

Petrifilm™

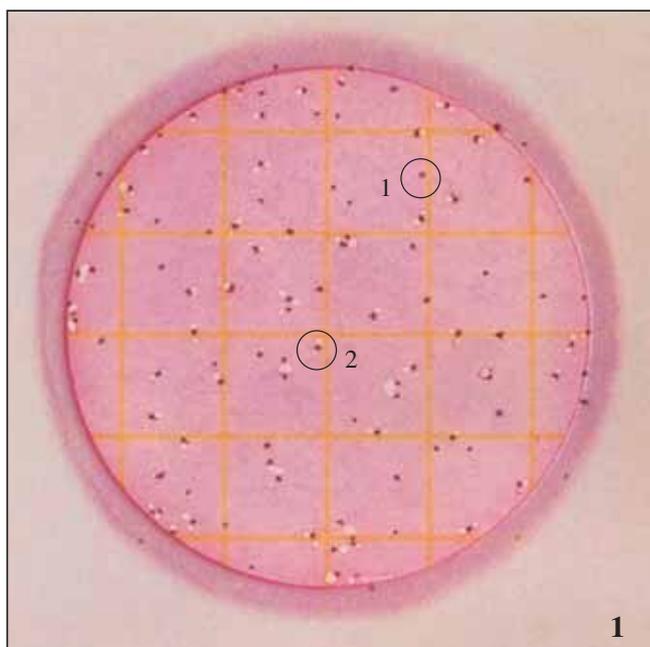
Piastre per il conteggio dei Coliformi

La presente guida serve per familiarizzare con i risultati delle piastre 3M Petrifilm per il conteggio Coliformi (CC). Per ulteriori informazioni, rivolgersi al rappresentante ufficiale di zona di 3M Prodotti per Microbiologia.

Le piastre Petrifilm CC contengono nutrienti modificati VRB, un agente gelificante solubile in acqua fredda, un indicatore di colore (tetrazolio) che facilita il conteggio delle colonie. Il film superiore trattiene il gas prodotto dai Coliformi che fermentano il lattosio.

La piastra Petrifilm CC può essere utilizzata per il conteggio sia di Coliformi totali che di Coliformi termotolleranti (fecali).

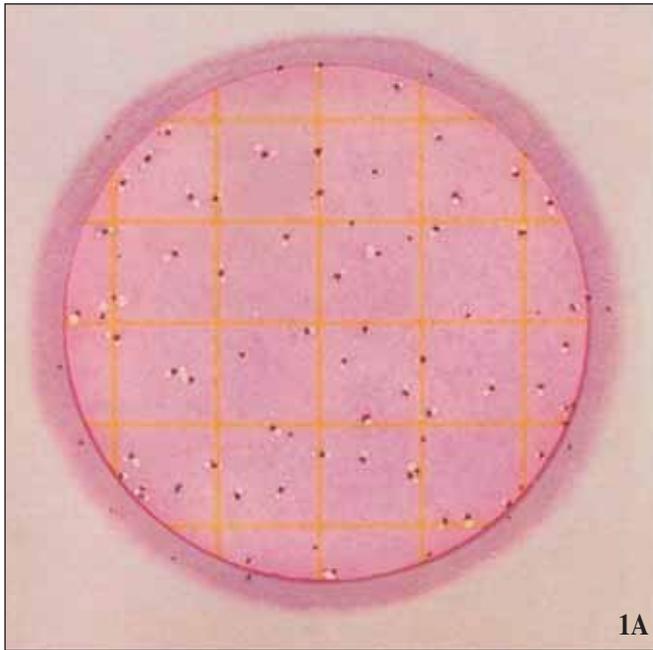
- **L'ISO** definisce i Coliformi per la loro capacità di crescere in mezzi selettivi secondo metodi specifici. Il metodo **ISO 4832**, enumerazione dei Coliformi con la tecnica del conteggio delle colonie, definisce i Coliformi per le dimensioni della colonia e la produzione di acido su VRB agar con lattosio (VRBL). Sulle piastre Petrifilm CC, questi Coliformi che producono acido sono indicati da colonie rosse con o senza gas (vedere cerchio 1). Il metodo **ISO 4831**, enumerazione dei Coliformi con il metodo del numero più probabile (Most Probable Number - MPN), definisce i Coliformi per la loro capacità di crescere e produrre gas dal lattosio in un brodo selettivo. Sulle piastre Petrifilm CC questi Coliformi sono indicati da colonie rosse associate a gas (vedere cerchio 2).
- **AOAC INTERNATIONAL** e **FDA (Food and Drug Administration)/BAM** definiscono i Coliformi come microrganismi gram-negativi che producono acido e gas dal lattosio durante la fermentazione metabolica. Le colonie Coliformi che crescono sulle piastre Petrifilm CC producono acido, che, grazie alla presenza dell'indicatore di pH, provoca una colorazione scura del gel; il gas intrappolato attorno alle colonie rosse indica che le colonie sono Coliformi. (vedere il cerchio 2).



Il tempo e la temperatura di incubazione nonché l'interpretazione delle piastre Petrifilm CC variano a seconda del metodo. AOAC®, AFNOR e NMKL hanno validato l'impiego di piastre Petrifilm CC in condizioni specifiche. Vedere le pagine 2 e 3 di questa guida all'interpretazione.

Numero di colonie che non producono gas: 24
Numero di colonie che producono gas: 75
Conteggio totale: 99

Interpretazione delle piastre 3M™ Petrifilm™ CC secondo i protocolli descritti dai seguenti enti: AOAC®, NMKL e AFNOR



65 Coliformi, Metodi Ufficiali AOAC®.

Lettura secondo i metodi ufficiali AOAC®

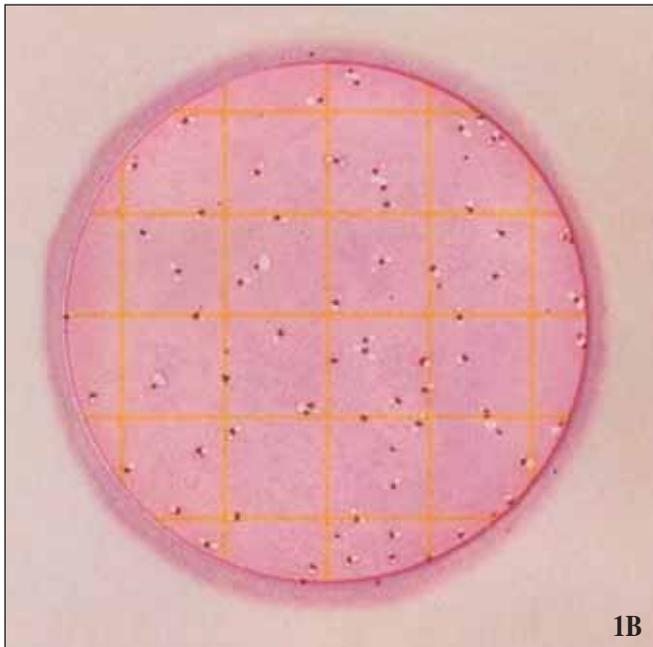
(AOAC® Official Methods) (986.33, 989.10 e 991.14)

Incubazione:

- *Conteggio dei Coliformi nel latte, nel latte crudo e nei latticini (Metodi Ufficiali 986.33 e 989.10):*
incubare per 24 h + 2 h a 32°C + 1°C
- *Conteggio dei Coliformi in tutti gli alimenti, ad eccezione di quelli sopra elencati (Metodo Ufficiale 991.14):*
incubare per 24 h + 2 h a 35°C + 1°C.

Interpretazione:

- Coliformi: contare tutte le colonie rosse con gas.



67 Coliformi, metodo validato NMKL

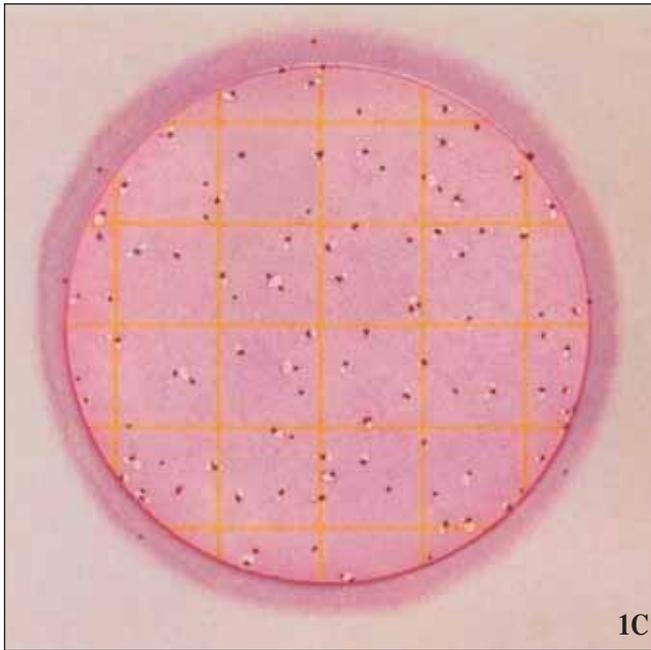
Lettura secondo il metodo validato NMKL (147.1993)

Incubazione:

24 h + 2 h a 37°C + 1°C

Interpretazione:

- Coliformi: contare tutte le colonie rosse con gas.



97 Coliformi, metodo approvato AFNOR in riferimento al metodo **ISO 4832**

72 Coliformi che producono gas, metodo approvato AFNOR in riferimento al metodo **ISO 4831**

Lettura secondo l'approvazione dell'AFNOR per i Coliformi totali

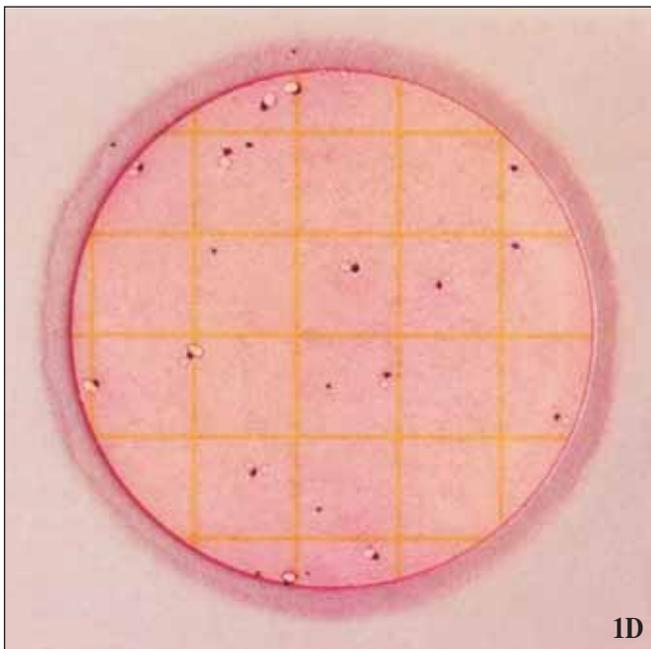
(certificati numero 3M 01/2-09/89A e 3M 01/2-09/89B)

Incubazione:

24 h + 2 h a 30°C + 1°C

Interpretazione:

- *In riferimento al metodo ISO 4832 (certificato 3M 01/2-09/89A):*
contare tutte le colonie con o senza gas.
- *In riferimento al metodo ISO 4831 (certificato 3M 01/2-09/89B):*
contare solo le colonie con gas.



21 Coliformi, metodo approvato AFNOR in riferimento al metodo **NF V08-017**

Lettura secondo l'approvazione AFNOR per i Coliformi termotolleranti

(certificati numero 3M 01/2-09/89C)

Incubazione:

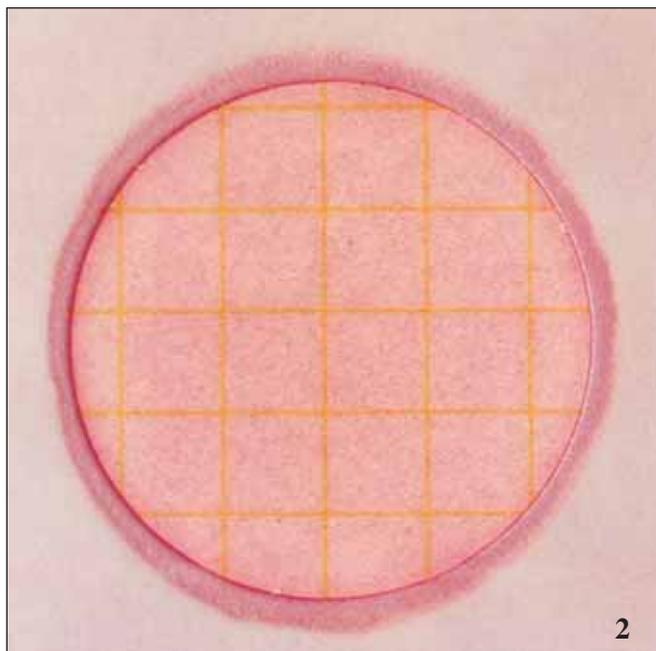
24 h + 2 h a 44°C + 1°C

Interpretazione:

- *In riferimento al metodo NF V08-017:*
contare tutte le colonie rosse con o senza gas.

Piastra 3M™ Petrifilm™ per il conteggio dei Coliformi

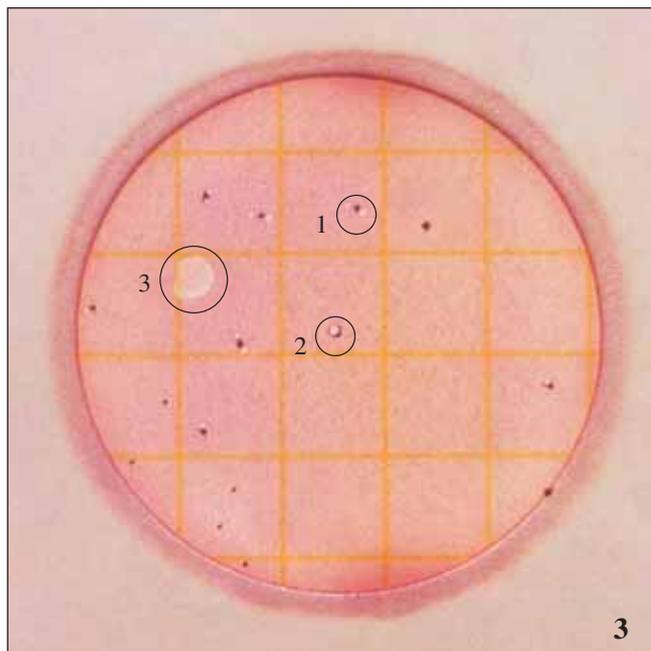
Man mano che aumenta il numero di Coliformi, il colore del gel diventa più scuro, come risulta dalle figure da 2 a 6.



Assenza di crescita

Numero di colonie = 0

Le bolle di fondo sono una caratteristica del gel e non il risultato della crescita di Coliformi. Le bolle di gas di fondo sono di dimensioni da piccole a grandi come una punta di spillo e non hanno una colonia associata.



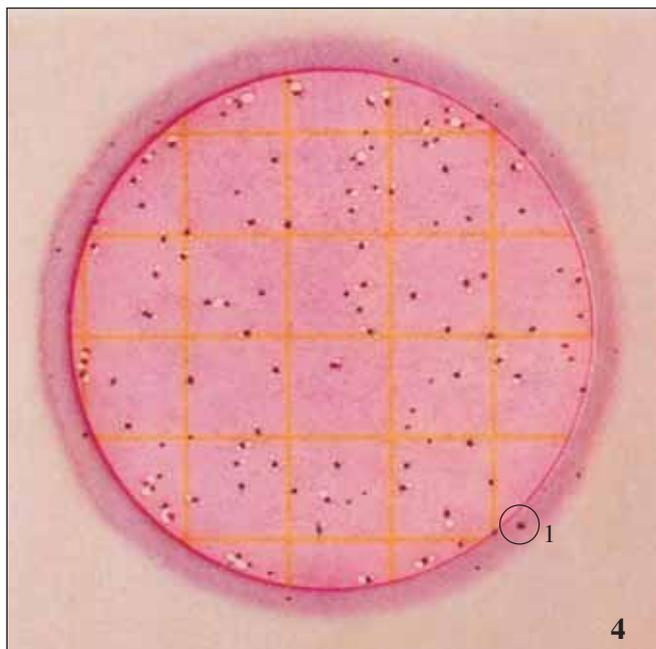
Numero di colonie che non producono gas: 7

Numero di colonie che producono gas: 8

Conteggio totale: 15

La Figura 3 mostra in che modo possono variare le forme delle bolle. Talvolta il gas rompe la colonia cosicché la colonia "delinea" la bolla. (vedere i cerchi 1 e 2). Queste bolle di gas devono essere entro all'incirca il diametro di una colonia.

Le bolle artefatte possono essere dovute ad un inoculo non corretto della piastra Petrifilm CC o ad aria intrappolata nel campione. Hanno forma irregolare e non sono associate ad una colonia (Vedere cerchio 3).



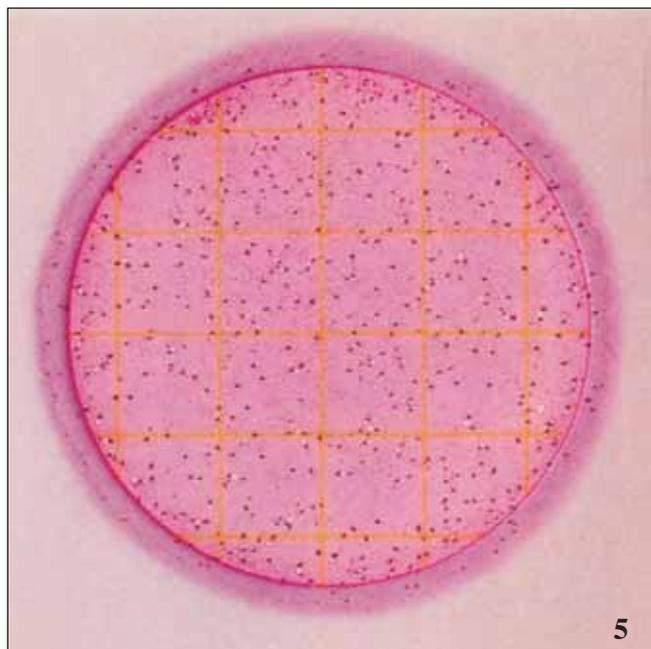
Numero di colonie che non producono gas: 29

Numero di colonie che producono gas: 83

Conta totale: 112

L'ambito di conteggio ideale (popolazione totale delle colonie) sulle piastre Petrifilm CC è di 15-150 colonie.

Non contare le colonie che appaiono sulla barriera di schiuma, dato che vengono eliminate dall'influenza selettiva del terreno di coltura (vedere il cerchio 1).



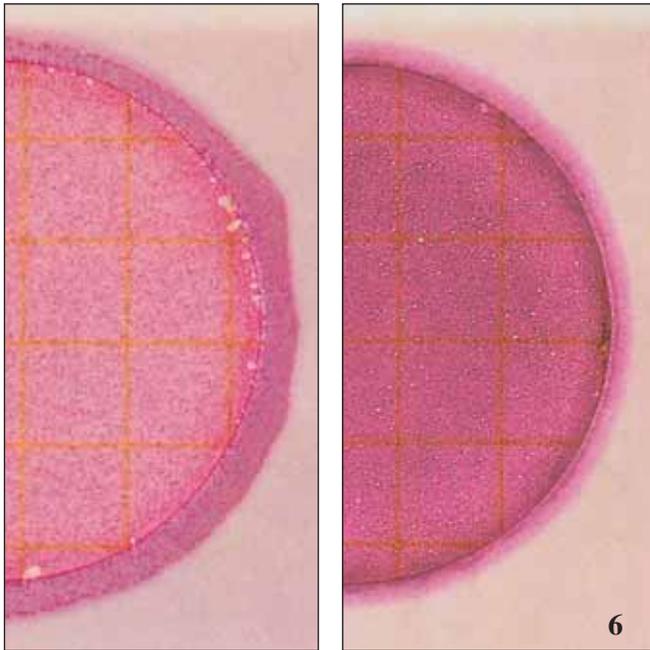
Numero totale stimato: 310

L'area di crescita circolare sulla piastra Petrifilm CC è di circa 20 cm². Si possono effettuare delle stime sulle piastre contenenti più di 150 colonie contando il numero di colonie in uno o più quadrati rappresentativi determinando il numero medio per quadrato. Moltiplicare il numero medio per 20 per determinare il numero stimato per ciascuna piastra Petrifilm CC.

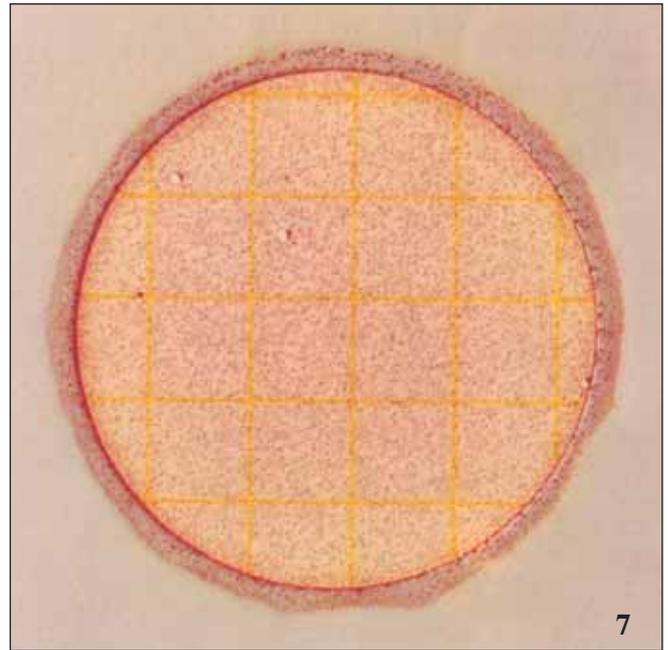
Si consiglia un'ulteriore diluizione del campione per ottenere un conteggio più accurato.

piastre con numero di colonie molto elevato (superiore al range di lettura consigliato).

Per ottenere un conteggio accurato, diluire ulteriormente il campione



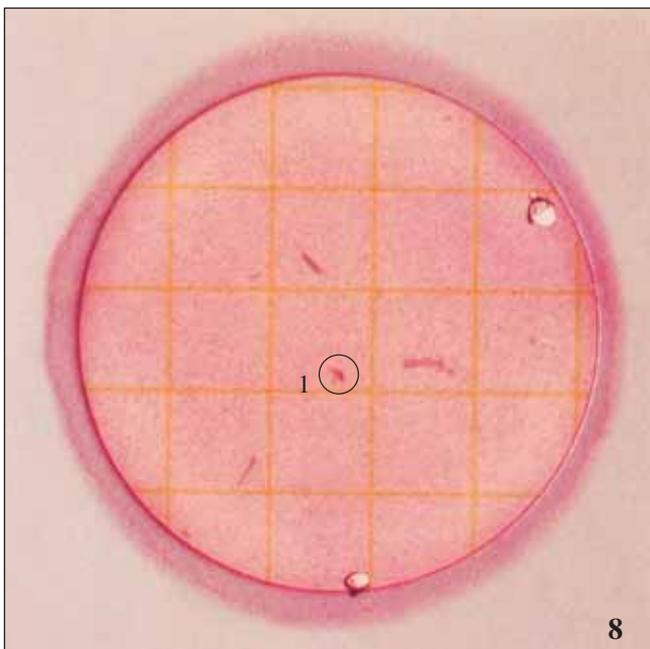
Le piastre Petrifilm CC con un numero molto elevato di colonie hanno una o più delle seguenti caratteristiche: numerose piccole colonie, molte bolle di gas e il colore del gel più scuro.



Colonie che producono gas: 4

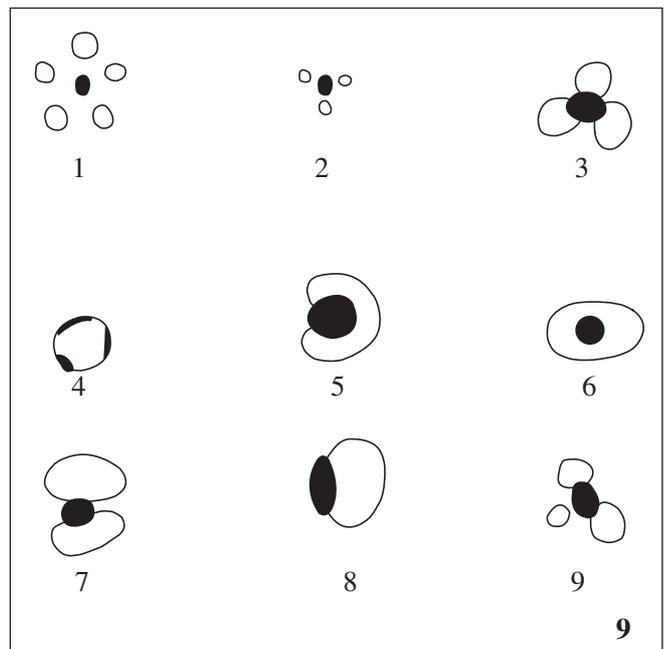
Quando su piastre Petrifilm CC è presente un numero elevato di microrganismi non Coliformi come lo *Pseudomonas*, il gel può virare al giallo.

Bolle



Colonie che producono gas: 2

Pezzetti di prodotto alimentare eventualmente presenti hanno una forma irregolare e non sono associati a bolle di gas. (vedere il cerchio 1).



Sono riportati ulteriori esempi di diversi tipi di bolle associate ad una colonia. Devono essere tutte contate.

3M™ Petrifilm™

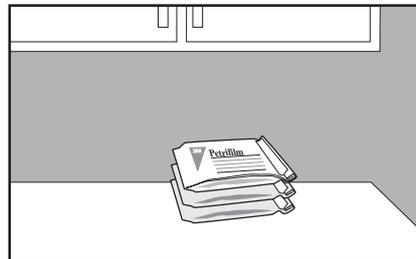
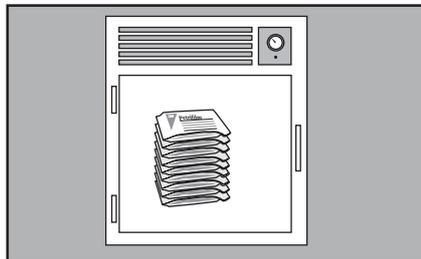
Piastre per il conteggio dei coliformi

Per le Avvertenze, le Precauzioni, la Garanzia, i Rimedi Limitati, lo Stoccaggio e lo Smaltimento e le Istruzioni per l'uso, vedere le note informative all'interno della confezione.

Guida
all'utilizzo

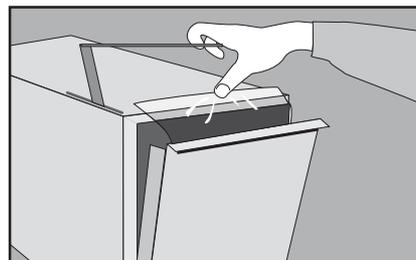
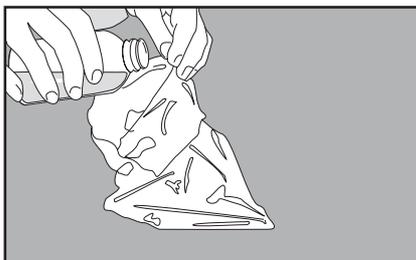


Stoccaggio



- 1 Conservare** le confezioni chiuse ad una temperatura $\leq 8^{\circ}\text{C}$. Utilizzare le piastre entro la data di scadenza indicata sulla confezione. In ambienti con umidità elevata dove è possibile la formazione di condensa, le confezioni devono essere riportate a temperatura ambiente prima dell'apertura.
- 2** Per sigillare le confezioni aperte, ripiegare l'apertura e sigillarla con nastro adesivo.
- 3** Conservare le confezioni così richiuse a $\leq 25^{\circ}\text{C}$ e $\leq 50\% \text{RH}$. **Non conservare in frigorifero le confezioni aperte.** Usare le piastre Petrifilm entro un mese dall'apertura.

Preparazione del Campione



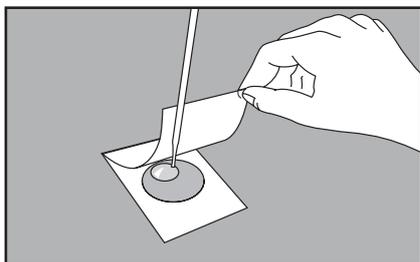
- 4** Inserire il prodotto in un contenitore sterile adeguato come un sacchetto da stomacher, un flacone per diluizioni, un sacchetto Whirl-Pak® o altri contenitori sterili appositi.
- 5** Se necessario, usare i diluenti **sterili** appropriati: diluente al sale peptonato (metodo ISO 6887) (Diluente Maximum Recovery), tampone fosfato Butterfield's (tampone fosfato IDF, KH_2PO_4 a 0,0425 g/L, regolato a pH 7,2), 0,1% acqua peptonata (metodo ISO 6579), soluzione salina (0,85 - 0,90%), brodo di Letheen senza bisolfito o acqua distillata.
- 6** Miscelare od omogeneizzare il campione secondo le procedure correnti.

Regolare il pH del campione diluito tra 6,6 e 7,2:

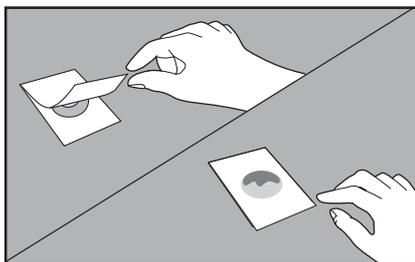
- per i prodotti acidi, usare NaOH 1N,
- per i prodotti alcalini, usare HCl 1N.

Non usare tamponi contenenti citrato, bisolfito o tiosolfato, dato che possono inibire la crescita.

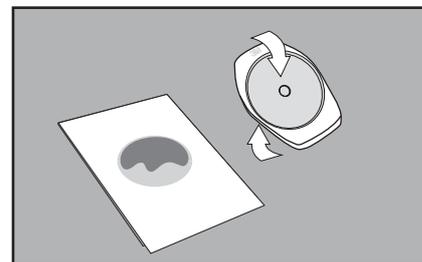
Inoculo



- 7 Posizionare la piastra Petrifilm su una superficie **piana**. Sollevare il film superiore. Tenendo una pipetta **perpendicolare** alla piastra Petrifilm, seminare 1 ml di campione nella parte centrale del film basale.

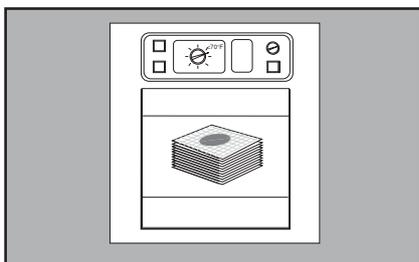


- 8 **Arrotolare attentamente** il film superiore per evitare di intrappolare bolle d'aria. **Non** lasciar cadere il film superiore.



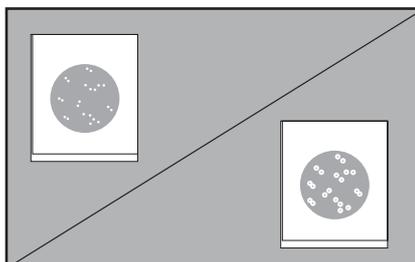
- 9 Posizionare il diffusore di plastica, tenendo il lato **piatto** rivolto verso il basso, sul film superiore sopra il campione seminato. Esercitare una **leggera** pressione sul diffusore per distribuire lungo l'area circolare prima che il gel solidifichi. Non torcere o far scivolare il diffusore. Sollevare la spatola. Attendere almeno un minuto perché il gel solidifichi.

Incubazione

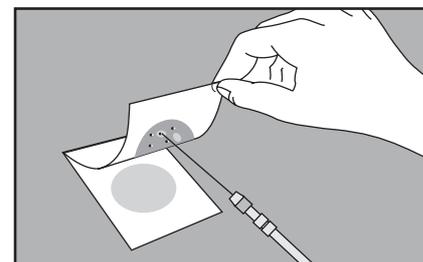


- 10 Incubare le piastre con il lato trasparente verso l'alto, in pile di massimo 20 piastre. Tempi e temperature d'incubazione variano secondo il metodo di riferimento.

Interpretazione



- 11 Il conteggio delle colonie sulle piastre Petrifilm può essere fatto con un conta-colonie standard o con un qualsiasi altro tipo di ingranditore. Per la lettura dei risultati, consultare la sezione Guida all'interpretazione.



- 12 Le colonie possono essere isolate per un'identificazione successiva. Sollevare il film di copertura e prendere la colonia dal gel.

Metodi approvati più comuni:

Coliformi Totali

• Metodi Ufficiali AOAC 986.33 e 989.10 (latte, latte crudo, altri prodotti lattiero-caseari) :

Incubare 24h ± 2h a 32°C ± 1°C.

• Metodi Ufficiali AOAC 991.14 (tutti gli alimenti) :

Incubare 24h ± 2h a 35°C ± 1°C.

• Metodo NMKL 147.1993 :

Incubare 24h ± 2h a 37°C ± 1°C.

• Metodi validati AFNOR

3M 01/2-09/89A e B :

Incubare 24h ± 2h a 30°C ± 1°C.

Coliformi Termotolleranti (fecali)

• Metodi validati AFNOR

3M 01/2-09/89C :

Incubare 24h ± 2h a 44°C ± 1°C.

E' necessaria l'umidificazione dell'incubatore a queste temperature elevate.



Prodotti per Microbiologia
3M Italia Spa

Via San Bovio, 1
20090 San Felice Segrate - MI
Tel : 02 70351

For Europe, please contact :
Laboratoires 3M Santé
Tel. : (33) 1 30 31 85 71
Fax : (33) 1 30 31 85 78

