

APT AGAR APT BROTH

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la coltivazione e l'enumerazione dei lattobacilli eterofermentanti.

2- COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA*

APT Agar		APT Broth	
Triptone	12,50 g	Triptone	12,50 g
Estratto di lievito	7,50 g	Estratto di lievito	7,50 g
Glucosio	10,00 g	Glucosio	10,00 g
Sodio citrato	5,00 g	Sodio citrato	5,00 g
Sodio cloruro	5,00 g	Sodio cloruro	5,00 g
Potassio fosfato bibasico	5,00 g	Potassio fosfato bibasico	5,00 g
Manganese cloruro	0,14 g	Manganese cloruro	0,14 g
Magnesio solfato	0,80 g	Magnesio solfato	0,80 g
Ferro solfato	0,04 g	Ferro solfato	0,04 g
Sorbitan monoleato	0,20 g	Sorbitan monoleato	0,20 g
Agar	15,00 g	Tiamina HCl	0,10 mg
Tiamina HCl	0,10 mg		

* Il terreno può essere compensato e/o corretto per adeguare le sue prestazioni alle specifiche.

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

APT (All Purpose Tween) Agar è stato ideato da Evans e Niven¹ e sviluppato da Shipp² per l'enumerazione non selettiva di lattobacilli eterofermentanti in grado di produrre H₂O₂ durante la crescita in condizioni aerobiche. Tale reazione sulle carni cotte provoca una colorazione verde.³ APT Agar con l'aggiunta di 20 g/L di saccarosio e porpora di bromocresolo e con l'aggiunta di 5 g/L di glucosio è efficace per il conteggio dei produttori di acido lattico alterato rispettivamente nei prodotti a base di carne e nei frutti di mare.⁴

APT Agar può essere utilizzato anche per la coltura dei pediococchi.⁴

APT Agar e APT Broth possono essere utilizzati per il mantenimento di colture madre e per la coltura di *Weissella* (*Lactobacillus*) *viridescens* ATCC™ 12706 utilizzato nel dosaggio della tiamina.⁵

Il triptone fornisce azoto, carbonio, minerali e aminoacidi per la crescita microbica, l'estratto di lievito è una fonte del complesso delle vitamine del gruppo B per la stimolazione della crescita, il glucosio è una fonte di carbonio ed energia, il cloruro di sodio è una fonte di elettroliti e mantiene l'equilibrio osmotico. La presenza di manganese e citrato mostra un effetto sinergico che aumenta l'intensità della crescita dei lattobacilli, la cui fase di latenza è accorciata dal Tween 80.⁵

4- PREPARAZIONE

APT Agar

Sospendere 61,2 g in 1000 mL di acqua purificata fredda; portare ad ebollizione agitando frequentemente e bollire per 1 minuto per sciogliere completamente il terreno. Sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Non superare il tempo e la temperatura di sterilizzazione.

APT Broth

Sospendere 46,2 g in 1000 ml di acqua purificata fredda; riscaldare leggermente per sciogliere il terreno agitando frequentemente. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Non superare il tempo e la temperatura di sterilizzazione.

Preparazione delle piastre a doppio strato³

Strato inferiore: APT Agar (15 mL)

Strato superiore: APT Agar + MnO₂ (10 mL) preparato come segue.

A ciascuna aliquota da 100 mL di APT Agar sterilizzato in autoclave e raffreddato a 45-47°C aggiungere 10 mL di una sospensione di 20 g di MnO₂ in 200 mL di APT Broth, dosata in aliquote da 10 mL e sterilizzata in autoclave a 121°C per 15 minuti.

5 – CARATTERISTICHE DEL TERRENO

APT Agar e APT Broth

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto della soluzione e delle provette	limpido, marrone
pH (20-25°C)	6,7 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
APT Agar	Terreno di coltura in polvere	4010852	500 g (8,1 L)
APT Broth	Terreno di coltura in polvere	4010902	500 g (10,8 L)

7 – MATERIALI NECESSARI E NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse sterili, aghi sterili, tamponi e pipette, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, terreni di coltura e reagenti ausiliari.





8 - CAMPIONI

Campioni alimentari, salumi, conserve, succhi di frutta. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Preparare le diluizioni del campione in peptone water allo 0,1% e inoculare con metodo di semina in superficie o per inclusione, con tecnica a singolo o doppio strato.

1. Utilizzando una pipetta sterile, dispensare 1 mL del campione liquido da testare, o 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti, in una capsula Petri vuota e miscelare con il terreno fuso preraffreddato a 44-46°C. Preparare le altre piastre nello stesso modo, utilizzando diluizioni decimali del campione in esame.
2. In alternativa, seminare le diluizioni del campione sulla superficie del terreno per ottenere colonie separate.
3. Incubare le piastre in condizioni aerobiche a una temperatura compresa tra 25 °C e 32 °C per un periodo compreso tra 72 ore e cinque giorni.

Il metodo di coltura, la temperatura e il tempo di incubazione devono essere scelti in base al tipo di campione da esaminare e agli obiettivi della ricerca. Consultare i riferimenti appropriati per le procedure raccomandate per il test e per l'interpretazione.⁴

10 – LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

L'H₂O₂ forma composti solubili con il MnO₂ in sospensione. Le colonie circondate da una zona chiara sono considerate batteri lattici potenzialmente produttori di H₂O₂.

Poiché questi terreni non sono selettivi e consentono la crescita di contaminanti, la diagnosi presuntiva della presenza di lattobacilli deve essere confermata da esami microscopici e biochimici.

È possibile eseguire un test di inquinamento artificiale per confermare la diagnosi di rinverdimento batterico delle carni in scatola. Trasferire alcune colonie dalle piastre di APT Agar in provette di APT Broth e incubare a 32°C per 24 ore. Preparare una piastra Petri con carta da filtro imbevuta di acqua sterile e adagiare una fetta del materiale in esame in condizioni asettiche. Inoculare la superficie con un'ansata della coltura in APT Broth; incubare a 32°C per 24 ore e osservare se la carne è diventata verde. Se questo accade e un campione di controllo non inoculato risulta invariato, la diagnosi è confermata. La presenza di inverdimento dovuto a un eccesso di nitriti deve essere distinta dall'inverdimento batterico eseguendo il test di identificazione e dosaggio dei nitriti con i reagenti standard.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Ciascun lotto del prodotto qui descritto è rilasciato alla vendita dopo l'esecuzione del controllo qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. È comunque facoltà dell'utilizzatore eseguire un proprio controllo di qualità con modalità in accordo alle normative vigenti in materia ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Nella tabella che segue sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità.

CEPO DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T° / t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. brevis</i> ATCC 14869	30°C / 5 giorni / A	buona crescita
<i>L. sakei</i> ATCC 215521	30°C / 5 giorni / A	buona crescita

A: incubazione in aerobiosi; ATCC è un marchio registrate di American Type Culture Collection

12 – VALUTAZIONE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo di tutti i lotti di APT agar con l'aggiunta di MnO₂ e APT Broth con l'aggiunta di 15 g/L di agar e con MnO₂, vengono testati per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività è testata con metodo quantitativo con la tecnica a doppio strato e con i seguenti ceppi: *L. brevis* ATCC 14869, *L. sakei* ATCC 15521, *L. plantarum* ATCC 8014. Le piastre vengono inoculate con diluizioni decimali in soluzione fisiologica di una sospensione di colonie e incubate a 30°C per 5 giorni. Le colonie vengono contate su entrambi i terreni e viene calcolato il rapporto di produttività. Se Pr è ≥ 0,7, i risultati sono considerati accettabili e conformi alle specifiche.

13 – LIMITI DEL METODO

- APT Agar e APT Broth sono terreni non selettivi su cui coliformi e molti altri commensali crescono bene.⁵
- Evitare il riscaldamento eccessivo poiché la tiamina è un fattore termolabile.⁵
- Studi di MacLeod e Snell hanno mostrato che Mn⁺⁺ inibisce la crescita di *L. arabinosus* e *L. pentosus*.⁷

13 – PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno qui descritto è per controlli microbiologici, è per uso professionale e deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni.
- I terreni in polvere devono essere manipolati con adeguate protezioni. Prima dell'uso consultare la scheda di sicurezza.
- Il terreno di coltura qui descritto contiene materiali di origine animale. I controlli *ante* e *post mortem* degli animali e quelli durante il ciclo di produzione e distribuzione delle materie prime non possono garantire in maniera assoluta che questo prodotto non contenga nessun agente patogeno trasmissibile; per queste ragioni si consiglia di manipolare il prodotto con le precauzioni di sicurezza specifiche per i materiali potenzialmente infettivi (non ingerire, non inalare, evitare il contatto con la pelle, gli occhi, le mucose). Scaricare dal sito web www.biolifeitaliana.it il documento TSE Statement, con le misure messe in atto da Biolife Italiana S.r.l. per il contenimento del rischio legato alle patologie animali trasmissibili.
- Applicare le norme di buona fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- L'ambiente di laboratorio deve essere controllato in modo da evitare contaminanti come terreno di coltura o agenti microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire il terreno non utilizzato ed il terreno inoculato con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzato, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare il prodotto qui descritto come principio attivo per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e la Scheda di Sicurezza del prodotto sono disponibili sul sito www.biolifeitaliana.it.
- Le informazioni contenute in questo documento sono state definite al meglio delle nostre conoscenze e capacità e rappresentano una linea guida al corretto impiego del prodotto, ma senza impegno o responsabilità. L'utilizzatore finale deve in ogni caso, rispettare le leggi, i regolamenti e le procedure standard locali per l'esame dei campioni raccolti dai diversi distretti organici umani ed animali, dei





campioni ambientali e dei prodotti destinati al consumo umano o animale. Le nostre informazioni non esonerano l'utilizzatore finale dalla sua responsabilità di controllare l'idoneità dei nostri prodotti allo scopo previsto.

14 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce e dell'umidità. In queste condizioni il prodotto rimane valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non utilizzare oltre questa data. Evitare di aprire il flacone in ambienti umidi. Una volta aperto, conservare il prodotto mantenendo il tappo del contenitore ben chiuso. Eliminare il prodotto nel caso il contenitore e/o il tappo fossero danneggiati, nel caso i contenitori non fossero ben chiusi o in caso di evidente deterioramento della polvere (modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).










L'utilizzatore è responsabile del processo di produzione e di controllo dei terreni preparati in laboratorio e della definizione del loro periodo di validità, in funzione della tipologia e del metodo di conservazione (temperatura e confezionamento).

In accordo con Baird RM e al. Le piastre pronte possono essere conservate fino a 7 giorni a $4 \pm 2^{\circ}\text{C}$.³

15 – BIBLIOGRAFIA

1. Evans JB, Niven C. Nutrition of the heterofermentative Lactobacilli that cause greening of cured meat products. J Bacteriol 1951 Nov;62(5):599-603
2. Shipp HL. The green discoloration of cooked cured meats of bacterial origin. Technical circular n° 266, British Food Manufacturing Industries Research Association, Leatherhead, U.K.
3. Baird RM, Corry JEL, Curtis GDW. Pharmacopoeia of Culture Media for Food Microbiology. Proceedings of the 4th International Symposium on Quality Assurance and Quality Control of Microbiological Culture Media, Manchester 4-5 September, 1986. Int J Food Microbiol 1987; 195-196.
4. APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015
5. Deibel RH, Evans JB, Niven CF. Microbiological assay for the thiamine using lactobacillus viridescens. J Bacteriol 1951; 62:818-821
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985.
7. Sharf JM. Recommended Methods for the Microbiological Examination of Foods. 2nd ed. APHA, Washington, D.C. 1966
8. MacLeod RA, Snell EE. Some mineral requirements of lactic acid bacteria. J Biol Chem 1947; 170:351

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Utilizzare entro	 Fabbricante	
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente <n> per test	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Proteggere dalla luce	 Proteggere dall'umidità

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto, aggiunta di ATP Broth	01/2023

Nota: lievi modifiche tipografiche, grammaticali e di formattazione non sono incluse nella cronologia delle revisioni

