

MRS AGAR WITH TWEEN® 80

Terreno di coltura in polvere e pronto all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per il rilevamento e il conteggio di *Lactobacillus* e altri batteri lattici nei prodotti lattiero-caseari e in altri prodotti alimentari, nonché nei prodotti destinati all'alimentazione animale.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

TERRENO IN POLVERE E PIASTRE PRONTE ALL'USO

Peptone	10,00 g
Estratto di carne	10,00 g
Estratto di lievito	5,00 g
Glucosio	20,00 g
Potassio fosfato bibasico	2,00 g
Sodio acetato	5,00 g
Diammonio citrato	2,00 g
Magnesio solfato	0,20 g
Manganese solfato	0,05 g
Agar	15,00 g
Tween® 80	1,00 mL

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I lattobacilli sono batteri lattici, un gruppo che comprende, tra gli altri, anche *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Lactococcus* e *Streptococcus*. Tutte queste specie possono produrre acido lattico in quantità considerevoli. Sono Gram-positivi, negativi alla catalasi e all'ossidasi e sono esigenti in fatto di nutrizione. La crescita è notevolmente favorita da condizioni microaerobiche.

MRS Agar con Tween 80 si basa sulla formulazione ideata da Johannes Cornelis de Man, Morrison Rogosa e Margaret Elisabeth Sharpe¹ nel 1960 principalmente per la coltivazione di lattobacilli provenienti da fonti orali, fecali, lattiero-casearie e di altro tipo, con l'intento di produrre un terreno definito come sostituto del tomato juice agar.

Il terreno consente una crescita rigogliosa di tutti i ceppi di lattobacilli, in particolare di quelli a sviluppo lento e difficile come *L. brevis* e *L. fermenti*.

MRS Agar con Tween 80 è leggermente selettivo per i lattobacilli e può verificarsi una certa crescita di leuconostoci e pediococchi. La selettività può essere migliorata con l'aggiunta di composti selettivi come l'acido sorbico o gli antibiotici, adattando la temperatura di incubazione e diminuendo il pH: i lattobacilli tollerano livelli di pH più bassi rispetto agli streptococchi (pH 5.0-6.5), mentre i pediococchi e i leuconostoci crescono meglio in questo intervallo.^{2,3}

I peptoni forniscono azoto e minerali per la crescita microbica; l'estratto di lievito è una fonte di complesso di vitamine B per la stimolazione della crescita. Il Tween® 80 fornisce gli acidi grassi necessari al metabolismo dei lattobacilli, mentre il solfato di magnesio e il solfato di manganese forniscono gli ioni essenziali per la moltiplicazione dei lattobacilli. Il glucosio è il carboidrato fermentabile e una fonte di carbonio ed energia per la crescita microbica. Il fosfato dipotassico tampona il terreno di coltura. La selettività è garantita dalla presenza di citrato di ammonio e acetato di sodio che, a basso pH, consentono la crescita dei batteri lattici e inibiscono una serie di altri gruppi di microrganismi.

MRS Agar con Tween 80 si differenzia da MRS Agar ISO Formulation (REF 401728S) per la presenza di ammonio citrato bibasico invece di tri-ammonio citrato e per il pH finale.

4 - PREPARAZIONE

Sospendere 70,2 g in 1000 mL di acqua fredda purificata. Riscaldare fino all'ebollizione con agitazione frequente per dissolverlo completamente e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a 47-50°C, mescolare bene e versare in piastre Petri sterili.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, giallastra
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo, limpido o leggermente opalescente
pH finale (20-25 °C)	6,4 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
MRS Agar with Tween® 80	Terreno in polvere	4017282	500 g (7.1 L)
MRS Agar with Tween® 80	Piastre pronte all'uso	541728	2 x 10 plates ø 90 mm

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

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

8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

1. Preparare il campione di prova, la sospensione iniziale e le diluizioni, in conformità alla norma internazionale specifica per il prodotto in questione.
2. Trasferire con pipette sterili 1 mL del campione in esame (se liquido) o 1 mL della sospensione iniziale e 1 mL di ciascuna diluizione decimale in duplice copia al centro di ciascuna piastra Petri vuota.





3. Versare in ogni piastra circa 15 mL di MRS Agar con Tween 80, raffreddato a circa 47°C.

4. Mescolare bene l'inoculo con il terreno e lasciare che la miscela si solidifichi.

Scegliere il tempo di incubazione, la temperatura e l'atmosfera in base alla ricerca da eseguire (ad es. 35°C per 3 giorni, o 30°C per 5 giorni in un'atmosfera aerobica integrata con anidride carbonica). Per ulteriori informazioni, consultare i riferimenti citati.^{5,6}

MRS Agar con Tween 80, acidificato a pH 5,4 ± 0,1 con acido acetico, può essere utilizzato per il conteggio di *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* nello yogurt secondo il metodo descritto dalla norma ISO 7889:⁴ trasferire con una pipetta sterile 1 ml di ogni diluizione in piastre Petri e versare 15 ml di MRS Agar acidificato. Mescolare l'inoculo con il terreno, lasciare solidificare la miscela e incubare in condizioni anaerobiche a 37 °C per 72 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

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

I lattobacilli crescono con colonie lenticolari, spesso di forma appuntita, di diametro compreso tra 1 mm e 3 mm, inserite in o su MRS Agar. Contare le colonie su piastre contenenti da 15 a 300 colonie.

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. 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.

CEPPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / T / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. sakei</i> ATCC 15521	30° / 72 H-A	crescita
<i>E. coli</i> ATCC 25922	30° / 72 H-A	inibito

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

12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di terreno in polvere e pronto all'uso MRS Agar with Tween 80 viene sottoposto alla valutazione della produttività e della selettività, confrontando i risultati con un Lotto di Riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con un metodo quantitativo con i ceppi target *L. sakei* ATCC 15521, *P. pentosaceus* ATCC 33316, *L. lactis* ATCC 19435. Le piastre vengono inoculate con la tecnica dell'inclusione con diluizioni decimali in soluzione salina di una sospensione di colonie e incubate a 30°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 le dimensioni delle colonie sono tipiche, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

La selettività viene valutata con il metodo Miles-Misra modificato inoculando le piastre con gocce di opportune diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di 0,5 McFarland dei seguenti ceppi non target: *E. coli* ATCC 25922 e *B. cereus* ATCC 11778. La crescita dei ceppi non target è inibita.

13 – LIMITI DEL METODO

- Alcuni *Leuconostoc* spp. possono formare grandi colonie viscide, che possono ostacolare lo sviluppo di altre colonie, causando così una sottostima del numero di batteri lattici.
- Leuconostoc mesenteroides* e *Leuconostoc dextranicum* si trovano spesso nello stesso habitat dei lattobacilli, soprattutto del *Lactobacillus brevis*, e possono crescere su MRS Agar. Questi due microrganismi si distinguono tuttavia per la capacità di fermentare il trealosio e per l'incapacità di idrolizzare l'arginina.
- A causa del possibile sviluppo di microrganismi diversi dai batteri lattici, in alcuni casi e per alcuni prodotti può essere necessario confermare le colonie con tecniche semplici (come la colorazione di Gram o il test della catalasi).²
- Se c'è il rischio di un'estesa contaminazione da lieviti (ad esempio, nelle salsicce essiccate), aggiungere acido sorbico al terreno di coltura.²
- Non lasciare che le piastre si asciughino; con l'essiccazione, la concentrazione di acetato aumenta in superficie, inibendo la crescita dei lattobacilli.⁷

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 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.
- 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.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti 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.





- 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

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 produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia (piastre/provette/flaconi) e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento). Secondo Baird RM et al. le piastre preparate possono essere conservate a 2-8°C per 14 giorni.⁸

Piastre pronte

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

- DeMan JC, Rogosa M, Sharpe ME. (1960). An improved medium for the cultivation of Lactobacilli. 1960; J Appl Bact 23,130-135.
- ISO 15214:1998. Microbiology of food and animal feeding stuffs – Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria – Colony-count technique at 30°C.
- Reuter G. Elective and selective media for lactic acid bacteria. Int J Food Microbiol 1985; 2:55-68
- ISO 7889 (IDF 117): 2003. Yogurt — Enumeration of characteristic microorganisms — Colony-count technique at 37 °C.
- Njongmenta NA et al. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 19 Acid-producing microorganism. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015
- Schoeni JL. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Chapter 20 Probiotics. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015
- MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
- 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; 5:228-232.

®Tween è un marchio di ICI Americas Inc.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF Numero di catalogo	LOT Numero di lotto	Monouso	Fabbricante	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	Date
Revisione 6	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

