
GELOSE CN POUR PSEUDOMONAS

DENOMBREMENT DES *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* DANS LES EAUX

1 DOMAINE D'UTILISATION

La gélose CN est un milieu sélectif utilisé pour l'isolement et le dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans les eaux embouteillées, les eaux de piscines, les eaux destinées à la consommation humaine.

La formule-type de la gélose répond à la composition définie dans les normes NF EN ISO 16266 et NF T90-421 pour le contrôle des eaux.

2 HISTORIQUE

La formule du milieu de base constitue une modification du milieu de King A dans lequel le chlorure de magnésium et le sulfate de potassium favorisent la production de pyocyanine. En 1951, Lowbury préconisa l'utilisation de cétrimide dans un milieu sélectif pour l'isolement des *Pseudomonas*. En raison de l'amélioration de la pureté de l'agent inhibiteur, sa concentration fut réduite par Lowbury et Collins en 1955. Goto et Enomoto ont montré que l'addition d'acide nalidixique avec diminution de la concentration en cétrimide permettait une meilleure récupération de *Pseudomonas aeruginosa*, avec un renforcement corrélatif de la production de pigment, tandis que les contaminants (*Proteus*, *Klebsiella*, *Providencia*) de la flore associée étaient fortement inhibés.

3 PRINCIPES

La peptone pancréatique de gélatine et l'hydrolysate acide de caséine constituent les substrats nutritifs nécessaires à la multiplication rapide des *Pseudomonas*.

La production de pyocyanine (pigment bleu, non fluorescent, soluble dans l'eau et le chloroforme) est stimulée en présence de chlorure de magnésium et de sulfate de potassium.

Les levures contaminantes sont inhibées par le cétrimide.

L'acide nalidixique bloque la réplication de l'ADN des germes sensibles à cet agent antibactérien.

Les colonies présentant une pigmentation bleu-vert sont confirmées comme *Pseudomonas aeruginosa*.

Les autres types de colonie sont présumés *Pseudomonas aeruginosa* et doivent être confirmés.

4 FORMULE-TYPE

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

Pour 1 litre de milieu complet :

- Peptone pancréatique de gélatine	16,0 g
- Hydrolysate acide de caséine	10,0 g
- Glycérol	10,0 mL
- Sulfate de potassium.....	10,0 g
- Chlorure de magnésium.....	1,4 g
- Cétrimide	0,2 g
- Acide nalidixique	15,0 mg
- Agar agar bactériologique	11,0 g

pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25 °C : 7,1 ± 0,2.

Pour 48,6 g de base déshydratée BK165

- Peptone pancréatique de gélatine 16,0 g
- Hydrolysate acide de caséine 10,0 g
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Cétrimide 0,2 g
- Acide nalidixique 15,0 mg
- Agar agar bactériologique 11,0 g

Glycérol non fourni

Pour 1 litre de milieu pré-coulé (BM145)

- Peptone pancréatique de gélatine 16,0 g
- Hydrolysate acide de caséine 10,0 g
- **Glycérol** **10 mL**
- Sulfate de potassium 10,0 g
- Chlorure de magnésium 1,4 g
- Cétrimide 0,2 g
- Acide nalidixique 15,0 mg
- Agar agar bactériologique 11,0 g

5 PREPARATION

- Mettre en suspension 48,6 g de milieu déshydraté (BK165) dans 1 litre d'eau distillée ou déminéralisée.
- Ajouter 10 mL de glycérol.
- Porter lentement le milieu à ébullition sous agitation constante et l'y maintenir durant le temps nécessaire à sa dissolution.
- Répartir en tubes ou en flacons.
- Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
- Refroidir et maintenir à 44-47 °C.
- Couler en boîtes de Petri stériles (Ø 55 mm) de façon à obtenir une épaisseur de gélose de 5 mm.
- Laisser solidifier sur une surface froide.

✓ **Reconstitution :**
48,6 g/L
10 mL/L de glycérol

✓ **Stérilisation :**
15 min à 121 °C

6 MODE D'EMPLOI

- Ne pas sécher les boîtes.
- Filtrer stérilement sur membrane 0.45 µm un volume déterminé de l'échantillon à tester.
- A la surface des boîtes ainsi préparées ou du milieu pré-coulé (BM145, BM196) ramené préalablement à température ambiante, déposer la membrane en veillant à ce que le contact soit parfait.
- Incuber à 36 ± 2 °C pendant 22 ± 2 heures et 44 ± 4 heures.

✓ **Ensemencement :**
Par filtration

✓ **Incubation :**
22 h et 44 h à 36 ± 2 °C

7 LECTURE

Procéder au comptage des boîtes ne contenant pas plus de 150 colonies.

Les colonies produisant une pigmentation bleu vert (pyocyanine) seront comptées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés.

Sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* présumés :

- Les colonies ne produisant pas de pyocyanine, mais présentant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet à 360 nm.
- Les colonies montrant une pigmentation brun rougeâtre sans présenter de fluorescence.

Les colonies présumées devront être soumises à des tests de confirmation tels que production d'ammoniaque à partir d'acétamide, production d'oxydase, fluorescence sur milieu de King B.

Voir ANNEXE 1 : SUPPORT PHOTO.

8 CONTROLE QUALITE

Milieu déshydraté de base : poudre blanc-crème, fluide et homogène.

Milieu préparé (complet) : gélose blanchâtre.

Réponse culturale sur milieu complet après 44 heures d'incubation à 36 °C (NF EN ISO 11133) :

Microorganismes		Croissance (Rapport de productivité)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00024	$P_R \geq 70 \%$
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	WDCM 00026	$P_R \geq 70 \%$
<i>Escherichia coli</i>	WDCM 00013	Inhibée, score 0
<i>Enterococcus faecalis</i>	WDCM 00087	Inhibée, score 0

9 CONSERVATION

Milieu de base déshydraté (sans glycérol) : 2-30 °C.

Milieu pré-coulé en boîtes de Petri : 2-8 °C.

Les dates de péremption sont mentionnées sur les étiquettes.

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

Milieu complet 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 de base déshydraté (sans glycérol) :

Flacon de 500 g BK165HA

Milieu complet pré-coulé en boîtes de Petri (Ø 55 mm) :

Coffret de 20 boîtes BM14508

Coffret de 120 boîtes BM19608

11 REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

Lowbury, E.J.L., and Collins, A.G., 1955. The use of a new cetrinide product in a selective medium for *Pseudomonas aeruginosa*., J. Clin. Pathol., 8: 47.

Brown, V.I., and Lowbury, E.J.L. 1965. Use of an improved Cetrinide Agar Medium and other culture methods for *Pseudomonas aeruginosa*. J. Clin. Pathol.,18: 752.

Goto, S., and Enomoto S. 1970. Nalidixic acid cetrinide agar. A new selective plating medium for the selective isolation of *Pseudomonas aeruginosa*.

Arrêté du 19 juin 2000 (JO du 20 juillet 2000) modifiant l'arrêté du 14 octobre 1937 modifié relatif au contrôle des sources d'eaux minérales.

NF EN ISO 16266. Août 2008. Qualité de l'eau. Détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa*. Méthode par filtration sur membrane.

NF T90-421. Aout 2006. Qualité de l'eau. Examens bactériologiques des eaux de piscine.

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 : CN_FR_v8.

Date création : 10-2002.

Date de révision : 07-2017.

Motif de révision : Ajout référence BM19608.

Gélose CN pour *Pseudomonas*

Détection et dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa*.

Lecture :

Croissance obtenue après 44 heures d'incubation à 36 °C (filtration sur membrane).

