



## HHD BROTH

### Terreno di coltura in polvere

#### 1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la rilevazione e la differenziazione dei batteri lattici eterofermentanti e omofermentanti.

#### 2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA \*

##### FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglimento IN ACQUA \*

Fruttosio	2,500 g
Potassio fosfato monobasico	2,500 g
Idrolisato triptico di caseina	10,000 g
Peptone di soia	1,500 g
Idrolisato acido di caseina	3,000 g
Estratto di lievito	1,000 g
Verde di bromocresolo	0,066 g

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

#### 3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

I batteri acido lattici sono ampiamente presenti in natura e sono coinvolti non solo nella produzione, ma anche nel deterioramento dei prodotti alimentari acidi. I batteri acido lattici (LAB), pur essendo costituiti da un certo numero di generi diversi, sono raggruppati come omofermentanti o eterofermentanti sulla base delle loro proprietà metaboliche: i batteri eterofermentanti, che a partire dagli zuccheri esosi producono CO<sub>2</sub>, acido lattico, acido acetico, etanolo e mannitolo e LAB omofermentanti, che producono principalmente acido lattico.

HHD Broth, preparato secondo la formula di McDonald et al.<sup>1</sup>, permette di differenziare i due gruppi di batteri sulla base di una diversa acidificazione del substrato che contiene una bassa quantità di fruttosio (14mM). L'aggiunta di agar al brodo HHD consente la differenziazione in base al colore della colonia in un terreno solido. HHD Agar è raccomandato da APHA<sup>2</sup> per il conteggio dei microrganismi produttori di acido nelle verdure fermentate e acidificate.

Il verde di bromocresolo viene utilizzato come indicatore di pH che differenzia il grado di acidificazione indotto da entrambi i gruppi di batteri. L'indicatore è giallo a valori di pH inferiori a 8,8 e blu a valori superiori a 5,6. I batteri omofermentanti producono 2 moli di acido lattico dal fruttosio e crescono su HHD Broth con un cambiamento di colore dell'indicatore in cellule sedimentate verdi e blu-verdi sul fondo della provetta. I batteri eterofermentanti inducono una minore acidificazione del substrato e crescono su HHD Broth senza modificare significativamente il colore del terreno, che rimane blu con sedimento bianco. Se si aggiunge agar a HHD Broth, i batteri omofermentanti crescono con colonie blu-verdi, quelli eterofermentanti con colonie incolori. McDonald et al.<sup>1</sup> raccomandano di registrare il colore del sedimento cellulare e delle colonie per la differenziazione dei due gruppi batterici piuttosto che il cambiamento di colore del terreno.

#### 4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Sospendere 20,6 g in 1000 mL di acqua purificata fredda e aggiungere 1 g di Tween 80 (REF: 42120502). Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente se necessario per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Per la preparazione di HHD Agar, aggiungere 13 g/L di Agar Bios LL (REF 411030) e aggiungere 1 g di Tween 80 (REF 42120502) a HHD Broth prima della sterilizzazione.

#### 5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, verde
Aspetto della soluzione	blu, limpida
pH finale (20-25 °C)	7,0 ± 0,1

#### 6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
HHD Broth	Dehydrated medium	4015292	500 g (24,2 L)

#### 7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, beute, provette, piastre di Petri, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

#### 8 – CAMPIONI

Campioni alimentari. Durante la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e ai regolamenti internazionali applicabili.<sup>2</sup>

#### 9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

##### HHD Broth

1. Inoculare le provette con la sospensione del campione e/o le sue diluizioni decimali o con colture pure.
2. Incubare a 30°C per 3 giorni.

##### HHD Agar<sup>2</sup>

1. Inoculare i campioni nelle piastre con HHD Agar fuso e dopo la solidificazione ricoprire con ulteriore HHD Agar.
2. Incubare le piastre a 30 °C per 72 ± 3 ore.

#### 10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

HHD Broth: i batteri omofermentanti crescono con un sedimento cellulare verde/blu-verde sul fondo della provetta mentre i batteri eterofermentanti crescono senza modificare significativamente il colore del terreno, che rimane blu con un sedimento bianco.

HHD Agar: i microrganismi omofermentanti crescono con colonie dal blu al verde, mentre le colonie eterofermentanti rimangono bianche.



### 11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti del prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione dei test del Controllo Qualità che ne verifica la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utilizzatore eseguire il proprio Controllo di Qualità in conformità alle normative locali applicabili, nel rispetto dei requisiti di accreditamento e dell'esperienza del Laboratorio. Di seguito sono riportati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità del terreno di coltura.

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE T°/ T - ATM	RISULTATI ATTESI
<i>L. mesenteroides</i> ATCC 14935	30°/ 72 H	crescita, il terreno resta blu, sedimento bianco
<i>L. plantarum</i> ATCC 14917	30°/ 72 H	crescita, il terreno vira al verde, sedimento verde

A: incubazione aerobica; ATCC è un marchio di American Type Culture Collection.

### 12 – VALUTAZIONI DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di brodo HHD disidratato viene testato per la produttività e le proprietà differenziali confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata mediante il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di appropriate diluizioni decimali di organismi in provette e incubando a 30°C per 72 ore e registrando la diluizione più alta che mostra la crescita e il colore delle cellule sedimentate nel lotto di riferimento ( $G_{r_{RB}}$ ) e nel lotto di riferimento ( $G_{r_{TB}}$ ). La produttività è testata con i seguenti ceppi omofermentanti: *L. acidophilus* ATCC 314, *L. plantarum* ATCC 14917, *B. bifidum* ATCC 11863, e con i seguenti ceppi eterofermentanti: *L. dulbrueckii* var *bulgaricus* DSM 20081, *L. mesenteroides* ATCC 14935. La produttività l'indice  $G_{r_{RB}}-G_{r_{TB}}$  per ciascun ceppo di prova deve essere  $\leq 1$  e il colore delle cellule sedimentate deve essere conforme alle specifiche.

### 13 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico ed è per uso professionale; deve essere usato in laboratorio da operatori adeguatamente addestrati, con metodi approvati di asepsi e di sicurezza nei confronti degli agenti patogeni
- I terreni disidratati devono essere maneggiati con adeguate protezioni. Prima dell'uso, consultare le schede 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](http://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 Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di preparazione dei terreni di coltura preparati.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura, i supplementi ed i ceppi microbici.
- Sterilizzare tutti i rifiuti a rischio biologico prima della loro eliminazione. Smaltire i terreni ed i supplementi non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- Non utilizzare i prodotti qui descritti come principi attivi per preparazioni farmaceutiche o come materiale per produzioni destinate al consumo umano ed animale.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza sono disponibili sul sito [www.biolifeitaliana.it](http://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 dei prodotti, 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

Dopo il ricevimento, conservare a +10°C /+30°C al riparo della luce in luogo asciutto. In queste condizioni il prodotto è valido sino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. 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 (es. modifiche del colore, indurimento, presenza di grossi grumi).

L'utilizzatore è responsabile del processo di preparazione e di controllo dei terreni in laboratorio e della validazione della loro shelf life, in funzione della tipologia e condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

### 15 - BIBLIOGRAFIA

- Mc Donald LC, Mc Feeters RF, Daeschel MA, Fleming HP. Differential medium for the enumeration of homofermentative and heterofermentative lactic acid bacteria. *App Environ Microbiol* 1987; 53:1382-1384.
- APHA Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. American Public Health Association, Washington D.C. 5th Ed, 2015.

### TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

### CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	02/2023

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