

DG18 AGAR BASE

DG18 AGAR

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso



DG 18 Agar: *Wallemia sebi*

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il conteggio di lieviti e muffe in alimenti e mangimi con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 (ISO 21527-2)

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

DG18 AGAR BASE, TERRENO DISIDRATATO

Idrolisato enzimatico di caseina	5 g
D-Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10 g
Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄)	1 g
Magnesio solfato (MgSO ₄ .H ₂ O)	0,5 g
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)	0,002 g
Agar	13,5 g

DG18 AGAR, PIASTRE PRONTE PER L'USO

DG18 Agar Base	30 g
Glicerolo	220 g
Cloramfenicolo	0,1 g
Acqua	1000 mL

* La formulazione può essere compensata e/o corretta per soddisfare le prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

DG18 Agar è un terreno a bassa attività dell'acqua (aw), ideato da Hocking e Pitt per il conteggio dei funghi xerofili da alimenti con bassa umidità.¹ È raccomandato da ISO 21527-2 e da FDA-BAM per il conteggio di lieviti osmofili vitali e muffe xerofile in prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali, aventi un'attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95, mediante la tecnica del conteggio delle colonie.^{2,3}

Il glicerolo nel terreno riduce l'attività dell'acqua da 0,999 a 0,95. Pitt e Hocking⁴ hanno dimostrato che il glicerolo è un soluto adatto per la coltivazione di una gamma di funghi xerofili: è meno inibitorio di NaCl per alcune specie, produce terreni trasparenti ed è più facilmente manipolabile rispetto agli zuccheri ad alte concentrazioni. È stato dimostrato che il dicloran (2,6-dicloro-4-nitroanilina) inibisce la diffusione dei funghi mucoracei e limita i diametri delle colonie di altri generi in un terreno di conteggio dei funghi per gli alimenti.⁵ Il digerito enzimatico della caseina fornisce azoto, carbonio, minerali e amminoacidi per la crescita microbica. Il glucosio è una fonte di carbonio ed energia. Il fosfato monobasico di potassio tampona il terreno. Il solfato di magnesio favorisce la crescita micologica. Le proprietà selettive del terreno sono aumentate dalla presenza di cloramfenicolo, un antibiotico ad ampio spettro, che è inibitore di un'ampia gamma di batteri Gram-negativi e Gram-positivi.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 15 g in 500 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione agitando frequentemente per sciogliere completamente e aggiungere 110 g (220 g/L) di Glicerolo anidro (REF 421015). Ricostituire una fiala di Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003) con 3 mL di una miscela di acqua distillata sterile ed etanolo (1:1) e aggiungere il contenuto a DG18 Agar Base (100 mg/L). Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 44-47°C, mescolare bene e distribuire in aliquote da 15 mL in piastre Petri sterili. Evitare l'esposizione del terreno alla luce.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto del terreno in polvere

Fine granulometria omogenea, beige

Aspetto del terreno in soluzione e in piastra

beige, da limpido a leggermente opalescente.

pH (20-25°C)

5,6 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
DG18 Agar Base	Terreno di coltura in polvere	4013942	500 g (16,6 L)
DG18 Agar	Piastre pronte all'uso	541393	2 x 10 piastre ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e tamponi sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, piastre di Petri sterili, Glicerolo anidro (REF 421015), Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003), terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano o all'alimentazione degli animali con un'attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 come frutta secca, torte, marmellate, carne secca, pesce sotto sale, cereali, cereali e prodotti a base di cereali, farine, noci, spezie e condimenti, ecc. Preparare il campione da testare in conformità allo Standard Internazionale specifico per il prodotto in questione. Operare secondo le buone pratiche di laboratorio per la raccolta dei campioni, la conservazione e il trasporto al laboratorio.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

La procedura di lavoro qui descritta è tratta dalla norma ISO 21527-2.²





1. Su una piastra di DG18 Agar, utilizzando una pipetta sterile nuova, trasferire 0,1 mL del campione in esame se liquido o 0,1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
2. Ripetere questa operazione con le diluizioni successive, utilizzando una nuova pipetta sterile per ogni diluizione decimale.
3. Per facilitare il conteggio di basse popolazioni di lieviti e muffe, un volume pari a 0,3 mL di una diluizione 10^{-1} del campione, o del campione stesso se liquido, può essere distribuito su tre piastre.
4. Distribuire uniformemente il liquido sulla superficie dell'agar con un dispositivo sterile fino a completo assorbimento del liquido nel terreno.
5. Incubare in aerobiosi le piastre inoculate in posizione verticale a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per 5-7 giorni.

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica e registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche specifiche delle colonie.

Se necessario, eseguire un esame con una lente binoculare o con un microscopio per distinguere tra cellule di lieviti o muffe e colonie di batteri.

Leggere le piastre dopo 2 giorni, 5 giorni e 7 giorni di incubazione. Se si sospetta la presenza di *Xeromyces bisporus*, incubare le piastre per 10 giorni.

Selezionare le piastre contenenti meno di 150 colonie/propaguli/germi e contare queste colonie/propaguli/germi,

Riportare il numero di colonie/propaguli/germi per grammo di alimento.

11 – CONTROLLO DI QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un 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.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> ATCC 9763	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	crescita
<i>Wallemia sebi</i> ATCC 42694	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	crescita
<i>Aspergillus restrictus</i> ATCC 42693	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	crescita con diffusione limitata
<i>Eurotium rubrum</i> ATCC 42690	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	crescita con diffusione limitata
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	inibito
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	$25 \pm 1^\circ\text{C} / 5 \text{ gg/A}$	inibito

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

12-CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, i campioni rappresentativi di tutti i lotti di DG18 Agar disidratato vengono testati per la produttività e la selettività confrontando i risultati con il lotto di riferimento: Sabouraud Dextrose Agar (produttività).

La produttività è testata mediante un test quantitativo con i ceppi target *S. cerevisiae* ATCC 9763, *W. sebi* ATCC 42694, *A. restrictus* ATCC 42693, *E. rubrum* ATCC 42690; le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie ed incubate a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ per 5 giorni in aria. Le colonie vengono contate sul lotto in esame e sul lotto di riferimento e viene calcolato il rapporto di produttività Pr. Se $\text{Pr} \geq 0,5$ e se la morfologia e il colore delle colonie sono tipici e se la diffusione delle colonie è limitata, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

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

13-LIMITI DEL METODO

- Evitare l'esposizione del terreno alla luce, poiché i prodotti di decomposizione citotossica possono determinare una sottostima della micoflora nei campioni.²
- Laddove la proliferazione batterica può rappresentare un problema, si raccomandano cloramfenicolo (50 mg/L) e clortetraciclina (50 mg/L).²
- DG 18 Agar e la procedura tratta dalla ISO 21527-2 non si applicano ai prodotti disidratati con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,60 e non consentono il conteggio delle spore di muffa.²
- 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 sessuate. Il numero di unità formanti colonie dipende dal grado di frammentazione del micelio e dalla proporzione di spore in grado di crescere sul terreno in piastra.²
- Si verifica spesso la non linearità dei conteggi dal metodo di coltura per 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 degli agglomerati di spore durante la diluizione, oltre all'inibizione competitiva quando sulle piastre è presente un gran numero di colonie.²
- 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.²
- Anche se le colonie microbiche presenti sulle piastre sono differenziate in base alle loro caratteristiche morfologiche e cromatiche, si raccomanda di eseguire i test di identificazione su isolati, da coltura pura.

14 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- DG 18 Agar 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 disidratati devono essere maneggiati 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 norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura in polvere ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni 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

Terreno in polvere

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 preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo Baird RM et al. le piastre preparate in autonomia possono essere conservate a +2°C +8°C al buio e protette dall'evaporazione per un massimo di 7 giorni.

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le piastre estratte dal sacchetto di plastica possono essere utilizzate entro 7 giorni. Eliminare se vi sono segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, disidratazione, restringimenti o screpolature del terreno, colore atipico, eccesso di condensa).

16 - BIBLIOGRAFIA

1. Hocking, A.D., and Pitt, J.L. (1980) Dichloran-glycerol medium for enumeration of xerophilic fungi from low moisture foods. Appl. Environm. Microbiol 39,488-492.
2. ISO 21527-2:2008. 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 less than or equal to 0,95.
3. FDA-BAM Chapter 18: Yeasts, Molds and Mycotoxins. Content current as of: 10/31/2017.
4. Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1977. Influence of solute and hydrogen ion concentration on the water relations of some xerophilic fungi. J. Gen. Microbiol. 101:35-40.
5. King, A. D., A. D. Hocking, and J. I. Pitt. 1979. Dichloran-rose bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods. Appl. Environ. Microbiol. 37:959-964.
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; 216-218.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 4	Aggiornamento del contenuto e del layout	01/2023

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

