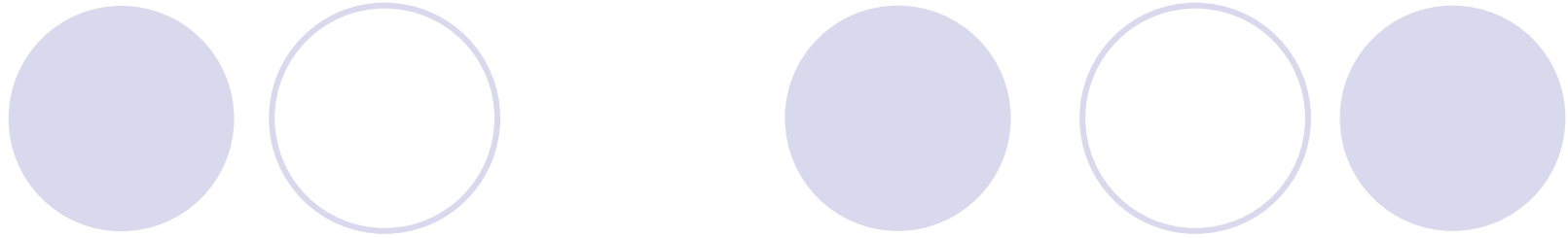


# **ISTRAŽIVANJE MIKROORGANIZAMA MIKROSKOPIMA**



**Mikroskop** (grč. mikros=malen, sitan; skopeo= gledam) je optički instrument koji se upotrebljava za promatranje objekata, kao što su mikroorganizmi, koji su presitni da bi se mogli vidjeti golim okom - to je osnova primjene mikroskopa za stvaranje slike mikrobnog svijeta.

razvoj:

- **1600.** god. Zacharias i Hans Janssen konstruirali prvi složeni mikroskop
- **1625.**god. Giovanni Faber - daje naziv mikroskopu
- **1665.**god. Robert Hooke primitivnim mikroskopom otkrio žive stanice
- **1674.**god. Antony van Leeuwenhoek pomoću jednostavnog mikroskopa (bikonveksna leća umetnuta između mjedenih ploča) otkrio nevidljive oblike života - “najsitnije životinje” tj. mikroorganizme

**Mikroskopi koji se danas koriste sastavljeni su od niza optičkih i mehaničkih djelova, a u osnovi razlikujemo dva tipa: svjetlosne i elektronske mikroskope.**

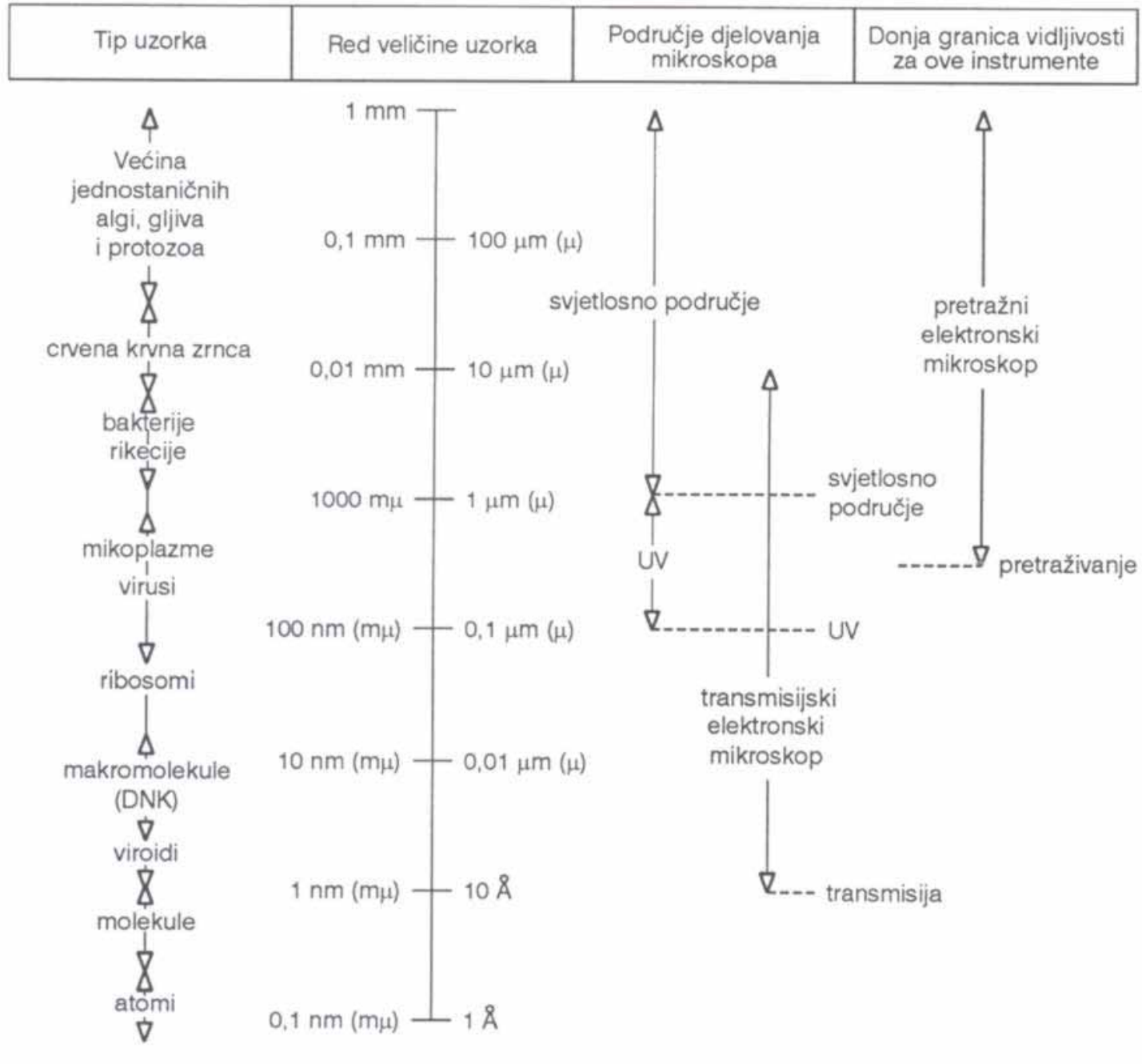
**Svjetlosni ili optički mikroskopi:**

- mikroskop s svjetlim vidnim poljem
- mikroskop s tamnim vidnim poljem
- fluorescentni mikroskop
- fazno-kontrastni mikroskop

**Elektronski mikroskop**

- transmisijski mikroskop
- pretražni elektronski mikroskop

**Grafički prikaz tipova uzoraka što se istražuju često upotrebljavan im mikroskopima u mikrobiologiji i srodnim područjima. Prikazan je i djelotvoran domet tih instrumenata**

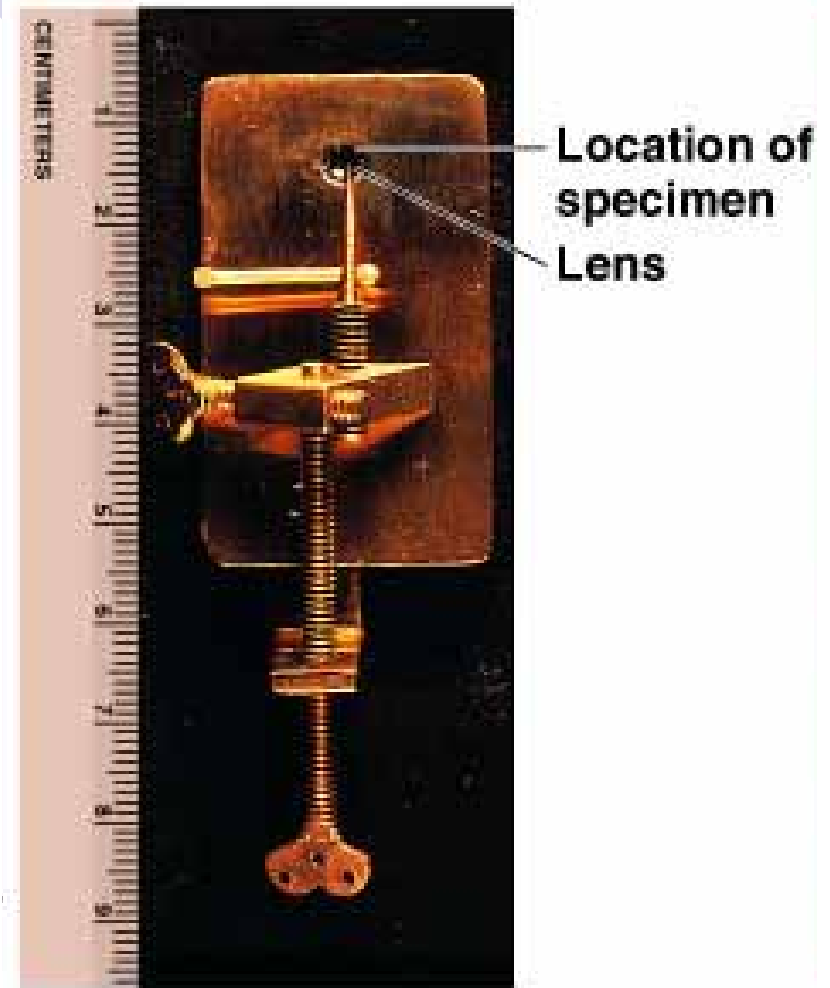


Tablica 9-1: Usporedba i mogućnosti različitih tipova mikroskopa

Tip mikroskopa	Moć razdvajanja	Izgled slike	Primjena
<b>Svjetlosni</b>	100–200 nm	Obojeni ili neobojeni jasan preparat na svijetloj pozadini	Istraživanje obojenih organizama za detaljniju strukturu
<b>S tamnim vidnim poljem</b>	100–200 nm	Dobiva se svijetla slika uzorka na tamnoj pozadini	Istraživanje neobojenih živih organizama ili organizama koji se uobičajenim postupcima teško boje. U preparatima je moguće promatranje pokretanja mikrobnih stanica
<b>Fazno kontrastni</b>	100–200 nm	Preparat ima različite stupnjeve svijetlih i tamnih površina	Detaljna istraživanja unutarnje strukture živih neobojenih organizama
<b>Nomarski</b>	50–100 nm	Proizvodi gotovo trodimenzionalnu sliku	Istraživanje finih detalja unutarnje strukture živih neobojenih organizama
<b>Fluorescentni</b>	100–200 nm	Svijetli, fluorescentni, obojeni uzorak na tamnoj pozadini	Dijagnostički uređaj za određivanje organizama ili antitijela u kliničkim uzorcima ili u imunološkim istraživanjima
<b>Transmisijski elektronski mikroskop</b>	0,2–1 nm	Visoka moć razdvajanja, izvrsno se vide detalji slike; slika nije trodimenzionalna izuzimajući određivanje sjena preparata	Istraživanje ultratankih presjeka stanica radi uočavanja detalja unutrašnje strukture, vanjskih dijelova stanica i virusa ili površina prijeloma smrznutih stanica
<b>Pretražni ("scanning") elektronski mikroskop</b>	1–10 nm	Trodimenzijska slika površina	Istraživanje vanjskih površina stanica, a mogu se istraživati i unutarnje strukture

# JEDNOSTAVNI MIKROSKOP

- SAMO JEDNA LEĆA



**(b) Microscope replica**

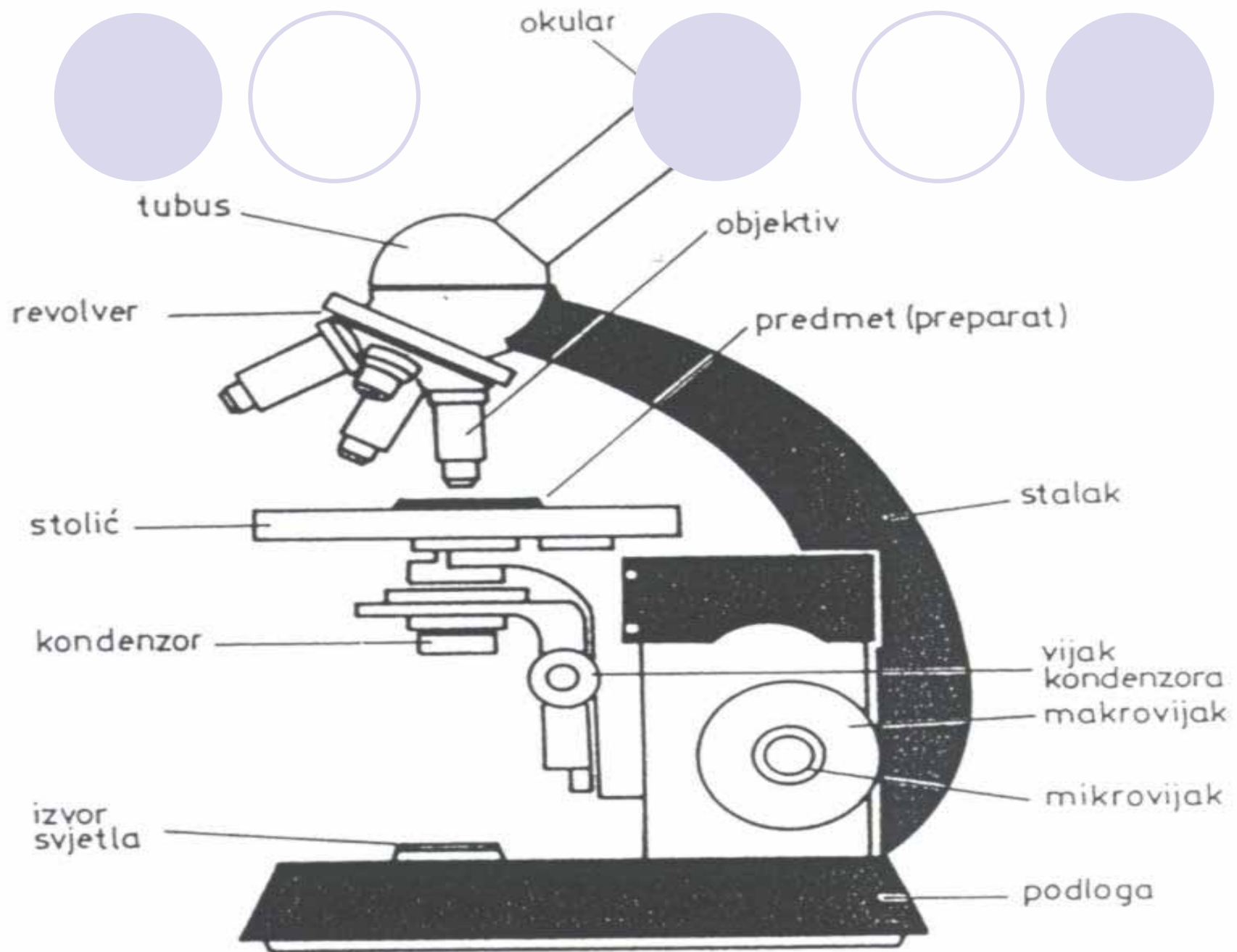
## Složeni svjetlosni mikroskop



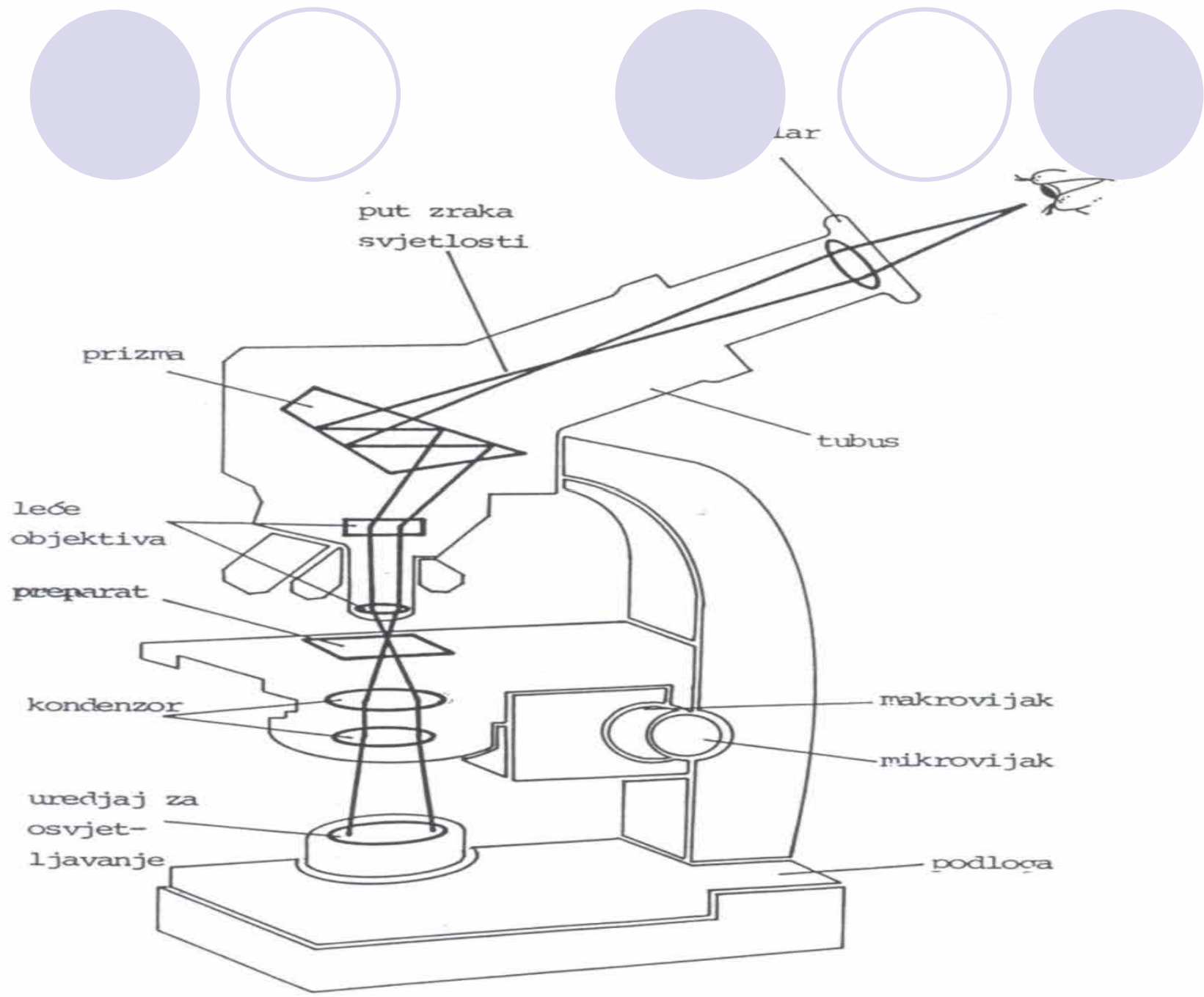
- **sastoji se najmanje dvaju sustava leća: objektiva koji povećava uzorak i okulara koji povećava sliku što je dobivena od objektiva.**
- **kao izvor svjetlosti u složenom mikroskopu se upotrebljava vidljivi dio spektra**
- **upotrbljava se za istraživanje vrlo sitnih objekata, a i njihove fine detalje ili ultrastrukture**
- **ukupno povećanje mikroskopa dobiva se tako da se pomnoži povećanje objektiva s povećanjem okulara**

### **Mehanički dijelovi mikroskopa:**

**postolje (podloga)**  
**stativ (ručica)**  
**tubus s revolverom**  
**stolić mikroskopa**  
**makrovijak i mikrovijak**  
**uređaj za osvjetljavanje**







put zraka  
svjetlosti

prizma

leće  
objektivna

preparat

kondenzor

uredjaj za  
osvjet-  
ljavanje

tubus

makrovijak

mikrovijak

podloza

okular

# Optički dijelovi - služe za uvećavanje i osvjetljavanje predmeta koji se promatraju

## 1. OKULAR

- kratka cijev koja sadrži dvije leće (gornja ili okularna i donja ili sabirna leća)
- nalazi se na gornjem kraju tubusa
- povećanja okulara su: 1x, 2x, 5x, 10x, 15x

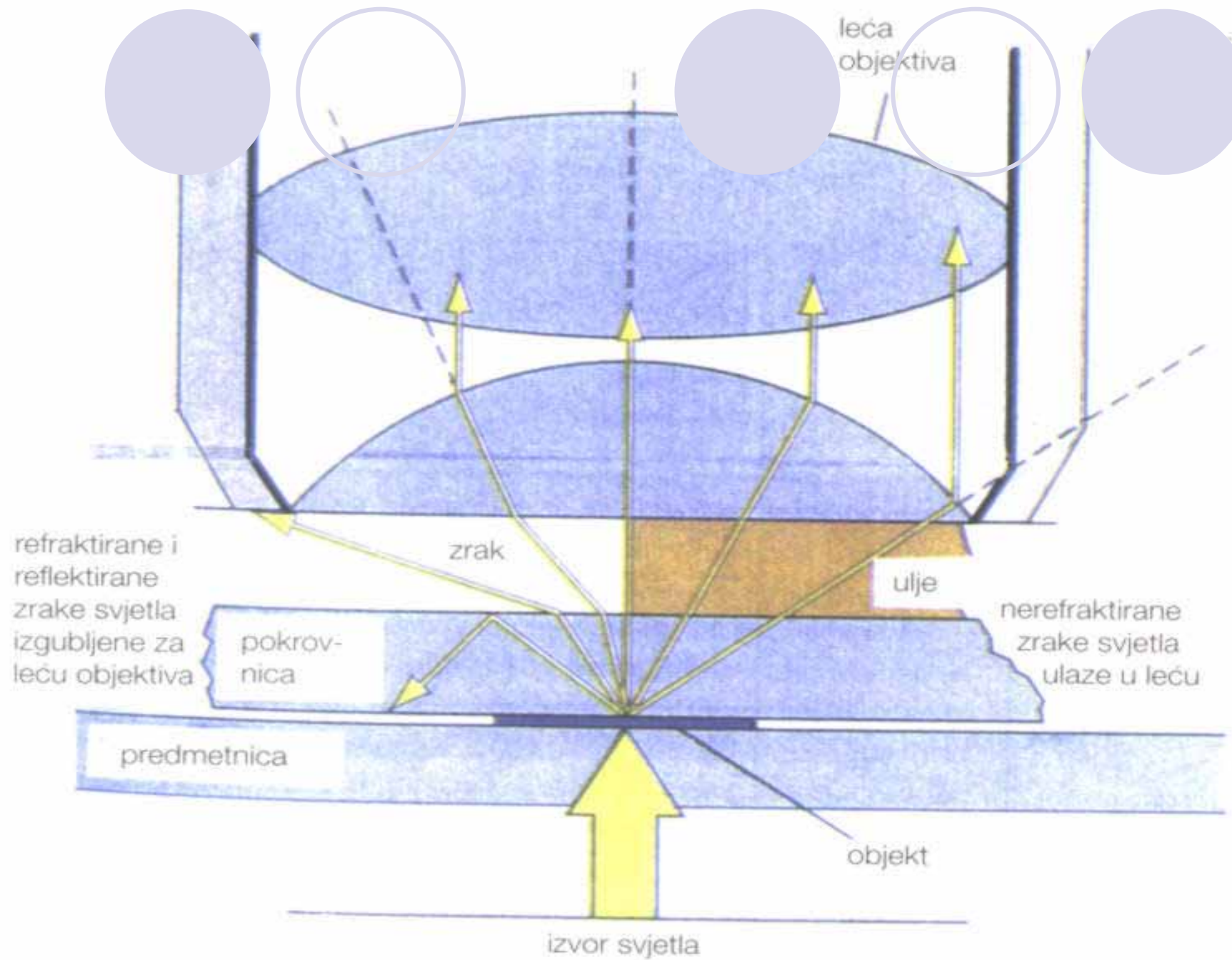
## 2. OBJEKTIV

- najvažniji optički dio mikroskopa
- leće objektiva služe za skupljanje i koncentriranje zraka svjetlosti koje dolaze iz preparata i za povećavanje stvorene slike predmeta
- **MOĆ RAZDVAJANJA** - najvažnija osobina objektiva - sposobnost leće da istakne fine detalje i strukturu
- većina mikroskopa ima 3 objektiva s različitim povećanjima:
  - malo povećanje (10x)
  - srednje povećanje (40x)
  - veliko povećanje (100x)

**Prema načinu promatranja preparata razlikujemo 2 sistema objektivna:**

- a) SUHI sistem objektivna** - za promatranje gljiva, algi, protozoa
- između frontalne leće i preparata nalazi se zrak
  - zrak nema isti indeks refrakcije kao staklo te dolazi do prelamanja svjetlosnih zraka
  - malo i srednje povećanje

- b) ULJNO IMERZIONI (MOKRI) sistem objektivna** - za promatranje bakterija, njihovih oblika i rasporeda stanica
- između preparata i frontalne leće nalazi se imerzijska tekućina (anisol, cedrovo ulje i sl.) kojoj je indeks refrakcije blizu indeksa refrakcije stakla
  - veliko povećanje



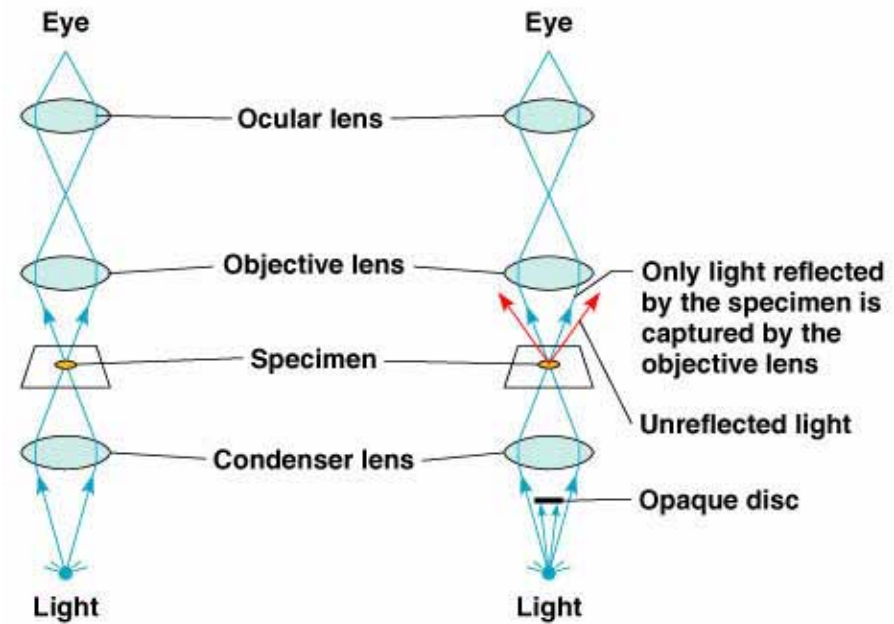


### **3. KONDENZOR I IRIS-ZASLON**

- **kondenzor se nalazi ispod stolića mikroskopa između izvora svjetla i promatranog preparata**
- **sastoji se od sustava leća koje sabiru svjetlosne zrake i usmjeravaju ih prema promatranom preparatu**
- **iris-zaslون služi za kontrolu intenziteta svjetla tj. za reguliranje količine svjetla koja ulazi u kondenzor**

# SVIJETLO POLJE

- TAMNI OBJEKTI SU VIDLJIVI U ODNOSU NA SVIJETLU POZADINU.



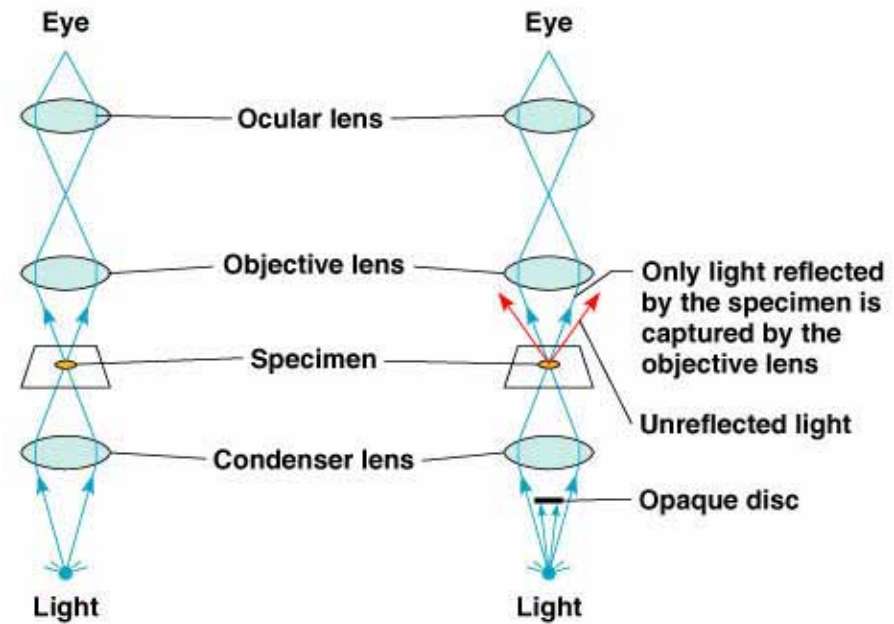
(a) Brightfield



(b) Darkfield

# TAMNO POLJE

- SVIJETLI OBJEKTI SU VIDLJIVI U ODNOSU NA TAMNO POLJE



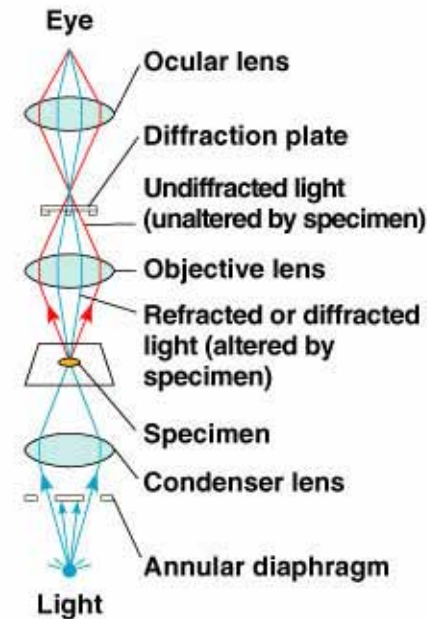
(a) Brightfield



(b) Darkfield

# FAZNO KONTRASNI MIKROSKOP

- POJAČAVA  
DIFRAKCIJU  
SVIJETLA KOJE  
PROLAZI KROZ  
UZORAK



(c) Phase-contrast



# FLUORESCENTNI MIKROSKOP

- UPOTREBLJAVA SE UV SVIJETLO.
- FLUORESCENTNE TVARI ADSORBIRAJU UV SVIJETLO I EMITIRAJU VIDLJIVO SVIJETLO
- STANICE SE MOGU BOJATI FLUORESCENTNIM BOJAMA

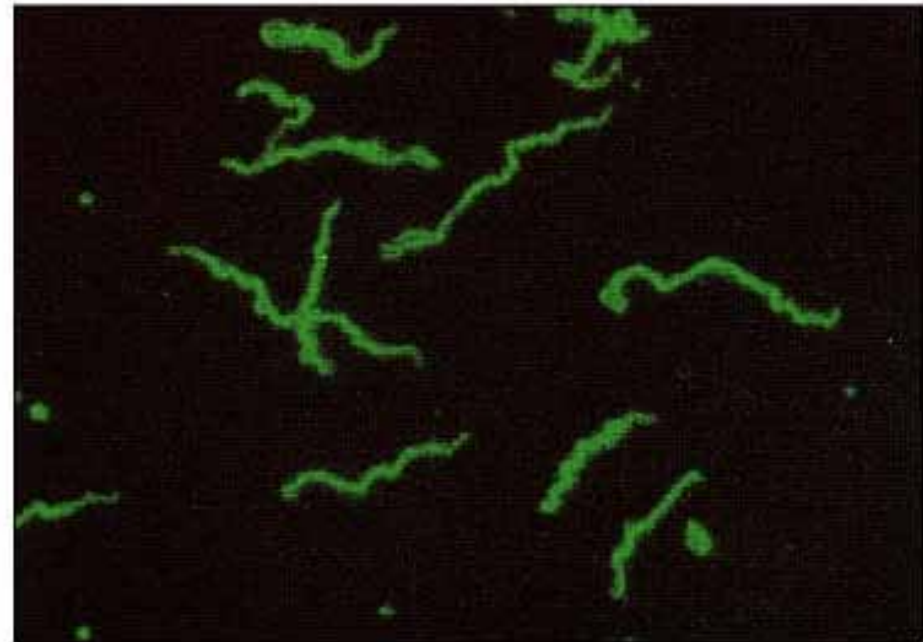


Figure 3.6b

# KONFOKALNI MIKROSKOP

- UPOTREBLJAVAJU SE FLUOROKROMI I LASERI.
- LASER OSVJETLJAVA SVAKI SLOJ UZORKA I STVARE SE 3 D SLIKA

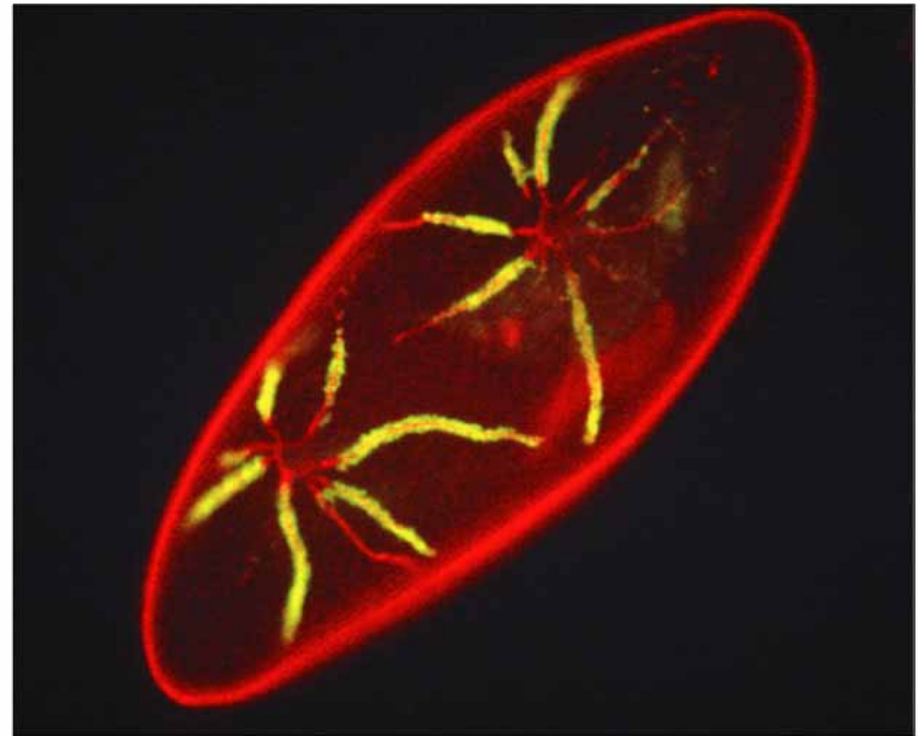


Figure 3.7

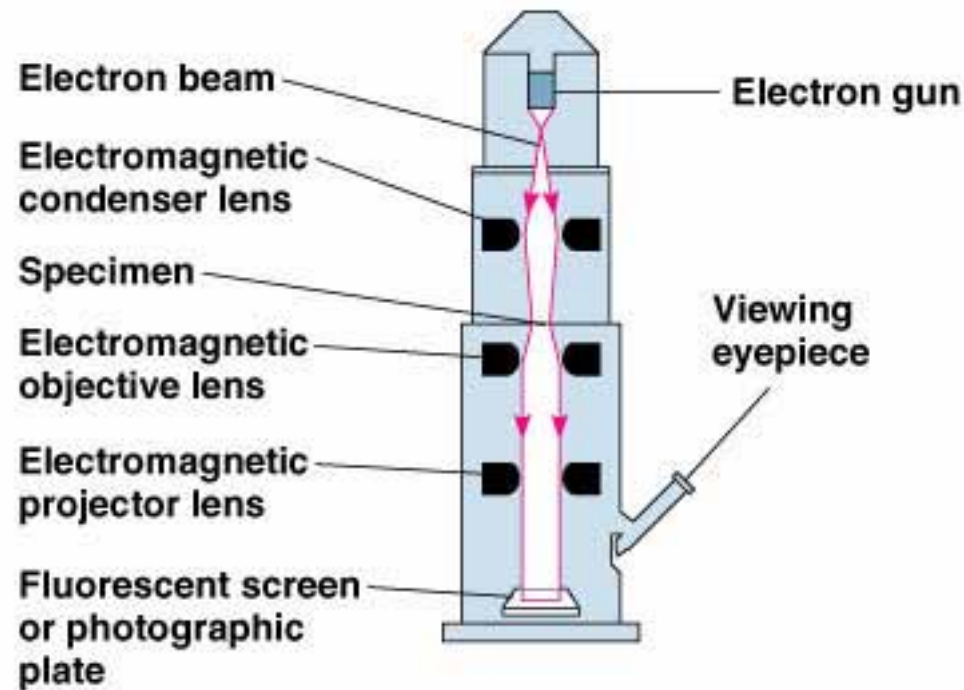
# ELEKTRONSKI MIKROSKOP



- UPORABA ELEKTRONA UMJESTO SVIJETLA
- NIŽA VALNA DULJINA ELEKTORNA DAJE BOLJU REZOLUCIJU.

# TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (TEM)

- **ULTRA TANKE SEKCIJE UZORKA**
- **SVIJETLOST PROLAZI KROZ UZORAK, ONDA KROZ ELEKTORMAGNETSKU LEĆU DO FILMA.**
- **UZORKA SE MOŽE OBOJITI SA SOLIMA TEŠKIH METALA.**



# TRANSMISIJSKI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (TEM)

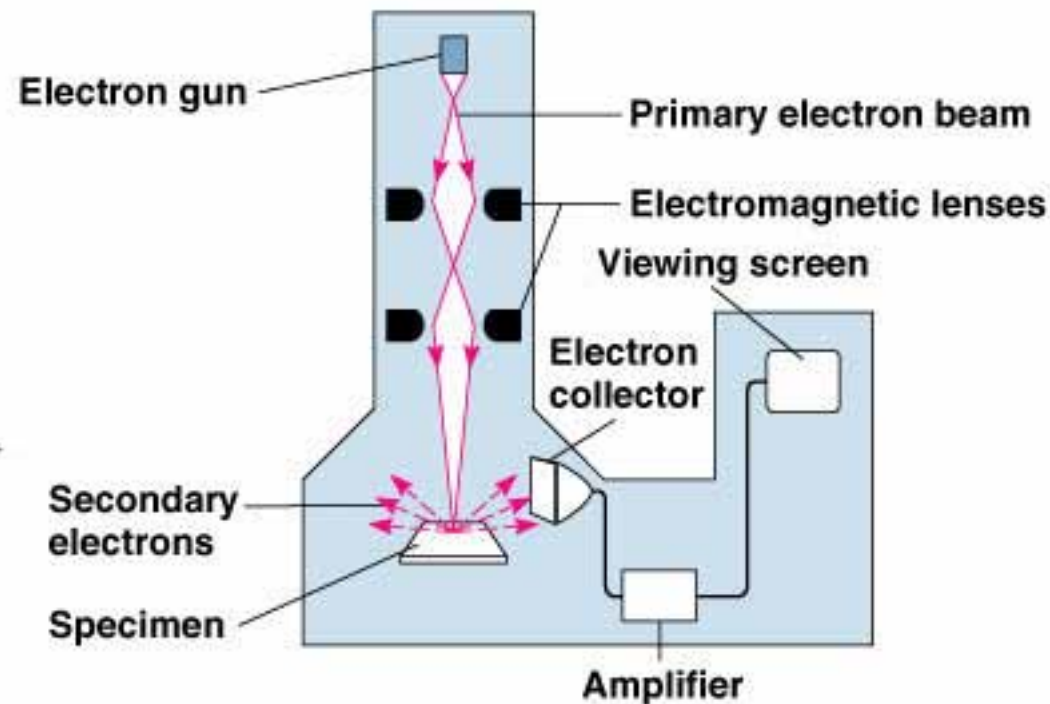
- 10,000-100,000 $\times$ ; rezolucija 2.5 nm



Figure 3.8a

# SKENIRAJUĆI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)

- SNOB ELEKTRONA SKENIRA POVRŠINU CJELOKUPNOG UZORKA.
- ELEKTRONI EMITIRANI OD UZORKA STVARAJU SLIKU.



# SKENIRAJUĆI ELEKTRONSKI MIKROSKOP (SEM)

- 1000-10,000×; rezolucija 20 nm

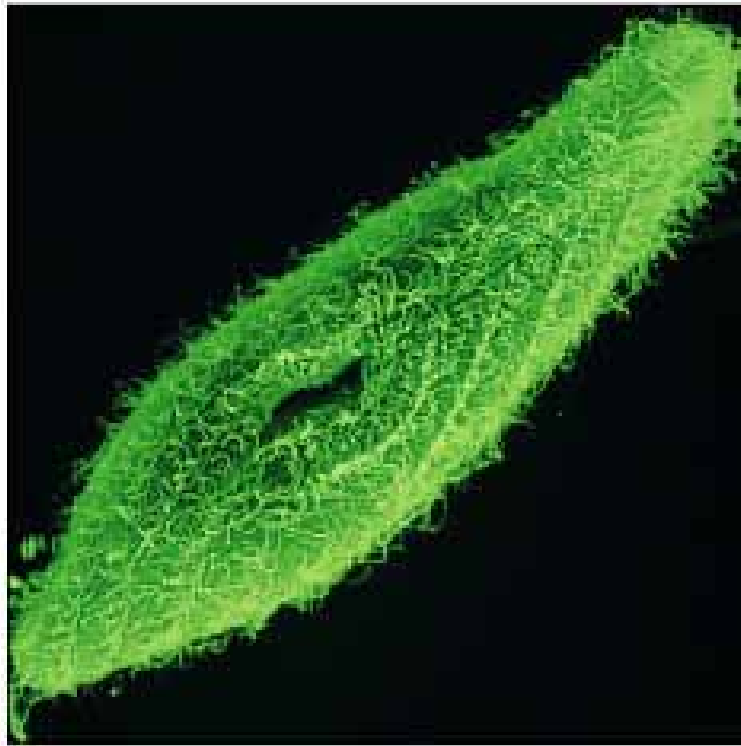


Figure 3.8b

# Priprava uzorka za mikroskopiranje svjetlosnim mikroskopom

Mikroskopski preparati služe nam za promatranje morfoloških karakteristika mikroorganizama. Dijelimo ih u dvije kategorije:

- 1. NEOBOJENI (NATIVNI) PREPARATI**
- 2. OBOJENI PREPARATI**

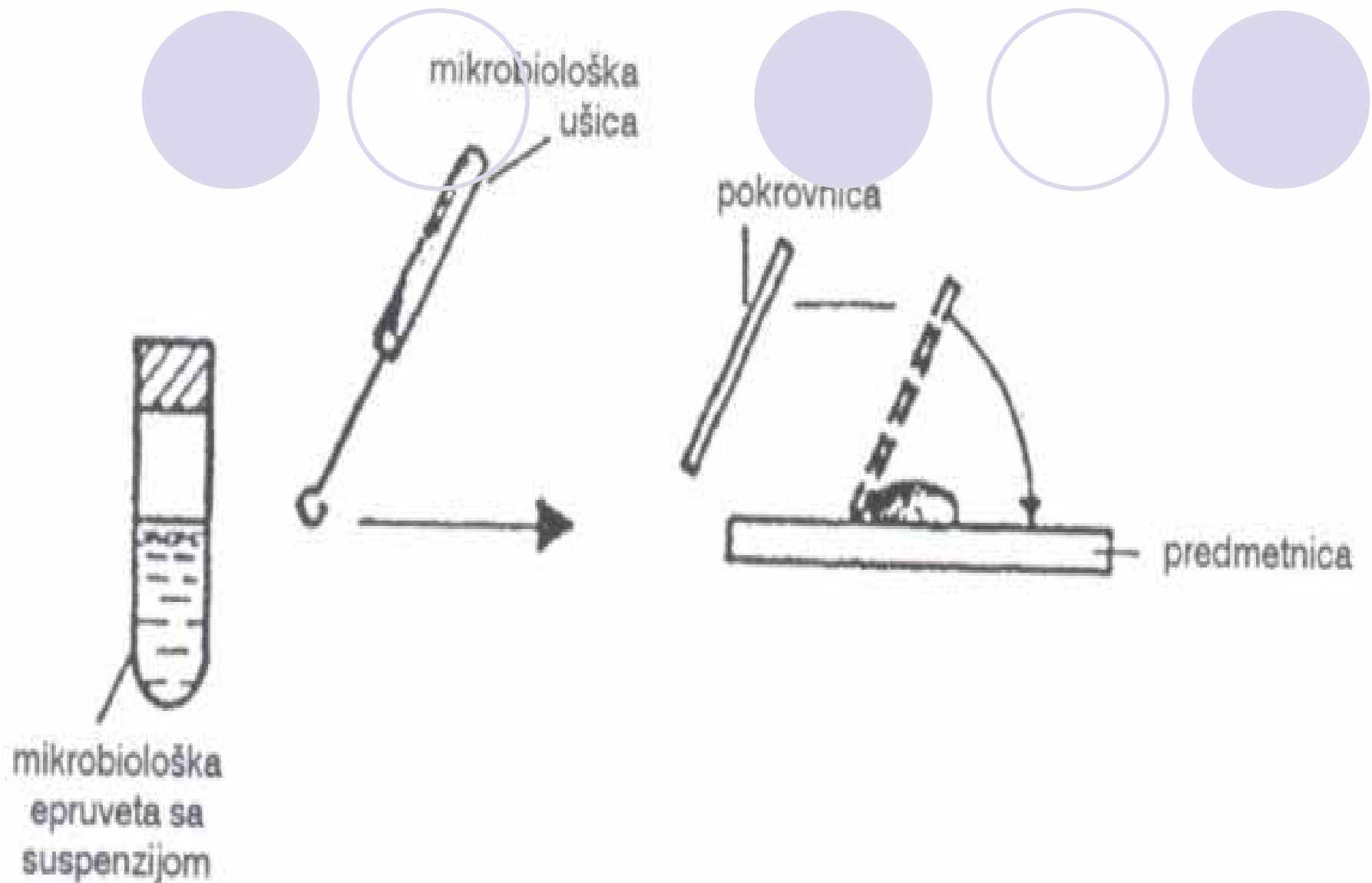
## **1. NEBOJENI (NATIVNI) PREPARATI**

- koriste se za mikroskopiranje živih mikroorganizama gdje se jasno vide veći mikroorganizmi (kvasci, plijesni, alge, veće bakterije). Mikroskopiraju se pod povećanjem od 400x

Vrste nebojenih preparata:

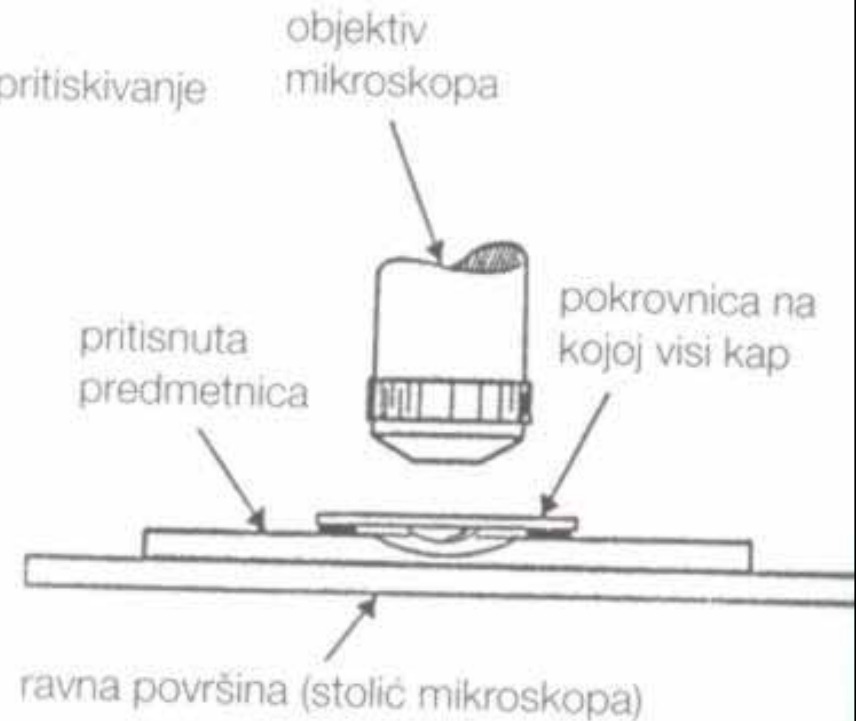
- a) vlažni preparati**
- b) viseća kap - za određivanje pokretljivosti bakterijskih stanica**





*Slika 8-1: Shematski prikaz pripravljanja vlažnog preparata.*

# Priprema preparata viseća kap



## **2. OBOJENI PREPARATI**

**-većina mikroorganizama je bezbojna, a da bismo ih mogli istraživati svjetlosnim mikroskopom, moramo ih obojati**

**Obojeni preparati omogućuju:**

- bolje i detaljnije izučavanje mikroorganizama**
- bolje uočavanje pojedinih struktura (spore, st. stjenka)**
- razlikovanje različitih tipova mikroorganizama**

### **MIKROBIOLOŠKE BOJE**

**Bojila za bojanje mikrobnih stanica najčešće su u obliku soli, u kojima je jedan od iona nosilac boje – kromogeni dio.**

**Sposobnost bojila da se veže na makromolekulske komponente stanice ovisi o električnom naboju na kromogenom dijelu, a i o staničnim komponentama koje se boje.**

**a) KISELA (anionska) bojila – imaju negativan naboj i afinitet prema pozitivno nabijenim dijelovima stanice**

- kiseli fuksin (crveno), eozin (crveno), eritrozin (crveno), fluorescein (žuto), nigrozina (crno)**

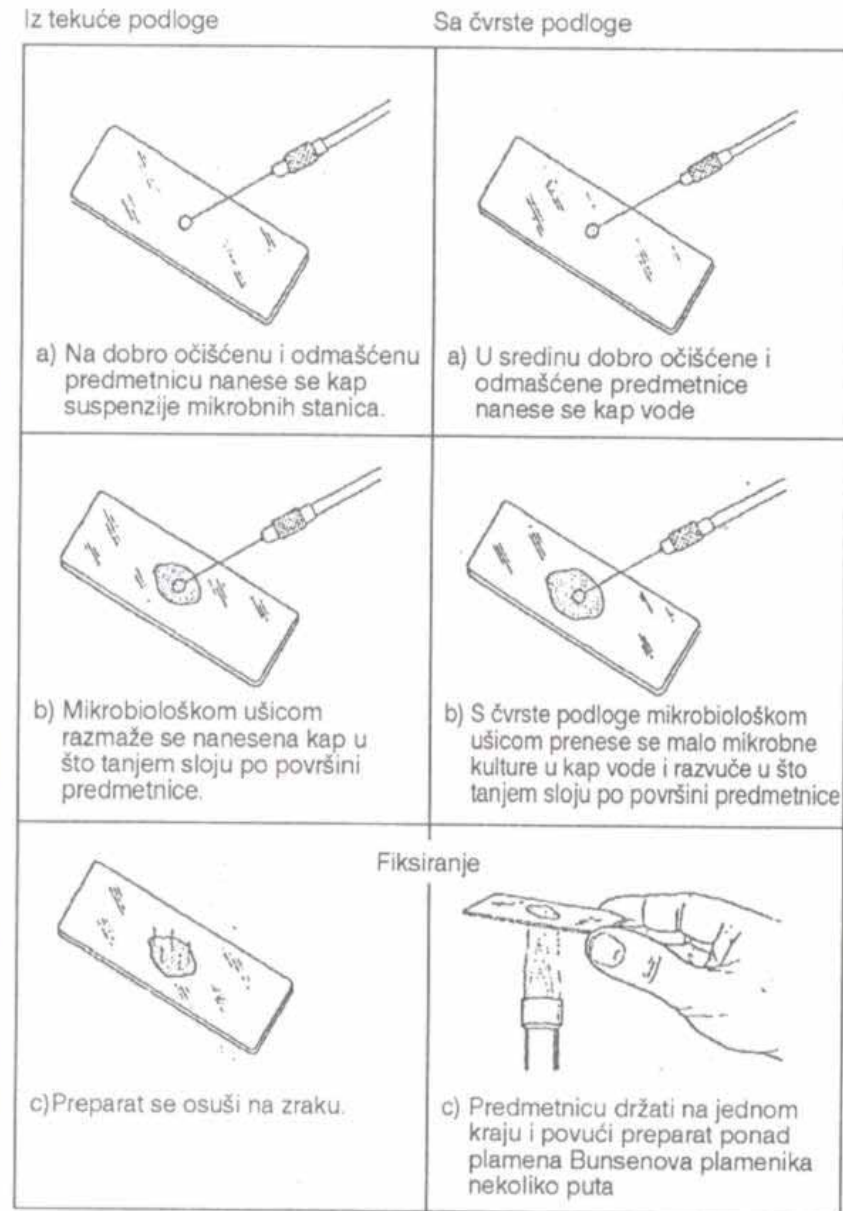
**b) BAZIČNA (kationska) bojila – imaju pozitivan naboj te afinitet prema negativno nabijenim dijelovima stanice**  
**- metilensko modrilo (plava), gentiana violet (ljubičasta), karbol fuksin (crveno)**

**Vrste postupaka bojenja:**

- JEDNOSTAVNO bojenje – koristi se jedno bojilo, služi za vizualizaciju morfološkog oblika**
- DIFERENCIJALNO bojanje – upotreba dvaju kontrastnih bojila**
  - izdvajanje u skupine (bojanje po Gramu)**
  - vizualizacija struktura (bojanje čahura, spora, bičeva, jezgre)**

# JEDNOSTAVNO BOJANJE – postupak:

- 1. Priprema preparata za bojanje**
  - odmaščivanje stakalca
  - nanošenje kapljice vode
  - nanošenje mikrobne kulture u kap vode
  - ezom se nanese kap razmaže po površini predmetnice
  - sušenje na zraku
  - fiksiranje
- 2. Bojanje s jednom mikrobiološkom bojom**
- 3. Ispiranje vodom nakon bojanja**
- 4. Sušenje pomoću upijajućeg papira**
- 5. Mikroskopiranje uz kap anisola i najveće povećanje mikroskopa**



Slika 8-6: Priprava preparata za bojenje.

(1) nanašanje boja  
na prečišćen  
preparat

(2) razvlačenje  
preparata u  
jednako  
tanjem sloju

(3) sušenje na zraku

(4) fiksiranje u plamenu

(5) dodavanje kristal violeta, a potom  
lugola (1-2 min)

(6) ispiranje 96%  
etanolom

(7) ispiranje  
vodom

(8) dodavanje safranina  
(ili karbol fuksina)  
(5 min)

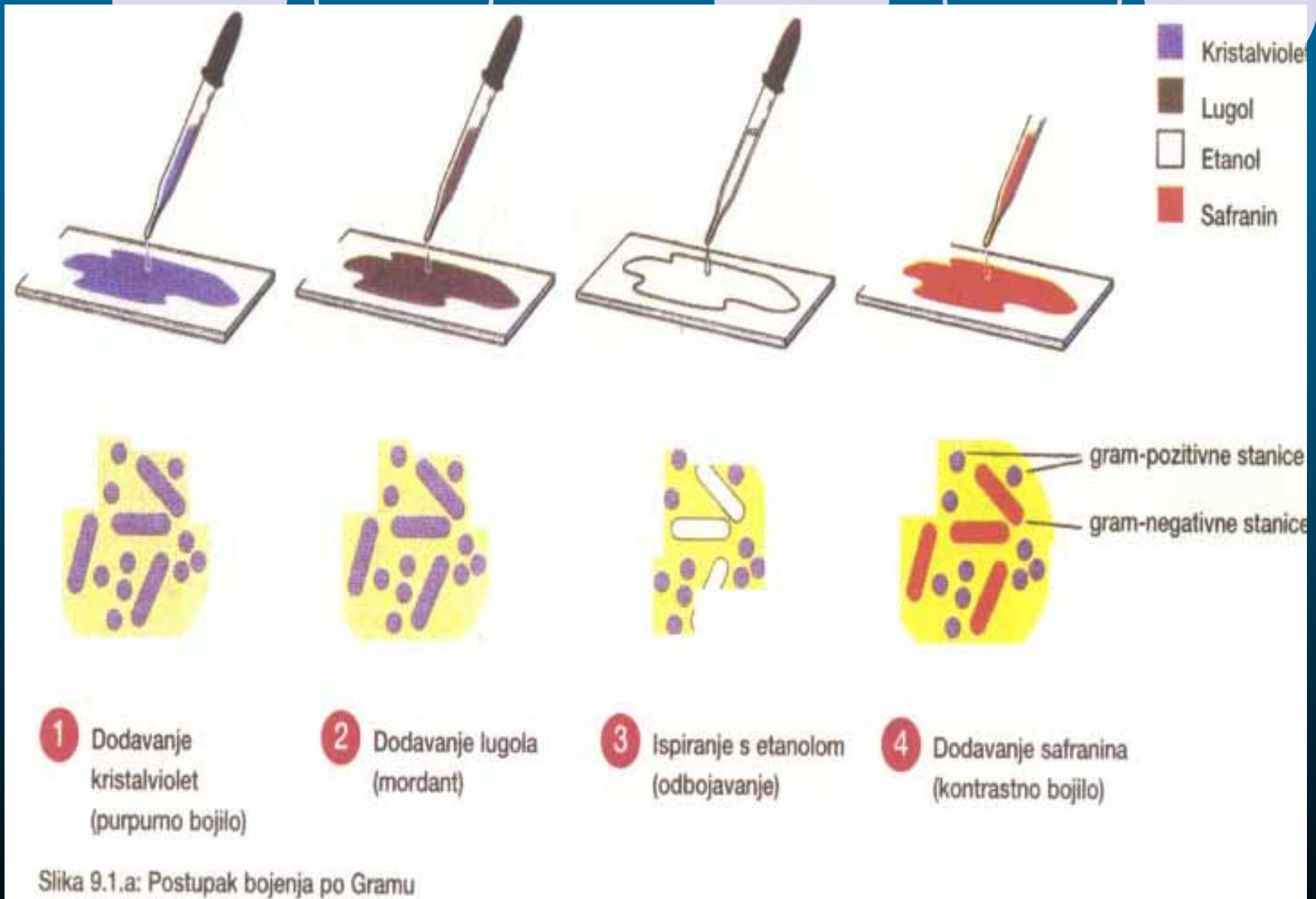
(9) ispiranje vodom

(10) sušenje preparat na zraku  
ili filtarskim papirom

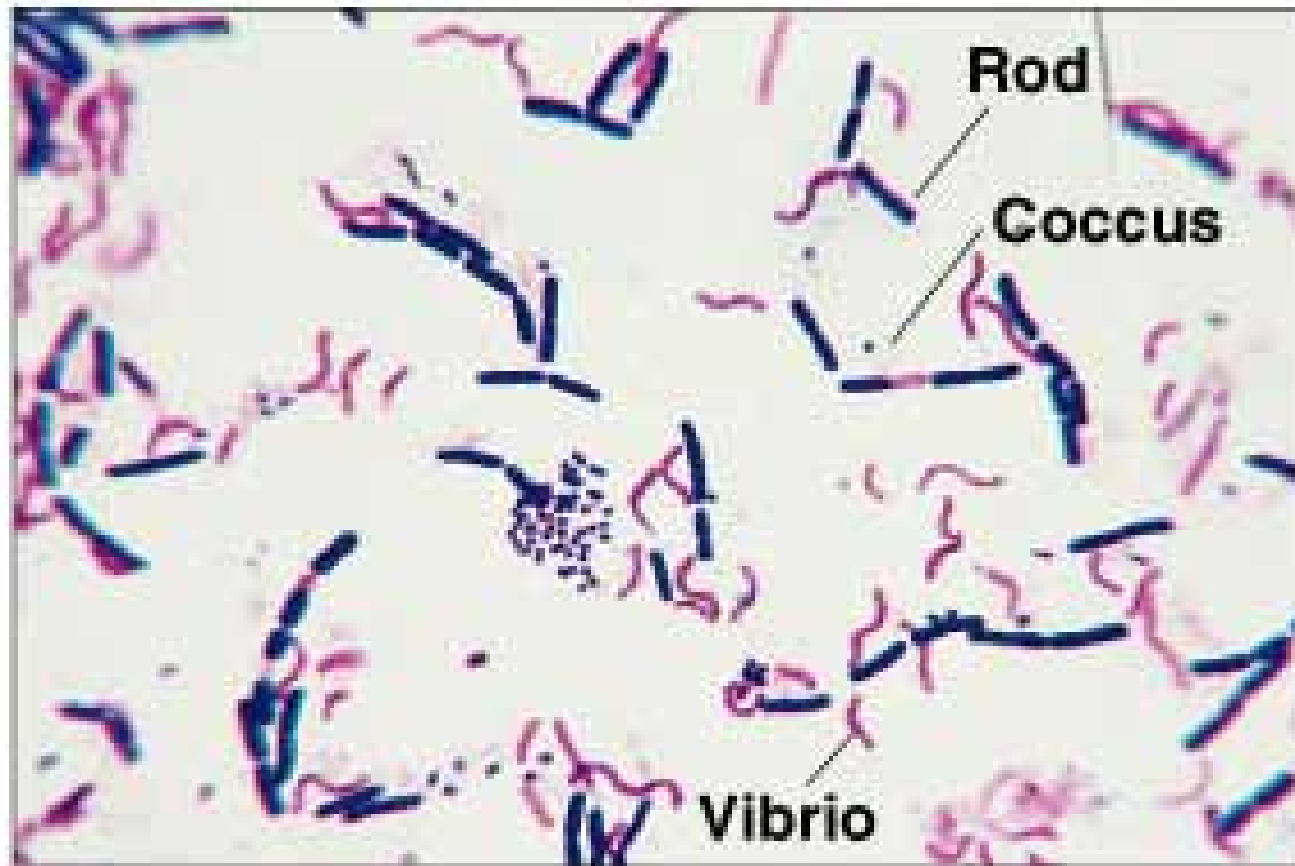
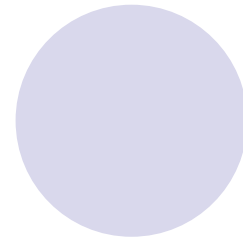
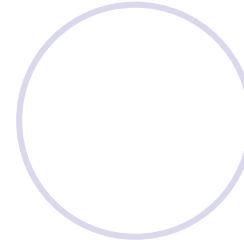
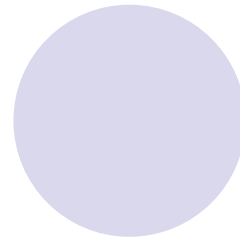
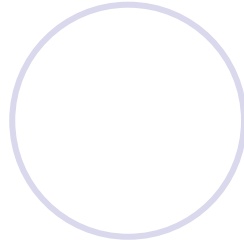
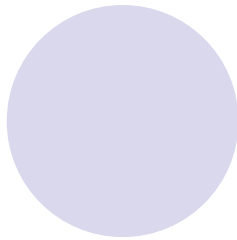
(11) mikroskopiranje (1000x)

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

# Postupak bojenja po Gramu

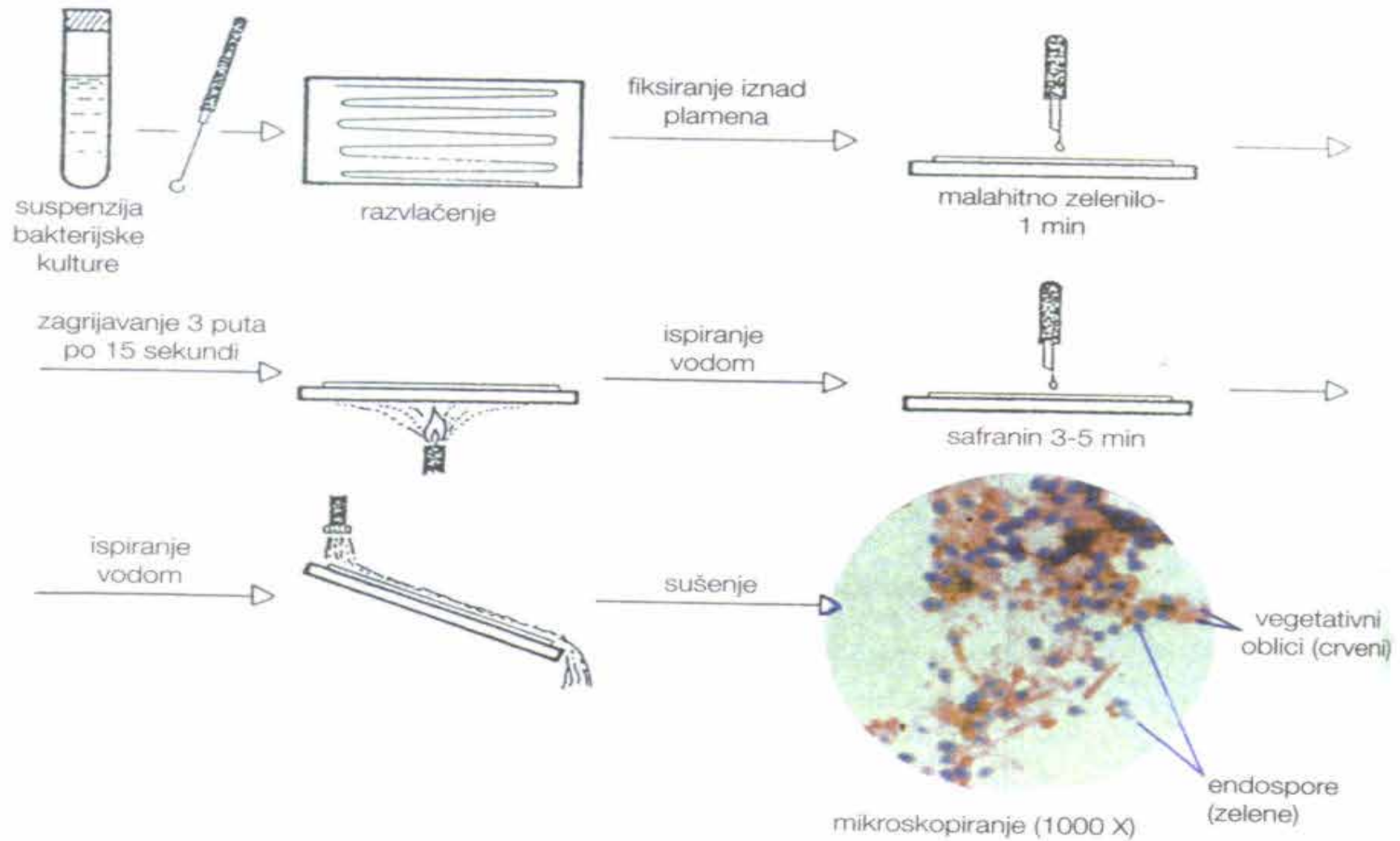


Slika 9.1.a: Postupak bojenja po Gramu





# Bojanje bakterijskih endospora po Schaeffer – Fultonovoj metodi



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

## Bojanje bakterijskih čahura (kapsula)

- 1) na predmetnom stakalcu načini se razmaz u kapi vode, koji se suši na zraku – **preparat se ne fiksira**
- 2) dodaje se boja **gentijana violet** (primarno bojilo) – **5 do 7 min**
- 3) S obzirom da su čahure neionske (nemaju naboj), primarno bojilo se na njih samo nataloži, bez povezivanja čvrstim kemijskim vezama, za razliku od ostalog dijela stanice
- 4) ispiranje s **20% otopinom  $\text{Cu SO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$**  – **služi kao agens za odbojavanje i kontrastno bojilo** – ( s obzirom da su kapsule topive u vodi ne ispiru se s vodom). Kontrastno bojilo se apsorbira i oboja kapsule, tako da će kapsule biti obojene svijetlo plavo
- 5) **sušenje na zraku** (ne filter papirom)
- 6) **mikroskopiranje pod najvećim povećanjem uz kap uljno-imerzione tekućine (anisol)**

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



## **Hranjive podloge za uzgoj mikroorganizama**

**Hranjive podloge služe nam za uzgoj mikroorganizama u laboratorijskim uvjetima. Svojom sastavom i karakteristikama osiguravaju mikroorganizmima onakve uvjete života koje bi oni imali u prirodnim sredinama.**

**Dijelimo ih prema:**

- a) načinu primjene**
- b) kemijskom sastavu**
- c) konzistenciji**

**a) Hranjive podloge prema načinu primjene dijelimo:**  
**obične podloge - služe za izolaciju i uzgoj većeg broja mikroorganizama**  
**specijalne podloge - služe za uzgoj točno određene grupe mikroorganizama**

Za utvrđivanje specifičnosti koristimo selektivne i diferencijalne podloge.

**SELEKTIVNE hranjive podloge** imaju takav sastav koji potiče rast željenih vrsta, a onemogućava rast neželjenih mikroorganizama. Njihova selektivnost se postiže dodatkom neke inhibicijske tvari.

**DIFERENCIJALNE hranjive podloge** omogućavaju lakše razlikovanje kolonija željenog mikroorganizma od drugih kolonija koje rastu na istoj hranjivoj podlozi.

b) Hranjive podloge prema kemijskom sastavu dijelimo na:  
**PRIRODNE hranjive podloge** - točan kemijski sastav takvih podloga nije poznat, a priređuju se od produkata biljnog (plodovi, sokovi) ili životinjskog (mlijeko, krvni serum, žuč) porijekla

**UMJETNE (SINTETSKE) hranjive podloge** - pripremaju se iz čistih kemijskih spojeva po određenim recepturama čije komponente mogu biti organskog ili anorganskog sastava

**KOMPLEKSNE hranjive podloge služe za uzgoj većine heterotrofnih gljiva i bakterija. Kemijski sastav takvih podloga varira i djelomično je poznat. Komponente su im kvasni i mesni ekstrakt.**

**Svaka hranjiva podloga mora osiguravati mikroorganizmima izvor ugljika, dušika, fosfora, aminokiselina, vitamina.**

**c) Hranjive podloge prema konzistenciji dijelimo:  
TEKUĆE, KRUTE (ČVRSTE) I POLUTEKUĆE.**

**Čvrstoća podloge postiže se dodavanjem agara tekućim hranjivim podlogama.**

**Agar je heteropolisaharid koji se dobiva iz morsih algi roda *Gelidium*. Zagrijavanjem agara (koji je u obliku praška) na temperaturu 95-98°C on se otopi u tekućoj podlozi, a prilikom hlađenja kod temp. 40-45°C uzrokuje skrućivanje hranjive podloge. Koncentracija agara u čvrstim hranjivim podlogama je 1-2%, a u polučvrstim podlogama 0,1-0,5%.**



**Bez obzira na pripadnost pojedinoj skupini nabrojenih hranjivih podloga, svaki hranjivi supstrat mora imati:**

- **sve hranjive sastojke koji su potrebni za rast i razmnožavanje**
- **dovoljnu količinu vode**
- **povoljanu pH vrijednost**
- **supstrat mora biti sterilan**
- **supstrat mora biti prozračan**



## **STERILIZACIJA**

**Sterilizacija podrazumijeva svaki proces, kemijski ili fizički, pomoću kojeg se ubijaju svi oblici života, osobito mikroorganizmi.**

**Prema sredstvu kojim se sterilizacija provodi razlikujemo:**

- 1) STERILIZACIJA TOPLINOM**
- 2) STERILIZACIJA FILTRACIJOM**
- 3) STERILIZACIJA ZRAČENJEM**
- 4) STERILIZACIJA ULTRAZVUKOM**

**Sterilizacija kemijskim putem vrši se pomoću nekih kemijskih agensa (dezinficijensi) koji suzbijaju rast mikroorganizama (npr. bakteriostatici) ili ubijaju mikroorganizme i endospore.**

**- alkoholi, kiseline, halogeni, fenoli, soli teških metala, oksidirajući agensi**

## **STERILIZACIJA TOPLINOM**

### **A) Suha sterilizacija**

- sterilizacija plamenom
- sterilizacija vrućim suhim zrakom - vrši se u suhom sterilizatoru (Pasterovoj peći)





## **B) Vlažna sterilizacija**

- **sterilizacija kuhanjem**

- **sterilizacija vodenom parom**

- a) **sterilizacija strujećom vodenom parom - odvija se u Kochovu loncu**

- **primjena: sterilizacija hranjivih podloga s tvarima koje ne podnose temperature iznad 100°C**

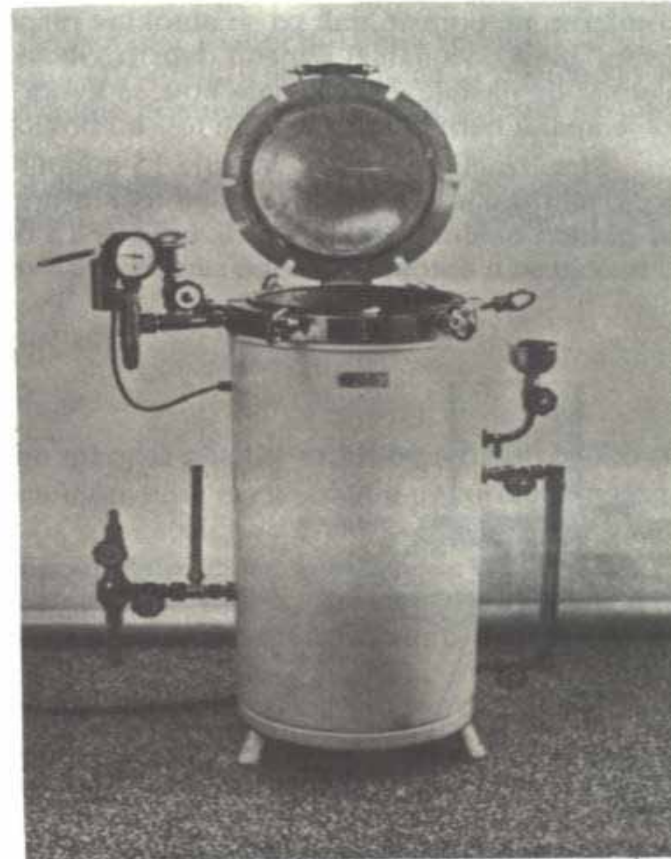
- **višekratna sterilizacija u Kochovu loncu naziva se **TINDALIZACIJA ili FRAKCIONA STERILIZACIJA****

- b) **sterilizacija strujećom vodenom parom pod tlakom - odvija se u autoklavu**

**Slika: Kochov lonac i autoklav**



**Slika 100.** Kochov lonac



**Slika 101.** Autoklav

## **STERILIZACIJA FILTRACIJOM**

**primjena: za sterilizaciju tekućina koje ne podnose sterilizaciju nekim drugim načinom jer bi im se izmjenila fizikalna i kemijska svojstva**

**postupak: tekućine se filtriraju pod tlakom kroz filtre poznate veličine pora**

**vrste filtra: Chamberlandovi (porculanski) filteri  
Berkefeldovi filteri  
Seitzovi azbestni filteri  
Membranski ili ultrafilteri**

## **STERILIZACIJA ZRAČENJEM**

**a) ultraljubičasto zračenje (UV)**

**b) ionizacijsko zračenje - elektromagnetske x-zrake i gama zrake**

**STERILIZACIJA ULTRAZVUKOM - zvučni valovi visoke frekvencije**



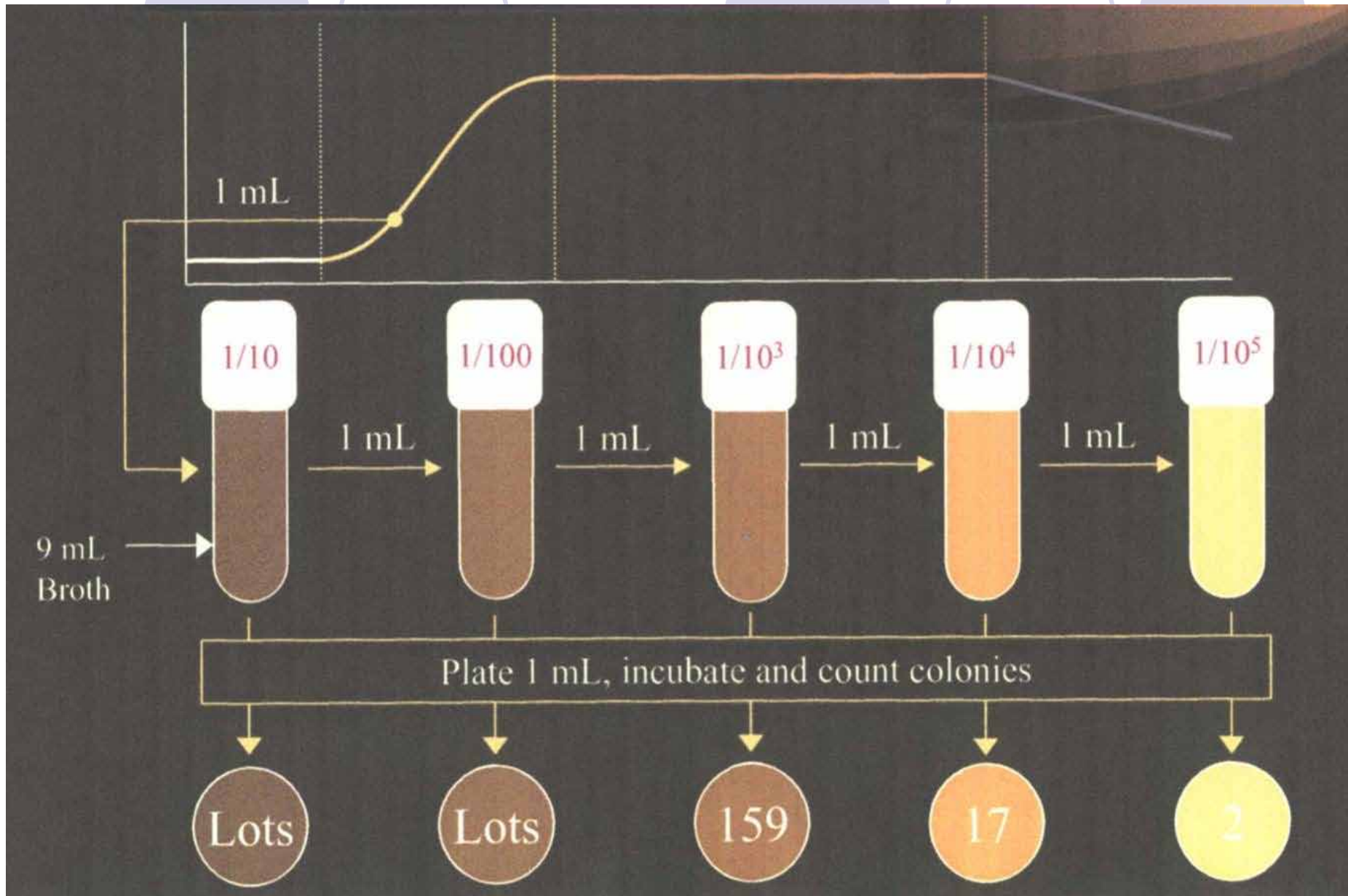
# **METODE ZA IZOLACIJU ČISTIH KULTURA**

**IZOLACIJA** je značajna mikrobiološka tehnika kojom se izdvajaju čiste kulture mikroorganizama iz mješovite populacije. Za proučavanje morfoloških i fizioloških osobina mikroorganizama, kao i njihove identifikacije, potrebno je imati njihove čiste kulture. Pod čistom kulturom se podrazumijeva kultura mikroorganizama koje sadrže samo jedan tip stanica.

**Za dobivanje čistih kultura koriste se slijedeće metode:**

**METODA RAZRJEĐENJA  
METODA ISCRPLJENJA**

# Metoda razrjeđenja



# Metoda razrijeđenja



- Daje nam brojnost živih, aerobnih mikroorganizama
- Nije uključeno
  - Obligatni Anaerobi
  - Mikroaerofili

# Metoda razrijeđenja



- **Pretpostavka**

- svaka kolonija potječe iz jedne stanice
- ponekad neke kolonija potječu iz više stanica

- **Izražava se**

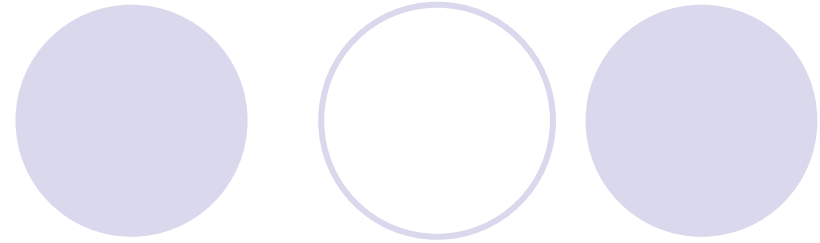
- Colony Forming Unit (CFU)/gramu ili ml
- NE kao ukupne bakterije (mikroorganizmi)

# Organičenja metode razrijeđenja

- Mogu se prebrojati samo aerobni mikroorganizmi
- nije poznata njihova vrsta
- podloge nisu univerzalne
- ljudska greška
- ponekad je teško razlikovati čestice hrane i kolonije
- kolonije mogu biti premale da se vide



# Tipovi uzorka



- tekući

- Ne viskozni-mjerenje pipetom
- Viskozni-vaganje

- Kruti

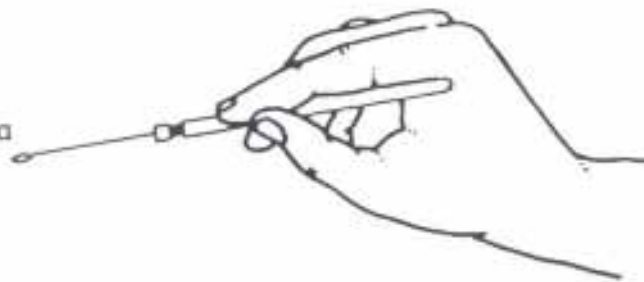
- vaganje

- prsotor

- pomoću sterilnih štapića određena površina

**Slika:  
Metoda  
iscrpljenja**

mikrobiološka ušica  
s uzorkom kulture



ušica se lagano pritisne  
na podlogu i povlači po  
površini čvrste podloge

1. NAČIN



početak

ušica se pomiče po podlozi  
a položaj Petrijeve zdjelice  
se mijenja

2. NAČIN



ušica se pomiče  
lijevo-desno po podlozi

A decorative graphic at the top of the slide consists of two groups of three circles. The left group has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right. The right group has a solid purple circle on the left, a white circle with a purple outline in the middle, and a solid purple circle on the right.

## IDENTIFIKACIJA BAKTERIJA

- identifikacija je praktičan dio taksonomije koji svrstava izolat u određene taksone
- do danas je klasificirano i identificirano više od 2000 vrsta bakterija
- Fischer i Muller napravili prvu klasifikaciju i sistematizaciju
- 1923. izašlo prvo izdanje **Bergeyeva** priručnika za bakterija. Tokom godina zabilježena su sva važnija dostignuća, zabilježene nove vrste, kriteriji klasifikacije i poboljšane sheme klasifikacije. Danas priručnik sadrži 4 podvolumena, a svaki od njih prikazuje specifične skupine bakterija

## **Karakteristike koje se koriste u klasifikaciji i identifikaciji mikroorganizama:**

- 1. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE KOLONIJA** - svaka vrsta bakterija ima karakterističan tip kolonija na hranjivoj podlozi
- 2. MORFOLOŠKE KARAKTERISTIKE BAKTERIJA**- oblik stalice, veličina, ultrastrukture, bojanje po Gramu, pokretljivost, raspored cilija i flagela, oblik i smještaj edospora, stanične inkluzije
- 3. FIZIOLOŠKE I BIOKEMIJSKE KARAKTERISTIKE** - odnose se na prirodu i aktivnost bakterijskih enzima i transportnih proteina. Neke od fiziološke i biokemijske karakteristike koje se ispituju su:  
izvor C i N, sadržaj st. stjenke, izvori energije, produkti fermentacije, sekundarni metaboliti, osmotska tolerancija, osjetljivost na metaboličke inhibitore i antibiotike, pH optimum

**Enzimatska aktivnost se široko primjenjuje za diferencijaciju bakterija jer i relativno srodne bakterije se mogu razlikovati na osnovu BIOKEMIJSKIH TESTOVA:**

**a) sposobnost iskorištavanja C iz različitih spojeva (monosaharida, polisaharida)**

**b) tvorba indola, amonijaka, H<sub>2</sub>S**

**c) hidroliza škroba, želatine, kazeina, eskulina**

**d) iskorištavanje citrata, malonata**

**e) aktivnost glukozidaze, katalaze, oksidaze, peptidaze, celulaze, fosfataze, esteraze**

**f) redukcija nitrata**

**4. EKOLOŠKE KARAKTERISTIKE- razlike između mikroorganizama s obzirom na ekološke uvjete (temperatura, pH, svjetlost, slobodan kisik)**



**5. SEROLOŠKE KARAKTERISTIKE-** imunološke tehnike koriste se za komparaciju proteina različitih mikroorganizama

**6. GENETIČKE I MOLEKULARNE KARAKTERISTIKE-** jedan od najvažnijih pristupa taksonomiji nastao kroz:

- analize proteina
- analize nukleinskih kiselina