



Département

Sciences et Technologies des Industries Alimentaires

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

CONTROLE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Professeur Jean-Louis CUQ

I. GENERALITES

Ce document contient des informations de “base” sur lesquelles les Ingénieurs des Industries agroalimentaires que vous serez très prochainement pourront s’appuyer pour “créer” et/ou “utiliser” un laboratoire d’analyses microbiologiques. Il devrait ainsi vous permettre de réaliser les différentes analyses et les divers contrôles indispensables à la maîtrise de la qualité des produits alimentaires mais aussi de la qualité hygiénique de l’environnement de production et de distribution.

A - INTERET DE LA BACTERIOLOGIE ALIMENTAIRE.

Le contrôle de la qualité microbiologique de nos aliments a été pendant longtemps limité aux contrôles des produits finis, le plus souvent par rapport à une norme. Ces analyses ont été souvent l’apanage de laboratoires spécialisés car il est bien connu que l’évaluation de la qualité hygiénique de nos denrées alimentaires nécessite beaucoup de matériel, un personnel qualifié et reste encore lourde, longue et coûteuse. En conséquence, cette évaluation est encore difficilement applicable à un nombre d’échantillons représentatifs d’un lot ou d’une production.

La maîtrise de **la qualité microbiologique** (*hygiénique* obligatoire et *marchande* souhaitée par le fabricant mais aussi le consommateur) passe par un ensemble de démarches qui vont du contrôle des matières premières brutes, en cours de transformation ou de l’aliment fini, aux pratiques de bonnes fabrications en passant par l’identification des principaux points critiques du système de production / distribution, le plus souvent par une démarche **HACCP**. Ces analyses prennent aujourd’hui largement place dans la plupart des usines et des réseaux de distribution et permettent, par la réalisation de contrôles judicieux, une bonne évaluation de la qualité et une mise en évidence d’éventuelles contaminations, les actions correctives qui en découlent sans pour autant trop alourdir les charges.

Dans ce contexte l’**analyse microbiologique traditionnelle des produits finis** reste encore indispensable car elle permet avec une certaine inertie d’éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation. Ce type de contrôle souvent pratiqué par des laboratoires officiels (DGCCRF: Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, Laboratoires des Services Vétérinaires, etc.) n’est pas préventif et ne permet pas de maîtriser la qualité microbiologique des produits fabriqués. Utilisé seul, il se révèle sans grand intérêt et souvent même inutile si sa mise en œuvre est longue et sans suite.

Le **contrôle en cours de production** doit permettre de déterminer les **points critiques**. Il faut donc choisir une méthode d’analyse qui permette, après interprétation, de réagir sur la fabrication en amont par un véritable “feed-back” quand un défaut d’origine microbienne est détecté. On comprend donc l’intérêt que portent les microbiologistes aux méthodes d’analyse rapides ou ultrarapides quand on sait que 24 heures à plus de quinze jours sont parfois indispensables pour obtenir des données quant à la qualité du produit ou de ses dérivés.

Les méthodes d’analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une **recherche** et/ou une **numération** des principaux germes microbiens rencontrés dans nos aliments afin d’en maîtriser leur présence ou absence (dans le cas de germes dangereux responsables de maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas de

germes peu dangereux, contaminants ou hôtes normaux des matières premières composant la denrée).

(ne jamais perdre de vue qu'il faut absolument garantir la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes dangereux ou éventuellement de métabolites toxiques ou de toxines microbiennes et assurer au produit une bonne qualité et une bonne conservation).

Au **plan sanitaire** la liste des bactéries "dangereuses" responsables de maladies après consommation d'aliments contaminés a tendance à s'accroître : aux *Salmonella* diverses, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* entérotoxigènes et *Clostridium perfringens* sont venus s'ajouter *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entéropathogènes ou encore des bactéries des genres *Streptococcus*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Brucella* etc.

Le contrôle microbiologique de routine d'un produit alimentaire solide ou liquide consiste le plus souvent, en absence d'information sur l'éventuelle implication de ce produit à une maladie infectieuse, une toxi-infection ou une intoxication, en :

- un **contrôle de stérilité** pour des produits soumis à des traitements antimicrobiens de stabilisation (température, additifs, etc.)

- une **estimation du nombre des contaminants** (flore aérobie mésophile totale, coliformes, anaérobies sulfito-réducteurs) ou leur détection - identification (*Salmonella*, *Listeria* etc).

Ce contrôle est actuellement long (plusieurs jours), ce qui implique souvent :

- de stocker le produit en attendant la réponse (impossible pour les produits très périssables)
- de diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.

B. LES RISQUES AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

Il est clair que les risques liés à la manipulation de microorganismes, dont l'identité et le pouvoir pathogène sont souvent inconnus dans les premières étapes de leur analyse doivent être parfaitement maîtrisés par des pratiques et un environnement **sans défaut**.

Il faut que le microbiologiste soit toujours conscient des risques liés à la manipulation de bactéries et à un degré moindre de levures et moisissures, en particulier après leur amplification nécessaire à leur étude. Rappelons qu'une colonie est constituée d'environ 10^9 à 10^{10} cellules et qu'une turbidité appréciable d'un milieu de culture liquide correspond à environ 10^8 cellules par ml.

La maîtrise du risque microbiologique passe par la parfaite connaissance :

- des germes manipulés ou recherchés
- des voies de "pénétration" de ces germes dans l'organisme
- des meilleures méthodes de manipulation pour minimiser ce risque.

Les microorganismes sont classés en 4 groupes en fonction des risques potentiels qu'ils représentent. Le **groupe 1** comprend des microorganismes peu dangereux pour le microbiologiste et son environnement. Le **groupe 2** correspond à des germes faisant courir des risques modérés aux manipulateurs et des risques limités à la communauté. Le **groupe 3** est constitué de microorganismes à haut risque pour le manipulateur et à risque modéré pour la communauté. Le **groupe 4** correspond à de microorganismes très dangereux pour le manipulateur et son environnement.

Les voies de l'infection sont essentiellement :

- **buccale** (ingestion) : pipetage, porté à la bouche des doigts ou d'objets contaminés comme des cigarettes, des stylos, des aliments etc. Ce type de contamination résulte d'un travail "aseptique" incorrect ou encore de projections, renversements ou actions diverses non contrôlés.
- **aérienne** (trachée artère, poumons) par des aérosols (particules liquides ou non en suspension dans l'air et porteuses de germes). Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques (homogénéisateur, centrifugeuse, etc.) et leur pouvoir de contamination est très grand.

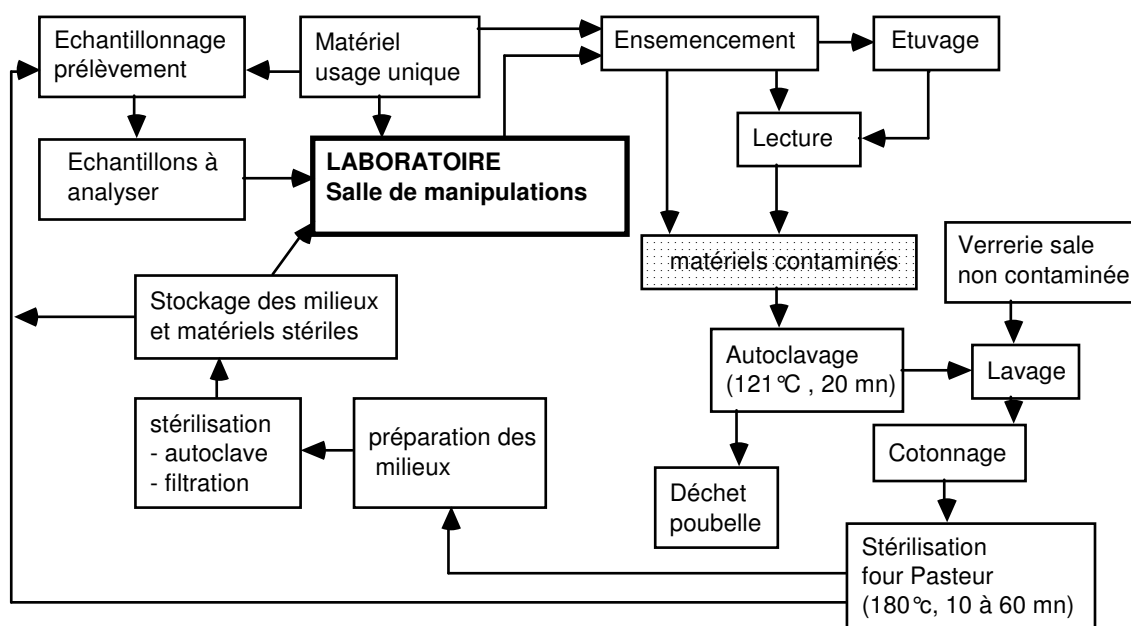
- par **contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou encore *Pseudomonas* par exemple) ou au niveau de muqueuses ou d'organes comme les yeux.
- par **pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au niveau d'une plaie).

C - LE LABORATOIRE

Le laboratoire d'analyse microbiologique doit être à même de réaliser des analyses de routine (contrôle de qualité par rapport à une norme, évaluation de la qualité des matières premières), mais aussi de permettre l'évaluation de la qualité des opérations de transformation ou de préparation, la recherche et maîtrise des éventuels points critiques (HACCP), l'évaluation de l'efficacité des traitements antimicrobiens de conservation, d'emballage ou de nettoyage etc. Les microorganismes susceptibles d'être rencontrés appartiennent pour la plupart aux groupes 1, 2 et éventuellement 3. Ceci impose donc des règles fondamentales de conception et de fonctionnement du laboratoire d'analyse microbiologique.

Le laboratoire doit être composé de trois parties principales :

- le laboratoire proprement dit où sont réalisées les analyses
- la salle de préparation des milieux de culture
- la laverie qui traite les produits et matériels utilisés pour l'analyse et qui fournit la verrerie et le matériel propre et stérile. La laverie et la salle de préparation peuvent ne constituer qu'une seule pièce.



Le laboratoire d'analyse doit disposer :

- d'un espace suffisant avec une circulation limitée. Deux ou trois parties sont souhaitables mais non nécessaires.
- de murs, plafonds et sol lisses mais non glissants, non absorbants, faciles à nettoyer et à désinfecter.
- d'un éclairage naturel ou artificiel de bonne qualité. Les fenêtres coulissantes avec montants aluminium équipées de volets roulants conviennent bien.

- de plans de travail lisses et résistants.

- de lampes UV disposées au plafond et équipées d'une minuterie au moins dans la salle de travail.

Le plan présenté sur la figure 1 est une proposition type de conception du laboratoire. Il ne faut pas perdre de vue que le bon fonctionnement du laboratoire requiert, en particulier aux niveaux des manipulations, des personnels qualifiés. Propreté et règles d'hygiène strictes doivent y régner.

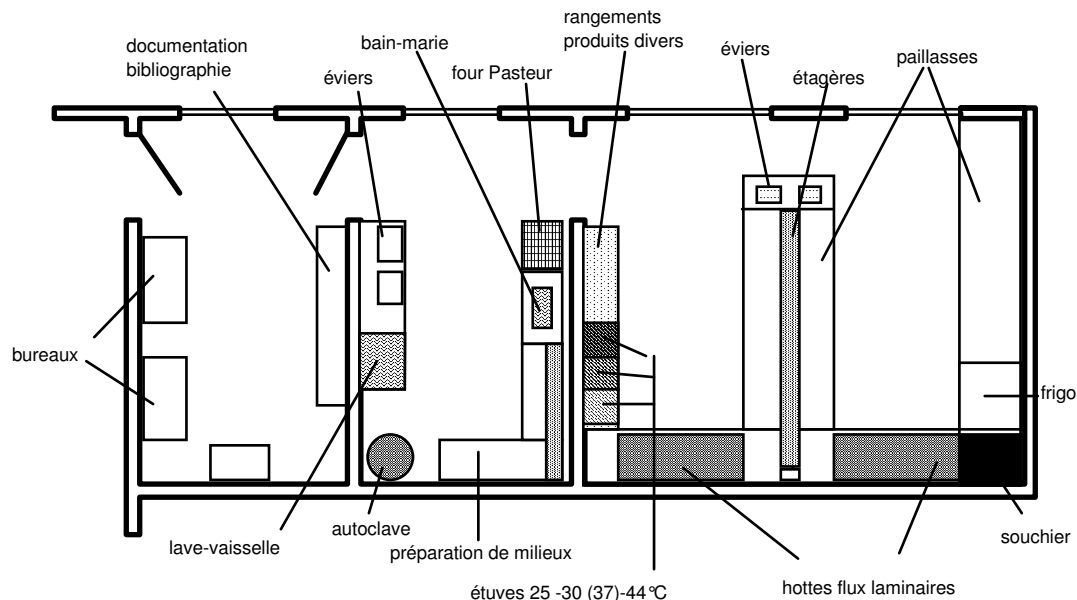


figure 1 . Schéma type d'un laboratoire d'analyse microbiologique

D. MATERIEL D'EQUIPEMENT DU LABORATOIRE D'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

L'équipement d'un laboratoire de microbiologie alimentaire diffère peu de celui d'un laboratoire de bactériologie médicale. Il faut disposer ainsi d'une réserve de produits chimiques les plus courants et de milieux ou de composants de milieux de culture (*deshydratés si possible*) et de colorants. En microbiologie alimentaire, la fréquence des études quantitatives et qualitatives et leur variété font qu'il est nécessaire de disposer d'un nombre élevé de milieux de culture et de matériels divers (tubes à essai, erlenmeyers, boîtes de Pétri, pipettes, etc).

Il est indispensable de disposer d'un certain nombre d'équipements et de matériels tels que :

D. 1 . Systèmes de stérilisation / désinfection et zones stériles:

1) L'*autoclave* vertical ou horizontal pour la stérilisation en milieu vapeur des milieux, des "déchets" est indispensable. La « stérilisation » est généralement réalisée à 115 ou 120 °C pendant 10 à 30 minutes.

2) Le *four Pasteur* permet la stérilisation à sec du matériel en verre ou en métal et doit pouvoir atteindre une température de 170 - 180°C.

3) Les *système de micro ou ultra filtration à membrane* sont utilisés pour les milieux de culture liquides non autoclavables et pour l'analyse e liquides (eau par exemple).

4) Les **lampes UV** germicides munies d’une minuterie et installées dans la pièce principale de manipulation ainsi que dans les hottes à flux laminaire. Leur effet sur un germe donné est fonction de la puissance de la lampe, de la longueur d’onde du rayonnement UV, de la distance et du temps d’irradiation. Elles sont efficaces sur les « zones éclairées ». Il est essentiel de se protéger vis-à-vis d’une exposition directe, la muqueuse oculaire étant particulièrement sensible.

5) Les **réipients contenant par exemple de l’hypochlorite de sodium** pour recueillir les matériels souillés tels que lames états frais, les pipettes, les cônes à usage unique etc. La récupération des milieux contaminés après lecture peut se faire dans des sacs en polypropylène qui ne seront éliminés qu’après autoclavage.

6) Les **zones de travail** sont situées dans la zone de protection de **becs Bunsen** avec déclenchement par bouton “à pied” et/ou dans des **hottes à flux laminaire** qui selon leur fonctionnement “protègent” avec efficacité soit le produit (figure 2), soit l’opérateur (figure 3), soit les deux (figure 4), ces hottes étant classées en trois catégories en fonction de leur fonctionnement. Elles sont utilisées pour la distribution aseptique des milieux et le remplissage de boîtes de Pétri. Un flux d’air stérilisé par filtration est dirigé sur la zone de travail soit horizontalement, soit verticalement avec ou non un recyclage. Il ne s’agit pas de zones de sécurité et les hottes de classe I ne peuvent pas être employées seules pour les manipulations des microorganismes ; dans ce cas, le travail stérile est réalisé dans la zone de protection d’un bec de gaz, ce dernier présentant néanmoins l’inconvénient de perturber le flux d’air dans le système.

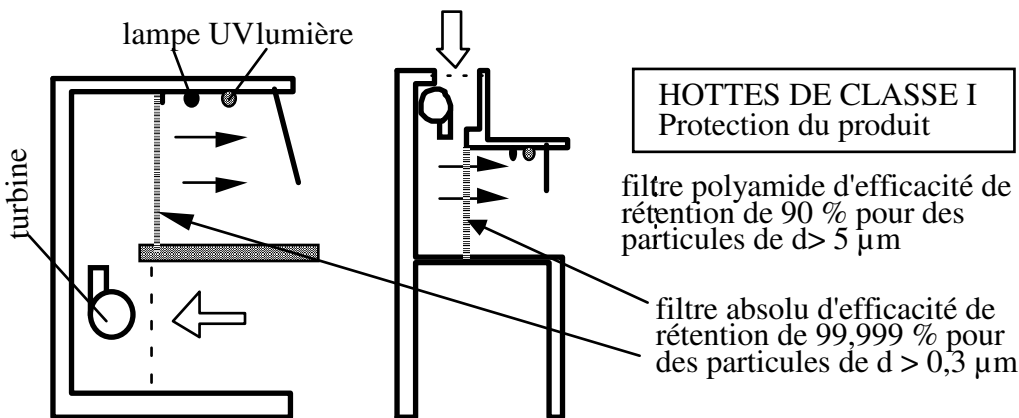


figure 2 . Hottes à flux laminaire horizontal de classe I avec protection du produit

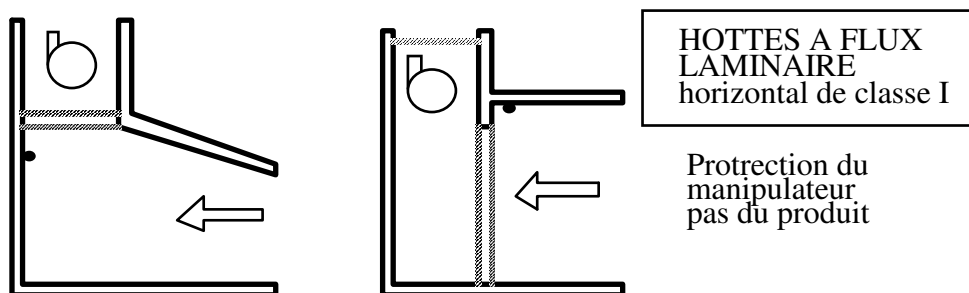


figure 3 . Hottes à flux laminaire horizontal de classe I avec protection du manipulateur

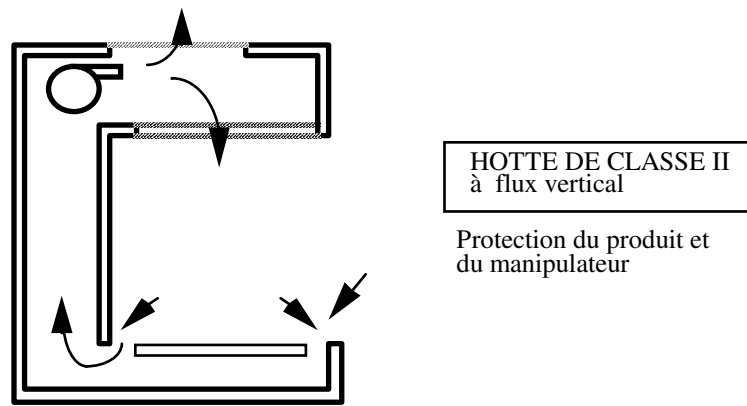
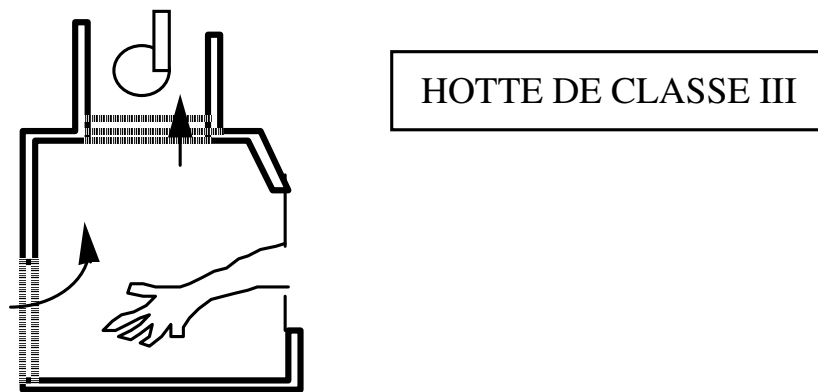


figure 4 . Hotte à flux laminaire vertical de classe II avec protection du manipulateur et du produit

Les hottes de classe III protègent avec une très grande efficacité produit et manipulateur mais restent d’une utilisation difficile. Il s’agit en fait de boîtes à gants étanches et stériles (figure 5).



igure 5. Hotte à flux laminaire de classe III

Dans ces hottes la vitesse linéaire de l’air est voisine de 0,25 à 1 m.sec⁻¹. La décontamination de ces hottes doit être effectuée quotidiennement (surface de travail et côtés). **Le formol est certainement le meilleur désinfectant car il assure la stérilisation la plus “homogène”**; les phénols laissent des résidus, ” et l’hypochlorite est très corrosif. L’étanchéité de la hotte doit être contrôlée ainsi que l’intégralité du filtre stérilisant HEPA. Si ce dernier filtre doit être changé, il faut le faire “aseptiquement” et placer immédiatement le filtre dans un emballage en polypropylène étanche.

« **Fabrication du formol** »

Le **formol** peut être généré par ébullition d’une solution de formaldéhyde à 40 %. Sa concentration désinfectante optimale est de 50 mg.m⁻³ qui sont par exemple obtenus par ébullition de 25 ml de formol à 40 % dans une hotte de 0,35 m³.Le formol peut aussi être généré à partir du chauffage à sec de paraformaldéhyde (3 g par hotte) ou par addition de 6 g de permanganate de potassium à 25 ml de formol à 40 % à température ambiante. Il est également possible de générer la quantité de formol nécessaire à la stérilisation de la hotte par mélange de 4 g de paraformaldéhyde, 8 g de permanganate de potassium et 10 ml d’eau. La durée de ce type de traitement doit être d’une dizaine d’heures et le système de ventilation mis en marche au moins une demi-heure avant réutilisation.

D . 2 . Matériels d'incubation et de préparation des milieux

Il faut disposer d'*étuves* bactériologiques qui doivent pouvoir être réglées avec précision entre 25 et 55°C. Trois températures d'étuvage sont généralement utilisées en microbiologie alimentaire.

Deux *jarres anaérobies* et leur nécessaire de contrôle de l'atmosphère (catalyseur, générateur d'hydrogène et de gaz carbonique, indicateur au bleu de méthylène) sont indispensables à l'étude des germes anaérobies stricts.

Deux *bains-marie* sont nécessaires pour régénérer les milieux de culture (100°C) et les maintenir en surfusion (45 à 47 °C). Une diminution de l'émission de vapeur d'eau est obtenue par recouvrement de la surface par des petits morceaux de polystyrène.

Un *four à microondes* permet de réduire la durée des traitements thermiques des milieux (préparation à chaud, régénération).

Deux *balances* (portée 1 à 2 kg au 1/10 de g et portée d'environ 200 g au 1/10 de mg) sont indispensables à la préparation des milieux et de l'échantillon.

Il faut toujours disposer de nombreux *tubes* à essai en verre de 16 x 160 ou 18 x 180 mm (réutilisables après lavage et bouchés au coton cardé ou avec des bouchons thermostables en polypropylène) ou des tubes en polycarbonate stériles et à usage unique (tubes à hémolyse) et de *réipients* de volumes variés et stérilisables (flacons, erlenmeyers, béchers etc).

Des pipettes stériles à usage unique, et des systèmes de pipetage « automatiques » à cônes stérilisables en propylène et à usage unique sont

Un *agitateur magnétique* chauffant (barreaux téflonés) et une *seringue de Cornwall* ou un *répartiteur* volumétrique sont nécessaires à la préparation et à la distribution des milieux.

D . 3 . Préparation des échantillons et culture microbienne

Les échantillons sont amenés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits finis ou dans des flacons ou récipients stériles s'il s'agit de produits en vrac ou de "prélèvements".

Il faut parfois disposer de matériels permettant le prélèvement d'aliments dans des emballages solides (poinçons, ouvre-boîtes) ou encore de matériels indispensables au prélèvement d'aliments solides (cautérisateurs, pipettes harpons, etc).

Le premier traitement auquel sont soumis la plupart des produits consiste, après prélèvement d'une partie aliquote, en une *homogénéisation*. Celle-ci est réalisée au moyen de mortiers ou par des broyeurs à couteaux (Virtis par exemple) ou des appareils de Potter ou encore par un Stomacher (figure 6).

Cette opération doit permettre la mise en suspension homogène des microorganismes présents sur ou dans le produit analysé en évitant cependant toute contamination externe ou une inactivation des germes par des conditions trop drastiques (ultra turrax avec échauffement par exemple).

Une *centrifugeuse* atteignant 3 à 4000 g permet, en peu de temps, de décanter les microorganismes présents dans les liquides. Des tubes bouchés sont indispensables pour éviter la contamination aérienne.

Un *vortex* permet d'homogénéiser les suspensions bactériennes présentes dans les tubes, en particulier au moment des dilutions ou des prélèvements. Avec cet appareillage, il faut engendrer un nœud de vibration entre pouce et index à une hauteur du tube qui est en dessous du niveau du coton cardé.

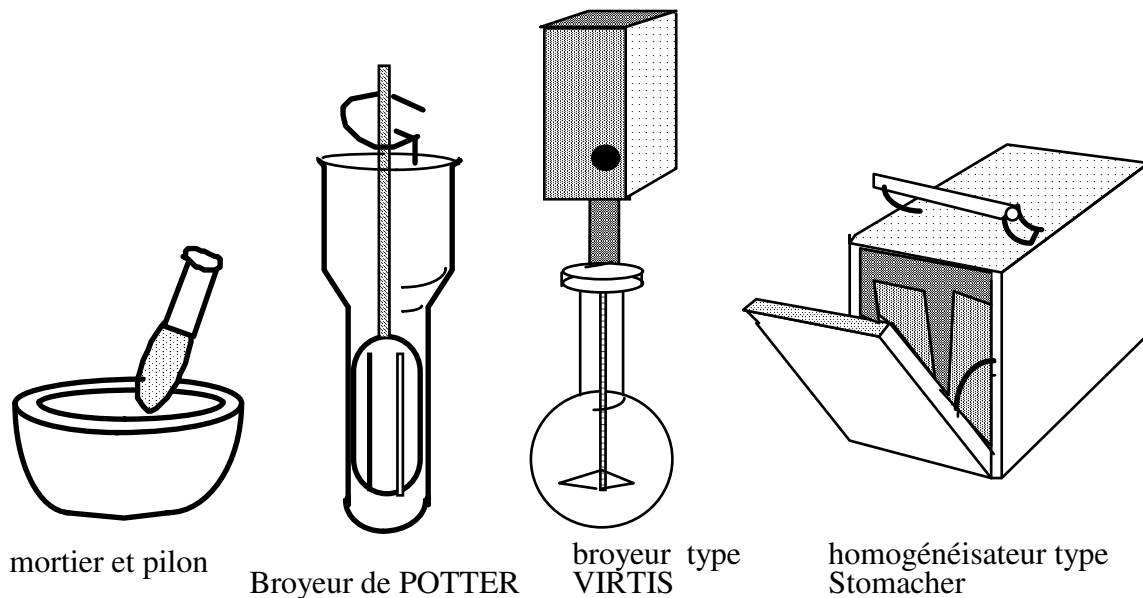


figure 6 . Schéma des divers systèmes de broyage / homogénéisation

Un très grand nombre *matériels à usage unique* (si possible) comme des boîtes de Pétri en polycarbonate de 90 mm de diamètre ou plus, de tubes à essai et à hémolyse, des pipettes graduées stériles (1 et 10 ml) ou de *pipettes automatiques* (de 0,1 ou 1 ml) à cônes en polypropylène stérilisables, des pipettes Pasteur, des cannes de verre, des anses de platine etc.

Un *ensemenseur spiral* et un *compteur de colonies* laser ou par analyse d'image ne s'imposent que si le nombre d'analyses à réaliser quotidiennement est élevé. Pour faciliter la numération des colonies dans les boîtes de Pétri il est possible d'utiliser un système du type *stylo-compteur*. Un système complet de *filtration* doit faire partie intégrante de l'équipement de base du laboratoire.

D . 4 . Microscopie

Bien que non prioritaire parmi les équipements, le microscope et son environnement de lames, lamelles, colorants et réactifs divers, constitue un outil important du laboratoire d'analyse microbiologique. Pour un agrément d'utilisation avec un minimum de fatigue et une meilleure image il est souhaitable d'adopter les systèmes binoculaires. De nombreux fabricants proposent un choix important de tels équipements; il faut veiller à la qualité des optiques, mais aussi de la partie "mécanique" de l'appareil. Les oculaires x10 sont les plus communs et il faut disposer d'objectifs x10, x 40 à sec et x100 à immersion. L'entretien des parties optiques du microscope doit être réalisé avec soin (xylène et papier joseph); il est aussi nécessaire de vérifier périodiquement le centrage de la lampe avant le condenseur.

Pour l'analyse en DEFT, il faut disposer d'un microscope adapté (épifluorescence). L'évolution des techniques immuno-microbiologiques avec détection de marquage par anticorps fluorescents requiert également des appareils adaptés. Les microscopes équipés de platines motorisés et d'une caméra vidéo permettant la saisie et le traitement des images (au moyen de logiciels de plus en plus perfectionnés et accessibles); ils constitueront un outil performant dans la mesure ou l'automatisation et le traitement de l'image seront simples et performants.

Les réactifs colorants les plus utilisés sont ceux qui permettent la coloration de Gram (éthanol, violet de gentiane, lugol, fuchsine) ou des colorations simples (bleu de méthylène phéniqué). Ces réactifs sont disponibles prêts à l'utilisation chez bon nombre de fournisseurs de produits. Veiller à

ne pas « colorer » la peau (doigts en particulier), certains de ces colorants réagissant avec les protéines ou les acides nucléiques.

La présence d'une loupe binoculaire (x 100 par exemple) permet, entre autre, de bien caractériser les colonies.

E . TECHNIQUES GENERALES

L'eau les matières premières et bon nombre de denrées alimentaires ne sont pas, à quelques exceptions près comme le lait stérilisé, les conserves par exemple, des produits stériles. La qualité marchande des produits dépend beaucoup du "contrôle " de la flore présente par des moyens physiques (température, pH, activité de l'eau par exemple) ou chimiques (additifs à effets antimicrobiens) et par des règles de "bonne fabrication". Le "microbiological guideline" comporte en effet des règles à appliquer avant, pendant et en fin de préparation, pour la distribution et le stockage; ces recommandations sont fondées sur le respect de *bonnes pratiques professionnelles (BPP)*. Les diverses étapes de ces BPP se situent au niveau des *ateliers* (construction, matériels et machines, outillages, facilité de nettoyage etc.), de la *qualité microbiologique des matières premières et de l'eau* , du *personnel* au niveau de son comportement et de son éducation hygiéniques, de la pertinence et de l'efficacité des *traitements antimicrobiens* appliqués aux produits ou aux systèmes potentiellement dangereux et enfin de la mise en place d'un ensemble de conditions de *distribution* les plus favorables au maintien de la qualité.

Les *spécifications microbiologiques* sont des critères applicables pendant et après la préparation afin de s'assurer que l'hygiène et les conditions de production sont satisfaisantes et en accord avec la réglementation. Les parties prenantes d'un marché y trouveront des garanties.

Les *normes* sont des spécifications microbiologiques adoptées par la législation qui s'adressent au produit fini et fixent les limites acceptables de présence de microorganismes donnés dans des produits bien définis.

Il existe actuellement de nombreux organismes nationaux ou internationaux (OMS, FAO, ISO, ICMSF, CEE, AFNOR, CNERNA , DGCCRF, services vétérinaires, etc.) qui se préoccupent de l'établissement de critères de qualité microbiologique de nos aliments.

La qualité hygiénique dépend surtout de la nature mais aussi souvent du nombre de la flore microbienne présente dans le produit. Si cette flore est composée de microorganismes susceptibles d'engendrer des maladies après consommation (maladies infectieuses, toxi-infections, intoxications) le produit est dangereux et ne doit en aucun cas être commercialisé. Il appartient alors au microbiologiste de détecter le ou les points critiques affectant cette qualité hygiénique pour laquelle la norme zéro défaut doit être un objectif prioritaire de l'ensemble du système de production.

En bactériologie alimentaire il n'est donc pas nécessaire de rechercher, de compter et d'identifier systématiquement toutes les bactéries, levures et moisissures présentes dans le produit. Il suffit souvent d'effectuer :

1) **une étude quantitative de la flore microbienne** :

- soit par dénombrement d'une flore microbienne donnée caractérisée par un ensemble de propriétés physiologiques communes comme par exemple numération de la *flore aérobie mésophile* revivifiable sur un milieu du type gélose nutritive ordinaire (germes hétérotrophes peu exigeants, mésophiles si la température d'incubation est voisine de 30°C avec une durée d'incubation généralement inférieure à 72 heures, neutrophiles si le pH est voisine de 7, aérobie ou aéro-anaérobie si l'incubation est réalisée à l'air), la numération des *levures et moisissures* confondues (germes acidophiles, aérobies pour la plupart, mésophiles "bas" etc.), la numération des

anaérobies sulfite-réducteurs (germes hétérotrophes, réduisant les sulfites en sulfure d'hydrogène, mésophiles, anaérobies stricts).

La présence de bactéries d'origine fécale ou tellurique témoigne dans nos aliments d'un manque d'hygiène et d'un défaut de rigueur technique et peut laisser craindre la présence concomitante dans le produit de bactéries entéropathogènes en nombre difficilement détectable ou après un temps d'analyse important.

- soit par dénombrement d'un groupe bactérien pouvant correspondre à une contamination déterminée: coliformes thermotolérants et/ou streptocoques du groupe D pour la *mise en évidence d'une contamination d'origine.*, staphylocoques pour la mise en évidence d'une contamination d'origine cutanée, germes indologènes, germes putrides, etc...

2) **une recherche orientée** de certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella, Staphylococcus, Shigella, Mycobacterium, Listeria, Brucella, Campylobacter, Yersinia*, etc.... Cette recherche exige l'utilisation de méthodes spécifiques hautement sélectives.

Le plus souvent, ces analyses ne diffèrent d'un produit alimentaire à un autre que par certains détails d'exécution. Parmi les analyses "communes" à tous (ou presque tous) les produits alimentaires on peut citer par exemple les numérations des coliformes ou de la flore "totale".

La **bonne qualité microbiologique** (hygiénique et marchande) est donc fonction de très nombreux facteurs ; le microbiologiste se doit néanmoins de définir le plus rapidement possible la notion quantitative et qualitative de **flore normale** de son produit ou de ses matières premières (microorganismes "habituels" et tolérables), et d'une **flore contaminante** dont le seuil de tolérance sera défini en fonction du risque que fait courir cette flore à un type donné de consommateur.

E . 1 . Prélèvements

Les modalités des prélèvements ont fait l'objet d'un arrêté publié au J.O. du 19 janvier 1980. Très schématiquement, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de 5 unités (lieu de fabrication ou de distribution), de 5 unités pour les conserves. Le laboratoire doit disposer d'environ 500 g de produits, soit 5 fois 100 g, ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces. Si le prélèvement de 5 échantillons s'avère trop élevé par rapport à la production il est procédé à un étalement dans le temps des prélèvements. Ces prélèvements doivent avant tout respecter des règles d'**aseptie** et de **représentativité**.

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre aux parties superficielles et profondes notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés par exemple. Pour les produits liquides elle est effectuée sur le produit "homogénéisé" ou sur les parties superficielles et profondes.

Dans le cas d'examen microbiologiques faisant suite à une maladie de type TIA il faut rechercher les germes dangereux (pathogènes, toxigènes) et leurs toxines aussi bien dans les prélèvements de surface que dans la masse.

Il faut tenir compte, pour un produit donné, des disparités possibles de fabrication et des disparités qui existent au niveau des résultats fournis par le laboratoire (il est généralement admis que la variabilité atteint une puissance de 10 ou même plus à ce niveau) .

E - 1 - a . Echantillonnage

Il s'agit là d'une **étape fondamentale** souvent délicate. Les ouvrages consacrés à l'échantillonnage sont nombreux et des règles précises par produit ou milieu ont été édictés par l'AFNOR et la DGCCRF; si les échantillons ne sont pas correctement prélevés et manipulés ou ne sont pas représentatifs d'un lot ou d'une production, les résultats d'analyse n'auront aucune signification.

Un échantillonnage représentatif est essentiel quand l'analyse a pour but de détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines qui peuvent être distribués de façon hétérogènes dans l'aliment ou quand la commercialisation d'un produit dépend de la qualité microbiologique en relation avec les normes imposées par la législation.

1) Méthode d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF (Internation Commission on Microbiological Specifications for Foods)

La Commission Internationale des Normes Microbiologiques relatives aux denrées alimentaires a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires. Le principe de base est le suivant : un échantillon analysé donne des résultats non satisfaisants s'il renferme des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle il devient potentiellement dangereux.

Dans cette méthode le symbole **m** représente la limite permettant de répartir les échantillons en 2 groupes: les acceptables (valeur $\leq m$) et les inacceptables (valeur $\geq m$). Pour certains microorganismes dangereux **m** peut être égal à 0.

Quand un microorganisme donné est toléré dans un aliment 3 catégories d'échantillons sont définies :

- catégorie 1 (acceptables sans réserve)
- catégorie 2 (acceptables mais avec une limite)
- catégorie 3 (inacceptables).

m sépare la 1ère et la 2ème catégories et **M** la 2ème et la 3ème (figure 7).

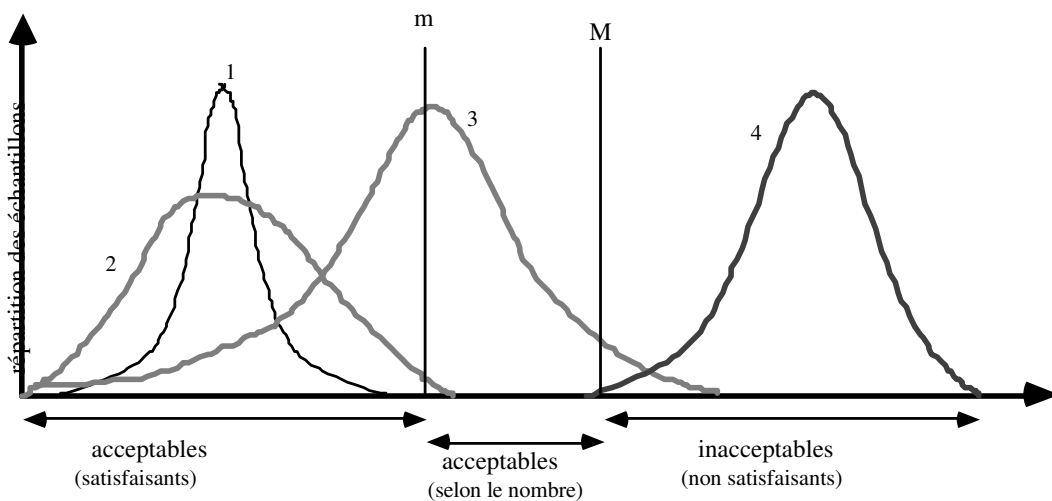


figure 7. Distribution des échantillons d'après l'ICMSF

Il existe deux types de plan d'échantillonnage qui sont applicables à des systèmes aliments - germes - consommateurs bien identifiés.

- Plan d'échantillonnage à 2 classes

Ce plan donne des résultats permettant de déterminer 2 classes de contaminations. Ce type de plan n'accepte aucune tolérance et correspond le plus souvent aux conclusions : absence dans (le résultat est bon et le produit jugé satisfaisant) ou encore présence dans (le résultat est mauvais et le produit est déclaré impropre à la consommation).

Avec un plan d'échantillonnage à 2 classes (catégories 1, 3), **n** représente le nombre d'échantillons examinés. Il existe deux possibilités pour ce type de plan :

- utiliser la notion de présence ou absence

- déterminer la tolérance ou non des numérations supérieures à la valeur critique **m**

Le symbole **c** représente le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil, nombre qui permet de juger le lot comme satisfaisant.

Exemple : Pour les viandes de volailles contaminées en surface par *Salmonella*

$$m = 0 \quad n = 5 \quad c = 1$$

Pour la plupart des autres produits on a avec cette bactérie et d'autres microorganismes très dangereux (*Listeria*, *Brucella*, etc.) $m = 0$, $n = 5$ et $c = 0$.

Pour les viandes de boucherie conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées on a pour la Flore Aérobique Mésophile

$$m = 5.10^4 \quad n = 5 \quad c = 0$$

La rigueur du plan dépend des valeurs de n et de c . Plus grand est n pour une valeur donnée de c , meilleure sera la qualité des lots acceptés. A l'inverse, si pour une valeur donnée de n , c augmente, la rigueur du plan diminue.

- Plan d'échantillonnage à 3 classes

Ce plan est basé sur la reconnaissance de 3 catégories d'échantillons en fonction de leur niveau et nature de contamination : celle inférieure ou égale à m , celle comprise entre m et le seuil M , celle supérieure à M . La valeur S constitue le seuil de toxicité.

Avec un plan d'échantillonnage à 3 classes (catégories 1, 2, 3), les symboles n et c ont la même signification mais il existe pour c un facteur de précision supplémentaire qui est le nombre d'échantillons tolérés dont les charges microbiennes sont comprises entre m et M . La présence d'échantillons entre m et M n'est pas souhaitable mais tolérée. Pour les valeurs supérieures à M les lots ne peuvent pas être acceptés pour la commercialisation en l'état. Ce plan à 3 classes permet de déterminer par des calculs appropriés la probabilité selon laquelle un lot sera accepté ou refusé en fonction du nombre d'échantillons défectueux qu'il contient. S'il n'y a pas d'échantillon avec une valeur supérieure à M on est ramené au plan à 2 classes.

Le plan est choisi en fonction de l'estimation du risque pour la santé et du mode d'utilisation de l'aliment. Les germes sont classés en fonction du risque qu'ils font courir au consommateur en :

- germes entraînant un risque sévère (*Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio comma*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*, *Clostridium perfringens* type C, virus de l'hépatite A).

- germes entraînant un risque moyen avec possibilité de large diffusion (Staphylocoques entérotoxigènes, *Salmonella typhimurium* et les autres sérotypes, autres *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entérotoxigènes, Streptocoques b hémolytiques).

- germes entraînant un risque moyen sans grande diffusion (*Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella arizonae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacter jejuni*, etc...).

Choix du plan : le plan à 3 classes est le plus souvent adopté; la valeur de m est déterminée par les résultats de l'analyse de nombreux échantillons sur des lots jugés satisfaisants. La valeur de M est plus difficile à fixer et est fonction du produit, de la bactérie recherchée et de la méthode employée.

Les valeurs de n et c sont choisies en fonction du niveau souhaité d’acceptabilité ou de rejet des lots. Il est évident que plus n sera grand et plus c sera petit et meilleur sera le contrôle réalisé (tableau I).

utilité ou risque		conditions prévisibles de manipulation et de consommation après échantillonnage , dans les conditions normales d'emploi		
		réduction du risque	pas d'influence sur le risque	augmentation du risque
pas de risque direct pour la santé. Utilité : vie commerciale		cas n°1 3 classes n = 5 c = 3	cas n°2 3 classes n = 5 c = 2	cas n°3 3 classes n = 5 c = 1
risque pour la santé	faible , indirect	cas n°4 3 classes n = 5 c = 3	cas n°5 3 classes n = 5 c = 2	cas n° 6 3 classes n = 5 c = 1
	moyen , direct diffusion limitée	cas n°7 3 classes n = 5 c = 2	cas n°8 3 classes n = 5 c = 1	cas n°9 3 classes n = 10 c = 1
	moyen , direct large diffusion possible	cas n° 10 2 classes n = 5 c = 0	cas n°11 2 classes n = 10 c = 0	cas n° 12 2 classes n = 20 c = 0
	sévère , direct	cas n°13 2 classes n = 15 c = 0	cas n° 14 2 classes n = 30 c = 0	cas n° 15 2 classes n = 60 c = 0

tableau I. Choix des valeurs de n et c et du type de plan en fonction des risques sur la santé et les modalités d’utilisation du produit

Exemple d’application : contrôle de l’absence de *Salmonella* dans des laits en poudre (cf aussi p. 14).

Les caractéristiques de risque “produit” sont classées en :

- a) produits contenant des ingrédients suspects
- b) pas d’application au produit de traitements antimicrobiens efficaces sur le germe considéré
- c) possibilité de croissance en cas d’erreur (composition du produit, pH, température, a_{eau} etc.)

A partir de ces caractéristiques 5 catégories d’aliments sont déterminables:

Catégorie I : aliments destinés aux enfants sujets malades ou déficients, vieillards

Catégorie II : aliments comportant les 3 catégories de risque

Catégorie III : aliments comportant 2 catégories de risque

Catégorie IV : aliments comportant 1 catégorie de risque

Catégorie V : aliment ne comportant aucune caractéristique de risque

Il est alors possible de définir un plan d’acceptation basé sur l’analyse d’échantillons unitaires de 25 grammes et sur les cas n° 13, 14 et 15 (tableau I). Ce plan drastique est mis en œuvre pour le contrôle de ce type de produit destiné à l’exportation aux USA (tableau II).

catégorie du produit	nombre d'unités testées		signification : probabilité à 95 %qu'il n'y ait pas plus de 1 <i>Salmonella</i> dans
	0 positif	pas plus de 1 positif	
I	60 (1500 g)	95 (2375 g)	500 g
II	30 (750 g)	48 (1200 g)	250 g
III , IV , V	15 (375 g)	24 (600 g)	125 g

tableau II . Plan d’échantillonnage pour *Salmonella* dans du lait en poudre

RESUME D’UTILISATION D’UN PLAN A TROIS CLASSES

VALEURS NUMERIQUES DES CRITERES D’UN PLAN A TROIS CLASSES

m : fixé par décret (surtout fonction du germe , du consommateur type et de l'aliment)
 tous les résultats égaux ou inférieurs à m sont considérés comme satisfaisants
M : seuil limite au-delà duquel les résultats ne sont pas considérés satisfaisants
 sans que le produit soit dangereux . Les valeurs de M sont fixées à :
 M = 10 m quand les dénombrements sont réalisés en milieux solides
 M = 30 m pour des numérations en milieu liquide
n : nombre d'unités composant l'échantillon
c : nombre d'unités de l'échantillon donnant des valeurs entre m et M

QUALITE DU LOT

satisfaisante ou acceptable : aucun résultat ne dépasse M
satisfaisante : les valeurs déterminées sont inférieures à :
 3 m lors de numérations en milieu solide
 10 m lors d'emploi de milieu liquide
acceptable : les valeurs déterminées sont comprises entre :
 3 m et 10 m en milieu solide
 10 m et 30 m en milieu liquide
 avec $c / n \leq 2,5$ (avec le plan $n = 5$ et $c = 2$)
non satisfaisant : des valeurs supérieures à M sont observées
 ou avec $c / n > 2,5$

Exemples de plan d’échantillonnage à 3 classes

ALIMENT	BACTERIE	n	c	m	M
cacao	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
chocolat	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
oeufs	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
lait en poudre	flore aérobie mésophile	5	1	$5 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$
crème glacée	flore aérobie mésophile	5	3	$5 \cdot 10^4$	10^5
	coliformes	5	1	10	50
eau minérale	coliformes	10	2	2	10
fromage (past.)	coliformes	5	2	$5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$
	<i>Staphylococcus</i>	5	2	10^2	10^3

2) Cas particulier des conserves

Les conserves doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité / stérilité. Ces épreuves consistent en deux étuvages de 5 échantillons à 37°C pendant 7 jours (ou à 30°C pendant 10 jours) et à 55°C pendant 7 jours. A l’issu de ces épreuves on observe l’éventuel bombage ou fuitage (il faut aussi que le ΔpH entre les unités étuvées et les unités témoins ne dépasse pas 0,5).

Par microscopie (après étalement d'un volume donné voisin de 10 µl de produit puis fixation et coloration au bleu de méthylène par exemple) on compte sur 20 champs le nombre de germes respectivement observés à partir de la boîte incubée (n) et de la boîte témoin (n'). n / n' doit être inférieur à 100.

3) Méthode d'échantillonnage pour rechercher un nombre peu élevé de micro-organismes

On peut déterminer le nombre d'échantillons à analyser dans un lot en fonction du degré de sûreté recherché

$$n = \frac{\log(1 - p)}{\log(1 - d)}$$

p est la probabilité de déceler le micro-organisme (en général p = 0,95)

d est le pourcentage de défauts admis pour le lot entier (souvent inférieur à 0,05).

On peut également réaliser un échantillonnage satisfaisant au point de vue statistique avec $n = \sqrt{N}$ dans laquelle n est le nombre d'échantillon à analyser et N le nombre total de divisions du produit à analyser. Cependant cette méthode conduit souvent à un nombre trop élevé d'analyses, en particulier quand n est supérieur à 10.

4) Choix des échantillons

- au hasard (tables de nombres)
- on calcule $N/n = a$ et on prélève la a^{ième} et ainsi de suite
- on calcule $\sqrt{n} = b$ et on prélève le b^{ième}, puis le (b - 1)^{ième} et ainsi de suite.

E - 1 - b. fréquence des prélèvements

L'échantillonnage doit être réparti dans le temps, et ce, en fonction du niveau de production et des risques de contamination.

E - 1 - c. Conditions du prélèvement

Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont d'abord le respect des règles d'asepsie (travail correct du microbiologiste) et la non modification des flores présentes dans le produit. Dans la mesure du possible, les échantillons du produit à analyser doivent être amenés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine, ce qui évite certaines contaminations.

Si le produit se présente sous forme de grands volumes (réservoirs à lait etc...) s'assurer de la bonne homogénéité de la répartition des micro-organismes ; une partie représentative du produit sera prélevée stérilement. Il est parfois nécessaire de réaliser des prélèvements à divers niveaux de l'aliment (surface, profondeur d'un aliment solide) ou après broyage et homogénéisation.

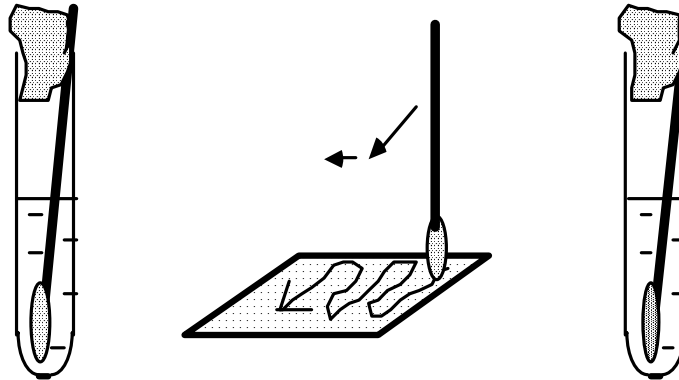
Les manipulations effectuées au cours du prélèvement ne doivent en aucun cas être à l'origine d'une contamination : nécessité d'utiliser des instruments stériles et de travailler stérilement.

Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement. Le trempage dans l'alcool et le flambage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée. Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, étanches, à col large stérilisés au four Pasteur (160°C - 10 mn) ou par autoclavage à 121°C pendant 30 min ou encore à usage unique et stériles ; leur taille doit être adaptée au volume de l'échantillon. Les récipients peuvent être en verre, en métal ou

en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate, polypropylène); dans ce dernier cas il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid (radiations γ ou β). Dans tous les cas les récipients de prélèvement doivent posséder un système de fermeture hermétique. Le prélèvement d'un produit non emballé doit être réalisé dans la zone de stérilité d'un bec bunsen ou d'un système équivalent.

1) Prélèvement en surface

- Ecouvillonnage



Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile de Ringer au 1/4 ou dans un bouillon tryptone-sel additionné de Tween (0,5%/°). Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit ; l'écouvillon est alors immergé dans 10 ml de Ringer au 1/4 ou 10 ml de bouillon tryptone-sel. L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

- Rinçage: cette méthode est utilisée dans le cas de récipients ou de tuyauteries; un volume connu de solution stérile est introduit dans le matériel à analyser. Après agitation, le liquide est récupéré et soumis à l'analyse.

- Méthode des empreintes : un ruban adhésif préalablement stérilisé par les UV est appliqué sur la surface à étudier. Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies.

- Méthode du cylindre : un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé.

2) Prélèvement de produits liquides

La technique varie avec le produit, le volume et la forme du contenant. Il faut néanmoins toujours s'assurer de la parfaite homogénéisation du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette (ou avec un flacon lesté stérile ou autre) le volume nécessaire à l'analyse.

3) Prélèvement de produits solides

Selon le produit, le prélèvement sera effectué au scalpel, à la sonde (fromages et produits mous) ou à la pipette harpon. La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

E . 2. Traitement de l'échantillon

E - 2 - a. Transfert de l'échantillon au laboratoire

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé il faut identifier immédiatement le produit avec une étiquette ou une référence. Il est souhaitable de ne pas utiliser de crayons feutres sur des films plastiques (PVC) car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse. Noter la température initiale, l'heure du prélèvement, la date et la température de transport.

Amener alors les échantillons le plus rapidement possible au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. L'analyse devrait être réalisée dans l'heure qui suit le prélèvement.

Dès réception au laboratoire l'échantillon accompagné de sa fiche signalétique est enregistré (nature, date, heure, provenance du prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées, autres indications utiles).

Si l'échantillon doit être transporté il faut réduire au maximum le délai avant l'analyse. Il est souvent nécessaire de réfrigérer (mais non congeler) le produit au cours de son transport; certains germes fragiles peuvent disparaître au cours de cette réfrigération. Si un produit est déshydraté ou en conserve il ne doit pas être réfrigéré.

Pour un **produit congelé** s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant 1 mois avant d'être analysé). Les dispositions relatives à l'analyse des produits congelés sont indiquées dans le JO du 19 janvier 1980. La congélation d'un produit provoque une diminution plus ou moins importante du nombre de germes qu'il contient. Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à -18°C , transporter le produit à cette température et décongeler à l'air ambiant à température voisine de 20°C pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permette le prélèvement.

E - 2 - b. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution.

Pour les **produits liquides** (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour les **produits solides** diverses techniques de "broyage" sont utilisables :

- 1) broyage manuel au Potter ou en en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)
- 2) broyage mécanique

- avec un broyeur électrique à couteaux de type VIRTIS . Au cours du broyage les germes doivent être dispersés mais non détruits; la température ne doit pas trop s'élever (le récipient peut être placé dans de la glace). Le broyage s'effectue en général avec 10 volumes (ou 9) de diluant pour 1 "volume" de produit (par exemple 10 g de produit et 100 ml (ou 90) de diluant stérile). Le diluant peut être de l'eau distillée, de l'eau physiologique, du Ringer au 1/4 ou une solution tryptone-sel , etc. .

- avec un broyeur du type STOMACHER. Cet appareil permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant. De plus il n'est pas nécessaire, comme dans le cas de l'utilisation d'un broyeur de type Virtis, de stériliser les récipients entre deux utilisations. En effet, le Stomacher (digesteur) utilise des sacs plastiques stériles à usage unique. La prise d'essai est le plus souvent de 10 g (ou 25) d'aliment et de 90 ml (ou 250) de diluant.

E - 3. Les diluants

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu: ainsi

Staphylococcus aureus est “tué” en quelques heures dans de l’eau distillée de même que la plupart des entérobactéries (*E.coli*); il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou dans du Ringer au 1/4 et pour *Escherichia coli* dans de l’eau salée à 8,5‰. Actuellement il paraît souhaitable, sauf indication afférente à un type donné d’aliment, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel. En absence d’information le choix se fera en fonction de la composition du produit à analyser: si le produit est riche en protéine et en minéraux, Ringer ou eau physiologique suffisent et même une solution de phosphate à 2 % et pH 7,4 dans le cas des fromages frais, crèmes fraîches et caséinates .

tryptone sel	Ringer (solution mère)	Eau physiologique	Eau peptonée tamponnée
tryptone 1 g NaCl 8,5 g eau D 1000 ml pH = 7	NaCl 9 g KCl 0,42 g CaCl ₂ 0,48 g NaHCO ₃ 0,2 g eauD 1000 ml	NaCl 9 g eau D 1000 ml	bacto peptone 20 g NaCl 5 g Na ₂ HPO ₄ 9 g K H ₂ PO ₄ 1,5 g eau D 1000 ml pH = 7,2

Tous ces diluants sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes.

Il faut noter que les milieu tryptone-sel et eau peptonée tamponnée permettent, dans des conditions particulières (température, temps), de réaliser une revivification.

L’eau peptonée tamponnée est utilisée avec certains produits acides au fort pouvoir tampon comme les yaourts.

E - 4. La revivification

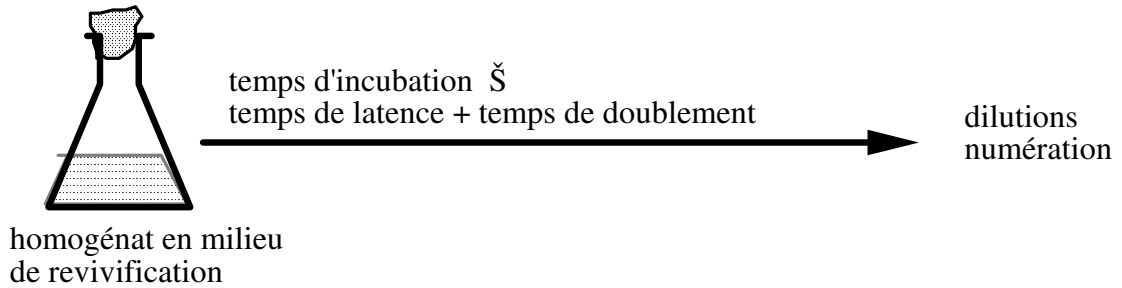
Les micro-organismes sont souvent “endommagés” mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillissement. Ces altérations se reflètent dans certaines de leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaries, colorants, sels etc.). En général ces altérations sont réversibles et après leur disparition les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, en particulier au niveau de leur croissance ou de leur pouvoir pathogène.

La nécessité de faciliter le “rétablissement” des cellules ayant subi des altérations sub-létales, c’est-à-dire leur “réanimation” ou encore leur revivification, s’impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d’inhibiteurs. En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu’il n’y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s’agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.

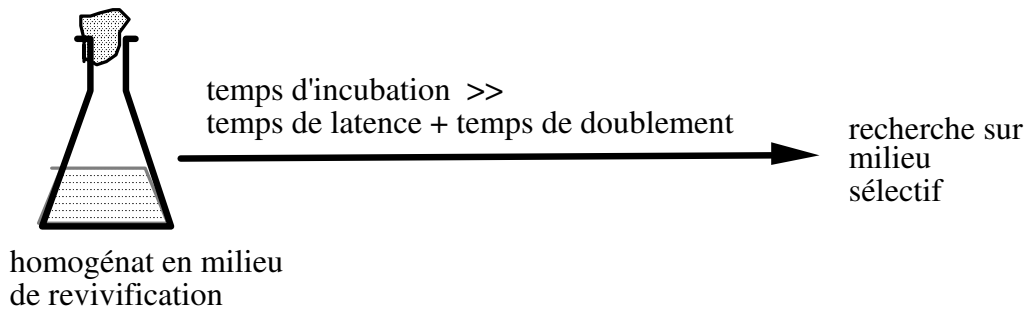
E - 4 - a. Revivification en milieu liquide

La revivification peut être réalisée dès la première étape de l’analyse au cours de laquelle le produit est additionné de diluant. Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d’incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps qui variera

en fonction du type d'analyse réalisé, temps qui est le plus souvent voisin du temps de latence du germe "normal". Si la durée de revivification est supérieure au temps de latence, il se produira une multiplication des germes non altérés ce qui conduira, selon les techniques de numération utilisées par la suite, à une surévaluation du nombre de germes. Après cette phase préalable de revivification la numération est réalisable soit en milieu liquide soit en milieu solide.

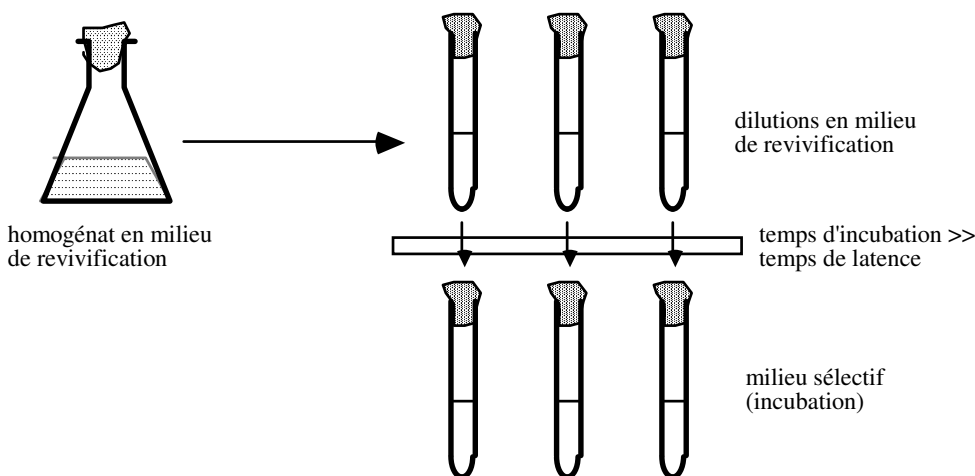


Dans les épreuves du type présence ou absence, la revivification est obtenue par un pré-enrichissement dans un milieu favorable (ex. recherche des *Salmonella*). La durée d'incubation peut être relativement longue car la multiplication des germes à rechercher est dans ce cas très souhaitable.



Dans le cas où la numération des germes doit être réalisée deux autres méthodes sont encore envisageables :

- Quand la numération est effectuée en milieu liquide, la revivification est réalisable dans des milieux non sélectifs ensemencés à partir des différentes dilutions. C'est à partir de ces milieux que sont ensuite ensemencés les milieux sélectifs (de tube à tube).

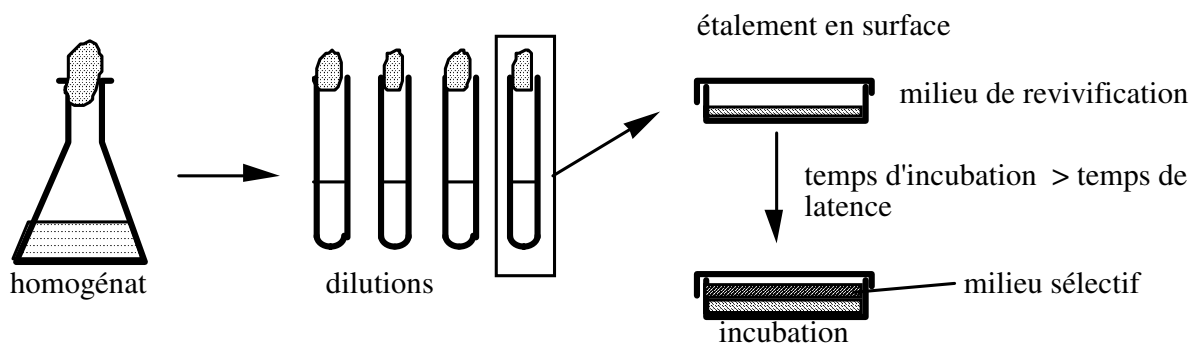


Le décret publié au JO du 19 janvier 1980 fixe les conditions de revivification : « à l'exclusion des produits laitiers, si le produit a subi un traitement thermique ou s'il a été congelé ou encore s'il renferme des sels pouvant exercer une action inhibitrice (NaCl, NaNO₂...) après homogénéisation,

laisser le flacon à la température du laboratoire ($20\pm 2^{\circ}\text{C}$) pendant trente à quarante cinq minutes (optimum quarante minutes) ».

E - 4 - b. Revivification sur milieu solide

- Quand la numération est effectuée sur milieu solide, la revivification peut être obtenue par une pré-culture sur une gélose non sélective favorable avec un temps d’incubation supérieur au temps de latence, mais ne permettant pas la formation de colonies macroscopiques visibles. Après revivification, la surface de la gélose est recouverte de gélose sélective.



- Quand la numération est réalisée après filtration sur membrane, la membrane sur laquelle se trouvent les germes est d’abord placée à la surface d’un milieu de revivification pendant un temps permettant éventuellement plusieurs divisions cellulaires normales puis le filtre est placé à la surface d’un milieu sélectif.

A titre d’exemple, les conditions optimales de revivification par cette méthode de germes “stressés” sont les suivantes :

Traitement	Germe	Revivification	
		temps (h)	t° (°C)
chaleur congélation	coliformes	5	35
	coliformes	4	35
	entérocoques	4,5	35
acide séchage	coliformes	4	35
	coliformes	2	25
	entérocoques	4	25

E - 5. Techniques de dilution

Elles nécessitent la présence de nombreux tubes à essais contenant le plus souvent 9 ml de diluant stérile et de nombreuses pipettes stériles de 1 et 10 ml. Les pipettes peuvent être remplacées par des systèmes de pipetage automatique munis de cônes à usage unique.

Toutes les manipulations sont à effectuer avec toutes les précautions d’asepsie exigées en microbiologie. L’introduction éventuelle d’un contaminant ou la contamination de l’opérateur doivent ne jamais se produire.

Le récipient contenant le liquide à diluer est agité manuellement avec précaution pour éviter les projections pendant une dizaine de secondes. On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (aspirer et refouler une fois avant le prélèvement) que l’on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile. Le tube est agité par des mouvements de rotation ou au moyen d’un Vortex. On obtient ainsi

une dilution au 1/10. Avec une nouvelle pipette de 1 ml on prélève 1 ml de cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml ; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution recherché.

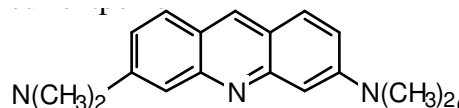
E - 6. Principales techniques de numération

En microbiologie alimentaire l'intérêt de l'étude à la fois quantitative et qualitative de la flore présente dans un aliment est considérable. Bien que de nombreuses techniques de numération soient utilisables, il n'existe pas à l'heure actuelle de technique parfaite. Certaines méthodes ne permettent pas de différencier les germes vivants des germes morts, d'autres s'avèrent incapables de compter individuellement les cellules microbiennes lorsque celles-ci sont associées (*Staphylococcus*, *Streptococcus*, mycélium etc..) et permettent d'évaluer des unités formant colonies (**UFC**) ou des unités formant trouble (**UFT**).

E - 6 - a. les méthodes générales directes

1) Comptage direct

Il s'effectue au microscope à l'aide de microchambres graduées de volume connu (cellules de Thoma, de Malassez, de Nageotte, de Salimbéni Cloup etc...) après dilution en eau physiologique pour les germes morts, en eau formolée à 10 % pour les germes vivants. Ce type de comptage peut être automatisé (compteurs de particules). Il est également possible d'estimer au microscope le nombre de micro-organismes d'un produit donné après étalement et coloration d'une quantité connue du produit (de l'ordre de quelques microlitres) sur une lame. Enfin, un comptage direct est réalisable après filtration du produit (ou de ses dilutions) sur membrane, coloration de la membrane et observation microscopique. Cette dernière technique permet l'évaluation, après coloration par l'acridine orange et observation en épifluorescence, des micro-organismes vivants et morts (DEFT). Ce colorant est un intercalant des acides nucléiques avec lesquels il forme des complexes fluorescents verts (ADN) ou orange (ARN)



2) Détermination du poids sec, ou dosage des protéines microbiennes ou dosage des acides nucléiques (après sonication par exemple et/ou extraction en milieu alcalin)

3) Néphélométrie

La turbidité d'un milieu est, dans certaines conditions, proportionnelle au nombre de micro-organismes présents dans ce milieu. Ainsi l'absorbance d'une suspension microbienne à une longueur d'onde supérieure ou égale à 540 nm varie linéairement jusqu'à des valeurs inférieures ou égales à 0,8 avec le nombre de germes. Il est par ailleurs possible de comparer visuellement la turbidité du milieu avec une gamme étalon d'albumine (méthode de Mestrezat : ainsi l'opacité d'une suspension de $5 \cdot 10^9$ staphylocoques par ml est identique à celle d'une suspension d'albumine à 0,5 g par litre).

4) Système luciférine - luciférase

Cette méthode permet le comptage des micro-organismes vivants par dosage de l'ATP intracellulaire, la teneur en ATP intracellulaire étant sensiblement constante pour un micro-organisme donné ; cette teneur est égale à 0 si le germe est mort. Après lyse de la cellule (SDS) l'ATP est dosé par voie enzymatique selon le schéma suivant :

E - 7. Numération à partir d'un milieu solide : UFC

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de Pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC présents dans l'inoculum.

De nombreuses critiques à cette méthode peuvent être formulées. Ainsi, les bactéries aérobies strictes se développent mal dans la masse de la gélose, tandis que les bactéries anaérobies strictes ne s'y développeront que dans des conditions d'incubation appropriées (jarre anaérobie par exemple). Il peut aussi exister certains antagonismes bactériens (bactériocines etc...). Par ailleurs si la température de mélange du milieu gélosé mélange à l'inoculum est supérieure à 45 - 47°C, il peut y avoir inactivation de microorganismes. Cette méthode de culture dans la masse conduit néanmoins à des dispersions homogènes dans la gélose et donc à une distribution homogène des colonies. Dans cette méthode des germes se trouveront dans la masse et d'autres en surface, les colonies formées étant, compte tenu des contraintes stériques imposées par le réseau gélifié, alors différentes pour un même micro-organisme. Cet inconvénient est éliminé par la technique de la double couche.

La numération en surface n'est réalisable que sur une surface de milieu parfaitement sèche. L'opération d'étalement au râteau reste à maîtriser (adsorption de germes sur le râteau) et le volume d'inoculum déposé ne peut en aucun cas excéder 0,5 ml avec des boîtes de 9 cm de diamètre (des volumes supérieurs ne sont pas absorbés par le gel d'agar et l'eau qui reste en surface rend impossible toute numération en raison de la formation d'une nappe). Cette méthode donne de bons résultats avec les germes aérobies et aéro-anaérobies.

E - 7 - a. Technique de numération dans la masse de la gélose

Les milieux gélosés (répartis en erlenmeyer ou en flacon de 15 ml) sont liquéfiés au bain-marie bouillant ou mieux au four à micro-ondes, puis maintenus en surfusion dans un bain-marie à 45 ±1°C. 1 ml du liquide dans lequel on veut connaître le nombre de micro-organismes est introduit au centre de la boîte de Pétri posée bien à plat dans la zone de protection du bec Bunsen. L'inoculum peut être réparti en gouttes sur le fond de la boîte. Afin de n'utiliser qu'une seule pipette stérile pour toutes ces opérations il est recommandé de commencer l'ensemencement par la dilution la plus grande pour terminer avec le liquide non dilué.

Noter avec soin sur chaque boîte l'origine de l'analyse, le milieu utilisé et la dilution correspondante (sur le côté de façon à ne pas être gêné par la suite pour le comptage).

On procède de la même façon pour chaque dilution en réalisant, dans la mesure du possible, deux essais par dilution.

Le milieu gélosé en surfusion dans lequel l'inoculum sera incorporé doit être à 45°C±1°C. Si sa température est supérieure à cette valeur il se produira une destruction partielle de la flore ; au contraire, si sa température est inférieure à 45°C le milieu se solidifiera irrégulièrement et ne se mélangera pas de façon homogène avec l'inoculum. Pour réaliser l'introduction du milieu gélosé : retirer le milieu du bain marie à 45°C, essuyer le récipient, l'ouvrir aseptiquement, flamber son ouverture et couler le milieu dans la boîte de Pétri contenant l'inoculum après l'avoir entrouverte dans la zone stérile. Ne pas appuyer le récipient sur la boîte. Mélanger rapidement par agitations circulaire et alternative horizontales ; éviter les mouvements brusques qui risquent de projeter le milieu inoculé sur les bords ou même à l'extérieur de la boîte. Laisser refroidir les boîtes bien à plat jusqu'à solidification complète (environ 30 minutes). Retourner les boîtes et les placer à l'étuve dans cette position à la température requise.

Pour éviter la formation de colonies de grande taille en surface (par rapport à celles qui se développeront dans la masse de la gélose) on peut couler à la surface de la gélose ensemencée une fine couche de milieu de culture identique à celui déjà présent dans la boîte ou couler à la surface une mince couche de gélose non nutritive (technique de la double couche).

E - 7 - b. Technique de numération en surface de la gélose

100 à 500 microlitres (pipette graduée ou mieux pipette automatique) du milieu à analyser sont déposés à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme à la surface du milieu au moyen d'un ensemencement stérile du type pipette râteau. La pipette rateau est "stérilisée" entre deux étalements par immersion dans de l'éthanol, l'éthanol adsorbé sur le verre étant ensuite enflammé (cette opération ne déforme pas l'ensemencement).

E - 8. Numération en milieu liquide : UFT

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification. Cette méthode repose sur le fait qu'un inoculum contenant au minimum 1 germe (UFT) donnera, après introduction dans un milieu liquide donné, une culture positive. Dans cette technique, la disponibilité des nutriments pour le micro-organisme est excellente.

E - 8 - a. fractionnement de grands volumes liquides

Pour éviter l'accumulation de produits de dégradation qui pourraient avoir une action inhibitrice, on ensemence 1 ml d'inoculum dans 100 ml de milieu de culture. Ce milieu est ensuite réparti aseptiquement dans 10 tubes à essais à raison de 10 ml par tube, puis incubé. En supposant une distribution homogène des micro-organismes, on peut conclure à la présence de 1 à 10 micro-organismes dans l'inoculum initial de 1 ml.

Si tous les tubes cultivent.....plus de 10 germes/ml
 Si 9 tubes cultivent..... plus de 9 germes/ml

 Si 1 tube cultive..... plus d'un germe/ml.

E - 8 - b. Méthode de Mac Grady (technique du nombre le plus probable NPP)

McGRADY, MH. (1918) Tables for rapid interpretation of fermentation test results. Public Health J., Toronto, 9, 201-210.

Cette méthode permet de révéler de plus faibles quantités de germes que la plupart des méthodes de numération en milieu solide. Elle repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des **nombre les plus probables (NPP)**. Il existe de nombreuses variantes à la méthode en fonction de la charge microbienne à évaluer. Cette méthode suppose que le micro-organisme est normalement distribué dans le milieu et donc qu'un même volume d'échantillon contient en moyenne le même nombre de microorganismes (en réalité il en contient un peu plus ou un peu moins) ; le nombre le plus probable correspond à la valeur moyenne. Si le nombre de micro-organismes est faible l'écart par rapport à la moyenne peut être élevé et inversement.

Exemple : un produit liquide contient 100 micro-organismes / 100 ml

Des prélèvements de 10 ml contiennent en moyenne 10 germes avec des tubes à plus de 10 et peu à moins de 1.

Des prélèvements de 1 ml contiennent en moyenne 1 germe avec des tubes à plus de 1 et des tubes négatifs.

Des prélèvements de 0,1 ml conduisent à 1 tube positif pour 10 tubes et de nombreux tubes sont négatifs.

La distribution de ces populations est schématisée sur la figure 8.

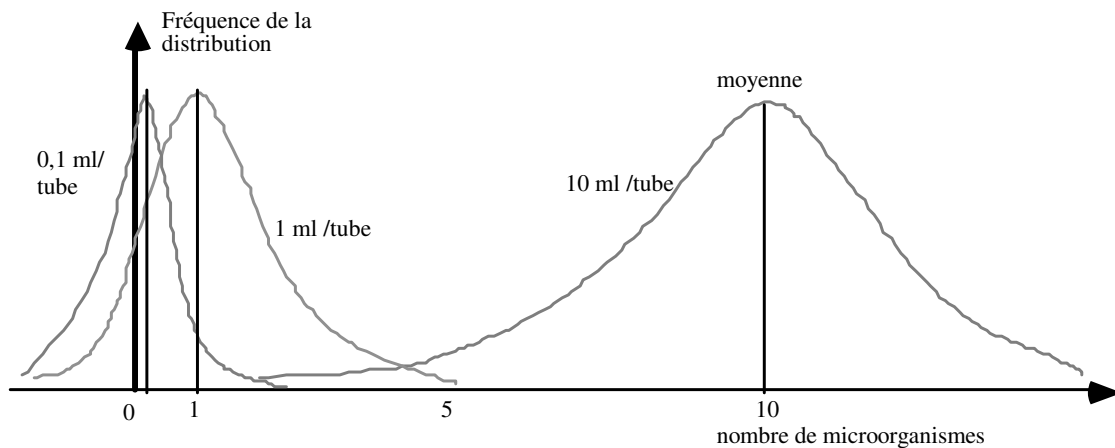


figure 8 . Distribution de la population microbienne dans une numération en milieu liquide

Numération de charges microbiennes comprises entre 0 et environ 15 pour 100 ml

Dans ce cas 50 ml de produit sont introduits dans un erlenmeyer avec 50 ml de milieu de culture adapté à double concentration, et 5 fois 10 ml introduits dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu de culture également à double concentration. Après incubation les tubes positifs sont identifiés et le NPP pour 100 ml de produit est déterminé en utilisant la table suivante :

Erlenmeyers positifs	tubes de 10 ml positifs	NPP / 100 ml
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	3	9
1	4	16
1	5	+ de 18

Numération de charge microbiennes comprises entre 0 et 100 germes par ml

Dans ce cas 1 ml de la suspension mère puis de ses dilutions est introduit dans des tubes contenant le milieu de culture choisi mais en réalisant chaque essai en double (ou en triple ou plus suivant le niveau de précision souhaité).

Avec l’essai comportant deux tubesensemencés par dilution on note, après incubation, les réponses positives ou négatives et on affecte :

- le chiffre 2 à deux tubes positifsensemencés avec la même dilution
- le chiffre 1 si l’un des deux tubes donne une réponse positive à une dilution donnée
- le chiffre 0 si la culture est négative pour les deux tubes.

Exemple

	produit pur		dilutions							
			10 ⁻¹		10 ⁻²		10 ⁻³		10 ⁻⁴	
	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2
résultat après incubation	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
affectation	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
nombre par dilution	2		2		1		1		0	
nombre de trois chiffres										

Les chiffres adjacents sont groupés par 3; on obtient des nombres de 3 chiffres qui sont 221, 211, 110. Le nombre le plus petit et pour lequel, si possible, le chiffre des unités est un 0 (110 ici) est choisi. Pour ce nombre, la table de Mac Grady donne le nombre le plus probable de bactéries par ml ou de produit pur et ce évidemment pour l’essai à deux tubes par dilution.

Le chiffre des centaines (**1** dans le cas de **110**) correspond à la dilution à considérer pour donner le NPN par ml de produit. Ainsi dans l’exemple choisi 110 correspond à la dilution “-2” ce qui donne, d’après la table de Mac Grady, 1,3 bactéries (UFT) par ml. Ce NPP correspond donc à la dilution 10⁻², soit à un NPP de 130 bactéries (UFT) par ml de produit non dilué.

Il existe des tables de Mac Grady pour les essais à 3 ou à 5 tubes avec des volumes d’inoculum de 1 ou 10 ml et même 50 ml.

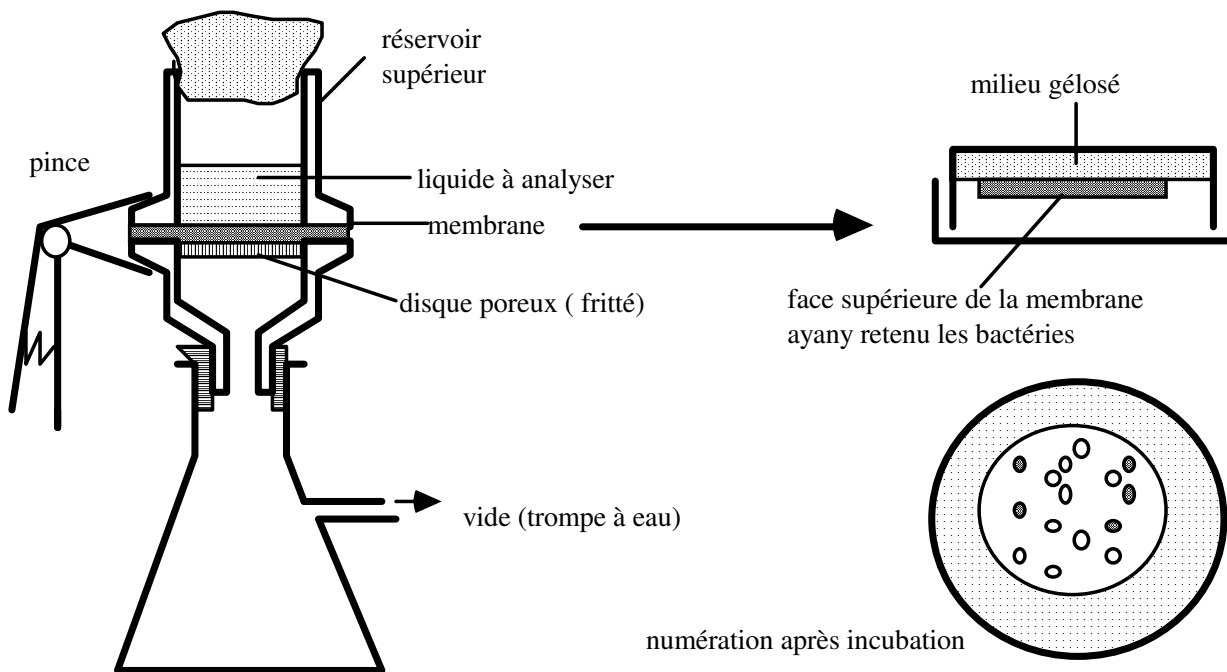
Table de Mac Grady (essai à 2 tubes)

nombre de 3 chiffres	Nombre d’UFT par ml (NPP/ml)
000	0
001	0,45
010	0,46
100	0,6
101	1,2
110	1,3
111	2
120	2,1
200	2,3
201	5
210	6,2
211	13
212	21
220	24
221	70
222	110 et plus

E - 9. Numération par filtration

Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon ou de ses dilutions au travers d'une membrane filtrante (par exemple une membrane Millipore ou Sartorius ou ...de 47 mm de diamètre et dont la porosité moyenne est de 0,45 µm à 0,22 µm) sur laquelle sont retenus les micro-organismes recherchés.

Après filtration, on rince l'entonnoir supérieur avec de l'eau distillée stérile ou avec une solution tamponnée stérile afin de récupérer la totalité des germes et d'éliminer du filtre lui-même d'éventuels agents microbicides. Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu de numération imbibant un filtre adéquat ou sur un milieu gélosé spécifique du germe à rechercher, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation, comme dans le cas de la numération en milieu gélosé, on compte les colonies formées à la surface du filtre.



Cette méthode présente certains avantages par rapport aux méthodes déjà écrites. Ainsi, le temps d'incubation est généralement plus court (18 heures au lieu de 24 heures), le volume d'échantillon analysable plus grand (jusqu'à plusieurs litres, ce qui permet de réaliser des numérations de germes dans des liquides en contenant très peu tels que certaines eaux) ; il n'y a aucune interférence entre micro-organismes (séparés à la surface du filtre et nourris par diffusion du milieu de culture au travers des pores) et les agents microbicides associés au produit sont éliminés (chlore, antibiotiques, conservateurs etc.).

Les différences existant entre les résultats des numérations spécifiques d'un micro-organisme donné ont le plus souvent comme origine la nature du milieu de culture choisi ainsi que la méthode utilisée, la température et la durée de l'incubation sans omettre les variations liées au manipulateur.

E - 10. Interprétation des numérations

E - 10 - a. Calcul de la charge microbienne du produit

Il faut, à partir du nombre d'unités formant colonies ou du NPP déterminé pour une dilution donnée, "remonter" au produit analysé.

Dans le cas d'un produit liquide, cela ne présente aucune difficulté puisqu'il suffit de multiplier le nombre ou le NPP trouvé à une dilution donnée par l'inverse de celle-ci. Si par exemple 256 colonies ont été comptées dans la boîte ensemencée à partir de 0,1 ml de dilution 10^{-3} du produit, le nombre d'UFC par ml de produit est égal à :

$$256 \times 1 / 0,1 \times 1 / 10^{-3} \text{ soit de } 256.10^4 \text{ UFC / ml.}$$

Dans le cas d'un produit solide, le broyage ou la mise en suspension initiale est considérée comme une dilution dont il faut tenir compte. Si par exemple 10 g de produit ont été mis en suspension dans 90 ml de bouillon tryptone-sel, on considère que 1 ml de cette suspension correspond à 0,1 g de produit. Il s'agit là d'une approximation car en toute rigueur, il faudrait procéder à la mise en suspension en prenant un poids donné de produit et en complétant à un volume précis par du diluant. Il est possible parfois de prendre en considération la teneur en eau du produit.

L'appréciation quantitative d'une flore microbienne donnée présente dans un aliment ou dans l'eau est souvent imprécise. Cette imprécision, outre les aléas biologiques, tient surtout à l'inévitable hétérogénéité du produit et des dilutions, hétérogénéité donnant lieu à des prélèvements dont la richesse en micro-organismes est variable. En effet les germes sont distribués de façon aléatoire et non uniforme, même après homogénéisation parfaite. Leur répartition s'effectue suivant la loi de POISSON¹, ce qui permet d'estimer la grandeur et la probabilité des variations. En milieu liquide, la mesure s'effectuant par l'appréciation présence ou absence, l'imprécision est plus grande.

1) La loi de Poisson est la loi suivie par une variable aléatoire x qui peut prendre toutes les valeurs entières positives (1,2,3...k) avec une probabilité P égale à :

$$P = \frac{a^k}{k!} \cdot e^{-a}$$

La loi est discontinue, la moyenne est a , la variance est aussi a

La densité microbienne d'un produit, exprimée par le nombre de germes par ml ou par g, est définie comme la moyenne du nombre de germes de toutes les fractions de 1 ml ou 1 g du produit: il s'agit du nombre total de germes présents dans le volume ou le poids total, divisé par ce volume ou ce poids.

La précision des dénombrements est mesurée par un paramètre de dispersion : le coefficient de variation V. V est le rapport, exprimé en %, de l'écart type à la moyenne des résultats obtenus par répétition de l'analyse du même produit. L'écart type est la racine carrée de la moyenne des carrés des écarts par rapport à la moyenne de la population.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n}} \quad V = \frac{\sigma}{\bar{x}} \times 100$$

L'estimation du nombre de germes peut être limitée par un intervalle de confiance (par exemple dans lequel on a 95 chances sur 100 de trouver la vraie valeur).

E - 10 - b . numération en milieu solide

La valeur de la densité microbienne de l'aliment est obtenue en multipliant le nombre de colonies observées (par comptage manuel ou automatique) par un facteur tenant compte du volume ensemencé et de la dilution.

Exemples :

- pour du lait (liquide) 150 colonies sont comptées dans une boîte de Pétri ensemencée avec 1 ml d'une dilution 10^{-3} . La densité microbienne sera de 150.10^3 UFC par ml de lait.
- pour un aliment solide il faut en toute rigueur tenir compte de l'eau qu'il contient ou réaliser la première dispersion à partir de x g de produit et rajouter le diluant en quantité suffisante pour y ml.

Le coefficient de variation V et les limites de confiance exprimées en % de l'estimation sont indépendants du facteur de dilution.

Le dénombrement obéissant à la loi de Poisson se caractérise par un écart type égal à la racine carrée de la moyenne ($\sigma = \sqrt{x}$).

Ainsi, si la densité microbienne du produit, la dilution et le volume ensemencée sont tels que l'on obtienne une moyenne x de colonies dans le milieu gélosé, on aura :

$$V = \frac{100}{\sqrt{x}}$$

Les limites de confiance à 95 % sont :

$$IC\ 95\ \% = \frac{1,96 \sqrt{N}}{n}$$

Le résultat s'exprime alors de la façon suivante :

$$\frac{N}{n} \pm \frac{1,96 \sqrt{N}}{n}$$

avec N nombre total de colonies comptées à une dilution donnée et n = nombre de boîtes comptées à cette dilution. Si n = , on a un intervalle de confiance à 95 % qui est égal à :

$$N \pm 1,96 \sqrt{N} \text{ soit } N \pm 2 \sqrt{N}$$

Remarque : le calcul de l'intervalle de confiance ne peut être réalisé qu'à partir des **colonies réellement comptées**. La prise en compte du facteur de dilution n'est réalisée qu'après.

Les coefficients de variation et les intervalles de confiance pour un nombre donné de colonies comptées sont indiqués ci-après.

nombre de colonies	coefficient de variation	Intervalle de confiance 95 %	
10	31	4	16
20	22	11	29
30	18	19	41
50	14	36	64
100	10	80	120
200	7	172	228
300	5,7	265	335
400	5	360	440
500	4,4	455	545

L'évaluation visuelle du nombre de colonies dans une boîte de Pétri de 9 cm de diamètre se limite aux environs de 300 unités. L'utilisation d'un analyseur d'image ou d'un compteur laser permet d'estimer jusqu'à 1000 colonies par boîte et donc d'améliorer la précision.

Pour obtenir, par la méthode d'appréciation visuelle, un nombre élevé de colonies et donc une bonne précision dans sa mesure, il est possible d'ensemencer plusieurs milieux gélosés à partir d'une dilution considérée; N se rapporte alors aux germes présents dans l'ensemble des géloses et peut atteindre des valeurs élevées grâce d'une bonne précision.

Il apparaît ici clairement que le coefficient de variation et l'intervalle de confiance dépendent du nombre de colonies présentes dans la gélose et qu'il convient donc d'effectuer les numérations à partir de boîtes dans lesquelles le nombre de bactéries est compris entre 30 et 300 (pour une boîte et plus pour n boîtes). Au-dessous de 30, V est trop grand; au-dessus de 300 par boîte, le comptage devient très difficile).

Il faut encore signaler que cette étude au cours de laquelle on estime que les micro-organismes sont distribués selon la loi de Poisson n'a de signification que dans des conditions idéales (distribution au hasard dans le produit, prises parfaitement aliquotes, toute bactérie produit une colonie, comptage réalisé sans erreur etc...).

E - 10 - c. Numération en milieu liquide

L'estimation de la variabilité des résultats obtenus par ces méthodes est plus délicate car les formules utilisées dans ce cas sont très complexes et font appel à des lois statistiques qui s'appliquent dès la détermination du NPP .

La principale difficulté de cette technique de numération réside dans le fait que les tables des nombres les plus probables (NPP) sont le fruit de calculs mathématiques et statistiques et qu'elles ne représentent qu'une probabilité de résultat. Il faudrait donc que le NPP soit toujours associé aux limites de confiance (par exemple à 95 %).

1) Numération avec une seule dilution dans n tubes

Il s'agit ici d'un système peu courant en microbiologie alimentaire . L'estimation du nombre probable moyen par portion de liquide inoculé est égale à :

$$N = NPP = Ln \left[\frac{n}{n - p} \right]$$

avec p = nombre de tubes positifs.

Le coefficient de variation V dépend de N et de n. Pour une valeur donnée de n il atteint son minimum (égal à 124 n) pour un N attendu de 1,6 (ou 80 % de tubes positifs). L'intervalle de confiance est tiré de tables.

n \ N	0,15	0,5	1	1,6
3	155			
5	120	72		
10	85	51	41	
20	60	36	29	28

Valeurs du coefficient de variation en fonction de N et n.

L'intervalle de confiance peut être calculé ou trouvé dans des tables. Ainsi, pour un intervalle de confiance à 95 % on a par exemple:

n	p	NPP	Intervalle de confiance 95 %	
3	2	1,1	0,1	4,8
5	4	1,61	0,3	5,3

Dans cette technique la numération est obtenue systématiquement avec des excès de l'ordre de 20, 13, 7 et 5 % respectivement avec les essais à 3, 5, 10 et 20 tubes. Cette erreur représente l'excès de la moyenne de tous les NPP possibles par rapport à la valeur vraie.

2) Numération avec plusieurs dilutions décimales de n tubes

L'ensemencement d'une dilution unique risque de déboucher sur une série entièrement positive (NPP = ∞) ou entièrement négative (NPP = 0) ou tout au moins sur un V élevé. En l'absence d'information sur la densité microbienne à estimer on effectue plusieurs dilutions. C'est cette approche qui est fréquemment utilisée en microbiologie alimentaire.

L'estimation du NPP nécessite l'emploi de tables. V est ici plus stable pour un n donné (entre certaines limites de densité microbienne). Pour quatre dilutions décimales de n tubes chacune, si la première reçoit par exemple 1 ml par tube et la dernière 1.10⁻³ ml par tube, la densité microbienne à la première dilution devra être comprise entre 1 et 10³ germes par ml. Dans ce cas on a :

$$V = 100 \sqrt{e^{\left(\frac{1,61}{n}\right)} - 1}$$

et les limites de confiance à 95 % sont égales à :

$$\text{NPP.} \left(e^{\sqrt{\frac{1}{n}}} \right)^{\pm 2,5}$$

Les valeurs de V et les limites de confiance à 95 % pour des essais à 2 , 3 , 5 et 10 tubes sont indiquées dans le tableau ci-après :

n	V	intervalle de confiance à 95%
2	110	0,17.NPP - 5,85.NPP
3	84	0,24.NPP - 4,23.NPP
5	62	0,33.NPP - 3,06.NPP
10	42	0,45.NPP - 2,20. NPP

Tableau des intervalles de confiance dans la numération en milieu liquide

E - 10 - d. Exemple d'exploitation statistique de résultats expérimentaux

Analyse d'un plat cuisiné : 25 g homogénéisés dans 225 ml de bouillon tryptone-sel (homogénat appelé produit). Des dilutions décimales sont réalisées dans le même diluant. Les coliformes totaux sont comptés en milieu solide (VRBL, 1 ml par boîte, 2 boîtes par dilution) et en milieu liquide dans des milieux BLBVB (essai à 2 tubes, 1 ml par tube).Les résultats sont les suivants :

	produit	dilution			
		10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
DCL	325	29	5	1	0
	378	39	2	1	0
BLBVB	+ +	+ +	+ +	+ -	- -

Le nombre significatif pour le BLBVB est de 210 , ce qui donne un NPP de 6,2 UFT de coliformes / ml pour la dilution 10⁻². L'intervalle de confiance à 95 % autour de ce NPP est : 6,2.0,17 UFT/ ml à 6,2. 5,85 UFT / ml soit de 1,05 à 36,3 UFT / ml à la dilution 10⁻². Le résultat est alors :

NPP de coliformes égal à 6,2.10³ UFT / g avec un IC 95% compris entre 1,05.10³ UFT /g à 36,3 .10³ UFT / g.

Le nombre total de colonies à partir du produit est de 703 colonies. Le nombre d'UFC de coliformes est de 703 / 2 soit de 351 UFC / ml de produit. L'intervalle de confiance à 95 % est égal à :

$$\frac{2 \cdot \sqrt{703}}{2} = 26,5$$

Ramené au plat cuisiné on a alors : **N = 3,5.10³ UFC coliformes / g** avec un IC 95% égal à 0,265.10³ UFC coliformes / g soit de 0,3.10³ UFC coliformes / g.

Le nombre total de colonies comptées à partir de la dilution -1 est de 68. Le nombre d'UFC est de 68 / 2 soit de 34 UFC / ml de dilution -1. L'intervalle de confiance à 95 % est égal à :

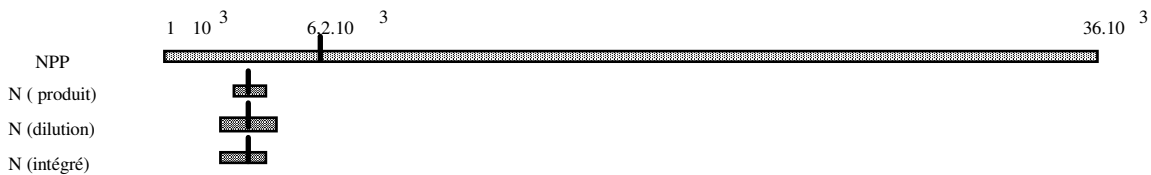
$$\frac{2 \cdot \sqrt{68}}{2} = 8,2$$

Ramené au plat cuisiné on a alors : **N = 3,4.10³ UFC coliformes / g** avec un IC 95% égal à 0,82.10³ UFC coliformes / g .

Si on prend en compte les résultats obtenus avec les deux dilutions on a alors :

N = (3,5 + 3,4).10³ UFC coliformes par g / 2 soit **N = 3,45.10³ UFC coliformes par g** avec un IC 95% qui est égal à (0,265.10³ + 0,82.10³) / 2 = 0,54.10³ UFC coliformes / g .

Si on schématise les résultats trouvés et leur intervalles de confiance on obtient :



Il n'est pas étonnant de trouver autour du NPP un IC 95% très grand car l'essai n'est qu'à 2 tubes.

E - 10 - e. Conclusions

La numération en milieu liquide est accompagnée d'une erreur systématique et cette technique est moins précise que la numération en milieu solide. Pour obtenir un même coefficient de variation dans les deux cas (14 % en milieu solide, N = 50), il faudrait utiliser en milieu liquide des galeries de 82 tubes.

Cette conclusion pourrait faire abandonner la technique en milieu liquide ; cependant cette dernière peut posséder une spécificité sans équivalent en milieu solide, ou encore être beaucoup plus sensible (1 à 2 germes par ml ou 10 ml).

En milieu solide, il faut noter que l'étalement en surface conduit à des valeurs uniformément inférieures à celles enregistrées après inoculation dans la masse (du fait de l'adhésion des bactéries à l'ensemencement).

E - 11. Le contrôle de conformité par rapport à une norme

Le concept de norme guillotine a longtemps prévalu et utilisait les résultats fournis par la laboratoire abusivement : toute valeur qui dépassait un seuil fixé, c'est à dire la norme ou le critère, était considérée comme une faute. Ce comportement répressif reposait sur la certitude accordée au résultat.

Or, les causes de variabilité (ou d'erreurs) sont nombreuses et se situent au niveau :

-de l'échantillon : sans plan d'échantillonnage les normes n'ont pas de signification. Il faut que l'échantillon soit représentatif pour extrapoler à l'ensemble du lot

- du traitement de l'échantillon (modalités de décongélation , hétérogénéité)
- des méthodes d'homogénéisation
- des suspensions mères et des dilutions
- des milieux de culture
- de l'incubation
- de la lecture
- de la nature de la flore (compétition etc)
- de la qualité de travail de l'opérateur
- de l'existence de germes stressés

Il faut donc analyser les résultats en s'appuyant sur une réglementation qui fixe n à 5 et $c \leq 2$ et qui tolère un écart entre m et M de 1 log. Le plan à 3 classes est universellement adopté sauf pour *Salmonella* qui est recherchée par un plan à 2 classes de type présence ou absence.

Si on désire déclarer un aliment conforme à une norme ou non (ou encore l'accepter ou le refuser) on adopte une démarche dans laquelle un critère de conformité ou nombre d'acceptation c est choisi.

Le raisonnement le plus simple est de choisir la norme et de la comparer avec l'estimation de la densité microbienne. Or il se peut que l'imprécision de la méthode fasse rejeter des aliments tout juste conformes et il devient nécessaire de fixer une marge de tolérance en déplaçant vers la "droite" le nombre d'acceptabilité.

On définit alors :

- une probabilité α (risque du producteur) pour qu'un aliment tout juste conforme soit refusé (mesure supérieure au critère)

- une probabilité β (risque du consommateur) pour que soient acceptés les aliments (mesure inférieure au critère) de degré de non conformité donné.

Dans la pratique on adopte un nombre d'acceptation tel que le producteur ne soit exposé qu'à un risque raisonnable (5 % par exemple) en s'efforçant de choisir un mode opératoire qui réduise au maximum les risques pour le consommateur.

La protection du consommateur qui est liée à l'efficacité du contrôle peut s'évaluer (avec un nombre d'acceptation c fixé) par le rapport :

$$R = 100 N_1 / N_2$$

avec

$N_1 = N_{\alpha 0,05}$: le nombre de germe donne lieu à une probabilité de refus de 5%

$N_2 = N_{\beta 0,1}$: le nombre de germes donne lieu à une probabilité d'acceptation de 10 %.

Ainsi, pour un contrôle réalisé en milieu solide, on fixe d'abord le nombre d'acceptation c (ou nombre maximum toléré de colonies dans le milieu gélosé). R augmente avec c , mais on choisit une valeur de c généralement comprise entre 50 et 100.

Avec un c égal à 50 on a $N_1 = 39,7$ $N_2 = 59,9$ et $R = 66,3$.

Pour un aliment tout juste conforme (avec une norme T de 100 germes par ml ou g) il faut procéder de telle sorte que la gélose présente N_1 (39,7) germes en moyenne; c'est en effet la condition pour que cet aliment n'ait que 5 chances sur 100 d'être refusé. Il faut donc déposer sur la gélose l'équivalent de $N_1/T = 39,7 / 100$ (ml ou g) du produit.

La valeur

$$\frac{N_2 \cdot T}{N_1} = \frac{100 T}{R} = 151 \text{ germes / ml ou g}$$

nous indique la densité microbienne d'un aliment qui a encore 10 chances sur 100 d'être accepté. La même démarche est applicable au contrôle en milieu liquide.

II. GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Tous les germes pathogènes qui peuvent être transmis par les aliments et les espèces de microorganismes capables d'altérer les aliments sont à considérer. Il en est de même des produits toxiques résultant de la présence des microorganismes (toxines, métabolites toxiques).

Parmi les germes importants en microbiologie alimentaire on peut citer, sans entrer dans le détail* les germes suivants :

(*pour plus de détails se référer au document « Maladies microbiennes liées à la consommation d'aliments »)

A. Clostridium botulinum

Ce germe fait courir un très grand risque de contamination bactérienne à de nombreux aliments, notamment les conserves (boîtes et bouteilles) qui subissent un traitement thermique insuffisant. Cependant les tests de routine permettant de le rechercher ne sont que très rarement réalisés : il ne peut exister aucun plan d'échantillonnage satisfaisant pour assurer une protection adéquate, et ce, en raison de la très grande toxicité de l'exotoxine synthétisée par le germe. Le contrôle est obtenu au moyen de spécifications à effectuer en cours de fabrication ou pendant l'entreposage (caractères de l'aliment tels que pH, activité de l'eau, addition de nitrites, stérilisation si possible, température d'entreposage, etc).

Le germe peut être recherché dans un aliment soupçonné d'être à l'origine d'une intoxication. L'aliment est mis en culture et on évalue la toxicité du filtrat (ou du surnageant de centrifugation) par injection à la souris, en utilisant les antitoxines appropriées pour les tests de protection. Cette méthode dangereuse demande beaucoup de temps. Actuellement la recherche des germes au moyen d'anticorps fluorescents est au point et la mise en évidence de la toxine peut être effectuée par électro-immunodiffusion. Néanmoins si le microbiologiste/technologue est amené à rechercher ce germe, c'est qu'il n'a pas maîtrisé l'ensemble des points critiques concernant ce germe.

B - Salmonella sp

Les nombreuses espèces de Salmonelles diffèrent énormément entre elles quant à leur pouvoir pathogène. Bien que la plupart des espèces puissent se retrouver dans les aliments, les normes visent en général celles qui sont à l'origine de toxi-infections plutôt que celles qui sont à l'origine des maladies infectieuses graves (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes).

La recherche des germes est complexe et il n'existe pas encore de technique standard rapide. Ainsi la nature du milieu de pré-enrichissement, celle du milieu d'enrichissement, la température d'incubation de ces milieux, la nature de la gélose sélective et les méthodes d'identification biochimique sont encore l'objet de nombreuses controverses.

De plus, certains plans d'échantillonnage requièrent l'examen d'une cinquantaine d'échantillons. Ces échantillons peuvent être mélangés et soumis au pré-enrichissement ; si $c > 0$, ils doivent être traités individuellement.

Parmi les nouvelles méthodes d'isolement et d'identification (non encore retenues) on peut citer : l'utilisation du phage général pour *Salmonella* (Felix 0-1), l'usage de sérums polyvalents pour les tests d'agglutination, la technique d'immunofluorescence ou immunoenzymatique et enfin les techniques par hybridation ADN-ADN déjà commercialisées sous forme de kits qui semblent très prometteuses.

C - Shigella sp

Ces germes sont souvent traités avec *Salmonella* en ce qui concerne les normes. Ces bactéries sont cependant plus souvent présentes que les *Salmonella* dans l'eau et les légumes frais exposés à une contamination fécale.

D - *Escherichia coli* entéropathogène

Ce germe est bien connu comme étant l'agent de maladies transmissibles par les aliments. Il n'existe cependant pas de techniques et de tests de pathogénicité standardisés. Le sérotype O157 H7 provoque une colite hémorragique sévère.

E - Les entérobactéries

Quatre groupes bactériens de cette famille sont utilisés comme germes indicateurs de contamination fécale: les coliformes, les coliformes fécaux assimilés souvent aux coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* et les "entérobactéries". Cependant, si les coliformes et *E. coli* sont des indicateurs valables de la pollution bactérienne des eaux, ils sont utilisés différemment pour les tests applicables aux aliments. La recherche de *E. coli* et des coliformes fécaux est réalisée pour surveiller la contamination d'origine fécale d'aliments n'ayant pas subi de traitements destinés à détruire les entérobactéries : les crustacés et les mollusques par exemple. La recherche des coliformes fécaux est souvent préférée à celle d'*E. coli* en raison de sa rapidité. Il faut signaler ici que le groupe des coliformes fécaux est défini "administrativement" et non sur des bases taxonomiques ; ils ne sont pas forcément *E. coli* et *E. coli* ne représente pas forcément l'ensemble des coliformes fécaux.

La recherche des coliformes est actuellement effectuée dans des aliments transformés (produits pasteurisés etc...). Elle permet de mettre en évidence l'insuffisance du processus ou de mauvaises conditions de fabrication (recontamination par exemple). Pour leur recherche dans le lait la température d'incubation est abaissée à 30°C pour inclure davantage d'espèces d'origine non fécale. L'acceptation du terme fécal peut être large et la recherche des coliformes peut constituer un indicateur de la présence de germes Gram négatif (les bactéries Gram positif et lactose négatif sont exclues). La recherche des entérobactéries dans laquelle ne sont exclues que quelques bactéries Gram négatives mais tous les bacilles et coques Gram positifs est souvent réalisée. Dans cette recherche le milieu contient du glucose (et non du lactose) et on dénombre ainsi certains germes lactose négatifs (*Salmonella*, *Shigella*) et certaines souches d'*E. coli* entéropathogènes qui ne sont pas retrouvées par colimétrie. Inversement cette épreuve permet de détecter des souches de *Salmonella* lactose positives qui échappent à la plupart des méthodes de recherche de *Salmonella*.

Pour le contrôle de la conformité aux normes, la numération de ces germes se fait en milieux solide (DCL) ou liquide (BLBVB et estimation du NPP). Trois séries de milieux sont utilisées pour les épreuves des coliformes, des coliformes fécaux et de *E. coli* . Parmi les milieux liquides, le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) et le bouillon tryptose au lauryl sulfate sont les plus utilisés.

Dans les recommandations de l'ICMSF de 1974, les valeurs de m pour les coliformes sont de moins de 3 à 10³ par ml ou g d'aliment, ce qui rend difficile l'utilisation de milieux solides.

F - *Staphylococcus aureus* et l'entérotoxine staphylococcique

Ce germe Gram positif halophile est souvent isolé ou dénombré dans des milieux fortement salés (Chapman). Cependant on sait depuis peu que les cellules "stressées" au cours des traitements technologiques ne sont pas récupérées quantitativement sur les milieux salés (liquides ou solides) ce qui a conduit à l'adoption d'autres milieux comme le milieu de BAIRD PARKER.

Les *Staphylococcus aureus* coagulase positive souvent recherchés ne sont pas forcément entérotoxigènes; par contre ceux qui sont coagulase négative ne synthétisent souvent pas de toxine.

Le nombre de staphylocoques tolérés dans les aliments est généralement peu élevé, ce qui nécessite l'utilisation de milieux liquides (milieux de GIOLOTTI CANTONI ou bouillon de soja - trypticase - 10 % NaCl).

La recherche de l'entérotoxine devrait être effectuée dans des produits où la production de toxines est suivie de la mort des staphylocoques. On estime à l'heure actuelle qu'il faut au moins 5.10⁵

staphylocoques par g ou ml de produit pour engendrer une maladie. Pour détecter les entérotoxines on utilise les techniques de diffusion en milieu gélosé (sur lame) ; il faut dans une première étape concentrer la toxine de plus de 100 fois. Les épreuves radioimmunologiques peuvent être utilisées dans les analyses de routine (méthode coûteuse), de même que la technique ELISA. Ces méthodes sont spécifiques des diverses toxines et il est possible que certaines entérotoxines n'aient pas encore été identifiées. Toute norme devrait donc préciser les toxines à rechercher. La recherche d'une ADNase thermostable pourrait constituer une indication de la présence de staphylocoques entérotoxigènes.

G - Vibrio

1 - *Vibrio cholerae*

Le choléra est une maladie grave qui, est le plus souvent, transmise par l'eau. La recherche de ce germe ne se fait que dans des aliments soupçonnés d'être à l'origine de la maladie ou dans des régions à risque élevé.

2 - *Vibrio parahæmolyticus*

Ce germe d'origine marine est de plus en plus largement reconnu comme responsable d'une toxique infection alimentaire par suite de la consommation de produits de la mer. La recherche de ce germe halophile est réalisable après enrichissement (bouillon salé à la colistine); pour sa numération on utilise un milieu gélosé (gélose saccharosée, aux sels biliaires, au citrate et au thiosulfate : TCBS). La réaction de KANAGAWA (mise en évidence d'une β -hémolyse sur milieu de WAGATSUMA additionnée de chlorure de sodium) permet la mise en évidence du germe.

3 - *Vibrio sp* non agglutonnants

La maladie attribuée à ces vibrions inspire des préoccupations croissantes en rapport avec des aliments provenant de certaines régions d'extrême Orient. Aucune norme visant ces germes n'est encore envisagée.

H - *Brucella sp*

La brucellose est une maladie infectieuse grave liée à la consommation d'aliments bien particuliers, le fromage de chèvre étant souvent mis en cause. Elle ne poserait aucun problème si le lait destiné à leur fabrication était pasteurisé. La recherche de cette bactérie se fera par hybridation ADN-ADN, alors que la recherche des anticorps anti-*Brucella* dans les produits laitiers se fait par le ring test.

I. *Clostridium perfringens*

Ce germe tellurique anaérobie strict est très largement répandu dans l'environnement et est responsable de toxico-infections. Les viandes sont fréquemment contaminées; ce germe ne présente dans la plupart des cas de risques pour le consommateur qu'après mauvaise manutention/gestion d'un aliment après cuisson. Ce germe produit au cours de sa sporulation une entérotoxine qui est libérée au moment de sa germination. Cette toxine est détectable par diverses méthodes (anticorps fluorescents, hémagglutination). Actuellement on réalise surtout l'isolement ou la numération des formes végétatives et des spores de ce microorganisme. Parmi les principaux milieux utilisés on peut citer : la gélose au sang au sulfate de néomycine, la gélose tryptone sulfite à la néomycine et la gélose sulfite à la polymyxine et à la sulfadiazine (SPS). *C. perfringens* est toléré dans les aliments en nombre relativement faible (entre 1 et 100 par g ou ml). Le recours à des méthodes d'enrichissement est envisagé pour certains produits (aliments diététiques et de régime). Des méthodes de recherche par hybridation ADN-ADN sont au point.

J - *Bacillus cereus*

Ce germe est très largement répandu dans l'environnement. Les risques liés à la présence de ce germe apparaissent quand l'aliment est mal manutentionné au cours de sa préparation finale avant

consommation. Pour sa numération, on utilise la polymyxine comme agent sélectif. L'observation de ses caractères lécithinase + et de mannitol - permet une numération sélective.

K - *Streptococcus sp*

Les maladies provoquées par les streptocoques hémolytiques sont fréquemment transmises par les aliments, mais leur fréquence est faible. Ainsi les normes visant *Streptococcus pyogenes* sont rares. Il est peu courant que les streptocoques fécaux soient impliqués dans des maladies d'origine alimentaire. Les entérocoques sont des indicateurs de contamination fécale en particulier dans les aliments congelés où ils survivent plus longtemps et mieux que les coliformes.

L - *Listeria monocytogenes*

La listériose est une maladie provoquée par la consommation de lait et surtout de fromages contaminés mal pasteurisés. Ce germe est capable de survivre longtemps dans des conditions défavorables et son caractère cryophile le rend particulièrement dangereux dans les produits réfrigérés. La recherche du germe par les méthodes traditionnelles est fastidieuse et longue. La recherche par hybridation ADN-ADN, les méthodes immuno-enzymatiques réalisées après enrichissement sont des techniques de recherche actuelles et dont la « modernisation » est continue.

M - *Campylobacter jejuni*

La campylobactériose est une maladie très répandue provoquée par cette bactérie qui est un hôte normal de l'intestin de nombreux animaux comme le poulet ou la dinde dans l'intestin desquels la charge microbienne est de l'ordre de 10^6 et plus. Ce sont surtout les aliments d'origine animale (volailles plus particulièrement) mal cuits qui sont à l'origine de la maladie. Ce germe est sensible aux traitements thermiques et ne se multiplie pas en-dessous de 30°C .

N - *Yersinia enterocolytica*

La yersiniose est une maladie provoquée par cette bactérie ingérée le plus souvent avec des aliments crus (lait, coquillages, viandes, volailles). Seules certaines souches sont pathogènes; ce germe est très sensible à la chaleur et est facilement détruit par cuisson ou pasteurisation.

L - Levures et moisissures

Les levures et moisissures sont des agents importants de détérioration des aliments acides ou à faible activité d'eau. Les mycotoxines qu'ils excrètent et présentes dans les aliments inspirent des préoccupations croissantes.

Ces microorganismes sont souvent isolés et dénombrés sur des milieux acidifiés (gélose glucosée à la pomme de terre, gélose à l'extrait de malt). Le pH bas de ces milieux n'inhibe pas toutes les bactéries et il peut même inhiber certaines levures ou moisissures. Certains milieux contiennent des antibiotiques ou autres agents antibactériens (gélose glucosée à l'oxytétracycline et extrait de levure (OGA) et gélose à la chlortétracycline et au rose de bengale (RBC).

L'interprétation du comptage des levures dans les aliments est simple. Par contre la signification des dénombrements des moisissures est considérablement influencée par les traitements d'homogénéisation et la forme principale sous laquelle se présente la moisissure : développement mycélien ou au contraire sporulation vigoureuse.

III. PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

L'analyse microbiologique des aliments est règlementée et au cours du contrôle qui peut être effectué par des laboratoires d'Etat ou des laboratoires agréés une distinction est faite entre produit non conforme et produit toxique. Ainsi les normes microbiologiques appliquées à un aliment donnent en général les limites de conformité et de toxicité de même que les méthodes à utiliser (normes de l'Association Française de Normalisation par exemple).

Le plus souvent ces normes imposent que l'aliment soit exempt de tout germe pathogène ou de toxine microbienne et que la flore totale soit peu abondante (au point de vue sanitaire, la flore totale n'est pas considérée dans le cas des produits fermentés).

Généralement l'analyse d'un aliment n'est pas systématique et elle peut reposer sur des présomptions. Le contrôle de la qualité sanitaire est basé sur la numération des **germes totaux** (flore hétérotrophe aérobie mésophile totale) de l'aliment et sur la recherche de **germes indicateurs** de contamination fécale tels que les coliformes (souvent associés à des flores pathogènes comme les *Salmonella* ou les *Shigella*), les entérocoques, les phages fécaux actifs sur la flore intestinale, de germes indicateurs d'une contamination tellurique comme les anaérobies sulfite réducteurs ou encore et en fonction de la nature du produit sur la recherche de germes ubiquitaires et d'origine humaine ou animale comme les *Staphylococcus*. Certains germes dangereux appartenant aux genres *Salmonella*, *Vibrio*, *Brucella*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia* ou encore *Mycobacterium* sont parfois recherchés dans des produits à risques. Les résultats obtenus permettent d'éliminer les produits suspects ou contaminés et surtout d'améliorer la qualité de fabrication par élimination des points critiques.

Parmi les méthodes de recherche et de numération des microorganismes dans les aliments dans les matières premières, dans l'eau et dans les unités de production et de distribution (matériels, conditions de travail, manipulateurs, conditions de traitement, modalités d'entreposage etc) on peut citer :

A - LA NUMERATION DES GERMES TOTAUX (ou flore totale ou germes aérobies mésophiles hétérotrophes neutrophiles)

Le dénombrement des germes totaux concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles revivifiables après 72 h d'incubation à 30°C dans un milieu de culture bien défini ; il est en effet presque impossible de réaliser en un seul test le dénombrement de la flore totale réelle (composition du milieu, température d'incubation, atmosphère etc...).

Ce dénombrement effectué dans l'analyse type d'un aliment constitue un indicateur de la qualité sanitaire et reflète l'**HISTOIRE** du produit naturel. La plupart des aliments d'origine animale ou végétale non soumis à des traitements de conservation sont normalement porteurs de certains germes. Il est ainsi possible de prédire les types microbiens que l'on a le plus de chance de rencontrer tout au long de leur histoire. Ce nombre de germes totaux pourra représenter l'état de fraîcheur ou l'état de décomposition du produit. Sur le produit manipulé ou soumis à divers traitements technologiques, le dénombrement des germes totaux permettra de juger de la qualité des opérations de production, transport, entreposage etc.

Il est très important de savoir qu'un nombre peu élevé de germes peut ne pas correspondre à un produit sain (présence de germes pathogènes, présence de toxines actives dans des conditions pour lesquelles les cellules qui les ont produites n'ont pas survécu) ; par ailleurs un nombre

très élevé de germes totaux peut correspondre à un produit sain (laits fermentés, choucroute, etc...). Ce dénombrement est généralement réalisé en milieu solide.

A - 1 . Méthodologie

1 ml de la suspension mère et de ses dilutions est ensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération (15 ml de milieu en surfusion à 45-47°C , 12 ml suffisent pour le lait). Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes entre la préparation de la suspension mère et ses dilutions et le moment où la gélose est coulée.

Il est également recommandé de couler à la surface du milieu ensemencé (après solidification) une mince couche de gélose blanche ou gélose non nutritive (4 ml de gélose à 1,5 %).

Cette numération peut être réalisée par étalement en surface au moyen d'un râteau, de 100 µl du produit et de ses dilutions; l'étalement au moyen du rateau doit être effectué immédiatement avant que ces 100 µl ne soient absorbés en totalité dans la gélose.

Remarque : la stérilisation du râteau entre chaque étalement est effectuée par son immersion rapide dans de l'alcool éthylique immédiatement suivie d'un passage dans une flamme pour enflammer l'alcool résiduel dont la combustion assurera la stérilisation sans échauffement excessif ni déformation.

A - 2 . Milieux préconisés

Milieu peptone-extrait de (PCA) l'AFNOR (1973)	milieu préconisé par l'American Public Health	milieu préconisé par levure Association
peptone 6 g	peptone pancréatique	hydrolysate pancréatique
extrait de levure 3 g	de caséine 5 g	de caséine 5 g
gélose 15 g	extrait de levure 2,5 g	extrait de levure 2,5 g
eau D 1000 ml	glucose 1 g	glucose 1 g
	gélose 18 g	gélose 15 g
pH final 7,2	eau D 1000 ml	eau D 1000ml
	pH final 7,2	pH final 7,0

Les milieux sont stérilisés à 121°C pendant 15 à 20 minutes.

La lecture se fait après 72 heures d'incubation à 30°C.

Ces milieux ne conviennent pas pour les *Lactobacillus* et pour certaines espèces osmophiles. Pour la numération des thermophiles 1 ml d'inoculum est mélangé à 20 ml de milieu en surfusion avant incubation.

REMARQUE : Cette numération peut être réalisée par la méthode de filtration (pour l'eau en particulier). Dans ce cas le filtre au travers duquel est passé un volume donné d'échantillon ou de sa dilution est déposé sur le milieu de culture préalablement coulé dans la boîte de Pétri, surface porteuse des germes vers le haut et les colonies formées sont comptées après 48 à 72 heures d'incubation à 30°C (boîte retournée pour éviter les phénomènes de condensation).

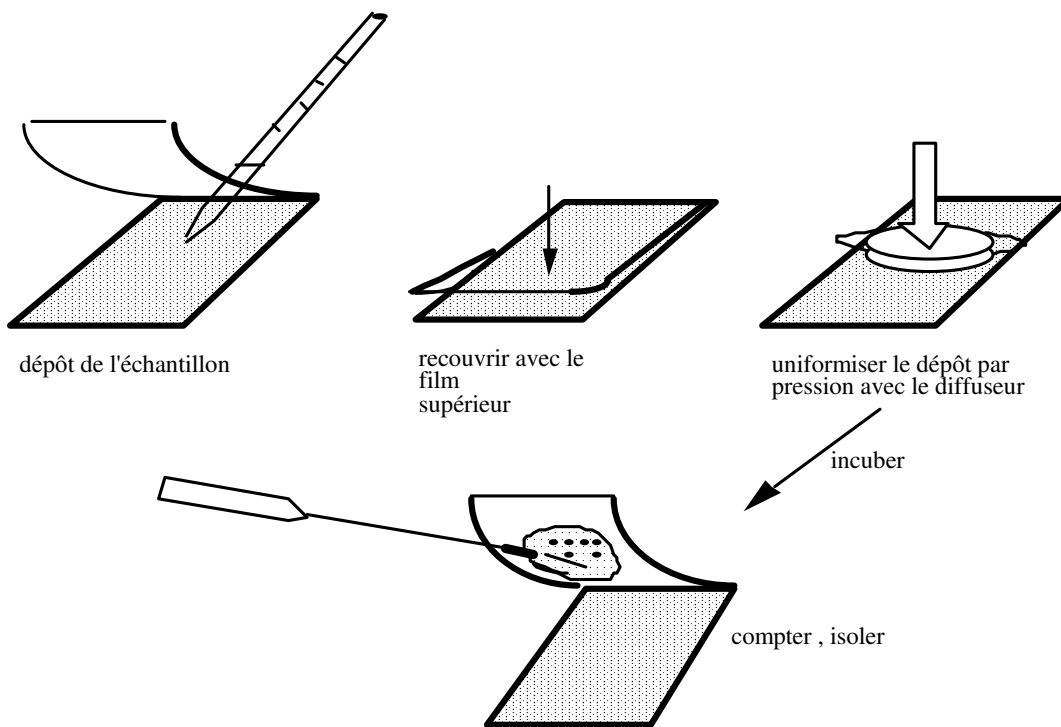
A - 3 . Dénombrement de la flore totale aérobie au moyen du Pétrifilm

(Laboratoires 3 M Santé, 40, rue G. CRIE, 92245 Malakoff Cedex, tél. 0146 57 12 34)

Il s'agit d'un système de culture / numération à "usage unique" qui peut être utilisé dans le cas d'analyses microbiologiques peu nombreuses.

Le Pétrifilm SM contient les éléments nutritifs du PCA, ainsi qu'un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. Le film inférieur est revêtu du milieu et d'un agent gélifiant; le film

supérieur sert de support à un agent gélifiant et à du chlorure de triphényltétrazolium qui est un indicateur rédox facilitant la lecture par sa réduction en formozan rouge. Pour réaliser la numération, il faut déposer le film sur une surface plate et dans une zone stérile, soulever le film supérieur et déposer lentement 1 ml de l'échantillon ou de ses dilutions au centre du film inférieur. Celui-ci est alors recouvert délicatement avec le film supérieur en évitant l'introduction de bulles d'air. La répartition homogène de l'inoculum est obtenue au moyen d'un applicateur avec lequel on exerce une légère pression sur le diffuseur. Le film est alors incubé horizontalement, le film supérieur vers le haut (il est possible d'empiler une vingtaine d'unités). Après 48 à 72h d'incubation à 30°C, le comptage des colonies est effectué.



Pour isoler des colonies destinées par exemple à une identification, on soulève le film supérieur sur lequel on effectue le prélèvement dans le gel. Après utilisation le système est autoclavé avant "mise à la poubelle".

Le film se conserve environ 1 an à 4°C dans son emballage d'origine.

D'autres systèmes « faciles » d'utilisation existent. Il vous appartient de vous tenir informés et de « moderniser » sans arrêt les méthodes utilisées en veillant à leur « validation » AFNOT ou ISO par exemple.

A - 4 . Interprétation des résultats

(Cf tableaux des critères microbiologiques de quelques aliments (fin du document)).

Il ne faut pas perdre de vue que cette numération est faussement qualifiée de totale car les germes anaérobies, les germes thermophiles, cryophiles, acidophiles etc. ne cultivent pas dans les conditions adoptées. Néanmoins, ces conditions permettent la croissance d'un grand nombre de germes dangereux et/ou susceptibles d'induire des dégradations.

On admet généralement qu'une charge microbienne $\geq 3.10^8$ par g (exception faite des produits fermentés) caractérise un produit dégradé et impropre à la consommation.

En cas d'expertise consulter la norme AFNOR V 08-011.

B - RECHERCHE D'UNE CONTAMINATION D'ORIGINE FECALE

B - 1 . La colimétrie

Les **coliformes** sont des entérobactéries (bacilles gram -, asporulés, glucose+ (F), oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz à 30°C. Il s'agit d'un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia* (avec les espèces *coli*, *intermedium*, *freudii*), *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*.

Les **coliformes fécaux**, donc d'origine intestinale, sont des coliformes qui fermentent le lactose avec production de gaz à 44°C (Tests de MAC CONKEY, 1901 ou d'EIJKMAN, 1904). On les assimile souvent aux **coliformes thermotolérants**.

Escherichia coli dont il existe de nombreux sérotypes, certains étant entéropathogènes, est identifiable dans le groupe des coliformes fécaux par le test de MACKENZIE (production d'indole à 44°C). Cette bactérie est le seul coliforme résistant au phénol à 0,85 %.

Le dénombrement des **coliformes "totaux"** est encore considéré comme un indice de contamination fécale. Or s'il s'avère que leur présence dans l'eau constitue un bon indice de contamination fécale récente, leur survie étant de courte durée dans ce milieu, il n'en est pas de même dans de nombreux aliments. Ainsi des coliformes ont été retrouvés dans d'autres sources que les matières fécales.

Le dénombrement des **coliformes fécaux (ou thermotolérants)** considérés comme des germes indicateurs de la qualité hygiénique de l'aliment, constitue par contre un bon indice de contamination à partir des matières fécales de l'homme et des animaux. Ces bactéries sont souvent associées à des entérobactéries pathogènes comme les *Salmonella* et les *Shigella*. Ces coliformes représentent environ 1 % de la flore intestinale et ne provoquent généralement pas de maladie chez l'homme adulte ; leur nombre est voisin de 10⁸ par g de matière fécale. La croissance de certains de ces germes est possible sur un très grand nombre de milieux ou d'aliments entre -2 et 50°C, entre pH 4,4 et 9.

La **résistance** des coliformes et des coliformes fécaux aux conditions extérieures défavorables est faible (traitements technologiques divers, entreposage, etc.). Ainsi leur nombre au moment de l'analyse ou fourni par l'analyse n'est pas toujours proportionnel à l'importance de la contamination ; leur présence dans un aliment cuit ou pasteurisé signifie que la contamination est postérieure au traitement thermique. Il reste alors à trouver l'origine de la contamination (manipulateurs, plans et instruments de travail, contact avec des produits crus). De plus, ces germes peuvent se multiplier dans certains produits quand les conditions sont favorables.

La plupart de ces germes n'est généralement pas, sauf en cas de prolifération abondante, dangereuse au point de vue sanitaire (attention au type de produit et de consommateur). Leur présence peut être un bon indice des mauvaises conditions de manipulation ou de traitement des aliments (pasteurisation insuffisante par exemple). Le test de différenciation entre les coliformes totaux et les coliformes fécaux (Test de Mac Conkey ou d'Eijkman) repose sur l'incubation des milieux à deux températures (30 et 44,5°C). L'effet inhibiteur de la température sur la croissance et le métabolisme des coliformes (non fécaux) à 44,5°C implique des composants cellulaires du métabolisme fermentatif et aérobie du lactose ; la perméabilité membranaire est très diminuée chez ces coliformes à 44,5°C.

Dans la plupart des analyses systématiques, la numération des coliformes fécaux et la recherche d'*E. coli* par le test de MAC KENZIE sont réalisées. Il faut cependant signaler que

la mise en évidence d'*E. coli* par cette méthode peut être erronée car certaines bactéries (*Klebsiella oxytoca* et certaines espèces de *Citrobacter*) donnent une réaction positive. Il faut alors identifier *E. coli* par la recherche de son biotype (galerie classique ou système de type API 20E ou 40E) et de son sérotype.

La **numération d'*Escherichia coli*** est un bon indice de contamination fécale. Ce germe peut être associé à des germes pathogènes. Cependant cette mesure ne permet pas de connaître, s'ils sont présents, la nature et le nombre de ces germes pathogènes.

La recherche d'*E. coli* entéropathogènes ou entérotoxinogènes est très importante au point de vue sanitaire. Ces germes sont capables de provoquer des diarrhées graves, en particulier chez les jeunes enfants avec des syndrômes ressemblant au choléra. Les *E. coli* entéropathogènes adhèrent à l'épithélium au niveau du colon et leur multiplication intracellulaire se traduit par un syndrôme ressemblant à la dysenterie (ulcérations et formation locale de lésions conduisant à la présence de sang, mucus et cellules dans les excréta). Ces germes adhèrent aux cellules de l'épithélium de l'intestin grêle et élaborent des entérotoxines (thermostables, thermolabiles ou les deux). La recherche et la numération de ces bactéries est actuellement réalisable (pour plus de détails voir par exemple: I.J. MEHLMAN et A. ROMERO, 1982, Enteropathogenic *E. coli* : methods for recovery from foods, Food Technology, March, 73-79).

Signalons enfin que la recherche et/ou la **numération des entérobactéries** comme indicatrices des mauvaises conditions de manipulation et de fabrication est parfois réalisée. Le milieu utilisé est le milieu VRBG (violet cristal, rouge neutre, bile, glucose, cf p.46) ; après ensemencement de 1 ml réalisé dans 13 ml de milieu à 47°C, 9 ml de milieu sont coulés en double couche. L'incubation dure 24 heures à 30°C. Les entérobactéries donnent des colonies rouges d'un diamètre $\geq 0,5$ mm.

La **colimétrie**, c'est à dire la numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide, soit en milieu solide (par ensemencement dans la gélose ou après filtration).

On tolère en général un nombre de coliformes inférieur à 100 par g ou ml du produit, cette tolérance étant fonction entre autre, de la nature du produit et du consommateur. Des normes bien précises sont donc définies pour chaque type d'aliment ainsi que les valeurs de n , c , m et M (cf p14).

En cas d'expertise se rapporter aux normes AFNOR V 08-015 et V-08-016

B - 1 - a . Dénombrement en milieu liquide (AFNOR, 1974)

La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1 ml de l'aliment (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon lactosé bilé au vert brillant (BLBVB). Les essais sont effectués en double ou en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady (cf page 24 et 29).

Milieu BLBVB (utilisé pour la plupart des produits alimentaires)

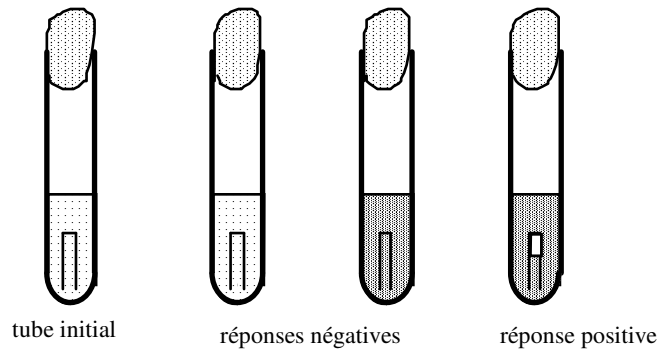
Peptone pancréatique de caséine	10 g
Lactose	10 g
Bile de bœuf déshydratée	20 g
Vert brillant	13,3 mg
Eau D	1000 ml

pH 7,2. Répartir à raison de 10 ml par tube et stériliser à 121°C pendant 15 min.

Chaque tube est préalablement muni d'un petit tube à essai renversé (cloche de DURHAM) destiné à piéger la formation éventuelle de gaz.

Le vert brillant inhibe les germes Gram+, et la bile, par son fort pouvoir tensioactif lié à la présence de sels biliaires, inhibe la plupart des germes qui ne sont pas d'origine intestinale.

Après ensemencement, les milieux sont incubés à 30°C pendant 24 h puis 48 h. Sont considérés comme positifs les tubes dans lesquels il y a croissance et une production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).



La numération des coliformes fécaux (ou *E. coli* présomptifs) est effectuée avec le même milieu mais après 48 heures d'incubation à 44,5°C.

Test de Mac KENZIE : une öse d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche , et une autre dans un tube d'eau peptonée ; si après incubation à 44°C pendant 48h il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d' *E. coli*.

Ces recherches peuvent être confirmées par l'isolement et l'identification des bactéries productrices de gaz (isolement sur EMB par exemple).

Quelques fois les milieux de culture sont utilisés à double concentration dans le but de préserver une composition finale adéquate au milieu après addition d'un volume d'inoculum égal au volume du milieu. Ceci permet la numération d'un nombre peu élevé de coliformes.

Milieu BCP : bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (colimétrie de l'eau)

- peptone 5 g
- extrait de viande 2 g
- lactose 5 g
- pourpre de bromocrésol 25 mg
- eau D 1000 ml ,
- pH 6,9

Répartir à raison de 10 ml par tube avec cloche de Durham. Stérilisation à 115°C pendant 20 minute .

Pour une analyse standard d'eau ,:

- 2 tubes avec 10 ml de bouillon à double concentration + 10 ml d'eau à analyser
- 2 tubes de bouillon normal + 1 ml d'eau à analyser
- 2 tubes de bouillon normal + 1 ml des diverses dilutions

L'incubation est de 48 heures à 30°C. Les tubes positifs (trouble et gaz) peuvent être soumis au test de Mac KENZIE .

B - 1 -b . Dénombrement en milieu solide

La numération des coliformes peut être effectuée par ensemencement de 1 ml de produit (ou de la suspension mère) et de ses dilutions dans 15 ml de milieu gélosé bilié au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) préconisé par l'AFNOR (1974) ou en milieu gélosé désoxycholate - citrate - lactose (DCL).

Milieu VRBL

Extrait de levures	3 g	3 g pour VRBG
peptone pancréatique de caséine	7 g	
désoxycholate de sodium	1,44 g	0,5 g pour VRBG
lactose	10 g	10 g glucose pour <u>VRBG</u>
NaCl	5 g	
rouge neutre	30 mg	
cristal violet	2 mg	
gélose	11g	
eau D	1000 ml	
pH = 7,4.		

Porter 1 litre d'eau à ébullition pendant 10 minutes et la ramener à la température ambiante ; ajouter lentement 37,5 g du mélange et attendre 5 minutes. Faire chauffer lentement en agitant jusqu'à ébullition. Ajuster le pH si nécessaire. Refroidir à 45°C pour l'ensemencement. NE PAS AUTOCLAVER. Ce milieu doit être utilisé rapidement après sa préparation.

1 ml de produit et de ses dilutions sont introduits dans une boîte de Pétri dans laquelle on ajoute alors et en mélangeant 13 ml de milieu à 45°C . Après refroidissement, 5 à 8 ml de ce même milieu stérile et à 45°C sont coulés à la surface et, après solidification, la boîte est incubée retournée 24 h à 30°C (ou 37°C selon les règlements).

Sur ce milieu le développement de la plupart des bactéries n'appartenant pas à la famille des entérobactéries est inhibé par le cristal violet et le sel biliaire; il en est de même avec les *Proteus* . L'utilisation du lactose est mise en évidence par le virage au rouge de l'indicateur dans la colonie.

Lecture : les colonies à considérer sont violettes à rose-rouges, d'un diamètre voisin de 0,5 à 1 mm, et entourées d'un halo rougeâtre de précipité de sels biliaires quand ceux-ci sont modifiés. Les colonies lactose- sont incolores .

Milieu DCL

bactopeptone	10 g
lactose	10 g
NaCl	5 g
K ₂ HP0 ₄	2 g (facultatif)
citrate ferrique	1 g (facultatif mais alors prendre 2 g de citrate de sodium)
citrate de sodium	1 g
désoxycholate de Na	0,5 g
rouge neutre	30 mg
gélose	13 g
eau D	1000 ml
pH = 7,2.	

Porter à ébullition de l'eau distillée pendant 10 minutes. Refroidir à 25°C. Ajouter 40,5 g de mélange pour 1 litre de cette eau ; attendre 5 minutes et faire chauffer lentement en agitant et ce, jusqu'à ébullition . Il est conseillé de NE PAS AUTOCLAVER.

Mode opératoire : 1 ml de produit et de ses dilutions sont mélangés à 13 à 15 ml de milieu maintenu à 45°C. Après solidification 4 à 6 ml de milieu stérile en surfusion sont ajoutés en surface. Après nouvelle solidification le milieu ensemencé est incubé à 30°C (ou 37°C) pendant 24 h pour la numération des coliformes totaux et à 44°C pendant 24 heures pour compter les coliformes fécaux .

Les coliformes donnent des colonies rouges dont le diamètre est supérieur à 0,5 mm . Les entérobactéries lactose - (*Salmonella* , *Shigella* , *Proteus*) et *Pseudomonas* donnent des colonies incolores.

Dans les boîtes ensemencées par étalement en surface *E. coli* donne des colonies rouges lenticulaires avec halo de précipité d'acide biliaire ; *Enterobacter* , *Citrobacter* et *Klebsiella* donnent des colonies pâles avec centre rose et halo de précipité .

B - 1 - c . Identification d'*Escherichia coli* (ou du coliforme total dominant ou du coliforme fécal)

Une à deux ôses du milieu BLBVB sont inoculées sur un milieu EMB coulé dans une boîte de Pétri (isolement par la méthode des cadrans). Après 24 h d'incubation à 37°C, la ou les colonies lactose + sont identifiées par la méthode classique (Kligler, citrate, mannitol-mobilité, urée-indole, Clark et Lubs) ou par une méthode du type API.

On considère comme *E. coli* toute souche glucose+ lactose + donnant les caractères : indole+, RM+, VP-, citrate-, Gaz+, mannitol+ et uréase-.

B - 1 - d . Colimétrie par filtration (cf chapitre E.9)

Il est possible de réaliser la colimétrie par la méthode de numération après filtration . Il est ainsi possible de réaliser la numération des coliformes ou des coliformes fécaux. Les milieux les plus souvent utilisés sont : la gélose lactosée au TTC et au tergitol ou le milieu d'ENDO ou autre.

Gélose lactosée au tergitol et au TTC

peptone	10 g	
extrait de viande	5 g	
lactose	20 g	
bleu de bromothymol	50 mg	
gélose	13 g	
eau D	1000 ml	, pH 7,2

Mélanger 47,8 g de milieu et 1 litre d'eau D à 20 °C, attendre 5 minutes et mélanger. Chauffer lentement jusqu'à dissolution à ébullition. Ramener à 45°C et ajouter :

- 50 ml d'une solution de chlorure de 2-3-5 triphényltétrazolium à 50 mg pour 100 ml d'eau D, solution préalablement stérilisée par filtration sur membrane 0,45 µm
- 50 ml d'une solution de tergitol 7 à 0,2 % d'eau D .

Mélanger , et couler à raison de 15 ml par boîte de Pétri de 90 mm.

Déposer la membrane sur la gélose et incubé 24 h à 37°C (coliformes totaux) ou 24 h à 44°C (coliformes fécaux).

Lecture : colonies violettes : réduisent le TTC. Colonies jaunes: non réductrices. Un halo jaune autour de la colonie indique la fermentation du lactose, il est bleu avec les germes lactose -

Milieu ENDO

peptone	10 g
hydrogénophosphate de K	3,5 g
sulfite de sodium	2,5 g
lactose	10 g
gélose	15 g
Fuchsine à 10 % dans l'éthanol	4 ml
eau D	1000 ml, pH 7,5

Stériliser à 120°C pendant 15 minutes.

Les coliformes donnent sur ce milieu des colonies rouges à éclat métallique doré. Les bactéries lactose - donnent des colonies incolores.

B - 1 - e . Colimétrie par le système Pétrifilm VRB

Le milieu inférieur contient un gélifiant à froid associé à un milieu bilié au cristal violet et au rouge neutre. Le film supérieur sert de support à un agent gélifiant à froid et à du chlorure de triphényltétrazolium. La fermentation du lactose par les coliformes s'accompagne de production de gaz. Celui-ci piégé par le film supérieur s'accumule autour des colonies de coliformes qui sont colorées en rouge. La numération des coliformes totaux et celle des coliformes fécaux est réalisable par incubation respective à 37 et 44°C.

B - 1 - f . Résultats

Les résultats sont exprimés en nombre de coliformes totaux ou de coliformes fécaux, ou d'*Escherichia coli* ou d'entérobactéries par ml ou par g d'aliment. Cf critères microbiologiques par aliment.

B - 2 . Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield

Les streptocoques du groupe D ou streptocoques fécaux font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux ; leur nombre varie de 10⁵ à 10⁷ par g de matière fécale. Ces germes sont par ailleurs abondamment répandus dans la nature (végétaux etc...) et de ce fait leur présence dans un aliment n'indiquera pas forcément une contamination d'origine fécale.

Ces germes ne sont pratiquement recherchés que dans les produits de la pêche et l'eau.

Parmi les streptocoques du groupe D on rencontre les espèces suivantes : *Streptococcus faecalis*, *S. faecalis* variété *liquefaciens*, *S. faecalis* var. *zymogenes*, *S. faecium* et *S. durans*. Certains auteurs ont proposé d'inclure les espèces *S. bovis*, *S. equinus* et *S. mitis* dans le groupe des streptocoques fécaux.

De toutes les bactéries non sporogènes, ces germes sont parmi ceux qui résistent le mieux à des conditions de milieu défavorables. Ces germes résistent mieux que les coliformes et *E. coli* à la réfrigération, à la congélation, au chauffage, à la salaison, à la dessiccation et à un séjour dans l'eau. De ce fait ces bactéries peuvent se multiplier dans un grand nombre d'aliments (produits acides, salés, réfrigérés etc..) qu'elles peuvent ainsi altérer.

Les streptocoques fécaux sont moins souvent associés aux germes pathogènes que les coliformes fécaux. Leur croissance est faible sur les milieux de culture (colonies de petit diamètre) ; elle est possible entre 0 et 50°C, entre pH 5 et 9,6, en présence de bile (40 %) et de chlorure de sodium (6,5 %). Ces germes sont microaérophiles.

Le groupe des streptocoques D ne renferme pas d'espèce considérée pathogène au point de vue alimentaire. Cependant, après prolifération abondante dans l'aliment, ces germes peuvent être à l'origine de toxi infections bénignes qui sont toutefois exceptionnelles.

De ce fait on tolère en général moins de 10^3 streptocoques fécaux par g ou ml d'aliment, étant entendu que cette tolérance doit être ajustée à la nature de l'aliment et au type de consommateur.

Remarque : le rapport coliformes fécaux / streptocoques fécaux est en général supérieur à 1 si la contamination est d'origine humaine, et inférieur à 1 si elle est d'origine animale.

B - 2 - a . Numération en milieu liquide

Cette numération se fait en deux étapes :

1) test présomptif

Ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de ROTHE (surtout pour l'analyse de l'eau : circulaire du 21 janvier 1960). Ce milieu contient de l'azide de sodium (NaN_3) qui inhibe la plupart des microorganismes (inhibiteur des phénomènes respiratoires). Ce milieu est peu favorable à la croissance des Streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries n'y cultivent pas. Le milieu de ROTHE est cependant moins sélectif que le milieu de LITZKY, ce qui le fait utiliser d'abord, les germes "adaptés" à l'effet inhibiteur de l'azide étant ensuite à même de s'adapter à la présence d'éthyl violet.

Milieu de ROTHE

peptone	20 g
glucose	5 g
NaCl	5 g
KH_2PO_4	2,7 g
K_2HPO_4	2,7 g
azide de sodium	0,2 g
eau D	1000 ml

pH = 6,8. Stériliser à 121°C pendant 20 minutes.

1 ml de la suspension mère (et de ses dilutions) est ensemencé dans 10 ml de milieu. Après 24 h (ou 48 h) d'incubation à 37°C , on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

2) test confirmatif

L'addition d'éthyl violet au milieu de Rothe le rend sélectif des seuls streptocoques fécaux.

Le milieu de LITZKY utilisé est en fait de milieu de Rothe additionné de 0,5 mg d'éthyl violet par litre. Ce milieu est ensemencé à partir d'une öse prélevée dans les milieux de Rothe positifs. Après 24 h d'incubation (ou 48 h) à 37°C , on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien avec parfois formation d'un culot violet (dans le cas où il se forme un culot violet, le trouble peut être très léger). Pour identifier l'espèce, procéder à un isolement à partir d'une öse prélevée sur milieu de Litzky ou de Rothe sur un milieu de BARNES.

B - 2 - b . Numération en milieu solide

Cette méthode n'est utilisable qu'en présence d'un grand nombre de streptocoques fécaux.

milieu de SLANETZ et BARTLEY (méthode par filtration)

peptone tryptique de caséine	20 g
extrait de levure	5 g
Na ₂ HPO ₄	4 g
azide de sodium	0,4 g
chlorure de triphényltétrazolium	0,1 g
glucose	2 g
gélose	10 g
eau D	1000 ml

pH = 7,2. Dissoudre le milieu à chaud. NE PAS AUTOCLAVER et ne pas refondre. Après inoculation, incuber 24 h (ou 48 h) à 37°C.

Les streptocoques fécaux donnent sur ce milieu des petites colonies rouges ou marron avec ou sans auréole blanche. Pour “revivifier” les streptocoques D stressés procéder à une incubation en deux temps : 4 heures à 37°C et 48 heures à 44°C .

Milieu KF streptocoque

protéose peptone	10 g
extrait de levure	10 g
NaCl	15 g
glycérophosphate de sodium	10 g
maltose	20 g
lactose	1 g
azide de sodium	0,4 g
pourpre de bromocrésol	15 mg
gélose	20 g
eau D	1000 ml

pH = 7,2.

Le milieu est stérilisé par autoclavage à 121°C pendant 10 minutes. Avant utilisation ajouter au milieu ramené à 50°C, 10 ml de chlorure de triphényltétrazolium à 1 %.

Les streptocoques fécaux donnent des colonies rouge foncé ou des colonies à centre rouge ou noir après 24 heures d’incubation à 37°C.

B - 2 - c . isolement

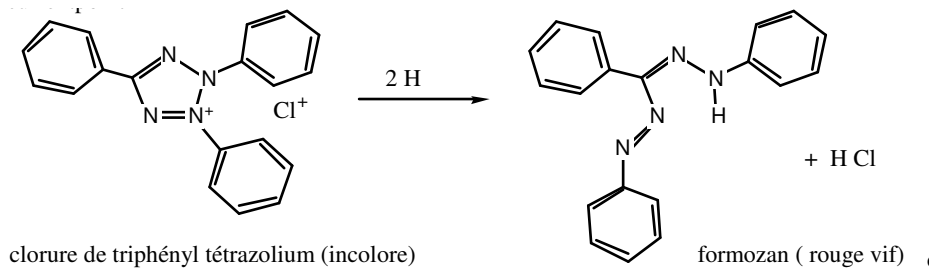
Milieu de BARNES INGRAM

peptone	10 g	
extrait de viande		10 g
glucose	10 g	
gélose	15 g	
eau D	1000ml	pH = 6

Après stérilisation à 120°C pendant 15 minutes, ajouter 1 ml d’acétate de thallium à 5 % et 1 ml de chlorure de triphényltétrazolium à 1 %

Après ensemencement l’incubation s’effectue à 37°C pendant 24 heures.

Lecture : L’acétate de thallium inhibe les germes Gram- sauf *Proteus hauseri* . *Micrococcus* et *Lactobacillus* peuvent cultiver sur ce milieu. Les streptocoques fécaux réduisent de triphényltétrazoium en formozan rouge :



Les caractéristiques des colonies dont diamètre est inférieur ou égal à 1 mm sont indiquées ci après. L’observation avec une loupe binoculaire des colonies est souhaitable pour évaluer ces caractéristiques.

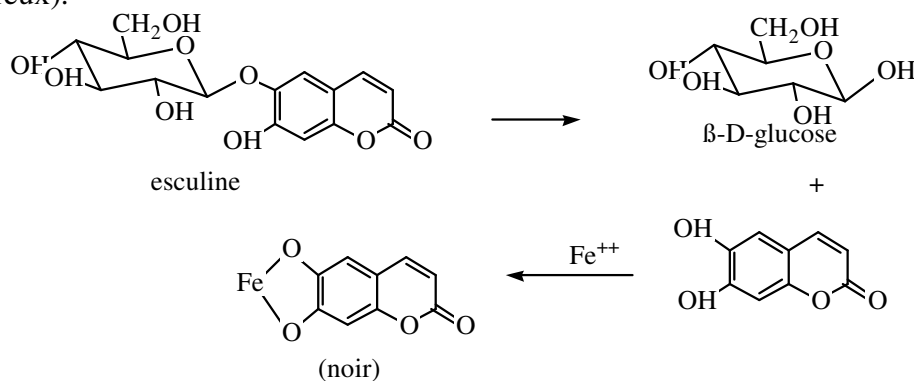
- S. faecalis* : colonie à centre rouge, auréole blanche
- S. faecium* : colonie blanche ou rosée
- S. durans* : colonie blanche
- S. bovis* : très petite colonie rosée ou pas de croissance
- S. lactis* : colonie rouge très foncé sans auréole.

Milieu D - Cocosel

Ce milieu permet l’isolement sélectif des entérocoques

Bio-trypticase	17 g
Bio-thione	3 g
extrait de levure	5 g
bile de boeuf	10 g
chlorure de sodium	5 g
citrate de sodium	1 g
esculine	1 g
citrate de fer ammoniacal	0,5 g
azide de sodium	0,25 g
gélose	13,5 g
eau D	1000 ml, pH 7,1. Autoclaver 15 minutes à 120°C.

Les streptocoques du groupe D donnent de petites colonies translucides entourées d’un halo noir correspondant à l’hydrolyse de l’esculine (le dérivé phénolique libéré forme un complexe noir avec les ions ferreux).



Les *Staphylococcus* cultivent sur ce milieu en donnant des colonies volumineuses, opaques, sans halo noir. Il en est de même avec certaines levures et pour quelques germes gram négatif. Il apparaît un léger brunissement autour des colonies d’*Enterobacter* ou de *Serratia* . Les *Listeria* cultivent bien sur ce milieu .

B - 2 - d . Résultats

Ils sont exprimés en nombre de streptocoques fécaux par g ou ml du produit.

C - RECHERCHE ET NUMERATION DES ANAEROBIES SULFITOREDUCTEURS **(CLOSTRIDIUM surtout)**

Ces bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, mais on les rencontre fréquemment dans la nature et en particulier dans le sol (**bactéries telluriques**) et dans les matières organiques en cours de putréfaction. Ces germes sont très résistants en raison de leur caractère sporulé.

Ils sont souvent, quelques fois avec d'autres germes sporulés, les seuls survivants d'une contamination ancienne de l'aliment. Parmi les *Clostridium* sulfito-réducteurs, *C. perfringens* occupe une place très importante: en effet, ce germe est très souvent à l'origine de toxico-infections d'origine alimentaire.

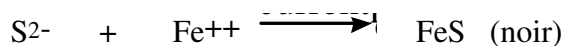
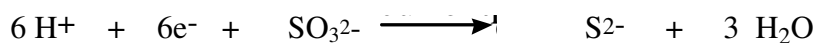
Il est possible de réaliser une numération sélective des spores ou des formes végétatives (les spores résistent bien à un traitement thermique de 5 à 10 minutes à 80 ou 85°C).

La présence de ces germes dans un aliment reflète, quand ils ne sont pas associés ni aux coliformes ni aux streptocoques fécaux, une contamination d'origine organique, plus rarement tellurique.

Les **aliments cuits** constituent d'excellents milieux pour ces germes car la teneur en oxygène est faible et leur survie sous forme sporulée est sélective après élimination des autres germes présents sous leur forme végétative.

C - 1. Dénombrement des spores et des formes végétatives

Ce dénombrement est réalisé en anaérobiose (en tube ou dans une jarre) et repose sur l'appréciation de la réduction du sulfite en H₂S dont la mise en évidence est obtenue par addition au milieu de sels de fer. La réaction est la suivante :



C - 1 - a . milieu viande-foie sulfité (VF)

base viande foie	30 g
glucose	2 g
amidon	2 g
gélose	11 g
eau D	1000 ml
pH = 7,2.	

Stériliser 15 minutes à 110°C. Répartir en tubes vissés à raison de 20 ml par tube. A 20 ml de milieu régénéré et ramené à 50° C ajouter 0,5 ml d'une solution aqueuse de sulfite de sodium à 5 % stérilisée par filtration ou par ébullition de 10 minutes et 0,2 ml d'une solution aqueuse de citrate de fer ammoniacal à 5 % stérilisée par filtration.

C - 1 - b . milieu de WILSON -BLAIR

bouillon nutritif	1000 ml
glucose	20 g
gélose	30 g
pH = 7,5.	

Répartir à raison de 25 ml / tube. Autoclaver 15 minutes à 110°C. Après régénération (10 minutes à 100°C) et refroidissement à 55°C, ajouter à chaque tube 1 ml de sulfite de sodium à 10 % stérilisé par filtration et 4 gouttes d'alun de fer à 5 %. Mélanger par retournement le tube bien vissé.

C - 1 - c . ensemencement

0,1 ml (ou 1 ml) de milieu ou de ses dilutions est introduit dans le tube en surfusion à 45°C. Le tube est alors vissé et le mélange effectué par retournement lent. Il faut éviter d'oxygéner le milieu au cours de cette phase. Dès qu'un tube est ensemencé, il faut le refroidir par immersion dans l'eau froide. Les tubes sont alors incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

C - 1 - d . lecture

Les colonies des bactéries sulfito-réductrices sont très nettement noires; leur taille varie selon l'espèce. *Clostridium perfringens* produit des colonies de grande taille en houe noire de 3 à 5 mm de diamètre.

C - 1 - e . résultats

Le nombre des bactéries anaérobies sulfito-réductrices est exprimé pour 1 g (ou 100) ou ml du produit alimentaire.

C - 2 . Numération des spores

La suspension mère à analyser est chauffée à 80°C pendant 5 ou 10 minutes au bain marie. Il y a, dans ces conditions, destruction des formes végétatives. Les techniques déjà décrites sont alors applicables à cette suspension (dilutions puis ensemencement) et permettent le dénombrement sélectif des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

D. RECHERCHE ET DENOMBREMENT DE *Clostridium perfringens*

Il s'agit d'un bacille Gram+, sporulé, anaérobie strict. La bacille (4 µm x 1 µm) se présente isolé, par paires ou en courtes chaînettes. Il est immobile et capsulé.

Le germe possède un pouvoir réducteur élevé (réduction rapide du sulfite en H₂S). La résistance de sa spore est très grande dans le sol, l'eau, l'eau de mer, l'air, les viandes, les légumes, les semi-conserves etc. La sporulation intervient peu dans les milieux de culture utilisés pour leur numération ou dans les aliments. C'est un germe que l'on rencontre fréquemment dans les produits cuits puis refroidis lentement.

Parmi les milieux de numération, le milieu TSN et le milieu TSC sont les plus utilisés. Ces milieux sont rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques tels que la néomycine, la polymyxine B ou la D cyclosérine.

D - 1 . Milieux de numération

D -1 - a . Milieu trypticase - sulfite - néomycine (TSN)

Ce milieu incubé à 46°C est le milieu qui donne les meilleurs résultats qualitatifs et quantitatifs pour la numération ou l'isolement de *Clostridium perfringens*. Ce germe donne des colonies entourées d'une auréole noire caractéristique.

Peptone de caséine	15 g
extrait de levure	10 g
sulfite de sodium	1 g
citrate de fer ammoniacal	0,5 g
sulfate de polymyxine B	50 mg
sulfate de néomycine	20 mg
gélose	13,5 g
eau D	1000 ml

pH = 7,2. Le milieu est autoclavé 12 minutes à 118°C.

Si le milieu doit être incubé, après ensemencement en conditions aérobies (tubes de 18 X 180 mm), il faut y adjoindre 25 ml d'une solution tamponnée de thioglycolate de sodium stérilisée par filtration contenant 2 g de K₂HPO₄, 1 g de NaHCO₃ et 2 g de thioglycolate.

Si l'incubation est réalisée dans des jarres anaérobies à 46°C, il faut lire les boîtes dans la demi-heure qui suit leur sortie de la jarre car le noircissement peut disparaître par oxydation à l'air.

D - 1 - b . Milieu tryptose - sulfite - cyclosérine (TSC)

Ce milieu est utilisé pour la numération des ASR et de *Clostridium perfringens* (également par filtration). La tryptone et la soytone et l'extrait de levure assurent aux *Clostridium* d'excellentes conditions de culture, tandis que la D-cyclosérine assure une bonne sélectivité (meilleure qu'avec la kanamycine ou la polymyxine) et diminue la taille des auréoles noires diffuses et parfois gênantes autour des *C.perfringens*. Le sulfite et le sels de fer permettent la mise en évidence de l'activité sulfitoréductase.

tryptone	15 g
extrait de levure	5 g
soytone	5 g
citrate ferrique ammoniacal	1 g
métabisulfite de sodium	1 g
gélose	20 g
eau D	900 ml

pH = 7,6. Stériliser à 121°C pendant 10 minutes.

Répartir en tubes de 18 x 180 mm à raison de 18 ml par tube.

Après régénération ajouter au milieu ramené à 60°C, 40 ml de D-cyclosérine à 1 % stérilisée par filtration.

Pour l'ensemencement en tubes, ajouter au milieu complet à 47°C 1 ml d'inoculum et mélanger doucement par retournement après s'être assuré de l'étanchéité de la fermeture.

Pour l'ensemencement en boîte de Pétri, à 10 ml de milieu à 45°C ajouter 0,1 ml de suspension mère (ou des dilutions). Après solidification ajouter 5 ml de milieu. Les colonies noires sont comptées après 24 h d'incubation à 45°C en jarre anaérobie.

L'addition de 8 ml de jaune d'oeuf dilué au 1/2 par de l'eau physiologique pour 100 ml de milieu permet de visualiser l'activité lécithinase du germe (halo opaque). Dans ce cas le produit et ses dilutions sont étalés à raison de 100 µl par boîte à la surface d'un milieu préalablement coulé en boîte de Pétri et incubé en anaérobiose (jarre).

D - 1 - b . milieu de WILLIS

Ce milieu permet d'isoler et de compter les *Clostridium* Lactose+ et Lactose- et de détecter leur lécithinase.

Peptone	10 g	
NaCl	5 g	
extrait de viande	3 g	
extrait de levure	5 g	
lactose	10 g	
cystéine HCl	0,4 g	
rouge neutre	30 mg	
gélose	20 g	
eau D	1000 ml	pH = 7,2. Stériliser 10 minutes à 115°C.

Au milieu régénéré ajouter 10 % de suspension stérile de jaune d'œuf diluée au 1/2 avec de l'eau D. Couler 15 ml de milieu par boîte et étaler sur une moitié de la boîte 1 goutte de sérum anti *Clostridium perfringens* A à 6000 unités/ml. Cet étalement sur la 1/2 boîte de l'antisérum n'est nécessaire qu'en cas d'isolement réalisé en vue d'une identification.

Répartir le germe de façon uniforme sur le milieu. Après 24 h d'incubation à 37°C (ou mieux à 45°C) en anaérobiose, les colonies de *C. perfringens* lactose + sont jaunâtres (les bactéries lactose- sont blanches). L'activité lécithinase se traduit par la présence d'une zone de précipitation blanche opaque autour des colonies. Si on est en présence de *C. perfringens* A , il n'y a pas ce phénomène sur la moitié de la boîte contenant l'antisérum. Il est possible de réaliser la recherche spécifique d'autres types de cette bactérie par le choix d'antisérum adapté .

D - 2 . Tests de confirmation

A partir d'une colonie prélevée sur TSN ou TSC ou Willis, procéder à des repiquages sur les milieu viande-levure, gélatine-lactose et nitrate mobilité.

D - 2 - 1 . milieu viande-levure

peptone	10 g
NaCl	5 g
extrait de levure	6 g
extrait de viande	3 g
cystéine HCl	0,3 g
glucose	2 g
gélose	6 g
eau D	1000 ml
	pH = 7,5. Stériliser 10 minutes à 115°C.

Le milieu en surfusion réparti en tube de 8 x 160 mm est ensemencé par piqûre centrale avec une canne de verre étirée et boutonnée. Après 24 h d'incubation à 37°C, la croissance dans la zone profonde du tube indique que le germe est anaérobie strict.

D - 2 - 2 . milieu gélatine-lactose

tryptose	15 g
extrait de levure	10 g
lactose	10 g
Na ₂ HPO ₄	5 g
gélatine	120 g
rouge de phénol	50 g
eau D	1000 ml
	pH = 7,5. Stériliser 10 minutes à 115°C.

Le milieu répartir en tube de 16 x 160 mm est ensemencé par piqûre centrale. Après 24 heures d'incubation à 37°C en anaérobiose, la présence de gaz, l'acidification (jaunissement) et la liquéfaction de la gélatine sont mises en évidence avec *C. perfringens*.

D - 2 - 3 . milieu nitrate-mobilité

extrait de viande	3 g
peptone	10 g
KNO ₃	1 g
gélose	4 g
eau D	1000 ml

pH = 7,4. Répartir à raison de 8 ml/tube et stériliser 15 minutes à 121°C.

Après ensemencement par piqûre et incubation à 37°C pendant 24 h en anaérobiose, *C. perfringens* immobile cultive le long de la ligne d'ensemencement. Ajouter 5 gouttes de réactif de GRIESS pour la recherche des nitrites (acide sulfanilique et a-naphtylamine dans l'acide acétique 5 N) ; une coloration rouge vif traduit une réponse positive .

Clostridium perfringens est nitrate réductase+

Les bacilles immobiles anaérobies stricts, Gram +, qui donnent des colonies noires en milieu TSN ou TSC ou Willis, lécithinase +, réduisant les nitrates en nitrites, lactose+, gélatinase+ sont considérés comme *C. perfringens*.

On peut réaliser la recherche du sérotype par séroagglutination sur lame avec chacun des 13 sérums correspondants aux sérotypes définis par HOBBS.

D - 3 . Milieu de sporulation

La sporulation de ces bactéries est réalisable sur des milieux contenant de l'amidon et des cations métalliques tels que le magnésium et parfois le manganèse.

milieu de ELLNER

polypeptone	10 g
extrait de levure	3 g
amidon	3 g
MgSO ₄	0,1 g
KH ₂ PO ₄	1,5 g
Na ₂ HPO ₄ .7H ₂ O	50 g
eau D	1000 ml.

Ce milieu est stérilisé à 120°C pendant 20 minutes.

La sporulation intervient dans ce milieu après 24 h (ou plus) d'incubation à 37°C

D - 4 . Numération de *Clostridium perfringens* par titrage de l' α - toxine

Les cellules végétatives de *C. perfringens* sont peu résistantes aux conditions défavorables de milieu externe. Elles meurent rapidement par exemple au cours de la réfrigération, de la congélation et après pasteurisation. Des numérations de *C. perfringens* après entreposage de l'aliment à basse température ne sont donc pas possibles. L'α-toxine produite au cours de la croissance du germe est stable au froid et sa production est sensiblement proportionnelle au nombre de cellules initiales. On peut donc l'extraire quantitativement et obtenir une relation avec le maximum de population initialement présente.

méthode

1 - broyer 25 g d'aliment dans 100 ml de tampon HEPES pendant 2 minutes

tampon : N-2-hydroxyéthylpipérazine N'-2-éthane sulfonique	6 g
NaCl	11,7 g
eau D	1000 ml

Le pH est ajusté à 8 avec NaOH 2 N

2 - centrifuger 20 minutes à 20000 g et à 5°C.

3 - le surnageant par filtration.

- 4 - transférer le filtrat dans un sac à dialyse. Concentrer à 5 ml contre 400 ml de polyéthylène glycol (MM 20000).
- 5 - le concentrat est ajusté à 7 ml.
- 6 - préparer 10 tubes de 13 x 100 mm avec 0,5 ml de NaCl à 0,85 % sauf le 1er et le dernier.
- 7 - ajouter 0,5 ml d'extrait au 1er et au 2ème tube ; mélanger le 2ème tube et transférer 0,5 ml de ce tube au 3ème et ainsi de suite (dilutions 1, 1/2, 1/4, 1/256)
- 8 - mélanger 0,25 ml d'extrait, 0,25 ml de NaCl à 0,85 % et 0,1 ml d'antitoxine A.
- 9 - préparer une gélose au sang
- 10 - faire des trous dans la gélose à l'emporte-pièce (3 mm de diamètre) espacés de 3 cm
- 11 - remplir chaque trou avec l'extrait en commençant par la plus grande dilution
- 12 - incubé 24 h à 35°C et mesurer l'hémolyse. L'extrait additionné d'antitoxine doit être négatif
- 13 - ajouter au liquide restant des tubes 0,5 ml l'extrait de jaune d'œuf (1 jaune d'œuf + 250 ml de NaCl à 0,85 %, centrifuger 20 minutes à 14000 g à 5°C; le surnageant est filtré sur filtre 0,45 mm). L'absence d'activité de la lécithinase est indiquée par une opacité des solutions. L'extrait additionné d'antitoxine doit donner une réaction négative.

TOXINE hémolyse + lécithinase +	population de C. Perfringens en 10 ⁶ /g
non dilué	1,2
1 / 2	2,5
1 / 4	6,5
1 / 8	9,5
1 / 16	25
1 / 32	80
1 / 64	150
1 / 128	210
1 / 256	450

E - RECHERCHE ET NUMERATION DE *Staphylococcus aureus*

Tous les staphylocoques présents dans les aliments ne sont pas entérotoxigènes. Ce n'est que depuis peu que l'on admet le rôle de *S. aureus* comme germe indicateur de contamination humaine (ou animale ou originelle) dans les aliments (aliments crus en particulier). Cette notion permet donc d'accepter des staphylocoques en petit nombre dans les aliments.

Ces germes sont naturellement présents sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux avec des charges qui peuvent largement dépasser les 100 000 germes par cm².

Dans les aliments le risque d'entérototoxicose devient grand quand leur nombre atteint ou dépasse les 10 000 / g .

E - 1 . Enrichissement

La recherche des staphylocoques coagulase + nécessite parfois un enrichissement préalable sur des milieux liquides tels que le milieu de ZEBOVITZ. C'est à partir de ce milieu que peut être réalisée la recherche du germe par hybridation ADN-ADN (cf *Salmonella*).

milieu de ZEBOVITZ

peptone de caséine	10 g
soytone	3,5 g
extrait de levure	6,5 g
mannitol	5 g
glycine	10 g
K ₂ HPO ₄	5 g

LiCl	5 g	
pyruvate de sodium	10 g	
eau D	1000 ml	pH = 7,3. Stériliser 15 minutes à 115°C.

Ajouter au milieu régénéré 20 ml de tellurite de potassium à 1 % stérilisé par filtration. Le milieu ensemencé est incubé 24 h à 37°C. Les staphylocoques coagulase+ réduisent le tellurite en tellure métallique ce qui leur permet d'éliminer la toxicité du tellurite. La concentration élevée en glycine inhibe fortement la flore secondaire Gram+, le chlorure de lithium, la flore Gram-. Pyruvate, mannitol et glycine favorisent le développement des staphylocoques coagulase+ en apportant ainsi une éventuelle atténuation aux inhibiteurs.

La formation de tellure noir révèle la croissance de *Staphylococcus* et l'intensité du noircissement dépend de la quantité de germes.

Le milieu de CHAPMAN liquide peut aussi être utilisé pour l'enrichissement des staphylocoques.

milieu de CHAPMAN liquide

peptone	10 g	
extrait de viande	6 g	
protéose peptone	10 g	
NaCl	150 g	
lactose	15 g	
gélose	1 g	
eau D	1000 ml	pH = 7,4. Stériliser 15 minutes à 121°C.

A 10 ml de milieu ajouter 10 ml de suspension à enrichir (concentration finale en NaCl 7,5 %). Incuber 24 h à 37°C. Ce milieu permet l'enrichissement en staphylocoques du fait de sa teneur très élevée en sel.

L'utilisation de ces milieux d'enrichissement permet de mettre en évidence des staphylocoques présents dans un aliment donné en très petit nombre. La réponse est alors du type présence ou absence dans x ml de produit analysé.

E - 2 . Numération sur milieux solides

Cette numération sur milieu n'est possible que si le nombre de staphylocoques dans le produit est supérieur à 10 /g ou ml.

E - 2 - a . Numération sur milieu de CHAPMAN

Ce milieu n'est sélectif que des germes aérobies halophiles. Ainsi de nombreuses espèces de *Bacillus* peuvent y cultiver.

peptone	10 g	
extrait de viande	1 g	
NaCl	75 g	
mannitol	10 g	
rouge de phénol	25 mg	
gélose	15 g	
eau D	1000 ml	pH = 6,8. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

Le milieu , réparti à raison de 17 ml par boîte de Pétri , est ensemencé en surface par 0,1 ml du produit ou des dilutions. La boîte est incubée 24 h à 37°C. Les colonies de *Staphylococcus*

aureus sont rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré; elles sont entourées d'un halo jaune correspondant à une acidification à partir du mannitol (mannitol +).
S.epidermidis donne des colonies blanches mannitol - .

E - 2 - b . Numération sur milieu de Baird Parker

peptone pancréatique de caséine	10 g
extrait de levure	1 g
extrait de viande	5 g
pyruvate de sodium	10 g
Li Cl	5 g
glycine	12 g
gélose	20 g
eau D	1000 ml

pH = 6,8. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes .

Ajouter au milieu régénéré et ramené à 50°C, 50 ml d'une émulsion de jaune d'œuf à 50 % en eau physiologique, 3 ml d'une solution de tellurite de potassium à 3,5 % stérilisées par filtration et pour éviter la croissance des *Proteus* , 50 mg de sulfaméthazine. Le tellurite inhibe la croissance des germes qui ne peuvent le réduire en tellure noir, la sulfaméthazine inhibe les *Proteus* et la glycine et le pyruvate sont des nutriments favorisant la croissance. Le chlorure de lithium inhibe les germes Gram - .

Ensemencer en surface à partir de 0,1 ml de suspension mère ou de ses dilutions et incuber 24 h à 37°C.

S. aureus donne des colonies noires, brillantes, convexes, de 1,5 mm de diamètre, entourées d'un halo clair (protéolyse) de 2 à 5 mm de diamètre. Des zones opaques peuvent apparaître plus tardivement dans le halo clair ; elles sont dues à l'activité lipolytique et lécinolytique du germe.

S. epidermis : colonies noires, brillantes, de forme irrégulière

Micrococcus : très petites colonies marron sans halo

Bacillus : colonies irrégulières marron foncé, ternes

Levures : colonies blanches.

E -3 . Numération en milieu liquide

Cette méthode est à utiliser si le nombre supposé de germes est inférieur à 10 par g ou ml d'aliment.

milieu trypticase - soja

tryptose	17 g
soytone	3 g
NaCl	100 g
K ₂ HPO ₄	2,5 g
glucose	2,5 g
eau D	1000 ml

pH = 7,3. Stériliser 15 minutes à 121°C.

Ensemencer avec 1 ml (ou 10 ml) de suspension mère ou de ses dilutions (essais en double ou en triple, méthode de Mac Grady). Incuber 48 h à 37°C.

Transférer une öse de chaque tube positif sur milieu de Baird Parker.

Incuber les boîtes 30 h à 37°C. Identifier la présence de colonies de staphylocoques. Réaliser la numération par la méthode du NPP.

E - 4 . Identification

Le germe est un coque Gram + , groupé en amas (mosaïque à partir de milieux solides), **catalase positive**, glucose + (F), halophile . Son identification repose surtout sur la recherche de l'activité coagulase et ADNase (thermonucléase) et sur la recherche de protéines à activités particulières.

E - 4 - a . Recherche de l'activité coagulase

Parmi les coques Gram+, catalase+, seuls les *Staphylococcus aureus* possèdent une plasma coagulase (coagulation de plasma oxalaté de lapin en moins de 24 h). La production de coagulase permet de différencier *S. aureus* de *S. epidermidis* et des *Micrococcus*.

On ensemence d'abord un bouillon dans lequel le staphylocoque excrètera la coagulase.

bouillon pour recherche de la staphylocoagulase

protéolysat papainique de viande	500 ml
hydrolysate de gélatine	20 ml
citrate trisodique	3 g
eau D	480 ml

Répartir à raison de 5 ml par tube et stériliser. Après ensemencement et 24 h d'incubation à 37°C, 0,5 ml de milieu est mélangé à 0,5 ml de plasma de lapin oxalaté. Le mélange est incubé à 37°C et observé toutes les 30 minutes. La prise en masse du plasma est généralement totale au point que le tube peut être renversé.

E - 4 - b . Recherche de l'activité ADNase

<u>milieu</u>	
Hydrolysate tryptique de caséine	20 g
ADN	2 g
NaCl	5 g
gélose	12 g
eau D	1000 ml

pH = 7,3. Stériliser 15 minutes à 121°C et couler en boîte de Pétri à raison de 15 ml par boîte. Ensemencer par strie unique. Incuber 24 heures à 37°C.

Inonder la surface de la gélose avec une solution d'acide chlorhydrique N, ou avec une solution à 0,1 % de bleu de toluidine. Après 5 minutes on observe dans les cas d'une réaction positive :

- avec l'acide chlorhydrique une zone claire autour de la strie (placer la boîte sur fond noir)
- avec le bleu de toluidine une zone rose autour de la strie, le reste de la boîte étant bleu.

La thermonucléase est recherchée par cette méthode après traitement de l'inoculum à 100°C pendant 15 minutes et dépôt de 5 à 10 µl d'inoculum dans des puits creusés à l'emporte pièce. Après 4 h d'incubation à 37°C, la gélose ADN préalablement additionnée de 3 ml de bleu de toluidine 0,1 M par litre devient rose autour des puits contenant la thermonucléase (cf aussi E-4-e).

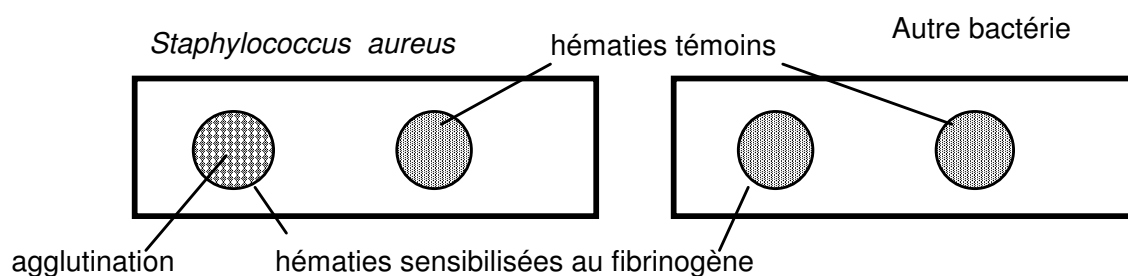
Les souches de *Staphylococcus* pathogènes coagulent en général le plasma de lapin et les staphylocoques coagulase négative ne produisent qu'exceptionnellement des entérotoxines.

La présence d'une ADNase thermostable semble être en bonne corrélation avec le pouvoir entérotoxigène des germes.

E - 4 - c. Staphyslide-test

principe : *S. aureus* possède un récepteur protéique pour un fragment du fibrinogène. Ce récepteur est présent sur 96% des souches humaines et sur la plupart des autres biotypes. Dans ce test, des hématies de moutons sensibilisées par du fibrinogène sont agglutinées en présence d'une souche de *S. aureus* porteuse du récepteur.

réalisation : sur une lame déposer une goutte d'hématies témoins (-) et une goutte d'hématies sensibilisées (+) sur une lame. Dans ces gouttes ,dispenser 1 à 2 colonies à l'aide de l'anse ou d'une pipette Pasteur boutonnée; donner à la lame un léger mouvement de rotation. Lire la réponse après 15 secondes. Une réponse positive correspond à une agglutination massive avec les hématies sensibilisées. Cette réponse est obtenue avec 99% des *S. aureus*. Une réponse négative est observée avec *Micrococcus* et les autres *Staphylococcus*.



E - 4 - d . Recherche de la protéine A

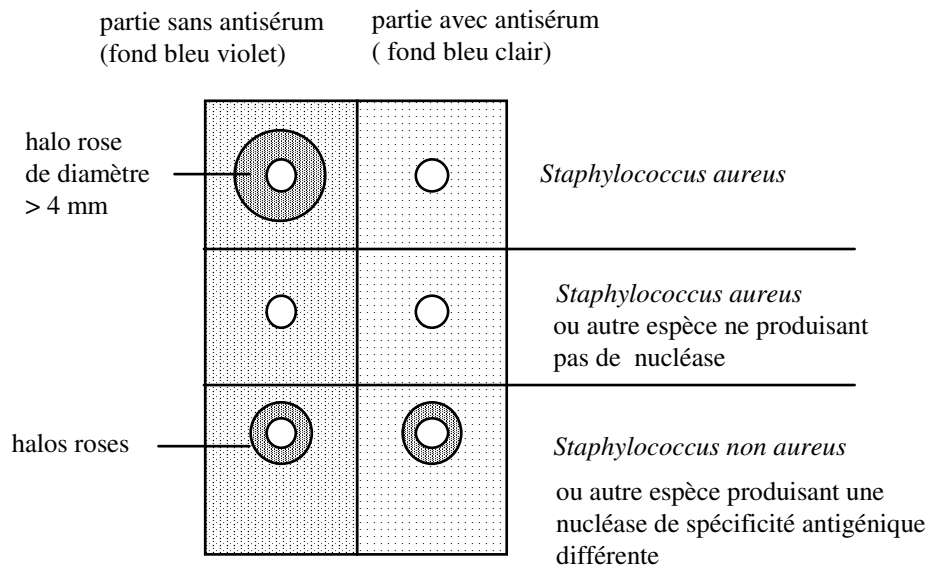
principe : La protéine A est un antigène spécifique de quelques biotypes de *S. aureus*, porté par 90% des souches d'origine humaine. Cette protéine A peut fixer un fragment F_C des immunoglobulines de lapin ou de l'homme. Des hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin anti-hématies de mouton sont agglutinés en présence de *Staphylococcus* porteurs de protéine A. La méthode permet de détecter 90% de *S. aureus* porteurs de protéine A ce qui permet un screening rapide.

réalisation : Le test est réalisé à partir du milieu GNO ou ADNase (pas Chapman ni gélose au sang). Sur une lame déposer une goutte de suspension d'hématies témoins et une goutte d'hématies sensibilisées; ajouter une colonie en agitant pour obtenir une suspension. Agiter la lame par rotation. Observer en lumière rasante : la réponse + correspond à une agglutination en moins de 2 minutes .

E - 4 - e . Détection immunologique de la DNase thermostable : test d'inhibition en gélose.

Principe : *S. aureus* possède une nucléase thermostable d'une grande spécificité antigénique. Le test consiste à comparer l'activité ADNasique d'une culture bactérienne sur une plaque gélosée contenant ou non un anticorps antinucléase, l'antisérum étant en quantité suffisante pour inhiber cete activité. En présence de bleu de toluidine et d'ADN dans la gélose, une activité nucléasique provoque la formation d'un halo rose.

Réalisation : Sur une plaque gélosée contenant de l'ADN et du bleu de toluidine et de l'antisérum sur sa moitié, introduire 7 µl de la culture à tester dans les puits. Incuber à 37°C pendant 2h.



L'entérotoxine A , B ou D peut être recherchée par immunoenzymologie (ELISA permettant un seuil de détection de 70 pg): Clonatec, 60, rue de Wattignies, 75580 Paris cédex12.

F. RECHERCHE DE *Salmonella* (et de *Shigella*) (cf norme AFNOR V 08 013)

Il s'agit là d'un problème très important en microbiologie alimentaire, la contamination des aliments par des *Salmonella* en France étant de plus en plus fréquente. La transmission s'effectue par des voies multiples et parfois complexes. Les viandes sont les vecteurs les plus communs mais toutes les variétés d'aliment peuvent être contaminées par ces germes. Le nombre de germes pouvant provoquer une maladie infectieuse est parfois très faible (de l'ordre de 1 à 50 par 100 g produit) et dépend de l'espèce et du consommateur. La recherche de ces germes s'effectue par des tests présence ou absence et la norme est de 0 germe par g (ou 25 ou 50 ou plus).

La recherche par hybridation ADN-ADN est une technique au point pour leur recherche, de même que des méthodes immunoenzymatiques ou par immunofluorescence ou par fixation de phage spécifique.

La mise en évidence des *Salmonella* par la méthode "traditionnelle" nécessite plusieurs phases:

- un pré-enrichissement (revivification) qui est facultatif pour les produits non soumis à certains types de traitements technologiques susceptibles de "stresser" les bactéries
- un enrichissement sélectif (obligatoire)
- un isolement sélectif
- une identification biochimique
- un sérotypage

Ces phases et les différentes méthodologies de recherche disponibles sont schématisées à la page suivante.

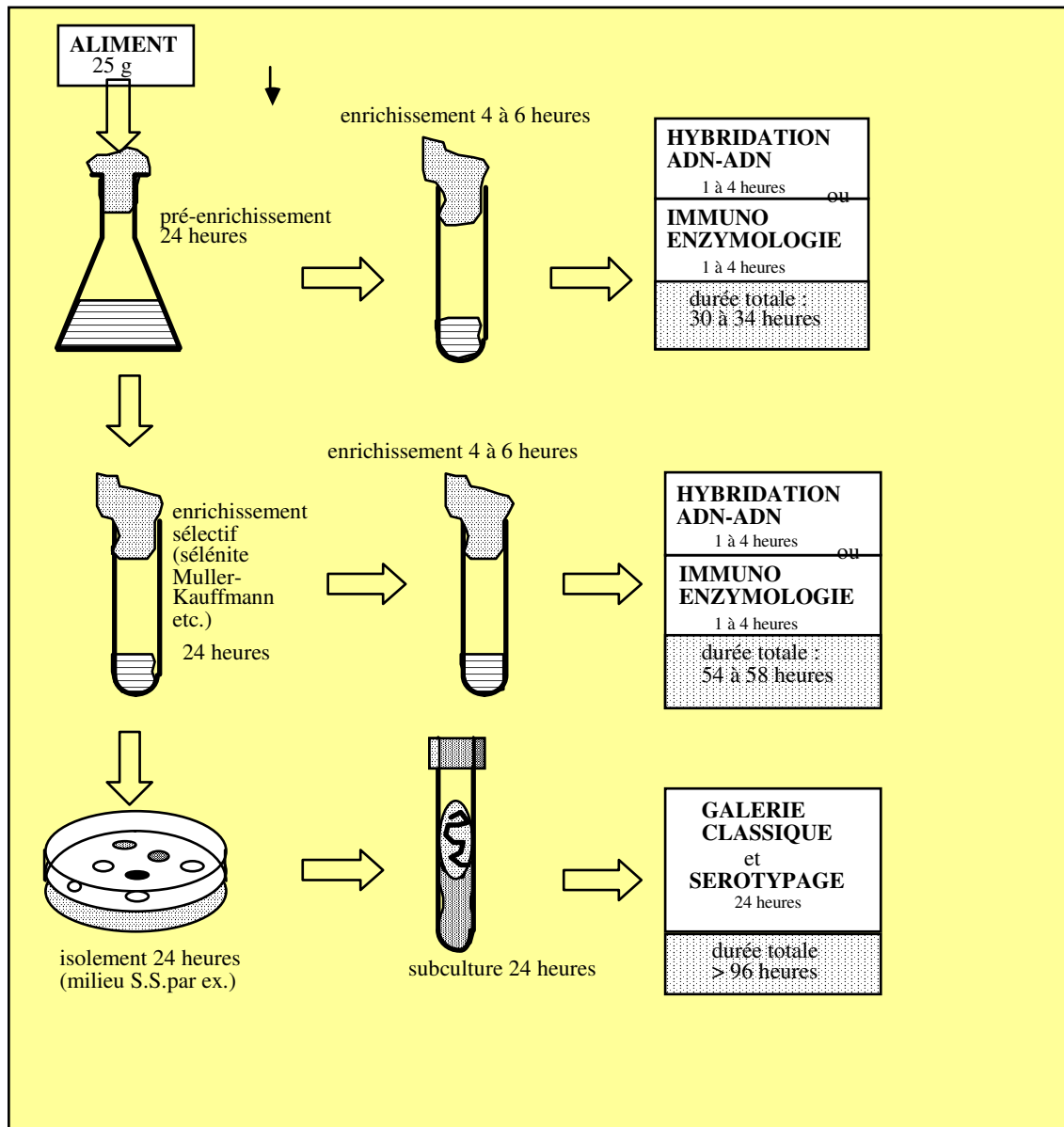
F - 1 . Pré-enrichissement (AFNOR 1973)

milieu eau peptonée tamponnée
extrait de viande

10 g

peptone 20 g
 NaCl 6 g
 KH₂PO₄ 1,5 g
 Na₂HPO₄ 9 g
 eau D 1000 ml pH = 6,9.
 Stériliser 20 minutes à 121°C.

25 g d'aliment sont broyés dans 225 ml de milieu pendant 2 minutes. L'incubation est réalisée pendant 16 h au moins et 24 h au plus à 37°C.



F - 2 . Enrichissement

Plusieurs milieux d'enrichissement sont utilisables :

milieu de MULLER KAUFFMANN au tétrathionate

extrait de viande 0,9 g
 peptone 4,5 g
 extrait de levure 1,8 g

NaCl	4,5 g
CaCO ₃	25 g
Na ₂ S ₂ O ₃	40,7 g
bile de bœuf sèche	4,75 g
eau D	1000 ml, pH = 7,6. Mélanger au bain marie à 100°C.

Au moment de l'emploi ajouter 19 ml de solution iodo iodurée (5 g de KI, 5 g d'I₂, eau D 20 ml) et 9,5 ml de vert brillant à 0,1 %. L'addition de 40 mg de novobiocine inhibe les *Proteus*. 1 à 2 ml de milieu de pré-enrichissement sont ajoutés à 10 ml de ce milieu. Réaliser deux tubes par essai. L'incubation est réalisée sur chaque tube respectivement à 42°C et 37°C pendant 24 h (ou 48 h).

Dans ce milieu le thiosulfate se transforme en tétrathionate en présence d'iode. Le tétrathionate inhibe la croissance des coliformes et des autres bactéries intestinales. Les *Salmonella* (mais aussi les *Proteus*) réduisent le tétrathionate et ne sont pas inhibés. Le carbonate de calcium a pour rôle de neutraliser l'acide sulfurique libéré au cours de cette réduction par formation de sulfate de calcium et d'acide carbonique qui se décompose en anhydride carbonique, ce qui évite l'acidification du milieu. L'addition de bile de bœuf stimule la croissance de *Salmonella* et inhibe les germes d'origine non intestinale. Le vert brillant inhibe les bactéries Gram+.

bouillon au sélénite et à la cystine (milieu mieux adapté au contrôle des aliments)

peptone de caséine	5 g
cystine	10 mg
lactose	4 g
Na ₂ HPO ₄	10 g
sélénite de sodium	4 g
eau D	1000 ml pH = 7. Stériliser par filtration.

10 ml de milieu de pré-enrichissement sont ajoutés à 100 ml de bouillon au sélénite. Deux tubes sont réalisés, l'un étant incubé à 37°C l'autre à 43°C pendant 24 à 48 h.

F - 3 . Isolement

A partir d'une öse ou d'une goutte d'un des milieux d'enrichissement on réalise un isolement sur milieu **SS** ou milieu gélosé sulfite bismuth ou sur **gélose au vert brillant et au rouge de phénol** ou sur DCL selon HYNES.

milieu SS (Salmonella Shigella)

peptone	5 g
extrait de viande	5 g
sels biliaires	8,5 g
citrate de sodium	10 g
Na ₂ S ₂ O ₃	8,5 g
citrate de fer	1 g
lactose	10 g
rouge neutre	25 mg
vert brillant	0,33 mg
gélose	15 g
Eau D	1000 ml
pH = 7 . NE PAS AUTOCLAVER.	

Après 48 h d'incubation à 37°C, les colonies se présentent sous les aspects suivants:

colonies rouges lactose + (*Enterobacter, Klebsiella*)

colonies incolores lactose- (*Salmonella, Shigella, Serratia, Proteus morgani, E. hafniae*)

colonies à centre orangé (*Proteus rettgeri, Providencia*)

colonies à centre noir (*Salmonella, Citrobacter, Proteus vulgaris, Proteus mirabilis*).

milieu au vert brillant et au rouge de phénol

peptone	10 g
extrait de levure	3 g
NaCl	5 g
lactose	10 g
saccharose	10 g
Na ₂ HPO ₄	2 g
rouge de phénol	80 mg
eau D	1000 ml

pH = 6,9. Autoclaver 12 minutes à 121°C. Après inoculation incubé 24 h à 37°C. Les dégradations du lactose et du saccharose sont mises en évidence par le rouge de phénol. Le vert brillant inhibe la flore Gram +. Du fait que les *Salmonella* sont lactose- et saccharose-, ce milieu évite les résultats faussement positifs. Les colonies lactose ou/et saccharose+ sont jaune-verdâtres et entourées d'une coloration identique.

Les *Salmonella* donnent des colonies rouges (ou roses) entourées d'une zone rouge franc. Les *Proteus* produisent parfois des colonies similaires.

milieu sulfite -bismuth

peptone	5 g
extrait de viande	5 g
Na ₂ HPO ₄ ·7H ₂ O	4 g
sulfite de bismuth	8 g
sulfate de fer	0,3 g
glucose	5 g
vert brillant	16 mg
gélose	13 g
eau D	1000 ml

pH 7,6 . NE PAS AUTOCLAVER.

Les boîtes sont incubées à 37°C au moins 48 h. Les composés soufrés présents dans le milieu sont transformés en H₂S, qui en association avec les sels de fer, permet la coloration en brun ou noir des colonies.

colonies vertes transparentes à centre noir et reflet métallique : *S. typhi*

colonies noires ouvertes ou claires parfois à reflet métallique en 48 h: autres *Salmonella*

colonies vertes : coliformes

colonies marron : *Shigella*

colonies noires : *Proteus*.

milieu DCL (désoxycholate, citrate, lactose) selon HYNES

peptone	5 g
extrait de viande	5 g
citrate de sodium	8,5 g
Na ₂ S ₂ O ₃	5,4 g
citrate ferrique	1 g
désoxycholate de sodium	5 g
lactose	10 g

rouge neutre	20 mg
gélose	16 g
eau D	1000 ml
pH = 7,3. NE PAS AUTOCLAVER	

Ce milieu diffère de celui utilisé pour la colimétrie surtout par sa teneur élevée en désoxycholate. Il inhibe la croissance des germes Gram+ et partiellement celle de nombreuses entérobactéries (*Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter*). L'incubation est réalisée à 37°C pendant 24 h. Sur ce milieu les germes lactose+ donnent des colonies rouges ou rosées. *Salmonella* donne des colonies incolores à blanchâtres (*Salmonella* H₂S-) avec un centre noir (*Salmonella* H₂S+).

F - 4 . Identification biochimique

La reconnaissance des colonies ne permet pas d'identifier *Salmonella* mais donne une bonne présomption (leur aspect peut varier en fonction des souches isolées, mais aussi en fonction du mode de préparation des milieux).

La recherche du biotype se fait par la méthode classique (Kligler, urée-indole, LDC, β-galactosidase, Clark et Lubs, citrate) ou par un minisystème de type API.

Le pourcentage de *Salmonella* donnant un caractère + ou - est indiqué ci-dessous:

caractères biochimiques	% des <i>Salmonella</i>
glucose + avec acidification	100
glucose+ (gaz)	92
lactose-	99
saccharose-	99,5
H ₂ S+	91,5
uréase-	100
LDC+	94,5
β-galactosidase-	98,5
indole-	99
VP-	100

Généralement, la présomption de présence de *Salmonella* suffit pour satisfaire aux buts de l'analyse, et cette présomption est acquise dès la fin de l'isolement sur SS ou autre milieu équivalent (la pression de sélection est telle tout au long de l'analyse que la présence de colonies lac - H₂S + sur ces milieux suffit à l'analyse pour conclure à la présence du germe).

F - 5 . Sérotypage

Sa réalisation au laboratoire n'est généralement pas nécessaire. En effet, cette détermination requiert des anti-sérums dont la durée de vie est limitée et de coût élevée. Par ailleurs le fait de connaître ce sérotype ne changera en rien les démarches à réaliser par rapport au produit ou au milieu dans lequel cette bactérie a été détectée.

En cas de détection d'un sérotype de *Salmonella* il est possible d'obtenir un sérotypage auprès de l'Institut Pasteur à Paris ou au Laboratoire Central d'Hygiène Alimentaire, 43 rue de Dantzig, 75015 Paris. Dans ce cas envoyer la souche repiqué sur GNO en tube.

Le genre *Salmonella* comprend plus de 2000 sérotypes. Ils se différencient par leurs antigènes somatiques O, de surface Vi et flagellaires H.

Les sérotypes sont classés en groupe (A, B, C,...Y, Z) et sous groupes d'après leurs antigènes O communs et constants.

L'antigène Vi sert à différencier des sérotypes dans les groupes C et D. Cet antigène de surface rend O-inagglutinables *S. typhi* et *S. paratyphi C*.

Les antigènes H définissent les sérotypes dans les groupes et peuvent se trouver sous 2 aspects (ou phases) dénommées 1 et 2.

La recherche du sérotype selon **KAUFFMANN WHITE** exige la présence :

- de sérums O polyvalents

OMA (agglutinines des groupes A, B, D, E, L)

OMB (agglutinines des groupes C, F, G, H)

OMC (agglutinines des groupes I, J, K, M, N, O, P)

OMD (agglutinines des groupes X, Y, Z)

OMF (agglutinines des groupes 54 à 59)

OMG (agglutinines des groupes 60 à 67).

- de sérums O monovalents

- de sérums H polyvalents

- de sérums H monovalents

- du sérum Vi

Méthodologie

La souche à sérotyper est cultivée sur gélose nutritive (24 h - 37°C).

1 - On s'assure que la souche est smooth (S) : on place une goutte d'eau physiologique sur une lame et on y émulsionne un peu de culture microbienne en agitant doucement. L'apparition d'agglutinats indique que la souche est en phase R (rough) et qu'elle ne peut être soumise au sérotypage (souche auto-agglutinante).

2 - on dépose sur une lame 1 goutte des différents sérums polyvalents (OMA et OMB surtout car 98 % des Salmonelles rencontrées chez l'homme et les animaux à sang chaud possèdent un antigène O correspondant aux agglutinines contenues dans les sérums OMA et OMB) et on y émulsionne un peu de culture. Après agitation douce on examine la goutte au-dessus d'un miroir concave ou à défaut sur fond noir pendant 5 minutes. Les agglutinations O sont lentes et fines.

3 - si l'essai est négatif il peut s'agir :

- d'une *Salmonella* appartenant à un autre groupe non testé
- d'une souche rendue O inagglutinable par masquage de ses antigènes O par des antigènes Vi que l'on recherche alors
- d'une bactérie n'appartenant pas au genre *Salmonella*
- d'une souche S possédant des antigènes T

4 - si l'essai 2 est positif on réalise des essais avec des sérums monovalents

5 - si l'essai est positif on recherche les antigènes H phase 1 ou 2.

Nature de quelques sérotypes selon KAUFFMANN WHITE

groupes	sérotypes	antigène O	Vi	antigène H	
				phase 1	phase 2
A	<i>S. paratyphi</i> A	1,2,12		a	
	<i>S. paratyphi</i> B	1,4,5,12		b	1,2
	<i>S. typhi murium</i>	1,4,5,12		i	1,2
B	<i>S. essen</i>	4,12		g m	
	<i>S. coeln</i>	4,5,12		y	1,2
	<i>S. paratyphi</i> C	6,7	+	c	1,5
C1	<i>S. cholerae suis</i>	6,7		c	1,5
C	<i>S. bareilly</i>	6,7		y	1,5
	C2 <i>S. newport</i>	6,8		e h	1,2
	<i>S. bovis morbificans</i>	6,8		r	1,5
D	<i>S. typhi</i>	9,12	+	d	
	<i>S. enteritidis</i>	1,9,12		g m	
	<i>S. dublin</i>	1,9,12		g p	
	<i>S. sendai</i>	1,9,12		a	1,5
	<i>S. pollurum</i>	1,9,12			

F - 6 . Autres méthodes de recherche des *Salmonella*

Les principales méthodes de recherche des *Salmonella* sont schématisées p.58.

La plupart des méthodes qualifiées de “rapides” requièrent encore les phases de pré-enrichissement et d’enrichissement. Seule la méthode par PCR sera peut-être, dans les années à venir, capable d’être appliquée sans l’ensemble de ces deux phases.

F - 6 - 1 . L’immunofluorescence

Un frottis est réalisé sur une lame à partir de 1 µl de milieu d’enrichissement. La technique directe utilise des anticorps anti-*Salmonella* conjugués à la fluorescéine (antigène somatiques O des groupes A à S), la technique indirecte d’abord des anticorps de lapin anti *Salmonella* H puis des anticorps de moutons fluorescents anti-anticorps de lapin.

Les lames sont observées au moyen d’un microscope équipé d’un système d’éclairage en fluorescence. Le seuil de détection est de 1 bactérie pour 100 champs soit environ 10⁴ cellules / ml de milieu d’enrichissement. Il n’y a pas de faux négatifs mais environ 20 % de faux positifs.

F - 6 - 2 . L’immuno-enzymologie

Cette méthodologie permet la recherche des *Salmonella* dans les milieux d’enrichissement .

Il existe actuellement deux principales modalités de cette technique qui font toutes deux appel à une phase solide lors de la réaction, phase qui permet la fixation du complexe Ag-Ac (il s’agit souvent de polystyrène sous forme de billes, tubes, puits etc. ou de fibres de verre) :

- dans la **technique sandwich** l'anticorps est fixé aux parois d'un support solide (figure ci-dessous). Le produit contenant les antigène ou susceptible de les contenir est incubé dans ce récipient ce qui conduit à la formation d'un complexe Ag-Ac .

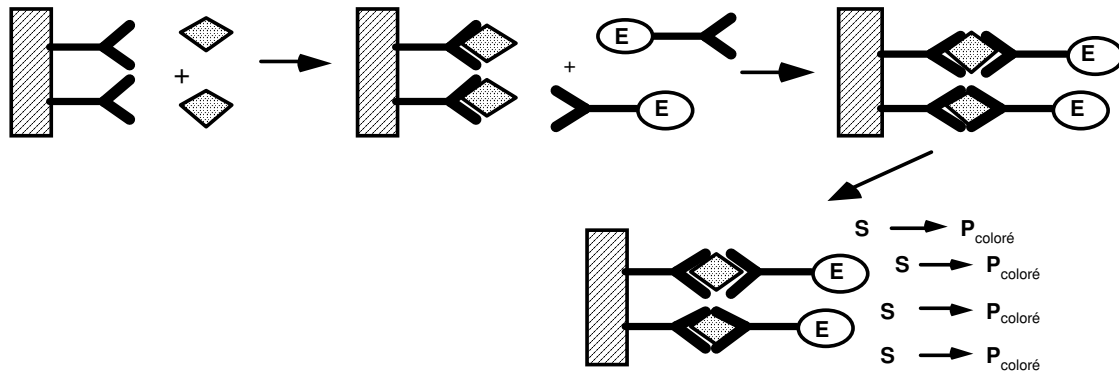


Schéma d'un dosage ELISA par la technique Sandwich

Le conjugué Ac-enzyme est alors ajouté au système et forme un complexe avec l'anticorps ayant fixé l'antigène. L'addition du substrat de l'enzyme permet de visualiser la fixation. La réponse est proportionnelle à la quantité d'antigène.

Ce test est réalisé en routine pour rechercher les *Salmonella* dans leur milieu d'enrichissement (test Técrà de 3M Santé: durée de la recherche 2 heures).

Le test Spectate (Rhône Poulenc) est composé de deux mélanges de suspensions de latex rouge, bleu et vert. Chaque bille de latex a été sensibilisée avec un anticorps spécifique d'un groupe donné de *Salmonella* . Pour procéder à la recherche de cette bactérie, il suffit de mélanger 1 goutte de réactif et 1 goutte de suspension à analyser. Après 4 minutes d'agitation, s'il y a réaction entre le latex sensibilisé avec l'anticorps correspondant au groupe de la *Salmonella* et la bactérie du milieu, il se produit une agglutination avec apparition d'un croissant coloré et d'un changement de coloration du fond.

- dans la **technique par compétition** c'est un antigène qui est fixé aux parois du récipient hydrophobe. L'échantillon susceptible de contenir un antigène de même nature est ajouté dans le récipient.

Dans l'exemple ci-dessous 3 échantillons différents sont soumis à ce type d'analyse et l'échantillon 1 a une concentration élevée en antigène, le 2ème une concentration plus faible et le 3ème n'en contient pas .Après addition du conjugué Ac-Enzyme, la réaction Ag-Ac se produit et conduit, en fonction des concentrations en Ag libre (à doser), à une fixation d'Ac-Enzyme sur le support d'autant plus importante que la quantité d'antigène à doser dans la solution est faible. Après lavage, l'addition du substrat et sa transformation en un produit coloré permet alors d'évaluer l'intensité de cette fixation (coloration ++++ en absence d'Ag, coloration ++ à faible concentration en Ag, pas de coloration en présence de forte concentration en Ag). La réponse est inversement proportionnelle à la quantité d'antigène initialement présente dans le produit.

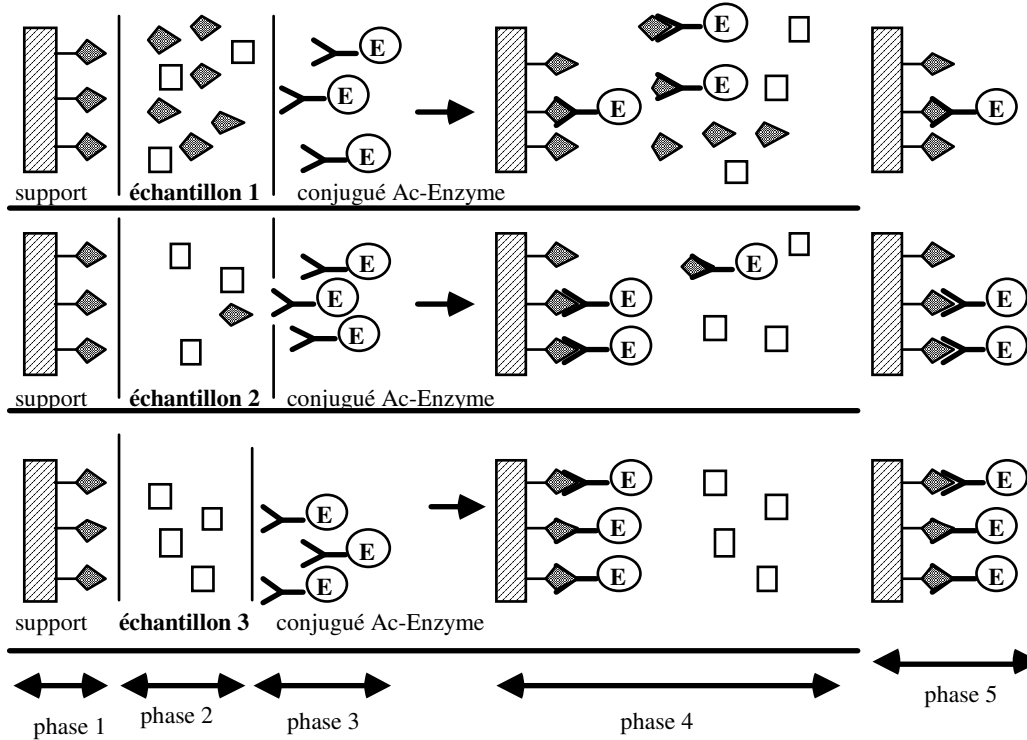


Schéma d'un dosage ELISA par compétition

Il existe des systèmes automatiques de réalisation de ces deux types de tests ELISA qui permettent jusqu'à 4000 analyses / j. De nombreux kits sont proposés par des Sociétés comme Transia, Chemunex etc..

La recherche proprement dite après pré-enrichissement et enrichissement (48 heures d'incubation) dure 1 heure et 30 minutes. Des systèmes d'évaluation par microtitration couplés à l'utilisation d'anticorps monoclonaux permettent actuellement de détecter moins de 10 cellules de *Salmonella* dans 25 g de produit en moins de 20 heures (LEE et Coll., 1990 ; VAN POUCKE, 1990).

Le **Salmonella Bio-EnzaBead Test Kit** (Organon Teknika Corp.) est sensible jusqu'à 1 *Salmonella* par 25 g. Dans ce test des billes plastiques "métallisées" porteuse d'un anticorps monoclonal anti-flagellaire sont mises au contact du produit puis séparées par attraction magnétique. Les bactéries sont ainsi récupérées et mise en évidence par un anticorps anti-*Salmonella* conjugué à la peroxydase.

F - 6 - 3 . L'hybridation ADN - ADN ou ARN-ARN

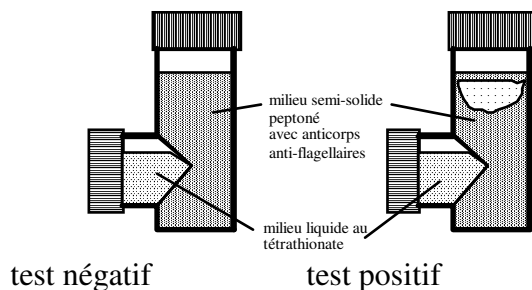
cf aussi Méthodes Modernes d'Analyse Rapide en Microbiologie Alimentaire. Cette approche analytique dans la recherche des *Salmonella*, mais aussi des autres bactéries importantes en hygiène alimentaire (*Listeria*, *E.coli*, *Staphylococcus aureus*, *Campylobacter*, *Yersinia*) est aujourd'hui particulièrement bien adaptée au contrôle qualité. Ces méthodes directement issues de la biologie moléculaire sont rapides, très spécifiques et simples à mettre en œuvre. Il s'agit là de méthodes de détection très prometteuses qui seront à la base de la plupart des méthodes d'analyse futures et dans un premier temps appliquées à la recherche "en tout ou rien" de germes pathogènes ou même de virus. Pour la recherche des *Salmonella* (et d'autres germes) la Société Gene-Trak Systems représenté en France par Diagnostics Nouveaux Alimentaires, Cap Alpha, 34831 Clapiers propose un kit qui permet de réaliser la recherche à partir du milieu d'enrichissement.

Les séquences de cette recherche sont les suivantes :

- 1 - lyse des bactéries avec libération de leur matériel génétique
- 2 - neutralisation puis hybridation avec une sonde spécifique des ARN possédant un triplet AAA et marquée à la fluorescéine.
- 3 - capture de l'hybride par chromatographie d'affinité avec une phase stationnaire TTT se présentant sous forme d'une bandelette.
- 4 - la phase stationnaire est retirée, lavée et placée dans un tube contenant un anticorps anti-fluorescéine couplé à la peroxydase. Incuber.
- 5 - retirer la bandelette, la laver et l'introduire dans un tube contenant le substrat chromogène. Incuber 20 minutes.
- 6 - retirer la bandelette et ajouter la solution d'arrêt. Lire l'absorbance à 450 nm.

F - 6 - 4 . Autres méthodes

Il existe d'autres tests de recherche des *Salmonella* comme le **test 1-2 de Biocontrol** qui est un test qualitatif de détection des *Salmonella* mobiles. Ce test associe le pouvoir sélectif du tétrathionate vis à vis des *Salmonella* et permet de détecter les flagelles de ces germes après qu'ils aient migré dans un milieu contenant des anticorps correspondants.



Il s'agit d'un dispositif en matière plastique transparente constitué de deux chambres. La plus petite, chambre d'inoculation, contient un bouillon au tétrathionate. La plus grande, chambre de migration, contient un milieu semi- solide peptoné renfermant des anticorps H polyvalents (anti-flagellaires). Les bactéries qui cultivent dans le bouillon au tétrathionate et mobiles se déplacent dans la chambre de migration où elles réagissent avec les anticorps anti-flagellaires. Il se produit une agglutination des bactéries: développement d'une immunobande visible à l'oeil nu. La lecture se fait 24 heures après l'ensemencement.

Le **Lumi-phage Testing system** (MCLAS Technologies Inc) est un test de détection des *Salmonella* dans lequel un bactériophage spécifique des *Salmonella* marqué avec du luminol permet la détection de 1 bactérie pour 25 g de produit alimentaire en 1 heure à partir du milieu de pré-enrichissement .

F - 7 . Recherche des *Shigella*

Les *Shigella* sont des germes pathogènes d'origine humaine. Agents de maladies infectieuses telles que la dysenterie bacillaire (*Shigella dysenteriae*), ils sont transmis par l'eau et par les aliments crus (salades, légumes etc...). L'ingestion de quelques milliers de bactéries peut provoquer la maladie. Les aliments à suspecter sont ceux qui sont manipulés sans chauffage et dont le pH est compris entre 6,5 et 7,5.

La recherche de ces germes est réalisable avec la même méthodologie que celle utilisée avec *Salmonella*.

Le sérotypage est effectué à partir d'une culture sur gélose ordinaire. Les Shigelles possèdent des antigènes O (parfois R) et quelques fois des antigènes K ; elles n'ont pas d'antigènes H. Au laboratoire on recherche le sérotype à partir de sérums A, A1, B, C, C1, C2, D et *Alkaescens*.

G - RECHERCHE INDIRECTE DE *Brucella*

Cette recherche est effectuée dans le lait (surtout de chèvre) par sérologie. Un antigène de *Brucella* (souche Londres 99) coloré à l'hématoxyline ou au rose bengale donne une réaction d'agglutination avec les anticorps de type IgG présents dans le lait des animaux malades.

Ring test ou test de l'anneau

1 ml de lait est mélangé avec 1 goutte d'antigène coloré. Si l'échantillon de lait est positif, les germes colorés qui constituent l'antigène sont agglutinés et adhèrent aux globules gras qui, en s'élevant dans le lait, forment un anneau teinté. La rapidité de la réaction est fonction de l'âge du lait testé et de sa teneur en matières grasses. Elle est plus rapide sur un lait frais et est accélérée par incubation à 37°C (lecture en 30 minutes).

Test positif : anneau de crème bleu violet, lait sous jacent blanc

Test négatif : anneau de crème blanc, lait sous jacent bleu violet clair

L'intensité de la réaction est fonction du taux d'agglutinines présentes dans le lait; la technique n'est pas applicable aux laits contenant du colostrum.

La bactérie peut être isolée sur gélose Columbia (cf *Campylobacter*)

Des travaux sont entrepris actuellement pour obtenir des sondes utilisables dans la détection de cette bactéries par hybridation.

Principaux caractères des *Brucella* : coccobacilles Gram- (1 µm x 0,5 µm) asporulés, immobiles, aérobies stricts. Pas d'acidification des milieux additionnés de glucides, uréase +, indole -, catalase +, nitrate réductase +, exigent des atmosphères enrichies en CO₂.

H - RECHERCHE ET/OU NUMERATION DES *Vibrio*

H - 1 . *Vibrio cholerae*

La recherche de cette bactérie ne s'effectue que dans des cas bien précis (épidémies etc...). L'eau est le véhicule de choix de ce vibriion dont l'isolement est basé sur la capacité que présente le germe de pousser dans des milieux dont le pH est supérieur ou égal à 8,5.

Ces germes sont aérobies préférentiels et forment des voiles à la surface des milieux de culture liquides. Sur les milieux gélosés les colonies lisses (S) sont brillantes, translucides, rondes. Le vibriion du choléra est très mobile (cil polaire) ; il se multiplie entre 10 et 40°C et cultive bien entre pH 7,6 et 9, ou dans des milieux salés (3 %). Il est inhibé par le sulfate de magnésium.

Les vibriions du choléra sont oxydase+, gélatine+, H₂S-, citrate+ (lentement), glucose+, amidon+, maltose+, mannose+, lactose-, dextrine+, indole+. Ils donnent la réaction du choléra roth : après 24 h d'incubation dans une eau peptonée additionnée de 0,1 % de nitrate de potassium, l'addition d'une goutte d'acide sulfurique produit une coloration rouge (formation de 2-nitrosoindole).

H - 1 - a . milieu d'enrichissement (eau peptonée alcaline)

peptone	10 g	
NaCl	10 g	
eau D	1000 ml	pH = 9. Stériliser 15 minutes à 121°C.

1 ml d'eau est additionnée à ce milieu. Après 6 h d'incubation à 37°C, on prélève une öse en surface et on ensemence un second tube qui est à sont tour incubé 6 h à 37°C ; l'isolement est réalisé à partir d'une öse prélevée en surface.

H - 1 - b . milieux d'isolement

1 - gélatine nutritive à pH = 9

2 - milieu TCBS

peptone	10 g	
extrait de levure	5 g	
citrate de sodium	10 g	
Na ₂ S ₂ O ₃	10 g	
NaCl	10 g	
bile séchée	8 g	
citrate ferrique	1 g	
saccharose	20 g	
bleu de bromothymol	40 mg	
bleu de thymol	40 mg	
gélose	14 g	
eau D	1000 ml	pH = 8,6. NE PAS AUTOCLAVER

La plupart des microorganismes sont inhibées en raison du pH élevé (au moins pendant 24 h) ; certains *Proteus* et Streptocoques D peuvent y cultiver. Ce milieu permet la croissance rapide de *V. cholerae* en 15 h à 37°C.

V. cholerae donne sur ce milieu des colonies jaune brun (saccharose+) de 2 à 3 mm de diamètre.

V.parahaeremolyticus donne sur ce milieu des colonies blanches arrondies sur fond vert.

H - 2 . *Vibrio parahæmolyticus*

Il s'agit d'un germe d'origine marine identifié en 1963 par SAKAZAKI au Japon. Entéropathogène, halophile, vibrion Gram-, anaérobie facultatif, il a d'abord été à l'origine de gastroentérites au Japon, pays où le poisson est parfois consommé cru. Tous les produits de la mer sont susceptibles d'être contaminés par cette bactérie.

La préparation de la suspension mère destinée à l'analyse (et de ses dilutions), à partir de poisson ou de crustacé, est toujours réalisée en milieu salé (NaCl 3 %).

H - 2 - a . Numération en milieu liquide**(milieu glucosé au teepol-méthyl-violet)**

extrait de viande	3 g	
peptone	10 g	
NaCl	30 g	
glucose	5 g	
méthyl violet	2 mg	
teepol	4 ml	
eau D	1000 ml	pH = 7,4.

Répartir à raison de 10 ml / tube. Autoclaver 15 minutes à 121°C.

Ensemencer avec 1 ml des dilutions (10⁻¹ à 10⁻⁴) et incuber 18 h à 37°C.

Après incubation 1 ose des tubes positifs est ensemencée sur milieu TCBS (p.72).

Les colonies sont observées après 18 h d'incubation à 37°C.

H - 2 - b . Identification

Le germe est glucose+, lactose-, H₂S-, gaz- (Kligler), mobilité+, glucose+ par voie fermentaire, oxydase+, LDC+, ADC-, gélatine+, croissance à 42°C+, VP-, indole+.

H - 2 - c . Mise en évidence de l'halophilie

Le germe cultive dans les milieux salés (entre 3 et 8 % de sel) mais pas à 0 et 10 % en sel.

1 - milieux liquides salés

Il suffit de préparer une gamme de concentration entre 0 et 100 g/l de chlorure de sodium dans des tubes de milieu du type eau peptonée à pH 9 et de suivre, après ensemencement, la croissance à 37°C après 24 heures d'incubation.

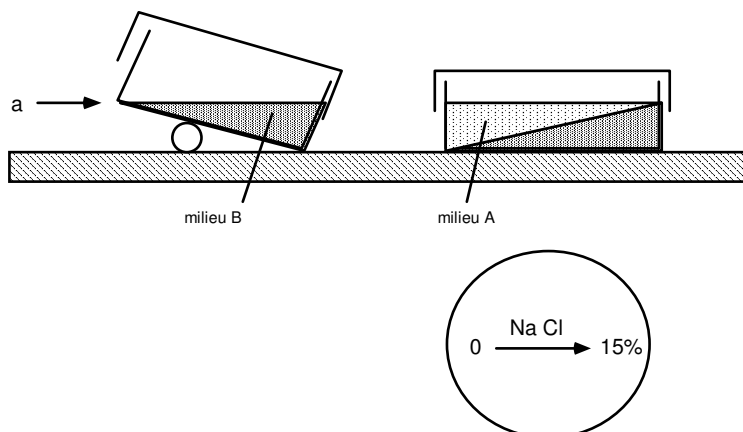
2 - milieu à gradient de concentration en sel (méthode de SZYBALSKI)

	milieu A	milieu B
extrait de viande	3 g	3 g
peptone	5 g	5 g
tergitol	0,1 ml	0,1 ml
gélose	15 g	15 g
NaCl	-	150 g
eau D	1000 ml	1000 ml

pH = 7. Autoclaver 15 minutes à 121°C.

Régénérer les 2 milieux et rajouter (à 55°C) 0,1 ml de solution stérile de chlorure de triphényltétrazolium à 1% à A et B.

Poser une boîte de Pétri avec une inclinaison donnée et verser 8 ml de milieu B de telle sorte que la gélose atteigne le niveau a (cf schéma).



Après solidification, poser la boîte à plat et couler 8 ml de milieu A.

Après nouvelle solidification, ensemencer en strie linéaire selon l'axe du gradient de concentration en sel.

Incuber 24 h à 37°C.

H - 2 - d . Phénomène de KUNAGAWA

V. parahaemolyticus isolé des aliments n'est pas hémolytique tandis qu'isolé à partir d'humains il est β hémolytique.

milieu de WATSAGUNA

extrait de levure	3 g
bactopeptone	10 g
NaCl	70 g

K ₂ HPO ₄	5 g
mannitol	10 g
cristal violet	0,1 mg
gélose	15 g
eau D	1000 ml .
pH = 8. NE PAS AUTOCLAVER.	

Après 30 minutes d'ébullition ajouter 100 ml d'une suspension fraîche d'hématies humaines préalablement lavées 3 fois dans de l'eau physiologique.

Ensemencer en stries ou par points (à partir d'une culture en bouillon trypticase soja à 3 % de NaCl préalablement incubée 20 h à 37°C).

Après 48 h d'incubation à 37°C observer l'hémolyse β (zone claire) autour des zones de développement du *Vibrio*.

H - 2 - e . bouillon glucosé salé au teepol

Ce milieu permet l'isolement et la numération de *Vibrio parahaemolyticus* dans l'eau et les aliments .

extrait de viande	3 g
tryptone	10 g
Na Cl	30 g
glucose	5 g
méthyl violet	2 mg
teepol 610	4 ml
eau D	1000 ml
dissoudre à chaud , ajuster le pH à 8,4.	

I - RECHERCHE ET NUMERATION DE *Bacillus cereus* ET DE *Bacillus* sp

Bacillus cereus est un bacille Gram+ sporulé rencontré dans de nombreux aliments crus ou traités et sur les végétaux. Cette bactérie peut par ailleurs se développer dans de nombreux aliments cuits et mal réfrigérés, les conserves de pommes de terre et de légumes, la viande hachée, les saucisses, les poudres de cacao, les potages etc... et y excréter une phospholipase C. La choline phosphorylée résultant de l'action de la phospholipase est à l'origine, après consommation de l'aliment dans lequel elle a été formée, des signes cliniques de la toxoinfection. On peut alors supposer qu'il existe un grand nombre de bacilles dans l'aliment (plus de 10⁶ / g).

I - 1 . Numération sur milieu de Mossel

extrait de viande	1 g
peptone	10 g
mannitol	10 g
NaCl	10 g
rouge de phénol	25 mg
gélose	15 g
eau D	900 ml
pH = 7,2. Autoclaver 15 minutes à 121°C.	

Au milieu ramené à 45°C ajouter 100 ml d'émulsion de jaune d'œuf à 20 % et 10 ml d'une solution de sulfate de polymyxine à 1 mg/ml stérilisés par filtration. Inoculer 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions sur la surface séchée du milieu. Incuber 48 h à 32°C.

B. cereus donne des colonies rouges plates, rugueuses, sèches, avec un fond coloré en violet, entourées d'un halo de précipité blanchâtre due à l'activité lécithinolytique

Il est possible de compter séparément les formes végétatives et les spores. Pour cela traiter la suspension mère à 80°C pendant 10 minutes (contrôler la température dans un tube témoin).

B. cereus est mannitol- ; la teneur en mannitol du milieu permet de séparer la flore secondaire mannitol + (jaune). L'addition de polymyxine permet d'inhiber une partie de la flore secondaire. *B. cereus* synthétise une lécithinase : les produits d'hydrolyse insolubles formés à partir de lécithine s'accumulent en formant un précipité blanc.

I - 2. Identification

B. cereus est un bacille court (4 µm x 1 µm) à bouts carrés, en chaînes courtes. Les spores sont ovoïdes à paroi mince, non déformantes et centrales.

B. cereus est glucose+, saccharose+, glycérol+, salicine+, xylose-, arabinose-, VP+, amidon +, caséine+, gélatine+, indole-, citrate-, uréase-, cultive en anaérobiose, nitrate réductase+.

I - 3 . Dénombrement des bactéries aérobies ou des spores de *Bacillus* mésophiles ou thermophiles (aromates , épices , autres denrées alimentaires)

Cette numération est réalisée sur gélose glucosée au pourpre de bromocrésol .

Milieu BCP-Glucose

peptone	10 g
glucose	5 g
amidon soluble	2 g
pourpre de bromocrésol	40 mg
gélose	15 g
eau D	1000ml

pH 7,0 . Autoclaver à 121°C pendant 20 minutes.

I - 3 - 1. Numération des bactéries mésophiles aérobies dans les sucres

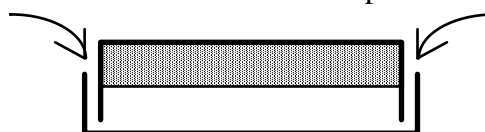
Inoculer 10 ml d'une solution de sucre à 20% dans 100 ml de milieu en surfusion à 47°C. Mélanger et répartir dans 5 boîtes de Pétri. Incuber à 30°C pendant 5 jours et dénombrer chaque jour séparément les colonies jaunes (acidifiantes) et les colonies bleues (non acidifiantes).

I - 3 - 2 . Numération des spores de *Bacillus* mésophiles et thermophiles

Dans les sucres : procéder comme en I-3-1 mais après avoir chauffé la solution sucrée 5 minutes à 100°C. Pour les épices procéder de la même façon mais avec une suspension au 1/10 de l'échantillon .

Pour les spores de *Bacillus* mésophiles incuber à 30°C pendant 5 jours en notant chaque jour le nombre de colonies acidifiantes ou non.

Pour les spores de *Bacillus* thermophiles incuber à 55°C pendant 3 jours après avoir obturé avec de l'huile de vaseline la boîte ou avec une bande adhésive plastifiée.



Dénombrer chaque jour, séparément, les colonies acidifiantes et non acidifiantes.

J. RECHERCHE DE *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis est recherché directement dans les produits alimentaires (lait) et mis en évidence par la coloration de ZIEHL. La spécificité de la coloration repose sur la propriété d'alcoolo-acido-résistance du germe (AAR).

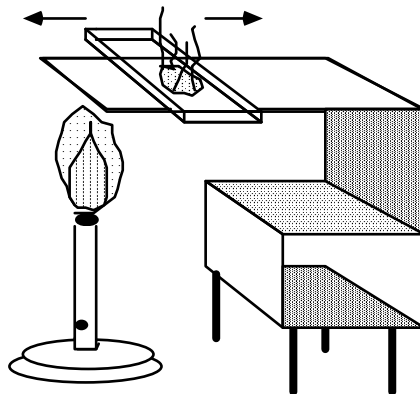
Après centrifugation à 3 000 g pendant 10 minutes du produit liquide (lait par exemple) on réalise des frottis à partir du culot et dans le cas du lait de la crème. Après séchage et fixation à l'alcool absolu, on effectue la **coloration de Ziehl**.

- colorer le frottis fixé par la fuchsine à chaud pendant 10 minutes sur une platine de Malassez (le frottis ne doit pas aller à sec et il doit y avoir émission de vapeurs blanches; il faut rajouter du colorant au fur et à mesure de son évaporation). La composition de la solution de fuchsine phéniquée est la suivante: Fuchsine basique 1 g, phénol aqueux 5,5 ml, éthanol à 95° 10 ml et eau qsp 100 ml.

- décolorer par HNO₃ au 1/2 (ou à H₂SO₄ au 1/4 soit 9 N) pendant 2 minutes
- rincer à l'eau
- décolorer par l'alcool absolu pendant 5 minutes
- rincer à l'eau
- le bleu de méthylène phéniqué (30'')

(bleu de méthylène 2 g, éthanol 95° 10 ml phénol aqueux 2,2 ml, eau qsp 100 ml) est utilisé comme colorant de contraste.

- rincer à l'eau. Sécher. Observer à l'objectif à immersion.



Les bacilles de KOCH (*M. tuberculosis*) se présentent sous forme de bacilles fins et longs colorés en rose sur fond bleu. L'observation de plusieurs dizaines de champs microscopiques est nécessaire avant de conclure.

La culture du germe est possible (milieux de Coletsos, de Dubos au Tween 80, de Løwenstein-Jensen) mais en raison des temps de latence et de doublement très élevés, l'observation visuelle des colonies caractéristiques de la bactérie n'est réalisable qu'après plusieurs jours d'incubation à 37°C (parfois 8 semaines). Les colonies sont lisses sur Coletsos et sèches et rugueuses sur Loewenstein-Jensen .

K - RECHERCHE DE *Yersinia enterocolytica*

Il s'agit d'une entérobactérie présente dans l'environnement (eaux, végétaux) et chez de nombreuses espèces animales (porc) qui peut se développer à des **températures relativement basses** (produits réfrigérés) et excréter une entérotoxine provoquant une entérite. Ses principaux caractères sont les suivants : lactose +, glucose +, gaz -, H₂S -, uréase +, APP -,

ADH -, IDC -, ODC +, galactose +, oxydase -, citrate -, nitrate réductase +, indole + ou -, saccharose +, VP + ou -, saccharose +, VP + ou -, lécithinase -, rhamnose -, sorbitol -.

Il existe 5 biotypes se différenciant par les caractères salicine, esculine, indole et xylose et 34 sérotypes O et 19 sérotypes H. Le germe est mobile à 20°C et immobile à 37°C.

La recherche du germe se fait en 4 phases comme pour *Salmonella*. et cette recherche est possible par hybridation ADN-ADN à partir du milieu d'enrichissement.

1) Pré enrichissement : 50 g de produit sont ajoutés à 200 ml de tampon phosphate 1/15 M à pH = 7,6. Après homogénéisation le mélange est incubé pendant 7 ou 14 jours à 4°C.

2) Enrichissement dans un bouillon au sélénite à 5 % contenant 0,05 % d'extrait de viande (1 ml de milieu de pré-enrichissement dans 10 ml de bouillon au sélénite). L'incubation est réalisée à 23°C pendant 3 jours. La recherche par hybridation ADN-ADN peut se faire après cette phase.

3) Isolement : sur un milieu SS ou bismuth - sulfite gélosé (à 23°C pendant 3 jours) ou sur milieu CIN.

Gélose CIN (cefsulodine, irgasan, novobiocine).

bio-gélytone	17 g	
bio-polytone	3 g	
extrait de levure	2 g	
mannitol	20 g	
sels biliaires	1 g	
chlorure de sodium	1 g	
pyruvate de sodium	2 g	
MgSO ₄	10 mg	
rouge neutre	30 mg	
cristal violet	1 mg	
cefsulodine	15 mg	
irgasan	4 mg	
novobiocine	2,5 mg	
gélose	13,5 g	
eau D	1000 ml,	pH 7,4

Les sels biliaires, le cristal violet , l'irgasan et les antibiotiques inhibent le développement des bactéries Gram + et celle de la plupart des bactéries Gram -. Le mannitol et le rouge neutre permettent une identification présomptive de *Y. enterocolytica* .

L'ensemencement peut se faire directement à partir d'une suspension de l'aliment ou mieux à partir du milieu d'enrichissement .

Incuber entre 23 et 32°C. *Y. enterocolytica* donne de petites colonies (1 mm) à centre rouge entouré d'une zone translucide à contour irrégulier. Après 48 heures d'incubation les colonies peuvent s'entourer d'une zone de précipité de sels biliaires. *Enterobacter*, *Citrobacter* et *Serratia* donnent des colonies roses sur CIN.

4) Identification (galerie traditionnelle des entérobactéries - API 20 , incubation à 30°C)

La présence d'entérotoxine (thermostable à 120° pendant 30 minutes) peut être visualisée par invasion d'une culture cellulaire HeLa.

L - RECHERCHE DE *Campylobacter jejuni*

C. jejuni est un germe commensal de l'intestin de nombreux mammifères et oiseaux. Eau et sol peuvent être contaminés par le germe. Le lait et les volailles semblent être les véhicules les plus importants du germe. L'importance de cette bactérie dans les maladies transmises par les aliments va en grandissant .

C. jejuni est microaérophile (10 % d'oxygène pour une croissance optimale). Il cultive très bien à 42°C. Il s'agit d'un germe de très petite dimension qui peut être isolé par filtration (filtres de 0,65 µm).

La recherche de ce germe est possible par hybridation.

Le germe peut être isolé sur le milieu de SKIRROW après 48 heures d'incubation à 42°C dans une jarre sous CO₂.

Milieu de SKIRROW

<i>milieu de base :</i>	peptones	23 g
(gélose Columbia)	amidon	1 g
	NaCl	5 g
	gélose	13,5 g
	eau D	1000 ml. Stériliser à 121°C pendant 10 minutes.

milieu complet :

Ajouter à 1000 ml de milieu de base ramené à 47°C 150 ml de sang de mouton défibriné (ou 70 ml de sang de cheval lysé) et 10 ml d'une solution d'antibiotiques (vancomycine 10 mg, polymyxine B 5000 UI soit 50 mg, triméthoprime 5 mg et amphotéricine B 2 mg).

L'atmosphère optimale requise est composée de 85 % d'azote, 10 % de gaz carbonique et de 5 % d'oxygène.

L'oxygène atmosphérique présent au taux de 21 % est toxique pour le germe. Une jarre anaérobie, avec générateur d'hydrogène et de gaz carbonique est utilisable à condition d'enlever le catalyseur situé généralement dans le couvercle.

Après incubation à 42°C, les colonies apparaissent, lisses, fines, avec une tendance à confluer. *Campylobacter jejuni* est oxydase +, catalase +, mobilité + (mobilité en flèche comme un *Vibrio*), croissance à 42°C +, croissance à 25°C -, sensibilité à l'acide nalidixique à 30 µg + (disque), hydrolyse l'hyppurate, résistant au TTC à 400 µg/ml.

La sous espèce *C. fetus subsp. intestinalis* cultive à 25 mais pas à 42°C, est résistante à l'acide nalidixique, sensible à la céfalotine et au TTC à 400 µg/ml et n'hydrolyse pas l'hyppurate.

Le milieu Campyloset est un milieu équivalent dans lequel les antibiotiques utilisés sont différents (par litre de milieu : céfopérazone 15 mg, vancomycine 10 mg, colistine 10 000 UI et amphotéricine B 2 mg). Après incubation à 42°C sous atmosphère adaptée, les colonies de *Campylobacter jejuni* ont un diamètre de 1 à 2 mm et s'étalent le long des stries d'ensemencement. Elles sont grisâtres, plates, lisses et brillantes parfois granuleuses.

M - RECHERCHE DE *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un petit bacille Gram + à bouts arrondis de 0,5 à 2 µm de longueur sur 0,4 à 0,5 µm de diamètre pouvant s'associer en palissade. Asporulé, parfois coccobacillaire, oxydase -, catalase +, cette bactérie est aéro-anaérobie mésophile (cultive entre +3 et +45°C avec un optimum à 37°C. La bactérie reste viable après plusieurs années d'entreposage à 4°C. Le genre *Listeria* fait partie des *Lactobacillaceae*. Sept espèces sont décrites dans le genre (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. gravi* et *L. murrayi* et *L. monocytogenes*).

Chez l'homme, ce germe opportuniste qui n'est virulent que si les défenses naturelles de l'organisme deviennent déficientes peut provoquer une méningo-encéphalite, une septicémie, l'avortement de la femme enceinte avec mortalité ou la naissance d'enfants infectés. Les malades sont le plus souvent des personnes âgées, des enfants de moins de 15 ans, des adultes immunodéprimés (malades hépatiques, diabétiques, cancéreux, sidaïques).

En pathologie humaine le sérotype le plus souvent rencontré est le 4b. L'hémolysine est la toxine majeure.

La contamination directe par contact avec des animaux ou des hommes malades est rare. Ce n'est qu'en 1985 que la relation entre la listériose et la consommation de fromage a été indiscutablement établie.

La relation plante-sol, comme pour la plupart des autres germes de la famille des *Lactobacillaceae* permet la constitution d'un réservoir (source primaire). Le germe se rencontre dans les produits laitiers non pasteurisés ou recontaminés. Le changement des habitudes alimentaires avec augmentation de la consommation de produits végétaux crus, réfrigérés est aussi à l'origine de l'augmentation du nombre de cas de listérioses.

La recherche des *Listeria* s'effectue suivant la démarche schématisée dans le tableau A. Dans les milieux de culture, le rôle des divers composés est le suivant :

l'acide nalidixique inhibe certains des germes Gram +, le LiCl les germes Gram -, la cycloheximide les champignons. Les autres antibiotiques ont une action inhibitrice sélective.

Sur le milieu OXFORD (base COLUMBIA et inhibiteurs) et sur gélose PALCAM, *L. monocytogenes* forme des colonies noires par hydrolyse de l'esculine (cf strepto D).

Sur les géloses MMA et LPM, la bactérie forme des colonies qui apparaissent bleutées par transillumination en lumière blanche incidente avec un angle de 45°C.

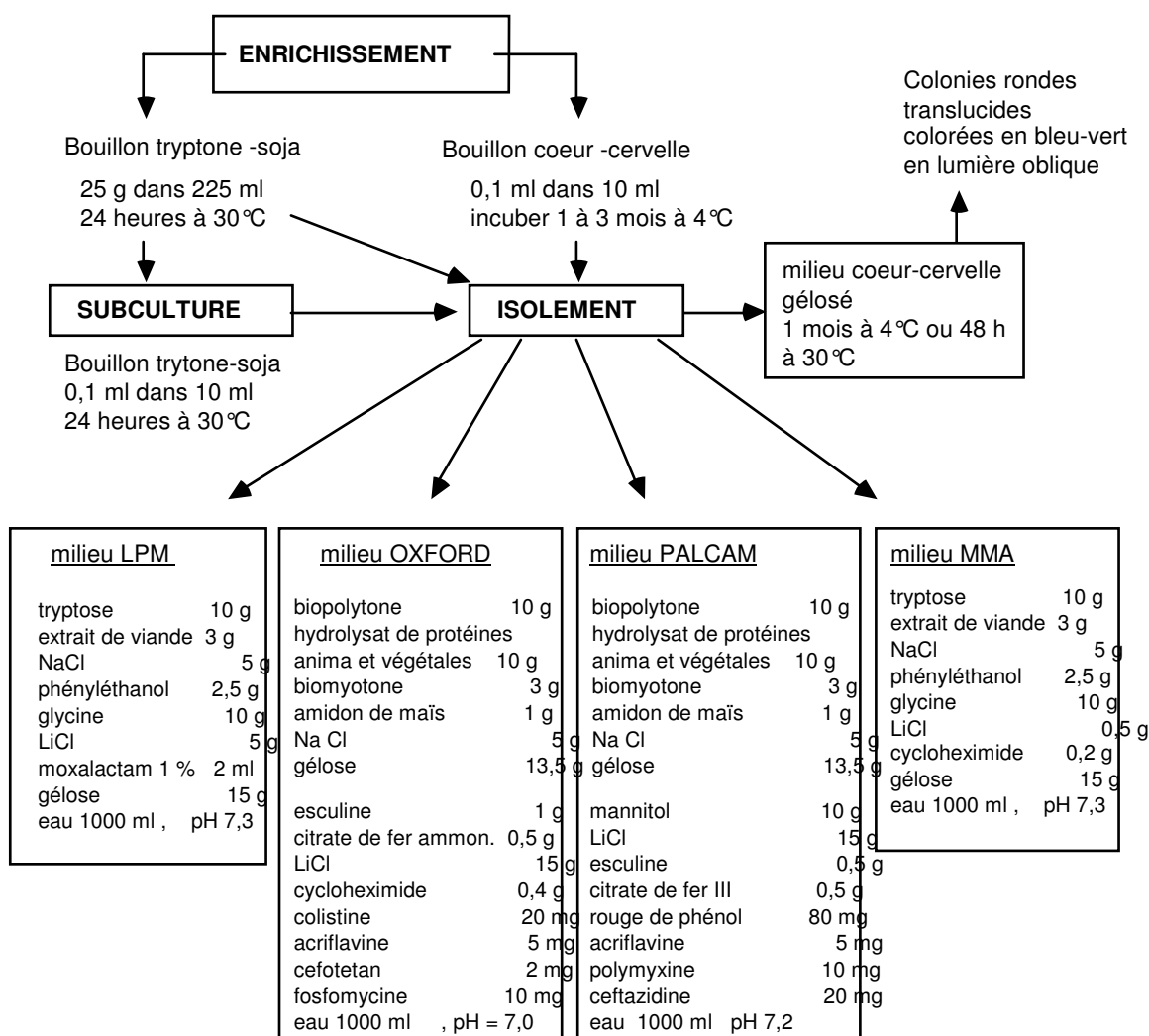


Tableau A . Les milieux d' isolements sont incubés à 35°C pendant 24 à 72 heures.

Un repiquage est alors réalisé sur milieu gélosé trypticase-soja (trypticase -soja - gélose BioMérieux) additionné de 0,6 % d'extrait de levure (24 à 48 heures à 30°C). L'identification est effectuée par la recherche de certains caractères morphologiques et biochimiques tels que :

- l'état frais (mobilité en pirouettes)
- catalase +
- coloration de Gram

- gélose au sang (gélose trypticase - soja - extrait de levure 0,6 % - sang de mouton défibriné 7%). *L. monocytogenes* : hémolyses avec petites zones claires; *L. ivanovii* zones claires nettes.

L'étude des fermentations est réalisée à partir d'une base milieu liquide.

protéose peptone n°3 Difco	10 g
extrait de viande	1 g
NaCl	5 g
pourpre de bromocrésol	15 mg
eau	1000 ml. pH 6,8 , stériliser 15 minutes à 121°C.

L'ose est ajouté au milieu à partir de solutions à 5 % stérilisées par filtration pour obtenir une concentration finale de 0,5 %. Placer des cloches de Durham dans les tubes de 16 x 160. Inoculer avec 0,3 ml d'une culture de 24 heures sur bouillon trypticase soja - extrait de levure et incubé pendant 7 jours à 35°C.

L. monocytogenes est glucose +(gaz -), esculine + (gaz -), maltose + (gaz -), mannitol -, rhamnose + (gaz -), xylose - .

Il existe une méthode de recherche par hybridation ADN-ADN réalisable après enrichissement .

N - NUMERATION DES LEVURES ET MOISSURES

La contamination des aliments par les moisissures est actuellement considérée avec beaucoup d'attention en raison des mycotoxines que ces microorganismes sont capables de synthétiser. Plus de 100 mycotoxines différentes ont été identifiées à ce jour et il est vraisemblable, qu'avec des méthodes d'analyse plus élaborées, d'autres le seront bientôt. Les moisissures sont très largement répandues dans la nature (air, sol...) et elles peuvent très facilement contaminer les aliments en cours de fabrication. Elles peuvent sporuler au cours d'opérations technologiques comme la déshydratation, l'acidification, la réfrigération, l'abaissement de l'activité de l'eau. Leurs enzymes peuvent être à l'origine d'altérations diverses dans les aliments.

Les levures acidophiles, psychrotrophes ou osmophiles peuvent induire des altérations profondes dans les aliments (structure, propriétés organoleptiques etc.). La plupart d'entre elles ne sont pas pathogènes.

Ces germes peuvent être dénombrés sur des milieux rendus sélectifs par acidification ou addition de substances antibactériennes (antibiotiques).

milieu gélosé à la pomme de terre (PDA)

infusion de pommes de terre	200 g
glucose	20 g
gélose	15 g
eau D	1000 ml

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Ajuster le pH à 3,5 par addition d'acide tartrique à 10%.ensemencer en surface par étalement à partir de 100 µl de produit ou de ses dilutions. Incuber 3 à 5 jours à 20-25°C.

milieu gélosé glucosé à l'oxytétracycline (OGA)

extrait de levure	5 g
glucose	20 g
gélose	16 g
eau D	1000 ml
pH = 6,8. Autoclaver 10 minutes à 121°C.	

Après régénération ajouter au milieu, ramené à 50°C, 100 ml d'une solution stérile d'oxytétracycline à 1 mg / ml ou 100 ml d'une solution stérile fraîchement préparée de gentamycine à 0,5‰. Avec le milieu PDA l'ensemencement est réalisable dans la masse avec une prise d'essai de 1 ml. En général la numération est effectuée après étalement de 0,1 ml de suspension mère ou de ses dilutions à la surface du milieu.

Le nombre de levures et moisissures est évalué après 3 à 5 jours d'incubation à 20-25°C.

O - RECHERCHE DES BACTERIOPHAGES FECAUX

Les bactériophages peuvent être présents dans l'environnement mais les phages capables d'infecter une espèce particulière de bactérie se retrouvent surtout dans des milieux où la bactérie est présente. Par exemple, les coliphages se retrouvent dans les matières fécales ou l'eau polluée par ces dernières.

Le nombre de phages dans les aliments (eau surtout) est souvent très faible et il est nécessaire de procéder souvent à un enrichissement par centrifugation ou autre.

Recherche des bactériophages d'*Escherichia coli*

- enrichissement

5 ml d'eau à analyser sont additionnés de 1 ml de chloroforme. Après centrifugation à 1500 g pendant 5 minutes, 1 ml de surnageant est transféré dans 9 ml d'une culture en bouillon ordinaire d'*E. coli* en phase exponentielle (2 h, 37°C). L'incubation est réalisée à 37° pendant 3 h.

L'enrichissement peut porter sur un grand volume d'eau. A 50 ml d'eau à analyser on ajoute 50 ml d'eau peptonée à double concentration et 10 gouttes d'une culture de 10 h d'*E. coli* sur eau peptonée. Après 10 h d'incubation à 37°C (production de phages), 6 ml sont prélevés et chauffés en tube à 56°C pendant 30 minutes; les cellules bactériennes sont détruites tandis que les coliphages résistent au traitement.

- mise en évidence

Sur une gélose ordinaire réaliser un étalement uniforme en surface à partir de 2 gouttes de culture d'*E. coli* en eau peptonée. Déposer à la surface 1 öse du tube contenant les coliphages. Incuber 8 h à 37°C . La présence de coliphages se traduit par une plage claire au point d'inoculation.

Les résultats sont exprimés en présence ou absence de phages dans le volume d'eau analysée.

P - RECHERCHE DE LA TOXINE BOTULINIQUE

Cette recherche dangereuse n'est qu'exceptionnellement réalisée par des laboratoires spécialisés. Elle est effectuée par ELISA ou par la méthode des souris protégées.

Il existe 6 toxines (A ,B ,C ,D ,E , F et quelques sous-groupes) qui ont une action toxique identique mais qui sont antigéniquement différentes, chaque type de toxine n'étant neutralisé que par le sérum spécifique contenant les anticorps correspondants.

Les types les plus fréquents sont les types A, B, E (A et B dans les conserves de légumes, jambons, conserves de viande, B et E dans les poissons et produits dérivés).

Méthodologie - 1 "volume" d'aliment est additionné d'1 volume d'eau physiologique stérile. Après mélange (broyage ou mortier 10 minutes) on centrifuge à 5000 g pendant 10 minutes. Le surnageant est soumis à une filtration stérilisante (Millipore 0,45 µm).

- 2 ml de filtrat sont prélevés et dilués (1 à 10⁻⁶) dans de l'eau physiologique. On injecte 0,5 ml de chaque dilution par voie intrapéritonéale à la souris (2 souris par dilution). On détermine ainsi la dose minima mortelle (DMM) de l'extrait. La mort survient dans les 72 h en présence de toxine.

- 2 ml de filtrat sont prélevés et chauffés 10 minutes à 100°C. 0,5 ml est injecté à la souris (2 souris par essai). La toxine perd son pouvoir toxique dans ces conditions (100°C, 10 minutes).
- 2 ml de filtrat sont traités par la trypsine (0,2 ml de trypsine DIFCO à 10 %) pendant 45 minutes à 37°C. Après dilutions injecter 1 ml à la souris. Le pouvoir toxique est maintenu dans ces conditions de traitement.

Répartir le filtrat à raison de 2 ml / tube

Ajouter au premier 0,1 ml de sérum antitoxinogène A

Ajouter au second 0,1 ml de sérum antitoxinogène B

.....
Ajouter au sixième 0,1 ml de sérum antitoxinogène F

Laisser en contact 30 minutes à 37°C. Après injection à la souris de 0,5 ml, seule survivra celle qui a été inoculée avec le surnageant traité par le sérum correspondant à la toxine qu'il contenait. Il est possible d'injecter le sérum à la souris et d'injecter ensuite le filtrat.

Q - LES MALADIES PARASITAIRES

Le nombre d'humains affectés par ces maladies et en particulier atteints d'HELMINTHIASES est très élevé (plusieurs dizaines de millions pour la trichinose et le téniasis et plusieurs centaines de milliers pour l'échinococcose).

Dans les aliments la recherche des parasites se fait par observation directe. Cette recherche est surtout réalisée dans la viande et les produits carnés ; elle permet de détecter les cestodes (*Taenia*, *Echinococcus*), les nématodes (*Trichinella*, *Ascaris*, *Dracunculus*), les trématodes (*Echinostoma*) et les protozoaires (*Toxoplasma*, *Entamoeba*).

L'examen histologique des viandes est réalisé sur des coupes fixées (formol à 5 %) déshydratées par l'éthanol avant inclusion dans la paraffine. Les coupes histologiques réalisées au microtome sont colorées à l'éosine orange G après déparaffinage au xylol.

La trichinose est due à un nématode (*Trichinella spiralis*) dont les larves s'enkystent dans le muscle strié d'animaux. Les kystes donnent, chez l'homme qui les a ingérés, des larves qui s'enkystent à leur tour. La viande de porc mal cuite ou mal salée est souvent porteuse de ces microorganismes.

Le taeniasis est très répandu en Afrique et en Asie. *Taenia saginata* ou *T. solium* se développent dans l'intestin de l'homme contaminé. Ces parasites proviennent souvent du porc (*T. solium*) ou du bœuf (*T. saginata*). L'homme s'infecte en consommant de la viande contenant des cysticerques vivants, forme intermédiaire du cycle à 2 hôtes, soit *Cysticercus bovis* (bœuf), soit *C. cellulosae* (porc). Les animaux ne peuvent s'infester que s'ils consomment des aliments contenant des œufs produits par la forme adulte or ces œufs ne sont éliminés que par les hommes porteurs de ténia.

L'échinococcose est une maladie grave souvent mortelle chez l'homme. L'homme s'infeste en absorbant des œufs éliminés par le chien porteur de la forme adulte du cestode: *Taenia echinococcus*.

La toxoplasmose et la Sarcosporidiose dues à des parasites présents dans des viandes (porc en particulier) sont très étudiées à l'heure actuelle.

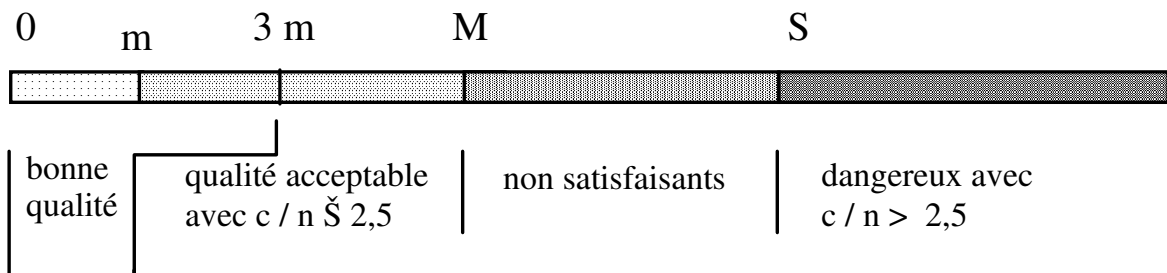
IV. ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES

Les méthodes utilisées et indiquées dans chacune des analyses décrites dans ce chapitre sont détaillées dans le chapitre III.

Pour une analyse donnée les numérations d'une flore particulière sont à réaliser pour des dilutions du produit qui sont indiquées entre parenthèses. Par exemple pour les coliformes fécaux (0 - 10⁻³) signifie que les dilutions à analyser sont les suivantes : produit , 10⁻¹ , 10⁻² et 10⁻³. La bonne connaissance du produit fabriqué permet ensuite de limiter le nombre d'analyse.

IV - A - PRESENTATION DES RESULTATS

L'appréciation de la qualité microbiologique d'un produit donné résulte souvent de l'interprétation de cinq analyses d'échantillons réalisées dans une même fabrication. La qualité du lot et par là même la qualité de l'ensemble de la fabrication devront alors être appréciables.



c = nombre d'échantillons entre m et M

n = nombre d'unités de l'échantillon

M = 10 m en milieu solide

M = 30 m en milieu liquide

S = m . 1000 seuil de toxicité

m fixé par décret (21 décembre 1979)

3m est un seuil limite de qualité satisfaisante tenant compte de la tolérance analytique (limite supérieure de IC 95%)

Cette valeur de S est utilisable pour la flore aérobie mésophile, les coliformes, les coliformes fécaux et les anaérobies sulfite-réducteurs.

En ce qui concerne *Staphylococcus*, le critère S est égal à m.1000 sans toutefois pouvoir dépasser 5.10⁴ / g ou ml . La présence de 1 seule *Salmonella* pour la prise d'essai (en général de l'ordre de 25 g à 25 ml) suffit pour qualifier le produit de "toxique".

EXEMPLE : Essai d'estimation de la qualité dans le cas où 5 analyses* (FAMT , coliformes, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus*, ASR à 46°C, *Salmonella*) **sont effectuées sur chacun des 5 échantillons prélevés.**

***Il s'agit des analyses les plus fréquemment réalisées au cours du contrôle systématique de la qualité**

Dans ce cas (5 échantillons, 5 analyses), chaque résultat d'analyse est affecté de la valeur (attribut) suivante :

-entre 0 et m : attribut égal à 0 pour chaque analyse

-entre m et 3 m : attribut égal à 0,01 pour chaque analyse

- entre 3 m et M : attribut égal à 0,4 pour chaque analyse
- entre M et S : attribut égal à 1,5 pour chaque analyse
- valeurs supérieures à S : attribut égal à 46 pour chaque analyse

Si la somme des attributs pour ces 5 échantillons (30 analyses) est :

- égale à 0 : excellente qualité du lot et donc de la fabrication
- comprise entre 0,01 et 0,3 : qualité satisfaisante
- comprise entre 0,4 et 1,08 : qualité acceptable
- comprise entre 1,5 et 45 : qualité non satisfaisante
- supérieure à 45 : produit dangereux

Dans l'exemple ci-après, c'est l'évaluation de la qualité microbiologique d'une fabrication de plat cuisiné à l'avance qui est décrite.

ANALYSE D'UN PLAT CUISINE A L'AVANCE	Résultats analytiques (UFC ou UFT / g) échantillon n°					NORME (19 jan 80)
	1	2	3	4	5	
date de prélèvement	17 /3 /91	17 /3 /91	17 /3 /91	17 /3 /91	17 /3 /91	
FAMT à 30°C	2.10 ⁶	10 ⁵	4.10 ⁴	7.10 ⁵	6.10 ⁴	3.10 ⁵
coliformes 30°C (DCL)	150	2.10 ²	25	2.10 ²	10 ²	10 ²
coliformes fécaux (BLBVB)	5	50	10	6	8	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	10 ²	0	0	50	10 ²
ASR à 46°C	10	50	5	10	0	30
<i>Salmonella</i> (25 g)	0	0	0	0	0	0

Les normes (valeurs de m concernant ce produit sont indiquées dans le JO) sont indiquées dans la colonne de droite et ne sont jamais dépassées pour *Salmonella* dans les échantillons de plats cuisinés, sinon le lot serait qualifié de toxique.

Les valeurs de 3m, M et S ainsi que les attributs de l'analyse sont les suivants:

	échantillon n°					valeurs des paramètres			
	1	2	3	4	5	3m	M	S	m
FAMT à 30°C	0,4	0	0	0,01	0	9.10 ⁵	3.10 ⁶	3.10 ⁸	3.10 ⁵
coliformes 30°C (DCL)	0,01	0,01	0	0,01	0,01	3.10 ²	10 ³	10 ⁵	10 ²
coliformes fécaux (BLBVB)	0	0,4	0,01	0	0	3.10	3.10 ²	10 ⁴	10
<i>Staphylococcus aureus</i>	0	0	0	0	0	3.10 ²	10 ³	10 ⁴	10 ²
ASR à 46°C	0	0,01	0	0	0	90	3.10 ²	3.10 ⁴	30
<i>Salmonella</i> (25 g)	0	0	0	0	0	0	0	0	0
total / analyse	0,41	0,42	0,01	0,02	0,01	en UFC ou UFT / g			
TOTAL	0,87								

Cette valeur de 0,87 correspond, pour le plat cuisiné, à une qualité acceptable du lot.

IV - B - ANALYSE DES EAUX DE CONSOMMATION

Il est aujourd'hui évident que l'eau est essentielle à bien des égards. Disposer d'une eau potable et évacuer des eaux usées les moins polluées possibles constituent deux problèmes majeurs de l'hygiène urbaine mais aussi de la plupart des industries alimentaires.

Les eaux destinées à l'alimentation humaine (boissons, préparation d'aliments etc.) ont des origines diverses (eaux souterraines ou de surface).

La flore microbienne présente dans l'eau est très variée et dépend de l'origine de l'eau (eau de captage ou de distribution, eau résiduaire etc.).

Parmi les principaux microorganismes susceptibles de se trouver dans l'eau on rencontre essentiellement des germes normalement aquatiques, des germes telluriques et des germes d'origine intestinale :

- Les bactéries vivant normalement dans l'eau sont surtout représentées par des bacilles ou des vibrions Gram - (*Vibrio*, *Flavobacterium*, *Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Cytophaga*, *Acinetobacter*, *bactéries sulfato-réductrices* ou *ferrugineuses*, *Sphaerotilus*, *Spirillum* etc...) des bactéries Gram + (*Streptomyces*, *Micrococcus*, *Corybacterium*). Bon nombre des bactéries typiquement aquatiques sont difficiles à cultiver au laboratoire et requièrent des milieux très dilués (ne cultivent pas ou peu sur les milieux ordinaires) et ont des températures optimales de croissance de 20°C ou moins. Certaines de ces bactéries (*Sphaerotilus*, *Leptothrix*, *Gallionella* et à un degré moindre *Pseudomonas* et *Acinetobacter*) sont qualifiées de mucogènes car elles induisent des troubles et la formation de "filaments" qui peuvent engendrer des corrosions ou bloquer les canalisations. Les germes typiques de l'eau sont souvent rencontrés sur les parois des canalisations ;

- Les germes telluriques sont surtout représentés par des germes sporulés comme par exemple *Clostridium*, *Bacillus* ou des germes des genres *Enterobacter* ou *Streptomyces*.

- Les germes de contamination intestinale humaine ou animale sont souvent pathogènes (Streptocoques D, entérobactéries dont *Salmonella*, *Clostridium*, *Vibrio* etc...). Ces bactéries ne se multiplient pas dans l'eau "peu chargée" en matières organiques. Ces germes sont "blessés" dans l'eau et leur culture nécessite souvent la revivification.

En dehors de ces microorganismes on peut signaler la présence éventuelle dans l'eau :

- d'algues microscopiques (*Chlorella*) photosynthétiques qui cultivent dans l'eau avec formation d'un "mucus chlorophyllien".

- de protozoaires et d'autres parasites animaux ou humains, en particulier sous des climats chauds et humides (kystes de la cysticercose, de l'amibe *Entamoeba histolytica*, douve du foie *Fasciola hepatica*, cercaire de la schistosomiase etc.).

- de virus (virus de la poliomyélite, hépatite virale, entérovirus, etc.).

La présence de microorganismes pathogènes dans l'eau est généralement la résultante d'une contamination de la nappe ou de la rivière ou encore du lac. Une contamination "secondaire" de l'eau de distribution peut intervenir avec des installations détériorées. Ces germes pathogènes sont généralement peu résistants en milieu aqueux et leur survie n'est pas bonne : les problèmes sanitaires qu'ils posent résultent alors de leur présence en nombre limité.

IV - B - 1. Définition d'une eau potable

Toute eau, pour être considérée comme potable, doit satisfaire aux conditions bactériologiques définies par le décret du 8 mars 1991 n°91-257. Les limites de qualité microbiologique des eaux destinées à la consommation humaine sont les suivantes :

- 1) l'eau ne doit pas contenir de germes pathogènes ou de parasites
- 2) Les limites d'acceptabilité sont de :
 - 0 *Salmonella* dans 5 litres

- 0 *Staphylococcus* pathogène dans 100 ml
- 0 bactériophage fécal dans 50 ml
- 0 entérovirus dans 10 litres
- 0 coliforme thermotolérant dans 100 ml
- 0 streptocoque fécal dans 100 ml
- 95 % au moins des échantillons prélevés ne doivent pas contenir de coliformes /100 ml
- pas plus d'une spore de bactéries anaérobies sulfito-réductrices / 20 ml

Lorsque les eaux sont livrées sous forme **conditionnée**, le nombre de germes aérobies mésophiles revivifiants ne doit pas dépasser 20 et 100 UFC / ml respectivement après incubation à 37°C pendant 24 heures et 22 °C pendant 72 heures.

L'eau destinée à la boisson, conservée et livrée en bouteilles ou autres récipients, doit présenter les mêmes autres critères que les eaux non traitées. L'analyse doit être réalisée dans les 12 heures suivant le conditionnement.

Les exigences de qualité des eaux douces superficielles destinées à produire de l'eau potable sont fonction des types de traitements qu'elle subira.

	en UFC ou UFT / 100 ml		
	A1	A2	A3
Coliformes totaux (37°C 24h)	50	5000	50000
Coliformes thermotolérants	20	2000	20000
Streptocoques fécaux	20	1000	10000
Salmonelles dans 5000 ml	0	0	0

A1 : traitement physique simple et désinfection

A2 : traitement normal physique, chimique et désinfection

A3 : traitement physique, chimique poussé, affinage et désinfection

IV - B - 2. Divers types d'analyses d'eau distribuées par un réseau public ou privé

a) analyse complète (de type B3)

Ce type d'analyse est réalisé sur une eau inconnue destinée à la distribution par exemple. Elle comprend : les dénombrements des germes aérobies revivifiants (22°C - 72 h et 37°C - 24 h), des coliformes totaux et thermotolérants (avec éventuellement recherche d'*E. coli*), des streptocoques fécaux, des spores de *Clostridium* sulfitoréducteurs.

A partir d'eaux suspectes la recherche des phages fécaux, de *Salmonella*, de *Shigella*, de *Vibrio* etc... peut être entreprise.

b) analyse sommaire ou de surveillance (de type B2)

Elle comprend la numération des germes aérobies revivifiants (22°C - 72 h et 37°C - 24 h), des coliformes thermotolérants (*E. coli*), des streptocoques fécaux.

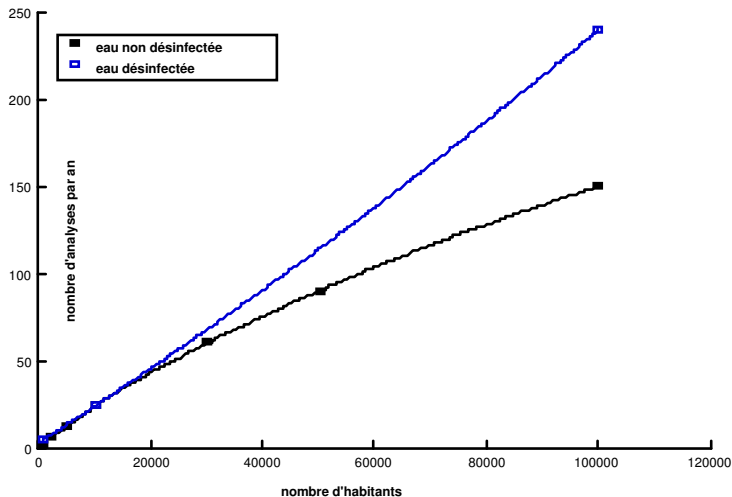
c) Analyse de surveillance réduite (de type B1)

Elle comprend la numération des coliformes thermotolérants (*E. coli*) et des streptocoques fécaux.

IV - B - 3 - Prélèvement et fréquence des analyses

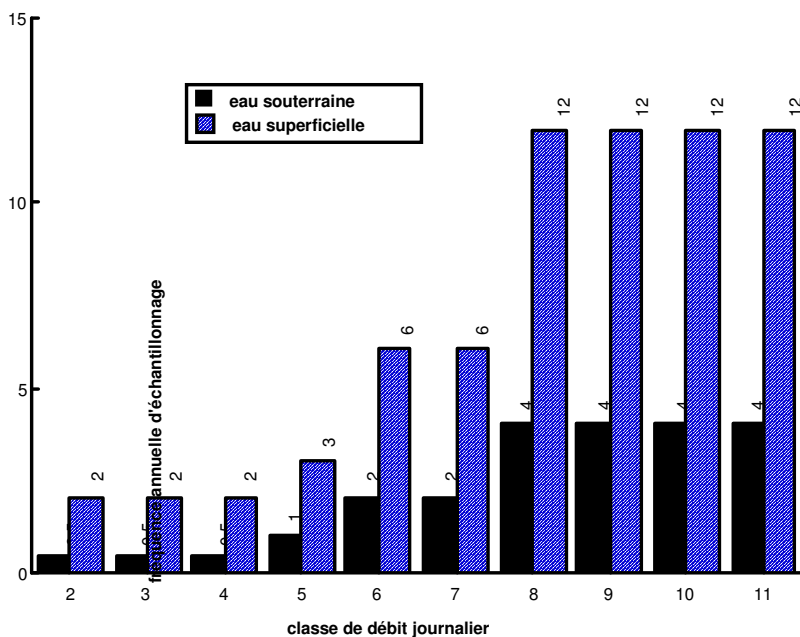
Les prélèvements d’eau à analyser sont régis par de Décret n° 91-257 du 7 mars 1991. Les analyses à réaliser pour des eaux souterraines ou superficielles sont du type :

- B1 au point de puisage avant traitement
- B3 avant traitement ou au point de puisage en l’absence de traitement
- B2 en réseau



La fréquence des analyses de l’eau distribuée est fonction du nombre d’habitants et sa valeur minimale est de 2 à 4 pour les communes de 500 habitants (eau non traitée - eau traitée), 6 pour les villages de 2000 habitants, 12 pour 5000 habitants etc. L’extrapolation linéaire est à réaliser pour des villes de plus de 100000 habitants. Cette analyse est du type **B2**.

En ressource et en usine de production d’eau, la fréquence annuelle varie en fonction du débit journalier, en fonction de l’origine et du traitement. Ainsi au point de puisage avant traitement la fréquence annuelle d’analyse doit être la suivante avec une analyse de type B1:



Avec comme symbole les correspondances indiquées dans le tableau ci-dessous les analyses sont du type B3.

Classe	débit journalier (m ³ .j ⁻¹)	fréquence annuelle		
		P1	P2	P3
1	inf 100	1	-	-
2	100 à 399	2,5	1	0,2
3	400 à 999	2,5	1	0,2
4	1000 à 1999	3,5	1	0,2
5	2000 à 5999	7	1	0,5
6	6000 à 9999	8	1	0,5
7	10000 à 19999	14	2	1
8	20000 à 29999	22	3	1
9	30000 à 59999	42	6	1
10	60000 à 99999	70	10	1
11	> à 100000	140	20	1

Les principaux types d'eau sont les suivants :

a) Quantité d'eau à prélever

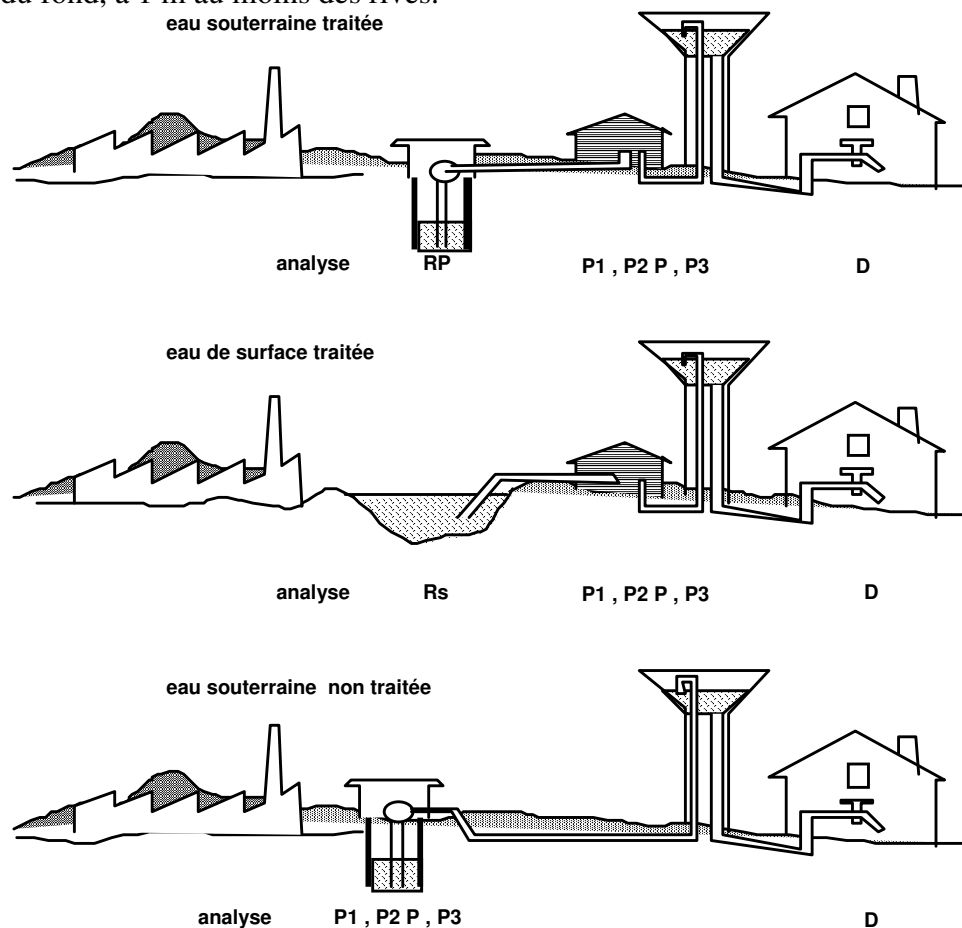
Elle varie avec le type d'analyse de 5 fois 1 litre (analyse de type B3) à environ 300 ml (analyses de types B1 et B2). Se référer aux règles d'échantillonnage.

b) Eaux de source

Un griffon (tube en acier inoxydable coudé) est enfoncé dans l'orifice d'émergence d'au moins 50 cm. On laisse couler plusieurs heures. On flambe l'orifice et le volume d'eau nécessaire à l'analyse est recueilli après refroidissement (10 minutes).

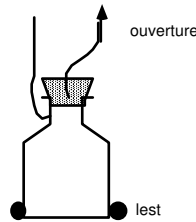
c) Eaux de surface

On utilise des flacons stériles lestés. L'eau est prélevée à 30 cm au moins de la surface et à moins de 30 cm du fond, à 1 m au moins des rives.



d) Eaux de puits

Le prélèvement s’effectue comme pour les eaux de surface. Il faut éviter de toucher les bords qui sont en général couverts d’enduits muqueux très riches en microorganismes. S’il y a une pompe, laisser couler 2 ou 3 heures avant de procéder au prélèvement .



e) Eaux de distribution

C’est l’analyse la plus souvent réalisée. Cette eau peut provenir de forages, de sources, de rivières ou de lacs. Elle est en général collectée puis élevée dans des réservoirs avant d’être distribuée aux consommateurs ou dans l’usine par un réseau de canalisations.

Très souvent cette eau est soumise à des traitements physicochimiques de clarification (sédimentation), de stérilisation (soit par le chlore soit par ozonisation).

Le **chlore** présent dans les eaux chlorées ou javellisées doit être éliminé avant de procéder à l’analyse microbiologique. Pour cela on ajoute quelques cristaux de thiosulfate de sodium dans le flacon destiné au prélèvement ou mieux 0,2 ml d’une solution de thiosulfate de sodium à 2 % (P/V) pour 100 ml d’eau à analyser.

La mise en évidence du chlore libre peut s’effectuer par la méthode à l’orthotoluidine :

10 ml d’eau + 1 ml de réactif à l’orthotoluidine (1g d’orthotoluidine pour 1000 ml d’acide chlorhydrique 0,46 N). Si l’eau contient du chlore une coloration jaune apparaît (sensibilité voisine de 0,01 mg de chlore par litre d’eau).

Les **eaux conditionnées et la glace alimentaire** ,subissent une analyse de type B3 avec 3 à 6 analyses au moins par an, l’analyse étant réalisée à la ressource, avant soutirage ou avant congélation, après conditionnement .

Si l’eau utilisée dans les **entreprises agroalimentaires** n’est pas d’origine publique, les analyses à réaliser sont du type B3 et leur fréquence correspond à celle donnée en fonction du débit (tableau p.80)

Le contrôle microbiologique est donc effectué à la source (ou à la station de pompage), au niveau de la station de traitement, à la sortie du réservoir ou au niveau du robinet chez l’usager. Dans l’usine le contrôle de la qualité de l’eau doit se faire tout au long de son réseau (entrée, traitement de déminéralisation, etc.)

IV - B - 4 - Analyse microbiologique

a) Dénombrement de la flore totale (eau - 10⁻⁴)

Méthodes utilisables : classique, filtration, Pétrifilm. Milieu PCA surtout.

Certaines tables”anciennes” donnent “la valeur hygiénique” d’une eau en fonction du nombre de germes totaux par ml. Ainsi la table de MIQUEL donne :

eau très pure	0-10 ²	germes/ml
eau pure	10 ² -10 ³	germes/ml
eau médiocre	10 ³ -10 ⁴	germes/ml
eau impure	10 ⁴ -10 ⁵	germes/ml

Ces valeurs n’ont qu’une plus qu’une signification très limitée et dépendent de la nature de la flore comptée qui est fonction de la composition du milieu et des conditions d’incubations.

b) Tests microbiens de contamination fécale

1) coliformes totaux et/ou des thermotolérants

(BLBVB : eau - 10^{-3} , VRBL ou DCL : eau - 10^{-2}).

Principales méthodes utilisables : classique, filtration, Pétrifilm.

En milieu liquide, ensemercer en fonction de la charge de l'eau :

50 ml d'eau avec 50 ml de BLBVB à double concentration

5 fois 10 ml avec 10 ml de BLBVB à double concentration

5 fois 1 ml avec 10 ml de BLBVB normal

puis ensemencements avec 1 ml des dilutions

2) numération des streptocoques fécaux (eau- 10^{-2})

Méthodes utilisables : classiques en milieux liquides ou solides, filtration

3) recherche des coliphages

c) Numération des anaérobies sulfito-réducteurs (eau - 10^{-3})

Méthodes utilisables : classiques en milieux liquides ou solides, filtration. Numération des spores après traitement à 80°C pendant 5 minutes.

d) Numération des germes putrides (eau - 10^{-3})

Il s'agit de bactéries productrices d' H_2S à partir de thiosulfate ou des acides aminés soufrés présents dans les protéines. La présence de ces germes diminue la qualité "technologique" ou "marchande" de l'eau. Aucune conclusion ne peut être tirée quant à la pathogénicité de cette catégorie de microorganismes.

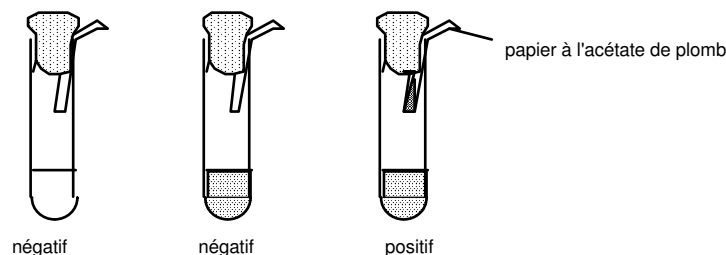
milieu

bouillon nutritif	1000 ml
peptone tryptique	20 g
NaCl	10 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$	1 g

pH = 7,2. Stériliser par autoclavage 15 minutes à 121°C .

Après ensemencement placer une bandelette de papier filtre inhibé d'acétate de plomb entre le bouchon et le tube et incubé 48 h à 37°C .

lecture



Tout tube avec trouble et noircissement du papier à l'acétate est considéré comme positif.

e) Recherche des germes pathogènes

Cette recherche est difficile car les bactéries pathogènes sont souvent peu nombreuses, ne sont pas dans leur milieu naturel, sont détruites soit par choc osmotique soit par des phages; de plus, ces bactéries sont souvent plus ou moins inhibées par la flore de l'eau.

Il faut en général procéder à une concentration préalable de ces germes en utilisant des milieux de pré-enrichissement (revivification) et d'enrichissements adéquats, ou concentrer au préalable les germes pathogènes par des méthodes physiques (centrifugation après addition à l'eau de lait d'alumine, filtration surtout).

Pour *Salmonella* : pré-enrichissement, enrichissement (sélénite à 37 ou 43°C) puis SS

Pour *Vibrio cholerae* : enrichissement en milieu à pH alcalin

Pour *Clostridium perfringens* : méthode par filtration puis milieu TSC ou TSN

Pour *Legionella* : gélose Columbia au sang avec cystéine, pyrophosphate ferrique sélénite et comme inhibiteurs cefamandole, polymyxine, anisomycine. Incubation à 37°C pendant 10 jours avec 10% de CO₂.

Pour *Pseudomonas aeruginosa* : filtration et milieu de King A.

f) résultats

Donner tous les renseignements concernant cette eau (commune, mode de distribution, le lieu du prélèvement, l'origine de l'eau, la date du prélèvement, la température de l'eau, le mode de transport, la date de l'analyse et le nom de l'analyste etc...).

Exprimer les résultats de l'analyse microbiologique par le nombre ou la présence de germes retrouvés dans 1 ou 10 ou X ml d'eau et les méthodes utilisées.

g) La qualité microbiologique de l'eau dans une "usine agroalimentaire"

Le cahier des charges concernant la qualité de l'eau dans l'usine doit être très rigoureux. Par exemple la présence de germes saprophytes psychrotrophes a une incidence sur la stabilité des aliments réfrigérés. Des germes comme *Sphaerotilus* ou *Leptothrix* peuvent bloquer des transferts d'eau dans des canalisations etc.

h) Analyses par filtration

Les méthodes d'analyse par filtration se prêtent très bien à l'analyse de l'eau, en particulier quand sa charge microbienne est très faible.

Ses avantages sont les suivants : rapidité, peu coûteuse, l'échantillon peut être traité sur place, les microorganismes peuvent être revivifiés facilement, de grandes quantités d'eau sont analysables, les antimicrobiens éventuellement présents sont éliminés. Ses inconvénients sont liés à la non mise en évidence de la production de gaz pour les coliformes, la non utilisabilité avec les eaux "troubles" qui colmatent la membrane, et la présence d'interférences de cultures sur le filtre.

4 - C - ANALYSE DU LAIT ET DES PRODUITS LAITIERS

"Le lait est le produit de la traite totale, effectuée plus de 7 jours après la mise bas de vaches saines, en bon état et soumises à des traites régulières". La législation requiert un taux de matières grasses supérieur ou égal à 35 g/L pour le lait commercialisé « entier ».

Le lait de vache est de très loin le plus répandu et, de par sa composition, il constitue un bon milieu de culture pour la plupart des microorganismes. Prélevé dans des conditions d'hygiène rigoureuses à partir d'un animal sain, le lait contient quelques milliers de germes par ml. Il s'agit de germes présents sur le pis et dans les canaux galactophores : *Micrococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus* (*S. lactis* surtout) qui en se développant vont conduire à son altération par acidification essentiellement. La présence de globulines dans le lait (lacténines) empêche la prolifération des bactéries dans la première heure qui suit la traite. Les laits de catégorie A ont des charges microbiennes voisines de 10 à 30 000 germes / ml. Les **laits paucimicrobiens** ont des charges microbiennes voisines de 3000 germes par ml ; ceci résulte de l'ensemble des mesures prises pour maîtriser la qualité de ce produit alimentaire hautement périssable (hygiène de la traite, désinfection des récipients et matériels de collecte, réfrigération immédiate à 4°C etc.).

Entre 15 et 30°C c'est surtout *Streptococcus lactis* et des Corynéformes qui se développent tandis qu'entre 30 et 40°C ce sont surtout les *Lactobacillus*, *Streptococcus thermophilus* et les éventuels coliformes. Ces organismes fermentent le lactose avec production d'acide lactique. Avec un lait naturellement contaminé, la coagulation acide fait "tourner" le produit, le coagulum pouvant être homogène ou au contraire grumeleux, gazeux ou à odeurs variables. Cette acidification empêche la prolifération des organismes putréfiants.

Les **laits pasteurisés ou stérilisés** peuvent devenir filants ou acquérir des odeurs maltées ou fruitées, voire ammoniacales ou encore putrides avec les laits stérilisés. Les laits conservés crus en tank ont parfois des odeurs ou des saveurs rances. Dans le lait pasteurisé *Microbacterium lactis*, thermorésistant, peut être présent. Cette bactérie provient de la peau ou de l'intestin des animaux.

Des **laits concentrés** sucrés peuvent contenir des “colonies mycéliennes” en bouton ou permettre le développement en surface de moisissures diverses.

Les **accidents** d'origine microbienne sur les laits fermentés et les fromages ne sont pas rares. Ainsi si le lait contient des antibiotiques, la flore “normale” ou “lactique” est inhibée et des germes acidifiants gazogènes comme les coliformes se développent alors; le yaourt coagule difficilement, les camemberts sont “troués”, gonflés et leur goût est désagréable. La présence de germes comme *Clostridium butyricum* perturbe la fabrication des fromages à pâte cuite comme le Comté, le Beaufort, l'Emmenthal ou le Gruyère.

En-dessous de 10°C ce sont surtout des *Pseudomonas*, des coliformes psychrophiles (*Klebsiella aerogenes*, *Enterobacter aerogenes*) qui se développent.

A des températures supérieures à 45°C les lactobacilles thermophiles (*L. thermophilus*) se multiplient rapidement et acidifient le lait.

Des bacilles Gram - sont rarement présents et proviennent de la peau des animaux et des manipulations. *Alcaligenes* est très commun dans les laits et *Pseudomonas fluorescens* provoque la gélification des laits UHT.

Le lait peut contenir de nombreuses espèces de **germes potentiellement pathogènes** (Pathogenic bacteria in milk, P.C. VASAVADA, J.Dairy Sci., 1988, **71**, 2809-2816) provenant d'animaux malades atteints de maladies comme la tuberculose, la brucellose, le charbon, la fièvre Q (respectivement *Mycobacterium tuberculosis*, *Brucella*, *Bacillus anthracis*, *Coxiella burnettii*) ou atteints d'infections de la mamelle qualifiées de mammites à *Streptococcus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus*.

Le lait peut aussi contenir des germes qui sont introduits au cours des diverses transformations qu'il subit et dont l'origine est variée (coliformes avec *Escherichia coli* entérophagotène, *Salmonella*, *Shigella*, *Clostridium butyricum*, *Leuconostoc*, *Aeromonas hydrophila*, Levures, *Staphylococcus*, *Yersinia enterocolytic*, *Corynebacterium diphtheriae*, ***Listeria monocytogenes***, *Streptococcus pyogenes*, *Rickettsia burnettii*, *Streptomyces* etc...).

Le lait peut, du fait du développement de microorganismes :

- s'acidifier (*S. lactis*, *S. thermophilus*, *Lactobacillus bulgaricus*...).

Quand le pH atteint 4,6 par accumulation d'acide lactique formé à partir du lactose il se produit une coagulation des caséines.

- se gazéfier (coliformes)

- s'alcaliniser au cours de l'entreposage à basse température par désamination des acides aminés libérés par protéolyse (*Pseudomonas fluorescens*, *Alcaligenes faecalis*, *Micrococcus*...)

- rancir par oxydation de la matière grasse (*Bacillus*...)

- se colorer par suite de la présence d'un pigment bactérien (*Pseudomonas syncyanea*, *P.aeruginosa* : bleu, *Flavobacterium* : jaune, *Serratia marcescens* ou *Brevibacterium erythrogenes* : rouge)

- filer par formation de substances mucopolysaccharidiques (capsules glycoprotéiques de *Leuconostoc mesenteroides*, *S. cremoris*, *Alcaligenes viscosus*, *Aerobacter* par exemple). Ce phénomène peut résulter d'une gélification par chauffage des protéines du lactosérum ou encore de la présence de composants du sang comme le fibrinogène et des leucocytes à la suite d'une mammite.

- s'hydrolyser (protéines) au cours d'un stockage à basse température. Cette protéolyse provoquée par des germes tels que *Micrococcus*, *Alcaligenes*, *Pseudomonas*, *Bacillus*, *Clostridium*).

- prendre des goûts particuliers (par exemple goût de caramel avec *Streptococcus lactis* variété *maligences*).

Signalons que les désinfectants de type anionique chlorés ou iodés ou de type ammonium quaternaires sont efficaces sur des bactéries comme *Listeria* ou *Salmonella*.

IV - C - 1 - Divers types de laits

Schématiquement, il est possible de décrire les divers types suivants :

a) lait cru (instable, doit toujours être réfrigéré)

b) laits modifiés par des méthodes industrielles

- lait écrémé (plus ou moins partiellement)

- lait chauffé (lait pasteurisé, lait stérilisé)

- lait homogénéisé

- lait conservé (lait en poudre, lait concentré sucré ou non)

- lait fermenté

Parmi les produits laitiers on peut citer le beurre, les fromages, les produits lactés divers.

IV - C - 2 - Prélèvement des échantillons (cf chapitre E.1)

Il est réglementé par arrêté ministériel et peut être effectué à tous les stades depuis la traite jusqu'à la vente. Le volume prélevé est en général de 50 à 100 ml pour les laits liquides. Le nombre de prélèvements pour le contrôle du lait dans un atelier de traitement est au minimum égal à :

2 pour une quantité de lait traitée de 5 m³ par jour

3 pour une quantité de lait traitée comprise entre 5 et 10 m³ par jour

5 pour une quantité de lait traitée supérieure à 10 m³ par jour

L'intervalle entre 2 prélèvements doit être supérieur à 15 minutes.

IV - C - 3 - Analyse microbiologique

a) examens microscopiques

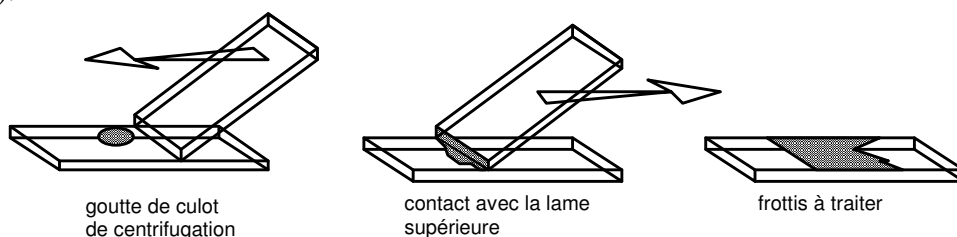
Ces examens ne sont pas réalisés dans les analyses de routine mais dans le cas de laits anormaux ou de laits fermentés.

1) *Estimation de la charge microbienne*

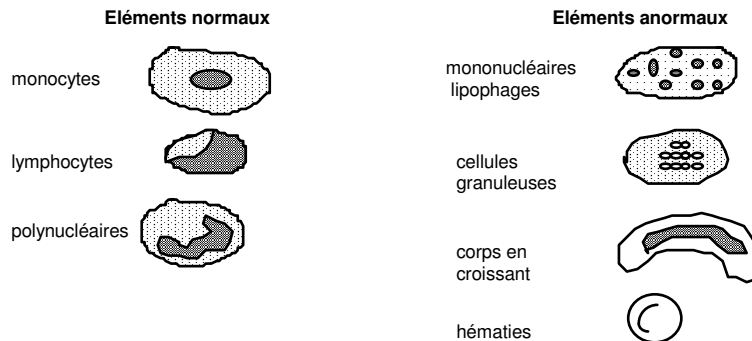
10 µl de lait sont étalés sous forme d'un carré de 1 cm de côté (1 cm²) sur une lame de verre. Après séchage à l'air chaud et fixation par l'alcool absolu pendant 5 minutes, le frottis est coloré par le bleu de méthylène phéniqué pendant 30 secondes. Après lavage à l'eau et séchage, on compte le nombre de bactéries par champ microscopique (x100), champ dont la surface est déterminée par l'évaluation de son diamètre au moyen du vernier de la platine. On peut aussi utiliser un micromètre objectif. On obtient ainsi une approximation de la "charge microbienne" du lait.

2) *Etude cytologique*

Cette étude est effectuée à partir de lait cru individuel. Le lait est maintenu 5 minutes à 37°C, puis centrifugé stérilement à 3000 g pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation est mis en suspension dans le liquide restant après décantation et étalé comme un frottis sanguin (en "tirant" la goutte).



Après échage à l'air, le frottis est fixé par immersion dans l'alcool absolu pendant 5 minutes. Colorer au bleu de méthylène phéniqué pendant 5 minutes. Différencier rapidement par l'alcool à 60°. Laver à l'eau et examiner après séchage à l'immersion. Compter alors une centaine d'éléments cellulaires qui seront classés en éléments normaux et éléments anormaux



Calculer le rapport

$$\frac{m}{p} = \frac{\text{nombre de mononucléaires}}{\text{nombre de polynucléaires}}$$

Si m/p est compris entre 0,5 et 1 le lait est "normal".

m/p est inférieur à 0,5 en cas de mammite aigüe et supérieur à 1 en cas d'infection tuberculeuse. Dans les laits de rétention ou le colostrum on rencontre des éléments anormaux.

3) Etude de la flore bactérienne : orientation morphologique

Cette étude se fait après coloration de Gram à partir d'un frottis réalisé dans l'étude cytologique. Pour les laits fermentés, étaler directement sur la lame 1 öse du produit. Il est souvent nécessaire de dégraisser au xylol pendant 5 minutes après fixation. Si la coloration est réalisée sur un frottis obtenu à partir d'une öse de lait, la "densité" cellulaire sera très faible.

Flore normale du lait cru : surtout des bactéries Gram+ (diplocoques, streptocoques, bacilles, streptobacilles).

Flore anormale : bactéries Gram-, longs streptocoques Gram + (20 à 100 cellules) traduisant une mammite streptococcique (*Streptococcus agalactiae*).

4) Recherche du bacille de KOCH

Cette recherche se fait après centrifugation du lait pendant 5 minutes à 3000 g. Faire 2 frottis avec la crème. Décanter. Mélanger le culot avec le peu de liquide restant et faire 2 autres frottis. Sécher et fixer à l'alcool absolu pendant 5 minutes. Réaliser une coloration de ZIEHL (cf chapitre III-J).

b) dénombrement de la flore aérobie (lait - 10⁻⁴)

Ce dénombrement est réalisée sur gélose au lait papaïné (milieu de CHEVALIER-GUITONNEAU). Les protéines du lait sont pré-hydrolysées dans ce milieu d'une part pour le transpariser et le rendre utilisable pour la numération et d'autre part pour générer des peptides qui sont des facteurs de croissance pour les bactéries lactiques.

Le comptage est effectué après 72 h d'incubation à 30°C (le lait cru des pays nordiques contient environ 3.10⁴ germes/ml, le lait dans les plupart des pays européens environ 10⁵ germes/ml).

c) numération des indologènes (lait - 10⁻⁴)

Cette numération se fait en eau peptonée après 48 h d'incubation à 37°C (ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs par tube ; la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge vif en surface). La flore normale du lait est indole - ; ces germes indologènes ont une bonne probabilité de correspondre à des entérobactéries indole + (*Escherichia*, *Providencia*, *Proteus*, *Edwardsiella* et

Shigella). L'incubation à 44,5°C donnant après 24 heures d'incubation une réponse positive a une forte probabilité de correspondre à *Escherichia coli* .

d) colimétrie (lait - 10⁻³)

Coliformes totaux et fécaux.

e) germes putrides (lait - 10⁻³) (voir analyse de l'eau)

f) flore thermorésistante (1 ml de lait)

Il s'agit de germes résistants à un chauffage de 30 minutes à 63°C (pasteurisation basse). L'importance de cette flore permet d'évaluer la pollution liée à la traite et d'envisager les techniques de pasteurisation adéquates.

10 ml de lait sont chauffés, dans un tube à essai, à 63°C pendant 30 minutes. Après refroidissement procéder comme pour le dénombrement de la flore totale.

g) recherche des staphylocoques pathogènes après enrichissement (1 ml)

h) numération des streptocoques fécaux (1 ml)

i) recherche des *Brucella* (Ring test)

j) recherche des *Salmonella* et *Shigella* (20 ml)

j) recherche des anaérobies sulfito-réducteurs (1 ml)

Pour l'interprétation des divers résultats cf chapitres IV-A et E-1-a et normes pour le lait.

IV - C - 4 - Analyses chimiques et biochimiques associées à l'analyse microbiologique

La couleur, la saveur, l'odeur et la consistance du lait sont notées.

a) contrôle de la propreté : lactofiltration

500 ml de lait sont filtrés sur ouate. La rondelle d'ouate est soumise à un examen comparatif (présence de poils etc.).

b) détermination de l'acidité

L'acidité du lait, exprimée en **degré Dornic**, est le nombre de ml d'hydroxyde de sodium N/9 nécessaire à neutraliser 10 ml de lait en présence de phénolphtaléine.

acidité normale :	15 à 17° D pour un lait cru
	14 à 16°D pour un lait pasteurisé
acidité augmentée	(fermentation lactique, addition de K ₂ Cr ₂ O ₇)
	26°D : lait coagulant par chauffage
	70°D : lait coagulant à température ordinaire
acidité diminuée	addition de NaHCO ₃ ou Na ₂ CO ₃

c) contrôle de la "pollution" par mesure d'activités enzymatiques d'origine microbienne

1) réductase (voir chapitre E-6-b)

Dans ce test rapide d'évaluation de la charge microbienne, 10 ml de lait sont additionnés de 1 ml de bleu de méthylène à 5 mg % et incubés à 37°C dans un bain-marie. Réaliser un témoin avec 10 ml

de lait et 1 ml d'eau. Noter le temps de décoloration. La réponse fournie par ce test n'est pas corrélée à l'éventuelle contamination fécale.

Décoloration :

- . en moins d'une heure : lait fortement contaminé ($10^6/ml$)
- . entre 1 h et 3 h : lait peu contaminé (entre 10^5 et $10^6/ml$)
- . en plus de 3 h : qualité satisfaisante (10^5 germes/ml)
- . en plus de 5 h : bonne qualité (inférieur à $10^5/ml$)

On peut procéder à un conditionnement préalable du lait en procédant comme suit : quand le lait arrive au laboratoire placer 50 ml dans un erlenmeyer pendant 24 heures à 18°C. Après mélange de 10 ml avec 1 ml de colorant et incubation à 37°C. Si le lait se décolore en moins de 1/2 heure, le lait ne respecte pas le test.

remarques : dans le cas de lait réfrigéré le test n'a de signification que si le lait est pré-incubé à une température de 12°C pendant 20 h (ou à 15°C pendant 15 h). Ceci élève le nombre de germes indicateurs d'une mauvaise hygiène de traite plus que le nombre de germes de "mamelles".

Le test n'est pas applicable au lait contenant du colostrum et au lait de mammite.

Quand le temps de décoloration augmente, le test perd de sa valeur.

Le lait cru possède un pouvoir réducteur qui est détruit après pasteurisation.

Le lait cru additionné de substances réductrices (formol par ex.) vire plus rapidement.

Les cellules non bactériennes (leucocytes) peuvent réduire le bleu de méthylène mais beaucoup moins vite que la résazurine.

Cette mesure est fonction du nombre de cellules, même si elles sont groupées en amas (dans ce cas un amas ne donne qu'une colonie sur une gélose : phénomène de clumping).

2) réduction de la résazurine

Cette réduction se fait par étapes successives. Après 1, 2 et 3 h d'incubation la couleur du lait additionné de résazurine est estimée au comparateur de Lovibond.

Les leucocytes réduisent rapidement ce colorant ce qui permet un dépistage rapide des mammites.

d) test au teepol

Il s'agit d'une mesure indirecte du nombre de cellules présentes dans le lait. La valeur de $5.10^5 /ml$ constitue la limite entre le lait de mammite et le lait normal.

Placer 2 ml de lait dans un cristalliseur de 6 cm de diamètre. Ajouter 2 ml de réactif au teepol (50 ml de teepol à 30 %, 15 mg de pourpre de bromocrésol, 10 ml d'eau). Agiter quelques secondes. L'ADN cellulaire libéré par éclatement des cellules sous l'effet du teepol floccule, et le pourpre de bromocrésol permet d'estimer le pH (la difficulté actuelle est de trouver du "vrai" teepol).

<u>réaction</u>	<u>nombre de cellules/ml</u>	<u>caractéristiques</u>
+++	10^6	formation d'un gel épais
++	8.10^5 à 5.10^6	floculat épais adhérent au fond
+	5.10^5	floculat léger persistant
-	inf. à 10^5	aucun flocculat

Il existe un cas où le flocculat léger disparaît après quelques secondes (+ -).

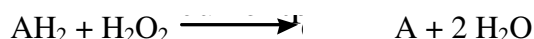
<u>pH</u>	<u>couleur</u>	<u>caractéristiques</u>
6,6 - 6,7	gris violet	normal
6,8 et +	violet	mammite ou fin de lactation
6,4 - 6,5	jaune olive	colostrum
6,3	jaune	lait acide

e) contrôle indirect du degré de chauffage

On peut estimer les conditions de chauffage auxquelles le lait a été soumis (durée - température) en constatant la présence ou l'absence de certaines activités enzymatiques normalement présentes dans le lait cru ou en mettant en évidence la dénaturation de certaines protéines. En connaissant la thermorésistance des enzymes ou de protéines constitutives on peut savoir quel traitement thermique le lait a subi.

1) recherche de la peroxydase

Les bactéries aérobies possèdent une peroxydase qui catalyse la réaction :



On choisit dans ce test le gaïacol comme substance oxydable (AH₂) ; il se forme alors un dérivé d'oxydation quinonique rose (A).

La peroxydase est "détruite" à 80°C en quelques secondes.

Dans un tube à essai on introduit 2 ml de lait, 0,2 ml de solution aqueuse de gaïacol à 2 % et 1 goutte d'eau oxygénée à 10 volumes ; le tube est tenu à la main (température voisine de 35°C).

Un tube témoin est réalisé dans les mêmes conditions à partir de 2 ml de lait bouilli.

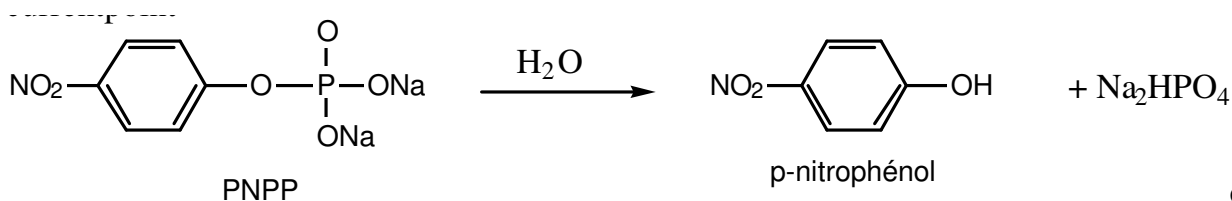
Une réaction positive se traduit par l'apparition d'une coloration rose marron en moins d'une minute.

Certains composés (cuivre) catalysent la réaction et conduisent à une réponse faussement positive.

2) recherche de la phosphatase : test d'ASHAFFENBURG et MUELLEN

La phosphatase doit être absente d'un lait pasteurisé. L'absence de cette enzyme thermolabile permet de présumer que le lait a subi une pasteurisation à une température suffisamment élevée pendant un temps donné pour assurer la destruction des formes végétatives des bactéries pathogènes.

Le substrat choisi dans ce test est de p-nitrophényl phosphate disodique (PNPP). Ce composé s'hydrolyse en p-nitrophénol jaune sous l'action de la phosphatase à pH = 8. La quantité de p-nitrophénol libérée est évaluée au comparateur de Lovibond. On effectue un témoin dont la phosphatase a été inactivée par ébullition.

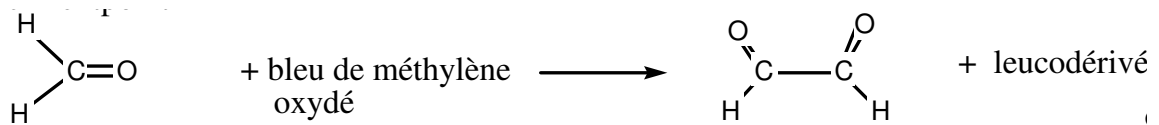


Dans un tube à essai on introduit 1 ml de lait et 5 ml de réactif PNPP (PNPP 1,5 g, NaHCO₃ 1,5 g, Na₂CO₃ 3,5 g, eau qsp 1000 ml). Le tube est incubé pendant 2 minutes au bain marie à 37°C, puis placé à l'étuve à 37°C. Après 30 minutes et 2 h d'incubation, la quantité de p-nitrophénol libérée est évaluée au comparateur de Lovibond (disque ATPW 7 donnant les teintes de jaune correspondant à des quantités de p-nitrophénol comprises entre 0 et 42 mg / ml).

Après 30 minutes d'incubation la réaction est positive avec une concentration en p-nitrophénol de 10 µg / ml au moins et après 2 h d'incubation avec une concentration de 18 µg / ml et plus.

3) recherche de la xanthine oxydase (aldéhydo réductase ou enzyme de SHARDINGER)

L'enzyme libère à partir d'aldéhydes de l'hydrogène actif capable de réduire, par exemple, le bleu de méthylène selon la réaction :



10 ml de lait sont additionnés de 0,5 ml de réactif (5 ml de solution alcoolique saturée de bleu de méthylène, 5 ml de formol neutralisé, 190 ml d'eau distillée) et incubés à 37°C. L'observation se fait de 10 minutes en 10 minutes. Si le lait reste bleu, il a subi une pasteurisation de quelques secondes à 75°C ou plus. Si la décoloration se produit en 25 minutes il s'agit d'un lait cru ou ayant subi une pasteurisation basse (30 minutes - 63°C).

4) contrôle de stérilisation (test de turbidité d'ASHAFFENBURG)

Ce test permet de savoir si un lait a été chauffé au-dessus de 100°C, température à laquelle sont dénaturées (précipitation) les protéines du lactosérum et en particulier les lactoglobulines. On élimine d'abord du lait les caséines par précipitation fractionnée au sulfate d'ammonium et on recherche dans le liquide surnageant la présence de globulines thermocoagulables. Si le lait a été chauffé à plus de 100°C les lactoglobulines sont dénaturées et coprécipitent avec les caséines.

A 20 ml de lait ajouter 4 g de (NH₄)₂SO₄ et dissoudre à froid. Après 10 minutes filtrer sur papier. Prélever 5 ml de filtrat et les porter 5 minutes à ébullition. Si le liquide reste limpide le lait testé a été chauffé à plus de 100°C. L'apparition d'une turbidité dans ces conditions révèle la présence de lactoglobulines (lait cru ou pasteurisé).

f) recherche d'antibiotiques

Dans une boîte de Pétri introduire 2 ml d'une culture de *Bacillus stearothermophilus* variété *colidolactis* et 5 à 6 ml de gélose - tryptose à 55°C. Mélanger et laisser solidifier. Déposer à la surface 1 disque de Pénicilline 10 U et 1 disque de papier filtre imprégné de 100 µl de lait à tester. Incuber 5 h à 24 h à 55°C la boîte préalablement enveloppée dans du papier d'aluminium pour éviter sa déshydratation. Mesurer le diamètre des zones d'inhibition autour des disques.

D'autres bactéries tests sont utilisables : *Micrococcus luteus*, *Bacillus subtilis*.

Il existe un test de réduction du TTC par *Streptococcus thermophilus*. Quand le lait ne contient pas d'antibiotiques, le germe réduit rapidement le TTC en formozan rouge .

IV - C - 5 - Analyse du lait cru

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴)
- b) colimétrie (totaux et fécaux) , *E. coli* (1 ml - 10⁻³)
- c) recherche des staphylocoques (1 ml)
- d) numération des indologènes (1 ml - 10⁻⁴)
- e) flore thermorésistante (1 ml - 10⁻² lait chauffé à 63°C pendant 30 minutes)
- f) anaérobies sulfite réducteurs (1 ml - 10⁻³)
- g) réductase > 3 h
- h) acidité

normes :

acidité titrable	<	21°D
réductase	>	3 h
indologènes	m =	100 / ml
coliformes	m =	100 / ml
anaérobies SR	m =	50 / ml

IV - C - 6 - Analyse du lait pasteurisé

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻²)
- b) colimétrie (coliformes totaux et fécaux) et *E. coli* (1 ml - 10⁻²)
- c) recherche des staphylocoques (1 ml)
- d) numération des indologènes (1 ml - 10⁻¹)
- e) recherche de *Salmonella* (250 ml)
- f) recherche de la phosphatase
- g) anaérobies sulfite réducteurs (1 ml)
- h) recherche d'antibiotiques.

Les normes (valeurs de m) concernant les laits pasteurisés sont indiquées dans le tableau ci-après (extraits du JO du 21 juin 1982).

	germes aérobies mésophiles à 30°C/ ml	coliformes à 30°C/ ml	coliformes fécaux / ml	Staphylococcus aureus / ml	Salmonella / 250 ml	Phosphatase	acidité (°D)	Stabilité à l'ébullition	analyse sensorielle
jusqu'à J + 4	3.10 ⁴	10	1	1	0	-			
à la date de péremption	3.10 ⁴	100	1	10	0	-	14 à 18	stable	sans défaut

IV - C - 7 - Analyse du lait stérilisé

Le lait stérilisé ne doit pas contenir de germes revivifiables (cf chapitre I - E - 1 - a - 2)

- a) étuvage 55°C 10 jours, à 30°C 20 jours
 - b) contrôle du chauffage
 - c) mesure de l'acidité
 - d) recherche des *Bacillus* (à partir des échantillons étuvés coagulés ou non) sur milieu gélosé - glucose - amidon (1 ml - 10⁻¹)
 - e) recherche des anaérobies sporulés (milieu VF) à partir des échantillons étuvés.
- norme : m = 5 sporulés /ml.

IV - C - 8 - Analyse d'un lait en poudre

10 g de lait sont additionnés de 90 ml de diluant tryptone - sel. Agiter 10 minutes à 45°C.

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴)
- b) coliformes et *E. coli* (1 ml - 10⁻⁴)
- c) streptocoques fécaux (1 ml - 10⁻⁴)
- d) anaérobies SR (1 ml - 10⁻¹)
- e) recherche de *Salmonella* (5 à 50 ml)
- f) recherche de *Staphylococcus* (10 ml)
- g) levures et moisissures (1 ml ; sur OGA)

normes : pas de germes pathogènes
 germes totaux m = 5.10⁴/g
 coliformes m = 5/ g

IV - C - 9 - Analyse d'un lait concentré sucré

A 10 ml de lait on ajoute 18 à 20 ml d'eau distillée stérile.

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10^{-3})
- b) colimétrie et *E. coli* (1 ml - 10^{-1})
- c) indologènes (1 ml - 10^{-1})
- d) *Staphylococcus* (1 ml)
- e) streptocoques du groupe D (1 ml)
- f) *Salmonella* (250 ml)
- g) levures et moisissures (1 ml)
- h) anaérobies SR (100 ml)

normes :

flore totale	m = 3.10^4 /ml
coliformes	m = 1/ml
indologènes	m = 1/ml
anaérobies SR	m = 10/1000 ml, levures m = 0/ml, pas de germe pathogène.

IV - C - 10 - Analyse de laits fermentés (yaourts, kéfir etc)

La flore normale du yaourt est composée de *Streptococcus thermophilus* (ferment d'arôme) et de *Lactobacillus bulgaricus* (ferment d'acidification). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bifidus* représentent la flore de lait fermentés "Bio".

Le kéfir subit une fermentation lactique par *Streptococcus lactis* puis une fermentation alcoolique (*Candida kefir*) et enfin une fermentation par *Lactobacillus acidophilus*.

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10^{-8})
- b) coliformes (totaux et fécaux) et *E. coli* (1 ml - 10^{-3})
- c) indologènes (1 ml - 10^{-3})
- e) acidité
- f) *Salmonella* (25 ml)
- g) levures et moisissures (1 ml - 10^{-2})

normes : m = 10 indologènes / ml , m = 10 coliformes / ml, m = 1 coliforme fécal / 1 ml, *Salmonella* m = 0 / 25 ml.

IV - C - 11 - Analyse des laits gélifiés et des laits emprésurés aromatisés

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10^{-3}) m = 10^3 / ml
- b) colimétrie (1 ml - 10^{-1}) (totaux m = 10/ml et fécaux m = 1/ml)
- c) indologènes (1 ml - 10^{-1})
- d) *Staphylococcus* (1 ml) m = 10 /ml
- e) *Salmonella* (25 ml) m = 0
- f) levures et moisissures (1 ml)
- g) anaérobies SR (100 ml)

IV - C - 12 - Analyse des fromages (frais pasteurisés)

10 g de fromage sont broyés dans 50 ml de citrate de sodium à 2 %, ou 50 ml de bouillon tryptone-sel.

- a) flore totale (1 ml - 10^{-6})
- b) indologènes (1 ml - 10^{-3}) + papier acétate de Plomb (putrides)
- c) coliformes (1 ml - 10^{-1}) (totaux m = 10 /g et fécaux m = 1 /g) et *E. coli*

- d) levures et moisissures (1 ml - 10⁻⁴)
- e) anaérobies SR (1 ml - 10⁻³)
- f) flore thermorésistante (1 ml - 10⁻³) sur VF après 10 minutes à 85°C
- g) *Staphylococcus* (1 ml - 10⁻¹) m = 10/g
- h) *Salmonella* (25 g) m = 0/25 g.

IV - C - 13 - Analyse du beurre

125 g de beurre sont additionnés de 10 ml de tampon phosphate 0,05 M pH = 8. Après 1 h d'incubation à 41°C, centrifuger 15 minutes à 2000 g. L'analyse est effectuée sur la phase aqueuse.

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴) avec m = 10⁴/g
- b) coliformes (totaux m = 25/g et fécaux m = 1/g)
- c) indologènes (1 ml - 10⁻³)
- d) recherche de *Salmonella* (10 ml)
- e) levures et moisissures (1 ml - 10⁻⁴) m = 10/g
- f) *Pseudomonas* (1 ml - 10⁻⁴) sur une eau peptonée. Incuber 3 j à 30°C et apprécier la pigmentation.

normes : pas de pathogène
absence de phosphatase

IV - C - 14 - Glaces et crèmes glacées

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴) m = 3.10⁵/g
- b) coliformes (1 ml - 10⁻²) : totaux m = 100/g et fécaux m = 1/g
- c) recherche des staphylocoques (1 ml) m = 10/g
- d) recherche des *Salmonella* (25 g de produit) m = 0 / 25g
- e) streptocoques fécaux (1 ml)
- f) phosphatase
- g) *Staphylococcus*

normes : pas de germes pathogènes
phosphatase négative

IV - C - 15 - Crèmes de consommation pasteurisées

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴) m = 3.10⁴/g
- b) coliformes (1 ml - 10⁻²) : totaux m = 100/g en vrac et 10/g conditionnée et fécaux m = 1/g
- c) recherche des staphylocoques (1 ml) m = 10/g
- d) recherche des *Salmonella* (25 g de produit) m = 0 / 25g
- e) streptocoques fécaux (1 ml)
- f) phosphatase
- g) *Staphylococcus*

normes: pas de germes pathogène
phosphatase négative et acidité ≤ 2,5 (acide lactique)

IV - C - 16 - Caséines et caséinates

- a) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁴) m = 3.10⁴/g
- b) coliformes totaux m = 0/0,1g
- c) flore thermophile (45°C) m = 3.10²/g

IV - D - ANALYSE DES VIANDES ET PRODUITS CARNES

IV - D - 1 - Flores microbiennes normales et pathogènes des viandes

La peau des animaux est naturellement contaminée par des bactéries Gram - qui y adhèrent fortement, par des bactéries gram + et par des spores de moisissures .Les muscles profonds mais aussi sous-jacents sont normalement stériles.

- La flore de contamination “normale” résultant de l’**abattage** provient donc d’abord de la **peau** et à un degré moindre des **muqueuses** (*Pseudomonas putrefasciens*, *Pseudomonas fluorescens*, *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Streptomyces*, moisissures des genres *Penicillium*, *Sporotrichum*, *Cladosporium*, *Mucor*, *Thamnidium* etc.) mais peut aussi provenir du **tube digestif** (entérobactéries, streptocoques fécaux, *Clostridium* etc.).

- Dans la préparation des viandes , des **contaminations extérieures** interviennent aussi (air, sol, manipulateurs, outils de découpe etc) . Les germes le plus souvent rencontrés appartiennent alors aux genres *Pseudomonas* , *Bacillus* (*B.cereus*), *Clostridium* (*C. perfringens* et *C. botulinum*), *Staphylococcus* ou à d’autres familles de bactéries Gram - (entérobactéries avec *Salmonella*, *E.coli*, *Shigella* , etc.) . Des levures et des spores de moisissures peuvent aussi contaminer la surface des viandes à partir de l’air ou de surfaces de travail contaminées (*Penicillium* , *Sporotrichum* , *Cladosporium* , *Mucor* , *Thamnidium* *Alternaria* , *Monilia* etc.) .

Ces microorganismes se retrouvent à la surface des viandes découpées avec des teneurs de l’ordre de 1000 UFC/cm² si les conditions de bonne fabrication et d’hygiène sont respectées.

- La viande fournie par les animaux malades est souvent porteuse des germes à l’origine de la maladie, la transmission vers le muscle se produisant surtout par la voie lymphatique. Les maladies transmises à l’homme par de telles viandes sont pour la plupart soit d’origine parasitaire soit d’origine bactérienne.

Certains **helminthes** tels que les **cestodes** et **nématodes** peuvent être transmis par les viandes. Parmi les cestodes on peut signaler *Taenia solium* (porc) et *Taenia saginata* (boeuf), la transmission de la maladie à l’homme (ver solitaire) résultant de la consommation de cysticerques. *Echinococcus granulosus* et *Echinococcus multilocularis* provoquent chez l’homme un kyste hépatique. Parmi les **nématodes**, *Trichinella spirali* , qui est l’agent de la trichinose (troubles moteurs graves), est le plus souvent impliqué, sa transmission à l’homme se faisant par consommation de viande de porc dans laquelle se trouvent des larves enkystées du parasite. Parmi les **protozoaires** susceptibles d’infester les viandes, il faut signaler *Toxoplasma gondii* (viande de porc ou viande contaminée par des ovocystes de déjection de chat) responsable de la toxoplasmose et *Sarcocystis* agent de la sarcosporiose, maladie transmise par la viande d’herbivores (mouton par exemple).

Parmi les **bactéries pathogènes** éventuellement présentes dans les viandes et susceptibles de provoquer une maladie chez les consommateurs, il faut signaler *Salmonella*, *Brucella*, *Erysipelothrix rhusiopathiae* (provoquant le rouget), *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis* (agent du charbon) et *Pasteurella tularensis* (agent de la tularémie : viande de gibiers).

Les bactéries anaérobies ne sont à considérer que si la température est supérieure à 25°C; dans ce groupe les *Clostridium* sp prédominent. Ainsi 65 à 70 % des carcasses de porc contiennent *C.perfringens* et environ 10 % *Clostridium botulinum*. Heureusement que cette dernière bactérie est une très mauvaise compétitrice en présence des autres bactéries contaminantes .

IV - D - 2 - Evolution des flores microbiennes des viandes et qualité

Au cours des phénomènes de résolution de la *rigor mortis*, la viande est soumise à l'action de protéases endogènes (cathepsines) qui en produisant un attendrissement favorisent la prolifération des germes contaminants. Cette prolifération dépend aussi de l'état physiologique de l'animal au moment de son abattage, de la charge microbienne, du pH, des méthodes d'équarrissage et d'entreposage (température, humidité).

Dans des conditions d'entreposage ou de transformation à **des températures de réfrigération** et en milieu humide, les microorganismes cryophiles contaminants les plus fréquents appartiennent à la famille des *Pseudomonadaceae* (*Pseudomonas putrefasciens*, *Pseudomonas fluorescens*) et aux genres *Acinetobacter*, *Enterobacter*, *Microbacterium*. Certains *Leuconostoc*, *Streptococcus* et *Lactobacillus* ainsi que des moisissures sont aussi rencontrés.

Les principales modifications qui affectent les propriétés organoleptiques des viandes et décelables sont les suivantes :

- formation du "limon" : elle correspond au développement en surface de microorganismes producteurs de substances mucilagineuses : *Pseudomonas*, *Leuconostoc*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Achromabacter*, *Streptococcus*, certaines levures et moisissures.

- formation de tâches par développement de microorganismes pigmentés ou excrétion de pigments. Dans des conditions d'entreposage en milieu sec, la prolifération des moisissures est possible jusqu'à -1°C (boeuf) et jusqu'à -10°C (viande congelée de mouton).

Les taches vertes sont le reflet de la présence de *Penicillium* spp., les taches blanches de *Sporotrichum* spp., les noires de *Rhizopus* ou *Cladosporium* spp., les rouges de *Rhodotorula* et les "feutrages" de *Mucor* et *Thamnidium*.

De nombreuses bactéries peuvent aussi contribuer à la formation de taches colorées (*Pseudomonas*, *Serratia*, *Micrococcus*, *Flavobacterium*, etc.).

- décoloration par modification de la myoglobine par des bactéries comme *Leuconostoc*, *Lactobacillus* etc.

- rancissement et modifications défavorables du goût par *Pseudomonas*, des bactéries lactiques, des levures et moisissures. Moisissement par *Thamnidium*, *Rhizopus* ou encore *Mucor* etc.

- surissement par formation d'acides organiques tels qu'acides lactique, acétique, formique, propionique, butyrique etc. (entérobactéries, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, *Clostridium* butyriques).

- putréfaction par formation de dérivés soufrés (H₂S, CH₃-S-CH₃), d'indole, de scatole et d'amines diverses (*Clostridium*, *Proteus*, *Staphylococcus*, *Bacillus cereus*, etc.). Ces dégradations sont souvent le fait de bactéries anaérobies strictes ou aéro-anaérobies et la toxicité des substances libérées associée au pouvoir pathogène des germes rendent ces viandes dangereuses à consommer.

Ce sont les viandes désossées, découpées en profondeur, hachées à l'avance, conditionnées sous film relativement imperméable pour lesquelles l'anaérobiose est présente qui peuvent le mieux servir de substrat à ces modifications et donc qui sont les plus dangereuses.

IV - D - 3 - Analyse des plats cuisinés à l'avance , escargots préparés , pièces de viandes cuites tranchées ou non (JO du 19 janvier 1980)

25 g de produit sont broyés dans 225 ml de bouillon tryptone peptone

normes

- | | |
|--|--------------------------|
| 1) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁸) | m = 3.10 ⁵ /g |
| 2) coliformes (1 ml - 10 ⁻⁶) | m = 10 ³ /g |
| 3) coliformes fécaux (1 ml - 10 ⁻⁴) | m = 10/g |
| 4) anaérobies SR (1 ml - 10 ⁻²) | m = 30/g |
| 5) <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml - 10 ⁻³) | m = 100/g |
| 6) <i>Salmonella</i> (25 g) | m = 0/25 g |
| 7) levures et moisissures (1 ml - 10 ⁻⁶) | m = 10 ⁴ /g |

IV - D - 4 - Analyse de la viande fraîche ou hachée

5 g de viande sont broyés dans 45 ml de diluant.

- | | |
|--|--------------------------|
| 1) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁵) | m = 5.10 ⁵ /g |
| 2) coliformes (1 ml - 10 ⁻³) fécaux | (m = 10 ² /g) |
| 3) indologènes (1 l - 10 ⁻⁵) | |
| 4) anaérobies SR (1 ml-10 ⁻²) après 10 mn à 85°C | m = 30/g |
| 5) <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml - 10 ⁻¹) | m = 10 ² /g |
| 6) <i>Salmonella</i> (25 g) | m = 0/25g |
| 7) <i>Bacillus cereus</i> (1 ml) | |

IV - D - 5 - Analyse de la charcuterie crue

Les germes les plus souvent rencontrés sont : *Lactobacillus*, *Leuconostoc* et *Streptococcus* (jusqu'à 10⁸/g) et des germes de dégradation : Corynébactéries, *Microbacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus* etc

5 g de produit sont broyés dans 45 ml de diluant.

normes

- | | |
|--|--------------------------------|
| 1) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁶) | m = 10 ⁵ /g (usine) |
| 2) indologènes (1 ml - 10 ⁻⁵) | |
| 3) streptocoques fécaux (1 ml) | |
| 4) anaérobies SR (5 ml, 1 ml) | m = 50/g |
| 5) <i>Staphylococcus aureus</i> (1 ml - 10 ⁻¹) | m = 5.10 ² /g |
| 6) <i>Salmonella</i> (25 g) | m = 0/25 g |
| 7) coliformes fécaux (1 ml - 10 ⁻²) | m = 10 ³ /g |

IV - D - 6 - Analyse de la charcuterie cuite

Boudins et rillettes sont soumis à une cuisson peu prolongée tandis que pâtés jambons cuits ou saucissons cuits sont soumis à un traitement thermique prolongé qui élimine pratiquement la flore microbienne présente sous sa forme végétative et "sélectionne" les spores de *Clostridium* et *Bacillus* .

Des recontaminations de ces produits par des *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus* , *Bacillus* peuvent engendrer des altérations du goût (sûrissement) ou l'apparition de "limon" ou de taches colorées (*Alternaria*, *Monilia*, *Rhizopus*, *Mucor* etc)

5 g de produit sont broyés dans 45 ml de diluant.

normes

1) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁵)	m = 3.10 ⁵ /g)
2) anaérobies SR (5 ml - 1 ml)	m = 30 g
3) streptocoques fécaux (1 ml - 10 ⁻¹)	
4) coliformes (1 ml - 10 ⁻¹)	coliformes m = 10 ³ /g, coliformes fécaux m = 10g
5) <i>Salmonella</i> (25 g)	m = 0/25 g
6) Staphylocoques (1 ml - 10 ⁻²)	m = 10 ² /g

IV - D - 7 - Analyse des semi-conserves

5 g de produit sont broyés dans 45 ml de diluant

- 1) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁸)
- 2) coliformes (1 ml - 10⁻⁶)
- 3) anaérobies SR (2ml - 1 ml)
- 4) *Salmonella* (5 g)
- 5) *Staphylococcus* (1 ml - 10⁻¹)
- 6) germes putrides (1 ml - 10⁻⁶)

normes : absence de bactéries pathogènes, flore totale inférieure à 10⁴/g.

IV - E - ANALYSE DES COQUILLAGES

La flore microbienne de l'eau de mer est comparable à celle de l'eau douce mais avec une adaptation aux conditions de salinité (voisine de 30 g/l). La survie de la plupart des germes pathogènes dans l'eau de mer n'est pas bonne ce qui rend la mer moins polluée que les eaux de rivière. Cependant, les eaux littorales sont souvent chargées de matières organiques qui "protègent" les microorganismes de l'action létale du sel et leur charge microbienne est souvent très élevée en raison du rejet d'eaux usées hautement contaminées.

La flore de l'eau de mer varie en fonction de très nombreux paramètres tels que teneur en matières organiques, profondeur, température, courants etc.. Elle est représentée par de nombreuses bactéries halophiles ou halotolérantes comme *Vibrio*, *Achromobacter*, *Halobacterium*, *Photobacterium*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Bacillus*, *Flavobacterium* etc.).

Les eaux des zones littorales sont souvent chargées en entérobactéries (*Salmonella*, *Proteus*) et *Clostridium botulinum* (type E) est un hôte normal de certaines eaux .

L'eau de mer peut véhiculer des virus (hépatite, entérovirus, bactériophages) et des parasites.

Les coquillages filtrent de grands volumes d'eau (plusieurs litres par jour pour une huitre par exemple) et concentrent sur leur filtre et l'eau internes les microorganismes. La flore la plus courante est constituée d'*Achromobacter* et *Flavobacterium* mais la présence de germes d'origine fécale dans les zones polluées par des rejets d'égouts n'est pas rare.

Laver, brosser les coquilles avec de l'eau savonneuse, immerger dans de l'eau javellisée diluée. Laver à l'alcool (flamber), ouvrir. Récupérer le contenu du coquillage (avec le liquide) et broyer. A 5 ml de broyat on ajoute 45 ml de diluant stérile (dilution 10⁻¹).

normes

1) coliformes fécaux (5 ml - 1 ml)	m = 10/g
2) <i>Salmonella</i> (25 ml)	m = 0/ 25 g

- | | |
|--|------------------------|
| 3) anaérobies SR (5 ml) | m = 10/g |
| 4) <i>Vibrio parahaemolyticus</i> (1 ml) | |
| 5) streptocoques fécaux | m = 25/100 ml |
| 6) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁶) | m = 10 ⁴ /g |
| 7) <i>Staphylococcus</i> | m = 10 ² /g |

IV - F - ANALYSE D'UNE VOLAILLE

La volaille peut être introduite entière dans un sac stérile en polyéthylène et être soumise à un “massage” en présence d’une quantité donnée de bouillon tryptone-sel. L’analyse sera alors réalisée sur une partie aliquote de la suspension obtenue. Il est possible de procéder à des prélèvements “découpés”.

La flore aérobie mésophile totale, les coliformes, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus* D et *Campylobacter* sont soit comptés soit recherchés.

Il n’est pas rare que la FAMT soit supérieure à 2,5.10⁵/cm², les coliformes en nombre supérieur à 10³/cm², et *Staphylococcus* supérieur à 10/cm²

Un FAMT peu nombreuse indique que les contaminants sont peu nombreux et un nombre peu élevé de coliformes fécaux indique une bonne hygiène de préparation alors qu’un nombre peu élevé de Streptocoques D reflète une éviscération correcte et une bonne hygiène .

IV - G - ANALYSE D'UN SUCRE

Il s’agit, si aucune autre précision n’est donnée, de saccharose extrait de végétaux comme la betterave ou la canne à sucre. La flore normale contaminante du produit est d’origine tellurique et “végétale”. Il s’agit essentiellement de *Pseudomonadaceae*, *Leuconostoc*, *Lactobacillus*, *Clostridium*, *Bacillus*, *Enterobacter*, levures et moisissures. Les opérations de raffinage conduisent à la destruction des formes végétatives et seules les spores de *Clostridium* (*C.saccharolyticum*, *C.nigricans*) et de *Bacillus* (*B.stearothermophilus*, *B.subtilis*) survivent. Des contaminants exogènes peuvent être apportés par l’eau ou par l’air.

Le sucre en grain est peu contaminé, stable (activité de l’eau très faible) et sa charge en spore est très faible. Une très légère humidification de la surface peut permettre la croissance de moisissures ou de levures (*Saccharomyces*, *Candida*, *Rhodotorula*). Les sirops de sucre peuvent permettre la croissance, en plus de ces spores, des germes osmophiles et en particulier des levures (*Saccharomyces rouxii*, *Saccharomyces bailii*, *Saccharomyces bisporus*).

Analyse

30 g de sucre sont additionnés de 150 ml d’eau D stérile.

1) flore aérobie totale : 10 ml de solution sont introduits dans 100 ml de gélose lactosée au pourpre de bromocrésol (BCP) à 50°C. Couler 5 boîtes de Pétri. Après 5 jours d’incubation à 30°C, compter les germes lac + et lac - ou saccharose + ou - (on peut utiliser une gélose sans lactose).

2) levures et moisissures (1 ml - 10⁻¹)

3) recherche de *Leuconostoc mesenteroides*

15 g de sucre sont ajoutés à 100 ml de bouillon ordinaire. Après 4 jours d’incubation à 30°C, procéder à un isolement sur gélose saccharosée (protéose peptone 15 g, saccharose 150 g, gélose 15 g, eau D 1000 ml, pH = 7, bouillir seulement).

Sur ce milieu *L. mesenteroides* donne de grosses colonies muqueuses transparentes.

IV - H - ANALYSE DES CONSERVES (cf E-1-a-1)

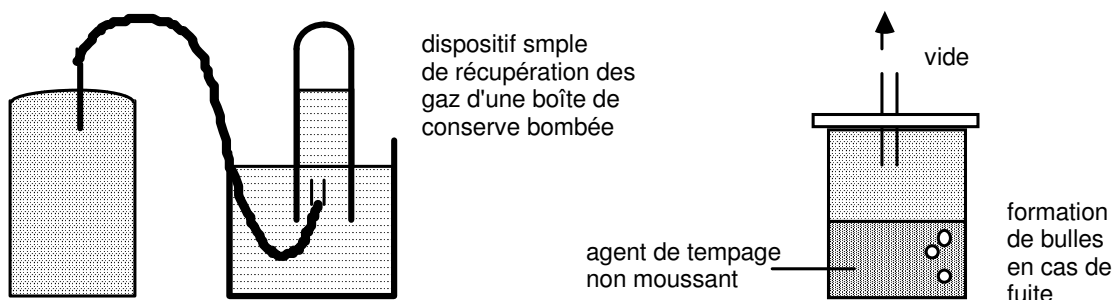
Les conserves sont des denrées alimentaires périssables d'origine animale ou végétale dont la conservation est assurée par l'emploi combiné - d'un conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux gaz et aux microorganismes, à toute température inférieure à 55°C - d'un traitement par la chaleur ou par tout autre mode autorisé ayant pour but de détruire ou d'inhiber totalement d'une part les enzymes et d'autre part les microorganismes et leurs toxines dont la prolifération pourrait altérer la denrée considérée ou la rendre impropre à l'alimentation humaine (décret du 10 février 1955).

Ces denrées doivent rester stables au cours d'un étuvage prolongé (au moins 8 jours à 37°C et à 55°C pour les pays chauds).

Une conserve ne doit pas subir d'altérations d'origine microbienne et si une telle altération intervient il faudra en déterminer l'agent causal et son origine. Une boîte anormale indique généralement un produit anormal.

Au cours des phénomènes d'altérations, la boîte peut présenter des anomalies d'aspect facilement appréciables : "à demi bombée, bombée déformable, bombée indéformable". Le bombage est soit d'origine microbienne (fermentation des glucides avec production de gaz - surtout du CO₂ - ou fermentation des protéines avec production d'azote ou de NO₂) soit d'origine chimique avec production d'hydrogène par attaque du métal par des acides soit lié à une surchauffe de stérilisation. Le contenu de la boîte peut aussi, par suite de la présence de bactéries, subir des modifications d'aspect, texture ou pH (**flat sour**).

La nature du gaz d'une conserve bombée peut être évalué après récupération du gaz dans un tube préalablement rempli d'eau barytée (la surface de la boîte est préalablement désinfectée avec une solution à 2% d'iode dans l'alcool à 70%). Si le volume diminue rapidement c'est qu'il s'agit de CO₂. Si une flamme présentée à l'orifice du tube déclenche une petite explosion il s'agit vraisemblablement d'hydrogène.



La détection de microfuites est réalisée en plaçant sur la boîte un adaptateur transparent avec une prise de vide.

Le contrôle de stérilité est réalisé sur 2 boîtes qui sont incubées à 37°C et 55°C et sur 1 boîte qui est soumise à l'analyse immédiate.

Après ouverture de la boîte dans des conditions d'aseptie rigoureuses (nettoyage du couvercle, flambage à l'alcool pour les boîtes non bombées) 30 g de produit sont broyés dans 120 ml de diluant.

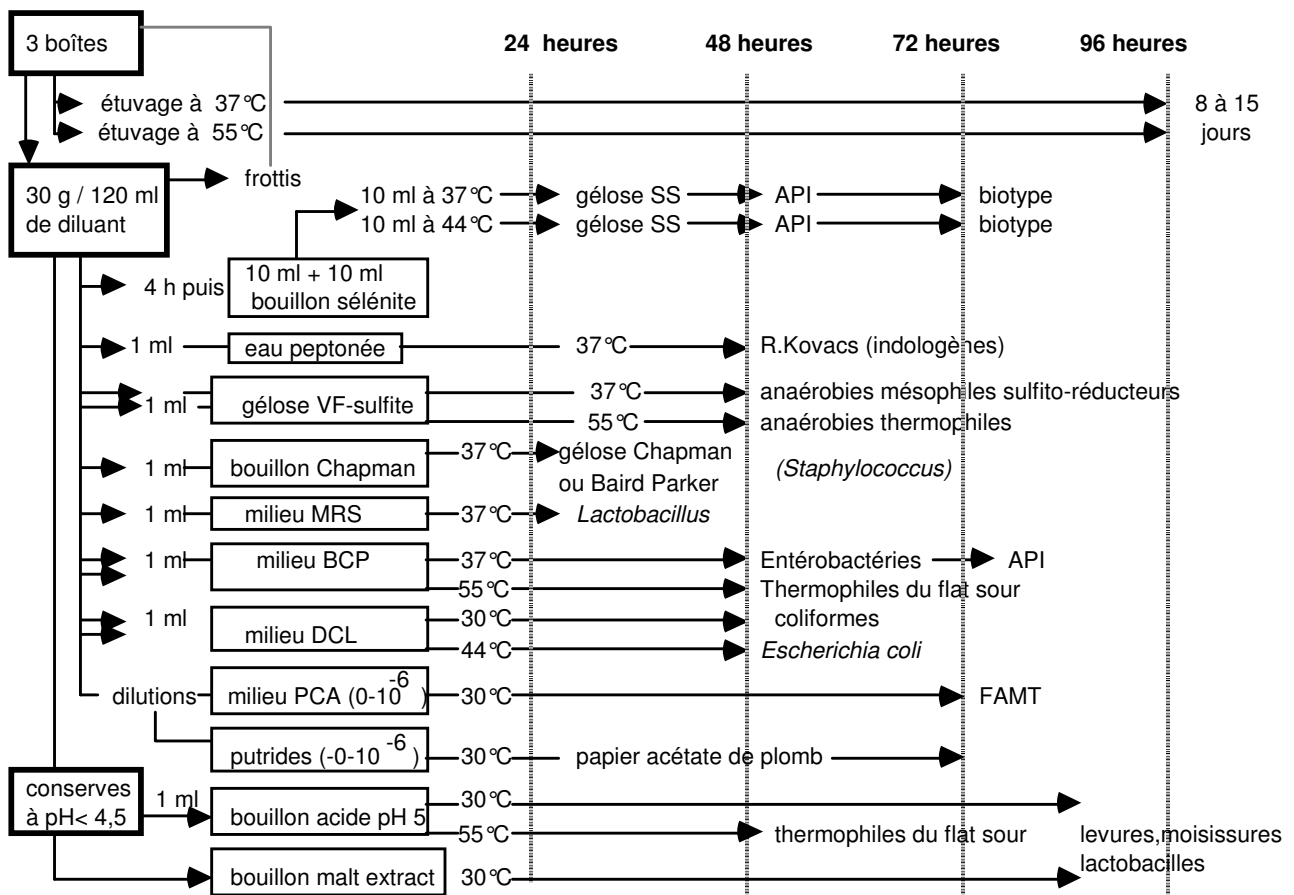
Les examens et analyses à réaliser sont les suivants :

- 1) examen microscopique d'un frottis après coloration de Gram (20 champs)
- 2) examen "macroscopique" : aspect, couleur, odeur, mesure du pH
- 3) examen de l'état des serts, appréciation du bombage
- 4) flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁶)
- 5) germes putrides (1 ml - 10⁻⁶)
- 6) staphylocoques (1 ml - 10⁻²)
- 7) coliformes (1 ml - 10⁻²)
- 8) *Salmonella* (10 ml)
- 9) indologènes (1 ml - 10⁻²)
- 10) *Lactobacillus* (1 ml sur milieu MRS)
- 11) anaérobies SR (1 ml - 10⁻³)
- 12) thermophiles du flat sour (1 ml - 10⁻³) Gélose BCP ;
Bacillus thermoacidurans et *B. stearothermophilus*
- 13) levures et moisissures (1 ml).

Les principales causes d'altérations des conserves sont schématisées dans le tableau ci-après:

		aspect externe	modifications du produit	microorganisme	
ALTERATIONS DES PRODUITS ACIDES	Produits peu acides (pH compris entre 4,5 et 6)	plate	perte de vide à l'entreposage , apparence peu modifiée , pH abaissé , liquéfaction , odeur anormale FLAT SOUR	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	
		plate	L'H2S produit induit une odeur d'oeuf pourri et un noircissement du produit	<i>Clostridium nigrificans</i>	
		bombage	risque d'explosion par production de CO2 et H2 Produit fermenté aigre , odeur butyrique	<i>Clostridium thermosaccharolyticum</i>	
		bombage	risque d'explosion (H2 et CO2). Contenu partiellement digéré , pH augmenté , odeur putride (H2S , indole , scatole , mercaptan etc)	<i>Clostridium sporogenes</i> <i>C. botulinum</i>	
		plate	un bombage peut intervenir avec les viandes cuites avec des nitrates et des sucres , dans du lait coagulé , des betteraves	<i>Bacillus polymyxa</i> <i>Bacillus macerans</i> <i>Bacillus subtilis</i>	
	Produits entre pH 4,5 et 3,7	bombage	risque d'explosion H2 , CO2). Produit fermenté . Odeur butyrique	<i>Clostridium butyricum</i> <i>Clostridium perfringens</i> <i>Clostridium pasteurianum</i>	
		plate	peu de modifications du vide (Flat sour du jus de tomate . pH peu affecté . Odeurs et saveurs marquées	<i>Bacillus thermoacidurans</i> <i>B. coagulans</i>	
		bombage	Eclatement ou bombage stabilisé pH diminué , odeurs d'aigre	bactéries lactiques <i>Streptococcus thermophilus</i>	
	en dessous de pH 3,7 , ce sont des altérations chimiques qui dominent				

Les analyses à réaliser peuvent être présentées sous forme d'un organigramme qui a l'avantage de permettre une bonne vision des opérations à réaliser.



IV - I - ANALYSE DE PRODUITS CONGELÉS (LÉGUMES SURGELÉS)

cf aussi chapitre E-2-a

10 g de produit congelé sont additionnés à 90 ml de diluant. Après décongélation, broyer.

normes (fonction du produit)

- | | |
|--|---|
| 1) flore aérobie totale (1 ml - 10 ⁻⁴) | m = 5.10 ⁵ /g |
| 2) germes psychrophiles (0,1 ml en surface d'une gélose nutritive ordinaire; incuber 25 jours à 8°C) | |
| 3) staphylocoques (1 ml) | m = 10/g |
| 4) coliformes (1 ml - 10 ⁻⁴) | coliformes m = 3.10 ³ /g, coliformes fécaux m = 15/g |
| 5) streptocoques fécaux (1 ml - 10 ⁻¹) | |
| 6) <i>C. perfringens</i> (5 ml) | m = 10/g |
| 7) <i>Salmonella</i> (25 g) | m = 0/25 g |
| 8) levures et moisissures (1 ml.10 ⁻³) | levures < 10 ³ /g moisissures < 5.10 ² /g |
| 9) anaérobies sulfitoréducteurs (1 ml) | m = 0/0,1 g pour <i>C. perfringens</i> |

IV - J - ANALYSE D'ALIMENT SOUPÇONNÉ D'ÊTRE À L'ORIGINE D'UNE MALADIE

10 g du "reste" du produit alimentaire soupçonné sont broyés dans 40 ml de diluant stérile. Les analyses devront tenir compte des symptômes présentés par les consommateurs malades.

- 1) *Salmonella* (25 ml)
- 2) coliformes et *E. coli* (1 ml - 10⁻²)
- 3) *C. perfringens* (1 ml - 10⁻²)
- 4) *Staphylococcus* (1 ml - 10⁻²)
- 5) recherches de la toxine botulinique et de la toxine staphylococcique
- 6) FAMT et anaérobies sulfito-réducteurs

IV - K - ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE L'ENVIRONNEMENT DANS UN ATELIER

Ce type d'analyse est nécessaire pour évaluer l'efficacité des procédures de nettoyage/sanitation, pour rechercher d'éventuels points critiques et pour contribuer à l'éducation des personnels. Les prélèvements sur les surfaces (sols, tables, murs etc) sont réalisables au moyen de lames ou de boîtes contact avec des milieux adaptés ou par écouvillonnage ou par rinçage.

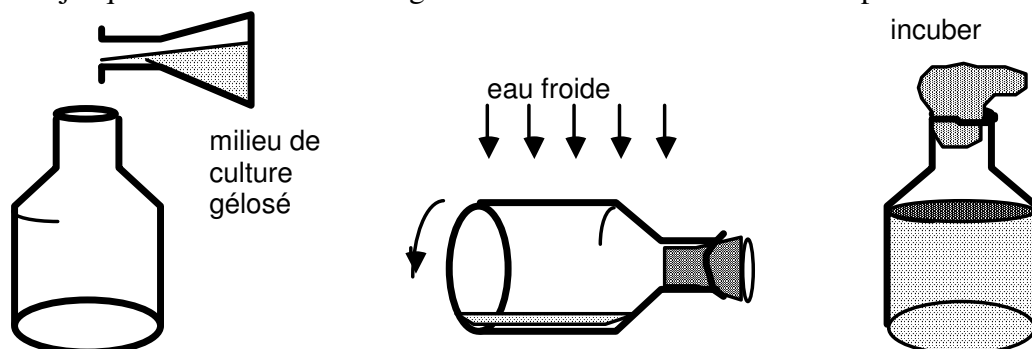
Par les **géloses contact** (boîte ou lame), il est possible d'estimer la flore totale aérobie mésophile, les entérobactéries, les staphylocoques ou encore les levures et moisissures contaminants de surfaces diverses. Très faciles à employer, les lames constituent par ailleurs un bon outil pédagogique et ont ainsi l'avantage d'encourager les bonnes pratiques d'hygiène du personnel. Avant d'être montrées aux personnels, ces lames ou boîtes doivent être fixées avec une laque à cheveux (acétate de vinyle dans une essence méthylée) pour éviter les contaminations "aériennes".

Ces lames ou boîtes doivent ensuite être obligatoirement autoclavées avant d'être éliminées.

Pour contrôler les **bouteilles en verre** après leur lavage (ou avant leur remplissage par le liquide alimentaire qu'elles sont supposées recevoir), utiliser les milieux solides classiques des flores à rechercher en augmentant leur teneur en gélose de 0,5 %:

PCA (flore totale), Baird Parker (*Staphylococcus*), DCL (coliformes), MRS* (*Lactobacillus*), RCM* (*Clostridium*), BCP (*Bacillus*).

Régénérer les milieux et les ramener à 50°C. Pour des bouteilles de volumes compris entre 250 et 1000 ml ajouter 100 ml de milieu en surfusion (et moins pour des volumes inférieurs). Boucher les bouteilles avec un bouchon stérile et refroidir la bouteille placée horizontalement sous un courant d'eau froide jusqu'à solidification de la gélose sur la surface interne du récipient.



Incuber verticalement et compter les colonies ; pour *Lactobacillus* et *Clostridium* incuber en anaérobiose

* milieu MRS (Man, Rogosa, Sharpe)

peptone	10 g
extrait de viande	8 g
extrait de levure	4 g
CH ₃ COONa	5 g
K ₂ HPO ₄	2 g
citrate NH ₄	2 g
MgSO ₄ ,7H ₂ O	0,2 g
MnSO ₄ ,4H ₂ O	0,05g
glucose	20 g
tween	1 ml
gélose	10 g
eau D	1000 ml , pH 6,2. Stériliser à 121°C pendant 15 minutes.

L'ensemencement peut être réalisé dans la masse ou en surface mais avec une double couche de 3 mm d'épaisseur pour protéger les *Lactobacillus* de l'effet toxique de l'oxygène. Les boîtes peuvent aussi être incubées en anaérobiose ou dans des atmosphères enrichies en CO₂ (10%).

Les colonies opaques et circulaires de 0,5 à 1 mm de diamètre apparaissent après 24 à 36 heures d'incubation à 30°C.

Par rapport aux *Bacillus* (catalase + et oxydase +) les *Lactobacillus* sont catalase - et oxydase -

***milieu RCM (Reinforced Clostridium Medium)**

peptone	10 g	
extrait de viande	10 g	
extrait de levure	3 g	
CH ₃ COONa	5 g	
glucose	5 g	
amidon soluble	1 g	
cystéine	0,5 g	
gélose	15 g	
eau D	1000 ml	pH = 7,1.

Stériliser 15 minutes à 120°C.

L'analyse de l'air est importante à réaliser car les germes "aériens" sont souvent des germes de contamination de produits . Ce sont surtout des bactéries et des spores de moisissures qui sont en suspension dans l'air, sous forme d'unités individuelles ou de petits amas.

Il est possible de laisser des boîtes de Pétri (contenant les milieux adaptés) ouvertes dans les zones à contrôler pendant des temps variables qui dépendent de la densité de contamination.

Les échantillonneurs d'air permettent l'analyse de volumes d'air connus (SAS : surface air systems). L'air est soumis à une accélération centrifuge et les particules décantées sont déposées sur la surface d'une gélose. Millipore propose le Stérifilm System dans lequel l'air est d'abord envoyé en barbotage dans un milieu liquide, lequel est soumis à une filtration (0,45 µm); les microorganismes retenus sur le filtre sont mis en évidence après incubation sur des milieux adaptés.

IV - L - STERILISATION, DESINFECTION ET TRAITEMENT DES MATERIELS CONTAMINES

Rappelons que les principales méthodes de stérilisation utilisées par le microbiologiste / technologue sont : le *flambage* , la *chaleur sèche* (four Pasteur), la *chaleur humide* (autoclaves), les *composés chimiques* (désinfectants, antiseptiques, additifs) le plus souvent utilisés sous forme liquide et parfois gazeuse, la *filtration* et les *radiations électromagnétiques* ou *soniques* (UV, γ). La plupart de ces méthodes sont étudiées en détail dans d'autres enseignements. Nous décrirons ici simplement les désinfectants utilisables dans l'industrie et au laboratoire.

IV - L - 1 - Types et usages au laboratoire de quelques désinfectants

Chaque produit désinfectant est caractérisé par son spectre d'activité. Généralement, ce sont les formes végétatives des bactéries qui sont les plus sensibles, levures et moisissures ainsi que virus contenant des lipides étant légèrement moins sensibles. Les mycobactéries et les virus sans lipides sont plus résistants. Les spores bactériennes sont par contre souvent très résistantes à ces agents.

Le tableau ci-après résume l'activité de quelques agents désinfectants.

Les plus utilisés au laboratoire sont les hypochlorites, l'éthanol et les solutions de phénols. L'oxyde d'éthylène et la β-propionolactone sont parfois utilisés pour stériliser des composants fragiles (ou les épices pour le premier) mais très peu employées au laboratoire.

Les solutions de **phénols** clairs sont utilisés à la concentration de 1 à 5 %, leur stabilité est d'environ 1 semaine.

L'**hypochlorite** est une solution de chlore dans une base (hydroxyde de sodium ou de potassium) . La sanitation de surfaces peu contaminées est réalisable avec des solutions à 1000 ppm. Les solutions à 2500 à 5000 ppm sont utilisées pour le pot collecteur de pipettes et lames et celles à 10 000 ppm pour les zones très contaminées. La stabilité des solutions est mauvaise et la concentration diminue très rapidement (24 heures pour les solutions diluées).

Les **aldéhydes** comme le formaldéhyde (gaz) ou le glutaraldéhyde (liquide) sont des antimicrobiens très actifs.

	ACTIVITE CONTRE					INACTIVE PAR				TOXICITE		
	levures et moisissures	bactéries gram -	bactéries gram +	mycobactéries	spores bactériennes	protéines	matériaux	eau dure	détergents	peau	yeux	poumons
phénols	+++	+++	+++	++	-	+	++	+	C	+	+	-
hypochlorites	+	+++	+++	++	++	+++	+	+	C	+	+	+
alcools	-	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	+
formaldéhyde	+++	+++	+++	+++	+++	+	+	+	-	+	+	++
glutaraldéhyde	+++	+++	+++	++	+++	+	+	+	-	+	+	+
iodophores	+++	+++	+++	++	+	+++	+	+	A	+	+	-
ammoniums quaternaires	+	+++	++	-	-	+++	+++	+++	A,C	+	+	-

A = détergent anionique , C = détergent cationique

Le formaldéhyde est peu actif à des températures inférieures à 20°C et requiert une humidité relative de 70%. Il est généré à partir de sa forme polymérisée (paraformaldéhyde) ou de sa solution (formol à 40%).

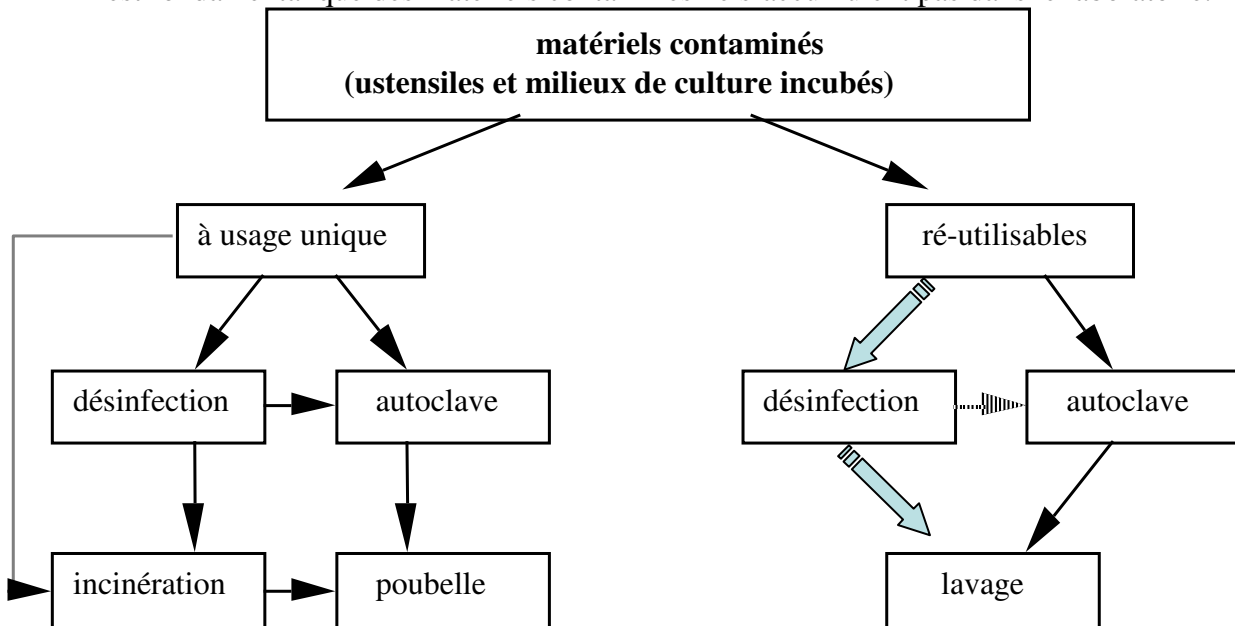
Les **alcools** (éthanol et à un degré moindre propanol) sont efficaces à des concentrations voisines de 70 %. Ils ne sont pas efficaces contre les spores fongiques et sont rapidement inactivés par les protéines. Leur efficacité est augmentée par association avec du formol (10% final) ou avec de l'hypochlorite de sodium (2000 ppm).

Les **ammoniums quaternaires** sont des détergents cationiques actifs à des concentrations de l'ordre de 1%. Leur double action (microbicide et détergente) associée pour la plupart des produits à une odeur agréable les fait utiliser largement.

Les **iodophores** (détergents et iode) sont actifs avec 150 ppm d'iode. La solution alcoolique (50%) d'iode à 1500 ppm a une activité sporicide très nette.

IV - L - 2 - Traitement et élimination des matériels contaminés

Il est fondamental que des matériels contaminés ne s’accumulent pas dans le laboratoire.



Les pipettes ainsi que les fioles volumétriques en verre ne peuvent être stérilisées sans risque de subir des dilatations irréversibles et doivent donc être désinfectés (flèche en pointillé)

QUELQUES ADRESSES UTILES POUR LA FOURNITURE DU MATERIEL ET DES MILIEUX UTILISES EN MICROBIOLOGIE (à réactualiser fréquemment...)

- Institut Pasteur 36, rue du Docteur Roux 75724 Paris cedex 15
catalogue des souches : 25, rue du docteur Roux 75015 Paris
- Institut Mérieux - BioMérieux Marcy l’Etoile 69752 Charbonnières les Bains
- Diagnostic Pasteur 3, Bd R. Poincaré, 92430 Marles la Coquette tél 01 47 41 79 33
- Produits DIFCO OSI 141, rue de Javel 75739 Paris cedex 15 tél 01 45 54 26 28
- Société MERCK 5 - 9, rue Anquetil BP 8
94130 Nogent sur Marne tél 01 43 94 54 00
- Millipore LWD/APD BP 307
78054 St Quentin en Yvelines cedex tél 01 30 12 70 00
- Labover SA Parc Euromédecine 20 Rue R. Koch 34193 Montpellier cedex
tél 04 67 10 59 00
- Poly Labo BP 36,10 rue de la Durance, 67023 Strasbourg tél 03 88 65 80 20
- Laboratoires 3M Santé 3 rue Danton, 92245 Malakoff cedex tél 01 49 65 51 51
- AES Laboratoire BP 54 Route de Dol, 35270 Combourg tél 02 99 73 11 35
- Prolabo 54 rue R. Salengro, 94126 Fontenay sous Bois tél 01 45 14 87 55
- Sartorius 11 avenue du 1er mai 91127 Palaiseau cedex tél 01 69 19 21 00
- ASTEC
- API System La Balme les Grottes 38390 Montalieu-Vercieu.

Les décrets règlementant les conditions d’analyse et fixant les normes microbiologiques par aliment sont disponibles au service des textes officiels, 26, rue Desaix, 75732 PARIS 15.
Les normes de l’Association Française de normalisation (AFNOR) sont disponibles auprès de l’AFNOR, Tour Europe, 92049 PARIS LA DEFENSE cedex (01 42 91 55 55).

GERMES PRODUITS		Fllore aérobie mésophile à 30 °C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux (44 °C)	Indogènes ou <i>E. coli</i>	Streptocoques fécaux	<i>Staphylococcus</i>	Anaérobies sulfito-réducteurs	<i>Salmonella</i>	Levures et moisissures	pathogènes	
Eau de consommation		10 (37°C) 100 (22°)		0 pour 100 ml	0 pour 100 ml	0 pour 50 ml		0 pour 20 ml			0	
LAIT & PRODUITS LAITIERS	Lait cru		100		100 (ln)			50			0	
	Lait pasteurisé conditionné	3.10^4	100	1			10		0 pour 250 ml		0	
	Lait en poudre	5.10^4	5								0	
	Lait concentré	5									0	
	Lait concentré sucré	3.10^4	1		1 (ind)			1 pour 100 ml			0	
	Laits fermentés Yaourt-kéfir		10	1	1				0 pour 25 g	10		
	Laits gélifiés et laits emprésurés	10^3	10	1					0 pour 25 g			
	Fromages frais pasteurisés		10	1			10		0 pour 25 g			
	crèmes pasteurisées	3.10^4	10 100 vrac	1			10		0 pour 25 g			
	glaces et crèmes glacées	3.10^5	100	1			10		0 pour 25 g			
	Beurre	10^4	25							10		
	Lait stérilisé	0	0	0	0	0	0	5	0	0	0	
	caséines et caséinates	3.10^4	0 dans 0,1 g									
	VIANDES & PRODUITS CARNES	viande réfrigérée ou congelée	Carcasses coupes 1/2 gros	5.10^2					2	0 pour 25 g		
pièces condition. sous vide ou non			5.10^4	100				2	0 pour 25 g			
portions unitaires conditionnées				300			100	10	0 pour 25 g			
viandes transformées		hachée d'avance ou à demande	5.10^5		100			100	30	0 pour 25 g		
		plats cuisinés à l'avance	5.10^5	10^3	10			100	30	0 pour 25 g		
		charcuterie crue séchée			100			5.10^2	50	0 pour 25 g		
		salaisons crues salées / séchées			10^3			5.10^2	50	0 pour 25 g		
Charcuterie cuite	3.10^5	10^3	10			100	30	0 pour 25 g				
jambon cuit entier	10^4	10	0 pour 1 g			0 pour 1 g	0 pour 1 g	0 pour 25 g				
OEUF & DERIVES	ovoproduits pasteurisés	10^5		10 entérobac			100		0 pour 25 g			
	blanc d'oeuf non pasteurisé								0 pour 25 g			

GERMES PRODUITS		Fllore aérobie mésophile à 30°C	Coliformes totaux	Coliformes fécaux (44°C)	Indogènes ou <i>E. coli</i>	Streptocoques fécaux	<i>Staphylococcus</i>	Anaérobies sulfito-réducteurs	<i>Salmonella</i>	Levures	moisissures	
VIANDE DE VOLAILLE	volaille entière , réfrigérée ou congelée								0 pour 25 g			
	rôtis ,escalopes crus panés ou non	5.10 ³		10 ³			5.10 ²	30	0 pour 1 g			
	rôtis cuits	3.10 ⁵		10			10 ²	10	0 pour 25 g			
	viande crue (VSM)	10 ⁶		5.10 ³			10 ³	10 ²	0 pour 1 g			
	viande cuite (VSM)	3.10 ⁵		10			10 ²	30	0 pour 25 g			
PRODUITS DE LA MER	poisson tranché , filet pané (frais ou réfrigéré)	10 ⁵		10			10 ²	10	0 pour 25 g			
	poisson tranché , filet pané (congelé)	10 ⁴		1			10 ²	2	0 pour 25 g			
	préparation à base de chair de poisson	5.10 ⁵		10 ²			10 ²	10	0 pour 25 g			
	crustacés cuits , réfrigérés	10 ⁵		1				2	0 pour 25 g			
	crustacés cuits ou non (congelés)	10 ³		1				2	0 pour 25 g			
	crevette décortiquée cuite réfrigérée	10 ⁵		10			10 ²	10	0 pour 25 g			
	coquillages bivalves présentés vivants			3		25 pour 100 ml			0 pour 25 ml			
	semi-conservé non pasteurisée	anchois	10 ³	0 pour 1 g	0 pour 1 g				0 pour 1 g	0 pour 25 g		
		saumon fumé	10 ⁴	0 pour 1 g	0 pour 1 g				0 pour 1 g	0 pour 25 g		
	FRUITS & LEGUMES	légumes surgelés	5.10 ⁵	3.10 ³	15			10	10	0 pour 25 g	10 ³	5.10 ²
légumes surgelés non blanchis		1,5.10 ⁶	5.10 ³	15			100	10	0 pour 25 g	2.10 ³	1,5.10 ³	
potages deshydratés		3.10 ⁵	10 ³	10			100	30	0 pour 25 g			
PATISSERIES ET CREMES PATISSIERES		3.10 ⁵	10 ³	1			100	10	0 pour 25 g			
SEMI-CONSERVES PASTEURISEES		10 ³	0 pour 1 g	0 pour 1 g			0 pour 1 g	0 pour 1 g	0 pour 25 g			

TABLES DES MATIERES

	Page
<u>I - GENERALITES</u>	
A - Intérêt de la microbiologie alimentaire	2
B - Les risques au laboratoire de microbiologie	3
C - Le laboratoire	4
D - Matériel d'équipement du laboratoire d'analyse microbiologique	5
D - 1 - Systèmes de stérilisation / désinfection et zones stériles	5
D - 2 - Matériels d'incubation et de préparation des milieux	8
D - 3 - Préparation des échantillons et culture microbienne	8
D - 4 - Microscopie	9
E - Techniques générales	10
E - 1 - Prélèvements	11
a) Echantillonnage	11
1) Méthode d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF	12
2) Cas particulier des conserves	15
3) Méthode d'échantillonnage pour rechercher un nombre peu élevé de microorganismes	16
3) Choix des échantillons	16
b) Fréquence des prélèvements	16
c) Conditions du prélèvement	16
1) Prélèvement en surface	17
2) Prélèvement de produits liquides	17
3) Prélèvement de produits solides	17
E - 2 - Traitement de l'échantillon	18
a) Transfert au laboratoire	18
b) Préparation de l'échantillon	18
E - 3 - Les diluants	18
E - 4 - La revivification	19
a) revivification en milieu liquide	19
b) revivification sur milieu solide	21
E - 5 - Techniques de dilution	21
E - 6 - Principales techniques de numération	22
a) Méthodes générales directes	22
b) Méthodes générales indirectes	23
E - 7 - Numération en milieu solide UFC	24
a) Technique de numération dans la masse de la gélose	24
b) Technique de numération en surface	25
E - 8 - Numération en milieu liquide UFT	25
a) Fractionnement de grands volumes liquides	25
b) Méthode de Mac Grady	25
E - 9 - Numération par filtration	28
E - 10 - Interprétation des numérations	28
a) Calcul de la charge microbienne du produit	28
b) Numération en milieu solide	29
c) Numération en milieu liquide	31
1) Numération avec une seule dilution dans n tubes	31
2) Numération avec plusieurs dilutions décimales de n tubes	32
d) Exemple d'exploitation statistique de résultats expérimentaux	32
e) Conclusions	33
E - 11 - Le contrôle de conformité par rapport à une norme	34
<u>II - GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE</u>	
A - <i>Clostridium botulinum</i>	36
B - <i>Salmonella</i> sp	36
C - <i>Shigella</i> sp	36
D - <i>Escherichia coli</i> entéro-pathogène	37
E - Les entérobactéries	37
F - <i>Staphylococcus aureus</i> et l'entérotoxine staphylococcique	37
G - <i>Vibrio</i>	38

1 - <i>Vibrio cholerae</i>	
2 - <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	
3 - <i>Vibrio</i> sp	
H - <i>Brucella</i>	38
I - <i>Clostridium perfringens</i>	38
J - <i>Bacillus cereus</i>	38
K - <i>Streptococcus</i> sp	39
L - <i>Listeria monocytogenes</i>	39
M - <i>Campylobacter jejuni</i>	39
N - <i>Yersinia enterocolytica</i>	39
O - Levures et moisissures	

III - PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

A - La numération des germes totaux	40
B - Recherche d'une contamination fécale	43
1 - La colimétrie	43
a) dénombrement en milieu liquide	44
b) Dénombrement en milieu solide	46
c) Identification d' <i>Escherichia coli</i>	47
d) colimétrie par filtration	47
f) colimétrie par le système Pétrifilm	48
g) Résultats	48
2 - Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield	48
a) Numération en milieu liquide	49
b) Numération en milieu solide	49
c) Isolement	50
C - Recherche et numération des anaérobies sulfite réducteurs	52
1 - Dénombrement des spores et des formes végétatives	52
2 - Numération des spores	53
D - Recherche et dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i>	53
1 - Milieux de numération	55
2 - Tests de confirmation	55
3 - Milieu de sporulation	56
4 - Numération de <i>C. perfringens</i> par titrage de l' α -toxine	56
E - Recherche et numération de <i>Staphylococcus aureus</i>	57
1 - Enrichissement	57
2 - Numération sur milieux solides	58
3 - Numération en milieu liquide	59
4 - Identification	60
F - Recherche de <i>Salmonella</i> (et de <i>Shigella</i>)	62
1 - Préenrichissement	62
2 - Enrichissement	63
3 - Isolement	64
4 - Identification biochimique	66
5 - Sérotypage	66
6 - Autres méthodes de recherche des <i>Salmonella</i>	68
1 - L'immunofluorescence	68
2 - L'immunoenzymologie	68
3 - L'hybridation ADN-ADN	70
4 - Autres méthodes	71
6 - Recherche de <i>Shigella</i>	71
G - Recherche indirecte de <i>Brucella</i>	72
H - Recherche et/ou numération des <i>Vibrio</i>	72
1 - <i>Vibrio cholerae</i>	72
2 - <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	72
I - Recherche et numération de <i>Bacillus cereus</i> et de <i>Bacillus</i> sp.	75
J - Recherche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	77
K - Recherche de <i>Yersinia enterocolytica</i>	77
L - Recherche de <i>Campylobacter jejuni</i>	78
M - Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	78
N - Numération des levures et moisissures	81
O - Recherche des bactériophages fécaux	82

P - Recherche de la toxine botulinique	82
Q - Les maladies parasitaires	83

IV - ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES

A - Présentation des résultats	84
B - Analyse des eaux de consommation	86
1 - Définition d'une eau potable	86
2 - Divers types d'analyses d'eau	87
3 - Prélèvements	88
4 - Analyse microbiologique	90
C - Analyse du lait et des produits laitiers	92
1 - Divers types de lait	94
2 - Prélèvement des échantillons	94
3 - Analyse microbiologique	94
4 - Analyses chimiques et biochimiques associées à l'analyse microbiologique	96
a) Contrôle de la propreté	
b) Recherche d'activités enzymatiques	
c) Détermination de l'acidité	
d) Test au teepol	
e) Contrôle indirect du degré de chauffage	
f) Recherche d'antibiotiques	
5 - Analyse du lait cru	99
6 - Analyse du lait pasteurisé	100
7 - Analyse du lait stérilisé	100
8 - Analyse du lait en poudre	100
9 - Analyse du lait concentré sucré	101
10 - Analyse de laits fermentés	101
11 - Analyse des laits gélifiés et des laits emprésurés aromatisés	101
12 - Analyse des fromages (frais , pasteurisés)	101
13 - Analyse du beurre	102
14 - Analyse des glaces et crèmes glacées	102
15 - Analyse des crèmes de consommation courante	102
16 - analyse des caséines et caséinates	102
D - Analyse des viandes et des produits carnés	103
1 - Flores microbiennes normales et pathogènes des viandes	103
2 - Evolution des flores microbiennes des viandes et qualité	104
3- Analyse de plats cuisinés à l'avance et de viandes cuites	105
4- Analyse de la viande fraîche ou hachée	105
5 - Analyse de la charcuterie crue	105
6- Analyse de la charcuterie cuite	105
7- Analyse des semi conserves	106
E - Analyse des coquillages	106
F - Analyse d'une volaille	107
G - Analyse d'un sucre	107
H - Analyse des conserves	108
I - Analyse de produits congelés	110
J - Analyse d'aliment soupçonné d'être à l'origine d'une maladie	110
K - Analyse microbiologique de l'environnement dans un atelier	111
L - Stérilisation , désinfection et traitement des matériels contaminés	102
1 - types et usages de quelques désinfectants	112
2 - Traitement et élimination des matériels contaminés	114

ADRESSES UTILES	114
------------------------	-----

CRITERES DE QUALITE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES	115
--	-----

TABLE DES MATIERES	117
---------------------------	-----