

# KING B Medium

Catalog #	Description
12018502	<b>KING B Medium</b> , ready-to-use, 7 ml x 25 tubes

For laboratory use only.

## Intended Use

Medium used to differentiate species of *Pseudomonas* in bottled water and other kinds of water which contain weak interfering flora, such as swimming pool water and water intended for human consumption (membrane filtration technique).

## Principle

*Pseudomonas aeruginosa* are classified as Gram-negative microorganisms that grow on selective media containing cetrimide and produce pyocyanin, or as microorganisms that grow on selective media containing cetrimide, are oxidase positive, fluoresce under UV light ( $360 \pm 20$  nm), and can produce ammonia from acetamide. Colonies producing pyocyanin on CN Agar medium are considered positive as *P. aeruginosa*. Other colonies producing fluorescence or reddish-brown pigmented colonies must be confirmed for their ability to synthesize pyoverdine using KING B medium. The medium contains high concentrations of magnesium sulphate that provide the cations necessary for activation of pyoverdine giving the culture medium a fluorescent greenish yellow color. Most strains (98%) produce a water-soluble fluorescent pigment.

## Theoretical Composition

### Base Medium

Bacteriological peptone "B"	20 g
Agar	12 g
Glycerol	10 ml
Di-potassium hydrogen phosphate	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydrous)	1.5 g
Magnesium sulphate heptahydrate	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Distilled water	1,000 ml

Final pH at 25°C =  $7.2 \pm 0.2$

## Shelf Life and Storage

Store ready-to-use medium at 2–8°C.

## Required Materials Not Supplied

This list is not exhaustive.

### Equipment

- All usual laboratory equipment
- Incubators or incubation room
- Scales
- Stirrer/homogenizer
- Vortexer
- UV equipment (catalog #3550717, 3550718)

### Supplies

- CN Agar (catalog #3563915, ready-to-use, 55 mm x 10 dishes; 3556034, ready-to-use, 200 ml x 6 bottles; 3564899, dehydrated, 500 g)
- Nutrient agar for water testing
- Oxidase test strips
- Distilled water
- Sterile Pasteur pipettes or inoculating loop

## 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
- Some strains of *P. fluorescens* and *P. putida* produce pyoverdine slowly. In this case, the medium must be incubated at 20°C for 2–3 weeks. Some of these strains can be non-pigmented
- Fresh pure cultures must always be used to obtain interpretable results
- The time lapse between the end of the preparation of the stock solution (or the 10<sup>-1</sup> dilution in the case of a solid product) and the moment when the dilutions come in contact with the culture medium must not exceed 15 min
- 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

### Detection and Enumeration of *P. aeruginosa*

- Perform detection and enumeration of *P. aeruginosa* according to ISO 16266:2006 standard. Follow the protocol described in the user guide for CN Agar
- Examine the membranes for growth after 22 ± 2 hr and 44 ± 4 hr. 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*
  - Count all other reddish-brown colonies that do not fluoresce as presumptive *P. aeruginosa*
- Confirm all presumed *P. aeruginosa* colonies

### Confirmation Test with KING B medium

#### Subculture on Nutrient Agar

- Subculture all the colonies requiring confirmation from the membrane filter on nutrient agar for water testing and incubate for 22 ± 2 hr at 36 ± 2°C
- Check the subcultures for purity and test those that were reddish-brown initially for oxidase reaction

#### Oxidase Test

- Refer to ISO 16266
- Alternatively, use commercially available oxidase tests following the manufacturer's instructions

#### Inoculation and Incubation on KING B Medium

- Melt the agar in a boiling water bath. Allow the medium to cool down to 45–50°C
- Leave the tubes in an inclined position until the medium is sufficiently solidified (once inclined, this medium can be kept for several weeks. Ensure the cap is screwed on tightly to avoid desiccation of the medium)
- Inoculate the tubes with a median streak on the surface of the agar, using a culture loop taken from a broth or an agar
- Replace the cap on each tube, without screwing it down. Incubate at 36 ± 2°C for 24 hr up to 5 days (in general 24 hr is sufficient)

### Reading and Interpretation

- Examine the growth under UV light and note the presence of fluorescence. Record any fluorescence appearing within 5 days as positive

## References

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44 (2) 301-307.

## Revision History

Release date	Document number	Change
September 2021	5093 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Major change</li><li>- New document design</li><li>- Document number change — previous version: V5_05-08_11</li></ul>
August 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- New item catalog number</li><li>- Removal of obsolete catalog numbers from materials list</li><li>- Updates to protocol for oxidase test and plate incubation temperature</li><li>- Removal of reference to incorrect ISO standard</li></ul>

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

## KING B Medium

Référence	Description
12018502	<b>KING B Medium</b> , prêt à l'emploi, 7 ml x 25 tubes

Uniquement pour une utilisation en laboratoire.

### Usage prévu

Milieu utilisé pour la différenciation des espèces de *Pseudomonas* dans les eaux embouteillées et d'autres types d'eaux contenant une faible flore interférente, telles que les eaux de piscines et les eaux destinées à la consommation humaine (technique de filtration sur membrane).

### Principe

*Pseudomonas aeruginosa* est classé comme microorganisme à Gram négatif qui se développe en milieu sélectif contenant du cétrimide et qui produit de la pyocyanine, ou comme microorganisme qui se développe en milieu sélectif contenant du cétrimide, est positif à l'oxydase, présente une fluorescence sous lampe UV ( $360 \pm 20$  nm) et peut produire de l'ammoniac à partir de l'acétamide. Les colonies produisant de la pyocyanine sur gélose CN sont considérées *P. aeruginosa* positives. Pour les autres colonies présentant une fluorescence ou les colonies brun-rougeâtre, leur capacité à synthétiser la pyoverdine doit être confirmée à l'aide du milieu KING B. Le milieu contient des concentrations élevées de sulfate de magnésium qui fournit les cations nécessaires à l'activation de la pyoverdine, qui entraîne une coloration jaune-verdâtre fluorescente du milieu de culture. La plupart des souches (98%) produisent un pigment fluorescent hydrosoluble.

### Formule théorique

#### Milieu de base

Peptone bactériologique « B »	20 g
Agar	12 g
Glycérol	10 ml
Hydrogénophosphate dipotassium	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhydre)	1,5 g
Sulfate de magnésium heptahydraté	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Eau distillée	1 000 ml
pH final à 25 °C = 7,2 ± 0,2	

### Durée de conservation et stockage

Conservation du milieu prêt à l'emploi à 2–8 °C.

### Matériel requis non fourni

Liste non exhaustive.

#### Matériel

- Tout le matériel de laboratoire habituel
- Incubateurs ou salle d'incubation
- Balances
- Agitateur-homogénéisateur
- Agitateur-mélangeur vortex
- Lampe UV (n° de référence 3550717, 3550718)

#### Produits

- CN Agar (n° de référence 3563915, prêt à l'emploi, 55 mm x 10 boîtes ; 3556034, prêt à l'emploi, 200 ml x 6 flacons ; 3564899, base déshydratée, 500 g)
- Gélose nutritive (microbiologie des eaux)
- Test oxydase

- Eau distillée
- Pipettes Pasteur stériles ou anse d'inoculation

### 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
- Certaines souches de *P. fluorescens* et *P. putida* ne produisent que lentement la pyoverdine. Dans ce cas, le milieu doit être incubé à 20 °C pendant 2–3 semaines. Certaines de ces souches peuvent être apigmentées
- De façon à obtenir des résultats interprétables, il est indispensable d'utiliser des cultures pures et fraîches
- Le temps écoulé entre la fin de la préparation de la solution mère (ou dilution 10<sup>-1</sup> dans le cas d'un produit solide) et le moment auquel les dilutions entrent en contact avec le milieu de culture ne doit pas excéder 15 min
- 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

#### Recherche et dénombrement de *P. aeruginosa*

- Procéder à la recherche et au dénombrement de *P. aeruginosa* conformément à la norme ISO 16266:2006. Suivre le protocole décrit dans le guide d'utilisation de la gélose CN
- Après 22 ± 2 hr et 44 ± 4 hr, observer tout développement sur les membranes. Considérer toutes les colonies produisant un pigment bleu/vert (pyocyanine) comme positives à *P. aeruginosa*
- Examiner les membranes à la lampe UV
  - Considérer toutes les colonies qui ne produisent pas de pyocyanine mais qui présentent une fluorescence comme *P. aeruginosa* présumés
  - Considérer toutes les autres colonies brun-rougeâtre qui ne présentent pas de fluorescence comme *P. aeruginosa* présumés
- Confirmer toutes les colonies de *P. aeruginosa* présumés

#### Test de confirmation avec le milieu King B

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

- Repiquer toutes les colonies nécessitant une confirmation depuis la membrane filtrante sur la gélose nutritive pour l'analyse des eaux et incubé pendant 22 ± 2 hr à 36 ± 2 °C
- Contrôler la pureté des sous-cultures et soumettre les sous-cultures initialement brun-rougeâtre au test de l'oxydase

##### Test de l'oxydase

- Se référer à l'ISO 16266
  - Alternativement, vous pouvez utiliser un test oxydase en suivant les instructions du fabricant
- ##### Inoculation et incubation en milieu KING B
- Faire fondre la gélose dans un bain-marie à ébullition. Laisser refroidir le milieu à 45–50°C
  - Laisser les tubes en position inclinée jusqu'à ce que le milieu soit suffisamment solidifié (en position inclinée, ce milieu peut être conservé pendant plusieurs semaines. Veiller à ce que le bouchon soit bien vissé afin d'éviter toute dessiccation du milieu)
  - Ensemencer les tubes en réalisant une strie médiane sur la surface de la gélose avec une anse de culture prélevée d'un bouillon ou d'une gélose
  - Remettre le bouchon en place sur chaque tube sans le visser. Incuber à 36 ± 2°C pendant 24 hr à 5 jours max. (en général, 24 hr suffisent)

#### Lecture et interprétation

- Examiner le développement à la lampe UV et observer la présence de fluorescence. Toute fluorescence apparaissant dans un délai de 5 jours doit être considérée comme un résultat positif

## Références

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44 (2) 301-307.

## Historique des révisions

Date de publication	Numéro de document	Modification
Septembre 2021	5093 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 : V5_05-08_11</li></ul>
Août 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Nouveau code produit</li><li>- Retrait des codes obsolètes de la liste matériel</li><li>- Mises à jour du protocole pour le test oxydase et de la température d'incubation des boîtes</li><li>- Retrait d'une référence incorrecte à une norme ISO</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.

# KING B Medium

Katalog-Nr. Beschreibung

12018502 **KING B Medium**, gebrauchsfertig, 25 Röhrchen x 7 ml

---

Nur für die Verwendung im Labor.

---

## Verwendungszweck

Medium zur Unterscheidung von *Pseudomonas*-Arten in abgefülltem Wasser und anderen Wasserarten mit geringer Begleitflora, wie z. B. Schwimmbadwasser und Wasser für den menschlichen Verzehr (Membranfiltrationstechnik).

## Prinzip

*Pseudomonas aeruginosa* sind klassifiziert als gramnegative Mikroorganismen, die auf Selektionsmedium mit Cetrimid wachsen und Pyocyanin bilden, oder als Mikroorganismen, die auf Selektionsmedium mit Cetrimid wachsen, Oxidase-positiv sind, unter UV-Licht ( $360 \pm 20$  nm) fluoreszieren und aus Acetamid Ammoniak bilden können. Kolonien, die auf CN Agar Pyocyanin bilden, gelten als *P. aeruginosa*-positiv. Andere fluoreszierende Kolonien oder rötlich-braun pigmentierte Kolonien sind auf ihre Fähigkeit zur Synthese von Pyoverdin mit KING B-Medium zu überprüfen. Das Medium enthält hohe Konzentrationen an Magnesiumsulfat, das die für die Aktivierung von Pyoverdin notwendigen Kationen liefert, wodurch das Kulturmedium eine fluoreszierende grünlich-gelbe Farbe erhält. Die meisten Stämme (98%) bilden ein wasserlösliches fluoreszierendes Pigment.

## Theoretische Zusammensetzung

### Basismedium

Bakteriologisches Pepton „B“	20 g
Agar	12 g
Glycerin	10 ml
Dikaliumdihydrogenphosphat	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (wasserfrei)	1,5 g
Magnesiumsulfatheptahydrat	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Destilliertes Wasser	1.000 ml
Finaler pH-Wert bei 25°C = 7,2 ± 0,2	

## Haltbarkeit und Lagerung

Das gebrauchsfertige Medium bei 2 – 8°C lagern.

## Zusätzlich benötigtes Material

Diese Liste ist nicht vollständig.

### Geräte

- Alle üblichen Laborgeräte
- Inkubatoren oder Inkubationsraum
- Waagen
- Rührer/Homogenisator
- Vortex
- UV-Lampe (Katalog-Nr. 3550717, 3550718)

### Zubehör

- CN Agar (Katalog-Nr. 3563915, gebrauchsfertig, 10 Agarplatten x 55 mm; Katalog-Nr. 3556034, gebrauchsfertig, 6 Flaschen x 200 ml; Katalog-Nr. 3564899, dehydriert, 500 g)
- Nutrient Agar for Water Testing
- Oxidase-Teststreifen
- Destilliertes Wasser

- Sterile Pasteur Pipetten oder Impföse

### 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
- Bei manchen Stämmen von *P. fluorescens* und *P. putida* läuft die Bildung von Pyoverdin langsam ab. In diesem Fall muss das Medium 2 bis 3 Wochen bei 20°C inkubiert werden. Manche dieser Stämme sind unter Umständen nicht pigmentiert
- Um interpretierbare Ergebnisse zu erhalten, müssen immer frische Reinkulturen verwendet werden.
- Der Zeitraum zwischen dem Ende der Herstellung der Stammlösung (bzw. der 10<sup>-1</sup> Verdünnung bei einem festen Produkt) und dem Zeitpunkt, an dem die Verdünnungen mit dem Kulturmedium in Kontakt kommen, darf 15 min nicht überschreiten
- 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

#### Nachweis und Zählung von *P. aeruginosa*

- Beim Nachweis und der Zählung von *P. aeruginosa* nach der Norm ISO 16266:2006 vorgehen. Das in der Gebrauchsanweisung für CN Agar beschriebene Protokoll befolgen
- Die Membranen nach 22 ± 2 hr und nach 44 ± 4 hr hinsichtlich eines Koloniewachstums überprüfen. Bei allen Kolonien, die blau-grünes Pigment (Pyocyanin) bilden, gilt das Vorhandensein von *P. aeruginosa* als bestätigt
- Die Membranen unter UV-Licht prüfen
  - Alle nicht Pyocyanin bildenden, aber fluoreszierenden Kolonien als präsumptive *P. aeruginosa* zählen
  - Alle anderen rötlich-braunen, nicht-fluoreszierenden Kolonien als präsumptive *P. aeruginosa* zählen
- Alle verdächtigen *P. aeruginosa*-Kolonien sind Bestätigungstests zu unterziehen

#### Bestätigungstest mit KING B Medium

##### Subkultur auf Nährstoffagar

- Von allen Kolonien auf dem Membranfilter, bei denen im Rahmen von Wasserproben tests eine Bestätigung erforderlich ist, Subkulturen auf Nährstoffagar anlegen und 22 ± 2 hr bei 36 ± 2°C inkubieren
- Die Subkulturen auf Reinheit prüfen und jene, die ursprünglich rötlich-braun waren, auf Vorhandensein einer Oxidase-Reaktion testen

##### Oxidase Test

- Es wird auf ISO 16266 verwiesen.
- Alternativ können handelsübliche Oxidase Tests verwendet werden; es sind die Herstellerangaben zu befolgen

##### Beimpfung und Inkubation auf KING B Medium

- Den Agar in einem siedenden Wasserbad schmelzen lassen. Das Medium auf 45 – 50°C abkühlen lassen
- Die Röhrrchen schräg halten, bis das Medium ausreichend erstarrt ist (danach ist dieses Medium mehrere Wochen haltbar). Es ist darauf zu achten, die Kappe fest zuzuschrauben, um ein Austrocknen des Mediums zu vermeiden
- Die Röhrrchen beimpfen, in dem eine mit einer Impföse aus einer Nährbouillon oder einem Agar aufgenommene Probe auf der Oberfläche des Agars mittig in einem Streifen verteilt wird
- Die Kappen wieder auf jedes Röhrrchen aufsetzen, aber nicht zuschrauben. 24 Stunden bis 5 Tage bei 36 ± 2°C inkubieren (generell sind 24 hr ausreichend)

#### AbleSEN und Auswerten der Ergebnisse

- Die gebildeten Kolonien unter UV auf Vorhandensein von Fluoreszenz untersuchen. Jegliche Fluoreszenz, die sich innerhalb von 5 Tagen entwickelt, ist als positiv zu werten

## Literatur

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. Journal of Laboratory Clinical Medicine 44 (2) 301-307.

## Revisionshistorie

Freigabedatum	Dokumentnummer	Änderung
September 2021	5093 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Bedeutende Änderung</li><li>- Neues Dokumentdesign</li><li>- Änderung der Dokumentnummer — vorhergehende Version: V5_05-08_11</li></ul>
August 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Neue Katalognummer</li><li>- Entfernung obsoleter Katalognummern von der Materialliste</li><li>- Aktualisierung des Protokolls für den Oxidase Test und die Inkubationstemperatur für die Platten</li><li>- Entfernung von Referenzen der nicht korrekten ISO Standard</li></ul>

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

# KING B Medium

N. catalogo Descrizione  
12018502 **KING B Medium**, pronto all'uso, 7 ml x 25 provette

Esclusivamente per uso in laboratorio.

## Uso previsto

Terreno utilizzato per differenziare le specie di *Pseudomonas* nell'acqua in bottiglia e in altri tipi di acqua che contengono una flora interferente debole, come l'acqua delle piscine e l'acqua destinata al consumo umano (tecnica di filtrazione su membrana).

## Principio

Le *Pseudomonas aeruginosa* sono classificate come microorganismi Gram-negativi che crescono su terreni selettivi contenenti cetrimide e che producono piocianina, oppure come microorganismi che crescono su terreni selettivi contenenti cetrimide, sono ossidasi positivi, fluorescenti sotto luce UV ( $360 \pm 20$  nm) e in grado di produrre ammoniaca a partire dall'acetammide. Le colonie che producono piocianina sul terreno Agar CN sono considerate positive come *P. aeruginosa*. Altre colonie che producono fluorescenza o colonie pigmentate rossastre-marroni devono sottoporsi a conferma per la loro capacità di sintetizzare la pioverdina usando il terreno KING B. Il terreno contiene concentrazioni elevate di solfato di magnesio che forniscono i cationi necessari per l'attivazione della pioverdina, dando al terreno di coltura un colore fluorescente di colore giallo verdastro. La maggior parte dei ceppi (98%) produce un pigmento fluorescente solubile in acqua.

## Composizione teorica

### Terreno di base

Peptone batteriologico "B"	20 g
Agar	12 g
Glicerolo	10 ml
Idrogenofosfato di dipotassio	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anidro)	1,5 g
Solfato di magnesio eptaidrato	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Acqua distillata	1000 ml
pH finale a 25°C = 7,2 ± 0,2	

## Durata e conservazione

Conservare il terreno pronto per l'uso a 2-8°C.

## Materiali richiesti non in dotazione

Il presente elenco non è esaustivo.

### Apparecchiatura

- Tutta la normale apparecchiatura di laboratorio
- Incubatori o camera di incubazione
- Bilance
- Agitatore/omogeneizzatore
- Vortex
- Attrezzatura UV (numero catalogo 3550717, 3550718)

### Materiali in dotazione

- CN Agar (numero catalogo 3563915, pronto per l'uso, 55 mm x 10 piastre; 3556034, pronto per l'uso, 200 ml x 6 flaconi; 3564899, disidratato, 500 g)
- Agar nutriente per test dell'acqua

- Strip per il test dell'ossidasi
- Acqua distillata
- Pipette Pasteur sterili oppure occhiello per inoculazione

### 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 che sono entrati in contatto con campioni d'acqua devono essere considerati contaminati e smaltiti conformemente alle norme e ai regolamenti locali
- Alcuni ceppi di *P. fluorescens* e *P. putida* producono piovverdina lentamente. In questo caso, il terreno deve essere incubato a 20°C per 2-3 settimane. Alcuni di questi ceppi potrebbero non essere pigmentati
- Per ottenere risultati interpretabili, occorre utilizzare sempre colture pure e fresche
- L'intervallo di tempo tra la fine della preparazione della soluzione madre (o la diluizione 10<sup>-1</sup> nel caso di un prodotto solido) e il momento in cui le diluizioni entrano in contatto con il terreno di coltura non deve superare i 15 minuti
- 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

#### Rilevamento ed enumerazione di *P. aeruginosa*

- Eseguire il rilevamento e l'enumerazione di *P. aeruginosa* secondo lo standard EN 16266:2006. Seguire il protocollo descritto nel manuale utente per l'Agar CN
- Esaminare la crescita nelle membrane dopo 22 ± 2 hr e 44 ± 4 hr. Contare tutte le colonie che producono un pigmento blu/verde (piocianina) come conferma della presenza di *P. aeruginosa*
- Esaminare le membrane sotto luce UV
  - Contare tutte le colonie che non producono piocianina e che presentano fluorescenza come *P. aeruginosa* presunta
  - Contare tutte le altre colonie rossastre-marroni e che non presentano fluorescenza come *P. aeruginosa* presunta
- Confermare tutte le presunte colonie di *P. aeruginosa*

#### Test di conferma con terreno KING B

##### Sottocoltura con Agar nutriente

- Eseguire la sottocoltura delle colonie che richiedono conferma dal filtro a membrana su agar nutriente per il test dell'acqua e incubare per 22 ± 2 hr a 36 ± 2°C
- Verificare la purezza delle sottocolture e testare quelle che inizialmente presentavano una colorazione rossastra-marrone per la reazione all'ossidasi

##### Test dell'ossidasi

- Fare riferimento alla ISO 16266
- In alternativa, utilizzare un test per l'ossidasi disponibile in commercio e seguire le istruzioni del produttore

##### Inoculazione e incubazione sul terreno KING B

- Sciogliere l'agar a bagnomaria con acqua bollente. Lasciar raffreddare il terreno a 45-50°C
- Lasciare le provette in posizione inclinata finché il terreno è sufficientemente solidificato (una volta inclinato, questo terreno può essere conservato per diverse settimane. Assicurarsi che il tappo sia avvitato saldamente per evitare l'essiccazione del terreno)
- Inoculare le provette con una striscia mediana sulla superficie dell'agar, usando un occhiello di coltura prelevato da un brodo o un agar
- Sostituire il tappo su ogni provetta, senza avvitarlo. Incubare a 36 ± 2°C per 24 hr fino a 5 giorni (in generale, 24 hr sono sufficienti)

#### Letture e interpretazione

- Esaminare la crescita sotto luce UV e notare la presenza di fluorescenza. Registrare eventuali fluorescenze verificatesi entro 5 giorni come positive

## Riferimenti

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44 (2) 301-307.

## Cronologia delle revisioni

Data di pubblicazione	Numero documento	Modifica
Settembre 2021	5093 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: V5_05-08_11</li></ul>
Agosto 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Nuovo codice prodotto</li><li>- Rimozione di numeri di catalogo obsoleti dalla lista dei materiali</li><li>- Aggiornamento del protocollo per il test dell'ossidasi e della temperatura di incubazione</li><li>- Rimozione di riferimento allo standard ISO errato</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.

## KING B Medium

Nº catálogo Descrição

12018502 **KING B Medium**, pronto para uso, 25 tubos de 7 ml

---

Somente para uso em laboratório.

---

### Uso previsto

Meio usado para diferenciar espécies de *Pseudomonas* em água engarrafada e outros tipos de água que contém flora de interferência fraca, como água de piscina e água destinada ao consumo humano (técnica de filtração por membranas).

### Princípio

*Pseudomonas aeruginosa* são classificados como micro-organismos Gram-negativos que crescem em meios seletivos contendo cetrimida e produzem piocianina ou como micro-organismos que crescem em meios seletivos contendo cetrimida, são positivos à oxidase, florescem sob luz UV ( $360 \pm 20$  nm) e podem produzir amônia a partir da acetamida. As colônias que produzem piocianina no meio Ágar CN são consideradas positivas como *P. aeruginosa*. Outras colônias que produzem fluorescência ou colônias pigmentadas de cor marrom-avermelhada devem ser confirmadas por sua capacidade de sintetizar pioverdina usando o meio KING B. O meio contém altas concentrações de sulfato de magnésio que fornecem os cátions necessários para a ativação da pioverdina, proporcionando ao meio de cultura uma cor amarelo-esverdeada fluorescente. A maioria das cepas (98%) produz um pigmento fluorescente solúvel em água.

### Composição teórica

#### Meio de Base

Peptona bacteriológica "B"	20 g
Ágar	12 g
Glicerol	10 ml
Hidrogenofosfato dipotássico	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anidro)	1.5 g
Sulfato de magnésio heptahidrato	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1.5 g
Água destilada	1.000 ml
pH final em 25°C = 7,2 ± 0,2	

### Prazo de validade e armazenamento

Armazene o meio pronto para uso a 2–8 °C.

### Materiais necessários não fornecidos

Essa lista não é exaustiva.

#### Equipamento

- Todo o equipamento comum de laboratório
- Incubadoras ou sala de incubação
- Balanças
- Misturador/homogeneizador
- Agitador
- Equipamento de UV (nº do catálogo 3550717, 3550718)

#### Suprimentos

- CN Agar (nº do catálogo 3563915, pronto para uso, 10 placas de 55 mm; 3556034, pronto para uso, 6 frascos de 200 ml; 3564899, desidratado, 500 g)
- Nutrient agar for water testing
- Oxidase test strips
- Água destilada

- Pipetas Pasteur estéreis ou alça de inoculação

### 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 descartados de acordo com as regras e regulamentos locais
- Algumas tiras de *P. fluorescens* e *P. putida* produzem pioverdina lentamente. Neste caso, o meio deve ser incubado a 20°C por 2 a 3 semanas. Algumas dessas tiras podem ser não pigmentadas
- As culturas puras frescas devem ser sempre usadas para obter resultados interpretáveis
- O tempo entre o final do preparo da solução de reserva (ou diluição  $10^{-1}$  no caso de um produto sólido) e o momento em que as diluições entram em contato com o meio de cultura não deve exceder 15 min
- 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 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

#### Detecção e enumeração de *P. aeruginosa*

- Realize a detecção e enumeração de *P. aeruginosa* de acordo com o a norma EN 16266:2006. Siga o protocolo descrito no guia do usuário para Ágar CN
- Exame as membranas para crescimento após  $22 \pm 2$  hr e  $44 \pm 4$  hr. Contagem todas as colônias que produzem pigmento azul/verde (piocianina) como confirmado *P. aeruginosa*
- Examine as membranas sob luz ultravioleta
  - Conte todas as colônias não produtoras de piocianina que florescem como presumíveis *P. aeruginosa*
  - Conte todas as outras colônias marrom-avermelhadas que não florescem como presumíveis *P. aeruginosa*
- Confirme todas as colônias *P. aeruginosa* presumíveis

#### Teste de confirmação com o meio KING B

##### Subcultura em Ágar Nutriente

- Proceda a subcultura de todas as colônias que requerem confirmação do filtro de membrana em ágar nutriente para teste de água e incube durante  $22 \pm 2$  hr a  $36 \pm 2$  °C
- Verifique as subculturas quanto à pureza e teste aquelas que inicialmente eram marrom-avermelhadas quanto à reação de oxidase

##### Teste de Oxidase

- Refere-se a ISO 16266
- Alternativamente, use testes de oxidase disponíveis comercialmente seguindo as instruções do fabricante

##### Inoculação e Incubação em Meio KING B

- Derreta o ágar em um banho de água fervente. Deixe o meio resfriar a 45–50 °C
- Deixe os tubos em uma posição inclinada até que o meio esteja suficientemente solidificado (uma vez inclinado, este meio pode ser mantido por várias semanas. Certifique-se de que a tampa esteja bem aparafusada para evitar dessecação do meio)
- Inocule os tubos com uma estria mediana na superfície do ágar, usando uma alça de cultura retirada de um caldo ou de um ágar
- Substitua a tampa em cada tubo, sem rosqueá-la. Incube a  $36 \pm 2$ °C por 24 hr até 5 dias (em geral, 24 hr é suficiente)

#### Leitura e Interpretação

- Examine o crescimento sob luz ultravioleta e observe a presença de fluorescência. Registre qualquer fluorescência aparecendo dentro de cinco dias como positivo

## Referências

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44 (2) 301-307.

## Histórico de Revisão

Data de lançamento	Número do documento	Alteração
Setembro de 2021	5093 Ver A	<ul style="list-style-type: none"><li>- Alteração importante</li><li>- Novo design de documento</li><li>- Alteração do número do documento — versão anterior: V5_05-08_11</li></ul>
Agosto de 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Novo código de catálogo</li><li>- Remoção de códigos de catálogo obsoletos da lista de materiais</li><li>- Atualizações no protocolo para teste de oxidase e temperatura de incubação da placa</li><li>- Remoção da referência ao padrão ISO incorreto</li></ul>

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.

## KING B Medium

Referencia # Descripción

12018502 **KING B Medium**, listo para usar, 7 ml x 25 tubos

---

Sólo para uso en laboratorio.

---

### Uso previsto

Medio utilizado para diferenciar las especies de *Pseudomonas* en el agua embotellada y otros tipos de agua que contienen una flora interferente débil, como el agua de las piscinas y el agua destinada al consumo humano (técnica de filtración en membrana).

### Principio

Las *Pseudomonas aeruginosa* se clasifican como microorganismos Gram-negativos que crecen en medios selectivos que contienen cetrimida y producen pirocianina, o como microorganismos que crecen en medios selectivos que contienen cetrimida, son positivos para la oxidasa, son fluorescentes bajo luz ultravioleta ( $360 \pm 20$  nm) y pueden producir amoníaco a partir de la acetamida. Las colonias que producen pirocianina en el medio CN Agar se consideran positivas como *P. aeruginosa*. Otras colonias que producen fluorescencia o colonias pigmentadas de color marrón rojizo deben ser confirmadas en cuanto a su capacidad de sintetizar pioverdina utilizando el medio KING B. El medio contiene altas concentraciones de sulfato de magnesio que proporcionan los cationes necesarios para la activación de la pioverdina, confiriendo al medio de cultivo un color amarillo verdoso fluorescente. La mayoría de las cepas (el 98 %) producen un pigmento fluorescente soluble en agua.

### Composición teórica

#### Medio base

Peptona bacteriológica "B"	20 g
Agar	12 g
Glicerol	10 ml
Hidrogenofosfato dipotásico	
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (anhidro)	1,5 g
Sulfato de magnesio heptahidratado	
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	1,5 g
Agua destilada	1.000 ml
pH final a 25 °C = 7,2 ± 0,2	

### Vida útil y almacenamiento

Almacenar el medio listo para usar a 2-8 °C.

### Materiales necesarios, pero no suministrados

Esta lista no es exhaustiva.

#### Equipos

- Todo el equipo habitual del laboratorio
- Incubadoras o sala de incubación
- Balanzas
- Agitador/homogeneizador
- Vórtex
- UV equipment (referencia #3550717, 3550718)

#### Fungibles

- CN Agar (referencia #3563915, listo para usar, 55 mm x 10 placas; 3556034, listo para usar, 200 ml x 6 frascos; 3564899, deshidratado, 500 g)
- Nutrient agar for water testing
- Oxidase test strips

- Agua destilada
- Sterile Pasteur pipettes o asa de inoculación

### 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
- Algunas cepas de *P. fluorescens* y *P. putida* producen pioverdina lentamente. En este caso, el medio debe incubarse a 20 °C durante 2 o 3 semanas. Algunas de estas cepas pueden ser no pigmentadas
- Para obtener resultados interpretables deben utilizarse siempre cultivos puros y frescos.
- El intervalo de tiempo entre el final de la preparación de la solución de reserva (o la dilución 10<sup>-1</sup> en el caso de un producto sólido) y el momento en que las diluciones entran en contacto con el medio de cultivo no debe superar los 15 min
- 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

#### Detección y recuento de *P. aeruginosa*

- Realice la detección y el recuento de *P. aeruginosa* según la norma EN 16266:2006. Siga el protocolo descrito en la guía del usuario para CN Agar
- Examine las membranas para comprobar el crecimiento después de 22 ± 2 hr y 44 ± 4 hr. Contabilice todas las colonias que produzcan pigmento azul/verde (piocianina) como *P. aeruginosa* confirmada
- Examine las membranas bajo luz ultravioleta
  - Contabilice todas las colonias que no producen piocianina y que son fluorescentes como sospechosas de ser *P. aeruginosa*
  - Contabilice todas las demás colonias de color marrón rojizo que no presenten fluorescencia como sospechosas de ser *P. aeruginosa*
- Confirme todas las colonias sospechosas de ser *P. aeruginosa*.

#### Prueba de confirmación con el medio KING B

##### Subcultivo en agar nutritivo

- Subcultive todas las colonias que requieran confirmación del filtro de membrana en agar nutritivo para el análisis de agua e incube durante 22 ± 2 hr a 36 ± 2°C
- Compruebe la pureza de los subcultivos y pruebe la reacción de la oxidasa en aquellos que inicialmente eran de color marrón rojizo

##### Prueba de oxidasa

- Referir a ISO 16266

- Alternativamente, utilice pruebas de oxidasa disponibles comercialmente siguiendo las instrucciones del fabricante

##### Inoculación e incubación en el medio KING B

- Derrita el agar en un baño de agua hirviendo. Deje que el medio se enfríe a 45–50 °C
- Deje los tubos en posición inclinada hasta que el medio esté suficientemente solidificado (una vez inclinado, este medio puede conservarse durante varias semanas). Asegúrese de que el tapón esté bien enroscado para evitar la desecación del medio)
- Inocule los tubos con una estría media en la superficie del agar, utilizando un asa de cultivo tomando de un caldo o de un agar
- Vuelva a colocar el tapón en cada tubo, sin enroscarlo. Incube a 36 ± 2°C durante 24 hr hasta 5 días (en general, 24 horas son suficientes)

#### Lectura e interpretación

- Examine el crecimiento bajo luz ultravioleta y anote la presencia de fluorescencia. Registre como positiva cualquier fluorescencia que aparezca en los 5 días siguientes

## Referencias

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

King, EO, Waerd, M, and Raney, DE. (1954) Two simple media for the demonstration of pyocyanin and fluorescein. *Journal of Laboratory Clinical Medicine* 44 (2) 301-307.

## Historial de revisiones

Fecha de publicación	N.º de documento	Cambio
Septiembre de 2021	5093 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: V5_05-08_11</li></ul>
Agosto de 2022	5093 Ver B	<ul style="list-style-type: none"><li>- Nuevo código de catálogo</li><li>- Eliminación de números de catálogo obsoletos de la lista de materiales</li><li>- Actualizaciones en el protocolo para pruebas de oxidasa y en la temperatura de incubación</li><li>- Eliminación de la referencia al patrón ISO incorrecto</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.