

BOUILLON LACTOSE BILIE AU VERT BRILLANT (BLBVB)

CONFIRMATION DES COLIFORMES

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) est utilisé pour la confirmation des coliformes et des coliformes thermotolérants dans les produits alimentaires, les eaux d'alimentation et les eaux résiduaires. Il peut être également utilisé comme milieu de dénombrement des coliformes dans les glaces et crèmes glacées.

La formule-type du bouillon répond à la composition définie dans les normes en microbiologie des aliments NF ISO 4831 et NF ISO 4832.

Elle répond aussi aux normes utilisées pour le contrôle des eaux NF T90-413 et PR NF T90-413.

2 HISTORIQUE

La recherche et la mise au point d'un milieu de culture, inhibant les microorganismes autres que les coliformes, ont depuis longtemps intéressé les bactériologistes. Dès 1926, Dunham et Schoenlein ont étudié les proportions de bile et de vert brillant susceptibles de donner de bons résultats. Dans ses travaux, Jordan a montré la supériorité de ce milieu comparativement au bouillon lactosé pour la détection des coliformes dans l'eau.

Pour le contrôle de la pasteurisation du lait, MacCrady et Langevin ont utilisé avec satisfaction le bouillon lactosé à la bile et au vert brillant pour la détection des coliformes. Mackenzie a vérifié que la teneur en vert brillant est suffisante pour inhiber effectivement la culture d'anaérobies fermentant le lactose et en particulier *Clostridium perfringens*.

3 PRINCIPES

La présence simultanée de bile de bœuf et de vert brillant provoque l'inhibition de la presque totalité des microorganismes à Gram positif et des bactéries à Gram négatif autres que les coliformes.

La teneur en vert brillant est spécialement déterminée afin d'empêcher la croissance des anaérobies fermentant le lactose à 44 °C, ce qui évite l'obtention de résultats faussement positifs.

Le développement des coliformes se manifeste par l'apparition d'une turbidité associée à une production de gaz dans la cloche de Durham par suite de la fermentation du lactose.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone	10,0 g
- Bile de bœuf bactériologique	20,0 g
- Lactose.....	10,0 g
- Vert brillant	13,3 mg

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

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 40,0 g de milieu déshydraté (BK002) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes contenant une cloche de Durham.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Après refroidissement, les cloches de Durham ne doivent pas contenir d'air.

✓ **Reconstitution :**
40,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Note :

Le bouillon double concentration peut être utilisé pour certaines applications spécifiques.
Mettre en suspension 80,0 g de milieu déshydraté (BK002) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.

6 MODE D'EMPLOI**Confirmation des coliformes (norme ISO 4831) :**

- Repiquer une öse des bouillons Laurylsulfate Tryptose simple et double concentration dans les tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant préparés ou prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 30 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C, suivant les accords entre les parties.
- Si la production de gaz n'est pas observée à ce stade, poursuivre l'incubation jusqu'à 48 ± 2 heures.

✓ **Ensemencement :**
1 öse

✓ **Incubation :**
24 à 48 h à 30 ou 37°C

Confirmation des coliformes (norme ISO 4832) :

- Prélever 5 colonies caractéristiques sur gélose VRBL et les inoculer dans les tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant préparés ou prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 30 ± 1 °C ou à 37 ± 1 °C, suivant les accords entre les parties.

✓ **Ensemencement :**
Inoculer 5 colonies

✓ **Incubation :**
24 h à 30 ou 37 °C

Confirmation des coliformes dans les eaux (norme NF T90-413) :

- A partir des milieux présomptifs (bouillon lactosé ou bouillon au laurylsulfate à simple ou à double concentration), inoculer une öse de culture à confirmer dans les tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant préparés ou prêt-à-l'emploi (BM011).
- Incuber pendant 48 heures à 37 ± 1 °C pour les coliformes ou à 44 ± 1 °C dans un bain d'eau pour les coliformes thermotolérants.

✓ **Ensemencement :**
1 öse

✓ **Incubation :**
48 h à 37 ou 44 °C

7 LECTURE

La fermentation du lactose se traduit par l'apparition de gaz dans les cloches de Durham (volume au minimum égal au 1/10ème du volume de la cloche) en moins de 48 heures. Elle indique la présence de coliformes.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre beige-vert à verdâtre, fluide et homogène.

Milieu préparé : solution verte limpide.

Réponse culturale après 24-48 heures d'incubation à 30 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance	Production de gaz (cloche Durham)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	Bonne, score 2	≥ 5 mm
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Bonne, score 2	≥ 5 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Partiellement inhibée, score 0-1	Négative

Réponse culturale typique après 48 heures d'incubation à 37 °C (FD T 90-461) :

Microorganismes		Croissance	Production de gaz (cloche Durham)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00179	Bonne, score 2	≥ 5 mm
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00176	Partiellement inhibée, score 0-1	Négative

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu simple concentration prêt-à-l'emploi en tubes avec cloches de Durham : 2-25 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en tubes ^(*) : 90 jours à 2-25 °C, à l'abri de la lumière.

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

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK002HA

Milieu prêt-à-l'emploi (simple concentration) en tubes avec cloches de Durham :

Coffret de 50 tubes de 10 mL BM01108

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Dunham, H.G. and Schoenlein, H.W.. 1926. Stain Technology, **1** : 129.

Jordan. 1927. Journal of American Water Works Association, **18** : 337.

McCrary and Langevin. 1932. Journal of Dairy Science, **15** : 321.

Mackenzie, E.F.W., Taylor, W.E., and Gilbert, W.E.. 1948. Recent experiments in the rapid identification of *Bacterium coli* type I. Journal of General Microbiology, **2** : 197-204.

Rodier, J. 1984. L'analyse de l'eau. Dénombrement des coliformes, coliformes fécaux, et *Escherichia coli* présumés. Dunod 7ème Ed., 793-798.

NF T 90-413. Octobre 1985. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

PR NF T 90-413. Mars 2012. Essais des eaux. Recherche et dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants. Méthode générale par ensemencement en milieu liquide (NPP).

Journal Officiel du 21 Septembre 1968. Méthodes officielles de prélèvement et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées (Arrêté du 30 Août 1968).

NF ISO 4831. Octobre 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes. Technique du nombre le plus probable.

NF ISO 4832. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode 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 : BLBVB_FR_v8.

Date création : 01-2003

Date de révision : 07-2016

Motif de révision : Révision générale.