
GELOSE LACTOSEE AU TTC ET AU TERGITOL 7

DENOMBREMENT DES *ESCHERCHIA COLI* ET DES COLIFORMES DANS LES EAUX

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 permet d'effectuer le dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux, notamment celles destinées à la consommation humaine, en filtration sur membranes.

Elle est aussi utilisée pour le contrôle des eaux de piscine.

La formule-type répond à la composition définie dans les 2 normes d'application obligatoires NF EN ISO 9308-1 pour les eaux de consommation humaine et NF T90-431 pour les eaux de piscine.

2 HISTORIQUE

Pollard, en 1946, avait démontré l'action bactéricide du Tergitol 7 sur les microorganismes à Gram positif, puis le milieu a été développé par Chapman qui fit des numérations de coliformes environ 30 % supérieures à celles effectuées sur d'autres milieux sélectifs. La formule a ensuite été modifiée par l'auteur par incorporation de TTC (chlorure de triphényltétrazolium) qui s'est révélé utile pour la reconnaissance rapide d'*Escherichia coli* et d'*Enterobacter aerogenes*.

3 PRINCIPES

Les coliformes présentent des colonies de coloration jaune ou orangée, à l'intérieur d'un halo jaune visible sous la membrane. Celui-ci est provoqué par l'acidification du lactose en présence de l'indicateur coloré, le bleu de bromothymol.

Le Tergitol 7 inhibe la croissance des microorganismes à Gram positif, limite l'envahissement par les *Proteus* et favorise la récupération des coliformes.

Le TTC (chlorure de 2,3,5 triphényltétrazolium) est présenté sous forme de supplément lyophilisé. Les bactéries réduisant le TTC (incluant *Proteus* et *Pseudomonas*) présentent des colonies rouges, dû à la formation de formazan insoluble.

Les germes qui ne fermentent pas le lactose présentent des colonies avec un fond de gélose bleu.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu complet :

- Peptone pancréatique de viande	10,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	6,0 g
- Lactose.....	20,0 g
- Tergitol 7	0,1 g
- Bleu de bromothymol	50,0 mg
- Chlorure de 2, 3, 5 triphényltétrazolium	25,0 mg
- Agar agar bactériologique	10,0 g

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

Pour 51,1 g de base déshydratée BK123

- Peptone pancréatique de viande	10,0 g
- Extrait de viande	5,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	6,0 g
- Lactose.....	20,0 g
- Tergitol 7	0,1 g
- Bleu de bromothymol.....	50,0 mg
- Agar agar bactériologique	10,0 g

Pour un flacon de supplément BS026

Triphényltétrazolium	12,5 mg
(chlorure).....	12,5 mg

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 51,1 g de milieu déshydraté (BK123) 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 flacons à raison de 100 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**
51,1 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

- Réhydrater chaque flacon de supplément nécessaire (BS026) avec 5 mL d'eau stérile.
- Homogénéiser ou vortexer de façon à obtenir une dissolution parfaite, tout en évitant la formation de mousse.
- Ajouter stérilement 1 mL de supplément TTC reconstitué (BS026) par flacon de 100 mL de base.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles Ø 55 mm (l'épaisseur de gélose doit être égale à au moins 5 mm).
- Laisser solidifier sur une surface froide.
- Ne pas sécher les boîtes.

✓ **Réhydratation BS026 :**
5 mL eau / flacon

✓ **Ajout :**
1 mL / 100 mL base

6 MODE D'EMPLOI

- Filtrer stérilement sur membrane 100 mL d'échantillon d'eau (ou 250 mL pour les eaux embouteillées) à tester.
- A la surface des boîtes ainsi préparées ou du milieu pré-coulé (BM147 ou BM093) ramené préalablement à température ambiante, déposer la membrane de filtration en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à 36 ± 2 °C pendant 21 ± 3 heures.

✓ **Ensemencement :**
Par filtration

✓ **Incubation :**
21 ± 3 h à 36 ± 2 °C

NOTES

Pour les boîtes ne présentant pas de colonies typiques après 21 ± 3 heures, il est possible de poursuivre l'incubation jusqu'à 44 ± 4 heures.

Pour limiter la flore annexe, il est possible d'incuber également une autre gélose à 44 °C.

7 LECTURE

Examiner les membranes et considérer comme typiques toutes les bactéries pour lesquelles la gélose présente une coloration jaune sous la membrane.

Confirmer la présence de coliformes par le test de l'oxydase.

Confirmer la présence d'*Escherichia coli* par un test de l'oxydase et un test Indole.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

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

Supplément TTC 12,5 mg : lyophilisat blanc, donnant après reconstitution une solution incolore, limpide

Milieu complet : gélose bleu-vert.

Réponse culturale après 21 heures d'incubation à 36 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	$P_R \geq 70$ %, colonies jaunes sous membrane
<i>Enterobacter aerogenes</i>	WDCM 00175	$P_R \geq 70$ %, colonies jaunes sous membrane
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	$P_R \geq 70$ %, colonies jaunes sous membrane
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Colonies rouges, couleur bleue dans le milieu
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée totalement, score 0

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Supplément TTC 12,5 mg : 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

Supplément TTC réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière

Milieu complet 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 de base déshydraté (sans TTC) :

Flacon de 500 g BK123HA

Supplément TTC 12,5 mg :

Coffret de 10 flacons BS02608

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 55 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM14708

Coffret de 120 boîtes BM09308

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Pollard, A.L. 1946. A useful selective bactericidal property of Tergitol 7. *Science*, **103**: 758-759.

Chapman, G.H. 1947. A superior culture medium for the enumeration and differentiation of coliforms. *J. Bacteriol.*, **53**: 504.

Chapman, G.H. 1951. A culture medium for detecting and confirming *Escherichia coli* in ten hours. *Am. J. Publ. Health*, **41**: 1381.

Mossel, D.A.A. 1962. An ecological investigation on the usefulness of two specific modifications of Eijkman's test as an element of the methods for the detecting of faecal contamination of foods. *J. Appl. Bact.*, **25**: 20-29.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux, et *Escherichia coli* présumés. Méthode de dénombrement par filtration sur membrane. Dunod 7ème Ed., 798-803.

NF EN ISO 9308-1. Septembre 2000. Qualité de l'eau. Recherche et dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Partie 1 : Méthode par filtration sur membrane.

NF T90-421. Aout 2006. Qualité de l'eau. Examens bactériologiques des eaux de piscine.

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).

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 LACTOSEE TTC TERGITOL 7_FR_V9.
Date création : 10-2002
Date de révision : 06-2017
Motif de révision : Correction écart pH

Gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7

Détection et dénombrement des *Escherichia coli* et autres bactéries coliformes.

Lecture :

Croissance obtenue après 21 heures d'incubation à 36 °C.

Escherichia coli
Colonie caractéristique :
couleur jaune à orangée.
Halo jaune sous membrane

