

**OGYE AGAR BASE****OXYTETRACYCLINE  
ANTIMICROBIC SUPPLEMENT****GENTAMICIN  
ANTIMICROBIC SUPPLEMENT**

Terreno di base, in polvere e pronto all'uso in flacone  
e supplementi selettivi per l'isolamento di lieviti e muffe negli alimenti.

**FORMULE TIPICHE****OGYE Agar Base (g/l)**

Estratto di lievito	5.0
Glucosio	20.0
Agar	13.0

**Oxytetracycline Antimicrobial Supplement (x fiala)**

Ossitetraciclina HCl 50 mg

**Gentamycin Antimicrobial Supplement (x fiala)**

Gentamicina solfato 25 mg

**PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE****A - Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar**

Sospendere 19 g di OGYE Agar Base in 500 ml di acqua distillata fredda; portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 115°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi, una fiala di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement (REF 4240000) con 5 ml di acqua distillata sterile ed addizionala al terreno di base; concentrazione finale 100 mg/l.

**B - Oxytetracycline-Gentamicin Glucose Yeast Extract Agar**

Sospendere 19 g di OGYE Agar Base in 500 ml di acqua distillata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione ed autoclavare a 115°C per 15 minuti. Raffreddare a 50°C. Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi, una fiala di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement, con 5 ml di acqua distillata sterile e una fiala di Gentamicin Antimicrobial Supplement (REF 4240004) con 5 ml di acqua distillata sterile ed addizionarli al terreno di base. Concentrazioni finali degli antibiotici: ossitetraciclina 100 mg/l, gentamicina 50 mg/l.

pH finale 6.6 ± 0.2

**PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE**

In un bagnomaria termoregolato a 100°C introdurre i flaconi e riscaldare fino ad ebollizione ed a scioglimento completo. Raffreddare a 45-50°C e, con le cautele dell'asepsi.

**A - Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar**

Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi, una fiala di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement (REF 4240000) con 5 ml di acqua distillata sterile ed aggiungere 1 ml al terreno di base; concentrazione finale 100 mg/l.

**B - Oxytetracycline-Gentamicin Glucose Yeast Extract Agar**

Ricostituire con le precauzioni dell'asepsi, una fiala di Oxytetracycline Antimicrobial Supplement, con 5 ml di acqua distillata sterile e una fiala di Gentamicin Antimicrobial Supplement (REF 4240004) con 5 ml di acqua distillata sterile ed aggiungere 1 ml di ciascuna soluzione al terreno di base. Concentrazioni finali degli antibiotici: ossitetraciclina 100 mg/l, gentamicina 50 mg/l.

**DESCRIZIONE**

Mossel e coll. segnalano già nel 1962 che i terreni a pH acido non risultavano idonei per il conteggio di lieviti e muffe negli alimenti, essenzialmente per due ragioni:

1 - Le cellule di lievito, stressate dal calore, non tollerano i pH acidi necessari all'inibizione dei contaminanti batterici.

2 - La crescita dei lieviti e delle muffe è sovente limitata dalla presenza di flore batteriche acidotolleranti.

L'aggiunta di ossitetraciclina ad una base a pH neutro si dimostrò invece particolarmente indicata allo scopo, poichè forniva conte micotiche più elevate rispetto ai terreni in cui era utilizzato il solo pH acido per sopprimere la crescita batterica (Mossel 1962). Queste osservazioni furono confermate da Buttiaux e Catsaras e da Sainclivier e Roblot. In uno studio su 4000 campioni di origine alimentare e clinica, Mossel e coll. (1970), valutarono l'accuratezza dei conteggi di lieviti e muffe su Oxytetracycline Glucose Yeast Extract Agar osservando come il terreno fosse particolarmente inibitorio nei confronti delle *Bacillaceae*. In particolari condizioni sperimentali e su determinati alimenti l'utilizzo della sola ossitetraciclina non si dimostrò comunque sufficiente ad ottenere conteggi attendibili di lieviti e muffe. In particolare Mossel e coll. (1979) hanno osservato che con alimenti ad alto contenuto proteico in cui vi sia presenza di bacilli Gram negativi è necessario l'uso concomitante della ossitetraciclina e della gentamicina per una completa inibizione della flora contaminante. Inoltre, quando vi sia necessità di temperature di incubazione più elevate, l'uso della ossitetraciclina nell'esame di alimenti ad alto contenuto proteico non si è dimostrato idoneo in quanto vi è una inattivazione di circa il 50% (per incubazione di 3 giorni a 37°C) ed una significativa perdita della sua attività selettiva (Mossel, 1979; Put) A volte, un'altro problema che si riscontra soprattutto nel conteggio dei lieviti, è l'interferenza delle larghe colonie di alcune muffe e dei loro miceli aerei (*Neurospora* e *Rhizopus* spp.); se si desidera limitare questo sviluppo, il terreno di scelta è il Rose Bengal Agar. È evidente quindi come sia necessario disporre di più terreni di coltura e di differenti agenti selettivi da impiegare in modo mirato in rapporto al tipo di alimento da esaminare, alle condizioni di incubazione e al tipo di microrganismo che si desidera ricercare. Il terreno OGYE Agar Base è preparato in accordo alla formulazione riportata da ISO 7954.

**IMPIEGO**

Per il conteggio dei lieviti e delle muffe si consiglia il seguente schema di impiego dei terreni di coltura:

- OGYE Agar Base + ossitetraciclina: uso generale su alimenti a basso contenuto proteico e poco contaminati da bacilli Gram negativi
- OGYE Agar Base + ossitetraciclina e gentamicina: alimenti ad alto contenuto proteico in cui lieviti e muffe siano associati a bacilli Gram negativi.
- Rose Bengal Agar + cloramfenicolo: temperatura di incubazione superiore ai 22-25°C; conteggio dei lieviti in condizioni di lavoro tali da limitare nelle dimensioni le colonie ed i miceli aerei delle muffe.

Per l'isolamento dei lieviti e delle muffe dagli alimenti operare secondo lo schema di lavoro seguente:

- Distribuire in piastre Petri 1 ml delle diluizioni decimali del campione.
- Aggiungere 15-20 ml di uno dei terreni preparati come descritto sopra e mescolare.
- Incubare le piastre capovolte a 25°C +/- 2°C per 3-5 giorni osservando giornalmente la crescita.
- Eseguire la conta delle colonie sulle piastre contenenti meno di 150 colonie dopo 5 giorni di incubazione o in qualsiasi giorno dopo il 3° se la presenza di miceli aerei troppo abbondanti minaccia di impedire la lettura.
- Calcolare il numero di lieviti e/o muffe per grammo di campione moltiplicando il numero di colonie per il fattore di diluizione.

### CONTROLLO QUALITÀ

Controllo produttività:

*C.albicans* ATCC 10231: buona crescita; *A.niger* ATCC 16404: buona crescita; *P.cyclopium* ATCC 16025: buona crescita; *S.cerevisiae* ATCC 9763: buona crescita

Controllo selettività

*E.coli* ATCC 25922: inibito; *B.subtilis* ATCC 6633: inibito

Incubazione: 25°C per 3 giorni

### CONSERVAZIONE

**Terreno in polvere:** conservare a 10-30°C al riparo della luce, in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento della polvere ecc.).

Conservare il terreno di base, senza aggiunti di supplementi, per un massimo di 1 mese a 2-8°C

Conservare le piastre, complete di supplemento, preparate in laboratorio per un massimo di 4 giorni a 2-8°C

**Supplementi selettivi:** conservare fino alla data di scadenza indicata sull'etichetta, a 2 - 8°C.

**Terreno in flacone:** conservare a 2-8°C nella confezione originale. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Eliminare se vi sono segni evidenti di deterioramento.

### PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

**Terreno in polvere:** il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni >1%. Come per tutti i terreni in polvere anche la manipolazione di questo terreno deve essere effettuata con una adeguata protezione delle vie respiratorie

**Supplementi selettivi :** i preparati qui descritti sono così classificati ai sensi della legislazione vigente:

Gentamicin Antimicrobic Supplement : T (tossico) . Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

Oxytetracycline Antim. Supplement : Xn (nocivo) . Consultare la scheda di sicurezza prima dell'impiego.

**Terreno in flacone** il preparato qui descritto non è classificato come pericoloso ai sensi della legislazione vigente né contiene sostanze pericolose in concentrazioni ≥1%.

I prodotti qui descritti devono essere usati in laboratorio, da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.

Sterilizzare le piastre dopo il loro uso e prima dell'eliminazione come rifiuto.

### BIBLIOGRAFIA

- Buttiaux, R. et Catsaras, M. (1965).. Annl. Inst. Pasteur, Lille, 16,167.
- ICMSF (1978). Microorganisms in Foods, Their Significance and Methods of Enumeration. University of Toronto Press, 157-159.
- ISO 7954 : 1987) Microbiology- general guidance for enumeration of yeasts and moulds – Colony count technique at 25°C
- Jarvis, B. (1973). J. App. Bact. 36, 723-727.
- Mossel, D.A.A., Visser, M. and Mengerink, W.H.J. (1962) Lab. Pract. 11, 109.
- Mossel, D.A.A., Kleynen-Semmeling A.M.C., Vincentie H.M. (1970). J. App. Bact. 33, 454
- Mossel, D.A.A et al. (1979). J. App. Bact. 39, 15
- Put H.M. (1974) Arch. Lebensmittel Hyg. 25, 73.
- Sainclivier M. and Roblot A.M. (1966) Annl. Inst. Pasteur, Lille, 17, 181.

### CONFEZIONI

Terreno in polvere

<b>4018381</b>	<b>OGYE Agar Base,</b>	<b>100 g (2.6 l)</b>
<b>4018382</b>	<b>OGYE Agar Base,</b>	<b>500 g (13.1 l)</b>
<b>4018384</b>	<b>OGYE Agar Base,</b>	<b>5 kg (131 l)</b>

Supplementi selettivi

<b>4240004</b>	<b>Gentamicin Antimicrobic Suppl.,</b>	<b>10 fiale liofile, ciascuna per 500 ml</b>
<b>4240000</b>	<b>Oxytetracycline Antim. Supplement,</b>	<b>10 fiale liofile, ciascuna per 500 ml</b>

Terreno in flacone

<b>5118382</b>	<b>OGYE Agar Base,</b>	<b>6 flaconi da 100 ml</b>
----------------	------------------------	----------------------------