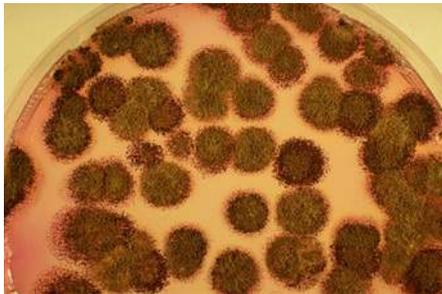


## ROSE BENGAL AGAR BASE

Terreno di coltura in polvere



Rose Bengal Agar con cloramfenicolo:  
colonie di *Aspergillus brasiliensis*

### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti, nei mangimi e nelle acque.

### 2 – COMPOSIZIONE

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

Peptone micologico	5,00 g
Potassio fosfato bibasico	1,00 g
Magnesio solfato	0,50 g
Glucosio	10,00 g
Rosa bengala	0,05 g
Agar	15,00 g

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

### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Rose Bengal Agar si basa sulla formulazione ideata da Jarvis<sup>1</sup> e modificata da Overcast e Weakley<sup>2</sup>, in cui la clortetraciclina è stata sostituita dal cloramfenicolo. È un terreno selettivo a pH neutro per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti ed è consigliato per alimenti proteici freschi la cui flora associata è composta principalmente da bacilli Gram-negativi.<sup>3</sup>

Rose Bengal Agar, addizionato di clortetraciclina, è raccomandato da APHA<sup>4</sup> per il conteggio dei funghi nelle acque reflue e inquinate con tecniche di diffusione su piastra e membrana filtrante.

Il terreno di coltura qui proposto è una base alla quale può essere aggiunto un supplemento antibiotico a scelta dell'utilizzatore, per evitare i rischi associati all'uso di terreni in polvere contenenti antibiotici.

Il peptone micologico fornisce azoto e minerali per la crescita microbica e la pigmentazione delle colonie. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il fosfato dipotassico viene utilizzato come agente tampone per controllare il pH nel terreno. Il solfato di magnesio migliora la crescita microbica. Il rosa bengala non solo limita le dimensioni e l'altezza delle colonie di muffe, ma ne aiuta il conteggio man mano che il colore viene assorbito dalle colonie. Il cloramfenicolo o la clortetraciclina sono usati come agenti selettivi per sopprimere la maggior parte dei batteri Gram-positivi e Gram-negativi.

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

Sospendere 16 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per sciogliere completamente. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C e aggiungere il contenuto di una fiala di Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003) ricostituito con 3 mL di una miscela di acqua distillata sterile-etanolo (1:1). Mescolare bene e distribuire in piastre Petri sterili. Il supplemento di cloramfenicolo può anche essere aggiunto al terreno di coltura prima della sterilizzazione. Il terreno di base può anche essere integrato con clortetraciclina cloridrato 70 mg/L (Dermathopyte Antimicrobial Supplement REF 4240024) dopo la sterilizzazione in autoclave.

Evitare l'esposizione del terreno alla luce.

### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, rosa
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	rosa brillante, limpido
pH finale (20-25 °C)	7,2 ± 0,2

### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Rose Bengal Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4019912	500 g (15,6 L)

### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, piastre di Petri sterili, Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003) o clortetracycline (Dermathopyte Antimicrobial Supplement REF 4240024), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

### 8 – CAMPIONI

Alimenti, alimenti per animali e campioni di acqua. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Preparare adeguate diluizioni decimali dei campioni.

Aggiungere 1 mL a piastre Petri vuote e utilizzare due piastre per ogni diluizione. Versare in ogni piastra circa 15 mL di terreno sciolto e raffreddato a 44-47°C. Mescolare delicatamente, lasciando solidificare il terreno.

In alternativa, inoculare direttamente le piastre di agar utilizzando la tecnica di diffusione in superficie con 0,1 o 0,2 mL di diluizioni decimali.

In alternativa utilizzare la tecnica del filtro a membrana: filtrare un volume appropriato di campione ben agitato o diluirlo attraverso filtri a membrana con diametro dei pori di 0,45 µm e trasferirlo sulle piastre.

Capovolgere le piastre e incubare a 22°C per 5-7 giorni.

### 10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare ogni caratteristica morfologica e cromatica specifica delle colonie

Contare le colonie su piastre che contengono circa 50-100 colonie. Riportare il numero di lieviti o muffe per grammo di alimento moltiplicando il numero di colonie per il fattore di diluizione.





### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può 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>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	25°C/ 72h/ A	crescita
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	25°C/ 72h/ A	crescita con limitata diffusione delle colonie
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	25°C/ 72h/ A	inibito

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

### 12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Rose Bengal Agar Base disidratato addizionato con Chloramphenicol Antimicrobial Supplement viene testato per produttività e selettività confrontando i risultati con un lotto di riferimento.

La produttività è testata con metodo ecometrico semiquantitativo con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 18804, *P. chrysogenum* ATCC 10106, *A. brasiliensis* ATCC 9642; le piastre vengono inoculate mediante tecnica di diffusione in superficie con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 25 °C per 72 ore in aerobiosi. I ceppi target mostrano una buona crescita con colonie tipiche e diffusione limitata delle colonie.

La selettività viene valutata con metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre in superficie con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione McFarland 0,5 dei seguenti ceppi: *E. coli* ATCC 25922, *S. aureus* ATCC 25923, *B. subtilis* ATCC 6633. La crescita del ceppo non target è totalmente inibita.

### 13 – LIMITI DEL METODO

- 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.<sup>5</sup>
- I metodi di conteggio dei lieviti e soprattutto delle muffe sono imprecisi perché essi sono costituiti da una miscela di micelio e spore asessuate e sessuali. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno mediante semina diretta in piastra.<sup>5</sup>
- Si verifica spesso la non linearità nei conteggi dalla semina con 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 dei grumi di spore durante la diluizione oltre all'inibizione competitiva quando sulle piastre è presente un gran numero di colonie.<sup>5</sup>
- Per una completa identificazione dei microrganismi isolati, si raccomanda di eseguire test appropriati utilizzando colture pure.

### 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.
- Prestare attenzione all'apertura dell'anello metallico dei supplementi per evitare lesioni.
- Applicare le buone pratiche di fabbricazione nel processo di produzione dei terreni.
- 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

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento). Secondo Baird et al. le piastre preparate autonomamente e contenenti cloramfenicolo possono essere conservate al buio a 2-8°C per 7 giorni.<sup>6</sup> Secondo l'APHA, il terreno su piastra con clortetraciclina può essere conservato fino a 4 settimane a 2-8°C.<sup>4</sup>



**16 - Bibliografia**

1. Jarvis B. Comparison of an improved rose-bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food. J Appl Bacteriol 1973; 36: 723-727.
2. Overcast WW, Weakley DJ. An aureomycin-rose Bengal agar for the enumeration of yeasts and moulds in cottage cheese. J Milk Food Technol 1969; 32:442.
3. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
4. APHA Standards Methods for the Microbiological of Water and Wastewater. 23rd, 2017. American Public Health Association, Washington D.C.,
5. ISO 21527-1:2008. 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 greater than 0,95.
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; 5:261-262.

**TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI**

<b>REF</b> Numero di catalogo	o <b>REF</b>	<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 5	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

