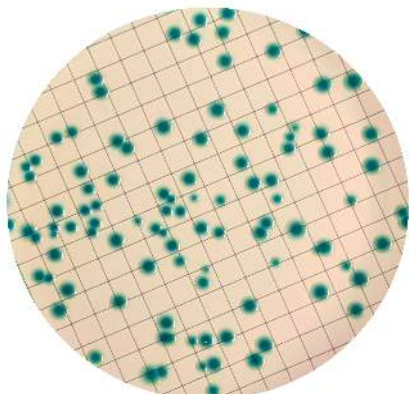




MEMBRANE LACTOSE GLUCURONIDE AGAR (MLGA)

Terreno disidratato e pronto all'uso in piastra



MLG Agar: colonie di *E.coli* ATCC 25922 su membrana filtrante

1 - DESTINAZIONE D'USO

Per la differenziazione e l'enumerazione di *Escherichia coli* ed altri coliformi con la tecnica delle membrane filtranti.

2 - COMPOSIZIONE

FORMULA TIPICA (PER LITRO, DOPO SCIoglimento IN ACQUA)*

TERRENO IN POLVERE E PRONTO ALL'USO

Peptone	40,00 g
Estratto di lievito	6,00 g
Lattosio	30,00 g
Rosso fenolo	0,20 g
Sodio lauril solfato	1,00 g
Sodio piruvato	0,50 g
Agar	10,00 g
X-Glucuronide (BCIG)	0,20 g

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

3 - DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Il conteggio di *Escherichia coli* e dei coliformi è un parametro sensibile per valutare la contaminazione fecale dei campioni e giudicare la qualità dell'acqua prima e dopo i trattamenti di sanificazione.¹

Il rapporto ISTISAN 14/18² e "The Environment Agency"¹ raccomandano l'uso del Membrane Lactose Glucuronide Agar (MLGA) con la tecnica della singola filtrazione su membrana.

Il terreno MLGA differisce dal Membrane Lauryl Sulphate Broth (mLSB) per l'aggiunta di X-glucuronide (BCIG), piruvato di sodio e agar; MLGA semplifica la tecnica di filtrazione su membrana per *E. coli* e coliformi riducendo da due a uno le filtrazioni richieste e riduce la necessità di ulteriori fasi di conferma.

Il peptone e l'estratto di lievito sono fonti di azoto e carbonio e sono fattori per la crescita microbica. Il sodio piruvato protegge le cellule danneggiate, favorisce il recupero dei coliformi e ne migliora la crescita; il sodio lauril solfato inibisce i batteri Gram positivi. La differenziazione di *E. coli* e dei coliformi è permessa da due reazioni biochimiche all'interno del terreno: la fermentazione del lattosio e la determinazione delle beta-glucuronidasi.

Il lattosio è fermentato dai coliformi con produzione di acidi che inducono il viraggio del rosso fenolo verso il giallo. Il substrato cromogenico 5-bromo-4-cloro-3-indolil-β-D-glucuronide (BCIG) viene scisso dall'enzima beta-glucuronidasi di *E.coli* e produce un cromoforo blu che si accumula nelle colonie.

I coliformi diversi da *E. coli*, lattosio-positivi, produrranno colonie di colore giallo; *E. coli*, crescerà con colonie di colore verde, quale combinazione del giallo della fermentazione del lattosio e del blu della reazione della beta-glucuronidasi.

4 - PREPARAZIONE DEL TERRENO IN POLVERE

Sospendere 88 g in 1000 mL di acqua purificata fredda. Portare ad ebollizione sotto agitazione fino a completa soluzione, quindi autoclavare a 121°C per 15 minuti. Raffreddare a circa 47-50°C e distribuire in piastre di Petri sterili.

5 - CARATTERISTICHE CHIMICO-FISICHE

Aspetto del terreno disidratato

Fine granulometria omogenea di colore da rosa a paglierino

Aspetto delle piastre

Rosso brillante, limpido

pH finale del terreno a 25 °C:

7,4 ± 0,2

6 - MATERIALE FORNITO - CONFEZIONI

Prodotto	Tipo	REF	Confezione
Membrane Lactose Glucuronide Agar	Terreno in polvere	4017502	500 g (5,68 L)
Membrane Lactose Glucuronide Agar	Piastre pronte all'uso	491750	3 x 10 piastre ø 55 mm

7 - MATERIALI NECESSARI MA NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, termostato ed altra strumentazione di laboratorio, piastre di Petri sterili, beute autoclavabili, anse e pipette sterili da microbiologia, membrane ed apparati per la filtrazione del campione, terreni di coltura e reagenti accessori.

8 - CAMPIONI

Campioni d'acqua e campioni della filiera alimentare. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, seguire le buone pratiche di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.^{1,2}

9 - PROCEDURA DELL'ANALISI

Filtrare il campione di acqua da analizzare attraverso un filtro a membrana (diametro 47 mm, dimensione dei pori 0,45 µm). Il volume e la diluizione dell'acqua filtrata devono essere scelti in modo da ottenere un numero di colonie da contare sulla membrana compreso tra 20 e 80. Per le acque che si prevede contengano un basso numero di coliformi, filtrare 100 mL. Per le acque inquinate utilizzare un volume inferiore o un campione diluito.





Posizionare il filtro a membrana su una piastra MLGA assicurandosi che non siano intrappolate bolle d'aria sotto la membrana. Incubare le piastre a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ per $4 \pm 0,5$ ore, quindi a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 16 ± 2 ore².

10 - LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Dopo l'incubazione, osservare la crescita batterica, registrare le caratteristiche morfologiche e cromatiche delle colonie e contare tutte le colonie gialle e verdi.

Le colonie gialle sono da considerare presuntivamente come coliformi diversi da *E. coli*

Le colonie verdi sono da considerare come *E. coli* e non è richiesta alcuna ulteriore conferma. Se ritenuto necessario possono essere comunque eseguiti test di conferma per dimostrare la produzione di acido dal lattosio, la formazione di indolo da triptofano a 44°C e la reazione della citocromossidasi².

La somma delle due rappresenta il numero di batteri coliformi totali. Esprimere il risultato in unità formanti colonie per volume di campione (UFC/mL).

Leggere i risultati entro 15 minuti dalla rimozione dal termostato poiché la colorazione gialla potrebbe cambiare nel tempo.

11-CONTROLLO QUALITÀ DELL'UTILIZZATORE

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, alle regole dell'accreditamento ed in funzione della propria esperienza di Laboratorio. Qui di seguito sono riportati alcuni ceppi utili per il controllo di qualità

CEPPI DI CONTROLLO	INCUBAZIONE/ T°/ t / ATM	RISULTATI ATTESI
<i>E. coli</i> ATCC 25922	$30^\circ\text{C}/4\text{H} + 37^\circ\text{C}/14\text{H}-\text{A}$	buona crescita, colonie verdi
<i>E. aerogenes</i> ATCC 13048	$30^\circ\text{C}/4\text{H} + 37^\circ\text{C}/14\text{H}-\text{A}$	buona crescita, colonie gialle
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	$30^\circ\text{C}/4\text{H} + 37^\circ\text{C}/14\text{H}-\text{A}$	buona crescita, colonie rosa
<i>B. subtilis</i> ATCC 6633	$30^\circ\text{C}/4\text{H} + 37^\circ\text{C}/14\text{H}-\text{A}$	inibito

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

12- LIMITI DEL METODO

- Questo metodo non è adatto per campioni di fanghi che sono stati trattati con calce o sottoposti a essiccamento o pastorizzazione, trattamenti che riducono significativamente le concentrazioni batteriche a valori inferiori a 10 cellule vitali di *E. coli* per grammo di peso umido o per quei campioni dove è prevista una intensa riduzione microbica².
- I fanghi con un alto contenuto di solidi ($>20\%$ p/v) tendono a bloccare la membrana filtrante alle diluizioni più basse o possono mascherare o inibire la crescita degli organismi target abbassando il limite di rilevamento².

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 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).
- Applicare le norme di buona fabbricazione nella preparazione del terreno.
- Ogni piastra di questo terreno di coltura è monouso.
- Le piastre pronte all'uso non sono da considerarsi un "prodotto sterile" in quanto non sono soggette a sterilizzazione terminale, ma un prodotto con biocontaminazione controllata, entro i limiti delle specifiche riportate sul Certificato di Controllo di Qualità.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati 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 i terreni non utilizzati ed i terreni inoculati con i campioni o con ceppi microbici e sterilizzati, in accordo alla legislazione vigente in materia.
- I Certificati d'Analisi e le Schede di Sicurezza 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 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

Terreno in polvere

Conservare a $+2^\circ\text{C} / +8^\circ$ 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 o in caso di evidente deterioramento della polvere (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 e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo (piastre/flaconi) e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura ed imballaggio).

Piastre pronte all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a $+2^\circ\text{C} / +8^\circ\text{C}$ al riparo dalla luce diretta. In queste condizioni il prodotto è valido fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Dopo l'apertura del sacchetto di plastica, le piastre possono essere usate entro 7 giorni, se conservate in ambiente pulito ed alla temperatura indicata in etichetta. Non utilizzare le piastre se il sacchetto di plastica è danneggiato, non utilizzare le piastre rotte. Non utilizzare le piastre oltre la data di scadenza. Non utilizzare le piastre se vi sono segni evidenti di deterioramento (es.: contaminazione, eccessiva umidità, eccessiva disidratazione, rotture dell'agar, colore alterato).





15 - BIBLIOGRAFIA

1. The Environment Agency - Methods for Examination of Waters and Associated Material - The Microbiology of Drinking Water 2002.
2. Bonadonna L, Musmeci L (Ed.). *Metodi analitici di riferimento per la valutazione microbiologica dei fanghi di depurazione e di matrici ad essi assimilabili*. Roma: Istituto Superiore di Sanità; 2014. (Rapporti ISTISAN 14/18).

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

 REF Numero di catalogo	 LOT Numero di lotto	 Monouso	 Fabbricante	 Lato superiore	 Proteggere dall'umidità
 Limiti di temperatura	 Contenuto sufficiente per <n> saggi	 Consultare le Istruzioni per l'Uso	 Utilizzare entro	 Fragile maneggiare con cura	 Proteggere dalla luce diretta

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Data
Revisione 0	Prima pubblicazione	05/2024

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

