



ÁGAR TBX (TRYPTONE BILE X-GLUCURONIDE)

CONTAGEM DE *ESCHERICHIA COLI* POSITIVA β -D-GLUCURONIDASE

USO

O Ágar TBX é um meio seletivo para a contagem de *Escherichia coli* β -D-glucuronidase positiva em alimentos e amostras ambientais. O resultado é obtido diretamente pela contagem das colônias características após 24 horas de incubação, sem que seja necessário realizar uma etapa de confirmação.

A fórmula padrão atende à composição definida nas normas NF ISO 16649-1, NF ISO 16649-2 e NF EN ISO 16649-3.

HISTÓRIA

Em 1949, Buehler *et al.* foram os primeiros a notar a presença de uma β -D-glucuronidase em *Escherichia coli*. Desde então, a maioria dos estudos tem mostrado que 94 a 97% das *Escherichia coli* de origem humana ou ambiental têm essa atividade enzimática. Este último também foi detectado em *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Salmonella*, *Shigella* e *Yersinia*, mas sua presença diz respeito apenas a um pequeno número de cepas em cada uma das espécies mencionadas. A β -D-glucuronidase pode, portanto, ser considerada um indicador válido para a detecção de *Escherichia coli* em alimentos e água. Em 1990, a Restaino usou com sucesso um novo substrato cromogênico: BCIG. Uma vez incorporado ao ágar Tergitol, este possibilitou a contagem em 24 horas de *Escherichia coli* presente em produtos cárneos. O ágar TBX não contém Tergitol, sendo o último composto substituído por sais biliares que fornecem propriedades seletivas semelhantes.

PRINCÍPIOS

BCIG (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurônico) é um substrato cromogênico. A maioria das cepas de *Escherichia coli* possui ação de clivagem da β -D-glucuronidase do BCIG, causando a coloração das colônias em azul para azul esverdeado.

É importante notar que nem todas as *Escherichia coli* têm β -D-glucuronidase e, em particular, o sorotipo O157 (entero-hemorrágica) que constitui colônias brancas.

Os sais biliares inibem o crescimento de microrganismos Gram-positivos e promovem a recuperação de *Escherichia coli*. A incubação realizada a 44°C é limitada a 24 horas tornando possível a inibição do crescimento da maioria dos microrganismos contaminantes.

COMPOSIÇÃO TÍPICA

(A composição pode ser ajustada para obter um desempenho ideal).

Para 1 litro de meio:

- Triptona 20,0 g
- Sais biliares n°3 1,5 g
- BCIG (5-bromo-4-cloro-3-indolil β -D-glucuronate) 75,0 mg
- Ágar bacteriológico 9,0 g

pH do meio pronto a usar a 25°C: 7,2 \pm 0,2.



PREPARAÇÃO

Preparação do meio desidratado:

- Suspender 30,6 g de meio desidratado (BK146) em 1 litro de água destilada ou desmineralizada.
- Lentamente, leve o meio para ferver com agitação constante até sua completa dissolução.
- Distribuir em tubos ou frascos
- Esterilizar em autoclave a 121°C por 15 minutos.
- Resfriar e manter a 47-50°C.

-
Reconstituição:

36,0 g/L

- Esterilização:
15 min a 121°C

Uso do meio pronto para liquefazer:

- Fundir o meio previamente preparado ou meio pronto para liquefazer (BM069 ou BM171) durante tempo mínimo necessário para a reliquefação total.
- Resfriar e manter a 47-50°C

INSTRUÇÃO DE USO

Numeração da membrana (NF ISO 16649-1):

- Inocular a membrana com 1 mL do inóculo e colocar em ágar modificado com glutamato.
- Incubar por 4 ± 0,25 h a 37 ± 1°C.
- Pegar a membrana e colocar em ágar TBX.
- Incubar por 20 a 24 horas a 44 ± 1°C.

- Semeado:

Depósito de
membrana

- Incubação:
20 h a 24 h a 44 ±
1°C

Semeadura profunda (NF EN ISO 16649-2):

- Transferir 1 mL da suspensão e suas diluições decimais sucessivas para placas de
- Despejar aproximadamente 15 47°C, por placa.
- Homogeneizar perfeitamente e fria.
- Incubar a 44 ± 1°C por 18 a 24

- Semeado:

1 mL de
profundidade

- Incubação:
18 h a 24 h a 44 ±
1°C

Petri estéreis.

mL de meio mantido a 44-

deixar solidificar em superfície

horas no máximo

NOTA

Se houver suspeita da presença de microrganismos injuriados, incubar primeiramente por 4 h a uma temperatura de 37°C, depois por 18 h a 24 h a uma temperatura de 44°C.

Enumeração pelo método NPP (NF EN ISO 16649-3):

- Despejar em placas de Petri estéreis e deixe solidificar em uma superfície fria.
- Repicar cada tubo de caldo de glutamato modificado (BK186) presumivelmente positivo no ágar assim preparado.
- Incubar a 44 ± 1 °C por 20 a 24 horas.

- Semeado:

Por estrias

- Incubação:
20 a 24 h a 44°C

LEITURA

As colônias características possuem colônias azuis a verde-azuladas.

Contar as placas contendo menos de 150 colônias características e menos de 300 colônias no total (características e não).



Consulte o ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRÁFICO.

CONTROLE DE QUALIDADE

Meio desidratado: pó creme, esbranquiçado e homogêneo.

Meio preparado: ágar esbranquiçado.

Resultado do cultivo após 21 horas de incubação a 44°C (NF EN ISO 11133):

Microrganismos		Crescimento (proporção de produtividade: PR)	Características
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	PR ≥ 50%	Colônias azuis
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00202	PR ≥ 50%	Colônias azuis
<i>Citrobacter freundii</i>	WDCM 00006	Não inibido	Colônias brancas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	Não inibido	Colônias de branco a bege verde
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inibido	-

ARMAZENAMENTO / VALIDADE DE PRATELEIRA

Meio desidratado: 2-20°C.

Meio pronto para liquefazer em frascos: 2-8°C, protegido da luz.

As datas de validade são mencionadas nas etiquetas.

Meio preparado em frascos (*): 180 dias a 2-8°C, protegido da luz.

Meio preparado em pratos (*): 15 dias a 2-8°C, protegido da luz.

(*) Valor indicativo determinado em condições padrão de preparação, seguindo as instruções do fabricante.

APRESENTAÇÃO

Meio desidratado:

Frasco de 100 g BK146HM

Frasco de 500 g BK146HA

Meio pronto para liquefazer:

Embalagem com 10 frascos de 100 mL.....BM06908

Embalagem com 10 frascos de 200 mL.....BM17108

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Buehler, H.J., Katzman, P.A. and Doisey, E.A. 1949. Bacterial glucuronidase. Federation Proceedings, 8: 189.

Adams, M.R., Grubb, S.M., Hamer, A. and Clifford, M.N. 1990. Colorimetric enumeration of *Escherichia coli* based on β -glucuronidase activity. Applied and Environmental Microbiology, 56 (7) : 2021-2024.

Restaino, L., Frampton, E.W. and Lyon, R.H. 1990. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3 indolyl- β -D-glucuronide (X-GLUC) for enumerating *Escherichia coli* in 24 h from ground beef. Journal of Food Protection, 53 (6): 508-510.

NF ISO 16649-2. Juillet 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase positive. Partie 2: Technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronate.



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 16649-3. Juillet 2015. Microbiologie de la chaîne alimentaire.. Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* β -glucuronidase-positives. Partie 3: recherche et technique du nombre le plus probable utilisant le bromo-5-chloro-4-indolyl-3- β -D-glucuronate.

NF ISO 16649-1. Septembre 2018. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour le dénombrement des *Escherichia coli* bêta-glucuronidase positive - Partie 1: technique de comptage des colonies à 44 °C au moyen de membranes et de 5-bromo-4-chloro-3-indolyl bêta-D glucuronide.

OUTRAS INFORMAÇÕES

As declarações feitas nas etiquetas têm precedência sobre as fórmulas ou instruções descritas neste documento e estão sujeitos a alterações a qualquer momento sem aviso prévio.

Código do documento: GELOSE TBX_FR_V15.

Data de criação: 01-2003

Data de revisão: 09-2018

Motivo da revisão: atualização das instruções de uso, referências bibliográficas.

ANEXO 1: SUPORTE FOTOGRÁFICO

Ágar TBX

Contagem de *Escherichia coli* positiva para β -D-glucuronidase.

Leitura:

Crescimento obtido após 24 horas de incubação a 44°C (em profundidade).

***Escherichia coli* β - glucuronidase
positiva**

Colônia característica: azul a azul
esverdeado.

