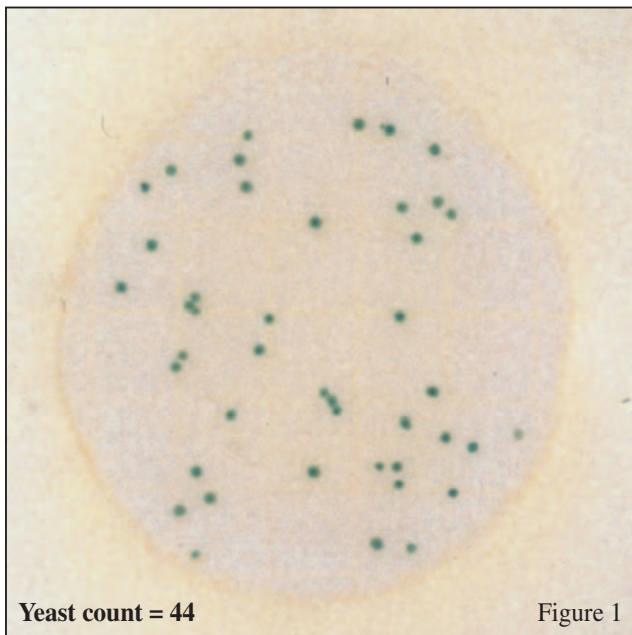


Petrifilm™

Sistemi pronti per conteggio di lieviti e muffe



Nel terreno di crescita del Petrifilm YM è contenuto un indicatore di contrasto che facilita l'individuazione delle colonie rendendone più semplice il conteggio.

Utilizzando le piastre Petrifilm YM, lieviti e muffe vengono distinti in base alle seguenti caratteristiche.

LIEVITI

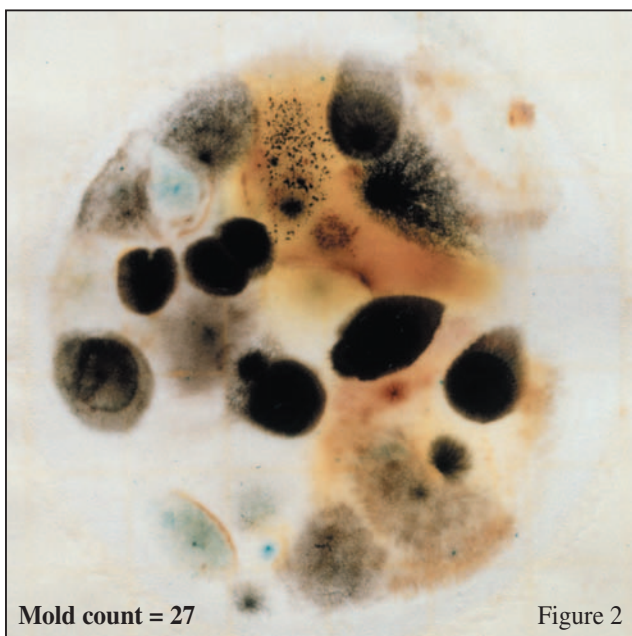
- colonie piccole
- bordo definito
- colore blu-verde
- colonie in rilievo
- colore uniforme

MUFFE

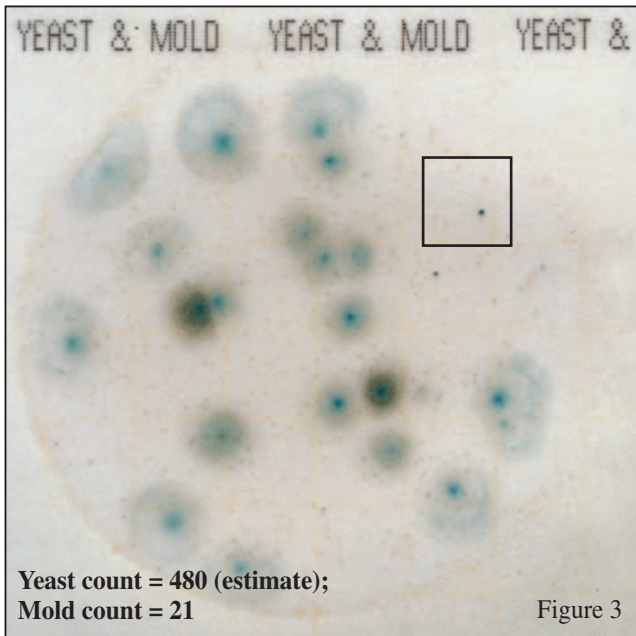
- colonie grandi
- bordo diffuso
- colore variabile per la presenza di pigmenti propri nelle muffe
- colonie piatte
- area centrale di colore più scuro

Le colonie sul Petri film YM riportato in figura 1 sono un tipico esempio di lieviti.

Nella figura 2, le colonie sono un tipico esempio di muffe.



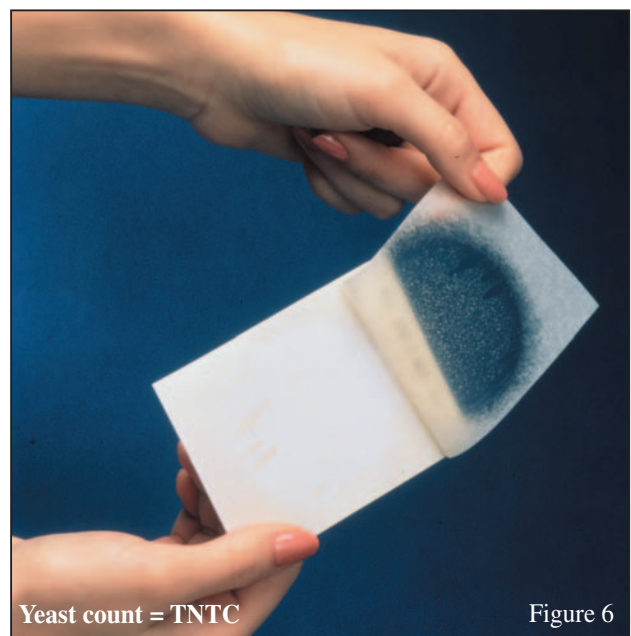
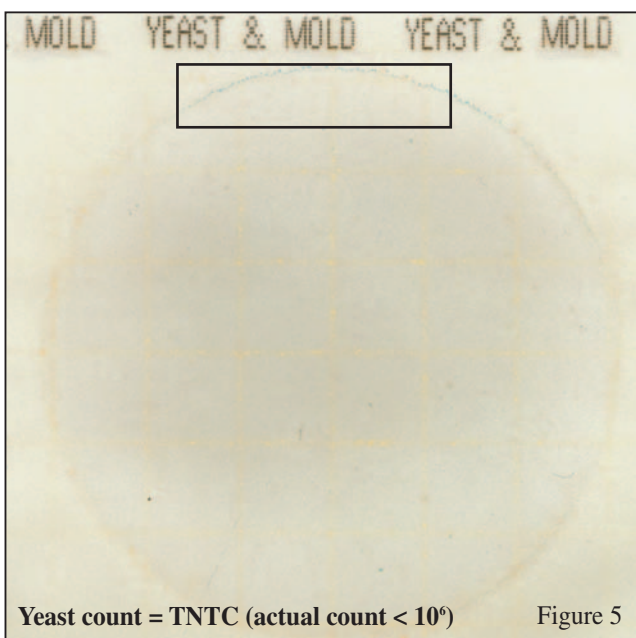
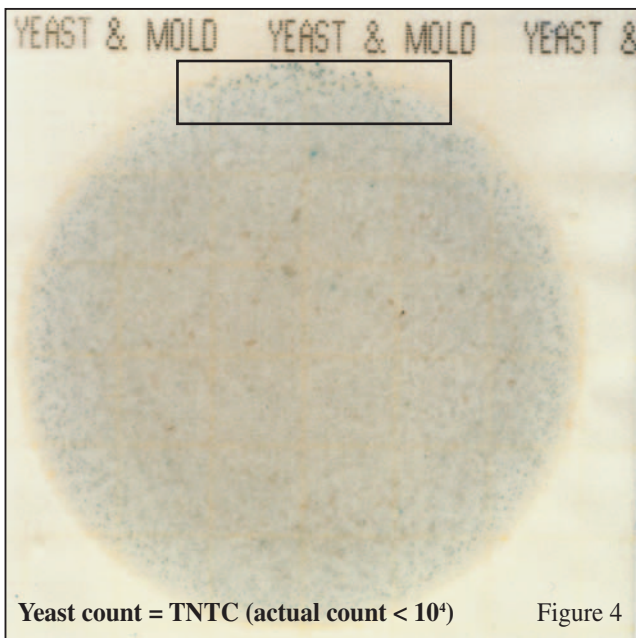
Lieviti



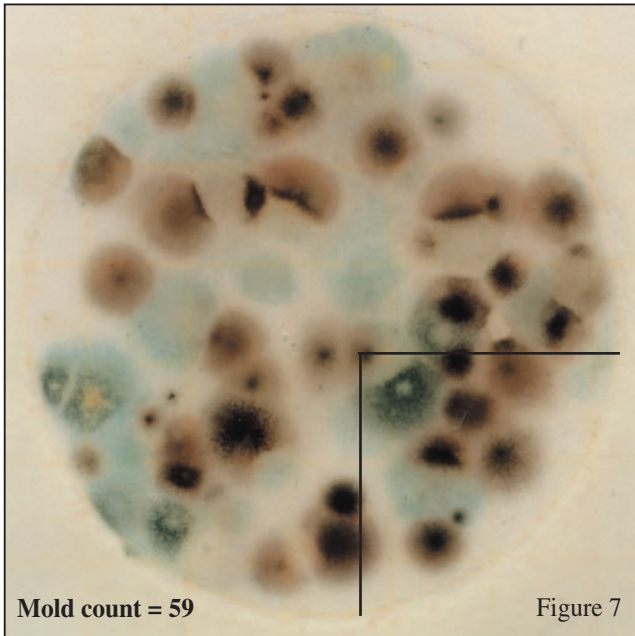
Il Petri film YM in figura 3, contiene 21 colonie di muffe, riconoscibili dalla dimensione, dal bordo sfumato e dall'area centrale più scura, ed un elevato numero di colonie di lieviti. Quando il numero delle colonie è superiore a 150, si consiglia di procedere ad un conteggio stimato, ottenibile determinando il numero medio di colonie presenti in un quadretto significativo di terreno (1 cmq) e moltiplicando lo stesso per 30, in quanto l'area utile di crescita sul Petrifilm YM è di circa 30 cmq.

Nel Petrifilm YM in figura 4, il numero di colonie di lieviti è talmente alto da non consentire alcun tipo di conteggio. Si nota infatti una fittissima presenza di piccole colonie posizionate soprattutto nella parte eccentrica dell'area di crescita. Lo stesso fenomeno si può notare, in modo più accentuato, nella figura 5 dove, le colonie sono visibili solo lungo il profilo del terreno. In casi come questo, se si desidera contare le colonie occorre diluire ulteriormente il campione.

Nella figura 6 è riportato un Petrifilm YM in cui vi è una assenza apparente di colonie. In effetti, sollevando il top-film di copertura possiamo invece notare una presenza di numerose colonie atipiche di lieviti di colore bianco che, mascherate dal fondo chiaro, non risultavano visibili.



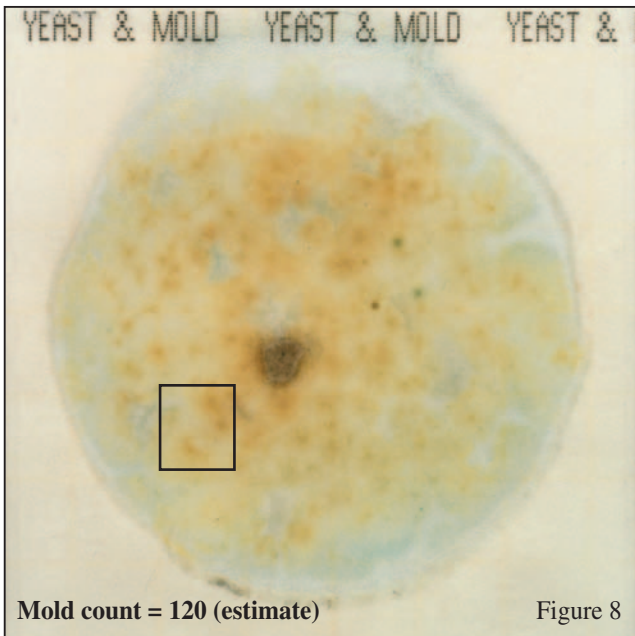
Muffe



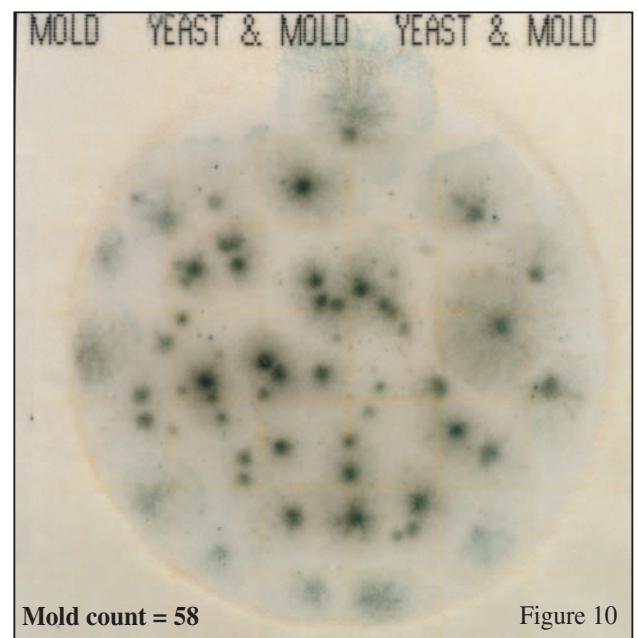
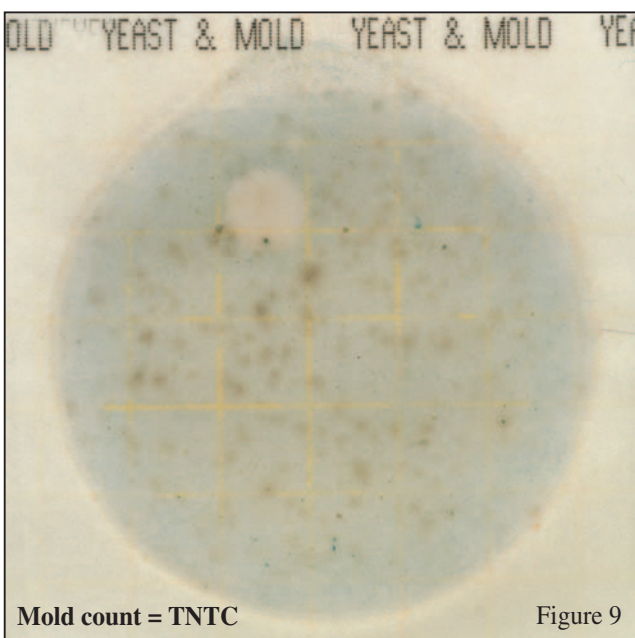
Sul Petrifilm YM riportato in figura 7, le colonie di muffe sono riconoscibili per la loro notevole dimensione, colorazione variabile, bordo diffuso e zone centrale più marcata. Data la dimensione, le colonie di muffe possono confluire, in questo caso, la zona centrale più scura di ogni colonia, facilita il conteggio delle stesse. Nell'area evidenziata sono presenti 15 colonie di muffe.

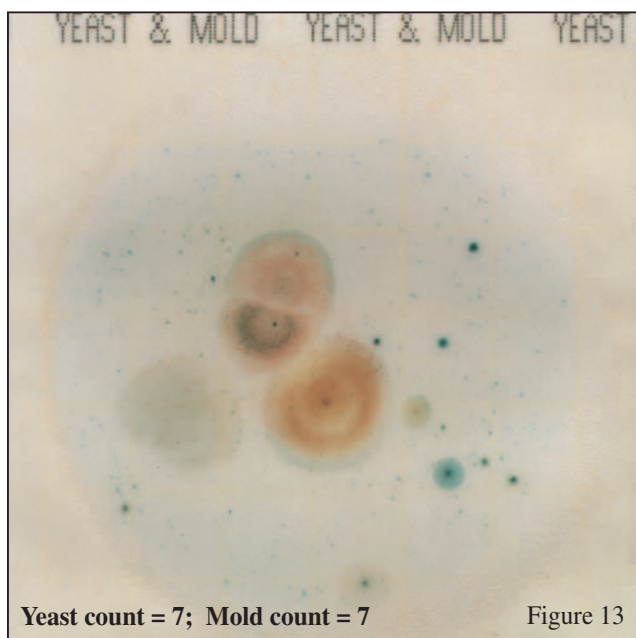
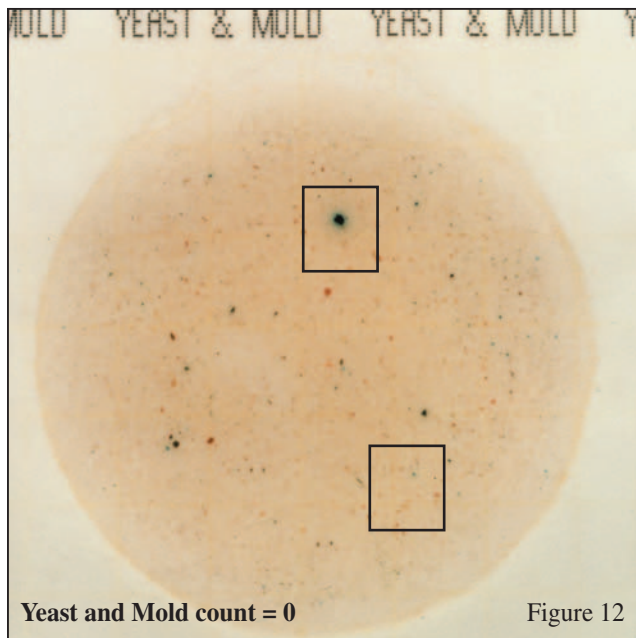
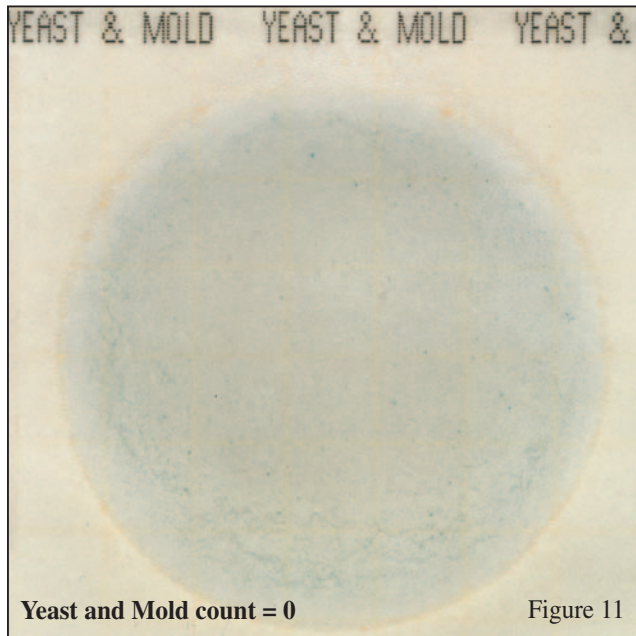
Un elevato numero di colonie di muffe (molte in fase di sporulazione) può presentarsi come in figura 8. Anche in questo caso il conteggio (stimato) si può effettuare facendo riferimento alle zone centrali più scure. Nel riquadro evidenziato sono presenti 4 colonie.

In questi casi, una ulteriore diluizione del campione facilita notevolmente il conteggio.



Nelle figure 9 e 10 è rappresentato lo stesso campione a due diluizioni differenti: rispettivamente I: 10 e I: 100. Le colonie in figura 9 sono piccole e difficilmente individuabili tutte le caratteristiche tipiche delle colonie di muffe; caratteristiche che, a causa della sovrappopolazione, vengono soffocate nel campione a diluizione minore.





Reazione della fosfatasi

Tutte le cellule viventi contengono un enzima : la fosfatasi. L'indicatore presente nel Petrifilm YM viene attivato dalla presenza di fosfatasi e conferisce alle colonie di lieviti una colorazione blu-verde, mentre nelle muffe esalta la naturale pigmentazione delle stesse.

Alcuni alimenti, crudi o processati, che contengono cellule vive (e quindi fosfatasi) possono reagire con l'indicatore presente ne Petrifilm YM. Quando ciò si verifica si possono riscontrare le seguenti situazioni: un uniforme lieve azzurrimento del terreno di crescita; una presenza di spots di colore blu molto intenso (più frequente con prodotti granulati).

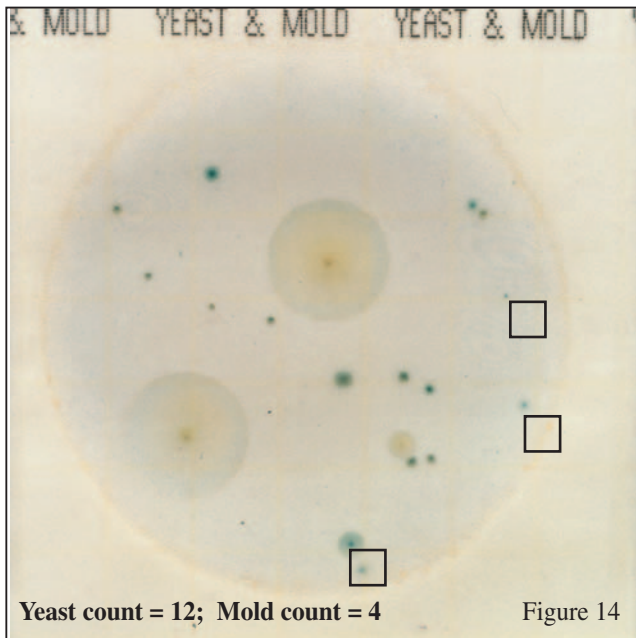
La colorazione dovuta alla naturale presenza di fosfatasi negli alimenti è riconoscibile da quella dovuta alla presenza di colonie di lieviti e muffe adottando le seguenti misure:

- 1) **DILUIZIONE** : quando possibile, ulteriori diluzioni possono attenuare o eliminare il background blu o il numero degli spots.
- 2) **SEMINARE IL SURNATANTE**: mescolare il campione, attendere qualche minuto affinché si depositino le particelle di maggiore dimensione e quindi prelevare il surnatante per la semina sul Petri film YM.
- 3) **TEMPERATURA DI INCUBAZIONE**: controllare le piastre a 25 :t J cc. La velocità di reazione indicatore-fosfatasi aumenta con l'aumentare della temperatura.
- 4) **OSSERVAZIONI SUCCESSIVE**: controllare il Petri film YM dopo 24-28 ore di incubazione ed annotare eventuali cambiamenti di colore da confrontare poi nella lettura finale.

Il Petrifilm YM in figura 11 mostra un tipico esempio di background azzurro dovuto alla naturale reazione della fosfatasi presente nel campione. La granulazione è dovuta alle particelle proprie del campione seminato. In questi casi, a differenza delle figure 4 e 5, la colorazione e la granulazione sono assenti lungo il perimetro dell'area di crescita.

La figura 12 mostra un esempio tipico di spot blu dovuto a reazione fosfatasica naturale. Sia la forma che il colore intenso consentono di distinguere queste particelle alimentari dalle colonie di lieviti e muffe.

In figura 13 si nota un altro esempio di particelle colorate dalla reazione della fosfatasi. Queste appaiono brillanti, sottili e irregolari. Nella figura sono presenti anche colonie di lieviti e colonie di muffe.

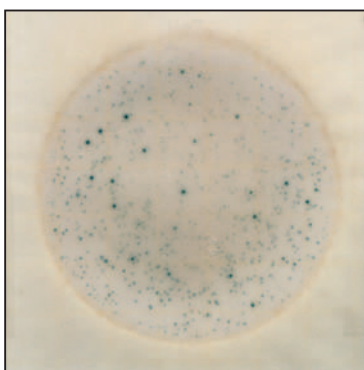


Nella figura 14 è riportato lo stesso campione di figura 13, seminando però solo il surnatante. Il numero delle particelle presenti (riquadrate) è notevolmente ridotto.

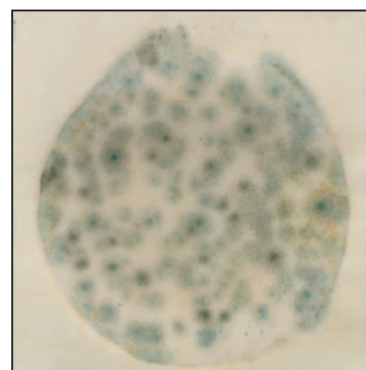
Tempo e temperatura

Appropriati tempi e temperature di incubazione sono importanti per assicurare una corretta crescita anche alle colonie di lieviti e muffe più sensibili a questi fattori.

A questo proposito si consiglia di incubare a 25°C:±1°C per 3-5 giorni. La presenza del top-film di copertura limita la diffusione delle spore prodotte dalle muffe evitando così la formazione di colonie addizionali. Incubare lieviti e muffe a temperature superiori non significa ottenere risultati più velocemente; ma soltanto ottenere risultati non corretti. Nelle figure 15 e 16 viene riportato lo stesso campione, incubato a temperature e tempi differenti.



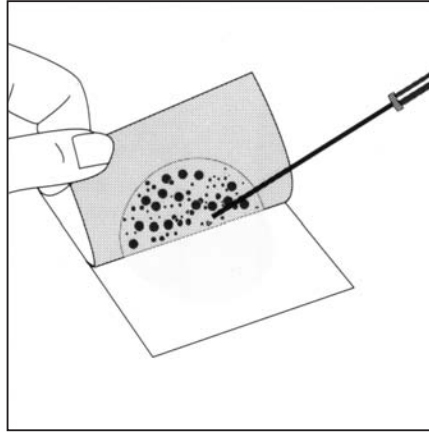
Incubato 3 giorni a 35°C



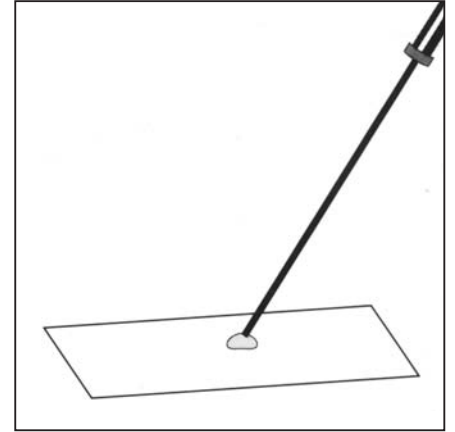
Incubato 5 giorni a temperatura ambiente Figura

Indagine microscopica

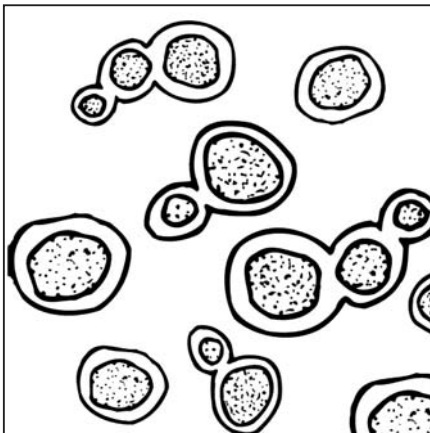
Tra lieviti e muffe troviamo organismi molto differenti, a volte difficilmente distinguibili gli uni dalle altre se ci si limita alla sola indagine macroscopica. Un esame microscopico può tuttavia fugare ogni dubbio.



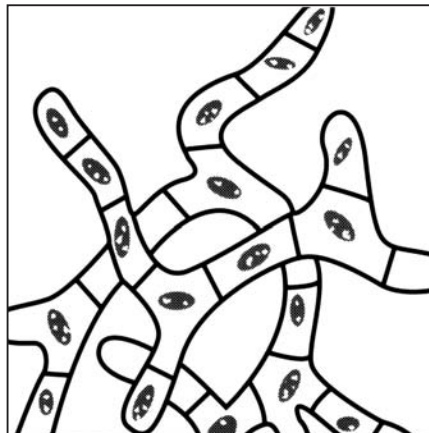
Per isolare le colonie per ulteriori identificazioni, prelevare le stesse dal gel utilizzando una ansa sterile.



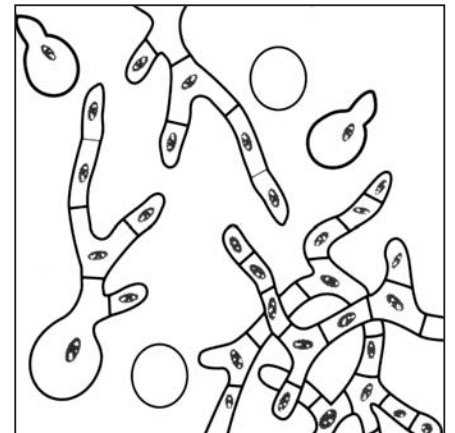
Trasferire le colonie per una goccia di soluzione sterile preparata in un vetrino per microscopi a ottica ad immersione in olio.



La forma ovoidale è tipica degli lieviti.



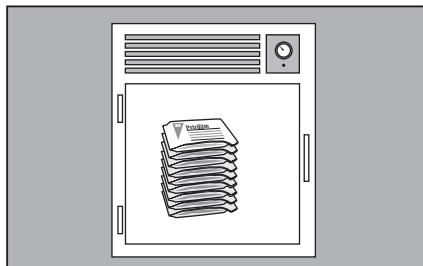
La forma ramificata filamentosa, micelio, è tipica delle muffe.



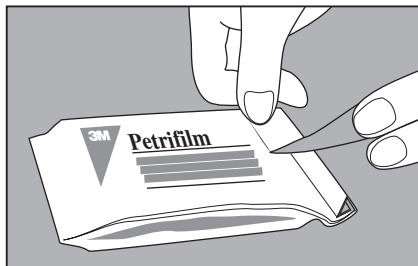
Muffe a vari stati di germinazione.



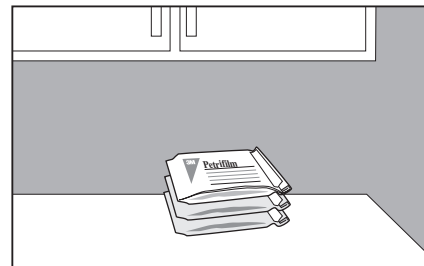
Stoccaggio



1 Conservare le piastre Petrifilm nelle confezioni originali, non ancora aperte, in frigorifero. Utilizzare le piastre entro la data di scadenza indicata sulla confezione.

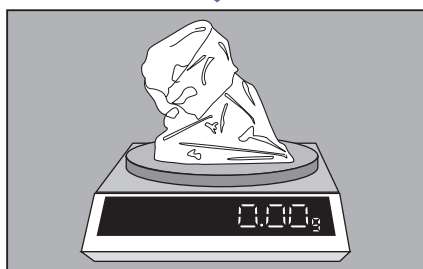


2 Le confezioni parzialmente utilizzate devono essere richiuse ripiegandone l'apertura e sigillandola con del nastro adesivo.

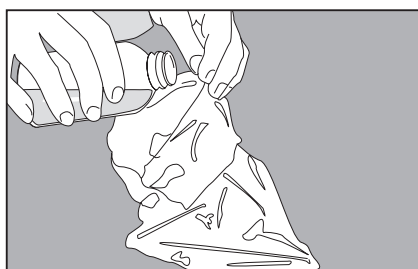


3 Conservare le confezioni richiuse a temperatura ambiente con una umidità relativa < 50%. Non conservare in frigorifero le confezioni aperte. Utilizzare le piastre entro un mese.

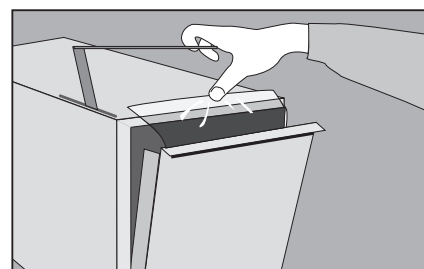
Preparazione



4 Preparare una diluizione (minimo 1: 10) del campione da analizzare. Pesare il prodotto in buste da stomacher, bottiglie di diluizione o altri appositi contenitori sterili.

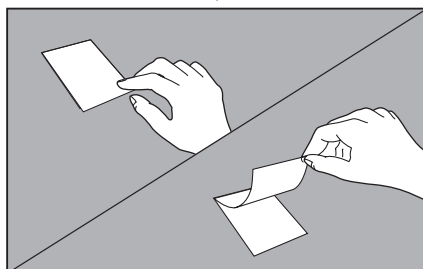


5 Aggiungere il diluente (phosphate buffer; peptone-salt ; acqua peptonata 0,1 % ; acqua distillata; butterfield's buffer - non utilizzare soluzioni di diluizione contenenti sodio citrato o tiosolfato).

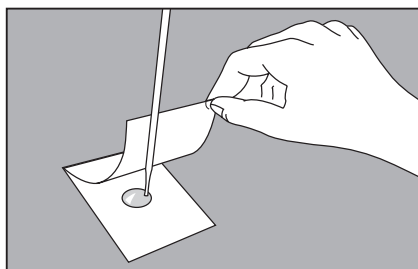


6 Omogenizzare il campione secondo le procedure correnti. * Nel caso sia richiesta una sensibilità maggiore, es per succhi o prodotti caseari, fare riferimento alla procedura indicata sull'apposita guida.

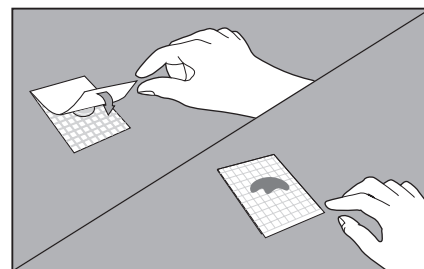
Inoculo



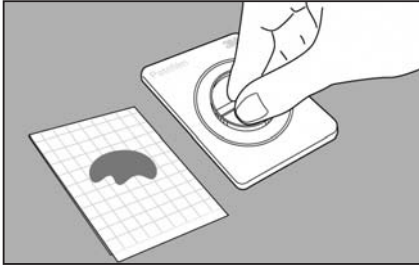
7 Posizionare il Petrifilm su una superficie piana. Sollevare il film di copertura.



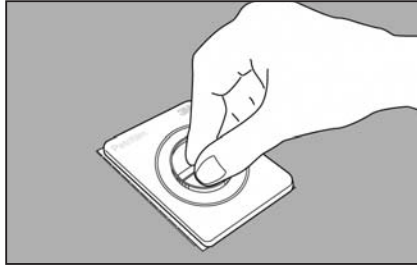
8 Tenendo la pipetta perpendicolare al Petrifilm, seminare 1 ml di campione nella parte centrale del film basale.



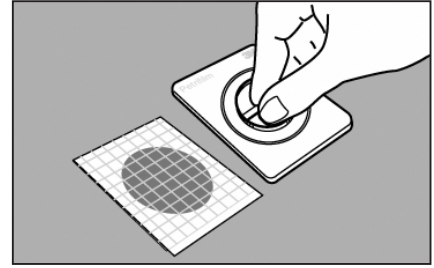
9 Richiudere il film di copertura al di sopra del campione inseminato.



10 Posizionare l'apposita spatola distributrice sul film di copertura in corrispondenza della area insemata.

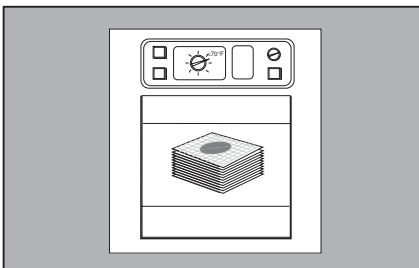


11 Esercitare una leggera pressione e distribuire l'inoculo lungo l'area circolare determinata dalla spatola stessa. Durante tale operazione, fare attenzione a non strisciare la spatola sul Petrifilm.



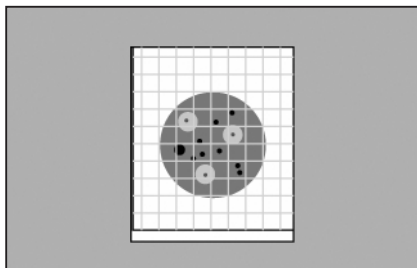
12 Sollevare la spatola e attendere un minuto affinché il gel inizi il processo di solidificazione.

Incubazione



13 Incubare le piastre Petrifilm, con il lato trasparente verso l'alto in pile massime di 20 piastre, per 3-5 giorni ad una temperatura di $25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$. Per ottimizzare la crescita delle colonie si consiglia di incubare le piastre all'interno di contenitori o buste di plastica.

Interpretazione



14 Effettuare il conteggio delle colonie utilizzando un normale contatore Quebec. Per l'interpretazione dei risultati, fare riferimento alla relativa Guida all'Interpretazione.

Date	Version
Février 2004	1.0

3M

Microbiology Products
3M Italia SP A

Via S. Bovio 1/3
20090 Segrate
MILANO
Tel: (02) 70 351

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

