

BRETTANOMYCES SELECTIVE AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso in piastre

1 - DESTINAZIONE D'USO

Terreno selettivo per l'isolamento e l'enumerazione di *Brettanomyces/Dekkera* nel vino e nella birra.

2 - COMPOSIZIONE

TERRENO IN POLVERE: FORMULA TIPICA PER LITRO, DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

Peptone	5,000 g
Estratto di malto	3,000 g
Estratto di lievito	3,000 g
Glucosio	10,000 g
Bromocresolo verde	0,022 g
Tiamina	0,02 g
Cicloeximide	0,010 g
Cloramfenicolo	0,100 g
Acido cumarico	0,100 g
Yeast Nitrogen Base	3,000 g
Agar	20,000 g

PIASTRE PRONTE ALL'USO

Brettanomyces Selective Agar	44,200 g
Etanolo 95%	16,000 mL
Acqua purificata	1000 mL



Brettanomyces Selective Agar: *Dekkera bruxellensis*

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il nome *Brettanomyces* risale al 1904, quando questo lievito fu identificato nel laboratorio del birrifico Carlsberg, da N.H. Claussen durante gli studi sulle birre ale britanniche.¹

Brettanomyces è un genere di lievito non sporiforme della famiglia delle *Saccharomycetaceae* che comprende 5 specie differenti (*B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus*, *B. anomalus* e *B. bruxellensis*). Il nome del genere *Dekkera* è usato in modo intercambiabile con *Brettanomyces*, in quanto descrive la forma teleomorfa o sporiforme delle specie *anomalus* e *bruxellensis*.

Dekkera bruxellensis è considerata una delle principali cause di deterioramento del vino in tutto il mondo.² I vini infetti sviluppano aromi distintivi e sgradevoli dovuti ai fenoli volatili (4-etil-fenolo e 4-etil-guaiacolo), prodotti da questa specie. Tuttavia, questo lievito è noto anche per il suo contributo positivo all'aroma di acido acetico delle birre Lambic belghe e del tè fermentato e zuccherato Kombucha.²

La formulazione del terreno Brettanomyces Selective Agar si basa sul lavoro di Rodrigues *et al.*³ e sulle successive modifiche del terreno originale, volte a ottenere una crescita con tempi di incubazione più brevi.^{4,5}

Il terreno contiene glucosio come fonte di carbonio ed energia, cicloeximide per prevenire la crescita di *Saccharomyces*, cloramfenicolo per inibire la crescita batterica, acido cumarico come precursore per la produzione di 4-etil-fenolo. Il peptone, l'estratto di malto e l'estratto di lievito forniscono carbonio, azoto e vitamine per la crescita microbica. La miscela Yeast Nitrogen Base e la tiamina sono fattori di crescita per i lieviti. L'etanolo migliora il recupero dei *Brettanomyces*, mentre il verde di bromocresolo è un indicatore della produzione di acidi.

4 - PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 44,2 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente. NON STERILIZZARE IN AUTOCLAVE. Raffreddare a 45-50°C, aggiungere 16 mL di etanolo al 95%, mescolare bene e versare in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea e scorrevole, beige
Aspetto del terreno in piastra	verde-bluastro, limpido
pH (20-25°C)	5,3 ± 0,2

6 - MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Brettanomyces Selective Agar	Terreno di coltura in polvere	4012322	500 g (11,3 L)
		4012324	5 kg (113 L)
Brettanomyces Selective Agar	Piastre pronte all'uso	491232	3 x 10 piastre, ø 55 mm

7 - MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Bagnomaria, anse tamponi pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, piastre di Petri, beute, membrane filtranti, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 - CAMPIONI

Vino, birra. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio.

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Inoculare un'aliquota del campione sulla superficie del terreno o filtrare il campione attraverso una membrana sterile (dimensione dei pori 0,45 µm).

Posizionare il filtro a membrana sulla superficie del terreno, assicurandosi che non vi sia aria intrappolata sotto ed incubare a 25-30°C per 5-7 giorni.





10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita microbica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie. *Brettanomyces/Dekkera* spp. crescono con colonie piccole, lucenti, molto convesse, quasi emisferiche, con bordo dritto o lobato, di consistenza cremosa; il colore delle colonie è tra il beige e il giallo-verdastro, con un alone giallo per la produzione di acidi ed il viraggio dell'indicatore da blu-verdastro a giallo. L'individuazione olfattiva del 4-etilfenolo, grazie al suo odore fenolico, aiuta a differenziare *Dekkera/Brettanomyces* spp. da altre specie di lieviti.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può eseguire il proprio Controllo di Qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>D. bruxellensis</i> ATCC 36234	30°C / 5-7 giorni/ A	crescita con odore tipico
<i>S. cerevisiae</i> ATCC 9763	30°C / 7 giorni/ A	nessuna crescita

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, campioni rappresentativi di tutti i lotti di *Brettanomyces* Selective Agar disidratato e pronto all'uso in piastra vengono testati per produttività e la selettività confrontando i risultati con Sabouraud Dextrose Agar (SDA).

La produttività viene testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *D. bruxellensis* ATCC 36234 e *D. anomala* ATCC 10562; le membrane filtranti sul terreno vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubati a 30°C per 5-7 giorni. Le colonie vengono enumerate sul Test Batch (TB) e su SDA e viene calcolato il rapporto di produttività ($Pr = CFU_{TB}/CFU_{SDA}$). Se $Pr \geq 1$ e se la morfologia, il colore e l'odore delle colonie sono tipici, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato, inoculando le piastre con diluizioni decimali adeguate in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non-target: *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Enterococcus faecalis* ATCC 29212, *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 9763. La crescita dei ceppi non-target è totalmente inibita.

13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura in polvere e le piastre pronte all'uso sono destinati al controllo microbiologico e sono per uso professionale; devono essere usati in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- Il terreno di coltura in polvere è classificato come pericoloso. 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 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 delle piastre.
- Ciascuna piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto a biocontaminazione controllata, nei limiti delle specifiche definite riportate sul Certificato di Controllo Qualità.
- Trattare tutti i campioni di laboratorio come potenzialmente infettivi.
- L'area del laboratorio deve essere controllata per evitare contaminazioni con il terreno in polvere, i supplementi o 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 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.
- 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.

14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno disidratato

Conservare a +10°C / +30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. 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 (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).

Piastre pronte all'uso

Conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).





15 - BIBLIOGRAFIA

1. Claussen NH. On a method for the application of Hansen's pure yeast system in the manufacturing of well-conditioned English stock beers. Journal of the Institute of Brewing, 1904.
2. Schifferdecker AJ, Dashko S, Ishchuk OP, Piškur J. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. Yeast 2014; 31(9): 323–332.
3. Rodrigues N, Gonçalves G, Pereira-da-Silva S, Malfeito-Ferreira M, Loureiro V. Development and use of a new medium to detect yeasts of the genera *Dekkera*/*Brettanomyces*. J Appl Microbiol 2001; 90: 588–599.
4. Couto JA, Barbosa A, Hogg T. A simple cultural method for the presumptive detection of the yeasts *Brettanomyces*/*Dekkera* in wines. Lett Appl Microbiol 2005; 41(6):505-10.
5. Benito S, Palomero F, Morata A, Calderon F, Palmero D, Suárez-Lepe JA. Identifying yeasts belonging to the *Brettanomyces*/*Dekkera* genera through the use of selective-differential media African Journal of Microbiology Research Vol. 6(34), pp. 6348-6357, 6 September, 2012.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Monouso	 Fabbrikante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 0	Prima edizione	04/2024

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

