Tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju

Molnar, Jasna

Undergraduate thesis / Završni rad

2015

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, FACULTY OF FOOD TECHNOLOGY / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek**

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:109:089465

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

REPOZITORIJ PTFOS PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

Repository / Repozitorij:

Repository of the Faculty of Food Technology Osijek

zir.nsk.hr

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

dabar DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Jasna Krstanović

(ud. Molnar)

Tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju

završni rad

Osijek, 2015.

SVEUČILIŠTE J. J. STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Nastavni predmet:

Opća mikrobiologija

Predmetni nastavnik: doc.dr.sc. Lidija Lenart

TEHNIKE RADA U MIKROBIOLOŠKOM LABORATORIJU

Završni rad

Student/ica:	Jasna Krstanović 3119/09
Mentor:	doc.dr.sc. Lidija Lenart
Predano (datum):	
Pregledano (datum):	

Ocjena: Potpis mentora:

_____ _____

TEHNIKE RADA U MIKROBIOLOŠKOM LABORATORIJU

Sažetak:

Mikrobiologija je znanost koja uključuje proučavanje pojavljivanje i važnosti bakterija, mikroskopskih plijesni, praživotinja i algi koje su početak i kraj zamršenih lanaca o kojima ovise svi oblici života. To je dinamička znanost. Ona konstantno uključuje velik broj informacija i stalno dodaje poznate a i nove mikrobiološke postupke koji se rapidno modificiraju i usavršavaju.

Rad u mikrobiološkom laboratoriju zahtjeva znanje, spretnost, preciznost. Za kvalitetan rad u mikrobiološkom laboratoriju potrebno je poznavati metode i tehnike rada nacepljivanja, precjepljivanja, bojanja, sterilizacije preparata, mikroskopiranja. Pridržavati se propisa za sigurno rukovanje uređajima, instrumentima i priborom, kao što su mikroskop, sterilizator, homogenizator, šejker, integrator, sonikator, eze, epruvete, zdjelice, tikvice. Pravilno označavanje, otvaranje, zatvaranje, i transport uzoraka, mjere sigurnosti s materijalima s kojima se rukuje, poznavanje zakonskih propisa, planovi za izvanredne situacije i postupanje u izvanrednim situacijama. Sve gore nabrojano su tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju koje osiguravaju kvalitetan i siguran rad.

Ključne riječi: mikrobiologija, laboratorij, spretnost, preciznost, siguran i kvalitetan rad

MICROBIOLOGICAL LABORATORY WORKING TECHNIQUES

Summary:

Microbiology is the study of microscopic organisms - bacteria, microscopic mold, protozoans and algae, which are considered to be the beginning and the end of complex chains that every living being depends on. It is a dynamical science. It includes a large amount of information and microbiological processes that constantly and rapidly change and improve.

Knowledge, skills and precision are necessary to work in a microbiological laboratory. It is necessary to be familiar with methods and techniques of grafting, coloring, sterilization and microscopy, and to work in a compliance with rules for appropriate usage of appliances, instruments and equipment (microscope, sterilizer, homogenizer, shaker, integrator, sonicator, loops, tubes, dishes, flasks etc.). Appropriate labeling, opening, closing, samples transportation, security measures while working with materials, knowledge of legislation, contingency plans and emergency procedures – these are working techniques that enable quality and secure work in a microbiological laboratory.

Key words: microbiology, laboratory, skills, precision, secure and quality work

Sadržaj

1. UVOD 1,2

2. GLAVNI DIO 3

2.1. Tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju 4
2.2. Sigurno rukovanje uzorcima u laboratoriju 4
2.3. Kontenjeri za uzorke 4
2.4. Transport uzoraka u objektu 4
2.5. Prijem uzoraka 4
2.6. Otvaranje paketa 4
2.7. Rad s pipetama i pipetnim pomagalima 5
2.8. Izbjegavanje raznošenja infektivnog materijala 5
2.9. Rad u biološki sigurnim kabinetima 6
2.10. Izbjegavanje unošenja infektivnog materijala kao i kontakta s kožom i očima 6
2.11. Izbjegavanje ubrizgavanja infektivnog materijala 7
2.12. Odvajanje seruma 7
2.13. Uporaba centrifuga 8
2.14. Uporaba homogenizatora, šejkera, integratora i sonikatora 9
2.15. Uporaba drobilica tkiva 11
2.16. Održavanje i korištenje hladnjaka i zamrzivača 11
2.17. Otvaranje ampula koje sadrže liofilizirane infektivne materijale 11
2.18. Skladištenje ampula koje sadrže infektivni materijal 12
2.19. Standardne preventivne mjere vezane za krv i druge tjelesne tekućine, tkiva, izlučevine itd. 12
2.19.1. Skupljanje, obilježavanje i transport uzoraka 12
2.19.2. Otvaranje epruveta i sadržaja sa uzorcima 12
2.19.3. Staklo i oštri predmeti 12
2.19.4. Mikroskopski razmazi 13
2.19.5. Automatizirana oprema (sonikatori, vorteks mikseri) 13
2.19.6. Tkiva 13
2.20. Mjere sigurnosti s materijalima koji mogu sadržavati prione 13
2.21. Planovi za izvanredne situacije i postupanje u izvanrednim situacijama 15
2.21.1. Plan Izvanredne situacije 15
2.21.2. Postupci za izvanredno stanje u mikrobiološkim labaratorijima 16
2.22. Dezinfekcija i sterilizacija 18
2.22.1. Sterilizacije 19
2.22.1.1. Fizička steralizacija – se najviše upotrebljava, a može biti: suha i vlažna 19
2.22.1.2. Kemijska sterilizacija 23
2.22.1.3. Sterilizacija zračenja 23
2.22.1. Mehanička sterilizacija (Sterilizacija bakteriološkom filtracijom) 24
2.23. Metode nacjepljivanja 24
2.23.1. Nacjepljivanje tekućih podloga 25
2.23.2. Nacjepljivanje čvrstih podloga 25
2.24. Metode za izuzimanje kultura 26
2.25. Mikroskopiranje 27

2.25.1. Rad mikroskopa i dijelovi mikroskopa ... *27*
2.25.2. Svjetlosni mikroskop ... *28*
2.25.3. Elektronski mikroskop ... *29*
2.26. BOJENJE MIKROORGANIZAMA ... 30
2.26.1. Boje i bojenje mikroorganizama ... *30*
2.26.2. Priprema otopine boja ... *31*
2.26.3. Priprema fiksiranih preparata ... *31*
2.26.4. Štavljenje i štavila ... *32*
2.26.5. Odbojavanje ... *32*
2.26.6. Jednostavno bojenje mikroorganizama ... *32*
2.26.7. Diferencijalno (složeno) bojenje ... *33*
2.26.7.1. Bojenje po gramu ... *34*
2.26.7.2. Bojenje acidorezistentnih bakterija: Bojenje po Ziehl-Neelsenu ... *37*
2.26.7.3. Bojenje bakterijskih endospora po Schaeffer-Fultonovoj metodi ... *39*
2.26.7.4. Bojenje kapsula (čahura) bakterija ... *40*

3. ZAKLJUČAK ... 42,43

4. LITERATURA ... 44,45

1. UVOD

Mikrobiologija je znanost koja uključuje proučavanje pojavljivanje i važnosti bakterija, mikroskopskih plijesni, praživotinja i algi koje su početak i kraj zamršenih lanaca o kojima ovise svi oblici života. To je dinamička znanost. Ona konstantno uključuje velik broj informacija i stalno dodaje poznate a i nove mikrobiološke postupke koji se rapidno modificiraju i usavršavaju.

Uzajamna djelovanja mikroorganizama, životinja i biljaka su stalna i prirodna . U najvećem broju slučajeva mikroorganizmi koriste naše izvore hrane kao tvari za svoj rast i razvoj. Ta uloga mikroorganizama može biti pozitivna (npr. proizvodnja jogurta,vina itd...),ali može biti i štetna(kvarenje mesa ,voća povrća). Mikroorganizmi imaju mnoge i važne uloge u okolišu, a dinamičke intereakcije između okoliša i mikrobioloških populacija doprinose održavanju cjelovitog ekosustava u različitim prebivalištima. Mikroorganizmi su nezamjenljivi u prečišćavanju voda, proizvodnji antibiotika,vitamina, krme, proizvodnji hrane i industrijski važnih kemijskih spojeva.

Rad u mikrobiološkom laboratoriju zahtjeva znanje, spretnost, preciznost. Za kvalitetan rad u mikrobiološkom laboratoriju potrebno je poznavati metode i tehnike rada nacepljivanja, precjepljivanja, bojanja, sterilizacije preparata, mikroskopiranja. Pridržavati se propisa za sigurno rukovanje uređajima, instrumentima i priborom, kao što su mikroskop, sterilizator, homogenizator, šejker, integrator, sonikator, eze, epruvete, zdjelice, tikvice. Pravilno označavanje, otvaranje, zatvaranje, i transport uzoraka, mjere sigurnosti s materijalima s kojima se rukuje, poznavanje zakonskih propisa, planovi za izvanredne situacije i postupanje u izvanrednim situacijama. Sve gore nabrojano su tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju koje osiguravaju kvalitetan i siguran rad.

2. GLAVNI DIO

2.1. Tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju

Ljudske pogreške, loše laboratorijske tehnike i pogrešno rukovanje opremom mogu biti uzrokom većine povreda i radom izazvanih infekcija u laboratoriju. Da izbjegnemo ili smanjmo najčešće probleme ove prirode potrebno je pridržavati se slijedećeg pravila pri radu u mikrobiološkom laboratoriju.

2.2. Sigurno rukovanje uzorcima u laboratoriju

Nepravilno sakupljanje, transport i rukovanje uzorcima u laboratoriju mogu izazvati infekcije uključenog osoblja.

2.3. Kontenjeri za uzorke

Kontejneri za uzorke mogu biti od stakla, ali su poželjniji oni od plastike, moraju biti čvrsti i ne smiju curiti kad je poklopac ili zatvarač pravilno postavjen. Materijal ne smije biti van kontejnera. Uzorci moraju biti pravilno obilježeni kako bi se olakšala identifikacija. Zahtjevi za uzorke i obrasci, specifikacije trebaju biti smešteni u odvojene vodootporne omotnice.

2.4. Transport uzoraka u objektu

Da bi izbjegli slučajna curenja ili prosipanja, koristiti sekundarne kontejnere, kao što su kutije opremljene ručicama, tako da kontejneri sa uzorcima ostanu uspravno. Kontejneri mogu biti od plastike ili metala, kako bi ih mogli sterilizirati ili kemisjki dezinficirati, a zaštitni poklopac treba imati zaptivač. Potrebno ih je redovito dekontaminirati.

2.5. Prijem uzoraka

Laboratorij koji prima veliki broj uzoraka, za prijem treba osigurati posebnu prostoriju.

2.6. Otvaranje paketa

Osoblje koje prima i raspakirava uzorke treba biti svjesno potencijalnih zdravstvenih rizika i obučeno za standardne mjere sigurnosti, posebno kada rukuje kontejnerima koji su razbijenii ili cure. Primarne kontejnere treba otvarti u biološki sigurnim kabinetima, a dezinficijensi moraju biti na dohvat ruke.

2.7. Rad s pipetama i pipetnim pomagalima

- Pipetna pomagala koristiti uvijek. Pipetiranje ustima je zabranjeno.
- Sve pipete moraju imati pamučne zatvarače kako bi se smanjila kontaminacija pipetnih dijelova.
- Ne smije se propuhivati zrak kroz tekućine koje sadrže infektivne reagense.
- Infektivni materijali se ne smeju miješati naizmjeničnim uvlačenjem i ispuhivanjem kroz pipetu. Tekućina se ne smeje na silu izbacivati iz pipete.
- "Mark-to-Mark" pipete su bolje od ostalih zato što ne zahtevaju ispuhivanje do poslijednje kapi.
- Kontaminirane pipete potpuno potopiti u nesalomljivi kontejner ispunjen odgovarajućim dezinficijensom, gdje ostaju neko vrijeme prije nego ih odložimo.
- Upotrebljene kontejnere za pipete smjestiti u biološki sigurni kabinet, a ne izvan njega.
- Šprice opremljine hipodermičkim iglama se ne smiju koristiti za pipetiranje.
- Treba koristiti uređaje za otvaranje septum boca, koje omogućavaju korištenje pipeta a izbjegavati uporabu hipodermičnih igala i šprica.
- Kako bi izbjegli disperziju infektivnog materijala koji je ispušten iz pipete potrebno je postaviti absorpcioni materijal na radnu površinu, a poslije uporabe odstraniti ga kao infektivni materija.

2.8. Izbjegavanje raznošenja infektivnog materijala

- U cilju izbjegavanja prijevremenog prosipanja materijala, koristiti mikrobiološke eze promjera 2 do 3 mm potpuno zatvorene. Kako bi sveli vibracije na minimum, drške ne trebaju biti dulje od 6 cm.
- Rizik od prskanja infektivnog materijala na plamen Bunsenovog plamenika izbjeći korištenjem potpuno ograđenog električnog mikroincineratora za sterilizaciju eza. Poželjnije su eze za jednokratnu uporabu kojima nije potrebna ponovna sterilizacija.
- Pri sušenju sputuma izbjegavati stvaranja aerosola.
- Odbačeni uzorci i kulture za sterilizaciju i/ili odlaganje odložiti u nepropusne kontejnere, tj. laboratorijske vreće za otpatke. Poklopce osigurati (autoklaving trakom) prije nego što se odlože u kontejnere za smeće.
- Radni prostor, na kraju svakog radnog perioda, dekontaminirati odgovarajućim dezificijensom.

2.9. Rad u biološki sigurnim kabinetima

- Svim potencijalnim korisnicima objasniti način rada i ograničenja u radu u biološki sigurnim kabinetima, s naglasko da kabinet neće zaštititi laboranta od curenja, lomova ili loše trehnike.
- Kabineti koji ne rade po zahtjevu, ne smiju se koristiti. Zaštino staklo ne smije biti otvoreno kada je kabinet u radu.
- U kabinetu koristiti minimalni broj aparata i materijala. Cirkulacija zraka na zadnjem plenumu ne smije biti blokirana.
- Bunsenovi plamenici ne smiju se koristiti u kabinetu, stvorena toplina bi narušila protok i uništila filtre. Električni mikroinsinerator je dozvoljen, ali su bolje sterilne eze za jednokratnu uporabu.
- Sav rad mora biti obavljan na sredini ili u zadnjem dijelu radne površine, vidljiv kroz zaštitnu staklenu ploču.
- Kretanje ljudi u prolazu iza laboranta mora biti svedeno na minimum.
- Laborant ne smije narušavati protok zraka stalnim uklanjanjem ili ubacivanjem ruku.
- Zračne rešetke ne smiju biti blokirane zabilješkama, pipetama ili drugim materijalma, narušiti će protok zraka izazivajući potencijalnu kontaminaciju materijala i izlaganje laboranta istoj.
- Površinu, biološki sigurnog kabineta, očistiti korištenjem odgovarajućeg dezinficijensa po završetku rada na kraju dana.
- Kabinetski ventilator uključiti najmanje 5 minuta prije početka i isključiti 5 minuta poslije završetka rada u kabinetu.
- Dokumentaciju nikada ne ostavljati u biološki sigurnim kabinetima.

2.10. Izbjegavanje unošenja infektivnog materijala kao i kontakta s kožom i očima

- Velike čestice i sitne kapi (>5μm promjera) oslobođene tijekom mikrobiološke manipulacije brzo se slegnu na radnu površinu i ruke laboranta. Zato treba nositi zaštitne rukavice za jednokratnu uporabu i izbjegavati dodirivanje usta, očiju i lica.
- U laboratoriju ne treba čuvati i konzumirati hranu i piće.
- U usta ne treba stavljati nikakve predmete: kemijske olovke, grafitne olovke i gume za žvakanje. Ne koristiti kozmetiku.
- Tijekom procesa koji može rezultirati prosipanjem potencijalno infektivnih materijala, lice, oči i usta pokriti maskom ili drugačije zaštititi.

2.11. Izbjegavanje ubrizgavanja infektivnog materijala

- Slučajna inokulacija koja je rezultat povrede razbijenim ili odlomljenim staklom izbjeći pažljivim vježbama ili uputama. Staklenu aparaturu zamjeniti plastičnom kad god je to moguće.
- Slučajno ubrizgavanje može nastati ubodima, na primjer hipodermičkim iglama, staklenom Pasterovom pipetom, ili slomljenim staklom.
- Povrede nastale ubodom iglom mogu se smanjiti:
  - Minimiziranjem uporabe šprica i igala (na primjer, postoje jednostavne sprave za otvaranje septum boca sa zatvaračem, tako da se umjesto šprica i igala mogu koristiti pipete) ili korištenjem posebno napravljenih oštrih sigurnosnih uređaja kada su šprice i igle neophodne.
- Nikada ne vraćati zatvarače na igle. Predmete za jednokratnu uporabu treba bacati u neprobojne, čvrste kontejnere sa poklopcem.
- Plastične Pasterove pipete zamjeniti onim izrađenim od stakla.

2.12. Odvajanje seruma

- Ovaj posao obavlja samo pravilno obučena osoba.
- Obavezno je nošenje rukavica i zaštite za oči i mukozne membrane.
- Prskanja i kapljice izbjeći ili minimizirati dobrim laboratorijskim tehnikama. Krv i serum uzimati samo pipetom, nikako presipavanjem.Uporaba pipete ustima je zabranjena.
- Poslije uporabe, pipete poptuno potopiti u odgovarajući dezinficijens.Ostaviti ih određeno vrijeme prije bacanja ili pranja i sterilizacije do naredne uporabe.
- Odbačene epruvete sa uzorcima koje sadrže ugruške krvi itd. (zatvorene zatvaračima), staviti u odgovarajuće nepropusne kontejnere za sterilizaciju i/ili incineraciju.
- Za čišćenje materijala koji su curili ili su rasuti, odgovarajući dezinficijensi, trebaju biti na dohvat ruku.

2.13. Uporaba centrifuga



Slika 1. Uređaj za centrifugiranje

https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=centrifuga&gbv=2&oq=centrifuga&gs_l=heirloom-hp.1.1.0l10.1686.7911.0.10993.10.7.0.3.3.0.109.723.1j6.7.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..0.10.762.OjIVokSWX1E (2014.)

- Kod uporabe laboratorijskih centrifuga (Slika 1) unaprijed je zadan zahtjev na zadovoljavajuće mehaničke performanse koje udovoljavaju mikrobiološkoj sigurnosti.
- Centrifuge koristiti prema uputama proizvođača.
- Centrifuge postaviti na nivo, da se može vidjeti unutar njih kako bi pravilno unijeli stalke i posude.
- Koristiti epruvete i kontejneri za uzorke, od debelog stakla ili plastike i provjeriti na oštećenja prije uporabe.
- Epruvete i posude za uzorke uvijek sigurnosno zatvoriti (ako je moguće zatavaračima sa navojem).
- Posude i stalke opteretiti, uravnotežiti, zatvarani i otvarani u biološki sigurnim kabinetima.
- Posude i stalke razvrstati po težini, sa epruvetama na odgovarajućem mjestu koje su precizno izbalansirane.
- Veličina prostora koju treba ostaviti između nivoa tekućine i okvira centrifuge odrediti prema preporukama proizvođača.

- Za balansiranje praznih posuda koristiti destiliranu vodu ili alkohol (propanol 70%). Ne koristiti slane ili hipokloridne otopine, jer korodiraju metale.
- Za mikroorganizme rizičnih skupina koristiti hermetičke centrifugalne posude.
- Kada se koriste centrifuge sa ugaonim rotorima, paziti da epruvete ne budu prepunjene.
- Unutrašnjost bubnja centrifuge svakodnevno provjeravati na mrlje i prljavštinu od zemlje u nivou rotora. Ako je evidentno da ih ima, procijeniti ponovno propise o uporabi.
- Rotori centrifuga i posude kontrolirati svakodnevno zbog korozije i malih pukotina.
- Posude, rotore i centrifugalne zdjelice dekontaminirati poslije svake uporabe.
- Poslije uporabe, posude odlagati u okrenutom položaju da iscuri balansirajuća tekućina.
- Pri korištenju centrifuga, mogu se osloboditi infektivne stanice koje se prenose zrakom. Međutim, dobra centrifuga i sigurno zatvorene epruvete pružaju adekvatnu zaštitu od zaraznih aerosola i raspršenih stanica.

2.14. Uporaba homogenizatora, šejkera, integratora i sonikatora



Slika 2. Homogenizator

https://www.google.hr/search?q=homogenizator+%C5%A1ejker,+sonicator&rlz=1C2AVNC_enHR598HR598&biw=1440&bih=799&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=Q2faVKv8EYf3Ov2ygfAD&ved=0CAYQ_AUoAQ (2014.)



Slika 3. Labaratorijski šejker

https://www.google.hr/images?hl=hr&q=laboratorijski+%C5%A1ejker&gbv=2&sa=X&oi=image_result_group&ei=2w_aVNfPEoXeapHjgNgJ&ved=0CBIQsAQ (2014.)

- Kućni (kuhinjski) homogenizatore se ne koriste u laboratorijama zato što mogu procuriti i oslobode aerosole. Laboratorijski integratori i stomaheri su sigurniji.
- Koristiti zatvarače, posude ili boce u dobrom stanju i bez pukotina ili naprslina. Zatvarači trebaju biti odgovarajućih veličina, a zaptivači u dobrom stanju.
- Tlak raste u posudi u toku rada homogenizatora (slika 2.), šejkera (slika 3.) i sonikatora. Aerosoli sa infektivnim tvarima mogu proći između zatvarača i posude. Posebno se preporučuje, plastika, politetrafloroetilenske posude (PTFE), zato što se staklo može razbiti i oslobodi infektivne tvari uz mogućnost povrede laboranta.
- Kada su u uporabi homogenizatori, šejkeri i sonikatori pokriti ih jačom prozirnom plastičnom navlakom. Nju treba dezinficirati poslije uporabe. Ovim uređajima upravljati ispod plastičnih navlaka u biološki sigurnim kabinetima, gdje god je to moguće.
- Na kraju postupka kontejnere otvarati u biološki sigurnim kabinetima.
- Osoblju koje koristi sonikatore omogućiti zaštitu sluha.

2.15. Uporaba drobilica tkiva

- Staklene drobilice držati u upijajućem materijalu. Ruke zaštititi rukavicama. Plastične drobilice su sigurnije.
- Drobilice tkiva otvarati u biološki sigurnim kabinetima.

2.16. Održavanje i korištenje hladnjaka i zamrzivača

- Hladnjake, zamrzivače i komore sa čvrstim ugljičnim dioksidom (suhim ledom) odmrzavati i čistiti periodično, a svaku slomljenu ampulu, epruvetu, itd.,prilikom odlagnja, ukloniti. Prilikom čišćenja nositi zaštitu za lice i zaštitne rukavice. Poslije čišćenja, unutarnje površine kabineta dezinficirati.
- Sve kontejnere odložene u hladnjake jasno označiti imenom sadržaja u njima, datumom odlaganja i imenom osobe koja ih je odložila. Neoznačene i zastarjele materijale sterilizirati i izbaciti sadržaj, o tome voditi evidenciju.
- Zapaljive rastvore ne odlagati u hladnjaku ukoliko nije zaštićen od eksplozija. Upozorenje istaknuti na vratima hladnjaka.

2.17. Otvaranje ampula koje sadrže liofilizirane infektivne materijale

Obratiti pažnju pri otvaranju ampula sa materijalom od suhog leda, jer njihov sadržaj može biti pod smanjenim tlakom, tako da iznenadni prodor zraka može raspršiti neke tvari u atmosferu. Ampule uvijek otvarati u biološki sigurnom kabinetu. Za otvaranje ampula preporučuju se slijedeći postupci:

1. Dekontminirati vanjsku površinu ampule.
2. Obilježitili ampulu turpijicom blizu sredine pamučnog ili celuloznog zatvarača ako on postoji.
3. Držati ampulu u alkoholom natopljenom pamuku kako bi zaštitili ruke prije nego što se slomi na turpijcom obilježenom mjestu.
4. Odvojiti vrh nježno i ponašati se prema njemu kao da je kontminirani materijal.
5. Ako je zatvarač još uvijek iznad sadržaja ampule,odstraniti ga sterilnom pincetom.
6. Polako dodati tekućinu za resuspenziju ampuli da ne bi došlo do pjenjenja.

2.18. Skladištenje ampula koje sadrže infektivni materijal

Ampule sa infektivnim materijalom nikada ne uranjati u tekući dušik zato što se naprsle ili nedovoljno dobro zatvorene ampule mogu slomiti ili eksplodirati pri uklanjanju. Ako se zahtjevaju vrlo niske temperature ampule se odlažu samo u plinovitoj fazi iznad tekućeg dušika. Infektivne tvari odlagati u mehaničkim kabinetima sa dubokim zamrzavanjem, ili na suhom ledu. Radnici u laboratoriju trebaju nositi zaštitu za oči i ruke pri uklanjaju ampula sa hladnog skladištenja.Vanjske površine ampula skladištenih na ovaj način dezinficirati prilikom njihovog uklanjanja sa skladištenja.

2.19. Standardne preventivne mjere vezane za krv i druge tjelesne tekućine, tkiva, izlučevine itd.

Standardne mjere su osmišljene da smanje rizik prijenosa mikroorganizama sa poznatog i nepoznatog izvora infekcije.

2.19.1. Skupljanje, obilježavanje i transport uzoraka

- Standardne mjere, uvijek primjenjivati rukavice za sve postupke.
- Krv pacijenata i životinja sakuplja obučeno osoblje.
- Za flebotomiju, konvencijalni sistem igle i šprice zamjeniti vakuumskim uređajem za jednokratno korištenje, on osigurava sakupljanje krvi direktno u zatvorenom transportu i/ili epruvetama za prijenos kulture, automatski onesposobljavajući iglu poslije korištenja.
- Epruvete postaviti u odgovajuće kontejnere za transport do laboratorija, a formulare staviti u odvojene nepropusne vreće ili omotnice.
- Prijemno osoblje ne otvara ove vreće.

2.19.2. Otvaranje epruveta i sadržaja sa uzorcima

- Epruvete sa uzorcima otvaraju se u biološki sigurnim kabinetima.
- Obavezno je nošenje rukavica. Također treba nositi zaštiti za oči i sluzokožu (zaštitne naočale i zaštitna maska za lice).
- Zaštitnoj odjeći dodati i plastičnu pregaču.
- Zatvarače držati pomoću komada papira ili gaze da se izbjegne rasipanje.

2.19.3. Staklo i oštri predmeti

- Gdje god je moguće staklo treba zamjeniti plastikom. Treba koristiti samo laboratorijski ocjenjeno (borsilikatno staklo). Svaki predmet koji je oštećen ili naprsnut baciti.
- Hipodermičke igle ne koristiti kao pipete.

2.19.4. Mikroskopski razmazi

Fiksiranje i pravljenje mrlja od krvi, sputuma i fekalnih uzoraka za mikroskopiranje ne ubija baš sve organizme i viruse na razmazima. Ovim predmetima treba rukovati pincetama, odlagati ih na prikladno mjesto, dekontaminirati ili sterilizirati prije uklanjanjanja.

2.19.5. Automatizirana oprema (sonikatori, vorteks mikseri)

- Koristiti opremu zatvrenog tipa da se izbjegnu disperzija kapi i aerosola.
- Otpadnu vodu sakupljati u zatvorenim posudama za dalju sterilizaciju ili uklanjanje.
- Opremu dezinficirati na kraju svake sesije, prema instrukcijama proizvođača.

2.19.6. Tkiva

- Korisititi formalinske fiksatere.
- Izbjegavati zamrznuto segmentiranje. Kriostat zaštititi kada je to neophodno, a laborant treba nositi sigurnosnu zaštitu preko lica. Radi dekontaminacije, temperaturu instrumenta podići najmanje za 20°C.
- Za dekontaminaciju preporučuju se hipokloriti i dezinficijensi visokog nivoa. Kod otopina sa svježe pripremljenim hipokloritom sadržaj klora je u količini od 1g/l za opću uporabu i 5g/l za slučaj prosipane krvi.

2.20. Mjere sigurnosti s materijalima koji mogu sadržavati prione

Prioni (također poznati kao “spori virusi”) se povezuju sa prenosivom spongiformnom encefalopatijom (TSE), naročito Creutzfeldt-Jakobovom bolešću (CJD; uljučujući i novi oblik), Gerstmann-Sträussler-Scheinkerovim sindromom, fatalnom porodičnom insomnijom i kuru kod ljudi; goveđom spongiformnom encefalopatijom (BSE) kod stoke; i drugim prenosivim encefalopatijama kod jelena, sjevernih jelena i krznara. Iako se CJD prenosi na ljude, nema dokazanih slučajeva laboratorijski povezanih infekcija bilo kojim od ovih agenasa. Ipak, mudro je poštivati određene mjere sigurnosti pri rukovanju materijalima sa zaraženih ili potencionalno zaraženih ljudi i životinja. Izbor nivoa biološke sigurnosti za rad sa tvarima u svezi sa TSE ovisit će od prirode agensa i uzoraka koji se proučavaju, osigurava se u dogovoru s nacionalnim službama. Najveće koncentracije priona su pronađene u tkivu centralnog nervnog sustava. Proučavanja životinja govore da se visoke koncentracije priona najverovatnije nalaze u slezenii, timusu, limfi, limfnim čvorovima i plućima. Nedavne studije ukazuju da prioni u lingvalnom i skeletnom mišićnom tkivu mogu predstavljati rizik od infekcije. Potpunu neaktivnost priona teško je postići. Važno je naglasiti uporabu raspoloživih instrumenata gde god je to moguće i uporabiti raspoloživu zaštitu radnih površina u biološki

sigurnom kabinetu. Glavna mjera sigurnosti osigurava da se izbjegne unošenje kontaminiranih materijala u organizam ili ubod kože laboranta u laboratoriju.

Slijedeće dodatne mjere sigurnosti su potrebne ako agensi nisu uništeni normalnim postupcima laboratorijske dezinfekcije i sterilizacije:

1. Preporučuje se uporaba posebno namjenjene opreme, to jest opreme koja se ne dijeli sa ostalim laboratorijima.
2. Moraju se nositi raspoloživa laboratorijska zaštitna odjeća (ogrtači i pregače) i rukavice (gumene rukavice ojačane čelikom za patologe).
3. Preporučuje se uporaba raspoloživih plastičnih posuda, koje se mogu koristiti i baciti poslije uporabe kao i sav otpad.
4. Ne koristiti procesore tkiva zbog problema sa dezinfekcijom. Umjesto toga koristiti tegle i plastične graduirane posude.
5. Sve radnje izvoditi u biološki sigurnim kabinetima.
6. Veliku pažnju posvetiti izbjegavanju stvaranja aerosola, unošenja u organizam, i posjekotina, uboda kože.
7. Tkiva stavljena u formalin tretirati kao još uvek infektivna, čak i poslije duljeg izlaganja u njemu.
8. Histološki uzorci koji sadrže prione uglavnom su neaktivni nakon jednog sata u 96% otopine mravlje kiseline.
9. Radni otpad, uključujući i rukavice za jednokratnu uporabu, ogrtače i pregače sterilizirati uz pomoć parnog sterilizatora na 134–137 °C ciklusu od 18 minuta, ili u šest uzastopnih ciklusa od 3 minute praćenih insineracijom.
10. Instrumente koji nisu za jednokratnu uporabu, uključujući čelične mrežaste rukavice, sakupiti i dekontaminirati.
11. Otpadne vode zaražene prionima dekontaminirati natrij hipokloridom koji sadrži klor u količini 20g/l (2%) u trajanju od 1h.
12. Postupci vaporizacije paraformaldehida ne umanjuju titre priona, i oni ostaju otporni na ultraljubičasto zračenje,te kabinete treba dekontaminrati standardnim metodama (tj. formaldehidnim plinom) da deaktiviramo druge agense koji mogu biti prisutni.
13. Biološki sigurni kabineti kontaminirani prionima i ostale površine, dekontaminirati natrij hiperkloridom koji sadrži klor sa 20g/l u trajanju od 1h.
14. Visokoefikasne zračne filtere za stanice (HEPA) spaliti na minimalnoj temperaturi od 1000°C poslije uklanjanja. Preporučuju se slijedeće kod sagorijevanja i to :
    a. prskanje izložene strane filtra lakom za kosu prje uklanjanja

b. pakiranje filtra u toku njegovog skidanja
c. uklanjanje HEPA filtra iz radne prostorije kako nedostupni plenum kabineta ne bi bio kontaminiran.

15. Instrumente potopiti u natrij hipokilorid koji sadrži klor u količini 20g/l (2%) u trajanju od 1h i onda isprati u vodi prije sterilizacije.
16. Instrumenti koji se ne mogu steriliziratiii očistimo ponavljanjem kvašenja natrij hipokloridom koji sadrži klor 20g/l (2%) u trajanju preko 1h,a nakon toga operemo na odgovarajući način da odstranimo preostali natrij hipoklorit.

2.21. Planovi za izvanredne situacije i postupanje u izvanrednim situacijama

Za svaki laboratorij koja radi sa infektivnim mikrorganizmima određene su mjere sigurnosti koje odgovaraju opasnostima od organizama sa kojima se rukuje. Donijeti pisane upute za postupanje u izvanrednim situacijama u laboratoriju.

2.21.1. Plan Izvanredne situacije

Omogućiti operativne postupke za:

1. Mjere sigurnosti za slučaj prirodnih nepogoda, požara, poplave,zemljotresa i eksplozije.
2. Procjene rizika biološke opasnosti.
3. Postupak i dekontaminaciju u slučaju nesreće.
4. Hitnu evakuaciju osoblja i životinja iz prostora.
5. Hitni medicinski tretman izloženih i povrijeđenih osoba.
6. Medicinski nadzor nad izloženim osobama.
7. Kliničko zbrinjavanje izloženih osoba.
8. Epidemiološku istragu.
9. Post-incidentni nastavak rada.

U razvoju ovog plana razmotriti slijedeće kao dodatak:

1. Identifikaciju organizama visokog rizika.
2. Lokaciju oblasti visokog rizika.
3. Identifikaciju osoblja i populacije izloženih riziku.
4. Identifikaciju odgovornog osoblja i njihovih dužnosti. Listu objekata za tretman i izolaciju koji mogu primiti izložene i inficirane osobe.
6. Transport izloženih i inficiranih.
7. Liste imunoseruma, vakcina, lijekova, specijalne opreme i zaliha.

8. Dodatnu opremu za hitne slučajeve, na primjer zaštitnu odjeću, dezinficijense, kemijske i biološke komplete za rukovanje rasutom tekućinom, opremu za dekontaminaciju i zalihe.

2.21.2. Postupci za izvanredno stanje u mikrobiološkim labaratorijima

- Povrede nastale ubodom, posjekotine i ogrebotine

Osobi koja je izložena djelovanju, odstrani zaštitnu odjeću, oprati ruke i svaki izloženi dio, uz korištenje odgovaraujćeg dezinfekcijskog sredstva za kižu, i potraži medicinsku pomoć ako je to potrebno. Uzrok povrede i organizme koji su uključeni prijaviti. Čuvati odgovarajuća kompletna medicinska izvješća.

- Unošenje u organizam potencijalno infektivnih tvari

Zaštitnu odeću ukloniti i potražiti medicinsku pomoć. Prijaviti identifikaciju unešenih tvari u organizam i okolnosti incidenta, i za sve ovo imati odgovarajuću i kompletnu medicinsku dokumentaciju.

- Oslobođenje potencijalno infektivnih aerosola (van biološki sigurnih kabineta)

Sve osobe smjesta napustiti ugroženo područje i svaku od njih podvrgnuti medicinskom pregledu. Odmah informirati odgovornog za laboratorij i službenika zaduženog za biološku sigurnost. Ne ulaziti u prostoriju neko odgovarajuće vrijeme (oko 1h), dok se veće čestice ne slegnu. Ako laboratorij nema centralnu ventilaciju, ulaženje treba odgoditi (oko 24h).Treba postaviti oznake koji ukazuju da je ulaz zabranjen. Poslije odgovarajućeg vremena, nastaviti sa dekontaminacijom koju nadgleda ovlaštena osoba za biološku sigurnost. Nositi odgovarajuću zaštitnu odjeću kao i respiratornu zaštitu.

- Slomljeni kontenjeri i prosute infektivne tvari

Slomljeni kontejneri, kontaminirani infektivnim tvari i prosute tvari prekriti platnenim ili papirnatim ručnicima, preliti dezinficijensima i ostaviti ih tako neko odgovarajuće vrijeme. Ručnicii od papira ili tkanine kao i slomljeni predmeti očistiti, a komadiće stakla ukloniti pincetom. Kontaminirano *područje obrisati dezinfincijensom. Ako se koriste lopatice za čišćenje slomljenih predmeta,* sterilizirati ih ili ostaviti u dezinficijensu. Tkanine, papirne ručnike koji se koriste za čišćenje odložiti u kontejner za kontaminirani otpad. Tijekom svih ovih postupaka nositi zaštitne rukavice. Ako su laboratorijski obrasci ili drugi papirnati pisani

materijali kontaminirani, informacije prepisati u drugi obrazac, a originale baciti u kontejner za kontaminirani otpad.

- Lom epruveta koje sadrže potencijalno infektivne tvari u centrifugama koje nemaju posude sa hermetičkim zatvaranjem

Ako se dogodi ili se sumnja na lomljenje epruveta dok stroj radi, isključiti motor i ostaviti uređaj zatvoren (oko 30min) da se omogući taloženje. Ako je otkrivena lomljava po zaustavljanju rada stroja, poklopac odmah zatvoriti i tako ga ostaviti (na pr. oko 30 min). U oba slučaja informirati odgovornog za biološku sigurnost. Za sve slijedeće postupke nositi jake rukavice (od debele gume), presvučene odgovarajućim rukavicama za jednokratnu uporabu, ako je neophodno. Pinceta ili pamučna vata koriste se za sakupljanje komadića stakla. Sve slomljene epruvete, fragmente stakla, posude, stalci i rotor potapaju se u dezinficijens koji djeluje protiv organizama o kojima je riječ. Cijele, zatvorene epruvete ostavljaju se u dezinficijensu u odvojenim kontejnerima. Bubanj obrisati istim dezifincijensom, u odgovarajućoj otopini, a onda ponovo obrisati, oprati vodom i osušiti. Sve materijale upotrijebljene u čišćenju tretirati kao infektivni materijal.

- Lomljenje epruveta unutar hermetički zatvorenih posuda (sigurnosne posude)

Sve hemretički zatvorene posude za centrifugu puniti i prazniti u biološki sigurnim kabinetima. Ako se sumnja na lomljavu unutar zaštitne posudice, treba je olabaviti, a posudu sterilizirati. Druga mogućnost je da se zaštitna posudica kemijski dezinficira.

- Požar i prirodne nepogode

U razvojne planove za pripravnost u slučaju nesreće uključiti vatrogasne i druge službe . Unaprijed moraju znati koje prostorije sadrže potencijalno infektivne tvari. Poslije prirodne nepogode, lokalne i nacionalne hitne službe upozoravaju se za slučaj potencijalnih opasnosti unutar i/ ili oko laboratorijskih zgrada. U laboratorij se ulazi u prisustvu obučenog laboratorijskog radnika. Infektivne tvari sakupljaju se u nepropusne kutije ili jače vreće za jednokratnu uporabu. Uklanjanje ili krajnje odlaganje određuje osoba za biološku sigurnost u skladu s pravilnicima.

- Hitne službe: kome se obratiti

Brojevi telefona i adrese izložiti na vidnom mjestu u objektu:

1. Institucija ili sam laboratorij.
2. Voditelj institucije ili laboratorija.
3. voditelj laboratorija.
4. Službenik za biološku sigurnost.
5. Vatrogasna služba.
6. Bolnice/ hitne službe/medicinsko osoblje (imena klinika, odjela i/ ili medicinskog osoblja ako je moguće).
7. Policija.
8. Medicinski radnik.
9. Odgovorni tehničar.
10. Vodovod, plin i elektrodistribucija.

- Oprema za vanredne situacije

1. Komplet za prvu pomoć, koji uključuje univerzalne i specijalne protuotrove.
2. Odgovarajući protupožarni aparati, deke za gašenje požara. Ako je potrebno i kompletna zaštitna odjeća (jednodjelni kombinezoni, rukavice i pokrivači.
3. Zaštitne maske za lice s respiratorima sa odgovarajućim kemijskim i posebnim filterskim spremnicima.
4. Aparatura za dezinfekciju prostorija, tj. sprejevi i formaldehidni raspršivači.
5. Nosila, alati, čekići, sjekire, kompleti ključeva za zavrtnje, odvrtači, ljestve, užad.
6. Oprema za demarkaciju i označavanje opasnosti.

(World health organization - Priručnik za biološku bezbednost u laboratoriji, Treće izdanje deo IV st. 65-98., Geneva 2004.)

2.22. Dezinfekcija i sterilizacija

Osnovno znanje o dezinfekciji i sterilizaciji je od krucijalne važnosti za biološku sigurnost u laboratoriju. Prljavi predmeti ne mogu biti brzo dezinficirani ili sterilizirani važno je razumjeti osnove čišćenja prije dezinfekcije. Slijedeći opći principi primenjuju se na sve poznate klase mikrobioloških patogena. Zahtjevi za specifičnom dekonataminacijom ovisi od vrste eksperimentalnog rada i prirode infektivnh agenasa s kojima se rukuje. Dezinficijensi su

specifični za svaki materijal i proizvođača. Sve preporuke za uporabu dezinficijenasa tražiti u uputama proizvođača.

2.22.1. Sterilizacije

Za uzgaj mikroorganizama neophodna je specijalna priprema kako posuđa, tako i odgovarajućih hranjivih podloga na kojima se mikroorganizmi mogu izdvojiti ili umnožavati. Poznato je da mikroorganizmi naseljavaju svaku prirodnu sredinu i sve predmete oko nas. Veliki broj mikroorganizama nalazi se u zraku. Zbog toga, posuđe i sav materijal pri uzgoju mikroorganizama mora biti ne samo kemijski čisti, već i bez mikroorganizama. Ovo se postiže specijalnim mikrobiološkim metodama.

Sterilizacija je postupak pri kojem se potpuno uništavaju ili odstranjuju sporogeni i vegetativni oblici mikroorganizama u određenoj sredini. Sterilizacija ne smije oštetiti predmete koji se steriliziraju niti utjecati na njihova svojstva. Postoji više vrsta sterilizacija: fizička, kemijska, mehanička (filtriranje) i sterilizacija zračenjem (ultraljubičaste i ionizacijske zrake).

2.22.1.1. Fizička steralizacija – se najviše upotrebljava, a može biti: suha i vlažna

a) Sterilizacija suhom toplinom uključuje:

- **spaljivanje** (koristi se za predmete koji nemaju veliku vrijednost kao npr. papir, zavojni materijal i dr.)
- **žarenje** (predmeti se direktno izlažu djelovanju plamena do usijanja, npr. bakteriološke eze)
- **opaljivanje** (nije siguran način za ubijanje mikroorganizama, primjenjuje se npr. pri radu u mikrobiološkim laboratorijima za opaljivanje ruba epruveta i sl.)
- **-topli zrak** (ubijanje bakterija na predmetima od stakla, metala, porculana. Vrućim zrakom se mogu sterilizirati praškasti proizvodi, bezvodna ulja, razna sredstva za mazanje i sl.

Aparati u kojima se vrši ova sterilizacija nazivaju se **suhi sterilizatori**- **Pasterove peći.** Predmeti koji se steriliziraju moraju biti čisti, bez ikakvih primjesa, organskih tvari i bilo kakvih nečistoća i sa što je moguće manjim brojem prisutnih mikroorganizama.

Predmeti moraju biti suhi, jer prisustvo vlage produžava vrijeme zagrijavanja. Stakleni predmeti se uvijaju u aluminijsku foliju ili stavljaju u aluminijske posude ili kasete. Stakleno

posuđe se sterilizira na temperaturi od 160-180^{0}C u trajanju 1,5 do 2 h. Male količine praškastih, glicerola, ulja se steriliziraju na 160^{0}C u toku 2,5 h.

b) Sterilizacija vlažnom toplinom:

Vlažna toplina je efikasnija, brža i jednostavnija, a izvodi se u specijalnim aparatima pomoću vodene pare. Temperatura vode može biti različita, što ovisi o atmosferskog tlaku.

- Vlažna sterilizacija sa povišenim atmosferskim tlakom:

Aparat za ovu sterilizaciju se naziva **autoclav** (Slika4) i neophodan je u mikrobiološkoj praksi



Slika 4. Sterilizacija zasićenom vodenom parom

Autoclaving

https://www.google.hr/search?q=sterilizacija+zasi%C4%87enom+vodenom+parom+autoclaving&hl=hr&gbv=2&prmd=ivns&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=uwLaVIriHsPxavLIgKgB&ved=0CAUQ_AU (2014.)

Autoclav je visokotlačni sterilizator unutar kojeg se vrši sterilizacija

- Zasićena para pod tlakom (autoclaving) je najefikasnije i najstabilnije sredstvo sterilizacije laboratorijskih predmeta. U većini primjena, slijedeći ciklusi osiguraće sterilizaciju pravilno napunjenih autoklava:
- 1. 3 min držati na 134°C
- 2. 10 min držati na 126°C
- 3. 15 min držati na 121°C
- 4. 25 min držati na 115°C

Autoklav ima široku primjenu jer se uz medicinski čelik mogu sterilizirati i instrumenti i predmeti od određenih vrsta gume i plastike, te se često koristi i za sterilizaciju medicinskog otpada prije odlaganja u standardni otpad i sterilizaciju tkanine (bolnička posteljina i sl.).

Provjeravanje ispravnosti autoklava

Instrumenti koji se steriliziraju u autoklavu se prije sterilizacije pakiraju u polupropusne folije za sterilizaciju u autoklavu koje na sebi imaju kontrolni indikator koji nakon sterilizacije mora promijeniti boju, također postoji i samoljepljiva indikator traka za kontrolu sterilizacije. Indikator je prije sterilizacije ružičaste boje a nakon sterilizacije ukoliko je autoklav ispravan mora promijeniti boju u tamno smeđu. Uz svakodnevnu kontrolu sterilizacije pomoću indikatora na folijama i indikator traka, ispravnost autoklava je periodički potrebno provjeriti sporama za provjeru valjanosti sterilizacije koje se izdaju na zavodu za javno zdravstvo. Spore se steriliziraju i nakon sterilizacije se šalju u laboratorij zavoda za javno zdravstvo na analizu, ukoliko je sterilizacija bila uspješna zavod za javno zdravstvo vam izdaje potvrdu o ispravnosti autoklava.

Punjenje autoklava

Predmete ne treba pakovati gusto u komori koja ima sistem lakog ulaska pare i uklanjanja zraka. Vreće trebaju omogućiti da para stigne do njihovog sadržaja.

Mjere za uporabu autoklava

Sljedeća pravila mogu minimizirati opasnosti u rukovanju posuda pod tlakom:

1. Za odgovornost rukovanja i rutinskog održavanja odrediti obučeno osoblje.
2. U preventivni program održavanja uključiti redovnu inspekciju prostorije, inspekciju žiga vrata i sve mjere kontrole koje provodi kvalificirano osoblje.
3. Para treba biti zasićena i oslobođena kemikalija (na pr. korozivni inhibitori) koje mogu kontaminirati predmete koji se sterliziraju.
4. Svi predmeti moraju biti sterilizirani u kontejnerima koji dozvoljavaju neprosredno odstranjivanje zraka i dobar prodor topline; komoru ne prenatrpati tako da para može doprijeti u sve dijelove.
5. Za autoklave bez uređaja za sigurnosnim samozaključavanjem, koje sprečava otvaranje vrata kada je komora pod tlakom, prije nego se otvore vrata zatvoriti glavni vetil za paru i tako dozvoliti da temperatura padne ispod 80°C.
6. Podešavanje laganog ispuhavanja korisiti prilikom sterilizacije tekućine, pošto se one mogu preliti kada se uklone uslijed velikog zagrijavanja.
7. Laboranti nose odgovarajuće rukavice i vizire za zaštitu pri otvaranju autoklava, čak i kad temperatura padne ispod 80°C.
8. Prilikom rutinskog promatranja rada autoklava, biološki indikatori ili termoparovi se moraju postaviti u centru svakog punjenja. Za određivanje odgovarajućih radnih ciklusa, pri najgorim slučajevima sterilizacije, poželjno je stalno praćenje termoparovima i uređajima za snimanje.
9. Odvodni filtri (mrežice) komore skidati i čistiti svakodnevno.
10. Voditi računa da se ispusni ventili lonca pod tlakom autoklava ne začepe papirom i sl. u punjenju.

(World health organization: Priručnik za biološku bezbednost u laboratoriji, Treće izdanje deo IV st. 65-98. Geneva 2004.)

Vlažna sterilizacija pomoću pare bez tlaka:

Obavlja se u specijalnom aparatu koji se zove **Kohov lonac**. To je u stvari pasterizacija, jer temperatura ne prelazi 100^0C i traje 30-60 minuta. Postupak koji se koristi za uništavanje patogenih i uvjetno patogenih mikroorganizama sa naglaskom na Mycobacterium tuberculosis (izazivač tuberkoloze) naziva se pasterizacija. Ona se može izvoditi na dva načina:

- kao spora - koristi se temperatura od 62^0C u trajanju od 30 minuta.

- kao brza - koristi se temperatura od 72^0C u trajanju od 15 sekundi

Vlažna sterilizacija bez tlaka koristi se za podloge i materijala koj su osjetljivi prema visokim temperaturama (složeni proteini, šećeri i dr.) Ovim načinom sterilizacije ne uništavaju se spore, već samo vegetativni oblici - dijelovi stanica. Za uništavanje spora, ova sterilizacija – pasterizacija se izvodi sukcesivno u tri navrata u tri dana. Poslije prve pasterizacije u trajanju 24 sata isklija najveći broj spora, koje će uginuti u tijeku druge pasterizacije. Trećom pasterizacijom se postiže potpuna sterilizacija materijala. Ova vrsta sterilizacije se zove tindalizacija.

Tindalizacija se koristi kod seruma i dr. tvari koje u sastavu imaju proteine koje se ne smiju sterilizirati na temperaturama višim od 60^0C. U pasterizaciji ili sterilizaciji tvari osjetljivih prema visokim temperaturama koriste se bakteriološka vodena kupelj sa termoregulatorom. Ona može biti različitog oblika i veličine. Zagrijavaju se plinom ili električnom strujom. U njima se steriliziraju tvari osjetljive prema visokoj temperaturi kao što su: krvni serum, vitamini, i dr. Sterilizacija u bakteriološkim vodenim kupeljima se izvodi obično pri temperaturi od 56-58^0C u trajanju 12 sati. Zagrijavanjem se uništavaju vegetativni oblici bakterija. Za potpunu sterilizaciju (uništavanje spora) zagrijavanje se obavlja u trajanju tri dana na ovoj temperaturi.

2.22.1.2. Kemijska sterilizacija

Za sterilizaciju mikrobiološkog posuđa, metalnih predmeta, laboratorijskih stolova na kojima se mikroskopira, podova i dr. mogu poslužiti razna kemijska sredstva koja djeluju baktericidno, čak i u slabim koncentracijama. U ovu svrhu se koriste: alkoholni rastvori joda, živin-klorid, karbolna kiselina (fenol), srebrni-nitrat, vodikov-peroksid.
Navedene kemijske tvari se upotrebljavaju kao dezinfekcijska sredstva.

2.22.1.3. Sterilizacija zračenjem

Danas se vrlo često za sterilizaciju koriste zrake kratkih valnih duljina.

a) Prvi su našli primjenu ultraljubičasti zrake. Najčešće se kao izvor ultraljubičaste svjetlosti koriste živine lampe specijalne izrade, čije zrake imaju valnu duljinu od 250-300μm. Svjetlost ovih lampi se neposredno upravlja na predmet. Zračenjem se često sterilizira prostorije, boksevi za nacjepljivanje, bakteriološko posude i dr. Na ovom principu su izrađene aseptične komore. Ove zrake ubijaju mikroorganizme na taj način, što ih protoplazma apsorbira, zbog čega dolazi do denaturacije nekih bjelančevina. Međutim, djelovanje ove svjetlosti je ograničeno samo na površinske slojeve predmeta i atmosfere, te je stoga ova vrsta sterilizacije isključivo površinska. UV zrake djeluju baktericidno na mikroorganizme

posebno sunčeva svjetlost koja ima izuzetno djelovanje na uzročnike tuberkoloze (Mycobacterium tuberculosis).

b) Lonizacijske zrake bilo da se radi o alfa, gama ili protonskim stanicama imaju osobinu da ubijaju mikroorganizme. Ova sterilizacija se upotrebljava u medicini, farmaciji i prehrambenoj industriji. Na ovaj način se steriliziraju medicinski instrumenti, pribor, vata, lijekovi i antibiotici, veliki broj hranljivih proizvoda koji se mijenjaju na višim temperaturama. Ovi ionizacijske zrake, za razliku od ultraljubičastih, ne djeluju samo površinski nego i dubinski.

2.22.1.4. Mehanička sterilizacija (Sterilizacija bakteriološkom filtracijom)

Sastoji se u tome što se podloga, koja služi za razvoj mikroorganizama filtrira kroz specijalne filtre, koji imaju manje pora nego što je veličina mikroorganizama, pa hranjive otopine prolaze, a mikroorganizmi ostaju na filtru. Ovi bakteriološki filtri su obično u obliku šupljih svijeća. (Šamberlanovi filtri, Borkfeldovi filtri, Zajcovi filtri) U novije vrijeme se upotrebljavaju i membranski filtri.(Ovi filtri mogu biti sa veoma sitnim porama, te mogu zadržati viruse, čak i molekule proteina.)

Kroz sve ove filtre, hranjive otopine koji će služiti za razvoj mikroorganizama, filtriraju se pod visokim tlakom ili u vakuumu.
Ovaj način sterilizacije se naročito upotrebljava za sterilizaciju hranjivih podloga-otopina, koje sadrže šećere, vitamine, i druge tvari koje se na temperaturi mijenjaju.

2.23. Metode nacjepljivanja

U mikrobiološkoj tehnici rada određenim postupcima vrši se nacjepljivanje hranjivih podloga i precjepljivanje. Nacjepljivanje je aseptično prenošenje mikroorganizama iz prirodne ili umjetne sredine na hranjivu podlogu. Precjepljivanje je prenošenje mikroorganizama sa jedne podloge na kojoj su bili nacijepljeni i na kojoj su se razvili, na drugu svježu i sterilnu podlogu. I jedan i drugi postupak se izvodi pomoću bakteriološke igle, bakteriološke petlje i pipete u strogo sterilnim uvjetima.

U razvijenim mikrobiološkim laboratorijima nacjepljivanje mikroorganizama se poklanja velika pažnja. Za ovaj posao se opremaju posebne prostorije sa UV lampama sa kojima se

prije nacjepljivanja vrši zračenje prostorija (zračna sterilizacija) kako bi u zraku bilo što manje mikroorganizama. Ukoliko ne postoje posebne prostorije i komore, za nacjepljivanje se može koristi i laboratorij. Radno mjesto se prije nacjepljivanja obriše dezinfekcijskim sredstvom npr. alkohol.

Da bi se izbjeglo strujanje zraka zatvoriti vrata i prozore laboratorija. Zabranjeno je pričanje i kretanje u laboratoriju. Postupak nacjepljivanja se izvodi u blizini plamena petrolejske lampe pažljivo i brzo. Otvori posuđa i zapušači se prije i poslije nacjepljivanja obavezno spale na plamenu. Zapušači se nikada ne stavljaju na stol, već se drže desnom rukom između malog i domalog prsta, srednjeg i domalog prsta, dlana i malog prsta i slično.

Dio zapušača koji ulaze u epruvetu ili drugo posuđe ne smije se dodirivati rukom i drugim nesterilizirani predmetima. Posuđe sa kulturom ili sterilnom podlogom ne smije se držati otvoreno. Otvara se samo za vrijeme nacjepljivanja i u blizini plamena. Bakteriološka petlja ili igla se obavezno spali na plamenu prije i poslije nacjepljivanja.

2.23.1. Nacjepljivanje tekućih podloga

a) Ako se kultura nalazi u tekućoj podlozi, dobro se promješa, a onda bakteriološkom petljom ili pipetom izuzima materijal i prenosi u sterilnu tekuću podlogu. (1 kap ili par ml.).

b) Ako se kultura mikroorganizama nalazi na čvrstoj podlozi, bakteriološkom petljom se izuzima i prenosi u tekuću podlogu i dobro promješa kako bi se mikroorganizmi u tekućini ravnomjerno rasporedili.

2.23.2. Nacjepljivanje čvrstih podloga

Čvrste hranjive podloge se mogu nacijepljivati kada su u čvrstom i rastaljenom stanju.

a) U čvrstom stanju se nacjepljuju po dubini i površini

- Nacijepljivanje čvrstih podloga po dubini se vrši bakteriološkom iglom, kojom se izuzima kultura i ubodom unese do dna podloge. Pri unošenju kulture epruvete u koju se unosi kultura se drži uspravno sa otvorom okrenutim na dolje.
- Površinsko nacijepljivanje se vrši na: kosoj površini (kosi agar) i ravnoj površini (agar razliven u Petrijevu zdjelicu).

Na kosoj površini vrši se nacjepljivanje u epruvetama u kojima je čvrsta hranjiva podloga iskošena-kosi agar. Postupak se izvodi bakteriološkom petljom sa kojom se pod sterilnim uvjetima unosi mala količina kulture do dna kose površine agara, a zatim vijugavim izvlačenjem petlje po površini agara izvrši nacjepljivanje.

Ravna površina agara se nacjepljuje na isti način kao i kosi agar. Kultura se nanosi bakteriološkom petljom ili pipetom. Petljom se kultura povlači po površini agara. Pipetom se nanosi tekuća kultura na površinu agara, a potom se savijenim staklenim štapićem ravnomjerno raširi po površini agara.

b) nacjepljivanje rastaljenih čvrstih podloga

Vrši se tako što se podloga u epruvetama (duboki agar) najprije rastali zagrijavanjem u vodenoj kupelji, a zatim ohladi do 45^0C.

Tekuća kultura se u određenoj količini izuzima sterilnom pipetom (0,1 i 1 ml) i uliva u praznu sterilnu Petrijevu zdjelicu, a potom ulije rastopljeni agar. Kultura se sa agarom ravnomjerno izmješa i ostavi da se stisne. Nacjepljena hranjiva podloga stavlja se u aparate za uzgoj mikroorganizama sa stalnom optimalnom temperaturom koja osigurava nesmetan razvoj nacjepljenih mikroorganizama.

2.24. Metode za izuzimanje kultura

Kultura se radi izuzimanja i proučavanja određenog izolata, precjepljuje na sterilnu, čvrstu podlogu u Petrijevu zdjelicu. U Petrijevu zdjelicu otvorenu samo koliko je to neophodno, na podlogu okrenutu naniže, pomoću eze ili igle se nanose spore ili djelići agara sa micelijom stare kulture. Na taj način podloga se maksimalno osigurava od zagađenja sa strane. Isto tako se pod aseptičnim uvjetima nacijepljuju kulture na kosi agar u epruvete. Nakon inkubacije u termostatu na određenoj temperaturi i za određeno vrijeme može se vršiti opis makroskopskih odlika kolonija pljesni. Pod tim se podrazumjeva:

1. promjer kolonije (ako nije okrugla mjeri se više promjera).
2. opis kolonije (dobro ili slabo razvijena na određenoj podlozi, micelija obilna ili oskudna, paučinasta, vunasta, pamučasta, baršunasta, gomuljičasta, radijalno ili koncentrično naborana.
3. odlike ruba kolonije (neprekidan ili razgranat, razuđen, ravan ili ispupčen).
4. boja (postoje skale za određivanje nijansi boja).
5. plodonosna tijela (prisutnost ili odsutnost, tvorevine za razmnožavanje koje dominiraju).
6. miris (prijatan, miris na plijesanj, na fermentaciju jabuka i sl).
7. naličje kolonije (pigment koji plijesni ispušta u podlogu) i dr.

Jednom dobivene čiste kulture, prenose se u epruvete u kojima se nalazi kosi agar sa odgovarajućim hranjivim sastavom. Kada su kulture na kosom agaru dovoljno porasle, slojem parafina zaštititi zapušače, ili cijelu epruveta uviti nepropusnim folijama, i nakon strogog etiketiranja epruvete čuvati u hladnjaku. Postupak ima za cilj održati organizam u latentnom stanju života. Isti se cilj može dobiti pokrivanjem rasta u epruveti parafinskim ili drugim uljima, koji spriječavaju disanje plijesni. Kod drugih metoda upotrebljavaju se male ampule u koje se prenose spore date plijesni, nakon čega se one zatvaraju vakumom. Metode liofolizacije se često upotrebljavaju za održavanje mikotoksičnih organizama. (liofilizacija- sušenje materijala osjetljivog na toplinu- smrzavanjem).

2.25. Mikroskopiranje

2.25.1. Rad mikroskopa i dijelovi mikroskopa

Mikroskop (grč. mikros=sitan, skopeo=gledam) - instrument je koji se upotrebljava za promatranje objekata kao npr. mikroorganizama koji su presitni da bi se mogli vidjeti golim okom. Prilikom mikroskopiranja veliki broj mikroorganizama postaje vidljiv, drugačiji i skladnih oblika, a ostali se pokazuju kao mali objekti sa slabo izraženim oblicima. Stupanj povećanja za promatranje mikroorganizama odabire se ovisno od njihove veličine. Mikroskopi koji se danas upotrebljavaju bitno se razlikuju od prvog: Antony van Leeuwenhoekova mikroskopa iz 1674. godine.

U osnovi, razlikujemo dva tipa mikroskopa:

1) Svjetlosni (optički) mikroskop
2) Elektronski mikroskop

Svjetlosni mikroskopi (optički) mogu biti: mikroskopi sa svijetlim vidnim poljem, sa tamnim vidnim poljem, flourescentni i fazno-kontrasni instrumenti.

Elektronski mikroskopi mogu biti: transmisijski i pretražni elektronski mikroskopi.

Bakterije, plijesni, alge i protozoe mogu se promatrati svjetlosnim mikroskopom, koji za osvjetljenje uzoraka upotrebljava vidljivi dio spektra.

Manji mikroorganizmi, kao što su virusi ili unutranja struktura mikrobnih stanica zahtjevaju primjenu mnogo savršenijih elektronskih mikroskopa, kod kojih se kao izvor svjetlosti upotrebljavaju elektroni za otkrivanje fine strukture uzoraka.

2.25.2. Svjetlosni mikroskop

Leeuwenhoekovi prvi mikroskopi bili su vrlo jednostavni jer su bili napravljeni samo sa jednim staklom-slično povećalu. **Složeni mikroskop** se sastoji od najmanje dvaju sistema stakala:

a) **Objektiva** - koji povećava uzorak,
b) **Okulara** - koji povećava sliku koja je dobivena u objektivu.

Kao izvor svjetlosti u složenom mikroskopu koristi se vidljivi dio spektra. Ukupno povećanje mikroskopom se dobije tako što se povećanje objektiva pomnoži sa povećanjem okulara. U optimalnim uvjetima, maksimalno povećanje svjetlosnim mikroskopom je u rasponu od 1000 do 2000 puta.



Slika 5. Svjetlosni mikroskop
(https://www.google.hr/search?q=svjetlosni+mikroskop&hl=hr&gbv=2&tbm=isch&oq=&gs_l, 2014.)

Rad sa svjetlosnim mikroskopom

Osnova rutinskog rada u mikroskopiji je savršena čistoća stakala okulara i objektiva. To se najčešće postiže brisanjem stakala lanenom krpom natopljenom ksilenom (ne etanolom, jer on otapa vezivo između stakla i njenog ležišta).

Ako mikroskop sadrži zrcalo tada njegovu ravnu stranu koristimo kada mikroskopiramo slabim objektivima (10x, npr.), a udubljenu stranu kada mikroskopiramo sa srednjim povećanjem
(40x, npr). Neki novi tipovi mikroskopa nemaju zrcalo jer im se izvor svjetla nalazi u podlozi.
Postupak mikroskopiranja:

- Gledajući, ne u okular, nego u zrcalo kondenzatora, pomiče se zrcalo (ako ga ima) u svim smjerovima, dok se u sredini stakla ne pojavi svijetla točka. To je dokaz da je vidno polje dobro osvijetljeno. Kondenzator je pri tome u gornjem položaju. Potom se u ležište okulara stavi pripadni okular (10x, ili 15x), a iris-zaslon se najviše otvori.
- Načinjeni preparat se stavi i učvrsti na stoliću mikroskopa, a na revoleru se zakretanjem namjesti prema preparatu najslabiji objektiv.
- Pomoću makrovijka, a gledajući ne u okular, nego sa strane u frontalno staklo objektiva, spušta se tubus dok staklo gotovo ne dodirne preparat.
- Sada se, gledajući u okular, makrovijkom podiže tubus dok se u vidnom polju ne pojavi slika preparata.
- Slika se potom izoštrava mikrovijkom.
- Podigne se zatim tubus mikroskopa , promijeni se na revolveru objektiv i istim postupkom mikroskopira sa većim povećanjem.
- Ako se radi sa ma kojim obojenim preparatima, ili neobojenim (nativnim) preparatima kultura bakterija, tada se na obojeni preparat, odnosno na pokrovicu nativnog preparata bakterijske kulture stavlja kap imerzijske tekućine (anisol ili kedrovo ulje), da bi se izbjegao lom zraka svjetlosti na granici dvaju sredstva različite optičke gustoće. U toku mikroskopiranja se upotrebljava najjači objektiv (90x ili 100x povećanja).

2.25.3. Elektronski mikroskop

Rad s elektronskim mikroskopom

Elektronski mikroskop umjesto svjetlosnih zraka koristi elektronski mlaz. Elektroni imaju puno manju valnu duljinu nego svjetlost, pa se pomoću njih može postići mnogo veće uvećanje. Kao i optički mikroskop, elektronski sadrži leće u okularu (projektoru) i objektivu, te kondenzor. Leće su snažni elektromagneti ili elektrode koje sliku stvaraju koristeći se elektronskim mlazom što prolazi kroz preparat. Projektor nastalu sliku prikazuje na ekranu.



Slika 6. Elektronski mikroskop

(https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=eleelektronski+mikroskop&gbv=2&oq=eleelektronski+mikroskop&gs_l=heirloom-hp.12...5967.18606.0.21316.23.12.1.10.0.0.186.1107.9j3.12.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..12.11.995.9EuUHwBnK90, 2014.)

2.26. Bojanje mikroorganizama

Mikroorganizmi se po svojoj građi veoma razlikuju, kako međusobno, tako i od stanica viših organizama. Mikroskopsko istraživanje živih stanica svjetlosnim mikroskopom je ograničeno na opažanje oblika, veličina i rasporeda stanica. Pošto je najveći broj mikroorganizama gotovo bezbojan, često ih moramo bojati da bi ih mogli istraživati standardnim svjetlosnim mikroskopom.

U obojanim preparatima fiksiranih stanica omogućeno je njihovo bolje promatranje, opažanje unutarnjih stanica sastojaka (npr. stanični zid, spora) i u velikom broju slučajeva, razlikovanje mikroorganizama.

2.26.1. Boje i bojanje mikroorganizama

U proučavanju građe stanica mnogih mikroorganizama koriste se specijalne metode bojanja: citokemijske metode, koje imaju dijagnostički karakter i omogućavaju da se izdiferencira prisutnost određenih stanica organela ili inkluzija, na osnovu njihovog kemijskog sastava. Obojani preparati osiguravaju bolje uočavanje i detaljnije izučavanje mikroorganizama, a naročito bakterija koje su veoma sitne i bezbojne. Boje kojima se boje mikroorganizmi nazivaju se mikrobiološke boje i mogu biti: prirodne i umjetne (anilinske).

1. Prirodne boje se nalaze u prirodi odakle se uzimaju, prečišćavaju i koncentriraju.

Od prirodnih boja najznačajnije su: **šafranin, karmin, lakmus**.

2. Umjetne ili anilinske boje su organskog porijekla, dobivaju se umjetnim putem, preradom kamenog ugljena ili smole. U mikrobiološkoj praksi se najčešće koriste ove boje.

Umjetne ili anilinske boje se dijele u tri skupine: **bazične, kisele i neutralne**.

a) Kod **bazičnih boja** nosilac boje je bazični sastojak, uglavnom soli sa amino- grupom. Bazične boje su kationske i imaju pozitivan (+) naboj. Za bojenje bakterija se najčešće koriste bazične boje. Najpoznatije su: bazni fuksin (crven), gancijan-violet, kristal-violet i tianin (ljubičasta), metilensko plavo (plavo), malahitno zelenilo, metilensko zelenilo (zeleno).

b) Kod **kiselih boja** nosilac boje su uglavnom soli sa sulfo- grupom. Kisele boje su anionske i imaju negativan (-) naboj. Ove boje služe za bojenje citoplazmatskog materijala i neke vrste staničnih granula i ostalih srodnih tvari u stanici. Najpoznatije kisele boje su: kiseli fuksin, eozin, eritrozin (crveno), fluorescin, kongo pikrinska kiselina (žuta) i nigrozin (crn).

c) Neutralne boje nastaju reakcijom kiselih i baznih boja. Najpoznatija neutralna boja je neutralno crvenilo.

2.26.2. Priprema otopine boja

Boje se u trgovini nalaze u čvrstom stanju (kristalnom ili amorfnom) ili u otopinama. Najbolja je priprema svježih otopina boja. Vodene otopine anilinskih boja (u 100 ml. vode se otopi 1-2 g. boje kristalne ili amorfne), su nepostojani, bojanje je sporo i ne boje se svi mikroorganizmi. Da se pospješili bojenje stanica mikroorganizama, boje se iz kristalnog oblika otapaju u 96% etanol i tako se dobiju njihove zasićene otopine (10-25%). Od takvih otopina se pripremaju boje kao 1%- tne vodene ili etanolne otopine.

2.26.3. Priprema fiksiranih preparata

Fiksiranje preparata je veoma složen postupak u bojanju preparata. Cilj fiksiranja je da materijal prione za pločicu i da se na taj način izbjegne njegovo skidanje pri bojanju i ispiranju, da se ubiju mikroorganizmi i tako postanu sigurni pri daljem radu. Za fiksiranje preparata se koriste **fizičke i kemijske tvari**.

Fizičko fiksiranje je na plamenu i u suhom sterilizatoru.

Kemijska fiksiranje je uporabom apsolutnog alkohola, acetona, metil-alkohola i dr.

2.26.4. Štavljenje i štavila

Kod nekih metoda je neophodno prethodno pripremiti stanicu kako bi primila boju. Za ovu pripremu se koriste različita štavila. To su tvari koje same direktno ne sudjeluju u bojanju, ali ga potpomažu. Ove kemijske tvari povećavaju intenzitet boje, pripremaju supstrat da lakše primi boju ili djeluju i na jedno i na drugo. To su npr. kromna kiselina, tanin, formaldehid, H_2SO_4, fenol, kloroform i dr.

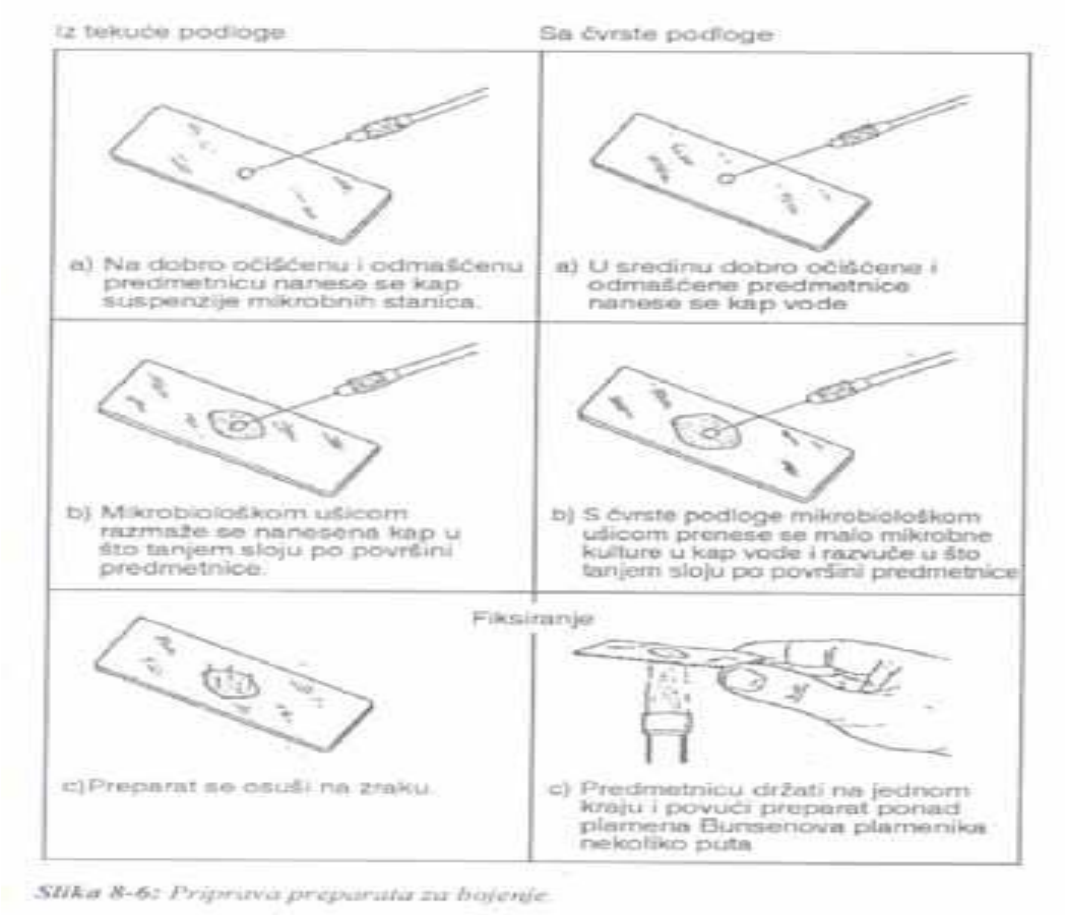
2.26.5. Odbojavanje

Kod nekih vrsta složenih bojenja gdje se primjenjuje više boja, neophodno je poslije primjene prave boje izvršiti odbojavanje stanica, tj. odbojavanje, pa tek onda pristupiti bojanju drugom bojom. Odbojavanje se vrši da bi se razlikovale pojedine vrste bakterija među sobom, a također i radi uočavanja nekih organela. Odbojavanje ovisi često od osobina tj. kemijskog sastava samih bakterija (npr. alkoholrezistentne, acidorezistentne i dr.). Tvari za odbojavanje su različite, ali su uglavnom to tvari koje sa bojom ne daju nove kemijske spojeve npr. voda i alkohol.

2.26.6. Jednostavno bojanje mikroorganizama

Jednostavna bojanja su ona kada se upotrebljavaju samo jedna boja kisele ili bazne reakcije. Za jednostavno bojanje se najčešće koriste: karbol-fuksin, kristal-violet, metilensko plavo i šafranin.

Jednostavno bojanje se upotrebljava kada se žele jasnije vidjeti bakterije pod mikroskopom tj. ako se proučava njihov oblik. Postupkom jednostavnog bojenja nanosi se jedna boja na fiksirani razmaz mikroskopske kulture i boja ostavlja na preparatu nekoliko sekundi do nekoliko minuta. Nakon završene reakcije preparat se opere pod mlazom vode ili odgovarajućeg otapala da se ukloni višak boje iz međustaničnog prostora, posuši filter-papirom i mikroskopira.



Slika 7. Priprava preparata za bojenje

(S. i L. Duraković: Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju, I dio knjiga prva, st.59)

2.26.7. Diferencijalno (složeno) bojanje

Za razliku od jednostavnog bojanja, reakcije u složenom bojanju su različita ovisno od vrste bakterija. Za složena bojenja se upotrebljava dvije ili više boja. One se mogu pomiješati i nanijeti na razmaz istovremeno ili se u postupku bojenja nanose jedna za drugom. Složena bojanja imaju važan dijagnostički značaj u bakteriologiji. Mogu se upotrebljavati za međusobno razlikovanje pojedinih grupa i vrsta bakterija- diferencijalna bojanja. Isto tako se primjenjuju za bojanje određenih vrsta bakterija i njihovu identifikaciju- specijalna bojanja.

Ako se želi detaljnije ispitati građa stanica mikroorganizama koriste se razna složena bojenja. Često se ovim bojanjima dokazuje prisustvo određenih organela ili spojeva u bakterijskoj stanici, uočava građa bakterija, prisustvo sporednih organela (flagela) ili stvaranje spora. Također mogu služiti i za bojanje drugih vrsta mikroorganizama (rikecija, protozoa, gljivica i dr.) ili stanica.

Najvažnija složena bojanja su:

1. Bojanje po Gramu
2. Bojanje acidorezistentnih bakterija(postupak po Ziehel-Neelsenu)

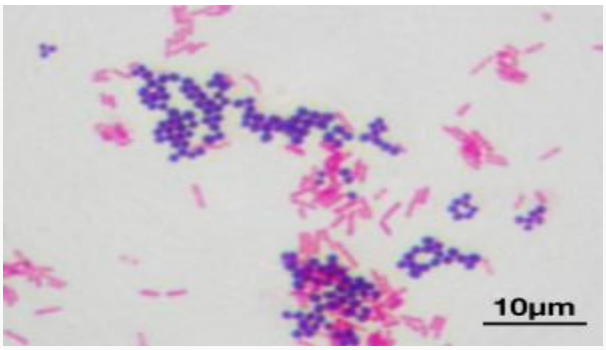
3. Bojanje endospora(postupak po Schaeffer-Fultonu)
4. Bojanje kapsula (čahura) bakterija

2.26.7.1. Bojanje po gramu

Bojanje bakterija po Gramu je dobilo naziv prema danskom fizičaru Cristianu Gramu koji je 1884. godine prvi put uveo ovu složenu metodu bojanja (uporaba više boja). Ovo je jedna od najvažnijih i najpoznatijih složenih metoda bojanja. Ova metoda je poznata i kao diferencijalna, kako se bakterije u ponašaju prema ovom postupku bojenja dijele se u tri skupine:

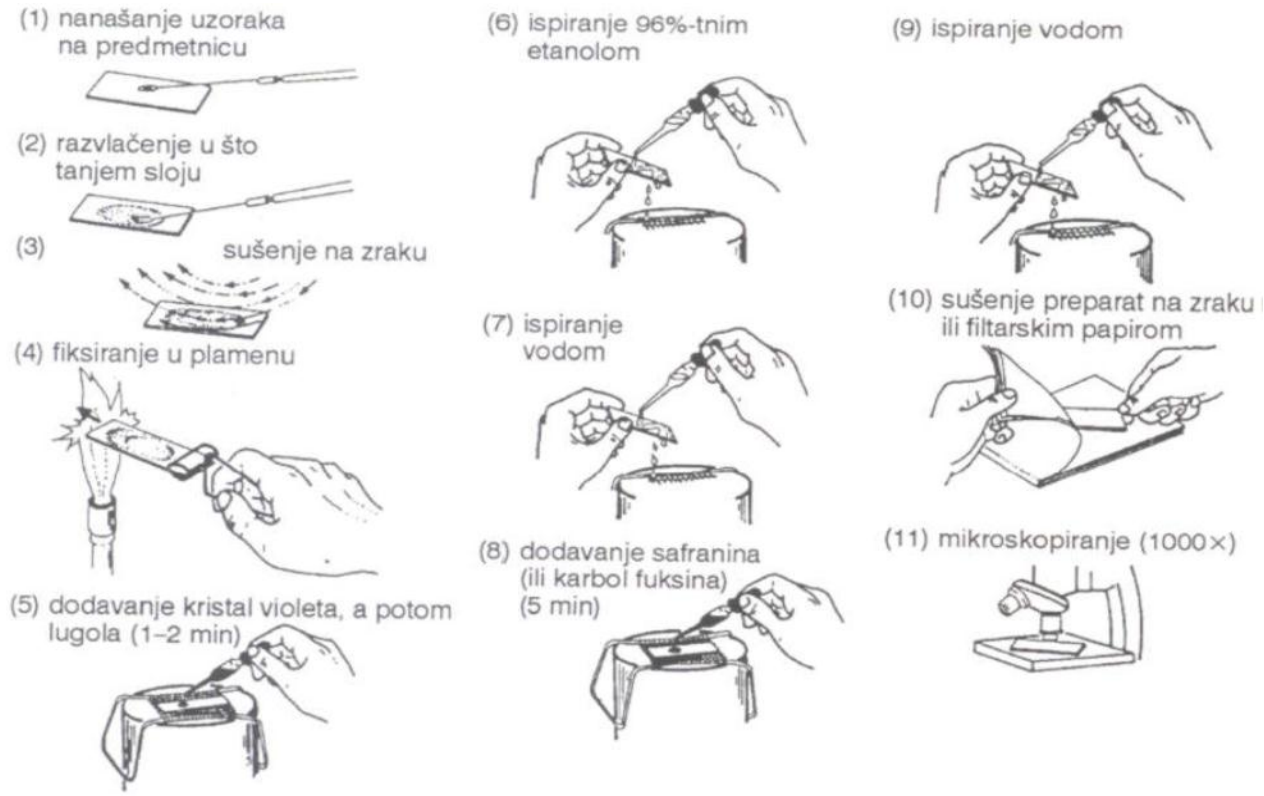
a) Gram pozitivne (G+), koje zadržavaju boju gencijan -violeta pri odbojavanju alkoholom (ljubičasta boja)
b) Gram negativne (G-), koje se odbojavaju alkoholom i poprimaju boju karbol-fuksina (crvena boja)Gram varijabilne ili gram labilne, koje se nekada oboje G+ , a nekad G-
c) ovisno o vanjskim uvjetima.

Između uporabe navedenih boja koristi se Lugol rastvor (otopina joda u kalij-jodidu) i za odbojavanje etil-alkohol.



Slika 8. Preparat gram pozitivnih i gram negativnih bakterija

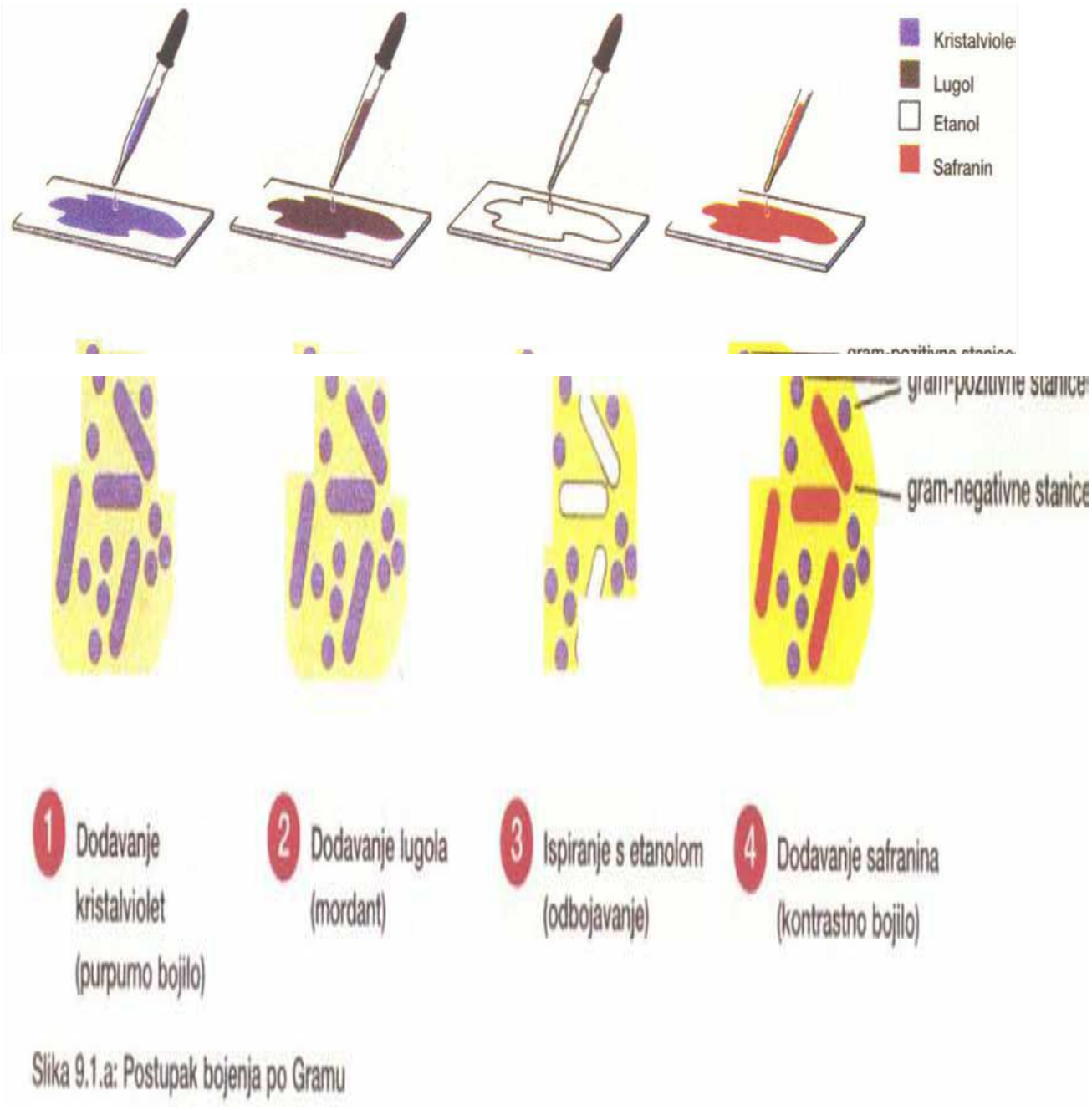
(http://www.google.hr/url?url=http://www.pmf.ac.me/Download.php%3Ffile%3Dskladiste/predmeti/262/4ac5eef841124/4ac5ef4befef5mikro-mikorskop.pdf%26filename%3Dmikro-mikorskop.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=5QjaVKb7OoTkarWjgrAG&ved=0CBIQFjAA&usg=AFQjCNETxmwL_gjL8rRe325QWusnEGGliA, 2014.)



Slika 8-7: Postupak bojenja po Gramu općenito se primjenjuje za razlikovanje velikih skupina bakterija.

Slika 9. Postupak bojanja po Gramu općenito se primjenjuje za razlikovanje velikih skupina bakterija

(S. i L.Duraković: Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju, I dio knjiga prva, 2014.)



Slika 10. Postupak bojanja po Gramu

(S. i L.Duraković:Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju, I dio knjiga prva, 2014)

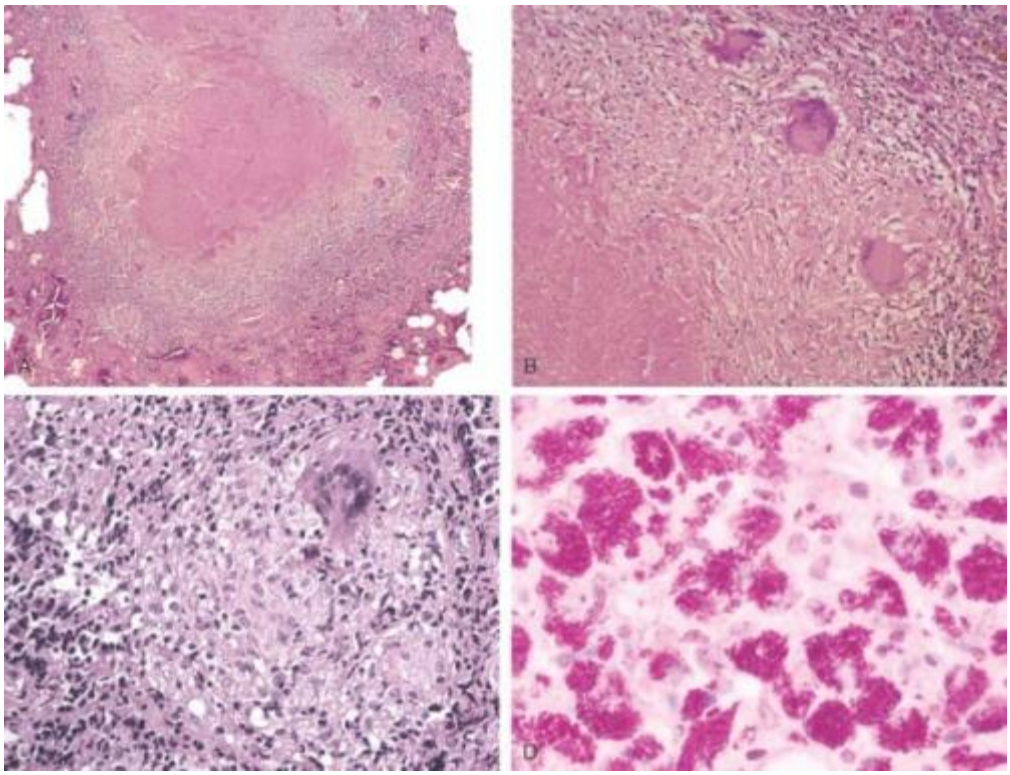
2.26.7.2. Bojanje acidorezistentnih bakterija: Bojanje po Ziehl-Neelsenu

Neke vrste bakterija imaju oko stanica omotač koji se sastoji od fotolipida i voska. Taj omotač ne dopušta prodiranje boje do stanice pa ga prije bojanja treba ukloniti. Najčešće se to provodi bojanjem vrućim bojama, tako da se zagrije preparat na koji je nanijeta boja. Omotač se otopi i boja prodire do mikrobne stanice. Kada se preparat ohladi, voštani omotač se skruti i obavija sada već obojanu stanicu. Zato se pripremljena boja ne može sa stanice ukloniti ni ispiranjem kiselim alkoholom (3% HCl u 96% -tnom etanolu), pa se takve bakterije nazivaju acidorezistentne.

Ovaj postupak bojanja razvio je Paul Ehrlich 1882. godine, a usavršili su ga Ziehl i Neelsen po kojima je i dobio ime. Postupak se obavlja nanošenjem bazične boje karbol-fuksina na fiksirani razmaz bakterijske kulture i zagrijavanjem iznad plamena. Ovim se postupkom oboje sve bakterije u preparatu crveno. Nakon što se preparat ohladi, ispere se kiselim etanolom, pri čemu se odboje sve bakterije, osim acidorezistentnih. Kada se taj preparat oboji kontrasnom bojom metilenskim-plavilom, plavo se oboje one bakterije koje nisu primile karbol-fuksin. Acidorezistentne bakterije, obojene već karbol-fuksinom i ponovo imaju voštani omotač ostat će obojene crvene nakon ispiranja preparata sa vodom.

Najpoznatiji predstavnici acidorezistentnih bakterija su:

- Mycobacterium leprae - uzrokuje bolest lepru.
- Mycobacterium tuberculosis- uzročnik tuberkoloze.
- Mycobacterium avium intracelulare- uzrokuje smrt kod velikog broja oboljelih od side.

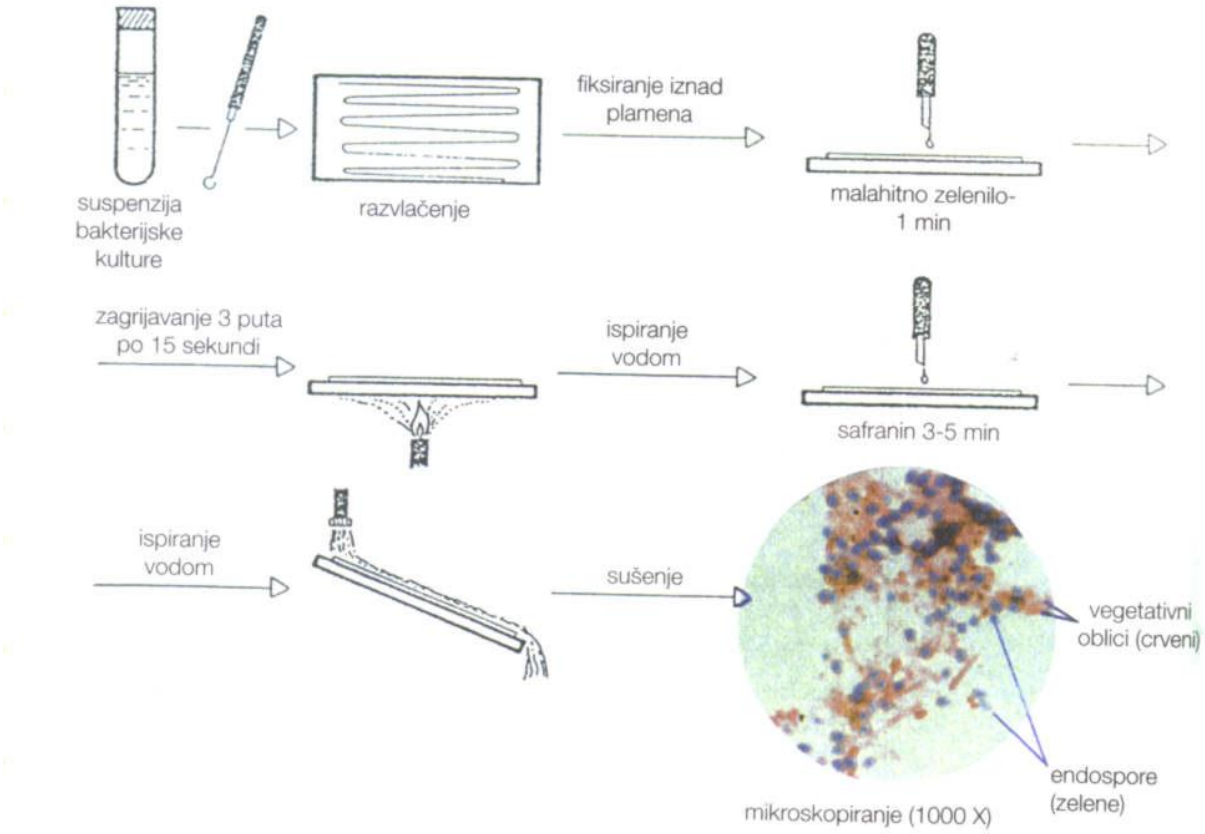


Slika 11. Morfološki spektar tuberkuloze.

Karakteristični tuberkul pri malom povećanju (slika A) i detaljno (slika B) prikazuju centralnu kazeoznu nekrozu okruženu epitelioidnim i multinuklearnim divovskim stanicama. To je obično odgovor koji se vidi kod pacijenata koji su razvili staničnu imunitet na organizam. Ponekad, čak i kod imunokompetentnih osoba, tubekularni granulomi ne moraju imati mjesta centrazlne kazeozne nekroze (slika C); zbog toga, treba izvesti druge vrste bojanja organizama kada su granulomi prisutni na histološkim rezovima. Kod imunosuprimiranih individualaca, tuberkuloza ne mora potaknuti granulomatozni odgovor ("nereaktivna tuberkuloza"), umjesto toga, vide se naslage pjenušavih histiocita, skupa s mikobakterijama. (slika D).

(https://www.google.hr/search?q=mikroskopski+spektar+tuberkuloze&hl=hr&gbv=2&prmd=ivns&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=JwjaVLX_GMPwaPGggdAM&ved=0CAUQ_AU, 2014)

2.26.7.3. Bojanje balterijskih endospora po Schaeffer–Fultonovoj metodi



Slika 8-12: Postupak u tijeku bojenja bakterijskih endospora metodom po Schaeffer-Fultonu.

Slika 12. Bojanje po Schaeffer - Fultonu (https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gbv=2&oq=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gs_l=heirloom-hp.12...3094.14795.0.17297.24.12.0.12.0.0.85.812.12.12.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..13.11.745.2iIT_GiZViw, 2014.)

Za dokazivanje prisutnih spora potrebni su posebni postupci bojanja a najčešće se upotrebljava metoda po Schaeffer-Fultonu. Prva boja je malahitno zelenilo, a nanosi se preko razmaza fiksirane bakterijske kulture i zagrijava iznad plamena tri puta po 15 sekundi (do početka isparavanja otapala).

Zagrijano malahitno zelenilo prodire u nepropustan omotač spora. Nakon toga se preparat ispire pod mlazom vode 30 sekundi. Kao kontrastna boja koristi se šafranin koji će nanesen preko razmaza obojiti vegetativne stanice koje nisu sporulirale. U dobro načinjenom preparatu vidjet će se zelene obojane endospore između crvenih vegetativnih stanica. Ovo bojanje je posebno važno kod identifikacije bakterija koje tvore spore, kao što su one koje pripadaju rodovima štapićastih bakterija: Bacillus i Clostridium.

Rod Bacillus su uzročnike bolesti antraksa (Bacillus anthracis).

Rod Clostridium su uzročnike: botulizma (Clostridium botulinum),

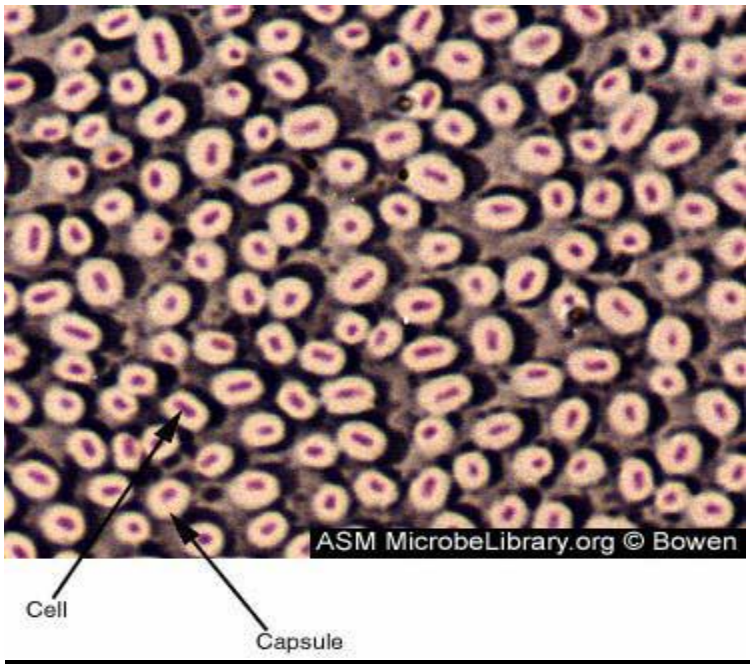
tetanusa (C. tetani) i plinske gangrene (C. perfringens).

Endospore nastaju kada se iscrpe esencijalne hranjive tvari ili kada nema vode u supstratu. Ovisno od vrste bakterija, spore mogu biti različitog oblika i formiraju se u određenim dijelovima stanica (sredina, na vrhu, više ka jednom ili drugom kraju). U odnosu na vegetativne stanice sadrže manje vode i drugačije su građe. Bakterijske endospore su poznate kao oblici otporni na povišenu i nisku temperaturu, zračenje, isušivanje, kemijska sredstva i ne bojenje. U prehrambenoj industriji predstavljaju problem, jer se teže uništavaju u odnosu na druge mikroorganizme. Kemijski sastav spora i njihov omotač se razlikuje od kemijskog sastava vegetativne stanice: Spore sadrže dipikolinsku kiselinu koju vegetativne stanice nemaju. Imaju visok sadržaj Ca (kalcija) i malo vode koja se u sporama nalazi u vezanom stanju sa različitim spojevima i ne može sudjelovati u biokemijskim reakcijama.
Spore bakterija se razlikuju od spora kvasaca i plijesni. Nekoliko sati mogu izdržati u ključaloj vodi, a u suhom stanju ako ih želimo uništiti potrebna je temperatura od 160^0C 1-2 sata. Pri niskim temperaturama od -190^0C do -273^0C neke od njih ostaju životno sposobne. U suhom stanju na običnoj temperaturi mogu se održati više godina. Kada se nađu u pogodnim uvjetima za život spore prelaze u vegetativne stanice.

2.26.7.4. Bojanje kapsula (čahura) bakterija

1. Na predmetnom stakalcu načini se razmaz u kapi vode,koji se suši na zraku – preparat se ne fiksira.
2. Dodaje se boja gentijana violet (primarna boja) od 5 do 7 min.
3. S obzirrom da su čahure neionske, primarno bojilo se na njih samo nataloži, bez povezivanja čvrstim kemijskim vezama, za razliku od ostalog dijela stanice.
4. Ispiranje s 20% otopinom Cu SO_4 x 5 H_2O- služi kao agens za odbojavanje i kontrasno bojilo- (s obzirom da su kapsule topive u vodi ne ispire se vodom). Kontrasno bojilo se apsorbira i oboja kapsule, tako da će kapsule biti obojane svijetlo plavo.
5. Sušenje na zraku (ne filter papiru).
6. Mikroskopiranje pod najvećim povećalom uz kap uljno – imerzione tekućine (anisol).

Rezultat: svijetlo plave (ljubičaste) kapsule s tamno ljubičasto obojenim bakterijskim stanicama



Slika 13. Bojanje čahura bakterija (https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gbv=2&oq=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gs_l=heirloom-hp.12...3094.14795.0.17297.24.12.0.12.0.0.85.812.12.12.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..13.11.745.2iIT_GiZViw, 2014.)

3. ZAKLJUČAK

ZAKLJUČAK

Iz svega gore navedenoga može se spoznati važnost mikrobiologije. Dok pišem ovaj rad na ovom području se sigurno događaju nova važna otkrića, a golemi broj informacija nam postaje dostupan zahvaljujući elektronskim medijima. Ovaj brzi razvoj mikrobiologija može zahvaliti novim istraživačkim postupcima, tehničkim pomagalima, sve brojnijim istraživačkim otkrićima i cijelovitim spoznajama o mikroorganizmima i njihovim sposobnostima.Danas bez izučavanja i unapređivanja mikrobiologije život na planetu Zemlja bio bi upitan i kompliciran. U ovom radu sam obradila potrebne tehnike rada koje osiguravaju široki spektar primjene za uporabu u temeljnoj i modernoj primjenjenoj mikrobiologiji, a i u programima srodnih struka. Opisani su postupci koji su dopunjeni priborom i instrumentima koja će u standardnim mikrobiološkim laboratorijima biti dostatni za kvalitetan rad.

Kako bi u mikrobiološkom laboratoriju osigurali siguran i kvaliteten rad, smanjili ljudske pogreške, povrede i radom izazvane infekcije, te pogrešno rukovanje opremom, potrebno je dobro upoznati i savladati tehnike rada.

4.LITERATURA

Literatura

1. S.Duraković: Prehrambena mikrobiologija, Medicinska naklada Zagreb1991.
2. S. i L.Duraković: Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju I, Zagreb 1997.
3. S. i L.Duraković : Priručnik za rad u mikrobiološkom laboratoriju II, Zagreb 1998.
4. S.Duraković: Primjenjena Mikrobiologija, PTI Zagreb1996.
5. World health organization: Priručnik za biološku bezbednost u laboratoriji, Treće izdanje deo IV(st. 65-98.), Geneva 2004.

https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=centrifuga&gbv=2&oq=centrifuga&gs_l=heirloom-hp.1.1.0l10.1686.7911.0.10993.10.7.0.3.3.0.109.723.1j6.7.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..0.10.762.OjIVokSWX1E (20.9.2014)

https://www.google.hr/search?q=sterilizacija+zasi%C4%87enom+vodenom+parom+autoclaving&hl=hr&gbv=2&prmd=ivns&source=lnms&tbm=isch&sa=X&ei=uwLaVIriHsPxavLIgKgB&ved=0CAUQ_AU (25.09.2014)

https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=eleelektronski+mikroskop&gbv=2&oq=eleelektronski+mikroskop&gs_l=heirloom-hp.12...5967.18606.0.21316.23.12.1.10.0.0.186.1107.9j3.12.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..12.11.995.9EuUHwBnK90 (30.09.2014)

https://www.google.hr/search?hl=hr&source=hp&q=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gbv=2&oq=bojenje+%C4%8Dahura+bakterija&gs_l=heirloom-hp.12...3094.14795.0.17297.24.12.0.12.0.0.85.812.12.12.0.msedr...0...1ac.1.34.heirloom-hp..13.11.745.2ilT_GiZViw (30.09.2014.)

http://www.google.hr/url?url=http://www.pmf.ac.me/Download.php%3Ffile%3Dskladiste/predmeti/262/4ac5eef841124/4ac5ef4befef5mikro-mikorskop.pdf%26filename%3Dmikro-mikorskop.pdf&rct=j&frm=1&q=&esrc=s&sa=U&ei=uxnjVKG8K8WtU7-JhIgI&ved=0CDwQFjAL&usg=AFQjCNFEyd16FbHB-sAzw7leBxB_eyc9CA (30.09.2014.)

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO – TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

PREDDIPLOMSKI STUDIJ PREHRAMBENE TEHNOLOGIJE

Jasna Krstanović

(ud. Molnar)

Tehnike rada u mikrobiološkom laboratoriju

završni rad

Osijek, 2015.