

GÉLOSE TSC (TRYPTONE-SULFITE-CYCLOSÉRINE)

DENOMBREMENT DES ANAÉROBIES SULFITE-REDUCTEURS ET DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose Tryptone-Sulfite-Cyclosérine (TSC) a été décrite par Harmon pour l'isolement sélectif et le dénombrement de *Clostridium perfringens* dans les eaux et les produits alimentaires. Ce milieu est également recommandé pour le dénombrement des anaérobies sulfite-réducteurs dans les denrées d'origine animale.

La formule-type répond à la composition définie dans les normes ISO 14189, NF EN ISO 7937 et NF V08-061.

2 PRINCIPES

Les microorganismes sulfite-réducteurs réduisent le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies.

Pour effectuer le dénombrement spécifique des *Clostridium perfringens*, il est recommandé d'incuber le milieu à 37°C et de procéder ensuite à la confirmation des colonies caractéristiques.

La flore contaminante est presque totalement inhibée par la D-cyclosérine qui diminue également la taille des halos noirs se développant autour des colonies.

3 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	15,0 g
- Peptone papainique de soja	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,0 g
- Métabisulfite de sodium	1,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	1,0 g
- D cyclosérine.....	0,4 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 7,6 ± 0,2.

Pour 42 g de BK031 (gélose Sulfite-fer, base TSC)

- Tryptone	15,0 g
- Peptone papainique de soja	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,0 g
- Métabisulfite de sodium	1,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....	1,0 g
- Agar agar bactériologique.....	15,0 g

Pour un flacon de supplément BS006 Cyclosérine

- D cyclosérine.....	200 mg
----------------------	--------

Pour un flacon de supplément BS092 Cyclosérine

- D cyclosérine.....	3,6 g
----------------------	-------

Pour un flacon de supplément BS094 Cyclosérine

- D cyclosérine.....	2,0 g
----------------------	-------

4 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 42,0 g de milieu déshydraté (BK031) 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 à raison de 20 mL ou en flacons à raison de 100 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**
42,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Préparation du supplément lyophilisé D cyclosérine

- Réhydrater un flacon de supplément lyophilisé (BS006) avec 5 mL d'eau stérile.
- Ajouter 1 mL de supplément pour 100 mL de gélose maintenue à 44-47 °C (ou 0,2 mL par tube de 20 mL).

Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier en flacons ou en tubes :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou bien le milieu prêt-à-liquéfier (BM039 ou BM077), pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

Préparation du milieu complet

- Juste avant l'ensemencement, ajouter 0,2 mL de supplément à chaque tube de 20 mL de base maintenue à 44-47 °C ou 1 mL de supplément à 100 mL de gélose.
- Homogénéiser parfaitement et utiliser aussitôt.

5 MODE D'EMPLOI

Microbiologie des aliments, dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (NF V08-061)

- L'ensemencement peut se faire en tubes de 20 mL ou en boîtes de Petri, à la convenance de l'utilisateur.
- Chauffer si besoin le produit à analyser afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores.

En tubes

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans les tubes en évitant au maximum d'incorporer de l'air au milieu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Refroidir dans un bain d'eau glacée.
- Incuber à 46 ± 1 °C pendant 20 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en tube

✓ **Incubation :**
20 h à 46 °C

En boîtes de Petri

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans les boîtes.
- Couler 15 à 20 mL de milieu complet.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface plane.
- Ajouter une seconde couche de gélose et laisser solidifier.
- Incuber les boîtes en jarre d'anaérobiose pendant 20 ± 2 heures à 46 °C en présence d'un mélange gazeux d'hydrogène et de dioxyde de carbone

✓ **Ensemencement :**
1 mL en double couche

✓ **Incubation :**
En anaérobiose
20 h à 46 °C

Microbiologie des aliments, dénombrement de *Clostridium perfringens* (NF EN ISO 7937)

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales dans les boîtes.
- Couler 15 à 20 mL de milieu complet.
- Homogénéiser parfaitement.
- Laisser solidifier sur une surface plane.
- Ajouter une seconde couche de gélose et laisser solidifier.
- Incuber les boîtes en jarre d'anaérobiose pendant (20 ± 2) heures à 37°C en présence d'un mélange gazeux d'hydrogène et de dioxyde de carbone.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en double couche

✓ **Incubation :**
En anaérobiose
20 h à 37 °C

Qualité des eaux, dénombrement de *Clostridium perfringens* (ISO 14189)

- Si besoin, détruire les formes végétatives en chauffant 15 min à 60 ± 2 °C.
- Couler la gélose en boîtes de Petri stériles et laisser refroidir sur une surface plane.
- Filtrer la quantité d'eau appropriée sur une membrane.
- Déposer la membrane à la surface de la gélose, face quadrillée vers le haut, en s'assurant qu'il ne reste pas de bulles d'air emprisonnées sous le filtre.
- Incuber les boîtes en jarre d'anaérobiose pendant 21 ± 3 heures à 44 ± 1 °C.

✓ **Ensemencement :**
filtration sur membrane

✓ **Incubation :**
En anaérobiose
21 h à 44 °C

NOTE :

Pour améliorer le noircissement des colonies, il est possible d'ajouter une seconde couche de base ou de milieu complet sur le filtre.

6 LECTURE

Dénombrer les colonies entourées d'un halo noir lorsque l'ensemencement se fait en profondeur.

Dénombrer toutes les colonies lorsque l'ensemencement se fait sur membrane (ISO 14189) car les anaérobies sulfito-réducteurs peuvent présenter une coloration jaune, marron, ou gris-noir.

Effectuer les lectures dès l'ouverture de la jarre, sinon les colonies risquent de pâlir par suite de l'oxydation du sulfure de fer.

En raison de la confluence des halos, il peut être nécessaire d'effectuer des comptages intermédiaires.

Procéder aux tests de confirmation pour le dénombrement de *Clostridium perfringens*.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

7 CONTROLE QUALITE

Milieu de base déshydraté : poudre beige, fluide et homogène.

Aspect lyophilisat : blanc, donnant après reconstitution une solution incolore, pouvant présenter un léger précipité.

Aspect supplément liquide : solution opalescente, blanche à jaunâtre.

Milieu préparé : gélose ambrée.

Réponse culturale (TSC complet avec D-cyclosérine) après 20 heures d'incubation à 37 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)	Caractéristiques colonies
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00007	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00080	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0	-

Réponse culturale (TSC complet avec D-cyclosérine) après 24 heures d'incubation à 44 °C (ISO 14189) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)	Caractéristiques colonies
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00007	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00080	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Clostridium perfringens</i>	WDCM 00174	$P_R \geq 50 \%$	Noires
<i>Bacillus subtilis</i>	WDCM 00003	Inhibée, score 0	-

8 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Milieus prêts-à-liquéfier : 2-25 °C.

Supplément lyophilisé sélectif D-cyclosérine 200 mg : 2-8 °C.

Supplément liquide D cyclosérine : 2-8°C, à l'abri de la lumière.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-25 °C.

Supplément cyclosérine réhydraté (*) : 20 jours à 2-8°C

Milieu complet préparé, avec supplément (*) : Utiliser immédiatement après préparation.

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

9 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté (sans D-cyclosérine) :

Flacon de 500 g BK031HA

Supplément sélectif D-cyclosérine 200 mg :

Coffret de 10 flacons qsp 500 mL BS00608

Supplément sélectif D-cyclosérine liquide :

Coffret de 10 flacons qsp 9 Litres BS09208

1 flacon de 50 mL qsp 5 Litres BS09408

Milieus prêts-à-liquéfier (base sans D-cyclosérine) :

Coffret de 10 flacons de 200 mL BM07708

Coffret de 50 tubes de 20 mL BM03908

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Harmon, S.M., Kanter, D.A., and Peeler, J.T. 1971. Comparison of media for enumeration of *Clostridium perfringens*. Appl. Microb., 21: 922-927.

Hauschild, A.H.W., Hilsheimer, R., and Griffith, D.W. 1974. Enumeration of faecal *Clostridium perfringens* spores in egg yolk-free Tryptose-Sulfite-Cycloserine Agar. Appl. Microb., 27: 527-530.

Orth, D.S. 1977. Comparison of sulfite-polymyxin-sulfadiazine medium and tryptose-sulfite-cycloserine medium without egg yolk for recovering *Clostridium perfringens*. Appl. Envir. Microbiol., 33: 986-988.

ISO 14189. Novembre 2013. Qualité de l'eau – Dénombrement de *Clostridium perfringens* – Méthode de filtration sur membrane.

NF T90-415. Octobre 1985. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices et de *Clostridium* sulfito-réducteurs. Méthode générale par incorporation en gélose en tubes profonds.

NF EN ISO 7937. Février 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Clostridium perfringens*. Technique par comptage des colonies.

NF V08-061. Décembre 2009. Microbiologie des aliments. Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfito-réductrices par comptage des colonies à 46 °C.

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.

11 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 TSC AVEC CYCLOSERINE_FR_V15

Date création : 10-2015

Date de révision : 11-2017

Motif de révision : Ajout D-cyclosérine liquide BS094

Gélose TSC

Détection et dénombrement des bactéries anaérobies sulfito-réducteurs

Lecture :

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

