

# RHAPSODY AGAR®

DENOMBREMENT DE *PSEUDOMONAS* SPP.

## 1 DOMAINE D'UTILISATION

RHAPSODY Agar® est un milieu sélectif destiné au dénombrement de *Pseudomonas* spp. dans les produits alimentaires et les échantillons de l'environnement.

La méthode est certifiée NF VALIDATION selon le protocole de validation ISO 16140-2 :2016, pour le dénombrement des *Pseudomonas* spp. dans les produits carnés



**BKR 23/09/-05/15 A,**  
**METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE**  
**POUR L'AGROALIMENTAIRE**  
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode.  
La méthode de référence utilisée pour la validation est la norme NF EN ISO 13720 : 2010.

La méthode est également certifiée NF VALIDATION selon le protocole de validation ISO 16140-2 :2016, pour le dénombrement des *Pseudomonas* spp. dans les produits laitiers,



**BKR 23/09/-05/15 B,**  
**METHODES ALTERNATIVES D'ANALYSE**  
**POUR L'AGROALIMENTAIRE**  
Certifié par AFNOR Certification <http://nf-validation.afnor.org>

Se référer au certificat disponible sur le site NF VALIDATION pour la date de fin de validité de la méthode.  
La méthode de référence utilisée pour la validation est la norme XP ISO/TS 11059 :2009.

La méthode validée permet d'obtenir un dénombrement en 48 ± 3 heures d'incubation et ne nécessite pas de confirmations, ni pour les produits laitiers, ni pour les produits carnés.

## 2 PRINCIPES

Les peptones constituent les substrats nutritifs nécessaires à la multiplication rapide des *Pseudomonas*.

Le substrat chromogénique inclus dans le milieu de culture est hydrolysé par tous les *Pseudomonas*. Les colonies présentent alors une coloration bleue très pâle à bleu-vert.

Le système sélectif retenu et la céphalosporine permettent l'inhibition de la majorité de la flore annexe.

## 3 FORMULE-TYPE

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

Pour 1010 mL de milieu complet :

- Polypeptone .....	28,9 g
- Système tampon .....	7,0 g
- Chlorure de sodium .....	5,0 g
- Système sélectif .....	5,5 g
- Système chromogène .....	0,2 g
- Agar agar bactériologique .....	15,0 g

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

## 4 PREPARATION

---

### Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 61,6 g de milieu déshydraté (BK214) 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.
- Répartir en flacons de 100 mL ou 200 mL.
- Stériliser à l'autoclave à 110 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir le milieu à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**  
61,6 g/L

✓ **Stérilisation :**  
15 min à 110 °C

### Réhydratation du supplément lyophilisé :

- Reprendre le lyophilisat BS089 en y ajoutant aseptiquement 5 mL d'eau distillée stérile ou reprendre le supplément BS096 en y ajoutant 2 mL d'eau stérile.
- Agiter le flacon plusieurs fois de façon à assurer une complète dissolution, tout en évitant la formation de mousse.

### Préparation du milieu complet :

- Faire fondre les flacons de milieu de base (R1) pendant le minimum de temps nécessaire à leur reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47°C.
- Ajouter 1 mL de supplément sélectif RHAPSODY® reconstitué pour 100 mL de milieu de base.
- Homogénéiser parfaitement.
- Couler en boîtes de Petri stériles et laisser solidifier sur une surface froide.

## 5 MODE D'EMPLOI

---

Respecter les bonnes pratiques de laboratoire.

Se reporter à la norme NF EN ISO 7218 pour l'ensemencement, le comptage des colonies et pour les calculs et expression des résultats.

Préparer la suspension mère de l'échantillon et les dilutions décimales selon les règles définies dans les normes ISO 6887 correspondantes.

- A la surface du milieu préparé en boîtes ou du milieu pré-coulé (BM167), transférer 0,1 mL de l'échantillon à analyser et/ou de ses dilutions décimales.
- Étaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile.
- Incuber à 30 ± 1 °C pendant 48 heures ± 3 heures.

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

✓ **Incubation :**  
48 ± 3 h à 30 ± 1 °C

### NOTES :

- La méthode est validée également avec la technologie d'ensemencement Spiral.

- La limite de dénombrement peut être diminuée d'un facteur de 10 en ensemençant 1,0 mL de l'échantillon ou de la suspension mère sur la surface de trois petites boîtes de gélose (90 mm).

Pour des raisons d'organisation des laboratoires, la durée d'incubation est validée entre 45 et 72 heures.

## 6 LECTURE

---

Les colonies caractéristiques présentent une coloration bleue très pâle à bleu-vert.

La taille des colonies et l'intensité de la coloration peuvent varier selon les espèces de *Pseudomonas* rencontrées.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 7 CONTROLE QUALITE

**Milieu déshydraté** : poudre beige, fluide et homogène.

**Milieu complet** : gélose ambrée.

Réponse culturale typique sur milieu complet après 48 heures d'incubation à 30 °C :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : $P_R$ )
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00026	$P_R \geq 50\%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00025	$P_R \geq 50\%$
<i>Pseudomonas putida</i>	WDCM 00117	$P_R \geq 50\%$
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	WDCM 00115	$P_R \geq 50\%$
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0
<i>Staphylococcus aureus</i>	WDCM 00034	Inhibée, score 0

## 8 CONSERVATION

**Milieu déshydraté** : 2-30 °C.

**Supplément lyophilisé** : 2-8 °C.

**Milieu pré-coulé** : 2-8 °C.

**Milieu de base prêt-à-liquéfier en flacons** : 2-8 °C

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

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

## 9 PRESENTATION

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

20 boîtes ..... BM16708

**Milieu déshydraté**

Flacon de 500 g ..... BK214HA

**Supplément sélectif RHAPSODY**

10 flacons qsp 500 mL ..... BS08908

## 10 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

XP ISO/TS 11059. Octobre 2009. Lait et produits laitiers. Méthode de dénombrement des *Pseudomonas* spp.

NF EN ISO 13720. Novembre 2010. Viandes et produits à base de viandes. Dénombrement des *Pseudomonas* spp. présomptifs.

NF EN ISO 7218. Octobre 2007. Microbiologie des Aliments. Exigences générales et recommandations. Modifié en Octobre 2013 par l'amendement A1.

NF EN ISO 16140-2. Septembre 2016. Microbiologie de la chaîne alimentaire - Validation des méthodes - Partie 2 : protocole pour la validation de méthodes alternatives (commerciales) par rapport à une méthode de référence - Microbiologie des aliments.

## 11 AUTRES INFORMATIONS

**RHAPSODY Agar®** est une marque de BIOKAR DIAGNOSTICS (division de SOLABIA SAS).

Code document : RHAPSODY\_V7 (fr).

Date création : 01-2013

Date de révision : 02-2021

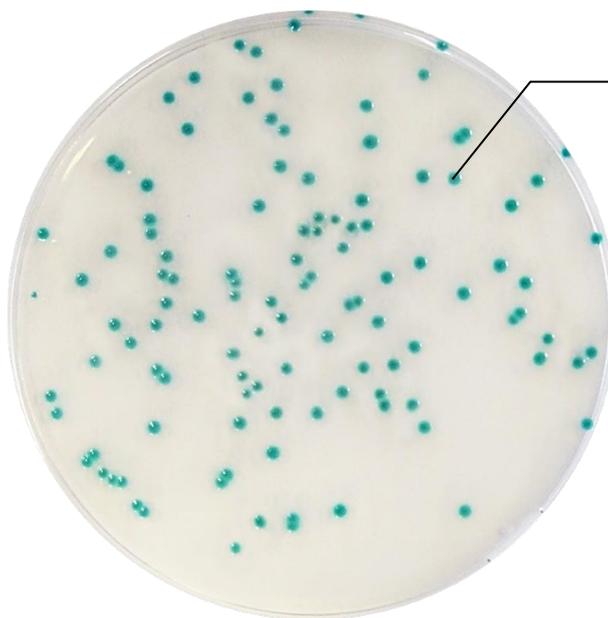
Motif de révision : Ajout consigne dénombrement selon NF EN ISO 7218

**RHAPSODY Agar®**

Détection et dénombrement des *Pseudomonas* spp.

**Lecture :**

Croissance obtenue après 48 heures d'incubation à 30 °C.



***Pseudomonas* spp.**

Colonie caractéristique :  
Bleue très pâle à bleu-vert

La taille des colonies et l'intensité de la coloration bleue à bleu-vert peuvent varier selon les espèces de *Pseudomonas* rencontrées.