



## Ágar DICLORAN ROSA DE BENGALA CLORANFENICOL

### USO

O ágar Dicloran Rosa de Bengala Cloranfenicol é recomendado para a contagem de bolores e leveduras viáveis que se desenvolvem em produtos destinados ao consumo humano e animal com uma atividade aquosa ( $a_w$ ) maior do que 0,95. Este é o método recomendado na norma NF ISO 21527-1 de dezembro de 2008.

### HISTÓRIA

Os primeiros meios seletivos destinados a contagem de bolores e leveduras usavam um pH ácido para limitar a proliferação de bactérias. Em 1962, o trabalho desenvolvido por Mossel para detecção de bolores e leveduras em alimentos mostrou a superioridade do meio a um pH mais neutro e contendo um agente antibacteriano em relação ao sistema baseado em pH ácido somente. Em 1973, Jarvis desenvolveu e usou com sucesso o Rosa de Bengala Clortetraciclina. Durante o curso do trabalho posterior em 1979, King *et al.* mostraram que a introdução do dicloran e a redução da concentração do rosa de bengala permitia uma maior recuperação dos bolores. Os resultados obtidos por estes mesmos autores também demonstraram que a esporulação foi melhor controlada a um pH de 5,6 neste meio.

Similarmente em 1978, Korburger e Rogers mostraram a eficiência da combinação do cloranfenicol e clortetraciclina na inibição bacteriana. Finalmente, em 1992, baseado nos estudos comparativos de detecção e contagem, Beuchat propôs que uma inoculação de superfície era favorecida em relação a um método de despejamento em placa para a contagem de bolores & leveduras.

### PRINCÍPIOS

- A triptona e a glicose asseguram o crescimento dos bolores e leveduras.
- O dicloran e o rosa de bengala inibem a invasão de bolores e reduzem o tamanho das outras colônias. O rosa de bengala é facilmente assimilado pelas leveduras o que tende a facilitar a sua contagem colorindo elas de rosa.
- A presença do cloranfenicol, um antibiótico resistente ao calor, e da clortetraciclina reforça a seletividade do meio contra a maioria das bactérias contaminantes.
- O zinco e o cobre sob a forma de sulfatos aumentam a produção de pigmento pelos bolores.
- O tergitol limita a proliferação de *Mucoraceae*.

## **PREPARAÇÃO**

- Suspender 30,0 g do meio desidratado (BK198) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.
- Lentamente levar a ebulação, com agitação constante até a dissolução completa.
- Dispensar 100 mL em frascos.
- Esterilizar em um autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Se o formato pronto para derreter é usado (BM149 ou BM142), derreter o meio por pelo menos uma quantidade de tempo mínima necessária para atingir a liquefação total.
- Resfriar e manter entre 44-47°C.

### **NOTA 1:**

Uma liquefação parcial do meio inevitavelmente levará a uma significativa modificação na força do gel do ágar solidificado, após a esterilização e resfriamento.

## **INSTRUÇÕES PARA USO**

### Contagem via inoculação de superfície:

- Despejar em placas de Petri estéreis.
- Deixar solidificar sobre uma superfície fria.
- Secar as placas em uma incubadora, com as tampas parcialmente removidas.
- Transferir 0,1 mL do produto a ser analisado e suas diluições seriadas em decuplicata para estas placas preparadas ou usar as placas pré-vazadas BM143.
- Espalhar o inóculo uniformemente sobre a superfície usando uma alça de Drigalski estéril.
- Incubar a (25 ± 1)°C por 2 a 5 dias, ao abrigo da luz.

### **NOTA 2:**

Não inverter as placas durante a incubação a fim de impedir a reinoculação das placas com os esporos de bolores eventualmente presentes na superfície, durante a manipulação repetida.

### Contagem via inclusão (método de contagem em placa):

- Transferir 1 mL do produto a ser analisado e suas diluições seriadas em decuplicata para placas de Petri vazias e estéreis.
- Despejar 10 a 15 mL do meio.
- Misturar bem por agitação.
- Deixar solidificar sobre uma superfície fria.
- Incubar a (25 ± 1)°C por 2 a 5 dias, ao abrigo da luz.

### **NOTA 3:**

Quando se utiliza a técnica de inoculação por inclusão, a equivalência dos resultados deve ser validada contra a de inoculação de superfície.

### **NOTA 4:**

Produtos de decomposição citotóxica produzidos pela exposição à luz podem resultar em subestimação da microflora presente na amostra. É, portanto, altamente recomendado evitar a exposição à luz durante a incubação.

## **RESULTADOS**

As placas devem ser lidas entre 2 e 5 dias de incubação. Reter apenas aquelas placas contendo menos do que 150 unidades formadoras de colônias ou formadoras de micélios. Se uma rápida invasão das placas é observada, reter as contagens feitas após 2 dias, em seguida, novamente após 5 dias de incubação. Se necessário, contar separadamente os bolores & leveduras. As leveduras aparecem rosa devido a assimilação do rosa de bengala. As colônias de leveduras e as de bactérias não-inibidas podem ser confundidas durante as contagens; neste caso um teste de confirmação envolvendo exame micro ou macroscópica pode tornar-se necessário.

## **COMPOSIÇÃO TÍPICA do meio completo**

(pode ser ajustada para se obter um melhor desempenho)

Para 1 litro de meio:

- Polipeptona.....	5,0 g
- Glicose.....	10,0 g
- Fosfato monopotássico.....	1,0 g
- Sulfato de magnésio, 7H <sub>2</sub> O.....	0,5 g
- Diclorano (dicloro-2,6-nitro-4-anilina).....	2,0 mg
- Rosa de bengala.....	25,0 mg
- Cloranfenicol.....	50,0 mg
- Cloridrato de clortetraciclina.....	50,0 mg
- Sulfato de zinco, 7H <sub>2</sub> O.....	10,0 mg
- Sulfato de cobre, 5H <sub>2</sub> O.....	5,0 mg
- Tergitol.....	1,0 mL
- Ágar.....	12,4 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 5,6 ± 0,2.

## **CONTROLE DE QUALIDADE**

- Meio desidratado: pó creme a rosado, de fluxo livre e homogêneo.
  - Meio preparado (completo): ágar rosa.
- Típica resposta da cultura após 5 dias de incubação a 25°C<sup>(1)</sup> :

Microrganismos	Crescimento (Índice de Produtividade: P <sub>R</sub> )
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	P <sub>R</sub> ≥ 50%
<i>Candida albicans</i>	P <sub>R</sub> ≥ 50%
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	P <sub>R</sub> ≥ 50%
<i>Mucor racemosus</i>	P <sub>R</sub> ≥ 50%
<i>Escherichia coli</i>	inibido, valor 0
<i>Bacillus subtilis</i>	inibido, valor 0

<sup>(1)</sup> De acordo com NF ISO 21527-1

## **ESTOCAGEM / SHELF LIFE**

### **Meio desidratado:** 2-8°C.

- A data de validade está indicada na etiqueta.

### **Meio preparado (valor de referência\*):**

- Meio em frascos: 3 meses entre 2-8°C, ao abrigo da luz.
- Meio em placas: 7 dias entre 2-8°C, ao abrigo da luz.

### **Meio pronto para derreter em frascos:**

- Armazenar entre 2-8°C, ao abrigo da luz.
- A data de validade está indicada na etiqueta.

### **Meio pré-vazado em placas:**

- Armazenar entre 2-8°C, ao abrigo da luz.
- A data de validade está indicada na etiqueta

## **EMBALAGEM**

Código

### **Meio pronto para derreter em frascos:**

- |               |         |
|---------------|---------|
| - 10 x 100 mL | BM14908 |
| - 10 x 200 mL | BM14208 |

### **Meio pré-vazado em placas de Petri (Ø 90 mm):**

- |             |         |
|-------------|---------|
| - 20 placas | BM14308 |
|-------------|---------|

### **Meio desidratado:**

- |                   |         |
|-------------------|---------|
| - Frasco de 500 g | BK198HA |
|-------------------|---------|

## **BIBLIOGRAFIA**

MOSSEL D.A.A., VISSER M. & MENGERINK W.J.H., 1962, A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages, *Laboratory Practice*, **11** : 109-112.

JARVIS B., 1973, Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food, *Journal of Applied Bacteriology*, **36** : 723-727.

KORBURGER J.A. & RODGERS M.F., 1978, Single or multiple antibiotic-amended media to enumerate yeasts and moulds, *Journal of Food Protection*, **41** : 367-369.

KING A.D., HOCKING A.D. & PITI J.I., 1979, Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods, *Applied and Environmental Microbiology*, **37** : 959-964.

BEUCHAT L.R., 1992, Media for detecting and enumerating yeasts and moulds, *International Journal of Food Microbiology*, **17** : 145-158.

XP CEN ISO/TS 11133-2 (V 08-104-2), Janvier 2004, *Microbiologie des aliments - Guide pour la préparation et la production des milieux de culture - Partie 2 : Guide général pour les essais de performance des milieux de culture*.

NF ISO 21527-1 (V 08-040-1), Novembre 2008 (2<sup>nd</sup> tirage), *Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures – Partie 1 : Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95*.

\*O valor de referência corresponde à vida de prateleira esperada quando preparados sob condições laboratoriais normais, seguindo as instruções do fabricante. É fornecido apenas como guia e sem garantia, expressa ou implícita associada com esta informação.

As informações fornecidas na embalagem procedem de formulações ou instruções descritas neste documento.

As informações e especificações contidas nesta ficha técnica datam de 12/01/2010.

Elas estão sujeitas a alterações a qualquer momento, sem aviso prévio.

Código do documento: BK198/A/2009-02: 3.