



## ÁGAR TSC (TRIPTONA-SULFITO-CICLOSERINA)

ENUMERAÇÃO DE ANAEROBIOS REDUTORES DE SULFITO E *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

### **USO**

O Ágar Triptona-Sulfito-Cicloserina (TSC) foi descrito por Harmon para o isolamento seletivo e enumeração de *Clostridium perfringens* em água e produtos alimentícios. Este meio também é recomendado para enumeração de anaeróbios redutores de sulfito em alimentos de origem animal.

A fórmula padrão atende à composição definida nas normas ISO 14189, ISO 7937 e NF V08-061.

### **PRINCÍPIOS**

Os microrganismos redutores de sulfito reduzem o sulfito de sódio a sulfeto, formando com citrato férrico um precipitado preto de sulfeto de ferro ao redor das colônias.

Para realizar a enumeração específica de *Clostridium perfringens* é recomendado incubar o meio a 37°C e então prosseguir com a confirmação das colônias características.

A microbiota contaminante é inibida parcialmente pela D-cicloserina, que também diminui o tamanho dos halos preto ao redor das colônias.

### **COMPOSIÇÃO TÍPICA**

(A composição pode ser ajustada para obter um desempenho ideal).

Para 1 litro de meio:

|  |        |
|--|--------|
| - Triptona .....                       | 15,0 g |
| - Peptona Papaínica de Soja.....       | 5,0 g  |
| - Extrato de levedura autolítica ..... | 5,0 g  |
| - Metabissulfito de sódio.....         | 1,0 g  |
| - Citrato férrico amoniacal .....      | 1,0 g  |
| - D-Cicloserina.....                   | 0,4 g  |
| - Ágar bacteriológico.....             | 15,0 g |

pH do meio pronto para uso a 25°C: 7,6 ± 0,2.

#### **Para 42 g de BK031 (ágar sulfito-ferro, base TSC)**

|  |        |
|--|--------|
| - Triptona .....                       | 15,0 g |
| - Peptona Papaínica de Soja.....       | 5,0 g  |
| - Extrato de levedura autolítica ..... | 5,0 g  |
| - Metabissulfito de sódio .....        | 1,0 g  |
| - Citrato férrico amoniacal .....      | 1,0 g  |
| - Ágar bacteriológico .....            | 15,0 g |

#### **Para um frasco de suplemento BS006**

##### **Cicloserina**

|                      |        |
|----------------------|--------|
| - D cicloserina..... | 200 mg |
|----------------------|--------|

#### **Para um frasco de suplemento BS092**



#### **Cicloserina**

- D cicloserina ..... 3,6 g

#### **Para um frasco de suplemento BS094**

#### **Cicloserina**

- D cicloserina..... 2,0 g

#### **PREPARAÇÃO**

##### **Preparação do meio desidratado:**

- Suspender 42,0 g de meio desidratado (BK031) em 1 litro de água destilada ou deionizada.
- Lentamente, leve o meio para ferver com agitação constante até completa dissolução.
- Distribuir em tubos de 20 mL ou frascos de 100 mL.
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar e mantenha a 44-47°C.

- Reconstituição:

42,0 g/L

- Esterilização:  
15 min a 121°C

##### **Preparação de suplemento liofilizado D cicloserina**

- Reidratar um frasco de suplemento liofilizado (BS006) com 5 mL de água estéril.
- Adicionar 1 mL de suplemento por 100 mL de ágar mantido a 44-47°C (ou 0,2 mL por tubo de 20 mL).

##### **Uso do meio pronto para liquefazer em frascos ou tubos:**

- Derreter o meio (se preparado com antecedência) ou o meio pronto para liquefazer (BM039 ou BM077), até completa liquefação.
- Resfriar e mantenha a 44-47°C.

##### **Preparação de meio completo**

- Pouco antes da inoculação, adicione 0,2 mL de suplemento a cada tubo de 20 mL de base mantido em 44-47°C ou 1 mL do suplemento para 100 mL de meio base.
- Homogeneizar perfeitamente e usar imediatamente.

#### **INSTRUÇÃO DE USO**

##### **Microbiologia alimentar, enumeração de anaeróbios redutores de sulfito (NF V08-061)**

- A inoculação pode ser feita em tubos de 20 mL ou em placas de Petri, de acordo com a conveniência do usuário.
- Aquecer a amostra a ser analisada, se necessário, para destruir as formas vegetativas e ativar os esporos.

##### Em tubos:

- Transferir 1 mL do inóculo e suas diluições decimais para os tubos, evitando ao máximo incorporar ar no meio.
- Homogeneizar perfeitamente.
- Incubar a  $46 \pm 1^\circ\text{C}$  por  $20 \pm 2$  horas.

- Semeando:

1 mL no tubo

- Incubação:

20 h a 46°C

##### Em placas de Petri

- Transferir 1 mL do inóculo e suas diluições decimais para as placas.
- Distribuir de 15 a 20 mL de meio na placa.

- Semeando:

1 mL em camada dupla

- Incubação:

Em anaerobiose

20 h a 46°C



- Homogeneizar perfeitamente realizando movimento em forma de 8.
- Deixar solidificar em uma superfície plana.
- Adicionar uma segunda camada de ágar e deixar solidificar.
- Incubar as placas em uma jarra anaeróbica por  $20 \pm 2$  horas a  $46^\circ\text{C}$  em presença de uma mistura de gás de hidrogênio e dióxido de carbono.

#### **Microbiologia de alimentos, enumeração de *Clostridium perfringens* (NF EN ISO 7937)**

- Transferir 1 mL do inóculo e suas diluições decimais para as placas.
- Distribuir de 15 a 20 mL de meio na placa.
- Homogeneizar perfeitamente realizando movimento em forma de 8.
- Deixar solidificar em uma superfície plana.
- Adicionar uma segunda camada de ágar e deixar solidificar.
- Incubar as placas em uma jarra de anaerobiose por ( $20 \pm 2$ ) horas a  $37^\circ\text{C}$ .

- Semeando:  
1 mL em camada dupla

- Incubação:  
Em anaerobiose  
20 h a  $37^\circ\text{C}$

#### **Qualidade da água, enumeração de *Clostridium perfringens* (ISO 14189)**

- Se necessário, destruir as formas vegetativas aquecendo por 15 min a  $60 \pm 2^\circ\text{C}$  a amostra a ser analisada.
- Despejar o ágar em placas de Petri estéreis e deixar esfriar sobre uma superfície fria.
- Filtrar a quantidade apropriada de água através de uma membrana.
- Colocar a membrana sobre superfície do ágar, com o lado da grade para cima, certificando-se de que não há bolhas de ar presas sob o filtro.
- Incubar as placas em uma jarra de anaerobiose por  $21 \pm 3$  horas a  $44 \pm 1^\circ\text{C}$ .

- Semeando:  
Filtração por membrana

- Incubação:  
Em anaerobiose  
21 h a  $44^\circ\text{C}$

#### **NOTA:**

Para melhorar as condições de anaerobiose, é possível adicionar uma segunda camada de meio base.

#### **LEITURA**

Contar as colônias com presença de halo preto.

Contar todas as colônias quando a semeadura for feita em uma membrana (ISO 14189) porque os anaeróbios redutores de sulfeto podem apresentar uma cor amarela, marrom ou cinza-escura.

Fazer as leituras assim que a jarra de anaerobiose for aberta, caso contrário, as colônias podem ficar pálidas devido à oxidação do sulfeto de ferro.

Realizar testes de confirmação para a contagem de *Clostridium perfringens*.

Consulte o ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRAFICO

#### **CONTROLE DE QUALIDADE**

**Meio básico desidratado:** pó bege e homogêneo.

**Aspecto liofilizado:** branco, possuindo após reconstituição uma solução incolor, que pode apresentar precipitado.

**Suplemento líquido de aparência:** Solução opalescente, branca a amarelada.



**Meio preparado:** ágar âmbar.

Resultado do cultivo (TSC completo com D-cicloserina) após 20 horas de incubação a 37°C (NF EN ISO 11133):

| Microrganismos                            | Crescimento (Relatório de produtividade) | Características das colônias |
|---|--|------------------------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007 | $P_R \geq 50 \%$                         | Preto                        |
| <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00080 | $P_R \geq 50 \%$                         | Preto                        |
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013        | Inibido                                  | -                            |

Resultado do cultivo (TSC completo com D-cicloserina) após 24 horas de incubação a 44°C (ISO 14189):

| Microrganismos                            | Crescimento (Relatório de produtividade) | Características das colônias |
|---|--|------------------------------|
| <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007 | $P_R \geq 50 \%$                         | Preto                        |
| <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00080 | $P_R \geq 50 \%$                         | Preto                        |
| <i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00174 | $P_R \geq 50 \%$                         | Preto                        |
| <i>Bacillus subtilis</i> WDCM 00003       | Inibido, pontuação 0                     | -                            |

#### **ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA**

**Meio básico desidratado:** 2-30°C.

**Meio pronto para liquefazer:** 2-25°C.

**Suplemento liofilizado seletivo de D-Cicloserina 200 mg:** 2-8°C.

**Suplemento líquido D cicloserina:** 2-8°C, protegido da luz.

As datas de validade são mencionadas nas etiquetas

**Meio básico preparado em frascos (\*):** 180 dias a 2-25°C.

**Suplemento de cicloserina reidratada (\*):** 20 dias a 2-8°C

**Meio completo preparado, com suplemento (\*):** Utilizar imediatamente após a preparação.

(\*) Valor indicativo determinado em condições padrão de preparação, seguindo as instruções do fabricante.

#### **APRESENTAÇÃO**

**Meio de base desidratado (sem D-cicloserina):**

Frasco de 500 g.....BK031HA

**Suplemento seletivo de D-Cicloserina 200 mg:**

Caixa com 10 frascos (qsp 500 mL) .....BS00608

**Suplemento Seletivo D-Cicloserina Líquido:**

Caixa com 10 frascos (qsp 9 litros) .....BS09208

1 frasco de 50 mL (qsp 5 litros) .....BS09408

**Meio pronto para liquefazer (base sem D-cicloserina):**

Caixa com 10 frascos de 200 mL .....BM07708

Caixa com 50 tubos de 20 mL.....BM03908



## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

Harmon, S.M., Kanter, D.A., and Peeler, J.T. 1971. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microb., 21: 922-927.

Hauschild, A.H.W., Hilsheimer, R., and Griffith, D.W. 1974. Enumeration of faecal *Clostridium perfringens* spores in egg yolk-free Tryptose-Sulfite-Cycloserine Agar. Appl. Microb., 27: 527-530.

Orth, D.S. 1977. Comparison of sulfite-polymyxin-sulfadiazine medium and tryptose-sulfite-cycloserine medium without egg yolk for recovering *Clostridium perfringens*. Appl. Environ. Microbiol., 33: 986-988.

ISO 14189. Novembre 2013. Qualité de l'eau – Dénombrement de *Clostridium perfringens* – Méthode de filtration sur membrane.

NF T90-415. Octobre 1985. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfite-réductrices et de *Clostridium* sulfite-réducteurs. Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.

NF EN ISO 7937. Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens*. Technique par comptage des colonies.

NF V08-061. Décembre 2009. Microbiologie des aliments. Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfite-réductrices par comptage des colonies à 46 °C.

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

## **OUTRAS INFORMAÇÕES**

As declarações feitas nas etiquetas têm precedência sobre as fórmulas ou instruções descritas neste documento e estão sujeitos a alterações a qualquer momento sem aviso prévio.

Código do documento: TSC GELOSE WITH CYCLOSERINE\_FR\_V15

Data de criação: 10-2015

Data de revisão: 11-2017

Motivo da revisão: adição de D-Cicloserina BS094 líquida

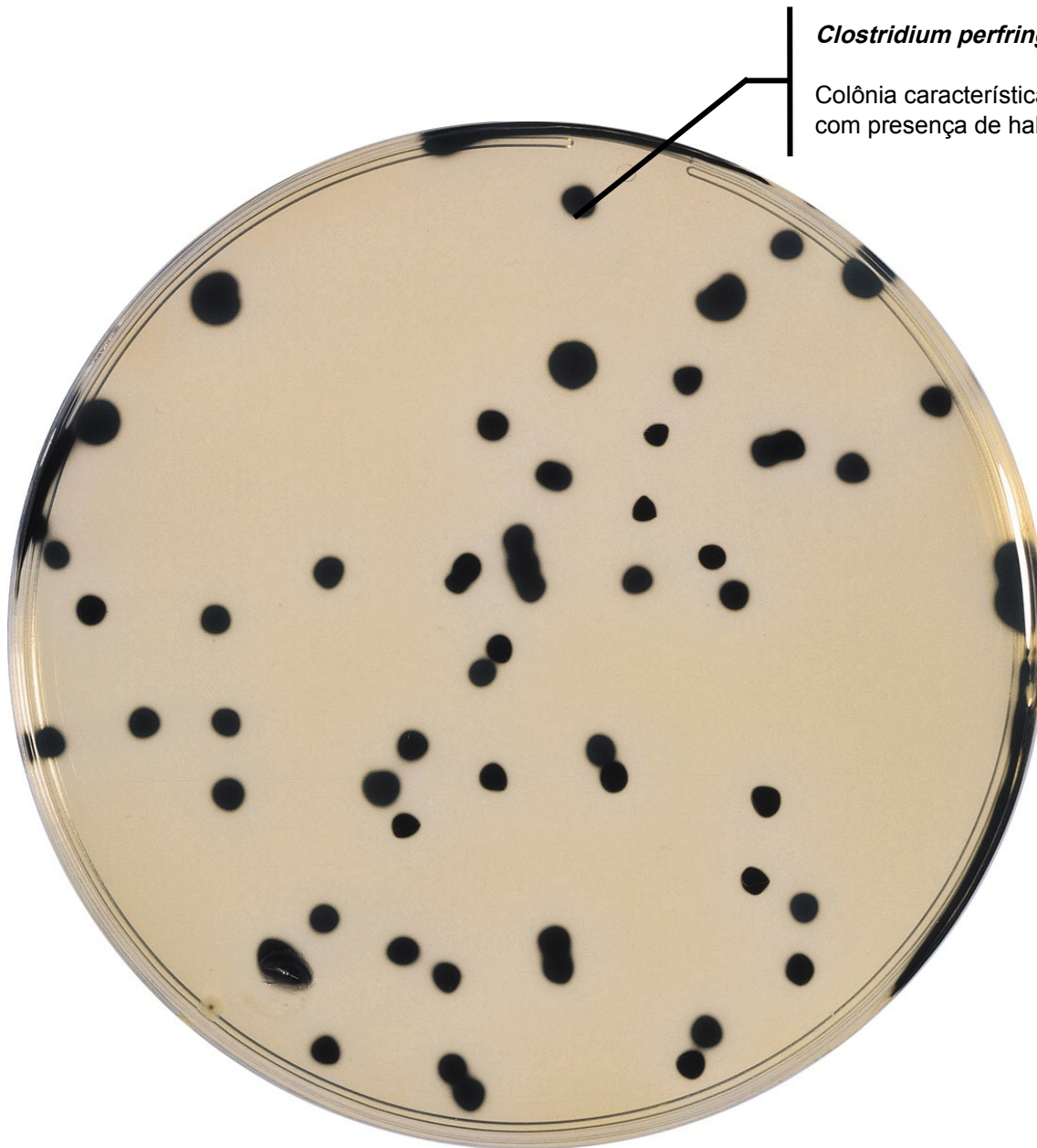
**ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRAFICO**

**Ágar TSC**

Detecção e enumeração de bactérias anaeróbias redutoras de sulfito

**Leitura:**

Crescimento obtido após 24 horas de incubação a 37°C em anaerobiose.



***Clostridium perfringens:***

Colônia característica: cor preta com presença de halo negro