

---

## GELOSE MRS

---

### DENOMBREMENT DES BACTERIES LACTIQUES

---

#### 1 DOMAINE D'UTILISATION

---

La gélose MRS (de De Man, Rogosa et Sharpe) est utilisée pour la culture et le dénombrement des bactéries lactiques dans les produits laitiers et les autres produits alimentaires ainsi que dans les produits destinés à l'alimentation animale.

Ce milieu permet de cultiver des germes à croissance ralentie tels que *Lactobacillus brevis* et *Lactobacillus fermentum*. Acidifié à pH 5,4, il permet également de dénombrer *Lactobacillus bulgaricus* dans les yaourts.

Selon la bactérie recherchée, le milieu peut être ajusté au pH optimal de croissance. La formule-type répond à la composition définie dans la norme NF ISO 15214.

---

#### 2 HISTORIQUE

---

En 1960, de Man, Rogosa et Sharpe ont développé la formulation d'un milieu spécialement adapté aux cultures des lactobacilles provenant de produits laitiers, ceci sans rajouter de jus de tomate (ingrédient de composition très variable).

---

#### 3 PRINCIPES

---

La peptone, le glucose et les sels de manganèse et de magnésium apportent les éléments nutritifs indispensables à la croissance des lactobacilles.

Le Tween 80, mélange d'esters oléiques, est une source d'acides gras nécessaires à la croissance de ces germes. Le phosphate dipotassique contribue à stabiliser le pH au cours de la croissance bactérienne.

Le citrate d'ammonium et l'acétate de sodium constituent les substances inhibitrices du développement de la plupart des contaminants tels que les streptocoques et les moisissures.

---

#### 4 FORMULE-TYPE

---

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

Pour 1 litre de milieu :

- Digestat enzymatique de caséine .....	10,00 g
- Extrait de viande .....	10,00 g
- Extrait autolytique de levure .....	4,00 g
- Glucose .....	20,00 g
- Tween 80 .....	1,08 g
- Phosphate dipotassique .....	2,00 g
- Acétate de sodium .....	5,00 g
- Citrate d'ammonium.....	2,00 g
- Sulfate de magnésium .....	0,20 g
- Sulfate de manganèse.....	0,05 g
- Agar agar bactériologique.....	16,00 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 5,7 ± 0,1.

## 5 PREPARATION

### Préparation du milieu déshydraté :

- Mettre en suspension 70,3 g de milieu déshydraté (BK089) 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 à 44-47 °C.

✓ **Reconstitution :**  
70,3 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 le milieu prêt-à-liquéfier (BM089) pendant le minimum de temps nécessaire à la reliqufaction totale. Ne pas répéter l'opération plus d'une fois.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.

### NOTES :

Selon le référentiel utilisé, la gélose peut être ajustée au pH préconisé avant le cycle de stérilisation.

- Avec de l'acide acétique à  $5,4 \pm 0,1$  pour l'analyse des yaourts
- Avec de la soude à pH 6,2 pour le dénombrement des *Lactobacillus* ou des *Pediococcus* dans les produits destinés à l'alimentation animale.
- Avec de la soude à  $pH 6,5 \pm 0,2$  pour le dénombrement des *Bifidobacterium* dans les produits destinés à l'alimentation animale.

## 6 MODE D'EMPLOI

### Dénombrement des bactéries lactiques mésophiles (NF ISO 15214)

- Transférer 1 mL de la suspension 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.
- Incuber pendant  $72 \pm 3$  heures à  $30 \pm 1$  °C dans des conditions aérobies.

✓ **Ensemencement :**  
1 mL en profondeur

✓ **Incubation :**  
Aérobie, 72 h à 30 °C

### OU

- A la surface du milieu préparé en boîtes ou du milieu précoulé (BM239), transférer 0,1 mL de la suspension et de ses dilutions décimales successives.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur stérile
- Incuber pendant  $72 \pm 3$  heures à  $30 \pm 1$  °C dans des conditions anaérobies ou microaérobies.

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

✓ **Incubation :** Anaérobie ou microaérobie, 72 h à 30 °C

### NOTES :

- Pour les produits laitiers, l'incubation doit être effectuée en anaérobiose à 37°C pendant 72 heures, se référer aux normes ISO 27205, ISO 7889, ISO 20128.
- En alimentation animale, pour les dénombrements des *Bifidobacterium* (NF EN 15785), ensemercer 0,1mL d'inoculum en surface et incuber en anaérobiose à  $37 \pm 1$  °C pendant 36-48 heures.

## 7 LECTURE

Procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant 300 colonies au maximum. En raison de la possibilité de développement de germes autres que les bactéries lactiques, il peut être nécessaire, dans certains cas, de vérifier au microscope qu'il s'agit bien de bacilles à Gram positif, non sporulés.

### NOTE :

En alimentation animale, pour la lecture des *Bifidobacterium* (NF EN 15785), procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant 30 à 300 colonies caractéristiques.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

## 8 CONTROLE QUALITE

**Milieu déshydraté** : poudre crème, légèrement mottée, friable.

**Milieu préparé** : gélose ambrée.

Réponse culturale après 72 ± 3 heures d'incubation à 30 ± 1°C (NF EN ISO 11133)

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité : $P_R$ )
<i>Lactobacillus sakei</i>	WDCM 00015	$P_R \geq 70 \%$
<i>Lactococcus lactis</i>	WDCM 00016	$P_R \geq 70 \%$
<i>Bacillus cereus</i>	WDCM 00001	Inhibée, score 0
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0

## 9 CONSERVATION

**Milieu déshydraté** : 2-20 °C.

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

**Milieu pré-coulé en boîtes de Petri** (Ø 90 mm) : 2-8°C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

**Milieu préparé en flacons (\*)** : 180 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..... BK089HA

**Milieu prêt-à-liquéfier (pH 5,7)** :

Pack de 10 flacons de 200 mL ..... BM08908

**Milieu pré-coulé (pH 5,7)** :

120 boîtes de Petri (Ø 90 mm) ..... BM23908

## 11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

De Man, J.C., Rogosa, M., and Sharpe, M.E. 1960. A medium for the cultivation of lactobacilli. J. App. Bacteriol., 23, (1): 130-135.

Journal Officiel du 4 janvier 1978. Méthode officielle d'analyse pour le dénombrement de la flore spécifique du yaourt ou yoghourt. (arrêté du 25 Novembre 1977).

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.

ISO 27205. Février 2010. Produits laitiers. Ferments acidifiants. Norme de composition.

NF ISO 15214. Septembre 1998. Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles. Technique par comptage des colonies à 30 °C.

ISO 7889. Février 2003. Yaourt. Dénombrement des micro-organismes caractéristiques. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

ISO 20128. Mai 2006. Produits laitiers. Dénombrement de *Lactobacillus acidophilus* présomptifs sur un milieu sélectif. Technique de comptage des colonies à 37 °C.

NF EN 15785. Décembre 2009. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Bifidobacterium* spp.

NF EN 15786. Novembre 2021. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Pediococcus* spp.

NF EN 15787. Novembre 2021. Aliments des animaux. Isolement et dénombrement du *Lactobacillus* spp.

## 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 MRS\_FR\_V12  
Date création : 10-2003  
Date de révision : 08-2023  
Motif de révision : Ajout du nouveau format, révision générale

**Gélose MRS**

Détection et dénombrement des *Lactobacillus*.

**Lecture :**

Croissance obtenue après 72 heures d'incubation à 30 °C.

***Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus***

Colonie caractéristique :  
couleur blanche de taille uniforme.

