

Usporedba izravnih i neizravnih metoda za određivanje broja živih mikroorganizama

Teskera, Nikolina

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Food Technology and Biotechnology / Sveučilište u Zagrebu, Prehrambeno-biotehnološki fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:159:410408>

Rights / Prava: [Attribution-NoDerivatives 4.0 International/Imenovanje-Bez prerada 4.0 međunarodna](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-14**



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Food Technology and Biotechnology](#)



**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Biotehnologija**

**Nikolina Teskera
0058215152**

**USPOREDBA IZRAVNIH I NEIZRAVNIH METODA
ZA ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH
MIKROORGANIZAMA**

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Mikrobiologija

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Zagreb, 2022.
TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Biotehnologija

Zavod za Biokemijsko inženjerstvo
Laboratorij za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Biotehnologija

Usporedba izravnih i neizravnih metoda za određivanje broja živih mikroorganizama

Nikolina Teskera, 0058215152

Sažetak:

Određivanje broja mikroorganizama u uzorcima hrane, sirovina, tla, vode, zraka ili drugih materijala iz okoliša dio je svakodnevne rutine u mikrobiološkim laboratorijima, a koristi se i u kliničkoj praksi kada je potrebno brzo identificirati mikroorganizme u svrhu postavljanja odgovarajuće terapije. Najboljom mjerom koncentracije stanica smatra se broj živih stanica koji se ujedno i određivao u ovom radu. Metode koje su se pritom koristile podijeljene su na izravne (McFarlandov standard, turbidimetrijsko određivanje, Thomaova komorica) i neizravne. Neizravna metoda uključuje pripremu decimalnih razrjeđenja te nacjepljivanje na odgovarajuće hranjive podloge. Rezultati su pokazali kako broj živih stanica mikroorganizama raste s porastom McFarland jedinica. Pri istim McF jedinicama postoji razlika u CFU vrijednostima i optičkoj gustoći u ovisnosti o vrsti mikroorganizama. Odabrane štapičaste gram-negativne bakterije, pri 2 McF pokazuju manje zamućenje suspenzije (optičku gustoću) u odnosu na odabrane gram-pozitivne bakterije i kvasce. Za pripremu istih vrijednosti McF jedinica potrebno je manje stanica kvasaca, jer su kvasci većih dimenzija od bakterija.

Ključne riječi: stanice, McFarland, razrjeđenje, mikroorganizmi

Rad sadrži: 23 stranice, 8 slika, 3 tablice, 30 literaturnih navoda, 0 priloga

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: prof. dr. sc. Ksenija Markov

Pomoć pri izradi: dr. sc. Željko Jakopović

Datum obrane: 19. rujna 2022.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Undergraduate thesis

University of Zagreb
Faculty of Food Technology and Biotechnology
University undergraduate study Biotechnology

Department of Biochemical Engineering
Laboratory for General Microbiology and Food Microbiology

Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Biotechnology

Comparison of direct and indirect methods for determining the number of live microorganisms

Nikolina Teskera, 0058215152

Abstract:

Determining the number of microorganisms in samples of food, raw materials, soil, water, air or other materials from the environment is part of the daily routine in the microbiological laboratories, and among other things, it is used in clinical practice when it is necessary to quickly identify microorganisms for the purpose of setting up appropriate therapy. The best measure of cell concentration is considered to be the number of living cells, which was also determined in this study. Used methods can be direct (McFarland standard, turbidimetric determination, Neubauer chamber) or indirect. An indirect method involves the preparation of decimal dilutions and inoculation on appropriate media. The results showed that the number of living cells of microorganisms increases with the increase of McFarland units. For the same McF units, there is a difference in CFU values and optical density depending on the type of microorganisms. Selected rod-shaped gram-negative bacteria, at 2 McF, show less turbidity of the suspension (optical density) compared to selected gram-positive bacteria and yeasts. Fewer yeast cells are needed to prepare the same values of McF units, because yeasts are larger than bacteria.

Keywords: cells, McFarland, dilution, microorganisms

Thesis contains: 23 pages, 8 figures, 3 tables, 30 references, 0 supplements

Original in: Croatian

Thesis is deposited in printed and electronic form in the Library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: PhD Ksenija Markov, Full Professor

Technical support and assistance: Željko Jakopović, PhD

Thesis defended: September 19, 2022

SADRŽAJ:

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI DIO	2
2.1. ODREĐIVANJE BROJA STANICA MIKROORGANIZAMA	2
2.2. IZRAVNE METODE ZA ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA U UZORKU	2
2.2.1. MCFARLANDOV STANDARD	2
2.2.2. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA	3
2.2.3. MIKROSKOPSKO ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA	5
2.2.3.1. PETROFF-HAUSEROVA KOMORICA.....	5
2.2.3.2.. THOMAOVA KOMORICA	6
2.3. NEIZRAVNA METODA ODREĐIVANJA BROJA ŽIVIH STANICA MIKROORGANIZAMA	7
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	9
3.1. MATERIJALI.....	9
3.1.1. MIKROORGANIZMI	9
3.1.2. PODLOGE ZA UZGOJ MIKROORGANIZAMA	9
3.1.3. APARATURA I PRIBOR.....	11
3.1.4. KEMIKALIJE.....	11
3.2. METODE	12
3.2.1. PRIPREMA MIKROBNIH KULTURA	12
3.2.2. PRIPREMA SUSPENZIJA ODREĐENIH GUSTOĆA MCFARLAND JEDINICA	12
3.2.3. TURBIDIMETRIJSKO ODREĐIVANJE BROJA BAKTERIJA/KVASACA	13
3.2.4. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH BAKTERIJA/KVASACA	14
3.2.5. ODREĐIVANJE BROJA ŽIVIH STANICA KVASCA DIREKTNOM METODOM	15
4. REZULTATI I RASPRAVA	17
4.1. REZULTATI.....	17
4.1.1. REZULTATI ODREĐIVANJA BROJA STANICA BAKTERIJA	17
4.1.2. REZULTATI ODREĐIVANJA BROJA STANICA KVASCA.....	18
4.2. RASPRAVA	19
5. ZAKLJUČAK	21
6. POPIS LITERATURE.....	22

1. UVOD

Mikrobni rast je jedna od osnovnih metoda upoznavanja svojstava pojedinog mikroorganizma, a može se odrediti praćenjem povećanja mase ili broja stanica. Za određivanje količine mikrobnih stanica u nekom uzorku upotrebljavaju se izravne i/ili neizravne metode. Ponekad postoji potreba da se mikrobna koncentracija izrazi bez da se navede broj stanica pa se prikazuje kao suha tvar mikrobnih stanica u kulturi (suha biomasa), mokra biomasa, optička gustoća ili turbiditet. U drugim slučajevima je nužno odrediti broj živih stanica radi procjene živih i/ili infektivnih mikroorganizama u određenom materijalu, ili kada je potrebno odrediti minimalnu inhibitornu koncentraciju (MIK), minimalnu baktericidnu koncentraciju (MBK) ili EC50 vrijednost (pola maksimalne učinkovite koncentracije) (Lozano i sur., 2018).

Od izravnih metoda određivanja broja mikroba najčešće se upotrebljavaju komorice za brojanje (Thomaova komorica, Petroff-Hauserova komorica i Neubauerova komorica), mjerenje zamućenja bujona usporedbom s McFarlandovim standardima ili spektrofotometrijsko određivanje. Neizravna metoda određivanja broja živih stanica uključuje pripremu decimalnih razrjeđenja, naciepljivanje na čvrstu hranjivu podlogu te brojanje poraslih kolonija mikroorganizama koje predstavljaju stvaran broj živih stanica. Metode koje se u mikrobiološkim laboratorijima koriste za određivanja broja stanica imaju i ograničenja pa izbor metode u pravilu ovisi o vremenu, opremljenosti i zahtjevu za precizno određivanje živih stanica.

Stoga je cilj ovog rada bio usporediti vrijednosti broja stanica odabranih sojeva bakterija i kvasaca dobivenih različitim (izravnim i neizravnim) metodama te ih međusobno usporediti, odnosno uočiti povezanost između McFarland jedinica i broja živih stanica ispitivanih mikroorganizama.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. ODREĐIVANJE BROJA STANICA MIKROORGANIZAMA

Određivanje broja mikroorganizama dio je svakodnevne rutine u mikrobiološkom laboratoriju. Koristi se kada se npr. treba odrediti broj bakterija u uzorcima hrane, vode ili u uzorcima koji potječu od pacijenata. Općenito se metode dijele na izravne i neizravne, a glavna razlika je da se pomoću izravnih metoda odmah mogu brojati stanice, dok je kod neizravnih nužna inkubacija koja obično traje 24 sata (Delaš i sur., 2018).

Od izravnih metoda se koriste spektrofotometrijsko određivanje, usporedba s McFarlandovim standardima, brojenje pomoću mikroskopa, Petroff-Hausserova komorica za određivanje broja stanica bakterija te Thomaova i Neubauerova komorica za određivanje broja stanica kvasaca. Od neizravnih metoda se ističe metoda pripreme serije decimalnih razrjeđenja u omjeru 1:10 koja se zatim nacjepljuju na hranjive podloge pri čemu svaka porasla kolonija predstavlja jednu stanicu ili nakupinu pojedinačnih stanica (npr. stafilokoki rastu u grozdovima) i izražava se kao CFU mL⁻¹ ili CFU g⁻¹ (eng. *Colony Forming Units*) (Duraković, 1996; Hajsig i Delaš, 2016).

2.2. IZRAVNE METODE ZA ODREĐIVANJE BROJA MIKROORGANIZAMA U UZORKU

2.2.1. McFarlandov standard

McFarlandovi standardi koriste se za vizualnu aproksimaciju koncentracije stanica u suspenziji (Souza i sur., 2020). McFarlandova ljestvica predstavlja brojkama označeni niz epruveta u kojima je optička gustoća namještena tako da približno odgovara određenoj koncentraciji bakterija u jednom mililitru suspenzije. Dizajnirana je za procjenu koncentracije bakterija u bujonu i drugim suspenzijama, a ponajprije za gram-negativne bakterije kao što je *E.coli* (Zapata i Ramirez-Arcos, 2015). Već spomenute epruvete napunjene su suspenzijom barijeve soli ili česticama lateksa koji su odnedavno dostupni, a produljuju vijek trajanja materijala (Lahuerta Zamora i Perez-Garcia, 2012). Suspenzija barijeve soli može biti različitih gustoća jer se priprema tako da se pomiješaju 1 % otopina bezvodnog BaCl₂ i 1 % otopina H₂SO₄ u različitim omjerima (tablica 1). Pri tome svaka epruveta svojim zamućenjem odgovara zamućenju suspenzije bakterija (Gupta i sur., 2005). Kako bi se brzo odredio približan broj bakterija u suspenziji, zamućenje suspenzije se prostim okom usporedi s nizom McFarlandovih standarda, a zatim se u tablici potraži odgovarajuća koncentracija bakterija za McFarlandov

standard sličnog zamućenja (tablica 1) (Peñuelas-Urquides i sur., 2013). Prednost metode je što nisu potrebni posebni uređaji da bi se odredio broj bakterija, niti je potreban prethodni uzgoj mikroba (Lahuerta Zamora i Perez-Garcia, 2012). Nedostatak je subjektivno određivanje zamućenja te nevaljani rezultati za mikroorganizme koji se razlikuju od *E.coli*. Samim time vrijednosti nisu u odgovarajućem rasponu za AET (eng. *Antimicrobial Effectiveness Test*) inokulum pa mogu biti potrebna daljnja razrjeđenja (Lozano i sur., 2018).

Tablica 1. Priprema McFarlandovog standarda i McFarlandova skala (Sutton, 2011)

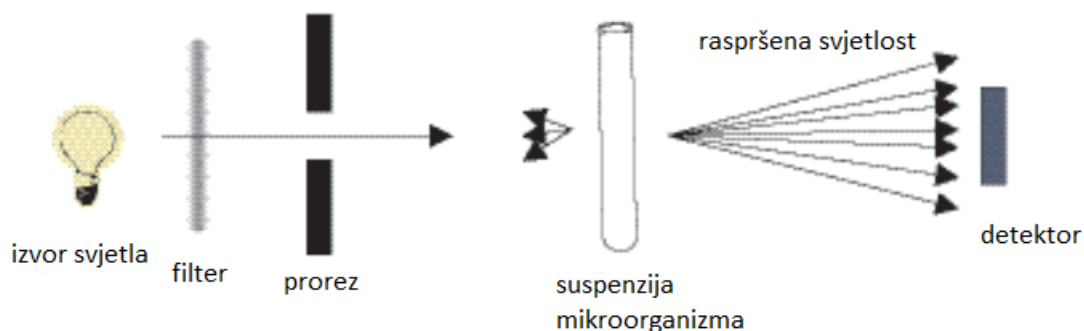
McFarlandova skala	CFU ($\times 10^6 \text{ mL}^{-1}$)	1% BaCl ₂ / 1% H ₂ SO ₄ (mL)
0,5	<300	0,05/9,95
1	300	0,1/9,9
2	600	0,2/9,8
3	900	0,3/9,7
4	1200	0,4/9,6
5	1500	0,5/9,5
6	1800	0,6/9,4
7	2100	0,7/9,3
8	2400	0,8/9,2
9	2700	0,9/9,1
10	3000	1,0/9,0

2.2.2. Turbidimetrijsko određivanje broja mikroorganizama

Turbidimetrijsko određivanje svrstava se u metode mjerenja pomoću optičke gustoće (turbiditeta, zamućenja, apsorbancije). Optička gustoća, međutim, nije mjera apsorpcije kako je razumijemo u kolorimetrijskim metodama, nego je mjera smanjenja propusnosti svjetla uzrokovanog raspršivanjem iz bakterijske suspenzije. Uređaj onda pretvara smanjenu propusnost svjetla u apsorbanciju baš kao što bi to učinio u kolorimetrijskoj analizi (Matlock i Wilmington, 2017). Dakle, pojednostavljeno, spektrofotometar mjeri koliko se svjetlosti apsorbiralo prilikom prolaska kroz uzorak te na taj način direktno mjeri optičku gustoću čije je povećanje proporcionalno porastu broja bakterija u hranjivoj podlozi. Što je više bakterijskih stanica, veće je zamućenje pa se i količina svjetlosti koja prolazi kroz uzorak smanjuje (Omar i MatJafri, 2009).

Usporedbom apsorbancije bakterijske suspenzije s apsorbancijom referentnog uzorka može se odrediti optička gustoća suspenzije. Tako određena optička gustoća ucrtava se u standardnu

baždarnu krivulju (pokazuje odnos broja stanica u suspenziji i optičke gustoće) te se očita broj mikroba u mililitru suspenzije (Hajsig i Delaš, 2016). Spektrofotometrijski postupak je brži od metode pri kojoj se nacjepljuju i uzgajaju uzorci iz deseterostrukih serijskih razrjeđenja, ali ima ograničenu osjetljivost iz razloga što bakterijska suspenzija koju mjerimo mora imati barem 10^6 CFU mL⁻¹ (Sutton, 2011). Osim toga, svako korištenje spektrofotometra te svaka zamjena žarulja zahtijevaju zasebnu kalibraciju kada se koristi za procjenu mikrobnih koncentracija (Hongve i Akesson, 1996). Na prividnu koncentraciju utjecat će širina proreza, stanje filtera te veličina i stanje detektora. Iz tog razloga bi uređaj trebao imati što uži prorez te što manji detektor kako bi se detektiralo samo ono svjetlo koje je raspršeno u smjeru prema naprijed (Pradhan i Tarafder, 2016) (slika 1). Korelacija apsorbancije prema suhoj težini vrlo je dobra za razrijeđene suspenzije bakterija, a taj odnos se održava bez obzira na veličinu stanice. Međutim, u koncentriranijim suspenzijama prethodno spomenuta korelacija više ne vrijedi tako da je nužno održavati linearni raspon vrijednosti apsorbancije u odnosu na CFU (Sutton, 2011). Glavni nedostatak ove metode je što se zapravo određuje ukupan broj stanica, dakle i žive i mrtve bakterijske stanice (Lewis i sur., 2014).



Slika 1. Spektrofotometar (Sutton, 2011)

2.2.3. Mikroskopsko određivanje broja mikroorganizama

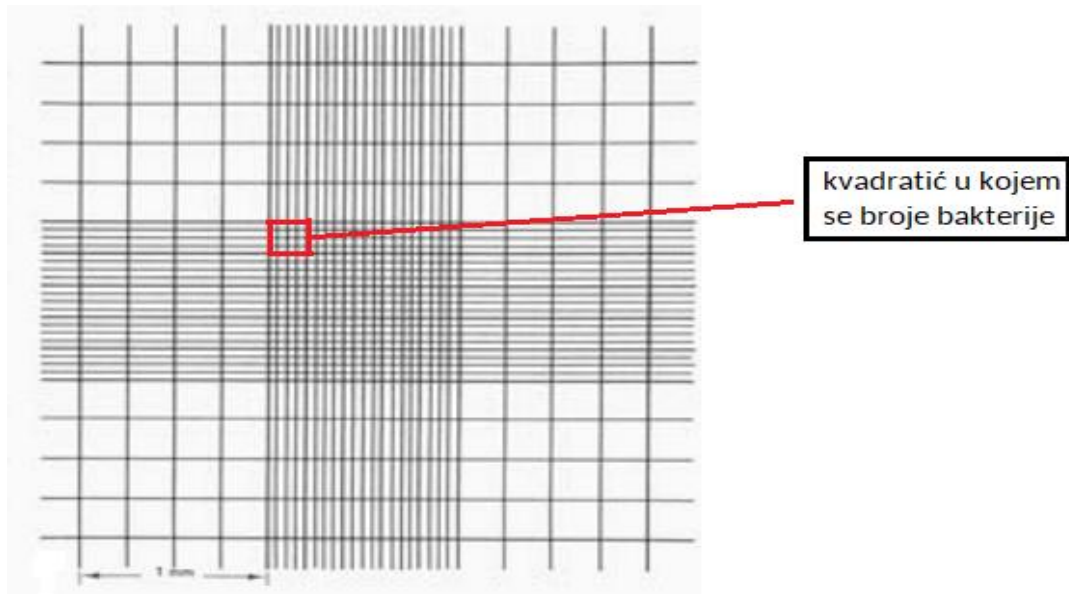
Mikroskopsko brojenje primjenjuje se kako bi se procijenio broj mikroorganizama u suspenziji (Beveridge i sur., 2007). Pri izravnom brojanju pod mikroskopom određuje se ukupan broj (i žive i mrtve) stanica u točno poznatom volumenu suspenzije mikroorganizama. Za brojenje bakterijskih stanica najčešće se koristi Petroff-Hauserova komorica, dok se ukupan broj stanica kvasaca te broj spora plijesni određuje pomoću Thomaove ili Neubauerove komorice. Iako su slične izvedbe komorice se razlikuju po volumenu suspenzije (tekućine) u kojemu se broje stanice. Volumen suspenzije što je zatvoren u Petroff-Hauserovoj komorici je $0,02 \text{ mm}^3$, a u Thomaovoj komorici iznosi $0,1 \text{ mm}^3$ (Duraković, 1996).

2.2.3.1. Petroff-Hauserova komorica

Petroff-Hauserova komorica izgleda kao deblje predmetno staklo s $0,02 \text{ mm}$ dubokom komorom u čijem se središtu nalazi ugravirana mrežica (slika 2). Mrežica je površine 1 mm^2 , a čini ju 25 velikih kvadrata (5×5), od kojih svaki ima 16 kvadratića (4×4) pa je to ukupno 400 kvadratića (Somasegaran i Hoben, 1994). Obično se izbroje bakterijske stanice u pet velikih kvadratića koji su dvostruko omeđeni te se taj broj podijeli s pet. Na taj način se dobije prosječan broj bakterija u jednom kvadratiću. Dobiveni broj se zatim pomnoži s $1,25 \times 10^6$ zato što kvadratić ima volumen od $(1/1,25 \times 10^6) \text{ cm}^3$ te se na taj način odredi ukupan broj bakterija u mililitru polazne suspenzije (Hajsig i Delaš, 2016). Ukoliko se uzorak razrijedio prije stavljanja u komoricu, onda treba uzeti u obzir i faktor razrjeđenja.

Mikroskopsko određivanje je brz postupak: kap bakterijske suspenzije se stavi na površinu mrežice te se preko nje pažljivo stavi pokrovnica. Zatim se na pokrovnicu stavi kap imerzionog ulja i mikroskopira imerzionim objektivom (povećanje 1000x) te se izbroje stanice unutar 25 kvadratića i provede izračun kako je gore već opisano (Stilinović i Hrenović, 2009).

Mane metode su: broje se i žive i mrtve stanice, nepouzdana je metoda za suspenzije u kojima je broj stanica veći od 10^6 CFU mL^{-1} , usporava proces te povećava mogućnost pogrešaka (Humberd i sur., 2005).



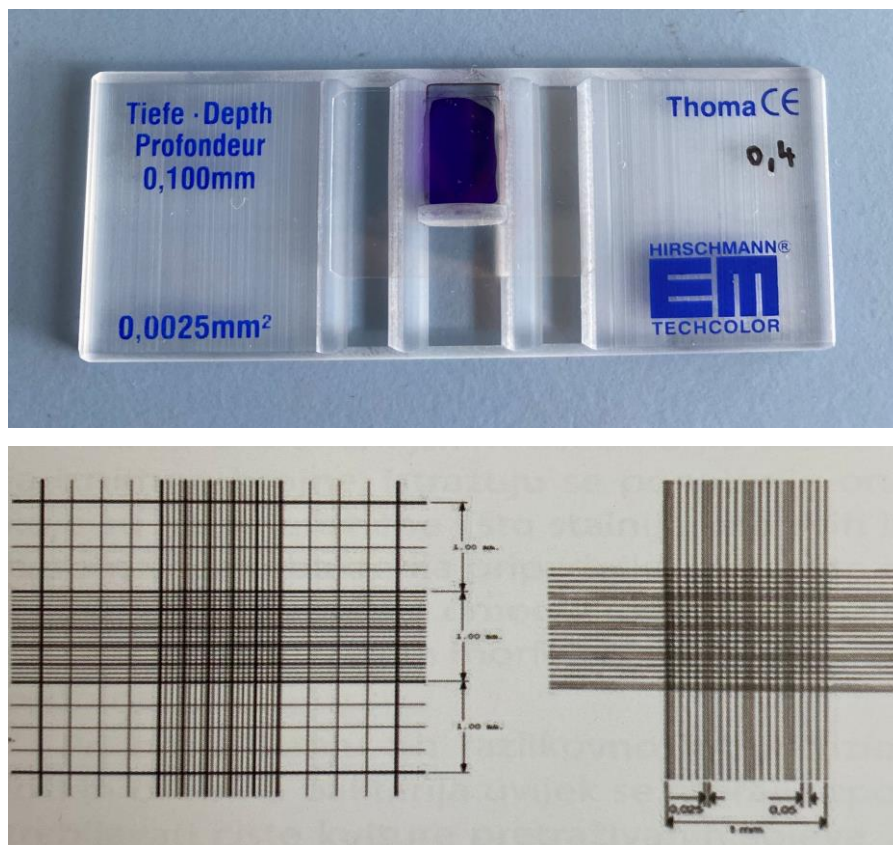
Slika 2. Petroff-Hausserova komorica (Andersen, 2005)

2.2.3.2. Thomaova komorica

Thomaova komorica je deblja predmetnica (30×70 mm i 4 mm debljine) koja na svom središnjem polju ima ugraviranu mrežicu na koju se stavlja suspenzija u kojoj se žele izbrojati stanice kvasca ili spore plijesni (slika 3) (Bastidas, 2013).

Različitim pokusima je ustanovljeno da jedna ispunjena mikrobiološka ušica sadrži oko 10^6 stanica, što je u rasponu uobičajenih koncentracija ($250\,000 - 2\,500\,000$ stanica mL^{-1}). Kada bi koncentracija bila ispod zadanog raspona, ne bi se postigla dobra procjena izvorne koncentracije, dok se u slučaju iznad raspona povećava vjerojatnost pogrešaka u brojanju pa je potrebno napraviti razrjeđenja kako bi se dobila koncentracija bliža optimalnoj (Bastidas, 2013). Cijela mrežica Thomaove komorice sastoji se od 16 velikih kvadrata (4×4), a svaki veliki kvadrat sadrži 25 kvadratića (5×5) (Baena-Ruano i sur., 2006, Hajsig i Delaš, 2016).

Metoda je brza i jednostavna, ali moguće su pogreške zbog pogrešaka pipetiranja, statističkih pogrešaka i grešaka od volumena unesenog u komoricu. Usprkos tome, primjena Thomaove komorice i dalje je najraširenija metoda za brojanje stanica kvasca (Zhang i sur., 2019).



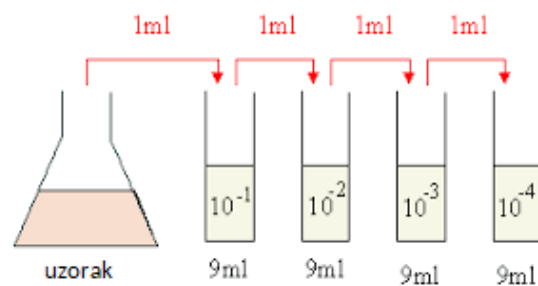
Slika 3. Thomaova komorica (gore) (vlastita fotografija) i ugravirana mrežica (dolje) (Hajsig i Delaš, 2016)

2.3. NEIZRAVNA METODA ODREĐIVANJA BROJA ŽIVIH STANICA MIKROORGANIZAMA

Kod ove metode je glavna pretpostavka da će iz svake žive stanice porasti jedna kolonija. Ukoliko se u uzorku nalazi previše mikroorganizama, onda će porasle kolonije biti sitne i prekrit će jedna drugu pa je u tom slučaju potrebno razrijediti uzorak prije nacjepljivanja na hranjivu podlogu kako bi se porasle kolonije mogle izbrojiti (Duraković, 1996; Ben-David i Davidson, 2014; Hajsig i Delaš, 2016). Tijekom razrjeđivanja se mora voditi briga o sterilnom načinu rada da bi se spriječile moguće kontaminacije (Duraković, 1996; Kanižai Šarić, 2015). Postupak se provodi na način da se u niz sterilnih epruveta otpipetira po 9 mL fiziološke otopine, a zatim se u prvu epruvetu pipetom prenese 1 mL mikrobne suspenzije te se dobro homogenizira na vibromikseru. Nakon homogeniziranja se 1 mL iz prve epruvete prenese u sljedeću epruvetu s 9 mL sterilne fiziološke otopine (slika 4). Postupak se ponavlja dok se ne

postigne optimalno decimalno razrjeđenje na kojem će na čvrstoj hranjivoj podlozi u Petrijevoj zdjelici porasti između 30 i 300 stanica te se to smatra statistički valjanim uzorkom (Delaš i sur., 2018). Nacjepljivanje decimalnih razrjeđenja na hranjivu podlogu je moguće na više načina: 1 mL otpipetirati u prazne Petrijeve zdjelice i zatim zaliti rastaljenom hranjivom podlogom; nacjepljivanje 5 kapi po 10 μ L uzorka na čvrstu hranjivu podlogu; nacjepljivanje po 100 μ L uzorka na čvrstu hranjivu podlogu (Hajsig i Delaš, 2016).

Prednost ove metode je dobra osjetljivost, a mana što je sporija od izravnih metoda i što se može koristiti samo za određivanje onih bakterija koje se mogu uzgojiti na odgovarajućoj hranjivoj podlozi (Somasegaran i Hoben, 1994).



Slika 4. Decimalna razrjeđenja (Anonymus 1)

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. MATERIJALI

3.1.1. Mikroorganizmi

Kao test mikroorganizmi u ovom radu korištene su bakterije i kvasci dobiveni iz zbirke mikroorganizama Laboratorija za opću mikrobiologiju i mikrobiologiju namirnica Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta u Zagrebu.

Bakterije:

gram-pozitivne: *Staphylococcus aureus* 3048 (ATCC 25923), *Staphylococcus carnosus* 12st, *Listeria monocytogenes* 3112 (ATCC 23074), *Lactobacillus plantarum* K1

gram-negativne: *Escherichia coli* 3014 (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* 3024 (ATCC 27853), *Salmonella typhimurium* 3064 (ATCC 14028)

Kvasci:

Candida albicans 86, *Saccharomyces cerevisiae* 5, *Kluyveromyces marxianus* DS12, *Pichia guilliermondii* ZIM 624

3.1.2. Podloge za uzgoj mikroorganizama

Podloga za uzgoj bakterija mliječne kiseline

Za uzgoj i određivanje broja bakterija mliječne kiseline *Lactobacillus plantarum* K1 korišteni su MRS bujon i MRS agar (Biolife, Italija). Uzgoj bakterija mliječne kiseline proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37 °C tijekom 48 sati.

MRS (de Man-Rogosa-Sharpe) bujon sastava (g L⁻¹):

pepton	10
goveđi ekstrakt	10
kvašćev ekstrakt	5
glukoza	20
Tween 80	1
MgSO ₄ ×7H ₂ O	0,1
MnSO ₄ ×7H ₂ O	0,5
Na ₂ HPO ₄	2

pH vrijednost podloge je 6,5, sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta. MRS agar je istog sastava kao i MRS bujon samo je u podlogu dodan agar od 15 g L⁻¹.

Podloga za uzgoj bakterija

Za uzgoj i određivanje broja bakterija *E. coli* 3014, *P. aeruginosa* 3024, *S. aureus* 3048, *S. typhimurium* 3064, *L. monocytogenes* 3112 i *S. carnosus* 12st korišteni su hranjivi bujon i hranjivi agar (Biolife). Uzgoj navedenih bakterija proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 37 °C tijekom 48 sati.

Hranjivi bujon sastava (g L⁻¹):

mesni ekstrakt	3
NaCl	5
K ₃ PO ₄	0,3
pepton	15

pH vrijednost podloge je 7,3, sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta. Hranjivi agar je istog sastava kao i hranjivi bujon samo je u podlogu dodan agar od 18 g L⁻¹.

Podloga za uzgoj kvasaca

Za uzgoj i određivanje broja stanica kvasaca *C. albicans* 86, *S. cerevisiae* 5, *K. marxianus* DS12 i *P. guilliermondii* korišteni su sladni bujon i sladni agar (Biolife). Uzgoj kvasaca proveden je u laboratorijskim uvjetima pri 28 °C tijekom 48 sati.

Sladni bujon sastava (g L⁻¹):

sladni ekstrakt	17
pepton	3

u destiliranoj vodi pH vrijednost podloge je 5,5, sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

Sladni agar sastava (g L⁻¹):

maltoza	12,5
dekstrin	2,5
glicerol	1,0
peptokompleks	2,6
agar	17

pH vrijednost podloge je 4,6, sterilizacija je provedena pri 121 °C tijekom 15 minuta.

3.1.3. Aparatura i pribor

autoklav Sutjeska, Beograd

termostat Sutjeska, Beograd

vibracijska miješalica, V⁻¹ plus, Biosan, Riga, Latvija

denzitometar, BioMerieux, Marcy-l'Etoile, Francuska

brojač kolonija (BZG30) WTW-Weilheim

Thomaova komorica

Petrijeve zdjelice Φ 10 cm

Mikrobiološke ušice

Bunsenov plamenik

Čitač mikrotitarskih pločica TECAN, Švicarska

3.1.4. Kemikalije

Metilensko modriilo (puferirano)

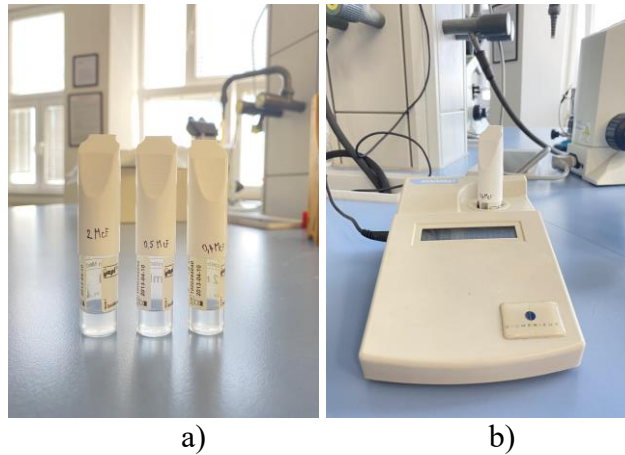
3.2. METODE

3.2.1. Priprema mikrobnih kultura

Prije početka pokusa, bakterije (*E.coli* 3014, *P. aeruginosa* 3024, *S. aureus* 3048, *S. typhimurium* 3064, *L. monocytogenes* 3112 i *S. carnosus* 12st) koje se čuvaju na $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ u hranjivom bujonu s 30 % (v/v) glicerola, bakterije mliječne kiseline (*L. plantarum* K1) koje se čuvaju u MRS bujonu s 30 % (v/v) glicerola i kvasci (*C. albicans* 86, *S. cerevisiae* 5, *K. marxianus* DS12 i *Pichia guilliermondii* ZIM 624) koji se čuvaju u sladnom bujonu s 30 % (v/v) glicerola, potrebno je revitalizirati. Sve bakterije osim *L. plantarum* K1 su nacijepljene u 5 mL svježe pripremljenog hranjivog bujona. *L. plantarum* K1 nacijepljen je u 5 mL svježe pripremljenog MRS bujona, dok su kvasci *C. albicans* 86, *S. cerevisiae* 5, *K. marxianus* DS12 i *Pichia guilliermondii* ZIM 624 nacijepljeni u 5 mL svježe pripremljenog sladnog bujona. Bakterijske kulture su inkubirane na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sati, dok su kulture kvasca inkubirane na $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ tijekom 24 sati. Nakon revitalizacije u tekućoj hranjivoj podlozi, po 0,1 mL bakterija nacijepljeno je na hranjivi agar, BMK na MRS agar te kvasci na sladni agar. Uzorci su zatim inkubirani na $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ za bakterije, odnosno $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ za kvasce tijekom 24 sati. Tako porasle mikrobiološke kulture korištene su u daljnjim pokusima.

3.2.2. Priprema suspenzija određenih gustoća McFarland jedinica

Kulture mikroorganizama porasle na čvrstim hranjivim podlogama korištene su za pripremu suspenzije određenih McFarlandovih jedinica (eng. *McFarland units*). Biomasa pojedine mikrobne kulture je resuspendirana u ampulicama (slika 5a) pomoću mikrobiološke ušice u mediju za pripremu suspenzija. Gustoće pripremljenih suspenzija mjerene su na denzitometru (slika 5b), a iznosile su 0,4, 0,5 i 2 McF jedinica za sve suspenzije mikroorganizama.



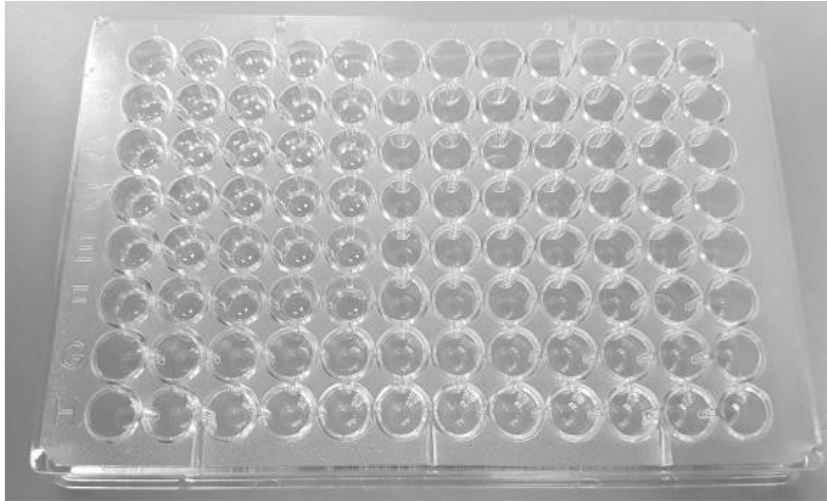
Slika 5. Priprema (a) i mjerenje McFarland jedinica (b) (vlastita fotografija)

Tako pripravljene suspenzije od 0,4, 0,5 i 2 McF upotrijebljene su za usporedno praćenje broja stanica bakterija/kvasaca određenih izravnim i neizravnim metodama. Nakon pripreme suspenzija odgovarajućih McFarland jedinica, pripravljena su decimalna razrjeđenja te su zadnja 3 nacijepljena na odgovarajuće hranjive podloge u triplikatu.

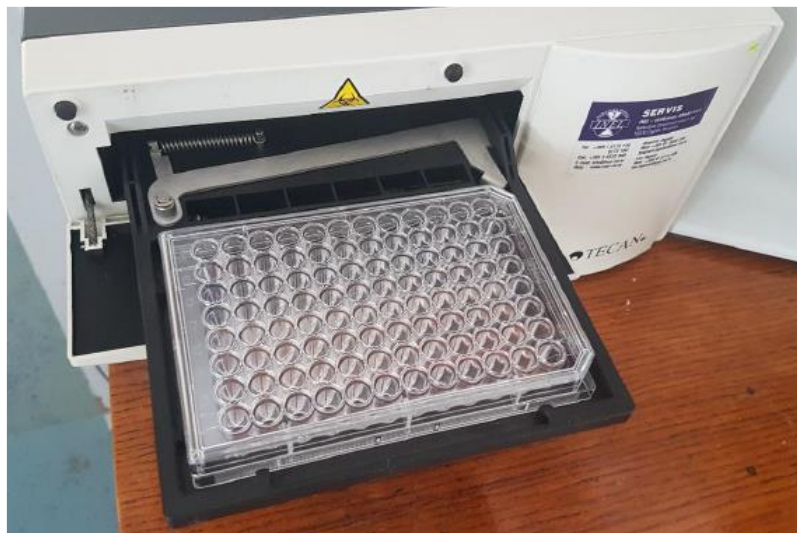
3.2.3. Turbidimetrijsko određivanje broja bakterija/kvasaca

Spektrofotometrijskim mjerenjem na valnoj duljini od 620 nm pomoću čitača mikrotitarskih pločica određena je prividna apsorbancija u pripremljenim suspenzijama bakterija/kvasaca od 0,4, 0,5 i 2 McF jedinica.

U jažice mikrotitarske pločice (slika 6) pipetirano je 250 μL svake suspenzije bakterije, odnosno kvasca. Nakon pipetiranja uzoraka u jažice mikrotitarske pločice, izmjerene su prividne apsorbancije pri 620 nm (slika 7).



Slika 6. Mikrotitarska ploča s naciepljenim uzorcima (vlastita fotografija)



Slika 7. Čitač mikrotitarskih pločica (vlastita fotografija)

3.2.4. Određivanje broja živih bakterija/kvasaca

Nakon što su pripremljene suspenzije mikroorganizama određenih gustoća, od istih su načinjene serije decimalnih razrjeđenja u omjerima 1:10 kako bi se neizravnom metodom naciepljivanja poznatog volumena suspenzije (0,1 mL) na čvrste podloge (hranjivi agar, MRS agar i sladni agar) odredio broj živih stanica ispitivanih mikroorganizama i usporedio s McFarlandovim standardom. Kolonije koje su porasle na čvrstoj podlozi predstavljaju stvaran broj živih stanica, a dobivene vrijednosti se označavaju kao CFU vrijednost (eng. *Colony Forming Units*). Broj živih stanica svake pojedine kulture mikroorganizama izračunat je prema jednadžbi (1).

$$CFU = \frac{\text{broj poraslih kolonija (N)}}{\text{upotrijebljeni volumen uzorka (mL)}} \times \text{recipročna vrijednost razrjeđenja} \quad (1)$$

3.2.5. Određivanje broja živih stanica kvasca direktnom metodom

Broj živih stanica kvasaca *C. albicans* 86 *S. cerevisiae* 5, *K. marxianus* DS12 i *Pichia guilliermondii* ZIM 624 je osim neizravnim metodom određivanja broja živih stanica, određen i izravnim metodom bojanjem puferiranim metilenskim modrilom i brojanjem u Thomaovoj komorici (slika 8). Makroskopski (prostom okom) se uoči ugravirana mrežica na središnjem polju komorice. Nakon što su pripremljene suspenzije kvasca gustoća 0,4, 0,5 i 2 McF jedinica, na površinu mrežice je stavljena jedna kap puferiranog metilenskog modrila (boja koju će apsorbirati samo mrtve stanice kvasaca) u koju je sterilnom mikrobiološkom ušicom nanesa suspenzija kvasca nakon čega je preparat ostavljen pet minuta kako bi se odvila reakcija (Hajsig i Delaš, 2016). Neophodno je dobro priliježanje pokrovnice, a ono se postiže njenim laganim pomicanjem gore-dolje i lijevo-desno do pojave Newtonovih kolobara (kolobari spektralnih boja) te istiskanjem mjehurića zraka (Delaš i sur., 2018). Komorica se zatim stavi na stolić mikroskopa i mikroskopira se pod ukupnim povećanjem 100x dok se ne vidi cijela mrežica, nakon čega se preparat mikroskopira pod ukupnim povećanjem 400x. Mikroskopiranjem pod ukupnim povećanjem 400x pronađen je jedan od velikih kvadrata na mrežici te su izbrojane sve žive stanice (nebojane). Stanice su izbrojene u 3 velika kvadrata te je izračunata njihova srednja vrijednost. Ukoliko su stanice na granici, uobičajena je praksa da se broje samo one koje se nalaze lijevo i gore u kvadratu (Zhang i sur., 2019). Svakako, u obzir je potrebno uzeti i razrjeđenje suspenzije iz koje je uzet uzorak za određivanje broja živih stanica kvasca.

Broj stanica kvasca izračunat je prema izrazu (2):

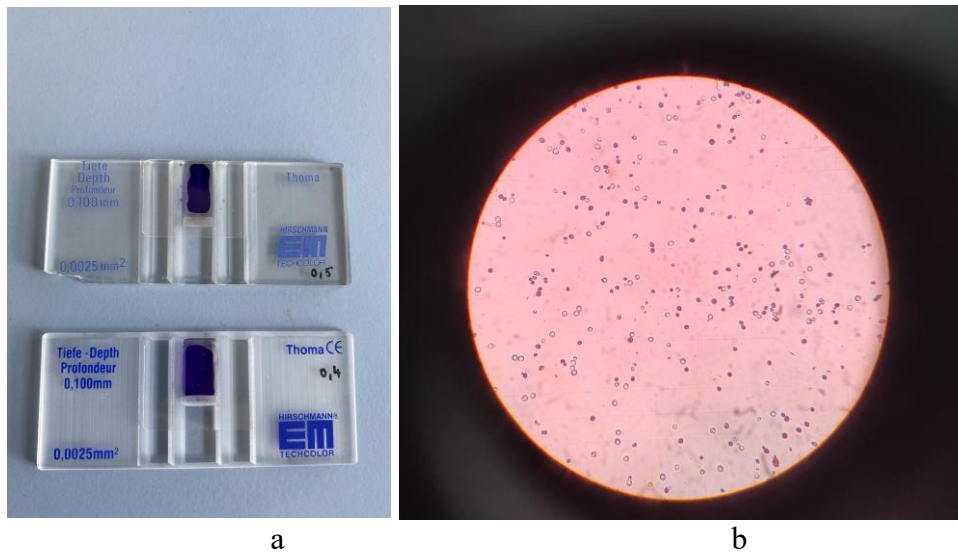
$$N = \frac{m \times n \times 1000 \times 4000}{q} \text{ stanica mL}^{-1} \quad (2)$$

Gdje je: N = broj živih stanica kvasca u Thomaovoj komorici

m = broj izbrojenih živih stanica

n = razrjeđenje uzorka u kojem su brojane stanice kvasca

q = broj malih kvadratića u kojima su izbrojene stanice kvasca



Slika 8. Priprema preparata kvasca u puferiranom metilenskom modrilu u Thomaovoj komorici (a) i mikroskopska slika živih (nebojanih) i mrtvih (plavih) stanica kvasca (b) (vlastita fotografija)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

U ovom je radu mikrobní rast određen praćenjem povećanja broja stanica pomoću izravnih i neizravnih metoda kao što su: priprema McFarlandovih jedinica, određivanje u Thomaovoj komorici, turbidimetrijsko određivanje odnosno određivanje broja živih stanica. Kao test mikroorganizmi upotrijebljeni su sojevi odabranih gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija te kvasci. Rezultati istraživanja prikazani su u tablicama 2 i 3.

4.1.1. Rezultati određivanja broja stanica bakterija

Rezultati određivanja broja živih stanica bakterija pri određenoj vrijednosti McFarlandovih jedinica prikazani su u tablici 2. Od metoda su se koristile priprema McF jedinica, naciepljivanje 0,1 mL suspenzije na podloge te turbidimetrijsko određivanje.

Tablica 2. Broj živih stanica predstavnika patogenih bakterija za 0,4, 0,5 te 2 McF jedinice

	McF jedinice	CFU mL ⁻¹	OD (620)
<i>E. coli</i> 3014	0,4	3×10^5	0,087
	0,5	$2,2 \times 10^7$	0,100
	2	$3,3 \times 10^8$	0,138
<i>S. typhimurium</i> 3064	0,4	$1,4 \times 10^8$	0,076
	0,5	$2,4 \times 10^8$	0,097
	2	$4,9 \times 10^8$	0,157
<i>P. aeruginosa</i> 3024	0,4	$7,7 \times 10^5$	0,084
	0,5	$9,3 \times 10^6$	0,093
	2	$5,4 \times 10^8$	0,189
<i>S. aureus</i> 3048	0,4	$1,9 \times 10^7$	0,098
	0,5	$3,4 \times 10^7$	0,110
	2	$3,7 \times 10^7$	0,205
<i>L. monocytogenes</i> 3112	0,4	$4,5 \times 10^7$	0,077
	0,5	$1,7 \times 10^8$	0,109
	2	$2,3 \times 10^8$	0,219
<i>S. carnosus</i> 12st	0,4	$2,3 \times 10^6$	0,079
	0,5	$3,3 \times 10^6$	0,154
	2	$2,4 \times 10^7$	0,205
<i>L. plantarum</i> K1	0,4	$1,3 \times 10^7$	0,082
	0,5	$2,4 \times 10^7$	0,085
	2	$6,3 \times 10^7$	0,194

4.1.2. Rezultati određivanja broja stanica kvasca

Rezultati određivanja broja živih stanica kvasca prikazani su u tablici 3. Korištene metode obuhvaćaju: pripremu McF jedinica, nacjepljivanje 0,1 mL suspenzije na podloge, turbidimetrijsko određivanje te brojanje pomoću Thomaove komorice.

Tablica 3. Broj živih stanica kvasca za 0,4, 0,5 te 2 McF jedinice

	McF jedinice	CFU mL ⁻¹	OD (620)	Thomaova komorica
<i>C. albicans</i> 86	0,4	$4,3 \times 10^6$	0,100	$3,2 \times 10^6$
	0,5	$6,8 \times 10^6$	0,104	$3,5 \times 10^6$
	2	$1,2 \times 10^7$	0,221	$7,5 \times 10^6$
<i>S. cerevisiae</i> 5	0,4	$1,5 \times 10^6$	0,057	$1,1 \times 10^6$
	0,5	$2,4 \times 10^6$	0,085	$2,6 \times 10^6$
	2	$1,5 \times 10^7$	0,174	$1,7 \times 10^7$
<i>K. marxianus</i> DS12	0,4	4×10^6	0,103	$1,5 \times 10^6$
	0,5	6×10^6	0,124	$1,6 \times 10^6$
	2	$1,8 \times 10^7$	0,221	$2,6 \times 10^7$
<i>P. guilliermondii</i> ZIM 624	0,4	3×10^7	0,091	$7,7 \times 10^7$
	0,5	$3,7 \times 10^7$	0,100	$8,3 \times 10^7$
	2	$1,2 \times 10^8$	0,208	$1,3 \times 10^8$

4.2. RASPRAVA

Rezultati u tablicama 2 i 3 prikazuju broj živih stanica ispitivanih mikroorganizama pripremljenih u različitim gustoćama suspenzija (0,4 do 2 McF jedinice). Korišteno je 7 različitih sojeva bakterija: *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *Salmonella spp.*, *L. monocytogenes*, *L. plantarum* i *S. carnosus* te 4 različita kvasca: *C. albicans*, *S. cerevisiae*, *K. marxianus* i *P. guilliermondii*.

Iz rezultata prikazanih u tablici 2, jasno je vidljivo povećanje broja živih stanica patogenih bakterija s povećanjem McF jedinica. Povećanje broja živih stanica vrijedi za svih 7 ispitivanih bakterija, no kod nekih (*E. coli* i *P. aeruginosa*) je ta razlika veća u usporedbi s drugim bakterijama (*Salmonella spp.* i *L. monocytogenes*), dok je u slučaju bakterija *S. aureus* i *L. plantarum*, razlika u povećanju broja živih stanica gotovo neprimjetna. Broj živih stanica bakterija za 0,5 McF iznosi $1,5 \times 10^8$ CFU mL⁻¹, dok za 2 McF iznosi $6,0 \times 10^8$ CFU mL⁻¹ (Anonymus 2, 2002). Uspoređujući to s dobivenim rezultatima, vidljivo je da vrijednosti većine bakterija (*E. coli*, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* te *L. monocytogenes*) odgovaraju tom redu veličine. Rezultati za preostale 3 bakterije (*S. aureus*, *S. carnosus* i *L. plantarum*) su za red veličine manji od uobičajenog jer točan broj živih stanica varira zbog razlike u veličini i masi mikroorganizama. Točnost gustoće McFarlandovih standarda može se provjeriti pomoću spektrofotometra. McFarlandov standard od 0,5 ima očitane apsorbancije od 0,08 do 0,1 na 625 nm (Anonymus 2, 2002). Budući da se u ovom radu koristila valna duljina od 620 nm, što je minimalna razlika u odnosu na 625 nm, može se uočiti da dobivene vrijednosti apsorbancije za sve patogene bakterije ulaze u navedeni raspon. Povećanjem McF jedinica, raste i optička gustoća jer je više bakterijskih stanica, veće je zamućenje pa se i količina svjetlosti koja prolazi kroz uzorak smanjuje (Omar i MatJafri, 2009) te su takvi rezultati očekivani. Kralik i sur. (2012) su u svom radu za slične vrijednosti optičke gustoće (0,08 i 0,15) dobili 100 puta manje brojeve u odnosu na rezultate prikazane u tablici 2, a razlog može biti što kolonije na istoj ploči rastu različitim brzinama i različite su veličine. U radu također navode da je ovisnost OD i CFU vrijednosti linearna, a isti trend prate i dobiveni rezultati u tablici 2. Granica detekcije za OD je kod Kralika i sur. (2012) bila niža ($3,0 \times 10^4$ CFU mL⁻¹) nego inače (10^6 CFU mL⁻¹) (Sutton, 2011), no kako se vrijednosti u ovom radu kreću iznad 10^6 , nije bilo problema s detekcijom.

Rezultati u tablici 3 pokazuju porast broja živih stanica kvasca s porastom McF jedinica za sva 4 soja, a povećanjem optičke gustoće proporcionalno raste i broj stanica u hranjivoj podlozi. Souza i sur. (2020) navode da je uobičajen broj živih stanica kvasca za 0,5 McF $1,2 \times 10^6$ CFU

mL⁻¹, dok za 2 McF iznosi $5,0 \times 10^6$ CFU mL⁻¹. Dobiveni rezultati se kreću oko 10^6 CFU mL⁻¹ te možemo reći da su očekivani. Izuzetak je *P. guilliermondii* koji ima više živih stanica od predviđenog, a razlog može biti razlika u veličini i masi mikroorganizama. Ako se usporede tablica 2 i 3, lako je uočiti da je broj živih stanica bakterija 100 puta veći od broja živih stanica kvasca, a tome je tako jer su stanice kvasca (20 do 50 µm) puno veće od bakterija (1 do 10 µm) pa je potrebno manje stanica kako bi se postigla predviđena zamućenost McFarlandovog standarda. Souza i sur. (2020) su u istom radu naveli da predviđena optička gustoća za 0,5 McF iznosi 0,104, dok za 2 McF iznosi 0,242. Uspoređujući te vrijednosti s dobivenim rezultatima, može se uočiti da optičke gustoće doista variraju oko 0,1 te 0,24.

Iako je priprema suspenzija mikroorganizama različitih gustoća i mjerenje McFarland jedinica prilično standardna, vrlo brza i široko rasprostranjena metoda, rezultati dobiveni tijekom ovog rada pokazali su da nije u potpunosti u skladu s brojanjem živih stanica u Thomaovoj komorici. Razlika u broju živih stanica kvasca dobivenih brojanjem poraslih kolonija na čvrstoj podlozi u Petrijevoj zdjelici i brojanjem u Thomaovoj komorici primjenom puferirane otopine metilenskog modrila može se objasniti fiziološkim stanjem organizma je su li mlade ili stare stanice, ali i time što CFU predstavlja jedinice koje tvore kolonije pa njihov broj dobiven na hranjivoj podlozi može biti manji nego broj stanica u suspenziji. Stoga, iako su se koristile suspenzije kvasca istih McF jedinica (0,4, 0,5 i 2), dobiveni su različiti rezultati primjenom različitih metoda. Razlika nije značajna (osim za *C. albicans* pri 2 McF kod kojeg je moguća pogreška u radu), no slična su zapažanja objavljena u znanstvenim radovima. Tako su na primjer, Procop i sur. (2017) sugerirali da je potrebno povremeno provjeravati količinu mikroorganizama u inokulumu ako se za pripremu inokuluma koristi McFarlandov standard i to na način da se inokuliraju serijska razrjeđenja suspenzije u agar ploče. U svakom slučaju, ono što svi autori ističu je potreba za standardizacijom i provjerom korištenih postupaka kako bi se smanjila mogućnost pogreške.

5. ZAKLJUČAK

Iz dobivenih rezultata istraživanja može se zaključiti sljedeće:

1. Pri istim McF jedinicama postoji razlika u CFU vrijednostima i optičkoj gustoći u ovisnosti o vrsti mikroorganizama.
2. Odabrane štapičaste gram-negativne bakterije, vjerojatno zbog svoje pokretljivosti, pri 2 McF pokazuju manje zamućenje suspenzije (optičku gustoću) u odnosu na odabrane gram-pozitivne bakterije i kvasce.
3. Budući da su stanice kvasca i do 10x veće od bakterija, za pripremu istih vrijednosti McF jedinica potrebno je i manje stanica kvasaca.
4. U ovom radu primjenom McF standarda za različite test mikroorganizme dobiveni su različiti rezultati primjenom različitih metoda, što sugerira da bi se za svaki mikroorganizam trebao načiniti vlastiti standard.

6. POPIS LITERATURE

Andersen RA (2005) Algal culturing techniques, 1.izd., Elsevier, str. 239–252.

Anonymus1,

<<https://cwoer.ccbcmd.edu/science/microbiology/Lab%20Manual/lab4/appb.html>>

Pristupljeno 23. lipnja 2022.

Anonymus 2, < http://www.dalynn.com/dyn/ck_assets/files/tech/TM53.pdf> Pristupljeno 21. kolovoza 2022.

Baena-Ruano S, Jiménez-Ot C, Santos-Dueñas IM, Cantero-Moreno D, Barja F, García-García I (2006) Rapid method for total, viable and non-viable acetic acid bacteria determination during acetification process. *Process Biochemistry* **41(5)**, 1160–1164.

Bastidas O (2013) Cell counting with neubauer chamber, basic hemocytometer usage. *Technical Note-Neubauer Chamber Cell Counting*, str. 1-6.

Ben-David A, Davidson CE (2014) Estimation method for serial dilution experiments. *Journal of Microbiological Methods* **107**, 214–221.

Beveridge TJ, Lawrence JR, Murray RG (2007) Sampling and staining for light microscopy. *Methods for general and molecular microbiology*, str. 19-33.

Delaš F, Markov K, Frece J (2018) Interna skripta za studentski praktikum iz kolegija „Mikrobiologija“, Prehrambeno-biotehnološki fakultet u Zagrebu.

Duraković S (1996) Opća mikrobiologija. *Prehrambeno tehnološki inženjering* **11**, 157-158.

Gupta A, Dwivedi M, Nagana Gowda GA, Ayyagari A, Mahdi AA, Bhandari M, i sur. (2005) ¹H NMR spectroscopy in the diagnosis of *Pseudomonas aeruginosa*-induced urinary tract infection. *NMR in Biomedicine* **18(5)**, 293–299.

Hajsig D, Delaš F (2016) Priručnik za vježbe iz opće mikrobiologije. Hrvatsko mikrobiološko društvo, Zagreb, 51-57.

Hongve D, Åkesson G (1996) Spectrophotometric determination of water colour in Hazen units. *Water Research* **30(11)**, 2771-2775.

Humberd CM, Murray CK, Stuart SK, Reeb BA, Hospenthal DR (2005) Enumerating leptospores using the Coulter Counter. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **73(5)**, 962-963.

Kanižai Šarić G (2015) Praktikum iz opće mikrobiologije, Fakultet agrobiotehničkih znanosti u Osijeku.

Kralik P, Beran V, Pavlik I (2012) Enumeration of *Mycobacterium avium* subsp. paratuberculosis by quantitative real-time PCR, culture on solid media and optical densitometry. *BMC Research Notes* **5(1)**, 114.

Lahuerta Zamora L, Perez-Gracia MT (2012) Using digital photography to implement the McFarland method. *Journal of The Royal Society Interface* **9(73)**, 1892–1897.

- Lewis CL, Craig CC, Senecal AG (2014) Mass and Density Measurements of Live and Dead Gram-Negative and Gram-Positive Bacterial Populations. *Applied and Environmental Microbiology* **80(12)**, 3622–3631.
- Lozano GE, Beatriz SR, Cervantes FM, María GNP, Francisco JMC (2018) Low accuracy of the McFarland method for estimation of bacterial populations. *African Journal of Microbiology Research* **2(31)**, 736–740.
- Matlock C, Wilmington DE (2017) Differences in bacterial optical density measurements between UV-Visible spectrophotometers. *Thermo Scientific*, Wilmington, DE USA.
- Omar AFB, MatJafri, MZB (2009) Turbidimeter design and analysis: a review on optical fiber sensors for the measurement of water turbidity. *Sensors* **9(10)**, 8311-8335.
- Peñuelas-Urquides K, Villarreal-Treviño L, Silva-Ramírez B, Rivadeneyra-Espinoza L, Said-Fernández S, León MBde (2013) Measuring of Mycobacterium tuberculosis growth: a correlation of the optical measurements with colony forming units. *Brazilian Journal of Microbiology* **44(1)**, 287–290.
- Pradhan SK, Tarafder, PK (2016) A scheme for performance evaluations of UV–Visible spectrophotometer by standard procedures including certified reference materials for the analysis of geological samples. *Mapan* **31(4)**, 275-281.
- Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Konema EW, Schreckenber PC (2017) Koneman Microbiological diagnosis-text and atlas. Wolters Kluwer 7a Ed. Barcelona
- Somasegaran P, Hoben HJ (1994) Quantifying the growth of rhizobia. *Handbook for rhizobia*, Springer, New York. str. 47-57.
- Souza FA, da Silva VG, Bitencourt TB (2020) Use of McFarland Standards and Spectrophotometry for Yarrowia Lipolytica QU69 cell counting. *International Journal of Environment, Agriculture and Biotechnology*, **5(4)**, 1089-1091.
- Stilinović B, Hrenović J (2009) Praktikum iz bakteriologije. Kugler, Zagreb, Hrvatska.
- Sutton S (2011) Measurement of microbial cells by optical density. *Journal of Validation Technology* **17(1)**, 46-49.
- Zapata A, Ramirez-Arcos S (2015) A Comparative Study of McFarland Turbidity Standards and the Densimat Photometer to Determine Bacterial Cell Density. *Current Microbiology* **70(6)**, 907–909.
- Zhang M, Gu L, Zheng P, Chen Z, Dou X, Qin Q, i sur. (2019) Improvement of cell counting method for Neubauer counting chamber. *Journal of Clinical Laboratory Analysis* **34(1)**.

Izjava o izvornosti

Ja ___Nikolina Teskera___ izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mojeg rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio/la drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Teskera

Vlastoručni potpis