

GELOSE POUR DENOMBREMENT (PCA)

DENOMBREMENT DES MICROORGANISMES TOTAUX

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose glucosée à l'extrait de levure, appelée par les Anglo-Saxons "Plate Count Agar" ou PCA, est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies dans les produits alimentaires, les produits d'alimentation animale et les échantillons de l'environnement. Elle est aussi utilisée pour le dénombrement des microorganismes psychrotrophes.

La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF EN ISO 4833-1 et 2, NF ISO 17410, XP V08-034 ; T90-425 et ISO 14461-1.

2 HISTORIQUE

La gélose pour dénombrement est préparée avec les mêmes ingrédients que ceux utilisés à l'origine par Buchbinder *et al.* Dans leurs travaux, ils comparèrent plusieurs lots d'extrait de levure et montrèrent que les résultats obtenus (sans lait ajouté au milieu) étaient satisfaisants pour les numérations de germes contaminant des échantillons de lait cru et pasteurisé. La transparence du milieu et la taille satisfaisante des colonies obtenues permettaient de faciliter les comptages.

3 PRINCIPES

Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

En bactériologie laitière, il est recommandé d'ajouter 1 g de lait écrémé en poudre par litre de milieu reconstitué (gélose pour dénombrement au lait écrémé ; BK161HA ou BM086).

4 FORMULE-TYPE

La composition peut être ajustée de façon à obtenir des performances optimales. Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 5,0 g
- Extrait autolytique de levure 2,5 g
- Glucose 1,0 g
- Agar agar bactériologique 12,0 g

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

5 PREPARATION

Préparation du milieu :

- Mettre en suspension 20,5 g de milieu déshydraté (BK144) 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 et maintenir le milieu à 44-47°C.
- Pour une utilisation en surface, couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface plane.

✓ **Reconstitution :**
20,5 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 (BM015 ou BM033) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.

6 MODE D'EMPLOI

Ensemencement en surface (NF EN ISO 4833-2) :

- Faire sécher les boîtes à l'étuve couvercle entrouvert.
- A la surface du milieu, transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et de ses dilutions décimales successives.
- Ensemencer l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 30 ± 1 °C pendant 72 ± 3 heures.

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

✓ **Incubation :**
72 h à 30 °C

NOTE

- Un dispositif d'ensemencement en spirale peut être utilisé.
- Pour la recherche des microorganismes psychrotrophes en microbiologie des aliments (NF ISO 17410), incuber les boîtes pendant 10 jours à 6,5 °C.

Ensemencement en profondeur (NF EN ISO 4833-1):

- Transférer 1 mL de l'inoculum et de ses dilutions décimales successives dans des boîtes de Petri stériles.
- Couler environ 15 mL de milieu ramené à 44-47 °C, par boîte.
- Homogénéiser parfaitement et laisser solidifier sur une surface froide.
- Incuber à 30 ± 1 °C pendant 72 ± 3 heures.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**
72 h à 30 °C

NOTE

Dans le cas où on suspecte la présence de colonies envahissant la surface de la gélose, il est possible de couler une seconde couche de gélose, après reprise en masse de la première (environ 4 mL).

6 LECTURE

Procéder au comptage des boîtes contenant moins de 300 colonies.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre crème, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose ambre claire.

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

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : P_R)
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00012	$P_R \geq 70$ %
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	$P_R \geq 70$ %
<i>Bacillus subtilis ssp. spizizenii</i>	WDCM 00003	$P_R \geq 70$ %

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C,

Milieu prêt-à-liquéfier en flacons : 2-25 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé en tubes ou en flacons (*) : 180 jours à 2-25 °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	BK144HA
Seau de 5 kg	BK144GC

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

Coffret de 20 boîtes	BM21708
Coffret de 120 boîtes	BM21808

Milieu prêt-à-liquéfier :

Pack de 10 flacons de 100 mL	BM01508
Pack de 10 flacons de 200 mL	BM03308

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Buchbinder, Baris, Alff, Reynolds, Dillon, Pessin, Pincus and Strauss. 1951. Public Health Reports, 66: 327.

NF EN ISO 4833-1. Octobre 2013. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes. Partie 1 : comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur.

NF EN ISO 4833-2. Octobre 2013. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes. Partie 2 : comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface.

NF ISO 17410. Novembre 2001. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes psychrotrophes.

XP V 08-034. Septembre 2010. Microbiologie des Aliments. Dénombrement des microorganismes par comptage des colonies obtenues à 30°C après ensemencement par la méthode spirale.

NF T 72-171. Novembre 1988. Antiseptiques et désinfectants utilisés à l'état liquide, miscibles à l'eau. Détermination de l'activité bactéricide en présence de substances interférentes de référence. Méthode par filtration sur membranes.

T 90-425. Février 1992. Essais des eaux. Examens bactériologiques des récipients et systèmes de bouchage destinés aux eaux conditionnées.

ISO 14461-1. Mai 2005. Lait et produits laitiers. Contrôle de qualité en laboratoires microbiologiques. Partie 1 : Evaluation de la performance des analystes effectuant les comptages de colonies.

NF ISO 8784-1. Février 2015. Pâte, papier et carton - Analyse microbienne - Partie 1 : dénombrement des bactéries et des spores bactériennes basé sur la désintégration

NF EN ISO 20743. Septembre 2013. Textiles. Détermination de l'activité antibactérienne des produits finis antibactériens.

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 PCA_FR_V12.
Date création : 06-2003
Date de révision : 04-2020
Motif de révision : Ajout de nouvelles références.