

DG18 AGAR BASE

Terreno di base in polvere e terreno pronto in flacone ed in piastra per il conteggio di lieviti ed muffe in alimenti e mangimi con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 (ISO 21527-2)

FORMULA TIPICA DEL TERRENO DI BASE IN POLVERE (g/L)

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

FORMULA TIPICA DEL TERRENO IN FLACONE ED IN PIASTRA (g/L)

Idrolisato enzimatico di caseina	5
Glucosio (C ₆ H ₁₂ O ₆)	10
Potassio diidrogenofosfato (KH ₂ PO ₄)	1
Magnesio solfato (MgSO ₄ .H ₂ O)	0,5
Dichloran (2,6-dichloro-4-nitroanilina)	0,002
Agar	13,5
Glicerolo	220
Cloramfenicolo	0,1
Acqua	1000 mL

PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 15 g in 500 mL di acqua distillata fredda e scaldare per sciogliere completamente la polvere. Aggiungere 110 g di glicerolo anidro (REF 421015). Ricostituire un flacone di Chloramphenicol Antimicrobial Supplement (REF 4240003) secondo le istruzioni ed aggiungerlo al terreno. Sterilizzare in autoclave a 121 °C per 15 minuti. Raffreddare ad una temperatura inferiore a 50 °C in bagnomaria termoregolato tra 44 a 47 °C. Mescolare e distribuire 15 mL in piastre di Petri sterili. Evitare di mantenere esposto il terreno alla luce.

pH finale 5,6 ± 0,2

PREPARAZIONE DEL TERRENO IN FLACONE

Scaldare in bagnomaria a 100 °C portando ad ebollizione il terreno in flacone agitando di tanto in tanto. Raffreddare a circa 50 °C e trasferire in piastre Petri sterili. pH finale 5,6 ± 0,2

DESCRIZIONE

Il terreno DG 18 (Dichloran 18% mass fraction glycerol) Agar Base, supplementato di cloramfenicolo e glicerolo anidro corrisponde alla formulazione descritta da ISO 21527-2 per il conteggio in piastra di lieviti ed muffe in prodotti destinati all'alimentazione umana ed in mangimi, con attività dell'acqua inferiore o uguale a 0,95 (frutta secca, prodotti di pasticceria, marmellata, pesce salato, carne secca, cereali e prodotti a base di cereali, farine, spezie e condimenti ecc.)

La procedura qui descritta non si applica ai prodotti con attività dell'acqua inferiore a 0,60 e non si applica al conteggio delle spore fungine dei funghi alofili e xerofili.

IMPIEGO

Preparare la sospensione del campione e le sue diluizioni decimali in accordo allo specifico standard internazionale applicabile

- Trasferire per mezzo di una pipetta sterile 0,1 mL campione tal quale se liquido o 0,1 mL della sospensione madre (10⁻¹) per gli altri prodotti. Per facilitare il conteggio di bassi numeri di lieviti e muffe è possibile seminare 0,3 mL in aliquote di 0,1 mL su tre piastre.
- Ripetere l'operazione per le successive diluizioni impiegando una pipetta sterile per ciascuna diluizione. Per campioni solidi è raccomandato dalla norma ISO il piastramento diretto: campioni

di questo tipo sono disinfettati in superficie con una soluzione di sodio ipoclorito 0,35% con un tempo di contatto di 2 minuti, quindi sciacquati con acqua distillata sterile, asciugati con carta sterile ed alla fine posizionati sulla superficie del terreno in piastra.

- Distribuire l'inoculo sulla superficie delle piastre per mezzo di un'ansa, spatolando fino che tutto il liquido è stato assorbito dall'agar.
- Incubare in aerobiosi le piastre non capovolte a $25 \pm 1^\circ\text{C}$
- Leggere le piastre dopo 2-5-7 giorni di incubazione. Selezionare le piastre che contengano meno di 150 colonie e contare in maniera selettiva tutte le varie morfologie di colonie (lieviformi, fungine ecc. Se si sospetta la presenza di *Xeromyces bisporus* incubare le piastre fino a 10 giorni
- Riportare come numero di colonie (eventualmente differenziando per tipo) per grammo di campione

CONTROLLO QUALITA' (25 \pm 1 °C, 5 GIORNI)

Produttività (ceppi suggeriti da ISO 21527-2)

S.cerevisiae ATCC 9763: crescita*Wallemia sebi* ATCC 42694: crescita*Aspergillus restrictus* ATCC 42693 crescita con limitato sviluppo del diametro delle colonie e dello sviluppo aereo dei miceli*Eurotium rubrum* ATCC 42690 crescita con limitato sviluppo del diametro delle colonie e dello sviluppo aereo dei miceli

Selettività (ceppi suggeriti da ISO 21527-2)

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

Terreno in polvere: polvere fine, omogenea di colore beige

Terreno in piastra: limpido beige

CONSERVAZIONE:

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

Piastrre preparate in laboratorio: conservare a 2-8°C al buio.

PRECAUZIONI E SICUREZZA DEGLI OPERATORI

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

Il prodotto qui descritto deve essere usato 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

ISO 21527-2 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

PACKAGING**Terreno in polvere****401394 DG18 Agar Base 500 g (16.6 L)****Supplementi****4240003 Chloramphenicol Antimicrobial Supplement 10 x 500 mL****421015 Glycerol 100 mL****Terreno pronto all'uso in piastra****541394 DG 18 AGAR 20 piastre diam 90 mm****Terreno pronto all'uso in flacone****5113942 DG 18 AGAR 6 x 100 mL**