

## CN Agar

Catalog #	Description
3563915	<b>CN Agar</b> , ready-to-use, 90 mm x 20 dishes
3556034	<b>CN Agar</b> , ready-to-use, 200 ml x 6 bottles
3564899	<b>CN Agar</b> , dehydrated, 500 g

---

For laboratory use only.

---

### Intended Use

Selective medium used for the detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* in bottled water, water intended for human consumption or swimming pool water (membrane filtration method).

### Principle

*P. aeruginosa* is a Gram-negative bacteria that grows on selective media containing cetrimide and produces pyocyanin, a blue-green pigment. Due to the presence of cetrimide and nalidixic acid, the growth of Gram-positive and some Gram-negative microorganisms are inhibited. The presence of magnesium chloride and potassium sulfate in the medium promotes the production of pyocyanin pigment by *P. aeruginosa*.

### Theoretical Composition

#### Base Medium

Gelatin peptone	16 g
Casein hydrolysate	10 g
Potassium sulfate anhydrous (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Magnesium chloride anhydrous (MgSO <sub>4</sub> )	1.4 g
Hexadecyltrimethyl ammonium bromide (cetrimide)	0.2 g
Nalidixic acid	0.015 mg
Glycerol	10 ml
Agar	13 g
Distilled water	1,000 ml

Final pH at 25°C = 7.1 ± 0.2

### Shelf Life and Storage

Store ready-to-use medium at 2–8°C protected from light. Store dehydrated medium at 15–25°C in carefully sealed bottles in a cool, dry place. Store media prepared from dehydrated base for 30 days at 2–8°C protected from light. Store media prepared from ready-to-use bottles for 2 weeks at 2–8°C protected from light.

### Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

#### Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Filtration device
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer
- Microscope for measuring fluorescence
- Portable UV observation chamber without UV lamp (catalog #3550717, #3550718)

## Supplies

- Forceps for handling membranes
- Sterile cellulose-ester membrane filters ( $\varnothing = 47$  mm,  $0.45$   $\mu\text{m}$ )
- King B Agar (catalog #3555278, ready-to-use, 7 ml x 25 tubes)
- Nutrient Agar for Water Testing (catalog #3563786, ready-to-use, 90 mm x 20 dishes)
- Acetamide Broth (catalog #3554355, ready-to-use, 5 ml x 25 tubes)
- Oxidase (catalog #35934260, 100 strips)

## Precautions

- Respect Good Laboratory Practice (EN ISO 8199). Appropriate protection, such as gloves and lab coats, should be worn when working with potentially infectious live bacteria
- Media that have come in contact with water samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

## Quality Control

Every product manufactured and marketed by Bio-Rad is subject to a quality assurance procedure at all stages, from reception of raw materials through to marketing of the finished products. Each batch of finished product undergoes quality control according to EN ISO 11133 and is marketed only if it satisfies the acceptability criteria. Documentation relative to the production and quality control of each batch is kept on file.

## Protocol

### Ready-To-Use Bottle Preparation

- Place the CN Agar bottle in a prewarmed water bath ( $100^{\circ}\text{C}$ ). Bring to boil and maintain temperature until the medium is completely dissolved
- Cool to a temperature of  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Pour into Petri dishes (8-10 ml/dish, i.e., a thickness of  $\geq 5$  mm), avoiding the creation of air bubbles and let dry

### Dehydrated Medium Preparation

- Shake before use
- Dissolve 50.6 g of powder in 1 L of sterile distilled water
- Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil until a homogeneous suspension is obtained
- Add 10 ml of glycerol and sterilize in autoclave at  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  for 15 min
- Cool to  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Pour into vials or 55 mm Petri dishes (8-10 ml/dish, i.e., a thickness of  $\geq 5$  mm), avoiding the creation of air bubbles and let dry

**Reconstitution Ratio:** 50.6 g/L (500 g of powder makes 9.8 L of medium)

### Sample Preparation

- Prepare samples according to the standards for the product concerned

### Inoculation and Incubation

- Filter 100 ml or 250 ml of water sample through the membrane filter (select the appropriate water-filtration volume according to the water sample's origin and the respective directive)
- Place each membrane filter on the surface of a Petri dish containing CN Agar (grid side up)
- Incubate the dishes at  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  for  $44 \pm 4$  h in containers that prevent moisture loss

### Reading and Interpretation

- Examine the membranes for growth after  $22 \pm 2$  h and  $44 \pm 4$  h. Count all colonies that produce blue-green pigment (pyocyanin) as confirmed *P. aeruginosa*
- Examine the membranes under UV light. Count all non-pyocyanin producing colonies that fluoresce as presumptive *P. aeruginosa* and confirm their identity using acetamide broth as described in confirmation tests
- Count all other reddish-brown colonies that do not fluoresce as presumptive *P. aeruginosa* and confirm their identity using an oxidase test, acetamide Broth and King B media

**Subculture onto Nutrient Agar**

- Subculture colonies from the membrane filter on nutrient agar and incubate at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  for  $22 \pm 2$  hr
- Check the subcultures for purity and test that were reddish brown initially for oxidase reaction

**Oxidase Test**

- Place an oxidase strip on a microscope slide and deposit 1 drop of sterile saline onto the strip. Take 1 freshly isolated pure colony and place it on the disk
- A violet coloration occurring within 60 sec indicates a positive reaction for the oxidase test

**Confirmation on King B Agar**

- Subculture oxidase positive reddish-brown cultures onto King B Agar and incubate for 24 hr up to 5 days at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- Examine the growth daily for fluorescence under UV light ( $\lambda = 366$  nm)
- Fluorescent growth indicates a positive reaction for *P. aeruginosa*

**Confirmation Test on Acetamide Broth**

- Inoculate a tube of acetamide broth with the subculture and incubate at  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  for  $22 \pm 2$  hr
- Add 1 to 2 drops of Nessler reagent and examine tubes for production of ammonia characterized by the production of a color ranging from yellow to brick-red

**Expression of Results/Calculations**

- Refer to the standards for mode of calculation

**References**

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

**Revision History**

Release date	Document number	Change
July 2021	5068 Ver A	- Major change - New document design - Document number change — previous version: V2_05-08_11

BIO-RAD is a trademark of Bio-Rad Laboratories, Inc. All trademarks used herein are the property of their respective owner.

## CN Agar

Référence	Description
3563915	<b>CN Agar</b> , prêt à l'emploi, 90 mm x 20 boîtes
3556034	<b>CN Agar</b> , prêt à l'emploi, 200 ml x 6 flacons
3564899	<b>CN Agar</b> , base déshydratée, 500 g

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

### Usage prévu

Milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux embouteillées, l'eau destinée à la consommation humaine ou les eaux de piscines (méthode par filtration sur membrane).

### Principe

*P. aeruginosa* est une bactérie à Gram négatif qui se développe en milieu sélectif contenant du cétrimide et qui produit de la pyocyanine, un pigment bleu-vert. Ce milieu inhibe le développement des microorganismes à Gram positif et de certains microorganismes à Gram négatif par la présence de cétrimide et d'acide nalidixique. La présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium dans le milieu favorise la production du pigment pyocyanine par *P. aeruginosa*.

### Formule théorique

#### Milieu de base

Peptone de gélatine	16 g
Hydrolysate de caséine	10 g
Sulfate de potassium anhydre (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Chlorure de magnésium anhydre (MgSO <sub>4</sub> )	1,4 g
Bromure d'hexacétyltriméthylammonium (cétrimide)	0,2 g
Acide nalidixique	0,015 mg
Glycérol	10 ml
Agar	13 g
Eau distillée	1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,1 ± 0,2

### Durée de conservation et stockage

Milieu prêt à l'emploi : conserver à 2–8 °C à l'abri de la lumière. Milieu déshydraté : conserver à 15–25 °C en flacons soigneusement scellés, dans un endroit froid et sec. Milieu préparé à partir de la base déshydratée : conserver pendant 30 jours à 2–8 °C à l'abri de la lumière. Milieu préparé à partir de flacons prêts à l'emploi : conserver pendant 2 semaines à 2–8 °C à l'abri de la lumière.

### Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

#### Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Incubateurs ou salle d'incubation
- Dispositif de filtration
- Balances
- Agitateur-homogénéisateur
- Agitateur-mélangeur vortex
- Microscope pour la mesure de la fluorescence
- Chambre d'observation UV portable sans lampe UV (référence 3550717, 3550718)

## Produits

- Pinces pour la manipulation des membranes
- Membranes filtrantes en ester de cellulose stériles ( $\varnothing = 47$  mm,  $0,45 \mu\text{m}$ )
- King B Agar (référence 3555278, prêt à l'emploi, 7 ml x 25 tubes)
- Nutrient Agar for Water Testing (référence 3563786, prêt à l'emploi, 90 mm x 20 boîtes)
- Acetamide Broth (référence 3554355, prêt à l'emploi, 5 ml x 25 tubes)
- Oxidase (référence #35934260, 100 bandelettes)

## Précautions

- Respecter les bonnes pratiques de laboratoire (EN ISO 8199). Porter un équipement de protection approprié, par exemple des gants et une blouse de laboratoire, pour travailler avec des bactéries vivantes potentiellement infectieuses
- Les milieux qui sont entrés en contact avec des échantillons d'eau doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

## Contrôle qualité

Chaque produit fabriqué et commercialisé par Bio-Rad est soumis à une procédure d'assurance qualité à toutes les étapes, de la réception des matières premières jusqu'à la mise sur le marché du produit fini. Chaque lot de produits finis subit un contrôle qualité conforme à EN ISO 11133 et est mis sur le marché uniquement s'il satisfait aux critères d'acceptabilité. La documentation relative à la production et au contrôle qualité de chaque lot est archivée.

## Protocole

### Préparation d'un flacon prêt à l'emploi

- Placer le flacon de gélose CN dans un bain-marie préchauffé ( $100 \text{ }^\circ\text{C}$ ). Porter à ébullition et maintenir à température jusqu'à dissolution complète du milieu
- Laisser refroidir à  $47 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$
- Verser dans des boîtes de Petri (8–10 ml/boîte, soit  $\geq 5$  mm d'épaisseur) en évitant la formation de bulles d'air et laisser sécher

### Préparation du milieu déshydraté

- Agiter avant utilisation
- Dissoudre 50,6 g de poudre dans 1 L d'eau distillée stérile
- Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à obtention d'une suspension homogène
- Ajouter 10 ml de glycérol et stériliser en autoclave à  $121 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant 15 min
- Laisser refroidir à  $47 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ . Verser dans des flacons ou des boîtes de Petri de 55 mm (8–10 ml/boîte, soit  $\geq 5$  mm d'épaisseur) en évitant la formation de bulles d'air et laisser sécher

**Taux de reconstitution** : 50,6 g/L (500 g de poudre donnent 9,8 L de milieu)

### Préparation des échantillons

- Préparer les échantillons conformément aux normes applicables au produit concerné

### Inoculation et incubation

- Filtrer 100 ml ou 250 ml d'échantillon d'eau à travers la membrane filtrante (sélectionner le volume de filtration d'eau approprié selon l'origine de l'échantillon d'eau et la directive applicable)
- Placer chaque membrane filtrante sur la surface d'une boîte de Petri contenant de la gélose CN (face quadrillée vers le haut)
- Incuber les boîtes à  $36 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$  pendant  $44 \pm 4$  hr dans des contenants préservant l'humidité

### Lecture et interprétation

- Après  $22 \pm 2$  hr et  $44 \pm 4$  hr, examiner les membranes à la recherche de colonies. Considérer les colonies qui produisent un pigment bleu-vert (pyocyanine) comme positives à *P. aeruginosa*
- Examiner les membranes à la lumière UV. Compter toutes les colonies qui ne produisent pas de pyocyanine et qui présentent une fluorescence comme présumées positives à *P. aeruginosa* et confirmer leur identité à l'aide de bouillon à l'acétamide, tel que décrit dans les tests de confirmation
- Compter toutes les autres colonies rougeâtre-brun qui ne présentent pas de fluorescence comme présumées positives à *P. aeruginosa* et confirmer leur identité à l'aide du test de l'oxydase, de bouillon à l'acétamide et de milieu King B

### Mise en sous-culture sur la gélose nutritive

- Repiquer les colonies à partir de la membrane filtrante sur la gélose nutritive et incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant  $22 \pm 2$  hr
- Contrôler la pureté des sous-cultures et tester la réaction d'oxydase de celles qui étaient initialement de couleur rougeâtre-brun

### Test de l'oxydase

- Placer une bandelette d'oxydase sur une lame de microscope et déposer 1 goutte de solution saline stérile sur la bandelette. Prélever une colonie pure fraîchement isolée et la placer sur la bandelette
- Une coloration violette apparaissant dans un délai de 60 secondes indique une réaction positive au test de l'oxydase

### Confirmation sur la gélose King B

- Repiquer les colonies rougeâtre-brun positives à l'oxydase sur la gélose King B et incuber entre 24 hr et 5 jours à  $36 \pm 2$  °C
- Examiner leur développement quotidiennement à la lumière UV afin de détecter toute fluorescence ( $\lambda = 366$  nm)
- Le développement d'une fluorescence indique une réaction positive à *P. aeruginosa*

### Test de confirmation dans le bouillon à l'acétamide

- Ensemencer un tube de bouillon à l'acétamide à partir de la sous-culture et incuber à  $36 \pm 2$  °C pendant  $22 \pm 2$  hr
- Ajouter 1 à 2 gouttes de réactif de Nessler et examiner les tubes afin de détecter une éventuelle production d'ammoniac, caractérisée par la formation d'une coloration allant du jaune au rouge brique

### Expression des résultats/calculs

- Se reporter aux normes applicables pour la méthode de calcul

### Références

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture

ISO 11133/A2:2020. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau — Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture — Amendement 2

ISO 16266:2006. Qualité de l'eau — Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* — Méthode par filtration sur membrane

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

## Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Juillet 2021	5068 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Modification importante</li><li>- Nouvelle conception de document</li><li>- Modification du numéro de document — version précédente : V2_05-08_11</li></ul>

BIO-RAD est une marque déposée de Bio-Rad Laboratories, Inc. Toutes les marques déposées utilisées dans ce document appartiennent à leur propriétaire respectif.

## CN Agar

Katalog-Nr.	Beschreibung
3563915	<b>CN Agar</b> , gebrauchsfertig, 20 Agarplatten x 90 mm
3556034	<b>CN Agar</b> , gebrauchsfertig, 6 Flaschen x 200 ml
3564899	<b>CN Agar</b> , dehydriert, 500 g

---

Nur für die Verwendung im Labor.

---

### Verwendungszweck

Selektives Medium für den Nachweis und die Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* in abgefülltem Wasser, Trinkwasser oder Schwimmbadwasser (Membranfiltrationsverfahren).

### Prinzip

*P. aeruginosa* ist ein gramnegatives Bakterium, das auf Selektivmedien mit Cetrimid wächst und Pyocyanin, ein blaugrünes Pigment, bildet. Durch das Vorhandensein von Cetrimid und Nalidixinsäure wird das Wachstum grampositiver und einiger gramnegativer Mikroorganismen gehemmt. Das Vorhandensein von Magnesiumchlorid und Kaliumsulfat in dem Medium fördert die Bildung von Pyocyanin durch *P. aeruginosa*.

### Theoretische Zusammensetzung

#### Basismedium

Gelatinepepton	16 g
Caseinhydrolysat	10 g
Kaliumsulfat, wasserfrei (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Magnesiumchlorid, wasserfrei (MgSO <sub>4</sub> )	1,4 g
Hexadecyltrimethylammoniumbromid (Cetrimid)	0,2 g
Nalidixinsäure	0,015 mg
Glycerin	10 ml
Agar	13 g
Destilliertes Wasser	1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,1 ± 0,2

### Haltbarkeit und Lagerung

Gebrauchsfertiges Medium bei 2 – 8°C lichtgeschützt lagern. Das dehydrierte Medium kühl und trocken in sorgfältig verschlossenen Flaschen bei 15 – 25°C lagern. Das aus der dehydrierten Basis hergestellte Medium kann 30 Tage lichtgeschützt bei 2 – 8°C gelagert werden. Das gebrauchsfertige Medium aus der Flasche kann 2 Wochen lichtgeschützt bei 2 – 8°C gelagert werden.

### Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

#### Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Inkubatoren oder Inkubationsraum
- Filtrationsvorrichtung
- Waagen
- Rührer/Homogenisator
- Vortex
- Mikroskop zur Fluoreszenzmessung
- Tragbare UV-Beobachtungskammer ohne UV-Lampe (Kat.-Nr. 3550717, 3550718)



## Zubehör

- Pinzette zur Handhabung von Membranen
- Sterile Celluloseester-Membranfilter ( $\varnothing = 47$  mm,  $0,45$   $\mu\text{m}$ )
- King B Agar (Kat.-Nr. 3555278, gebrauchsfertig, 25 Röhrchen x 7 ml)
- Nutrient Agar for Water Testing (Kat.-Nr. 3563786, gebrauchsfertig, 20 Agarplatten x 90 mm)
- Acetamide Broth (Acetamid-Nährbouillon, Kat.-Nr. 3554355, gebrauchsfertig, 25 Röhrchen x 5 ml)
- Oxidase (Kat.-Nr. 35934260, 100 Streifen)

## Vorsichtsmaßnahmen

- Es sind die Richtlinien der guten Laborpraxis zu beachten (EN ISO 8199). Bei der Arbeit mit potenziell infektiösen lebenden Bakterien sollte angemessene Schutzkleidung wie Handschuhe und Laborkittel getragen werden.
- Medien, die mit Wasserproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen entsprechend zu entsorgen.
- Das Sicherheitsdatenblatt (SDS) und das Analysezertifikat für das Produkt sind auf **bio-rad.com** erhältlich.

## Qualitätskontrolle

Jedes von der Firma Bio-Rad hergestellte und verkaufte Produkt unterliegt vom Rohstoffeingang bis zur Vermarktung der Fertigprodukte einer umfassenden Qualitätssicherung. Jede Charge des fertigen Produkts wird einer Qualitätskontrolle gemäß EN ISO 11133 unterzogen und gelangt nur dann in den Vertrieb, wenn sie die Akzeptanzkriterien erfüllt. Die Unterlagen zur Produktion und Qualitätskontrolle jeder Charge werden archiviert.

## Protokoll

### Zubereitung des gebrauchsfertigen Mediums aus der Flasche

- Die Flasche mit CN-Agar in ein vorgewärmtes Wasserbad ( $100^{\circ}\text{C}$ ) stellen. Zum Kochen bringen und die Temperatur beibehalten, bis sich das Medium vollständig gelöst hat.
- Auf eine Temperatur von  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$  abkühlen lassen.
- In Petrischalen pipettieren (8 – 10 ml/Schale, d. h. eine Dicke von  $\geq 5$  mm) und fest werden lassen. Dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.

### Herstellung von Medium ausgehend vom dehydrierten Basismedium

- Vor Gebrauch schütteln.
- 50,6 g Pulver in 1 L sterilem destilliertem Wasser lösen.
- Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen, bis eine homogene Suspension vorliegt.
- 10 ml Glycerin zugeben und in einem Autoklaven 15 min bei  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  sterilisieren.
- Auf  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$  abkühlen lassen. In Gefäße oder Petrischalen mit einem Durchmesser von 55 mm pipettieren (8 – 10 ml/Schale, d. h. eine Dicke von  $\geq 5$  mm) und fest werden lassen. Dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.

**Rekonstitutionsverhältnis:** 50,6 g/L (500 g Pulver ergeben 9,8 L Medium)

### Probenvorbereitung

- Die Proben nach der für das jeweilige Produkt geltenden Standardmethode vorbereiten.

### Beimpfung und Inkubation

- 100 ml oder 250 ml Wasserprobe über den Membranfilter filtrieren (je nach Herkunft der Wasserprobe und der jeweiligen Richtlinie das geeignete Wasserfiltrationsvolumen wählen).
- Jeden Membranfilter (mit der Rasterseite nach oben) auf die Oberfläche des CN-Agars in einer Petrischale legen.
- Die Schalen bei  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  für  $44 \pm 4$  hr in Behältern inkubieren, die einen Feuchtigkeitsverlust verhindern.

### Ablesen und Auswerten der Ergebnisse

- Die Membranen nach  $22 \pm 2$  hr und  $44 \pm 4$  hr hinsichtlich eines Koloniewachstums überprüfen. Alle Kolonien zählen, die als Bestätigung für *P. aeruginosa* blaugrünes Pigment (Pyocyanin) bilden.
- Die Membranen unter UV-Licht prüfen. Alle nicht Pyocyanin bildenden, fluoreszierende Kolonien als präsumptive *P. aeruginosa* zählen und ihre Identität mit Acetamid-Bouillon, wie in den Bestätigungstests beschrieben, bestätigen.
- Alle anderen rötlich-braunen, nicht fluoreszierenden Kolonien als präsumptive *P. aeruginosa* zählen und ihre Identität mit einem Oxidase-Test, Acetamid-Bouillon und King B-Medium bestätigen.

**Subkultur auf Nährstoffagar**

- Zum Anlegen von Subkulturen Kolonien von dem Membranfilter auf Nährstoffagar für  $22 \pm 2$  hr bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  inkubieren.
- Die anfänglich rötlich-braunen Subkulturen auf Reinheit überprüfen und hinsichtlich einer Oxidasereaktion testen.

**Oxidase-Test**

- Einen Oxidase-Teststreifen auf einen Objektträger legen und 1 Tropfen sterile Kochsalzlösung auf den Streifen geben. 1 frisch isolierte Reinkolonie aufnehmen und auf das Blättchen geben.
- Eine innerhalb von 60 Sekunden auftretende Violettfärbung zeigt eine positive Reaktion im Oxidase-Test an.

**Bestätigung auf King B Agar**

- Oxidase-positive rotbraune Kulturen auf King B-Agar subkultivieren und 24 hr bis 5 Tage bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  inkubieren.
- Die Kultur täglich unter UV-Licht auf Fluoreszenz überprüfen ( $\lambda = 366$  nm).
- Fluoreszierende Kolonien bedeuten positives Wachstum von *P. aeruginosa*.

**Bestätigungstest auf Acetamid-Nährbouillon**

- Ein Röhrchen mit Acetamid-Nährbouillon mit der Subkultur inokulieren und für  $22 \pm 2$  hr bei  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  inkubieren.
- 1 bis 2 Tropfen Nessler-Reagenz zugeben und die Röhrchen auf die Bildung von Ammoniak untersuchen, was an der Färbung von gelb bis ziegelrot erkennbar ist.

**Angabe der Ergebnisse/Berechnungen**

- Bezüglich der Art der Berechnung sind die Standards zu beachten.

**Literatur**

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien.

ISO 11133/A2:2020. Mikrobiologie von Lebensmitteln, Futtermitteln und Wasser — Vorbereitung, Herstellung, Lagerung und Leistungsprüfung von Nährmedien – Änderung 2

ISO 16266:2006. Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung von *Pseudomonas aeruginosa* — Membranfiltrationsverfahren

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

**Revisionshistorie**

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Juli 2021	5068 Ver A	- Bedeutende Änderung - Neues Dokumentdesign - Änderung der Dokumentnummer — vorhergehende Version: V2_05-08_11

BIO-RAD ist eine Marke von Bio-Rad Laboratories, Inc. Alle hierin verwendeten Marken sind Eigentum der jeweiligen Firmen.

## CN Agar

N. catalogo	Descrizione
3563915	<b>CN Agar</b> , pronto all'uso, 20 piastre da 90 mm
3556034	<b>CN Agar</b> , pronto per l'uso, 6 flaconi da 200 ml
3564899	<b>CN Agar</b> , in forma disidratata, 500 g

-----  
Esclusivamente per uso in laboratorio.  
-----

### Uso previsto

Terreno selettivo utilizzato per la ricerca e l'enumerazione di *Pseudomonas aeruginosa* in acqua di bottiglia, acqua destinata alla composizione umana o acqua di piscina (metodo per filtrazione su membrana).

### Principio

Lo *P. aeruginosa* è un batterio gram-negativo che cresce su terreni selettivi contenenti cetrimide e produce piocianina, un pigmento blu-verde. A causa della presenza di cetrimide e acido nalidixico, la crescita dei microorganismi Gram-positivi e di alcuni microorganismi Gram-negativi è inibita. La presenza di cloruro di magnesio e di solfato di potassio nel terreno favorisce la produzione del pigmento piocianina da parte dello *P. aeruginosa*.

### Composizione teorica

#### Terreno di base

Peptone di gelatina	16 g
Idrosilato di caseina	10 g
Solfato di potassio anidro (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Cloruro di magnesio anidro (MgSO <sub>4</sub> )	1,4 g
Bromuro di esadeciltrimetilammonio (cetrimide)	0,2 g
Acido nalidixico	0,015 mg
Glicerolo	10 ml
Terreno di coltura agar	13 g
Acqua distillata	1000 ml
pH finale a 25°C = 7,1 ± 0,2	

### Durata e conservazione

Conservare il terreno pronto per l'uso a 2-8°C al riparo dalla luce. Conservare il terreno disidratato a 15-25°C in un flacone accuratamente sigillato in un luogo fresco e asciutto. Conservare i terreni preparati da base disidratata per 30 giorni a 2-8°C al riparo dalla luce. Conservare i terreni preparati da flaconi pronti per l'uso per 2 settimane a 2-8°C al riparo dalla luce.

### Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

#### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Incubatori o camera di incubazione
- Dispositivo di filtrazione
- Bilance
- Agitatore/omogeneizzatore
- Vortex
- Microscopio per misurazione della fluorescenza
- Camera di osservazione UV portatile senza lampada UV (n. catalogo 3550717, 3550718)

### Materiali in dotazione

- Pinze per manipolazione delle membrane
- Filtri a membrana sterili in esteri di cellulosa ( $\varnothing = 47$  mm,  $0,45$   $\mu\text{m}$ )
- King B Agar (catalogo #3555278, pronto per l'uso, 7 ml x 25 provette)
- Nutrient Agar per analisi dell'acqua (catalogo #3563786, pronto per l'uso, 90 mm x 20 piastre)
- Acetamide Broth (n. catalogo 3554355, pronto all'uso, 25 provette da 5 ml)
- Oxidase (catalogo #35934260, 100 strisce)

### Precauzioni

- Rispettare le buone pratiche di laboratorio (EN ISO 8199). Indossare protezioni adeguate, come guanti e camici da laboratorio, quando si manipolano batteri vivi potenzialmente infettivi
- I terreni entrati in contatto con campioni di acqua devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

### Controllo qualità

Tutti i prodotti fabbricati e commercializzati dalla società Bio-Rad sono sottoposti a un sistema di assicurazione qualità dal momento del ricevimento delle materie prime fino alla commercializzazione dei prodotti finiti. Ciascun lotto di prodotto finito è soggetto a un controllo di qualità conformemente alla norma EN ISO 11133 e viene messo in commercio soltanto se risulta conforme ai criteri di accettazione. La documentazione relativa alla produzione e al controllo di qualità di ciascun lotto è conservata a cura del fabbricante.

### Protocollo

#### Preparazione del flacone pronto per l'uso

- Posizionare il flacone di CN Agar in una vasca con acqua preriscaldata ( $100^{\circ}\text{C}$ ). Portare a ebollizione e mantenere la temperatura finché il terreno non sarà sciolto completamente
- Raffreddare a una temperatura di  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- Versare nelle piastre di Petri (8-10 ml/piastra, ovvero uno spessore di  $\geq 5$  mm) evitando la formazione di bolle d'aria, quindi lasciar seccare

#### Preparazione del terreno disidratato

- Agitare prima dell'uso
- Sciogliere 50,6 g di polvere in 1 L di acqua distillata sterile
- Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino ad ottenere una sospensione omogenea
- Aggiungere 10 ml di glicerolo e sterilizzare in autoclave a  $121 \pm 1^{\circ}\text{C}$  per 15 minuti
- Raffreddare a  $47 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Versare in flaconi o in piastre di Petri da 55 mm (8-10 ml/piastra, pari a uno spessore di  $\geq 5$  mm), evitando la creazione di bolle d'aria e lasciare asciugare

**Rapporto di ricostituzione:** 50,6 g/L (500 g di polvere producono 9,8 L di terreno)

#### Preparazione dei campioni

- Preparare i campioni secondo gli standard applicabili al prodotto in questione

#### Inoculazione e incubazione

- Filtrare 100 ml o 250 ml di campione di acqua attraverso membrana filtrante (selezionare il volume di filtrazione dell'acqua opportuno in base all'origine del campione d'acqua e alla rispettiva direttiva)
- Posizionare ciascun filtro a membrana sulla superficie di una piastra di Petri contenente CN Agar (lato della griglia rivolto verso l'alto)
- Incubare le piastre a  $36 \pm 2^{\circ}\text{C}$  per  $44 \pm 4$  hr in contenitori che impediscono la perdita di umidità

### **Lettura e interpretazione**

- Esaminare le membrane per la crescita dopo  $22 \pm 2$  hr e  $44 \pm 4$  hr. Contare tutte le colonie che producono un pigmento di colore blu-verde (piocianina) come conferma della presenza di *P. aeruginosa*
- Esaminare le membrane sotto la luce UV. Contare tutte le colonie che producono non-piocianina con fluorescenza come *P. aeruginosa* presunta e confermare la loro identità usando il brodo di acetammide come descritto nei test di conferma
- Contare tutte le altre colonie di colore rosso-marrone senza fluorescenza come *P. aeruginosa* presunta e confermare la loro identità usando un test dell'ossidasi, brodo di acetammide e terreno King B

### **Subcoltura con Nutrient Agar**

- Eseguire la subcoltura delle colonie dal filtro a membrana su agar nutriente e incubare a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  per  $22 \pm 2$  hr
- Verificare la purezza delle subcolture e testare la colorazione iniziale rosso-marrone per la reazione all'ossidasi

### **Test dell'ossidasi**

- Posizionare una striscia di ossidasi su un vetrino e depositare 1 goccia di salina sterile sulla striscia. Prendere 1 colonia pura appena isolata e posizionarla sul disco
- Una colorazione viola che si verifica entro 60 secondi indica una reazione positiva per il test dell'ossidasi

### **Conferma con King B Agar**

- Subcoltivare le colture di ossidasi positiva di colore rosso-marrone sull'Agar King B e incubare per 24 hr e fino a 5 giorni a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$
- Esaminare la crescita quotidianamente per verificare la presenza di fluorescenza sotto luce UV ( $\lambda = 366$  nm)
- La crescita di fluorescenza indica una reazione positiva per *P. aeruginosa*

### **Test di conferma con brodo di acetammide**

- Inoculare una provetta di brodo di acetammide con la subcoltura e incubare a  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  per  $22 \pm 2$  hr
- Aggiungere 1-2 gocce di reagente Nessler ed esaminare le provette per verificare la produzione di ammoniaca caratterizzata dalla produzione di una colorazione che va dal giallo al rosso mattone

### **Espressione dei risultati/Calcoli**

- Fare riferimento agli standard per la modalità di calcolo

### **Riferimenti**

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

## Cronologia delle revisioni

<b>Data di pubblicazione</b>	<b>Numero documento</b>	<b>Modifica</b>
Luglio 2021	5068 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Modifica importante</li><li>- Nuova struttura del documento</li><li>- Modifica al numero di documento – versione precedente: V2_05-08_11</li></ul>

BIO-RAD è un marchio registrato di Bio-Rad Laboratories, Inc. Tutti i marchi registrati qui utilizzati sono di proprietà del rispettivo proprietario.

## CN Agar

Nº catálogo	Descrição
3563915	<b>CN Agar</b> , pronto para uso, 20 placas de 90 mm
3556034	<b>CN Agar</b> , pronto para uso, 200 ml x 6 frascos
3564899	<b>CN Agar</b> , desidratado, 500 g

Somente para uso em laboratório.

### Uso previsto

Meio seletivo utilizado para a detecção e enumeração de *Pseudomonas aeruginosa* na água engarrafada, água para composição humana ou água de piscina (método de filtração por membrana).

### Princípio

*P. aeruginosa* é uma bactéria gram-negativa que cresce em meios seletivos contendo cetrimida e produz piocianina, um pigmento verde-azulado. Devido à presença de cetrimida e ácido nalidíxico, o crescimento de micro-organismos Gram-positivos e alguns Gram-negativos são inibidos. A presença de cloreto de magnésio e sulfato de potássio no meio promove a produção de pigmento de piocianina pela *P. aeruginosa*.

### Composição teórica

#### Meio de Base

Peptona de gelatina	16 g
Hidrolisado de caseína	10 g
Sulfato de potássio anidro (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Cloreto de magnésio anidro (MgSO <sub>4</sub> )	1,4 g
Brometo de hexadeciltrimetilamônio (cetrimida)	0,2 g
Ácido nalidíxico	0,015 mg
Glicerol	10 ml
Ágar	13 g
Água destilada	1.000 ml

pH final a 25 °C = 7,1 ± 0,2

### Prazo de validade e armazenamento

Armazene o meio pronto para uso a 2–8 °C protegido da luz. Armazene o meio desidratado a 15–25 °C em frascos cuidadosamente fechados em um local fresco e seco. Armazene os meios preparados com base desidratada por 30 dias a 2–8 °C protegidos da luz. Armazene os meios preparados a partir de frascos prontos para uso por 2 semanas a 2–8 °C ao abrigo da luz.

### Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

#### Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Incubadoras ou sala de incubação
- Dispositivo de filtração
- Balanças
- Misturador/homogeneizador
- Agitador
- Microscópio para medição de fluorescência
- Câmara de observação UV portátil sem lâmpada UV (Nº do catálogo 3550717, 3550718)

### Suprimentos

- Pinça para manuseio de membranas
- Membranas de filtro de éster de celulose estéril ( $\varnothing = 47$  mm, 0,45  $\mu$ m)
- King B agar (N° do catálogo 3555278, pronto para uso, 7 ml x 25 tubos)
- Nutrient Agar for Water Testing (N° do catálogo 3563786, pronto para uso, 90 mm x 20 placas)
- Acetamide Broth (N° do catálogo 3554355, pronto para uso, 5 ml x 25 tubos)
- Oxidase (N° do catálogo 35934260, 100 tiras)

### Precauções

- Respeite as Boas Práticas de Laboratório (EN ISO 8199). Proteção adequada, como luvas e jalecos, deve ser usada ao trabalhar com bactérias vivas potencialmente infecciosas
- Os meios que tiverem entrado em contato com amostras de água devem ser considerados contaminados e devem ser descartados de acordo com as regras e regulamentos locais
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite [bio-rad.com](http://bio-rad.com)

### Controle de Qualidade

Todos os produtos fabricados e comercializados pela Bio-Rad estão sujeitos aos procedimentos de garantia de qualidade em todas as etapas, desde o recebimento da matéria-prima até a comercialização do produto final. Cada lote de produto acabado passa por um controle de qualidade de acordo com a EN ISO 11133 e é comercializado apenas quando satisfaz os critérios de aceitabilidade. A documentação relativa à produção e ao controle de qualidade de cada lote é mantida arquivada.

### Protocolo

#### Preparação do Frasco Pronto para Uso

- Posicione o frasco de CN Ágar em um banho-maria pré-aquecido (100 °C). Deixe ferver e mantenha a temperatura até que o meio esteja completamente dissolvido
- Resfrie a uma temperatura de  $47 \pm 2$  °C
- Despeje em placas de Petri (8–10 ml/placa, ou seja, uma espessura de  $\geq 5$  mm), evitando a criação de bolhas de ar e deixe secar

#### Preparação do Meio Desidratado

- Agite antes de usar
- Dissolva 50,6 g de pó em 1 L de água destilada estéril
- Aqueça suavemente, agitando com frequência, em seguida, leve à fervura até que uma suspensão homogênea seja obtida
- Adicione 10 ml de glicerol e esterilize em autoclave a  $121 \pm 1$  °C por 15 min
- Resfrie a  $47 \pm 2$  °C. Despeje em ampolas ou placas de Petri de 55 mm (8–10 ml/placa, ou seja, uma espessura de  $\geq 5$  mm), evitando a criação de bolhas de ar e deixe secar

**Taxa de reconstituição:** 50,6 g/L (500 g de pó faz 9,8 L de meio)

#### Preparação da amostra

- Prepare amostras de acordo com os padrões para o produto em questão

#### Inoculação e Incubação

- Filtre 100 ml ou 250 ml de amostra de água através do filtro de membrana (selecione o volume de filtração de água apropriado de acordo com a origem da amostra de água e a respectiva diretiva)
- Coloque cada filtro de membrana na superfície de uma placa de Petri contendo CN Ágar (lado da grade para cima)
- Deixe encubar as placas a  $36 \pm 2$  °C por  $44 \pm 4$  hr em recipientes que evitem a perda de umidade

#### Leitura e Interpretação

- Examine as membranas quanto ao crescimento após  $22 \pm 2$  hr e  $44 \pm 4$  hr. Conte todas as colônias que produzem pigmento verde-azulado (piocianina), conforme confirmado *P. aeruginosa*
- Examine as membranas sob luz ultravioleta. Conte todas as colônias não produtoras de piocianina que apresentam fluorescência como *P. aeruginosa* presuntiva e confirme sua identidade usando caldo de acetamida, conforme descrito nos testes de confirmação
- Conte todas as outras colônias marrom-avermelhadas que não apresentam fluorescência como *P. aeruginosa* presuntiva e confirme sua identidade usando um teste de oxidase, caldo de acetamida e meio King B



**Subcultura em Ágar Nutriente**

- Realize subcultura das colônias do filtro de membrana em ágar nutriente e deixe incubar a  $36 \pm 2$  °C por  $22 \pm 2$  hr
- Verifique as subculturas quanto à pureza e teste que inicialmente eram marrom-avermelhadas quanto à reação de oxidase

**Teste de Oxidase**

- Coloque uma tira de oxidase em uma lâmina de microscópio e deposite 1 gota de solução salina estéril na tira. Pegue uma colônia pura recém-isolada e coloque-a no disco
- Uma coloração violeta ocorrendo dentro de 60 segundos indica uma reação positiva para o teste de oxidase

**Confirmação em Ágar King B**

- Realize subcultura de culturas de cor marrom-avermelhada positivas para oxidase em Ágar King B e incube por 24 hr até 5 dias a  $36 \pm 2$  °C
- Examine o crescimento diariamente para fluorescência sob luz ultravioleta ( $\lambda = 366$  nm)
- O crescimento fluorescente indica uma reação positiva para *P. aeruginosa*

**Teste de confirmação em caldo acetamida**

- Inocule um tubo de caldo acetamida com a subcultura e incube a  $36 \pm 2$  °C por  $22 \pm 2$  hr
- Adicione 1 a 2 gotas de reagente Nessler e examine os tubos quanto à produção de amônia, caracterizada pela produção de uma cor que varia do amarelo ao vermelho tijolo

**Expressão de Resultados/Cálculos**

- Consulte os padrões para o modo de cálculo

**Referências**

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

**Histórico de Revisão**

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Julho de 2021	5068 Ver A	- Alteração importante - Novo design de documento - Alteração do número do documento — versão anterior: V2_05-08_11

BIO-RAD é uma marca comercial da Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas as marcas comerciais usadas neste documento são de propriedade de seus respectivos proprietários.

## CN Agar

### Referencia # Descripción

3563915	<b>CN Agar</b> , listo para el uso, 90 mm x 20 placas
3556034	<b>CN Agar</b> , listo para el uso, 200 ml x 6 frascos
3564899	<b>CN Agar</b> , deshidratado, 500 g

---

Sólo para uso en laboratorio.

---

### Uso previsto

Medio selectivo utilizado para la detección y enumeración de *Pseudomonas aeruginosa* en agua embotellada, agua destinada al consumo humano o agua de piscina (método de filtración en membrana).

### Principio

La *P. aeruginosa* es una bacteria Gram negativa que crece en medios selectivos que contienen cetrimida y produce piocianina, un pigmento verde azulado. Debido a la presencia de cetrimida y ácido nalidíxico, se inhibe el crecimiento de los microorganismos Gram-positivos y de algunos Gram-negativos. La presencia de cloruro de magnesio y sulfato de potasio en el medio promueve la producción de pigmento de piocianina de la *P. aeruginosa*.

### Composición teórica

#### Medio base

Peptona de gelatina	16 g
Hidrolizado de caseína	10 g
Sulfato de potasio anhidro (K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> )	10 g
Cloruro de magnesio anhidro (MgSO <sub>4</sub> )	1,4 g
Bromuro de hexadeciltrimetilamonio (cetrimida)	0,2 g
Ácido nalidíxico	0,015 mg
Glicerol	10 ml
Agar	13 g
Agua destilada	1.000 ml

pH final a 25 °C = 7,1 ± 0,2

### Vida útil y almacenamiento

Almacenar el medio listo para su uso a 2-8 °C protegido de la luz. Almacenar el medio deshidratado a 15-25 °C en frascos bien cerrados en un lugar fresco y seco. Almacenar el medio preparado a partir de la base deshidratada durante 30 días a 2-8 °C protegido de la luz. Almacenar el medio preparado en frascos listos para usar durante 2 semanas a 2-8 °C protegidos de la luz.

### Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

#### Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Incubadoras o sala de incubación
- Equipo de filtración
- Balanzas
- Agitador/homogeneizador
- Vórtex
- Microscopio para medir la fluorescencia
- Cámara de observación UV portátil sin lámpara UV (referencia #3550717, #3550718)

## Fungibles

- Fórceps para manipular las membranas
- Filtros estériles de membrana de éster de celulosa ( $\varnothing = 47$  mm,  $0,45$   $\mu$ m)
- King B Agar (referencia #3555278, listo para usar, 7 ml x 25 tubos)
- Nutrient Agar for Water Testing (referencia #3563786, listo para usar, placas de 90 mm x 20)
- Acetamide Broth (referencia #3554355, listo para su uso, 5 ml x 25 tubos)
- Oxidase (referencia #35934260, 100 tiras)

## Precauciones

- Deben respetarse las buenas prácticas de laboratorio (EN ISO 8199). Usar protección adecuada, como guantes y batas de laboratorio, cuando se trabaja con bacterias vivas potencialmente infecciosas
- Los medios que han estado en contacto con muestras de agua deben considerarse contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- Visite [bio-rad.com](http://bio-rad.com) para obtener información de seguridad del producto (SDS) y certificados de análisis

## Control de calidad

Todos los productos fabricados y comercializados por Bio-Rad están sujetos a un protocolo de garantía de calidad en todas las etapas, desde la recepción de las materias primas hasta la comercialización de los productos terminados. Cada lote de producto terminado se somete a un control de calidad según la norma EN ISO 11133 y sólo se comercializa si cumple los criterios de aceptabilidad. La documentación relativa a la producción y al control de calidad de cada lote se mantiene archivada.

## Protocolo

### Preparación de frascos listos para usar

- Colocar el frasco de Agar CN en un baño de agua precalentado ( $100$  °C). Llevar a ebullición y mantener la temperatura hasta que el medio esté completamente disuelto
- Enfriar hasta una temperatura de  $47 \pm 2$  °C
- Verter en las placas de Petri (8-10 ml/placa, es decir, un espesor de  $\geq 5$  mm), evitando la aparición de burbujas de aire y dejar solidificar

### Preparación del medio deshidratado

- Agitar antes de usar
- Disolver 50,6 g de polvo en 1 L de agua destilada estéril
- Calentar suavemente, agitando con frecuencia, y luego llevar a ebullición hasta obtener una suspensión homogénea
- Añadir 10 ml de glicerol y esterilizar en autoclave a  $121 \pm 1$  °C durante 15 minutos
- Enfriar a  $47 \pm 2$  °C. Verter en viales o en placas de Petri de 55 mm (8-10 ml/placa, es decir, un espesor de  $\geq 5$  mm), evitando la formación de burbujas de aire y dejar solidificar

**Proporción de reconstitución:** 50,6 g/L (con 500 g de polvo se obtienen 9,8 L de medio)

### Preparación de las muestras

- Preparar las muestras según los estándares aplicables al producto en cuestión

### Inoculación e incubación

- Filtrar 100 ml o 250 ml de muestra de agua a través del filtro de membrana (seleccionar el volumen de filtración de agua apropiado según el origen de la muestra de agua y la directiva correspondiente)
- Colocar cada filtro de membrana en la superficie de una placa de Petri que contenga Agar CN (con la cuadrícula hacia arriba)
- Incubar las placas a  $36 \pm 2$  °C durante  $44 \pm 4$  hr en recipientes que eviten la pérdida de humedad

### Lectura e interpretación

- Examinar las membranas en busca de crecimiento después de  $22 \pm 2$  hr y  $44 \pm 4$  hr. Contar todas las colonias que produzcan pigmento azul verdoso (piocianina) como la *P. aeruginosa* confirmada
- Examinar las membranas bajo la luz ultravioleta. Contar todas las colonias que no produzcan piocianina y que sean fluorescentes como presuntas *P. aeruginosa* y confirmar su identidad utilizando caldo de acetamida como se describe en las pruebas de confirmación
- Contar todas las demás colonias de color marrón rojizo que no presenten fluorescencia como presuntas *P. aeruginosa* y confirmar su identidad mediante una prueba de oxidasa, caldo de acetamida y medio King B

### Subcultivo en agar nutritivo

- Subcultivar las colonias del filtro de membrana en agar nutritivo e incubar a  $36 \pm 2$  °C durante  $22 \pm 2$  hr
- Comprobar la pureza de los subcultivos y comprobar si la reacción de la oxidasa es de color marrón rojizo

### Prueba de oxidasa

- Colocar una tira de oxidasa en un portaobjetos y depositar 1 gota de solución salina estéril en la tira. Tomar 1 colonia pura recién aislada y colocarla en el disco
- Una coloración violeta que se produce en 60 segundos indica una reacción positiva para la prueba de la oxidasa

### Confirmación en Agar King B

- Subcultivar los cultivos de color marrón rojizo positivos a la oxidasa en Agar King B e incubar durante 24 hr hasta 5 días a  $36 \pm 2$  °C
- Examinar diariamente el crecimiento para comprobar la fluorescencia bajo luz ultravioleta ( $\lambda = 366$  nm)
- El crecimiento fluorescente indica una reacción positiva para *P. aeruginosa*

### Prueba de confirmación en caldo de acetamida

- Inocular un tubo de caldo de acetamida con el subcultivo e incubar a  $36 \pm 2$  °C durante  $22 \pm 2$  hr
- Añadir de 1 a 2 gotas de reactivo de Nessler y examinar los tubos para la producción de amoníaco caracterizado por la producción de un color que va del amarillo al rojo ladrillo

### Expresión de resultados/cálculos

- Consulte los estándares para ver el modo de cálculo

## Referencias

Brown, V.I., Lowbury, E.J.L. (1965) *J. Clin. Path.*, 18, 752-756

Gotto, S., and Enamotos, S. (1970) *Jap. J. Microbiol.*, 14, 65-72.

ISO 11133:2014. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media

ISO 11133/A2:2020. Microbiology of food, animal feed and water — Preparation, production, storage and performance testing of culture media – Amendment 2

ISO 16266:2006. Water quality — Detection and enumeration of *Pseudomonas aeruginosa* – Method by membrane filtration

Lilly, H.A., and Lowbury, E.J.L. (1972) *J. Med. Microbiol.*, 5, 151-153.

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.B. (1955) *J. Clin. Path.*, 8, 47-48.

## Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Julio 2021	5068 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Cambio significativo</li><li>- Nuevo diseño del documento</li><li>- Cambio en el número de documento – versión anterior: V2_05-08_11</li></ul>

BIO-RAD es una marca registrada de Bio-Rad Laboratories, Inc. Todas las marcas comerciales aquí indicadas son propiedad de sus respectivos propietarios.