

## Milieu liquide R (milieu Lactose-sulfite)

356-4914

### DOMAINE D'APPLICATION

Bouillon pour la recherche et la confirmation des spores de *Clostridium perfringens* dans les produits alimentaires après incubation à 46°C.

### REFERENCE(S)

#### MICROBIOLOGIE PHARMACEUTIQUE

• **Pharmacopée Européenne 6.0** - Méthodes Biologiques - **2.6.13.** : Contrôle Microbiologique des produits non stériles (Recherche de micro-organismes spécifiés)

### PRINCIPE

Le principe du bouillon Lactose-Sulfite repose sur l'aptitude du *Clostridium perfringens* à fermenter le lactose en produisant du gaz (observable dans la cloche de Durham) et à réduire le sulfite en sulfure à 46°C (précipité noir de sulfure de fer dans le fond du tube).

### PRESENTATION

#### Déshydraté

100 g

code 356-4914

### CONSERVATION

- Déshydraté : +15-25°C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais et sec
- La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

### FORMULE THEORIQUE

Peptone	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Chlorure de sodium	2,5 g
Lactose	10 g
Chlorhydrate de cystéine	300 mg
Eau distillée	1000 ml

pH (25 °C) final = 7,1 ± 0,1

*NB : Des adaptations de la formule ont pu être réalisées afin d'atteindre les critères de performance requis.*

### AUTRE(S) PRODUIT(S) NECESSAIRE(S) (NON FOURNI(S))

- Diluant(s)
- Eau distillée
- Solution stérile de métabisulfite de sodium à 1,2 % ou solution stérile de sulfite de sodium à 1,2 %
- Solution stérile de citrate de fer III ammoniacal à 1 %

### MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Tubes à essais (16 x 160 mm) avec bouchons autocassables et cloches de Durham correspondantes
- Fioles munies de cloches de Durham correspondantes
- Pipettes stériles (10 ml,.....)
- Pipettes Pasteur stériles (code 355-0751)
- Bain-marie avec une précision de ±1°C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire

### PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

**Toujours agiter avant chaque utilisation.**

Dissoudre 20,3 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée.

Faire chauffer légèrement jusqu'à dissolution complète.

Répartir en tubes munis de cloches de Durham à raison de 8 ml par tube (utilisation du bouillon comme milieu de confirmation pour *Clostridium perfringens*).

Répartir en fioles munies de cloches de Durham à raison de 80 ml par fiole (utilisation du bouillon pour la recherche des spores de *Clostridium perfringens* dans les gélatines alimentaires).

Stériliser à l'autoclave pendant 15 minutes à 121°C ± 1°C.

### Juste avant l'ensemencement :

Eliminer les bulles éventuellement présentes dans les cloches de Durham en retournant les tubes (ou les fioles).

Dévisser légèrement les bouchons des tubes (ou des fioles), puis les placer 5 minutes dans un bain-marie bouillant (régénération).

Revisser les tubes.

Refroidir les tubes à température ambiante. Puis ajouter dans chaque tube 0,5 ml d'une solution stérile de métabisulfite de sodium (ou de sulfite de sodium\*) stérile à 1,2 % et 0,5 ml d'une solution stérile de citrate de fer III ammoniacal à 1 %. Dans le cas de fioles de 80 ml de bouillon, ajouter 5 ml de chaque solution.

- Les résultats obtenus avec le sulfite de sodium (croissance des *C. perfringens*, intensité de coloration du précipité de sulfure de fer) sont généralement supérieurs à ceux obtenus avec le métabisulfite de sodium.

## PROTOCOLE

### • Préparation des échantillons

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

### • Ensemencement et incubation

- Utilisation du bouillon Lactose-Sulfite comme milieu de confirmation pour *Clostridium perfringens* :

Ensemencer un tube de bouillon Lactose-Sulfite avec quatre à cinq gouttes d'une culture de 18 à 24 heures en bouillon thioglycolate de la bactérie à identifier (*Clostridium perfringens* présumé).

Bien revisser le tube. Incuber à 46°C pendant 24 heures (± 2 heures).

- Utilisation du bouillon Lactose-Sulfite comme milieu de recherche des spores de *Clostridium perfringens* :

Ensemencer une fiole de bouillon Lactose-Sulfite avec 10 ml de solution de gélatine à analyser.

Bien revisser la fiole. Incuber à 46°C pendant 24 heures (± 2 heures), poursuivre éventuellement l'incubation jusqu'à 48 heures (± 2 heures).

## LECTURE ET INTERPRETATION

- Utilisation du bouillon Lactose-Sulfite comme milieu de confirmation pour *Clostridium perfringens* :

*Clostridium perfringens* : tube présentant un précipité noir de sulfure de fer et dont la cloche de Durham est remplie au moins au tiers par du gaz.

- Utilisation du bouillon Lactose-Sulfite comme milieu de recherche des spores de *Clostridium perfringens* :

L'échantillon contient au moins une spore de *Clostridium perfringens* si la fiole présente un précipité noir de sulfure de fer et si la cloche de Durham contient du gaz.

## PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Eliminer les bulles de gaz éventuellement présentes dans la cloche de Durham avant régénération en retournant les tubes (ou les fioles).

- Eviter toute réoxygénation du bouillon de base après régénération. L'inoculum est mélangé au bouillon par des mouvements circulaires en évitant toute arrivée d'air dans le bouillon. Il est recommandé de ne pas utiliser d'agitateur mécanique (type Vortex par exemple).

- Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

## CONTROLE QUALITE

Au regard des travaux préalables à l'harmonisation des pharmacopées actuellement en cours, nous vous recommandons de vous reporter aux certificats de contrôle pour connaître les modalités mises en œuvre pour le contrôle de la qualité (performance et sélectivité) des milieux de culture fabriqués par Bio-Rad.

Tous les produits fabriqués et commercialisés par la société Bio-Rad sont placés sous un système d'assurance qualité de la réception des matières premières jusqu'à la commercialisation des produits finis.

Chaque lot du produit fini fait l'objet d'un contrôle de qualité et il n'est commercialisé que s'il est conforme aux critères d'acceptation.

La documentation relative à la production et au contrôle de chaque lot est conservée.

## MOTS CLES

Lactose-Sulfite/Spores de *Clostridium perfringens*/Produits alimentaires/Recherche/Confirmation/Lactose/Gaz/Cloche de Durham/NPP/Bouillon

## BIBLIOGRAPHIE

**BEERENS, H., CRIQUELION, J., LEPAGE, C., ROMOND, CH. (1981)** : Dénombrement en milieu liquide de *Clostridium perfringens* dans les aliments. Ann. Fals. Chim. **74** : 181-184