
GELOSE DICHLORAN ROSE BENGALE CHLORAMPHENICOL (DRBC)

DENOMBREMENT DES LEVURES ET MOISSURES

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose au Dichloran Rose Bengale Chloramphénicol (DRBC) est recommandée pour le dénombrement des levures et des moisissures viables dans les produits alimentaires dont l'activité de l'eau est supérieure à 0,95. Le milieu ne permet pas le dénombrement des spores de moisissures.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans la norme NF EN ISO 21527-1.

2 HISTORIQUE

Les premiers milieux sélectifs destinés au dénombrement des levures et des moisissures présentaient un pH acide afin de limiter la croissance des bactéries. En 1962, les travaux réalisés par Mossel sur la recherche des levures et des moisissures dans les aliments, démontrèrent la supériorité des milieux à pH neutre contenant un agent antibactérien sur ceux dont le système sélectif était basé sur un pH acide. En 1973, Jarvis a décrit la gélose rose bengale chlortétracycline, dans laquelle la combinaison du pigment et de l'antibiotique diminue la croissance des bactéries et limite la sporulation des moisissures. Suite à ces travaux, en 1979, King *et al.* montrèrent que l'introduction du dichloran et la réduction de la concentration en rose bengale permettait la récupération d'un plus grand nombre d'espèces de moisissures. Les résultats obtenus par ces mêmes auteurs montrèrent aussi que la limitation de la sporulation des moisissures était meilleure à pH 5,6. Parallèlement, Koburger et Rodgers (1978) ont montré l'efficacité de la combinaison du chloramphénicol et de la chlortétracycline sur l'inhibition de la flore bactérienne. Enfin, en 1992, sur la base de travaux comparatifs sur les méthodes de recherche et de dénombrement, Beuchat a montré que l'ensemencement en surface donnait de meilleurs résultats en numération que l'ensemencement en profondeur.

3 PRINCIPES

Les peptones et le glucose assurent la croissance des levures et des moisissures.

Le dichloran et le rose bengale ralentissent le développement des bactéries et préviennent l'envahissement des boîtes de Petri par les moisissures.

Le rose bengale assimilé par les levures facilite leur dénombrement en colorant les colonies en rose.

Le chloramphénicol, antibiotique thermostable, et le chlortétracycline permettent de renforcer la sélectivité du milieu vis-à-vis de la plupart des bactéries contaminantes. Le Tergitol limite la prolifération des *Mucoraceae*.

Le zinc et le cuivre, présents sous forme de sulfates, améliorent la production de pigments par les moisissures.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

- Polypeptone	5,0 g
- Glucose	10,0 g
- Phosphate monopotassique.....	1,0 g
- MgSO ₄ ,H ₂ O	0,5 g
- Dichloran	2,0 mg
- Rose bengale	25,0 mg
- Chloramphénicol	50,0 mg
- Chlorhydrate de chlortétracycline	50,0 mg
- ZnSO ₄ ,7H ₂ O	10,0 mg
- CuSO ₄ ,5H ₂ O	5,0 mg
- Tergitol	1 mL
- Agar agar bactériologique	12,4 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,6 ± 0,2.

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 30,0 g de milieu déshydraté (BK198) 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 flacons à raison de 100 mL par flacon.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles.
- Laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
30,0 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 bien le milieu prêt-à-liquéfier (BM142) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

6 MODE D'EMPLOI

- Faire sécher les boîtes à l'étuve, couvercle entrouvert.
- Transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales à la surface des boîtes.
- Ensemencer l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber les boîtes, couvercle en haut, à 25 ± 1 °C de 2 à 5 jours.

✓ **Ensemencement :**
0,1 mL en surface

✓ **Incubation :**
2 à 5 jours à 25 ± 1 °C

Notes :

L'ensemencement en profondeur peut aussi être utilisé, l'équivalence des résultats doit alors être validée par rapport à l'ensemencement en surface.

Eviter l'exposition du milieu à la lumière, car les produits de décomposition cytotoxiques peuvent causer la sous-évaluation de la mycoflore dans les échantillons.

7 LECTURE

Dénombrer les boîtes contenant moins de 150 germes.

La lecture des boîtes à des temps intermédiaires permet de faciliter le dénombrement des moisissures.

Les colonies de levures apparaissent en rose en raison de l'assimilation du rose bengale.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème à rosâtre, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose rose.

Réponse culturelle après 5 jours d'incubation à 25 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	WDCM 00058	$P_R \geq 50 \%$
<i>Aspergillus brasiliensis</i>	WDCM 00053	$P_R \geq 50 \%$
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0
<i>Bacillus subtilis</i> ssp. <i>spizizenii</i>	WDCM 00003	Inhibée, score 0

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-20 °C.

Milieu prêt-à-liquéfier : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en flacons (*) : 90 jours à 2-8 °C.

Milieu préparé en boîtes (*) : 30 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 BK198HA

Milieu prêt-à-liquéfier :

Pack de 10 flacons de 200 mL BM14208

11 RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Mossel D.A.A., Visser M. & Mengerink W.J.H., 1962, A comparison of media for the enumeration of moulds and yeasts in foods and beverages, *Laboratory Practise*, **11** : 109-112.

Jarvis B., 1973, Comparison of an improved rose bengal-chlortetracycline agar with other media for the selective isolation and enumeration of moulds and yeasts in food, *Journal of Applied Bacteriology*, **36** : 723-727.

Korburger J.A. & Rdgers M.F., 1978, Single or multiple antibiotic-amended media to enumerate yeasts and moulds, *Journal of Food Protection*, **41** : 367-369.

King A.D., Hocking A.D. & Pitt J.I., 1979, Dichloran-Rose Bengal medium for enumeration and isolation of molds from foods, *Applied and Environmental Microbiology*, **37** : 959-964.

Beuchat L.R., 1992, Media for detecting and enumerating yeasts and moulds, *International Journal of Food Microbiology*, **17** : 145-158.

NF ISO 21527-1. Novembre 2008. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des levures et des moisissures. Partie 1 : Technique par comptage des colonies dans les produits à activité d'eau supérieure à 0,95.

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 : DRBC_FR_V4.

Date création : 01-2009

Date de révision : 03-2016

Motif de révision : Révision générale.