
GELOSE BEA (BILE, ESCULINE ET AZOTURE)

CONFIRMATION DES ENTEROCOQUES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose à la bile, à l'esculine et à l'azide de sodium (BEA) est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et le dénombrement des entérocoques dans les produits de la chaîne alimentaire ainsi que dans les produits pharmaceutiques. Elle est aussi utilisée pour le dénombrement des entérocoques en alimentation animale.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans les normes d'application obligatoire NF EN ISO 7899-2 et NF T90-421, pour la confirmation des entérocoques dans les eaux et les eaux de piscine.

2 HISTORIQUE

Rochaix a le premier montré l'intérêt de l'hydrolyse de l'esculine pour l'identification des entérocoques; puis, Meyer et Schonfeld ont démontré que cette hydrolyse, dans un milieu bilié, constituait un excellent test pour la mise en évidence des streptocoques du groupe D. Les premières formulations décrites par Swan ont été modifiées par Isenberg qui a obtenu un milieu à la fois plus sélectif et en même temps apte à favoriser une croissance rapide et une bonne récupération des germes recherchés.

La formule actuelle est décrite comme milieu de confirmation des entérocoques intestinaux dans les eaux, lorsque le dénombrement est effectué par la méthode de filtration sur membrane.

3 PRINCIPES

L'azide de sodium provoque l'inhibition des bactéries contaminantes à Gram négatif.

La bile de bœuf empêche la croissance des bactéries à Gram positif.

Les entérocoques hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales.

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	17,00 g
- Peptone pepsique de viande	3,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Bile de bœuf bactériologique	10,00 g
- Chlorure de sodium	5,00 g
- Esculine	1,00 g
- Citrate ferrique ammoniacal	0,50 g
- Azide de sodium.....	0,15 g
- Agar agar bactériologique	13,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,1.

5 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 54,6 g de milieu déshydraté (BK158) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri et laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
54,6 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou bien le milieu prêt-à-liquéfier (BM104) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.

6 MODE D'EMPLOI

Confirmation des entérocoques intestinaux dans les eaux :

- Après culture sur gélose de Slanetz et Bartley, transférer la membrane sans retournement sur les boîtes non séchées.
- Incuber à 44 ± 1 °C pendant 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
Dépôt filtre

✓ **Incubation :**
2 h à 44 °C

Dénombrement en alimentation animale :

- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- A la surface du milieu préparé en boîtes, transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales.
- Ensemencer l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 37 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface

✓ **Incubation :**
24 h à 37 °C

7 LECTURE

Après croissance sur gélose de Slanetz et Bartley et transfert de la membrane sur BEA, les colonies typiques montrent une couleur brune à noire dans le milieu environnant.

En dénombrement direct sur BEA, les entérocoques présentent de petites colonies translucides et un halo brun à noir.

Les staphylocoques et les levures peuvent donner des colonies opaques sans halo noir. Il est indispensable d'identifier les microorganismes suspects, notamment pour écarter toute confusion avec les *Listeria* qui peuvent donner des colonies similaires à celles des entérocoques.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose ambrée, à reflet bleuâtre.

Réponse culturale après 24 h d'incubation à 37 °C :

Microorganismes	Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Escherichia coli</i>	WDCM 00087 WDCM 00013 $P_R \geq 50\%$ Inhibée, score 0

Hydrolyse de l'esculine après 2 heures d'incubation à 44 °C (FD T 90-461) :

Microorganismes	Réaction en 2 heures
<i>Enterococcus faecalis</i> <i>Aerococcus viridans</i>	WDCM 00176 WDCM 00061 Positive Négative

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu prêt-à-liquéfier en flacons : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C.

(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK158HA

Milieu prêt-à-liquéfier :

Pack de 10 flacons de 100 mL BM10408

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Isenberg, H.D., Goldberg, D. and Sampson, J.. 1970. Laboratory Studies with a Selective *Enterococcus* Medium. Applied Microbiology, **20 (3)** : 433-436.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. Dénombrement des streptocoques fécaux présumés (Méthode par ensemencement en milieux liquides). Dunod 7ème Ed., 825-828.

NF EN ISO 7899-2. Août 2000. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des entérocoques intestinaux. Partie 2 : Méthode par filtration sur membrane.

NF T 90-421. Août 2006. Essais des eaux. Examens bactériologiques des eaux de piscines.

NF EN 15788. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement de l'entérocoque (*E. faecium*) spp.

FD T 90-461. Août 2016. Qualité de l'eau - Microbiologie - Contrôle qualité des milieux de culture.

12 AUTRES INFORMATIONS

Les mentions portées sur les étiquettes sont prédominantes sur les formules ou les instructions décrites dans ce document et sont susceptibles d'être modifiées à tout moment, sans préavis.

Code document : BEA_FR_V13

Date création : 06-2003

Date de révision : 06-2017

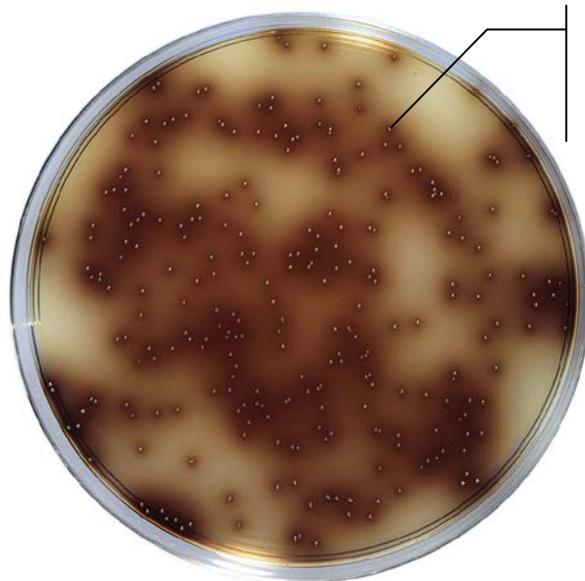
Motif de révision : Correction variation pH

Gélose BEA

Détection et dénombrement des Entérocoques.

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 37 °C.



Enterococcus faecalis

Colonie caractéristique :
petite, incolore et entourée
d'un halo noir.