Bakterije porodice Enterobacteriaceae

Djurdjević, Ivana

Undergraduate thesis / Završni rad

2014

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:109:788398

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

Ivana Djurdjević

Bakterije porodice *Enterobacteriaceae*

završni rad

Osijek, 2014.

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU

PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Opća mikrobiologija

Bakterije porodice

Enterobacteriaceae

Završni rad

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Lenart

Studentica: **Ivana Djurdjević** 3143/09

Mentor: doc. dr. sc. Lidija Lenart

Predano:

Pregledano:

Ocjena:

Potpis mentora:

_____

Bakerije porodice *Enterobacteriaceae*

Sažetak

Obitelj *Enterobacteriaceae* ili crijevne bakterije kao sto se zajednički nazivaju, uključuju skupinu bakterija koje obitavaju u probavnom sustavu ljudi I životinja, a izmetom dospijevaju u vodu, tlo i biljke. Enterobakterije čine oko 2% normalne crijevne flore. Neke su vrste stalni stanovnici, ostale se nalaze samo u dijelovima populacije, a neke dolaze samo u oboljelih organizama. Najveći broj predstavnika fermentiraju glukozu i ugljikohidrate. Enterobakterije uključuju pokretljive a i nepokretne vrste, pokretljive imaju bičeve. Mnoge vrste imaju pile koje im pomažu da se pričvrste na membrane sluznice. Specijalizirani tzv. *seks pili* pomažu u izmjeni genetičkog materijala među stanicama, koja često uključuje otpornost prema djelovanju antibiotika. Porodica *Enterobacteriaceae* je heterogena skupina gram negativnih štapića i kokobacila, fakultativnih anaeroba, značajne biokemijske aktivnosti, što koristimo za njihovu identifikaciju. Među važnim rodovima enterobakterija nalaze se *Escherichia, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Serratia, Proteus, Yersinia, Erwinia* i *Enterobacter*.

Ključne riječi: *Enterobacteriaceae,* probavni sustav, indentifikacija, rodovi

A bacteria of the family *Enterobacteriaceae*

Abstract

The family *Enterobacteriaceae* or intestinal bacteria such as commonly called, including a group of bacteria that live in the digestive systems of humans and animals, and feces get into the water, soil and plants. Enterobacteria accounted for about 2% of the normal intestinal flora. Some species are permanent residents, others are found only in parts of the population, and some come only in diseased organisms. The largest number of representatives ferment glucose and carbohydrates. Enterobacteria involving mobile and immobile species, mobile species have motile whips. Many species have a blade that help them to attach to mucous membranes. Specialized called. sex *pilus* help in modifying genetic material between cells, which often involves resistance to the action of antibiotics. The family *Enterobacteriaceae* is a heterogeneous group of gram-negative rods and coccobacilli, facultative anaerobes, important biochemical activities, which we use to identify them. Among the important families are enterobacteria *Escherichia, Salmonella, Shigella, Klebsiella, Serratia, Proteus, Yersinia, Erwinia* and *Enterobacter*.

Keywords: *Enterobacteriaceae*, digestive system, indentification, families

Sadržaj

1. UVOD 2

2. RODOVI 3

2.1. *Escherichia* 4

2.2. *Salmonella* 7

2.3. *Proteus* 9

2.4. *Shigella* 11

3. Karakteristike, indentifikacija i izolacija bakterija porodice *Enterobacteriaceae* 12

3.1. Biokemijska indentifikacija vrsta 12

3.2. Fermentativni metabolizam glukoze 13

3.3. Fermentacija laktoze 15

4. Selektivne podloge za izolaciju predstavnika iz obitelji *Enterobacteriaceae* 16

5. Podloge za namnožavanje mikroorganizama 19

LITERATURA 20

1. UVOD

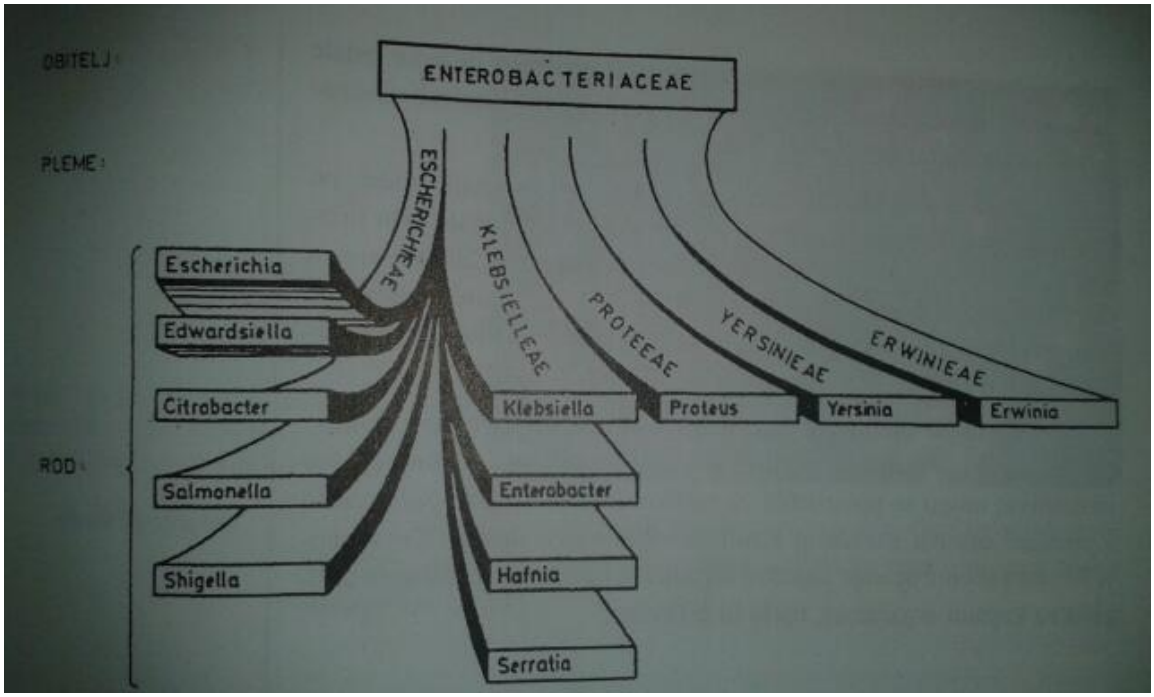
Bakterije porodice *Enterobacteriaceae* su oksidaza-negativni, gram-negativni, katalaza-pozitivni štapićasti mikroorganizmi dugi od 2 do 6 μm. Obično se pokreću flagelama ili su nepokretni. Ove bakterije su fakultativni anaerobi koji se lako uzgajaju na hranjivim podlogama, fermentiraju glukozu i reduciraju nitrate u nitrite. Žive stalno ili povremeno u crijevima. Prenose se fekalno-oralnim putem, onečišćenim rukama, hranom ili vodom. U ovu skupinu spadaju: *Salmonella, Shigella, Yersinia, Escherichia, Klebsiella, Enterobacter, Serratia, Proteus, Morganella, Providencia* itd. Pripadnici rodova *Escherichia, Shigella, Salmonella, Citrobacter, Klebsiella i Enterobacter* se često navode pod zajedničkim imenom koliformni bacili. Dio su normalne mikroflore ljudi i životinja. Neke od ovih bakterija opskrbljavaju organizam vitaminima B-kompleksa.

Enterobakterije mogu izazvati različite bolesti ljudi, i to od veoma teških bolesti (kuga) do oportunističkih infekcija. Izazivaju pretežno crijevne infekcije, ali mogu uzrokovati i infekcije ostalih tkiva i organa. Pored bolesti čovjeka enterobakterije mogu biti i uzročnici bolesti koje se javljaju kod biljaka (krumpir, kukuruz) i životinja (svinje, telad), a to može dovesti do velikih ekonomskih gubitaka.

Enterobakterije, poput najvećeg broja ostalih bakterija, proizvode proteine što se nazivaju *bakteriocini*, koji uzrokuju *lizu* (cijepanje) nekih drugih vrsta bakterija. Tijekom indentifikacije roda za razlikovanje predstavnika iz obitelji *Enterobacteriaceae* od ostalih gram-negativnih štapičastih bakterija ne pomažđe postupak bojanja po Gramu. Budući da najveći broj vrsta raste tvoreći mutne, sive, suhe do sluzave kolonije, promatranje morfoloških osobina na krvavom agaru ograničena je dijagnostička uporabljivost.

2. RODOVI

Porodica *Enterobacteriace* se ubraja u fakultativno anaerobne gram negativne štapićaste bakterije. Naziv ove porodice bakterija potječe od grčke riječi enteron što znači crijevo, jer porodica *Enterobacteriaceae* obuhvaća veliki broj bakterija koje žive u crijevima čovjeka i životinja. Ovoj porodici pripadaju slijedeći rodovi: *Salmonella, Escherichia, Proteus, Shigella, Serratia, Citrobacter, Klebsiella, Enterobacter, Hafnia, Edwardsiella, Providencia, Morganella, Yersinia* i *Erwinia*. Neki od ovih rodova su izraziti patogeni i izazivači velikog broja različitih oboljenja kod ljudi, kao što su: septikemija, pneumonija, meningitis, infekcije urinarnog trakta, bolesti organa za probavu, i mnogih drugih bolesti (Govedarica, 1995).



Slika 1: Porodica *Enterobacteriaceae* podijeljena je u pet plemena na osnovu genetičkih podataka (sadržaj G i C) i biokemijskih različitosti. (S. Duraković, S. Redžepović – Bakteriologija u biotehnologiji).

Prisustvo enterobakterija u namirnicama je indikator fekalnog zagađenja, tj. nedovoljne higjene tokom proizvodnje, čuvanja i tretiranja hrane. Namirnice u kojima se utvrdi prisustvo enterobakterija se smatraju zdravstveno naispravnim. Prema još uvijek važećem Pravilniku o mikrobiološkoj ispravnosti namirnica u prometu (Pravilnik 26/93) kao i prema Pravilniku Europske Unije (EC 2073/2005) u životnim namirnicama obavezna je kontrola na prisustvo slijedećih rodova iz porodice *Enterobacteriaceae: Salmonella, Escherichia i Proteus.*

2.1. *Escherichia*

Rod *Escherichia* pripada porodici *Enterobacteriaceae* i jedina vrsta iz tog roda je *Escherichia coli*. Ovu bakteriju otkrio je njemački pedijatar i bakteriolog Theodor Escherich 1885. godine. E. coli je gram negativna, aerobno i fakultativno anaerobna, štapićasta bakterija. E. coli posjeduje veliku fermentativnu i oksidativnu sposobnost. U anaerobnim uvjetima nastaje laktat, sukcinat, etanol, acetat i CO_2. Ne proizvodi H_2S. Serološki se razlikuju tipovi na osnovu O, K i H antigena. E. coli dobro raste na svim hranjivin podlogama. Razmnožava se pri temperaturama od 10 do 46°C, a optimalno se razmnožava na 37°C. Neke vrste mogu rasti i na 4°C, a većina vrsta preživljava temperature znatno niže od 0 °C. Američki znanstvenici ispitivali su mogućnost preživljavanja *E. coli* na temperaturama iznad 45 °C, i dokazali su da na temperaturama oko 45°C mogu preživjeti oko 5 minuta u 0,1 M KCl. Dokazano je i da neki mutagene vrste mogu vrlo kratko izdržati na temperaturama iznad 49 °C, ali na tim temperaturama nemaju sposobnost rasta i razvoja. Termičkom obradom namirnicama na temperaturi od 60°C u trajanju od 15 minuta možemo biti sigurni da su uništene sve stanice *E. coli*. Minimalni aw za njihovo razmnožavanje je 0,93, a minimalan pH je 4,3. E. coli je osjetljiva na klor i klorove spojeve, dok prema različitim antibioticima vrlo brzo postaje rezistentna. Prirodno stanište ove bakterije je probavni sustav čovjeka i životinja. *E. coli* je dio normalne crijevne flore čovjeka, i neophodna je za proces probave, kao i sintezu nekih supstanci neophodnih za normalno funkcioniranje organizma, kao što je vitamin K.

Postoji i određena podjela sojeva *E. coli* s obzirom na njihovu patogenost; tako imamo enteropatogenu *E. coli* (EPEC), enterotoksikogenu *E. coli* (ETEC), enteroinvazivnu *E. coli* (EIEC), enterohemoragičnu *E. coli* (EHEC) i enteroagregativnu

E. coli (EAEC) (Nataro i Kaper, 1998.). Iako se smatra kako *E.coli* nije opasna i dio je prirodne mikroflore probavnog trakta ljudi i drugih toplokrvnih životinja (čineći manje od 1% mikroflore, odnosno kod ljudi 10^8 po gramu; Smith, 1961.), postoje određeni sojevi odgovorni za brojne bolesti, od kojih neke mogu rezultirati i smrću. Proizvodnja citotoksina je zajedničko svojstvo za VTEC (Vero citotoksigene *E.coli*) koje se još nazivaju i proizvođačima Shiga toksina (STEC) i enterohemoragične *E. coli* (EHEC).

Kod novorođenčadi *E. coli* se javlja već par dana nakon rođenja. Dijete većinom unese bakteriju fekalno-oralnim putem od majke, ali i iz okoline. Rezultati oralnih eksperimenata odraslih osoba pokazuju da je razina od 10^5 do 10^{10} EPEC dovoljna da izazove dijareju, 10^8 do 10^{10} ETEC potrebno je za infekciju i dijareju, a razina od 10^8 EIEC uzrokuje pojavu simptoma dijareje kod odraslih osoba. Međutim, ti podaci variraju, a ovise o jačini želučane kiseline pojedinaca (Doyle i Padhye, 1989.; Sussman, 1997.). S druge strane, epidemiološka istraživanja pokazuju kako infektivna doza VTEC može biti i vrlo mala, npr. manje od 100 stanica (Savjetodavni odbor za mikrobiološku sigurnost hrane, 1995.). VTEC mogu izazvati i hemolitički uremički sindrom (HUS), kojeg karakterizira akutno zatajenje bubrega, hemolitička anemija i trombocitopenija (smanjeni broj trombocita u perifernoj krvi), a obično se javlja kod djece mlađe od 5 godina.

Danas je u hrani vrlo niska infektivna razina VTEC-a, posebno VTEC O157:H7, što ukazuje na to kako se u poljoprivrednoj praksi održavaju najviši mogući standardi i proizvođači hrane pridržavaju se visoko higijenskih uvjeta procesa proizvodnje hrane koji se temelje na načelima HACCP-a (Hazard Analysis and Critical Control Point). Nadalje, vrlo je važno obratiti pažnju i na održavanje čistoće i visokih higijenskih uvjeta u svim fazama proizvodnje hrane kako bi se mogli kontrolirati mogući zaostaci *E. coli* i kako bi se spriječila potencijalna opasnost za potrošače. U prehrambenoj industriji se *E. coli* uobičajeno uključuje u propise koji se odnose na sirove materijale i gotove prehrambene proizvode kao indikator zdravstvene ispravnosti hrane. To se posebno odnosi na *E.coli* O157:H7, jer, ako je i prisutna u hrani, poželjno je da to bude u vrlo niskim koncentracijama u sirovinama i gotovim proizvodima.

Uspoređena je DNA kod *E. coli* i DNA kod nekih drugih rodova porodice *Enterobacteriaceae*, posebno nekih značajnijih ljudskih patogena (Brenner, 1984.), te, na osnovu DNA homologije, Jones (1988.) navodi da bi se *E. coli* i četiri soja roda *Shigella* trebale smatrati kao zasebna vrsta.

Do sredine 1940-tih godina, razvijena je shema serogrupa na osnovu koje *E.coli* može biti podijeljena na više od 170 različitih serogrupa koje se baziraju na njenim somatskim (O) antigenima (Kauffmann,1947.). Nadalje, postoji preko 50 flagelarnih (H) antigena te oko 100 kapsularnih (K) antigena na osnovu kojih se *E. coli* dalje dijeli na seotipove. Zahvaljujući serogrupama i serotipovima, te ostalim informacijama o bakterijama koje su dobivene istraživanjima, kao što su biotip i proizvodnja enterotoksina, danas je olakšano razlikovanje pojedinih vrsta koje su sposobne izazvati zarazne bolesti kod ljudi i životinja (Linton i Hinton, 1988.).



Slika 2: Izgled *E. coli* na hranjivoj podlozi (http://www.sxc.hu; http://www.astrographics.com)

2.2. *Salmonella*

Danas je poznato više od 2000 različitih vrsta iz roda Salmonella, a bolesti kod ljudi najčešće izazivaju *S. typhi, S. paratyphi, S. enteritidis, S. typhimurium, S. pullorum i S. enterica*. To su gramnegativne, pokretne štapićaste bakterije. Kreću se pomoću peritrihijalnih flagela i fimbrija. Jedine nepokretne vrste su *S. pullorum i S. gallinarum*.



Slika 3: *Salmonella pullorum* (http://www.tehnologijahrane.com)

Salmonele su fakultativno anaerobne bakterije. Razlažu veliki broj ugljikovih hidrata uz stvaranje kiseline i plina. Salmonele ne razgrađuju laktozu, saharozu i ureu, a produkuju H2S. Salmonele dobro rastu i razmnožavaju se na velikom broju podloga, a samim tim mogu se razvijati i u velikom broju namirnica različitog sastava (Arsenijević, 1999). Salmonele se razmnožavaju u temperaturnom intervalu od 5 do 47°C. Temperature iznad 60°C uništavaju ih za nekoliko minuta. Optimalne vrijednosti pH za salmonele su u intervalu 6,5-7,5, a mogu se razmnožavati i pri vrijednostima od 4,5-9,0. Mogu preživjeti u namirnicama u kojima je aw ≥ 0,94. Salmonele su osjetljive na klor i klorove spojeve. Neki aditivi, konzervansi, začini i starter kulture, sami ili sinergistički sa drugim parametrima (pH, aw, temperatura) usporavaju ili zaustavljaju razmnožavanje Salmonella. Salmonele mogu biti prisutne u rijekama, otpadnim vodama, kanalizaciji i drugim vodama.

Tablica 1. Vremenski period preživljavanja Salmonella u različitim sredinama

Mjesto	Vrijeme (dan)
bunarska voda	89
bara	115
pašnjačko gnoivo	120
baštensko gnoivo	280
ptičiji izmet	840
goveđi izmet	900

Do nedavno je vladalo mišljenje patke, guske, ćurke). Zaražene životinje izlučuju salmonele preko izmeta, sekreta i ekstreta, a salmonele kod zaraženih životinja nalaze se i njihovom mlijeku i mesu, kao i u jajima. Domaće životinje jako često mogu biti samo kliconoše, a da ne pokazuju nikakve znakove bolesti. Alimentarne toksikoinfekcije, izazvane Salmonellom najčešće nastaju konzumiranjem kontaminiranog mesa i mesnih prerađevina (mesne salate, mljeveno meso, pašteta i svježe sirove kobasice), mlijeka i mliječnih proizvoda (sladoled, sir, kremovi), jaja (svježa, smrznuta, osušena), riba, rakova i školjki. Salmoneloze mogu nastati i u kontaktu sa prljavim rukama kliconoše ili oboljelog, kao i upotrebom zagađenog pribora i posuđa. Izvori zaraze salmonelama mogu biti i zaraženi glodavci, kućni ljubimci, i čovijek.

Životne namirnice porijeklom od zdravih životinja, mogu se naknadno kontaminirati salmonelama: nehigijenskim postupcima obrade hrane, upotrebom higijenski neispravne vode, izmetom, preko insekata, kao i neadekvatnim postupcima tijekom transporta, čuvanja i distribucije hrane. Salmoneloze kod čovijeka nastaju nakon konzumiranja mesa, mlijeka i jaja, koja potiču od zaraženih životinja i njihovih proizvoda

ili naknadno kontaminiranih Salmonellom. Kontak sa zaraženim životinjama i vodom su znatno rijeđi način prenošenja Salmonella. Salmoneloze se kod ljudi javljaju tokom cijele godine, a najčešće ljeti i početkom jeseni.

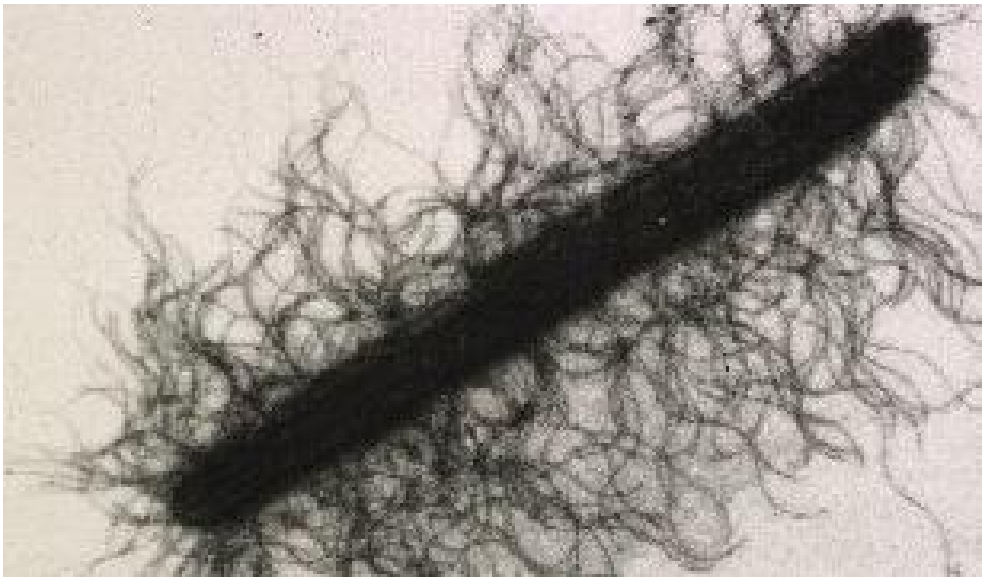
I ako je danas proizvodnja hrane na izuzetno visokoj razini i posvećuje se velika pažnja kako proizvodnji, tako i preradi i pripremi namirnice za konzumiranje, i dalje se i u njrazvijenijim zemljama svijeta bilježe pojave salmoneloza: U SAD-u je u prvom tromesječju 2008. godine registrirano 28 oboljelih osoba od ove bolesti. Oboljeli su bili uzrasta od 4 mjeseca, pa do čak 95 godina.

2.3. *Proteus*

Najrasprostranjenije vrste roda *Proteus* su *P. vulgaris, P. mirabilis, P. morganii, P. rettgeri i P. inconstans*. Za higijenu namirnica najznačajniji su *P. vulgaris i P. mirabilis*. Ove vrste pripadaju grupi gram negativnih bakterija štapićastog oblika. Imaju peritrihijalno raspoređene flagele i vrlo su pokretljive. Nemaju sposobnost sinteze kapsule. Kao i ostale bakterije iz porodice *Enterobacteriace*, rastu i razmnožavaju se kako u aerobnim tako i u anaerobnim uvjetima. *Proteus* vrste su široko rasprostarnjene u prirodi, prisutne su u zemljištu, vodi, namirnicama, organskim materijama koji trule, kao i fekalijama ljudi i životinja. Prilagođeni su i parazitskom načinu života. Tipični su predstavnici oportunističkih bakterija, što znači da počinju sa razmnožavanjem kada padne imunitet organizma. Ulaze u sastav fiziološke mikroflore probavnog trakta. Značajan medicinski problem predstavljaju *Proteusom* izazvane urinarne infekcije, meningitisi i infekcije rana, a naročito intrahospitalne infekcije kao što su: infekcije mekih tkiva, pneumonija, absces pluća i septikemija.

P.mirabilis izaziva oko 90% infekcija izazvanih proteus vrstama. Proteus vrste se često nalaze kod ljudi kao sastavni dio normalne mikroflore crijeva. Oko četvrtine ljudske populacije sadrži ovu bakteriju u svom probavnom traktu. Prilikom pada imuniteta dolazi do prelaza Proteus vrsta iz probavnog trakta u urinarni trakt. U urinarnom traktu ove bakterije produkuju ureazu koja hidrolizira ureu do amonijaka i CO2, čime se povećava bazičnost urina, što pogoduje stvaranju kristala. Ukoliko potraju pogodni uvjeti za

razmnožavanje proteus vrsta i formiranje i rast kristala, doći će do nastanka kamena u urinarnom traktu. Jednom stvoren kamen tijekom vremena stalno će se povećavati i tako će stalno dovoditi do oštećenja funkcije bubrega. Iz ovog razloga potrebno je infekcije Proteus vrstama uz pomoć antibiotika liječiti na vrijeme, jer kada se kamen već stvori on predstavlja zaštitu ovim bakterijama od djelovanja antibiotika.



Slika 4: *Proteus mirabilis (http://www.med.umich.edu/opm/newspage/2006/pmirabilis.htm)*

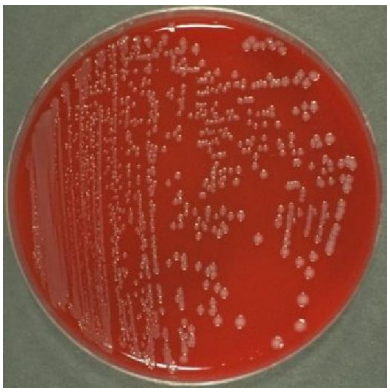
P. mirabilis pokazuje veću osjetljivost na antibiotike od *P. Vulgarisa*. Prisustvo Proteus vrsta u hrani ukazuje na to da je hrana stara, ili da je pripremljena ili čuvana u nehigijenskim uvjetima, ili da je do kontaminacije došlo uslijed neadekvatne manipulacije hranom, kao i neadekvatnih postupaka termičke obrade ili hlađenja hrane. Proteus vrste se razmnožavaju u temperaturnom intervalu od 0 do 43ºC. Osjetljive su na povišenu temperaturu, pa ih vlažna toplota od 55ºC ubija za 1h. Proteus se može razvijati u namirnicama u kojima je aw iznad 0,95 i pH iznad 4,0. Dakle, Proteus vrste se ne nalaze u suvim, kiselim i termički obrađenim namirnicama, ukoliko su zadovoljeni svi higijenski uvjeti tijekom pripreme, proizvodnje i čuvanja namirnica.

2.4. *Shigella*

Shigella vrste koje najčešće izazivaju bolesti kod ljudi su *Shigella dysenteriae, S. flexneri, S. boydii i S. sonnei. Shigella dysenteriae* je poznata kao izazivač dizenterije, *S. flexneri* je sa 60% najzastupljenija od Shigella vrsta u zemljama u razvoju, a *S. sonnei* izaziva oko 77% bolesti u razvijenim zemljama i oko 15% u zemljama u razvoju.

Fekalno-oralna kontaminacija je tipična za Shigellu. Ukoliko ove bakterije imaju dovoljno hranjivih materijala mogu preživjeti i do dva tjedna na temperaturi oko 20ºC. Jednostavnim postupkom, tj. redovnim pranjem ruku stupanj kontaminacije Shigella vrstama može se znatno smanjiti. Veoma je bitno od malena, kod djece razviti navike redovnog pranja ruku. U uslovima loše higijene može doći i do kontaminacije vode za piće i hrane ovim bakterijama. Hrana se može kontaminirati ukoliko sa njom manipulira osoba sa lošim higijenskim navikama, preko kontaminirane vode ili preko insekata i glodara. Da bi se izbjegle infekcije Shigella vrstama potrebno je hranu kontolirati, ali i adekvatno pripremati i čuvati. Shigella vrste se uništavaju pri temperaturi od 60ºC u trajanju od 30 min. Osjetljive su i na alkalije i kiseline.





Slika 5 i 6: Put infekcije *Shigella* bakterijama i *Shigella* na hranjivoj podlozi (http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/bacteria/Shigella_sonnei/)

3. Karakteristike, indentifikacija i izolacija bakterija porodice *Enterobacteriaceae*

U kliničkim mikrobiološkim labaratorijima se, kao najčesće prisutni nalaze rodovi iz i vrste iz obitelji *Enterobacteriaceae*. Kao što im i ime govori, mnogi predstavnici te skupine su autohtoni mikroorganizmi u probavnom sustavu sisavaca. Prije pojave antiobiotika, kemoterapije i imonoloških određivanja, predstavnici te skupine bili su uglavnom istraživani kao odgovorni uzročnici probavnog i urinarnog sustava. Kolika je važnost tih bakterija govori i podatak da se danas predtavnici *Enterobacteriaceae* mogu izolirati iz infekcija praktički svakog anatomskog dijela, pa stoga i mikrobiolog mora nastojati da te bakterije izolira iz svake kulture koja je poslana u labaratorij.

Tijekom postupka indentifikacije roda za razlikovanje predstavnika iz obitelji *Enterobacteriaceae* od ostalih gram-negativnih bacila, metoda bojanje po Gram-u ne pomaže. Budući da najveći broj vrsta raste tvoreći mutne, sive, suhe do sluzave kolonije, promatranje morfoloških osobina kolonija na krvnom agru također je ograničena dijagnostička upotrebljivost. Neke vrste iz roda *Proteus* mogu rasti raširene po površini čvrste podloge kao tanak sloj, ta se pojava naziva „rojenje“.

3.1. Biokemijska indentifikacija vrsta

Klasifikacija *Enterobacteriaceae* osniva se na određivanju prisutnosti ili odsutnosti različitog enzima što su kodirani u genetičkoj tvari bakterijskog kromosoma. To su enzimi iz izravnog metabolizma bakterija, koji se mogu odrediti pomoću hranjivih podloga za uzgoj, upotrebljavajući tehnike „in vitro“. Supstrati s kojima ti enzimi mogu reagirati, sastavni su dio hranjive podloge zajedno sa sustavom indikatora koji se može odrediti ili razgradnju supstrata, ili prisutnost specifičnih produkata metabolizma.

Za indentifikaciju predstavnika iz obitelji *Enterobacteriaceae* često su nužne složene serije biokemijskih testova, znatno vrijeme, a potencijalno je moguća pogrešna

indentifikacija. Ona se može izbjeći ako se načine preliminarna istraživanja s pomoću biokemijskih testova.

Uz neke iznimke svi predstavnici u obitelji *Enterobacteriaceae* imaju ove karakteristike:

a) Glukozu metaboliziraju fermentativnim putem
b) Nedostaje im aktivnost citokrom oksidaze
c) Reduciraju nitrate do nirita.

3.2. Fermentativni metabolizam glukoze

Za određivanje sposobnosti test mikroorganizma da fermentativno upotrijebi ugkljikohidrate kao izvor ugljika, primjenjuju se različite tekuće i čvrste podloge. Princip fermentacije ugljikohidrata osniva se na rezultatima istraživanja Pasteur-a prije više od 100 godina, koji je dokazao da se, kao rezutat rasta velikog broja vrsta mikroorganizama na ugljikohidratnim supstratima, u njima stvara kiseline.

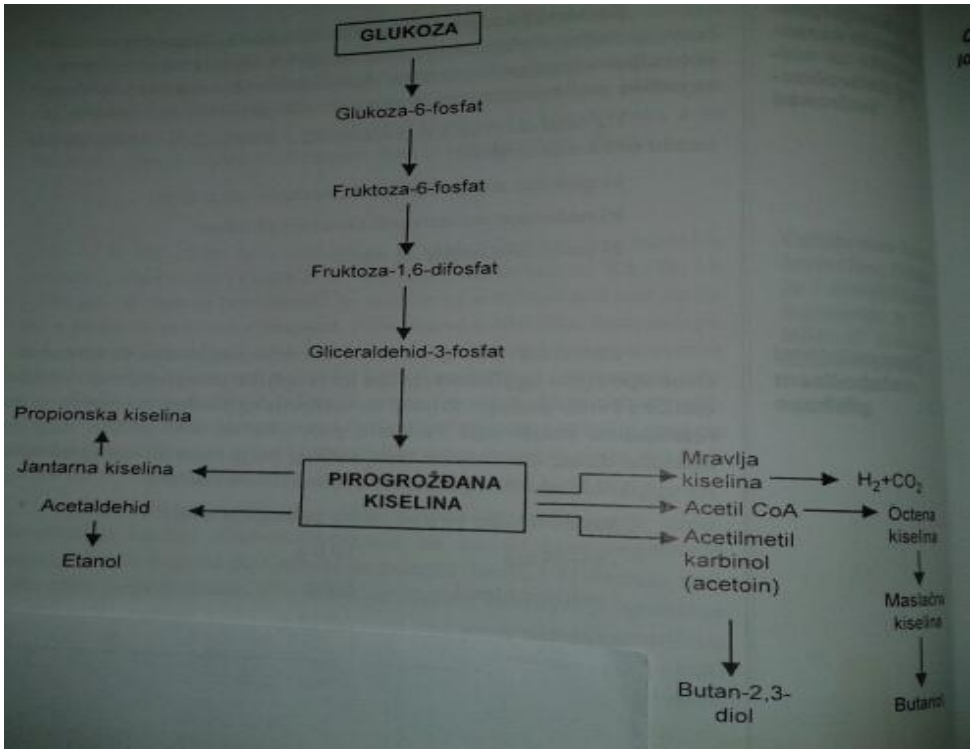
Sastav tipične fermentativne podloge je ovaj:

-triptikaza	10,0 g
-natrijev klorid	5,0 g
-fenolno crvenilo	0,018 g
-destilirana voda do	1,000 ml.

Ugljikohidrat koji će biti testiran (npr.glukoza) strerilizira se i dadaje u ovako pripravljenu podlogu do konačne koncentracije od 0,5-1,0 %. Triptikaza je hidolizat proteina koji služi kao izvor ugljika i dušika, NaCl se dadaje kao osmotrski stabilizator, a fenolno crvenilo je indikator pH vrijednosti podloge. Ono je žute boje kada pH padne ispod 6,8. U tome tipu podloge dobro rastu svi predstavnici iz obitelji *Enterobacteriaceae.*

Fermentacija glukoze nakon anaerobnog Embden-Meyerhof-Parnas (EMP) puta najvažnija je za tvorbu pirogrožđane kiseline od koje se stvaraju različite organske kiseline.

Sve *Enterobacteriaceae* fermentiraju glukozu tim putom, tvoreći mješovitokiselu fermentaciju i, uz fenolno crvenilo kao indikator pH, podgloga se oboji žuto.



Slika 8: Embdeb-Meyerhof-Parnasov put (S. Duraković, S. Redžepović – Bakteriologija u biotehnologiji).

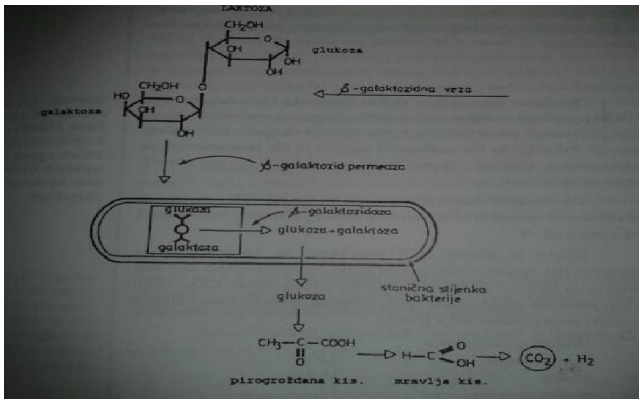
U praktičnom radu mikroorganizmi koji ne mogu fermentirati glukozu, općenito se određuju na osnovi reakcija sto ih daju tijekom rasta na Kliglerovu željeznom agaru (KŽA), ili na željeznom agaru s trostrukim šećerom (TŠŽA). Reakcija lužnato na kosini/lužnato u dubini na te obje podloge, pokazuje izostanak tvorbe kiseline i nesposobnost istraživanog mikroorganizma da fermentira glukozu i ostale ugljikohidrate koji su u podlozi sadržani. Na osnovi te reakcije mogu se određeni mikroorganizmi isključiti kao pripadajući obitelji *Enterobacteriaceae.*

3.3. Fermentacija laktoze

Fermentacija laktoze s pomoću bakterija znatno je složenija nego što je fermentacija glukoze. Laktoza je disaharid što se sastoji od glukoze i gaktoze povezanih preko kisikovih atoma vezom nazvanom galaktozidna veza. Tijekom hidrolize, ta se veza razara i oslobađaju se glukoza i galaktoza. U bakterija koje metaboliziraju laktozu prisutna su 2 enzima: β-galaktozid permeaza, odgovorna je za prolazak β-galaktozida (npr.laktoze) preko stanične stijenke bakterije; i β-galaktozidaza, koji enzim zahtijeva hidrolizu β-galaktozidne veze kada je disaharid ušao u stanicu, da bi mogao biti metaboliziran. Konačna kisela reakcija nastaje razgradnjom glukoze po EMP putu.

Budući da je fermentacija lktoze konačno provedena po EMP metabolizamskom putu razgradnje, to slijedi da svaki mikroorganizam koji ne moze upotrijebiti glukozu, ne može ni stvarai kiselinu iz laktoze. To objašnjava zažto je glukoza izostavljena iz sastava podloge u postupcima primarne izolacije; inače bi postupak za određivanje sposobnosti mikroorganizma da fermentira lakotzu, bio gubljenje vremena. Budući da je završna točka fermentacije laktoze u test podlozi stavarnje kiseline, to znači da mikroorganizmima koji ne fermentiraju laktozu nedostaje β-galaktozidaza, ili one ne mogu metabolizirat u glukozu. Stoga se *Enterobacteriaceae* tijekom definiranja fermentacije glukoze određuju, samo na osnovi pomankanja određenih enzima.

Dakle, kao laktoza fermentirajući organizmi smatraju se oni koji imaju β-galaktozidazno djelovanje i koji imaju neznatno permeazno djelovanje za laktozu.



Slika 9: Fermentacija laktoze pomoću bakterija (S. Duraković, S. Redžepović – Bakteriologija u biotehnologiji).

4. Selektivne podloge za izolaciju predstavnika iz obitelji *Enterobacteriaceae*

Dodatkom inhibitora rasta primarnim podlogama za izolaciju, mogu se od njih načiniti selektivne podloge. Primjenom tih podloga bivaju inhibirane neke nepoželjne bakterije, a omogućuje se rast potencijalnih medicinskih važnih vrsta. Primjerice, selektivne podloge sto se upotrebljavaju za izolaciju vrsta iz obitelji *Enterobacteriaceae,* iz mješovitih kultura, načinjeni su tako da inhibiraju rast gram-pozitivnih bakterija i razlikuju se u stupnju produžetka rasta *Escherichia coli* i ostalih koliformnih bakterija. To omogućuje izolaciju bakterija iz rodova *Shigella* i *Salmonella* iz uzoraka u kojima se oni nalaze u malom broju u poredbi sa velikim brojevima ostalih bakterija probavnog sustava.

Iako se spominje velik broj podloga što se upotrebljavaju u mikrobiološkim laboratorijima kao najčešćse spominju se ove:

- *Salmonela-Shigella* (SS) - agar
- Ksiloza-lizin-deoksikolatni (KLD) – agar
- Bizmut – sulfitni agar.

Izbor selektivne podloge ovisi o vrsti mikroorganizama koji valja izolirati, a i o osobnoj sklonosti analitičara. Općenito se selektivne podloge upotrebljavaju za dokazivanje vrsta iz rodova *Salmonella* i *Shigella* iz uzoraka manirnica i voda za koje se sumnja da bi mogli biti kontaminirani s fekalijama. Praktički sve vrste *Salmonella* dobro rastu u prisutnosti žučnih soli, što objašnjava zašto se salmonele mogu izolirati iz žučnog mjehura, osobito u osoba koje su njihovi prenosioci.

Tablica 2: *Salmonella-Shigella* agar (S. Duraković, S. Redžepović – Bakteriologija u biotehnologiji).

Podloga	**Sastav**	**Namjena i dodatci**	**Reakcije i interpretacija**
***Salmonella-Shigella* agar (SS)**	Ekstrakt goveđeg mesa 5,0 g Pepton 5,0 g Laktoza 10, 0 g Žučne soli 8,5 g Natrijev citrat 8,5 g Željezni citrat 1,0 g Agar 13,5 g Neutralno crvenilo 0,025 g Briljatno zelenilo 0,033 g Dest. voda do: 100,00 ml Konačni pH=7,4	SS agar visoko je selektivna podloga načinjena da inhibira rast najvećeg broja koliformnih bakterija, a omogućuje rast *Salmonella* i *Shigella* vrsta. Visoka koncentracija žučnih soli i natrijeva citrata inhibira sve gram-pozitivne i mnoge gram-negativne bakterije, uključujući koliformne. Lakzoza je jedini ugljikohidrat, a neutralno crvenilo je indikator za određivanje kiselosti podloge. Natrijevtiosulfat je izvor sumpora. Ma koje bakterije koje proizvode H_2S plin, određuju se na osnovi stvaranja crvenog taloga, što se stvara s pomoću željeznog citrata (relativno intenzivno). Visoka selektivnost SS agara dopušta veliku koncentraciju bakterija u inokulumu.	Svaka kolonija bakterija koje fermentiraju laktozu oboji se u prisutnosti neutralnog crvenila. Rijetke vrste *Salmonella* (Arizona vrste) fermentiraju laktozu kolonije i mogu nalikovati kolonijama *E.coli*. SS agar stimulira rast *Salmonella*-vrsta, a porasle kolonije su bezbrojne s crnim središtem u obveznu tvorbu H_2S plina. *Shigella*-vrste rastu u također kao bezbojne, ali bez crnog središta. Pokretljive se *Proteus*-vrste, koje rastu na SS agaru, ne „roje“.

Žučne soli se dodaju u selektivne podloge, jer ostale vrste bakterija koje žive u probavnom sustavu, uključujući i neke od velikog broja osjetljivih *Shigella,* u takvoj

podlozi slabo rastu. SS-agar sadrži relativno visoku koncentraciju žučnih soli, pa je stoga ta podloga vrlo pogodna za dokazivanje vrsta *Salmonella* iz uzoraka što su izrazito kontaminirani s koliformnim bakterijama.

KLD-agar sadrži malu koncentraciju žučnih soli, pa je stoga vrlo prikladna podloga za dokazivanje *Shigella* vrsta, osobito iz uzoraka u kojima su te bakterije bile namnožene nacjepljivanjem u tekuću podlogu za uzgoj gram-negativnih bekterija i držanjem u njoj nekoliko sati. Ta se podloga uvelike upotrebljava u kliničkim laboratorijima, jer se na njoj mogu dokazivati mnoge različite biokemijske karakteristike tijekom prethodne indentifikacije vrste. KLD-agar sarži laktozu, saharozu i ksilozu; stoga se mnogi mikroorganizmi koji na toj podlozi rastu proizvode kiselinu i tvore žuto obojene kolonije. Bakterije, koje ne metaboliziraju te ugljikohidrate stvarat će bezbrojne kolonije.

Salmonella vrste, pretpostavlja se, mogu se indentificirati na KLD-agaru, jer tvore kolonije tipičnih osobina. Najveći broj vrsta proizvodi malu količinu kiseline iz ksiloze, stvarajući kolonije žute boje. To je razlika od reakcije na selektivnim podlogama koje sadrže samo laktozu ili saharozu, na kojima se pojavljuju bezbrojne kolonije. Međutim, budući da KLD-agar sadrži i lizin a najveći broj *Salmonella* vrsta može dekarboksilirati tu aminokiselinu stvarajući lužnate amine, kolonije često imaju i narančaste nijanse.

Ta je osobina često važna u razlikovanju vrsta *Salmonella* od *Proteus* vrsta, potom mnogobrojnih vrsta koje se pojavljuju kao „laktoza nefermentirajuće“ na ostalim selektivnim podlogama, a stvaraju H_2S plin. Na KLD-agaru *Proteus* vrste stvaraju prozirne kolonije u kojima se u sredini može i ne mora nalaziti crni krug.

Bizmut-sulfitni agar gotovo se isključivo upotrebljava za dokazivanje *Salmonella typhi* iz uzoraka fekalnog podrijetla. Ta je podloga osobito korisna kada se odabire veliki broj bakterija koje mogu uzrokovati kokalne ili regionale epidemije. Bizmut-suflit i briljantno zelenilo u podlozi inhibiraju gotovo sve mikroorganizme osim salmonela, koje ne toj podlozi tvore crne kolonije. Bizmut-sulfitni agar je također korisna podloga za dokazivanje rijetkih laktoza-pozivnih *Salmonella* vrsta, koje se ne vide na selektivnim podlogama. No, budući da je visoka selektivnost te podloge kratkotrajna – traje samo jedan dan, ona se u kliničkim laboratorijama mnogo ne upotrebljava.

5. Podloge za namnožavanje mikroorganizama

Kao što i naziv govori podloge za namožavanje upotrebljavaju se radi pospješavanja rasta nekih vrsta mikroorganizama, a istodobno one inhibiraju rast nepoželjnih vrsta.

Takve se podloge odobito upotrebljavaju u laboratorijima za dokazivanje *Salmonella* i *Shigella* vrsta iz uzoraka kontaminiranih s fekalijama. To je osobito nužno u slučaju prenosnika bolesti uzrokovanih salmonelama, ili u nekim slučajevima infekcijama šigelama, gdje broj tih bakterija može biti vrlo mali, kao npr. 200 živih bakterija po gramu fecesa u poredbi s ogromnim brojevima *E.coli,* koji dosižu i do 10^9/g fecesa, ili više.

Podloge za namnožavanje djeluju na principu da se normalna crijevna flora zadržava u lag-fazi rasta, a istodobno vrste *Salmonella* i *Shigella* koje nisu inhibirane ulaze u normalnu log-fazu rasta. Stoga se izolacija iz podloga za namnožavanje kao jednih od selektivnih podloga, preporučuje unutar 6-12 sati. Najčešće upotrebljavane podloge za namonožavanje su:

- Selenit bujon
- Gram-negativni (GN) bujon
- Tetrationatni bujon.

U ovisnosti o upotrebljenom inhibitoru, te se podloge razlikuju u svojoj selektivnosti i specifičnoj primjeni. Podloge sa selenitom i tetrationatom izrazitije inhibiraju *E.coli* i ostali gram-negativnih bakterija, nego GN podloga.

Stoga su one najbolje prilagođene za dokazivanje *Salmonella* i *Shigella* vrsta iz izrazito kontaminiranih uzoraka kao što su feces ili uzorci voda iz kanalizacije. Uprkos toga, GN bujon se mnogo upotrebljava u laboratorijima u koje pristiže velik broj uzoraka, budući da su u toj podlozi slabije inhibirane vrlo osjetljive *Shigella* vrste. Namnožavanje bakterija iz uzoraka fekalnog porijekla u GN bujonu tijekom 4-6 sati, a potom uzgoj na KLD-agaru, najbolja je tehnika za dokazivanje *Shigella* vrsta iz uzoraka za koje se drži da bi mogli sadržavati uzročnike bacilarne dizenterije.

LITERATURA

1. Bem, Z., Adamič, J., 1991., Mikrobiologija mesa i proizvoda od mesa, Univerzitet u Novom Sadu, Tehnološki fakultet
2. Coner, C., Poore, C. A., 2000., Pathogenesis of Proteus mirabilis urinary tract infection, Department of Microbiology and Immunology, University of Maryland, Baltimore
3. Feng, P., Weagant, S., Grant, M., 2002., Enumeration of Escherichia coli and the Coliform Bacteria. Bacteriological Analytical Manual (8th ed.). FDA/Center for Food Safety and Applied Nutrition
   Fotadar, U., Zaveloff, P., Terracio, L., 2005., Growth of Escherichia coli at elevated temperatures, Basic Microbiol, College of Dentistry, New York University, USA
4. Kanneth, T., 2008., Shigella and Shigellosis, University of Wisconsin-Madison Department of Bacteriology
5. Kotironta, A., Lounatmaa, K., Haapasolo, M., 2000. Epidemology and pathogenesis of Bacillus cereus infections, Microbes and Infection, 2.
6. Mattick, K., et al, 2005., The survival of foodborne pathogens during washing-up and subsequent transfer onto washing-up sponges, kitchen surfaces and food, International Journal of Food Microbiology, 85
7. Senadin Duraković, Lejla Duraković – Priručnik za rad u mikrobiološkom labaratoriju
8. Senadin Duraković, Sulejman Redžepović – Bakteriologija u biotehnologiji
9. http://biology.northwestcollege.edu/biology/b1010lab/bactypes.htm
10. http://pictures.life.ku.dk/atlas/microatlas/veterinary/bacteria/Shigella_sonnei/
11. http://www.astrographics.com
12. *http://www.med.umich.edu/opm/newspage/2006/pmirabilis.htm*
13. http://www.scribd.com/doc/142110533/Enterobacteriaceae-docx
14. http://www.sxc.hu
15. http://www.tehnologijahrane.com
16. http://www.tehnologijahrane.com/mikrobiologijahrane/patogene-bakterije-u-hrani-12
17. www.bact.wisc.edu