

SPORULATION AGAR AK SPORULATION BROTH

Terreno di coltura in polvere

1 – DESTINAZIONE D'USO

Per la preparazione di sospensioni di spore da usare nella determinazione dei residui antibiotici nel latte e nei prodotti lattiero caseari.

2 – COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA PER LITRO DOPO SCIoglIMENTO IN ACQUA *

SPORULATION AGAR AK

Peptone di gelatina	6,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Tryptone	4,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Manganese solfato	0,3 g
Agar	15,0 g

SPORULATION BROTH

Peptone di gelatina	6,0 g
Estratto di lievito	3,0 g
Tryptone	4,0 g
Estratto di carne	1,5 g
Glucosio	1,0 g
Manganese solfato	0,3 g

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

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

La sporulazione, unica di due specie batteriche, *Clostridium* e *Bacillus*, è un processo indotto da livelli ridotti di nutrienti nell'ambiente o nella coltura.¹ Per produrre spore da un gruppo specifico di batteri sporigeni è necessario uno specifico terreno di sporulazione.

Sporulation Agar AK, noto anche come AK 2 Agar o USP Antibiotic Medium 32, è una modifica dell'Antibiotic Assay Medium No.1, descritto da Arret e Kirshbaum² per la produzione di spore di *Bacillus subtilis* per il test rapido per la rilevazione della penicillina nel latte. Il terreno è risultato utile anche per la produzione di spore in *Bacillus megaterium* ATCC 9885.^{3,4}

Il peptone di gelatina, l'estratto di carne e il triptone forniscono azoto, amminoacidi e oligoelementi per la crescita microbica. L'estratto di lievito è una fonte di vitamine, in particolare del gruppo B. Il glucosio è un carboidrato fermentabile e una fonte di energia. Gli ioni manganese sono necessari per l'attività dell'enzima fosfoglicerato fosfomutasi coinvolto nel processo di sporificazione.⁵

Sporulation Broth è preparato con la stessa formulazione di Sporulation Agar AK con l'omissione dell'agar. Può essere utilizzato per la sporificazione in un terreno di coltura liquido o aggiunto all'agar per la crescita sulla superficie del terreno.

4A – SPORULATION AGAR AK: INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO

Sospendere 30,8 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione con agitazione frequente, distribuire ed autoclavare a 121°C per 15 minuti.

4B – SPORULATION BROTH: INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO

Sospendere 15,8 g in 1000 ml di acqua purificata fredda. Mescolare accuratamente e riscaldare leggermente se necessario per sciogliere completamente la polvere. Distribuire e sterilizzare in autoclave a 121°C per 15 minuti. Se necessario, aggiungere 15 g/L di agar (REF 411030) prima della sterilizzazione in autoclave.

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere	Fine granulometria omogenea, beige
Aspetto del terreno in soluzione e in piastra	giallo pallido, limpido
pH finale (20-25 °C)	6,6 ± 0,2

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Sporulation Agar AK	Terreno di coltura in polvere	4020702	500 g (16,2 L)
Sporulation Broth	Terreno di coltura in polvere	4020712	500 g (31,6 L)

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse sterili, incubatore e attrezzatura da laboratorio secondo necessità, fiasco Roux, terreni di coltura e reagenti ausiliari.

8 – CAMPIONI

Culture pure di batteri sporigeni.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI, LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Preparazione delle spore di *B. subtilis* con Sporulation Agar AK⁶

1. Trasferire mensilmente la coltura di *B. subtilis* ATCC 6633 su slant fresco di Antibiotic Seed Agar A1 (REF 401075)
2. Lavare la crescita con soluzione fisiologica sterile dallo slant sulla parete di un fiasco Roux contenente 300 mL di Sporulation Agar AK solidificato.
3. Incubare il fiasco in aerobiosi a 35°C per 5 giorni con i tappi allentati.





4. Lavare asetticamente la crescita risultante in 50 mL di soluzione salina fisiologica sterile con l'ausilio di perle di cristallo sterili, se necessario.
5. Centrifugare, decantare asetticamente ed eliminare il supernatante.
6. Risospendere il sedimento in pochi millilitri di soluzione fisiologica sterile e scaldare a 70°C per 30 minuti.
7. La sospensione di spore può essere conservata per diversi mesi.⁶

Preparazione delle spore di *B. subtilis* con Sporulation Broth⁷

1. Per la sporulazione nel terreno liquido, 25 mL di una coltura batterica vengono aggiunti in un flacone da 2 L contenente 250 mL di Sporulation Broth fresco e incubati a 37 °C con vigorosa agitazione a 200 giri/min per almeno 3 giorni, fino a che la frazione di spore/cellule vegetative ha raggiunto un livello massimo.
 2. Centrifugare, risospendere il sedimento e riscaldare la coltura come descritto sopra.
- Consultare i riferimenti per le procedure di analisi che utilizzano sospensioni di spore di *B. subtilis*² o *B. megaterium*⁴.

10 – LETTURA E INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

La crescita sulla superficie dell'agar è compatta e l'entità della sporulazione deve essere valutata mediante osservazione microscopica. La crescita nel terreno liquido è indicata da un diverso grado di torbidità, granelli e flocculazione nel terreno. L'entità della sporulazione deve essere valutata mediante osservazione microscopica.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto sono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, l'utilizzatore finale può 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 elencati alcuni ceppi di prova utili per il controllo di qualità.

CEPPI DI CONTROLLO*B. subtilis* ATCC 6633**INCUBAZIONE T° / T / ATM**

35° / 5 days/A

RISULTATI ATTESI

buona crescita, presenza di spore

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

12 – CARATTERISTICHE DELLE PRESTAZIONI

Prima del rilascio alla vendita, un campione rappresentativo per ogni lotto di Sporulation Agar AK e Sporulation Broth disidratato addizionato con 15 g/L di agar viene testato per la produttività confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene valutata mediante Roux bottle sporulation test con *B. subtilis* ATCC 6633. Dopo incubazione a 37°C per 5 giorni, l'entità della sporulazione viene valutata mediante osservazione microscopica e confrontata con la sporulazione ottenuta nel terreno di riferimento. Al microscopio si osserva un numero comparabile di spore nel lotto di prova e nel lotto di riferimento.

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 buone pratiche di fabbricazione nel processo di produzione dei terreni.
- Trattare i campioni come potenzialmente infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'area di laboratorio con il terreno di coltura ed i ceppi 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

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'utente è responsabile dei processi di produzione e di controllo della qualità dei terreni di coltura preparati autonomamente e della validazione della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre, provette, flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e confezionamento).

15 - BIBLIOGRAFIA

1. Driks A. Overview: development in bacteria: spore formation in *Bacillus subtilis*. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59: 389-391.
2. Arret B, Kirshbaum A. A rapid disc assay method for detecting penicillin in milk. *J Milk Food Tec.* 1959; 22:329.
3. Verma N, Singh NA, Kumar N, Raghu HV. Screening of different media for sporulation of *Bacillus megaterium*. *Int J Microbiol Res and Rev* 2013;1: 68-73.
4. APHA Standard Methods for the Examination of Dairy Products. American Public Health Association. Washington, D.C. 15th ed. 1985
5. Vasantha N, Freese E. The role of manganese in growth and sporulation of *Bacillus subtilis*. *J Gen Microbiol* 1979; 112:329-36.
6. MacFaddin JF. Media for Isolation-Cultivation-Identification-Maintenance of Medical Bacteria. Baltimore: Williams & Wilkins; 1985
7. Li L, Jin J, Hu H, Deveau IF, Foley SL, Chen H. Optimization of sporulation and purification methods for sporicidal efficacy assessment on *Bacillus* spores. *J Ind Microbiol and Biotechnol* 2022; 49:1-10.





TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

REF o REF Numero di catalogo	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 4	Aggiornamento del contenuto e del Layout	04/2023

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

