

GELOSE CHROMOGENE POUR BACTERIES COLIFORMES (CCA)

DENOMBREMENT DES *E. COLI* ET COLIFORMES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA) permet le dénombrement des *Escherichia coli* et des coliformes dans les eaux à faible teneur en bactéries (moins de 100 colonies totales). Ces eaux peuvent être l'eau potable, l'eau de piscine désinfectée ou l'eau propre sortant des usines de traitement.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans la norme ISO 9308-1 : 2014.

2 PRINCIPES

La présence simultanée de deux substrats chromogènes permet la détection des deux activités enzymatiques spécifiques : la β -galactosidase et la β -glucuronidase.

Les bactéries appartenant au groupe des coliformes se distinguent par la production d'une β -galactosidase (β -gal). Cette enzyme réagit avec le mélange chromogène pour former un précipité de couleur rose à rouge.

Toutes les souches d'*Escherichia coli* possèdent une β -galactosidase et 94 à 97% d'entre elles possèdent également une β -glucuronidase (GUD). La présence de cette enzyme est révélée par la présence d'un composé de couleur bleue. L'action simultanée des deux enzymes fait apparaître les colonies d'*Escherichia coli* en bleu foncé à violet.

3 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Digestat enzymatique de caséine	1,0 g
- Extrait autolytique de levure	2,0 g
- Chlorure de sodium	5,0 g
- Dihydrogénophosphate de sodium x 2 H ₂ O	2,2 g
- Hydrogénophosphate disodique	2,7 g
- Pyruvate de sodium	1,0 g
- Sorbitol	1,0 g
- Tryptophane	1,0 g
- Tensioactif à l'éthoxylate d'alcool secondaire	0,15 g
- 6-Chloro-3-indoxyl- β -D-galactopyranoside	0,2 g
- Acide 5-Bromo-4-chloro-3-indoxyl- β -D-glucuronique	0,1 g
- Isopropyl- β -D-thiogalactopyranoside (IPTG)	0,1 g
- Agar agar bactériologique	16,0 g

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

4 PREPARATION

- Mettre en suspension 32,5 g de milieu déshydraté (BK204) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles (l'épaisseur de gélose doit être au moins égale à 5 mm).
- Laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
32,5 g/L

✓ **Stérilisation**
Porter à ébullition

Note : Protéger le milieu de la lumière.

5 MODE D'EMPLOI

- Filtrer stérilement sur membrane un volume déterminé de l'échantillon d'eau à tester.
- A la surface des boîtes ainsi préparées ou du milieu pré-coulé (BM182) ramené préalablement à température ambiante, déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à (36 ± 2) °C pendant 21 à 24 heures.

✓ **Ensemencement :**
filtration sur membrane

✓ **Incubation :**
21 à 24 h à 36°C

6 LECTURE

Dénombrer séparément les *Escherichia coli* et les coliformes selon le tableau ci-après :

Microorganismes	Phénotype typique	Coloration des colonies
<i>Escherichia coli</i>	GUD ⁺ / β -gal ⁺	Bleu foncé à violette
Coliformes non <i>Escherichia coli</i>	GUD ⁻ / β -gal ⁺	Rose à rouge

Pour faciliter la lecture, il est possible de réaliser directement les comptages sur le fond des boîtes. En cas de doutes sur la coloration rosée des coliformes (activité β galactosidase ou pigmentation naturelle de la souche), il est conseillé de soulever le filtre. La coloration liée à l'activité chromogénique se voit sur la gélose.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

Selon la norme ISO 9308-1, les coliformes doivent être confirmés par l'obtention d'un résultat négatif du test oxydase.

7 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose ambrée.

Réponse culturale typique après 21 heures d'incubation à 36 °C (ISO 9308-1/A1) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	$P_R \geq 70\%$, colonies bleues à violettes
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	$P_R \geq 70\%$, colonies bleues à violettes
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	$P_R \geq 70\%$, colonies roses
<i>Enterobacter aerogenes</i>	WDCM 00175	$P_R \geq 70\%$, colonies roses
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00024	Inhibée ou colonies non caractéristiques
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée

8 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

Milieu pré-coulé : 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en boîtes de Petri (*) : 30 jours à 2-8 °C, à l'abri de la lumière.

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

9 PRESENTATION

Milieu pré-coulé :

20 boîtes de Petri Ø 55 mm BM18208

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK204HA

10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

B. Lange, M. Strathmann and R. Oßmer. Performance validation of chromogenic coliform agar for the enumeration of *Escherichia coli* and coliform bacteria. Letters in Applied Microbiology Volume 57, Issue 6, pages 547–553, December 2013.

ISO 9308-1. Septembre 2014. Qualité de l'eau. Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Partie 1 : méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries.

ISO 9308-1/A. Décembre 2016. Qualité de l'eau. Dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes. Partie 1 : méthode par filtration sur membrane pour les eaux à faible teneur en bactéries. Amendement 1 à la norme ISO 9308-1 de septembre 2014.

11 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 : CCA_FR_V3

Date création : 04-2015

Date modification : 01-2017

Motif de révision : Mise à jour de la durée d'incubation.

Gélose chromogène pour bactéries coliformes (CCA)

Dénombrement des *Escherichia coli* et autres bactéries coliformes dans les eaux.

Lecture :

Croissance obtenue après 21 heures d'incubation à 36 °C.

