



## ÁGAR MRS

### ENUMERAÇÃO DE BACTÉRIAS LÁCTICAS

#### **USO**

O Ágar MRS é usado para a cultura e enumeração de bactérias produtoras de ácido láctico em produtos lácteos e outros alimentos, bem como em ração animal.

Este meio permite o cultivo de microrganismos de crescimento lento, como *Lactobacillus brevis* e *Lactobacillus fermentum*. Acidificado a pH 5,4, também permite o desenvolvimento de *Lactobacillus bulgaricus*.

Dependendo da bactéria pesquisada, o meio pode ser ajustado para o pH de crescimento ideal. A fórmula padrão corresponde à composição definida na norma NF ISO 15214.

#### **HISTÓRIA**

Em 1960, de Man, Rogosa e Sharpe desenvolveram a formulação de um meio especialmente adaptado às culturas de lactobacilos em laticínios, sem adição de suco de tomate (ingrediente muito variável).

#### **PRINCÍPIOS**

Os sais de peptona, glicose e manganês e magnésio fornecem os nutrientes essenciais para o crescimento de lactobacilos.

Tween 80, uma mistura de ésteres oleicos, é uma fonte de ácidos graxos necessários para o crescimento desses microrganismos.

Fosfato dipotássico ajuda a estabilizar o pH durante o crescimento bacteriano.

Citrato de amônio e acetato de sódio são os inibidores do desenvolvimento da maioria dos contaminantes, como estreptococos e bolores.

#### **COMPOSIÇÃO TÍPICA**

A composição pode ser ajustada para obter um desempenho ideal.

Para 1 litro de meio:

- Digestão enzimática de caseína .....	10,00 g
- Extrato de carne .....	10,00 g
- Extrato de levedura autolítica .....	4,00 g
- Glicose .....	20,00 g
- Tween 80 .....	1,08 g
- Fosfato dipotássico .....	2,00 g
- Acetato de sódio .....	5,00 g
- Citrato de amônio .....	2,00 g
- Sulfato de magnésio .....	0,20 g
- Sulfato de manganês .....	0,05 g
- Agar bacteriológico .....	16,00 g

pH do meio pronto para uso a 25°C: 5,7 ± 0,1.

#### **PREPARAÇÃO**

##### **Preparação do meio desidratado:**

- Suspender 70,3 g de meio desidratado (BK089) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.



- Lentamente, levar o meio à fervura com agitação constante até sua completa dissolução.
- Distribuir em tubos ou frascos.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar a 44-47°C.

- Reconstituição: 70,3 g/L
- Esterilização: 15 min a 121°C

**Utilização do meio pronto para liquefazer:**

- Derreter o meio (se preparado com antecedência) ou o meio pronto para liquefazer (BM089) pelo mínimo de tempo necessário para a liquefação total. Não repetir a operação mais de uma vez.
- Resfriar e manter a 44-47°C.

**NOTAS:**

Dependendo do padrão utilizado, o ágar pode ser ajustado ao pH recomendado antes do ciclo de esterilização:

- Com ácido acético a  $5,4 \pm 0,1$  para a análise de iogurtes
- Com ácido clorídrico em pH 6,2 para a enumeração de *Lactobacillus* ou *Pediococcus* nos produtos destinados à ração animal.
- Com hidróxido de sódio em pH  $6,5 \pm 0,2$  para a contagem de *Bifidobacterium* em produtos destinados a alimentação animal.

**INSTRUÇÃO DE USO**

**Enumeração de bactérias mesófilas de ácido láctico (NF ISO 15214):**

- Transferir 1 mL da suspensão e suas sucessivas diluições decimais em placas de Petri estéreis.
- Despejar cerca de 15 mL de meio, por placa.
- Homogeneizar perfeitamente e deixar solidificar em superfície fria.
- Incubar por  $72 \pm 3$  horas a  $30 \pm 1^\circ\text{C}$  em condições aeróbias.

- Semear:
1 mL em profundidade
- Incubar: Aeróbico, 72h a 30°C

**NOTAS:**

- Para os laticínios, a incubação deve ser realizada em condições anaeróbicas a 37°C por 72 horas, consulte Padrões ISO 27205, ISO 7889, ISO 20128.
- Para ração animal, inocular na superfície do meio a amostra e incubar em condições anaeróbicas a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$ , por 36 a 48 horas para a contagem de *Bifidobacterium* e 48 a 72 horas para *Lactobacillus* (NF EN 15785; NF EN 15786; NF EN 15787).

**RESULTADO**

Contar as colônias presentes nas placas com no máximo 300 colônias. Devido a possibilidade de desenvolvimento de microrganismos que não sejam bactérias do ácido láctico, pode ser necessário, em alguns casos, verificar ao microscópio que se trata de bacilos Gram-positivos, não esporulados.

Consulte o ANEXO 1: SUPORTE DE FOTOGRAFIA.

**CONTROLE DE QUALIDADE**

**Meio desidratado:** pó cremoso.



**Meio preparado:** ágar âmbar.

Resposta de cultivo após 72 horas de incubação a 30°C (NF EN ISO 11133):

Microrganismos		Crescimento: Razão de produtividade: $P_R$
<i>Lactobacillus sakei</i>	WDCM 00015	$P_R \geq 70 \%$
<i>Lactococcus lactis</i>	WDCM 00016	$P_R \geq 70 \%$
<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001	Inibido
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inibido

#### **ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA**

**Meio desidratado:** 2-20°C.

**Meio pronto para liquefazer em frascos:** 2-8°C.

As datas de validade são mencionadas nas etiquetas.

**Meio preparado em frascos (\*):** 180 dias a 2-8°C.

(\*) Valor indicativo determinado em condições padrão de preparação, seguindo as instruções do fabricante.

#### **APRESENTAÇÃO**

Meio desidratado:

Frascos de 500 g ..... BK089HA

Meio pronto para liquefazer (pH 5,7):

Embalagem com 10 frascos de 200 mL ..... BM08908

#### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130-135.

Journal Officiel du 4 janvier 1978. Méthode officielle d'analyse pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt ou yoghourt. (arrêté du 25 Novembre 1977).

ISO 27205. Février 2010. Produits laitiers. Ferments acidifiants. Norme de composition.

NF ISO 15214. Septembre 1998. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Technique par comptage des colonies à 30°C.

ISO 7889. Février 2003. Yaourt. Dénombrement des micro-organismes caractéristiques. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

ISO 20128. Mai 2006. Produits laitiers. Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

NF EN 15785. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Bifidobacterium* spp.

NF EN 15786. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Pediococcus* spp.

NF EN 15787. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Lactobacillus* spp.



**OUTRAS INFORMAÇÕES**

As declarações feitas nas etiquetas têm precedência sobre as fórmulas ou instruções descritas neste documento e estão sujeitos a alterações a qualquer momento sem aviso prévio.

Código do documento: GELOSE MRS\_FR\_V9.

Data de criação: 10-2003

Data de revisão: 11-2017

Motivo da revisão: Atualização do protocolo.

**ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRÁFICO**

**Ágar MRS**

Deteção e contagem de *Lactobacillus*.

**Lendo:**

Crescimento obtido após 72 horas de incubação a 30 °C.

***Lactobacillus casei* subsp. *Ramnosus***

Colônia característica:  
coloração branca de tamanho uniforme.

