

Base de Agar T.S.C. (Triptosa Sulfito Cicloserina) ISO

Cat. 1029

Para la detección y enumeración de *Clostridium perfringens* en alimentación.

Información práctica

Aplicaciones	Categorías
Recuento selectivo	<i>Clostridium perfringens</i>
Detección	<i>Clostridium perfringens</i>

Industria: Aguas de consumo / Alimentación

Regulaciones: ISO 11133 / ISO 14189 / ISO 7937

Principios y usos

La Base de Agar T.S.C. (Triptosa Sulfito Cicloserina) fue formulada originalmente por Harmon para la identificación y enumeración de presuntos *Clostridium perfringens* en aguas y alimentos. Este medio ha sido documentado como uno de los medios más útiles para la recuperación cuantitativa de *C. perfringens*, al tiempo que suprime el crecimiento de otros anaerobios facultativos. Es un medio recomendado por el Comité de Normativa ISO. Dependiendo de la fórmula, se pueden agregar suplementos para aumentar la selectividad del medio. El suplemento Emulsión Yema de Huevo (Cat. 5152) se agrega para demostrar la actividad de la lecitinasa, donde después de la incubación, los productores de lecitinasa generan un área opaca en el entorno de la colonia.

La base proporciona las condiciones óptimas para el desarrollo de *Clostridia*. La triptosa y la peptona de soja proporcionan nitrógeno, vitaminas, minerales y aminoácidos esenciales para el crecimiento. El extracto de levadura es una fuente de vitaminas, particularmente del grupo B, esencial para el crecimiento bacteriano. El citrato de amonio férrico y el disulfuro disódico son indicadores de H₂S. El agar bacteriológico es el agente solidificante. La cicloserina inhibe la flora bacteriana acompañante, y puede hacer que las colonias que se desarrollan permanezcan con un tamaño más pequeño.

Las colonias que producen sulfuro de hidrógeno se caracterizan por un ennegrecimiento debido a la reacción con la sal férrica. La degradación de la lecitina de la yema de huevo genera productos insolubles que se acumulan alrededor de las colonias, formando un precipitado blanco. Después de 24 horas de incubación, todas las colonias negras, lecitinasa positivas y lecitinasas negativas, deben considerarse como presuntas positivas para *C. perfringens*, y deben realizarse las pruebas de confirmación correspondientes.

Fórmula en g/L

Digerido enzimático de caseína	15	Agar bacteriológico	15
Disulfuro disódico (Anhidro)	1	Citrato de amonio férrico	1
Extracto de levadura	5	Digerido enzimático de soja	5

Preparación

Suspender 42 gramos del medio en un litro de agua destilada. Mezclar bien y disolver por calentamiento agitando con frecuencia. Hervir durante un minuto hasta su completa disolución. Esterilizar en autoclave a 121 °C durante 15 minutos. Enfriar el medio según la normativa aplicable y agregar asépticamente dos viales de Suplemento para *Clostridium perfringens* (Cat. 6020) reconstituido (cada uno) en 5 ml de agua destilada estéril caliente. Si se desea, se puede agregar 25 ml de Suplemento Emulsión Yema de Huevo (Cat. 5152) (no se indica en la Normativa ISO). Homogeneizar suavemente y dispensar en placas de Petri.

Instrucciones de uso

Recuento de *Clostridium perfringens* en alimentos de acuerdo a ISO 7937:

- Transferir 1 ml de la suspensión inicial a las placas de Petri vacías.
- Verter 10 a 15 ml de Agar TSC (44-47 °C) en la placa y mezclar con el inóculo girando suavemente cada placa. Cuando el medio se haya solidificado, agregar una sobrecapa de 10 ml de agar TSC.
- Incubar en condiciones anaeróbicas a 37 °C durante 20±2 horas.
- Después de 24 horas de incubación, todas las colonias negras, lecitinasa positivas y las lecitinasas negativas, deben considerarse como colonias presuntas positivas de *C. perfringens* y deben realizarse las correspondientes pruebas de confirmación.

Recuento de *Clostridium perfringens* en muestras de agua de acuerdo a ISO 14189:

- Filtrar un volumen medido de agua, para crecer entre 10-80 colonias en la membrana.

- Colocar la membrana en una placa de Agar TSC.
- Incubar las placas con los filtros, en condiciones anaeróbicas a 44 ± 1 °C durante 21 ± 3 horas, invertidas.
- Después de 24 horas de incubación, todas las colonias negras, lecitinasas positivas y las lecitinasas negativas, deben considerarse como colonias presuntas positivas de *C. perfringens* y deben realizarse las correspondientes pruebas de confirmación.

Control de calidad

Solubilidad	Apariencia	Color del medio deshidratado	Color del medio preparado	Final pH (25°C)
Sin restos	Polvo fino	Beige	Ámbar ligeramente opalescente	$7,6\pm 0,2$

Test microbiológico

De acuerdo a ISO 11133, Microbiología de los alimentos: *Clostridium perfringens* y *Escherichia coli*.

Condiciones de incubación: (37 ± 1 °C, atmósfera anaeróbica / 20 ± 2 h).

Condiciones inoculación: Productividad cuantitativa (100 ± 20 . Min. 50 CFU) / Selectividad (10^4 - 10^6 CFU).

Medio referencia: TSA

De acuerdo a ISO 11133, Microbiología del agua: *Clostridium perfringens* y *Bacillus subtilis*.

Condiciones incubación: (44 ± 1 °C, atmósfera anaeróbica / 21 ± 3 h).

Condiciones inoculación: Productividad cuantitativa (100 ± 20 . Min. 50 CFU) / Selectividad (10^4 - 10^6 CFU).

Medio referencia: TSA

Microrganismos	Especificación	Reacción característica
<i>Clostridium perfringens</i> ATCC 13124	Buen crecimiento >50%	Colonias negras
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	Inhibición total	
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	Inhibición total	

Almacenamiento

Temp. Min.: 2 °C

Temp. Max.: 25 °C

Bibliografía

Sahidi S.A. and Ferguson A.R. (1971) Appl. Microbiol, 21 500-506. Harmon S.M., Kauttar D.A. and Peeler J.T. (1971) Appl. Microbiol. 21 922-927.

Hauschild A.H.W. and Hilsheimer R. (1973) Appl. Microbiol. 27. 78-82.

International standard ISO 7937 Microbiology of food and animal feeding stuffs-Horizontal method for enumeration of *Clostridium perfringens* –colony count technique

International standard ISO 14189 Water quality — Enumeration of *Clostridium perfringens* — Method using membrane filtration