
BOUILLON AU THIOGLYCOLATE AVEC RESAZURINE

TESTS DE STERILITE
CONFIRMATION DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon au thioglycolate avec résazurine est couramment utilisé pour les contrôles de stérilité des produits biologiques et pour les cultures des germes aérobies, anaérobies et microaérophiles. Le milieu est conforme aux exigences de la Pharmacopée européenne pour effectuer les tests de stérilité et de l'AOAC pour l'analyse bactériologique des antibiotiques et la détermination de l'effet sporicide des désinfectants. Le milieu est également utilisé en microbiologie alimentaire pour la culture des *Clostridium*, en vue de la confirmation de *Clostridium perfringens*.

La formule type répond à la composition définie dans la Pharmacopée européenne et dans la norme NF EN ISO 7937.

2 HISTORIQUE

Brewer a démontré l'intérêt de ce milieu pour la culture des germes anaérobies en présence de thioglycolate de sodium. Nungester, Hood et Warren ont ensuite mis en évidence que le thioglycolate de sodium neutralisait l'effet inhibiteur des composés mercuriques présents dans les échantillons à analyser. Malin et Finn observèrent qu'en présence de glucides, le thioglycolate possédait un léger effet inhibiteur sur quelques microorganismes.

3 PRINCIPES

La peptone pancréatique de caséine, l'extrait de levure, la cystine et le glucose assurent la croissance d'une grande variété de microorganismes aérobies et anaérobies.

Le thioglycolate de sodium, à une concentration de 0,05 %, abaisse le potentiel d'oxydo-réduction sans avoir d'effet toxique. En outre, il neutralise le pouvoir antibactérien des dérivés mercuriques utilisés comme conservateurs de produits biologiques.

La présence d'agar favorise le développement des bactéries anaérobies en stabilisant le milieu contre les courants de convection, de façon à maintenir l'anaérobiose dans la partie inférieure des récipients.

La résazurine, moins toxique que le bleu de méthylène, est utilisée comme indicateur d'oxydo-réduction : incolore en milieu réducteur, elle devient rose en milieu oxydé.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	15,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Glucose monohydraté	5,50 g
- Chlorure de sodium	2,50 g
- Thioglycolate de sodium	0,50 g
- L-cystine	0,50 g
- Résazurine	1,0 mg
- Agar agar bactériologique	0,75 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 29,7 g de milieu déshydraté (BK017) 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 10 mL par exemple ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir le milieu à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
29,7 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

6 MODE D'EMPLOI

Test de stérilité

- Ensemencer l'échantillon à analyser, selon les règles d'usage définies dans la pharmacopée, dans les tubes ou flacons ainsi préparés ou dans les bouillons prêts à l'emploi en tubes (BM082).
- Incuber pendant au moins 14 jours à 30-35 °C.

✓ **Ensemencement :**
Selon produit

Incubation :
14 jours à 30-35 °C

Confirmation des *Clostridium perfringens* (NF EN ISO 7937) :

- Prélever une colonie noire et la transférer dans 10 mL de bouillon ainsi préparé ou dans un tube prêt-à-l'emploi (BM082).
- Incuber en anaérobiose pendant 18 à 24 heures à 37 ± 1 °C.
- Transférer 5 gouttes de chaque culture obtenue dans un tube de milieu LS (BK140) et suivre le protocole de confirmation.

✓ **Ensemencement :**
1 colonie

Incubation :
18-24 h à 37 °C

Note : Si, avant ensemencement, le milieu présente une coloration rose (signe d'oxydation) de plus de 1/3 de la hauteur à partir de la surface, restituer les conditions d'anaérobiose en le chauffant à 95-100 °C pendant 10 minutes. Ne pas effectuer cette opération plus d'une fois.

7 CONTROLE QUALITE

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

Milieu préparé : milieu semi-fluide, légèrement opalescent, ambre clair et présentant un anneau rosé en surface.

Réponse culturale après 72 heures d'incubation à 30-35 °C, inoculum ≤ 10² microorganismes :

Microorganismes	Croissance
<i>Staphylococcus aureus</i> WDCM 00032	Positive
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00026	Positive
<i>Clostridium sporogenes</i> WDCM 00008	Positive

Réponse culturale typique après 21 heures d'incubation à 37 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes	Croissance
<i>Clostridium perfringens</i> WDCM 00007	Turbidité positive (1-2)

8 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu prêt-à-l'emploi en tubes : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

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

9 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK017HA

Milieu prêt-à-l'emploi :

Coffret de 50 tubes de 10 mL BM08208

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Brewer, J.H. 1940. Clear Liquid medium for the "aerobe" cultivation of anaerobes. JAMA, 115: 598.

Journal Officiel du 25 octobre 1978. Essai de stérilité, 8233-8237.

MacFaddin, J.F. 1985. Media for Isolation. Cultivation. Identification. Maintenance of Medical Bacteria. Vol 1. Williams and Wilkins. Baltimore, 755-762.

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

Pharmacopée Européenne. Chapitre 2.6.1. Stérilité. Milieux de culture et températures d'incubation. Milieu liquide au thioglycolate.

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 : BK017/FR/2003-06 :10.

Date création : 06-2003

Date de révision : 10-2015

Motif de révision : Révision générale.

ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO

Bouillon thioglycolate avec résazurine

Contrôle de stérilité des produits biologiques.
Confirmation des *Clostridium perfringens*

Lecture :

Croissance obtenue après 20 heures d'incubation en anaérobiose à 37 °C.

