



WL NUTRIENT MEDIUM

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la coltivazione e il conteggio di lieviti e batteri nella produzione della birra e in altri processi di fermentazione.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA *

Estratto di lievito	4,0 g
Triptone	5,0 g
Glucosio	50,0 g
Agar	20,0 g
Potassio fosfato monobasico	550,0 mg
Potassio cloruro	425,0 mg
Calcio cloruro	125,0 mg
Magnesio solfato	125,0 mg
Ferro cloruro	2,5 mg
Manganese solfato	2,5 mg
Verde di bromocresolo	22,0 mg

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La fermentazione è un noto processo naturale utilizzato dall'umanità da migliaia di anni con lo scopo fondamentale di produrre bevande alcoliche, nonché pane e derivati. I processi di fermentazione per la produzione di vini, birre e sidri sono tradizionalmente eseguiti con ceppi di *Saccharomyces cerevisiae*, il lievito più comune e disponibile in commercio.¹

Il terreno WL Nutrient Medium (Wallerstein Laboratory) si basa sulla formulazione sviluppata da Gray² e Green e Gray.³⁻⁵ Viene utilizzato per la coltivazione e il conteggio di lieviti e batteri nel controllo microbiologico effettuato nell'industria della birra e in altre fermentazioni.

I lieviti utilizzati in diversi processi di fermentazione hanno requisiti di crescita diversi per quanto riguarda il pH, l'atmosfera e la temperatura di incubazione. WL Nutrient Medium ha un pH di 5,5, che è ottimale per il conteggio del lievito di birra. Se si deve esaminare il lievito di panificazione o il lievito di distillazione, il pH del terreno deve essere regolato a 6,5. Se l'incubazione viene effettuata in condizioni anaerobiche, si sviluppano cocchi e lattobacilli nella produzione di birra; se viene incubato in condizioni aerobiche, crescono batteri aceto-acetici e termobatteri. L'incubazione a 25°C è adatta per i lieviti di birra, l'incubazione a 30°C per i lieviti di panificazione.⁶

WL Nutrient Medium supporta la crescita dei batteri, ma a meno che il numero di cellule di lievito non venga ridotto, i batteri non possono essere rilevati. A causa di questa limitazione, Green e Gray hanno sviluppato WL Differential Agar aggiungendo 4 mg/L di cicloeximide che inibisce la crescita del lievito.^{4,5}

L'estratto di lievito e il triptone forniscono azoto, carbonio, minerali e vitamine per la crescita microbica. Il fosfato viene utilizzato come agente tampone per controllare il pH nel terreno. Il cloruro di potassio, il cloruro di calcio e il cloruro ferrico sono fonti di elettroliti e mantengono l'equilibrio osmotico. Il solfato di magnesio e il solfato di manganese forniscono cationi bivalenti per migliorare la crescita dei lieviti. Il glucosio ad alta concentrazione è il carboidrato fermentabile e una fonte di energia. Il verde bromocresolo è un indicatore di pH, giallo a pH 4 e blu a pH 5,6.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 80 g in 1000 mL di acqua purificata fredda, portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti.

WL Nutrient Medium a pH 6,5: prima della sterilizzazione in autoclave aggiungere circa 30 mL/L di soluzione acquosa di carbonato di sodio all'1%.

WL Differential Medium: prima della sterilizzazione in autoclave aggiungere 4 mg/L di cicloeximide.

Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	blu pallido, limpida
pH finale (20-25 °C)	5,5 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
WL Nutrient Medium	Terreno di coltura in polvere	4021952	500 g (6,2 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Campioni dal processo di fermentazione. 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

Preparare 3 piastre per campione, una con WL Nutrient Medium e due con WL Differential Medium e inoculare con 0,1 mL di sospensione e/o diluizioni del campione, strisciate sulla superficie delle piastre.⁶

1- Inoculo 1: WL Nutrient Medium, incubato in aerobiosi per il conteggio totale delle colonie, principalmente di lieviti.

2- Inoculo 2: WL Differential Agar, incubato in aerobiosi per la crescita di batteri dell'acido acetico, *Flavobacterium*, *Proteus* e batteri termofili.

3- Inoculo 3: WL Differential Agar, incubato in anaerobiosi per la crescita di batteri lattici e *Pediococcus* spp.

pH e temperatura di incubazione: materiali per la fermentazione: pH 5,5, 25°C; lievito di birra e mosto alcolico: pH aggiustato a 6,5, 30°C

Tempo di incubazione per tutti i terreni: da 1 settimana a 14 giorni a seconda della flora; effettuare conteggi a vari intervalli.





Nota: lo schema di lavoro descritto è tratto dalla letteratura⁶; tuttavia, le combinazioni di pH e le condizioni di incubazione possono essere personalizzate in base all'analisi da eseguire.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Contare il numero di colonie per piastra e calcolare la carica microbica.

La colorazione delle colonie varia notevolmente, dal bianco o crema a varie sfumature di verde, con diverse sfumature di colore del terreno attorno alle colonie a seconda del lievito o del ceppo batterico isolato.

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, l'utente 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.²

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	25°/ 72 H-A	buona crescita
<i>E. faecalis</i> ATCC 19433	25°/ 72 H-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 di WL Nutrient Agar disidratato (Test Batch:TB) viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento (RB) precedentemente approvato.

La produttività è testata mediante un test quantitativo con i seguenti ceppi: *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 18804, *Yeast* sp. CB1950, *E. coli* ATCC 25922, *E. faecalis* ATCC 19433. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 25°C per 72 ore. Le colonie vengono contate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr: UFC_{TB}/UFC_{RB}). Se Pr è ≥ 0,7 e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

CB: Collezione microbica Biolife

13 – LIMITI DEL METODO

- Evitare il surriscaldamento e il ridiscioglimento del terreno.
- Le colonie isolate sulle piastre devono essere identificate con test adeguati.

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
- Il terreno disidratato deve essere maneggiato 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 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.
- 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

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'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

16 - REFERENCES

1. Maicas S. The Role of Yeasts in Fermentation Processes. *Microorganisms* 2020; 8:1142.
2. Gray PP. Some advances in microbiological control for beer quality. *Wallerstein Lab Commun* 1951; 14: 169.
3. Green SR, Gray PP. Paper read at American Society of Brewing Chemists Meeting. *Wallerstein Lab Commun* 1950; 12: 43.
4. Green SR, Gray PP. A differential procedure applicable to bacteriological investigation in brewing. *Wallerstein Lab Commun* 1950; 13: 357.
5. Green SR, Gray PP. A differential procedure for bacteriological studies useful in the fermentation industries. *Wallerstein Lab Commun* 1951; 14: 289.
6. MacFaddin JF. *Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria*. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 2	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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

