

DG18 CHLORAMPHENICOL AGAR

Terreno di coltura in polvere



DG18 Chloramphenicol Agar colonies of *Eurotium rubrum*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di lieviti e muffe in alimenti e mangimi con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 (ISO 21527-2)

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

DG18 AGAR BASE, TERRENO DISIDRATATO

Idrolisato enzimatico di caseina	5 g
D-Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g
Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄)	1 g
Magnesio solfato (MgSO ₄ .H ₂ O)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)	0,002 g
Cloramfenicolo	0,1 g
Agar	13,5 g

* La formulazione può essere compensata e/o corretta per soddisfare le prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

DG18 Chloramphenicol Agar è un terreno a bassa attività dell'acqua, ideato da Hocking e Pitt per il conteggio dei funghi xerofili da alimenti con bassa umidità.¹ È raccomandato da ISO 21527-2 e da FDA-BAM per il conteggio di lieviti osmofili vitali e muffe xerofile in prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali, aventi un'attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95, mediante la tecnica del conteggio delle colonie.^{2,3}

Il glicerolo nel terreno riduce l'attività dell'acqua da 0,999 a 0,95. Pitt e Hocking⁴ hanno dimostrato che il glicerolo è un soluto adatto per la coltivazione di una gamma di funghi xerofili: è meno inibitorio di NaCl per alcune specie, produce terreni trasparenti ed è più facilmente manipolabile rispetto agli zuccheri ad alte concentrazioni. È stato dimostrato che il dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) inibisce la diffusione dei funghi mucoracei e limita i diametri delle colonie di altri generi in un terreno di conteggio dei funghi per gli alimenti.⁵ Il digerito enzimatico della caseina fornisce azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il fosfato monobasico di potassio tampona il terreno. Il solfato di magnesio favorisce la crescita micotica. Le proprietà selettive del terreno sono determinate dalla presenza di cloramfenicolo già incluso nel terreno disidratato: un antibiotico ad ampio spettro, che è inibitore di un'ampia gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 30,1 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente fino a completa dissoluzione e aggiungere 220 g di Glicerolo anidro (REF 421015). Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47°C, mescolare bene e distribuire in aliquote da 15 mL in piastre Petri sterili. Evitare l'esposizione del terreno alla luce.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione e in piastra

beige, da limpido a leggermente opalescente.

pH (20-25°C)

5,6 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
DG 18 Chloramphenicol Agar	Terreno di coltura in polvere	401394C2	500 g (16,6 L)

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre di Petri sterili, Glicerolo anidro (REF 421015), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali con un'attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 come frutta secca, torte, marmellate, carne secca, pesce sotto sale, cereali, cereali e prodotti a base di cereali, farine, noci, spezie e condimenti, ecc. Preparare il campione da testare in conformità allo Standard Internazionale specifico per il prodotto in questione. Operare secondo le buone pratiche di laboratorio per la raccolta dei campioni, la conservazione e il trasporto al laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

La procedura di lavoro qui descritta è tratta dalla norma ISO 21527-2.²

1. Su una piastra di DG18 Chloramphenicol Agar, utilizzando una pipetta sterile nuova, trasferire 0,1 mL del campione in esame se liquido o 0,1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.

2. Ripetere questa operazione con le diluizioni successive, utilizzando una nuova pipetta sterile per ogni diluizione decimale.

3. Per facilitare il conteggio di basse popolazioni di lieviti e muffe, un volume pari a 0,3 mL di una diluizione 10⁻¹ del campione, o del campione stesso se liquido, può essere distribuito su tre piastre.

4. Distribuire uniformemente il liquido sulla superficie dell'agar con un dispositivo sterile fino a completo assorbimento del liquido nel terreno.

5. Incubare in aerobiosi le piastre inoculate in posizione verticale a 25 ± 1°C per 5-7 giorni.





10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Se necessario, eseguire un esame con una lente binoculare o con un microscopio per distinguere tra cellule di lieviti o muffe e colonie di batteri.

Leggere le piastre dopo 2 giorni, 5 giorni e 7 giorni di incubazione. Se si sospetta la presenza di *Xeromyces bisporus*, incubare le piastre per 10 giorni.

Selezionare le piastre contenenti meno di 150 colonie/propaguli/germi, contare le colonie/propaguli/germi e riportarne il numero per grammo di alimento.

11 – CONTROLLO DI QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	25 ± 1°C/ 5 gg/A	crescita
<i>Wallemia sebi</i> ATCC 42694	25 ± 1°C/ 5 gg/A	crescita
<i>Aspergillus restrictus</i> ATCC 42693	25 ± 1°C/ 5 gg/A	crescita con diffusione limitata
<i>Eurotium rubrum</i> ATCC 42690	25 ± 1°C/ 5 gg/A	crescita con diffusione limitata
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25 ± 1°C/ 5 gg/A	inibito
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	25 ± 1°C/ 5 gg/A	inibito

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, i campioni rappresentativi di tutti i lotti di DG 18 Chloramphenicol Agar disidratato vengono testati per la produttività e la selettività confrontando i risultati con il lotto di riferimento: Sabouraud Dextrose Agar (produttività).

La produttività è testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *W. sebi* ATCC 42694, *A. restrictus* ATCC 42693, *E. rubrum* ATCC 42690; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie ed incubate a 25 ± 1°C per 5 giorni in aerobiosi. Le colonie vengono contate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e viene calcolato il rapporto di produttività Pr. Se Pr è ≥ 0,5 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici e se la diffusione delle colonie è limitata, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato inoculando in superficie le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione McFarland 0,5 dei seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922, *B. subtilis* ATCC 6633. La crescita dei ceppi non target è totalmente inibita.

13-LIMITI DEL METODO

- Evitare l'esposizione del terreno alla luce, poiché i prodotti di decomposizione citotossica possono determinare una sottostima della micoflora nei campioni.²
- Laddove la proliferazione batterica può rappresentare un problema, si raccomandano cloramfenicolo (50 mg/L) e clorotetraciclina (50 mg/L).²
- DG 18 Chloramphenicol Agar e la procedura tratta dalla ISO 21527-2 non si applicano ai prodotti disidratati con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,60 e non consentono il conteggio delle spore di muffa.²
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle muffe sono imprecisi perché essi sono costituiti da una miscela di micelio e spore asexuate e sessuate. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno in piastra.²
- Si verifica spesso la non linearità dei conteggi dal metodo di coltura per diluizione, ovvero diluizioni di 10 volte dei campioni spesso non determinano riduzioni di 10 volte del numero di colonie recuperate sui terreni di coltura. Ciò è stato attribuito alla frammentazione del micelio e alla rottura degli agglomerati di spore durante la diluizione, oltre all'inibizione competitiva quando sulle piastre è presente un gran numero di colonie.²
- Le spore delle muffe si disperdono nell'aria con grande facilità, maneggiare le piastre Petri con cura per evitare lo sviluppo di colonie satelliti che darebbero una sovrastima della popolazione nel campione.²
- Anche se le colonie microbiche presenti sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire i test di identificazione su isolati, da coltura pura.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- DG 18 Chloramphenicol Agar è per controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Il terreno disidratato DG 18 Chloramphenicol Agar è classificato come pericoloso. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.





- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo Baird RM et al. le piastre preparate in autonomia possono essere conservate a +2°C +8°C al buio e protette dall'evaporazione per un massimo di 7 giorni.⁶

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Hocking, A.D., and Pitt, J.L. (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. Appl. Environm. Microbiol 39:488-492.
2. ISO 21527-2:2008. Microbiology of food and animal feeding stuffs -- Horizontal method for the enumeration of yeasts and moulds -- Part 1: Colony count technique in products with water activity less than or equal to 0,95.
3. FDA-BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Content current as of: 10/31/2017.
4. Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1977. Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. J. Gen. Microbiol. 101:35-40.
5. King, A. D., A. D. Hocking, and J. I. Pitt. 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl. Environ. Microbiol. 37:959-964.
6. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 216-218.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni.

