



Méthodes d'analyses microbiologiques des aliments

VHS : 30 H Travaux pratiques

Dr. CHERIF-ANNTAR Asmaa

asmaa.cherifanantar@univ-tlemcen.dz
cherifasma1@gmail.com



**Denrée
alimentaire**

Qualité

Pourquoi



Comment

**Contrôle
microbiologique**



Objectifs de la matière :

Maitrise des contrôles microbiologiques des produits alimentaires conformément à la réglementation algérienne

Contenu de la matière:

Méthodes d'investigations et techniques normées des contrôles microbiologiques des :

- Lait et produits laitiers.
- Viandes rouges et dérivés
- Viandes de volailles et dérivés
- Graisses végétales et animales
- Céréales et produits dérivés
- Boissons et jus de fruits et de légumes



Introduction :

Définition de la qualité

La notion du mot **qualité** est subjective, ainsi on a plusieurs définitions, qui sont soit repérées dans le langage courant ou dans les dictionnaires, soit données par les leaders de la qualité, soit employées par les entreprises, où bien d'autres mises par les organismes de normalisation telles que l'association française de normalisation (AFNOR), et l'organisation internationale de normalisation ou bien de standardisation (ISO)

C'est la valeur d'une chose (langage courant)

C'est le degré d'excellence possédé par un produit (dictionnaire)

C'est assurer la conformité d'un produit par rapport à ce qui a été prévu (entreprise)

C'est l'aptitude d'un produit à satisfaire ses utilisateurs (AFNOR)



Introduction :

Définition de la qualité alimentaire

La définition de la qualité alimentaire repose sur :

La notion **subjective** qu'est le ressenti du consommateur

La notion **objective**, basée elle sur l'expertise scientifique

Deux aspects de la qualité (**hygiénique et technologique**) font l'objet du contrôle microbiologique afin de garantir, au consommateur, des produits alimentaires sains et stables (salubrité et sécurité).



Introduction :

Définition de la qualité alimentaire



1

Qualité hygiénique

La qualité hygiénique d'un produit alimentaire est **l'absence de microorganismes pathogènes ou leurs toxines** susceptibles de nuire à la santé du consommateur.

La présence de tels microorganismes et de ses composés toxiques conduit à des maladies de type alimentaire.

Suivant la nature de microorganismes en cause, trois cas de maladie peuvent se présenter :

Introduction :

Définition de la qualité alimentaire

Infections alimentaires : Ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de **microorganismes altérants vivants** dans le produit alimentaire ou dans l'eau. C'est le cas par exemple des Entéropathogènes ou virus : *Salmonella enterica* (salmonellose), *Shigella* spp. (dysenterie bacillaire), *Yersinia enterocolitica* (yersiniose), *E. coli* entéropathogène, et infections virales.

Toxi-infections alimentaires : Ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de **microorganismes pathogènes vivants** dans le produit alimentaire et la sécrétion après ingestion d'une **toxine**. C'est le cas par exemple de : *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* (gastro-entérite) et *Vibrio cholerae* (choléra).



Ces deux derniers se manifestent par des diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et sont associés avec de la fièvre et des troubles apparaissant après une période moyenne à longue.

Introduction :

Définition de la qualité alimentaire

Intoxications alimentaires : ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité d'une **toxine** présente dans le produit alimentaire, le produit est dangereux à consommer, même si le microorganisme pathogène n'est plus vivant dans le produit. C'est le cas par exemple des *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (Botulisme), *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*.

Cette intoxication alimentaire se manifeste par des diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, signes neurologiques, mais elle est sans fièvre et les troubles apparaissent rapidement.



Le contrôle microbiologique de la qualité hygiénique vise à éviter la présence de microorganismes pathogènes dans le produit alimentaire afin de ne pas risquer sa qualité hygiénique, ou au moins de détecter ces microorganismes s'ils sont présents avant sa commercialisation.

Introduction :

Définition de la qualité alimentaire



2

Qualité technologique (marchande)

La qualité technologique (marchande) d'un produit alimentaire est l'aptitude de ce produit à la transformation et à la distribution. Étant donné que le consommateur n'est pas le seul utilisateur, or la qualité est la satisfaction de tous les utilisateurs (fabricant et distributeurs), le produit alimentaire doit être apte à survivre tout le long de la chaîne de distribution. L'altération de sa qualité marchande modifie ses caractéristiques plastiques et organoleptiques et le rend non commercialisable. Cette altération se produit :

Introduction :

Définition de la qualité alimentaire

- Lorsque la technologie mise en œuvre pour assurer la stabilité microbiologique du produit alimentaire est défectueuse. Exemple : développement des levures osmophiles (gonflement) dans un produit sucré à activité de l'eau faible, si cette dernière n'a pas été parfaitement maîtrisée.
- Lentement au cours du stockage.



Le contrôle microbiologique de la qualité technologique vise à détecter la présence de microorganismes pouvant altérer la qualité marchande de produit fini, et de vérifier l'efficacité de la technologie après leur application, afin de stocker et de commercialiser des produits alimentaires microbiologiquement stables.

Principe :



Principe des techniques utilisées pour le contrôle

Le principe est de déterminer pour chaque type d'aliment un groupe de bactéries à dénombrer ou à rechercher, en fonction des risques.

Pour chaque bactérie de ce groupe, on détermine un critère d'acceptation **quantitatif** ou **qualitatif**. Ensuite on applique ces critères pour interpréter les résultats et définir si la qualité du produit est satisfaisante ou non.

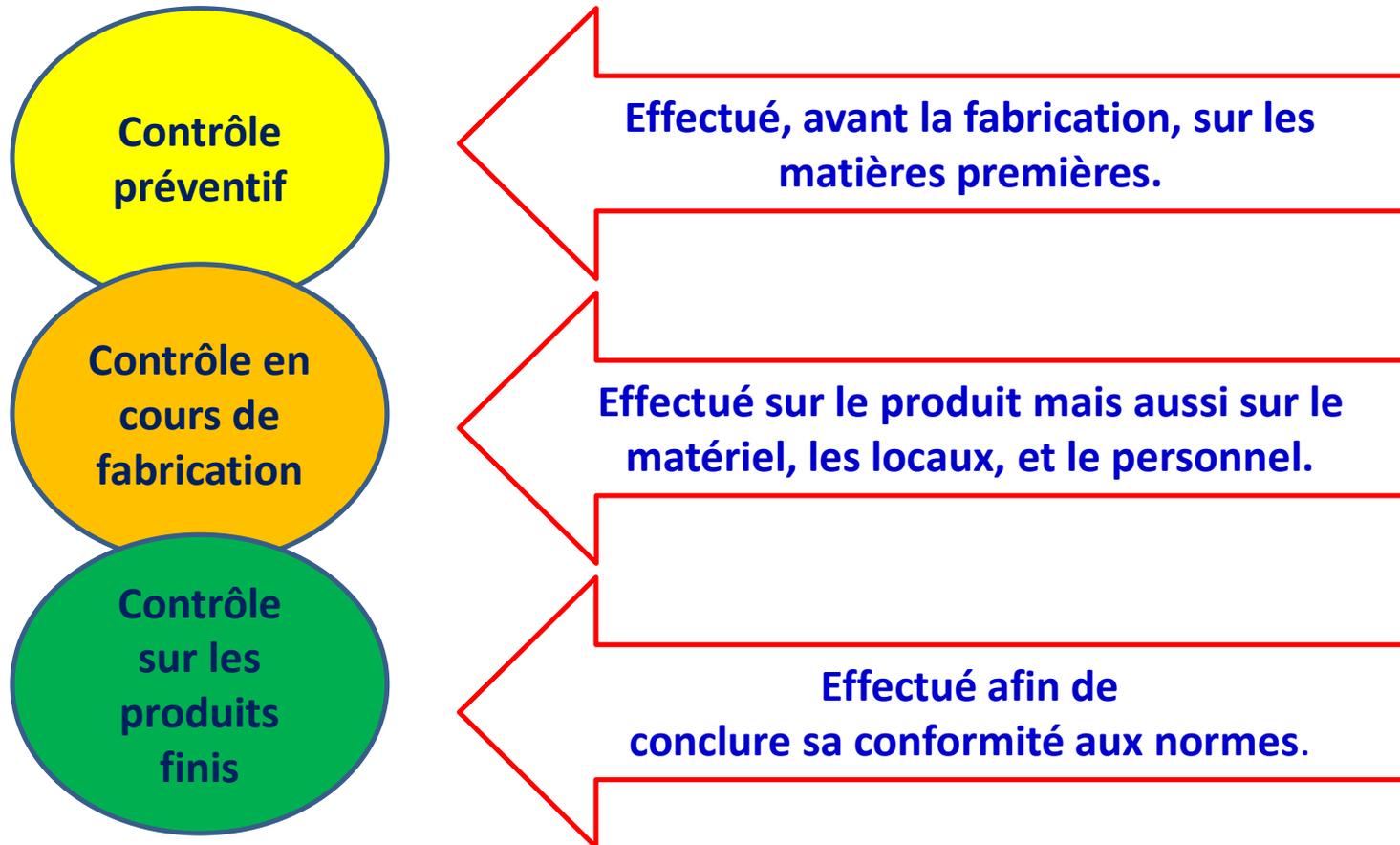
Les critères qualitatifs sont de la forme : absence ou présence de la bactérie dans le produit.

Les critères quantitatifs sont définis sous forme d'une valeur.

Le contrôle microbiologique :

Les niveaux du contrôle

On a **3** niveaux de contrôle : avant, en cours et après la fabrication du produit.



Le contrôle microbiologique :

La fréquence du contrôle

La fréquence de contrôle est établie sur la base de l'expérience et les moyens disponibles et en fonction de type de produit (type de fabrication), même selon le type d'usine (unité de production). Un contrôle répété permet de déterminer les points critiques.

Le contrôle microbiologique :



Les paramètres à contrôle

Les microorganismes à contrôler varient suivant la technologie et les caractéristiques physicochimiques du produit en cours de fabrication et du produit fini, mais cependant, on peut les répartir en deux groupes :

Microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique :

Bactéries pathogènes : *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *St. aureus*, Streptocoques fécaux, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus spp.*, *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*.

Bactéries témoins de contamination : *St. aureus* (témoin d'une contamination cutanéomuqueuse, Streptocoques fécaux, coliformes et coliformes fécaux (témoins d'une contamination fécale).

Microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande :

Levures dans les produits sucrés ou les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés, bactéries lactiques et acétiques dans les produits acides.

Définitions importantes :



Produit : la matière qu'on veut analyser.

Lot : l'ensemble d'individus d'un produit de caractéristiques uniformes.

Échantillon : Quantité de produit prélevé et représentatif d'un lot qui sera soumis à des essais en laboratoire. Un échantillon peut consister en une ou plusieurs unités d'échantillonnage.

Échantillon global : l'ensemble des unités d'échantillons prélevés du même lot.

Unité d'échantillonnage: Portion ou contenant individuel de produit prélevé au hasard dans un lot. Une unité d'échantillonnage peut correspondre à un échantillon (**5** unités pour l'analyse microbiologique, et **3** unités pour l'analyse physicochimique).

Définitions importantes :



Échantillon pour laboratoire : nombre réduit d'unités de l'échantillon global, de quantité représentative nécessaire pour analyse au laboratoire.

Non endommagé ou modifié : l'échantillon doit être gardé protégé contre toute contamination provenant de l'environnement, et même conservé dans des conditions réduisant toute modification du nombre de microorganismes présents.

Définitions importantes :



n : nombre d'unités constituant l'échantillon ;

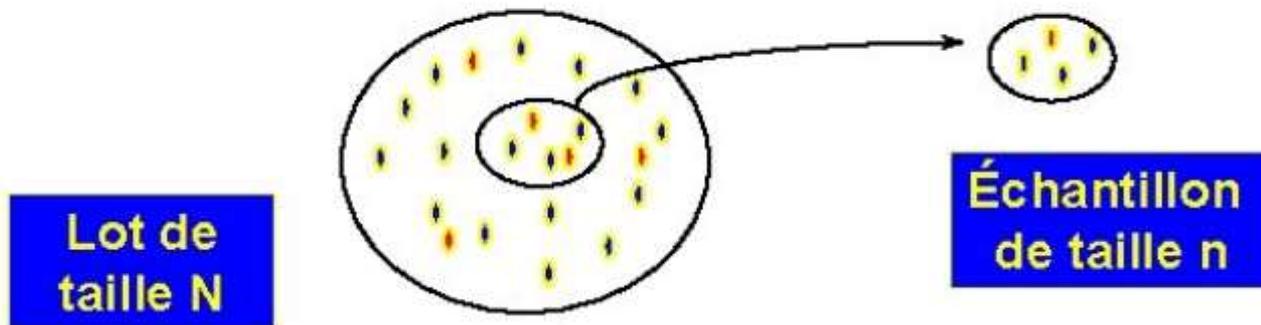
m : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante ;

M : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable ;

c : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté c'est-à-dire nombre d'unité d'échantillon donnant des valeurs situées entre m et M .

Définitions importantes :

Plan d'échantillonnage: Un plan d'échantillonnage définit le nombre d'individus dans l'échantillon et la règle de décision pour évaluer la conformité ou non du lot à la spécification = **C'est une procédure qui permet de déterminer si un lot doit être accepté ou rejeté.**

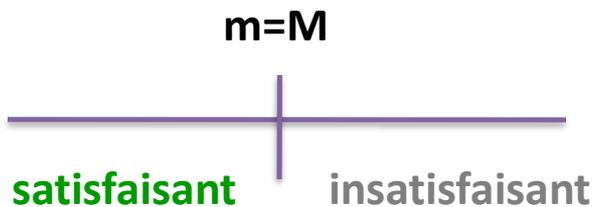


Définitions importantes :

L'échantillonnage microbiologique est exprimé en fonction de plans à deux classes ou à trois classes, selon le niveau de risque.

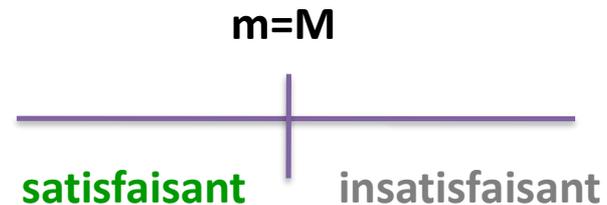
Les plans à 2 classes sont utilisés quand on ne tolère pas, dans les aliments, la présence d'une contamination microbienne.

Le plan à 3 classes est utilisé quand on tolère la présence d'un certain niveau de contamination.



Plan d'échantillonnage :

Plan d'échantillonnage à **2** classes :



Plan à 2 classes est fondé sur l'utilisation d'une seule valeur limite de référence ($m=M$) séparant la conformité de la non-conformité de produit vis-à-vis des normes. Pour ce plan, il faut noter que :

- ✓ Il n'y a pas de tolérance ;
- ✓ Résultat exprimé par absence ;
- ✓ **Résultat** $< m$: le résultat est considéré comme conforme (satisfaisant, propre à la consommation) ;
- ✓ **Résultat** $> m$: le résultat est considéré comme non conforme (non satisfaisant, inacceptable, impropre à la consommation) ;
- ✓ **c** sera noté par un zéro (0).

Plan d'échantillonnage :

Plan d'échantillonnage à **3** classes :



Plan à trois classes est fondé sur l'utilisation de 2 valeurs limites de référence (m et M), séparant la conformité de la qualité marginale tolérée, de la non-conformité. Pour ce plan, il faut noter que :

- ✓ **Résultat $\leq m$** : le résultat est considéré comme satisfaisant (satisfaisant, propre à la consommation) ;
- ✓ **Résultat compris entre m et M** : le résultat est toléré, il est de qualité médiocre (toujours acceptable, toujours propre à la consommation) ;
- ✓ **Résultat $\geq M$** : le résultat est considéré comme non satisfaisant (inacceptable, impropre à la consommation sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique). M sont fixés à :

$M=10 m$ \longrightarrow lors du dénombrement effectué en milieu **solide**

$M= 30 m$ \longrightarrow lors du dénombrement effectué en milieu **liquide**

Interprétation des résultats :

**interprétation des
résultats d'analyse**

conclusion sur la qualité des denrées
alimentaires, quant à leur acceptabilité
pour la santé des consommateurs,
conformément aux critères définis par la
réglementation



Interprétation des résultats :

Évaluation de la qualité microbiologique du lot contrôlé :

Les résultats des analyses microbiologiques de l'échantillon révèlent la qualité microbiologique du lot :

Qualité satisfaisante, si les résultats de **tous** les critères microbiologiques sont **satisfaisants** ;

Qualité non satisfaisante si, **au minimum**, un résultat sur un des critères microbiologiques est **non satisfaisant** ;

Qualité acceptable si, **au minimum**, un résultat sur un des critères est **acceptable**, aucun résultat n'étant par ailleurs, non satisfaisant ;

Le lot est considéré toxique si la limite est supérieure ou égal à 10^5 pour les bactéries : Anaérobies sulfite-réducteurs, staphylocoques à coagulase+ et *Bacillus cereus*.

Interprétation des résultats :

En cas de **non-conformité** à un critère



D'hygiène du procédé
de fabrication

De sécurité des
denrées

Mise en place de
mesures correctives

Informers les services
vétérinaires

Retirer le lot de produits
dont est issu l'échantillon

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

Il est important que le laboratoire d'analyse microbiologique reçoive un échantillon représentatif du lot de produit, non endommagé ou modifié lors du transport et du stockage.

Le prélèvement de l'échantillon global se fait d'une façon systématique ou aléatoire, à partir des endroits différents du lot. Le prélèvement de l'échantillon pour laboratoire est la dernière étape de l'échantillonnage, il est effectué à partir de l'échantillon global.

Cependant les produits ne sont pas toujours contenus dans leurs emballages, ils peuvent se présenter en vrac de nature solide ou liquide : le blé dans les silos ou dans des bateaux, l'huile dans les citernes.

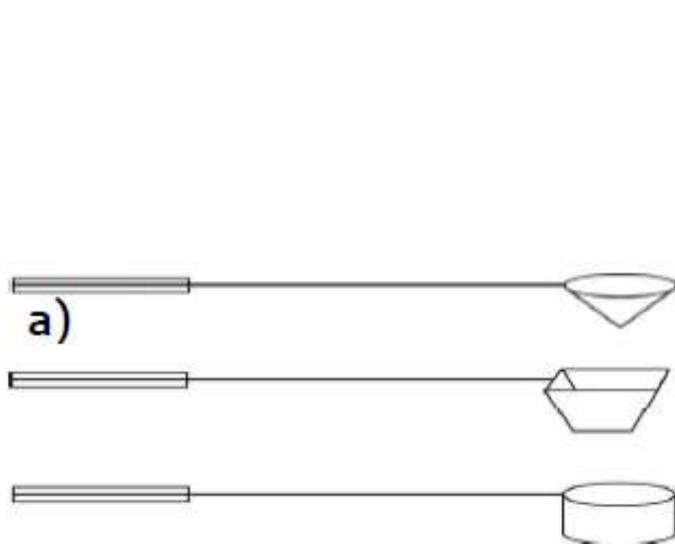


Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

1/Cas des aliments solides

Pour mieux expliquer la procédure d'échantillonnage des produits en vrac solide on prend l'exemple des grains, dont l'échantillonnage se fait avec le matériel suivant : grandes pelle (a), pelle à main (b), sonde cylindrique (c). Par exemple:

Prélèvement en bateau : se fait pendant l'opération de déchargement en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés.



Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

2/Cas des aliments liquides

La procédure d'échantillonnage des produits en vrac liquides se fait à l'aide d'un échantillonneur de fond (d) ou à soupape (e), à partir de :

Citernes (fixes, wagons, camions, navire) : se fait sur un produit homogène et à différents niveaux. Si, le produit n'est pas homogène, on doit réaliser des prélèvements, séparés par intervalle de temps, de haut en bas.



L'échantillonnage doit être effectué, aseptiquement, avec les mains propres, ou avec des gants propres en latex, en se servant des récipients propres et stériles ou des sachets stériles

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

3/Échantillonnage en surface

Dans certains cas, on réalise un échantillonnage en surface :

➤ En règle générale on met la surface à analyser en contact avec un diluant stérile, puis on prélève la suspension microbienne ;

➤ **Par écouvillonnage de la surface**, à l'aide d'un écouvillon (c) qui est ensuite mis en suspension dans un diluant stérile, ou directement étalé sur un milieu gélosé ;

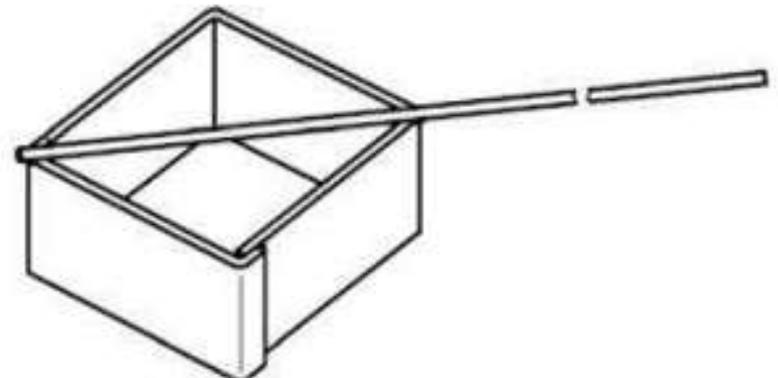
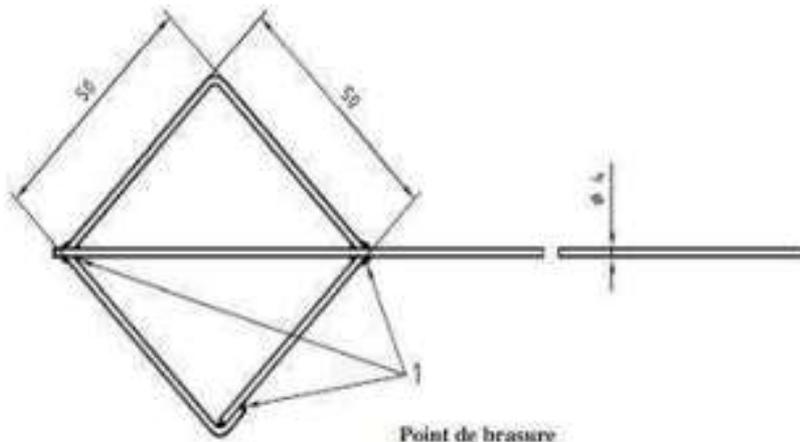
➤ **Au moyen de boîtes de contact (a)** ou lames d'immersion (b et d) remplies du milieu Gélosé, qui est pressée contre la surface à soumettre à l'essai.



Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

→ Exemple la viande

les échantillons sont prélevés avec ou sans cautériser la surface exposée . A l'aide d'un scalpel stérile, inciser le long des bords internes d'un gabarit (cadre métallique ou en plastique de dimensions appropriées permettant la délimitation de la surface à prélever). Utiliser ensuite des pinces stériles pour soulever la prise d'essai (la viande), découper la surface délimitée à une profondeur de 2 à 3 mm et placer les morceaux dans un sac en plastique ou un récipient stérile qui est ensuite soigneusement fermé et scellé.



Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

→ Exemple matière grasse (animale ou végétale)

- Peser 10g et placer dans un bain marie à 45°C jusqu'à ce que l'échantillon soit fondu,
- Ajouter 90ml de diluant (**dilution 1/10: dilution primaire ou suspension mère**),
- Mélanger et laisser séparer pendant 15 min au max,
- Si nécessaire pour séparer les 2 phases, placer l'échantillon dans un tube et centrifuger,
- Prélever stérilement la phase grasse (supérieure),
- Passer aux dilutions à partir de la phase aqueuse (**dilution décimale suivante**).

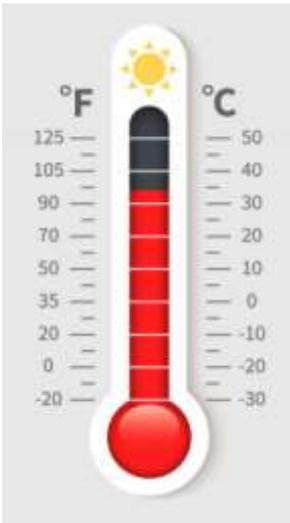


Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

→ Exemple le lait en poudre

- Mélanger soigneusement le contenu du récipient fermé en le secouant par inversion (Si son emballage d'origine est trop plein, transférer l'échantillon dans un récipient plus grand),
- Chauffer au bain marie 90 ml du diluant à 45°C,
- Peser 10 g et verser lentement dans la fiole (**dilution 1/10: dilution primaire ou suspension mère**),
- Tourner lentement pour hydrater la poudre puis agiter 25 fois/ 10sec ,
- Replacer la fiole dans le bain marie 5min et agiter de temps à autre,
- Prélever 10 ml par pipette stérile du lait reconstitué dans 90 ml de dilution (**dilution 1/100: dilution décimale suivante**)
- Agiter 25 fois,
- Passer aux dilutions.

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :



- ✓ Les échantillons doivent être identifiés clairement et intégralement
- ✓ Les échantillons doivent avoir un transport rapide et un stockage bref
- ✓ **Les températures suivantes sont recommandées durant le transport :**
 - **Produits stables : température ambiante (inférieure à 40 °C) ;**
 - **Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;**
 - **Autres produits non stables à température ambiante : de 1 °C à 8 °C.**

Les températures suivantes sont recommandées durant le stockage :

- **Produits stables : température ambiante (de 18 °C à 27 °C) ;**
- **Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;**
- **Autres produits non stables à température ambiante : 3 °C ± 2 °C.**

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons doivent être préparés en vue du contrôle microbiologique.

Pour l'échantillon liquide, il constitue la solution mère (SM) et si nécessaire des dilutions décimales sont réalisées dans un diluant stérile, et utilisées pour la recherche et le dénombrement de microorganismes selon les méthodes de dénombrement de(s) groupe(s) de microorganisme(s) à rechercher.

Quant à l'échantillon solide, celui-ci nécessite un broyage dans un diluant stérile à l'aide des broyeurs de laboratoire, cet ensemble (échantillon et diluant) constitue la dilution mère (DM), et si nécessaire d'autres dilutions décimales sont réalisées.

Dans les deux cas (solide et liquide) plusieurs rapports de dilution sont pratiqués (**25/225, 10/90, 5/45, 3/27, 1/9, 0.5/4,5**), dont le principe est le rapport **1/9**. Une partie de l'échantillon, neuf parties de diluant.

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et des dilutions décimales porte :

- Sur les parties superficielles et profondes, notamment pour les produits en tranches, hachés et les plats cuisinés à l'avance ;
- Sur la partie profonde après cautérisation de la surface du produit, notamment pour les viandes (pièces), les volailles (pièces), les produits carnés (pièces) et les poissons entiers ;
- Sur le produit homogénéisé ou sur les parties superficielles et profondes, selon la nature du produit liquide ou semi-liquide, notamment les produits laitiers.

Prélèvement, transport et préparation des échantillons :

Broyeur à main type mortier et pilon



Broyeur électrique type mortier et pilon



Broyeur à pédale type stomacher



Broyeur électrique type à couteaux

Diluants utilisés :

1

Diluants pour emploi général :

→ **Solution peptone – sel :**

1g peptone
8,5 g Chlorure de sodium (NaCl)
1l Eau

Dissoudre les composants dans l'eau, en chauffant, si nécessaire. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation. il soit de $7,0 \pm 0,1$ à 25°C .

→ **Solution de Ringer diluée au quart :**

2,25 g Chlorure de sodium (NaCl)
0,105 g Chlorure de potassium (KCl)
0,06 g Chlorure de calcium anhydre (CaCl_2)
0,05 Hydrogénocarbonate de sodium (NaHCO_3)
1l Eau

Dissoudre les sels dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $6,9 \pm 0,1$ à 25°C .

Diluants utilisés :

1

Diluants pour emploi général :

→ **Solution de peptone :**

1g peptone
1l Eau

Dissoudre la peptone dans l'eau.

Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit $7,0 \pm 0,1$ à 25°C .

→ **Solution tampon de phosphate :**

42,5 g Dihydrogénophosphate de potassium
(KH_2PO_4)
1l Eau

Dissoudre le sel dans 500 ml d'eau. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,2 \pm 0,1$ à 25°C , à l'aide d'une solution d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique à 1 mol/l.

Diluer à 1000 ml avec de l'eau. Conserver cette solution mère au réfrigérateur.

Avant emploi, ajouter 1 ml de cette solution mère

(à 20°C) à 1000 ml d'eau pour l'utiliser en tant que diluant.

Diluants utilisés :

2

Diluants pour emploi particulier :

→ **Solution de citrate de sodium** (pour fromage, fromage fondu et lait sec) :

{ 20,0g Citrate trisodique dihydraté ($\text{Na}_3\text{C}_6\text{H}_5\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)
1l Eau

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C. Ajuster le pH de sorte qu'après stérilisation, il soit de $7,5 \pm 0,1$ à 25°C.

Diluants utilisés :

2

Diluants pour emploi particulier :

→ **Solution de monohydrogéo-phosphate de potassium** (pour le fromage, le fromage fondu, la caséine acide, les poudres de caséine lactique, les caséinates, les poudres de lactosérum acides et les acides et la crème aigre):

{ 20,0g Monohydrogéo-phosphate de potassium (K₂HPO₄)
1l Eau

Dissoudre le sel dans l'eau en chauffant entre 45 °C et 50°C.

Ajuster le pH:

Pour la dilution primaire de la caséine acide, de la caséine lactique et de la poudre de lactosérum acide, le pH après stérilisation doit être de $8,4 \pm 0,1$ à 25°C.

Pour les caséinates, les fromages, les fromages fondus et la crème aigre, il doit être de $7,5 \pm 0,1$.

Diluants utilisés :

L'eau utilisée doit être de l'eau distillée avec un appareillage en verre, ou de l'eau déminéralisée. Elle doit être exempte de substances susceptibles d'inhiber la croissance des micro-organismes dans les conditions de l'essai.

Des solutions d'hydroxyde de sodium ou d'acide chlorhydrique (à 0,1 mol/l environ) doivent être utilisées pour ajuster le pH des diluants, sauf spécifications contraires.

Utiliser le diluant à température ambiante.

Pour présence/absence dans 0.1 g ou 0.1ml: pas de dilution.

Stériliser à l'autoclave à $121\text{ °C} \pm 1$ pendant 15 minutes (un temps plus long peut être nécessaire pour des volumes plus importants).

Conserver le diluant à l'obscurité entre 0 °C et 5 °C , pendant 1 mois au maximum dans des conditions évitant toute modification de son volume ou de sa composition.



Dilution et mode de calculs :

Définitions

suspension mère (première dilution)

Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser (ou de l'échantillon pour essai préparé à partir de ce produit) a été mélangée avec une quantité neuf fois égale de diluant.

Dilutions décimales suivantes

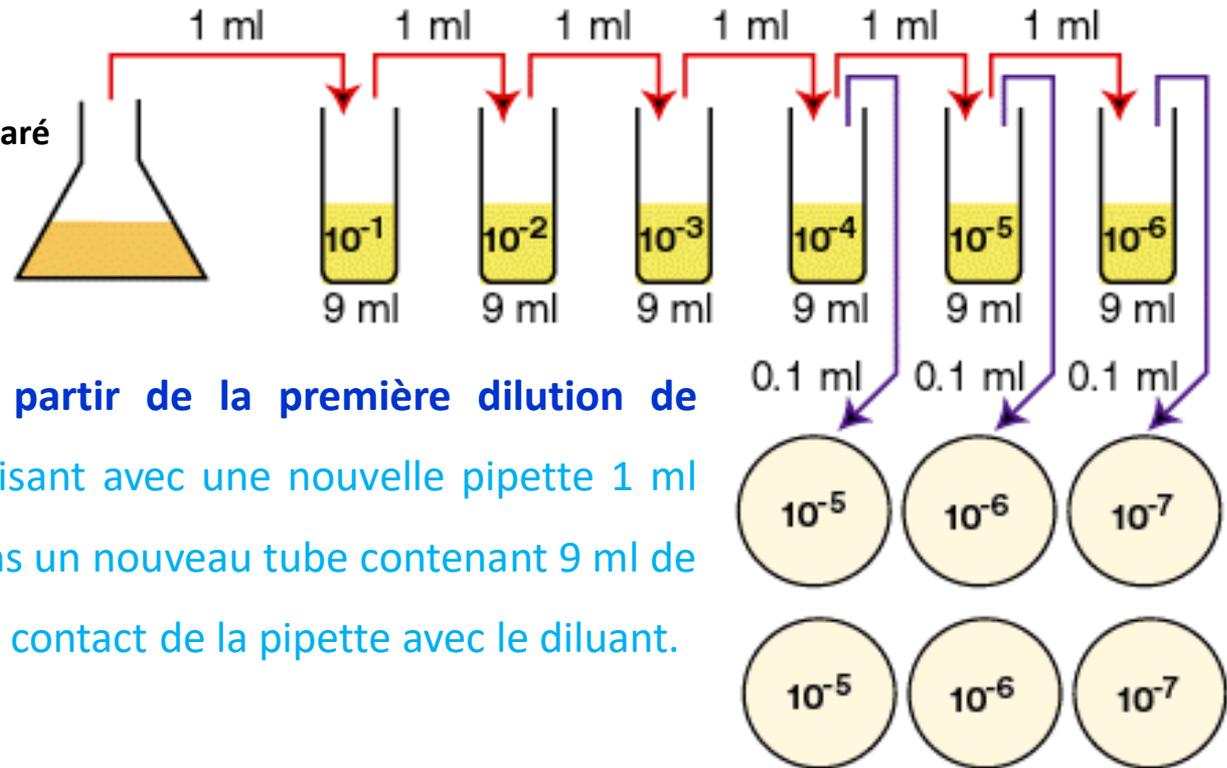
Suspensions ou solutions obtenues en mélangeant un volume mesuré de la suspension mère avec un volume neuf fois égal de diluant et en répétant cette opération sur les dilutions suivantes, jusqu'à obtention d'une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.



Dilution et mode de calculs :



Échantillon préparé
(1^{ère} dilution)



- **Préparer les dilutions à partir de la première dilution de l'échantillon :** en Introduisant avec une nouvelle pipette 1 ml de la dilution primaire dans un nouveau tube contenant 9 ml de diluant stérile en évitant le contact de la pipette avec le diluant.
- **Homogénéiser :** Mélanger soigneusement, soit par aspiration refoulement, 10 fois, avec une nouvelle pipette, soit en utilisant un agitateur mécanique (vortex) pendant 5 à 10 secondes pour obtenir la dilution 10^{-2} et ainsi de suite.

Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la dilution primaire et le mélange des dilutions et des milieux ne doit pas être supérieur à 15 min.

Dilution et mode de calculs :

But

Les dilutions décimales servent à réduire le nombre de micro-organismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des milieux liquides) ou d'observer les colonies (cas des boîtes de gélose).

Expression des résultats

- Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre **10** et **300**. Utiliser, si nécessaire, une loupe de grossissement.
- Mode de calcul :



$$\frac{\sum c}{(n1 + 0,1 n2) d}$$

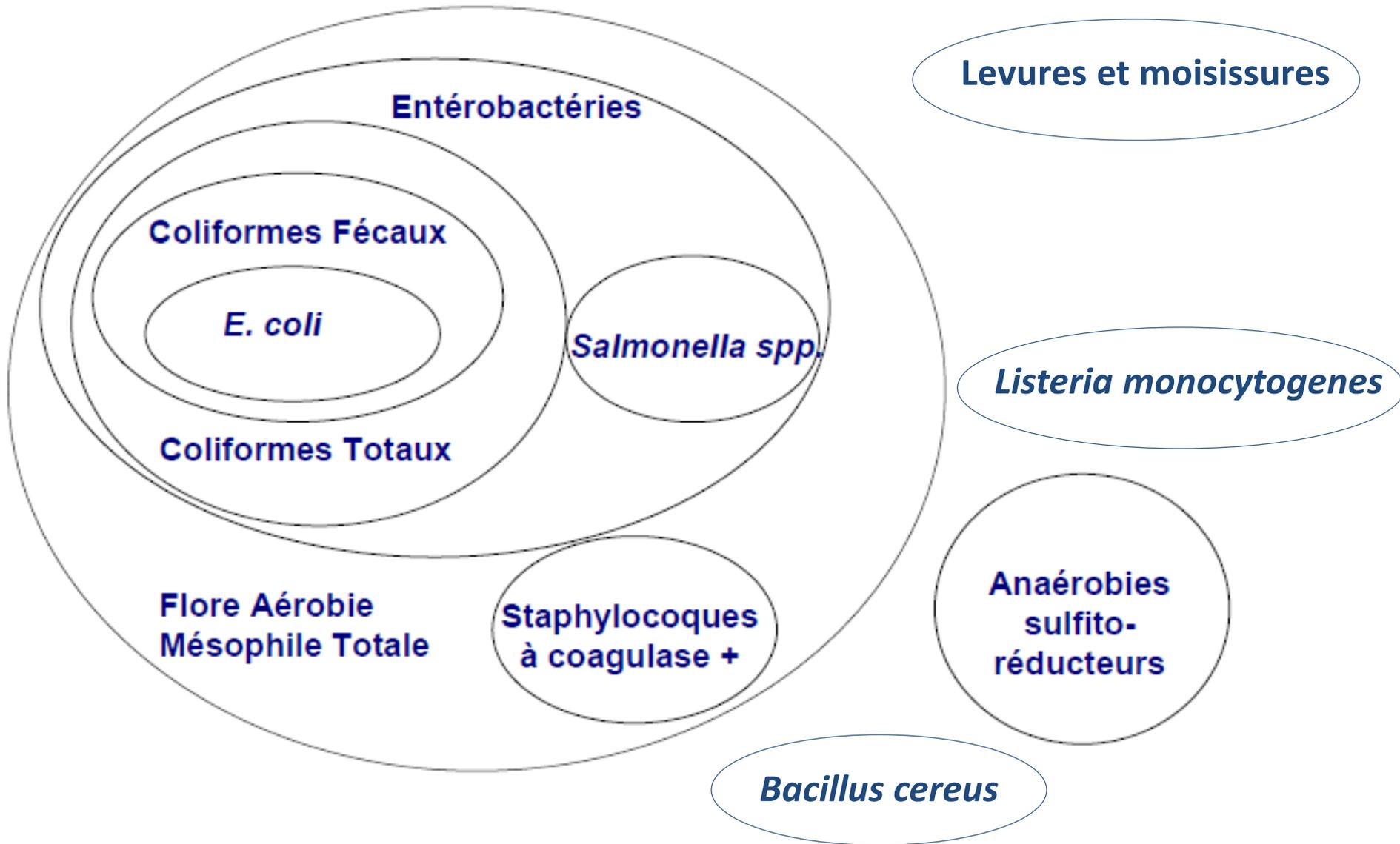
c : Somme totale des colonies comptées.

n1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Méthodes de recherche :



Méthodes de recherche :

1 Germes aérobies à 30°C :

- L'ensemble de microorganismes correspondant aux germes banaux de contamination.
- Ce sont de bons indicateurs de la qualité générale et de la stabilité des produits : ils donnent une indication de l'état de fraîcheur ou de la qualité sanitaire du produit et/ou sa décomposition (altération) qui permet de suivre son évolution au cours de sa transformation.
- L'ensemble des microorganismes aptes à se multiplier à l'air aux températures moyennes, plus précisément ceux dont la température optimale de croissance est située entre 25 et 40°C.



Des valeurs élevées n'indiquent pas nécessairement la présence de pathogènes, **MAIS** aussi des valeurs basses peuvent accompagner la présence de pathogènes à des niveaux dangereux.

Méthodes de recherche :

1 Germes aérobies à 30°C :

Origine : - Environnement. - Matières premières (mauvaises qualités, chaîne du froid non respectée). - Manipulations (nettoyage inefficace ou défaut de pasteurisation).

Intérêt d'analyse : - Ce sont des indicateurs de l'hygiène globale du process et de l'efficacité des techniques de conservation. - Signe de dégradation rapide de la denrée alimentaire (charge supérieure à 10^6 UFC/g).

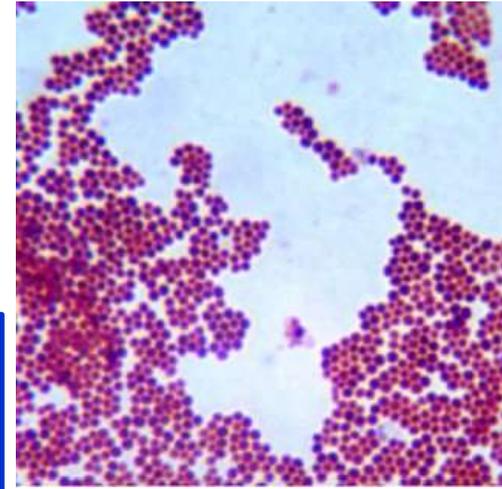
- 1 -Transférer en double 1 ml des dilutions dans des boîtes de Pétri stériles.
- 2 -Couler 12 à 15 ml de milieu Plate Count Agar (**PCA**), fondu au préalable et refroidi dans un bain d'eau à $45\text{ °C} \pm 0,5$ (le maintien dans le bain d'eau ne doit pas excéder 3h).
- 3 -Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et laisser solidifier et placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $30\text{ °C} \pm 1$ pendant $72\text{h} \pm 2\text{ h}$.

Méthodes de recherche :

2

Staphylocoques à coagulase + :

Staphylocoque aureus aussi appelé Staphylocoque doré est une bactérie pathogène pour l'homme, à Gram positif, catalase positif aéro-anaérobie facultatif qui se présente comme une coque, associée par groupes en amas (grappe de raisin). D'environ 1 micromètre de diamètre, la cellule bactérienne est immobile.



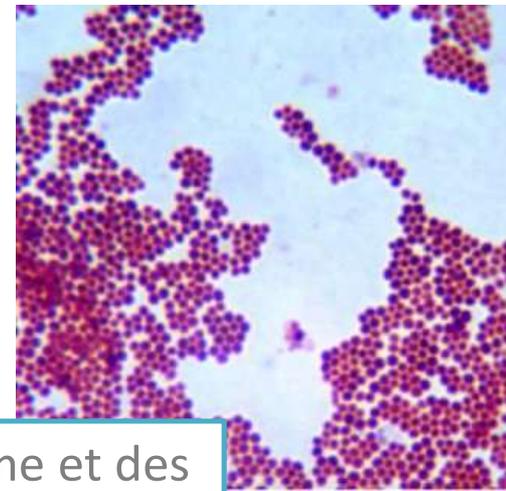
Ce microorganisme est fréquemment trouvé dans la muqueuse nasale, la bouche, la gorge et sur la peau d'individus sains, autant chez les humains que les animaux à sang chaud. Cette bactérie peut être disséminée facilement dans l'environnement et peut ainsi contaminer les aliments.

Les intoxications alimentaires sont en majorité causées par *S. aureus coagulase positive* qui produit une entérotoxine thermorésistante. Étant thermosensibles, elles sont généralement détruites au cours de la pasteurisation ou de la cuisson des aliments. Cependant, les entérotoxines sont thermostables et peuvent résister si elles ont été préalablement synthétisées dans l'aliment.

Méthodes de recherche :

2

Staphylocoques à coagulase + :



Origine : - Présente sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux. - Elles sont capables de se multiplier dans des salaisons, ou en surface de poissons salés. - Certaines espèces psychrotrophes se développent sur des aliments réfrigérés.

-Au moment de l'emploi, après fusion de la gélose **BAIRD PARKER**

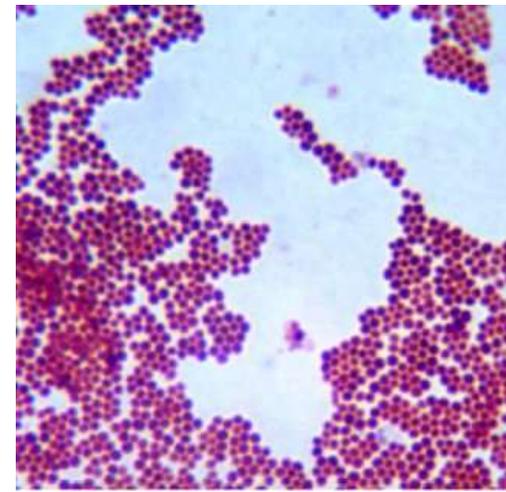
faire refroidir 90 ml dans un bain d'eau à 50° C et ajouter : 1 ml Solution aqueuse à 1 % de **tellurite de potassium** ; 5 ml Solution aqueuse à 20 % de **pyruvate de sodium** ; 5 ml **Émulsion de jaune d'œuf** à 20 %. Mélanger soigneusement entre chaque addition et couler le milieu.

-Laisser solidifier, puis sécher les boîtes dans une étuve entre 45° C et 53° C durant 30 min.

Méthodes de recherche :

2

Staphylocoques à coagulase + :



-Procéder à ensemencement de 1 ml de la prise d'essai dans les 30 min qui suivent la fin du séchage à l'aide d'un étaleur en verre stérile, étaler à la surface du milieu la totalité du volume.

-Attendre 15 min avant de placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ pendant 24 à 48 heures.

-Après l'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques des Staphylococcus : **Colonies noires, brillantes, convexes**, entourées d'une zone **transparente** qui peut être translucide.

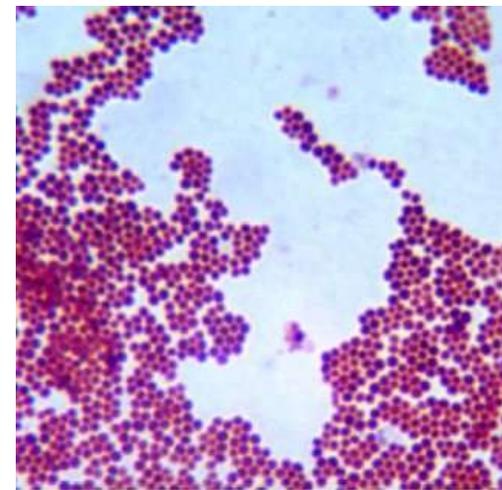
-Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de **250** colonies caractéristiques ,

-Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase un nombre maximum de cinq colonies caractéristiques .

Méthodes de recherche :

2

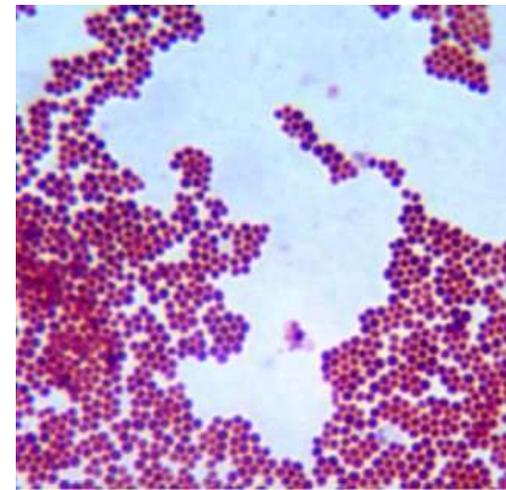
Staphylocoques à coagulase + :



Méthodes de recherche :

2

Staphylocoques à coagulase + :



Épreuve de la coagulase :

- Ensemencer la colonie dans un **bouillon cœur-cervelle (BHIB)** et incuber dans une étuve à 37° C durant 20 à 24 heures.
- Pour l'épreuve de la coagulase, utiliser un **plasma de lapin** 0,5 ml et 0,5 ml de la culture en BHIB,
- Incuber à 37 °C ± 1 °C et examiner les tubes à hémolyse en vue de la formation d'un coagulum, chaque heure pendant 4 h, puis après 24 h.
- L'épreuve est positive lorsque le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initial.

Expression des résultats :

Si au moins **80 %** des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies dénombrées correspond à *Staphylococcus aureus*.

Méthodes de recherche :

3

Enterobacteriaceae/Coliformes :

Entérobacteriaceae = Bacilles à Gram négatif, non exigeants asporulés, glucose+, oxydase-, nitrate réductase+, aéro-anaérobies facultatifs retrouvés partout dans le sol, dans l'eau, et surtout dans l'intestin (Entéro-) de l'homme et des animaux à sang chaud.



Coliformes = Bacilles à Gram négatif, oxydase-, aéro-anaérobie facultatifs, non sporulés présents dans l'intestin des animaux à sang chaud, mais elles sont aussi présentes dans les sols, sur les débris végétaux.

Ils fermentent le lactose avec production de gaz et d'acide: **Témoins de contamination fécale**. Leur présence dans les produits traités est un indicateur d'inefficacité du mode de stérilisation.

Les principaux genres appartenant aux coliformes sont :

• **Escherichia** • **Citrobacter** • **Klebsiella** • **Enterobacter**

Méthodes de recherche :

3

Enterobacteriaceae/Coliformes :

➔ **Coliformes totaux** : sont des entérobactéries fermentant le lactose à **30 °C** avec production de gaz.

➔ **Coliformes fécaux ou thermotolérants** : sont des entérobactéries fermentant le lactose à **44 °C** avec production de gaz.

➔ ***Escherichia coli*** : est une entérobactérie fermentant le lactose à **44 °C** avec production de gaz et **produisant de l'indole** à **44 °C**.

Méthodes de recherche :

3

Enterobacteriaceae :

Origine :

- Denrées souillées par des fèces : viande contaminée lors de l'éviscération ; légumes en contact avec du fumier, eaux souillées
- Les entérobactéries proviennent souvent des matières premières ou d'une contamination croisée durant la production.

Intérêt d'analyse :

- Indicateurs de contamination fécale (humaine ou animale).
- La présence d'entérobactéries laisse suspecter la présence possible de pathogènes alimentaires.

Méthodes de recherche :

3

Enterobacteriaceae :

- Procéder à ensemencement de 1 ml des dilutions dans les boites de pétri stériles.
- Couler 15ml du milieu gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre **VRBG** ou **MacConkey** fondu dans un bain marie puis refroidie à 45°C, homogénéiser et laisser se solidifier. Lorsque le milieu est solidifié, couler environ 4 ml de la même gélose (une couche protectrice de l'inoculum);
- Attendre 15 min avant de placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à **30° ± 1° C** pendant **24 h**.
- Après l'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques des Enterobacteriaceae entre **15** et **150** : Colonies roses rouges (glucose +), diamètre supérieur à 0.5 mm, avec ou sans zone transparente de précipitation de la bile.

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

Origine :

- Mauvaise hygiène du matériel : problème de nettoyage et désinfection des surfaces, mains...
- Contaminations croisées.
- Traitement thermique inefficace (par exemple : lait mal pasteurisé).

Intérêt d'analyse :

- E. coli* est le meilleur indicateur de contamination fécale.
- Sa présence est généralement associée à un manque d'hygiène du personnel, ou à une contamination croisée (par exemple : salade souillée par des matières fécales).

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

- Leur identification se fait par deux méthodes: milieu solides **VRBL** (gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) ou sur le milieu liquide **BLBVB** (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant).

1/Dénombrement sur VRBL:

- Transférer 1 ml des dilutions dans une boîte de pétrie stérile et couler par la suite environ 15 ml de gélose VRBL (Violet Red Bile Lactose);
 - Mélanger soigneusement le milieu et laisser le mélange se solidifier ;
 - Lorsque le milieu est solidifié, couler environ 4 ml de la même gélose (une couche protectrice de l'inoculum);
 - Laisser solidifier à nouveau et placer les boîtes de pétrie retournées dans une étuve à **30°C pour totaux, 44 °C pour thermotolérants** pendant 24h.
 - Les coliformes présentent des colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm.
- Les entérobactéries lactose-négatif sont incolores.



Gélose VRBL

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

Le principe :

La méthode du **NPP** ou le Nombre le Plus Probable est une méthode statistique pour connaître le nombre (le plus probable) de bactéries présentes dans 1ml de dilution.

Cette technique utilise plusieurs tubes par dilution (2,3,4 ou 5) et on compare les résultats à une table statistique : **la table de Mac Grady** qui donne le NPP sur la dilution considérée.

Il s'agit donc d'une interprétation probabiliste

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La technique :

- Réaliser une gamme de dilution du produit à analyser;
- Ensemencer 1 ml de chaque dilution dans plusieurs tube (2,3,4 ou 5) contenant 9 ml du milieu BLBVB avec cloche de Durham;
- Incuber les tubes à la températures adaptée :



30°C pour les coliformes totaux

44°C pour les coliformes fécaux (thermotolérants)

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

Si le tube est +



il y'a au moins 1 bactérie par ml de dilution

Si le tube est -

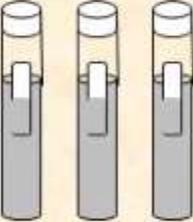
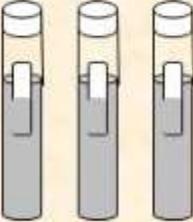
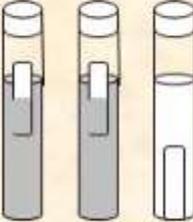
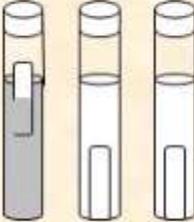
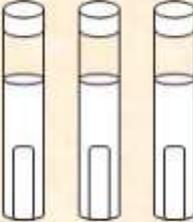


il y'a moins d'1 bactérie par ml de dilution

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

-Après incubation des tubes, noter dans un tableau pour chaque tube si le résultat est positif ou négatif:

Dilutions	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de résultats +					
Regroupement					

Méthodes de recherche :

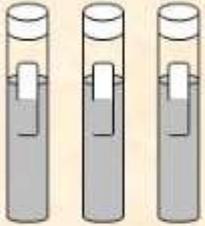
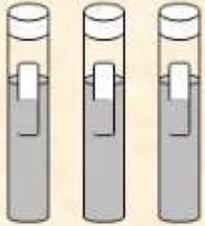
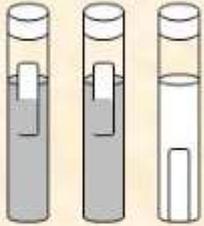
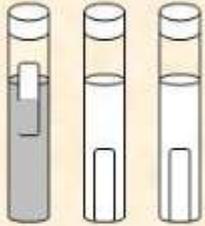
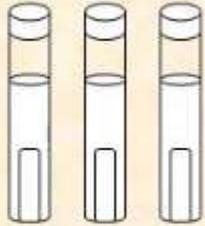
4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

-Grouper le nombre de résultats positifs par dilution:

Dilutions	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de résultats +	3	3	2	1	0
Regroupement					

Méthodes de recherche :

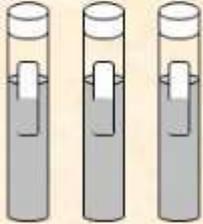
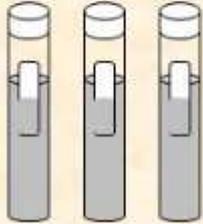
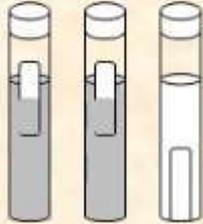
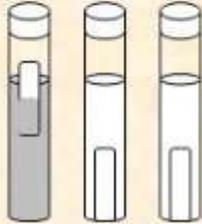
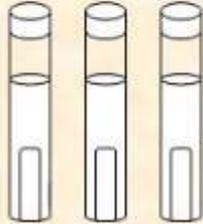
4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

-Regrouper en nombre de 3 chiffres la suite des chiffres obtenus :

Dilutions	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de résultats +	3	3	2	1	0
Regroupement	332	321	210	-	-

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

-Le choix de la dilution pour le calcul, on a 2 méthodes possibles :

Choisir la dilution qui possède le regroupement le plus grand tout en étant inférieur à :

220 pour la méthode à 2 tubes par dilution

330 pour la méthode à 3 tubes par dilution

440 pour la méthode à 4 tubes par dilution

Ou

Choisir la plus forte dilution contenant tous ces tubes positifs.

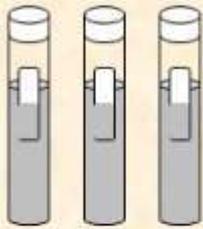
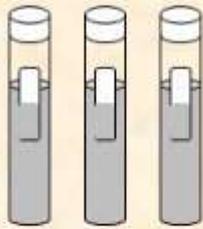
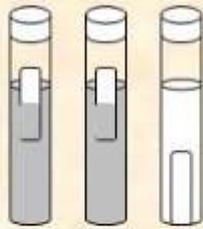
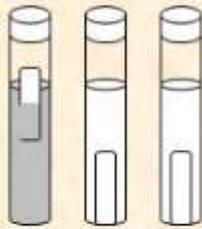
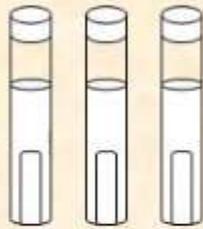
Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

Dilutions	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de résultats +	3	3	2	1	0
Regroupement	332	321	210	-	-



Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

La lecture :

-Lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady et on déduire la concentration des bactéries dans l'échantillon :

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP	Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	< 0,3	230	2,9
001	0,3	300	2,3
010	0,3	301	4
020	0,6	302	6
100	0,4	310	4
101	0,7	311	7
110	0,7	322	12
111	1,1	320	9
120	1,1	321	15
121	1,5	322	21
200	0,9	323	29
201	1,4	330	20
210	1,5	331	50
211	2,0	332	110
220	2,1	333	>110
221	2,8		

Méthodes de recherche :

4

Coliformes :

2/Dénombrement sur BLBVB :

L'interprétation du résultat :

-Le choix de la dilution 10^{-1} : donc $Fd = 10^1$

Détermination du NPP : regroupement choisi : **321** qui correspond à **15** dans la table de

Mac Grady:

Calcul:

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} \times Fd$$

$$N = 15/1 \cdot 10^1 = 150 \text{ UFT/ml}$$

Méthodes de recherche :

5

E.coli :

Le test de Mac Kenzie :

-A partir d'un tube BLBVB positif à 30 °C,ensemencé 2 tubes:

1 tube BLBVB

1 tube eau peptonnée

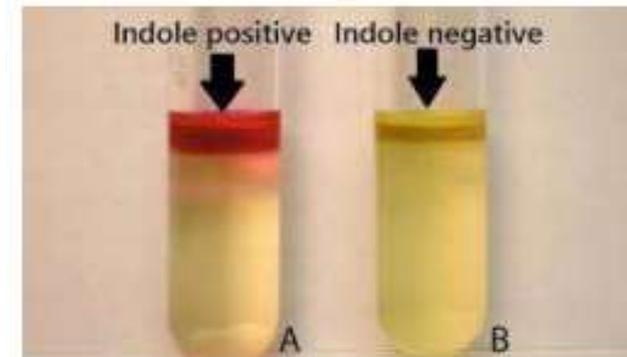
-Incuber à 44°C/48h



Lecture du résultat:

Tube 1 **BLBVB +** → Présence de Coliformes fécaux

Tube 2 **eau peptonnée** → addition de réactif de Kovacs

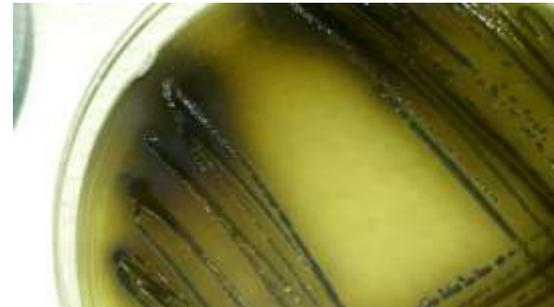
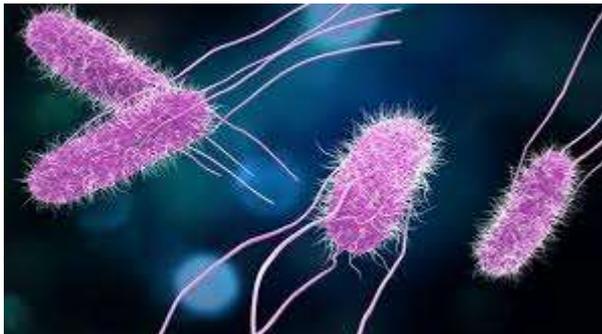


Méthodes de recherche :

6

Salmonella :

Elles forment un genre appartenant à la famille des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 μm de diamètre, pour 2 à 5 μm de longueur, des bacilles à Gram négatifs, mobiles pour la plupart (ciliature péritriche), aéro-anaérobies facultatifs, oxydase -, nitrate réductase +, fermente le glucose, lactose -, indole-, responsables de gastro-entérites, toxi-infections alimentaires et des fièvres typhoïde et paratyphoïde (*S. Typhi* et *S. Paratyphi*).



Salmonella on Bismuth Sulfate Agar

1 Pré-enrichissement en milieu non sélectif:

6 Salmonella :

Produits liquides: pas de pré-enrichissement: 50ml dans 225ml dans milieu d'enrichissement
Produit secs: 25g dans 225 ml EDS + 1 ml solution de vert brillant (0.5 g dans 100 ml eau)
Autres produits: 25g ou 25ml dans 225ml eau peptonnée tamponnée

Incubation à 37°C/18-24h

2 Enrichissement en milieux sélectifs liquides:

0.1ml de la culture + 10ml du bouillon
RVS (Rappaport-Vassiliadis avec Soja):
Incuber à 41,5 °C ± 1 °C/24 h ± 3 h

1ml de la culture + 10ml du bouillon **MKTTn**
(Muller-Kauffmann au Tétrathionate-
novobiocine): Incubation à 37 °C ± 1°C/24 h ± 3 h

3 Isolement et identification sur milieu sélectif solide:

Ensemencer la gélose **XLD** (gélose xylose
lysine désoxycholate): Incuber à 37°C/24 h

Ensemencer la gélose au **vert brillant** ou la
gélose **au sulfate de Bismuth**: Incubation à
37°C/20-24h

Examiner les boîtes et recherche de colonies typiques :

Sur la gélose au vert brillant et au rouge de phénol: colonies roses bordées de rouge

Sur la gélose au sulfate de bismuth : brunes ou noires métalliques et certaines sont vertes

Sur la gélose XLD:

Colonies typiques de Salmonella : centre noir entourées d'un halo clair transparent rouge.

Colonies atypiques susceptibles d'être Salmonella:

- Les Salmonella H₂S négatif (Salmonella Paratyphi A): roses avec un centre rose foncé
- Les Salmonella lactose positif : jaunes sans noircissement.



4

Confirmation :



A partir de chaque milieu sélectif, ensemencer 5 colonies typiques sur **Gélose nutritive**.

Incubation : 24 h ± 3 h à 37 °C ± 1 °C



Confirmation biochimiques :

TSI, Uréase, lysine décarboxylase, bêta-galactosidase, Réaction Voges Proskauer, indole

Confirmation sérologique

La recherche de la présence des antigènes «O», «Vi», ou «H» des Salmonella est effectuée par une agglutination sur lame avec les sérums appropriés à partir de colonies pures

Expression des résultats

→ TSI (Triple Sugar Iron)

TSI est un milieu de sulfate ferreux à triple sucre pour l'identification des bacilles entériques. Ensemencer le culot par pique centrale et la pente par stries et incuber à 37°C/24h

Culot

Culot jaune : Glucose + i.e fermentation du glucose (bactérie anaérobie facultative)

Culot rouge : Glucose – (pas de fermentation i.e bactérie aérobie)

Précipité insoluble noire : thiosulfate de sodium est réduit en sulfure d'hydrogène H_2S qui réagit avec les ions ferriques pour produire le sulfure de fer

Bulles ou fissures : formation de gaz à partir de la fermentation du glucose

Pente

Jaune : Lactose et/ou saccharose + (bactérie anaérobie facultative)

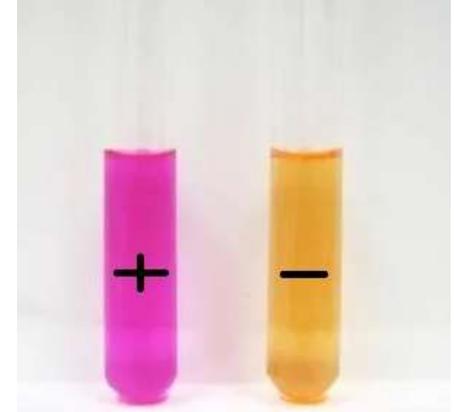
Rouge : Résultat - (pas de fermentation i.e bactérie aérobie)



→ Uréase

Le milieu Urée-indole permet la mise en évidence de l'**uréase**, la **tryptophane désaminase** et la production d'**indole**. Ensemencer une anse le milieu Urée-Indole. Incuber à 37°C/24h

Résultat + : le milieu vire au rouge i.e le milieu est devenu alcalin à cause de la transformation de l'urée en carbonate d'ammonium



Ajouter des gouttes du réactif de Kovacs au milieu après 24h d'incubation.

Résultats + : formation d'anneau rouge

Ajouter des gouttes de Ferric chloride solution au milieu après 24h d'incubation.

Résultats + : Coloration brun rouge

Résultat - : Coloration Jaune orangée



6

Salmonella :

→ Lysine décarboxylase (LDC)

Le milieu Lysine de Taylor permet la mise en évidence de **la LDC**. Ensemencer une anse le et incuber à 37°C/24h

Résultat LDC -: Le milieu est jaune.

Résultat LDC +: Le milieu est violet.



6

Salmonella :

→ Béta-Galactosidase

Le test **ONPG (O-Nitrophényl-β-D-galactopyranoside)** est utilisé pour détecter l'enzyme **β-galactosidase**, qui dégrade le lactose en glucose et galactose.

l'organisme est prélevé dans un milieu contenant une concentration élevée de lactose (comme TSI) et est inoculé dans le bouillon **ONPG**. Si l'organisme possède de la **bêta-galactosidase**, l'enzyme divisera la liaison bêta-galactoside, libérant de l'o-nitrophénol qui est un composé de couleur jaune. Cela indique un test positif.



6

Salmonella :

→ Réaction de Voges Proskauer

La **réaction Voges-Proskauer** est utilisée comme un test qualitatif pour distinguer entre les membres des *Enterobacteriaceae* sur la base de la capacité à produire de l'acétoïne comme produit de la fermentation à partir du glucose.

La réaction positive du test Voges-Proskauer est visible par une coloration rouge.

Ensemencer le milieu RMVP et incuber en aérobiose à 37°C pendant 24 h. Après l'incubation, ajouter 6 gouttes d'**alpha-naphtol** à 5 % et bien mélanger pour aérer. Ajouter 2 gouttes **d'hydroxyde de potassium** à 40 % et bien mélanger pour aérer.

Résultat + : Observer une couleur rose-rouge à la surface dans les 30 min.



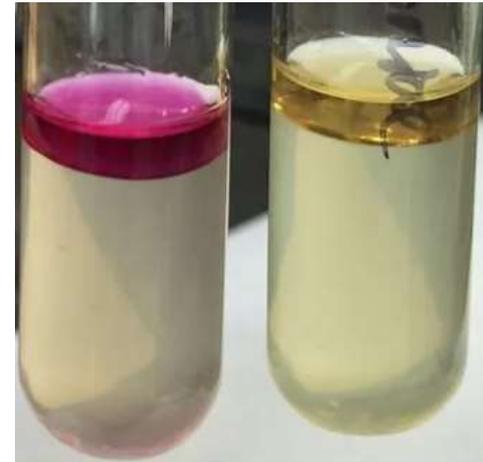
6

Salmonella :

→ Réaction de l'Indole

Le test recherche la capacité d'un organisme à dégrader le tryptophane et produire de l'**indole**, La production d'indole est mise en évidence par l'addition de réactif de **Kovac** qui agit avec l'indole en donnant une **coloration rouge**

Inoculer le bouillon tryptophane (ou peptone) avec l'organisme à tester et incuber à 37°C pendant 24 à 48h
Ajouter 0,5 ml (5 gouttes) de réactif de Kovác et agiter doucement
Examiner la couche supérieure de liquide après environ 1 min

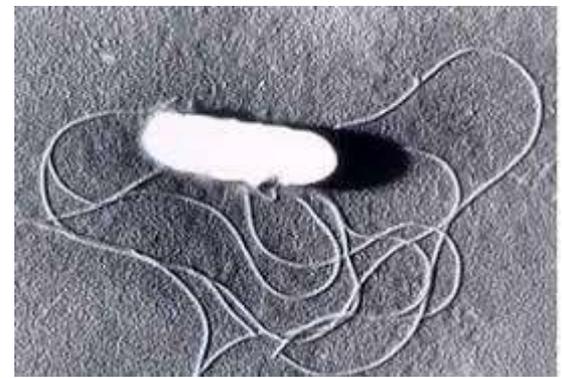


Interprétation des résultats

Essai	Souche de <i>Salmonella</i>							
	<i>S. Typhi</i>		<i>S. Paratyphi A</i>		<i>S. Paratyphi B</i>	<i>S. Paratyphi C</i>	Autres souches	
	Réaction	% ^a	Réaction	% ^a	Réaction	Réaction	Réaction	% ^a
Glucose, TSI (formation d'acide)	+	100	+	100	+	+	+	100
Glucose, TSI (formation gaz)	- ^b	0	+	100	+	+	+	92
Lactose, TSI (formation d'acide)	-	2	-	100	-	-	-	1
Saccharose, TSI (formation d'acide)	-	0	-	0	-	-	-	1
Sulfure d'hydrogène, TSI	+	97	-	10	+	+	+	92
Hydrolyse de l'urée	-	0	-	0	-	-	-	1
Décarboxylation de la lysine	+	98	-	0	+	+	+	95
Réaction à la β -galactosidase	-	0	-	0	-	-	-	2 ^c
Réaction de Voges-Proskauer	-	0	-	0	-	-	-	0
Recherche de l'indole	-	0	-	0	-	-	-	1

Méthodes de recherche :

7 *Listeria monocytogenes* :



Les bactéries du genre *Listeria* se présentent sous la forme de petits bacilles de forme régulière de 0,5 μm à 2 μm de long et de 0,4 μm à 0,5 μm de diamètre, à extrémité arrondie, à Gram positif, non sporulé, mobiles à 20-25°C, aéro-anaérobie facultatif. Elles peuvent être considérées comme des agents pathogènes alimentaires « parfaits » provoquant la listeriose. Elles sont présentes dans le sol, l'eau et les végétaux. Cette bactérie est capable de croître à 4°C (donc dans les denrées réfrigérées).



Intérêt d'analyse :

- Analyser pour assurer l'absence de *L.monocytogenes* dans tous les aliments où le pathogène pourrait se multiplier.
- Notification obligatoire en cas de résultat positif.

Enrichissement primaire: 25g ou 25ml dans 225ml de milieu **Fraser**



Incubation à 30°C/18-24h



Enrichissement secondaire et isolement primaire:

Enrichissement secondaire: 0.1ml de la culture sur Fraser dans 10ml du meme milieu

Isolement primaire: ensemencement par stries de la culture sur Fraser sur la gélose

Oxford ou **Palcam**



Incubation à 37°C/24-48h



Confirmation :

Isolement secondaire: ensemencement par stries la gélose Oxford ou Palcam à partir de l'enrichissement secondaire

Purification: sélectionner 3-5 colonies caractéristiques de Listeria (entourées par halo noir) et ensemencer la gélose **TSYEA** (Tryptone Soja Extrait de levure)



Incubation à 37°C/24 ou plus



Examen complémentaires:

Catalase (+), mobilité (mobile lent), Gram (+), hémolyse (+), type respiratoire (aéro-ana), esculine

Méthodes de recherche :

Se développant en conditions anaérobies

8

Bactéries sulfito-réductrices:

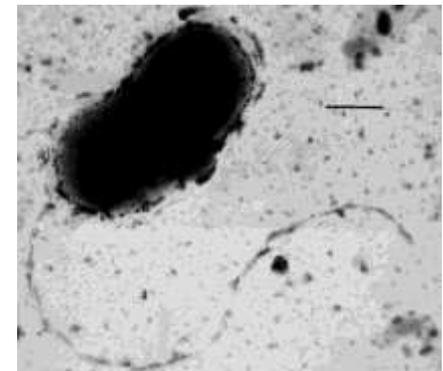
Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR) sont des bacilles à gram positives, anaérobies strictes et qui ont la capacité de réduire les sulfites en sulfures.

~~O₂~~

Dans ce groupe on retrouve principalement *Clostridium perfringens* mais également le groupe des *Clostridium botulinum* et d'autres germes capables de réduire les sulfites (certains *Bacillus* et *streptocoques*). Les *Clostridi* sont des germes pathogènes rencontrés en hygiène alimentaire.

Intérêt d'analyse :

- Des témoins de contamination de la qualité hygiénique des aliments.
- Elles ont la propriété de se transformer sous une forme résistante (**spore**) dans des conditions défavorables.
- Elles sont aussi un indicateur de l'efficacité d'un traitement thermique.



1g prise d'essai + 9g diluant (peptone-sel)

Suspension mère

Traitement thermique
pour éliminer les bactéries
végétatives afin d'obtenir le résultat
en nombre de spores de bactéries ou
en nombre de spores de Clostridia
Thermophiles : 75 °C/20 min

Dilution décimale

En cas de suspicion de
bactéries thermophiles

Ensemencement en masse

Gélose au sulfite de fer. Incubation à 50 °C ±
1 °C Pendant 24 h à 48 h

Ensemencement en masse

Gélose au sulfite de fer. Incubation à 37 °C
± 1 °C Pendant 24 h à 48 h.



Dénombrement de colonies caractéristiques

La couleur noire des colonies est due à la formation du
sulfure de fer (II) résultant de la réaction entre les ions
sulfurés et les ions trivalents ferriques [Fe (III)] présents
dans le milieu.



Méthodes de recherche :

8

Bactéries sulfito-réductrices:

Interprétation des résultats

Résultat donnant le nombre de bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies.



Essais de confirmation

- le pouvoir respiratoire
- la formation de spores



Résultat donnant le nombre de **Clostridia thermophiles.**



Résultat donnant le nombre de **Clostridia.**

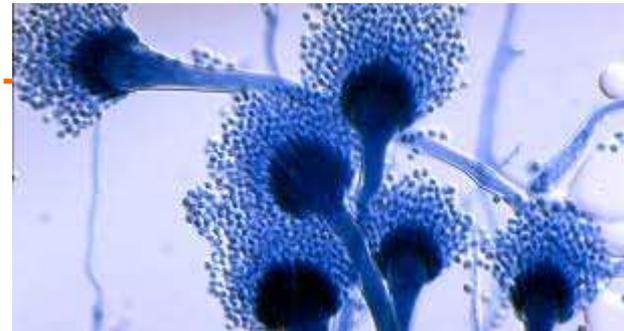
Méthodes de recherche :

9 *Levures et moisissures :*

Micro-organisme aérobie, mésophile qui, à 25° C sur un milieu gélosé se développe à la surface en formant des colonies avec un contour régulier et une surface plus au moins convexe.



Micro-organisme aérobie, mésophile filamentueux qui, à la surface d'un milieu gélosé développe habituellement des propagules ou des germes plats ou duveteux ou des colonies présentant souvent des fructifications colorées et des formes de sporulation.



Méthodes de recherche :

9 Levures et moisissures :

Micro-organismes capables de croître en conditions adverses (basse température, acidité, faible humidité). Certaines moisissures peuvent produire des mycotoxines cancérigènes. La « levure de bière » (*Saccharomyces cerevisiae*) est très utilisée en brasserie et en panification.

Intérêt d'analyse :

- Les levures et moisissures sont des agents importants d'altération. Elles dégradent : les **denrées fraîches** (fruits et légumes), **réfrigérées** (produits de viande, fromages), **sèches** (charcuteries) et même **acides** (jus de fruits).
- Les moisissures produisant des mycotoxines représentent un danger pour la santé du consommateur.

Méthodes de recherche :

9 *Levures et moisissures :*

Méthode appliquée aux denrées alimentaires destinées à la consommation humaine ou animale dont **l'activité d'eau est supérieure ou égale à 0.95**: œufs, viande, produits laitiers (sauf le lait en poudre), fruits, légumes, pâtes fraîches

Diluant

Il est possible d'ajouter au diluant « **Eau peptonnée à 0.1%** » des agents tensioactifs, par exemple **Tween 80 à 0,05 %** pour réduire l'agglutination des spores de moisissures et des conidies.

Ensemencement

Transférer 0.1 ml de la suspension mère à la surface de la gélose **DRBC (Dichloran rose bengale chloramphénicol)** et étaler l'inoculum sur la surface de la gélose avec un étaleur stérile

Méthodes de recherche :

9 Levures et moisissures :



En raison de la sédimentation rapide des spores dans la pipette, maintenir la pipette horizontale (et non verticale) lorsqu'elle est remplie du volume approprié de suspension. Agiter la suspension mère et les dilutions afin d'éviter la sédimentation de particules contenant des micro-organismes



Incubation

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées en aérobiose à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant **5 à 7 jours**. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un 1 à deux 2 jours.



Il est recommandé d'incuber les boites dans un sac plastique ouvert afin d'éviter la contamination de l'étuve en cas de dissémination des moisissures à l'extérieur des boites.

Méthodes de recherche :

9 *Levures et moisissures :*

Lecture des résultats

Lire les boîtes entre 2 et 5 jours d'incubation. Sélectionner les boîtes contenant moins de **150** colonies ou propagules. Si l'on observe un envahissement rapide des boîtes, retenir les comptages obtenus après 2 jours, puis de nouveau après 5 jours.

Le dénombrement des levures et en particulier des moisissures est imprécis du fait qu'elles consistent en un mélange de mycélium et de spores. Le nombre d'unité à l'origine de la formation de colonies dépend du degré de fragmentation du mycélium et de la proportion de spores capables de se développer sur le milieu.

Des comptages non linéaires à partir des dilutions se produisent souvent, c'est à dire qu'une dilution d'un facteur 10 ne aboutit généralement pas à une réduction d'un facteur 10 du nombre de colonies. Cela est dû à la fragmentation du mycélium et à la dispersion des spores pendant la dilution et à la compétition entre espèces.



Méthodes de recherche :

9 *Levures et moisissures :*

Méthode appliquée aux denrées alimentaires destinées à la consommation humaine ou animale dont **l'activité d'eau est inférieure ou égale à 0.95**: fruits secs, gâteaux, confitures, viande séchée, poisson salé, gains, céréales et produits à base de céréales, farines, noix, épices et condiments : **levures osmophiles et des moisissures xérophiles**

Diluant

L'utilisation d'un diluant **l'eau peptonnée à 0,1 %** comportant une quantité suffisante de soluté [par exemple une solution de **20 à 35 % de glycérol ou de D-glucose**] pour réduire le choc osmotique des moisissures xérophiles et des levures osmophiles

Ensemencement

Transférer 0.1 ml de la suspension mère à la surface de la **Gélose Dichloran à 18% de glycérol** et étaler l'inoculum sur la surface de la gélose avec un étaleur stérile

Méthodes de recherche :

9 *Levures et moisissures :*



Incubation

Les boîtes de Pétri sont ensuite incubées en aérobiose à $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant **5 à 7 jours**. Puis, si nécessaire, les boîtes de gélose sont laissées au repos à la lumière du jour pendant un 1 à deux 2 jours.



Lecture des résultats

Lire les boites entre 2 et 5 jours d'incubation. Sélectionner les boites contenant moins de **150** colonies ou propagules. Si l'on observe un envahissement rapide des boites, retenir les comptages obtenus après 2 jours, puis de nouveau après 5 jours.

Méthodes de recherche :

10

Pseudomonas spp.:

Les bactéries du genre *Pseudomonas* sont des bacilles à Gram négatif, oxydase + ; aérobies stricts ; glucose +. Généralement mobiles par ciliature polaire (monotriche ou lophotriche) ; Peu exigeantes, cultivant de 0 à 30 °C ; indole - ; asporulées avec des colonies souvent pigmentées.

Pseudomonas aeruginosa est l'espèce type du genre *Pseudomonas*.

Elles sont largement répandues dans l'environnement, vivent dans le sol et les eaux douces, salées.

Elles est présente chez l'homme ou l'animal au niveau des fosses nasales et dans l'intestin. Elles constituent, pour la plupart, une flore commensale. Certaines jouent un rôle pathogène l'Homme et l'animal (avec principalement *Pseudomonas aeruginosa*).



Méthodes de recherche :

10

Pseudomonas:

→ Transférer 0.1 ml de la suspension mère à la surface de la **Gélose au Cétrimide, au Fusidate de sodium et à la Céphalothine (CFC)** et étaler l'inoculum sur la surface de la gélose avec un étaleur stérile

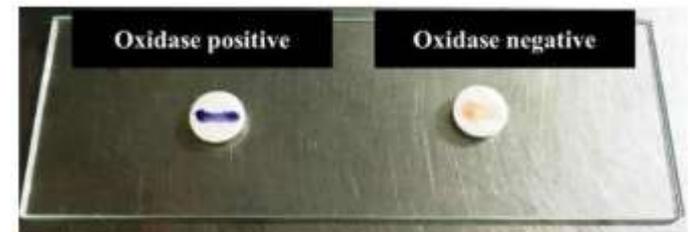
→ Incuber dans une étuve à **25 °C ± 1 °C** pendant **44 h ± 4 h** les boîtes de Pétri ainsi préparées dont leurs couvercles sont tournés vers le bas. Comptage se fait à partir des boîtes ne contenant pas plus de 150 colonies



Confirmation



Recherche de l'oxydase :



En présence d'oxydase, une couleur violette à pourpre apparaît dans les 5 s à 10 s. Si la couleur n'a pas viré après 30 s, l'essai est considéré comme négatif.

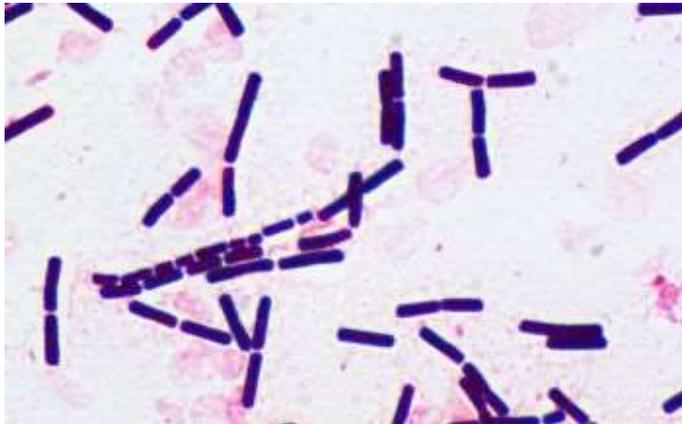
Méthodes de recherche :

12

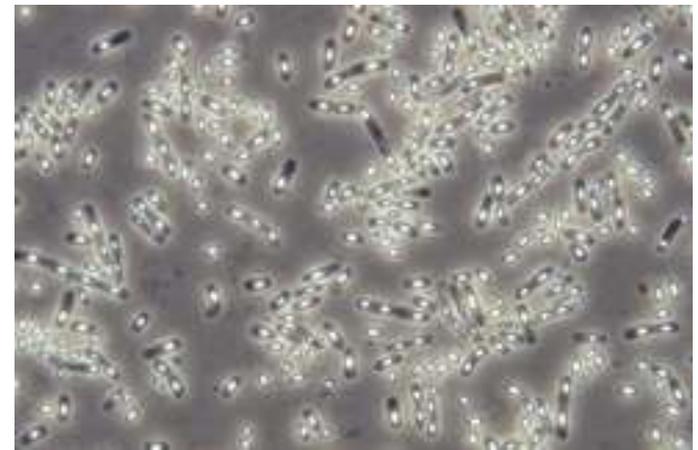
Bacillus cereus:

Ce sont des bactéries à Gram positif, aérobies ou anaérobies facultatives, mobiles, sporulantes, elle peut produire une ou plusieurs *toxines*. souvent incriminées dans les TIAC.

Le sol est la principale source de contamination des aliments crus par des spores de *B. cereus*. Le sol peut contenir entre **10³ et 10⁵** spores de *B. cereus* par **gramme**. Certains ingrédients des aliments complexes, tels que les



agents de texture, les œufs liquides, les herbes et les épices, ont été identifiés comme une source importante de contamination par les spores de *B. cereus*. Les spores peuvent survivre à des étapes de traitement intenses telles que la déshydratation et ensuite contaminer différentes denrées alimentaires par l'intermédiaire des ingrédients déshydratés.



Méthodes de recherche :

12

Bacillus cereus:

Ensemencement

Transférer 0.1 ml de la suspension mère à la surface de la **Gélose Mossel Mannitol egg-yolk polymyxine (MYP)** et étaler l'inoculum sur la surface de la gélose avec un étaleur stérile. Incuber à **30 °C** pendant **18 à 24 heures**. Si les colonies ne sont pas bien visibles, ré-incuber pendant 24 heures supplémentaires.

Lecture des résultats

Les colonies présumées de *Bacillus cereus* sont de couleur rose (mannitol-négatif) et presque toujours entourées d'un halo de précipité, indiquant la production de lécithinase. En général, elles mesurent de 2 à 5 mm, et présentent des bords « effilochés »

