

BOUILLON RCM DE HIRSCH ET GRINSTED

RECHERCHE DES CLOSTRIDIÉS

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon RCM (Reinforced Clostridial Medium) est un milieu non sélectif utilisé pour rechercher les clostridies dans le cadre du contrôle microbiologique des produits non stériles suivant les chapitres harmonisés des Pharmacopées. Il peut être utilisé pour la culture et le dénombrement des spores de *Clostridium* totaux gazogènes dans les produits laitiers, les conserves, les semi-conserves et les autres produits alimentaires.

La formule-type du bouillon répond à la composition définie dans les Pharmacopées européenne et américaine.

2 HISTORIQUE

Ce milieu fut décrit par Hirsch et Grinsted pour le dénombrement des anaérobies, plus particulièrement *Clostridium butyricum*, par la méthode du "nombre le plus probable".

3 PRINCIPES

Les facteurs nutritifs sont apportés par la Tryptone, les extraits de viande et de levure, le glucose et la cystéine, qui agit également comme substance réductrice.

L'amidon favorise la germination des spores.

Le chlorure de sodium maintient l'équilibre osmotique.

Le milieu est non sélectif. Il permet également la culture des lactobacilles et de la plupart des autres germes anaérobies.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	10,0 g
- Extrait de viande	10,0 g
- Extrait autolytique de levure.....	3,0 g
- Cystéine (chlorhydrate)	0,5 g
- Glucose	5,0 g
- Amidon soluble.....	1,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Acétate de sodium	3,0 g
- Agar agar bactériologique	0,5 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 6,8 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 38,0 g de milieu déshydraté (BK094) 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 à chaud en tubes à raison de 10 mL par tube.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.

✓ **Reconstitution :**
38,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

NOTE :

S'il a été préparé à l'avance, régénérer le milieu par un chauffage de 20 minutes à 100 °C puis refroidir à température ambiante.

6 MODE D'EMPLOI

Recherche des Clostridies dans les produits pharmaceutiques

- Chauffer 10 mL de la dilution mère pendant 10 minutes à 80 °C afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores, puis refroidir rapidement.
- Ne pas chauffer la seconde partie de la dilution mère, afin de rechercher également les formes végétatives.
- Ensemencer 1 mL d'inoculum dans chaque tube de milieu.
- Incuber en anaérobiose pendant 48 heures à 30-35 °C
- Procéder aux subcultures sur Gélose Columbia (BK019).

✓ **Ensemencement :**
1 mL par tube

✓ **Incubation :**
48 h à 30-35 °C

NOTE : Selon le protocole utilisé, l'anaérobiose peut être obtenue en ajoutant 2 mL de paraffine stérile par tube. Le milieu peut ainsi être utilisé en méthode NPP, pour le dénombrement des germes anaérobies.

7 LECTURE

Considérer comme positifs les tubes présentant une croissance.
En présence de paraffine, considérer comme positifs les tubes présentant un dégagement gazeux soulevant le bouchon.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre blanc-crème, fluide et homogène.
Milieu préparé : milieu semi-fluide, ambré.
Réponse culturale après 24-48 heures d'incubation en anaérobiose à 30-35 °C, inoculum ≤ 10² microorganismes

Microorganismes	WDCM 00008	Croissance
<i>Clostridium sporogenes</i>		Positive

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C. La date de péremption est mentionnée sur l'étiquette.
Milieu préparé en tubes ou en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C. Régénérer les tubes avant utilisation.
(*) Valeur indicative déterminée dans les conditions standards de préparation, suivant les instructions du fabricant.

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :
Flacon de 500 g BK094HA

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Hirsch, A. and Grinsted, E.. 1954. Methods for the growth and enumeration of anaerobic sporeformers from cheese, with observations on the effect of nisin. Journal of Dairy Research, **21** : 101-110.

Gibbs, B.M. and Freame, B.. 1965. Methods for the recovery of *Clostridia* from foods. Journal of Applied Bacteriology, **28** : 95-111.

Pharmacopée Européenne. Chapitre 2.6.13. Contrôle microbiologique des produits non stériles : Recherche de microorganismes spécifiés.

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 RCM_FR_V6. Date de révision : 03-2016
Date création : 04-2001 Motif de révision : Révision générale.