

GELOSE VRBL

DENOMBREMENT DES COLIFORMES TOTAUX

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et le dénombrement des coliformes et des coliformes thermotolérants dans les produits alimentaires.

La formule-type répond à la composition définie dans les normes NF V08-050, NF V08-060 et NF ISO 4832.

2 HISTORIQUE

Ce milieu a été étudié par un grand nombre de chercheurs : MacCrady en 1932 pour le « Committee on Standards Methods of Milk Analysis of the American Public Health Association », puis par Bartram et Black pour l'isolement des coliformes dans le lait cru et le lait pasteurisé, et également par Miller et Prickett dans une note concernant la recontamination du lait. Tous ces auteurs trouvèrent le milieu satisfaisant en raison de l'obtention de résultats complets en 24 heures d'incubation.

3 PRINCIPES

La fermentation du lactose se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliaires autour des colonies.

La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries à Gram positif.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu :

| | |
|--------------------------------------|---------|
| - Peptone pepsique de viande..... | 7,0 g |
| - Extrait autolytique de levure..... | 3,0 g |
| - Lactose..... | 10,0 g |
| - Sels biliaires | 1,5 g |
| - Chlorure de sodium..... | 5,0 g |
| - Rouge neutre..... | 30,0 mg |
| - Cristal violet..... | 2,0 mg |
| - Agar agar bactériologique | 12,0 g |

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,4 ± 0,2.

5 PREPARATION

Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 38,5 g de milieu déshydraté (BK152) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir pendant 2 minutes.
- Ne pas autoclaver.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Utiliser dans les 4 heures suivant la préparation.

✓ **Reconstitution :**
38,5 g/L

✓ **Stérilisation :**
Porter à ébullition
2 minutes

Utilisation du milieu prêt-à-liquéfier :

- Faire fondre le milieu (s'il est préparé à l'avance) ou bien le milieu prêt-à-liquéfier (BM034 ou BM035) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliquéfaction totale.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Utiliser dans les 4 heures suivant la préparation.

6 MODE D'EMPLOI

- Transférer 1 mL de l'inoculum 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.
- Couler à nouveau environ 5 mL de milieu, de façon à former une deuxième couche.
- Laisser solidifier.
- Incuber pendant 24 ± 2 heures à 30 ± 1°C ou à 44 ± 1°C selon la norme à appliquer.

✓ **Ensemencement :**
1 mL en double couche

✓ **Incubation :**
24 ± 2 h à 30 ou 44 °C

NOTE : Dans le cadre de la norme NF ISO 4832, couler 4 mL de milieu pour former la deuxième couche et incuber à 30 ou 37 °C selon accord.

7 LECTURE

Les coliformes présentent des colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm et parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de la bile.
Les entérobactéries lactose-négatif sont incolores.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté : poudre beige à beige-rosé, fluide et homogène.

Milieu préparé : gélose rougeâtre.

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

| Microorganismes | Croissance (Rapport de productivité : P_R) | Caractéristiques |
|--|--|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00012 | $P_R \geq 50 \%$ | Colonies violacées |
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00013 | $P_R \geq 50 \%$ | Colonies violacées |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025 | Bonne, score 2 | Colonies beige-rosé |
| <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087 | Inhibée | - |

Réponse culturale après 24 heures d'incubation à 44 °C (NF V 08-060) :

| Microorganismes | Croissance (Rapport de productivité : P_R) | Caractéristiques |
|--|--|---------------------|
| <i>Escherichia coli</i> WDCM 00012 | $P_R \geq 50 \%$ | Colonies violacées |
| <i>Pseudomonas aeruginosa</i> WDCM 00025 | Bonne, score 2 | Colonies beige-rosé |
| <i>Enterococcus faecalis</i> WDCM 00087 | Inhibée | - |

9 CONSERVATION

Milieu déshydraté : 2-30 °C.

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

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

Milieu préparé à partir du déshydraté (*) : Non recommandé

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

10 PRESENTATION

Milieu déshydraté :

| | |
|-----------------------|---------|
| Flacon de 500 g | BK152HA |
| Seau de 5 kg | BK152GC |

Milieu prêt-à-liquéfier :

| | |
|-----------------------------------|---------|
| Pack de 10 flacons de 100 mL..... | BM03408 |
| Pack de 10 flacons de 200 mL..... | BM03508 |

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

NF ISO 4832. Juillet 2006. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des coliformes. Méthode par comptage des colonies.

NF V08-050. Avril 2009. Microbiologie des aliments. Dénombrement des coliformes présumés par comptage des colonies obtenues à 30°C.

NF V08-060. Avril 2009. Microbiologie des aliments. Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44°C.

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 (Tirage 2 (2016-01-01)).

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 : VRBL_FR_V10.
Date création : 01-2004
Date de révision : 10-2018
Motif de révision : Correction mode d'emploi.

Gélose VRBL

Détection et dénombrement des coliformes.

Lecture :

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

