

# GÉLOSE TRYPTONE-BILE-GLUCURONATE (TBX)

DENOMBREMENT DES *ESCHERICHIA COLI* β-D-GLUCURONIDASE POSITIVE

## 1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose TBX est un milieu sélectif destiné au dénombrement des *Escherichia coli* β-D-glucuronidase positive dans les produits alimentaires et les échantillons de l'environnement de production. Le résultat est obtenu directement par comptage des colonies caractéristiques après seulement 24 heures d'incubation, sans qu'il soit nécessaire de pratiquer une étape de confirmation.

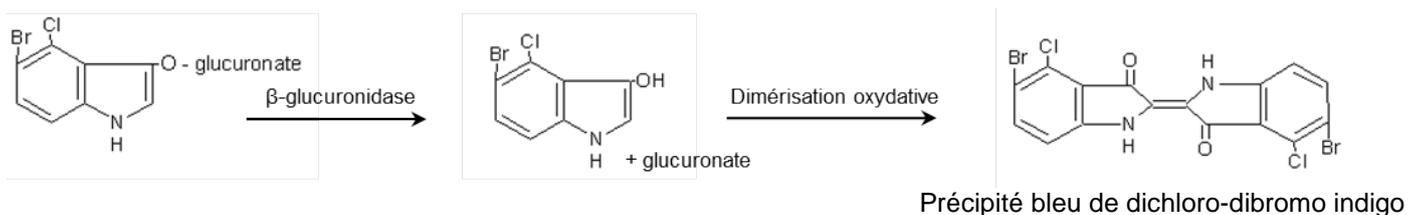
La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF ISO 16649-1, NF ISO 16649-2 et NF EN ISO 16649-3.

## 2 HISTORIQUE

En 1949, Buehler *et al.* furent les premiers à relever la présence d'une β-D-glucuronidase chez *Escherichia coli*. Depuis cette époque, la plupart des études ont montré que 94 à 97% des *Escherichia coli* d'origine humaine ou issues de l'environnement possèdent cette activité enzymatique. Cette dernière a été également détectée chez les *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* et *Yersinia*, mais sa présence ne concerne qu'un nombre réduit de souches dans chacune des espèces citées. La β-D-glucuronidase peut donc être considérée comme un indicateur valable pour la détection d'*Escherichia coli* dans les produits alimentaires et dans les eaux. En 1990, Restaino a utilisé avec succès un nouveau substrat chromogène : le BCIG. Une fois incorporé dans une gélose au Tergitol, cette dernière permettait d'effectuer la numération en 24 heures des *Escherichia coli* présents dans les produits carnés. La gélose TBX ne contient pas de Tergitol, ce dernier composé étant remplacé par des sels biliaires qui assurent des propriétés sélectives similaires.

## 3 PRINCIPES

Le BCIG (acide 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronique) est un substrat chromogène. La plupart des souches d'*Escherichia coli* possédant une β-D-glucuronidase agissent par clivage du BCIG, entraînant la coloration des colonies en bleu à bleu vert selon le mécanisme réactionnel suivant :



Il est important de noter que tous les *Escherichia coli* ne possèdent pas de β-D-glucuronidase et en particulier le sérotype entérohémorragique O157 qui présente des colonies blanches.

Les sels biliaires inhibent la croissance des microorganismes à Gram positif et favorisent la récupération des *Escherichia coli*. L'incubation réalisée à 44 °C et impérativement limitée à 24 heures permet d'inhiber la croissance de la majorité des microorganismes contaminants.

## 4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone ..... 20,0 g
- Sels biliaires n°3..... 1,5 g
- BCIG (5-bromo-4-chloro-3-indolyl  $\beta$ -D-glucuronate)..... 75,0 mg
- Agar agar bactériologique ..... 9,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C :  $7,2 \pm 0,2$ .

## 5 PREPARATION

### Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 30,6 g de milieu déshydraté (BK146) 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 47-50 °C.

✓ **Reconstitution :**  
30,6 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 le milieu prêt-à-liquéfier (BM069 ou BM171) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 47-50 °C.

## 6 MODE D'EMPLOI

### Numération sur membrane (NF ISO 16649-1) :

- Ensemencer la membrane avec 1 mL de l'inoculum et déposer sur une gélose modifiée au glutamate.
- Incuber pendant  $4 \pm 0,25$  h à  $37 \pm 1$  °C.
- Prélever la membrane et la déposer sur une gélose TBX coulée en boîte de Petri stérile et solidifiée.
- Incuber pendant 20 à 24 heures à  $44 \pm 1$  °C.

✓ **Ensemencement :**  
Dépôt membrane

✓ **Incubation :**  
20 h à 24 h à  $44 \pm 1$  °C

### Ensemencement en profondeur (NF EN ISO 16649-2) :

- Transférer 1 mL de la suspension et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler environ 15 mL de milieu maintenu à 44-47 °C, par boîte.
- Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à  $44 \pm 1$  °C pendant 18 à 24 heures maximum.

✓ **Ensemencement :**  
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**  
18 h à 24 h à  $44 \pm 1$  °C

### NOTE

Si la présence de microorganismes stressés est soupçonnée, incuber d'abord pendant 4 h à une température de 37°C, puis pendant 18 h à 24 h à une température de 44 °C.

### Dénombrement par méthode NPP (NF EN ISO 16649-3) :

- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.
- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Repiquer chaque tube de bouillon au glutamate modifié (BK186) présomptivement positif sur la gélose ainsi préparé.
- Incuber à  $44 \pm 1$  °C pendant 20 à 24 heures.

✓ **Ensemencement :**  
En stries

✓ **Incubation :**  
20 à 24 h à 44 °C

## 7 LECTURE

Les colonies caractéristiques présentent des colonies bleues à bleu-vert.

Procéder au comptage des boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et moins de 300 colonies au total (caractéristiques et non).

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 8 CONTROLE QUALITE

**Milieu déshydraté** : poudre blanc-crème, fluide et homogène.

**Milieu préparé** : gélose blanchâtre.

Réponse culturale après 21 heures d'incubation à 44 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : $P_R$ )	Caractéristiques
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	$P_R \geq 50\%$	Colonies bleues
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00202	$P_R \geq 50\%$	Colonies bleues
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Non inhibée, score 2	Colonies blanches
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Non inhibée, score 2	Colonies blanches à vert-beige
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée, score 0	-

## 9 CONSERVATION

**Milieu déshydraté** : 2-20 °C.

**Milieu prêt-à-liquéfier en flacons** : 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

**Milieu préparé en flacons (\*)** : 180 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

**Milieu préparé en boîtes (\*)** : 15 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

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

## 10 PRESENTATION

**Milieu déshydraté** :

Flacon de 100 g ..... BK146HM

Flacon de 500 g ..... BK146HA

**Milieu prêt-à-liquéfier** :

Pack de 10 flacons de 100 mL ..... BM06908

Pack de 10 flacons de 200 mL ..... BM17108

## 11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Buehler, H.J., Katzman, P.A. and Doisey, E.A.. 1949. Bacterial glucuronidase. Federation Proceedings, 8 : 189.

Adams, M.R., Grubb, S.M., Hamer, A. and Clifford, M.N.. 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on  $\beta$ -glucuronidase activity. Applied and Environmental Microbiology, 56 (7) : 2021-2024.

Restaino, L., Frampton, E.W. and Lyon, R.H.. 1990. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3 indolyl- $\beta$ -D-glucuronide (X-GLUC) for enumerating *Escherichia coli* in 24 h from ground beef. Journal of Food Protection, 53 (6) : 508-510.

NF ISO 16649-2. Juillet 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive. Partie 2 : Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- $\beta$ -D-glucuronate.

NF EN ISO 11133. Juillet 2014. Microbiologie des aliments, des aliments pour animaux et de l'eau - Préparation, production, stockage et essais de performance des milieux de culture (Tirage 2 (2016-01-01)).

NF EN ISO 16649-3. Juillet 2015. Microbiologie de la chaîne alimentaire.. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase-positives. Partie 3 : recherche et technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3- $\beta$ -D-glucuronate.

NF ISO 16649-1. Septembre 2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive - Partie 1 : technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide.

## 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 : GELOSE TBX\_FR\_V15.  
Date création : 01-2003  
Date de révision : 09-2018  
Motif de révision : Mise à jour du mode d'emploi, références bibliographiques

**Gélose TBX**

Dénombrement des *Escherichia coli*  $\beta$ -D-glucuronidase positive.

**Lecture :**

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 44 °C (en profondeur).

***Escherichia coli*  $\beta$ -glucuronidase positive**

Colonie caractéristique :  
couleur bleue à bleu vert

