

WORT AGAR BASE

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la conta microbica su piastra nel latte, nei prodotti lattiero-caseari, nell'acqua e in altri campioni di importanza sanitaria.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

Estratto di malto	15,00 g
Peptone	0,78 g
Maltosio	12,75 g
Destrina	2,75 g
Potassio fosfato bibasico	1,00 g
Ammonio cloruro	1,00 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

Wort Agar Base è equivalente al terreno descritto da Parfitt¹ ed è adatto per la coltivazione e il conteggio dei funghi, soprattutto lieviti, nel burro, nello zucchero e negli sciroppi, nelle limonate e più in generale nelle bevande dolci o analcoliche.

Sono state proposte diverse modifiche del terreno worth agar per scopi specifici.² Secondo Rapp², l'aggiunta di alcuni coloranti indicatori consente la differenziazione tra colonie di lieviti e batteri. Scarr³ ha utilizzato un Wort Agar modificato ("agar osmofilo") per l'esame dei prodotti zuccherini per i lieviti osmofili. Il worth agar o l'hoppet-worth agar con acido moniodacetico secondo Šilhánková⁴ è adatto per il rilevamento dei lieviti non Saccaromiceti; inoltre, l'acido moniodacetico sopprime la crescita della maggior parte dei batteri. Il worth agar contenente solfato di rame viene utilizzato anche per la valutazione del lievito selvatico. Wort Agar con l'aggiunta di CuSO₄ (0,55 g/l) ha consentito la crescita di lieviti selvatici non Saccaromiceti.⁶ L'abbassamento della concentrazione a 0,2 g/L consente il rilevamento di alcuni lieviti selvatici Saccaromiceti.⁷ Secondo Röcken et al.⁸ incubazione del worth agar a pH 4,5 a 37 °C è consigliata per la rilevazione del lievito amilolitico ("S. diastaticus") nei lieviti a bassa fermentazione. Il terreno, che riproduce la composizione del mosto naturale, contiene peptone ed estratto di malto che forniscono i fattori di crescita per la crescita micologica. Il maltosio e la destrina sono i carboidrati fermentabili e una fonte di carbonio ed energia. L'acidità media (pH 4,8) è favorevole alla crescita del lievito e inibisce la maggior parte dei batteri. Per aumentare le proprietà selettive, il pH può essere ridotto a 3,5 aggiungendo acido tartarico o lattico. Il fosfato dipotassico tampona il terreno mentre il glicerolo, aggiunto alla base del terreno, riduce l'attività dell'acqua.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 48,28 g in 1000 mL di acqua depurata fredda e aggiungere 2,35 mL di glicerolo (REF 421015); portare ad ebollizione con agitazione frequente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili. Il riscaldamento prolungato o eccessivo ridurrà la resistenza del gel dell'agar.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione	giallo scuro, limpida
pH finale (20-25 °C)	4,8 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Wort Agar base	Terreno di coltura in polvere	4022032	500 g (10,3 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

Burro, zucchero e sciroppi, limonate e più in generale bevande dolci o analcoliche. Fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili per la raccolta di campioni alimentari. Operare secondo le buone pratiche di laboratorio per la raccolta dei campioni, la conservazione e il trasporto al laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio di lieviti e muffe nel burro.

- Preparare la sospensione iniziale del campione e le diluizioni decimali con soluzione Ringer a un quarto.
- Trasferire mediante pipette sterili 1 mL del campione in esame (se liquido) o 1 mL della sospensione iniziale e 1 mL di ciascuna diluizione decimale, in doppio, al centro di ciascuna piastra Petri vuota.
- Versare circa 15 mL di Wort Agar, raffreddato a circa 47°C, in ogni piastra.
- Mescolare bene l'inoculo con il terreno e lasciare solidificare la miscela.
- Incubare per 5 giorni a 25°C

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Contare il numero di colonie di lieviti e muffe per piastra e calcolare il conteggio microbico.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono messi in 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
S. <i>cerevisiae</i> ATCC 9763	25°/ 72 H-A	buona crescita
S. <i>aureus</i> ATCC 25923	25°/ 72 H-A	parzialmente inibito



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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

di tutti i lotti di worth agar base disidratato addizionato con glicerolo viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento approvato in precedenza.

La produttività è valutata mediante un test quantitativo con i seguenti ceppi: *S. cerevisiae* ATCC 9763, *C. albicans* ATCC 18804. 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 contaminate su entrambi i lotti e viene calcolato il rapporto di produttività (Pr). Se Pr è $\geq 0,7$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

Inoltre, la produttività è testata con metodo Miles-Misra modificato con *A. brasiliensis* ATCC 16404. Dopo l'incubazione il ceppo mostra una buona crescita con colonie tipiche.

La selettività è valutata con metodo Miles-Misra modificato in superficie inoculando le piastre con opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione 0,5 McFarland del seguente ceppo non target *S. aureus* ATCC 25923. La crescita del ceppo non target è parzialmente inibito dopo incubazione a 25°C per 72 ore.

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

- Parfitt EH. J Dairy Sci. 1933; 16: 141-147.
- Matoulková D, Kubizniaková P. Brewing Microbiology – Wild Yeasts and Methods of Their Detection. Kvasny Prum. 2013;59: 246–257
- Rapp, M.: Indikatorzusätze zur Keimdifferenzierung auf Würze- und Malzextrakt-Agar. Milchwiss. 1974; 29:341-344.
- Scarr MP J. Sci. Food Agric . 1959; 10(12):678-681.
- Šilhánková L. A new method of quantitative determination of contamination of baker's yeast by wild yeasts or by dissociation forms of the production culture. Folia Microbiol. 1962; 7: 255–256.
- Lin Y. Formulating and testing of cupric sulphate medium for wild yeast detection. J. Inst. Brew. 1981;87: 151–154.
- Taylor GT, Marsh AS. MYGP + copper, a medium that detects both Saccharomyces and non-Saccharomyces wild yeast in the presence of culture yeast. J Inst Brew 1984; 90: 134–145.
- Röcken W, Schulte S. Nachweis von Fremdhefen. Brauwelt 1986; 41: 1921–1927.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF o REF Numero di catalogo	 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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	05/2023

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

