
GELOSE SELECTIVE POUR *BACILLUS CEREUS* SELON MOSSEL

DENOMBREMENT DE *BACILLUS CEREUS*

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose sélective pour *Bacillus cereus* selon Mossel est utilisée pour la détection et le dénombrement des spores et formes végétatives de *Bacillus cereus* dans les produits alimentaires. Elle est utilisée pour le dénombrement à 30 °C des *Bacillus cereus* présomptifs (NF EN ISO 7932). En méthode de détection ou pour les petits nombres, la méthode NF EN ISO 21871 préconise aussi ce milieu.

La formule-type répond à la composition de la gélose MYP (au mannitol, jaune d'œuf et polymyxine) définie dans les normes NF EN ISO 7932 et NF EN ISO 21871.

2 HISTORIQUE

En 1967, Mossel *et al.* ont préconisé l'utilisation d'un milieu au mannitol, rouge de phénol et jaune d'œuf, dont le principe de fonctionnement est fondé sur l'absence de fermentation du mannitol par *Bacillus cereus* et la présence d'une lécithinase chez la majorité des souches testées.

Les auteurs ont démontré qu'en présence de polymyxine B à 10 mg/L, le degré de sélectivité obtenu était satisfaisant.

3 PRINCIPES

La Tryptone et l'extrait de viande favorisent la croissance de *Bacillus cereus*.

L'émulsion stérile de jaune d'œuf utilisée comme additif permet de mettre en évidence la présence d'une lécithinase chez la majorité des souches de *Bacillus cereus*. Les produits insolubles résultant de la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf s'accumulent autour des colonies pour former un précipité blanchâtre.

La présence de mannitol permet de différencier les microorganismes contaminants qui le fermentent. Ils sont identifiés par le virage au jaune du rouge de phénol.

La polymyxine, présentée sous forme de supplément lyophilisé, permet d'inhiber la presque totalité de la microflore secondaire lorsque l'échantillon à tester est fortement contaminé.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu complet :

- Tryptone	10,0 g
- Extrait de viande	1,0 g
- D-mannitol	10,0 g
- Chlorure de sodium	10,0 g
- Rouge de phénol	25,0 mg
- Polymyxine B	1x10 ⁵ UI
- Emulsion de jaune d'œuf stérile	100 mL
- Agar agar bactériologique	13,5 g

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

Pour 44,5 g de base déshydratée BK116

- Tryptone10,0 g
- Extrait de viande1,0 g
- D-mannitol10,0 g
- Chlorure de sodium10,0 g
- Rouge de phénol25,0 mg
- Agar agar bactériologique13,5 g

Par flacon de supplément Polymyxine BS007 Qsp 500 mL

- Polymyxine B 5×10^4 UI

Pour un flacon de supplément BS066 (50 mL)

- Emulsion stérile de jaune d'œuf 50,0 mL

Pour un flacon de supplément BS055 (50 mL)

- Polymyxine B (sulfate) 5×10^4 UI
- Emulsion stérile de jaune d'œuf 50,0 mL

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 44,5 g de milieu déshydraté (BK116) dans 0,9 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 flacons à raison de 90 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

- ✓ **Reconstitution :**
44,5 g pour 900 mL
- ✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

- Dans chaque flacon de 90 mL de milieu de base, ajouter stérilement 10 mL d'émulsion stérile de jaune d'œuf avec Polymyxine B (BS055).
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

NOTE :

A la place de 10 mL d'émulsion stérile de jaune d'œuf à la polymyxine, il est possible d'ajouter 10 mL d'émulsion de jaune d'œuf (BS066) et 1 mL de supplément polymyxine (supplément BS007 réhydraté avec 5 mL d'eau stérile).

6 MODE D'EMPLOI

Comptage des *Bacillus cereus* à 30 °C (NF EN ISO 7932)

- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- A la surface du milieu ainsi préparé ou bien du milieu pré-coulé (BM038, BM199), transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales successives.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 30 °C pendant 18 à 24 heures. Si les colonies ne sont pas bien visibles, ré-incuber pendant 24 heures supplémentaires.

- ✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface
- ✓ **Incubation :**
18 h à 48 h à 30 °C

Détection ou comptage des petits nombres de *Bacillus cereus* (NF EN ISO 21871)

- A la surface du milieu ainsi préparé ou bien du milieu pré-coulé (BM038, BM199), repiquer une ôse de chaque tube de bouillon d'enrichissement.
- Incuber à 30 °C pendant 18 à 24 heures. Si les colonies ne sont pas bien visibles, ré-incuber pendant 24 heures supplémentaires.

- ✓ **Ensemencement :**
En surface
- ✓ **Incubation :**
18 h à 48 h à 30 °C

7 LECTURE

Les colonies présumées de *Bacillus cereus* sont de couleur rose (mannitol-négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase. En général, elles mesurent de 2 à 5 mm, et présentent des bords « effilochés ».

NOTE :

Si les boîtes ont une forte teneur en flore contaminante fermentant le mannitol, la coloration rose de la gélose et des *Bacillus cereus* peut ne plus être visible.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu de base déshydraté : poudre rosée, fluide et homogène.

Aspect lyophilisat Polymyxine : blanc, donnant après reconstitution une solution incolore et limpide.

Suppléments au jaune d'œuf : émulsion jaunâtre, opaque, présentant un précipité qui peut être remis en suspension.

Milieu préparé (complet) : gélose rosée à orangée, opaque.

Réponse culturale après 24 ⁽¹⁾ ou 48 heures d'incubation à 30 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance	Caractéristiques
⁽¹⁾ <i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001	Bonne à excellente, score 2	Colonies rosées avec halo
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	WDCM 00003	Limitée, score 1-2	Colonies jaunes sans halo
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0	-

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté : 2-30 °C.

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C.

Emulsion stérile de jaune d'œuf : 2-8 °C

Emulsion stérile de jaune d'œuf à la Polymyxine B : 2-8 °C

Supplément sélectif Polymyxine B : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

Milieu complet préparé en boîtes (*) : 30 jours à 2-8 °C.

Supplément polymyxine réhydraté (*) : 30 jours à 2-8 °C.

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

10 PRESENTATION

Milieu de base déshydraté (sans jaune d'œuf, ni Polymyxine B) :

Flacon de 500 g BK116HA

Emulsion stérile de jaune d'œuf à la Polymyxine B :

Coffret de 10 flacons de 50 mL BS05508

Emulsion stérile de jaune d'œuf :

Coffret de 10 flacons de 50 mL BS06608

Supplément sélectif Polymyxine B :

Coffret de 10 flacons BS00708

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 90 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM03808

Coffret de 120 boîtes BM19908

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mossel, D.A.A., Koopman, M.J., and Jongerius, E. 1967. Enumeration of *Bacillus_cereus* in Foods. App. Microb., 15, (3): 650-653.

NF EN ISO 7932. Juillet 2005. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présomptifs. Technique par comptage des colonies à 30 °C.

NF EN ISO 21871. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement de *Bacillus cereus* présumés en petit nombre. Technique du nombre le plus probable et méthode de recherche.

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.

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 SELECTIVE MOSSEL_FR_V13
Date création : 02-2003
Date de révision : 04-2018
Motif de révision : Ajout nouvelle référence BM19908

Gélose MYP (pour *Bacillus cereus* selon Mossel)

Détection et dénombrement des *Bacillus cereus*.

Lecture :

Croissance obtenue après 24 heures d'incubation à 30 °C.

Bacillus cereus
Colonie caractéristique :
couleur rosée entourée d'un
halo opaque (production de
lécithinase)

