

Egalement nommé

CCA; ACC

Principe

Milieu sélectif et différentiel pour la détection des coliformes et E. coli dans les eaux à faible fond bactérien par technique MF.

Formule * en g/L

Digestion enzymatique de caséine.....	1.00	Sorbitol.....	1.00
Extrait de levure.....	2.00	6-Chloro-3-indoxyl-	
Chlorure de sodium.....	5.00	β-D-galactopyranoside.....	0.20
Di-sodium hydrogen phosphate.....	2.70	5-Bromo-4-chloro-3-	
Sodium dihydrogen phosphate		indoxyl-β-D-glucuronic acid.....	0.10
dihydrate.....	2.20	IPTG.....	0.10
Tryptophan.....	1.00	Agar.....	13.00
Sodium pyruvate.....	1.00		
Tergitol®7.....	0.15		

pH final 6,8 ±0,2 à 25 °C

*Ajuster et/ou compléter au besoin pour répondre aux critères de performance

Préparation

Suspendre 29,45 g de poudre dans un litre d'eau distillée et faire bouillir pour dissoudre la gélose. Distribué dans des récipients appropriés et conservé dans un bain-marie d'eau bouillante ou de vapeur. Remuer fréquemment jusqu'à dissolution complète (environ 35 min). Si nécessaire, ajuster le pH à 6,8 ± 0,2 (25 ° C) après le traitement. Pas d'autoclave ni de surchauffe.

Description

L'action combinée de la peptone, de l'extrait de levure, du pyruvate et du sorbitol permet une croissance rapide des colonies dans ce milieu tamponné au phosphate, ce qui permet également une récupération simple des coliformes sublétaux thermiquement endommagés. Le chlorure de sodium fournit l'environnement osmotique correct nécessaire à la croissance. La sélectivité est atteinte, en partie, par le Tergitol® 7, qui inhibe la croissance des bactéries Gram positives et certaines Gram négatif sans affecter les bactéries coliformes. Le milieu de culture a été formulé sans antibiotiques pour des échantillons d'eau à faible flore bactérienne, avec moins de 100 UFC par MF: il peut s'agir de l'eau potable, de l'eau de piscine désinfectée ou de l'eau finie des stations d'épuration.

La différenciation coloniale est due au mélange chromogène, composé de deux substrats enzymatiques: le 6-chloro-3-indoxyl-β-D-galacto-pyranoside (Salmon®-GAL) et le 5-bromo-4-chloro-3-indoxyl- β-D-glucuronide (X-Glucuronide). Le premier est clivé par l'enzyme caractéristique des coliformes, la β-D-galactosidase et donne une couleur rouge saumon aux colonies de coliformes. La deuxième substance chromogène est clivée par l'enzyme β-D-glucuronidase caractéristique d'E. Coli et transforme les colonies de ces bactéries en bleu. E. coli possède les deux enzymes et clive les deux substances chromogènes donnant des colonies bleu foncé à violettes. Les coliformes totaux sont la somme des colonies d'E. Coli et des colonies rouge saumon. L'IPTG améliore le métabolisme des chromogènes. D'autres bactéries à Gram négatif produisent des colonies incolores, sauf certaines qui possèdent une activité glucuronidase (mais pas la galactosidase) et elles produisent des colonies bleu clair à turquoise.

Pour confirmer les colonies d'E. Coli dans ce milieu, une petite quantité de tryptophane est incluse vérifiant la production d'indol: enduiser les colonies bleu-violet avec une goutte de réactif Kovacs. Si le réactif prend une couleur rouge cerise en quelques secondes, cela confirme la production d'indol et donc la présence d'E. Coli.

Lorsque la gélose chromogène pour coliformes est utilisée avec la méthode du filtre à membrane, la couleur et la croissance des colonies peuvent être modifiées par les caractéristiques du filtre à membrane. Il est conseillé de valider le type de filtre à membrane utilisé.

Limitation de la procédure:

La production de β-galactosidase, bien que commune à tous les coliformes, varie d'une souche à l'autre en fonction de la température et du temps d'incubation. à des températures supérieures à 37 ° C sa production diminue, entraînant une perte d'intensité de Couleur rougeâtre, tandis que les tons bleutés des souches d'Escherichia coli sont accentués.

Si la méthode de filtration sur membrane est utilisée, il faut tenir compte du fait que la nature et les caractéristiques de la membrane filtrante influencent également la taille et la couleur des colonies cultivées sur ce milieu de culture.

Utilisation

L'échantillon d'eau est filtré à travers un filtre à membrane de 0,45 µm de diamètre de pore validé selon la norme ISO 7704: 1985. La membrane est ensuite placée à la surface du milieu CCA en évitant le piégeage de bulles d'air entre la membrane et la surface de la gélose.

La boîte de Pétri avec la membrane est incubée pendant 18-24 heures à 36 ± 2°C. Si, après 18 h, des colonies rouges ou incolores se développent, prolonger l'incubation jusqu'à 24 h pour inclure les réactions tardives de la β-galactosidase ou de la β-glucuronidase. Compter les colonies positives pour la β-galactosidase et les colonies négatives pour la β-glucuronidase (toutes les colonies colorées du rose saumon au rouge) comme des bactéries coliformes non-E. coli. Compter les colonies positives pour la β-galactosidase et les colonies positives pour la β-glucuronidase (toutes les colonies colorées du bleu profond au violet) comme E. coli.

Le nombre total de coliformes est obtenu en ajoutant les colonies rose saumon aux colonies rouges plus les colonies bleu foncé à violettes.

Calculer la concentration de bactéries coliformes et E. coli dans 100 ml à partir du volume initial d'eau filtrée et du nombre de colonies caractéristiques comptées sur la membrane. Les résultats sont exprimés en unités de formation de colonies par 100 millilitres (CFU / 100 ml).

Contrôle qualité

Température d'incubation: 36°C ± 2.0

Temps d'incubation: 18-24 h

Inoculum: Gamme d'utilisation 100 ± 20 UFC. Min. 50 UFC (Productivité) / 10⁴-10⁶ UFC (sélectivité), ≥ 10³ UFC (spécificité) selon ISO 11133: 2014 / Amd 1: 2018.

Micro-organismes

Escherichia coli ATCC® 8739

Escherichia coli ATCC® 25922

Citrobacter freundii ATCC® 43864

Pseudomonas aeruginosa ATCC® 10145

Enterococcus faecalis ATCC® 19433

Enterobacter aerogenes ATCC® 13048

Croissance

Productivité > 0.70

Productivité > 0.70

Productivité > 0.70

Bonne

Inhibition partielle à totale

Productivité > 0.70

Remarques

Colonies bleu-violet. Indol (+)

Colonies bleu-violet. Indol (+)

Colonies rouges à saumon. Indol (-)

Colonies incolores.

-

Colonies rouges à saumon.

Références

- ADAMS, M., R.GRUBB, S.M. HAMER & A. CLIFFORD (1990) Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β-glucuronidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 56:2021.
- ISO 7704 Standard (1985) Water Quality - Evaluation of membrane filters used for microbiological analyses.
- ISO 9308-1: 2014/Amd.1:2016(E) Water quality. Enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria - Part 1: Membrane filtration method for waters with low bacterial background flora.
- ISO 11133:2014/ Adm 1:2018. Microbiology of food, animal feed and water. Preparation, production, storage and performance testing of culture media.
- KILIAN, M. & P. BÜLOW (1976) Rapid Diagnostic of Enterobacteriaceae. I. Detection of bacterial glycosidases. *Acta Pathol. Microbiol. Scand. Sect. B* 84:245-251.
- MANAFI, M & W. KNEIFEL (1989) A combined chromogenic-fluorogenic medium for the simultaneous detection of total coliform and *E. coli* in water. *Zentralbl. Hyg.* 189:225-234.
- TURNER, K.M., L. RESTAINO & E.W. FRAMPTON (2000) Efficacy of Chromocult Coliform Agar for coliform and *Escherichia coli* detection in Foods. *J.Food Protect.* 63(4):539-541

Conservation

Pour usage professionnel uniquement. À conserver fermé, loin de la lumière, dans un endroit frais et sec (+4°C à 30°C).