

## MRS BROTH WITH TWEEN 80

Terreno di coltura in polvere

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la coltivazione di *Lactobacillus* spp. e altri batteri lattici in prodotti lattiero-caseari e altri alimenti, nonché in prodotti destinati all'alimentazione animale.

### 2 – COMPOSIZIONE

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

Peptone	10,00 g
Estratto di carne	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Glucosio	20,00 g
Potassio fosfato bibasico	2,00 g
Sodio acetato	5,00 g
Ammonio citrato	2,00 g
Magnesio solfato	0,20 g
Manganese solfato	0,05 g
Tween® 80	1,00 mL

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I lattobacilli sono batteri lattici, un gruppo che comprende, tra gli altri, anche *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Tutte queste specie possono produrre acido lattico in quantità considerevoli. Sono Gram-positivi, negativi alla catalasi e all'ossidasi e sono esigenti in fatto di nutrizione. La crescita è notevolmente favorita da condizioni di microaerofilia.

MRS Broth con Tween 80 si basa sulla formulazione ideata da de Man, Rogosa e Sharpe<sup>1</sup> nel 1960, principalmente per la coltivazione di lattobacilli provenienti da fonti orali, fecali, lattiero-casearie e di altro tipo, con l'intento di produrre un terreno definito come sostituto del succo di pomodoro. Il terreno consente una crescita rigogliosa di tutti i ceppi di lattobacilli, in particolare di quelli a sviluppo lento e difficile come *L. brevis* e *L. fermenti*. MRS Broth con Tween 80 è leggermente selettivo per i lattobacilli e può verificarsi una certa crescita di leuconostoci e pediococchi. La selettività può essere migliorata con l'aggiunta di composti selettivi come l'acido sorbico, adattando la temperatura di incubazione e diminuendo il pH: i lattobacilli tollerano livelli di pH più bassi rispetto agli streptococchi (pH 5,0-6,5), mentre i pediococchi e i leuconostoci crescono meglio in questo intervallo.<sup>2,3</sup> Il brodo MRS è raccomandato dall'APHA<sup>4</sup> per lo screening dei produttori di acido lattico eterofermentanti con la procedura MPN. I fattori di crescita essenziali sono forniti da peptoni ed estratto di lievito, fonti di azoto, carbonio, vitamine e minerali. Il polisorbato 80 fornisce gli acidi grassi necessari al metabolismo dei lattobacilli, mentre il solfato di magnesio e il solfato di manganese forniscono gli ioni essenziali per la moltiplicazione dei lattobacilli. Il glucosio è il carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia per la crescita microbica. Il fosfato dipotassico tampona il terreno di coltura. La selettività è garantita dalla presenza di citrato di ammonio e acetato di sodio che, a basso pH, consentono la crescita dei batteri lattici e inibiscono una serie di altri gruppi di microrganismi.

### 4 - PREPARAZIONE

Sospendere 55,2 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione agitando frequentemente per sciogliere completamente il prodotto. Distribuire in provette o fiaschi di capacità adeguata e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

### 5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, gialla
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	marrone, limpido
pH finale (20-25 °C)	6,4 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
MRS Broth with Tween® 80	Terreno in polvere	4017292	500 g (9,1 L)

### 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

Campioni alimentari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole di buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Il campione e le sue diluizioni possono essere inoculati direttamente in MRS Broth con Tween 80. Scegliere il tempo di incubazione, la temperatura e l'atmosfera in base alla ricerca da eseguire (ad esempio, a 35°C per 4 giorni o a 30°C per 5 giorni, in atmosfera aerobica). APHA<sup>4</sup> descrive una procedura MPN per individuare i produttori di acido lattico. Le provette di MRS Broth contenenti provette di Durham capovolte vengono inoculate in un metodo MPN a tre provette; dopo l'incubazione a 35°C per 4 giorni, le provette che mostrano formazione di gas vengono considerate positive per organismi eterofermentanti presuntivi.

### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La presenza di microrganismi è indicata da un grado variabile di torbidità, puntini e flocculazione nel terreno di coltura. Il controllo non inoculato rimane chiaro e senza torbidità dopo l'incubazione. Le caratteristiche delle crescite sono strettamente correlate al tipo o ai tipi di microrganismi coltivati.

### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità che ne verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà l'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.



CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. sakei</i> ATCC 15521	30-37° C / 72 H / A	crescita
<i>P. damnosus</i> ATCC 29358	30-37° C / 72 H / A	crescita
A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrato di American Type Culture Collection		

### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di MRS Broth disidratato con Tween 80 viene sottoposto a test di produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato. La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 37°C per 72 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita nel lotto di riferimento ( $G_{RB}$ ) e nel lotto di prova ( $G_{TB}$ ). La produttività è stata testata con i ceppi target *L. acidophilus* ATCC 314, *L. delbrueckii* subsp. *bulgaricus* DSM 20081, *L. sakei* ATCC 15521, *L. fermentum* ATCC 9338, *L. lactis* ATCC 11454. L'indice di produttività ( $G_{RB}-G_{TB}$ ) per ciascun ceppo in esame deve essere  $\leq 1$ .

### 13 – LIMITI DEL METODO

- L. mesenteroides* e *L. dextranicum* si trovano spesso nello stesso habitat dei lattobacilli, soprattutto del *Lactobacillus brevis*, e possono crescere su MRS Broth. Questi due microrganismi, tuttavia, si distinguono per la capacità di fermentare il trealosio e per l'incapacità di idrolizzare l'arginina.<sup>2</sup>
- Se c'è il rischio di una contaminazione estesa da lieviti (ad esempio, nelle salsicce essiccate), aggiungere acido sorbico al terreno di coltura.<sup>2</sup>

### 14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto 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. 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](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 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 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](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 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

Al ricevimento, conservare a +2°C /+8°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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio).

### 16 - BIBLIOGRAFIA

- DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. (1960). An improved medium for the cultivation of Lactobacilli. 1960; J Appl Bact 23,130-135.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C.
- Reuter G. Elective and selective media for lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 1985; 2:55-68.
- Njongmenta NA et al. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 19 Acid-producing microorganism. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015

®Tween è un marchio di ICI Americas Inc.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

### Cronologia delle revisioni

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

