



TRADICIONALNE TEHNIKE IZOLACIJE PLIJESNI NA AGARU



Sonja Žinić, dipl. ing.

PLIJESNI

-carstvo gljiva

-proizvodi za prehranu ljudi i hrana za životinje

-hranjive podloge, pri 25°C



ZAKONSKA REGULATIVA



Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu, ožujak 2011., 3. izdanje, RH Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja

<http://www.mps.hr/UserDocImages/publikacije/2011/Vodic%20o%20mikrobioloskim%20kriterijima-%203.%20izdanje-objava.pdf>

VAŽEĆA NORMA



HRN ISO 21527- 1(2012) : Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 1. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode većim od 0,95 (ISO 21527-1:2008)

HRN ISO 21527- 2 (2012) : Mikrobiologija hrane i hrane za životinje – Horizontalna metoda za brojenje kvasaca i plijesni – 2. dio: Tehnika brojenja kolonija u proizvodima s aktivitetom vode manjim od 0,95 (ISO 21527-2:2008)

PRIMJENA

21527-1

- mliječni proizvodi, meso, jaja,
voće i povrće, svježa
tjestenina,...



21527-2

- sušeno voće, sušeno meso,
soljena riba, žitarice, mahunarke,
brašno, orašasti plodovi,...



- brzo rastuće plijesni

NIJE PRIMJENJIVO

- identifikacija flore (određivanje vrsta plijesni ili kvasaca)
- brojenje spora plijesni
- prisutnost mikotoksina



21527-1 - brojenje plijesni otpornih na toplinu

(konzervirani i flaširani proizvodi)

21527-2 - dehidrirani proizvodi sa $a_w \leq 0,6$

(masni proizvodi, instant napitci u prahu, začini, sjemenke, neke vrste plijesni iz sušene ribe)

Annex A – a_w u odnosu na matrix

NEVAŽEĆE NORME

- HRN ISO 7698(2001) : Žitarice, mahunarke i njihovi proizvodi – Brojenje kolonija kvasaca i plijesni (ISO 7698:1990)
- HRN ISO 13681(2001) : Meso i mesni proizvodi – Brojenje kolonija kvasaca i plijesni – Brojenje kolonija (ISO 13681:1995)
- HRN ISO 7954(2002) : Mikrobiologija – Opća uputa za brojenje kvasaca i plijesni – Brojenje kolonija pri 25°C (ISO 7954:1987)

PRIPREMA BUJONA I AGARA PREMA ISO/TS 11133

Diluent – 0,1 % peptonska voda

Agar

Dicloran Rose bengal chloramphenicol agar (DRBC) 21527-1	Dicloran 18% glycerol agar (G18) 21527-2
enzim iz mesa ili biljnog tkiva (pepton)	Enzim iz kazeina (pepton)
glukoza	glukoza
K dihidrogen fosfat	K dihidrogen fosfat
Mg – sulfat	Mg – sulfat
Rose bengal	Bezvodni glicerol
Dikloran	Dikloran
Agar – agar	Agar – agar
Chloramphenicol	Chloramphenicol
Voda	Voda

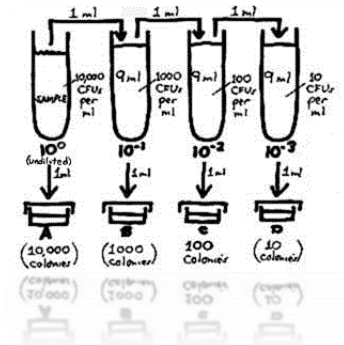
pH=5,6 ±0,2 pri 25°C

PRIPREMA UZORKA, OSNOVNOG I OSTALIH DECIMALNIH RAZRJEĐENJA PREMA ISO 6887

- 10g + 90 mL 0,1 % peptonske vode
- priprema osnovnog i daljnjih d. razrjeđenja – procjena broja (tekući i ostali uzorci)



homogenizacija i vorteksiranje radi brze sedimentacije čestica koje sadrže mikroorganizme



priprema d.razrjeđenja – pipeta u vodoravnom položaju





METODA - NACJEPLJIVANJE NA PODLOGU PREMA ISO 7218

- 2 uzastopna decimalna razrjeđenja / 0,1 mL
- 1 mL / 3 ploče – brojenje malog broja kvasaca i/ili plijesni

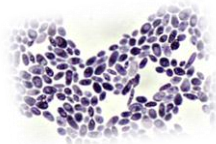
*metoda zalijevanjem podloge – nakon validacije

INKUBACIJA I IDENTIFIKACIJA

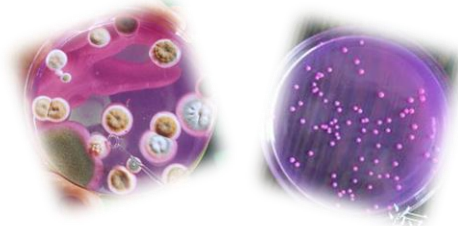
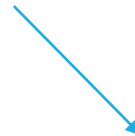


- pri $(25 \pm 1)^\circ\text{C}$, aerobno
 - u otvorenoj plastičnoj vrećici
 - očitavanje 21527-1 - 5d - brzo rastuće plijesni 2.,
zatim 5. dan
- ↓
- 21527-2- 5-7 d- brzo rastuće plijesni 2., 5., a
zatim 7. dan
 - Sumnja na *Xeromyces bisporus* - inkubacija 10 d

Podloge - $>10\text{cfu}$ i $<150\text{cfu}$ (prema ISO 7218)



Računanje



izražavanje broja cfu/g ili cfu/mL uzorka

Algoritam 21527-1

10 g uzorka + 90 mL diluenta (0,1 % peptonska voda)



homogenizacija

Priprema osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja



procjena broja

nacjepljivanje barem 2 uzastopna razrjeđenja

0,1 mL na površinu DRBC agara

inkubacija pri (25±1) °C 5 d

Brojenje

2 uzastopna razrjeđenja u kojima je izraslo najviše 150 kolonija, najmanje 10 kolonija prema ISO 7128:2008

Identifikacija kvasaca (mikroskopski preparat)

Računanje

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

Algoritam 21527-2

10 g uzorka + 90 mL diluenta (0,1 % peptonska voda)



homogenizacija

Priprema osnovnog i ostalih decimalnih razrjeđenja



procjena broja

nacjepljivanje barem 2 uzastopna razrjeđenja

0,1 mL na površinu DG 18 agara

inkubacija pri (25±1) °C 5 – 7

brzo rastuće plijesni 2., 5. i 7. dan
Xeromyces bisporus – 10

Brojenje

2 uzastopna razrjeđenja u kojima je izraslo najviše 150 kolonija, najmanje 10 kolonija prema ISO 7128:2008

Identifikacija kvasaca (mikroskopski preparat)

Računanje

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2) \times d}$$

ZAKLJUČAK

TEHNIKE BROJENJA KVASACA I PLIJESNI

- neprecizna metoda (mješavina micelija, vegetativnih i spolnih spora)
- broj cfu – stupanj fragmenata micelija
 - odnos spora sa sposobnosti rasta na hranjivoj podlozi
- ne linearnost rezultata (decimalna razrjeđenja)
 - razlomljenost micelija
 - lomljenje spora rast velikih količina plijesni koje nisu prisutne u uzorku }
- rukovanje Petrijevim posudama – veliki oprez(kontaminacija prostorija i inkubatora)
- pojava „satelitnih” kolonija – precjenjivanje broja plijesni koji nisu prisutni u uzorku

HVALA NA PAŽNJI

