

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

Catalog #	Description
3554419	TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin) , ready-to-use, 100 ml x 6 bottles
3569644	TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin) , dehydrated, 500 g

For laboratory use only.

Intended Use

Base medium used for the detection and enumeration of sulfite-reducing anaerobic bacteria in food products and water.

Principle

The principle of the medium relies on the ability of *Clostridium* to reduce sulfites to sulfide which, in the presence of ferric citrate, forms a black precipitate of iron sulfide around the colonies. Due to the presence of D-cycloserin, the medium inhibits the growth of other bacteria. Incubation at 46°C enhances the selectivity of the medium to *Clostridium perfringens*.

Theoretical Composition

Base Medium

Peptone	15 g
Soy peptone	5 g
Yeast extract	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Ferric ammonium citrate III	1 g
Agar	15 g
Distilled water	1,000 ml
Final pH at 25°C = 7.6 ± 0.2	

Shelf Life and Storage

Store ready-to-use at 2–8°C. Store dehydrated medium at 15–25°C in carefully sealed bottles in a cool, dry place.

Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Filtration device
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer

Supplies

- 150 ml Pyrex bottles with autoclave proof stoppers
- Sterile cellulose-ester membrane filters (Ø = 47 mm, 0.45 µm)
- Sterile pipettes (1 ml, etc)
- Sterile Petri dishes (Ø = 90 mm)
- Equipment for anaerobic culture (cloche, catalyst, etc)

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 food or water samples should be considered contaminated and should be disposed of in accordance with local rules and regulations
- D-cycloserin should not be added to a base medium at a temperature exceeding 49°C
- To avoid re-oxygenation of the medium, it should not be stirred vigorously
- For SDS product safety information and certificate of analysis, visit **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

Dehydrated Medium Preparation

- Shake before use
- Dissolve 42 g of powder in 1 L of sterile distilled water
- Wait for 5 mins, then mix thoroughly until a homogenous suspension is obtained
- Heat gently, agitating frequently, then bring to a boil until completely dissolved
- Dispense in tubes or bottles (100 ml) and sterilize in autoclave at $121 \pm 1^\circ\text{C}$ for 15 minutes

Reconstitution Ratio: 42 g/L (500 g of powder makes 11.9 L of medium)

Complete Medium Preparation with Cycloserin

- Just prior to use, add 1 ml of a 4% solution of filter sterilized D-cycloserin to 100 ml of tempered (44–49°C) medium

Complete Medium Preparation with Cycloserin and Egg Yolk

- To the base medium (100 ml) containing cycloserin, add 8 ml of a 50% solution of egg yolk in physiological water
- When using this version of the medium, spread 0.1 ml decimal dilutions of the sample per plate

Sample Preparation

- Prepare samples according to the standards for the product concerned

Inoculation and Incubation for Food Standards

Depth inoculation (NF V08-019)

- Place 1 ml of the original suspension or decimal dilution in 2 Petri dishes and add 12–15 ml of tempered agar (44–49°C). Homogenize by swirling and leave to solidify. Pour another layer of agar (about 5 ml) and allow to dry
- Incubate in anaerobic conditions at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 20 hr

Inoculation and Incubation for Water Standards

Inoculation in tubes (NF T90-415)

- Add 20 ml of tempered agar (44–49°C) to a tube containing the test sample
- Incubate in anaerobic conditions at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 and/or 48 hr

Membrane filtration technique

- Filter the test sample and place the membrane in a Petri dish (grid side up) avoiding the creation of air bubbles
- Add 18 ml of tempered medium (44–49°C) without D-cycloserin and allow to cool
- Incubate in anaerobic conditions at $37 \pm 1^\circ\text{C}$ for 24 and 48 hr

Membrane filtration method

- Filter the test sample avoiding the creation of air bubbles between the filter and the filtration device
- Place the membrane (grid side up) on a Petri dish containing TSC with D-cycloserin avoiding the creation of air bubbles
- Incubate in anaerobic conditions at $44 \pm 1^\circ\text{C}$ for 21 ± 3 hr

Reading and Interpretation

- Examine the membranes for sulfite-reducing anaerobes: black colonies with a black halo
- Only enumerate from Petri dishes presenting colonies that are clearly distinct from one another
- Perform further tests according to the standards for the specific enumeration of *C. perfringens*
- When egg yolk is present in the medium, colonies of *C. perfringens* are black and usually surrounded by an opaque halo caused by the lecithinase of the bacterium

References

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique.

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 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions

NF EN 26461-2 July 1993: Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

NF T90-415 October 1985: Testing water — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobic bacteria and sulfite-reducing (Clostridia) — General method by standing tube technique

Official Journal of the European Communities — Council Directives 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption - Annex III: Specifications for the analysis of parameters.

Obligatory microbiological criteria for foodstuffs of animal origin — General methods of bacteriological analysis (Decree of 21 December 1979 in JO dated 19 January 1980, amended by Decrees of: 7 September 1984 in JO dated 29 September 1984; 5 March 1985 in JO dated 23 March 1985; 2 June 1988 in JO dated 8 July 1988; 13 March 1989 in JO dated 20 April 1989).

Revision History

Release date	Document number	Change
July 2021	5070 Ver A	- Major change - New document design - Document number change — previous version: V4 05-08 11

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

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

Référence	Description
3554419	TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin) , prêt à l'emploi, 100 ml x 6 flacons
3569644	TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin) , base déshydratée, 500 g

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

Usage prévu

Milieu de base utilisé pour la recherche et le dénombrement des bactéries anaérobies sulfite-réductrices dans les produits alimentaires et les eaux.

Principe

Le principe du milieu repose sur la capacité de *Clostridium* à réduire les sulfites en sulfures, qui, en présence de citrate de fer, forment un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies. Ce milieu inhibe le développement des autres bactéries par la présence de D-cyclosérine. L'incubation à 46 °C renforce la sélectivité du milieu vis-à-vis de *Clostridium perfringens*.

Formule théorique

Milieu de base

Peptone	15 g
Peptone de soja	5 g
Extrait de levure	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Citrate d'ammonium ferrique III	1 g
Agar	15 g
Eau distillée	1 000 ml

pH final à 25 °C = 7,6 ± 0,2

Durée de conservation et stockage

Milieu prêt à l'emploi : 2–8 °C. Milieu déshydraté : 15–25 °C en flacons soigneusement scellés, dans un endroit froid et sec.

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

Produits

- Flacons en Pyrex de 150 ml avec bouchons autoclavables
- Membranes filtrantes en ester de cellulose stériles (Ø = 47 mm, 0,45 µm)
- Pipettes stériles (1 ml, etc.)
- Boîtes de Petri stériles (Ø = 90 mm)
- Équipement de culture anaérobie (cloche, catalyseur, etc.)

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 alimentaires ou d'eau doivent être considérés comme contaminés et doivent être éliminés conformément aux règles et réglementations locales.
- La D-cyclosérine ne doit pas être ajoutée au milieu de base à une température supérieure à 49 °C
- Ne pas agiter violemment le milieu afin d'éviter toute ré-oxygénation de ce dernier.
- Pour obtenir les informations sur la sécurité du produit (fiche de données de sécurité, FDS) et le certificat d'analyse, visiter **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 du milieu déshydraté

- Agiter avant utilisation
- Dissoudre 42 g de poudre dans 1 L d'eau distillée stérile
- Attendre 5 minutes puis bien mélanger jusqu'à obtention d'une suspension homogène
- Chauffer doucement en mélangeant fréquemment, puis amener à ébullition jusqu'à dissolution complète
- Distribuer dans des tubes ou flacons (100 ml) et stériliser en autoclave à 121 ± 1 °C pendant 15 minutes

Taux de reconstitution : 42 g/L (500 g de poudre donnent 11,9 L de milieu)

Préparation du milieu complet avec cyclosérine

- Immédiatement avant utilisation, ajouter 1 ml d'une solution à 4 % de D-cyclosérine stérilisée par filtration à 100 ml de milieu tempéré (44–49 °C)

Préparation du milieu complet avec cyclosérine et jaune d'œuf

- Ajouter 8 ml d'une solution à 50 % de jaune d'œuf en eau physiologique au milieu de base (100 ml) contenant de la cyclosérine
- Avec cette préparation du milieu, répartir 0,1 ml des dilutions décimales de l'échantillon par boîte

Préparation des échantillons

- Préparer les échantillons conformément aux normes applicables au produit concerné

Inoculation et incubation pour les normes alimentaires

Insemencement en masse (NF V08-019)

- Placer 1 ml de suspension mère ou de sa dilution décimale dans deux boîtes de Petri et ajouter 12–15 ml de gélose tempérée (44–49 °C). Homogénéiser en mélangeant et laisser solidifier. Verser une autre couche de gélose (environ 5 ml) et laisser sécher
- Incuber en condition anaérobie à 37 ± 1 °C pendant 20 hr

Inoculation et incubation pour les normes des eaux

Inoculation en tubes (NF T90-415)

- Ajouter 20 ml de gélose tempérée (44–49 °C) à un tube contenant l'échantillon de test
- Incuber en condition anaérobie à 37 ± 1 °C pendant 24 et/ou 48 hr

Technique de filtration sur membrane

- Filtrer l'échantillon de test et placer la membrane dans une boîte de Petri (face quadrillée vers le haut) en évitant la formation de bulles d'air
- Ajouter 18 ml de milieu tempéré (44–49 °C) sans D-cyclosérine et laisser refroidir
- Incuber en condition anaérobie à 37 ± 1 °C pendant 24 et 48 hr

Méthode par filtration sur membrane

- Filtrer l'échantillon de test en évitant la formation de bulles d'air entre le filtre et le dispositif de filtration
- Placer la membrane (face quadrillée vers le haut) sur une boîte de Petri contenant de la gélose TSC avec D-cyclosérine en évitant la formation de bulles d'air
- Incuber en condition anaérobie à 44 ± 1 °C pendant 21 ± 3 hr

Lecture et interprétation

- Examiner les membranes à la recherche de colonies noires entourées d'un halo noir, caractéristiques des bactéries anaérobies sulfito-réductrices
- Effectuer le dénombrement uniquement sur les boîtes de Petri présentant des colonies clairement distinctes les unes des autres
- Réaliser des tests complémentaires conformément aux normes applicables pour le dénombrement spécifique de *C. perfringens*
- En présence de jaune d'œuf dans le milieu, les colonies de *C. perfringens* sont noires et habituellement entourées d'un halo opaque dû à la lécithinase de la bactérie

Références

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) — Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane

ISO 7937:2004. Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* — Technique par comptage des colonies.

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 15213:2003. Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies

NF EN 26461-2 juillet 1993 : Qualité de l'eau — Recherche et dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) — Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane

NF T90-415 octobre 1985 : Essais des eaux — Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de (*Clostridium*) sulfito-réducteurs — Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds

Journal officiel de l'Union européenne — Directive 98/83/CE du Conseil relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine — Annexe III : Spécifications pour l'analyse des paramètres.

Critères microbiologiques auxquels doivent satisfaire certaines denrées animales ou d'origine animale — Méthodes générales d'analyse bactériologique (arrêté du 21 décembre 1979 publié dans le Journal officiel en date du 19 janvier 1980, modifié par les arrêtés des : 7 septembre 1984 publié dans le Journal officiel en date du 29 septembre 1984 ; 5 mars 1985 publié dans le Journal officiel en date du 23 mars 1985 ; 2 juin 1988 publié dans le Journal officiel en date du 8 juillet 1988 ; 13 mars 1989 publié dans le Journal officiel en date du 20 avril 1989).

Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Juillet 2021	5070 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Modification importante- Nouvelle conception de document- Modification du numéro de document — version précédente : V4_05-08_11

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

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

Katalog-Nr. Beschreibung

3554419 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, gebrauchsfertig, 6 Flaschen x 100 ml
3569644 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, dehydriert, 500 g

Nur für die Verwendung im Labor.

Verwendungszweck

Basismedium für den Nachweis und die Zählung sulfitreduzierender anaerober Bakterien in Lebensmitteln und Wasser.

Prinzip

Das Prinzip des Mediums beruht auf der Fähigkeit von *Clostridium*, Sulfite zu Sulfid zu reduzieren, das in Gegenwart von Eisen(III)-citrat einen schwarzen Niederschlag aus Eisensulfid um die Kolonien bildet. Aufgrund des Vorhandenseins von D-Cycloserin im Medium wird das Wachstum anderer Bakterien gehemmt. Die Inkubation bei 46°C erhöht die Selektivität des Mediums gegenüber *Clostridium perfringens*.

Theoretische Zusammensetzung

Basismedium

Pepton	15 g
Sojapepton	5 g
Hefeextrakt	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Ammoniumeisen(III)-citrat	1 g
Agar	15 g
Destilliertes Wasser	1.000 ml

Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,6 ± 0,2

Haltbarkeit und Lagerung

Gebrauchsfertiges Medium bei 2 – 8°C lagern. Dehydriertes Medium in der sorgfältig verschlossenen Flasche kühl und trocken bei 15 – 25°C lagern.

Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Inkubatoren oder Inkubationsraum
- Filtrationsvorrichtung
- Waagen
- Rührer/Homogenisator
- Vortex

Zubehör

- 150 ml-Pyrexflaschen mit autoklavierbarem Stopfen
- Sterile Celluloseester-Membranfilter (Ø = 47 mm, 0,45 µm)
- Sterile Pipetten (1 ml usw.)
- Sterile Petrischalen (Ø = 90 mm)
- Produkte zum Anlegen anaerober Kulturen (Durham-Röhrchen, Katalysator usw.)

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 Lebensmittel- oder Wasserproben in Kontakt gekommen sind, sind als kontaminiert zu betrachten und den vor Ort geltenden Vorschriften und Bestimmungen entsprechend zu entsorgen.
- D-Cycloserin sollte dem Basismedium bei einer Temperatur unter 49°C zugesetzt werden.
- Zur Vermeidung einer erneuten Oxygenierung des Mediums sollte dieses nur leicht gerührt werden.
- 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

Herstellung des Mediums ausgehend vom dehydrierten Pulver

- Vor Gebrauch schütteln.
- 42 g Pulver in 1 L sterilem destilliertem Wasser lösen.
- Fünf (5) Minuten warten, dann gründlich mischen, bis eine homogene Suspension entstanden ist.
- Unter ständigem Rühren vorsichtig erhitzen und zum Kochen bringen, bis sich das Medium vollständig gelöst hat.
- In Röhrrchen bzw. Flaschen (100 ml) pipettieren und in einem Autoklaven 15 Minuten bei $121 \pm 1^\circ\text{C}$ sterilisieren.

Rekonstitutionsverhältnis: 42 g/L (500 g Pulver ergeben 11,9 L Medium)

Herstellung von Komplettmedium mit Cycloserin

- Unmittelbar vor der Verwendung 1 ml einer 4%-igen Lösung aus filtersterilisiertem D-Cycloserin zu 100 ml temperiertem (44 – 49°C) Medium geben

Herstellung von Komplettmedium mit Cycloserin und Eigelb

- Zu dem Basismedium (100 ml) mit Cycloserin 8 ml einer 50%-igen Lösung von Eigelb in physiologischer Kochsalzlösung geben.
- Bei Verwendung dieser Version des Mediums 0,1 ml Dezimalverdünnung der Probe je Platte ausstreichen.

Probenvorbereitung

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

Beimpfung und Inkubation, Lebensmittelstandards

Plattengußverfahren (NF V08-019)

- 1 ml der Ausgangssuspension oder eine Dezimalverdünnung in 2 Petrischalen geben und 12 – 15 ml temperierten Agar (44 – 49°C) zugeben. Durch Schwenken homogenisieren und fest werden lassen. Eine weitere Schicht Agar (ca. 5 ml) aufbringen und trocknen lassen.
- Unter anaeroben Bedingungen 20 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.

Beimpfung und Inkubation gemäß Wasserstandards

Beimpfung in Röhrrchen (NF T90-415)

- 20 ml temperierten Agar (44 – 49°C) in ein Röhrrchen mit der Testprobe geben.
- Unter anaeroben Bedingungen 24 und/oder 48 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.

Membranfiltrationstechnik

- Die Testprobe filtrieren und die Membran in eine Petrischale legen (Rasterseite nach oben). Dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.
 - 18 ml temperiertes Medium (44 – 49°C) ohne D-Cycloserin zugeben und abkühlen lassen.
 - Unter anaeroben Bedingungen 24 und 48 hr bei $37 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.
-

Membranfiltrationsverfahren

- Die Testprobe filtrieren. Dabei die Bildung von Luftblasen zwischen Filter und Filtrationsvorrichtung vermeiden.
- Die Membran in eine Petrischale mit TSC mit D-Cycloserin legen (Rasterseite nach oben) und dabei die Bildung von Luftblasen vermeiden.
- Unter anaeroben Bedingungen 21 ± 3 hr bei $44 \pm 1^\circ\text{C}$ inkubieren.

AbleSEN und Auswerten der Ergebnisse

- Die Membranen auf sulfitreduzierende anaerobe Keime (schwarze Kolonien mit schwarzem Hof) untersuchen.
- Für die Zählung nur Petrischalen mit Kolonien verwenden, die klar voneinander abgegrenzt sind.
- Weitere normgerechte Tests für die spezifische Zählung von *C. perfringens* durchführen.
- Wenn Eigelb im Medium vorhanden ist, sind Kolonien von *C. perfringens* schwarz und normalerweise von einem opaken Hof umgeben, der durch die Lecithinase des Bakteriums verursacht wird.

Literatur

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung der Sporen sulfitreduzierender Anaerobier (Clostridien) — Teil 2: Membranfiltrationsverfahren

ISO 7937:2004. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Zählung von *Clostridium perfringens* — Koloniezählverfahren.

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 15213:2003. Mikrobiologie von Lebensmitteln und Futtermitteln — Horizontales Verfahren zur Zählung von unter anaeroben Bedingungen wachsenden sulfitreduzierenden Bakterien

NF EN 26461-2 Juli 1993: Wasserbeschaffenheit — Nachweis und Zählung der Sporen sulfitreduzierender Anaerobier (Clostridien) — Teil 2: Membranfiltrationsverfahren

NF T90-415 Oktober 1985: Wasseruntersuchungen — Nachweis und Zählung sulfitreduzierender Anaerobier und sulfitreduzierender (Clostridien) — Allgemeines Verfahren mit Anwendung einer Standardröhrchentechnik

Amtsblatt der Europäischen Gemeinschaften — Richtlinie 98/83/EG des Rates über die Qualität von Wasser für den menschlichen Gebrauch — Anhang III: Spezifikationen für die Analyse der Parameter.

Obligatorische mikrobiologische Kriterien für Lebensmittel tierischen Ursprungs — Allgemeine Methoden der bakteriologischen Analyse (Erlass vom 21. Dezember 1979 im Amtsblatt vom 19. Januar 1980, geändert durch die Verordnungen vom: 7. September 1984 im Amtsblatt vom 29. September 1984; 5. März 1985 im Amtsblatt vom 23. März 1985; 2. Juni 1988 im Amtsblatt vom 8. Juli 1988; 13. März 1989 im Amtsblatt vom 20. April 1989).

Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
Juli 2021	5070 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Bedeutende Änderung- Neues Dokumentdesign- Änderung der Dokumentnummer — vorhergehende Version: V4_05-08_11

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

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

N. catalogo Descrizione

3554419 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, pronto per l'uso, 100 ml x 6 flaconi
3569644 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, in forma disidratata, 500 g

Esclusivamente per uso in laboratorio.

Uso previsto

Terreno di base utilizzato per la rilevazione e il conteggio dei batteri anaerobi solfito-riduttori in alimenti e acqua.

Principio

Il principio del terreno si basa sulla capacità di *Clostridium* di ridurre i solfiti in solfuri, i quali reagiscono con il citrato ferrico formando un precipitato nero di solfuro di ferro attorno alle colonie. A causa della presenza di D-cicloserina, il terreno inibisce la crescita dei batteri positivi. L'incubazione a 46°C migliora la selettività del terreno per *Clostridium perfringens*.

Composizione teorica

Terreno di base

Peptone	15 g
Peptone di soia	5 g
Estratto di lievito	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Citrato ferrico di ammonio III	1 g
Terreno di coltura agar	15 g
Acqua distillata	1000 ml
pH finale a 25°C = 7,6 ± 0,2	

Durata e conservazione

Conservare pronto per l'uso a 2-8°C. Conservare il terreno disidratato a 15-25°C in un flacone accuratamente sigillato in un luogo fresco e asciutto.

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

Materiali in dotazione

- Flaconi in pyrex (150 ml) con tappi sterilizzabili in autoclave
- Filtri a membrana sterili in esteri di cellulosa (Ø = 47 mm, 0,45 µm)
- Pipette sterili (1 ml, ecc.)
- Piastre Petri sterili (Ø = 90 mm)
- Attrezzatura per la coltura di batteri anaerobi (tubo di Durham, catalizzatore, ecc.)

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 alimenti o acqua devono essere considerati come contaminati e quindi smaltiti in conformità alle normative e direttive locali
- La D-cicloserina non deve essere aggiunta al terreno di base a temperature superiori a 49°C
- Per evitare la riossigenazione del terreno, non agitarlo con forza
- Per informazioni sulla sicurezza del prodotto (schede dati di sicurezza) e il certificato di analisi, visitare **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 terreno disidratato

- Agitare prima dell'uso
- Sciogliere 42 g di polvere in 1 L di acqua distillata sterile
- Attendere 5 minuti, quindi miscelare accuratamente fino ad ottenere una sospensione omogenea
- Riscaldare lentamente, agitando frequentemente, quindi portare a ebollizione fino al completo scioglimento
- Dispensare in provette o flaconi (100 ml), quindi sterilizzare in autoclave a $121 \pm 1^\circ\text{C}$ per 15 minuti

Rapporto di ricostituzione: 42 g/L (500 g di polvere producono 11,9 L di terreno)

Preparazione del terreno completo con cicloserina

- Prima dell'utilizzo, aggiungere 1 ml di una soluzione al 4% di D-cicloserina sterilizzata a filtro a 100 ml di terreno temperato (44-49°C)

Preparazione del terreno completo con cicloserina e tuorlo d'uovo

- Aggiungere al terreno di base (100 ml) contenente cicloserina 8 ml di una soluzione al 50% di tuorlo d'uovo in acqua fisiologica
- Durante l'utilizzo di questa versione del terreno, distribuire 0,1 ml di diluizioni decimali del campione per piastra

Preparazione dei campioni

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

Inoculazione e incubazione per gli standard alimentari

Inoculazione profonda (NF V08-019)

- Posizionare 1 ml di sospensione originale o diluizione decimale in 2 piastre Petri, quindi aggiungere 12-15 ml di agar temperato (44-49°C). Omogeneizzare agitando e lasciare a solidificare. Versare un altro strato di agar (circa 5 ml) e lasciar asciugare
- Incubare in condizioni anaerobiche a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 20 hr

Inoculazione e incubazione per gli standard dell'acqua

Inoculazione in provette (NF T90-415)

- Aggiungere 20 ml di agar temperato (44-49°C) a una provetta contenente il campione del test
- Incubare in condizioni anaerobiche a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 e/o 48 hr

Tecnica di filtrazione su membrana

- Filtrare il campione del test e posizionare la membrana in una piastra Petri (griglia rivolta verso l'alto), evitando la formazione di bolle d'aria
- Aggiungere 18 ml di terreno temperato (44-49°C) senza D-cicloserina e lasciare raffreddare
- Incubare in condizioni anaerobiche a $37 \pm 1^\circ\text{C}$ per 24 e 48 hr

Metodo di filtrazione su membrana

- Filtrare il campione da testare evitando la formazione di bolle d'aria tra il filtro e il dispositivo di filtrazione
- Posizionare la membrana (griglia rivolta verso l'alto) su una piastra Petri contenente TSC con D-cicloserina, evitando la formazione di bolle d'aria
- Incubare in condizioni anaerobiche a $44 \pm 1^\circ\text{C}$ per 21 ± 3 hr

Letture e interpretazione

- Esaminare le membrane per anaerobi solfito-riduttori: colonie nere con un alone nero
- Enumerare unicamente le piastre Petri che presentano colonie chiaramente diverse l'una dall'altra
- Eseguire ulteriori test secondo gli standard per la conta specifica di *C. perfringens*
- In presenza di tuorlo d'uovo nel terreno, le colonie di *C. perfringens* risultano nere e solitamente circondate da un alone opaco a causa della lecitinasi del batterio

Riferimenti

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique.

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 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions

NF EN 26461-2 luglio 1993: Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

NF T90-415 ottobre 1985: Testing water — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobic bacteria and sulfite-reducing (Clostridia) — General method by standing tube technique

Gazzetta ufficiale delle Comunità europee — Direttive 98/83/EC del Consiglio Europeo concernente la qualità delle acque destinate al consumo umano - Allegato III: Specifiche per l'analisi dei parametri.

Obligatory microbiological criteria for foodstuffs of animal origin — General methods of bacteriological analysis (Decree of 21 December 1979 in JO dated 19 January 1980, amended by Decrees of: 7 September 1984 in JO dated 29 September 1984; 5 March 1985 in JO dated 23 March 1985; 2 June 1988 in JO dated 8 July 1988; 13 March 1989 in JO dated 20 April 1989).

Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
Luglio 2021	5070 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Modifica importante- Nuova struttura del documento- Modifica al numero di documento – versione precedente: V4_05-08_11

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

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

Nº catálogo Descrição

3554419 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, pronto para uso, 100 ml x 6 frascos

3569644 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, desidratado, 500 g

Somente para uso em laboratório.

Uso previsto

Meio básico usado para a detecção e contagem de bactérias anaeróbias redutoras de sulfito em produtos alimentícios e água.

Princípio

O princípio do meio depende da capacidade do *Clostridium* de reduzir os sulfitos a sulfeto que, na presença de citrato férrico, forma um precipitado preto de sulfeto de ferro ao redor das colônias. Devido à presença de D-cicloserina, o meio inibe o crescimento de outras bactérias. A incubação a 46 °C aumenta a seletividade do meio ao *Clostridium perfringens*.

Composição teórica

Meio de Base

Peptona	15 g
Peptona de soja	5 g
Extrato de levedura	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Citrato férrico de amônio III	1 g
Agar	15 g
Água destilada	1.000 ml
pH Final a 25 °C = 7,6 ± 0,2	

Prazo de validade e armazenamento

Armazene pronto para uso a 2–8 °C. Armazene o meio desidratado a 15–25 °C em frascos cuidadosamente fechados em um local fresco e seco.

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

Suprimentos

- Frascos de pirex de 150 ml com rolhas à prova de autoclave
- Membranas de filtro de éster de celulose estéril (Ø = 47 mm, 0,45 µm)
- Pipetas estéreis (1 ml, etc)
- Placas de Petri estéreis (Ø = 90 mm)
- Equipamento para cultura anaeróbia (tubos de Durham, catalisador, etc)

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
- O meio que entrou em contato com amostras de alimentos ou água deve ser considerado contaminado e descartado de acordo com as regras e regulamentos locais
- A D-cicloserina não deve ser adicionada a um meio de base a uma temperatura superior a 49 °C
- Para evitar a reoxigenação do meio, ele não deve ser agitado vigorosamente
- Para informações de segurança do produto SDS e certificado de análise, visite 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 a recepção 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 Meio Desidratado

- Agite antes de usar
- Dissolva 42 g de pó em 1 L de água destilada estéril
- Aguarde 5 min e misture muito bem até obter uma suspensão homogênea
- Aqueça delicadamente, agitando com frequência, e deixe ferver até dissolver completamente
- Dispense em tubos ou frascos (100 ml) e esterilize em autoclave a 121 ± 1 °C por 15 minutos

Taxa de reconstituição: 42 g/L (500 g de pó faz 11,9 L de meio)

Preparação do Meio Completo com Cicloserina

- Antes de usar, adicione 1 ml de uma solução a 4% de D-cicloserina esterilizada por filtro a 100 ml de meio (44–49 °C) temperado

Preparação do Meio Completo com Cicloserina e Gema de Ovo

- Ao meio base (100 ml) contendo cicloserina, adicione 8 ml de uma solução a 50% de gema de ovo em água fisiológica
- Ao usar esta versão do meio, espalhe diluições decimais de 0,1 ml da amostra por placa

Preparação da amostra

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

Inoculação e Incubação para Padrões Alimentares

Inoculação de profundidade (NF V08-019)

- Coloque 1 ml da suspensão original ou diluição decimal em 2 placas de Petri e adicione 12–15 ml de ágar temperado (44–49 °C). Homogeneíze usando vortex e deixe solidificar. Despeje outra camada de ágar (cerca de 5 ml) e deixe secar
- Incube em condições anaeróbicas a 37 ± 1 °C por 20 hr

Inoculação e Incubação para Padrões de Água

Inoculação em tubos (NF T90-415)

- Adicione 20 ml de ágar temperado (44–49 °C) a um tubo contendo a amostra de teste
- Incube em condições anaeróbicas a 37 ± 1 °C por 24 hr e/ou 48 hr

Técnica de filtragem por membrana

- Filtre a amostra de teste e coloque a membrana em uma placa de Petri (grade para cima) evitando a criação de bolhas de ar
 - Adicione 18 ml de meio temperado (44–49 °C) sem D-cicloserina e deixe esfriar
 - Incube em condições anaeróbicas a 37 ± 1 °C por 24 hr e 48 hr
-

Método de filtração por membrana

- Filtre a amostra de teste evitando a criação de bolhas de ar entre o filtro e o dispositivo de filtração
- Coloque a membrana (grade para cima) em uma placa de Petri contendo TSC com D-cicloserina, evitando a criação de bolhas de ar
- Incube em condições anaeróbicas a 44 ± 1 °C por 21 ± 3 hr

Leitura e Interpretação

- Examine as membranas para anaeróbios redutores de sulfito: colônias pretas com um halo preto
- Enumere somente as placas de Petri que apresentam colônias que são claramente distintas umas das outras
- Realize testes adicionais de acordo com os padrões para a enumeração específica de *C. perfringens*
- Quando a gema de ovo está presente no meio, colônias de *C. perfringens* são pretas e geralmente rodeadas por um halo opaco causado pela lecitinase da bactéria

Referências

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique.

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 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions

NF EN 26461-2 July 1993: Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

NF T90-415 October 1985: Testing water — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobic bacteria and sulfite-reducing (Clostridia) — General method by standing tube technique

Official Journal of the European Communities — Council Directives 98/83/EC on the quality of water intended for human consumption - Annex III: Specifications for the analysis of parameters.

Obligatory microbiological criteria for foodstuffs of animal origin — General methods of bacteriological analysis (Decree of 21 December 1979 in JO dated 19 January 1980, amended by Decrees of: 7 September 1984 in JO dated 29 September 1984; 5 March 1985 in JO dated 23 March 1985; 2 June 1988 in JO dated 8 July 1988; 13 March 1989 in JO dated 20 April 1989).

Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Julho de 2021	5070 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Alteração importante- Novo design de documento- Alteração do número do documento — versão anterior: V4_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.

TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite-Cycloserin)

Referencia # Descripción

3554419 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, listo para su uso, 100 ml x 6 frascos
3569644 **TSC without D-Cycloserin Agar (Tryptone-Sulfite Cycloserin)**, deshidratado, 500 g

Sólo para uso en laboratorio.

Uso previsto

Medio base utilizado para la detección y recuento de bacterias anaerobias sulfato reductoras en productos alimenticios y agua.

Principio

El principio del medio se basa en la capacidad del *Clostridium* de convertir los sulfitos en sulfuro que, en presencia de citrato férrico, forma un precipitado negro de sulfuro de hierro alrededor de las colonias. Debido a la presencia de D-cicloserina, el medio inhibe el crecimiento de otras bacterias. La incubación a 46 °C aumenta la selectividad del medio para el *Clostridium perfringens*.

Composición teórica

Medio base

Peptona	15 g
Peptona de soja	5 g
Extracto de levaduras	5 g
Na ₂ SO ₅	1 g
Citrato de amonio férrico III	1 g
Agar	15 g
Agua destilada	1.000 ml
pH final a 25 °C = 7,6 ± 0,2	

Vida útil y almacenamiento

Almacenar listo para su uso a 2-8 °C. Almacenar el medio deshidratado a 15-25 °C en frascos bien cerrados en un lugar fresco y seco.

Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Incubadoras o sala de incubación
- Dispositivo de filtrado
- Balanzas
- Agitador/homogeneizador
- Vórtex

Fungibles

- Frascos de Pyrex de 150 ml con tapones resistentes a la esterilización en autoclave
- Filtros estériles de membrana de éster de celulosa (Ø = 47 mm, 0,45 µm)
- Pipetas estériles (1 ml, etc.)
- Placas de Petri estériles (Ø = 90 mm)
- Equipo para el cultivo anaeróbico (tubos de Durham, catalizador, etc.)

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 alimentos o agua deben considerarse potencialmente contaminados y deben eliminarse de conformidad con las normas y reglamentos locales
- No debe añadirse D-cicloserina a un medio base a una temperatura superior a 49 °C
- Para evitar la reoxigenación del medio, no debe agitarse con fuerza
- Visite 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 del medio deshidratado

- Agitar antes de usar
- Disolver 42 g de polvo en 1 L de agua destilada estéril
- Esperar 5 minutos, luego mezclar bien hasta obtener una suspensión homogénea
- Calentar suavemente, agitando frecuentemente, y luego llevar a ebullición hasta que se disuelva completamente
- Dispensar en tubos o frascos (100 ml) y esterilizar en autoclave a 121 ± 1 °C durante 15 minutos

Proporción de reconstitución: 42 g/L (con 500 g de polvo se obtienen 11,9 L de medio)

Preparación del medio completo con cicloserina

- Poco antes del uso, añadir 1 ml de una solución al 4% de D-cicloserina esterilizada filtrada en 100 ml de medio templado (44-49 °C)

Preparación del medio completo con cicloserina y yema de huevo

- Añadir al medio base (100 ml) que contiene cicloserina, 8 ml de una solución de yema de huevo al 50% en agua fisiológica
- Al utilizar esta variante del medio, se deben extender diluciones decimales de 0,1 ml de la muestra por placa

Preparación de las muestras

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

Inoculación e incubación a efectos de las normas alimentarias

Inoculación mediante siembra en profundidad (NF V08-019)

- Colocar 1 ml de la suspensión original o de la dilución decimal en 2 placas de Petri y añadir 12-15 ml de agar templado (44-49 °C). Homogeneizar girando la placa y dejar solidificar. Verter otra capa de agar (unos 5 ml) y dejar secar
- Incubar en condiciones anaeróbicas a 37 ± 1 °C durante 20 hr

Inoculación e incubación a efectos de los estándares de agua

Inoculación en tubos (NF T90-415)

- Añadir 20 ml de agar templado (44-49 °C) a un tubo que contenga la muestra de ensayo
- Incubar en condiciones anaeróbicas a 37 ± 1 °C durante 24 o 48 hr

Método de filtración por membrana

- Filtrar la muestra de ensayo y colocar la membrana en una placa de Petri (con la rejilla hacia arriba) evitando la aparición de burbujas de aire
 - Añadir 18 ml de medio templado (44-49 °C) sin D-cicloserina y dejar enfriar
 - Incubar en condiciones anaeróbicas a 37 ± 1 °C durante 24 o 48 hr
-

Método de filtración por membrana

- Filtrar la muestra de ensayo evitando la aparición de burbujas de aire entre el filtro y el dispositivo de filtración
- Colocar la membrana (con el lado de la rejilla hacia arriba) en una placa de Petri que contenga TSC con D-cicloserina evitando la aparición de burbujas de aire
- Incubar en condiciones anaeróbicas a 44 ± 1 °C durante 21 ± 3 hr

Lectura e interpretación

- Examinar las membranas en busca de bacterias anaerobias sulfato reductoras: colonias negras con un halo negro
- Realizar el recuento únicamente a partir de placas de Petri que presenten colonias claramente diferenciadas entre sí
- Realizar las pruebas sucesivas según las normas para la enumeración específica de *C. perfringens*
- Con la presencia de yema de huevo en el medio, las colonias de *C. perfringens* son negras y suelen estar rodeadas de un halo opaco causado por la lecitinasa de la bacteria

Referencias

Harmon, S.M., Kautter, D.A., and Peeler, J.T. (1971) Improved medium for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 22: 688-692.

Hauschild, A.H.W., and Hilseimer, R. (1974) Evaluation and modifications of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. *Applied Microbiology* 27: 78-82

ISO 6461-2:1986. Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: Method by membrane filtration

ISO 7937:2004. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of *Clostridium perfringens* — Colony-count technique.

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 15213:2003. Microbiology of food and animal feeding stuffs — Horizontal method for the enumeration of sulfite-reducing bacteria growing under anaerobic conditions

NF EN 26461-2, julio 1993: Water quality — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobes (closteridia) — Part 2: método de filtración por membrana

NF T90-415, octubre 1985: Testing water — Detection and enumeration of the spores of sulfite-reducing anaerobic bacteria and sulfite-reducing (Clostridia) — General method by standing tube technique

Diario Oficial de las Comunidades Europeas. Directivas 98/83/CE del Consejo sobre la calidad de las aguas destinadas al consumo humano. Anexo III: Especificaciones para el análisis de los parámetros.

Criterios microbiológicos obligatorios para los productos alimenticios de origen animal - Métodos generales de análisis bacteriológico (Decreto de 21 de diciembre de 1979 en el Boletín oficial del 19 de enero de 1980, modificado por los Decretos de: 7 de septiembre de 1984 en Boletín oficial del 29 de septiembre de 1984; 5 de marzo de 1985 en Boletín oficial del 23 de marzo de 1985; 2 de junio de 1988 en Boletín oficial del 8 de julio de 1988; 13 de marzo de 1989 en Boletín oficial del 20 de abril de 1989).

Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Julio 2021	5070 Ver A	<ul style="list-style-type: none">- Cambio significativo- Nuevo diseño del documento- Cambio en el número de documento - versión anterior: V4_05-08_11

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