
GELOSE MRS

DENOMBREMENT DES BACTERIES LACTIQUES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose MRS (de De Man, Rogosa et Sharpe) est utilisée pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale.

Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*. Acidifié à pH 5,4, il permet également de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts.

Selon la bactérie recherchée, le milieu peut être ajusté au pH optimal de croissance.

La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF ISO 15214.

2 HISTORIQUE

En 1960, de Man, Rogosa et Sharpe ont développé la formulation d'un milieu spécialement adapté aux cultures des lactobacilles provenant de produits laitiers, ceci sans rajouter de jus de tomate (ingrédient de composition très variable).

3 PRINCIPES

La peptone, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles.

Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes.

Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne.

Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Digestat enzymatique de caséine	10,00 g
- Extrait de viande	10,00 g
- Extrait autolytique de levure.....	4,00 g
- Glucose	20,00 g
- Tween 80.....	1,08 g
- Phosphate dipotassique.....	2,00 g
- Acétate de sodium	5,00 g
- Citrate d'ammonium	2,00 g
- Sulfate de magnésium	0,20 g
- Sulfate de manganèse	0,05 g
- Agar agar bactériologique	16,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,7 ± 0,1.

5 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 70,3 g de milieu déshydraté (BK089) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution complète.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**
70,3 g/L

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou le milieu prêt-à-liquéfier (BM089) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale. Ne pas répéter l'opération plus d'une fois.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

NOTES :

Selon le référentiel utilisé, la gélose peut être ajustée au pH préconisé avant le cycle de stérilisation.

- Avec de l'acide acétique à $5,4 \pm 0,1$ pour l'analyse des yaourts
- Avec de la soude à pH 6,2 pour le dénombrement des *Lactobacillus* ou des *Pediococcus* dans les produits destinés à l'alimentation animale.
- Avec de la soude à $pH 6,5 \pm 0,2$ pour le dénombrement des *Bifidobacterium* dans les produits destinés à l'alimentation animale.

6 MODE D'EMPLOI

Dénombrement des bactéries lactiques mésophiles (NF ISO 15214) :

- Transférer 1 mL de la suspension et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler environ 15 mL de milieu, par boîte.
- Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber pendant 72 ± 3 heures à 30 ± 1 °C dans des conditions aérobies.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**
Aérobie, 72 h à 30 °C

NOTES :

- Pour les produits laitiers, l'incubation doit être effectuée en anaérobiose à 37°C pendant 72 heures, se référer aux normes ISO 27205, ISO 7889, ISO 20128.
- En alimentation animale, ensemercer en surface et incuber en anaérobiose à 37 ± 1 °C, pendant 36 à 48 heures pour le dénombrement des *Bifidobacterium* et 48 à 72 heures pour les *Lactobacillus* (NF EN 15785 ; NF EN 15786 ; NF EN 15787).

7 LECTURE

Procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant 300 colonies au maximum. En raison de la possibilité de développement de germes autres que les bactéries lactiques, il peut être nécessaire, dans certains cas, de vérifier au microscope qu'il s'agit bien de bacilles à Gram positif, non sporulés.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème, légèrement mottée, friable.

Milieu préparé : gélose ambrée.

Réponse culturale après 72 heures d'incubation à 30 °C (NF EN ISO 11133)

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Lactobacillus sakei</i>	WDCM 00015	$P_R \geq 70 \%$
<i>Lactococcus lactis</i>	WDCM 00016	$P_R \geq 70 \%$
<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001	Inhibée, score 0
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-20 °C.

Milieu prêt-à-liquéfier en flacons : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en flacons (*) : 180 jours à 2-8 °C.

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

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

Flacon de 500 g BK089HA

Milieu prêt-à-liquéfier (pH 5,7) :

Pack de 10 flacons de 200 mL BM08908

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130-135.

Journal Officiel du 4 janvier 1978. Méthode officielle d'analyse pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt ou yoghourt. (arrêté du 25 Novembre 1977).

ISO 27205. Février 2010. Produits laitiers. Ferments acidifiants. Norme de composition.

NF ISO 15214. Septembre 1998. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Technique par comptage des colonies à 30 °C.

ISO 7889. Février 2003. Yaourt. Dénombrement des micro-organismes caractéristiques. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

ISO 20128. Mai 2006. Produits laitiers. Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

NF EN 15785. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Bifidobacterium* spp.

NF EN 15786. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Pediococcus* spp.

NF EN 15787. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Lactobacillus* spp.

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 : GELOSE MRS_FR_V9.

Date création : 10-2003

Date de révision : 11-2017

Motif de révision : Mise à jour du protocole.

Gélose MRS

Détection et dénombrement des *Lactobacillus*.

Lecture :

Croissance obtenue après 72 heures d'incubation à 30 °C.

Lactobacillus casei subsp. *rhamnosus*

Colonie caractéristique :
couleur blanche de taille uniforme.

