
BOUILLON FRASER

ENRICHISSEMENT SELECTIF SECONDAIRE POUR *LISTERIA*

1 DOMAINE D'UTILISATION

Le bouillon de Fraser est utilisé pour l'enrichissement sélectif secondaire de *Listeria monocytogenes* et des autres *Listeria* dans les produits alimentaires, selon la méthode normalisée NF EN ISO 11290-1.

2 HISTORIQUE

Le milieu, étudié par Fraser *et al.* en 1988, représente une modification de la formulation de Donnelly et Baigent. La composition de base, identique à celle du bouillon UVM, a été modifiée par adjonction de chlorure de lithium comme agent sélectif et de citrate ferrique ammoniacal afin de visualiser les cultures hydrolysant l'esculine par l'apparition d'un noircissement dans le milieu.

3 PRINCIPES

La seule différence de concentration en acide nalidixique et en acriflavine des bouillons de Fraser-demi et de Fraser ainsi que les deux étapes d'enrichissement, permettent une récupération très satisfaisante de *Listeria monocytogenes*. Le bouillon de Fraser permet d'effectuer l'étape d'enrichissement secondaire.

La polypeptone, l'extrait de levure et l'extrait de viande apportent les éléments nutritifs nécessaires à la croissance des *Listeria*.

La forte teneur en chlorure de sodium permet d'accroître la sélectivité du milieu.

Les phosphates agissent comme substances tampons pour le maintien du pH.

L'esculine est hydrolysée par les *Listeria* en glucose et en esculétine. Ce dernier composé forme un complexe noir en présence des ions ferriques qui, apportés extemporanément par le citrate de fer, favorisent également la croissance des *Listeria*.

Le chlorure de lithium inhibe la plupart des entérocoques susceptibles d'hydrolyser l'esculine.

L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles à cet agent antibactérien.

L'acriflavine supprime la croissance de la microflore secondaire à Gram positif.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu complet :

- Digestat enzymatique de tissus animaux.....	5,00 g
- Digestat enzymatique de caséine	5,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	5,00 g
- Extrait de viande	5,00 g
- Chlorure de sodium.....	20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*	9,60 g
- Phosphate monopotassique.....	1,35 g
- Esculine.....	1,00 g
- Chlorure de lithium	3,00 g
- Acide nalidixique	20 mg
- Acriflavine (chlorhydrate)	25 mg
- Citrate de fer III ammoniacal.....	0,50 g

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

Pour 55 g de base déshydratée BK133

- Digestat enzymatique de tissus animaux5,0 g
- Digestat enzymatique de caséine.....5,0 g
- Extrait autolytique de levure5,00 g
- Extrait de viande.....5,00 g
- Chlorure de sodium20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*9,60 g
- Phosphate monopotassique.....1,35 g
- Esculine.....1,00 g
- Chlorure de lithium3,00 g

Pour un flacon de supplément BS031

- Acide nalidixique 10,00 mg
- Acriflavine (chlorhydrate) 12,5 mg
- Citrate de fer (III) ammoniacal..... 0,25 g

Pour 55 g de base déshydratée BK115

- Digestat enzymatique de tissus animaux 5,0 g
- Digestat enzymatique de caséine..... 5,0 g
- Extrait autolytique de levure5,00 g
- Extrait de viande.....5,00 g
- Chlorure de sodium20,00 g
- Phosphate disodique anhydre*.....9,60 g
- Phosphate monopotassique.....1,35 g
- Esculine.....1,00 g
- Chlorure de lithium3,00 g
- Acide nalidixique20,0 mg
- Acriflavine chlorhydrate25 mg

Pour un tube de supplément liquide BS062 (10 mL)

- Citrate de fer (III) ammoniacal 0,5 g

Pour un flacon de supplément liquide BS059 (90 mL)

- Citrate de fer (III) ammoniacal..... 4,5 g

* NOTE : Equivaut à 12 g d'hydrogénophosphate disodique dihydraté.

5 PREPARATION

Utilisation du milieu de base déshydraté BK115

- Mettre en solution 55,0 g de milieu de base (BK115) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes à raison de 10 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.
- Ajouter 0,1 mL d'une solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5 % (BS059 ou BS062) dans chaque tube de bouillon.

✓ **Reconstitution :**
55,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation du milieu de base déshydraté BK133

- Mettre en solution 55,0 g de milieu de base (BK133) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Agiter lentement jusqu'à dissolution complète.
- Répartir en tubes à raison de 10 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à température ambiante.
- Reconstituer le supplément lyophilisé sélectif pour Fraser (BS031) avec 5 mL d'une solution 1:1 éthanol / eau distillée stérile.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.
- Ajouter 0,1 mL de supplément reconstitué (BS031) dans chaque tube de bouillon.

✓ **Reconstitution :**
55,0 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

6 MODE D'EMPLOI

- Dans les tubes ainsi préparés, ou dans les tubes de bouillon prêt-à-l'emploi (BM013), transférer 0,1 mL du bouillon d'enrichissement primaire obtenu.
- Homogénéiser parfaitement.
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 37 ± 1 °C.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL dans 10 mL

✓ **Incubation :**
24 h à 37 °C

7 LECTURE

Repiquer tous les tubes (noirs ou non) sur COMPASS *Listeria* Agar (BM123) et sur un second milieu au choix (PALCAM ou Oxford).

NOTE

Le noircissement des cultures indique la présence présomptive de *Listeria*.

Toutefois; certaines souches de microorganismes hydrolysent l'esculine (entérocoques notamment) et peuvent entraîner aussi le noircissement du milieu.

8 CONTROLE QUALITE

Milieus déshydratés : poudres jaunâtres, fluides et homogènes.

Milieus préparés (complets) : solutions ambre jaune à reflets bleutés.

Réponse culturale après 48 heures d'incubation à 37 °C, puis repiquages sur COMPASS *Listeria* Agar :

Microorganismes	Croissance
<i>Listeria monocytogenes</i> 4b WDCM 00021 + <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087 + <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	> 10 colonies caractéristiques
<i>Listeria monocytogenes</i> ½ a WDCM 00109 + <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087 + <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	> 10 colonies caractéristiques
<i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087 <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013	< 100 colonies Inhibée, score 0

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté (BK115) : 2-30 °C.

Milieu de base déshydraté (BK133) : 2-30 °C.

Solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5 % : 2-25 °C.

Supplément sélectif pour bouillon de Fraser : 2-8 °C.

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

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu de base préparé BK115 (*) : 180 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Milieu de base préparé BK133 (*) : 180 jours à 2-8 °C.

Milieu complet préparé en tubes (*) : 1 mois à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Supplément sélectif BS031 réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °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 FRASER base (sans citrate de fer III ammoniacal) :

Flacon de 500 g BK115HA

Solution stérile de citrate ferrique ammoniacal à 5 % :

Pack de 10 flacons de 90 mL BS05908

Sachet de 7 tubes de 10 mL BS06208

Milieu déshydraté FRASER base II (sans citrate de fer III ammoniacal, ni acide nalidixique, ni acriflavine) :

Flacon de 500 g BK133HA

Seau de 5 kg BK133GC

Supplément sélectif lyophilisé (avec citrate de fer III ammoniacal, acide nalidixique et acriflavine) :

Coffret de 10 flacons qsp 500 mL BS03108

Milieu prêt-à-l'emploi en tubes :

Coffret de 50 tubes de 10 mL BM01308

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Donnelly, C.W., and Baigent, G.J.. 1986. Method for flow cytometric detection of *Listeria monocytogenes* in milk. Applied and Environmental Microbiology, **52** : 689-695.

Fraser, J.A., and Sperber, W.H.. 1988. Rapid detection of *Listeria* spp. in food and environmental samples by esculin hydrolysis. Journal of Food Protection, **51** : 762-765.

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)).

NF EN ISO 11290-1. Juillet 2017. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement de *Listeria monocytogenes* et *Listeria* spp. - Partie 1 : méthode de recherche.

12 AUTRES INFORMATIONS

COMPASS® est une marque de SOLABIA S.A.S.

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 FRASER_FR_V14.

Date création : 04-2003.

Date de révision : 05-2018

Motif de révision : Correction formule BS062/BS059