

T.B.X./Gélose (Tryptone Bile X - Glucuronide)

355-5309
356-4035

DOMAINE D'APPLICATION

Milieu **chromogénique** sélectif pour dénombrer directement (sans confirmation des colonies) les *Escherichia coli* dans les produits destinés à l'alimentation humaine et animale.

REFERENCE(S) NORMATIVE(S)

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

• **NF ISO 16649-1 (Août 2001)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive : Partie 1 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et d'acide 5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate (IC: V08 031-1).

• **NF ISO 16649-2 (Juillet 2001)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive : Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44°C au moyen d'acide 5-bromo 4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate (IC : V08-031-2).

• **XP ISO/TS 16649-3 (Décembre 2005)** : Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive : Partie 3 : Technique du nombre le plus probable avec utilisation de 5-bromo-4 chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate (IC: V08 031-3).

• **NF V08-053 (Novembre 2002)** : Microbiologie des aliments – Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive par comptage des colonies à 44 °C au moyen du 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta D-glucuronide - Méthode de routine.

PRINCIPE

Le principe du milieu repose sur la mise en évidence de la β -D-glucuronidase des *Escherichia coli*.

Le milieu contient un complexe (chromogène lié à un sucre) appelé 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide (BCIG) spécifique de la β -D-glucuronidase. Ce complexe absorbé par le micro-organisme cible est hydrolysé par cette enzyme. Le sucre est consommé par la bactérie et l'agent chromogène s'accumule dans cette même cellule, donnant ainsi la couleur bleue/bleu-verte à la colonie *E.coli*.

Ce milieu est sélectif vis-à-vis des Gram + et de la flore interférente par l'action conjuguée Température élevée-sels biliaires.

Remarque : Il existe des souches *E.coli* :

- β -D-glucuronidase négatives (environ 3-4 %) qui ne donnent pas la couleur bleue, par exemple *E.coli* O157.

- qui ne se développent pas à la température élevée de 44 °C, par exemple *E.coli* O157:H7

- Quelques sérovars de *Salmonella* et quelques espèces de *Shigella* possèdent également l'enzyme β -D-glucuronidase (< 1,5%).

PRESENTATION

• Prêt à l'emploi

100 ml x 6 flacons

code 355-5309

• Déshydraté

500 g

code 356-4035

CONSERVATION/VALIDITE/LOT

• Prêt à l'emploi : + 2 - 8 °C à l'obscurité.

• Déshydraté : + 15 - 25 °C, flacon soigneusement fermé dans un endroit frais, sec et à l'obscurité.

• La date de péremption et le numéro du lot sont indiqués sur le conditionnement.

• Milieu préparé par l'utilisateur à partir du milieu sec : 1 mois à + 2 - 8 °C à l'obscurité.

FORMULE THEORIQUE

Digestat enzymatique de caséine	20 g
Sels biliaires N°3	1,5 g
BCIG	0,075 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml

pH (25°C) final = 7,2 ± 0,2

AUTRES PRODUITS NECESSAIRES

NON FOURNIS (liste non exhaustive)

- Diluant(s)
- Eau distillée

MATERIEL NECESSAIRE NON FOURNI

(liste non exhaustive)

- Balance
- Sacs de pesée stériles
- Broyeur

T.B.X./Gélose (Tryptone Bile X - Glucuronide)

- Agitateur - homogénéisateur
- Pipettes stériles (1 ml,...)
- Etaleurs stériles
- Boîtes de Petri stériles ($\varnothing = 90$ mm)
- Membranes filtrantes stériles ($\varnothing = 85$ mm, 0,45 μ m à 1,2 μ m)
- Bain-marie avec une précision de ± 1 °C
- Etuves ou enceintes thermostatées avec une précision de ± 1 °C
- Autoclave
- Tout matériel courant d'un laboratoire.

PREPARATION DU MILIEU DESHYDRATE

Toujours agiter avant chaque utilisation

Dissoudre 33,6 grammes de poudre dans un litre d'eau distillée.

Attendre 5 minutes, puis mélanger jusqu'à l'obtention d'une suspension homogène.

Chauffer lentement, en agitant fréquemment, puis porter à ébullition jusqu'à complète dissolution.

Répartir, puis stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

Taux de reconstitution : 33,6 g/500 grammes de poudre permettent de reconstituer 14,8 litres de milieu.

PROTOCOLE

• Préparation des échantillons

A effectuer conformément à la norme du produit concerné.

• Ensemencement (2 boîtes/dilution)

• Avec membrane

(pour produits susceptibles de contenir des bactéries sévèrement stressées).

- Préparer des boîtes de Petri avec le milieu MMGA et avec le milieu TBX (environ 15 ml/boîte).
- Placer aseptiquement la membrane sur la surface sèche de la gélose MMGA.
- Transférer 1 ml de l'échantillon à analyser (produit liquide) ou 1 ml de la suspension mère (autres produits) et/ou 1 ml de ses dilutions décimales au centre de la membrane.
- Etaler l'inoculum de façon uniforme sur toute la surface de la membrane, en évitant tout débordement hors de la membrane.
- Laisser les boîtes ensemencées en position horizontale à température ambiante pendant environ 15 minutes jusqu'à ce que l'inoculum soit imprégné par la gélose.
- Retourner les boîtes et incubé à 37°C (± 1 °C) pendant 4 heures (± 1 h).
- Après la revivification, transférer, à l'aide de pinces stériles, la membrane du milieu MMGA sur les boîtes de Pétri contenant le

milieu TBX.

• Sans membrane

(bactéries stressées ou non)

- Transférer, à l'aide de pipettes stériles, 1 ml de l'échantillon à analyser (produit liquide) ou 1 ml de la suspension mère (autres produits) et/ou 1 ml de ses dilutions décimales dans les boîtes de Pétri stériles.
- Couler rapidement une quantité d'environ 15 ml du milieu préalablement fondu et refroidi à 44 - 47 °C.
- Homogénéiser. Laisser refroidir sur une surface fraîche et horizontale.

• Incubation

- Retourner les boîtes et incubé à 44°C (± 1 °C) pendant 21 heures (± 3 h).

NB : Le temps d'incubation ne doit pas dépasser 24 heures.

Ensemencement technique NPP

Après incubation, à partir de chaque tube de MMG* (simple et double concentration code 355-5308 et 355-5310) présentant une coloration jaune, mettre en subculture avec une anse bouclée sur une boîte de milieu TBX et pratiquer des stries pour obtenir des colonies isolées.

* voir fiche technique correspondante.

LECTURE ET INTERPRETATION

• Comptage des colonies (UFC)

Après la période d'incubation, procéder au comptage des colonies caractéristiques d'*E. coli* qui sont bleues ou bleues-vertes. Les autres colonies sont blanches/beiges.

NB :

- Rétention que les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total.
- Selon les différentes méthodes de calcul, les boîtes contenant aucune colonie peuvent être retenues

• Expression des résultats/Calculs

- Se reporter aux normes 16649 -1 -2 et -3 et NF ISO 7218

PRECAUTIONS D'EMPLOI

- Pour les milieux prêt à l'emploi et préparé à l'avance, il faut éviter toute surchauffe prolongée pendant leur fusion. Pour conserver une qualité optimale, le milieu ne doit pas subir plus de 1 cycle de surfusion-gélification.
- Le milieu peut présenter un aspect floconneux après gélification en flacon. Il conserve cependant toutes ses qualités dès lors que

2/3

T.B.X./Gélose (Tryptone Bile X - Glucuronide)

- cet aspect disparaît après fusion et agitation.
- Le développement des colonies sur le fond de la boîte de Pétri pouvant nuire à la lecture (tâches), le temps qui s'écoule entre le dépôt de l'inoculum dans la boîte de Pétri et l'ajout du milieu ne doit pas dépasser 15 minutes.
 - Eviter d'enfermer des bulles d'air en de sous de la membrane lors de son dépôt sur la gélose. Si nécessaire, aplatir doucement et avec précaution la membrane avec la pince.
 - Lors de l'ensemencement sans membrane, si la présence d'*E.coli* stressés est soupçonnée, incubé 4 heures à 37 °C (± 1 °C), puis 21 heures (± 3h) à 44 °C (± 1 °C).
 - "Le sulfoxyde de diméthyle est nocif par inhalation et contact. L'utilisation d'une hotte à extraction lors de sa manipulation est conseillée du fait de sa toxicité. Le diluant recommandé par le fabricant peut être utilisé.
 - " Bio-Rad recommande l'utilisation d'eau pour cette dilution.
 - Respecter les Bonnes Pratiques de Laboratoire.

CONTROLE QUALITE DU FABRICANT

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

T.B.X. / *Escherichia coli* / Produits alimentaires/ Dénombrement / BCIG / Bêta-D-Glucuronidase/ Chromogène / Milieu.

PERFORMANCES/CONTROLE QUALITE DU TEST

Les performances culturales sont contrôlées à l'aide des souches suivantes :

MICRO-ORGANISMES	Aspect des colonies ¹	
	CROISSANCE	COULEUR
<i>Escherichia coli</i> ² WDCM 00013	+	Bleues
<i>Escherichia coli</i> ² WDCM 00012	+	Bleues
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087	Inhibé	NA
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00009	Inhibé	NA
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ² WDCM 00025	+	Blanches à vert-beige
<i>Citrobacter freundii</i> ² WDCM 00006	+	Blanches à vert-beige

¹ Suivant les recommandations de l'ISO/TS 11133-2/A1:2011

² Rendement de Productivité ≥ 0,5 (Réf = TSA)

NA = Non Applicable