

Egalement nommé

TBX

Principe

Milieu chromogène sélectif et différentiel pour la détection et le dénombrement d' E.Coli β glucuronidase (+) selon les standards ISO.

Formule * en g/L

Tryptone.....	20.000
Sels biliaire No. 3.....	1.500
5-Bromo-4-chloro-3- indoxyl- β -D-glucuronide.....	0.075
Agar.....	15.000

pH final 7.2 \pm 0.2 à 25 °C

*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance

Préparation

Verser 36,6 g de poudre dans 1 litre d'eau distillée. Porter à ébullition tout en mélangeant jusqu'à dissolution totale de la poudre. Distribuer dans des récipients appropriés et stériliser 15 minutes à 121°C à l'autoclave.

Description

Escherichia coli est le seul coliforme qui possède la β -D-glucuronidase et peut être facilement différencié des autres coliformes ne présentant pas cette activité enzymatique. Il existe quelques souches d'E. Coli (moins de 3 à 4% de la population totale) qui sont β -D-glucuronidase négatives.

E. coli absorbe le substrat chromogène (X- β -D-glucuronide) et l'enzyme bactérienne β -D-glucuronidase sépare la liaison entre la fraction X chromophorique et le β -D-glucuronide.

La fraction X libre colore les cellules d'E. Coli et produit une colonie bleu-vert.

La teneur élevée en Sels biliaire du milieu inhibe la croissance des bactéries à Gram positif qui l'accompagnent et la température d'incubation élevée (44 \pm 1 °C) inhibe les bactéries à Gram négatif autres que E. coli.

Utilisation

1 Inoculation directe (Technique dans la masse)

Pipeter 1 ml du produit à tester ou de ses dilutions décimales dans des boîtes de Petri stériles (deux boîtes par dilution). Couler 15 ml du milieu TBX-Agar en surfusion (44-47 °C). Bien homogénéiser et laisser solidifier. L'écart de temps entre le pipeter du produit et verser le milieu ne doit pas excéder 15min. Incuber les boîtes pendant 20-24 heures

à 44 \pm 1 °C. Si la présence de cellules stressées est suspectée, incuber pendant une période initiale de 4 h \pm 0,25 à 37 \pm 1 °C, puis élever la température d'incubation à 44 °C. La durée totale d'incubation ne doit pas dépasser 24 heures et la température d'incubation ne doit pas dépasser 45 °C.

2. Filtration sur membrane (Technique de réhydratation ?)

Aucune membrane spéciale n'est recommandée. Toute membrane stérile et non inhibitrice en acétate de cellulose ou en esters mixtes de cellulose, avec une taille de pores de 0,45 μ m à 1,2 μ m et un diamètre de 85 mm peut être utilisée.

2.1. Réhydratation

Placer aseptiquement une membrane sur la surface séchée de chacune des deux plaques de gélose au glutamate modifié aux minéraux (MMGA) avec soin pour éviter de piéger les bulles d'air. Ajouter 1 ml de l'échantillon à tester au centre de chaque membrane et étendre l'inoculum uniformément sur toute la surface de la membrane. Répétez la procédure pour chaque dilution de l'échantillon.

Laisser les plaques inoculées à température ambiante pendant 15 minutes jusqu'à ce que l'inoculum soit trempé dans la gélose. Incuber les plaques à 37 \pm 1 °C pendant 4 \pm 0,25 heures.

2.2. Transfert vers le milieu sélectif

Après la période de réhydratation, transférer les membranes du milieu de réhydratation vers les plaques de TBX Agar à l'aide de pinces stériles, en prenant soin d'éviter de piéger des bulles d'air sous la membrane. Ne touchez ni ne dérangez la surface de la membrane. Incuber les plaques pendant 20 à 24 heures à 44 °C (et pas plus de 45 °C).

3. Résultats

L'Escherichia coli β -D-glucuronidase positive = colonies caractéristiques produit des colonies bleues (bleu-vert). Certaines souches (3-4% de la population totale) d'E. Coli n'ont pas l'enzyme glucuronidase et produisent des colonies incolores. Certaines cellules stressées d'E. Coli sont incapables de se développer à 44 °C et ne produisent pas de colonies.

Contrôle qualité**Température d'incubation:** 44 ± 1 °C**Temps d'incubation:** 22 ± 2h**Inoculum:** Gamme utilisable 100±20 CFU. min. 50 CFU (productivité)/ 10⁴-10⁶ CFU (sélectivité)/ ≥ 10³ CFU (spécificité) selon ISO 11133:2014/Amd 1:2018. MF method.**Micro-organismes**

Enterococcus faecalis ATCC® 19433
Escherichia coli ATCC® 25922
Escherichia coli ATCC® 8739
E. coli NCTC® 13216
C. freundii ATCC® 43864

Croissance

Inhibée
Productivité > 0.50
Productivité > 0.50
Productivité > 0.50
Bonne

Remarques

Sélectivité
Colonies bleues
Colonies bleues
Colonies bleues
Colonies incolores

Références

- DELISLE, G.L. & A. LEY (1989) Rapid detection of *E. coli* in urine samples by a new chromogenic β-glucuronidase assay. *J. Clin. Microbiol.* 27:778-779
- ISO Standard 16649-1:2018. Microbiology of foods chain- Horizontal method for the enumeration of β-glucuronidase-positive *Escherichia coli* - Part 1: Colony count technique at 44°C using membranes and 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-glucuronide.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- OGDEN, I.D. & A.J. WATT (1991) An evaluation of fluorogenic and chromogenic assays for the direct enumeration of *E. coli*. *Letters in Appl. Microbiol.* 13:212-215.
- SCHWEIZERISCHES LEBENSMITTELBUCH (2005) Kap.56 Mikrobiologie, Bundesamt für Gesundheit. Direktionsbereich Verbraucherschutz. Bern.

Conservation

Pour usage professionnel uniquement. À conserver fermé, loin de la lumière, dans un endroit frais et sec (+4°C à 30°C).