

## M17 AGAR

### Terreno di coltura in polvere

#### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Terreno per la coltivazione e il conteggio degli streptococchi lattici nel latte e nei prodotti lattiero-caseari; per il conteggio dello *Streptococcus thermophilus* nello yogurt.

#### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

##### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA \*

Idrolizzato triptico di caseina	2,50 g
Peptone	2,50 g
Peptone di soia	5,00 g
Estratto di lievito	2,50 g
Estratto di carne	5,00 g
Sodio glicerofosfato	19,00 g
Magnesio solfato	0,25 g
Acido ascorbico	0,50 g
Lattosio	5,00 g
Agar	13,00 g

\*Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche

#### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Gli streptococchi lattici sono batteri produttori di acido, nutrizionalmente esigenti, che richiedono terreni complessi per una crescita ottimale. Sono molto utilizzati come colture starter nell'industria lattiero-casearia.

M17 Agar è stato sviluppato da Terzaghi e Sandine<sup>1</sup> per migliorare la crescita degli streptococchi lattici e dei loro batteriofagi aggiungendo il disodio-β-glicerofosfato come sistema tampone al terreno M16 ideato da Lowrie RJ *et al.*<sup>2</sup> In seguito si è scoperto che l'aggiunta del tampone glicerofosfato inibisce la crescita di molte specie di *Lactobacillus*.<sup>3</sup>

M17 Agar è raccomandato dalla ISO 7889 (IDF 117) per il conteggio di *Streptococcus thermophilus* dallo yogurt.<sup>4</sup> Terzaghi e Sandine raccomandano M17 Agar anche per la dimostrazione dell'attività dei batteriofagi lattici; quando si adotta questo metodo, 100 mL di terreno vengono integrati con 10 mL di CaCl<sub>2</sub>·6 H<sub>2</sub>O 1,0 M.<sup>1</sup> Il terreno si è rivelato utile anche per l'isolamento di mutanti batterici privi della capacità di fermentare il lattosio; tali mutanti hanno formato colonie minuscole su piastre di M17 agar, mentre le cellule wild-type hanno formato colonie di 3-4 mm di diametro.<sup>1</sup>

L'estratto di proteine vegetali (peptone di soia) e altri peptoni forniscono azoto e minerali per la crescita microbica, l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine B per la stimolazione della crescita, il lattosio è il carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia. Il glicerofosfato di sodio tampona l'acidità prodotta dalla fermentazione del lattosio e mantiene il pH al di sopra di 5,7 durante la crescita microbica attiva, consentendo il recupero ottimale degli streptococchi lattici e l'inibizione di molti lattobacilli. L'acido ascorbico stimola la crescita degli streptococchi lattici, mentre il solfato di magnesio fornisce gli ioni essenziali per la crescita. Il terreno contenente calcio è utilizzato per il dosaggio dei batteriofagi degli streptococchi lattici.<sup>1</sup>

Come indicato dalla Farmacopea dei terreni di coltura per la microbiologia alimentare<sup>5</sup>, il lattosio è incluso nella formulazione, tuttavia Biolife rende disponibile un terreno senza lattosio (M17 Agar w/o Lactose REF 401719S2).

#### 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 55,2 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

#### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallastra
Aspetto della soluzione	giallo, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,0 ± 0,2

#### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
M17 Agar	Terreno di coltura in polvere	4017192	500 g (9,1 L)

Su richiesta del cliente, il terreno è disponibile anche senza lattosio: M17 Agar senza lattosio REF 401719S2, 500 g.

#### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre Petri sterili, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

#### 8 – CAMPIONI

Latte e prodotti lattiero-caseari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

#### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Per il conteggio di *S.thermophilus* nello yogurt, la norma ISO 7889<sup>4</sup> raccomanda la seguente tecnica:

- Mescolare accuratamente il contenuto del vasetto di yogurt utilizzando una spatola sterile. Nel caso dello yogurt alla frutta, omogeneizzare il contenuto del vasetto per un minuto.
- Pesare 10 g di prodotto in un flacone da 200 mL e portarlo a 50 g con un diluente autoclavato come specificato nelle norme ISO 6887-16 e ISO 6887-57 (ad esempio, soluzione di peptone allo 0,1%).
- Miscelare per 1 minuto con il frullatore. Diluire a 100 g con il diluente per ottenere una diluizione 10<sup>-1</sup>.
- Preparare una serie adeguata di diluizioni decimali della sospensione del campione in 9 mL di diluente.
- Da ogni provetta, pipettare 1 mL della diluizione appropriata in una piastra Petri da 90 o 100 mm in doppio.





6. Versare 15 mL di M 17 Agar, raffreddato a 45°C in ogni piastra. Mescolare l'inoculo con il terreno e lasciare che la miscela si solidifichi.  
7. Incubare a 37°C per 48 ore.

### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, esaminare le piastre sotto una luce non intensa. Contare le colonie sulle piastre contenenti da 15 a 300 colonie. *S. thermophilus* forma colonie lenticolari di diametro compreso tra 1 e 2 mm. Al microscopio, questi microrganismi appaiono come cellule sferiche o ovoidali (di diametro compreso tra 0,7 µm e 0,9 µm) a coppie o in lunghe catene. Sono Gram-positivi e catalasi-negativi. Fare attenzione a non confondere le particelle di campione non disciolto o di materiale precipitato con le colonie puntiformi.

### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore finale eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. thermophilus</i> ATCC 19258	37°C / 48 ore /A	buona crescita

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di M17 Agar disidratato viene testato per la produttività e la selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *S. thermophilus* ATCC 19258 e *S. lactis* ATCC 11454 e con il conteggio di *S. thermophilus* in un campione di yogurt. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie o di diluizioni di yogurt e incubate a 37°C per 48 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr). Se Pr è ≥ 0,7 e se la morfologia e le dimensioni delle colonie sono tipiche, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con un metodo quantitativo su piastra con ceppi non bersaglio: *L. acidophilus* ATCC 314 e *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* DSM 20081. La crescita dei ceppi non bersaglio è parzialmente inibita e la crescita presenta piccole colonie puntiformi.

### 13 – LIMITE DEL METODO

Alcuni ceppi di *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* possono formare piccole colonie puntiformi su M17 Agar, soprattutto in campioni di yogurt che presentano un numero di lattobacilli molto più elevato rispetto al numero di streptococchi.<sup>4</sup>

### 14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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](http://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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://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 dei prodotti, 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

Al ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo dalla luce diretta in un luogo asciutto. Se conservato correttamente, può essere utilizzato fino alla data di scadenza. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in luoghi umidi. Dopo l'uso, il contenitore deve essere ben chiuso. Scartare il prodotto se il contenitore e/o il tappo sono danneggiati, o se il contenitore non è ben chiuso, o in caso di evidente deterioramento della polvere (cambiamenti di colore, indurimento, grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei supporti preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio). Secondo Curtis GDV e Baird RM,<sup>5</sup> il terreno una volta preparato può essere conservato a +2°C/+8°C per 7 giorni.










### 16 - BIBLIOGRAFIA

1. Terzaghi BE, Sandine WE. Improved medium for lactic streptococci and their bacteriophages. *App Microbiol* 1975;29 (6): 807–813.
2. Lowrie RJ, Pearce LE. The plating efficiency of bacteriophages of lactic streptococci. *NZ J Dairy Sci Technol* 1971; 6: 166–171.
3. Shankar PA, Davies FL. A note on the suppression of *Lactobacillus bulgaricus* in media containing β-glycerophosphate and application of the media to selective isolation of *Streptococcus thermophilus* from yoghurt. *Int J Dairy Technol* 1977;30 (1):28–30.
4. ISO 7889 (IDF 117): 2003. Yogurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 °C.
5. Curtis GDV, Baird RM. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology: Additional Monographs (II). Proceedings of the 6th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Heidelberg 30 March-3 April, 1992. *Int J Food Microbiol* 1993; 17:214-15.



6. ISO 6887-1:2017 Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination - Part 1: General rules for the preparation of the initial suspension and decimal dilutions.
7. ISO 6887-5:2020 Microbiology of the food chain - Preparation of test samples, initial suspension and decimal dilutions for microbiological examination -Part 5: Specific rules for the preparation of milk and milk products.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

 <b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b> Numero di catalogo	 <b>LOT</b> 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	Date
Revisione 4	Aggiornamento del layout e dei contenuti	03/2023

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

