



MINERALS MODIFIED GLUTAMATE MEDIUM (MMGM) BASE MINERALS MODIFIED GLUTAMATE MEDIUM (MMGM) SODIUM GLUTAMATE

Terreno di coltura in polvere e terreno pronto all'uso

1 – DESTINAZIONE D'USO

Brodo di arricchimento per la rilevazione di *Escherichia coli* secondo la norma ISO 16649 e di altri organismi coliformi in campioni di alimenti, acqua e acque reflue.

2 - COMPOSIZIONE – FORMULA TIPICA *

TERRENO IN POLVERE E PROVETTE PRONTE ALL'USO

401737 MINERALS MODIFIED GLUTAMATE MEDIUM BASE (MMGM)

	DOPPIA CONCENTRAZIONE	SINGOLA CONCENTRAZIONE
Lattosio	20,000 g	10,000 g
Sodio formiato	0,500 g	0,250 g
L-cistina	0,04 g	0,020 g
Acido L (-) aspartico	0,048 g	0,024 g
L (+) arginina	0,040 g	0,020 g
Tiamina	0,002 g	0,001 g
Acido Nicotinico	0,002 g	0,001 g
Acido Pantotenico	0,002 g	0,001 g
Magnesio solfato 7H ₂ O	0,200 g	0,100 g
Ferro ammonio citrato	0,02 g	0,010 g
Calcio cloruro 2H ₂ O	0,020 g	0,010 g
Di-potassio idrogeno fosfato	1,800 g	0,900 g
Bromocresolo porpora	0,020 g	0,010 g

4123642 Sodio Glutamato

Sodio glutamato**	12,70 g	6,35 g
Ammonio cloruro**	5,00 g	2,50 g
Acqua	1000 mL	1000 mL

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

** Not included in the dehydrated medium; it must be added to the basal medium

3 – DESCRIZIONE E PRINCIPIO DEL METODO

Un terreno chimicamente modificato a base di acido glutammico fu proposto per la prima volta da Folpners¹ nel 1948 per il conteggio dei batteri coliformi nell'acqua. Questa formulazione di base fu modificata da Burman e Oliver nel 1952² e dal Public Health Laboratory Service del Regno Unito³ sostituendo il glucosio con il lattosio. Il terreno di coltura con lattosio è stato ulteriormente migliorato da Gray nel 1959⁴, che ha aumentato il pH e aggiunto il formiato di sodio per aumentare la produzione di gas. Ulteriori modifiche sono state apportate da Windle Taylor⁵: la concentrazione di lattosio è stata aumentata e il fosfato diminuito, e il terreno modificato è stato adottato nel Regno Unito al posto del brodo di MacConkey per tutti i campioni di routine esaminati con il metodo delle provette multiple. Contemporaneamente e indipendentemente, nel 1964 anche Gray⁶ apportò ulteriori modifiche che portarono alla pubblicazione di un terreno glutammato lattosio formiato migliorato.

Prove comparative con MacConkey Broth⁷ hanno dimostrato che la modifica del terreno di Gray ha fornito un numero significativamente più elevato di risultati positivi per i coliformi e l'*E. coli*, dopo solo 24 ore di incubazione. In una valutazione comparativa con il Lauryl Tryptose Broth (LTB)⁸, a 48 ore di incubazione, il Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM) ha dato risultati migliori per i coliformi totali, compreso l'*E. coli*, nelle acque clorate, soprattutto con cariche basse. Il MMGM è stato valutato da Abbis *et al*⁹ in comparazione al Lauryl Sulfate Tryptose Broth, al MacConkey Broth e al Brilliant Green Bile Broth per il conteggio dei coliformi in diversi campioni alimentari e ha fornito migliori risultati di sensibilità.

Il MMGM è raccomandato dalla ISO 16649-3¹⁰ e, integrato con agar, dalla ISO 16649-1¹¹. Entrambe le tecniche includono una fase di rivitalizzazione e sono utilizzate per il conteggio di *E. coli* positivi alla β-glucuronidasi da alimenti che potrebbero contenere cellule con lesioni sub-letali.

I fattori di crescita essenziali sono forniti dal glutammato di sodio e dal formiato di sodio; il lattosio è un carboidrato fermentabile. La presenza di vitamine del complesso B, aminoacidi e ioni magnesio consente di aumentare il tasso di crescita e fermentazione. L'aggiunta di cloruro di ammonio (non incluso nel terreno disidratato) aumenta la produzione di gas da parte dei ceppi target, mentre l'idrogenofosfato di potassio agisce come sistema tampone durante la fermentazione del lattosio. Il porpora di bromocresolo serve come indicatore acido-base, dando un colore giallo al brodo con batteri che fermentano il lattosio, mentre i batteri che non fermentano il lattosio sviluppano un colore blu. Per migliorare la stabilità del terreno disidratato durante la conservazione, il glutammato di sodio è fornito separatamente (REF 4123642) e deve essere aggiunto al terreno di base REF 401737.

4 – INDICAZIONI PER LA PREPARAZIONE DEL TERRENO DISIDRATATO

Terreno a concentrazione singola

Sciogliere 2,5 g di cloruro di ammonio in 1000 mL di acqua fredda purificata. Aggiungere 11,4 g di Minerals Modified Glutamate Medium Base e 6,35 g di Sodium Glutamate (REF 4123642).

Terreno a concentrazione doppia

Sciogliere 5 g di cloruro di ammonio in 1000 mL di acqua depurata fredda. Aggiungere 22,7 g di Minerals Modified Glutamate Medium Base e 12,7 g di glutammato di sodio (REF 4123642).





Mescolare e riscaldare se necessario per sciogliere completamente il terreno.

Dispensare il terreno a singola concentrazione in volumi da 10 mL in provette o flaconi di dimensioni minime di 16 mm x 160 mm.

Dispensare il terreno a doppia concentrazione in volumi da 10 mL in provette o flaconi di dimensioni minime di 18 mm x 180 mm o 20 mm x 200 mm. Se necessario, inserire in ogni contenitore una provetta di fermentazione capovolta. Sterilizzare in autoclave per 10 minuti a 116°C. Minerals Modified Glutamate Medium Base può essere integrato con 13 g/L di Agar Bios LL (REF 401030) prima della sterilizzazione per la preparazione di Minerals Modified Glutamate Agar.¹¹

5 – CARATTERISTICHE FISICHE

Aspetto della polvere
Aspetto della soluzione
pH finale (20-25 °C)

Fine granulometria omogenea, da color bianco al malva
viola, limpida
6,7 ± 0,1

6 – MATERIALI FORNITI - CONFEZIONI

Product	Type	REF	Pack
Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM) Base	Terreno in polvere	4017372	500 g (44 o 22 L)
Sodio Gutammato	Materia prima/supplemento	4123642	300 g (46,9 o 23,4 L)
Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM)	Provette pronte all'uso	551737	20 x 10 mL
Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM) 2x	Provette pronte all'uso	551737D	20 x 10 mL

7 – MATERIALI NECESSARI NON FORNITI

Autoclave, bagnomaria, anse e pipette sterili, incubatore e attrezzature di laboratorio necessarie, beute, provette, cloruro di ammonio, glutammato di sodio (REF 4123642), terreni di coltura e reagenti ausiliari, Agar Bios LL (REF 411030).

8 – CAMPIONI

Prodotti destinati al consumo umano, all'alimentazione degli animali e campioni ambientali nel settore della produzione e della manipolazione degli alimenti; acqua e acque reflue. Per la raccolta, la conservazione, il trasporto e la preparazione dei campioni, attenersi alle regole della buona pratica di laboratorio e fare riferimento agli standard e alle normative internazionali applicabili.

9 – PROCEDURA DELL'ANALISI

Conteggio di *E. coli* mediante tecnica MPN nei prodotti alimentari (ISO 16649-3)¹⁰

- Inoculare 3 o 5 provette MMGM a doppia concentrazione con aliquote di 10 mL del campione in esame, se liquido, o con aliquote di 10 della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
- Inoculare 3 o 5 provette di MMGM a singola concentrazione con aliquote da 1 mL del campione in esame, se liquido, o con aliquote da 1 mL della sospensione iniziale nel caso di altri prodotti.
- Ripetere l'inoculazione del terreno liquido a singola concentrazione per ciascuna delle ulteriori diluizioni decimali, utilizzando una nuova pipetta per ogni diluizione.
- Incubare le provette a 37°C per 24 ± 2 ore.
- Da ciascuna delle provette incubate che mostrano un colore giallo, effettuare una subcultura con un'ansa su una piastra di TBX Agar (402156) per ottenere colonie isolate e incubare a 44°C per 24 ± 2 ore.
- Esaminare le piastre di TBX Agar per verificare la presenza di colonie verde-blu (*E. coli* beta-glucuronidasi positivo).
- Esprimere i risultati come numero più probabile di *E. coli* in base alla presenza di colonie verde-blu sulle piastre TBX.

Conteggio dei coliformi/*E.coli* nell'acqua

Inoculare il campione d'acqua nel terreno di coltura nei seguenti volumi:

- 50 mL di campione in 50 mL di terreno a doppia concentrazione o 5 x 10 mL di campione in 5 x 10 mL di terreno a doppia concentrazione (in caso si sospetti di un basso numero di organismi target).
- 5 x 1 mL di campione in 5 x 5 mL di terreno a singola concentrazione o 5 x 1 mL di una diluizione 1:10 del campione in 5 x 5 mL di terreno a singola concentrazione (in caso si sospetti di un elevato di organismi target).
- Incubare le provette a 37°C. Esaminare dopo 18-24 ore di incubazione e nuovamente a 48 ore.

Conteggio di *E. coli* negli alimenti con MMG Agar (ISO 16649-1)¹¹

Questa tecnica richiede l'uso di Minerals Modified Glutamate Medium (MMGM) Base integrato come descritto sopra e con 13 g/L di Agar Bios LL (REF 411030): MMG Agar.

- Trasferire al centro della membrana 1 mL del campione o 1 mL della sospensione iniziale e distribuire l'inoculo sulla superficie della membrana. Ripetere la procedura con ulteriori diluizioni decimali, se necessario.
- Utilizzando uno spargitore sterile, distribuire l'inoculo in modo uniforme su tutta la superficie della membrana, evitando qualsiasi fuoriuscita dalla membrana.
- Lasciare le piastre a temperatura ambiente per 15 minuti in modo che il terreno di coltura assorba il campione liquido.
- Incubare le piastre per 4 ore ± 0,25 ore a 37 °C, con la superficie della membrana/agar rivolta verso l'alto.
- Dopo questa fase di rivitalizzazione, trasferire le membrane su piastre di TBX Agar e incubare a 44 °C per 18-24 ore.

10- LETTURA ED INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Il MMGM diventa torbido quando i batteri sono in crescita; la fermentazione del lattosio può essere rilevata dalla formazione di gas e dallo sviluppo del colore giallo. Ogni provetta presuntivamente positiva deve essere confermata con adeguate subcolture e con ulteriori test biochimici.

Esaminare le piastre di TBX Agar per verificare la presenza di colonie tipiche, blu o blu-verdi, che indicano la presenza di *E. coli* positivi alla β-glucuronidasi.

11 – CONTROLLO QUALITÀ

Tutti i lotti di prodotto vengono rilasciati alla vendita dopo l'esecuzione del Controllo Qualità per verificare la conformità alle specifiche. Tuttavia, è facoltà dell'utente finale 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
E. coli ATCC 8739
E. faecalis ATCC 29212

INCUBAZIONE T°/ T - ATM
37°C/24 H/A
37°C/24 H/A

RISULTATI ATTESI
crescita, con gas; il terreno vira al giallo
inibito

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 MMGM disidratato viene sottoposto a test di produttività, specificità e selettività, confrontando i risultati con un lotto di riferimento precedentemente approvato.

La produttività viene testata con il metodo delle diluizioni ad estinzione, inoculando 1 mL di diluizioni decimali appropriate di organismi target in provette, incubando a 37°C per 24 ore e registrando la diluizione più alta che mostra crescita, produzione di gas e colore giallo nel lotto di riferimento (G_{RB}) e nel lotto di prova (G_{TB}). La produttività viene testata con i seguenti ceppi target: *E. coli* ATCC 8739, *E. coli* NCTC 13216, *E. coli* ATCC 25922, *C. freundii* ATCC 43864. L'indice di produttività $G_{RB}-G_{TB}$ per ciascun ceppo in esame è ≤ 1 e le provette presentano gas e colore giallo.

La specificità è stata testata con diluizioni appropriate di ceppi non target *S. Typhimurium* ATCC 14028 e *P. aeruginosa* ATCC 27853. Dopo l'incubazione, i ceppi mostrano una buona crescita senza ingiallimento del terreno e senza produzione di gas.

La selettività viene testata con diluizioni appropriate dei ceppi non target *E. faecalis* ATCC 29212 e *S. aureus* ATCC 25923. Dopo l'incubazione, la crescita dei ceppi non target viene inibita.

13 – LIMITE DEL METODO

- Il pH del terreno di coltura influisce in modo significativo sulle sue prestazioni. Evitare il surriscaldamento e controllare il pH di ogni lotto in preparazione.
- Alcuni ceppi di *E. coli* possono crescere poco o per nulla nei terreni di coltura incubati a 44 °C. Di conseguenza, alcuni ceppi di *E. coli*, compresi quelli patogeni, non verranno rilevati dai metodi sopra riportati e tratti dalle norme ISO. L'attività della β -glucuronidasi può essere mostrata a 44 °C anche da alcuni altri membri delle *Enterobacteriaceae*, in particolare *Shigella* e *Salmonella*.¹⁰
- Alcuni organismi diversi dai batteri coliformi possono crescere nel terreno con produzione di acido e gas. Ogni provetta presuntivamente positiva deve essere confermata con adeguate subcolture e con ulteriori test biochimici.

14 - PRECAUZIONI ED AVVERTENZE

- Il terreno di coltura è destinato al controllo microbiologico e sono 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
- Il terreno disidratato deve essere maneggiato con adeguate protezioni. MMGM è classificato come pericoloso secondo la normativa vigente. Prima dell'uso, consultare le schede di sicurezza.
- Applicare le Buone Pratiche di Fabbricazione nel processo di produzione dei supporti preparati.
- Prestare attenzione all'apertura dei tappi a vite per evitare lesioni dovute alla rottura del vetro.
- Le provette sono soggette a sterilizzazione terminale in autoclave.
- Ogni provetta di questo terreno di coltura è monouso.
- Tutti i campioni di laboratorio devono essere considerati infettivi.
- Evitare la contaminazione dell'ambiente 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.
- 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.

15 – CONSERVAZIONE E VALIDITÀ

Terreno di coltura in polvere e Sodio Glutammato

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 e della convalida della loro durata di conservazione, in base al tipo e alle condizioni di conservazione applicate (temperatura e imballaggio).

Provette pronto all'uso

Dopo il ricevimento, conservare nella confezione originale a +2°C / +8°C al riparo della luce. In queste condizioni le provette sono valide fino alla data di scadenza indicata in etichetta. Non usare oltre la data di scadenza. Le provette estratte dal confezionamento secondario possono essere utilizzate sino alla data di scadenza. Le provette aperte devono essere usate immediatamente. Prima dell'uso, controllare la chiusura e l'integrità del tappo a vite. Eliminare le provette con segni di deterioramento (es. contaminazione microbica, torbidità anormale, colore atipico).











16 - REFERENCES

- Folpmer T. Is it justified to use lactose broth for the detection of Bact. coli in the presumptive test of routine water analysis? *Antonie van Leeuwenhoek*. 1948; 14: 58-64.
- Burman NP, Oliver CW. A comparative study of Folpmer's glutamic acid medium for the detection of Bact. coli in water. *Proc Soc Appl Bact*. 1952; 15:1-7.
- Public Health Laboratory Service, Water Sub-Committee. A comparison between MacConkey broth and glutamic acid media for the detection of coliform organisms in water. *J Hyg Camb* 1958; 56:377-88.
- Gray RD. Formate lactose glutamate: a chemically defined medium as a possible substitute for MacConkey broth in the presumptive coliform examination of water. *J Hyg Camb* 1959;57: 249-65.



5. Windle Taylor E. (1961--62). Glutamic acid media. Rep Results Bact Chem Biol Exam Lond Wat. 1961-1962; 40, 18-22.
6. Gray RD. An improved formate lactose glutamate medium for the detection of Escherichia coli and other coliform organisms in water. J Hyg Camb 1964; 62:495-508
7. P. H. L. S. Standing Committee on the Bacteriological Examination of Water Supplies. Comparison of MacConkey broth, Teepol broth and glutamic acid media for the enumeration of coliform organisms in water. J Hyg Camb 1968; 65:67-82.
8. Joint Committee of the P. H. L. S. and the Standing Committee of Analysts. A comparison between minerals-modified glutamate medium and lauryl tryptose lactose broth for the enumeration of Escherichia coli and coliform organisms in water by the multiple tube method. J. Hyg., Camb.1980;85:35-49.
9. Abbiss JS, Wilson JM, Blood RM, Jarvis B. A comparison of minerals modified glutamate medium with other media for the enumeration of coliforms in delicatessen foods. J Appl Bacteriol 1981; 51:121-127.
10. ISO 16649-3:2016. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 3: Detection and most probable number technique using 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide
11. ISO 16649-1:2018. Microbiology of the food chain — Horizontal method for the enumeration of beta-glucuronidase-positive Escherichia coli. Part 1: Colony-count technique at 44 °C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl beta-D-glucuronide.

TABELLA DEI SIMBOLI APPLICABILI

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

CRONOLOGIA DELLE REVISIONI

Versione	Descrizione delle modifiche	Date
Revisione 3	Aggiornamento del contenuto e del Layout	03/2023

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

