

Pravilnik o metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica

("Sl. list SFRJ", br. 25/80)

Sadržaj

Deo prvi

1. Meso i proizvodi od mesa
2. Mleko i proizvodi od mleka
3. Ostale životne namirnice

II Postupak za određivanje prisustva, izolovanja i identifikaciju mikroorganizama

Član 1

Mikrobiološke analize i superanalize uzoraka životnih namirnica radi ispitivanja zdravstvene ispravnosti životnih namirnica vrše se po metodama koje su propisane ovim pravilnikom.

Član 2

Podloge i drugi materijali koji se upotrebljavaju pri vršenju mikrobioloških analiza i superanaliza uzoraka životnih namirnica moraju biti sterilni i u pogledu svog sastava i kvaliteta ispunjavati uslove određene ovim pravilnikom.

Član 3

Zdravstvene i druge organizacije udruženog rada i ustanove koje vrše mikrobiološke analize i superanalize uzoraka životnih namirnica dužne su da proveravaju sterilnost, sastav i kvalitet podloge i drugog materijala pre njihovog korišćenja za ispitivanje zdravstvene ispravnosti životnih namirnica.

Član 4

Mikrobiološke analize i superanalize uzoraka životnih namirnica radi ispitivanja zdravstvene ispravnosti životnih namirnica vrše se po Metodama vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica, koje su odštampane uz ovaj pravilnik i čine njegov sastavni deo.

Za životne namirnice koje nisu obuhvaćene metodama iz stava 1 ovog člana primenjivaće se, radi ispitivanja njihove zdravstvene ispravnosti, te metode predviđene za srodne namirnice.

Član 5

Ovaj pravilnik stupa na snagu osmog dana od dana objavljivanja u "Službenom listu SFRJ".

Metode

vršenja mikrobioloških analiza i superanaliza životnih namirnica

Deo prvi

Najmanja količina uzoraka životne namirnice koja se dostavlja na analizu ili superanalizu iznosi 200 g. Ako su u pitanju namirnice u originalnim pakovanjima male težine, količina uzetog pakovanja mora iznositi najmanje 100 g, pod uslovom da su iste proizvodne partije.

Ako su u pitanju namirnice za koje se sumnja da su izazvale alimentarne intoksikacije ili toksinofekcije, uzima se količina uzoraka veća od 200 g, zavisno od preostale količine namirnice na koju se sumnja da je izazvala trovanje.

Pre pristupanja vršenju mikrobioloških analiza i superanaliza uzoraka namirnica, potrebno je utvrditi stanje ambalaže u kojoj je uzorak dostavljen, podatke o uzorku istaknute na ambalaži i eventualna

odstupanja od karakterističnih organoleptičkih svojstava za odnosnu namirnicu.

Dostavljeni uzorci namirnica koji su podložni brzim organoleptičkim promenama (kvarenju), a ne mogu se iz bilo kojih uzroka odmah podvrgnuti ispitivanju, treba da se čuvaju tako da se onemogućiti razmnožavanje bakterija hlađenjem do temperature ispod +4°C.

I Pripremanje uzoraka životnih namirnica za mikrobiološko ispitivanje

Sve vrste uzoraka namirnica za mikrobiološko ispitivanje pripremaju se pod aseptičkim uslovima da bi se sprečila kontaminacija uzoraka mikroorganizmima iz okoline.

1. Meso i proizvodi od mesa

1) Meso trupova, polutki ili četvrtina

Površina mesa pripremljenog za ispitivanje opali se plamenom ili užarenom metalnom špatulom.

Sterilnim nožem ili makazama sa opaljenog mesa odstrani se sloj debljine 2 do 3 cm. Zatim se iz dubine izreže komad težine 50 do 70 g. Uzeti komad se usitni, a zatim homogenizira u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno (decimalno) razređenje.

2) Meso u manjim komadima ili konfekcionirano meso, usitnjeno meso, usitnjeno oblikovano meso i iznutrice

Sterilnom špatulom uzorak se izmeša, odvoji u tarionik ili mikser 50 do 70 g i dobro usitni. 20 g se prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

3) Suvomesnati proizvodi

Zavisno od vrste, veličine i oblika suvomesnatog proizvoda, ukloni se površinski sloj debljine 0,5 do 1 cm. Zatim se izreže 50 do 70 g i dobro usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

4) Kobasičarski proizvodi

Na prikladan način, sa nadeva se ukloni omotač. Zatim se uzima 50 do 70 g nadeva i usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

5) Mesne konzerve

Površina ambalaže (lim, plastika, staklo i sl.) očisti se vatom natopljenom alkoholom, a zatim opali plamenikom. Ambalaža se sterilno otvara ili buši, a uzorak uzima cevastim bušačem, skalpelom ili pincetom u količini od 50 do 70 g i usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

6) Dehidrirani proizvodi od mesa sa ili bez dodataka koji se u prometu nalaze u originalnom pakovanju

Na odgovarajući način otvori se ambalaža. Odmeri se 50 do 70 g i, po potrebi, usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

7) Sveža ili smrznuta riba, sveži ili smrznuti rakovi, školjkaši, morski ježevi, puževi i žabe, čija pojedinačna težina ne prelazi 0,5 kg

Riba, rakovi, školjkaši, ježevi, puževi, odnosno žabe dobro se isperu pod mlazom bakteriološki besprekorne (sterilne – prokuwane) vode, uklone se glave, škrge, oklopi, ljuske, bodljike i peraja. Ostali delovi u količini od najmanje 100 g se na prikladan način usitne u tarioniku ili mikseru. Posle toga se 20 g mase iz tarionika prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima i doda se 180 ml fiziološkog rastvora i dobro homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

8) Sveža, smrznuta, dimljena i sušena riba, sveži ili smrznuti rakovi i kornjače, čija je pojedinačna težina veća od 0,5 kg

Površina iznad dovoljno debelog sloja muskulature ostruže se ili se ukloni oklop, opali plamenom ili užarenom metalnom špatulom. Sterilno se ukloni opaljeni sloj i iz dubine izreže 50 do 70 g. Izdvojeni uzorak se usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

9) Konzerve i polukonzerve od riba, rakova, školjkaša, morskih ježeva, puževa, žaba i kornjača

Konzerve i polukonzerve se pre uzimanja uzorka očiste vatom natopljenom u alkoholu. Površina koja se otvara, prelije se zatim alkoholom i zapali. Pod aseptičkim uslovima, posude (limenke, staklenke, plastične vrećice i dr.) se otvore i uzima 50 do 70 g sadržaja koji se, po potrebi, usitnjava u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

10) Soljena riba

Soljena riba dobro se očisti od soli i dobro ispere pod mlazom bakteriološki besprekorne vode. U tarioniku ili mikseru odmeri se 50 do 70 g uzorka i dobro usitni. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

2. Mleko i proizvodi od mleka

1) Mleko, pasterizovano mleko i napici od pasterizovanog mleka, kiselo mleko, jogurt i kefir

Uzorak se dobro promeša. Kapaljkom se prenese 20 ml u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima i doda 180 ml fiziološkog rastvora i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

2) Zgusnuto mleko

Površina ambalaže se obriše vatom natopljenom alkoholom i opali plamenikom. Sterilnim nožem napravi se otvor i kapaljkom širokog otvora prenese 20 ml u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima i doda se 180 ml fiziološkog rastvora i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

3) Sve vrste pavlake

Površina ambalaže se obriše vatom natopljenom alkoholom i opali plamenikom. Sterilnim nožem napravi se otvor ili se poklopac ambalaže aseptično ukloni. Kapaljkom širokog otvora sadržaj se dobro promeša i 20 ml prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda 180 ml 2% rastvora natrijum citrata i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

4) Maslac, margarin, majonez, salate sa majonezom, kremovi i kolači sa kremom

U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g uzorka i doda 180 ml 2% rastvora natrijum citrata koji je pre toga zagrejan na 45oC. Posle toga uzorak se mućkanjem dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

5) Sirevi i kajmak

Za tvrde sireve aseptično se ukloni površinski sloj debljine 0,5 do 1 cm i uzorak se uzima iz dubine. Za topljene sireve aseptično se ukloni ambalaža i uzima uzorak. Za meke sireve (sveži, sitni sir) i kajmak uzorak se prethodno izmeša. U tarioniku ili mikseru se odmeri 20 g uzorka i usitni uz dodavanje 180 ml 2% rastvora natrijum citrata prethodno zagrejanog na 45oC. Ako se homogenizacija obavlja u tarioniku, rastvor natrijum citrata se dodaje postupno čime se postiže bolje emulgiranje. Sadržaj tarionika ili miksera prenese se u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima i pre pipetiranja snažno promućka. Tako se dobiva osnovno razređenje.

6) Mleko u prahu

U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima odmeri se 20 g uzorka i doda se 180 ml fiziološkog rastvora zagrejanog na 45oC i homogenizira mućkanjem. Mućkanje treba da bude umereno da se na površini ne stvara pena i da ne dođe do izdvajanja masti. Tako se dobiva osnovno razređenje.

7) Sladoled i prašak za sladoled

U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima odmeri se 20 g uzorka i doda se 180 ml 2% rastvora natrijum citrata prethodno zagrejanog na 45oC. Mućkanjem se sadržaj dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

3. Ostale životne namirnice

1) Gotova smrznuta jela

Otvori sa ambalaža i oštirim sterilnim nožem ili skalpelom izrežu tanki listovi ili sitne kockice, najbolje na simetralnom prerezu proizvoda. Po potrebi, odmeri se 50 do 70 g i usitni u tarioniku ili mikseru. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima odmeri se 20 g tako pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

2) Gotova jela

Ceo uzorak u posudi dobro se izmeša. Po potrebi prenese se 50 do 70 g uzorka u tarionik ili mikser i dobro usitni. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima odmeri se 20 g pripremljenog uzorka, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i homogenizira mućkanjem ili vibriranjem za vreme od 15 minuta. Tako se dobiva osnovno razređenje.

3) Smrznuto voće i smrznuto voće u sirupu

Uzorak se odmrzne u sterilnoj posudi u kojoj se zatim homogenizira zajedno sa otpuštenom tečnošću. Ako je u pitanju voće čvršćih plodova, treba usitnjavanje da se vrši u tarioniku ili mikseru. Odmeri se 20 g usitnjenog uzorka u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i mućkanjem dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

4) Sušeno i ušećereno voće, sušeno i smrznuto povrće

20 g uzorka odmeri se u sterilnu posudu, tarionik ili mikser. Prelije se sa 180 ml fiziološkog rastvora da omekša ili odmrzne. Po potrebi, usitnjava se a zatim prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima u kojoj se dalje homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

5) Kikiriki, orasi, lešnici, bademi i kafa

Ako su plodovi u ljusci, ljuska se aseptično ukloni. U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima odmeri se 20 g uzorka i doda se 180 ml fiziološkog rastvora temperature 4 do 6oC. Dobro se promućka i ostavi da stoji 3 do 4 časa u frižideru na temperaturi od 4 do 6oC uz povremeno mućkanje. Tako se dobiva osnovno razređenje.

6) Voće, povrće i pečurke konzervisane toplotom

Ambalaža se prebriše vatom natopljenom alkoholom, po mogućnosti opali plamenikom i otvori.

Odmeri se 20 g u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, a prema potrebi prethodno usitni u tarioniku ili mikseru. Doda se 180 ml fiziološkog rastvora i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

7) Voćni sokovi, sirupi i osvežavajući voćni napici

Ambalaža se aseptički otvara. Uzorku se zatim odredi pH i neutrališe kiselost. 100 ml ispitivanog uzorka odmeri se u Erlenmajerovu tikvicu i kapaljkom se dodaje n/1 KON, i to oprezno jer samo nekoliko kapi može dovesti do neutralizacije. Odmeri se 20 ml uzorka i prenese u Erlenmajerovu tikvicu, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i mućkanjem dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

8) Mlevena kafa i druge namirnice u prahu

U Erlenmajerovu tikvicu odmeri se 20 g uzorka, doda 180 ml fiziološkog rastvora i mućkanjem dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

9) Sirila, jaja u prahu i smrznuta lupana jaja

U Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima odmeri se 20 g, odnosno 20 ml uzorka i doda se 180 ml fiziološkog rastvora. Mućkanjem se uzorak rastvori i dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

10) Sveža jaja za ispitivanje prisustva kvasca i plesni u g

Površina jaja se očisti vatom natopljenom alkoholom i na emajliranoj plitkoj posudi opali plamenikom. Na ljusci se sterilnim priborom (skalpel, makaze) napravi otvor kroz koji se uvuče kapaljka kojom se sadržaj prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima. Mućkanjem ili vibriranjem uzorak se dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

11) Smrznuta testa

Uzorak se prethodno odmrzne. Sa nekoliko mesta uzorka uzme se 20 g i unese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora zagrejanog do 45oC i mućkanjem dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

12) Testenine

Uzorak se dobro usitni u tarioniku 20 g se prenese u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora prethodno zagrejanog na 45oC i mućkanjem se homogenizira sve dok se ne postigne homogena suspenzija. Tako se dobiva osnovno razređenje.

13) Kakao-prah, sve vrste čokolade, nugati, marcipan i gume za žvakanje

Odmeri se, a po potrebi prethodno mehanički usitni 20 g proizvoda u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora prethodno zagrejanog na 45oC, dobro začepi gumenim čepom i mućka dok rastvor ili suspenzija ne postane homogena. Tako se dobiva osnovno razređenje.

14) Industrijski proizvedeni pakovani kolači, bombone, dražeji, keksi, vafli, peciva i oblande

Odmeri se 20 g uzorka u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i mućkanjem rastvori i dobro homogenizira. Tako se dobiva osnovno razređenje.

15) Šećer, koncentрати za supe i druge u vodi lako rastvorljive namirnice

Odmeri se 20 g uzorka u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora koji, po potrebi, može biti zagrejan do 45oC i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

16) Sok od povrća, umak od povrća i kečap

Odmeri se 20 g (20 ml) uzorka u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zncima, doda se 180 ml fiziološkog rastvora i dobro homogenizira mućkanjem. Tako se dobiva osnovno razređenje.

17) Pivo i osvežavajuća gazirana bezalkoholna pića

Odmeri se 150 ml uzorka u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima, blago mućka 5 do 10 minuta da se ukloni ugljen-dioksid. 1 ml prenese se u epruvetu sa 9 ml fiziološkog rastvora i tako se dobiva osnovno razređenje.

II Postupak za određivanje prisustva, izolovanja i identifikaciju mikroorganizama

Za sve namirnice za čije je mikrobiološko ispitivanje potrebno više razređenja, uzima se 1 ml osnovnog (decimalnog) razređenja i prenosi u epruvetu sa 9 ml fiziološkog rastvora. Zameni se kapaljka čistom i izvrši homogenizacija više puta uveličavanjem i ispuštanjem tečnosti iz kapaljke u epruvetu. Postupak se ponavlja pri izradi daljih razređenja.

1. Određivanje broj mikroorganizama u g ili ml

Od priređenih osnovnih razređenja uzoraka otpipetira se po 1 ml u Petrijeve ploče i zalije, uz mešanje, sa oko 15 ml rastvorenog i na 45oC ohlađenog hranljivog agara. Kad se podloga ukruti, ploče se inkubiraju na 30oC za vreme od 72 časa. Posle inkubiranja, izbroje se kolonije na pločama na kojima je izraslo 30 do 300 kolonija. Ako je zadnja cifra izbrojanog broja kolonija 5 ili manja od 5, izvrši se korekcija broja kolonija na nižu, a ako je 6 ili veća od 6 na višu punu deseticu (na primer ako je izbrojano 105 kolonija, broj se koriguje na 100, a ako je izbrojano 106 broj se koriguje na 110). Izuzetno, kad se kod uzoraka utvrđuje broj mikroorganizama manji od 100/1 g ili ml kolonije se broje i na pločama na kojima ih je izraslo manje od 30. Ako je pri tom, njihov broj 10 do 29, vrši se korekcija druge cifre na napred opisan način, a ako je njihov broj manji od 10 korekcija se ne izvodi nego se iskazuje stvarno utvrđeni broj.

Dobiveni broj kolonija množi se veličinom razređenja i iskazuje kao broj mikroorganizama u g ili ml.

2. Određivanje prisustva mikroorganizama u sterilizovanom mleku i sterilizovanim mlečnim napicima

1) Određivanje prisustva aerobnih mikroorganizama

Uzorak se u originalnoj ambalaži dobro promućka i aseptično otvori. Kapaljkom se prenese po 1 ml uzorka u dve Petrijeve ploče koje se zaliju otopljenim i na 45oC ohlađenim hranljivim agarom sa skrobom. Kad se podloga ukruti Petrijeve ploče se inkubiraju 72 časa, jedna na 30oC, a druga na 55oC. Unutrašnja površina poklopca Petrijeve ploče koja se inkubira na 55oC prelije se slojem sterilnog vazelina. Ako posle inkubacije, na ovim podlogama ne dođe do porasta kolonija, smatra se da uzorak ne sadrži aerobne mikroorganizme u ml. Ako dođe do porasta, kolonije se izbroje i iskazuju kao broj mesofilnih, odnosno termofilnih mikroorganizama u jednom mililitru.

2) Određivanje prisustva anaerobnih spороgenih bakterija

1 ml uzorka, prethodno zagrevanog 10 minuta na 80oC, prenese se u podlogu za dokazivanje anaerobnih spороgenih bakterija. Podloga se inkubira 72 časa na 37oC.

Porast vidljivih kolonija u stupcu podloge, stvaranje plina ili cepanje smatra se dokazom prisutnosti anaerobnih spороgenih bakterija u 1 ml. Ako na podlozi ne dođe do porasta, smatra se da uzorak ne sadrži anaerobne spороgene bakterije u jednom mililitru.

3. Određivanje broja aerobnih spороgenih bakterija u g ili ml

Tekuće namirnice ili osnovno razređenje uzorka u količini od 10 ml, u epruveti veličine 16 x 160 mm, urone se u ključalu vodu za vreme od 5 minuta. Ohlade se pod tekućom hladnom vodom. Po potrebi, naprave se dalja osnovna razređenja. Otpipetira se 1 ml u Petrijeve ploče i zalije otopljenim i na 45oC ohlađenim hranljivim agarom. Posle ukrućenja podloge, ploče se inkubiraju 72 časa na 30oC. Posle inkubacije, izbroje se izrasle kolonije, kao pri određivanju broja mikroorganizama u g ili ml i iskazuju kao broj aerobnih spороgenih bakterija u jednom gramu ili jednom mililitru.

4. Određivanje broja kvasaca i plesni u g ili ml

Od priređenih uzoraka jaja, odnosno od osnovnih razređenja drugih namirnica, otpipetira se 1 ml u

Petrijeve ploče koje se zaliju rastvorenim i na 45°C ohlađenim Sabouraud maltoznim agarom. Podloga se inkubira 3 do 5 dana na sobnoj temperaturi. Posle inkubiranja, izbroje se izrasle kolonije, kao pri određivanju broja mikroorganizama u g ili ml i iskazuju kao broj kvasaca i plesni u jednom gramu ili jednom mililitru.

5. Biološki opit za dokazivanje prisustva histaminskih materija

Pripremi se, zavisno od veličine uzorka, 20 do 200 g mišićnog tkiva ribe. Makazama ili skalpelom izreže se na sitne kockice, odmeri težina i unese se u Erlenmajerovu tikvicu sa staklenim zrcima. Na jedan deo mesa dodaje se dva dela fiziološkog rastvora temperature oko 60°C. Tikvica se začepi gumenim čepom, a uzorak se jakim mućkanjem dobro homogenizira. Posle toga se ostavi 2 do 4 časa u frižideru na temperaturi 40°C do 60°C. Za to vreme tikvica se svakih 30 minuta dobro promućka. Posle toga, iscrpina se filtrira na Sertzovom filtru tako da se dobije sterilni filtrat. Mladom, zdravom zecu koji se prethodno odmeri, ubrizga se intravenozno 1 ml filtrata na jedan kilogram telesne težine i posmatra se reakcija. Ukoliko su u uzorku prisutne histaminske materije, zec vrlo brzo uginu sa simptomima anafilaktičnog šoka. Uginuće zeca smatra se dokazom prisustva štetnih količina histaminskih materija u ispitivanom uzorku.

6. Određivanje ćelijskih elemenata u mleku

Za određivanje broja ćelija u mleku, uzorak se uzima od dobro promešanog sirovog mleka. Uzorci se različito tretiraju zavisno od toga da li se za brojanje ćelija koristi direktna mikroskopska metoda ili elektronska metoda.

1) Direktna mikroskopska metoda

Pribor: mikroskop, mikropipeta, eza sa uškom promera 4 mm i debljine žice 0,3 mm, šablona sa ucrtanim kvadratom od 1 cm² i predmetno staklo za mikroskopiranje.

Reagensi: ksilol, 96%-tni alkohol i rastvor boje. Priprema rastvora boje pomeša se 370 ml alkohola, 130 ml destilovane vode i 3 g metilenskog plavila. Ta smeša se kratko vreme kuva i filtrira, a zatim joj se doda 20 ml rastvora fuksina (10 g bazičnog fuksina rastvorenog u 100 ml alkohola).

Rastvor boje se priprema dan pre upotrebe i povremeno se meša. Pre upotrebe se ponovo filtrira i doda mu se 10 ml anilina i dobro izmeša, a zatim se doda 25 ml 10%-tne sumporne kiseline i 300 ml vruće destilovane vode. Dobijena smesa se 1 minut zagreva i još jednom filtrira.

Način rada. Razmazi se prave u roku od 6 časova od uzimanja uzorka mleka. Mikropipetom se uzima 0,01 ml prethodno dobro izmešanog mleka i razmazuje na ploču za mikroskopiranje tako da površina razmaza bude 1 cm². Da bi se to postiglo koristi se šablon sa ucrtanim kvadratom. Preparati se u horizontalnom položaju suše 24 časa. Dobro osušeni preparati obezmašćuju se 5 minuta u ksilolu i fiksiraju apsolutnim alkoholom 5 minuta. Osušeni preparati potope se u rastvor za bojenje i u tom rastvoru se drže 30 sekundi a zatim isperu vodom.

Broj ćelija u 1 ml mleka izračunava se tako da se pod mikroskopom uz korišćenje imerzije, pregleda obojeni preparat i izbroje ćelije u 30 vidnih polja. Iz dobijenih brojeva izračuna se srednja vrednost koja se pomnoži faktorom mikroskopa. Dobijeni broj pomnoži se sa 100, jer se za razmazivanje uzima 0,01 ml mleka i iskazuje kao broj ćelijskih elemenata u jednom mililitru.

2) Elektronska metoda

Pribor: elektronski brojač, mikropipeta, epruveta i vodeno kupatilo na 80°C.

Reagensi: tečnost za stabilizaciju uzorka (10 ml 35%-tnog formaldehida i 0,02 geozina rastvori se u 100 ml destilovane vode i filtrira kroz filter G 4).

– elektrolit-emulgator, smesa koja se sastoji od 84,5 vol% NaCl, 1 vol% 1% formaldehida, 12,5 vol% alkohola i 2 vol% tritona x-100, koji predstavlja nejonski deterdžent octylphenolpolyetilen glykoletar. Pripremljenoj smesi se podesi pH na 7,0 sa 0,5 M rastvorom trihydroxymethylaminometana

Cl₄H₁₁NO₃, molekularne težine 121,14. Smesa se zatim filtrira kroz celuloznu acetatnu membranu sa porama ispod 0,5 mikrona. Tako pripremljeni elektrolit ima manje od 100 čestica u jednom mililitru.

Način rada. Mleko koje se ispituje ne sme sadržavati kolostrum. Stabilizacija ćelija i sprečavanje razmnožavanja bakterija postiže se dodavanjem 0,2 ml tečnosti za stabilizaciju na 10 ml mleka. Posuda sa mlekom zatvori se gumenim čepom, dobro izmeša i ostavi 24 časa na sobnoj temperaturi. Posle toga se, do dalje obrade, može držati u frižideru najduže 72 časa. Može se izvršiti i brza stabilizacija zagrevanjem na 60oC za vreme od 30 minuta.

Dobro izmešani stabilizovani uzorci razblaže se elektrolit-emulgator smesom u odnosu 1:100 (0,1 ml mleka i 9,9 ml smese). Pripremljeni uzorci drže se 10 minuta na 80oC u vodenom kupatilu i posle toga se ohlade do temperature od 20oC. Ohlađena suspenzija prelije se u posudu za brojanje, a ćelije se izbroje na elektronskom brojaču.

7. Određivanje lipolitičkih bakterija

1 ml određenog osnovnog razređenja otpipetira se u Petrijevu ploču i zalije, uz mešanje, sa oko 15 ml otopljenog i na 45oC ohlađenog tributyrin agara. Kad se podloga ukruti, ploče se inkubiraju 72 časa na temperaturi od 30oC. Kolonije lipolitičkih bakterija očituju se koncentričnom, svetlom, prozirnom zonom čija širina mora biti veća od 1 mm. Broj lipolitičkih bakterija određuje se brojanjem karakterističnih kolonija na način na koji se utvrđuje broj mikroorganizama u 1 g ili 1 ml uzorka.

8. Izolovanje i identifikacija Salmonellae

U Erlenmajerovu tikvicu zapremine 300 do 750 ml odmeri se 250, odnosno 50 g ili ml ispitivane namirnice, prethodno usitnjene (homogenizirane) u postupku pripremanja uzorka za mikrobiološku analizu. Na odmerenu količinu uzorka doda se 225, odnosno 450 ml podloge za obogaćenje, selenit bujona i mućkanjem ili vibriranjem dobro homogenizira, a zatim inkubira 18 do 24 časa na 37oC. Ako su u pitanju uzorci dehidriranih namirnica koje bubre, količinu selenit bujona treba povećati do količine koja obezbeđuje da homogenizirani uzorak ima konzistenciju retko tekuće emulzije.

Posle inkubacije, podloga se dobro promućka i po jedna eza zasejava po površini SS agara i Wilson-Blairova bizmutsulfitnog agara. Zasejane podloge se inkubiraju 24 do 48 časova na 37oC. Izrasle kolonije, za koje se sumnja da su salmonele, presejavaju se na Kliglerov dvostruki šećer. Kolonije koje i na dvostrukom šećeru daju reakcije karakteristične za salmonele, dalje se identifikuju skraćenim biohemijskim nizom. Zasejava se kosi agar sa ureom, tekuća podloga za KCN i peptonska voda za indol. Podloge se inkubiraju 24 do 48 časova na 37oC, a posle toga očitavaju rezultati prema sledećoj tablici 1.

Tablica 1

Rod	Urea	KCN	Indol
Salmonellae	-	-	-
Proteus	+	+	+ ili -

Kultura koja daje sve biohemijske reakcije na salmonele dalje se identifikuje reakcijama aglutinacije polivalentnim i monovalentnim serumima. Pre identifikacije soja aglutinacijom, treba proveriti soj i aglutinirajući serum na pojavu spontane aglutinacije. Na odgovarajuće staklo stavi se kap skupnog O (polivalentnog) aglutinirajućeg seruma za salmonele i s njom izmeša eza ispitujuće kulture. Pozitivna reakcija aglutinacije izražena je pojavom sitno zrnastih pahuljica u bistroj tečnosti, serumu.

9. Izolovanje i identifikacija koagulaza pozitivnih stafilokoka

Ako se koagulaza pozitivne stafilokoke traži u 1 g ili 1 ml uzorka, onda se ta količina koja je prethodno usitnjena i homogenizirana, zasejava u slani bujon.

Ako se koagulaza pozitivne stafilokoke traži u 0,1 g uzorka čvrste namirnice, onda se 1 ml osnovnog razređenja, takođe, zasejava u slani bujon. Zasejane epruvete bujona inkubiraju se 24 časa na 37oC. Ako se koagulaza pozitivne stafilokoke traži u 0,1 ml tekuće namirnice, ili 0,01 g čvrste namirnice, onda se 0,1 ml tekuće namirnice, odnosno 0,1 ml osnovnog razređenja čvrste namirnice zasejavaju površinski na ETGP agar po Baird-Parkeru i razmazuju staklenim štapićem. Posle inkubacije slanog bujona zasejanog sa 1 ili 0,1 g, uzorak se ezom presejava takođe na površinu ETGP agara po Baird-Parkeru.

Zasejana podloga inkubira se 24 do 48 časova na 37oC. Izrasle kolonije, karakteristične za koagulazu pozitivne stafilokoke, proveravaju se na sposobnost koagulisanja plazme, odnosno na prisustvo fermenta koagulaze.

10. Izolovanje i identifikacija sulfitoredujućih klostridija

1 ml odgovarajućeg osnovnog razređenja uzorka prenese se u epruvetu 16 x 160 mm. Epruveta se uroni u vodu, koja je u kupatilu prethodno zagrejana na 80oC i ostavi 10 minuta. Posle toga se epruveta nalije pripremljenim otopljenim sulfitnim agarom tako da udaljenost od čepa ne bude veća od 1 cm, a visina razlivena podloge ne bude niža od 14 cm. Zasejana podloga se inkubira 3 do 5 dana na 37oC. Porast karakterističnih crnih kolonija u dubini podloge, ili difuzno crnjenje cele podloge uz stvaranje plina i cepanje podloge ili bez stvaranja plina, označava se kao pozitivni prethodni ogled, odnosno kao znak verovatnog prisustva sulfitoredujućih klostridija u uzorku. Dalje se ogled izvodi tako da se od karakterističnih crnih kolonija napravi razmaz i oboji po Gramu. Istovremeno se kultura ezom prenese na krvni agar koji se inkubira aerobno 48 časova na 37oC.

Nalaz Gram pozitivnih štapića, sa ili bez spora, u mikroskopskom preparatu i izostanak rasta na krvnom agaru smatra se pozitivnim potvrdnim ogledom, odnosno dokazom prisustva sulfitoredujućih klostridija u ispitivanom uzorku.

Pri izolovanju sulfitoredujućih klostridija iz mesa trupova, polutki ili četvrtina, 1 g mesa se neposredno zasejava u Rosenowu podlogu koja se inkubira 3 do 5 dana na temperaturi od 37oC. Posle toga se u dve epruvete prenese po jedan ml kulture. Jedna epruveta se termički obrađuje a zatim se obe zalivaju sulfatnim agarom prema napred opisanom postupku. Pozitivnim nalazom smatra se rast sulfitoredujućih klostridija u jednoj ili obe epruvete.

Postupak izolovanja sulfitoredujućih klostridija iz namirnica za koje se sumnja da su izazvale trovanje, a kod kojih postoje uslovi za razmnožavanje klostridija, dopunjuje se istovremeno uporednom obradom uzoraka koji se pre zasejavanja termički ne obrađuje na napred naveden način. Pri tom se uvek zasejava serija od najmanje 4 epruvete sa razređenjima 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³ i 10⁻⁴. Pozitivnim nalazom smatra se utvrđeni rast sulfitoredujućih klostridija u termički obrađenom uzorku ili utvrđen rast u najmanje dva razređenja kod termički neobrađenog uzorka.

11. Izolovanje i identifikacija Proteus vrsta

Ako se Proteus vrste traže u jednom gramu ili jednom mililitru uzorka, onda se ta količina, koja se prethodno homogenizira, zasejava u hranljivi bujon. Ako se Proteus vrste traže u 0,1 g čvrste namirnice, onda se 1 ml osnovnog razređenja, takođe, zasejava u hranljivi bujon. Zasejane epruvete bujona inkubiraju se 24 časa na 37oC.

Ako se Proteus vrste traže u 0,1 ml tekuće namirnice, ili u 0,01 g čvrste namirnice, ili u manjim količinama, onda se 0,1 ml tekuće namirnice, odnosno 0,1 ml osnovnog razređenja, ili odgovarajućeg razređenja, zasejava na površini brilijant-zelenog agara i razmazuje staklenim štapićem. Posle inkubacije zasejanog hranljivog bujona uzorak se ezom zasejava, takođe, na površinu brilijant-

zelenog agara. Podloga se inkubira 24 do 48 časova na 37oC. Izrasle laktoza negativne kolonije, Gram negativni štapići, karakteristični za *Proteus* vrste, dalje se presejavaju na dvostruki šećer po Kligleru. Kulture sa dvostrukog šećera sumnjive na *Proteus* vrste identifikuju se dalje prema sledećoj tablici 2.

Tablica 2

Rod – vrsta	MR	VP	Urea	Simona citrat	KCN	Indol	Fenil-acetin
Salmonellae	+	-	-	+	-	-	-
Proteus	+	V	+	V	+	V	+
Escherichia coli	+	-	-	-	-	+	-

Identifikacija pojedinih *Proteus* vrsta može se izvršiti prema sledećoj tablici 3.

Tablica 3

Rod – vrsta	Glukoza	Saharoza	Maltoza	Manit	Indol	Simons citrat	HaS	Želatin	Urea	Pokretljivost
<i>Proteus vulgaris</i>	kp	+	+	-	+	V	+	+	+	+
<i>Proteus mirabilis</i>	kp	+	-	-	-	+	+	+	+	+
<i>Proteus morgani</i>	kp	-	-	-	+	-	-	-	+	+
<i>Proteus rettgeri</i>	kp	+	-	+	+	+	-	-	+	+

k = kiselina, p = plin, V = varijabilno

12. Izolovanje i identifikacija *Escherichiae coli*

1 g ili 1 ml uzorka, odnosno 1 ml određenog osnovnog razređenja, zavisno od toga u kojoj se količini određuje prisustvo *E coli*, zaseje se u epruvetu sa brilijant-zelenim laktoza žučnim bujonom sa Durhamovim cevčicama. Podloga se inkubira 24 do 48 časova na 44oC. Ako se inkubacija obavlja u termostatu sa zagrevanim vazduhom, podlogu prethodno treba zagrejati na 44oC u vodenom kupatilu. Stvaranje plina u Durhamovim cevčicama posle 24 ili 48 časova označava sumnju da je u podlozi došlo do rasta *E coli*, odnosno označuje se kao pozitivan prethodni ogled.

Iz epruveta sa pozitivnim prethodnim ogledom ezom se presejava sadržaj na površinu ljubičasto-crvenog žučnog agara koji se zatim inkubira 24 do 48 časova na 44oC 0,1oC. Rast karakterističnih kolonija *E coli* na površini podloge i nalaz Gram negativnih štapića u mikroskopskom preparatu označava se kao pozitivni potvrdni ogled. Kultura tih kolonija prenesu se na kosi agar, inkubiraju 24 časa na 37oC i identifikuju kratkim biohemijskim nizom – IMVC ogledom. Kulture se presejavaju na peptonsku vodu za indol, podlogu za izvođenje MR i VP ogleda i podlogu za dokaz korišćenja citrata. Podloge se inkubiraju 24 do 48 časova na 37oC. Posle očitavanja rezultata identifikacija *E coli* (završni ogled) obavlja se prema sledećoj tablici 4.

Tablica 4

Rod	Indol	MR	VP	Simons citrat
-----	-------	----	----	---------------

Escherichia coli	+	+	-	-
Citrobacter	-	+	-	+
Klebsiella enterobacter	-	-	+	+

13. Izolovanje i identifikacija koliformnih bakterija u gaziranim bezalkoholnim pićima

Prethodni ogled u pet epruveta sa po 10 ml i u jednu epruvetu sa 50 ml peptonske vode sa laktozom i Andradeovim indikatorom dvostruke koncentracije s Durhamovim cevčicama unese se po 10, odnosno 50 ml uzorka iz kojeg je odstranjen ugljen-dioksid. Epruvete se inkubiraju 24 časa na 37oC. Posle toga utvrđuje se aciditet podloge i stvaranje plina u Durhamovim cevčicama. Aciditet podloge i stvaranje plina označavaju pozitivni prethodni ogled. Epruvete bez aciditeta podloge i bez plina inkubiraju se sledeća 24 časa, a stvaranje plina u cevčicama i aciditeta podloge posle te inkubacije, označava se sto tako kao pozitivni prethodni ogled.

Odsustvo plina u cevčicama i aciditeta podloge posle inkubacije od 48 časova označava se kao negativni prethodni ogled, odnosno kao dokaz odsustva koliformnih bakterija u ispitivanom uzorku. Potvrđni ogled izvodi se tako da se iz epruveta sa pozitivnim prethodnim ogledom, ezom presejava sadržaj na površinu ljubičasto-crvenog žučnog agara, koji se zatim inkubira 24 do 48 časova na 37oC. Rast karakterističnih crvenih kolonija i nalaz Gram negativnih štapića u mikroskopskom preparatu smatra se pozitivnim potvrđnim ogledom, odnosno dokazom prisustva koliformnih bakterija u ispitivanom uzorku.

Ako se utvrdi rast atipičnih kolonija, rezultat se ne može uzeti kao negativni potvrđni ogled, pa je potrebno izvršiti završni ogled.

Završni ogled nekoliko atipičnih kolonija prenesu se ezom u peptonsku vodu s laktozom i Andradeovim indikatorom jednostruke koncentracije i na kosi agar. Podloge se inkubiraju 24 do 48 časova na 37oC. Stvaranje aciditeta podloge i plina u Durhamovim cevčicama i nalaz Gram negativnih asporogenih štapića u razmazu kulture sa kosog agara uzima se kao pozitivni završni ogled, odnosno kao dokaz prisustva koliformnih bakterija u ispitivanom uzorku.

Iz utvrđenog broja epruveta sa pozitivnim nalazom koliformnih bakterija na peptonskoj vodi s laktozom i Andradeovim indikatorom, a prema sledećoj tablici 5, odredi se najverovatniji broj koliformnih bakterija u 100 ml.

Tablica 5

Broj epruveta s pozitivnim nalazom	Najverovatniji broj MPN koliformnih bakterija u 100 ml uzorka	
1 epruveta sa 50 ml podloge	5 epruveta sa 10 ml podloge	
0	0	0
0	1	1
0	0	2
0	3	4

0	4	5
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	beskrajan

K = stvaranje kiseline, RKG = redukcija, stvaranje kiseline i zgrušavanje, V = varijabilno

5. Izolovanje i identifikacija *Streptococcus beta haemolyticus*

Ako se *Streptococcus beta haemolyticus* traži u 0,1 g čvrste namirnice, onda se 1 ml osnovnog razređenja zasejava na bujon za beta streptokoke koji se inkubira 18 do 24 časa na 37oC. Posle inkubiranja, kap bujona se prenese na površinu krvnog agara za beta streptokoke i staklenim štapićem pažljivo razmaže.

Za tačne namirnice 0,1 ml uzorka se kapaljkom direktno prenese na površinu krvnog agara za beta streptokoke i staklenim štapićem pažljivo razmaže. Posle toga se ploče krvnog agara inkubiraju 24 časa na 37oC. Kolonije *Streptococcus beta haemolyticus* na krvnom agaru stvaraju potpunu hemolizu, koja se označava kao hemoliza. Sumnjive kolonije proveravaju se mikroskopski, a zatim se odredi serološka pripadnost grupama A, C i G, precipitacijom ili aglutinacijom.

Deo drugi

PODLOGE I REAGENSI

1. Hranljivi agar

Sastav:	
- ekstrakt kvasca	2,5 g,
- tripton	5,0 g,
- glukoza	1,0 g,
- agar	12 do 18 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se rastvore u destilovanoj vodi, pH proveriti i dotera na 6,5 do 7,0, podloga razlije u boce ili epruvete i sterilise u autoklavu 20 minuta na 120oC. Do upotrebe čuva se na 4 do 6oC.

Pre upotrebe podloga se otopi, ohladi do 45oC i razliva u Petrijeve ploče sa inokuliranim razređenjima uzoraka.

2. Hranljivi bujon

Sastav:	
- pepton	15,0 g,
- ekstrakt mesa	3,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g,
- kalijum fosfat (K ₃ PO ₄)	0,3 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se rastvore, razliju u epruvete ili boce i sterilišu 15 minuta na 120oC.

3. Hranljivi agar sa skrobom

Sastav:	
- tripton	10,0 g,
- ekstrakt kvasca	1,0 g,
- glukoza	1,0 g,
- skrob	1,0 g,
- agar	15,0 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se postupnim zagrevanjem rastvore u destilovanoj vodi, pH proveriti i dotera na 7,2, razlije u boce ili epruvete i steriliše u autoklavu 20 minuta na 120oC.

4. V L agar za anaerobne sporogene bakterije

Sastav:	
- tripton	10,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g,
- ekstrakt mesa	4,0 g,
- ekstrakt kvasca	5,0 g,
- glukoza	2,0 g,
- hlorhidrat cistein	0,3 g,

- skrob	1,0 g,
- agar	15,0 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se zagrevanjem rastvore, pH dotera na 7,4 i podloga se razlije po 25 ml u epruvete veličine 20 x 200 mm i sterilize u autoklavu 20 minuta na 120oC

5. Selenit bujon

- pepton	0,5%,
- laktoza	0,4%,
- natrijum selenit (Na ₂ Se ₂ O)	0,4%,
- natrijum fosfat (Na ₃ PO ₄)	1,0%.

Sastojci se rastvore u prethodno prokuvanoj destilovanoj vodi, u sterilnoj posudi. Podloga se koristi odmah posle pripremanja, odnosno za svako ispitivanje priprema se sveža podloga. Gotova podloga treba da ima pH 7,0.

Mogu se koristiti i gotove dehidrirane podloge prema uputstvu proizvođača.

6. Wilson-Blairov bizmutsulfitni agar

Sastav:	
- pepton	1,0%,
- ekstrakt mesa	0,5%,
- dekstroza	0,5%,
- natrijum fosfat (Na ₃ PO ₄)	0,4%,
- ferosulfat (FeSO ₄)	0,03%,
- bizmutsulfit indikator	0,8%,
- agar	2,0%,
- brilijant-zeleno	0,0025%.

Sastojci se rastvore u sterilnoj destilovanoj vodi i ostave 15 minuta. Uz pažljivo zagrevanje, podloga se otopi, ohladi na oko 50oC, dobro promeša da se precipitat ujednači i odmah razliva u Petrijeve ploče. Podloga se ne sterilize, a pH treba da je 7,7. Pre upotrebe razlivenu podlogu u Petrijevim pločama treba držati 4 dana na 4oC. Kolonije salmonela na podlozi su crne s metalnim sjajem i mogu se zapaziti tek posle inkubacije od 24 časa na 37oC. Kolonije bez tih karakteristika su atipične i ne

smatraju se sumnjivim na salmonele.

Mogu se koristiti i gotove dehidrirane podloge, čiji sastav odgovara sastavu koji je dat u ovoj tački.

Bizmutsulfit indikator

- bizmut amonijum citrat	3,0 g,
- natrijum sulfit (Na_2SO_3)	10,0 g,
- dinatrijev fosfat (Na_2HPO_4)	5,0 g,
- dekstroza	5,0 g.

Sastojci se rastvore u 100 ml destilovane vode zagrevanjem do ključanja. Ohlađen rastvor se dodaje u osnovu podloge prema navedenom sastavu.

7. SS agar

Sastav:	
- pepton	5,0 g,
- ekstrakt mesa	5,0 g,
- laktoza	10,0 g,
- žučne soli	8,5 g,
- natrijum citrat ($\text{C}_6\text{H}_5\text{Na}_8\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)	8,5 g
- natrijum tiosulfat ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{C}_3 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	3,5 g
- fericitrat ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)	1,0 g,
- agar	13,0 g,
- neutralno crvenilo	0,023 g,
- brilijant-zeleno	0,00033 g.

Žučne soli mogu se zameniti sa 100 ml sveže goveđe žuči.

Sastojci se stave u 1000 ml hladne destilovane vode, dobro se promeša i ostavi da stoji 15 minuta.

Posle toga se zagrevanjem sastojci potpuno otope i podesi se na pH 7,0. Ohladi se do 60°C, dobro se promeša i razliva se u Petrijeve ploče. Podloga se ne sterilizuje u autoklavu.

Razlivene ploče suše se u termostatu 1 do 2 časa pre upotrebe. Razlivena podloga može se nekoliko dana čuvati na hladnom mestu do upotrebe.

8. Kosi agar

Hranljivi agar se otopi zagrevanjem i po 7 ml razlije u epruvete 16 x 160 mm. Sterilizuje se u

autoklavu 15 minuta na 120oC. Bez hlađenja se iskosi tako da se dobije odgovarajuća kosa površina. Može se čuvati na temperaturi 4 do 6oC i koristiti sve dok se stvoreni kondenzat ne osuši.

9. Dvostruki šećer po Kligleru

Sastav:	
- ekstrakt mesa	0,3%,
- ekstrakt kvasca	0,3%,
- pepton	2,0%,
- laktoza	1,0%,
- dekstroza	0,1%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%,
- ferosulfat (FeSO4)	0,2%,
- natrijum tiosulfat (Na2S2O3 5H2O)	0,03%,
- agar	2,0%,
- fenolno crvenilo	0,0024%.

Sastojci se zagrevanjem otope u destilovanoj vodi pH podesi na 7,4. Po 7 ml razlije se u epruvete 16 x 160 mm i steriliše se u autoklavu 15 minuta na 120oC. Podloga se iskosi, kao za kosi agar i ohladi. Pri ispitivanju, kultura se zaseje po kosini, a posle toga ubodom eze u stupčić na dnu epruvete. Posle inkubacije od 24 ili 48 časova na 37oC, salmonele daju sledeće reakcije:

- kosi deo podloge je crven (laktoza negativna),
- stupčić podloge je žut (dekstroza pozitivna),
- plin se ne stvara,
- sumporovodonik (crna boja podloge) se stvara ili ne stvara.

Mogu se koristiti i gotove podloge proizvođača, prema navedenom sastavu

10. Kosi agar sa ureom po Christensenu

Sastav:	
- pepton	0,1%,
- dekstroza	0,1%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%,
- monokalijum fosfat (KH2PO4)	0,2%,

- urea	2,0%,
- fenolno crvenilo	0,0012%,
- agar	1,5%.

1,5 agara u prahu rastvori se u 90 ml destilovane vode i steriliše se u autoklavu 15 minuta na 120oC. Neposredno pre upotrebe agar se otopi i ohladi na oko 50oC. Tada mu se doda 10 ml rastvora koji sadrži pepton, dekstrozu, natrijum hlorid, kalijum fosfat, ureu i fenolno crvenilo u navedenim koncentracijama. Svi se ti sastojci rastvore u sterilnoj destilovanoj vodi i odmah koriste. Po 3,5 do 4 ml podloge razlije se u epruvete 12 x 120 mm i u kosom položaju ohladi pH podloge treba da je 6,9. Ispitivana kultura, sumnjiva na salmonele ili proteuse, zasejava se ezom po kosini i ubodom u stupčić podloge. Pozitivna (ureza pozitivna) reakcija očituje se pojavom crvene boje podloge, a zasejana kultura raste i na kosom delu podloge.

Mogu se koristiti i gotove dehidrirane podloge prema navedenom sastavu.

11. Kosi fenilalanin agar

Sastav:	
- pepton	10,0 g,
- dikalijum fosfat (K ₂ HPO ₄)	1,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g,
- ekstrakt kvasca	3,0 g,
- LD fenilalanin ili L fenilalanin	2,0 ili 1,0 g,
- agar	12,0 g,
- destilovana voda	1000,0 ml.

Sastojci se rastvore zagrijavanjem, razliju po 5 ml u epruvete 16 x 160 mm. Prethodno se podesi pH na 7,2. Sterilišu se u autoklavu 20 minuta na 120oC, a posle toga se iskose, kao za kosi agar i ohlade. Zasejana podloga se inkubira 18 do 24 časa na 37oC. Posle inkubacije prelije se izrasla kultura sa 4 do 5 kapi 10% rastvora ferihlorida (FeCl₃). Pozitivna reakcija očituje se pojavom tamnozelene boje kulture i tečnosti koja iščezava posle 30 minuta.

12. Tekuće podloge za KCN ogled

Sastav:	
- proteoza pepton	0,3%,
- dinatrijum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	0,564%,

- monokalijum fosfat (KH ₂ PO ₄)	0,0225%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%.

Sastojci se rastvore u destilovanoj vodi, pH podesi na 7,6, razlije se u boce po 100 ml i steriliše se u autoklavu 15 minuta na 120oC. Ohladi se na oko 20oC i na 100 ml doda 1,5 ml 0,5% rastvora kalijum cijanida (KCN).

Rastvor kalijum cijanida priprema se tako što se 0,5 ml kalijumovog cijanida stavi trbušastom kapaljkom u 100 ml destilovane vode.

Po 2 ml podloge razlije se u sterilne epruvete 1 x 120 mm, koje se zatvore gumenim čepom.

Kulture, sa 24 časa starog bujona, zaseju se ezom. Ako mikroorganizam raste u prisustvu KCN podloga se zamuti.

Može se koristiti i gotova dehidrirana podloga, koja odgovara navedenom sastavu.

13. Peptonska voda za dokazivanje stvaranja indola

Sastav:	
- pepton (koji sadrži tripofan)	1,0%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%.

Pepton i natrijum hlorid rastvore se zagrijavanjem u destilovanoj vodi, po 10 ml podloge razlije se u epruvete 16 x 160 mm i steriliše se 15 minuta na 120oC.

pH gotove podloge treba da je 7,5.

Reakcija je specifična za mikroorganizme koji razlažu triptofan (aminokiselinu sa indolovim prstenom), pa je zbog toga obavezno da se on nalazi u podlozi. Podloga ne sme sadržavati šećer, jer šećer ometa reakciju stvaranja indola.

Stvoreni indol, u podlozi zasejanoj ispitivanom kulturom, dokazuje se pomoću reagensa A i B i ksilola ili Kovačevog reagensa.

Reagens A (Erhehov reagens):

- paradimetilaminobenzaldehid (PMAB)	1,0 g,
- alkohol (96%)	95 ml,
- koncentrovana hlorovodonična kiselina	20 ml.

U alkoholu se mućkanjem otopi PMAB, a posle toga doda hlorovodonična kiselina.

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

Kovačev reagens.

- paradimetilaminobenzaldehid	5,0 g,
- amil alkohol (ili isamyl)	75 ml,
- koncentrovana hlorovodonična kiselina	25 ml.

U podlogu koja pokazuje rast bakterija doda se 1 ml ksilola i snažno promućka, da se izdvoji indol. Epruveta se ostavi da se ksilol izdvoji na površini, pa se polako niz zid doda 1 ml rastvora A. Ako u podlozi ima indola, na granici ksilola i podloge pojavíće se crveni prsten. Da je crveni prsten zaista rezultat stvorenog indola, dokazuje se dodavanjem nekoliko kapi rastvora B koji boju pojačava.

14. Brilijant-zeleni agar

Sastav:	
- ekstrakt kvasca	0,3%,
- pepton	1,0%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%,
- laktoza	1,0%,
- saharoza	1,0%,
- fenolno crvenilo	0,008%,
- brilijant-zeleno	0,00125%,
- agar	2,0%.

Sastojci se rastvore blagim zagrevanjem (da ne dođe do ključanja) u destilovanoj vodi. Podlozi se doda 1,25 ml 0,1% vodenog rastvora brilijant-zelenog. Udesi se pH na 6,9 do 7,2; razlije se u manje boce i sterilíše se 15 minuta na 120oC. Kolonije bakterija koje ne razlažu laktozu ne menjaju boju podloge, imaju svetloružičasto opalescentnu boju i malog su promera za *Salmonellae*, a mogu se spajati i činiti tanak sloj za *Proteus*. Bakterije koje razlažu laktozu menjaju pH podloge i stvaraju žuto-zelene kolonije (koliformne).

Mogu se koristiti gotove dehidrirane podloge prema uputstvu proizvođača.

15. Brilijant-zeleni laktoza žučni bujon

Sastav:	
- pepton	10,0 g,
- laktoza	10,0 g,
- sveža goveđa žuč ili 200 ml 5% rastvora goveđe dehidrirane žuči	200 ml,
- destilovana voda	786,7 ml.

U prokuvanoj destilovanoj vodi rastvore se pepton i laktoza, doda se žuč (ili 5%-tni rastvor goveđe dehidrirane žuči), a posle toga 13,3 ml 0,1% vodenog rastvora brilijant-zelenog. Po 9 ml podloge razlije se u epruvete 15 x 160 mm Durhamovim cevčicama i sterilíše se u autoklavu 20 minuta na 115oC.

pH podloge treba da je 7,2.

Escherichia coli na 44,5oC u podlozi stvara plin, koji se skuplja u Durhamovim cevčicama.
16. Ljubičasto-crveni žučni agar (VRB, violet-red bile agar)

Sastav:	
- ekstrakt kvasca	0,3%,
- pepton	0,7%,
- žučna so br. 3	0,15%,
- laktoza	1,0%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%,
- agar	2,0%,
- neutralno crvenilo	0,003%,
- kristalviolet	0,002%.

Svi sastojci, osim kristalviolet-indikatora, rastvore se u prokuvanoj destilovanoj vodi. Po 100 ml podloge razlije se u manje boce i sterilize se 15 minuta na 120oC. Posle sterilizacije pH se podesi na 7,4. Ako se odmah koristi, podloga se ohladi na oko 50oC, pa se doda na svakih 100 ml, 0,1 ml 0,2% vodenog rastvora kristalvioleta. Podloga se može čuvati na 4 do 6oC.

Escherichia coli stvara na podlozi purpurnocrvene kolonije, promera 1 do 2 mm, okružene crvenkastom zonom precipitirane žuči.

Preporučuje se korišćenje gotove dehidrirane podloge, prema navedenom sastavu.

17. Podloga za izvođenje MR i VP oglada (Metil red i Voges Proskauer)

Sastav:	
- proteoza pepton	0,5%,
- dikalujum fosfat (K ₂ HPO ₄)	0,5%,
- glukoza	0,5%.

Sastojci se rastvore u destilovanoj vodi, podloga se razlije u epruvete i sterilize se 15 minuta na 150oC. Gotova podloga treba da ima pH 6,9.

18. MR (Metil red) ogled

Ovim se ogledom na osnovu pH vrednosti određuje stepen fermentacije glukoze, specifične osobine nekih mikroorganizama. Zasejana podloga sa ispitujućom kulturom mikroorganizama inkubira se 24 do 48 časova na 37oC. Razlaganje glukoze pod dejstvom ispitujućeg mikroorganizma dokazuje se reagensom sa metilnim crvenilom kao indikatorom.

Sastav reagensa:	
------------------	--

- metilno crvenilo	0,1 g,
- alkohol (96%)	250 ml,
- destilovana voda	250 ml.

Posle inkubiranja podloge sa zasejanom kulturom, doda joj se 5 do 6 kapi reagensa na oko 10 ml podloge. Pojava crvene boje podloge označava da je u podlozi razlaganjem glukoze nastala kiselina i promena pH vrednosti, a to ujedno znači i pozitivan MR ogled.

19. VP (Voges Proskauer) ogled

Za ovaj se ogled koristi ista podloga kao i za MR ogled, a najintenzivnije razlaganje glukoze dokazuje se dejstvom fermentata nekih mikroorganizama. Pored ostalih proizvoda razgradnje, stvara se i acetilmetilkarbinol čije se prisustvo dokazuje specifičnim reagensima A i B (po Barrittu).

Reagens A:	
- alfa naftol	5 g,
- alkohol (96%)	100 ml.

Mućkanjem, u staklenoj posudi, alfa naftol se otopi u alkoholu i koristi bez filtriranja.

Reagens B: 40% vodeni rastvor kalijum hidroksida (KOH).

Na 1 ml podloge, zasejane kulturom koja se ispituje, posle inkubiranja doda se 0,6 ml reagensa A i 0,2 ml reagensa B. Dobro se promućka i ostavi da se razvije reakcija. Ako u podlozi ima acetilmetilkarbinola javlja se ružičasta do tamnocrvena boja, što istovremeno označava pozitivan VP ogled.

20. Dokaz korišćenja citrata po Simonsu

Neki mikroorganizmi pripadnici familije enterobakterija koriste citrat kao jedini izvor ugljenika, odnosno mogu rasti u podlozi koja sadrži natrijum citrat kao jedini izvor ugljenika.

Sastav:	
- magnezijum sulfat ($\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$)	0,02%,
- amonijum fosfat (NH_4), PO_4	0,1%,
- dikalijum fosfat (K_2HPO_4)	0,1%,
- natrijum citrat ($\text{C}_2\text{H}_5\text{Na}_3\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$)	0,2%,
- natrijum hlorid (NaCl)	0,5%,
- bromtimolplavo	0,008%,
- agar	2,0%.

Sastojci se rastvore zagrevanjem u destilovanoj vodi. Podesi se pH na 6,8 i po 5 do 8 ml razlije se u epruvete. Steriliše se 15 minuta na 120°C. Podloga se iskosi i hladi kao kod kosog agara.

Mikroorganizmi koji se koriste citratom rastu stvarajući kolonije koje menjaju podloge u plavo. Mogu se koristiti i gotove dehidrirane podloge prema datom sastavu.

21. Slani bujon sa 10% natrijum hlorida

Sastav:	
- pepton	15,0 g,
- ekstrakt mesa	3,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	100,0 g,
- dikalijum fosfat (K ₂ HPO ₄)	0,3 g,
- destilovana voda	1000 ml.

pH podloge treba da bude 9,2.

Po 9 ml podloge razliva se u epruvete i sterilise se 15 minuta na 120oC.

22. ETGP agar po Baird-Parkeru

Sastav:	
- tripton	1,0%,
- ekstrakt mesa	0,5%,
- litrijum hlorid (LiCl)	0,5%,
- ekstrakt kvasca	0,1%,
- agar	2,0%.

Postupnim zagrevanjem sastojci se rastvore u destilovanoj vodi, a ako je potrebno pH se podesi na 7,0. U boce se razlije po 100 ml podloge i sterilise se 15 minuta na 120oC.

Otopljenoj i na oko 45oC ohlađenoj podlozi, neposredno pre upotrebe doda se:

- 6 ml 20% rastvora glicina (H₂NCH₂COOH)
- 1 ml 1% rastvora kalijum telurita (K₂TeO₃)
- 5 ml 20% rastvora natrijum piruvata (CH₃COCOONa)
- 5 ml žumanca od svežeg jajeta homogeniziranog mućkanjem
- 1 ml 0,4% rastvora sulfodimidina.

Podloga se mućkanjem homogenizuje i razliva se u Petrijeve ploče.

Kolonije Staphylococcus aureusa su sitne crne kao ugljen, okružene svetlom zonom liziranog lecitina.

Mogu se koristiti i gotove dehidrirane podloge prema datom sastavu.

23. Bromkrezol purpurni agar po Baird-Parkeru

Sastav:	
- tripton	1,0%,

- ekstrakt kvasca	0,1%,
- glukoza	1,0%,
- bromkrezol purpur	0,004%,
- agar	0,5%.

Postupnim zagrijavanjem u destilovanoj vodi sastojci se rastvore i pH podesi na 7,2. Po 10 ml podloge razlije se u epruvete 16 x 160 mm i sterilize 20 minuta na 115oC.

Podloga se koristi za ispitivanje oksidacijsko-fermentacijskog testa, kojim se diferenciraju rodovi *Micrococcus* i *Staphylococcus*.

Ispitivana kultura zaseje se u dve epruvete ubodom do dna podloge. U jednu se epruvetu preko podloge prelije sloj parafina ili nehranljivog agara, debljine oko 1 cm.

Na temperaturi inkubacije od 37oC u trajanju 1 do 5 dana stafilokoke rastu anaerobno i razlažu glukozu pri čemu podloga od ljubičastoplave, zbog promene indikatora, dobija žutu boju Mikrokoke rastu samo aerobno i slabo oksidativno menjaju boju na površini podloge.

24. Test koagulaze plazme

Opit služi za dokazivanje fermentata koji koaguliraju plazmu čoveka, kunića i nekih drugih vrsta. Za ta ispitivanja može se koristiti sveža ili dehidrirana plazma kunića ili čoveka, nerazređena ili razređena fiziološkim rastvorom do odnosa 1 : 5. Dehidrirana plazma restituira se prema uputstvu proizvođača. Pri korišćenju sveže ili restituirane plazme, u tri sterilne epruvete stavi se po 0,5 do 1 ml. U jednu se ezom unese kultura koja se ispituje, u drugu ista količina kulture poznatog kaougulaza pozitivnog stafilokoka, a treća služi kao kontrola plazme. Epruvete se inkubiraju na temperaturi od 37oC, a reakcije se očitavaju posle 2, 4, 6 i 24 časa, jer sojevi koji stvaraju fibrinolizin mogu razgraditi nastali koagulum što bi imalo za posledicu pogrešno očitavanje rezultata. Pozitivna reakcija očituje se potpunom koagulacijom plazme u prvoj i drugoj epruveti, dok u trećoj epruveti ne sme doći do koagulacije.

25. Rosenowa podloga

Sastav:	
- tripton	10,0 g,
- ekstrakt mesa	3,0 g,
- dekstroza	2,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	2,0 g,
- L-cistin	0,3 g,
- fuksin S	0,015 g.
pH podloge treba da je 7,2.	

Sastojci se rastvore u 1000 ml destilovane vode, uz zagrijavanje do ključanja. Po 10 ml podloge razlije se u epruvete uz dodatak komadića mramora i kockice zaleđenog goveđeg mozga. Sterilize se

15 minuta na 120oC.

26. Sulfitni agar

Sastav:	
- tripton	15,0 g,
- ekstrakt kvasca	10,0 g,
- destilovana voda	750 ml,
- voda za piće (aqua fontis)	250 ml

Sastojci se postupnim zagrijavanjem otope, podesi se pH na 7,0, razlije u boce po 100 ml i steriliše se 15 minuta na 120oC. Podloga se čuva na 6 do 8oC.

Neposredno pre upotrebe, na 100 ml otopljene i na oko 45oC ohlađene podloge dodaju se rastvori:

- 1 ml 5% vodenog rastvora citrata gvožđa ($\text{FeC}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$),
- 1 ml 5% vodenog rastvora natrijum sulfita ($\text{Na}_2\text{SO}_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),
- 1 ml 1% vodenog rastvora kalijum permanganata (KMnO_4)

Sulfitoredukujuće klostridije, na ovoj podlozi, rastu u obliku okruglih crnih kolonija. Crna boja kolonija i njihove okoline nastaje stvaranjem gvožđa sulfida, u redukciji vodonikovog sulfida, s prisutnim trovalentnim gvožđem.

27. Sabouraud maltozni agar

Sastav:	
- pepton	1,0%,
- maltoza	4,0%,
- agar	2,0%.

Sastojci se zagrijavanjem rastvore u destilovanoj vodi, podesi se pH na 5,6, razlije u boce na 100 ml i steriliše se 15 minuta na 120oC.

Neposredno pre upotrebe, na 100 ml otopljene i na 45oC ohlađene podloge doda se:

- 1ml 1% rastvora hloramfenikola i
- 1 ml 1% rastvora oksitetraciklina.

Podloga se dobro izmeša i razlije se u Petrijeve ploče inokulirane sa uzorcima.

28. Krvni agar za beta streptokoke po Liebermeisteru i Bravenyu

Sastav:	
- pepton	1,0 g,
- ekstrakt mesa	0,6 g,
- ekstrakt kvasca	0,5 g,

- L (+) – Lysin	0,02 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	6,0 g,
- dinatrijum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	2,0 g,
- agar	15,0 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Postupnim zagrevanjem sastojci se zagreju u destilovanoj vodi, pH proveriti i dotera do 7,2. Podloga se razlije u boce i sterilise se u autoklavu 15 minuta na 121oC. Posle sterilizacije boce se rashlade do 50oC i aseptički doda 10% defibrinirane ovčije ili konjske krvi. Pažljivo se promeša i podloga se razliva u sterilne Petrijeve ploče.

29. Bujon za beta streptokoke po Liebermeisteru i Bravenyu

Sastav:	
- pepton	1,0 g,
- ekstrakt mesa	0,6 g,
- ekstrakt kvasca	0,5 g,
- L (+) – Lysin	0,02 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	6,0 g,
- dinatrijum fosfat (Na ₂ HPO ₄)	2,0 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se stave u destilovanu vodu i zagrevanjem do ključanja, uz mešanje, dobro otope. Kad se bujon ohladi do 37oC, pH se dotera na 7,3, razlije se po 10 ml u epruvete i sterilise se 15 minuta na 121oC.

30. Tributyrin agar

Sastav:	
- agar	20,0 g,
- pepton	5,0 g,
- ekstrakt kvasca	10,0 g,
- voda za piće	1000 ml,
- tributirin	10,0 ml.

Svi navedeni sastojci, osim tributirina, rastvore se zagrijavanjem na temperaturi od 100oC, zatim se podloga rashladi na 60oC, doda se tributirin i meša u mikseru jedan minut, razlije se u boce i sterilize se u autoklavu 15 minuta na 115oC. pH podloge treba da je 7,5.

31. Peptonska voda sa laktosom i Andradeovim indikatorom (LAP)

Sastav:		
	Jednostruka koncentracija	Dvostruka koncentracija
- tripsični pepton	10,0 g,	20,0 g,
- laktoza	5,0 g,	10,0 g,
- Andradeov indikator	10,0 ml,	20,0 ml,
- destilovana voda	1000,0 ml	1000,0 ml.
Andradeov indikator		
- kiseli fuksin	0,5 g,	
- destilovana voda	100,0 ml.	

Titrira se na n/1 NaOH kap po kap iz birete uz stalno mešanje, tako da se od crvene dobiva žuta boja i za to je potrebno 18 ml NaOH. Rastvor stoji 24 časa na sobnoj temperaturi, profiltrira se i dodaje podlozi u količini koja odgovara za jednostruku, odnosno dvostruku koncentraciju.

Sastojci se rastvore u destilovanoj vodi uz zagrijavanje, profiltrira se, pH se dotera na 6,9 do 7,0, razlije se po 10 ml u epruvete 220 x 22 mm Durhamovom cevčicom veličine 6 x 30 mm. Sterilizuje se 20 minuta u autoklavu na 120oC.

32. Dokazivanje sumpor-vodonika (H₂S) na filter-papiru

Vrpce filter-papira za dokazivanje H₂S nakvašene rastvorom olovnog acetata (100 ml vode prokuva se i doda 5 g olovnog acetata, promeša se i još jednom prokuva) iseku se tako da im širina iznosi 1 cm a dužina 10 cm, osuše se u termostatu i uglavljaju uz čep epruveta s peptonskom vodom tako da papir nije od površine podloge udaljen više od 2 cm. Ako su zasejane bakterije koje proizvode H₂S, dolazi do redukcije olovnog acetata u olovni sulfid i filter-papiri postane jače ili slabije sivocrne boje.

33. Hanny-Nortonov bujon

Sastav:	
- proteaza pepton	10,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g,
- dikalijum fosfat (K ₂ HPO ₄)	5,0 g,
- monokalijum fosfat (K ₂ H ₂ PO ₄)	2,0 g,
- glukoza	5,0 g,

- ekstrakt kvasca	3,0 g,
- natrijum azid (NaN ₃)	0,25 g,
- 1,6% alkoholni rastvor bromkrezolpurpura	2 ml,
- destilovana voda	do 1000 ml.

Sastojci se uz postupno zagrevanje otope. pH podesi na 6,8, razlije se u epruvete po 10 ml podloge i sterilise se 15 minuta na 120oC.

34. Agar s teluritom

Sastav:	
- pepton	10,0 g,
- ekstrakt mesa	10,0 g,
- natrijum hlorid (NaCl)	5,0 g,
- ekstrakt kvasca	3,0 g,
- glukoza	5,0 g,
- agar	20,0 g,
- destilovana voda	1000 ml.

Sastojci se zagrevanjem otope. Podesi se pH na 7,1 i razlije se po 20 ml u epruvete 20 x 200 mm.

Steriliše se 15 minuta na 120oC.

Pre upotrebe, otopljenoj i na oko 45oC ohlađenoj podlozi doda se 1 ml na jednu epruvetu 0,8% vodenog rastvora kalijum telurita (K₂TeO₃). Posle dobivanja rastvora kalijumovog telurita, u Petrijeve ploče zasejava se površno razmazivanjem 0,1 ml uzorka i inkubira 24 do 48 časova na 37oC. Kolonije *Streptococcus faecalis* su sitne, okrugle i crne.

35. Krvni agar

Sastav:	
- hranljivi agar	100 ml,
- defibrinisana ovčja, konjska ili teleća krv	5 do 10 ml.

Hranljivi agar se otopi držanjem boce u ključaloj vodi, ohladi se na 45oC, doda mu se krv, dobro se izmeša i odmah se razliva u Petrijeve ploče uz plamenik, kojim se brzo prelazi preko tek razlivena površine, čime se obezbeđuje sterilnost i istiskuju mehurići zraka.