

---

# BOUILLON LACTOSE-SULFITE (LS)

---

## CONFIRMATION DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

### 1 DOMAINE D'UTILISATION

---

Le bouillon Lactose Sulfite (LS) est un milieu de confirmation permettant de détecter sélectivement la présence de formes végétatives ou de spores de *Clostridium perfringens* dans les produits alimentaires et les prélèvements biologiques d'origine animale, sans qu'il soit nécessaire de purifier les colonies dénombrées sur boîte.

La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF EN ISO 7937, pour le dénombrement de *Clostridium perfringens* en microbiologie des aliments.

### 2 HISTORIQUE

---

Utilisant les travaux antérieurs de Put (1961), relatifs à l'étude de la sensibilité des *Clostridium* au sulfite, la croissance optimale de *Clostridium perfringens* à 46 °C ainsi que sa capacité à fermenter le lactose, Beerens *et al.* en 1982, ont formulé et développé avec succès le milieu LS. Ils ont particulièrement recommandé son utilisation pour la détection des faibles quantités de *Clostridium perfringens* dans les produits alimentaires fortement contaminés par d'autres bactéries sulfito-réductrices.

### 3 PRINCIPES

---

La spécificité du milieu vis à vis de *Clostridium perfringens* est due principalement à la capacité de ce microorganisme à résister aux sulfites et à fermenter le lactose en produisant du gaz.

La concentration en métabisulfite inhibe le développement de la plupart des clostridies autres que *Clostridium perfringens*.

L'incubation à 46 °C assure la culture spécifique de *Clostridium perfringens* qui réduit le métabisulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique, un précipité noir de sulfure de fer qui se dépose au fond du tube.

### 4 FORMULE-TYPE

---

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

Pour 1 litre de milieu :

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| - Tryptone .....                     | 4,44 g |
| - Extrait autolytique de levure..... | 2,22 g |
| - Chlorhydrate de cystéine .....     | 0,27 g |
| - Lactose.....                       | 8,89 g |
| - Chlorure de sodium.....            | 2,22 g |
| - Métabisulfite de sodium .....      | 0,67 g |
| - Citrate ferrique ammoniacal.....   | 0,56 g |

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

## 5 PREPARATION

### A partir du milieu déshydraté

- Mettre en solution 19,3 g de milieu déshydraté (BK140) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement, jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes contenant une cloche de Durham, à raison de 9 mL par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**  
19,3 g/L

✓ **Stérilisation :**  
15 min à 121 °C

### A partir du bouillon prêt-à-l'emploi

- Avant utilisation, régénérer les tubes en les portant 10 minutes à 100°C.
- Refroidir à température ambiante.

## 6 MODE D'EMPLOI

- Repiquer 5 colonies noires observées sur gélose TSC dans un bouillon au thioglycolate avec résazurine (BK017, BM082).
- Incuber les tubes en anaérobiose pendant 18 à 24 heures à 37 °C.
- Ensemencer 5 gouttes de la culture obtenue dans chaque tube de bouillon LS ainsi préparé.
- Retirer l'air dans les cloches de Durham, par retournement des tubes.
- Incuber à 46 °C pendant 18 à 24 heures dans un bain d'eau thermostaté.

✓ **Ensemencement :**  
5 gouttes d'inoculum

✓ **Incubation :**  
18 à 24 h à 46 °C

## 7 LECTURE

Vérifier que les bouchons soient légèrement desserrés avant de procéder à la lecture.

La présence de gaz (supérieure au ¼ du volume de la cloche) et la présence simultanée d'un précipité noir de sulfure de fer dans les tubes confirment la présence de *Clostridium perfringens*.

**Note :** Dans le cas du bouillon prêt-à-l'emploi en tubes, le précipité de sulfite de fer peut être de noir à gris.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 8 CONTROLE QUALITE

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

**Milieu préparé :** solution ambrée, limpide.

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 46 °C

| Microorganismes                 |             | Croissance      | Production de gaz | Noircissement |
|---------------------------------|-------------|-----------------|-------------------|---------------|
| <i>Clostridium perfringens</i>  | WDCM 00007  | Bonne, score 2  | Positive          | Positif       |
| <i>Clostridium perfringens</i>  | WDCM 00080  | Bonne, score 2  | Positive          | Positif       |
| <i>Clostridium bifermentans</i> | ATCC® 19299 | Faible, score 1 | Négative          | Positif       |

## 9 CONSERVATION

**Milieu déshydraté :** 2-30 °C.

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

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

**Milieu préparé en tubes (\*) :** utiliser le jour même de la préparation.

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

## 10 PRESENTATION

---

### Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g ..... BK140HA

### Milieu prêt-à-l'emploi :

Sachet de 7 tubes, avec cloche de Durham ..... BM19208

## 11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

Beerens, H., Romond, C.H., Lepage, C., and Criquelion, J. 1982. A Liquid Medium for the Enumeration of *Clostridium perfringens* in Food and Faeces. Isolation and Identification Methods for Foods Poisoning Organisms. Edited by Academic Press London, 137-149.

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

## 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 : BOUILLON LACTOSE SULFITE\_FR\_V9.  
Date création : 01-2004  
Date de révision : 06-2018  
Motif de révision : Mise à jour du paragraphe Lecture

**Bouillon Lactose-Sulfite (LS)**

Détection et confirmation de *Clostridium perfringens*.

**Lecture :**

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 46 °C.

