијском саставу саме ћелије, па представљају добар извор протеина (оплемењивање хранива);
- способности микроорганизама да ферментису шећере, што се користи за производњу и конзервирање хране (силаже);
- способности њиховог брзог умножавања.

Са друге стране, поједини сапрофитни микроорганизми, фитопатогени и токсикогени микроорганизми могу изазвати значајне нежељене последице, као што су кварење хране, стварање токсина, термогенезу, разлагање протеина и других хемијских састојака хране. Све ово веома умањује квалитет и постојаност сточне хране, због чега храниво постаје неупотребљиво за исхрану стоке. Из тог разлога, веома је важно водити рачуна о броју микроорганизама у сточној храни, као и о микробиолошкој контаминацији хранива, те наћи и применити на време адекватне мере да се негативне последице избегну.

Бројност и активност микроорганизама у сточној храни највише зависи од врсте хранива, времена складиштења, хемијског састава и рН, влаге, температуре, аеробних и анаеробних услова.

Најчешће сапрофитне бактерије у сточној храни су бактерије рода *Bacillus*, *Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Propionibacter*, *Flavobacterium*, *Proteus*, *Nocardia*, *Escherichia*. Од сапрофитни гљива, у сточној храни најприсутније су гљиве рода *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Alternaria*, *Cladosporium*. Од патогених и условно патогених бактерија, у сточној храни најчешће су присутне бактерије рода *Salmonella*, *Clostridium*, *Escherichia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Rickettsia*, *Brucella*.

У зависности од врсте сточне хране, приликом испитивања микробиолошке исправности сточних хранива, одређује се укупна бројност сапрофитних бактерија и гљива, присутност рода *Salmonella*, сулфиторедукујућих кластридија, токсикогених гљива, број млечних и протеолитичких бактерија.

1. Бројност микроорганизама (бактерија и гљива) у сточној храни одређује се методом агарних плоча, засејавањем разређене суспензије хране на одговарајуће храниве подлоге. **Укупан број бактерија** одређује се на хранљивом агару или РСА подлози. Засејана подлога се инкубира на 30°C, 3 дана а након тога се изброје израсле колоније, а резултат изрази као CFU/g. **Бројност гљива** одређује се на Чапековом или Сабуровом агару, а може и утврђивањем количине слободне воде у узорку, и то на DRBC или DG18 подлози.

2. ***Salmonella spp.*** садрже ендотоксине и патогене су за људе и животиње. Изолација и идентификација се врши на подлогама SS (*Salmonella-Shigella* агар) и Вилсон-Блер агар (*Wilson-Blair*) и инкубира на 37°C у трајању од 24 до 48 сати. На SS агару салмонеле стварају прозачне колоније са црним центром, а на Вилсон-



Блер агару стварају мрке колоније са металним сјајем. Даље потврђивање се изводи биохемијским и серолошким тестовима, као и молекуларним методама.

3. У концентратима се посебна пажња посвећује одређивању присуства токсикогених гљива и бактерија. Присуство **токсикогених микроорганизама** у сточној храни указује на њен лош квалитет и на садржај токсина. Од гљива најпознатије су *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp. и *Claviceps purpurea*. Њихова бројност одређује се на подлогама за гљиве. Од токсикогених бактерија посебно је значајан род *Clostridium* који се одређује на подлози за сулфиторедукујуће клостридије.

4. У силажи је додатно потребно одредити број **бактерија млечне киселине**, број сулфиторедукујућих клостридија и број протеолитичких бактерија. Бројност млечнокиселинских бактерија одређује се на MRS подлози (подлога по *deManu*, *Rogosa* и *Sharpu*), клостридија на подлози за сулфиторедукујуће клостридије, а бројност протеолитичких на хранљивом агару и подлози са желатином. Висока бројност млечнокиселинских бактерија показатељ су доброг квалитета силаже, док је висока бројност других микроорганизама знак слабијег квалитета.

Законом је прописано који је највећи број сапрофитних и патогених микроорганизама дозвољен у појединим врстама сточне хране (Табеле 11, 12 и 13).

Табела 11. Највећи број сапрофитских микроорганизама у храни за животиње

Хранива и смеше	Број бактерија у 1g	Број квасаца и плесни у 1g	Допуштено одступање утврђено микробиолошким претрагом
Хранива биљног порекла	$12 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	15%
Хранива анималног порекла	$6 \times 10^6$	$10 \times 10^3$	10%
Смеше за младе животиње	$3 \times 10^6$	$5 \times 10^4$	10%
Смеше за одрасле животиње	$5 \times 10^6$	$2 \times 10^5$	15%

Табела 12. Највећи број микроорганизама по врстама у храни за животиње

Врста микроорганизама	Производ	Број микроорганизама
<i>Salmonella</i>	хранива и смеше	0 у 50 g
<i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	хранива и смеше	0 у 50 g
<i>Staphylococcus aureus</i>	хранива и смеше	0 у 50 g
<b>Остали микроорганизми</b>	хранива и смеше	0 у 50 g

Табела 13. Максималне количине паразитских гљива у храни за животиње

Врста паразитске гљивице	Храна за животиње	mg/kg (ppm)
<i>Secale cornutum</i> ( <i>Claviceps purpurea</i> )	Жита и смеше од жита	1000

## 9. МИКРОБИОЛОГИЈА МЕСА И ПРОИЗВОДА ОД МЕСА

Због високог садржаја протеина, минералних материја, воде и неутралне реакције, месо је погодна средина за развој микроорганизама.

Главни извори контаминације меса микроорганизмима су саме животиње, алат и прибор за клање и обраду меса, вода, особље које рукује месом, хладњача и ваздух. Неправилно и нестручно руковање месом, нарочито приликом клања и вађења органа, када може доћи до изливања садржаја унутрашњих органа (црева, желуца), може довести до контаминације меса веома штетним протеолитичким бактеријама. Патогени микроорганизми могу доспети у месо из спољашње средине, али се могу наћи у месу и у случају клања болесних, заражених животиња.

Као главни узрочници кварења меса могу се појавити различити аеробни, анаеробни и факултативно анаеробни микроорганизми. При ниским температурама, на месу се јављају психрофилни, а на вишим мезофилни и термофилни микроорганизми. Површинско труљење меса најчешће изазивају квасци, плесни, бактерије рода *Proteus*, *Pseudomonas*, а дубинско труљење анаеробне врсте рода *Bacillus*. На кожи животиња налазе се спорогене бактерије из рода *Clostridium* (*C. sporogenes*, *C. botulinum*, *C. putrefaciens*), које доспевши у месо изазивају његово кварење, али и тровање људи јер стварају токсине.

Контаминирано месо и месни производи, подлежу различитим облицима кварења, као што су: кисељење, слузавост површине, промена боје меса, плесниност, промена својства масног ткива и др. Присуство микроорганизама у месу, може се утврдити:

- микроскопским прегледом бриса (у почетној, раној фази контаминације),
- уочавањем промене изгледа површине меса (појава слузи је сигуран знак контаминације),
- уочавањем промене боје, укуса, мириса, конзистенције меса.

Да не би дошло до контаминације меса и месних производа, веома је важно спроводити све неопходне хигијенске мере приликом производње и прераде меса.

Уклањање, односно уништавање микроорганизама у месу и производима од меса, може се постићи на више начина:

1. Физичким путем
  - хлађењем и смрзавањем (ниске температуре)
  - израда конзерви и полуконзерви од меса (високе температуре)
  - сушењем
2. Хемијским путем
  - сољење
  - саламурење
3. Физичко-хемијским путем
  - димљење

Да би се спречила употреба меса контаминираног микроорганизмима, обавезан је микробиолошки преглед. Правилником је прописано одређивање укупног броја бактерија, присуство рода *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella* и врста *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*.

**1. Укупан број бактерија** одређује се применом индиректне методе, засејавањем одређеног разређења на одговарајућу подлогу. Дозвољен укупан број бактерија у полуткама и великим комадима је до  $10^3$  CFU/g, а у млевеном месу до  $10^6$  CFU/g испитиваног узорка.

**2. Присуство рода *Staphylococcus*** одређује се засејавањем у слани бујон. Инкубација траје 24 сата на 37°C. Затим се бујонска култура засејава на површину ETGP (*egg yolk tellurite glycine piruvate*) агага. Инкубација траје 24 до 48 сати на 37°C. Колоније *Staphylococcus* су црне боје. Присуство ових бактерија се у последње време одређује засејавањем на ВУ подлози, а потврда да се ради о *S. aureus* врши се применом коагулаза тестом.

**3. Присуство *Escherichia coli*** одређује се у две етапе. У првој етапи користи се подлога по Кеслеру, у чији састав улазе материје које спречавају раст млечнокиселинских и других Грам-позитивних бактерија. Те материје су најчешће жуч и боја геницијан виолет. Друга етапа испитивања сумње на присуство *E.coli* се ради само ако је резултат у првој етапи био позитиван. За идентификацију се користи подлога Ендо-агар. Ако се на овој подлози формирају карактеристичне колоније црвене боје са металним сјајем, потврђује се присуство *E.coli*. У новије време, присуств *E.coli* испитује се засејавањем узорка на ТВХ (*Tryptone Bile X-glucuronide*) подлози. На овој подлози, *E.coli* формира плаво-зелене колоније.

**4. Присуство *Listeria monocytogenes*** испитује се узимањем бриса са површина које долазе у контакт са храном. Контрола присуства ове бактерије врши се у свим фазама производње хране и њене дистрибуције. Узети брис се преноси у одговарајућу количину бујона за обогаћење, добро измеша и инкубира при одговарајућој температури. Даљи поступак изолације и идентификације се ради стандардним методама (EN ISO 11290-1: 2002 за *L. monocytogenes*).

**5. Присуство рода *Salmonella* и сулфиторедукујућих клостридија** одређује се као што је приказано у поглављу » Одређивање бројности микроорганизама у сточној храни«.

Обавезно одсуство и граничне вредности присуства испитиваних група бактерија (бактерије рода *Clostridium*, *Staphylococcus*, *Salmonella*, и врсте *Escherichia coli* и *Listeria monocytogenes*) дефинисане су *Правилником о микробиолошким критеријумима за храну*, које прописује надлежно Министарство.

Поред поменутих група микроорганизама, приликом микробиолошког прегледа меса и производа од меса, пожељно је урадити и одређивање укупног броја квасаца и плесни, доказивање присуства анаеробних мезофилних спорогених бактерија, као и патогених бактерија *Bacillus cereus*, *Yersinia enterocolitica* и *Campylobacter* spp.

## 10. МИКРОБИОЛОГИЈА МЛЕКА

Микробиологија млека проучава микроорганизме којима су млеко и млечни производи природно станиште за живот и чијом се биохемијском активношћу мењају физичке, хемијске и органолептичке особине млека и млечних производа.

Млеко је, захваљујући свом хемијском саставу, веома погодна средина за развој бројних хетеротрофних микроорганизама. Млеко у млечној жлезди је са изузетно малим бројем микроорганизама, готово стерилно. Ипак, млеко се може контаминирати различитим микроорганизмима са којима долази у додир у току muže, транспорта или чувања. Ови микроорганизми својом биохемијском активношћу могу поправити или покварити квалитет млека. Главни извори контаминације млека су опрема која долази у додир са млеком, вода, сточна храна и простирка.

Бројност и разноврсност микроорганизама у млеку зависи од начина производње, хигијенских мера и температуре. Микроорганизми који се најчешће налазе у млеку су **бактерије, квасци и плесни**.

1. **Бактерије** које се налазе у млеку и млечним производима, можемо разврстати у три групе:

- Ацидогене бактерије: Имају способност да врше млечну ферментацију. Нашле су примену у производњи млечних производа као што су сир, јогурт, кисело млеко, кефир и др. Овде спадају различите лактококе (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*) и лактобацили (*Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus helveticus*).

- Ацидопротеолитичке: Имају способност да врше ферментацију шећера и хидролизу млечних масти и протеина. Овде спадају различите колиформне бактерије (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*) и бактерије бутерне ферментације (*Clostridium* sp.). Присуство бактерија ове групе у млеку, индикатор је лоше хигијене приликом рада са млеком.

- Протеолитичке бактерије: Други назив ових бактерија је *трулежне бактерије*. Ове бактерије имају способност разлагања млечних протеина и масти. У ову групу спадају аспорогене протеолитичке бактерије (*Pseudomonas fluorescens*, бактерије рода *Proteus*, *Salmonella*, *Shigella*, *Micrococcus*, *Streptococcus*, *Sarcina*) и спорогене протеолитичке бактерије (*Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Clostridium sporogenes*, *Clostridium perfringens*). Бактерије из ове групе могу проузроковати тзв. слатко згрушавање млека, неспецифично тровање људи, али и врло озбиљна тровања која могу имати и леталан исход.

2. **Квасци** се у већем броју најчешће налазе у сиревима и киселим млечним производима. Њиховом размножавању посебно погодује виша температура, па су зато чести узрочници кварења млека и млечних производа током летњих дана. У већем броју изазивају размекшавање сирног теста, појаву црних пега на површини ементалског сира (*Candida nigra*) или ужегlost (*Candida lipolytica*). Осим штетног дејства, квасци имају значајну улогу у процесу добијања млечних производа. За млекарство, посебно су значајни квасци *Klyveromyces lactis* (код сирева ствара шупљине), *Candida kefir* (улази у састав кефирних зрна), *Torulopsis* sp. и *Saccharomyces lactis* (у производњи кефира).

3. **Плесни** (гљиве) се у млеку налазе у мањем броју, али су зато врло честе у млечним производима. Поједине врсте плесни могу да изазову кварење млека и млечних производа или да чак продукују токсине који могу веома штетно деловати на здравље људи, па чак имати и летално дејство. Осим штетног утицаја, неке врсте

плесни могу бити веома корисне. Ове врсте плесни нашле су широку примену у прехранбеној, фармацеутској и хемијској индустрији. Најзначајнији родови су *Penicillium* (*P. roqueforti*, *P. camemberti*), *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, *Cladosporium*.

Свеже млеко, захваљујући поседовању антимикуробног система, има способност да након дуже, извесно време инхибира размножавање микроорганизама. Ова фаза се назива *микробицидна фаза*. Дужина ове фазе зависи од индивидуалних особина музне животиње, броја и врста микроорганизама, температуре млека, а може трајати до 6 сати. Антимикуробни систем млека обухвата активност антитела (имуноглобулина) и леукоцита, потом присуство лактоферина (протеин који везује Fe и тиме га чини недоступним за микроорганизме) и ЛПС (лактопероксидаза – тиоцијанат – H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> систем), као и антимикуробно деловање продуката метаболизма масти и различитих ензима.

Да би се избегле штетне последице микробиолошке контаминације млека, постоје стандарди, који одређују максималан број микроорганизама који одређени млечни производи и млеко могу садржавати. Микробиолошка контрола је редовна законска мера у току процеса производње и прераде млека. Микробиолошка исправност млека и млечних производа, одређује се преко **бројности микроорганизама и преко биохемијске активности млека**.

### Одређивање бројности микроорганизама у млеку

За одређивање бројности микроорганизама у млеку и млечним производима користе се директне и индиректне методе. Директна метода подразумева бројање бактеријских ћелија у размазу под микроскопом и прерачунавање на одређену количину млека, односно производа од млека. Индиректна метода подразумева припрему разређења материјала и засејавање на одређену подлогу. У млеку и млечним производима се одређује укупан број бактерија, број млечних бактерија и доказивање присуства колиформних бактерија (*Escherichia coli*).

1. **Укупан број бактерија** одређује се директним и индиректним методама. Директно одређивање укупног броја бактерија врши се прављењем фиксираног препарата директно из млека или производа од млека.

2. Одређивање бројности **млечних бактерија** (*Lactobacillus bulgaricus* и *Streptococcus thermophilus*) у млечно киселим производима одређује се на подлози по CeNapi. За доказивање рода *Lactobacillus-a* често се користи MRS подлога и биохемијски тестови.

3. Присуство *Escherichia coli* одређује се на начин како је приказано у поглављу » Микробиологија меса и месних прерађевина«.

Осим ових параметара, приликом испитивања микробиолошке исправности млека и млечних производа, пожељно је извршити и одређивање укупног броја квасаца и плесни, као и одређивање броја аеробних мезофилних и термофилних спорогених бактерија у 1ml или g испитиваног материјала.

### Одређивање биохемијске активности млека

Биохемијска активност млека је директна последица бројности микроорганизама у млеку. Одређивање биохемијске активности млека заснива се на способности неких врста микроорганизама да помоћу својих ензима редукују боју индикатора, као што су резазурин и метиленско-плаво. Са повећањем броја микроорганизама у млеку, брзина обезбојавања индикатора расте. Мерењем времена које је потребно за обезбојавање индикатора, као и праћењем промене боје индикатора кроз време, може се одредити приближан број микроорганизама, односно дати оцена исправности млека. У зависности од тога који се индикатор

користи, разликујемо две методе, **редуктазна проба са резазурином** и **редуктазна проба са метиленским плавим**.

1. Редуктазна проба са резазурином- За одређивање бројности микроорганизама у млеку, односно садржаја ензима редуктазе пореклом из микроорганизама, користи се својство резазурина да мења боју при редукцији. Са повећањем броја микроорганизама у млеку, расте количина ензима редуктазе и повећава се брзина обезбојавања резазурина. Узорак млека се меша са одређеном концентрацијом резазурина. Промена боје се бележи након 10, 20 и 60 минута и пореди са вредностима из табеле 14. Ова метода се често примењује јер се до резултата брзо долази.

Табела 14: Квалитет млека на основу редукције резазурина

Класа	Оцена квалитета млека	Трајање промене боје	Боја млека	Број бактерија у 1 cm <sup>3</sup> млека
I	Добро	Кроз 1 сат	сива до боје јоргована	$< 5 \times 10^5$
II	Задовољавајуће	Кроз 1 сат	боја јоргована, роза	$5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$
III	Лоше	Кроз 1 сат	бледо-роза	$4 \times 10^6 - 20 \times 10^6$
IV	Врло лоше	До 20 мин.	бела	$> 20 \times 10^6$

2. Редуктазна проба са метиленским плавим- Принцип методе је исти као и код предходне методе са резазурином. Млеко се меша са метиленским плавим. Очитавање промене боје се врши након 20 минута, 2 сата и 5,5 сати. Млеко са већим бројем микроорганизама ће брже изгубити плаву боју. Сматра се да је млеко контаминирано недозвољеним бројем микроорганизама ако 4/5 узорака млека се обезбоји за краће од два сата (Табела 15).

Табела 15. Квалитет млека на основу редукције метиленског плавог

Класа	Квалитет	Време обезбојавања	Број ћелија у 1 ml
I	Добар	330мин	$< 5 \times 10^5$
II	Средњи	60-330мин	$5 \times 10^5 - 4 \times 10^6$
III	Лош	20-60мин	$4 \times 10^6 - 20 \times 10^6$
IV	Врло лош	<20мин	$> 20 \times 10^6$

## 11. ОПШТЕ КАРАКТЕРИСТИКЕ ЗНАЧАЈНИХ ПАТОГЕНИХ БАКТЕРИЈА У СТОЧНОЈ ХРАНИ, МЕСУ И МЛЕКУ

Контрола сточне хране, меса, млека, као и њихових прерађевина на присуство бактерија и гљива, омогућава процену квалитета како би се утврдила да ли је погодна за употребу. Не сме се користити храна за животиње, месо и млеко уколико садрже штетне микроорганизме или је покварено због њиховог присуства. Размножавање микроорганизама у храни може резултирати губитком важних састојака и производњом нуспроизвода који су веома штетни за животиње и људе. Присуство микроорганизама у храни такође може довести до тога да она постане безукусна.

Храна за животиње, месо, млеко и њихове прерађевине морају бити у „исправном стању“, односно не би требало да садрже микроорганизме који могу потенцијално наштетити животињама или потрошачима производа животињског порекла. Међутим, важно је нагласити да храна за животиње, одређени производи од меса и млека садрже микроорганизме који су сапрофити и део су природне микрофлоре или настају у току производње и складиштења (нпр. јогурт, кефир, силажа). У току производње се могу и додавати одређени микроорганизми, тзв. пробиотици који позитивно утичу на квалитет хране и могу побољшати здравље животиња и људи који конзумирају такву храну. Од лабораторија које врше микробиолошку контролу може се затражити да утврде присуство и пробиотичких микроорганизама.

До контаминације микроорганизмима може доћи током прераде, складиштења, транспорта или из околине у којој се узгајају животиње или убиру усеви (Слика 73).



Слика 73. Потенцијални извори микроорганизама у млеку и њихов утицај када се налазе у млеку

Контаминација често може довести до ширења заразе, те је неопходно вршити континуиран надзор микробиолошке исправности сточне хране, меса, млека и њихових прерађевина. Микробиолошка контрола је редовна законска мера која се

спроводи као мера контроле и превенције ширења инфекција и зараза у анималној и хуманој популацији.

Храна за животиње, месо и млеко су због свог састава, идеална средина за раст микроорганизама. Ови микроорганизми могу бити сапрофитни, патогени, условно патогени или токсикогени, а њихов раст зависи од многих абиотичких фактора.

Патогени су микроорганизми или други агенси који изазивају болести. То могу бити бактерије, гљиве, протозое, вируси или приони.

С обзиром на значај патогена, у овом поглављу описани су најраспрострањенији патогени из групе бактерија.

### 1. *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus aureus* је бактерија која је веома распрострањена, присутна је у око 30% хумане популације, асимптоматски. Конзумирање намирница које садрже *S. aureus* ће најчешће изазвати реакцију у виду цревних поремећаја типа мучнине, повраћања, грчева, дијареје већ након 3 до 6 часова. Такође може довести до веома озбиљних и инвазивних инфекција коже и меких ткива, као што су сепса и пнеумонија.

*S. aureus* продукује преко 40 егзотоксина које се могу груписати у три велике групе на основу структурне и функционалне сличности. То су цитотоксини, суперантигени и цитотоксин-ензими.

*S. aureus* је факултативни анаероб, има округле ћелије у гроздовима, аспорогена, Грам-позитивна, каталаза позитивна бактерија. На хранљивој подлози формира округласте колоније карактеристичне златно жуте боје (пигмент стафилоксантин). Доводи до  $\beta$ -хемолизе односно потпуне разградње црвених крвних зрнаца на крвном агару.

Оптимална температура за развиће је 37°C, подноси веће концентрације соли (7,5 %). На температурама мањим од 8°C се не размножава, а на 10°C је минимална продукција токсина. Не расте при већој киселости од рН 4,3.

Најчешће се налази у млеку и млечним производима, шункама итд.

**Превенција:** кување, брзо хлађење, брзо закишељавање (ферментација).

### 2. *Salmonella sp.*

*Salmonella* је други најзначајнији патоген који контаминира храну. Конзумирање намирница које садрже *Salmonella* spp. изазива гастроинтестиналне тегобе типа дијареје, грчева, грознице, повраћања.

Постоји преко 2600 *Salmonella* серотипова које су груписане у 2 врсте на основу анализе разлика у секвенци 16S рРНК. То су *Salmonella enterica* (најчешће *serovar. Typhimurium* и *Enteritidis*) и *Salmonella bongori*. Скоро 99% серотипова који узрокују инфекције у хуманој популацији и у популацији топлокрвних животиња припадају *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. Врста *Salmonella typhi* изазива цревни тифус само код људи.

*Salmonella* spp. си штапићасте, Грам-негативне, покретне, аспорогене бактерије са перитрихама. Јављају се појединачно, у паровима или кратким ланцима. Расту на рН 3,7-9,5 и температури између 7°C и 48° С. Ствара водоник сулфид (H<sub>2</sub>S). Уништава се пастеризацијом (осетљива на температуре изнад 70°C).

Присутна је у свежем месу, нарочито у пилетини и јајима (око 60%), свињетини и јунетини (око 20%), риби, свежем поврћу, али и у недовољно куваној и реконтаминираној храни.



**Превенција:** адекватна термичка обрада, избегавати и спречити реконтаминацију.

### 3. *Clostridium botulinum*

*Clostridium botulinum* је бактерија која је веома распрострањена у природи. *C. botulinum* је Грам-позитивна, покретна, штапићаста бактерија која формира споре које су изузетно отпорне на дејство разних абиотичких фактора. Расту на температурама између 3,3°C и 48°C, оптимална је 35-37°C за протеолитичке и 26-30°C за непротеолитичке. Каталаза је негативна, разлаже желатин. Сама бактерија и споре не изазивају болест, већ јак неуротоксин-ботулин. Токсин изазива изузетно озбиљно стање парализе која може да доведе и до смрти. Постоји седам различитих типова токсина означених са А, В, С, D, Е, F и G. Типови А, В, Е и ретко F могу изазвати ботулизам код људи, док типови С и D изазивају обољење код животиња и птица. Тип G је идентификован 1970. године, али још није повезан ни са једним случајем интоксикације људи и животиња.

Токсин је термолабилан, мање је отпоран на високе температуре, уништава се на 80°C у току 10 минута, док споре издржавају 120°C неколико минута. Смањење рН испод 4,5 спречава раст. Такође је инхибиран нитритима. Ниво контаминације је низак, епидемије су ретке.

**Превенција:** адекватна термичка обрада, хлађење, употреба нитрита.

### 4. *Clostridium perfringens*

*Clostridium perfringens* су анаеробни, спорогени штапићи, Грам-позитивни. Споре *C. perfringens* су распрострањене у земљишту, прашина, вегетацији. Јављају се углавном у куваној храни са месом која се дуго држе на топлом или се споро хладе (супе, сосеви, варива, гулаши итд). Приликом кувања вегетативна ћелија умире, али споре преживе и могу да клијају у нову вегетативну ћелију и да се умноже у великом броју. Обољење се јавља уношењем великог броја ћелија, најмање  $10^6$  до  $10^8$  CFU/g хране, и лучењем токсина који изазивају тегобе као што су дијареја, грчеви, болови у стомаку, ретко мучнина.

Постоји пет типова *C. perfringens*, на основу типа токсина (А, В, С, D и Е). Већину интоксикација са *C. perfringens* изазива тип А.

Расте на температурама између 15°C и 55°C, оптимум је 43-47°C. рН оптимум износи 6 до 7, осетљив на нижу рН од 5.

**Превенција:** адекватно кување, брзо хлађење, контрола температуре складиштења хране

### 5. *Listeria monocytogenes*

*L. monocytogenes* је распрострањена у земљишту и води, где може да преживи неколико месеци. Животиње, нарочито стока може да буде асимптоматски инфицирана са *L. monocytogenes*

То су Грам-позитивни, аспорогени штапићи чији је оптимум развића између 30°C и 45°C. Расте споро и на 0°C, тако да хлађење у фрижидерима није довољна заштита, али је потребан кисеоник за њен раст. Отпорна је на већи садржај соли, смањену киселост, утицај високих али и ниских температура.

Често се проналази у месу иако су млечни производи значајнији извор контаминације овом бактеријом. Конзумирање хране са *L. monocytogenes* изазива листериозу, обољење које нарочито погађа труднице, затим малу децу, старе особе. Није учестао проблем, али је стопа смртности висока. Изазива абортус, енцефалитис,

менингитис итд., док код особа које су некомпромитованог имуног система најчешће изазива симптоме сличне грипи.

Осетљива је на топлоту, кување на 71°C је адекватно за уништавање бактерије.

**Превенција:** адекватно кување, избећи реконтаминацију.

#### **6. *Yersinia enterocolitica***

*Yersinia enterocolitica* је свеприсутна бактерија, која се често изолује из земљишта, воде, животиња или контаминираних хране. Код животиња (говеда, овце, свиње, пси, мачке) се јавља у гастроинтестиналном тракту, који могу бити хронични носиоци *Y. enterocolitica*. Људи се инфицирају конзумирањем недовољно куване хране, нарочито свињетине, ферментисане кобасице, али и млечних производа, чоколаде, свежег поврћа. Тегобе које се јављају након инфицирања су дијареја, грозница, температура, повраћање, симптоми слични запаљењу слепог црева.

*Y. enterocolitica* је Грам-негативна, аспорогена штапићаста бактерија, не продукује токсине, Аеробна је, мада може расти и у анаеробним условима. Способност *Y. enterocolitica* да расте на температури близу 0°C значи да и правилно хлађена и чувана храна у фрижидеру може бити потенцијални извор инфекције. Оптимална температура раста је 10 до 45°C. Ацидотолерантна је (рН 4,6), а преживљава и у вакууму.

**Превенција:** адекватно кување, примена нитрита се може постићи ефективна контрола.

#### **7. *Escherichia coli* O157: H7**

*Escherichia coli* O157:H7 је први пут пронађена и регистрована као патоген у САД-а, 1982. године. Случај је био повезан са конзумирањем хамбургера у McDonalds-у, који је довео до масовног оболевања људи. Испитивањима се установило присуство новог патогеног соја *Escherichia coli*, који производи токсин који оштећује бубреге (хемолитични-уремични синдром) и утиче на централни нервни систем (тромботична тромбоцитопенична пурпура), а предходно се јавља крвава дијареја. Токсин је назван вероцитотоксин и Shiga токсин (сличан токсину који продукује *Shigella*).

*E. coli* O157:H7 може да преживи до неколико недеља у контаминираним месу и поврћу. Може да преживи на рН 3,7 до 3,9 на 4 °C. Оптимум за развиће је 37°C, а расте и на 44°C. Сматра се да је потребна мала доза бактерија да би дошло до инфекције, мање од 100 ћелија. Као већина бактерија, осетљива је на високу температуру.

Уништава се пастеризацијом, температура од 60°C у трајању од 1 минуте убије 90% бактерија.

**Превенција:** адекватна термичка обрада.

#### **8. *Campylobacter jejuni***

*Campylobacter jejuni* је заступљена у гастроинтестиналном тракту многих животиња, говеда, коња, живине, кућних љубимаца, птица. Изолована је и из млечних производа и меса.

*C. jejuni* је ситна Грам-негативна бактерија, димензија 0,2 до 0,5 μм ширине и 0,5 до 8 μм дужине, карактеристичног S-облика ћелије. Спада у микроаерофиле (5% (v/v) кисеоника), оптимална температура за раст је између 30°C и 45°C, али не расте испод 30°C. Инактивира се на рН 3,0 до 4,5. Такође је осетљива на присуство NaCl. Уништава се пастеризацијом.

Конзумирањем контаминиране хране настају стомачне тегобе као што су грчеви, дијареја, главобоља, болови у мишићима. Инфекција настаје уношењем око 500 CFU/g.

**Превенција:** адекватно кување.

### 9. *Shigella spp.*

Бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* укључују четири врсте и то: *S. sonnei*, *S. dysenteriae*, *S. flexneri* и *S. boydii*. Вода која је контаминирана фекалијама, нехигијенски услови и пракса у процесу руковања и припреме хране су најчешћи извори контаминације намирница са *Shigella spp.* Само људи и примати могу бити носиоци *Shigella spp.*, дакле трансмисија бактерије међу људима може ићи искључиво фекално-оралним путем. Веома је инфективна, свега између 10-200 CFU/g бактерија може довести до обољевања.

*Shigella spp.* су Грам-негативне, аспорогене, штапићасте бактерије, факултативни анаероби, непокретне, имају фимбрије дужине 1 до 2µm. Производе Shiga токсин који је важан фактор вируленције. Оболеле особе веома брзо развијају симптоме као што су, грчеви, температура, која је често праћена са гнојном крвавом дијарејом.

Температурна амплитуда за раст је између 6,1°C и 47°C, рН између 4,8 и 9,3. Осетљива је на високе температуре, инактивира се на 65°C.

**Превенција:** спречити контаминацију, адекватна термичка обрада.

### 10. *Bacillus cereus*

*Bacillus cereus* је аеробна, спорогена, Грам-позитивна бактерија која је широко распрострањена у земљишту, на поврћу, у сировој храни (нарочито свеже млеко и сиреви који се праве од таквог млека), али и у прерађеној храни (сосеви, супе, кувана јела од меса). Земљиште је главни извор контаминације хране спорама *B. cereus*. Давно је препозната као патоген, односно као извор тровања храном код људи, али се јавља спорадично, не у виду епидемија.

*B. cereus* је одличан конкурент са другим бактеријама цревне флоре, као што су *Salmonella* и *Campylobacter* (боље усвајају хранљиве материје и адхезија на површину црева је израженија). Код домаћих животиња (кокошке, зечеви и свиње), одређени сојеви *B. cereus* се користе као пробиотици, да би се смањило размножавање *Salmonella sp.* у цревима и у цекуму. На овој начин се позитивно утиче на здравље животиња, али и потрошача, јер се знатно смањује ризик од инфекција које изазивају *Salmonella spp.*

*B. cereus* може расти на температурама хлађења (4-6°C), већина расте између 15 и 55°C, док је оптимална температура између 30°C и 37°C. Температура од 60°C убија вегетативну ћелију, али токсини остају активни. Распон рН за раст је између 5,5 и 8. Вредност рН испод 4,5 спречава размножавање ове бактерије.

**Превенција:** адекватна термичка обрада и адекватно хлађење (брзо охладити и хладити у року од два сата од кувања)

## **ЛАБОРАТОРИЈСКИ ДНЕВНИК**

## ПРАВИЛА ПОНАШАЊА У ВЕЖБАОНИЦИ

1. У вежбаоници не сме да се једе, пије, жваће жвака и користи мобилни телефон. Све ствари које нису потребне за рад се остављају на за то предвиђена места.  
**На радно место треба понети практикум и прибор за писање.**
2. Пре почетка сваке вежбе потребно је:
  - завезати дугу косу
  - опрати руке
3. Пратите инструкције за рад које су написане у оквиру сваке вежбе и/или их добијете усмено од одговорног лица.
4. По завршетку сваке вежбе:
  - средити радно место, обрисати са антисептичким средством
  - опрати руке
5. Уколико дође до незгоде, нпр. просипања, разбијања предметног стакалца, епрувете, Петри кутије и сл., обавезно обавестити одговорно лице.
6. Уколико дође до контакта микробне културе са очима, слузокожом или отвореним ранама обавезно:
  - извршити испирање очију за млазом воде
  - ране треба опрати са сапуном и водом
  - контактирати лекара (по потреби)

**Праћењем одговарајућих процедура обезбеђује се пријатно и безбедно радно окружење у лабораторији.**

**Лабораторијски рад, осим што треба да буде безбедан и едукативан, треба да буде и забаван.**

## **ВЕЖБА 1. МИКРОБИОЛОШКА ЛАБОРАТОРИЈА, ПРИБОР, ОПРЕМА И ПРИНЦИПИ РАДА**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте са изгледом, опремом и принципима рада микробиолошке лабораторије.

### **Протокол -Асептичне технике :**

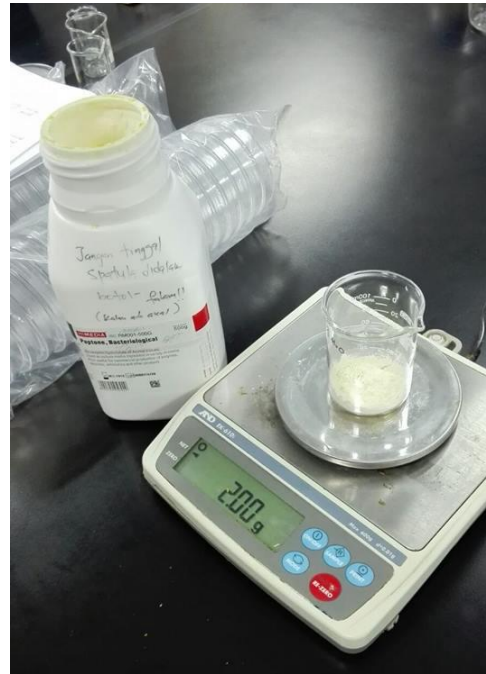
1. Дезинфиковати радне површине антибактеријским средством.
2. Носите рукавице и лабораторијски мантил (по потреби).
3. Приликом обележавања Петри кутија, маркером пишете по доњој страни кутије или по поклопцу.
4. Приликом коришћења пламеника, морате бити веома пажљиви. Не остављајте езе (бактериолошке петље) у/на пламенику, истопиће се. Опрез од могућих опекотина.
5. Приликом рада са чистом културом микроорганизама, обавезна стерилизација езе пре и после преношења културе. Стерилишите езу више пута чак и уколико радите са истом културом.
6. Обавезно сачекајте да се еза охлади јер не желите да убијете микроорганизме врелом езом.
7. Након скидања поклопца са епрувете, кратко фламбирајте отвор епрувете пре него што убаците езу у епрувету ради узимања узорка. Поново фламбирајте отвор епрувете пре затварања епрувете.
8. Немојте ништа стављати на сто: езе, игле, пинцете, затвараче епрувета и слично. Чим се ставе на сто, више нису стерилни.
9. Езе и игле се могу привремено одложити у посебне држаче који су намењени за ту сврху.
10. Затвараче епрувета држите са малим прстом.
11. Пипете држите у цилиндру све до употребе.
12. Не остављајте отворене Петри кутије и епрувете са подлогом јер бактерије и гљиве из ваздуха могу контаминирати подлогу.
13. Немојте претеривати са инокулацијом. Благо додирните колонију езом или је уроните у течну подлогу да би захватили малу количину. Немојте гребати културу или копати по подлози.
14. Када наносите културу на агаризовану подлогу, водите рачуна да не загребете подлогу. Довољан је нежан потез по површини подлоге да се равномерно распореди култура.
15. По завршетку рада, поново обришите радну површину дезинфекционим средством.
16. Оперите руке!

**ЗАДАТАК:**

У којим просторијама (лабораторијама) се налазе прибор и опрема који су приказани на сликама 1-4. Описати прибор и опрему које су приказане на фотографијама број 1, 2, 3 и 4.



Слика 1.



Слика 2.



Слика 3.



Слика 4.

Слика 1.

---

---

---

Слика 2.

---

---

---

Слика 3.

---

---

---

Слика 4.

---

---

---

**ПИТАЊА:**

1. Наведите главне кораке који се морају применити да би се избегла контаминација?
2. Објасните значај асептичне технике у извођењу микробиолошких експеримената?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_



## ВЕЖБА 2. СТЕРИЛИЗАЦИЈА, ХРАНЉИВЕ ПОДЛОГЕ, ИЗОЛАЦИЈА, ГАЈЕЊЕ И ЧУВАЊЕ МИКРООРГАНИЗАМА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте са различитим начинима стерилизације, врстама хранљивих подлога, као и основним техникама изолације микроорганизама.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Петри кутије са разливеном хранљивом подлогом
2. Петри кутије/епрувете са чистом културом микроорганизама
3. Езе за пресејавање
4. Пламеник
5. Стерилни дискови филтер папира
6. Пинцета
7. Хемијска средства

### ЗАДАТАК 1:

1. Обележити Петри кутије (рад у групама/појединачно).
2. Узети посуде са антимикуробним средствима као и стерилне дискове
3. Натопити један диск у одговарајуће хемијско средство. Користити пинцету за трансфер дискова.
4. Поставити дискове на површину хранљиве подлоге. Водити рачуна о равномерној расподели дискова.
5. Инкубирати на 28°C у трајању од 24 до 48 сати.
6. Измерити зону инхибиције раста микроорганизама (mm) уз помоћ лењира.
7. Уписати резултате у табелу 1.

### ЗАДАТАК 2:

1. Обележити Петри кутије (рад у групама/појединачно).
2. Узети чисту културу микроорганизама и методом исцрпљења пренети у другу Петри кутију.
3. Узети чисту културу микроорганизама из течне подлоге и пренети у Петри кутије са селективном хранљивом подлогом.
4. Инкубирати на 28°C у трајању од 24 до 48 сати.

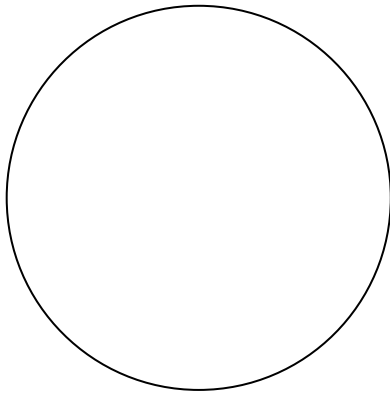
### РЕЗУЛТАТИ:

#### 1. Микробицидно/микробистатично деловање хемијских средстава на микроорганизме

Табела 1. Испитивање утицаја хемијских средстава на раст микроорганизама

Антимикуробно хемијско средство	Пречник инхибиције (mm)		
	Бактерија	Гљива	
Бетадин (јод)			
Антибактеријски сапун			
70% етил алкохол			
3% хидроген пероксид (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )			
Варикина			

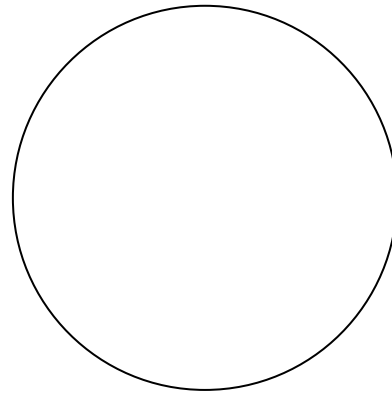
## 2. Изолација микроорганизама:



Метода исцрпљења  
(уцртати потез засејавања)

Означити врсту подлоге: \_\_\_\_\_

Запажање: \_\_\_\_\_



Метода селективне хранљиве  
подлоге

Означити врсту подлоге: \_\_\_\_\_

Запажање: \_\_\_\_\_

### ПИТАЊА:

1. Наведи разлику између стерилизације и пастеризације.
2. Зашто је важно стерилисати просторију, посуђе и материјал пре почетка рада?
3. Објаснити појам изолације микроорганизама.
4. Зашто је неопходно вршити разређивање испитиваног супстрата и како знамо да смо довољно разредили супстрат?
5. Шта је чиста култура микроорганизама?
6. Која је предност гајења чистих култура на чврстој хранљивој подлози?

*Одговори:*

ДАТУМ: \_\_\_\_\_

ОБЕРА: \_\_\_\_\_

### **ВЕЖБА 3. МИКРОСКОП, МИКРОСКОПСКИ ПРЕПАРАТИ, ТЕХНИКА МИКРОСКОПИРАЊА И ОСНОВНИ ОБЛИЦИ МИКРООРГАНИЗАМА**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте са микроскопом и техником микроскопирања и то посматрањем различитих облика микроорганизама. Такође, студенти ће се упознати са врстама микроскопских препарата и научити како се прави обичан нативни препарат.

#### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Светлосни микроскоп
2. Чашица са течном културом микроорганизама
3. Предметне плочице и покривна стакалца (за обичан нативни препарат)
4. Капаљка
5. Отисни препарат
6. Фиксирани/трајни микроскопски препарат
7. Имерзионо уље

#### **Протокол-Техника микроскопирања:**

Да би се објекат добро уочио, неопходно је правилно подешавање механичких и оптичких делова микроскопа.

1. Прво се укључи систем за осветљење.
2. Затим се кондензор подигне до сточића, а дијафрагма на кондензору се потпуно отвори.
3. Изнад отвора на сточићу центрира се објектив са најмањим увећањем (10×). Помоћу макрометарског завртња сточић се подигне на удаљеност око 1 cm од објектива. Посматрањем кроз окулар треба да се види правилан и добро осветљен круг.
4. Препарат се стави изнад отвора на сточићу. Приликом постављања препарата на сточић микроскопа, обратити пажњу да се препарат постави правилно, стабилно, са објектом гледања окренутим према објективу (а не наопако).
5. Подизањем и спуштањем сточића помоћу макрометарског завртња пронаћи слику посматраног објекта. **Уколико се даље микроскопира објективом сувог система, прећи на корак 6. Уколико је потребно микроскопирати имерзионим објективом, потребно је прескочити корак 6 и прећи на корак 7.**
6. Да би се добила крупнија слика објекта, окренути објектив са већим увећањем (40×). Изоштравање слике врши се окретањем макрометарског завртња, подизањем или спуштањем кондензора и затварањем и отварањем дијафрагме на кондензору. Проналажење слике треба вршити веома пажљиво да не дође до ломљења препарата и оштећења сочива на објективу.
7. Ако се користи имерзиони објектив (100×), након проналажења слике (корак 5), не померајући сточић са препаратом, на препарат се стави кап имерзионе течности (на део где пада снап светла). Потом се имерзиони објектив постави у оптичку осу микроскопа (при томе ће уронити у кап имерзионе течности). Изоштравање слике врши се окретањем макрометарског завртња, подизањем кондензора и отварањем дијафрагме на кондензору. Изоштравање слике треба вршити веома пажљиво да не дође до ломљења препарата и оштећења сочива на објективу.
8. Након завршеног микроскопирања, оптичке делове (имерзиони објектив) треба очистити са ксилолом, а остале делове са чистом марамицом.

**ЗАДАТАК 1:** Направити нативни препарат.

1. Узети предметну плочицу. Ставити помоћу Пастерове капаљке малу капљицу суспензије микроорганизама на предметну плочицу. Преко нанете капљице суспензије ставити покровно стакалце, водећи рачуна о томе да се истисну мехурићи ваздуха из течности.
2. Према протоколу за микроскопирање, посматрати под микроскопом **обичан нативни** препарат и нацртати уочено на увећању 10×40.

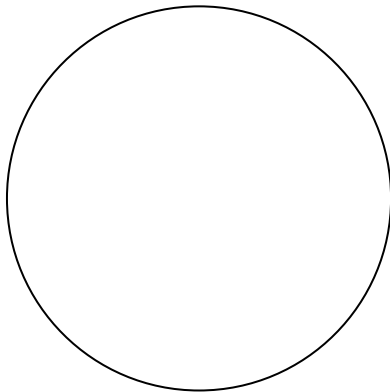
**ЗАДАТАК 2:**

1. Према протоколу за микроскопирање, посматрати под микроскопом **отисни** препарат и нацртати уочено на увећању 10×40.

**ЗАДАТАК 3:**

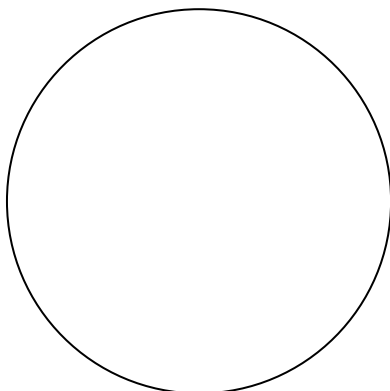
1. Према протоколу за микроскопирање под имерзијом, посматрати под микроскопом **трајни** препарат и нацртати уочено на увећању 10×100.

**РЕЗУЛТАТИ:**



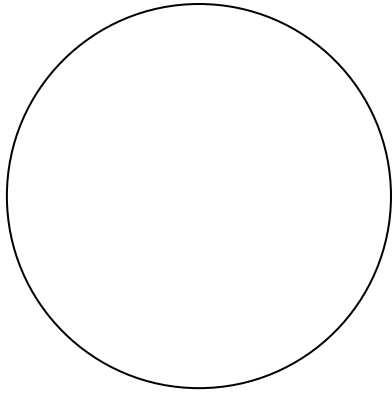
Увећање: \_\_\_\_\_

Округао облик: \_\_\_\_\_



Увећање: \_\_\_\_\_

Кончаст облик: \_\_\_\_\_



Увећање: \_\_\_\_\_

Штапићаост облик: \_\_\_\_\_

**ПИТАЊА:**

1. Наведи улогу за сваку наведену компоненту микроскопа:

- а. кондензор
- б. макрометарски завртањ
- ц. микрометарски завртањ
- д. дијафрагма
- е. ротор

2. Која је улога имерзионог уља?

3. Каква слика се добија микроскопирањем?

4. Да ли си у могућности да видиш унутрашњу структуру ћелије, на пример једро, на било ком препарату посматраном на објективу 100×. Објасни.

5. Ако окулар има увећање 10×, а објектив увећање 40×, колико је укупно увећање микроскопа?

6. Шта је раздвојна моћ микроскопа?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 4. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПРОТОЗОА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са морфологијом протозоа и начинима њиховог кретања. Студенти треба да уоче и нацртају протозоу са њеним органелама за кретање.

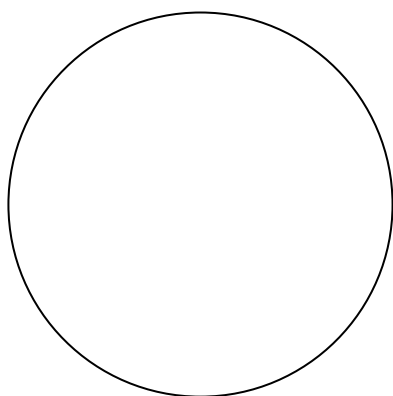
### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Инфузум
2. Капаљка
3. Предметна плочица
4. Љуспица
5. Светлосни микроскоп

### ЗАДАТАК:

1. Узети предметну плочицу и љуспицу.
2. Капаљком, са површине инфузума, узети малу кап воде (инфузума) и нанети на површину предметне плочице.
3. Преко капи инфузума ставити љуспицу.
4. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
5. На увељичању  $10\times 10$  пронаћи места на препарату где се протозое крећу спорије, или где су се умириле.
6. Пребацити на увељичање  $10\times 40$ .
7. На овом увељичању посматрати облик протозоа, начин кретања, и уочити коју органелу за кретање има протозоа из узорка.
8. Нацртати протозое на увељичању  $10\times 40$ , водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља.
9. Уклонити нативни препарат и ставити га у кадицу за прање.
10. Угасити и спаковати микроскоп.
11. Оставити чисто радно место.

### РЕЗУЛТАТИ:



1. Ћелија
2. Локомоторни орган
3. Вакуола

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: \_\_\_\_\_

**ПИТАЊА:**

1. Ком разделу припадају протозое које сте гледали у узорку инфузума?
2. Да ли су протозое које сте микроскопирани биле покретне?
3. Ако су биле покретне, напишите коју врсту органела за кретање су поседовале?
4. Раздео *Ciliophora* се дели на која четири подраздела?
5. Према грађи ћелије и начину исхране, протозое спадају у коју групу организама?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 5. ИДЕНТИФИКАЦИЈА АЛГИ

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са различитим облицима микроскопских алги и да уоче разлику у грађи и облику хлоропласта.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Трајни микроскопски препарати: *Spirogyra* sp., *Zygnema* sp.
2. Предметна плочица
3. Љуспица
4. Капаљка
5. Течна култура алге- *Chlorella* sp.
6. Светлосни микроскоп

### ЗАДАТАК 1:

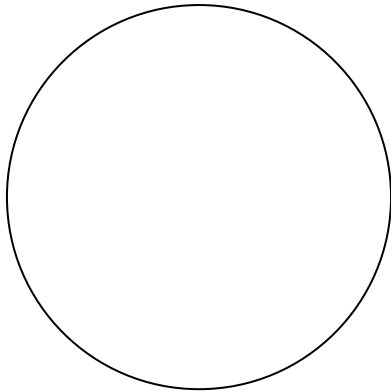
1. Направити нативни препарат алге *Chlorella* sp. према корацима од 2 до 5.
2. Узети предметну плочицу и љуспицу.
3. Капаљком узети малу кап течне културе и нанети на површину предметне плочице.
4. Преко капи ставити љуспицу.
5. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
6. Алгу нацртати на увељичању 10×40 водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља.
7. Обележити означене делове. Уочити облик алге, облик хлоропласта и постојање пиреноида.
8. На крају микроскопирања, нативни препарат ставити у кадицу за прање.

### ЗАДАТАК 2:

1. Алге *Spirogyra* sp. и *Zygnema* sp. се посматрају на готовим микроскопским препаратима.
2. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. Алге нацртати на увељичању 10×40, водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља.
4. Обележите означене делове. Уочити облик алге, облик хлоропласта и постојање пиреноида.
5. На крају микроскопирања, микроскопски препарат вратити на место где сте га затекли.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.



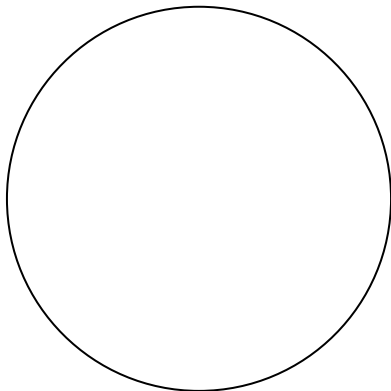
**РЕЗУЛТАТИ:**



1. Округао облик ћелије
2. Пехараст хлоропласт
3. Пиреноиди

Увећање: \_\_\_\_\_

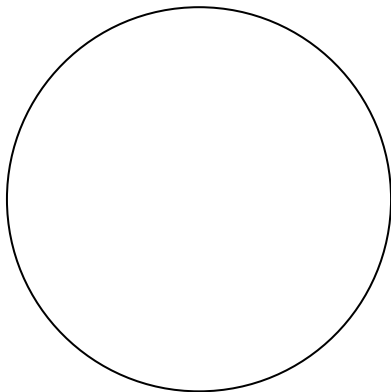
Врста: *Chlorella* sp.



1. Кончаст талус
2. Спирално увијен хлоропласт
3. Пиреноиди

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Spirogyra* sp.



1. Кончаст талус
2. Звездаст облик хлоропласта
3. Пиреноиди

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Zygnema* sp.

**ПИТАЊА:**

1. Ком разделу припадају посматране алге?
2. Шта су пиреноиди?
3. Систематика алги је урађена на основу ког критеријума?
4. Према грађи ћелије и према начину исхране, алге спадају у коју групу организама?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## **ВЕЖБА 6. ИДЕНТИФИКАЦИЈА НИЖИХ КОНЧАСТИХ ГЉИВА И КВАСАЦА**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са грађом нижих гљива, изгледом несептиране хифе и грађом ендогених спора за бесполно размножавање гљива. У току ове вежбе, студенти ће имати прилику да се упознају и са грађом амицеларних гљива, односно квасаца.

### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Готови микроскопски препарати: *Mucor* sp., *Rhizopus* sp.
2. Предметна плочица
3. Љуспица
4. Течна култура пекарског квасца (*Saccharomyces cerevisiae*)
5. Капаљка
6. Светлосни микроскоп

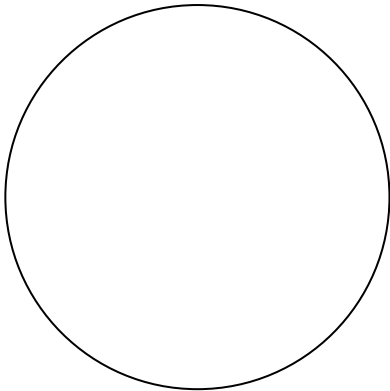
### **ЗАДАТАК 1:**

1. Гљиве *Mucor* sp. и *Rhizopus* sp. се посматрају на готовим микроскопским препаратима.
2. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. *Mucor* sp. нацртати на увељичању  $10\times 40$ , водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља. Обележите означене делове.
4. *Rhizopus* sp. нацртати на увељичању  $10\times 10$ , водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља. Обележите означене делове.
5. На крају микроскопирања, микроскопске препарате вратити на место где сте их затекли.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

### **ЗАДАТАК 2:**

1. Направити нативни препарат квасца *Saccharomyces cerevisiae* према корацима од 2 до 5.
2. Узети предметну плочицу и љуспицу.
3. Капаљком узети малу кап течне културе и нанети на површину предметне плочице.
4. Преко капи ставити љуспицу.
5. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
6. Квасац нацртати на увељичању  $10\times 40$  водећи рачуна о односу величине ћелије и видног поља. Обележити означене делове. Уочити облик ћелије квасца и постојање пупољака.
7. На крају микроскопирања, нативни препарат ставити у кадицу за прање.

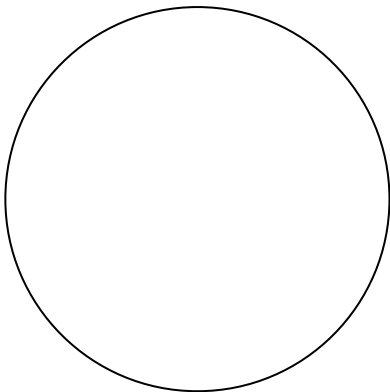
**РЕЗУЛТАТИ:**



1. Несептирана хифа
2. Спорангиофора
3. Спорангија
4. Спорангиоспора

Увећање: \_\_\_\_\_

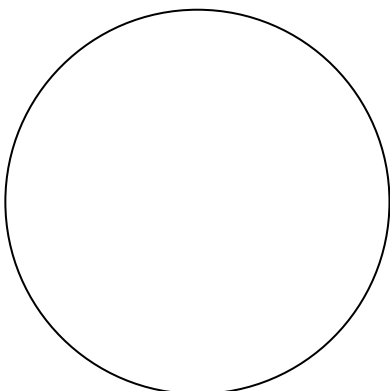
Врста: *Mucor* sp.



1. Несептирана хифа
2. Спорангиофора
3. Спорангија
4. Спорангиоспора
5. Ризоид

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Rhizopus* sp.



1. Округао облик ћелије
2. Пупољак
3. Псеудомицелија

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Saccharomyces cerevisiae*

**ПИТАЊА:**

1. Како се назива ћелија код кончастих гљива?
2. Код којих гљива се јавља псеудохифа и псеудомицелија?
3. Спорангиоспоре се, према месту где се образују, сврставају у коју групу спора?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 7. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ВИШИХ КОНЧАСТИХ ГЉИВА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са грађом виших гљива, грађом септиране хифе и изгледом егзогених једноћелијских и вишећелијских спора за бесполно размножавање гљива.

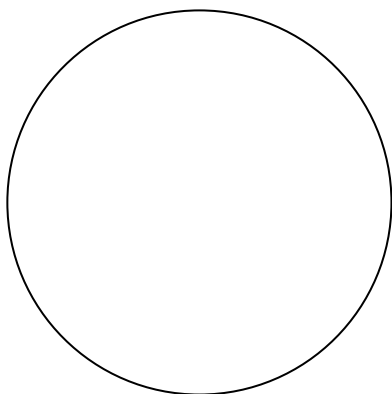
### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Трајни микроскопски препарати посматраних гљива
2. Светлосни микроскоп

### ЗАДАТАК:

1. Узети микроскопски препарат.
2. Поставити препарат на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. Сваку гљиву нацртати на увећању  $10\times 40$ , водећи рачуна о односу величине гљиве и видног поља.
4. Обележити означене делове.
5. На крају микроскопирања, микроскопске препарате вратити на место где сте их затекли.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

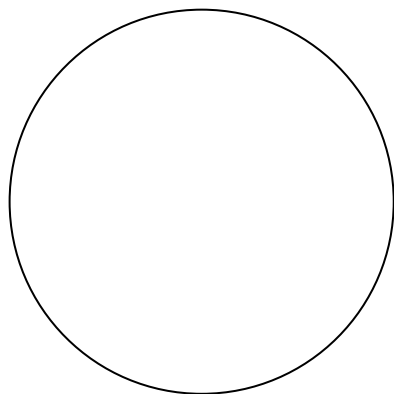
### РЕЗУЛТАТИ:



1. Септирана хифа
2. Једноћелијске конидије
3. Конидиофора

Увећање: \_\_\_\_\_

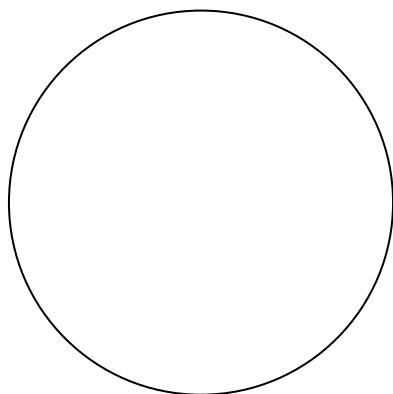
Врста: *Aspergillus sp.*



Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Penicillium* sp.

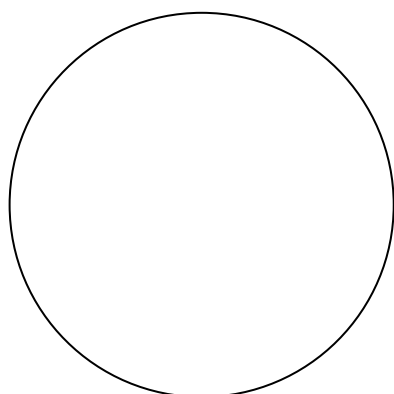
1. Септирана хифа
2. Једноћелијске конидије
3. Граната конидиофора



Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Alternaria* sp.

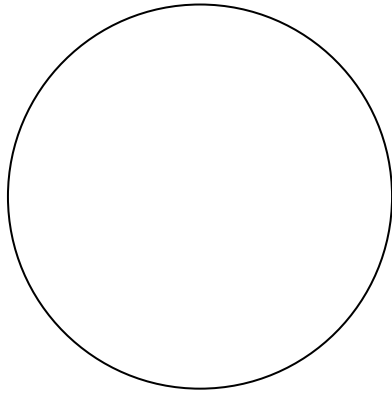
1. Септирана хифа
2. Вишећелијске конидије



Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Fusarium* sp.

1. Септирана хифа
2. Вишећелијске конидије



1. Септирана хифа
2. Конидије

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Trichoderma* sp.

**ПИТАЊА:**

1. Навести врсте генеративних спора код гљива.
2. Према грађи ћелије, гљиве спадају у коју групу микроорганизама?
3. Како расту септе код гљива?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_



## ВЕЖБА 8. МОРФОЛОГИЈА БАКТЕРИЈСКЕ КОЛОНИЈЕ И БОЈЕЊЕ ПО ГРАМУ

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је одредити морфологију бактеријске колоније и савладати технику диференцијалног бојења по Граму.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Микроскоп
2. Предмете плочице
3. Сталак са реагенсима и бојама за бојење по Граму
4. Кадица за бојење
5. Флаша са водом
6. Пламеник
7. Еза
8. Папирна вата

### ЗАДАТАК 1.

Одредити морфологију бактеријске колоније описом следећих својстава (резултат уписати у табелу 2):

**Облик:** тачкаст, округао, сочиваст, неправилан, ризоидан, кончаст.

**Величина:** ситне (до 3 mm), средње (до 5 mm), крупне (до 1 cm) и гигантске (преко 1 cm).

**Боја:** крем, жута, црна, црвена, зелена...

**Профил:** раван, испупчен и удубљен.

**Површина:** глатка, сјајна и наборана.

**Оптичка особина:** провидна, полупровидна, непровидна.

**Положај:** положај може бити површински и дубински.

**Промене у подлози:** пигментација, обезбојавање подлоге, без промене.

\***Ивица** колоније може бити равна, таласаста, неправилна, тестераста и кончаста.

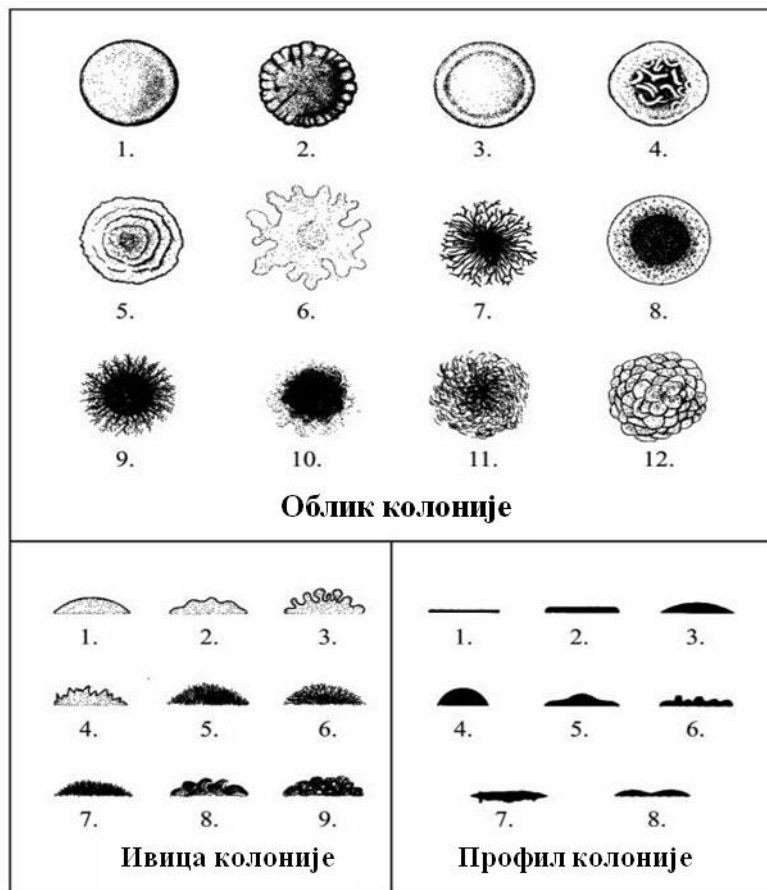
\***Структура** колоније може бити зрнаста, коврцава и хомогена.

**Конзистенција или текстура:** вискозна (лепи се за езу, тешко се скида), брашнаста (сува), воскаста (тврда, распада се), слузава (лепљива, растегљива), тестаста, кожаста

\* Ивица и структура бактеријске колоније се одређује употребом микроскопа!

Користи се лупа или објектив најмањег увећања ( $\times 10$ ). Петри кутија се стави на сточић микроскопа, центрирајући посматрану колонију.

**Напомена:** Водити рачуна да сочиво објектива не уроните у хранљиву подлогу!



Слика 5. **Облици бактеријских колонија** : *округао* (1, 2, 3, 4 ,5 и 8), *неправилан* (6 и 10), *кончаст* (7 и 9), *ризоидан* (11), *комплексан* (12). **Ивице колоније** : *равне* (1), *таласасте* (2 и 3), *тестерасте* (4), *кончасте* (5, 6 и 7), *коврцаве* (8 и 9), **Профил колоније**: *раван* (1, 2 и 7), *испупчен* (3, 4 и 5), *неправилан* (6), *кратераст* (8)

## ЗАДАТАК 2.

1. Обојити препарат методом по Граму.

### Протокол за диференцијално бојење – Бојење по Граму:

1. Припрема размаза и сушење препарата:

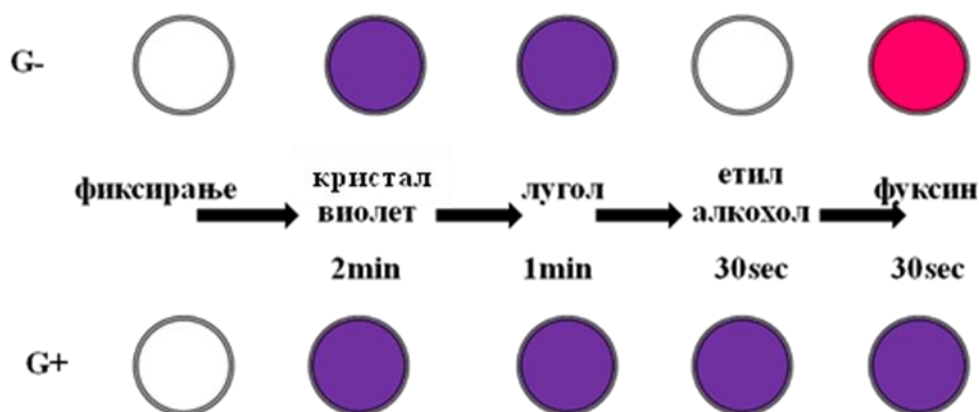
- Ставити малу капљицу воде на средину предметне плочице
- Стерилисати езу на пламенику и оставити да се охлади или охладити на хранљивој подлози у Петри кутији из које се узима узорак.
- Благим/нежним додиром, односно урањањем езе у бактеријску колонију, узети малу количину узорка. **Не копати** по агару!
- Ставити узорак у капљицу воде на плочици и направити размаз.
- Стерилисати езу на пламенику.
- Осушити размаз на ваздуху. **Не користити топлоту** за сушење размаза!

2. Фиксирање препарата

- **Плочица мора бити сува**, иначе ће се приликом фиксирања бактерије скувати и уништити.
- Осушен размаз се фиксира над пламеном пламеника провлачењем плочице 2-3 пута у укупном трајању од неколико секунди.

- На овај начин се убију бактерије, јаче се залепе за плочицу чиме ће боље примати боју приликом бојења

3. Након фиксирања на размаз се наноси раствор кристал виолета у трајању од 2 минута.
4. Боја се затим испере са водом а на размаз се нанесе раствор лугола у трајању од 1 минута.
5. Лугол се испере са водом а на размаз се стави кап 96% алкохола у трајању од 30 секунди.
6. Алкохол се испере водом а на размаз се стави кап базног фуксина у трајању од 30 секунди или кап шафранина у трајању од 20 секунди.
7. Након тога препарат се испере са водом, осуши са филтер папиром и посматра уз кап имерзионог уља имерзионим објективом.



#### НАПОМЕНА:

- Важно је користити младу бактеријску културу, нарочито Грам-позитивних, јер старије културе имају слабију/смањену способност задржавања боје (комплекс јода и кристал виолет боје).
- Критична фаза у процесу бојења је примена етил-алкохола. Строго водите рачуна о времену! Ако се дуже држи алкохол на размазу, испраће се кристал виолет и добиће се лажна негативна реакција. Ако се прерано испере алкохол, добиће се лажно позитиван налаз.
- Обратите пажњу да се не спере ознака на предметној плочици.
- Не брините ако се не види обојен размаз на плочици. То је честа појава код Грам- негативних бактерија.

## РЕЗУЛТАТИ:

Табела 2. Морфологија бактеријске колоније

<b>Облик</b>	
<b>Величина</b>	
<b>Боја</b>	
<b>Профил</b>	
<b>Површина</b>	
<b>Оптичке особине</b>	
<b>Положај</b>	
<b>Ивица</b>	
<b>Структура</b>	
<b>Конзистенција</b>	

## ПИТАЊА:

1. Која је најзаступљенија техника диференцијалног бојења? Набројте и друге технике бојења.
2. Које информације добијемо као резултат диференцијалног бојења по Граму?
3. Објасните улогу реагенса које се користе у процедури бојења по Граму.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 9. МОРФОЛОГИЈА БАКТЕРИЈСКЕ ЋЕЛИЈЕ

**Циљ:** Наставни циљ је одредити морфолошке карактеристике бактеријске ћелије.

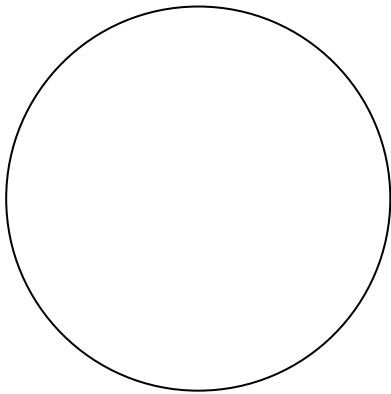
### МАТЕРИЈАЛ И ОПРЕМА:

1. Светлосни микроскоп
2. Прибор за микроскопирање
3. Фиксирани препарати бактерија

### ЗАДАТАК:

1. Посматрати препарат обојен по Граму на увећању  $10\times 100$ .
2. Посматрати препарате представника бактерија из других раздела.
3. Нацртати и обележити назначене делове.

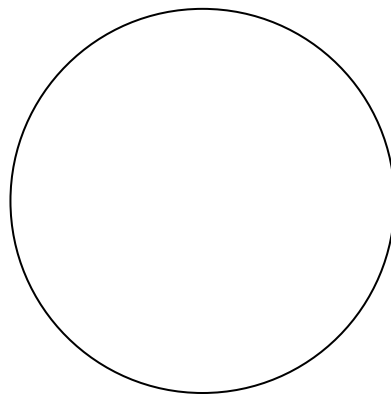
### РЕЗУЛТАТИ:



1. Спорогеност: \_\_\_\_\_
2. Бојење по Граму: \_\_\_\_\_

Увећање: \_\_\_\_\_

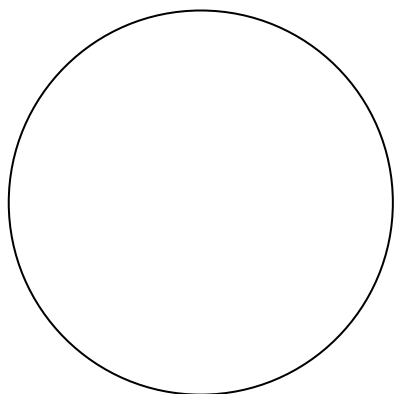
Облик: \_\_\_\_\_



1. Хетероциста
2. Вегетативна ћелија

Увећање: \_\_\_\_\_

Суанобактерија: \_\_\_\_\_



1. Кончаста ћелија
2. Бојење по Граму: G+

Увећање: \_\_\_\_\_

Actinobacteria: \_\_\_\_\_

**ПИТАЊА:**

1. Које су основне морфолошке карактеристике бактерија из раздела Firmicutes, Proteobacteria, Суанобacteria и Actinobacteria?
2. Наведите најзначајније представнике (Латински назив рода) из сваког раздела који су нашли примену у пољопривредној производњи.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 10. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да студенти науче како се методом агарних плоча и методом капи одређује бројност појединих систематских и физиолошких група микроорганизама у земљишту.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. 10 g земљишта
2. Ерленмајер боца са 90 ml стерилног физиолошког раствора
3. Сталак за епрувете
4. 5 епрувета са по 9 ml стерилног физиолошког раствора
5. Стерилне пипете
6. Петри кутије
7. Маркер
8. Хранљиве подлоге

### ЗАДАТАК:

1. Епрувете поставити у сталак и скинути чепове.
2. На поклопцима Петри кутија маркером написати одговарајуће ознаке за микроорганизме, **према табели 3, колона ОЗНАКА**; по једну Петри кутију одвојити за сваку испитивану групу микроорганизама. Петри кутија у којој се већ налази подлога је за *Azotobacter* sp., па на њој написати ознаку АЗБ.
3. На поклопцима Петри кутија уписати ознаке за ваш смер/групу и радну групу на вежби.
4. 10 g узорка земљишта пренети у боцу са 90 ml стерилног физиолошког раствора.
5. Енергично мућкати (кружним покретима из зглоба) 10 минута.
6. Узети пипету. Из боце одпипетирати 1ml суспензије и пренети у прву епрувету. Приликом пипетирања, пазити да се не увуче талог, јер ће се у том случају пипета запушити.
7. Из прве епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у другу епрувету.
8. Из друге епрувете одпипетирати 1ml и пренети у трећу епрувету.
9. Из треће епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у четврту.
10. Из четврте епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у пету. Овим је завршена метода разређења.
11. Узети нову пипету.
12. **Метода агарних плоча:** У празне Петри кутије пипетом засејати 0,5ml суспензије из одговарајуће епрувете, односно из одговарајућег разређења (према упутству из табеле 3). Водити рачуна да се у Петри кутију са одређеном ознаком на поклопцу засеје разређење које је изабрано за ту групу микроорганизама. Засејавање почети од највећег разређења.
13. **Метода капи:** Узети Петри кутију са подлогом, на којој је написана ознака АЗБ. Пипетом узети 0,2 ml суспензије из одговарајућег разређења и распоредити у 30 до 50 капи једнаких, малих капи по површини подлоге.
14. Кориштене пипете одложити у посуду са водом и средити радно место.
15. Лаборант на предмету ће Петри кутије потом одложити у термостат.

Табела 3. Одређивање бројности микроорганизама у земљишту

ГРУПА микроорганизама	ОЗНАКА	ПОДЛОГА	РАЗРЕЂЕЊЕ	ПЕРИОД ИНКУБАЦИЈЕ
Укупан број	УБ	Хранљиви агар	$10^{-6}$	5 дана
Амонификатори	МПА	Мезопептонски агар	$10^{-6}$	2 дана
Актиномицете	С	Синтетички агар	$10^{-4}$	7-10 дана
Гљиве	Ч	Чапеков агар	$10^{-4}$	4 дана
Фосфомобилизатори	Ф	Менкина подлога	$10^{-4}$	2-10 дана
Азотобактер	АЗБ	Фјодоров агар	$10^{-1}$	2 дана

**РЕЗУЛТАТИ:**

1. Нацртати шематски приказ методе разређења и методе агарних плоча.

2. Нацртати Петри кутију у којој је засејавање извршено методом капи.



**ПИТАЊА:**

1. Шта је чиста култура?
2. Шта је колонија?
3. Којим се методама може одредити бројност микроорганизама у земљишту?
4. Приликом засејавања суспензије земљишта, посебно је потребно водити рачуна о избору правилног разређења. Зашто је то важно?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## **ВЕЖБА 11. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ (укупан број, актиномицете, гљиве)**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да студенти науче како се одређује укупан број бактерија, број актиномицета и гљива у земљишту. На микроскопском препарату посматраће целулолитичке микроорганизме

### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Маркер
2. Игла
3. Петри кутије са израслим колонијама
4. Трајни микроскопски препарат
5. Имерзиона течност
6. Папирна вата
7. Ксилол
8. Светлосни микроскоп

### **ЗАДАТАК 1:**

1. Узети маркер и Петри кутију са **укупним бројем бактерија**.
2. Са доње стране Петри кутије, посматрати и избројати израсле колоније, обележавајући маркером сваку избројану колонију.
3. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
4. Узети Петри кутију са **гљивама**.
5. Са доње стране Петри кутије, посматрати израсле колоније и избројати колоније које су паучинасте, баршунасте, у облику вате.
6. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
7. Узети Петри кутију са **актиномицетама**.
8. Узети иглу и отворити Петри кутију.
9. Колоније актиномицета се одликују кожастом, хрскавичавом компактношћу, различитих су боја и тешко се скидају са агара. Зато је потребно иглом превући преко сваке колоније у Петри кутији, и проверити која колонија се теже уклања са површине подлоге.
10. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
11. Према формули за израчунавање броја микроорганизма прерачунати број микроорганизма у 1 граму апсолутно сувог земљишта и резултат уписати у табелу 4.

Формула за израчунавање броја микроорганизма гласи:

$$B = (a \times b \times c) / d$$

где су :

Б - број микроорганизма у 1g апсолутно сувог земљиша

а - просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

б - коефицијент корекције на 1ml (2 – ако је засејавање вршено са 0,5 ml; 5- ако је засејавање вршено са 0,2 ml)

ц - разређење којим је извршено засејавање (видети у табели из предходне вежбе)

д - маса једног грама апсолутно сувог земљишта из кога је извршено засејавање

**ЗАДАТАК 2:**

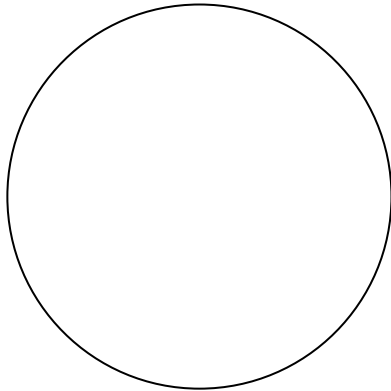
1. Узети трајни микроскопски препарат (целулолитички микроорганизми).
2. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање под имерзијом.
3. Препарат цртати на увељичању  $10\times 100$ .
4. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом. Плочицу вратити на место.
5. На друго парче папирне вате, канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

**РЕЗУЛТАТИ:****1. Бројност микроорганизма у земљишту**

Табела 4. Бројност микроорганизма у испитиваном узорку земљишта

<b>ГРУПА микроорганизма</b>	<b>ОЗНАКА</b>	<b>а</b>	<b>б</b>	<b>ц</b>	<b>д</b>	<b>Б</b>

## 2. Посматрање разлагања целулозне нити



1. Целулозна нит
2. Бактерије и гљиве

Увећање: \_\_\_\_\_

### ПИТАЊА:

1. Најзначајнији разлагачи целулозе
2. Набројати индиректне методе за одређивање броја микроорганизама у земљишту.

*Одговори:*

ДАТУМ: \_\_\_\_\_

ОБЕРА: \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 12. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У ЗЕМЉИШТУ (аминохетеротрофи, азотофиксатори)

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да студенти науче како се одређује број аминохетеротрофа и бактерија рода *Azotobacter* у земљишту. Треба да се упознају са морфолошким особинама ћелије *Azotobacter* sp. и грађом и функцијом бактериоида.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Маркер
2. Петри кутије са израслим колонијама
3. Трајни микроскопски препарати (*Azotobacter* sp., бактериоид)
4. Имерзиона течност
5. Папирна вата
6. Ксилол
7. Светлосни микроскоп

### ЗАДАТАК 1:

1. Узети маркер и Петри кутију са **аминохетеротрофним микроорганизмима**.
2. Са доње стране Петри кутије, посматрати и избројати израсле колоније, обележавајући маркером сваку избројану колонију.
3. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
4. Узети Петри кутију са ***Azotobacter* sp.**
5. Са доње стране Петри кутије, око сваке фертилне капи посматрати израсле млечно-беле, беле, провидне, слузасте колоније и избројати их.
6. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
7. Према формули за израчунавање броја микроорганизма прерачунати број микроорганизма у 1 граму апсолутно сувог земљишта и резултат уписати у табелу 5.

Формула за израчунавање броја микроорганизма гласи:

$$B = (a \times b \times c) / d$$

где су :

B - број микроорганизма у 1g апсолутно сувог земљиша

a - просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

b - коефициент корекције на 1 ml (2 – ако је засејавање вршано са 0,5 ml, или 5, ако је засејавање вршено са 0,2 ml)

c - разређења којим је извршено засејавање (видети у табели из предходне вежбе)

d - маса једног грама апсолутно сувог земљишта из кога је извршено засејавање

### ЗАДАТАК 2:

1. Узети трајни микроскопски препарат.
2. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. Оба препарата цртати на увеличању 10×100.
4. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом. Плочицу вратити на место.

5. На друго парче папирне вате, канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

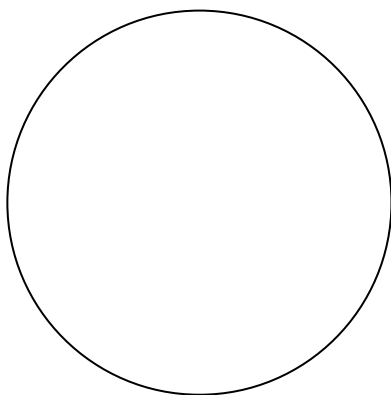
**РЕЗУЛТАТИ:**

**1. Бројност микроргансима у земљишту**

Табела 5. Бројност микроргансима у испитиваном узорку земљишта

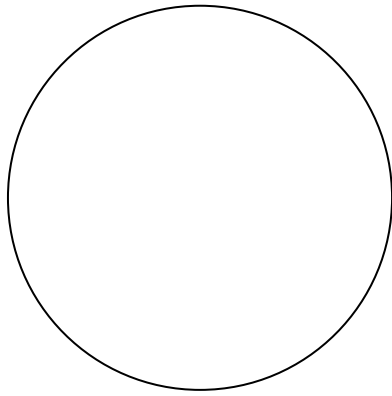
ГРУПА микроргансима	ОЗНАКА	а	б	ц	д	Б

**2. Посматрање микроскопских препарата**



1. Капсула
2. Ћелија

Увећање: \_\_\_\_\_  
 Врста: *Azotobacter* sp.



Увећање: \_\_\_\_\_

Препарат: Бактероиди

**ПИТАЊА:**

1. Шта су бактериоиди и која је њихова улога?
2. Који микроорганизми врше трансформацију органских облика азота? Навести примере.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 13. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ ФОСФОМОБИЛИЗАТОРА И ОПИС БАКТЕРИЈА ЦИКЛУСА ФОСФОРА И СУМПОРА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да студенти науче како се одређује број фосфомобилизатора у земљишту. Треба да се упознају са морфолошким особинама ћелије *Bacillus megatherium* и *Acidithiobacillus thiooxidans*.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Маркер
2. Петри кутије са израслим колонијама
3. Трајни микроскопски препарати
4. Имерзиона течност
5. Папирна вата
6. Ксилол
7. Светлосни микроскоп

### ЗАДАТАК 1:

1. Узети маркер и Петри кутију са **фосфомобилизаторима**.
2. Са доње стране Петри кутије, посматрати израсле колоније. Броје се колоније око којих се формирала прозирна зона.
3. На поклопцу Петри кутије уписати број колонија.
4. Према формули за израчунавање броја микроорганизама прерачунати број микроорганизама у 1 граму апсолутно сувог земљишта и резултат уписати у табелу б.

Формула за израчунавање броја микроорганизама гласи:

$$Б = (а \times б \times ц) / д$$

где су :

Б - број микроорганизама у 1g апсолутно сувог земљиша

а - просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

б - коефициент корекције на 1ml (2 – ако је засејавање вршано са 0,5 ml, или 5 , ако је засејавање вршено са 0,2 ml)

ц - разређења којим је извршено засејавање (видети у табели из предходне вежбе)

д - маса једног грама апсолутно сувог земљишта из кога је извршено засејавање

### ЗАДАТАК 2:

1. Узети трајни микроскопски препарат.
2. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. Оба препарата цртати на увећању 10×100.
4. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом. Плочицу вратити на место.
5. На друго парче папирне вате, канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.



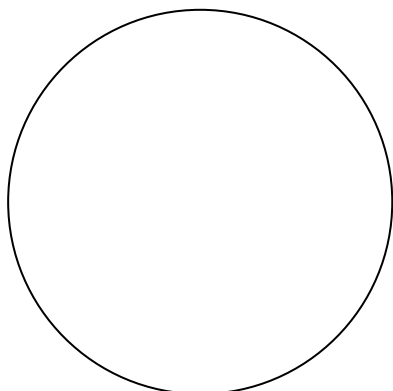
## РЕЗУЛТАТИ:

### 1. Бројност микроорганизама у земљишту

Табела 6. Бројност микроорганизама у испитиваном узорку земљишта

ГРУПА микроорганизама	ОЗНАКА	а	б	ц	д	Б

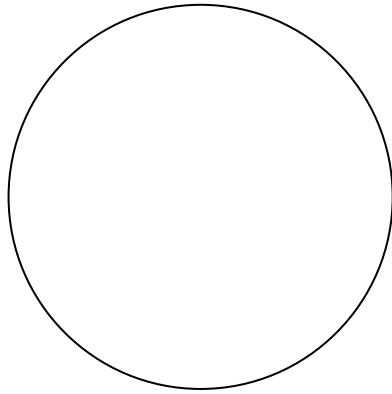
### 2. Посматрање микроскопских препарата



1. Штапићаста ћелија- бацил
2. Спора
3. Диплобацил
4. Бацили у ланцима
5. G+

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Bacillus megatherium*



1. Аспорогена штапићаста ћелија
2. Диплобактерија
3. G-

Увећање: \_\_\_\_\_

Врста: *Acidithiobacillus thiooxidans*

**ПИТАЊА:**

1. У чему се огледа значај фосфомобилизатора?
2. Навести значај бактерије *Bacillus megatherium* у циклусу фосфора?
3. Назив бактерије *Acidithiobacillus thiooxidans* указује да ова бактерија учествује у микробиолошким трансформацијама ког елемента?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 14. ИСПИТИВАЊЕ УТИЦАЈА ПЕСТИЦИДА НА МИКРООРГАНИЗМЕ

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте на који начин пестициди утичу на микроорганизме у *in vitro* условима.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

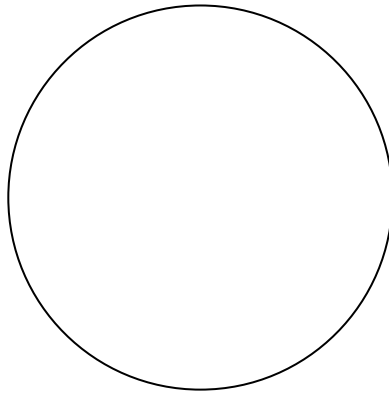
1. Чисте културе микроорганизма
2. Петри кутије са разливеном подлогом (хранљиви агар)
3. Стерилни дискови од филтер папира
4. пинцета
5. узорци пестицида

### ЗАДАТАК:

1. Узети чисту културу микроорганизма и Петри кутију са подлогом (рад појединачно/у групама)
2. Направити размаз микроорганизма.
3. Уронити дискове у пестициде до пола и поставити их на површину хранљиве подлоге са микроорганизмима. Контрола је диск уроњем у дестиловану воду.
4. Ставити на инкубацију на 28°C у трајању од 24 до 48 сати.
5. У случају инхибиторног утицаја пестицида, измерити зону инхибиције.
6. У случају стимулације раста микроорганизма, констатовати стимулативан утицај пестициде
7. Резултате уписати у табелу и нацртати у видно поље.

### РЕЗУЛТАТ:

Пестицид	Боја	Концентрација	Зона инхибиције (mm)	Стимулација	Коментар



Пестицид: \_\_\_\_\_

Постављени дискови у Петри кутији и зона инхибиције/стимулације

**ПИТАЊА:**

1. Како пестициди утичу на микроорганизме?
2. Којом методом се одређује утицај пестицида на микроорганизме?
3. Да ли се индиректном методом може испитати утицај пестицида на микроорганизме? Објаснити.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 15. ИСПИТИВАЊЕ КВАЛИТЕТА МИКРОБИОЛОШКИХ ЋУБРИВА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте са параметрима који се испитују приликом провере квалитета микробиолошких ђубрива, одеђивање основних физичких и хемијских својстава, микроскопско испитивање ђубрива (провера присуства живих и вијабилних ћелија микроорганизама, спора, инфективних пропагула).

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Микроскоп
2. Предметне плочице, покровно стакалце
3. Капаљка
4. рН индикатор папир
5. Узорци микробиолошких ђубрива

### ЗАДАТАК:

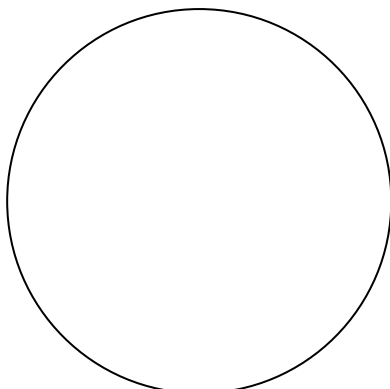
1. Узети узорак микробиолошког ђубрива (рад појединачно/у групама)
2. Одредити боју, мирис, агрегатно стање, текстуру (органолептички преглед)
3. Одредити рН реакцију
4. Направити микроскопски препарат (нативни) и посматрати под микроскопом (увећање 10×40).
5. Резултате уписати у табелу 7 и нацртати у видно поље.

### РЕЗУЛТАТИ:

Табела 7.

Микробиолошко ђубриво	Боја	Мирис	Агрегатно стање	Текстура	рН реакција

Микроорганизми у микробиолошком ђубриву



Увећање: \_\_\_\_\_

**ПИТАЊА:**

1. Који параметри се проверавају приликом испитивања квалитета микробиолошких ђубрива?
2. Зашто је важно проверавати квалитет микробиолошких ђубрива?
3. Како се све може утврдити број микроорганизама/спора/инфективних пропагула у микробиолошком ђубриву? Објаснити сваку методу.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 16. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У СТОЧНОЈ ХРАНИ БИЉНОГ ПОРЕКЛА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да студенти науче како се *Методом агарних плоча* испитује микробиолошка исправност сточне хране, односно како се одређује укупна бројност сапрофитних бактерија и гљива, присутност рода *Salmonella*, сулфито-редукујућих бактерија и бактерије *Escherichia coli*. На микроскопском препарату посматраће целулолитичке микроорганизме.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. 10 g сточне хране
2. Ерленмајер боца са 90 ml стерилног физиолошког раствора
3. Сталак за епрувете
4. 5 епрувета са по 9 ml стерилног физиолошког раствора
5. Стерилне пипетте
6. 5 празних Петри кутија
7. Маркер
8. Трајни микроскопски препарат
9. Имерзiona течност
10. Папирна вата
11. Ксилол
12. Светлосни микроскоп
13. Хранљиве подлоге

### ЗАДАТАК 1:

1. Епрувете поставити у сталак и скинути чепове.
2. На поклопцима Петри кутија маркером написати одговарајуће ознаке за микроорганизме, **према табели 8, колона ОЗНАКА**; по једну Петри кутију одвојити за сваку испитивану групу микроорганизма. На поклопцима Петри кутија уписати ознаке за ваш смер/групу и радну групу на вежби.
3. 10 g узорка сточне хране пренети у боцу са 90 ml стерилног физиолошког раствора.
4. Енергично мућкати (кружним покретима из зглоба) 10 минута.
5. Узети пипету. Из боце одпипетирати 1ml суспензије и пренети у прву епрувету. Приликом пипетирања, пазити да се не увуче талог, јер ће се у том случају пипета запушити.
6. Из прве епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у другу епрувету.
7. Из друге епрувете одпипетирати 1ml и пренети у трећу епрувету.
8. Из треће епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у четврту.
9. Из четврте епрувете одпипетирати 1ml суспензије и пренети у пету. Овим је завршена метода разређења.
10. Узети нову пипету.
11. Метода агарних плоча: У празне Петри кутије пипетом засејати 1ml суспензије из одговарајуће епрувете, односно из одговарајућег разређења (према упутству из табеле). Водити рачуна да се у Петри кутију са одређеном ознаком на поклопцу засеје разређење које је изабрано за ту групу микроорганизма. Засејавање почети од највећег разређења.
12. Кориштене пипете одложити у посуду са водом.
13. Лаборант на предмету ће Петри кутије потом одложити у термостат.

14. У термину следеће вежбе, прерачунати бројност микроорганизама и уписати резултат у табелу 9.

Табела 8.Одређивање бројности микроорганизама у сточној храни.

ГРУПА микроорганизама	ОЗНАКА	ПОДЛОГА	РАЗРЕЂЕЊЕ	ПЕРИОД ИНКУБАЦИЈЕ
Укупан број	УБ	Хранљиви агар	$10^{-6}$	5 дана
Гљиве	Ч	Чапеков агар	$10^{-4}$	4 дана
<i>Salmonella</i> sp.	С	SS агар	$10^{-1}$	2 дана
<i>Escherichia coli</i>	Е	Ендо агар	$10^{-1}$	2 дана
Сулфит-редукујуће бактерије	СР	Сулфитни агар	$10^{-3}$	5 дана

### ЗАДАТАК 2:

1. Узети трајни микроскопски препарат.
2. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање.
3. Препарат цртати на увеличању  $10\times 100$ . Уочити бактерије које разлажу целулозну нит.
4. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом. Плочицу вратити на место.
5. На друго парче папирне вате, канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

### РЕЗУЛТАТИ:

1. а) Нацртати шематски приказ методе разређења и методе агарних плоча.



б) Попуните табелу на основу резултата које сте добили у вашој Петри кутији:

Табела 9. Бројност микроорганизама у сточној храни

ГРУПА микроорганизама	ОЗНАКА	а	б	Б

Формула за израчунавање броја микроорганизама гласи:

$$Б = а \times б$$

где су :

Б – број микроорганизама у 1g сточне хране

а – просечан број колонија израслих на засејаним Петри кутијама

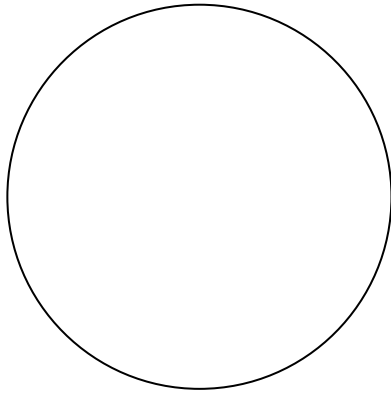
б - разређења којим је извршено засејавање (видети у табели из предходне вежбе)

в) Заокружите одговор према вашем резултату из Петри кутије:

Присуство патогених бактерија у узорку сточне хране:

- *Salmonella* spp. (SS агар): присутне/нису присутне
- *Escherichia coli* (Ендо агар): присутне/нису присутне
- Сулфито-редукујуће бактерије (СР агар): присутне/нису присутне

## 2. Посматрање разлагања целулозне нити



- 1.Целулозна нит
- 2.Бактерије

Увећање: \_\_\_\_\_

### ПИТАЊА:

1. Шта је чиста култура?
2. Шта је колонија?
3. На који начин долази до контаминације сточне хране?
4. Зашто је потребно вршити микробиолошка испитивања сточне хране?
5. Који микроорганизми се према важећим законским прописима не смеју наћи у 50 g сточне хране?

*Одговори:*

ДАТУМ: \_\_\_\_\_

ОБЕРА: \_\_\_\_\_

## **ВЕЖБА 17. МИКРООРГАНИЗМИ У ПРОИЗВОДЊИ СИЛАЖЕ**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са улогом микроорганизама у производњи силаже.

### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Пинцета
2. Предметна плочица
3. Сталак са бојом
4. Кадица за бојење
5. Флаша са водом
6. Пламеник
7. Имерзиона течност
8. Папирна вата
9. Ксилол
10. Светлосни микроскоп
11. Дестилована вода
12. Штапић
13. Порцеланска шоља
14. Индикатор (смеша истих количина бромтимол-плавог и метил-црвеног)

### **ЗАДАТАК 1:**

1. Пинцетом узети мало силаже
2. Без додавања воде, силажом притиснути предметно стакло, како би остао отисак.
3. Препарат оставити да се суши на ваздуху.
4. Када се препарат осуши, фиксирати га на пламену.
5. Нанети боју на препарат (кристал виолет) и оставити да делује 2 до 3 минуте.
6. Вишак боје испрати водом.
7. Препарат осушити филтер папиром.
8. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање под имерзијом.
9. Препарат цртати на увељичању 10×100.
10. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом и ставити је у кадицу за прање.
11. На друго парче папирне вате, канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
12. Угасити и спаковати микроскоп.

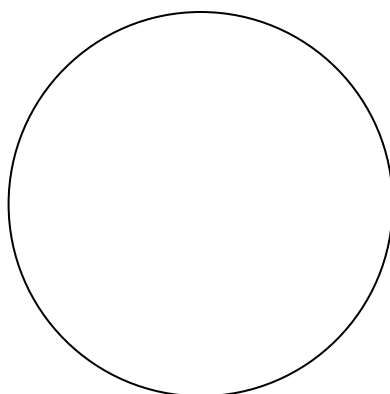
### **ЗАДАТАК 2:**

1. У епрувету ставити мало силаже и долити мало дестиловане воде, да би се силажа прекрила.
2. Садржај добро измијешати штапићем. рН одредити помоћу индикатора.
3. У порцеланску шољу пипетом унети 2 ml екстракта силаже и додати 2 капи индикатора.
4. Упоредјујући боју у шољи са подацима датим у табели 10, одредити концентрацију водоникових јона испитиваног узорка силаже.

## РЕЗУЛТАТИ:

### 1. Посматрање микроскопског препарата силаже

На препарату обично доминирају *Lactobacillus plantarum* - хомоферментативни мезофилни кратки штапићи, који се често распоређују у паралелне редове и млечнокиселе стрептококе. Понекад се могу наћи ћелије квасаца са пупољцима. У силажи слабог квалитета налазе се бацили и плесни.



Увећање: \_\_\_\_\_

### 2. Одређивање концентрације водоникових јона у силажи

Табела 10. Одређивање рН у силажи

Боја индикатора	рН вредност
Зелено-плава	7,2-7,6
Зелена	6,4-7,2
Жуто-зелена	6,1-6,4
Жута	5,2-6,1
Наранџаста	4,6-5,2
Црвено-наранџаста	4,2-4,6
Црвена	4,2-и ниже

рН узорка силаже је:

**ПИТАЊА:**

1. Који је биохемијски процес у основи производње силаже?
2. Да би се осигурао оптималан развој бактерија млечне ферментације у процесу силирања, потребно је да се створе какви услови?
3. Присуство већег броја којих микроорганизама у силажи доводи до пада киселости односно слабијег квалитета силаже?

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## **ВЕЖБА 18. МИКРООРГАНИЗМИ МЛЕЧНЕ ФЕРМЕНТАЦИЈЕ**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је да се студенти упознају са особинама и улогом микроорганизама млечне ферментације.

### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Култура микроорганизама
2. Еза
3. Петри кутија са млечним агаром (млечни агар се добија мешањем једног дела стерилисаног млека са 1 до 5 делова растопљеног 3% агара).
4. Трајни микроскопски препарати
5. Имерзиона течност
6. Папирна вата
7. Ксилол
8. Светлосни микроскоп

### **ЗАДАТАК 1:**

1. На поклопцу Петри кутије написати маркером који сте смер, група и број радне групе.
2. Езом узети малу количину бактеријске културе.
3. У виду цик-цак потеза, езом засејати културу на чврсти млечни агар разливен у Петри кутији.
4. Засејане подлоге се инкубирају 48 сати на 37°C.

### **ЗАДАТАК 2:**

1. Узети трајни микроскопски препарат.
2. Ставити га на сточић микроскопа и микроскопирати према протоколу за микроскопирање са имерзијом.
3. Препарат цртати на увеличању 10×100. Уочити бактерије.
4. По завршетку рада, микроскопски препарат обрисати сувом папирном ватом. Пластицу вратити на место.
5. На друго парче папирне вате канути пар капи ксилола и тиме обрисати имерзиони објектив.
6. Угасити и спаковати микроскоп.
7. Оставити чисто радно место.

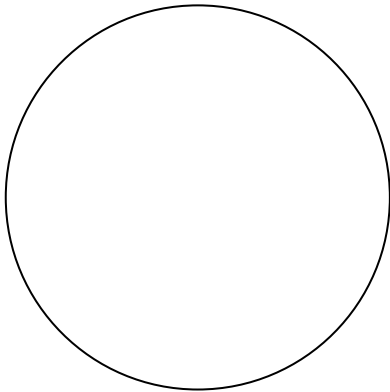
### **РЕЗУЛТАТИ:**

#### **1. Хидролиза казеина млека**

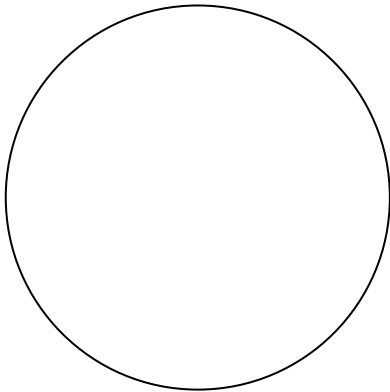
Уколико је испитивани микроорганизам разложио казеин, око колоније се формира провидна, просветљена зона.

Написати коментар на добијене резултате:

## 2. Микроскопирање трајних препарата



Увећање: \_\_\_\_\_  
Врста: *Streptococcus lactis*



Увећање: \_\_\_\_\_  
Врста: *Lactobacillus bulgaricus*

### ПИТАЊА:

1. Коју улогу имају бактерије млечне ферментације у производњи силаже, млечно-киселих производа, киселењу поврћа?
2. Навести врсте бактерија млечне ферментације.

Одговори:

ДАТУМ: \_\_\_\_\_

ОБЕРА: \_\_\_\_\_

## **ВЕЖБА 19. ОДРЕЂИВАЊЕ БРОЈНОСТИ МИКРООРГАНИЗАМА У МЛЕКУ И МЛЕЧНИМ ПРОИЗВОДИМА**

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је савладати методу за прављење препарата за микроскопско посматрање бактерија млечне ферментације као и одређивање укупног броја сапрофитних бактерија у узорцима млека/млечних прерађевина методом агарних плоча.

### **МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:**

1. Светлосни микроскоп и прибор за микроскопирање
2. Узорци млека и млечних производа за испитивање
3. Епрувете са 9 ml физиолошког раствора
4. Пипете
5. Петри кутије
6. Хранљива подлога
7. Прибор за просто бојење

### **ЗАДАТАК 1:**

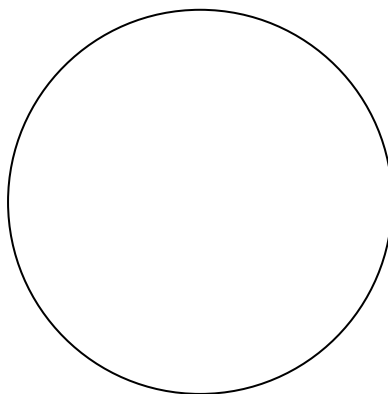
1. Направити обојени препарат из узорка (просто бојење)
2. Посматрати препарат на увећању  $10\times 100$ .
3. Нацртати.

### **ЗАДАТАК 2:**

1. Обележите Петри кутије-рад у групама (обележи групу, име/иницијале, испитиван материјал)
2. Направити серију разређења са узорком који се испитује.
3. Засејати 1ml узорка у празну Петри кутију, па прелити подлогом за укупан број бактерија.
4. Инкубација на  $28^{\circ}\text{C}$  у трајању од 48 сати.
5. Извршити опис раста бактерија на хранљивој подлози
6. Одредити укупан број бактерија (CFU/ml узорка)

### **РЕЗУЛТАТИ:**

1. **Микроскопско посматрање бактерија млечне ферментације**



Увећање: \_\_\_\_\_

Облик: \_\_\_\_\_

Спорогеност: \_\_\_\_\_



2. **Бројност бактерија у узорцима млека/млечним прерађевинама** (опис раста бактерија на хранљивој подлози).

**ПИТАЊА:**

1. Како се одређује микробиолошка исправност млека и млечних производа?
2. Бројност којих група микроорганизама у млеку и млечним производима се одређује?
3. Објаснити методе за одређивање биохемијске активности млека.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 20. ИДЕНТИФИКАЦИЈА ПРИСУСТВА МИКРООРГАНИЗАМА У МЕСУ И ПЕРАЋЕВИНАМА ОД МЕСА

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је савладати протокол за одређивање присуства Грам-негативних колиформних бактерија користећи хранљиву подлогу *Salmonella-Shigella* агар (SS агар), као и микроскопско посматрање протеолитичких бактерија из рода *Bacillus*.

### МАТЕРИЈАЛ И ПРИБОР:

1. Узорци меса и прерађевина за испитивање
2. Петри кутије са разливеним SS агаром
3. Стерилни ватени штапићи
4. Физиолошки раствор
5. Светлосни микроскоп и прибор за микроскопирање
6. Микроскопски препарат *Bacillus* spp.

### ЗАДАТАК 1:

Упутство за рад:

1. Обележите Петри кутије (обележи групу, име/иницијале, испитиван материјал)
2. Добро утрљати стерилне ватене штапиће у испитиван узорак и направите размаз на површини SS агара (цик-цак линија).
3. Инкубација на 37°C.
4. Извршити опис раста бактерија на SS агару користећи следећи критеријум:
5. *Escherichia*: ферментише лактозу и има **црвенкасто ружицасте колоније** на агару.
6. *Salmonella*: не ферментише лактозу, али продукује водоник сулфид. Колоније су или **црне или беличасте са црном тачком у средини**.
7. *Shigella*: не ферментише лактозу, не продукује водоник сулфид. **Колоније су прозирне**.
8. Резултате уписати у табелу 11.

### ЗАДАТАК 2:

1. Посматрати препарат на увећању 10×100.
2. Нацртати.

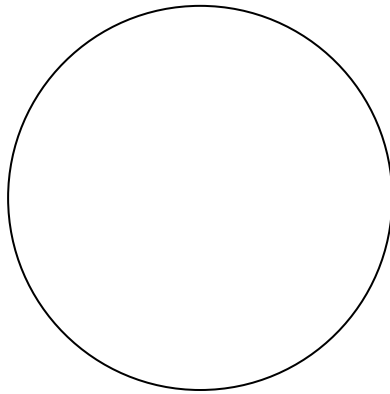
### РЕЗУЛТАТИ:

1. Присуство микроорганизама у узорцима меса и прерађевинама од меса.

Табела 11. Присуство бактерија у узорцима меса

Микроорганизам	Пилеће месо	Кобасице	Млевено месо	Салама	Риба
<i>Escherichia</i> / колиформни мо					
<i>Salmonella</i> sp.					
<i>Shigella</i> sp.					

**2. Микроскопско посматрање спорогених бактерија из рода *Bacillus*.**



Увећање: \_\_\_\_\_

Облик: \_\_\_\_\_

Спорогеност: \_\_\_\_\_

**ПИТАЊА:**

1. Како објашњавате појаву да се на SS агару развијају колоније различите боје?
2. Зашто се у млевеном месу може очекивати већи број бактерија у односу на веће комаде меса?
3. Које бактерије изазивају кварење меса? Наведите родове/врсте.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## ВЕЖБА 21. КОНТРОЛА КВАЛИТЕТА МЕСА, МЛЕКА, ЊИХОВИХ ПРОИЗВОДА И МЕРЕ ЗА СПРЕЧАВАЊЕ КОНТАМИНАЦИЈЕ ХРАНЕ

**Циљ:** Наставни циљ вежбе је упознати студенте са протоколима тестирања хране на присуство патогених микроорганизама (нпр. *Salmonella* sp., *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *Bacillus cereus*), као и са мерама које се спроводе у циљу спречавања контаминације хране.

Пракса контроле квалитета и исправности хране користи се од почетка XX века. Микробиолози знају да ће, ако је производни процес хране под контролом, број микроорганизама индикатора такође бити под контролом. Уобичајени тестови за микроорганизме индикаторе укључују тестове за одређивање укупног броја бактерија и гљива и броја колиформних бактерија из фамилије *Enterobacteriaceae* (*Salmonella*, *Escherichia*, *Shigella* и друге).

Одређивање **укупног броја бактерија и гљива** методом агарних плоча један је од најчешће примењиваних тестова. Ова метода пружа информације о укупној популацији присутних сапрофитних микроорганизама. Ова анализа укључује бројање бактерија, гљива и квасаца који расту у умереном температурном опсегу, обично између 20 и 40°C, у присуству кисеоника. Уколико се овом методом утврди број микроорганизама који је изнад одређеног прага, то обично сугерише/значи да су санитарне мере одређеног простора/објекта или опреме биле неефикасне или неправилно изведене.

Осим одређивања бројности, врше се и **биохемијске анализе** које укључују оксидаза тест, каталаза тест, продукцију индол сирћетне киселине, метал ред тест, Voges - Proskauer (VP) тест, тест покретљивости, коришћење цитрата, ферментацију угљених хидрата и друге. Ове анализе се могу радити применом стандардних метода али и уз помоћ брзих тестова - китова, тзв. биохемијских низова.

**Имуноензимски тест** (познатији и код нас под енглеским називом **ELISA**, Enzyme Linked Immunosorbent Assay) је **серолошки тест** који се заснива на доказивању специфичних протеинских маркера који се називају антигени а који су смештени у ћелији или флагелама бактерија. Специфично антитело против одређеног микроорганизама је везано за ензим, најчешће пероксидазу или алкалну фосфатазу и причвршћено за пластичну полистиренску плочу која има 96 „бунарчића“. У овако припремљену тзв. „микротитар плочу“ додаје се одговарајући узорак који се потом ставља на инкубацију. Након инкубације, као супстрат за пероксидазу додаје се водоник пероксид а за алкалну фосфатазу нитрофенил фосфат. У случају позитивног налаза односно присуства специфичног микроорганизама настаје промена боје, код пероксидазе јавиће се смеђа а у случају алкалне фосфатазе жуто-зелена боја, што се може видети голим оком или спектрофотометром. Ови тестови су врло специфични, мада их карактерише ниска осетљивост ( $10^6$  CFU/ml узорка). Такође се често користе и „моноклонска антитела“ намењена за најспецифичније делове протеинских антигена бактерија, што омогућава брзу и поуздану детекцију микроорганизама.

**PCR тестови** се спроводе да се изврши детекција патогених бактерија и токсикогених гљива, али и да се утврди присуство генетски модификованих организама у храни. Ова врста анализе је јако важна, јер по тренутно важећим регулативама Европске Уније, сва храна за људе и сточна храна која садржи генетски модификоване биљке у концентрацији већој од 0,9%, мора бити јасно означена.

**Колиформне бактерије** су разнолика група бактерија које се налазе у животној средини и увек су присутне у пробавном тракту животиња и људи. Познате су по својој способности да ферментишу лактозу да би произвеле киселину и угљен-диоксид. Колиформне бактерије нису увек доказ фекалне контаминације, а њихова бројност се надгледа и регулише у многим земљама и индустријама. Истраживања показују да само део колиформних бактерија има фекално порекло док већину чине загађивачи из животне средине.

Присуство колиформних бактерија указује на неправилно спроведено чишћење, нехигијенске услове или накнадну контаминацију у процесу складиштења.

Контаминација хране микроорганизмима је углавном последица лоших хигијенских услова особа које су укључене у припрему хране. Микроорганизми се брзо умножавају и могу довести до појаве непожељних последица након конзумирања такве хране. У табели 12 су приказане мере које би се морале спроводити како би се смањила могућност контаминације хране и обезбедила микробиолошка исправност хране.

Табела 12. Мере спречавања контаминације хране

КОРАК	ОПАСНОСТ	МЕРА ПРЕВЕНЦИЈЕ
Снабдевање/куповина	Контаминација сирове хране	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Набавка хране од поузданих добављача</li> <li>✓ Одржавање хигијенских услова приликом транспорта и рада са сировим намирницама</li> </ul>
	Контаминација готових/куваних производа	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Набавка хране од проверених/поузданих добављача</li> <li>✓ Набавка хране од произвођача који су НАССР* сертифициковани</li> </ul>
Складиштење/чување	Контаминација	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Држати храну запаковану или у затвореним посудама</li> <li>✓ Заштита од штеточина</li> </ul>
	Умножавање микроорганизама	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Пратити време и температуру складиштења</li> </ul>
Припрема хране	Контаминација због лоше личне хигијене	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Опрати руке пре почетка рада</li> <li>✓ Спречити контаминацију радних површина и посуђа</li> <li>✓ Раздвојити сирову храну од куване</li> </ul>
	Умножавање микроорганизама	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Обратити пажњу на време држања хране на собној температури</li> </ul>
Кување	Преживљавање патогена	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Адекватна термичка обрада хране (темп. хране 70°C)</li> </ul>

Хлађење и чување на ниским температурама	Умножавање микроорганизама и клијање спора; продукција токсина	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Обезбедити брзо хлађење хране испод 5°C</li> <li>✓ Не држати храну на собној температури дуже од 2 сата</li> <li>✓ Избегавати пренатрпавање фрижидера или замрзивача</li> </ul>
	Контаминација	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Водити рачуна о чистоћи посуда у којима се држе кувана храна</li> <li>✓ Посебно држати сирову храну од куване</li> </ul>
Држање хране на високој температури	Умножавање микроорганизама и клијање спора; продукција токсина	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Држати храну на температури изнад 60°C</li> </ul>
Подгревање	Преживљавање микроорганизама	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Обезбедити адекватно подгревање**</li> </ul>
Сервирање хране	Умножавање микроорганизама и клијање спора; продукција токсина	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Обезбедити адекватно подгревање</li> </ul>
	Контаминација	<ul style="list-style-type: none"> <li>✓ Не дирати храну рукама</li> <li>✓ Сервирати топлу храну</li> <li>✓ Спречити контакт свеже, некуване хране и прљавог посуђа</li> </ul>

\* Hazard Analysis Critical Control Point (систем безбедности хране који се заснива на анализи и контроли потенцијалних биолошких/микробиолошких, хемијских и физичких опасности којима су изложене сировине, могућих опасности при руковању, производњи, дистрибуцији и конзумирању крајњег производа. Његова примена подразумева поштовање стандардних оперативних процедура и упутстава којима се смањују ризици по безбедности хране)

\*\*Сви делови хране морају достићи температуру од најмање 74°C. Подгревање се мора изводити брзо, најкасније 2 сата од кад је храна извађена из фрижидера. Храна која се подгрева у микроталасној пећници се након подгревања, а пре служења мора промешати, покрити и оставити да стоји 2 минуте.

**ПИТАЊА:**

1. Наведите најефикасније мере спречавања контаминације хране у кућним условима?
2. Да ли контаминација хране микроорганизмима зависи од природе/порекла/врсте хране (нпр. јабука, лимун, пилеће месо, млевена јунетина, свежа и сушена кобасица, шунка, млади сир или пармезан)? Објаснити одговор.

*Одговори:*

**ДАТУМ:** \_\_\_\_\_

**ОБЕРА:** \_\_\_\_\_

## **РЕЧНИК МИКРОБИОЛОШКИХ ПОЈМОВА**



**АБИОТИЧКИ ФАКТОРИ** - обухватају комплекс фактора неживе природе. Могу се разврстати у три групе фактора: климатске факторе (светлост, температуре, вода и влажност, ваздух, кисеоник, сунчево зрачење), едафске (физичке, хемијске и биолошке особине земљишта и стена) и орографске факторе (рељеф, надморска висина, нагиб терена, степен разуђености).

**АБИОЗА** - престанак живота, општа неспособност за живот.

**АЦЕЛУЛАРНО** – од латинског *a* - без и *cellula* - ћелија; безћелијско, нећелијско. Ацелуларни организми нису достигли ниво ћелијске грађе. Вируси су ацелуларни.

**АЦИДОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који за раст и развој захтевају киселу средину. Оптимална вредност рН средине ових микроорганизама је око 5. Овде спада највећи број квасаца, гљива и поједине бактерије.

**АЦИДОГЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - ацидофилни микроорганизми који у току свог метаболизма издвајају киселине па тако закишељавају средину у којој живе. Овде спадају многе гљиве, бактерије млечне и сирћетне ферментације.

**АЦИДОТОЛЕРАНТНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који толеришу широк распон ниских рН вредности.

**АДЕНОЗИН-3-ФОСФАТ** - макромолекул, који у ћелији представља извор енергије.

**АЕРОБНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који захтевају присуство слободног кисеоника као крајњег акцептора водоника и електрона у процесу дисања. Живе у ораничном слоју земљишта, на површини воде, надземним деловима биљака, телу човека и животиња, у ваздуху.

**АЕРОТОЛЕРАНТНИ АНАЕРОБНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који не користе кисеоник. Ови микроорганизми енергију добијају у процесима анаеробних ферментација.

**АГАР** - сува хидрофилна колоидна супстанца која се добија екстракцијом из црвених алги, користи се за спремање чврстих хранљивих подлога.

**АГАРНЕ ПЛОЧЕ** - метода одређивања квантитативне заступљености микроорганизама у лабораторијским условима.

**АКИНЕТИ** - споре код појединих *Cyanobacteria*. Настају од вегетативних ћелија од који су крупније и тамније. Основна функција им је преживљавање неповољних услова.

**АКСИЈАЛНА НИТ** - органела за кретање код спирохета (бактерије спиралног облика).

**АКТИНОРИЗЕ** - симбиотска заједница актиномицета из рода *Frankia* и биљака из фамилија *Rosaceae*, *Muriaceae* и *Betulacea*. На корену ових биљака формирају се крупне нодуле у којима се фиксира елементарни азот. Овај азот биљка користи за своје потребе, а истовремено актиномицету снабдева угљеним хидратима.

**АКТИВНИ ТРАНСПОРТ** - је транспорт супстанци кроз ћелијску мембрану уз утрошак енергије. Уколико се преноси један молекул или јон, онда се то назива унипорт, ако се преноси два или више молекула или јона, онда се то назива котранспорт.

**АЛГЕ** - од латинске речи *algae* што значи „морска трава“; еукариотски фототрофни једноћелијски и вишећелијски организми.

**АЛКАЛОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који за раст и развој захтевају алкалну средину. Оптимална вредност рН је између 8 и 10. Овде спадају алге, као и бактерије (уреобактерије и амонификатори).

**АЛКАЛОГЕНИ** - микроорганизми који у току свог метаболизма продукују једињења базне природе и подижу рН вредност у средини у којој живе.

**АМЕНСАЛИЗАМ** - је антагонистички однос између микроорганизама у коме један инхибира раст другог преко производа метаболизма- антибиотика, киселина, база.

**АМИНОАУТОТРОФИ** - група микроорганизама који користе азот из неорганских једињења.

**АМИНОХЕТЕРОТРОФИ** - група микроорганизама који као извор азота користе органска једињења.

**АМОНИФИКАТОРИ** - обухватају велику групу бактерија, гљива и актиномицета који учествују у процесу амонификације тј. процесу разградње протеина до амонијака.

**АНАБИОЗА** - стање успореног раста, размножавања и ензимске активности микроорганизама – латентно стање или стање мировања.

**АНАЕРОБНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који не могу да живе у присуству кисеоника. Енергију добијају у процесима анаеробних ферментација, а акцептор водоника и електрона им је неко органско једињење типа алдехида или кетона. Живе у дубљим слојевима земљишта, органима за варење, млеку, млечним производима, месу, силажи.

**АНАМОРФ** - фаза размножавања гљива, где се ћелије формирају бесполним путем у процесу митозе, вегетативна фаза.

**АНТЕРИДИЈЕ** - мушке гаметангије код гљива из раздела Oomycota и Ascomycota.

**АНТИБИОТИК** - је продукт метаболизма неких гљива и актиномицета који неповољно делује на развој или размножавање других микроорганизама.

**АНТИБИОЗА** - или антагонизам, такав однос у којем једна микроорганизама спречава развој или директно уништава другог.

**АНТИПОРТ** – облик котранспорта, честице се истовремено преносе у супротном смеру (унос једне супстанце, условљава избацивање друге, и обрнуто).

**АНТРОПОГЕНИ ФАКТОРИ** - фактори који се односе на дејства која на живи свет врши човек. Могу бити посредни, када мењају физичко-хемијске и биолошке услове средине и непосредни, када делују директно на организме.

**АРБУСКУЛЕ** - специјалне структуре/творевине које формирају арбускуларне микоризне гљиве у ћелијама кортекса корена. Арбускуле изгледом подсећају на дрвеће.

**АРТРОСПОРЕ** - хифе појединих врста гљива раскидају се на њихове појединачне ћелије, при чему се сваки тај део понаша као спора. Овако настале споре називају се атроспоре или талусне споре.

**АСЕПТИЧНЕ ТЕХНИКЕ** - технике које се спроводе у стерилним условима.

**АСПЕРГИЛОЗА** - болести људи и животиња узрокованих гљивама из рода *Aspergillus*.

**АСПОРОГЕНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који не формирају споре.

**АУКСИНИ** - биљни хормони који стимулишу издуживање биљне ћелије, диференцијацију ксилема и флоема, развој цветних пупољака, индукују формирање плодова и др. Утврђено је да око осамдесет процената изолованих

микроорганизама из ризосфере различитих биљака има способност да продукује ауксине.

**АУКСОСПОРА** – од грчке речи *aukso* - расти, увећавати; стадијум у развићу силикатних алги, који се одликује способношћу растења. Настаје полним путем, односно спајањем једара две јединке.

**АУТОХТОНА ПОПУЛАЦИЈА** - популација организама која живи у одређеном станишту.

**АУТОТРОФАН** начин исхране - је начин исхране еукариотских биљака, неких бактерија и алги при чему оне процесима фотосинтезе или хемосинтезе из неорганских материја, у присуству светлосне или хемијске енергије стварају органску материју.

**АУТОТРОФИ** - произвођачи, продуценти; организми који су способни да синтетишу органске материје (храну) из неорганских једињења. Овде спадају углавном зелене биљке, алге и неке врсте бактерија. Према извору енергије коју користе за синтезу хране деле се на фототрофе (фотосинтетичке организме) и хемотрофе (хемосинтетичке организме).

**АЗОТОФИКСАЦИЈА** - процес коришћења азота из ваздуха и превођења у облик приступачан биљци.

**АЗОТОФИКСАТОРИ** - микроорганизми који уз помоћ ензима нитрогеназе усвајају азот из атмосфере.

**БАКТЕРИЦИДИ** - средства која уништавају бактерије.

**БАКТЕРИЈЕ** - једноћелијски, прокариотски микроорганизми. Обавијене су плазма мембраном, а врло често и додатним ћелијским зидом и капсулом. Многе су изазивачи обољења људи, биљака и животиња, али је још већи број сапрофита.

**БАКТЕРИОЛОГИЈА** – од грчке речи *bacterion* - штапић, палица и *logos* - наука; наука која проучава морфолошка својства бактерија, њихов раст, метаболизам, и генетику.

**БАКТЕРИОТОКСИНИ** - токсини које ослобађају бактерије.

**БАКТЕРОИДИ** - ћелије бактерија неправилног, разгранатог облика (у облику латиничних слова Y, H, L), које испуњавају нодуле (квржице) на корену легуминозних и малог броја нелегуминозних биљака. Бактероиди у нодулама потичу од бактерија из рода *Rhizobium*, *Bradyrhizobium*, *Sinorhizobium*, *Mesorhizobium*, *Allorhizobium* и *Azorhizobium*.

**БАКТОПРЕНОЛ** - у липидима растворљив, мембрански везан полипренол, који је први пут идентификован код одређених врста бактерија рода *Lactobacillus*. Има кључну улогу у синтези ћелијског зида Грам-позитивних бактерија.

**БАРОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који живе у условима високог притиска.

**БАЗАЛНО ТЕЛАШЦЕ** - цилиндрична структура која везује флагелу за ћелију микроорганизама.

**БАЗИДИОКАРП** - плодносно тело гљива из раздела *Basidiomycotina*.

**БИОАУГМЕНТАЦИЈА** - додавање концентроване и специјализоване популације микроорганизама (појединачни сој или мешана култура) у земљиште која може да метаболише специфично органско једињење.

**БИОФЕРТИЛИЗАТОРИ** - препарати који садрже одабране културе микроорганизама који се користе за инокулацију семена и расада или се уносе у земљиште како

би се интензивирали микробиолошки процеси којима се повећава доступности хранљивих материја биљкама.

**БИОФИЛМ** - заједница микроорганизама чије су ћелије иреверзибилно повезане са супстратом и међусобно, урођене у ванћелијски матрикс полисахаридних полимера који су саме продуковале, а испољавају измењен фенотип услед промењене брзине размножавања.

**БИОФУНГИЦИДИ** - препарати који се користе у борби против фитопатогених гљива. Могу бити у облику праха и гранула у којима се налазе сасушене споре или мицелије одабраних култура микроорганизама.

**БИОГЕНИ ЕЛЕМЕНТИ** - су хемијски елементи који улазе у састав ћелије. Биогени елементи су у ћелији присутни у различитим количинама, па их према томе можемо разврстати у две групе: макроелементе, присутни у великој количини (грч. *macro*-много, чине 99% масе ћелије), којима припадају С, Н, О, N, P, K, Ca, Mg, Fe и S, и микроелементе, присутни у малој количини (грч. *micro*-мало), којима припадају Cu, Br, Mn, F, Na и др.

**БИОИНСЕКТИЦИДИ** - микробиолошки препарати који се користе за сузбијање штетних инсеката. Разликујемо биоинсектициде на бази бактерија, гљива, вируса и протозоа.

**БИОЛОШКА АЗОТОФИКСАЦИЈА** - процес везивања и превођења азота из ваздуха у облик дотупан биљкама уз помоћ микроорганизама. Биолошку азотофиксацију врши посебна група прокариотских микроорганизама са заједничким именом-азотофиксатори или диазотрофи.

**БИОЛУМИНИСЦЕНЦИЈА** - продукција светлости од стране живих организама уз помоћ ензима луциферазе.

**БИОПЕСТИЦИДИ** - препарати базирани на примени микроорганизама (бактерија, гљива, вируса, протозоа) ради сузбијања штетних инсеката, фитопатогених гљива и бактерија, продукцијом антибиотика и антифугалних метаболита. Највише се примењују биоинсектициди и биофунгициди.

**БИОРЕМЕДИЈАЦИЈА** - је поступак коришћења микроорганизама или њихових ензима у циљу решавања еколошких проблема, као што су загађење земљишта, површинских или подземних вода. У ужем смислу под биоремедијацијом се сматра ремедијација уз помоћ микроорганизама, а у ширем смислу уз помоћ биљака (фиторемедијација).

**БИОТИЧКИ ФАКТОРИ** - представљају групу еколошких фактора који потичу од живих организама и подразумевају њихове међусобне утицаје.

**БИОВЕНТИЛАЦИЈА** - процедура где се врши аерација површинског слоја земљишта да би се интензивирала биолошка активност микроорганизама.

**БЛАСТОСПОРЕ** - су овалне или лоптасте, бесполне споре, које настају пупљењем и одвајањем од родитељске ћелије. Честе су код квасаца.

**БОЈЕЊЕ ПО ГРАМУ** - диференцијална метода бојења бактеријских ћелија, користе се две микробиолошке боје и два реагенса. Ћелије се обоје љубичасто (G+) или црвено (G-).

**ЋЕЛИЈА** - основна градивна и функционална јединица свих живих бића, .

**ЋЕЛИЈСКА ДЕОБА** - процес умножавања ћелија у коме се једна ћелија дели на две или већи број ћелија. За еукариотске ћелије су карактеристичне митоза и мејоза, док се код прокариотске ћелије јавља бинарна деоба.

**ЋЕЛИЈСКА МЕМБРАНА** - или цитоплазмина мембрана, омотач ћелије изграђен од липида и протеина, којима су придружени олигосахариди. Код еукариота, липидни слој садржи и стереоиде (холестерол). Липиди и протеини су међусобно у таквом односу да граде тзв. течни мозаик. Течно-мозаични модел грађе мембране први су дали 1972. године Сингер и Николсон (*Jonathan Singer* и *Gart Nicolson*). Главна особина је семипермеабилност или селективна пропустљивост. Код прокариота преузима улогу синтезе састојака ћелиског зида, обавља дисање, фотосинтезу, синтезу липида.

**ЋЕЛИЈСКЕ ОРГАНЕЛЕ** - цитоплазмине органеле су делови ћелије обавијени једноструком или двоструком мембраном и способни да обављају одређене функције. У цитоплазми се налазе органеле које учествују у процесима синтезе (ендоплазматични ретикулум, Голџијев комплекс), органеле у којима се складиште хидролитички ензими (лизозоми, пероксизоми и вакуоле биљне ћелије), органеле у којима се синтетише АТФ (митохондрије и хлоропласти), центрозома, који учествују у деоби и једру, у коме су смештени хромозоми (гени).

**ЋЕЛИЈСКИ ЦИКЛУС** - процес умножавања ћелије у току кога она удвостручује свој садржај и дели се на две кћерке ћелије. Обухвата две фазе: интерфазу и фазу деобе. Интерфаза обухвата Г1 (пресинтетска), С (синтетска) и Г2 (постсинтетска) фазу у току којих долази до репликације ДНК и удвостручавања масе ћелије и количине органеле у цитоплазми. У фази деобе се ћелија дели на две међусобно једнаке кћерке ћелије. Деобе могу бити митоза (соматске ћелије) или мејоза (полне ћелије).

**ЦЕЛУЛАЗЕ** - група ензима који каталишу реакцију хидролизе целулозе. Продукују их гљиве, бактерије и протозое.

**ЦЕЛУЛОЗА** - полисахарид, хемијско једињење који настаје међусобним спајањем 8 до 12 хиљада молекула шећера глукозе. Општа формула је  $(C_6H_{10}O_5)_n$ . Улази у састав ћелиског зида биљне ћелије и микроорганизама.

**ЦИЈАНОБАКТЕРИЈЕ** - прокариотски аутоτροφни фотосинтетски микроорганизми.

**ЦИЛИЈЕ** - органеле за кретање код протозоа.

**ЧИСТА КУЛТУРА** - потомство једне ћелије микроорганизама.

**ЦИСТЕ** - види споре. За разлику од спора, нису отпорне на температуре изнад 65°C.

**ЦИТОКИНИНИ** - биљни хормони који стимулише деобу ћелија, морфогенезу, раст латералних пупољака, олистивање, отварање стома, као и развиће корена и коренских длачица. Цитокидине продукују велики број ризосферних микроорганизама

**ДЕНИТРИФИКАЦИЈА** - процес редукције нитрата. У зависности од тога да ли се денитрификација одвија у аеробним или анаеробним условима, разликујемо асимилациону, дисимилациону и праву денитрификацију.

**ДЕПЛАЗМОЛИЗА** - појава повећања запремине вакуоле и потискивање протопласта према ћелијском зиду. Када је ћелија у хипотоничном раствору, вода улази у ћелију и вакуолу (у правцу ниже концентрације воде). Супротан процес је плазмолиза.

**ДЕЗИНФЕКЦИЈА** - поступак уништавања вегетативних форми микроорганизама физичким и хемијским поступцима.

**ДЕЗИНФЕКТАНТ** - хемијско једињење које делује антимикубно, микробистатично-заустваља размножавање или микробицино-убија бактерије, гљиве и вирусе, али не и њихове споре (репродуктивна тела).

**ДИАЗОТРОФ** - микроорганизам који је способан за биолошку фиксацију азота, не ствара симбиотску заједницу са биљком, живи слободно у земљишту или на корену биљака.

**ДИФЕРЕНЦИЈАЛНА ХРАНЉИВА ПОДЛОГА** - омогућава раст више група микроорганизамима, где их је због присуства одређених супстанци или индикатора могуће разликовати. Пример је крвни агар на коме се могу разликовати типови хемоллизе код стрептокока.

**ДИКАРИОН** - стање када су два једра присутна у ћелији нпр. хифи, а да није дошло до фузије истих (може бити хомокарион или хетерокарион).

**DOMAIN** - највиши ниво биолошке класификације који је изнад краљевства односно царства. Три домене свих живих организама су Bacteria, Eukarya и Archaea.

**ЕГЗОЦИТОЗА** - избацивање материје из ћелије помоћу мембранских мехурића који се стапају са ћелијском мембраном. Супротан процес је ендоцитоза.

**ЕГЗОМИКОРИЗЕ** - или ектомикоризе, заједнице између корена вишегодишњих двенастих биљака и гљива из класа *Basidiomycotina*, *Ascomycotina*, *Zigomycotina*.

**ЕГЗОТОКСИНИ** - токсини које ослобађају живи организми.

**ЕКОФИЗИОЛОГИЈА** - наука која проучава деловање различитих еколошких фактора на функцију ћелије, ткива, органа, органских система и популација организама.

**ЕКОЛОГИЈА** – од грчке речи *oikos* – дом и *logos* - реч, наука; је наука која проучава односе живих бића и околине.

**ЕКОЛОШКИ ФАКТОРИ (ЖИВОТНИ ФАКТОРИ)** - фактори спољашње средине, неопходни за опстанак организама. Врше позитиван и негативан утицај на организме. Еколошке факторе карактерише бројност и разноврсност, просторна и временска променљивост и комплексност и узајамност. Еколошки фактори се деле на: абиотичке, биотичке и антропогене.

**ЕНДОЦИТОЗА** - уношење материје у ћелију, при чему долази до стварања удубљења на мембрани, у којој се налази материја коју треба да унесе ћелија. Ивице мембране удубљења се споје око унете материје и при томе долази до образовања везикуле.

**ЕНДОЕГЗОМИКОРИЗЕ** - симбиотске заједнице биљака из фамилије *Ericaceae* (вресак) и гљива из класе *Ascomycetes* и *Basidiomycetes*. Хифе гљива делимично обавијају корен, а делимично улазе у интерћелијске просторе где формирају клупчасте сплетове хифа.

**ЕНДОФИТНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који живе у ћелијама биљке домаћина. У зависности од биљке, ендофитни микроорганизми могу настанити паренхимско ткиво и ксилемске цевчице различитих делова биљке.

**ЕНДОМИКОРИЗЕ** - заједнице између корена великог броја биљака и гљива рода *Glomus*, *Gigaspora*, *Acaulospora*, *Sclerocystis*, *Scutellospora*. Хифе гљива улазе у ткиво корена биљке.

**ЕНЗИМИ** - биолошки (природни) катализатори који омогућавају да се реакције у ћелији одигравају великом брзином и по утврђеном редоследу. Прости ензими

се састоје само од протеина, док сложени (холоензими) поред протеина садрже и неки непротеински део (коензим или простетична група).

**ЕПИФИТНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који насељавају надземни део биљке (стабло и листове).

**ЕУКАРИОТЕ (EUCARYOTA)** - једноћелијски и вишећелијски организми са еукариотским типом грађе ћелије сврстани у царство Eucaria.

**ЕУКАРИОТСКА ЋЕЛИЈА** - ћелија која садржи диференцирано једро, ћелијске органеле и ћелијски скелет. Обавијена је ћелијском мембраном, а код биљака и микроорганизама и ћелијским зидом.

**ФАКУЛТАТИВНО АНАЕРОБНИ** - микроорганизми који захтевају кисеоник за раст и развој, али се могу добро развијати у његовом одсуству. У ову групу спадају многи квасци, а од бактерија значајних за биљну производњу, представници рода *Bacillus*.

**ФЕРМЕНТАЦИЈА** - оксидо-редукциони процес разградње угљених хидрата (али и органских киселина, аминокиселина) у којима се синтетише АТФ, а где се као донори и акцептори електрона користе органска једињења. Ферментације могу бити аеробне и анаеробне.

**ФИЛОСФЕРНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - види епифитне, микроорганизми који насељавају надземни део биљака.

**ФИМБРИЈЕ** - кратке филаментозне структуре на површини бактеријске ћелије, које су значајне за адхезију бактерије на неку површину.

**ФИТОСТИМУЛАТОРИ** - препарати базирани на примени одабраних култура микроорганизама који стимулишу раст биљака путем продукције хормона.

**ФЛАГЕЛА** - органеле за кретање код протозоа; дугачки и дебели локомоторни покретни органи изграђени од протеина флагелина.

**ФОСФОРИЛАЦИЈА** - процес стварања и акумулације енергије; може бити субстратна (настаје у процесима ферментације), оксидативна (настаје у процесима дисања) и фотосинтетска (настаје у процесу фотосинтезе).

**ФОТОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који поседују зелени пигмент хлорофил и помоћне пигменте- каротеноиде, фикоксантине, фикоеритрине и фикоцијанине, за апсорпцију светлости различитих таласних дужина. У току овог процеса светлосна енергија се трансформише у хемијску, која се троши за синтезу угљених хидрата.

**ФОТОФОБНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који не подносе сунчеву светлост. У фотофобне микроорганизме спадају протозое и велики број бактерија.

**ФОТОИНДИФЕРЕНТНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који не захтевају светлост за раст и развиће, али им и не смета. Овде спадају гљиве, актиномицете и бактерије које живе у ваздуху.

**ФОТОТРОФИ** - од грчке речи *photos* - светлост; организми који користе енергију сунчеве светлости.

**ГЕНЕРАЦИЈСКО ВРЕМЕ** - време потребно да се популација удвостручи.

**ГЕОЗМИН** - је органско једињење (1,10-диметил-транс-9-декалол) које даје карактеристични мирис земљи или води. Геозмин продукују зракасте бактерије (актиномицете) и цијанобактерије.

- ГЉИВЕ** - еукариоти, хетеротрофи, аеробни микроорганизми који могу бити сапрофити и паразити. Имају ригидан ћел.зид, ту спадају печурке, квасци и кончасте гљиве.
- ХАЛОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми адаптирани на живот у хипертоничним растворима. За свој раст захтевају високе концентрације соли.
- ХАЛОТОЛЕРАНТНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који подносе велике концентрације соли.
- ХЕМОЛИТОТРОФИ** - микроорганизми који енергију добијају оксидацијом неорганских једињења.
- ХЕМООРГАНОТРОФИ** - микроорганизми који енергију добијају оксидацијом сложених органских једињења.
- ХЕМОСТАТ** - апарат за гајење континуалне културе микроорганизама.
- ХЕМОТРОФИ** - организми који обезбеђују енергију путем оксидације различитих органских и неорганских једињења. У оквиру хемотрофа, разликујемо органотроге и литотрофе.
- ХЕТЕРОЦИСТЕ** - нефотосинтетичке ћелије унутар којих се врши фиксација азота код цијанобактерија.
- ХЕТЕРОТРОФАН** - начин исхране животиња, гљива, протозоа и неких бактерија којим оне узимају готове органске материје (храну) из природе.
- ХИДРОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који за свој раст и развој захтевају велику количину слободне воде.
- ХИФА** - ћелија кончастих гљива. Може бити септирана или несептирана.
- ХЛАМИДОСПОРА** - унутарћелијска или терминална асексуална спора задебљалих зидова. Настаје заобљавањем ћелије. Могу очувати клијавост често и више година. Најкарактеристичније су код гљива из реда *Ustilaginales* у класи *Basidiomycetes*.
- ХОЛОМОРФ** - гљива која има потпуни циклус развића, полни (телеоморф) и бесполни (анаморф). Гљива може имати различите називе за анаморфни и телеоморфни стадијум. Телеоморф може имати два или више анаморфа као што и анаморф може имати више од једног телеоморфа.
- ХОРИЗОНТАЛНИ РАСПОРЕД МИКРООРГАНИЗАМА** - представља бројност микроорганизама у зависности од географске ширине.
- ХРОМАТСКА АДАПТАЦИЈА** - могућност адаптивне промене боје талуса алги као последица промене спектралног састава светлости. Повећава се количина пигмента који је комплементаран боји светлосног зрака којим су осветљени.
- ХУМИФИКАЦИЈА** - процес минерализације органске материје и њена трансформација до хумуса. Процес хумификације се одвија под директним утицајем микроорганизама-хумификатора.
- ХУМУС** - група специфичних органских материја које се стварају у процесима хумификације органских остатака. У састав хумуса улазе праве/специфичне хумусне материје (хуминске киселине, фулво киселине и хумини) и неспецифичне хумусне материје (угљени хидрати, воскови, смоле, лигнин и сл.).
- ИНФЕКТИВНА НИТ** - цевчица у коренској длаци, кроз коју ризобијуми пролазе и инфицирају корен.
- ИНОКУЛАЦИЈА** - уношење микроорганизама у/на подлогу са циљем стварања пожељног одговора.



**ИНОКУЛУМ** - материјал (микроорганизми) који се уноси на одређену подлогу за раст.

**ИНТЕРСПЕЦИЈСКИ ОДНОСИ** - односи између јединки различитих врста.

**ИНТРАСПЕЦИЈСКИ ОДНОСИ** - односи између јединки исте врсте.

**ИНВАЗИВНОСТ** - својство микроорганизама да уђе у ћелије домаћина, да се размножава и проширује.

**ИЗОЛАЦИЈА** - издвајање микроорганизама из њиховог природног станишта на хранљиве подлоге у лабораторијским условима.

**КАПСИД** - спољашњи протеински омотач вируса.

**КАТАБОЛИЗАМ** - део метаболизма, у коме се у току разградње органских једињења ослобађа енергија.

**КЛОН** - организам који садржи исти генетички материјал као и родитељ од кога је настао. Скуп генетички идентичних ћелија или индивидуа насталих од заједничког претка бесполом, митотском деобом.

**КОХ-ОВИ ПОСТУЛАТИ** - 4 постулата које је дефинисао Роберт Кох (*Robert Koch*), за процену да ли је одређен микроорганизам узročник болести.

**КОЛИФОРМНЕ БАКТЕРИЈЕ** - група Грам-негативних аспорогених штапићастих бактерија које живе у воденим срединама, земљишту; заступљене су у цревима и у фецесу топлокрвних животиња и људи. Њихово присуство се користи као индикатор фекалне контаминације вода указујући на могуће присуство цревних патогена. У колиформне бактерије спадају: *Enterobacter* spp., *Klebsiella* spp., *Citrobacter* spp., *Escherichia* spp.

**КОЛОНИЗАЦИЈА** - успостављање целе популације микроорганизама на одређеном месту.

**КОМЕНСАЛИЗАМ** - однос између две јединке који је за једну позитиван (коменсал), а за другу неутралан.

**КОМПЕТИЦИЈА** - однос између две јединке у ком се оне мођусобно такмиче приликом искоришћавања природних ресурса који су ограничени и обострано потребни. Компетиција може бити интраспецијска и интерспецијска.

**КОНИДИЈА** - егзогена бесполна спора код гљива; једноћелијска или вишећелијска. Развијају се на темену (врху) посебних диференцираних делова мицелије, који се називају конидиофори (носачи конидија). Конидиофори могу бити прости или разгранати на различите начине.

**КОЊУГАЦИЈА** - преношење генетског материјала непосредним контактом две ћелије. Да би се процес обавио неопходно је да ћелије поседују фактор фертилитета (F+).

**КОНТИНУАЛНА КУЛТУРА** - култура микроорганизама која се гаји у хемостату где се ћелија одржава у експоненцијалној фази раста у дужем временском периоду.

**КСЕРОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који захтевају мале количине слободне воде.

**ЛАГ-ФАЗА** - временски период у ком нема раста у броју микроорганизама, фаза прилагођавања после инокулације микроорганизама у свежу течну хранљиву подлогу.

**ЛИТОТРОФ** - од грчке речи lithos - камен, минерал; организам који користи неорганска једињења као електрон донор у енергетском метаболизму. Могу бити хемолитотрофи или фотолитотрофи.

**ЛИЗИС** - пуцање и деструкција ћелије, губитак ћелијског садржаја.

**ЛОФОТРИХЕ** - бактерије које имају више цилија на једном крају ћелије.

**ЛОГ-ФАЗА** - други назив експоненцијална фаза, фаза активних деоба ћелија, где се број ћелија увећава геометријском прогресијом.

**МЕТАБИОЗА** - вид симбиозе у коме продукте метаболизма једних микроорганизама користе други микроорганизми. Чланови ове заједнице не морају живети заједно, већ једни стварају услове за живот других.

**МЕТОДА РАЗРЕЂЕЊА** - метода за одређивање бројности вијабилних микроорганизама у неком узорку.

**МЕЗОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који за свој раст и развој захтевају да влажност средине буде око 60%. У условима смањене влажности формирају споре и цисте, тј. прелазе у стање анабиозе.

**МИЦЕЛИЈА** - сплет хифа код гљива.

**МИКОЛОГИЈА** – од грчких речи *mycota*- гљива и *logos*- наука; грана биологије која се бави проучавањем гљива.

**МИКОРИЗЕ** - симбиозне заједнице биљака и микоризних гљива. Постоје ендомикоризе, егзомикоризе и ендоегзомикоризе.

**МИКОРИЗНЕ ГЉИВЕ** - гљиве које формирају симбиозну заједницу са биљкама. Посебно су значајне за биљне врсте које не поседују коренске длачице. Ове заједнице назване су микоризе.

**МИКОТОКСИНИ** - од грчких речи *mycota* - гљива, *toxikon* – отров; су екстрацелуларни метаболити плесни, који су токсични или имају друге негативне биолошке ефекте по људе и животиње. Токсини из групе микотоксина су афлатоксин, охратоксин, стеригматоцистин, зеараленон и др.

**МИКРОБИЦИДНО** - штетно, смртоносно за микроорганизме.

**МИКРОБНА БИОМАСА** - укупна маса микроорганизама који живе у одређеној маси или запремини земљишта.

**МИКРОБНА ПОПУЛАЦИЈА** - укупан број микроорганизама који живе у одређеној маси или запремини земљишта.

**МИКРООРГАНИЗМИ** - најчешће, организама који су мали да би се видели голим оком. Називају се и микроби, а ту спадају бактерије, гљиве, протозое, алге и вируси.

**МИКРООРГАНИЗМИ СЕМЕНА** - микроорганизми који живе на семену (зрну) на рачун хранљивих материја које се налазе на површини или у непосредној близини зрна ако је оно у земљишту.

**МИТОХОНДРИЈЕ** - мембранска органела код еукариота, место где се одвија ћелијско дисање.

**МЛЕЧНЕ БАКТЕРИЈЕ** - бактерије млечне ферментације. Разлагање лактозе врше у анаеробним условима, а као крајњи продукт настаје млечна киселина (хомоферментативни тип), а у хетероферментативном типу настаје и етил алкохол, сирћетна киселина и угљен диоксид. Најзначајнији представници су: *Streptococcus* spp., *Pediococcus* spp., *Lactobacillus* spp., *Bifidobacterium* spp.

**МУТУАЛИЗАМ** - симбиотски однос између две јединке који је подједнако користан за оба симбионта.

**NAD<sup>+</sup>** (никотин-амид-аденин-динуклеотид) - значајан коензим који је носилац електрона и водоника у редокс реакцијама.

**NADP<sup>+</sup>** (никотин-амид-аденин-динуклеотид-фосфат) - значајан коензим који је носилац електрона и водоника у редокс реакцијама.

**НЕУТРОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који за свој раст и развој захтевају неутралну средину. Оптимална вредност рН средине ових микроорганизма је између 6,5 и 7,5. Овде спаде највећи број бактерија, алги, протозоа.

**НИШЕ** - представља део простора у коме врста постиже максималну успешност (у смислу бројности), у складу са унутрашњим (конституција, обојеност, понашање) и физиолошким (еколошка валенца) ограничењима; изједначен термин са термином станиште (J. Grinnell: просторни концепт нише)

**НИТРИФИКАЦИЈА** - Процес у којем долази до оксидације амонијачног азота до нитрата. У првој фази  $\text{NH}_3$  оксидише до  $\text{NO}_2$ , а затим  $\text{NO}_2$  до  $\text{NO}_3$ . У свакој од ове две фазе учествују различити микроорганизми: у првој нитритне (нитрозне) бактерије (*Nitrosomonas*), а у другој нитратне бактерије (*Nitrobacter*).

**НИТРОГЕНАЗА** - ензим који је неопходан за биолошку фиксацију азота.

**НОДУЛИН** - протеин који настаје у коренским длачицама или нодулама као резултат инфекције ризобијумима.

**НУКЛЕОИД** - хроматинско телашце код бактерија, еквивалент једру код еукариотских микроорганизма. Не садржи мембрану нити деобно вретено.

**ОБЛИГАТНИ ПАРАЗИТИ** - или биотрофи, су организми који су у природи увек паразити и не могу се култивисати.

**ОИДИЈЕ** - или артроспоре, се образују сукцесивном деобом посебних огранака мицелије. Код ових огранака у порасту појављују се попречне преграде, које их деле на већи или мањи број ћелија и свака од ових ћелија развија се у посебну ћелију - спору. Оне се затим одвајају једна од друге и расејавају.

**ОРГАНОТРОФИ** - микроорганизми који добијају енергију оксидацијом органских једињења.

**ОСМОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који могу да живе у растворима са великим осмотским притиском.

**ПАРАЗИТИЗАМ** - однос између две различите врсте у ком једна врста (паразит) живи на рачун друге (домаћин).

**ПАСТЕРИЗАЦИЈА** - процес уништавања вегетативних облика микроорганизма, користи се топлота (температуре испод  $100^\circ\text{C}$ ).

**ПЕПЛОМЕРЕ** - вирусни гликопротеински изданци који се налазе на овојници.

**ПЕПТИДОГЛИКАН**- хемијско једињење из којег је изграђен ћелијски зид код бактерија. Још се назива муреин. Удео пептидогликана код Грам-позитивних бактерија износи 50-90%, а код Грам-негативних 10-30%.

**ПЕРИПЛАЗМАТИЧНИ ПРОСТОР** - простор између ћелијске мембране и ћелијског зида код Грам-негативних бактерија.

**ПЕРИТЕЦИЈУМ** - делимично отворено плодно тело најчешће крушкастог или флашастог облика у коме се образују аскуси са аскоспорама. Перитеције имају отвор-остиолу који служи за ослобађање асуса са аскоспорама.

**ПЕРОКСИЗОМИ** - од водоник-пероксид и грчке речи *soma* - тело; пероксизоми или микротелашца, су мале, једноструком мембраном окружене ћелијске органеле у облику везикуле. Садрже ензиме за оксидацију масних киселина и аминокиселина, при чему се као споредан производ јавља водоник-пероксид. Отрован водоник-пероксид се у њима захваљујући ензиму каталази, разлаже на воду и кисеоник.

- ПЕТРИ КУТИЈА** - плитка цилиндрична стаклена или пластична посуда са поклопцем која се користи за гајење микроорганизама у лабораторијским условима; названа по Јулиас Ричард Петрију (*Julius Richard Petri*), немачком бактериологу.
- ПГПР (PLANT GROWTH PROMOTING RHIZOBACTERIA)** - хетерогена група бактерија, које се могу наћи у зони ризосфере, на површини или у асоцијацији са кореном биљке, а када се користе као инокуланти имају значајан утицај на биљни раст, принос и квалитет пољопривредних култура. Овај термин први пут је употребљен 1978. године.
- ПИКНОСПОРЕ** - су конидје које се образују у унутрашњости плодноносних тела, која се називају пикниди.
- ПИЛЕ** - називају се и сех пиле, кратке структуре на површини бактеријске ћелије, имају значајну улогу у трансферу ДНК у процесу коњугације.
- ПИРЕНОИДИ** - су телашца протеинске природе. Могу бити различитих облика и различите величине. Најчешће се налазе у хлоропластима, али се код појединих црвених алги могу формирати и изван њих. Улога пиреноида је у нагомилавању и фиксацији угљен-диоксида (CO<sub>2</sub>).
- ПЛАСТИДИ** - аутономне органеле карактеристичне за фотоаутоτροφне еукариотске организме. Пластиди садрже пигменте који одређују њихову боју. Назив долази од грчке речи "plastos", што значи "исклесан".
- ПЛАЗМИД** - екстрахромозомска ДНК; мали кружни молекули ДНК који се у ћелији прокариота репликују аутономно. Могу бити интегрисани у хромозом, и тада носе назив епизом.
- ПЛАЗМОГАМИЈА** - спајање цитоплазме две родитељске ћелије без спајања једара у полном процесу размножавања гљива.
- ПЛАЗМОЛИЗА** - појава исушивања ћелије деловањем хипертоничног раствора (соли, шећера и сл.) у коју је ћелија уроњена.
- ПЛАЗМОПТИЗА** - појава бубрења и/или пуцања ћелијског зида услед неконтролисаног уласка воде у ћелију која се налази у хипотоничној средини.
- ПРЕДАТОРСТВО** - однос између две врсте организама, за једну позитиван (предатор), а за другу негативан (плен). Однос између грабљивице и плена.
- ПРОТЕАЗЕ** - група ензима. Катализирају протеолизу, односно разградњу протеина, хидролизом пептидних веза, којима су аминокиселине повезане у полипептидном ланцу.
- ПРОТИСТОЛОГИЈА** – од грчких речи *prôtistos* - први, најранији и *logos* – наука; наука која проучава протисте.
- ПРОТОПЛАСТ** - ћелија без ћелијског зида.
- ПРОТОЗОЕ** - једноћелијски, покретни, аеробни, хетеротрофни, еукариотски микроорганизми. Већина протозоа су сапрофити, али има и паразитских врста које изазивају обољења човека и животиња.
- ПСИХРОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ**- микроорганизми који живе на ниским температурама захваљујући отпорности њихових ензима, транспортном систему електрона и механизму синтезе протеина.
- QUORUM-QUENCHING** - техника или механизам којим се спречава појава quorum-sensing-a.
- QUORUM-SENSING** - сигнални систем који се јавља код одређених микроорганизама; способност микроорганизама да региструју густину своје популације и

покрену одређене механизме продукцијом малих сигналних молекула, тзв. аутоиндусера.

**РИЗОМЕДИЈАТОРИ** - микроорганизми који разлажу органске полутанте.

**РИЗОСФЕРА** - зона земљишта која се налази око површине корена биљке, а у којој су бројност, активност и метаболизам микроорганизама одређени и усмерени коренским излучевинама. Разликујемо спољну егзоризосферу, која обухвата слој земљишта до 0,5cm од корена и унутрашњу хистосферу, која обухвата танки слој на самој површини корена. Ризосфера представља динамичан систем у коме земљишни микроорганизми и биљни корен чине једну целину. Овај термин први пут је увео немачки агроном Лоренц Хилтнер (Lorenz Hiltner) 1904. године.

**РИЗОСФЕРНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми који насељавају корен и непосредну околину корена, ризосферу.

**САПРОБИ** - или сапротрофи, (грчки: *sapros* - труо, *trophē* - храна) , организми који се хране мртвом органском материјом.

**СЕЛЕКТИВНА ПОДЛОГА** - садржи бар један састојак (боје, антибиотици и сл.) који инхибира раст непожељних микроорганизама. Примери селективних подлога су: минимална подлога, Симонсов цитратни агар, и др.

**СИДЕРОФОРЕ** - мали хелатирајући молекули, метаболити неких бактерија и гљива које имају висок афинитет везивања гвожђа ( $Fe^{3+}$ ).

**СИЛАЖА** - ферментисана сточна храна која се користи за исхрану преживара и коња. Припрема се од биљака које имају висок удео угљених хидрата.

**СИМБИОЗА** - је начин живота у коме две или више врста микроорганизама живе заједно у мање или више корисним заједницама. Према степену корисности и прилагођености, односи у симбиози могу бити: мутуализам, коменсализам и метабиоза.

**СИМПОРТ** - облик котранспорта, пренос две или више супстанци у истом смеру.

**СИНЕРГИЗАМ**- облик мутуалистичке заједнице када се организми удружују при чему изводе одређене реакције које иначе нису способни да изазову самостално.

**СКЛЕРОЦИЈЕ** - вегетативне структуре, настају од густо сабијених и испреплетених хифа у којима се смањује садржај воде, а повећава количина хранљивих материја. Облик за преживљавање/конзервацију микроорганизама у неповољним условима.

**СОЈ** - појам у микробиологији; популација микроорганизама која потиче од једне ћелије или из чисте културе; различити сојеви представљају генетску варијабилност унутар исте врсте.

**СПОРАНГИЈА** - посебно диференцирано плодносно тело код несептираних гљива из раздела *Zygomycotina*.

**СПОРЕ ПОЛНОГ ПОРЕКЛА** - јављају се код гљива. Споре полног порекла су: аскоспоре, базидиоспоре, зооспоре, зигоспоре, ооспоре. Полне споре настају након мејотичке деобе.

**СПОРЕ** - у неповољним условима, поједини микроорганизми образују специјалне заштитне творевине које им омогућавају преживљавање- споре и цисте. У овом облику, микроорганизми прелазе у стање анабиозе (латентно стање). Када наступе повољни услови, ћелија прелази у вегетативни облик и нормално наставља своје функције.

**СТАЦИОНАРНА ФАЗА** - фаза у којој се број живих ћелија не увећава.

**СТЕРИЛИЗАЦИЈА** - процес уништавања свих облика микроорганизама.

**СУБСТРАТ** - подлога на којој организам расте. Могу бити и супстанце које разлажу ензими.

**ТАКСОН** - је реалан и конкретан организам, независан од хијерархијског ранга (нпр. конкретна врста (*Bacillus subtilis*), конкретан род (*Bacillus*) и сл.).

**ТАКСОНОМСКА КАТЕГОРИЈА** - је апстрактан појам којим се означава било који таксон, односно група организама на истом хијерархијском нивоу. Основне таксономске (систематске) категорије су: Царство (Regnum), Раздео (Divisio), Класа (Classis), Ред (Ordo), Фамилија (Familia), Род (Genus), Врста (Species).

**ТАКСОНОМИЈА** - је мултидисциплинарна наука која се бави принципима, методама и правилима класификације организама.

**ТАЛУС** - вегетативно тело алги.

**ТЕЧНА КУЛТУРА** - микроорганизми који се гаје у течној хранљивој подлози, најчешће у већој количини.

**ТЕЛЕОМОРФ** - фаза полног размножавања гљива, где се ћелије формирају у процесу мејозе и генетске рекомбинације.

**ТЕРМОФИЛНИ МИКРООРГАНИЗМИ** - микроорганизми чија је оптимална температура за раст и развој од 50 до 60°C.

**ТИНДАЛИЗАЦИЈА** - испрекидана или фракциона стерилизација; ову врсту стерилизације у праксу увео је Џон Тиндал (*John Tyndall*). Ова метода се изводи у етапама, најчешће у току 3 дана. За тиндализацију се користи Кохов лонац.

**ТОКСИН** - метаболит микроорганизама који може да оштети ћелије домаћина.

**ТРАНСДУКЦИЈА** - једносмерна генетска размена у којој умерен вирус служи као преносилац.

**ТРАНСФОРМАЦИЈА** - преношење дела ДНК из спољашње средине/мртве ћелије даваоца у живу ћелију примаоца.

**УМЕРЕНИ ВИРУС** - вирус који не изазива деструкцију и лизу ћелије домаћина, вирусни геном може да се умножава заједно са ћелијом домаћина.

**УРЕАЗА** - ензим који каталише реакцију хидролизе урее, при чему настаје угљен-диоксид и амонијак.

**УРЕОБАКТЕРИЈЕ** - алкалоphilне бактерије, које разлажу уреу.

**ВЕГЕТАТИВНА ЋЕЛИЈА** - ћелија која расте или се храни.

**ВЕКТОР** - у епидемиологији, организам који преноси неку болест. У генетици и молекуларној биологији, средство (плазмид или вирус) које служи за унос генетичког материјала у ћелију.

**ВЕРТИКАЛНИ РАСПОРЕД МИКРООРГАНИЗАМА** - представља бројност микроорганизама по дубини профила земљишта и по надморској висини.

**ВЕЗИКУЛА** - сферична структура која се формира интрацелуларно код неких микоризних гљива.

**ВИРИОН** - комплетна инфективна честица вируса изван ћелије домаћина.

**ВИРОЛОГИЈА** - или вирусологија, лат. *virus* - отров, слуз; гр. *logos* – наука, проучава вирусе, вироиде и прионе, инфективне честице мање од вируса, који су узрочници болести биљака, животиња и људи.

**ВИРУСИ** - аћелијски паразити који за своје умножавање користе ћелије домаћина у којој се све биосинтезе одвијају под командом вирусног генома.

**ВРСТА** - у биологији, основна јединица биолошке разноврсности или скуп генетски сличних јединки. Припадници једне врсте се међусобно могу полно размножавати. У научној класификацији, врсти се даје двојно латинско име (прво име рода, а друго врсте).

**WORONINOVA TELAŠCA** - сферичне структуре које се налазе у хифама гљива из раздела *Ascomycota*, у близини пора/отвора септума, а улога им је затварање пора уколико дође до повреде хифе.

**ЗИГОСПОРЕ** - гљиве раздела *Zygomycota* образују полне диплоидне споре које се називају зигоспоре.

**ЗООНОЗЕ** - су инфективне болести заједничке за људе и животиње које могу да се пренесу на човека. Оне укључују болести чији су изазивачи бактерије, гљиве, вируси и паразити.

**ЗООСПОРЕ** - су добиле име због особине да се самостално крећу кроз водену средину помоћу једног бича, тако да потсећају на неке ниже животиње.

## ПРИЛОГ

### Списак оригиналних слика и слика са изворима са којих су преузете и модификоване:

- Слика 1. Кораци при стерилизацији омче езе у пламену:  
<https://slideplayer.com/slide/3867683/> + ауторке
- Слика 2. Кораци при стерилизацији отвора епрувете и чепа на пламену: ауторке
- Слика 3. Зона стерилне површине ( $\varnothing$  око 40 cm) и стерилног простора око пламена:  
[www.paulding.k12.ga.us](http://www.paulding.k12.ga.us) + ауторке
- Слика 4. Осетљивост микроорганизама на дејство дезинфицијенаса: ауторке
- Слика 5. Шематски приказ директне методе бројања ћелија у Нојберовој (Neubauer) комори: [http://insilico.ehu.eus/counting\\_chamber/neubauer\\_improved.php](http://insilico.ehu.eus/counting_chamber/neubauer_improved.php)
- Слика 6. Шематски приказ методе разређења: Јарак и Ђурић, 2006 + ауторке
- Слика 7. Турбидиметријска метода:  
[https://www.mlsu.ac.in/econtents/1834\\_indirectmethodsofmeasurementofgrowth.pdf](https://www.mlsu.ac.in/econtents/1834_indirectmethodsofmeasurementofgrowth.pdf) + ауторке
- Слика 8. Метода исцрпљења: различити начини засејавања:  
<https://pharmacyscope.com/methods-of-isolation-of-pure-culture/>
- Слика 9. Пресејавање микроорганизама са чврсте на чврсту подлогу (коси агар): Јарак и Ђурић, 2006 + ауторке
- Слика 10. а) Ауксихромне групе; б) Хромофорне групе : ауторке
- Слика 11. Кристал виолет (Базна боја): <https://www.guidechem.com/encyclopedia>
- Слика 12. Бојење базном бојом: ауторке
- Слика 13. Еозин (Кисела боја): [https://www.wikiwand.com/sh/Eozin\\_Y](https://www.wikiwand.com/sh/Eozin_Y)
- Слика 14. Бојење киселом бојом: ауторке
- Слика 15. Обичан нативни препарат: <https://www.slideshare.net/aashuvj1234/classii>
- Слика 16. Висећа кап: <https://paramedicsworld.com/microbiology-practicals>
- Слика 17. Фиксирање микробиолошког материјала:  
<https://slideplayer.com/slide/11842260/>
- Слика 18. Просто бојење: <https://slideplayer.com/slide/5305085>
- Слика 19. Сложено бојење (бојење по Граму): <https://theory.labster.com/reagents/>
- Слика 20. Бојење по Ziehl-Neelsen-у: <https://microbenotes.com/ziehl-neelsen-staining/>
- Слика 21. Бојење ендоспора по Шефер-Фултону: <https://microbiologyinfo.com/endospore-staining-principle-reagents-procedure-and-result/>
- Слика 22. Светлосни микроскоп: ауторке
- Слика 23. (а) Имерзиони објектив уроњен у уље користи се за побољшање резолуције; (б) Шематски приказ микроскопирања са и без имерзионог уља (светлост се расипа док пролази кроз ваздух изнад препарата):  
<https://www.coursehero.com/study-guides/microbiology/instruments-of-microscopy/>
- Слика 24. Микроскоп са тамним пољем: (а) кондензор са тамним дном; (б) препарат спирохете: Јарак и Ђурић, 2006.
- Слика 25. Непровидни светлосни граничник уметнут у микроскоп светлог поља користи се за производњу слике тамног поља: <https://www.coursehero.com/study-guides/microbiology/instruments-of-microscopy/> + ауторке
- Слика 26. Изглед протозое на фазно - контрасном микроскопу: Јарак и Ђурић, 2006



- Слика 27. Изглед бактеријских ћелија обојене флуоресцентном бојом која раздваја живе (зелена) и угинуле (црвена) ћелије:  
<https://twitter.com/RossanaMelo5/status/1520417163584094210> + ауторке
- Слика 28. Изглед ћелије бактерије *Escherichia coli* код СЕМ: Halbus et al., 2019. + ауторке
- Слика 29. Имерзиони објектив 100× увећање са урезаним црним прстеном:  
<https://www.microscope.healthcare.nikon.com/guides/e100/en/page/oil.html>
- Слика 30. Однос величина појединих група микроорганизама:  
<https://www.microscopemaster.com/bacteria-size-shape-arrangement.html> + ауторке
- Слика 31. Окуларни микрометар (лево) и објективни микрометар (десно):  
[https://www.isccenter.co.th/product/ocular-micrometer/;](https://www.isccenter.co.th/product/ocular-micrometer/)  
<https://www.raviscientific.in/product/erma-stage-micrometer-sm-001>
- Слика 32. Окуларни микрометар и објективни микрометар у видном пољу микроскопа (при увећању микроскопа 100×): <https://slideplayer.com/slide/13807199/> + ауторке
- Слика 33. Представници суперкласе *Rhizopoda*: Montessory biology
- Слика 34. Представници суперкласе *Actinopoda*: Biologijk
- Слика 35. Љуштуре протозоа из реда *Foraminifera*: Monaco Nature Encyclopedia
- Слика 36. Различити изглед флагела: [www.embibe.com/questions/Acronematic-flagellum-is-present-in/EM6615714](http://www.embibe.com/questions/Acronematic-flagellum-is-present-in/EM6615714)
- Слика 37. Представници раздела *Ciliophora*: ауторке
- Слика 38. Једноћелијске алге: [www. http://cfb.unh.edu/phycokey](http://cfb.unh.edu/phycokey)
- Слика 39. Колонијалне алге : [www.microscopesandmonsters.wordpress.com](http://www.microscopesandmonsters.wordpress.com)
- Слика 40. Сифоналне алге : [www.biologiamarina.org](http://www.biologiamarina.org)
- Слика 41. Вишећелијске алге: [www. https://istudy.pk/category/algae](http://www.istudy.pk/category/algae)
- Слика 42. Различити облици хлоропласта (звездаст, спиралан): ауторке
- Слика 43. Изглед хлоропласта и пиреноида: ауторке
- Слика 44. *Chlorella*, *Chlorococcum* и *Chlamydomonas sp.*: ауторке
- Слика 45. Ћелијски зид дијатомеја: [https://biolozi.files.wordpress.com/2011/11/7-bag-alge-bacillariophyta\\_2009\\_10.pdf](https://biolozi.files.wordpress.com/2011/11/7-bag-alge-bacillariophyta_2009_10.pdf)
- Слика 46. Златно-мрке алге: ауторке
- Слика 47. *Rhizopus* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ):  
 The Characteristics of Zygomycota - Education Blog For Everyone  
 (blogeducationforstudents.blogspot.com) + ауторке
- Слика 48. *Mucor* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ):  
 Pulmonary Mucormycosis: Risk Factors, Radiologic Findings, and Pathologic Correlation | RadioGraphics (rsna.org) + ауторке
- Слика 49. *Mortierella* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ):  
 Mortierella | Zygomycetes; <https://www.researchgate.net/publication/228687429>
- Слика 50. Споре најфреквентнијих микоризних гљива из раздела Glomeromycota:  
 International Culture Collection of Glomeromycota (www.furb.br/cicg)
- Слика 51. *Aspergillus* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ):  
 Aspergillus Images, Stock Photos & Vectors | Shutterstock+ауторке
- Слика 52. *Penicillium* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ):  
 Structure of Penicillium. Mycelium with Conidiophore and Conidium Stock Vector - Illustration of structure, phialide: 180154018 (dreamstime.com) + ауторке

- Слика 53. *Trichoderma* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ): *Trichoderma viride* - My Edible Landscape | Edible landscaping, Edible, Medical laboratory (pinterest.es) + ауторке
- Слика 54. *Fusarium* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ): *Fusarium* (pinterest.com) + ауторке
- Слика 55. *Alternaria* sp. (изглед колоније, микроскопски препарат и шематски приказ): *Honguitos-Micologia | Fungos, Fungo* (pinterest.com.mx) + ауторке
- Слика 56. Пупљење-вегетативно размножавање квасаца: Budding. Asexual Reproduction of Yeast Cell Stock Vector - Illustration of biology, budding: 142312343 (dreamstime.com)
- Слика 57. Квасци-микроскопски препарат: Life in evolution's fast lane | Vanderbilt University; *Brettanomyces, Brettanomyces*— gordsellar.com
- Слика 58. *Geotrichum* sp. (колонија и појединачне ћелије): *Geotrichum candidum* ~ Everything You Need to Know with Photos | Videos (alchetron.com)
- Слика 59. Грађа печурке: ауторке
- Слика 60. Поступак за одређивање морфолошких особина ћелије бактерије: Практикум из микробиологија, Јарак и Ђурић, 2006
- Слика 61. Најчешћи облици бактерија: округли, штапићасти (бацил) и извијени: *Bacteria* - Mr. Evans' Science Website (google.com)
- Слика 62. Бактерије са различитим распоредом флагела: Pili Images, Stock Photos & Vectors | Shutterstock
- Слика 63. Ћелијски зид Грам-позитивних и Грам негативних бактерија: *Microbiology lec2* (slideshare.net)
- Слика 64. Капсула код бактерија (светао слој око ћелије ): *gramstain* | Printable flash cards, *Microbiology, Flashcards* (pinterest.com)
- Слика 65. Бациларни тип споре: *Colony of Bacillus subtilis bacteria* - Stock Image - B220/0203 - Science Photo Library
- Слика 66. Плектридијални тип споре: Valgaeren et al., 2011
- Слика 67. Примери различите морфологије бактеријских колонија: *Classification of Bacteria* (slideshare.net)
- Слика 68. Поједностављен приказ домена *Bacteria* i *Archaea*: *Bergey Manual of Systematic Bacteriology*, 2012
- Слика 69. Различите цијанобактерије: *Microcystis wesenbergii*, *Cyanobacteria*, Image Gallery, USGS Microbiology; [https://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/LucidKeys3.5/Keys\\_v3.5/Carolina35\\_Key/Media/Html/Scytonema\\_Main.html](https://fmp.conncoll.edu/Silicasecchidisk/LucidKeys3.5/Keys_v3.5/Carolina35_Key/Media/Html/Scytonema_Main.html); *Microscopic photography, Protists, Microscopic images* (pinterest.jp)
- Слика 70. Раст *Chondromyces crocatus* на хранљивој подлози: Zaborannyi et al., 2016
- Слика 71. Фазе провере квалитета микробиолошког ђубрива: ауторке
- Слика 72. Процентуални удео микробиолошких ђубрива регистрованих у Републици Србији: ауторке
- Слика 73. Потенцијални извори микроорганизама у млеку и њихов утицај када се налазе у млеку: Quigley et al., 2013.

## ЛИТЕРАТУРА

- Ainsworth G.C. (1973): Introduction and keys to higher taxa. In: The Fungi: an advanced treatise (Ainsworth GC, Sparrow FK, Sussman AS, eds) 4 (A): 1–7. New York: Academic Press.
- Bergey's manual of *Systematics of Archaea and Bacteria*. (2015): Online ISBN: 9781118960608| DOI: 10.1002/9781118960608
- Brenner D.J., Krieg N.R., Staley J.T. (eds) (2005): Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Volume Two The *Proteobacteria* Second Edition. ISBN-10: 0-387-24145-0. ISBN-13: 978-0387-24145-6.
- Burdass D., Grainger J., Hurst J. (2016): Basic practical microbiology: a manual, The Society for general microbiology.
- Collins C.H., Lyne P.M., Grange J.M., Falkinham J.O. (eds) (2004): Microbiological methods, 8<sup>th</sup> edition, Published by Arnold A member of the Hodder Headline Group, London.
- Đukić D.A., Mandić L.G., Stanojković A.B. (2010): Praktikum iz mikrobiologije, Budućnost, Novi Sad.
- Goodfellow M., Kämpfer P., Busse H. J., Trujillo M. E., Suzuki K. I., Wolfgang L., Whitman W. B. (2012): Bergey's Manual of Systematic Bacteriology Volume 5: The Actinobacteria, : <https://doi.org/10.1007/978-0-387-68233-4>.
- Granum P.E., Lund T. (1997): *Bacillus cereus* and its food poisoning toxins. FEMS Microbiology Letters 157: 223-228.
- Gruninger R. J., Puniya A.K., Callaghan T.M., Edwards J.E., Youssef N., Dagar S.S., Fliegerova K., Griffith G.W., Forster R., Tsang A., McAllister T., Elshahed M.S. (2014): Anaerobic fungi (phylum Neocallimastigomycota): advances in understanding their taxonomy, life cycle, ecology, role and biotechnological potential. FEMS Microbiol Ecol 90: 1–17. DOI: 10.1111/1574-6941.12383
- Halbus A.F., Horozov T.S., Paunov N.V. (2019): Controlling the Antimicrobial Action of Surface Modified Magnesium Hydroxide Nanoparticles, *Biomimetics* 4, no. 2: 41. <https://doi.org/10.3390/biomimetics4020041>
- Hausman K. (1998): Protozologija I deo, MIR, Moskva.
- Hibbett D.S., Binder M., Bischoff J.F., et al. (67 co-authors) (2007): A higher-level phylogenetic classification of the Fungi. Mycol Res. 111:509–547. doi:10.1016/j.mycres.
- Issa A.A., Abd-Alla M.H., Ohyama T. (2014): Nitrogen Fixing Cyanobacteria: Future Prospect, Advances in Biology and Ecology of Nitrogen Fixation, Takuji Ohyama, IntechOpen, DOI: 10.5772/56995.
- Jarak M., Đurić S. (2006): Praktikum iz mikrobiologije, Poljoprivredni fakultet, Novi Sad.
- Knežević-Vukčević J., Vuković-Gačić B., Simić D. (2006): Metode u mikrobiologiji: Praktikum, laboratorijski dnevnik. Deo 1, Biološki fakultet, Univerzitet u Beogradu.
- Krieg N.R., Staley J.T., Brown D.R., Hedlund B.P., Paster B.J., Ward N.L., Wolfgang L., Whitman W.B.V. (eds) (2010): Bergey's manual of Systematic Bacteriology. Second Edition Volume Four: The *Bacteroidetes*, *Spirochaetes*, *Tenericutes* (*Mollicutes*), *Acidobacteria*, *Fibrobacteres*, *Fusobacteria*, *Dictyoglomi*, *Gemmatimonadetes*, *Lentisphaerae*, *Verrucomicrobia*, *Chlamydiae*, and *Planctomycetes*. ISBN: 978-0-387-95042-6 e-ISBN: 978-0-387-68572-4 DOI: 10.1007/978-0-387-68572-4. Springer New York Dordrecht Heidelberg London.

- Madigan M. T., Martinko J.M., Dunlap P.V., Clark D.P. (eds) (2009): Brock Biology of Microorganisms, 12<sup>th</sup> edition, Published by Pearson International Edition.
- Naranjo-Ortiz M. A., Gabaldon T. (2019): Fungal evolution: diversity, taxonomy and phylogeny of the Fungi. *Biol. Rev.* 94: 2101–2137. doi: 10.1111/brv.12550.
- Nguyen Thuong T. T., Park S.W., Pangging M., Lee H.B. (2019): Molecular and Morphological Confirmation of Three Undescribed Species of *Mortierella* from Korea. *Microbiology*, 47, 1:31–39. <https://doi.org/10.1080/12298093.2018.1551854>
- Quigley L., O’Sullivan O., Stanton C., Beresford T.P., Ross R.P., Fitzgerald G.F., Cotter P.D. (2013): The complex microbiota of raw milk. *FEMS Microbiol Rev* 37: 664–698. DOI: 10.1111/1574-6976.12030.
- Sahoo D., Seckbach J. (eds.) (2015): The Algae world, Vol 26, Published by Springer Science.
- Svetska zdravstvena organizacija (WHO) (2004): Priručnik za biološku bezbednost u laboratoriji. Treće izdanje, Ženeva, Švajcarska. ISBN 92 4 154650 6 (LC/NLM klasifikacija: QY 25).
- Türker M. (2014): Yeast Biotechnology: Diversity and Applications. <https://www.researchgate.net/publication/285598626>.
- Uçar A., Volkan Yilmaz M., Çakıroğlu F.P. (2016): Significance, Prevention and Control of Food Related Diseases. Book chapter in: Food Safety – Problems and Solutions. <http://dx.doi.org/10.5772/63176>.
- Valgaeren B., Schutter P.D., Pardon B., Eeckhaut V., Boyen F., Van Immerseel F., Deprez P. (2011): Thermic dehorning and ear tagging as atypical portals of entry of *Clostridium tetani* in ruminants. *Vlaams Diergeneeskundig Tijdschrift*. <https://www.researchgate.net/publication/277205153>.
- Yousuke D., Walter G. (2004): A new species of *Mortierella*, and an associated sporangiiferous mycoparasite in a new genus, *Nothadelphia*. *Studies in Mycology* 50(2):567-572.
- Zaburanyi N., Boyke B., Josef M., Jörg O., Rolf M. (2016): Genome Analysis of the Fruiting Body-Forming Myxobacterium *Chondromyces crocatus* Reveals High Potential for Natural Product Biosynthesis, *Applied and Environmental Microbiology*, 82 (6): 1945-1957, DOI: 10.1128/AEM.03011-15.
- Правилник о условима за разврставање и утврђивање квалитета средстава за исхрану биља, одступањима садржаја хранљивих материја и минималним и максималним вредностима дозвољеног одступања садржаја хранљивих материја и о садржини декларације и начину обележавања средстава за исхрану биља, («Сл. Гласник РС», бр.30/2017).