

mikrobiologie labor technik

E.M.B. Levine Agar

PRINCIPIU

E.M.B. Levine Agar (Eosin Methylene Blue Agar) este folosit pentru izolarea și diferențierea enterobacteriilor (*Escherichia coli* și *Enterobacter aerogenes*), lactozo-fermentative de cele care nu fermentează lactoza. Colorațiile din preparat, Eozina Y (gălbuie) și albastru de metilen inhibă creșterea germeilor Gram pozitivi cu excepția *Streptococcus faecalis*. Tamponul fosfat ajută la diferențierea *Escherichia coli* de *Enterobacter aerogenes* minimalizând producerea de acizi prin fermentarea lentă a lactozei de către *Enterobacter*. Se întrebuințează *in vitro*. Se păstrează între 2-25°C.

FORMULA TIPICĂ

Componente	g/l
Extract pancreatic de gelatină	10.0
Lactoză	10.0
Fosfat de dipotasiu	2.0
Albastru de metilen	0.065
Eozină Y	0.4
Agar	15.00
pH final: 7.1 + 0.2 la 25°C	

METODA

Se suspendă 37.5 g de pudră în 1 litru de apă distilată sau deionizată. Se încălzește până la fierbere și se amestecă continuu pentru dizolvarea completă. Se sterilizează prin autoclavare timp de 15 minute la 121°C. Se toarnă în tuburi și plăci.

TEHNICĂ

Se lichefiază mediul într-o baie de apă fierbinte, apoi se răcește la 45-50°C.

Se omogenizează bine tuburile pentru a oxida albastrul de metilen și se dizolvă complet precipitatul. Acest pas este esențial pentru performanțele acestui mediu. Se toarnă în plăci Petri sterile.

După inoculare, se incubează mediul la 37°C timp de 18-24 de ore.

INTERPRETAREA REZULTATELOR

Se descriu tipurile de colonii:

• **Speciile lactozo-pozitive cresc sub forma unor colonii purpurii închis:**

- ***Escherichia coli***: crește sub forma unor colonii violet închis cu un diametru 2-3 mm. Sunt plate, sau ușor concave cu un luciu metalic și au tendința de confluență. De asemenea, au un centru opac care reprezintă $\frac{3}{4}$ din colonii atunci când sunt observate la lumină.

- ***Enterobacter aerogenes***: crește sub forma unor colonii roz, cu diametru de la 4 la 6 mm cu tendință de confluență. Zona centrală, de maro închis este mai opacă decât cea a coloniilor de *Escherichia coli* și este de obicei plană; o ușoară strălucire metalică poate fi văzută în lumina reflectată.

- ***Citrobacter***: colonii violet pal, cu un centru și o strălucire metalică mai puțin evidente și cu un diametru mic.

• **Speciile lactozo-negative cresc sub formă de colonii gri:**

- ***Proteus***: crește sub forma unor colonii mici gri (2 mm). *P. mirabilis* și *vulgaris* sunt înconjurate de o peliculă.

- **Salmonella & Shigella:** cresc sub forma unor colonii mici, transparente și gri. Cu diametrul 1-2 mm.
- **Pseudomonas:** crește sub forma unor colonii neregulate, plate cu o tentă albastră. Cu diametrul 2-4 mm.
- **Streptococcus faecalis:** crește sub forma unor colonii foarte mici, opace și gri. Cu diametrul 0.5 mm.
- **Staphylococcus coagulase positive:** crește sub forma unor colonii incolore punctiforme.

IDENTIFICAREA RAPIDĂ A CANDIDEI ALBICANS

Prin adăugarea de 100 mg/L de HCl clorotetraciclină mediul devine mai selectiv și permite identificarea *Candida albicans*. După incubare la 37°C timp de 24 până la 48 ore în condiții de atmosferă îmbogățită cu 10% CO₂, *C. albicans* va crește sub forma unor colonii cu aspect de pânză de păianjen sau de pană. Alte specii de *Candida* vor crește sub forma unor colonii de drojdii cu aspect tipic: rotunde, netede și opace.

LIMITE ȘI PRECAUȚII

Reducerea albastrului de metilen poate modifica mediul dându-i o tentă de culoare diferită ce nu interferează cu selectivitatea sa caracteristică. Odată turnat în plăci Petri mediul revine la culoarea sa întunecată atunci când este răcit. Mediul este foarte sensibil la lumină. Se păstrează în

plăci la întuneric la 2-8°C sau se folosește în ziua preparării. În cazul în care este utilizat în aceeași zi în care a fost preparat nu este obligatorie autoclavarea sa, se preferă să se fiarbă mediul pentru câteva minute înainte de turnarea în plăci Petri. Ocazional, câțiva germeni, cum ar fi *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* și *Yersinia* pot crește pe mediu.

BIBLIOGRAFIE

1. Levine M. 1918. Differentiation of *E. coli* and *A. aerogenes* on a simplified Eosin-Methylene Blue agar. J. Infect. Dis.23:43-47
2. AFNOR V08-017. Juin 1980. Microbiologie alimentaire - Directives générales pour le dénombrement des Coliformes fécaux et d'*Escherichia coli*.

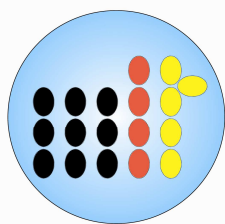
AMBALARE

Mediul deshidratat

(A se păstra între 1-30°C)
140130A: Flacon de 500 g
140130L: Flacon de 500 g

Mediul gata preparat

(A se păstra la întuneric între 2-25°C)
110130: Cutie cu 20 de plăci de 90 mm Ø
130130: Cutie cu 3 sticle de 200 ml



mikrobiologie labor technik

E.M.B. Levine Agar

PRINCIPLE

E.M.B. (Eosin Methylene Blue)

Agar is used to isolate and differentiate Lactose fermenting from not fermenting *Enterobacteria*, such as *Escherichia coli* and *Enterobacter aerogenes*. The stains in the preparation, Eosin Y (Yellowish) and methylene blue, inhibit the growth of Gram + germs except *Streptococcus faecalis*. The phosphate buffer helps to differentiate *Escherichia coli* from *Enterobacter aerogenes* by minimizing the acids produced by the slow fermentation of the lactose by the *Enterobacter*.

FORMULA

Components	g/l
Pancreatic digest of gelatin	10.00
Lactose	10.00
Dipotassium phosphate	2.00
Methylene blue	0.065
Eosine Y	0.40
Agar	15.00
Final pH 7.1 ± 0.2 at 25°C	

PREPARATION

Suspend 37.5 g of powder in one litre of purified water. Bring slowly to the bowl until completely dissolved under constant homogenisation. Dispatch in flasks or tubes. Autoclave 15 minutes at 121°C.

METHOD

Liquefy the medium in a boiling water bath then cool to 45-50°C. Homogenize well the flasks as to oxidize methylene blue and completely dissolve the

precipitate. This step is essential for the performances of the medium. Pour in sterile Petri plates. After inoculation, incubate the medium at 37°C for 18 to 24 hours.

RESULTS

Describe the typicality of the colonies.

• Lactose + species grow as dark purple colonies:

Escherichia coli: grow as dark purple colonies with a diameter from 2 to 3 mm. These colonies are flat, or slightly concave with a metallic shine and have a tendency to confluence. They also have an opaque centre representing $\frac{3}{4}$ of the colony when observing them against the light.

Enterobacter aerogenes : grow as pink colonies with a diameter from 4 to 6 mm that have a tendency to confluence. The central zone, of a dark brown is less opaque than the one of *Escherichia coli* colonies and is usually depressed; a slight metallic shine can be seen under reflected light.

Citrobacter : pale violet colonies, with a centre and metallic shine not clearly marked and usually of a small diameter.

• Lactose – species grow as greyish colonies:

Proteus: grow as small greyish colonies (2 mm). ***P. mirabilis* & *vulgaris*** surround themselves with a film.

Salmonella* & *Shigella: grow as small, transparent, grayish colonies. Diameter : 1 to 2 mm.

Pseudomonas: grow as flat irregular colonies that can have a blueish tint. Diameter 2 to 4 mm.

Streptococcus faecalis : very small opaque grey colonies. Diameter 0.5 mm

Staphylococcus coagulase positive : Pin point colourless colonies.

CANDIDA ALBICANS FAST IDENTIFICATION

By adding 100 mg/L of chlorotetracycline HCl the medium becomes more selective and enables the identification of *Candida albicans*. After incubation at 37°C for 24 to 48 hours under an atmosphere enriched with 10% CO₂, *C. albicans* will grow as colonies in the shape of a spider's web or a feather. The other *Candida* grows as typical yeast colonies: round, smooth and opaque.

LIMITS & PRECAUTIONS

The reduction of the methylene blue can alter the medium thus giving to the medium different tint of coloration do not interfere in its selectivity characteristics. Once poured in Petri plates the medium takes back on its dark colour when cooled. The medium is very sensitive to the light. Store the prepared plates in the dark at 2 to 8°C or use the medium the same day of its preparation. When the medium is used the same day of its preparation the use of

autoclave is not imperative, prefer to boil the medium for a few minutes before dispensing in Petri plates. Occasionally a few germs such as *Acinetobacter*, *Aeromonas*, *Plesiomonas* and *Yersinia* can grow on the medium.

BIBLIOGRAPHY.

1. Levine M. 1918. Differentiation of *E. coli* and *A. aerogenes* on a simplified Eosin-Methylene Blue agar. J. Infect. Dis. 23:43-47
2. AFNOR V08-017. Juin 1980. Microbiologie alimentaire - Directives générales pour le dénombrement des Coliformes fécaux et d'*Escherichia coli*.

PACKAGING

Dehydrated medium

To be stored between 1 and 30°C

140130A: Flask of 500 g

140130L: Flask of 500 g

Ready to use medium

To be stored in the dark between 2 and 25°C

130130: Pack of 3 flasks of 200 ml

110130: Pack of 20 plates 90 mm Ø