



ANALYSE BACTÉRIOLOGIQUE DES DENREES ALIMENTAIRES



AZIZI  DJAMAL
INSTITUT PASTEUR



DIFFERENTES METHODES

D'ANALYSE

ANALYSE BACTERIOLOGIQUE DES ALIMENTS:

- **Buts de l'analyse?**
- **Paramètres recherchés?**
- **Dénombrement des micro-organismes?**
- **Définition des germes recherchés?**

Buts de l'analyse?

Rechercher et dénombrer les micro-organismes:

- **Qualité marchande**
Germes qui provoquent l'altération de l'aliment.
Saveur, odeur...
- **Qualité hygiénique**
Germes potentiellement pathogènes
qui provoquent l'intoxication alimentaire.

3 groupes de germes recherchés:

- **Germes capables d'altérer la qualité marchande de l'aliment.**
Moisissures et Pseudomonas...
- **Germes potentiellement pathogènes pour le consommateur.**
Salmonella ,Listéria ...
- **Témoins de contamination fécale.**
Coliformes...

Dénombrement des micro-organismes?

Interprétation des résultats

2 plans sont désignés



~~Plan à 2 classes~~



Plan à 3 classes

**pour faire l'analyse
bactériologique des aliments?**

Référentiels

- Norme NF V 08- 010 :règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.
- Norme NF EN ISO 6887-1 relative à la suspension mère et dilutions décimales;1.règle générale.
- Norme NF V 08- 057- 2 Microbiologie alimentaire - Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.
- Norme XP V 08 – 102 relative aux règles générales pour le comptage des colonies et l'expression des résultats.
- Norme NF ISO 7218 :règles générales pour les examens microbiologiques.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

La prise d'essai:

A - cas de produit solide (exemple: fromage, viande....).

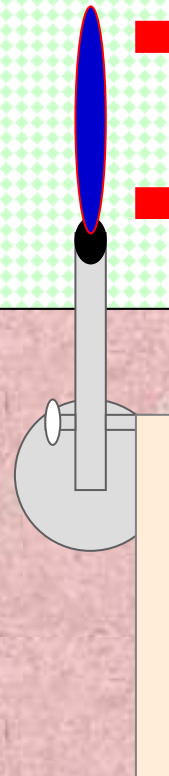
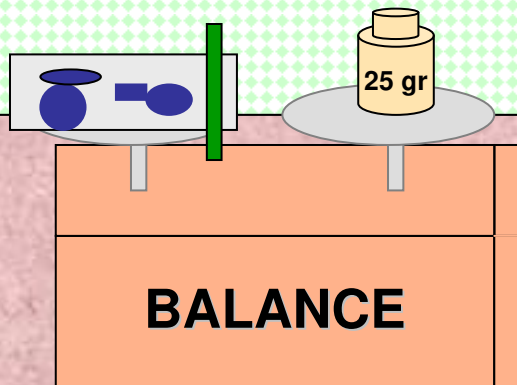
B -cas de produit liquide (exemple: lait pasteurisé, jus.....).



A- Cas de produit solide.

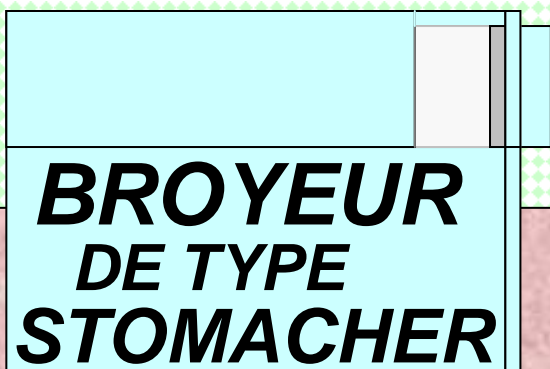
Peser dans un sachet stérile 3 × 25 gr du produit à analyser aseptiquement.

- La 1^{ère} pesée servira au contrôle bactériologique.
- La seconde servira à la recherche des Salmonella.
- La troisième servira à la recherche de Listéria.



a- La prise d'essai pour une analyse bactériologique classique:

- Verser le TSE dans le sachet stérile contenant 25 gr de produit à analyser.
 - Broyer l'aliment 6 à 8 minutes.
 - Verser le contenu dans le flacon de TSE.

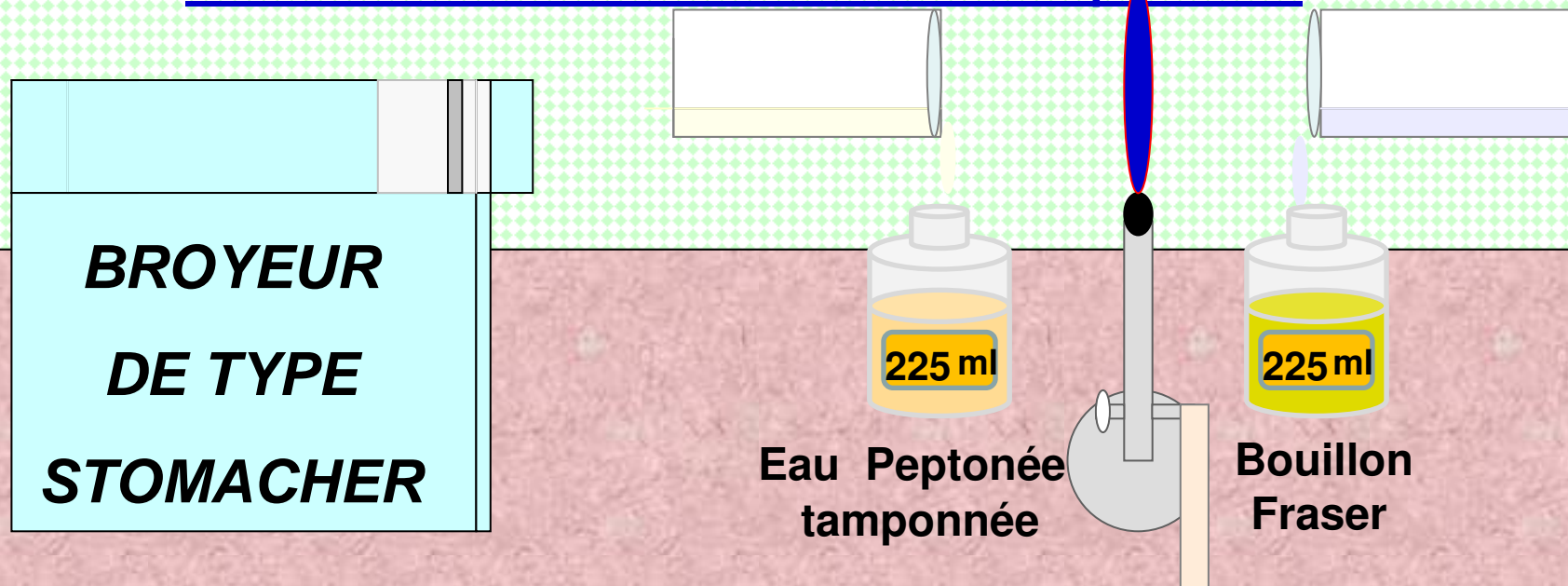


(suspension mère)

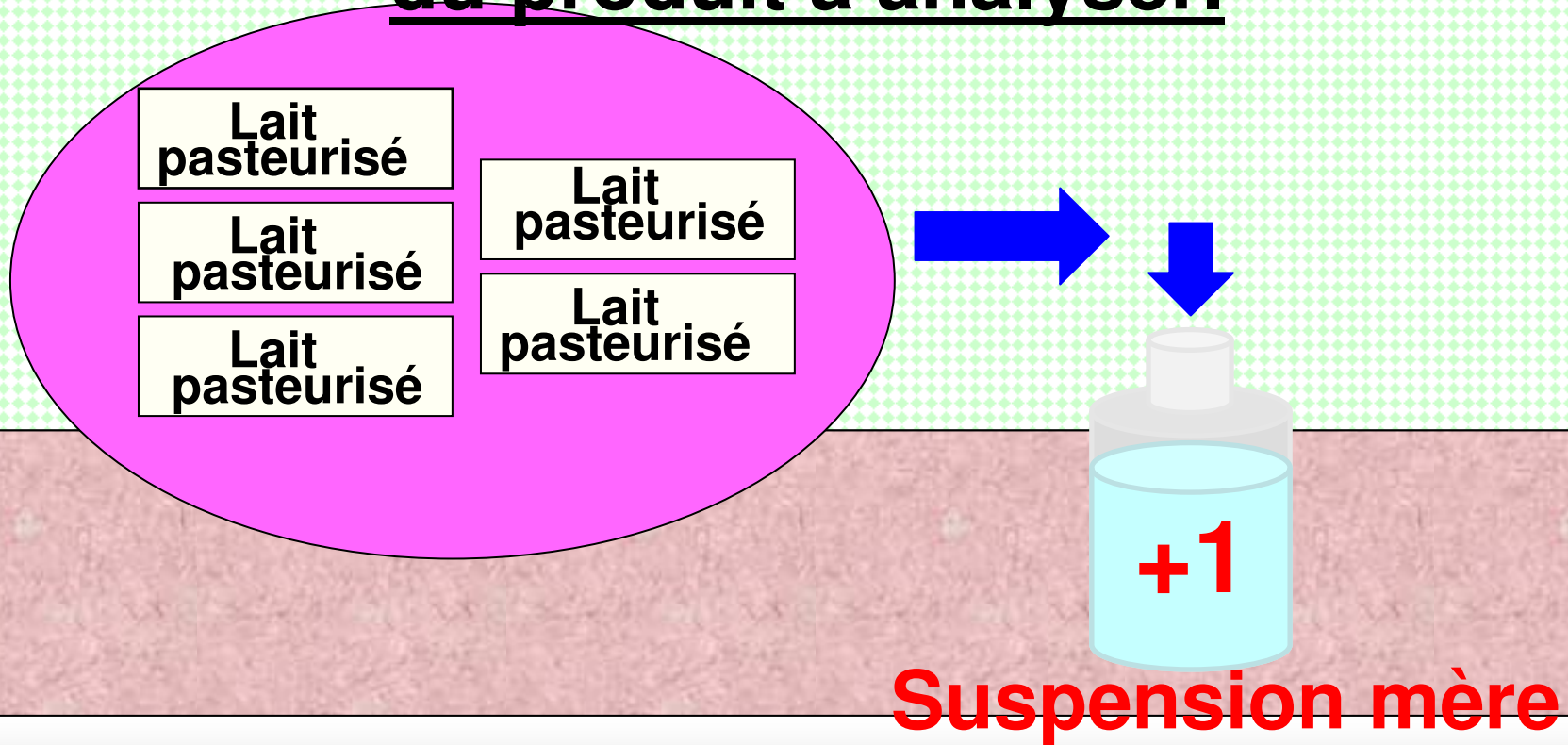
10^{-1}

b- La prise d'essai pour la recherche des Salmonella et des Listéria.

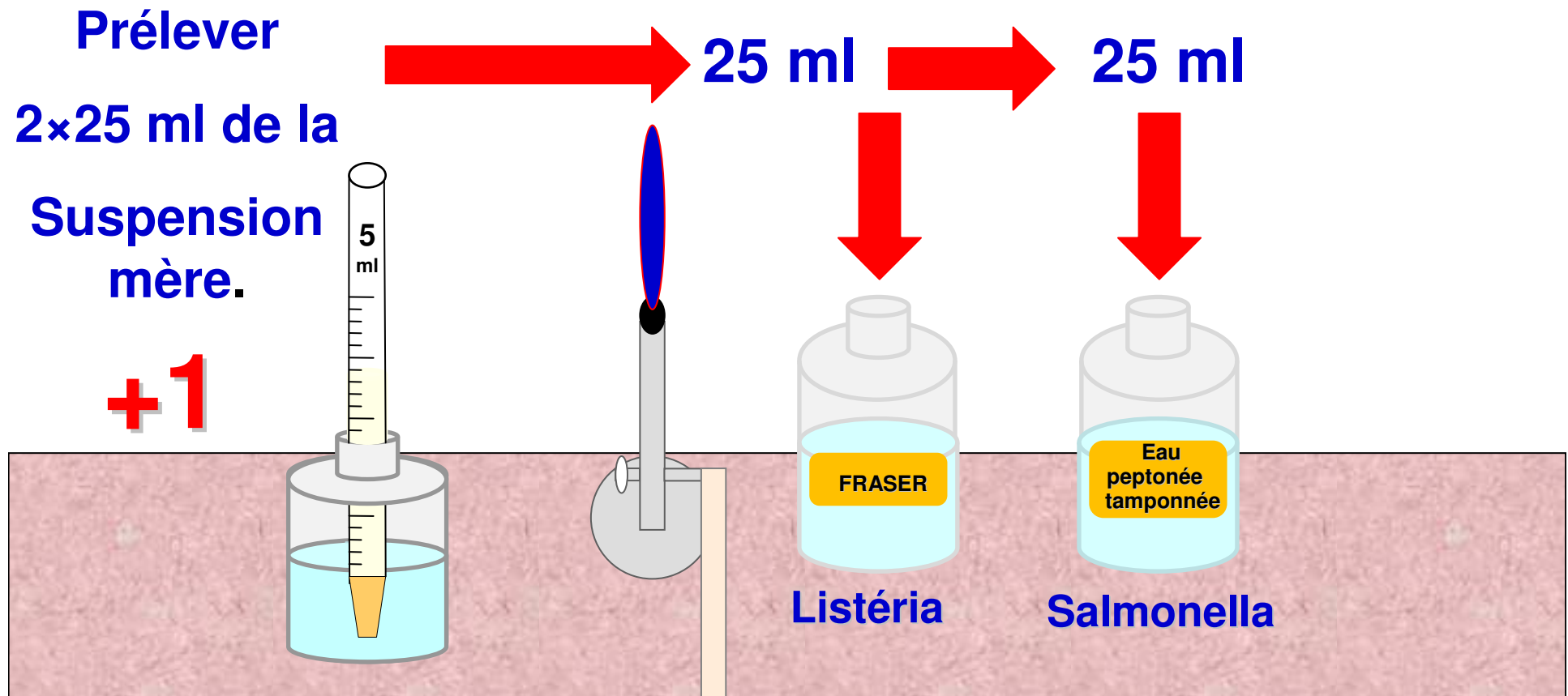
- Verser l'Eau Peptonée Tamponnée(Salmonella) et le bouillon Fraser(Listéria) dans le sachet stérile contenant 25 gr de produit à analyser.
- Broyer l'aliment 6 à 8 minutes.
- Verser le contenu dans les flacons respectives.



B – Cas de produit liquide:
a- La prise d'essai pour une analyse
bactériologique classique:
Faire un mélange de 3 à 5 unités
du produit à analyser.



b- La prise d'essai pour les recherches des Salmonella et des Listéria.



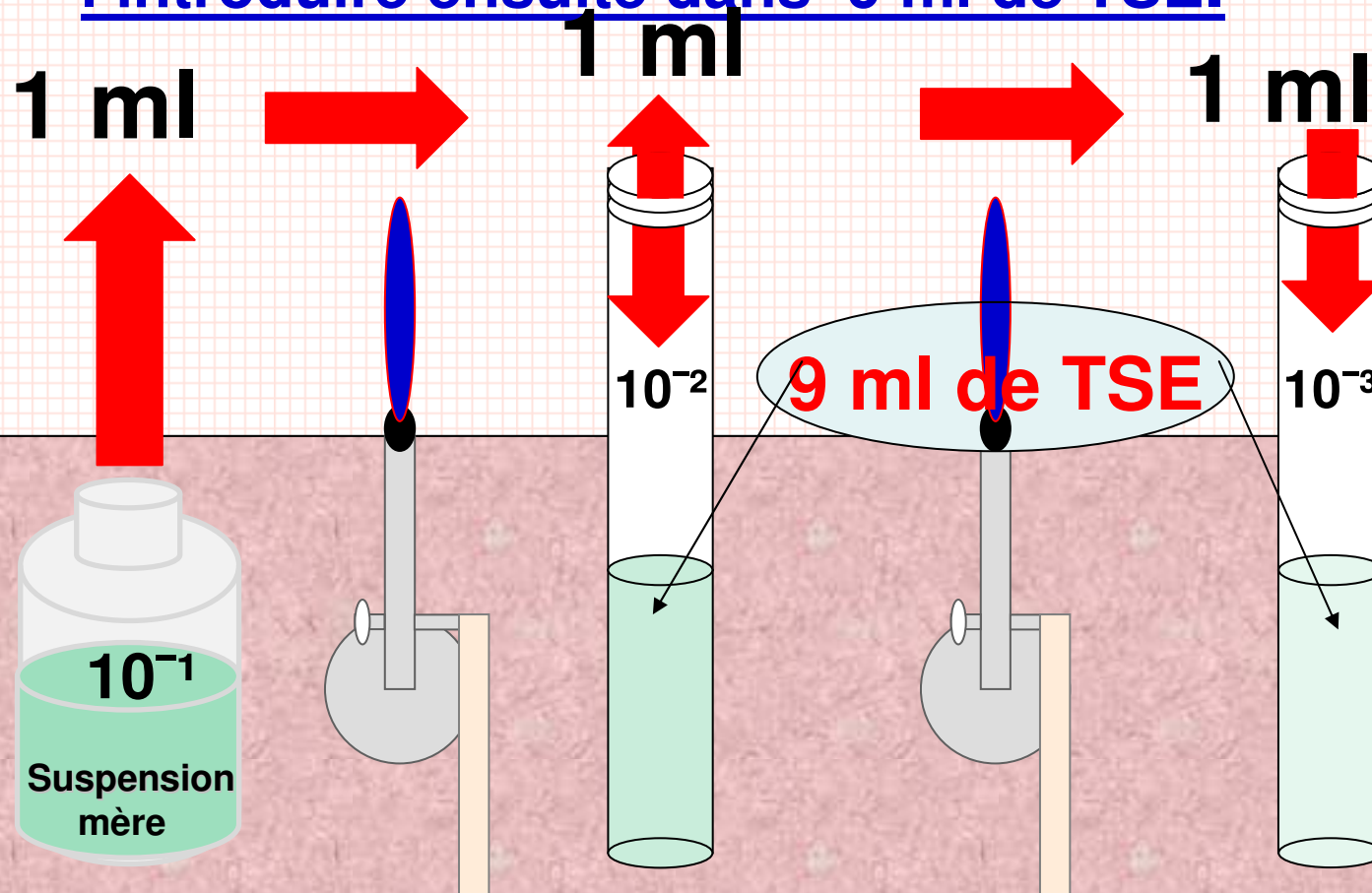
PRÉPARATION DES DILUTIONS DÉCIMALES

a - cas de produit solide.

b - cas de produit liquide.

a - Cas de produit solide:

- Introduire 1 ml de la suspension 10^{-1} dans 9 ml de TSE.
- Mélanger, puis prélever 1 ml de la dilution 10^{-2} et l'introduire ensuite dans 9 ml de TSE.



PARAMETRES RECHERCHES

- Recherche et dénombrement des microorganismes totaux (Flore mésophile).
- Recherche et dénombrement des levures et moisissures.
- Recherche et dénombrement des Coliformes, Coliformes thermo tolérants et EscherichiaColi.
- Recherche et dénombrement des Anaérobies Sulfite –Réducteurs à 37°C.
- Recherche et dénombrement de Clostridium Perfringens à 46°C.
- Recherche et dénombrement des Staphylococcus aureus.
- Recherche des salmonelles.
- Recherche de Listéria.

1^{er} JOUR DES TARVAUX PRATIQUES

**RECHERCHE ET
DENOMREMENT DES
MICROORGANISMES PAR
COMPTAGE DES COLONIES
OBTENUES A 30 °C,
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

Définition de la Flore Mésophile Aérobic Total

Définition:

La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'UFC (Unité Formant une Colonie) présentes dans un produit. Ce dénombrement se fait à 30 °C ce qui permet de dénombrer trois grands types de flore :

la flore thermophile, température optimale de croissance à 45 °C ;

la flore mésophile, température optimale de croissance entre 20 °C et 40 °C ;

la flore psychrophile, température optimale de croissance à 20 °C.

Référentiels

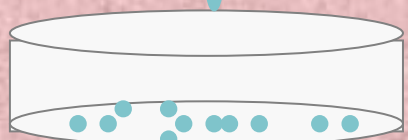
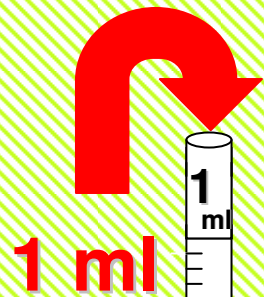
- Norme NF 08 – 051 relative au dénombrement des micro-organismes – méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- Norme XP V 08 – 102 relative aux règles générales pour le comptage des colonies et l'expression des résultats.
- Norme NF V 08 – 002:Microbiologie alimentaire – Directives générales pour les examens microbiologiques.
- Norme NF V- 057- 2 Microbiologie alimentaire - Directives générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.
- Norme NF ISO 7218:règles générales pour les examens microbiologiques.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Milieu utilisé:

Gélose PCA
(Plate Count Agar)

■ Inoculer les boites de pétri avec 1 ml des différentes dilutions.

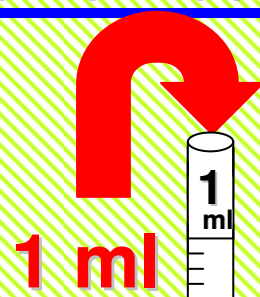
1 ml



10^{-1}



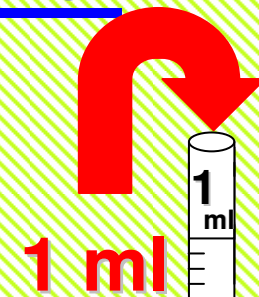
1 ml



10^{-2}



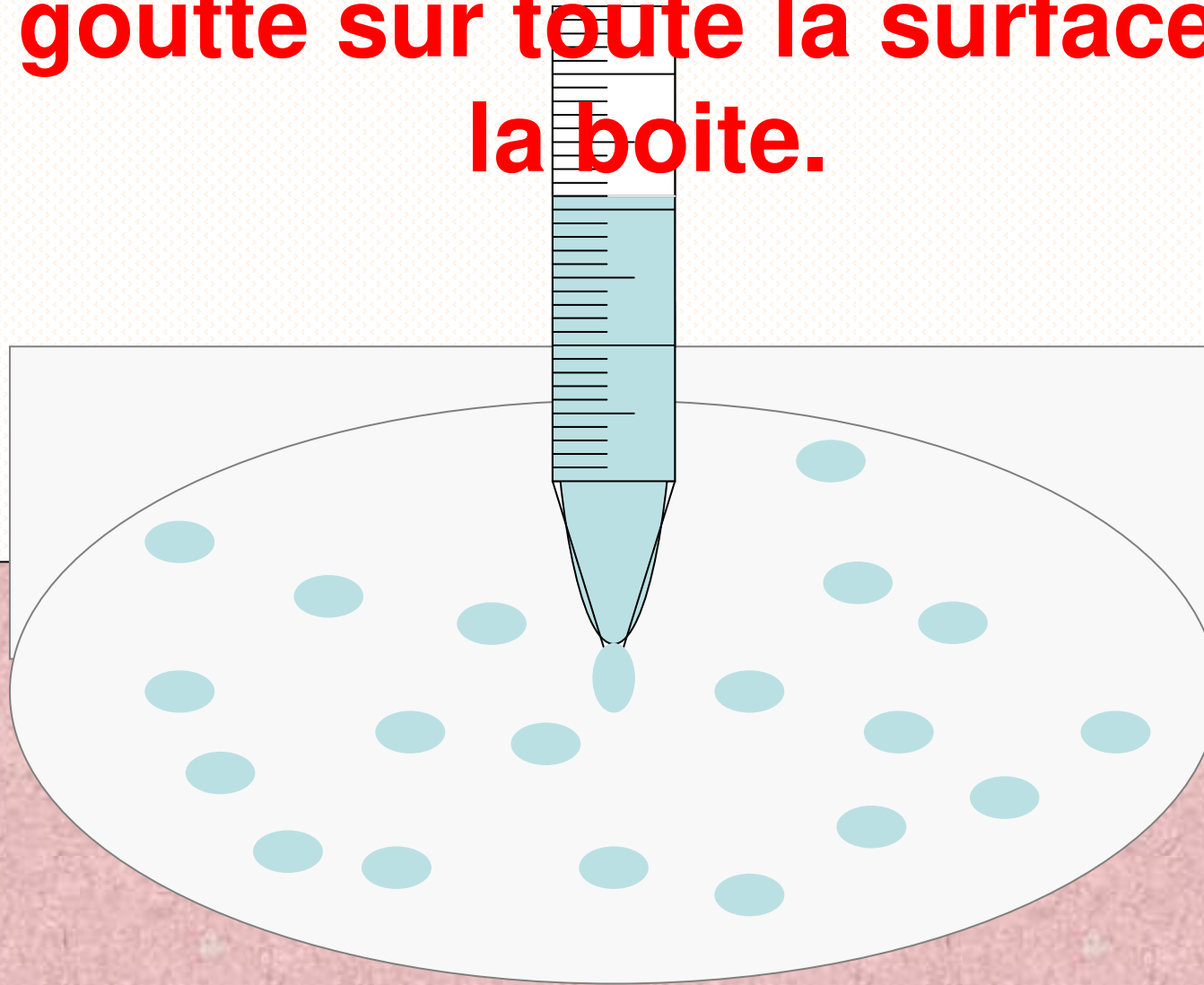
1 ml



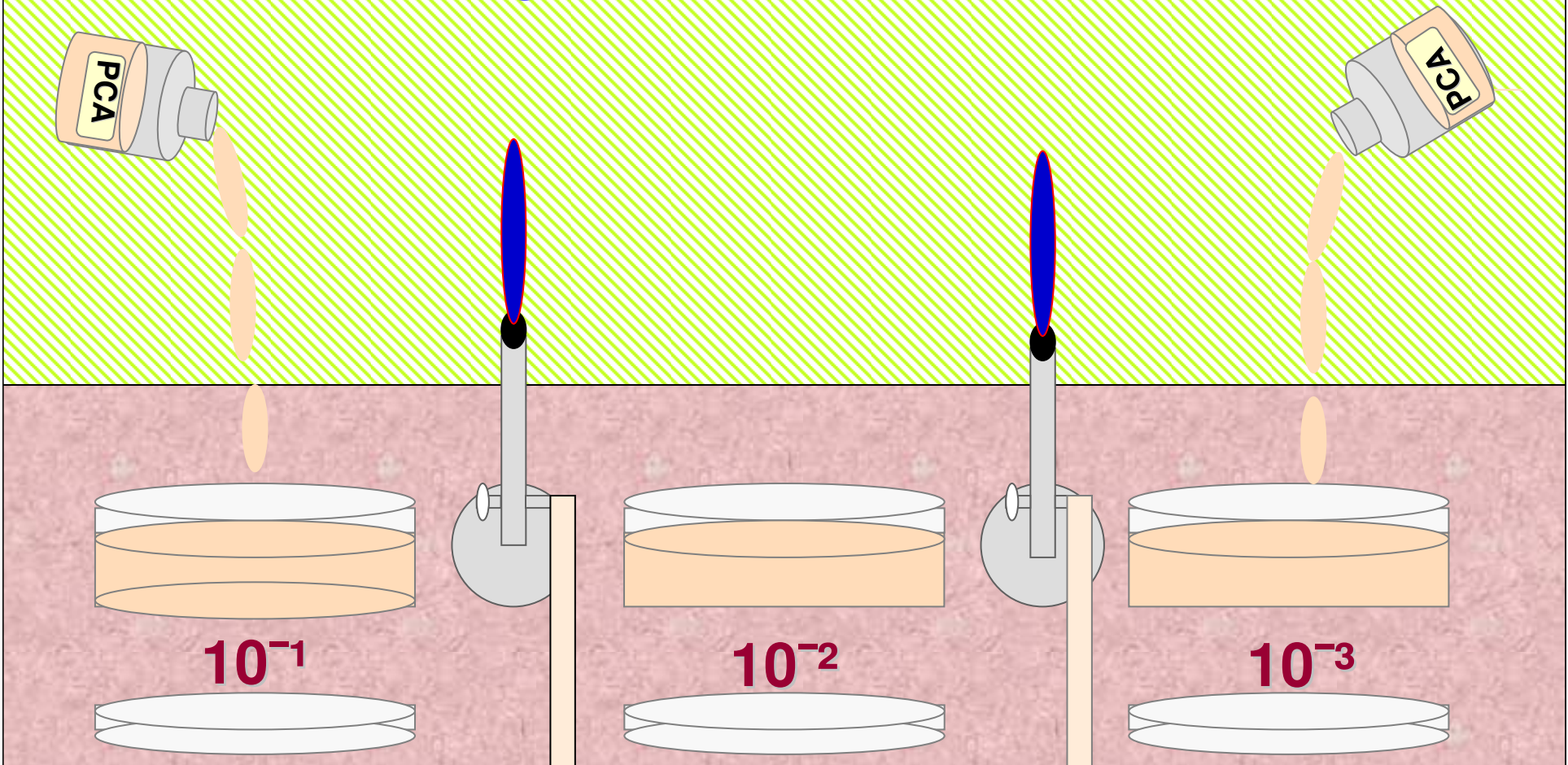
10^{-3}



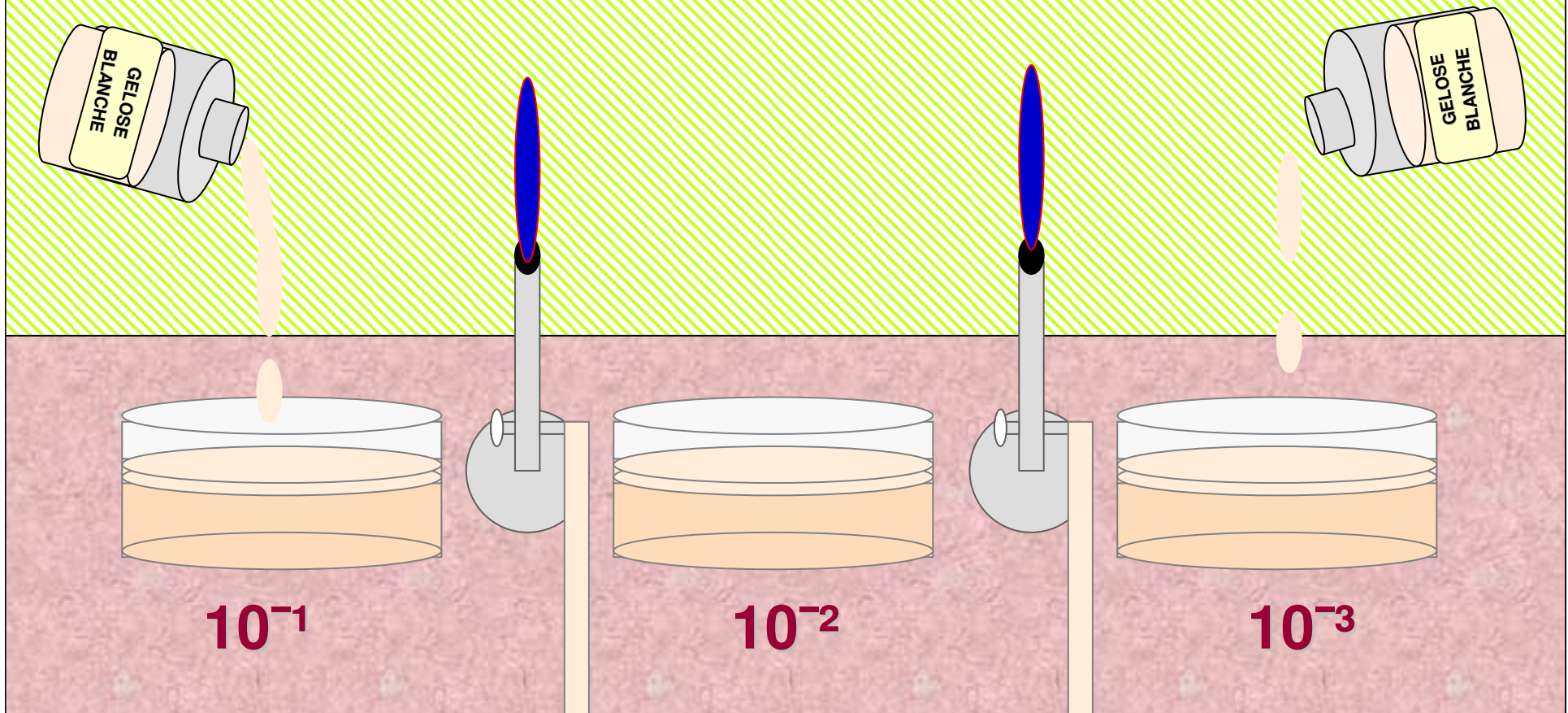
Déposer l'inoculum(1 ml) goutte à goutte sur toute la surface de la boîte.



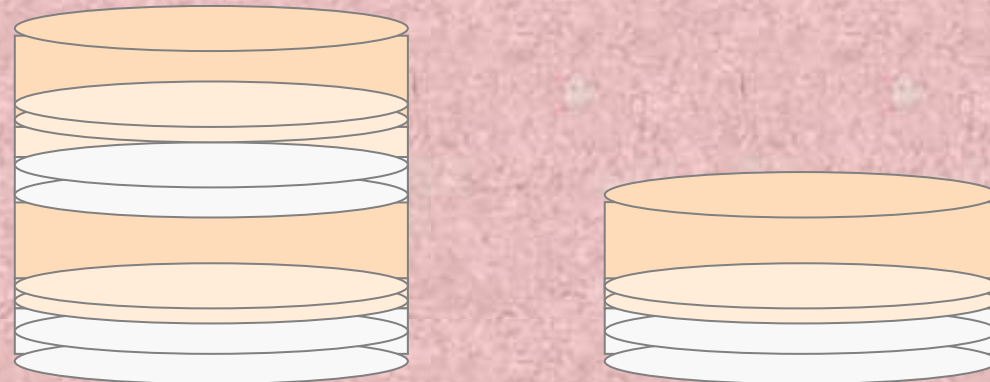
- Couler la gélose PCA ≈ 15 ml
refroidie $\approx 45^\circ\text{C}$.
- Mélanger et laisser solidifier.



- Couler une deuxième couche de gélose blanche \approx 5 ml.
- Laisser solidifier.



- Incuber les boites couvercle en bas
72 ±3h à 30°C.



Incuber 72h à 30°C

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DES
COLIFORMES, COLIFORMES
THERMOTOLERANTS ET
ESCHERICHIA COLI DANS LES
DENREES ALIMENTAIRES**

Définition des coliformes totaux:

Définition :

- Les coliformes totaux sont des bactéries en forme de bâtonnet
- aérobies ou anaérobies facultatives
- possédant l'enzyme β - galactosidase permettant l'hydrolyse du lactose à 35°C avec production de gaz
- Les principaux genres inclus dans le groupe sont : *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella* et *Serratia*

**coliformes thermotolérants ou
coliformes fécaux**

Définition:

- **Les coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux sont un sous-groupe des coliformes totaux**
- **capables de fermenter le lactose à une température de 44°C**

Définition d' *Escherichia coli*

Définition:

- *Escherichia coli*: Il s'agit là de coliformes thermotolérants qui produisent , en outre , de l'indole à partir du tryptophane à 44°C .
- La bactérie *E. coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés

Milieu utilisé:

- **VRBL: gélose au cristal**

Violet et au Rouge neutre Biliée Lactosée
(autres que les produits laitiers)

- **DESOXYCHOLATE 1 ‰**
(pour les produits laitiers)

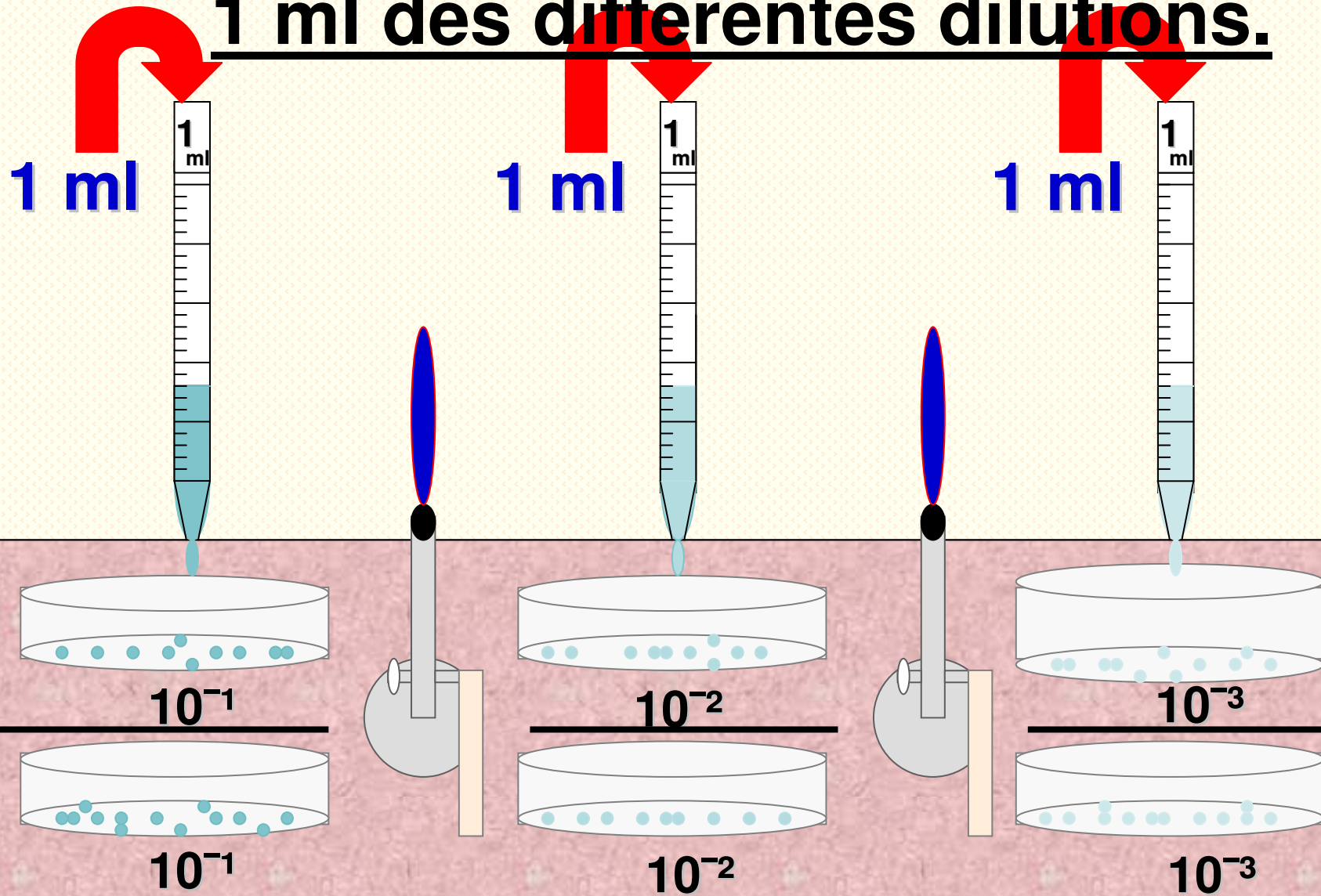
Référentiels

- Norme NF ISO 4831 relative au dénombrement des coliformes – technique du nombre le plus probable après incubation à 30°C.
- Norme NF V 08 - 050 relative au dénombrement des coliformes – méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- Norme NF V 08 – 017 relative au dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* (annexe à NF V 08 – 015 et NF V 08 -016).
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

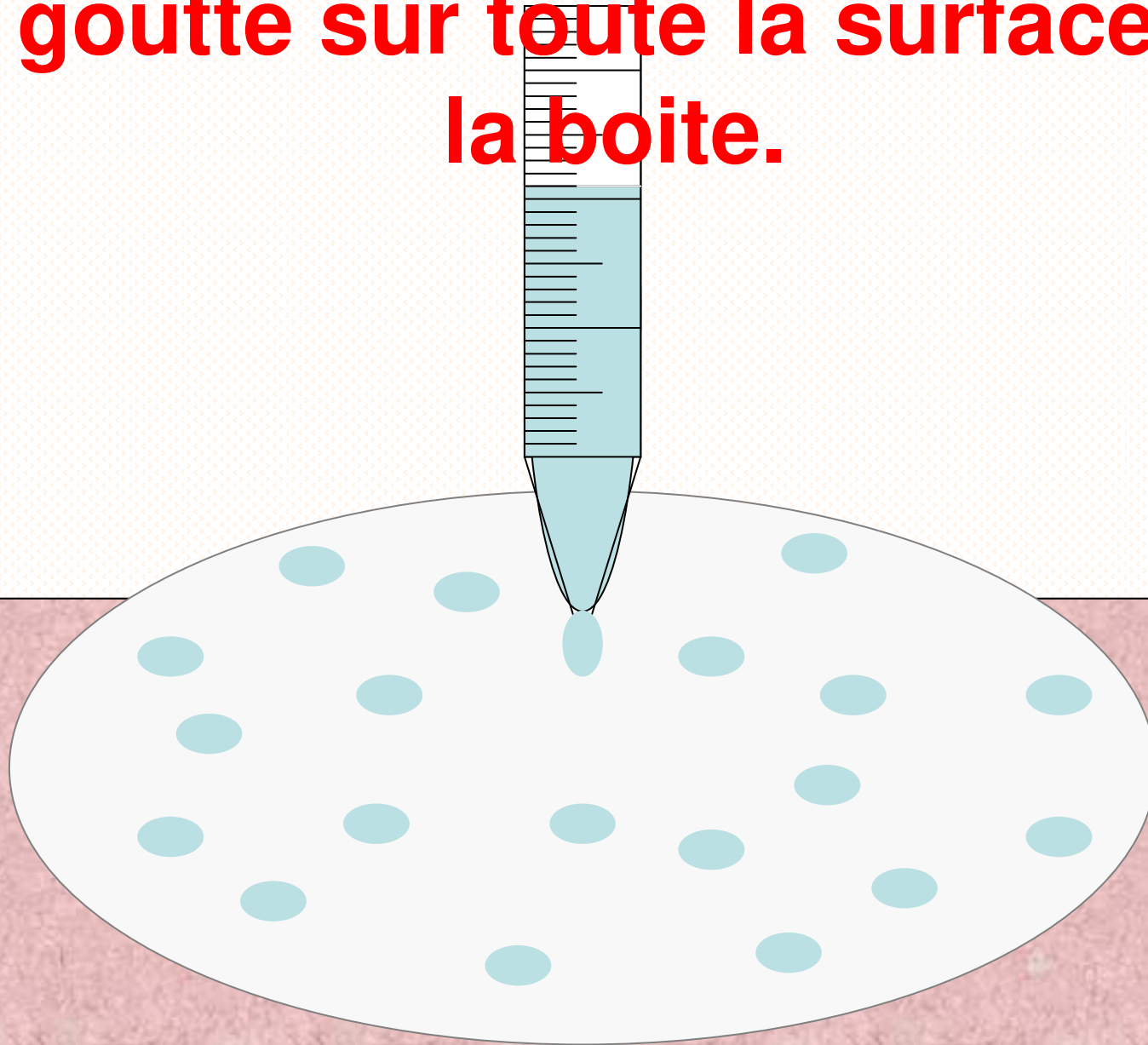
Référentiels

- Norme NF V 08-051:dénombrement des coliformes par comptage des colonies,méthode de routine.
- Norme NF V 08-017:dénombrement des coliformes fécaux et d'Eschérichia Coli(annexe NF V 08-015 et NF V08-016).
- Norme NF ISO 7218:règles générales pour les examens microbiologiques.
- Norme NF V 08- 010 :règles générales pour la préparation des dilutions en vue de l'examen microbiologique.
- Norme XP V 08-102:règles générales pour le comptage des colonies et l'expression des résultats:cas des dénombrements en milieu solide.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

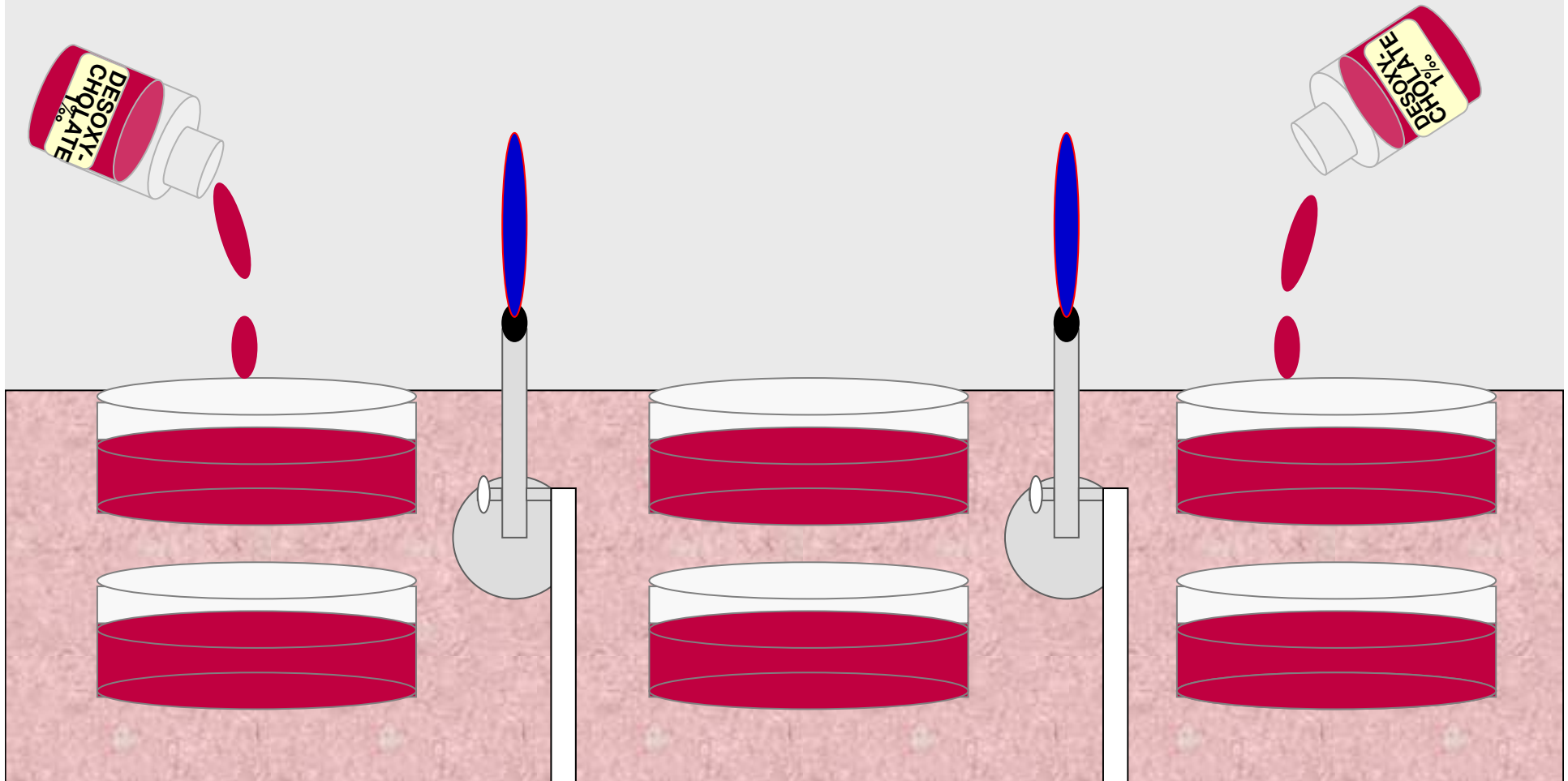
Inoculer 2 séries de boîtes avec 1 ml des différentes dilutions.



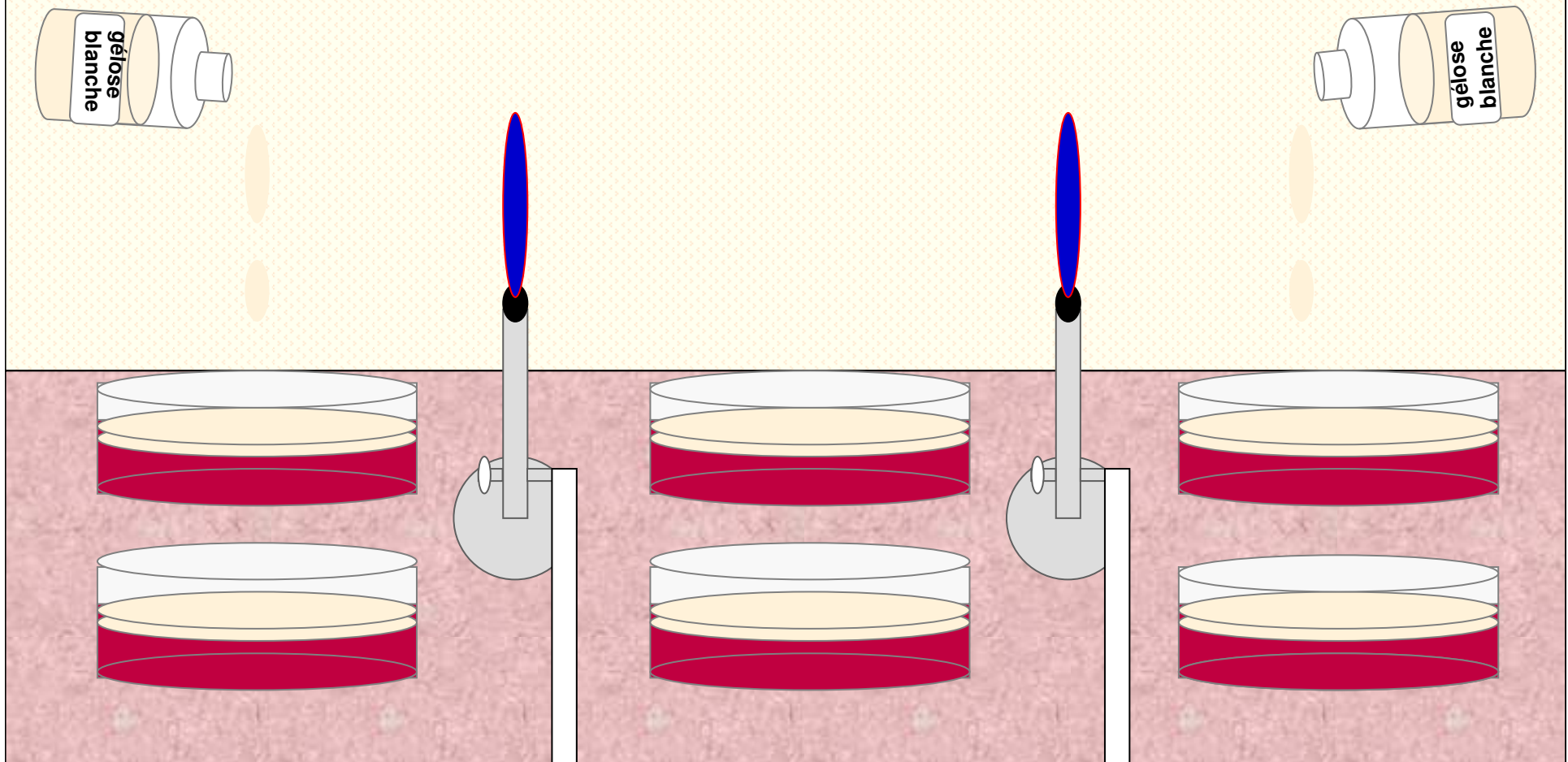
**Déposer l'inoculum(1 ml) goutte
à goutte sur toute la surface de
la boîte.**



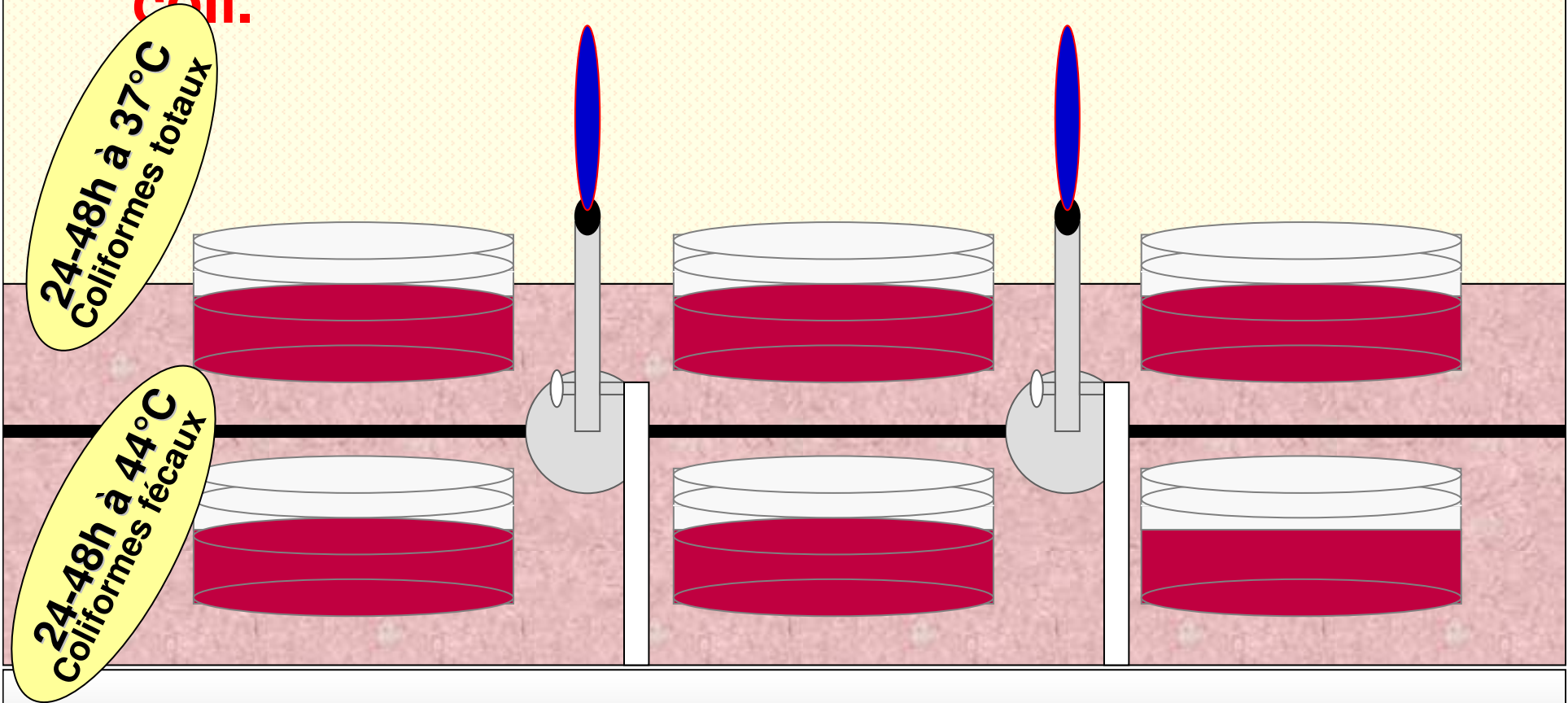
- Couler une couche de gélose de désoxycholatee 1%
ou VRBL ≈ 15 ml, refroidie à la température $\approx 45 \pm 1$ °C.
- Mélanger et laisser solidifier.



- Couler une 2^{ème} couche de gélose blanche ou de désoxycholatee 1‰ ou de VRBL ≈ 4ml.
Laisser solidifier.



- Incuber une série de boîtes 24-48 h à 37°C pour la recherche des coliformes totaux.
- Incuber l'autre série à 44 °C pour la recherche des coliformes thermo tolérants et *Escherichia coli*.



**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

Milieu utilisé:

Gélose Baird Parker

DEFINITION:

- **microorganismes de forme sphérique**
- **cooci Gram positif**
- **halophiles c'est-à-dire cultivent en présence de 5 % de NaCl**
- **possèdent une catalase**

(se multiplier dans des salaisons, ou en surface de poissons salés. Certaines espèces **psychrotrophes** se développent sur des aliments réfrigérés Certaines espèces **osmophiles** se multiplient dans des produits sucrés exemple laits concentrés sucrés).

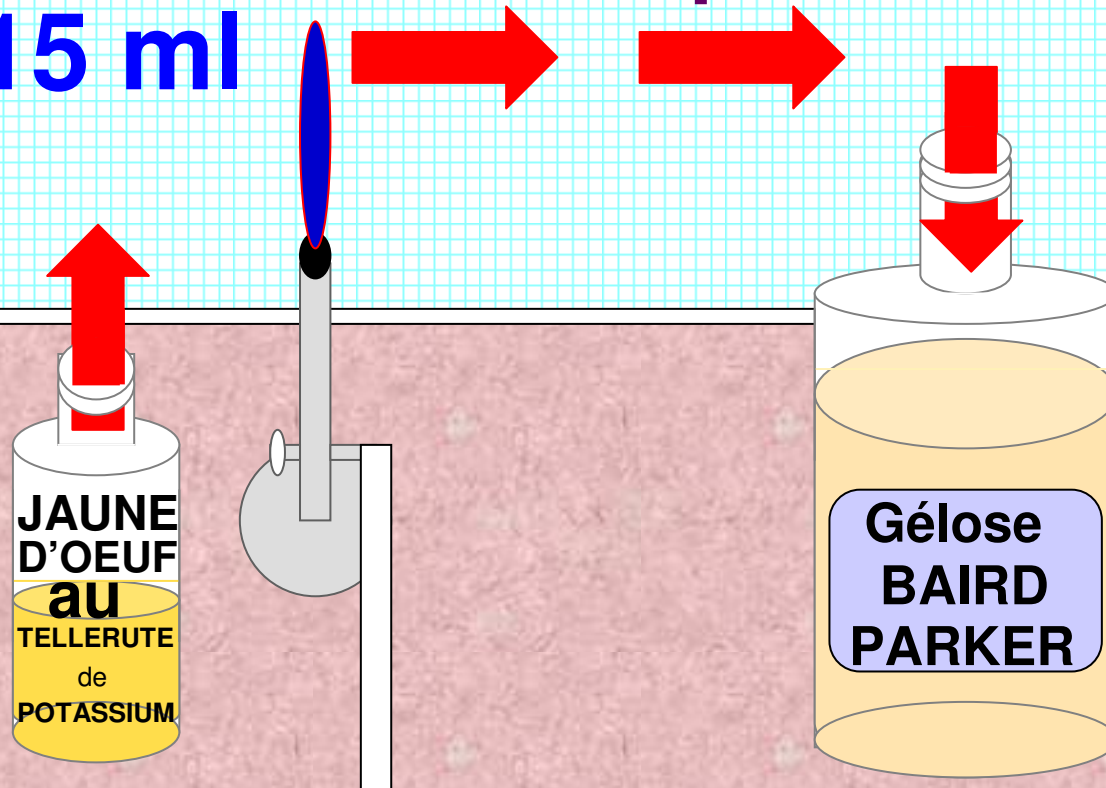
Référentiels

- Norme NF ISO 6888 - 1 relative au dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive (S.aureus et autres espèces) – Partie 1: technique utilisant le milieu gélosé de Baird Parker.
- Norme NF V 08 – 057 – 1 relative au dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – 1: technique avec confirmation des colonies.
- Norme NF V 08 – 057 – 2 relative au dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive par comptage des colonies à 37°C – 2: technique sans confirmation des colonies.
- Norme NF ISO 6888 -2 relative au dénombrement des Staphylocoques à coagulase positive (S.aureus et autres espèces) – Partie 1: technique utilisant le milieu gélosé au plasma de lapin et au fibrinogène.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Préparation du milieu Baird Parker:

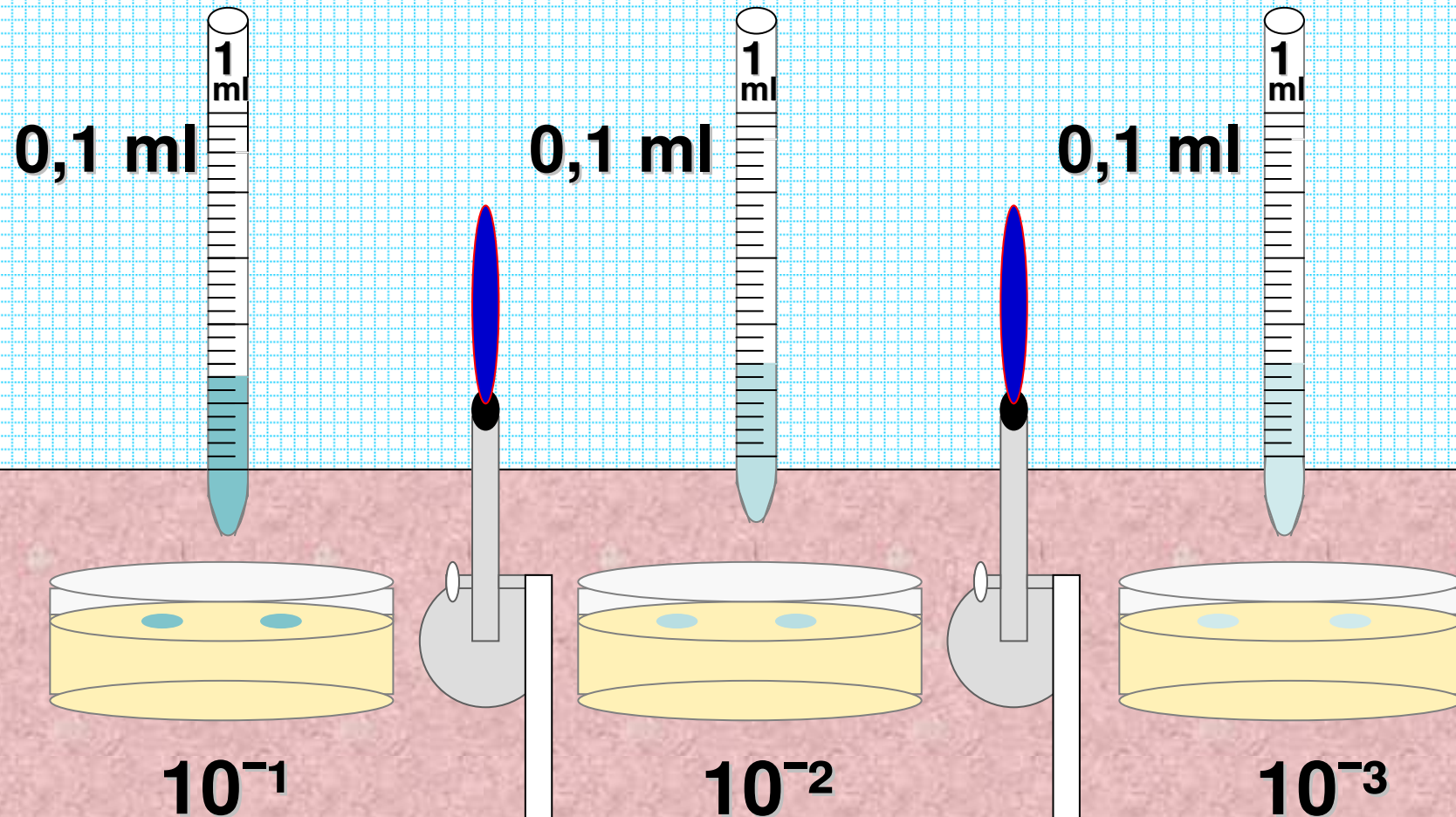
Ajouter au milieu de base Baird Parker
15 ml de la solution jaune d'œuf
au tellurite de potassium

15 ml

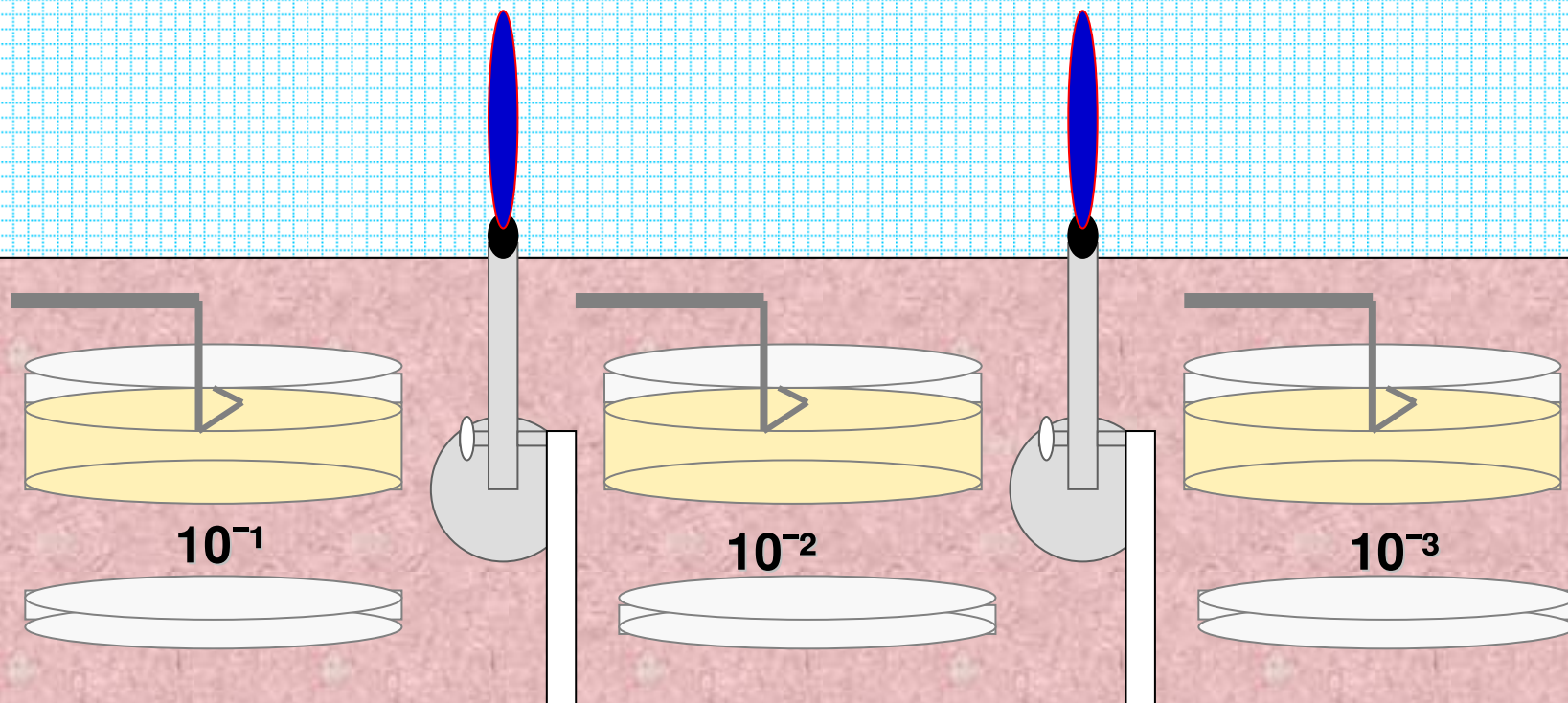


Couler la gélose dans des boîtes de pétri
et conserver à +4°C.

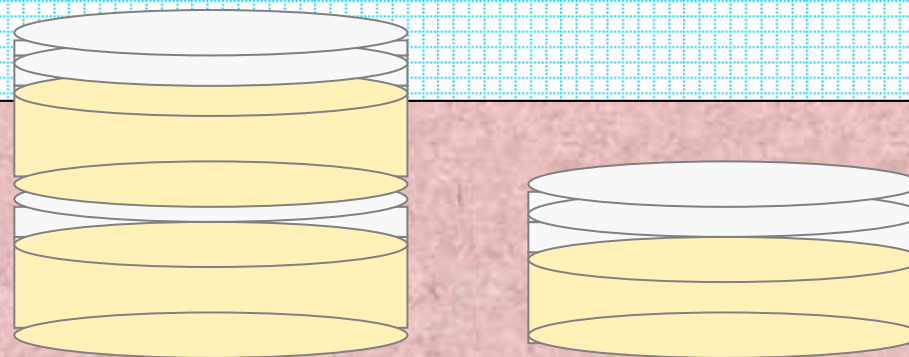
- **Inoculer les boîtes avec 0,1 ml des différentes dilutions**



■ Étaler les gouttes à l'aide d'une pipette râteau



- Incuber les boites de Baird Parker
couvercle en haut 48h \pm 2 à 37°C**



**Incuber 48h \pm 2 à 37°C
1^{ère} lecture 24h \pm 2**

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DES
LEVURES ET MOISSISSURES
DANS LES DENREES
ALIMENTAIRES**

les levures et les moisissures

Ce sont des champignons

les levures:

- la forme unicellulaire est prédominante
- la forme la plus fréquente est ovale ou sphérique

les moisissures:

- Sont des micro-organismes filamenteux qui sont disséminés par l'émission de spores

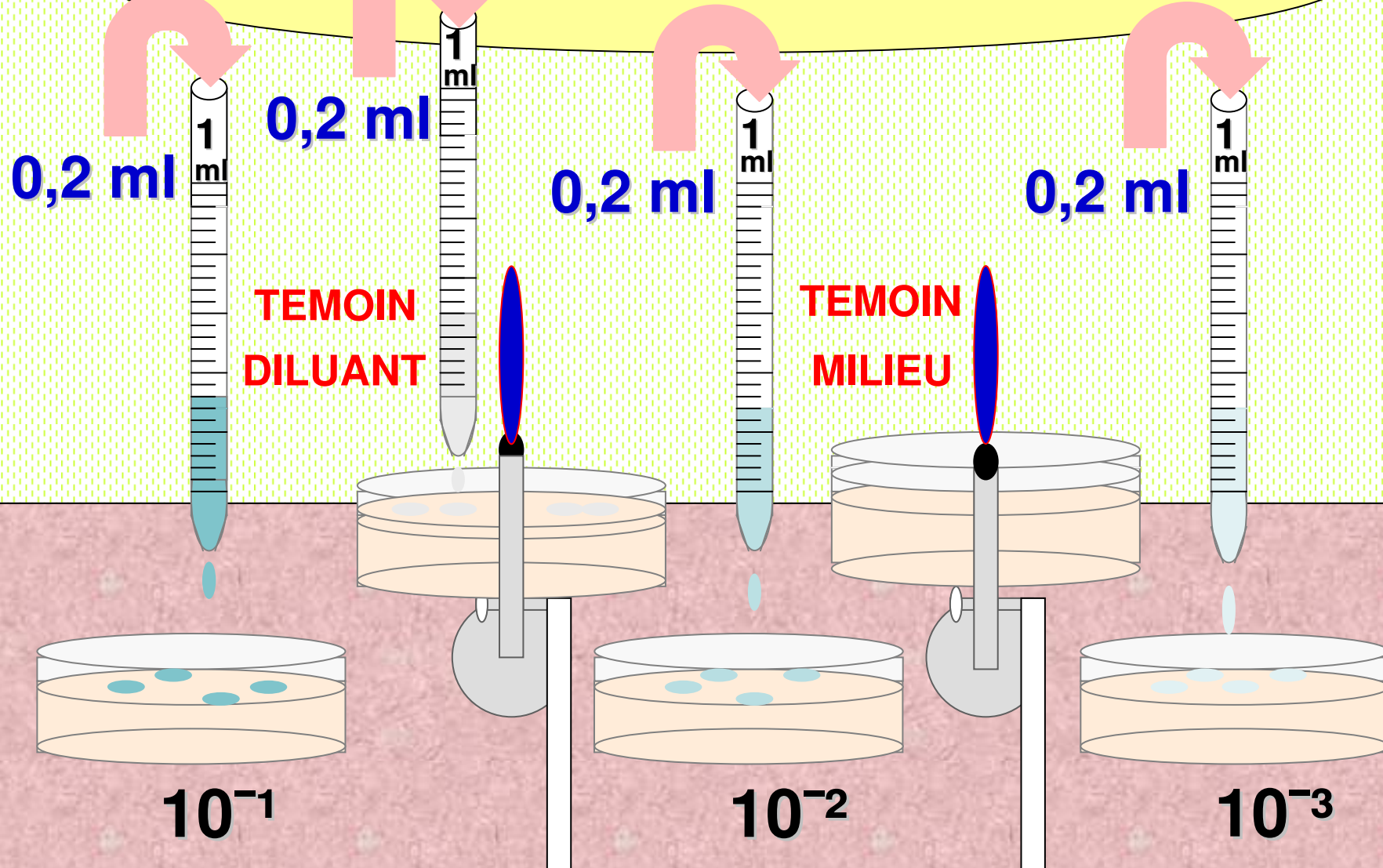
Référentiels

- Norme XP V 08 – 059 relative au dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C.
- Norme NF ISO 7954 relative au dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25 °C.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Milieu utilisé:

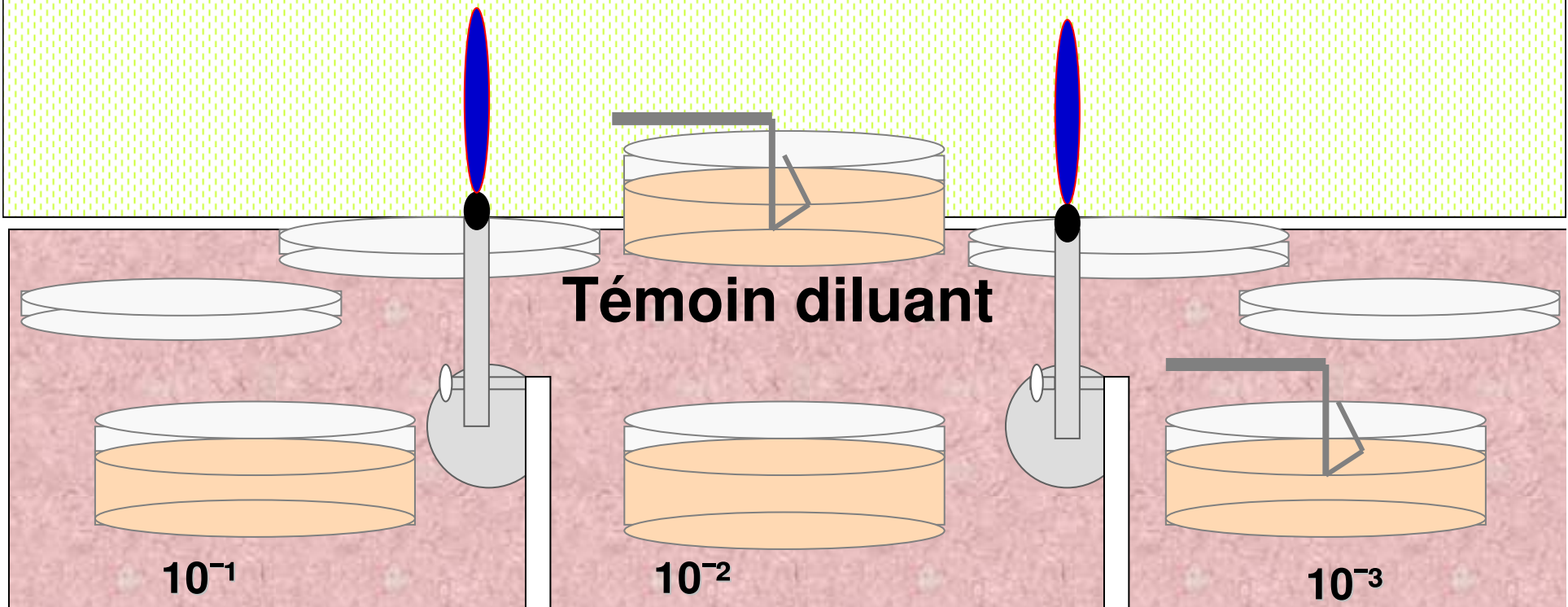
Sabouraud au Chloramphénicol

Ensemencer les boîtes comme l'indique le schéma.

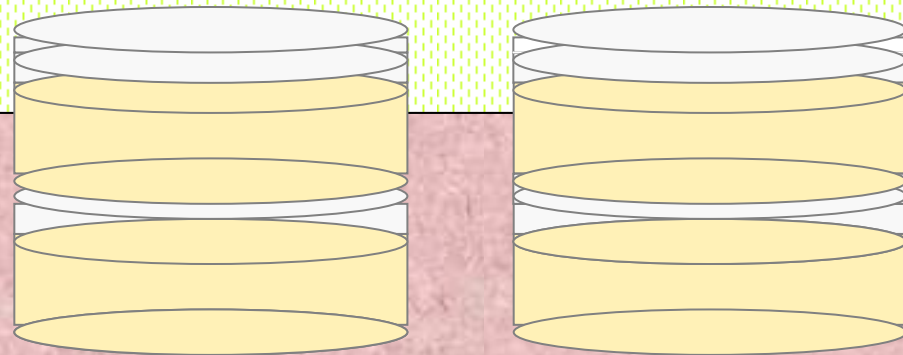


Ne pas ensemer la boîte témoin

- Étaler les gouttes à l'aide
d'une pipette râteau.



- **Incuber les boites de Sabouraud au Chloramphénicol couvercle en haut**
5 jours à 25°C.



Incuber 3 à 5 jours à 25°C
Lecture tous les jours.

**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DES
ANAÉROBIES SULFITO-
RÉDUCTEURS A 37°C
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

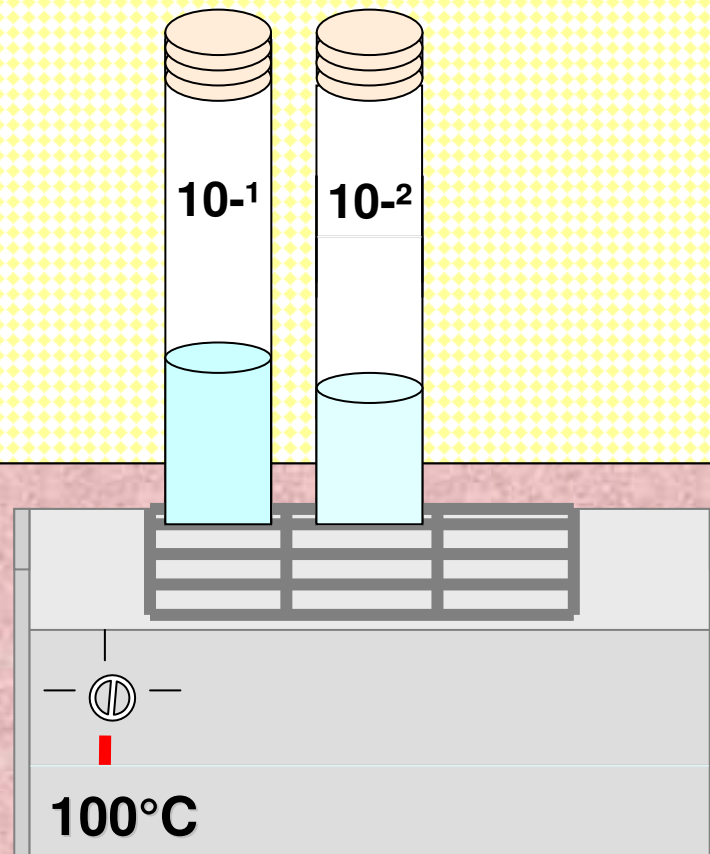
Référentiels

- Norme XP V 08 – 061 relative au dénombrement en anaérobiose des bactéries Sulfito – Réductrices par comptage des colonies à 46 °C. Méthode de routine.
- Norme V 08- 056 relative au dénombrement des Clostridium perfringens par comptage des colonies .
- Norme NF V 08 – 019 relative au dénombrement des Clostridium perfringens par comptage des colonies .
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Milieu utilisé:

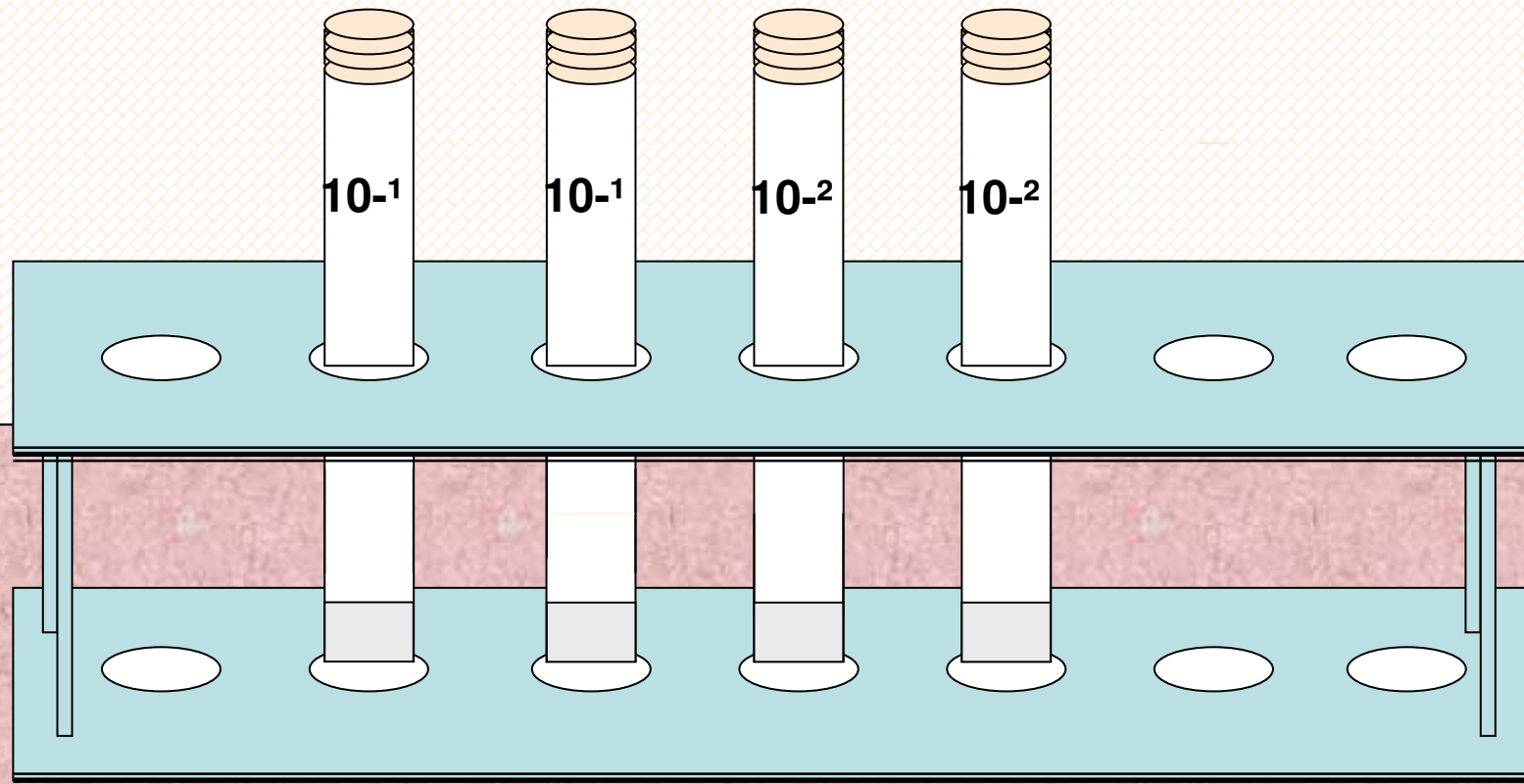
Gélose Viande Foie

- **Chauffer à 100°C pendant 5'; puis refroidir rapidement à l'eau de robinet :**

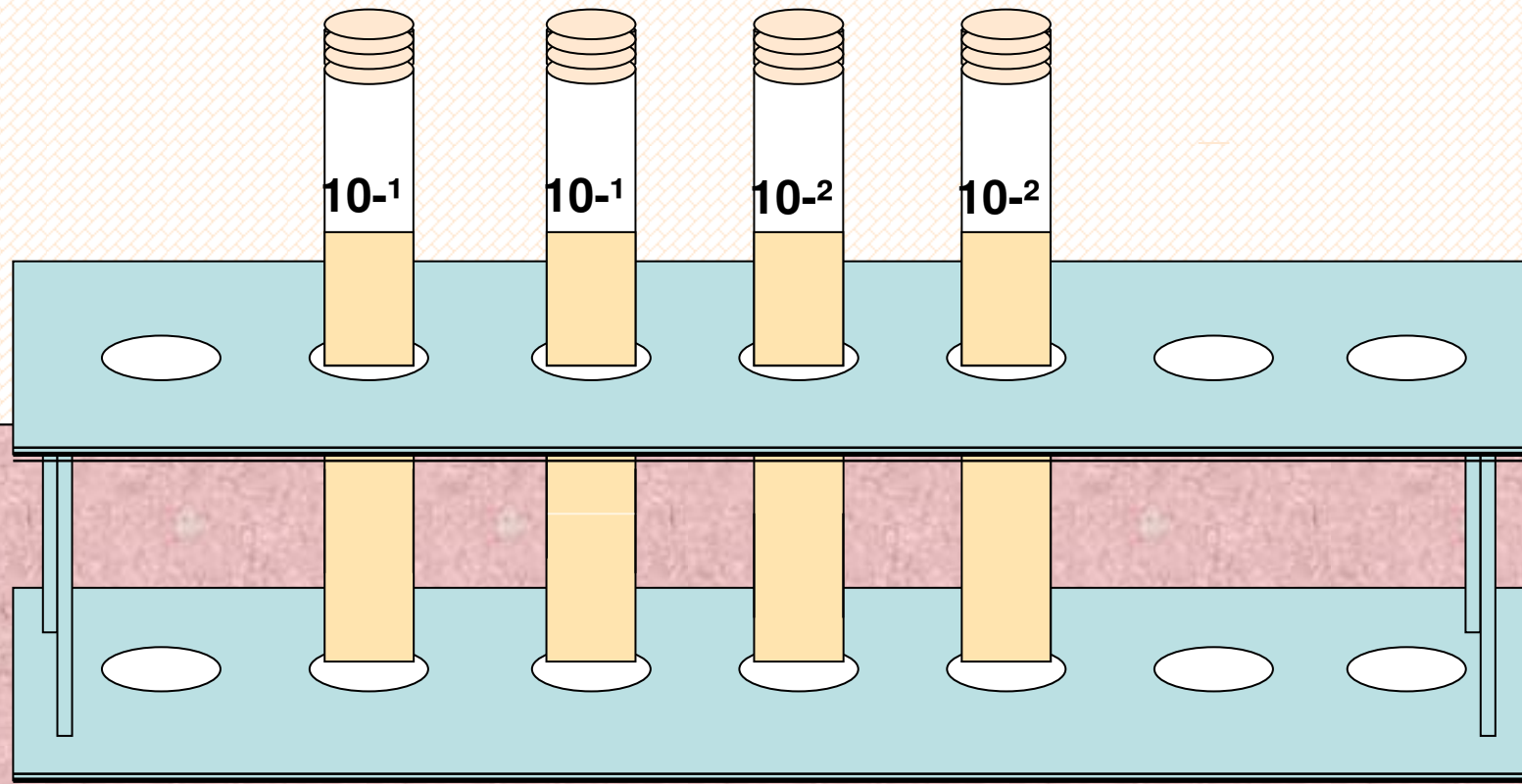


15 mn à 75°C
10 mn à 80°C

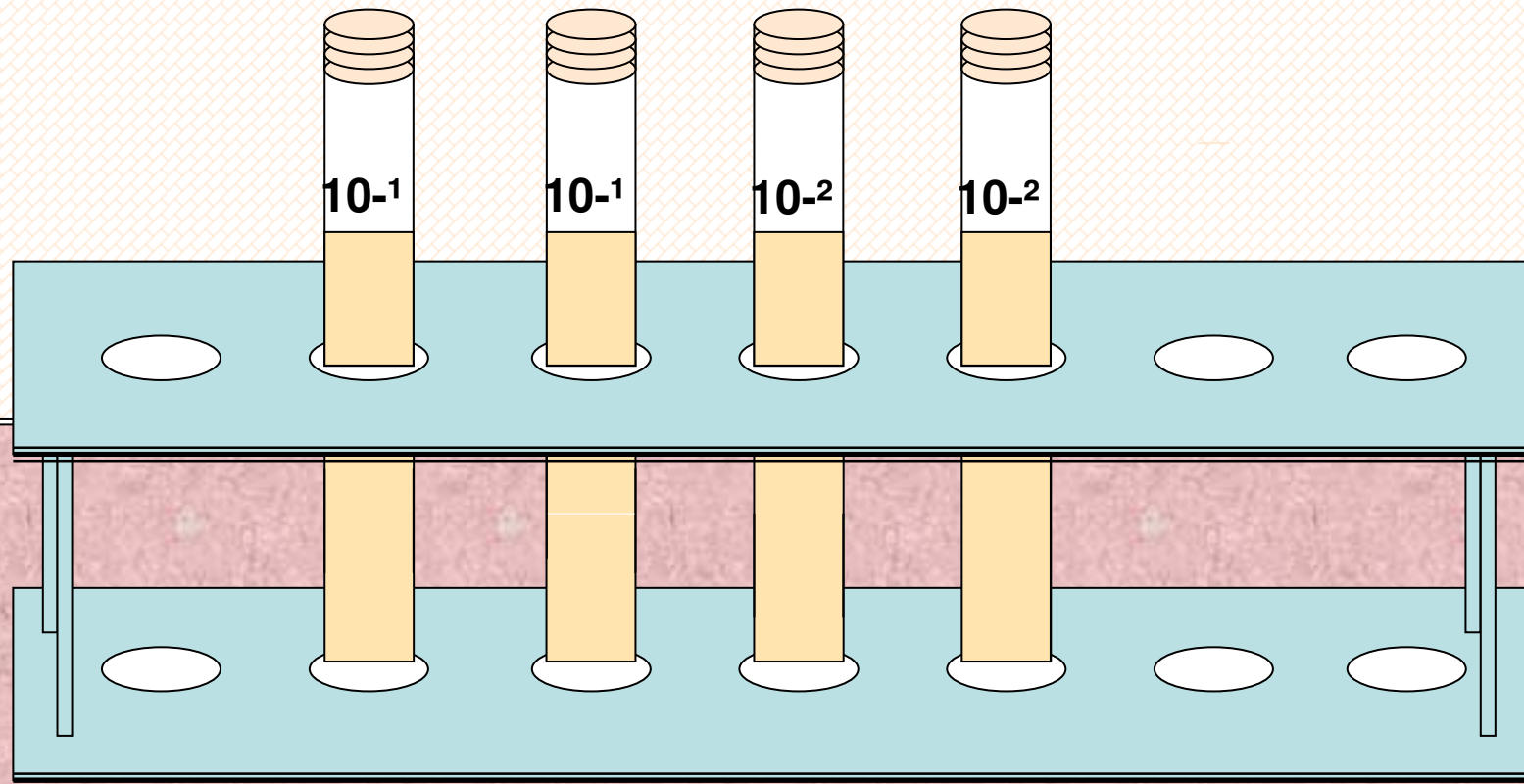
Inoculer les tubes avec 1 ml des différentes dilutions:



**Couler ≈ 15 ml de la gélose VF
additionnée d'1 ampoule de Sulfite de Na
et 1 ampoule d'Alun de Fe:**



**Mélanger doucement par retournement.
Laisser solidifier.**



Incuber 48 h à 37°C

RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

SALMONELLA

Entérobactérie

Bacilles à Gram négatif,

Mobile (ciliature péritriche),

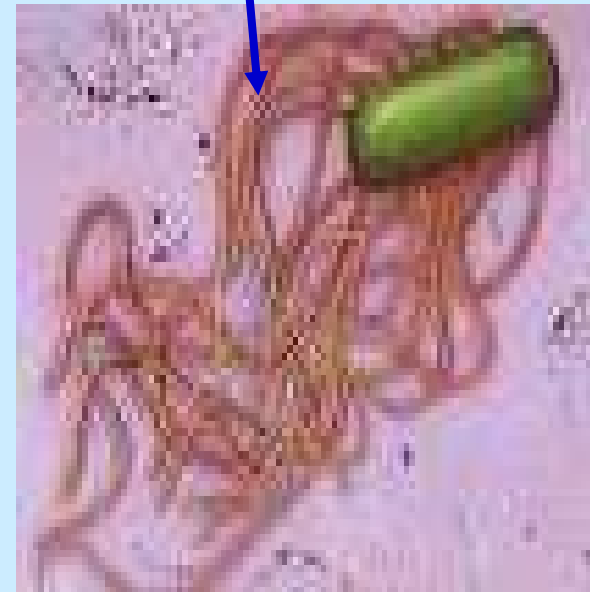
Aéro-anaérobie facultatif,

Oxydase -

Fermentative du glucose,

Lactose –

flagelles



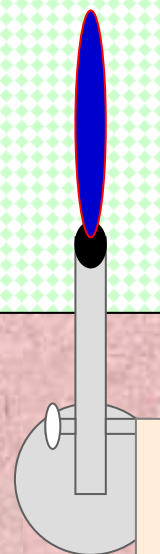
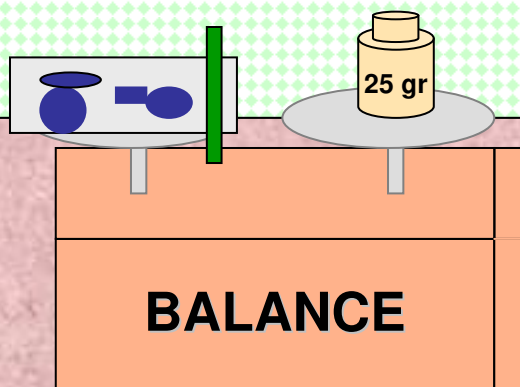
Responsable de toxi-infection alimentaire

Référentiels

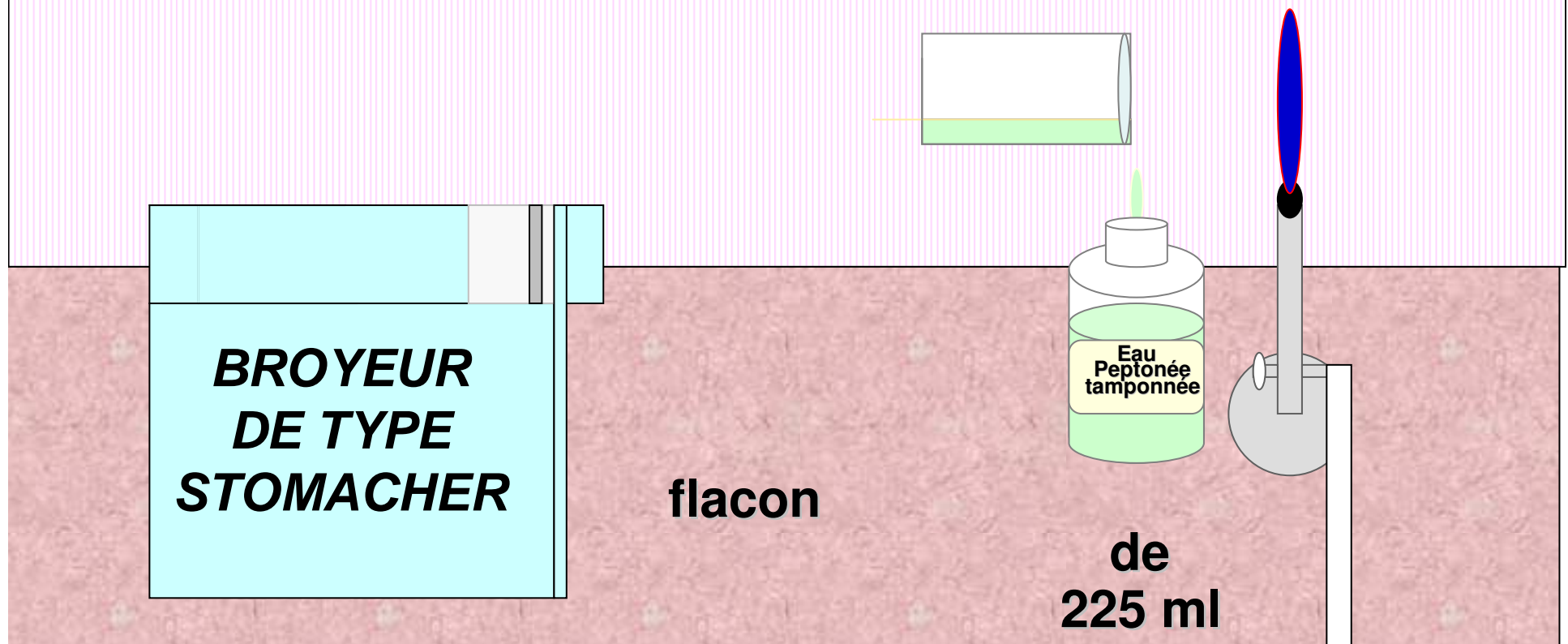
- Norme NF V 08 6- 052 relative à la méthode de routine pour la recherche des Salmonella.
- Norme EN 12824 relative à la recherche des Salmonella.
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

A- Cas de produit solide.

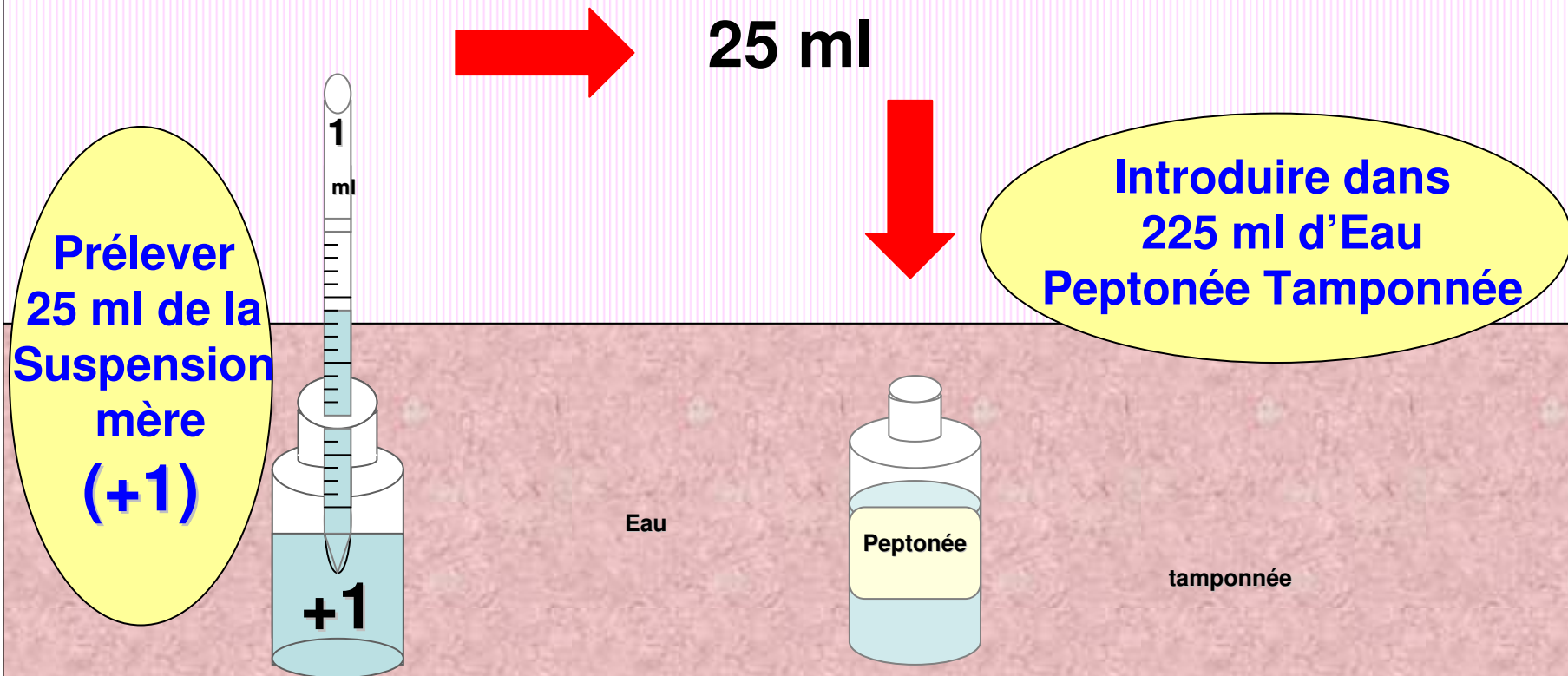
Peser dans un sachet stérile 25 gr du produit à analyser aseptiquement.



- **Verser l'Eau Peptonée Tamponnée dans le sachet stérile contenant 25 gr de produit**
- **Broyer l'aliment.**
- **Verser le contenu dans le flacon d'E.P. Tamponnée.**

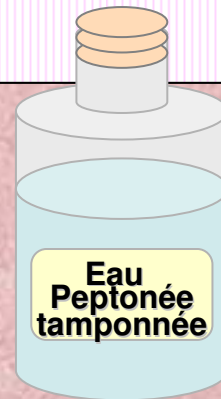


B - Cas de produit liquide.



étape de pré- enrichissement

Incuber la solution ensemencée d'Eau Peptonée Tamponnée



INCUBER 16- 20h à 37°C

2^{ème} JOUR DES TARVAUX PRATIQUES

**RECHERCHE ET
DENOMREMENT DES
MICROORGANISMES PAR
COMPTAGE DES COLONIES
OBTENUES A 30 °C,
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

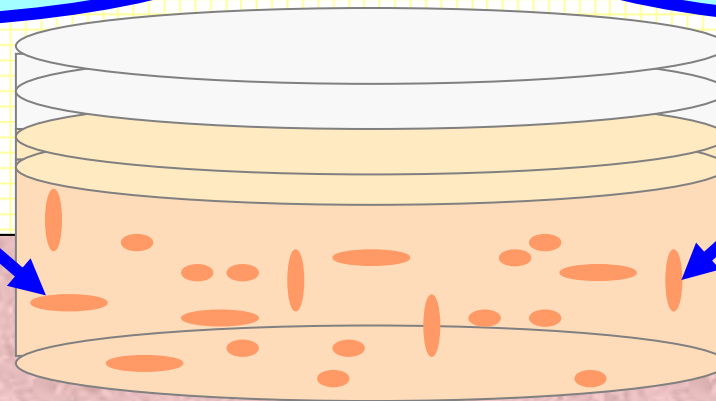
1^{ère} Lecture

24h d'incubation

- ◆ **Dénombrer les colonies de formes lenticulaires qui poussent en masse et noter les dilutions correspondantes.**
- ◆ **Tenir compte des boites ayant un nombre compris entre 15 et 300.**

Germes totaux

Germes totaux



Réincuber à 30°C

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DES
COLIFORMES, COLIFORMES
THERMOTOLERANTS ET
ESCHERICHIA COLI DANS LES
DENREES ALIMENTAIRES**

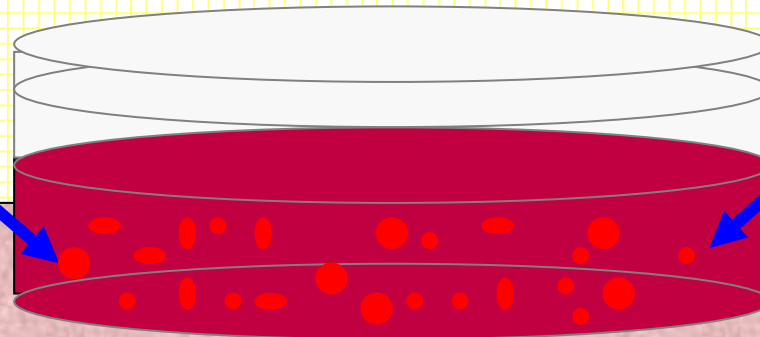
Lecture des coliformes totaux

Gélose VRBL

Dénombrer les colonies rouges qui poussent en masse , noter la dilution correspondante.
Tenir compte des boites ayant un nombre compris entre 15 et 150.

Colonies rouges

Colonies rouges



Lecture et interprétation:

Retenir 2 dilutions successives (plus fortes dilutions) où le nombre de colonies dénombrées soit : $15 \leq c \leq 150$.

Appliquer cette formule:

$$N = \frac{\sum c}{1,1 \times d}$$

$\sum c$: $c_1 + c_2$ (c_1 = nombre de colonies de la 1^{ère} dilution et c_2 = nombre de colonies de la 2^{ème} dilution retenues).

d : le taux de dilution de la 1^{ère} boîte retenue.

N = nombre de coliformes totaux / gr ou ml.

Lecture et interprétation

Cas d'une seule boîte positive où $C > 30$:

$$N = \frac{C}{D} = \text{nombre de coliformes totaux ou coliformes fécaux / gr ou ml}$$

D : - taux de dilution de la suspension mère

(produits solide)

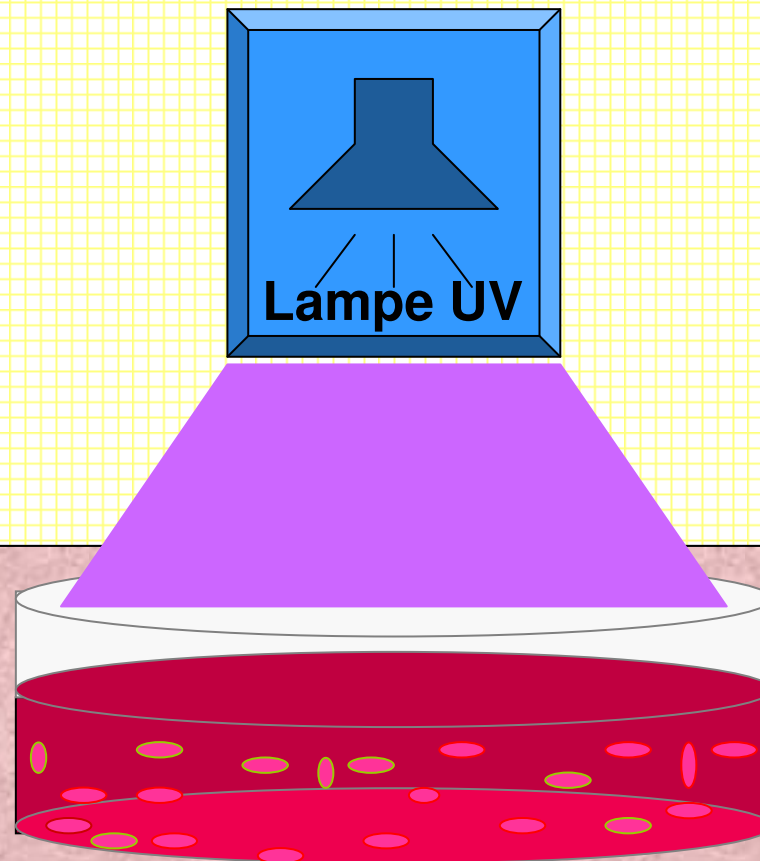
- Inverse de la 1^{ère} dilution

(produit liquide)

Lecture des coliformes **totaux et fécaux**

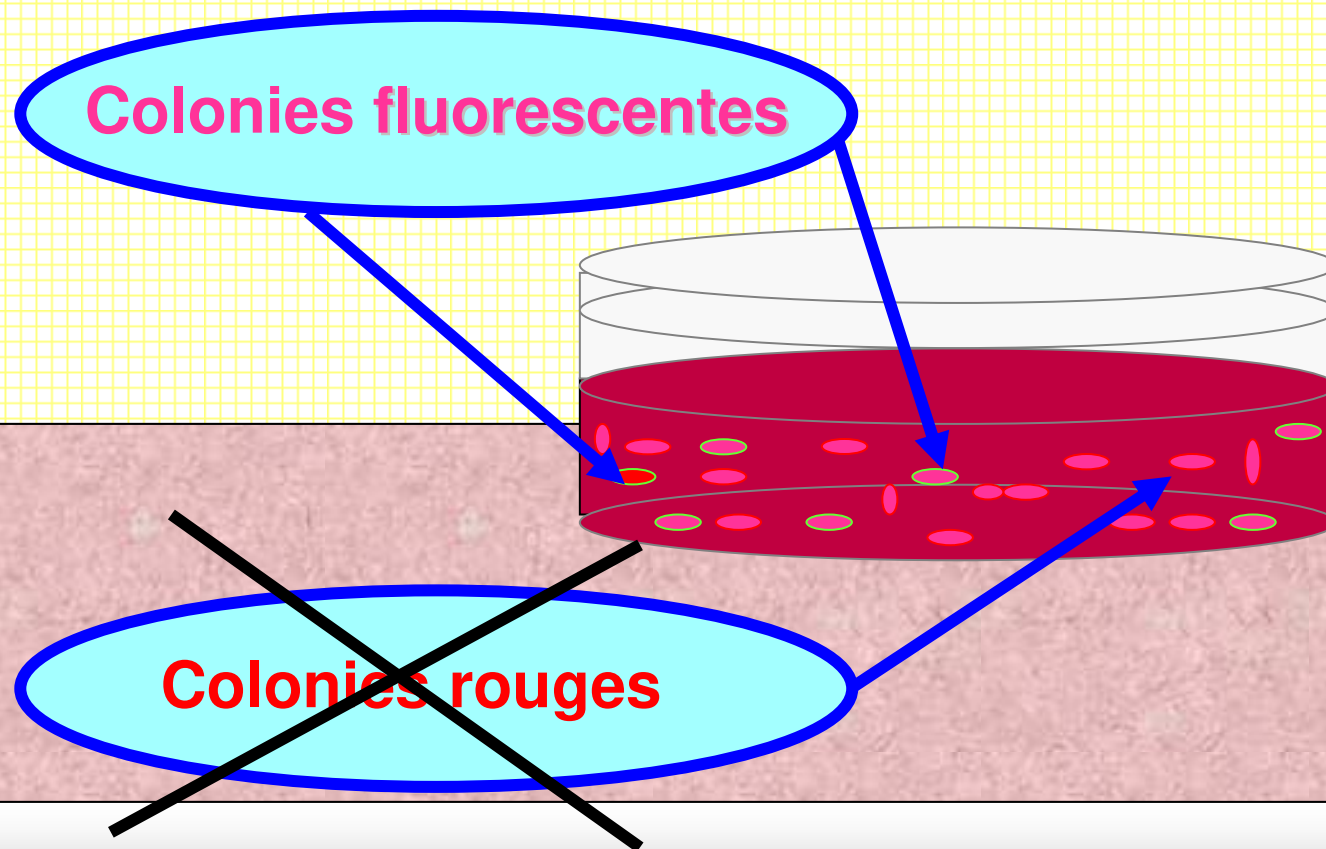
Gélose désoxycholate 1%.
(produits laitiers)

- ◆ **Exposer la boîte sous radiation UV**
- ◆ **Lecture immédiate dans une chambre noire**
- ◆ **Dénombrer les colonies fluorescentes**



Dénombrer les colonies rouges fluorescentes
qui poussent en masse , noter les dilutions et
les températures correspondantes.

Tenir compte des boites ayant un nombre
compris entre 15 et 150.



Lecture et interprétation:

Retenir 2 dilutions successives (plus fortes dilutions) où le nombre de colonies dénombrées soit : **$15 \leq c \leq 150$** .

Appliquer cette formule:

$$N = \frac{\sum C}{1,1 \times d}$$

$\sum C$: $c_1 + c_2$ (c_1 = nombre de colonies de la 1^{ère} dilution et c_2 = nombre de colonies de la 2^{ème} dilution).

d : le taux de dilution de la 1^{ère} boîte retenue.

N = nombre de coliformes totaux
ou coliformes fécaux / gr ou ml

Lecture et interprétation

Cas d'une seule boîte positive où $C > 30$:

$$N = \frac{C}{D} = \text{nombre de coliformes totaux ou coliformes fécaux / gr ou ml}$$

D : - taux de dilution de la suspension mère

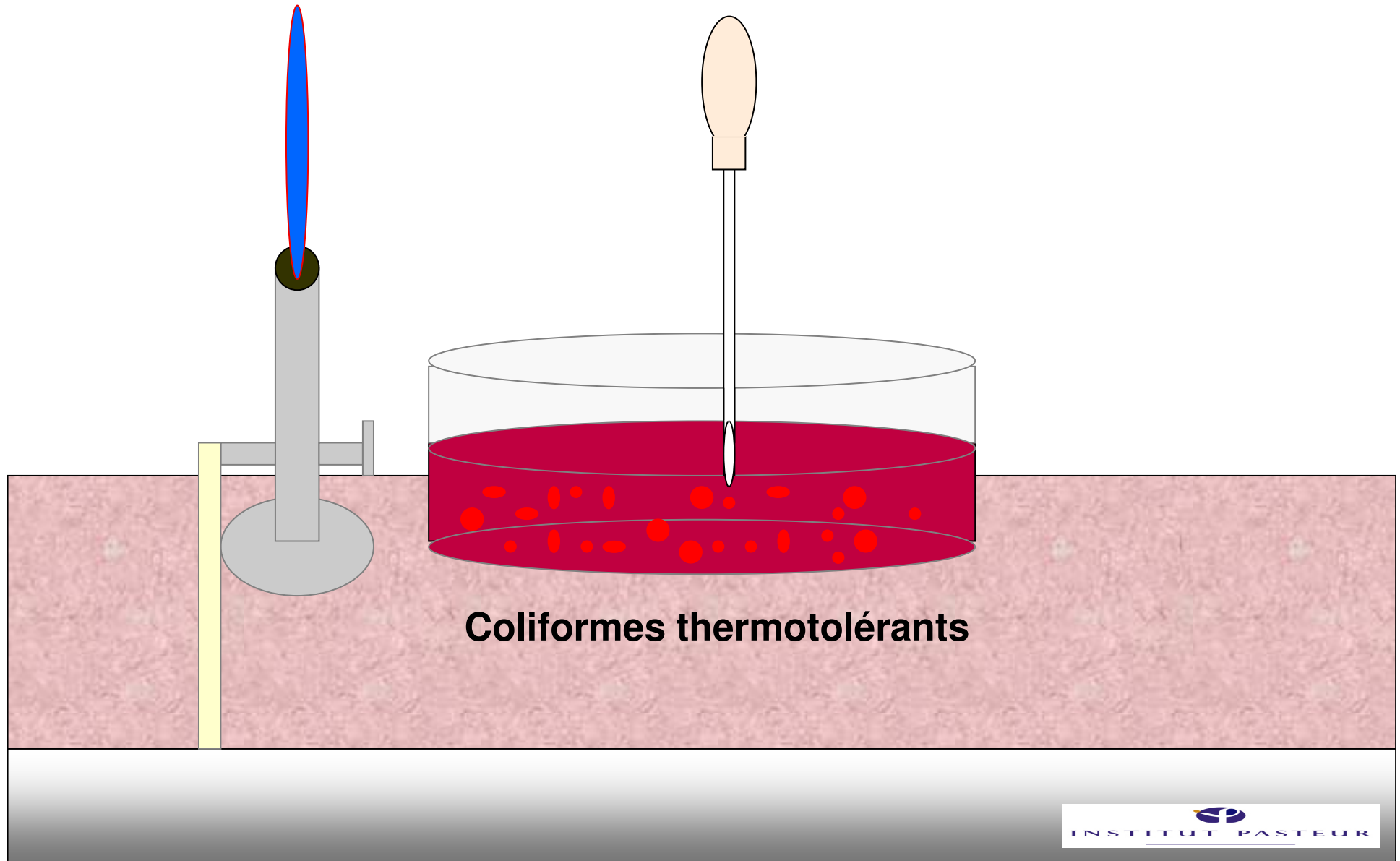
(produits solide)

- Inverse de la 1^{ère} dilution

(produit liquide)

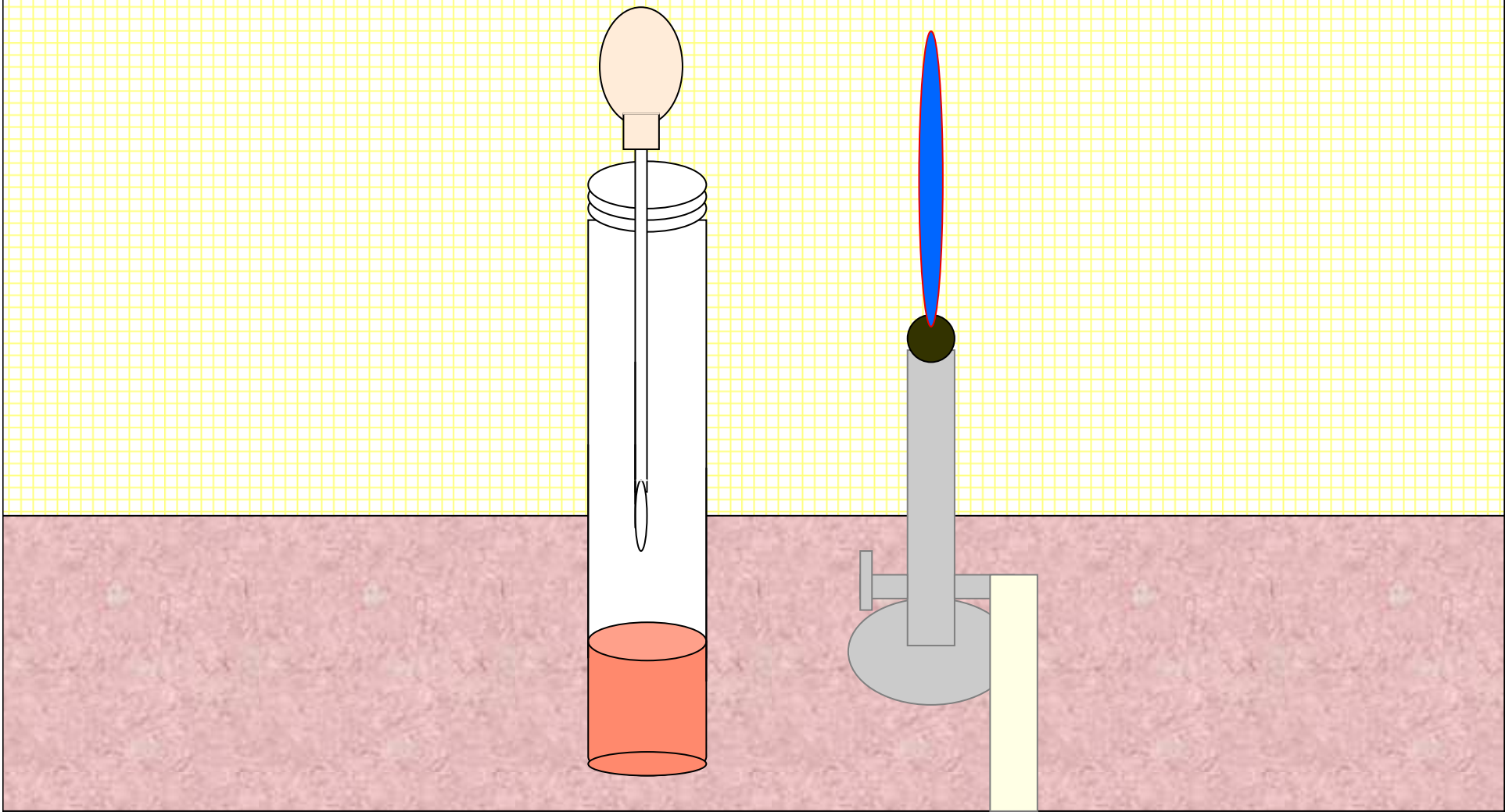
Recherche et dénombrement d'Eschérichia Coli

Repiquer 3 à 5 colonies caractéristiques sur le milieu Urée Indole



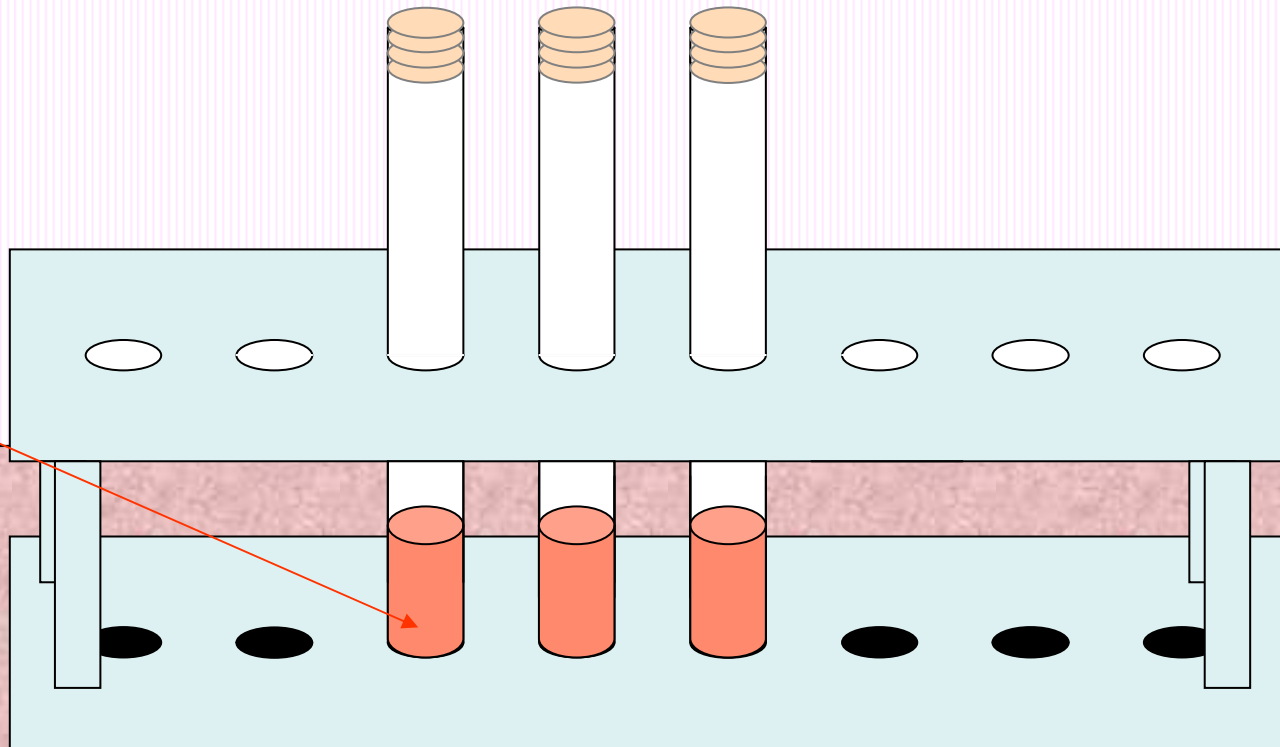
Coliformes thermotolérants

Ensemencer le milieu Urée Indole.



Incuber le milieu Urée Indole ensemencé 24 h à 37°C

UREE



**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

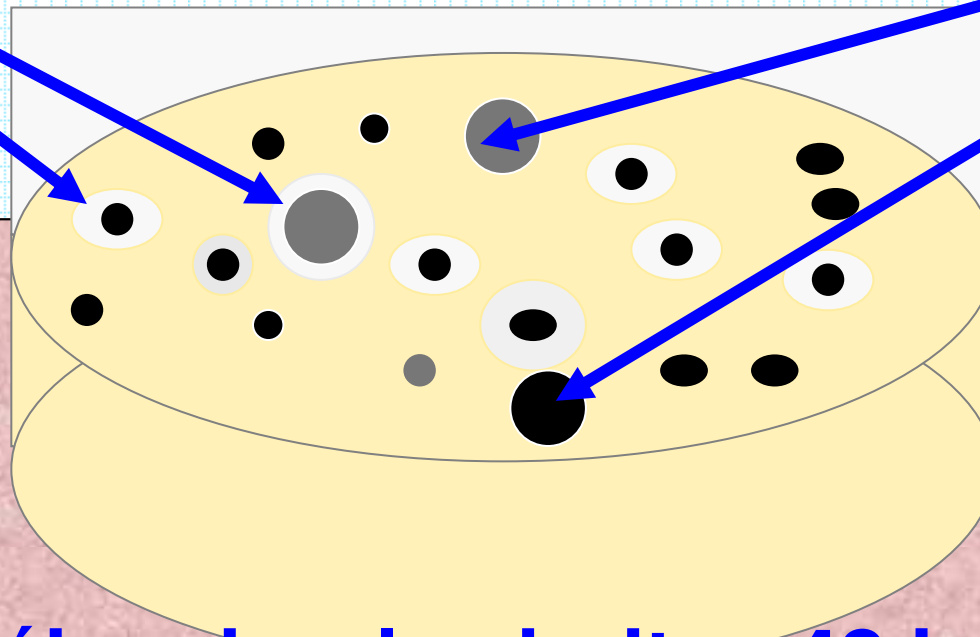
Lecture des staphylocoques

1^{ère} lecture

**Dénombrer les colonies caractéristiques
et non caractéristiques et noter les
dilutions correspondantes**

Colonies
caractéristiques (halo)

Colonies non
caractéristiques



réincuber les boîtes 48 h

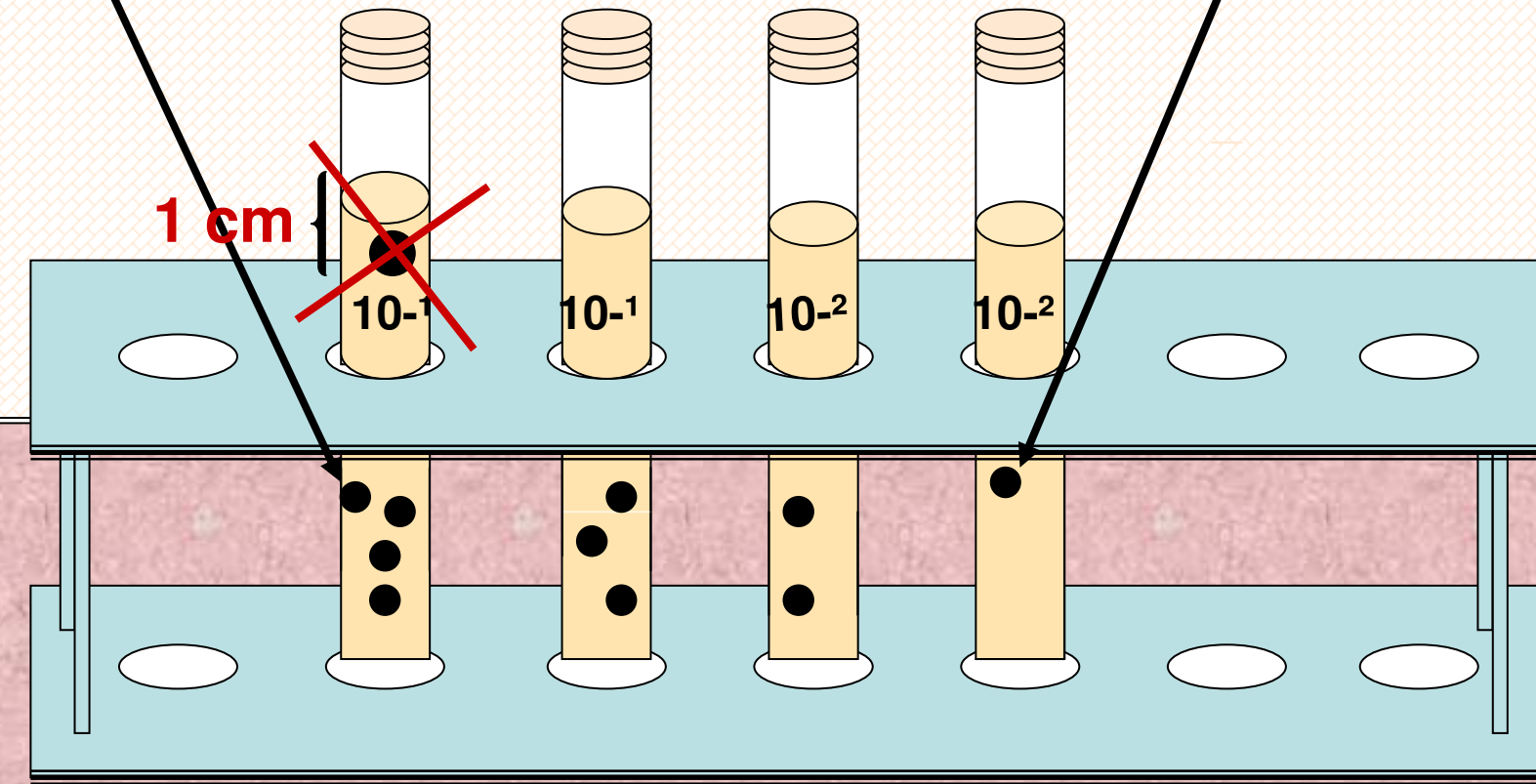
**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DES
ANAÉROBIES SULFITO-
RÉDUCTEURS A 37°C
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

Lecture des ASR

1^{ère} lecture

16h d'incubation

Dénombrer les colonies qui poussent en profondeur

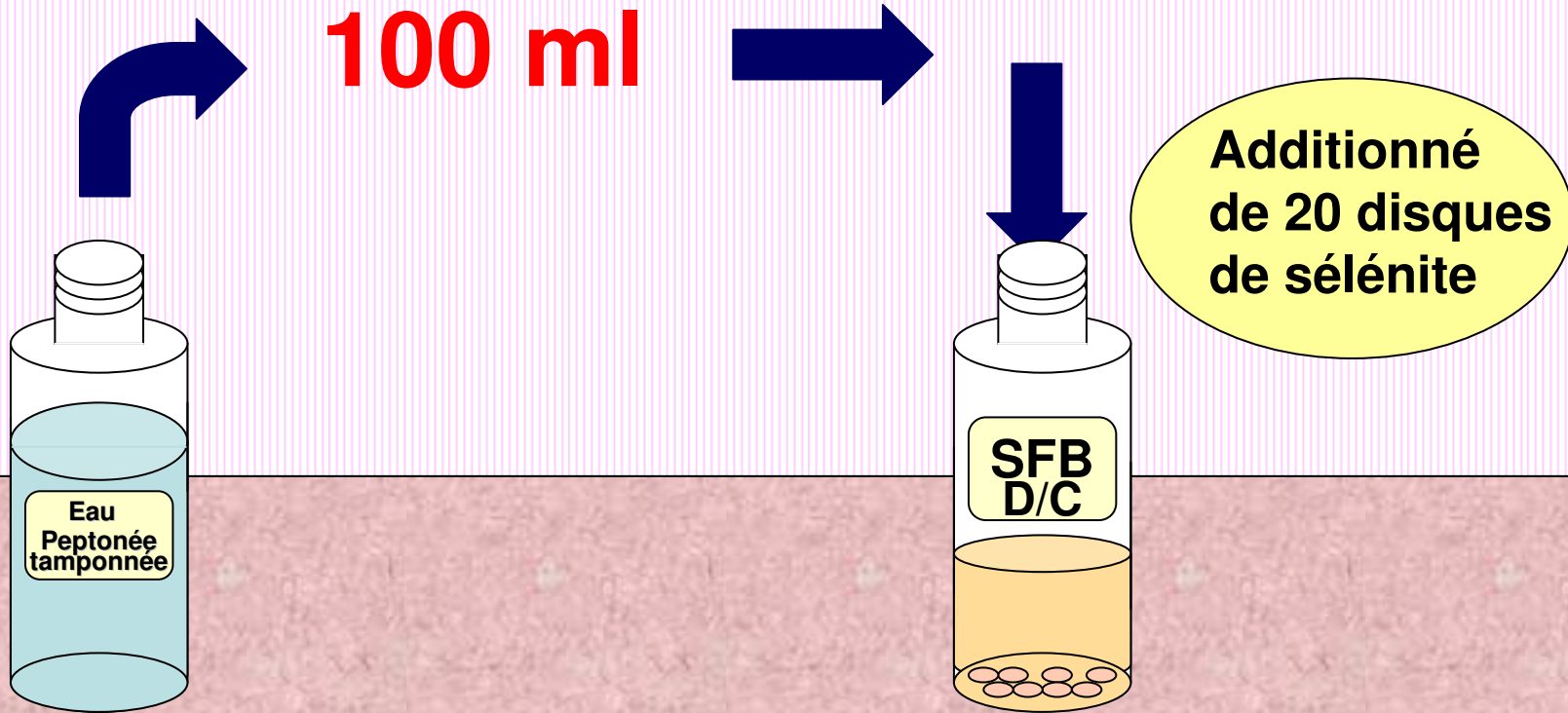


réincuber 48 h à 37°C

RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

étape d'enrichissement

ENSEMENCER UN BOUILLON SFB:



Flacon d'Eau Peptonée
pré enrichie

Incuber 18 à 24h à
37 °C

3^{ème} JOUR DES TARVAUX PRATIQUES

**RECHERCHE ET
DENOMREMENT DES
MICROORGANISMES PAR
COMPTAGE DES COLONIES
OBTENUES A 30 °C,
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

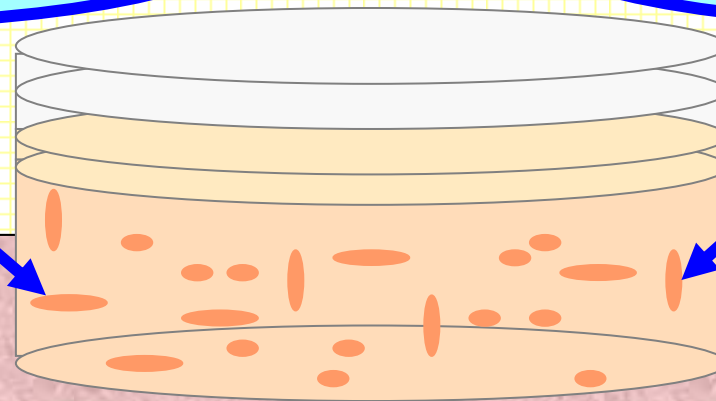
2^{ème} Lecture

48h d'incubation

- ◆ **Dénombrer les colonies de formes lenticulaires qui poussent en masse et noter les dilutions correspondantes.**
- ◆ **Tenir compte des boites ayant un nombre compris entre 15 et 300.**

Germes totaux

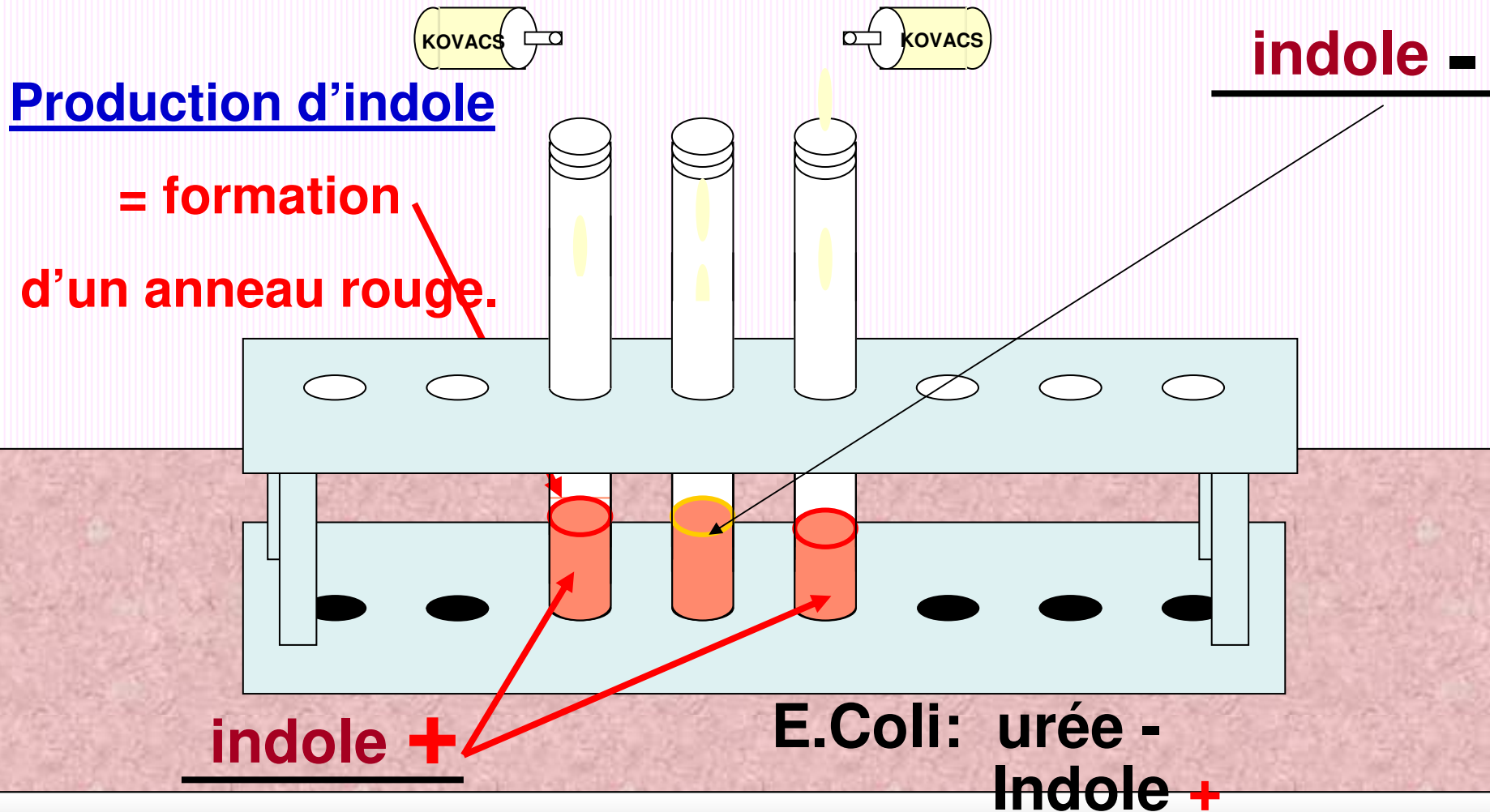
Germes totaux



Réincuber à 30°C

Lecture des coliformes fécaux(E. coli)

Lecture du milieu Urée Indole



Lecture et interprétation.

Formule: $a = \frac{b \times c}{A}$

- ✦ **b** : Nombre de colonies caractéristiques indole ✦
- ✦ **c** : Nombre total de colonies caractéristiques sur la
boite.
- ✦ **A** : Nombre de colonies caractéristiques repiqués.
- ✦ **a** : Nombre d'Escherichia Coli identifiés par boite.

Retenir 2 dilutions successives
(plus fortes dilutions) où le nombre
de colonies dénombrées soit :

$$15 \leq c \leq 150.$$

Appliquer cette formule:

$$N = \frac{\sum a}{1,1 \times d}$$

$\sum a =$ Nombre d'Escherichia Coli identifiés.

d : le taux de dilution correspondant à la 1ère
dilution retenue.

N = nombre d'Escherichia Coli /gr ou
ml.

**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

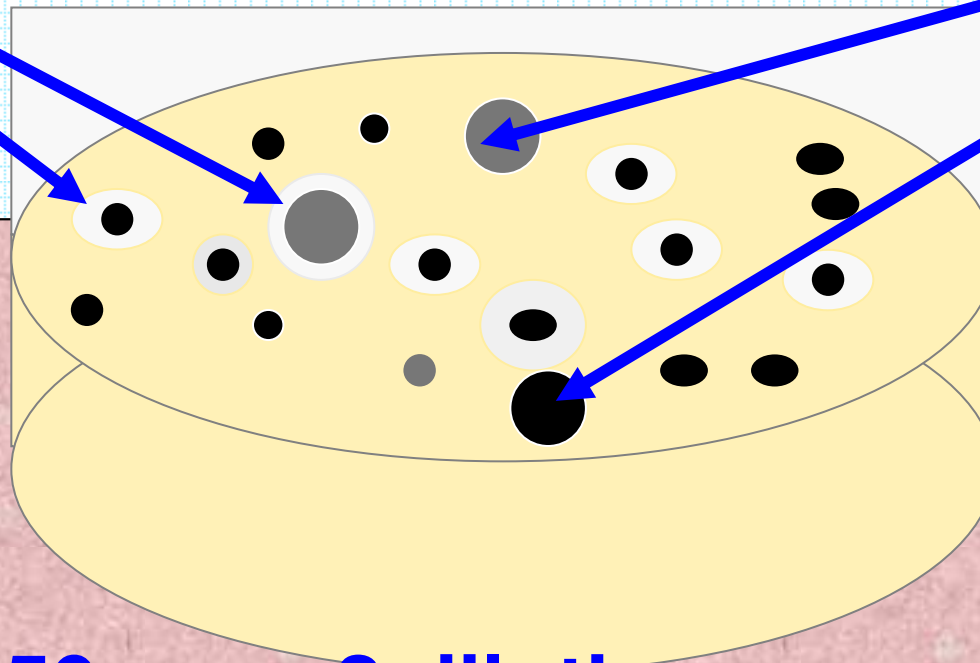
Lecture et identification des staphylocoques pathogènes

- 2^{ème} lecture 48h
- tests de confirmation

**Dénombrer les colonies caractéristiques
et non caractéristiques et noter les
dilutions correspondantes**

Colonies
caractéristiques (halo)

Colonies non
caractéristiques

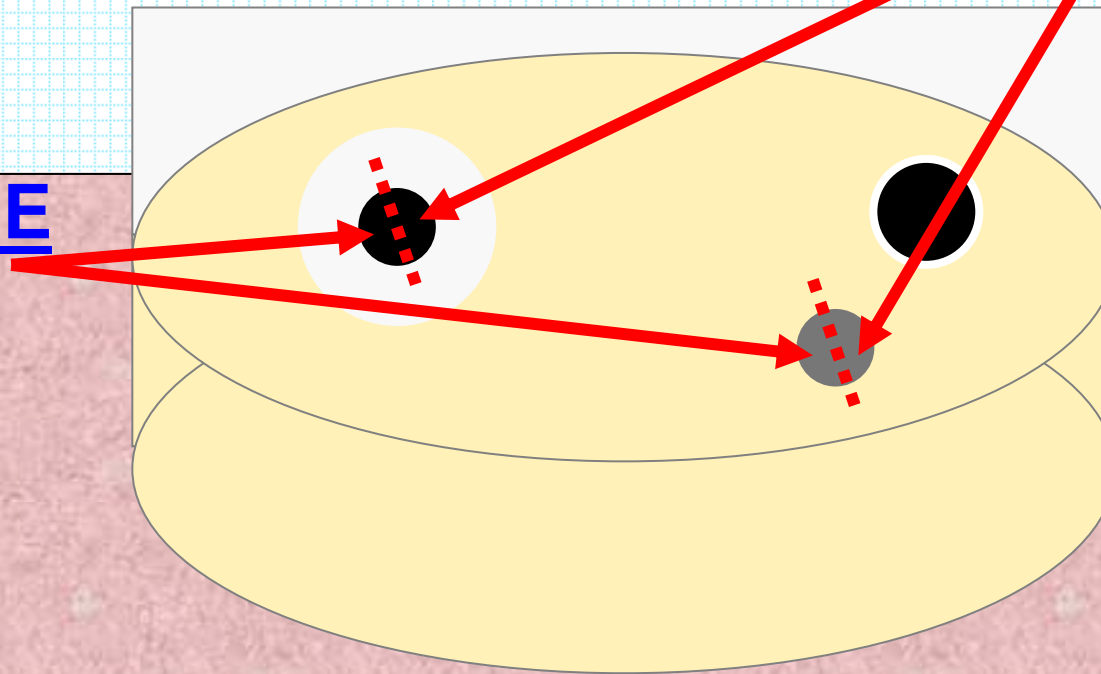


$15 \leq X \leq 150$ pour 2 dilutions successives.

Recherche de la catalase puis de la coagulase

CATALASE

COAGULASE

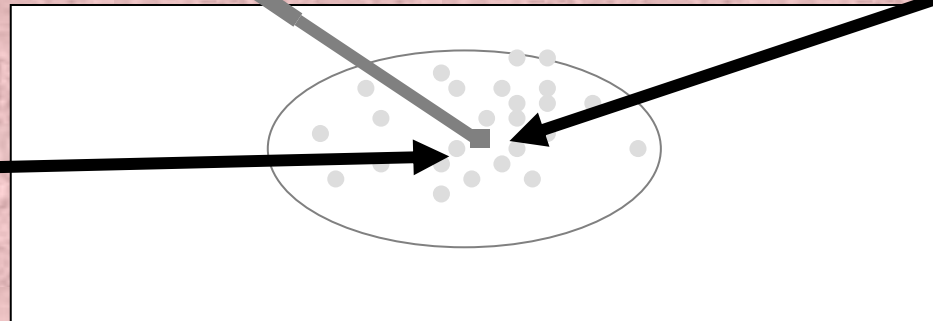


Réaction de la catalase:

Pipette Pasteur.

Déposer 1
goutte d'H₂O₂
20V

Déposer une
partie de la
colonie



Apparition de bulles d'air.

— Observation à l'oeil nu ou
au microscope.

Réaction de la coagulase:

a- ensemencer un bouillon cœur cerveau.



Incuber 20-24h à 37°C

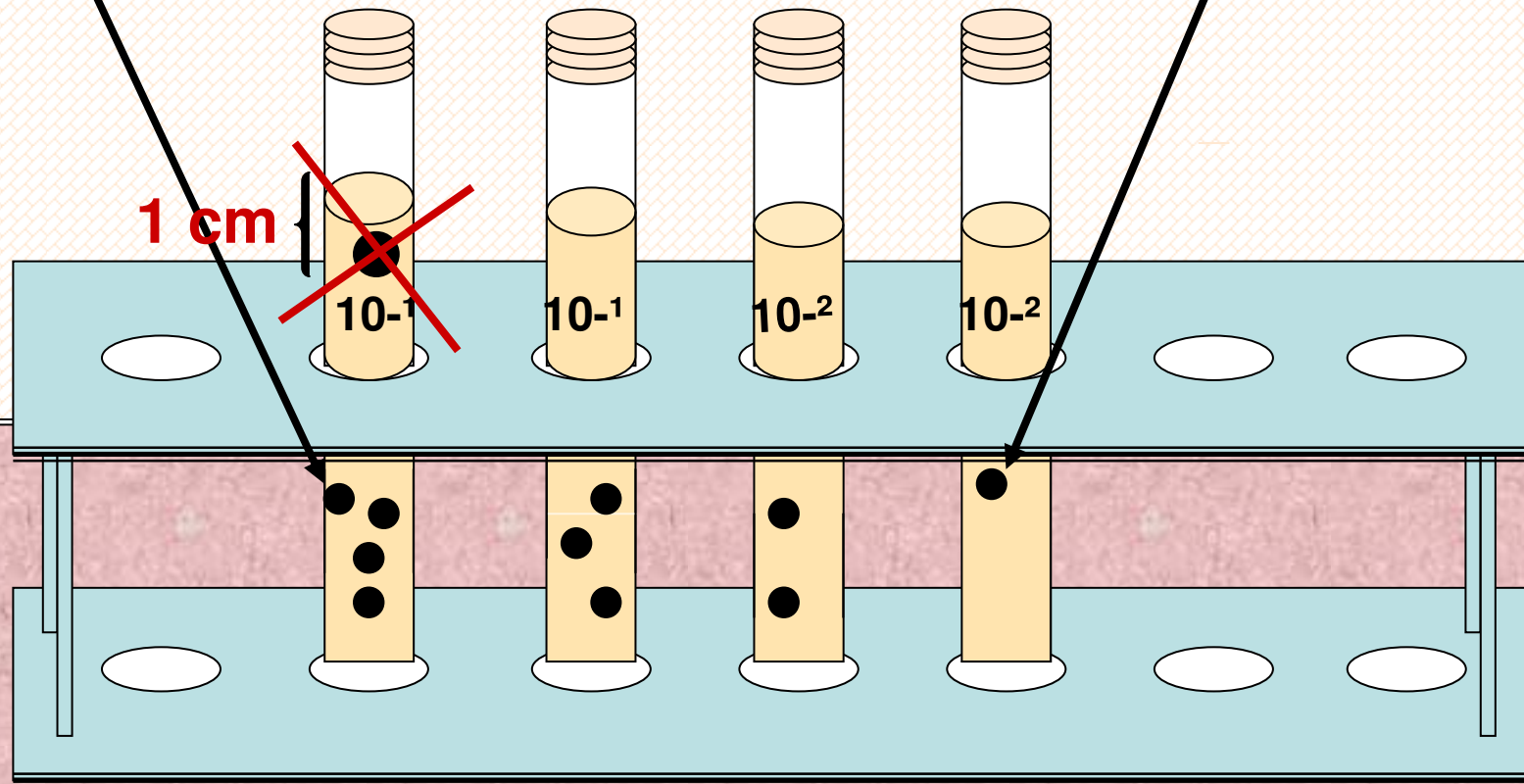
**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DES
ANAÉROBIES SULFITO-
RÉDUCTEURS A 37°C
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

Lecture des ASR

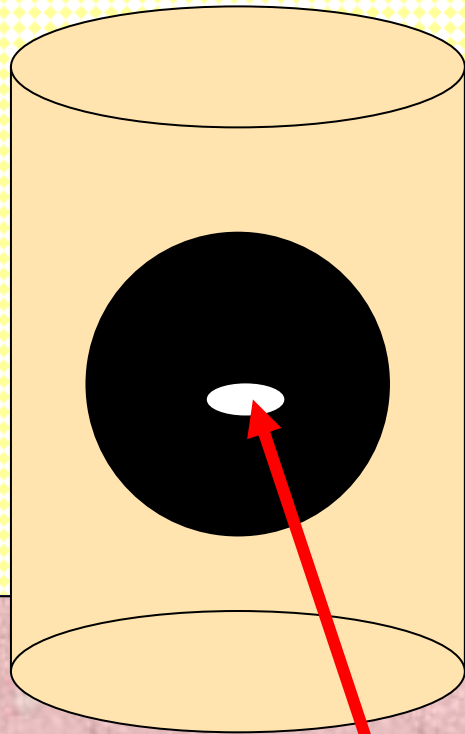
2^{ème} lecture

48h d'incubation

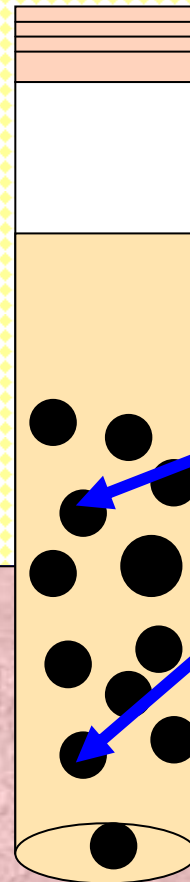
Dénombrer les colonies noires qui poussent en profondeur



**Dénombrer les colonies caractéristiques
de couleurs noires
et de 5 mm de diamètre**



colonie



ASR

RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

Recherche des Salmonella

étape d'isolement

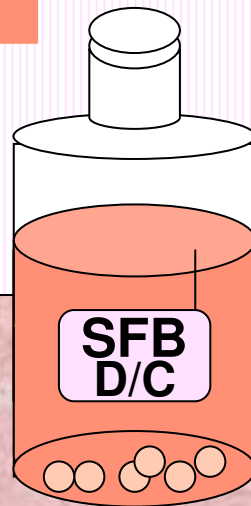
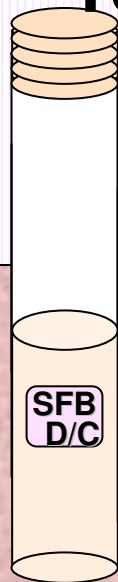
gélose hektoen

Isoler par des stries :

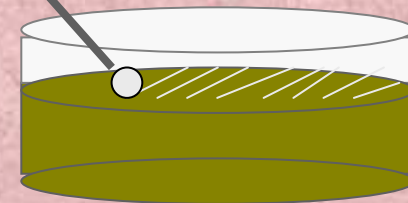
Ensemencer une boîte de gélose Hektoen à partir du bouillon SFB

Additionné
de 2 disques
de sélénite

10 ml



Anse de platine



Incuber 18- 24h à 37°C

18-24 h à 37°C

4^{ème} JOUR DES TARVAUX PRATIQUES

**RECHERCHE ET
DENOMREMENT DES
MICROORGANISMES PAR
COMPTAGE DES COLONIES
OBTENUES A 30 °C,
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

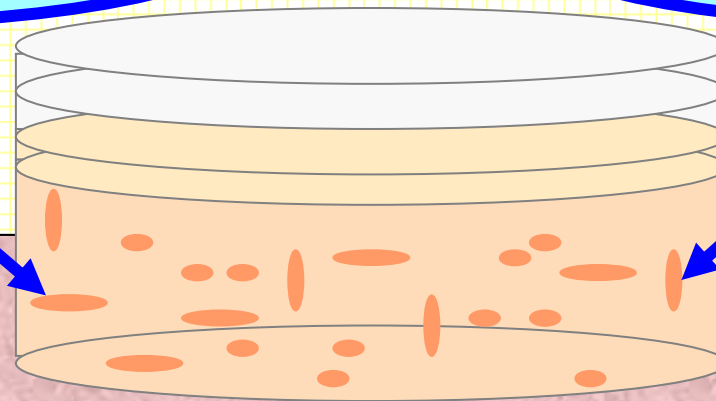
3^{ème} Lecture

72h d'incubation

- ◆ **Dénombrer les colonies de formes lenticulaires qui poussent en masse et noter les dilutions correspondantes.**
- ◆ **Tenir compte des boites ayant un nombre compris entre 15 et 300.**

Germes totaux

Germes totaux



Réincuber à 30°C

Lecture et interprétation:

Retenir 2 dilutions successives (plus fortes dilutions) où le nombre de colonies dénombrées soit : $15 \leq c \leq 300$.

Appliquer cette formule:

$$N = \frac{\sum c}{1,1 \times d}$$

$\sum c$: $c_1 + c_2$ (c_1 = nombre de colonies de la 1^{ère} dilution et c_2 = nombre de colonies de la 2^{ème} dilution).

d : le taux de dilution de la 1^{ère} boîte retenue.

N = nombre de
micro-organismes /gr ou ml

Lecture et interprétation

Cas d'une seule boite positive où $C > 30$:

$$N = \frac{C}{D} \quad / \quad \text{gr ou ml}$$

D : - taux de dilution de la suspension mère

(produits solide)

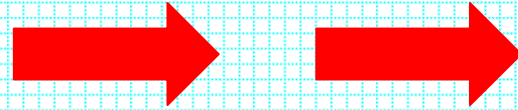
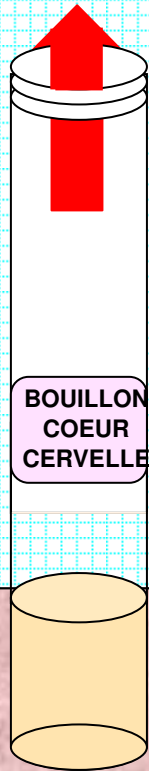
- Inverse de la 1^{ère} dilution

(produit liquide)

Identification des staphylocoques pathogènes

b- recherche de la coagulase libre:

0,1 ml



Plasma de
lapin

0,3 ml

Incuber 24h à 37°C

1ère lecture après 6h d'incubation.

RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

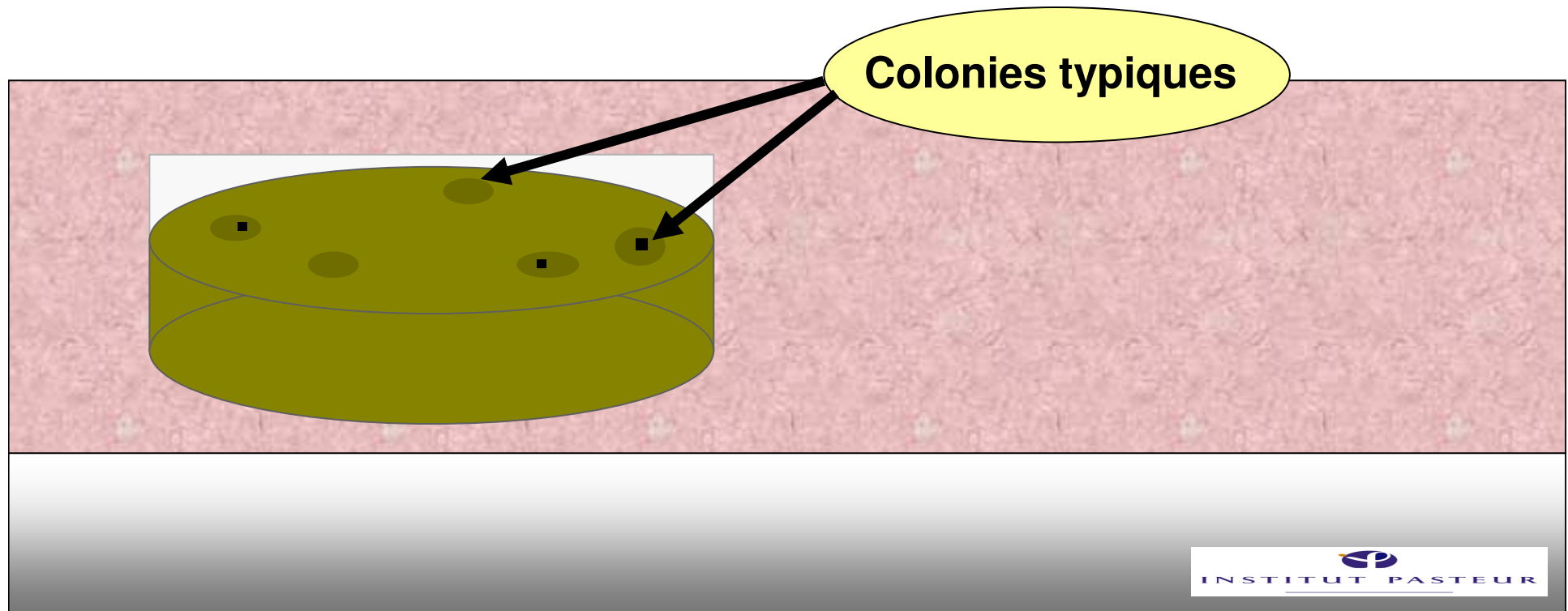
Recherche des Salmonella

étape d'identification

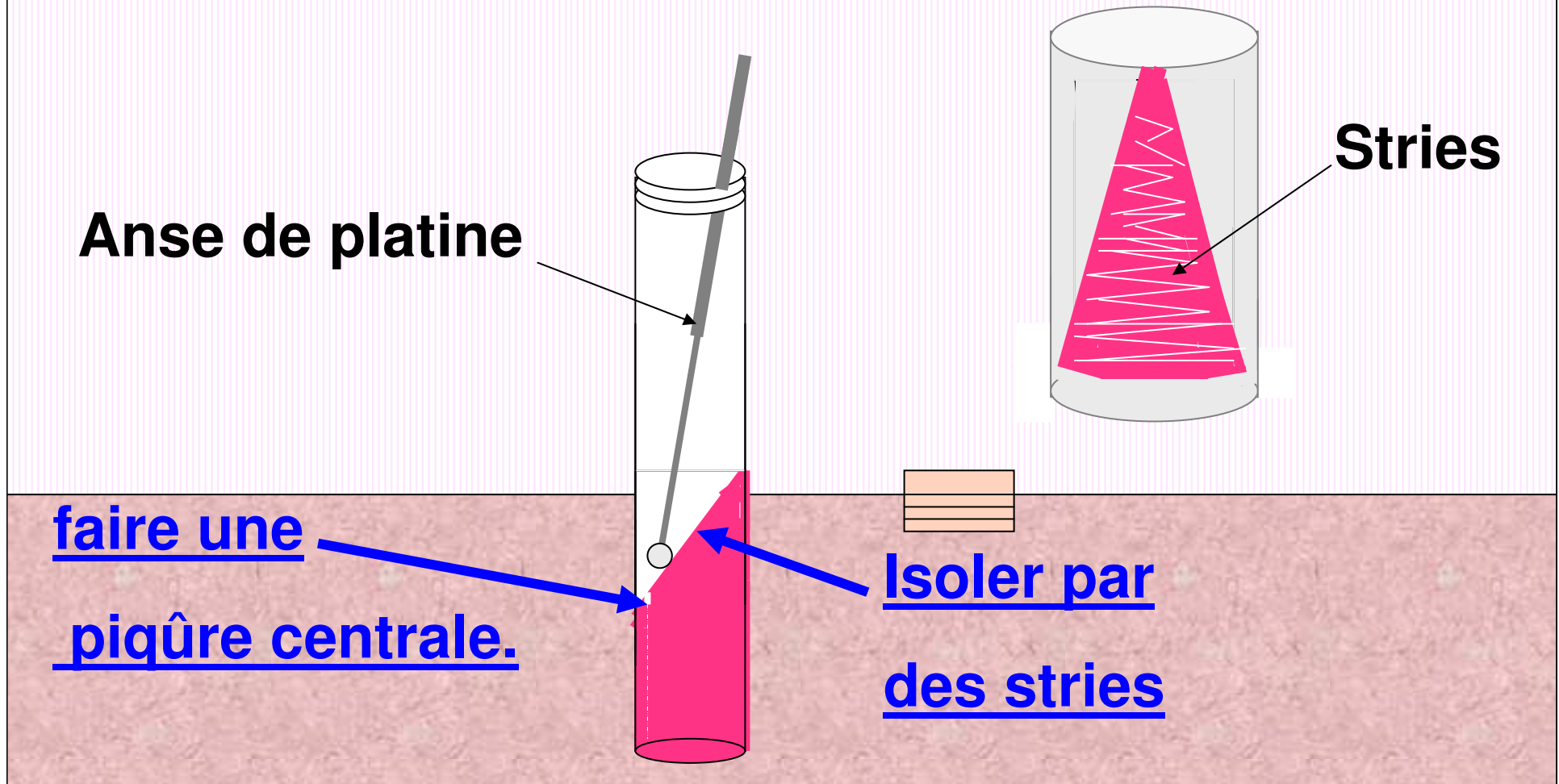
repiquage sur TSI

Lecture de la boîte Hektoen

- Colonies ayant un contour régulier.
- Colonies ayant la couleur du milieu ,parfois avec ou sans centre noir sur la gélose Hektoen.



Repiquer 5 colonies typiques de Salmonella sur le milieu TSI

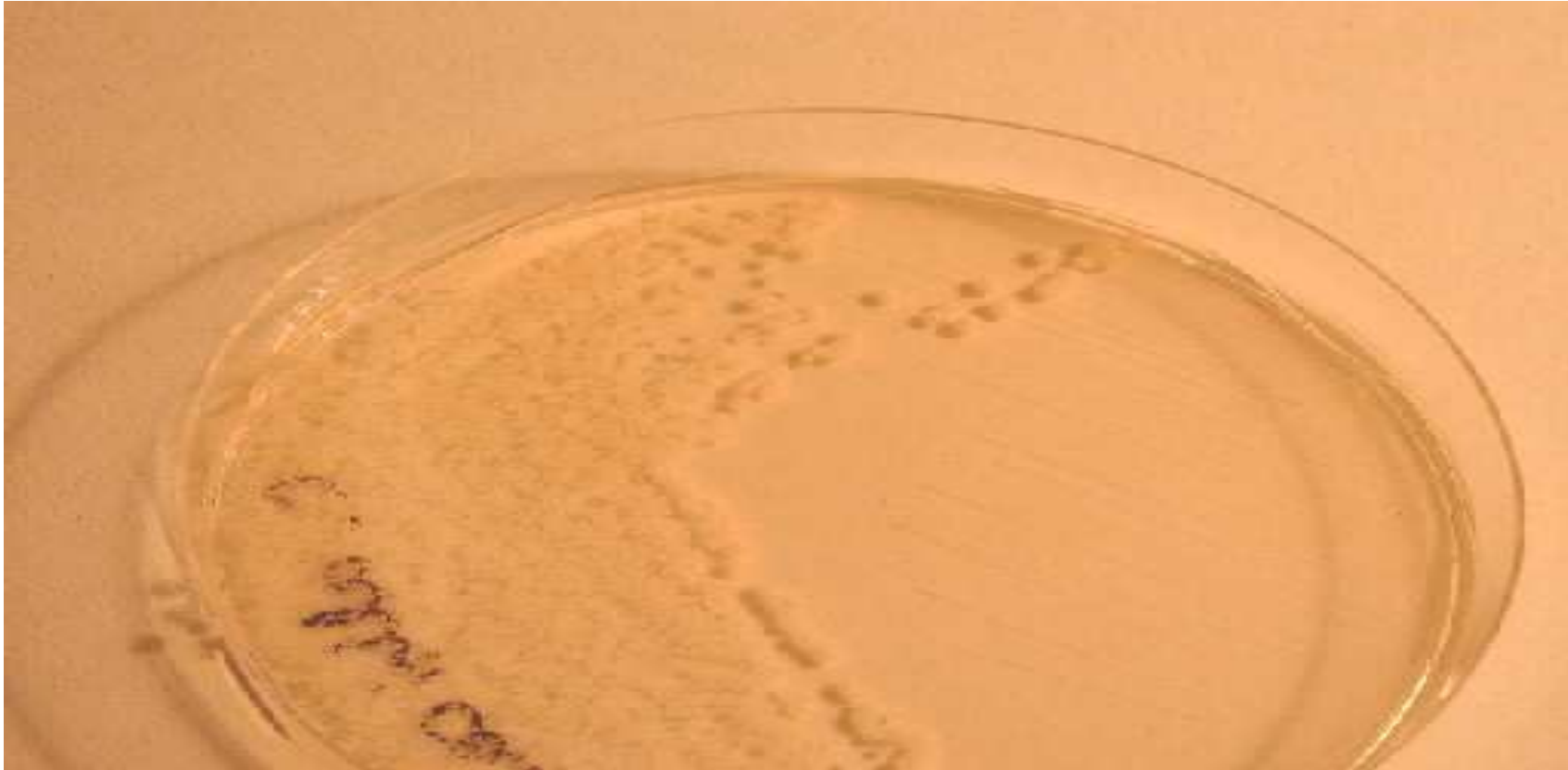


Incuber 24h à 37°C

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DES
LEVURES ET MOISSISSURES
DANS LES DENREES
ALIMENTAIRES**

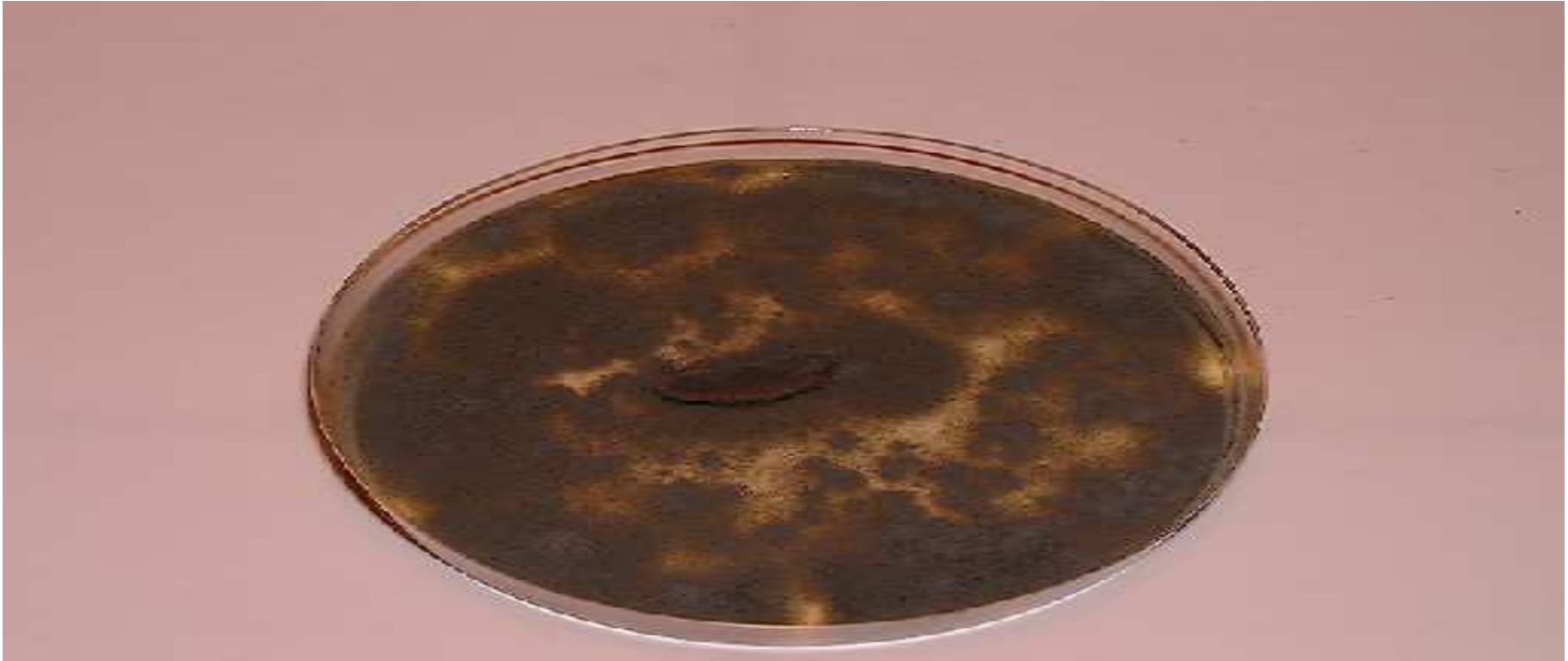
Lecture des levures et moisissures

levures



Aspergillus fumigatus
culture sur gélose Sabouraud

moisissures

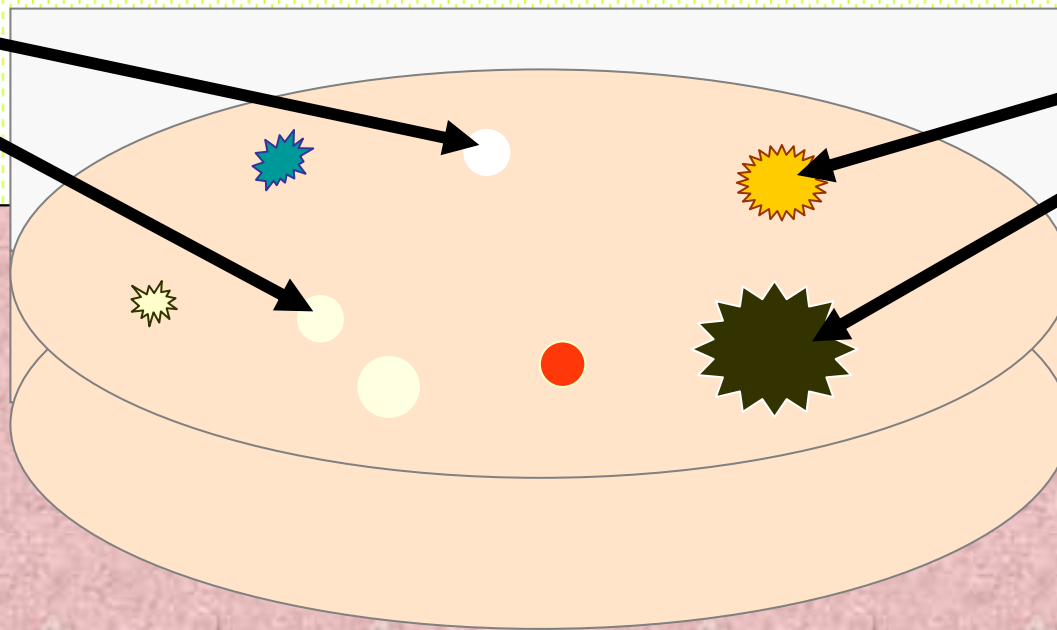


Candida albicans
culture sur gélose Sabouraud

Dénombrer les levures et moisissures et noter la dilution correspondante

LEVURES

MOISSISSURES



**RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES LEVURES
ET MOISSURES DANS LES LAITS T PRODUITS
LAIERS**

Calcul: $c \times 5 \times \text{inverse de la dilution}$

5^{ème} JOUR DES TRAVAUX PRATIQUES

**RECHERCHE ET
DÉNOMBREMENT DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DANS LES DENRÉES
ALIMENTAIRES**

Identification des staphylocoques pathogènes

lecture de la staphylocoagulase

Le coagulum occupe + des $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial.



Plasma de
lapin coagulé

Réaction +

Lecture et interprétation:

FORMULE :
$$a = \frac{b^c}{A^c} \times c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times c^{nc}$$

- A^c = nombre de colonies caractéristiques repiquées.
- A^{nc} = nombre de colonies non caractéristiques repiquées.
- b^c = nombre de colonies caractéristiques repiquées à coagulase +.
- b^{nc} = nombre de colonies non caractéristiques repiquées à coagulase +.
- c^c = nombre total de colonies caractéristiques par boîte.
- c^{nc} = nombre total de colonies non caractéristiques par boîte.

Lecture et interprétation.

Calcul du nombre de staphylocoques aureus:

formule:
$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times F}$$

$\sum a = a_1 + a_2$ (a_1 = nombre de staphylocoques à coagulase + de la 1^{ère} dilution retenue et a_2 = nombre de staphylocoques à coagulase + de la 2^{ème} dilution retenue.)

Lecture et interprétation.

$$N = \frac{\sum a}{1,1 \times d} \quad \text{/gr ou ml}$$

$\sum a$: La somme des colonies +.

d : Le taux de dilution de la 1^{ère} dilution retenue.

NB: retenir 2 boites de dilutions successives contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques.

Lecture et interprétation

Si $c < 15$

$$N_e = \frac{c}{D} \text{ /gr ou ml}$$

D : taux de dilution de la suspension mère

Si $c = 0$

$$N < \frac{1}{D} \text{ /gr ou ml}$$

D : taux de dilution de la suspension mère

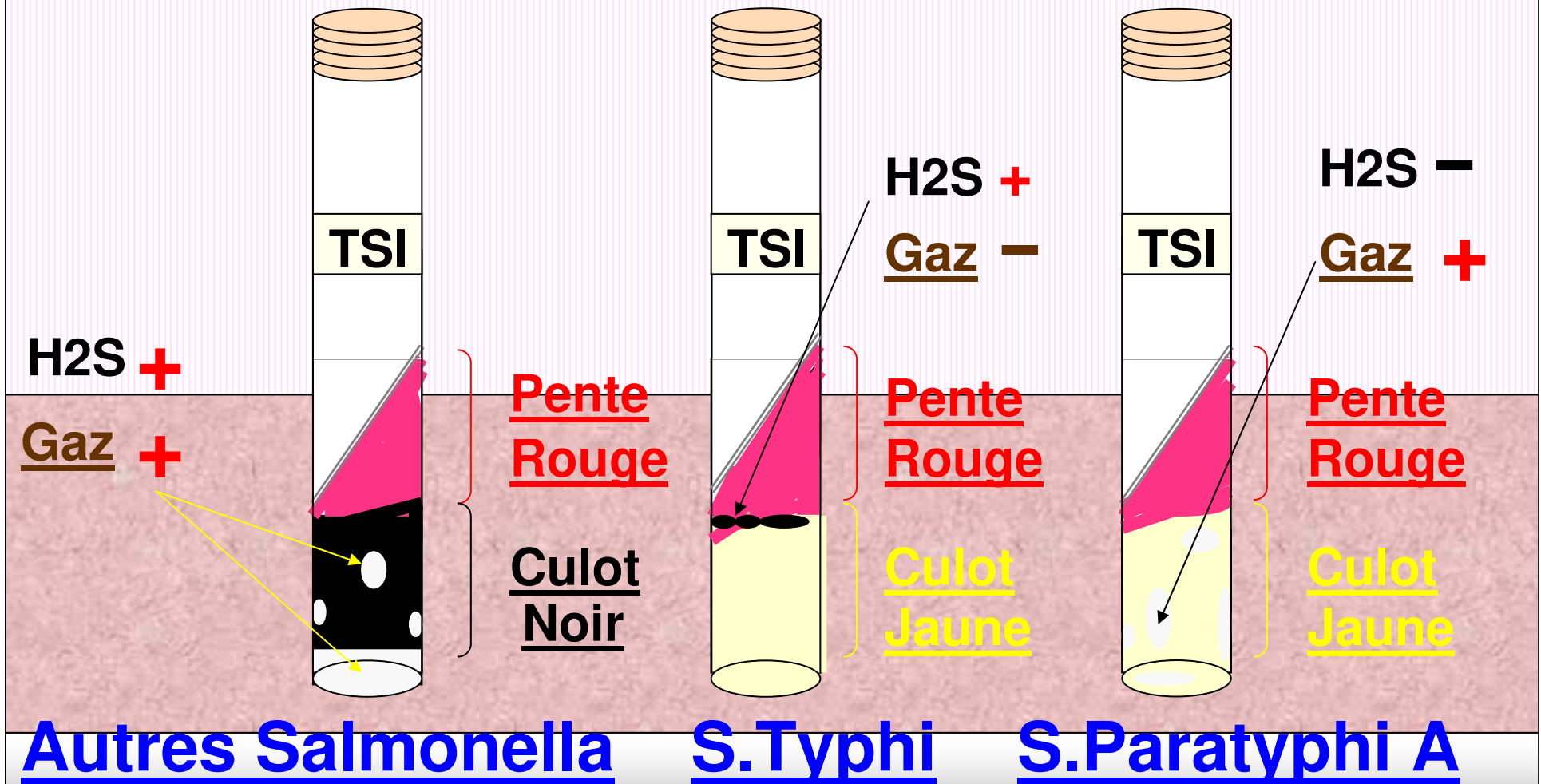
RECHERCHE DES SALMONELLA DANS LES DENREES ALIMENTAIRES

Recherche des Salmonella

étape d'identification

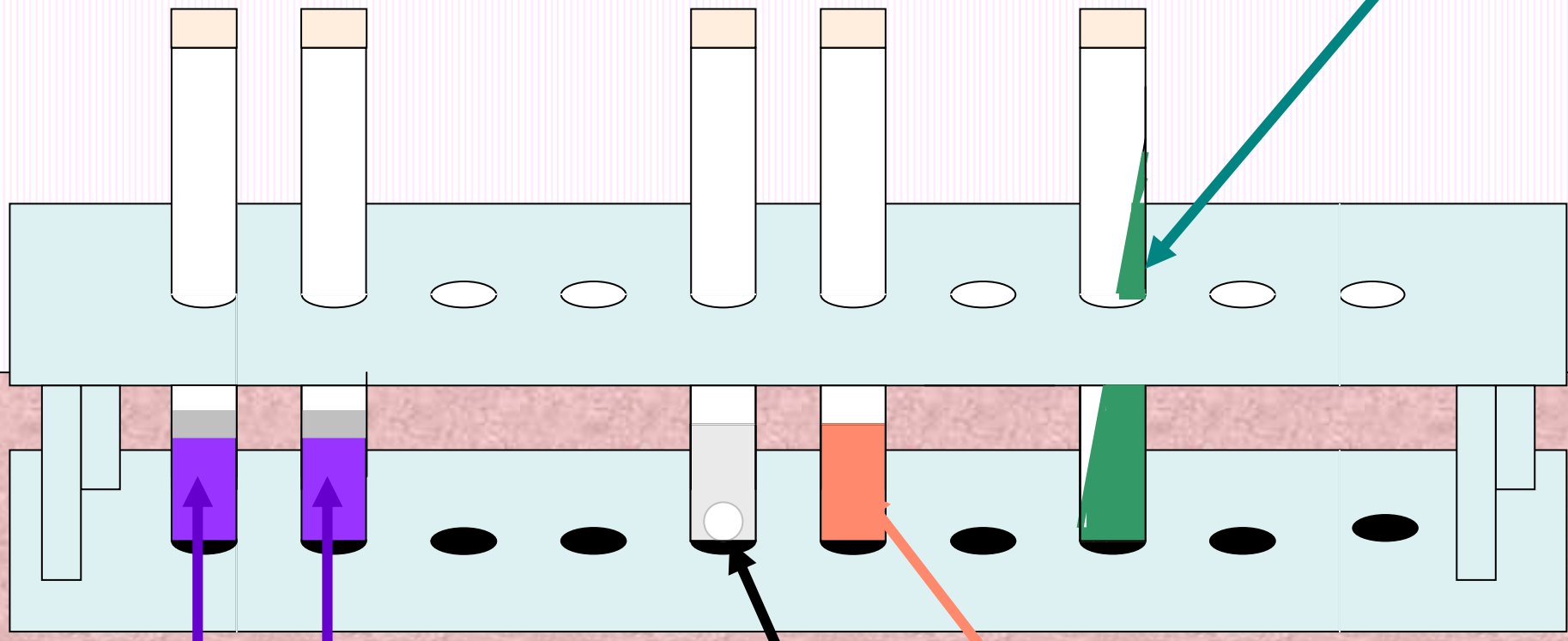
identification biochimique

Aspect de Salmonella sur TSI



Ensemencer une mini-galerie biochimique

CITRATE DE SIMMONS



TEMOIN LDC

ONPG

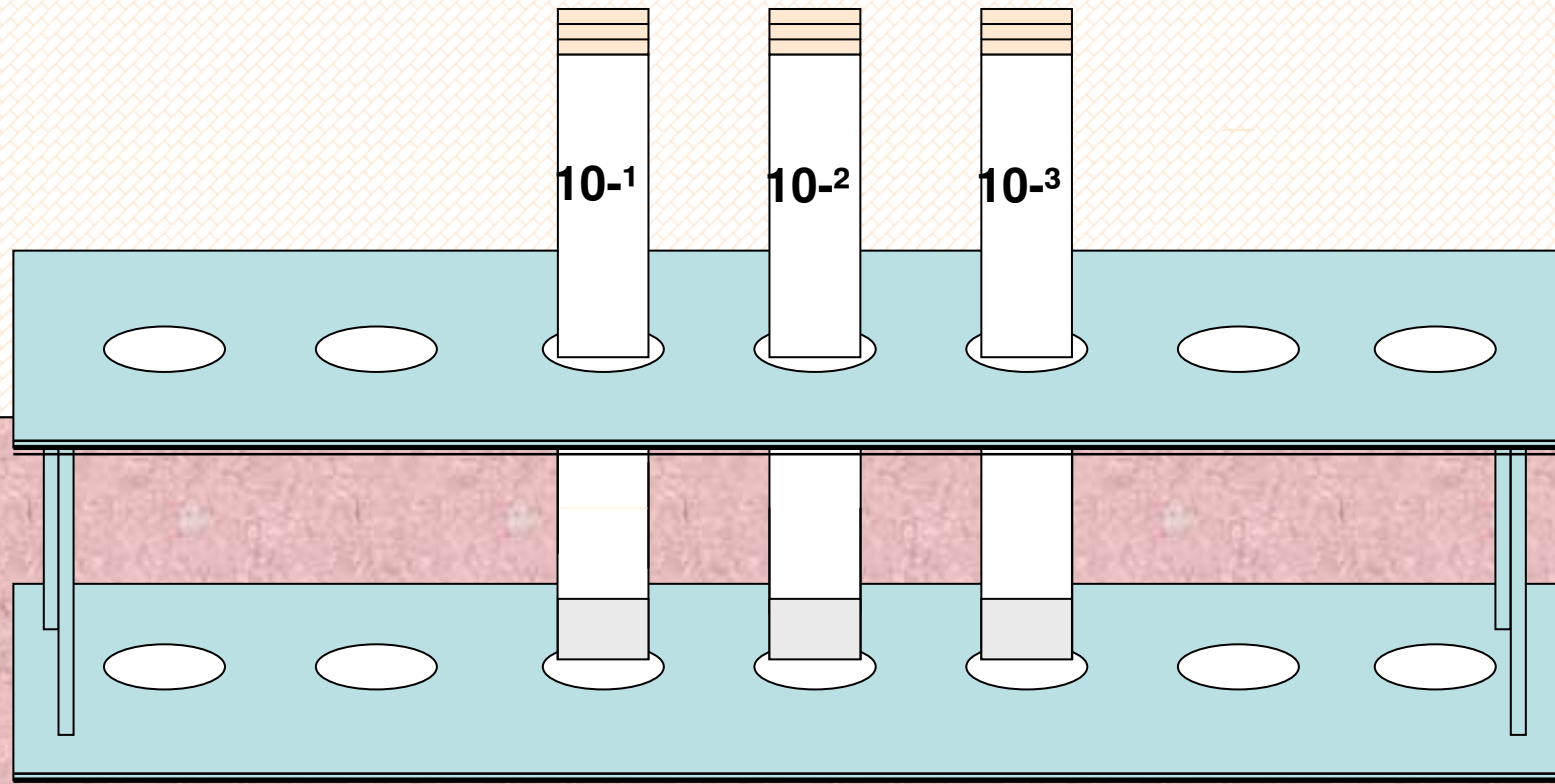
UREE

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS
DANS LES DENREES
ALIMENTAIRES**

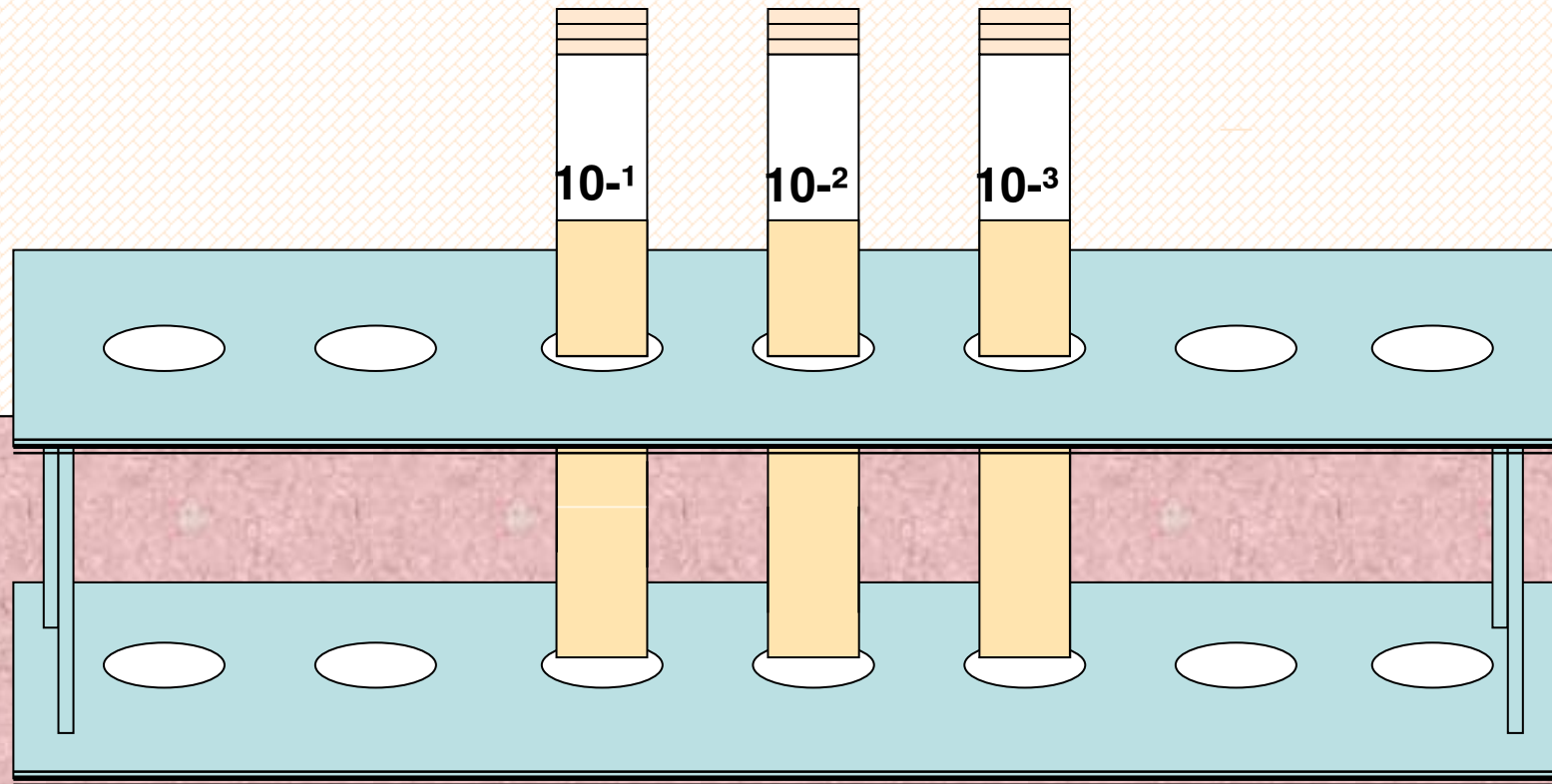
Milieu utilisé:

Bouillon Giolitti cantoni

Inoculer les tubes avec 1 ml des différentes dilutions:

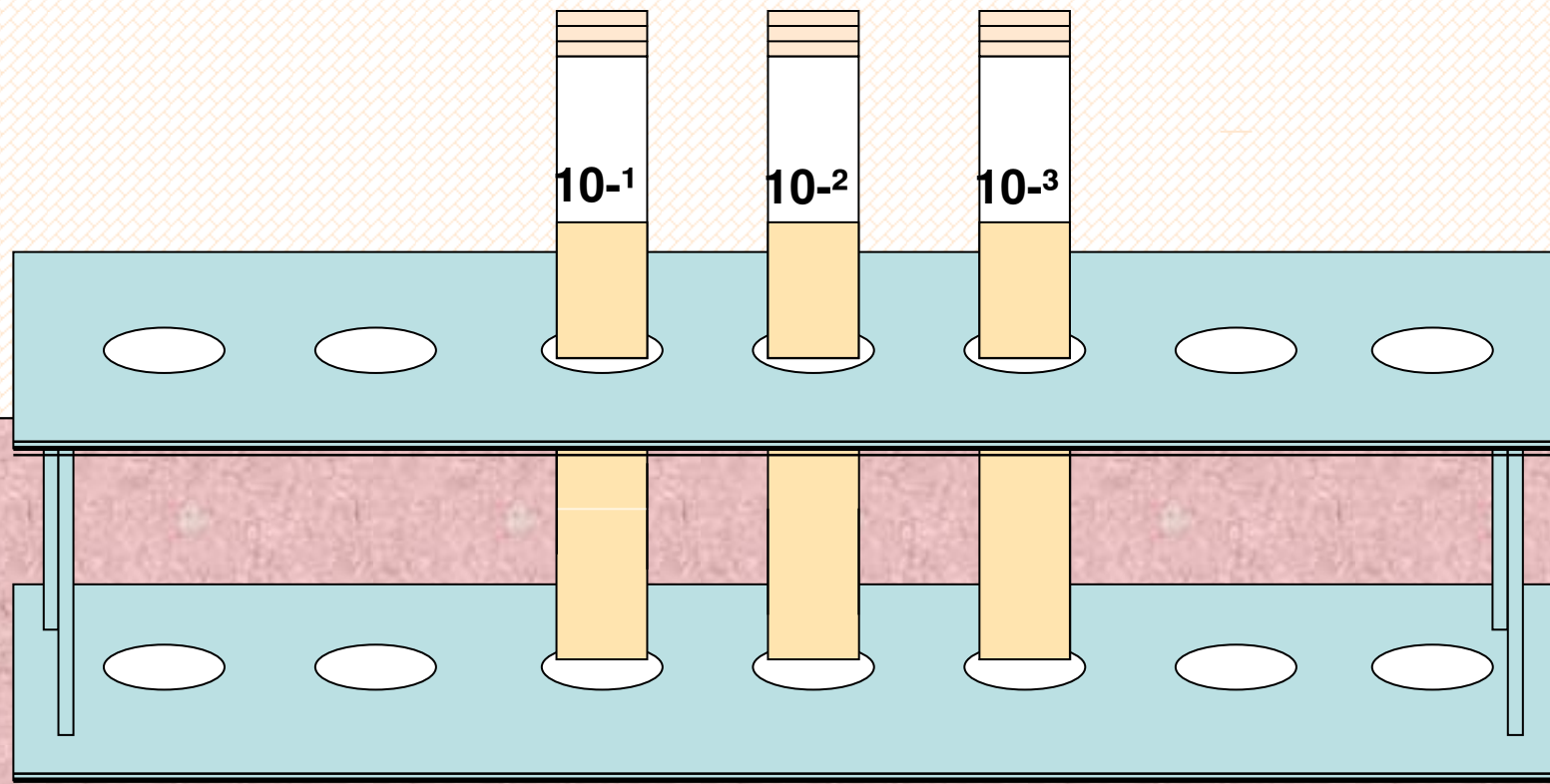


Couler \approx 15 ml du bouillon Giolitti
Cantoni additionné d'1 ampoule et $\frac{1}{2}$ de
Tellurite de K:



Incuber 48 h à 37°C

Faire la 1ère lecture:

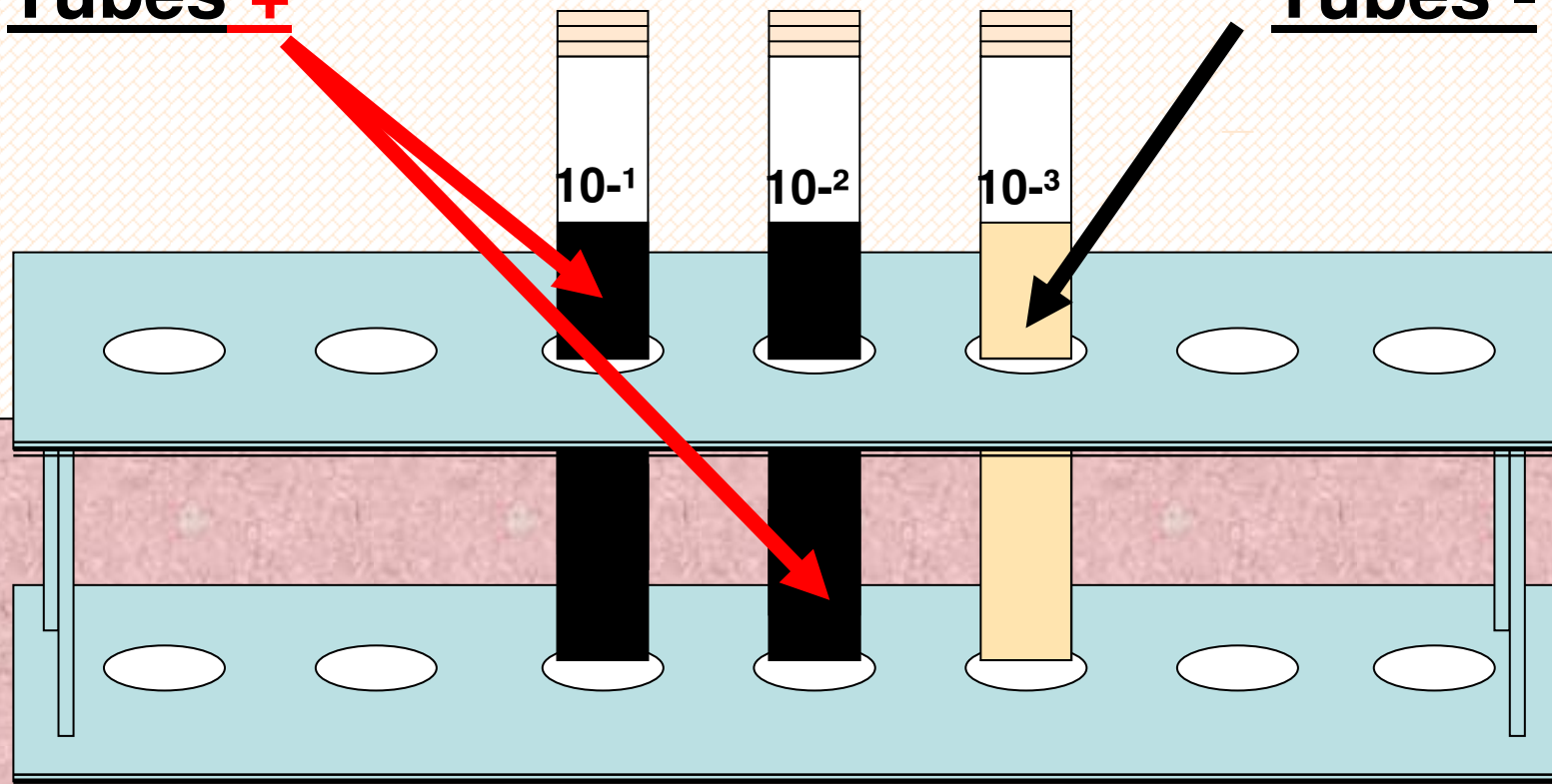


Reincuber 48 h à 37°C

Faire la 2ème lecture:

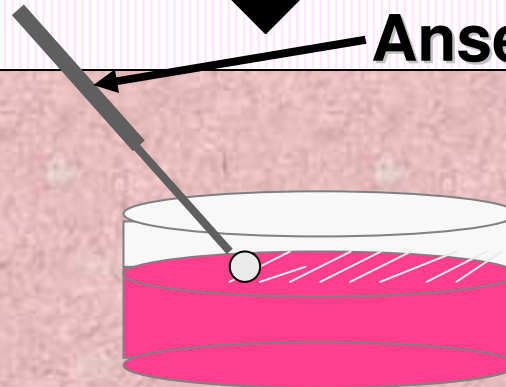
Tubes +

Tubes -



Isoler les tubes + sur la gélose Chapman

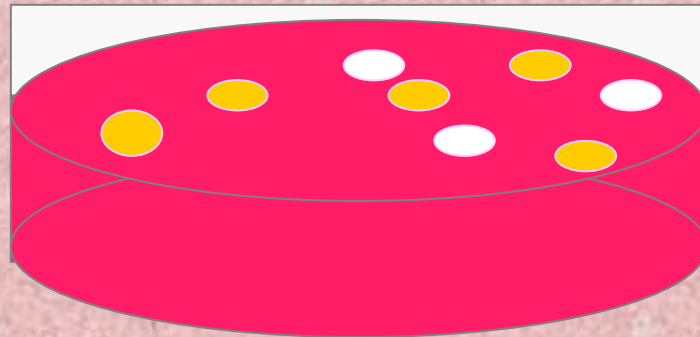
Isoler par des stries :
Ensemencer sur boîtes de gélose
Chapman à partir de chaque bouillon de
Giolitti Cantoni +.



Anse de platine

24 à 48h à 37°C

Faire une réaction de la catalase
à partir de tout type de colonies
ayant poussées.

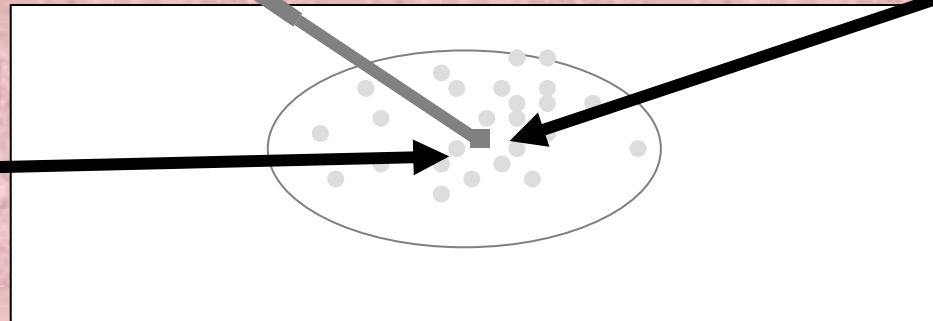


Réaction de la catalase:

Pipette Pasteur.

Déposer 1
goutte d'H₂O₂
20V.

Déposer une
partie de la
colonie.

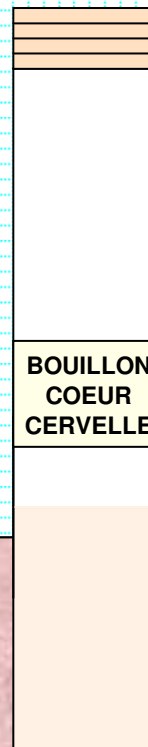


Apparition de bulles d'air.

— Observation à l'oeil nu ou
au microscope.

Réaction de la coagulase:
ensemencer un bouillon cœur cervelle.

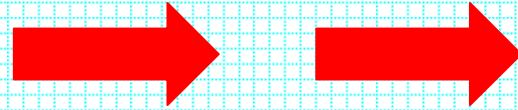
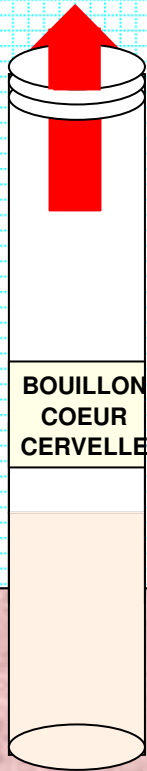
Si catalase +



Incuber 20-24h à 37°C

b- recherche de la coagulase libre:

0,1 ml



Plasma de
lapin

0,3 ml

Incuber 24h à 37°C

1ère lecture après 6h d'incubation.

Le coagulum occupe + des $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial.



Plasma de lapin coagulé

Réaction +

Lecture et interprétation.

Nombre de staphylocoques

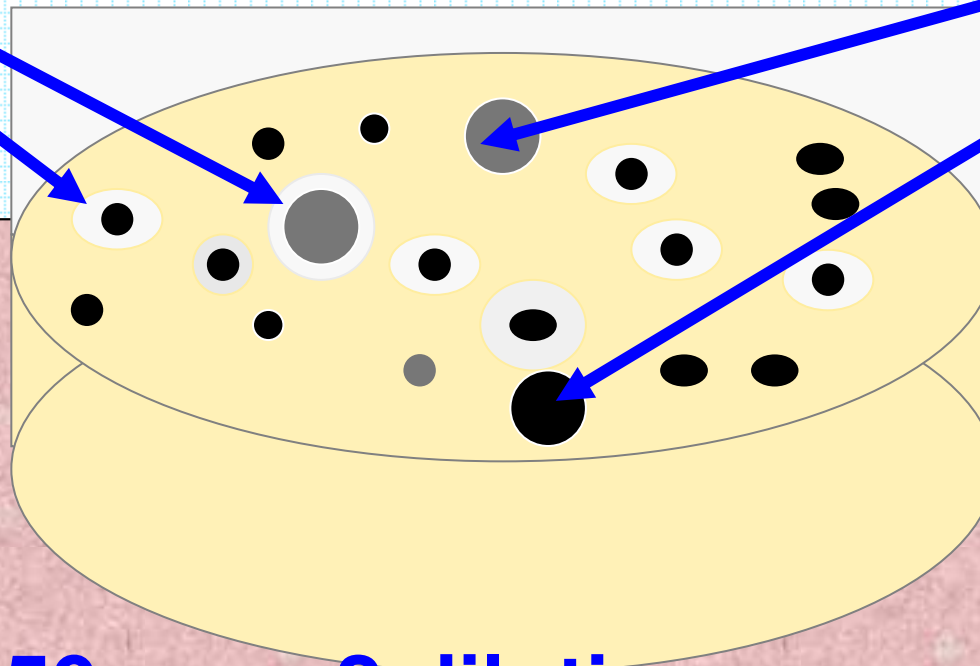
pathogènes /gr ou ml =

1 x inverse de la dilution

**Dénombrer les colonies caractéristiques
et non caractéristiques et noter les
dilutions correspondantes**

Colonies
caractéristiques

Colonies non
caractéristiques

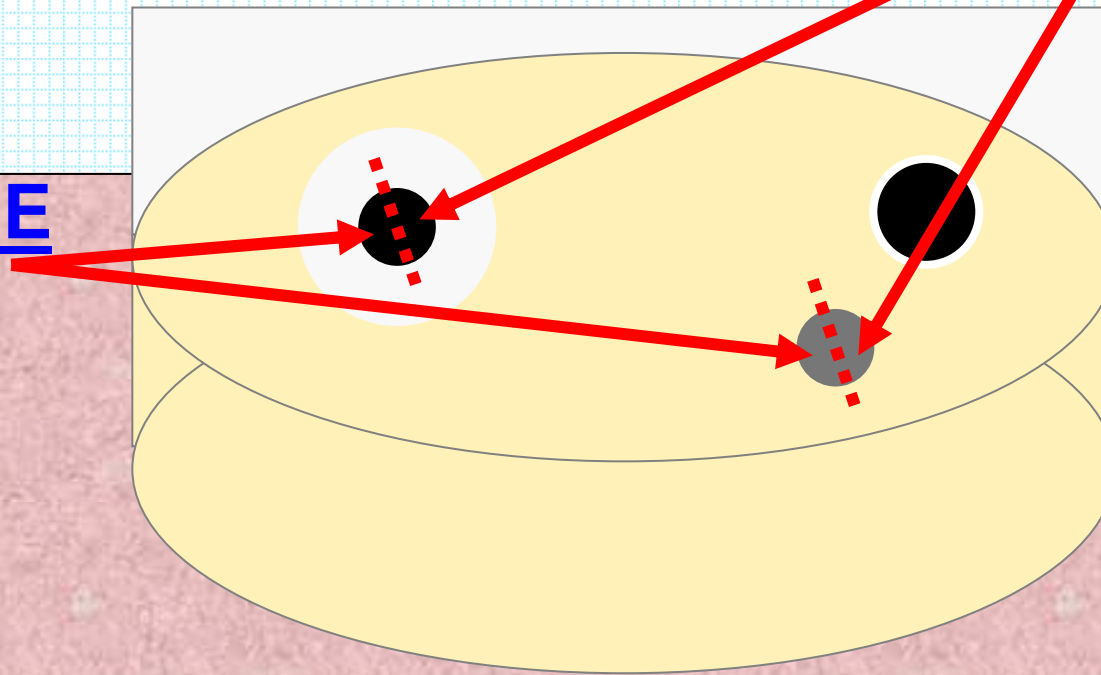


$15 \leq X \leq 150$ pour 2 dilutions successives.

Recherche de la catalase puis de la coagulase

CATALASE

COAGULASE

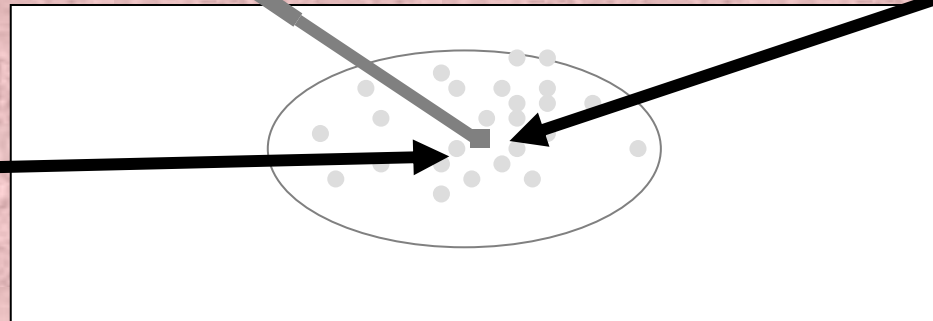


Réaction de la catalase:

Pipette Pasteur.

Déposer 1
goutte d'H₂O₂
20V

Déposer une
partie de la
colonie

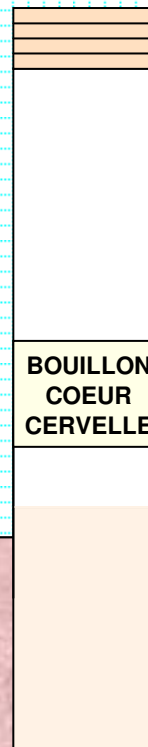


Apparition de bulles d'air.

— Observation à l'oeil nu ou
au microscope.

Réaction de la coagulase:

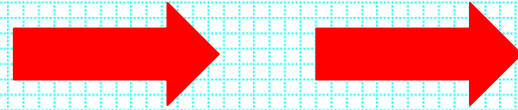
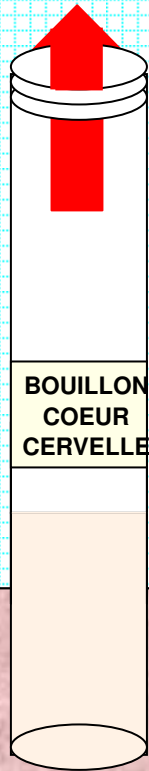
a- ensemencer un bouillon cœur cerveau.



Incuber 20-24h à 37°C

b- recherche de la coagulase libre:

0,1 ml



Plasma de
lapin

0,3 ml

Incuber 24h à 37°C

1ère lecture après 6h d'incubation.

Le coagulum occupe + des $\frac{3}{4}$ du volume du liquide initial.



Plasma de
lapin coagulé

Réaction +

Lecture et interprétation:

FORMULE :
$$a = \frac{b^c}{A^c} \times c^c + \frac{b^{nc}}{A^{nc}} \times c^{nc}$$

- A^c = nombre de colonies caractéristiques repiquées.
- A^{nc} = nombre de colonies non caractéristiques repiquées.
- b^c = nombre de colonies caractéristiques repiquées à coagulase +.
- b^{nc} = nombre de colonies non caractéristiques repiquées à coagulase +.
- c^c = nombre total de colonies caractéristiques par boîte.
- c^{nc} = nombre total de colonies non caractéristiques par boîte.

Lecture et interprétation.

Calcul du nombre de staphylocoques aureus:

formule:
$$N = \frac{\sum a}{V \times 1,1 \times F}$$

$\sum a = \underline{a_1} + a_2$ (a_1 = nombre de staphylocoques à coagulase + de la 1^{ère} dilution retenue et a_2 = nombre de staphylocoques à coagulase + de la 2^{ème} dilution retenue.)

Lecture et interprétation.

$$N = \frac{\sum a}{1,1 \times d} \quad \text{/gr ou ml}$$

$\sum a$: La somme des colonies +.

d : Le taux de dilution de la 1^{ère} dilution retenue.

NB: retenir 2 boites de dilutions successives contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques.

Lecture et interprétation

Si $c < 15$

$$N_e = \frac{c}{D} \text{ /gr ou ml}$$

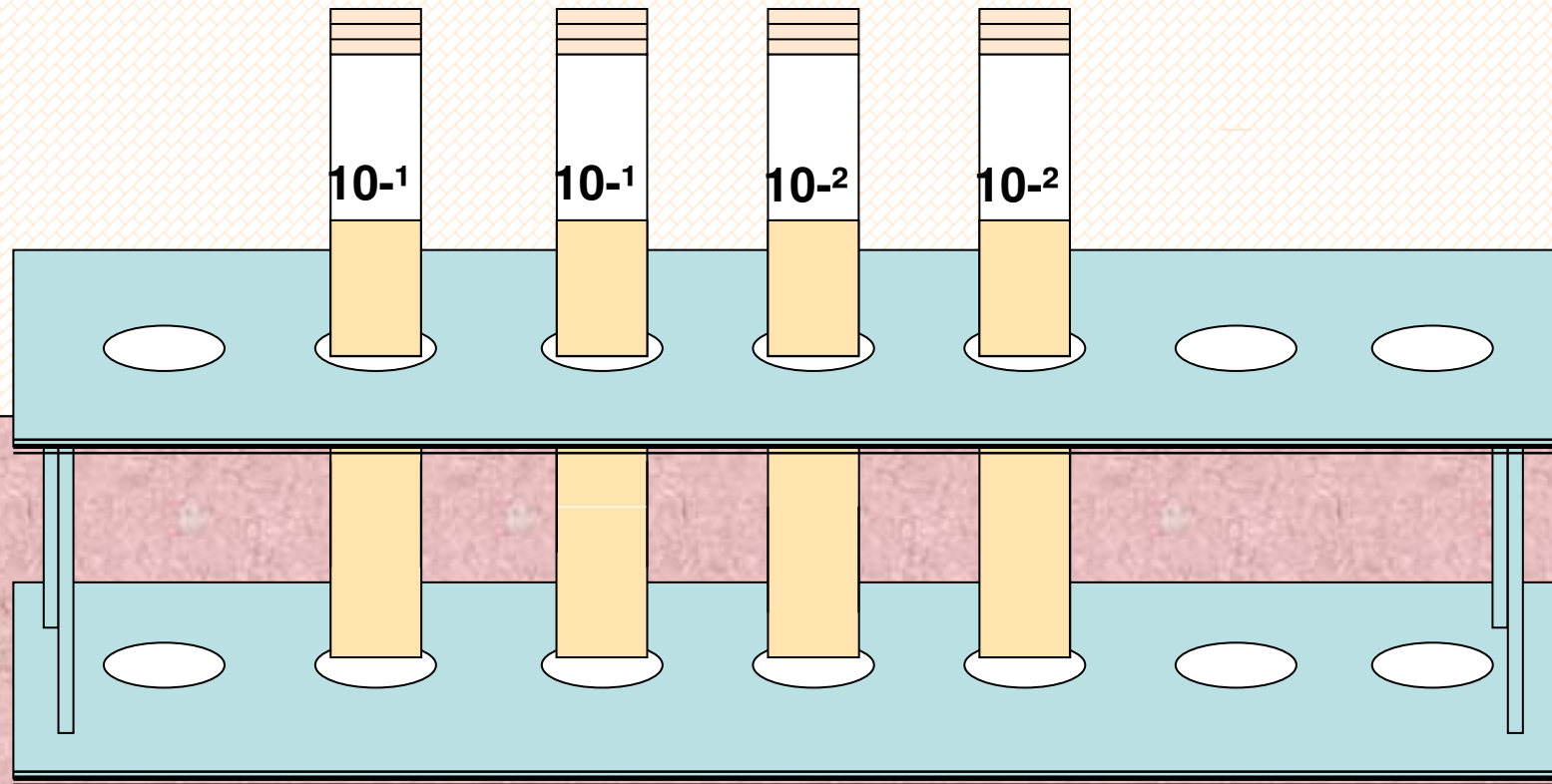
D : taux de dilution de la suspension mère

Si $c = 0$

$$N < \frac{1}{D} \text{ /gr ou ml}$$

D : taux de dilution de la suspension mère

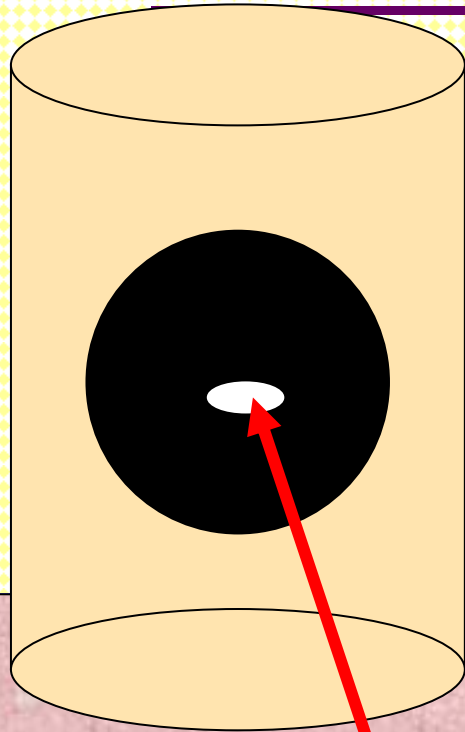
Mélanger doucement par retournement.
Laisser solidifier.



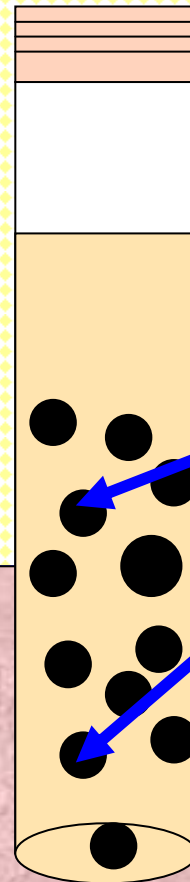
Incuber 48 h à 37°C

Dénombrer les colonies caractéristiques
de couleurs noires

et de 5 mm de diamètre re-incuber.



colonie



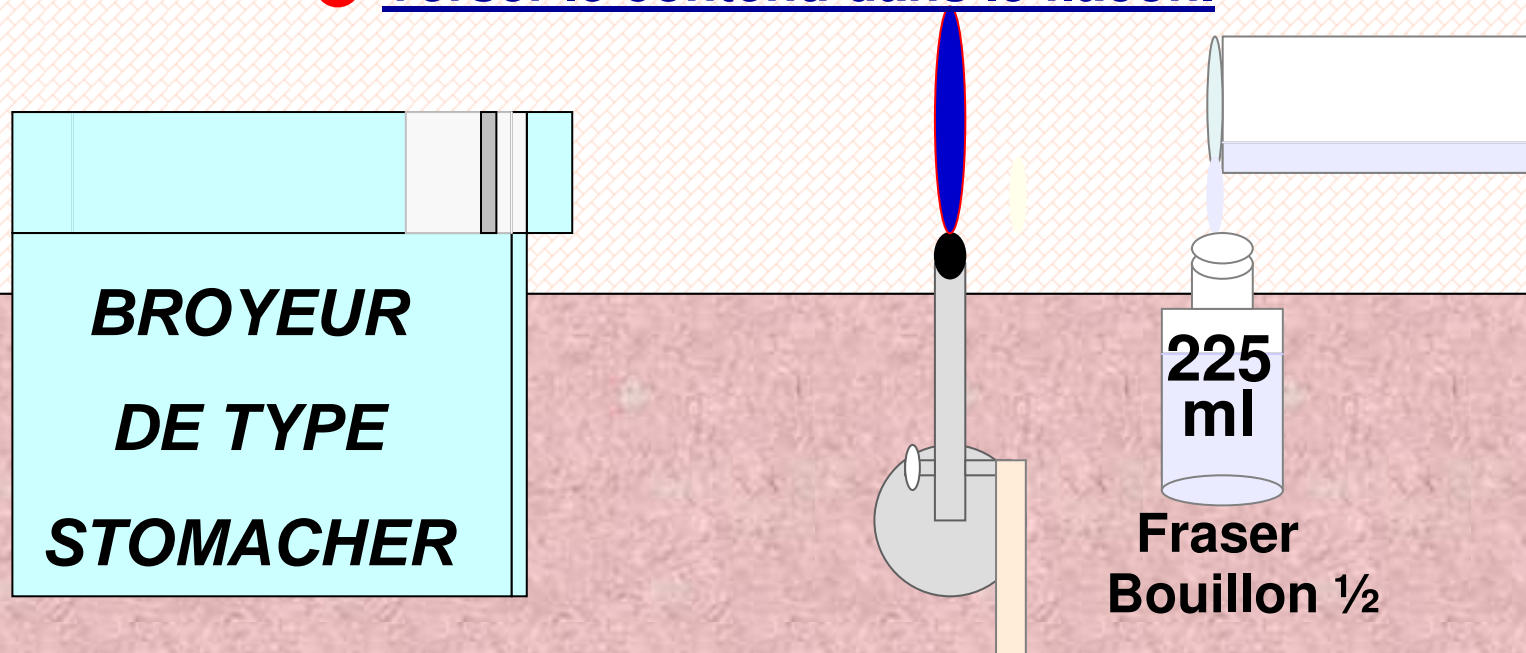
ASR

**RECHERCHE DES
LISTERIA
DANS LES DENREES
ALIMENTAIRES.**

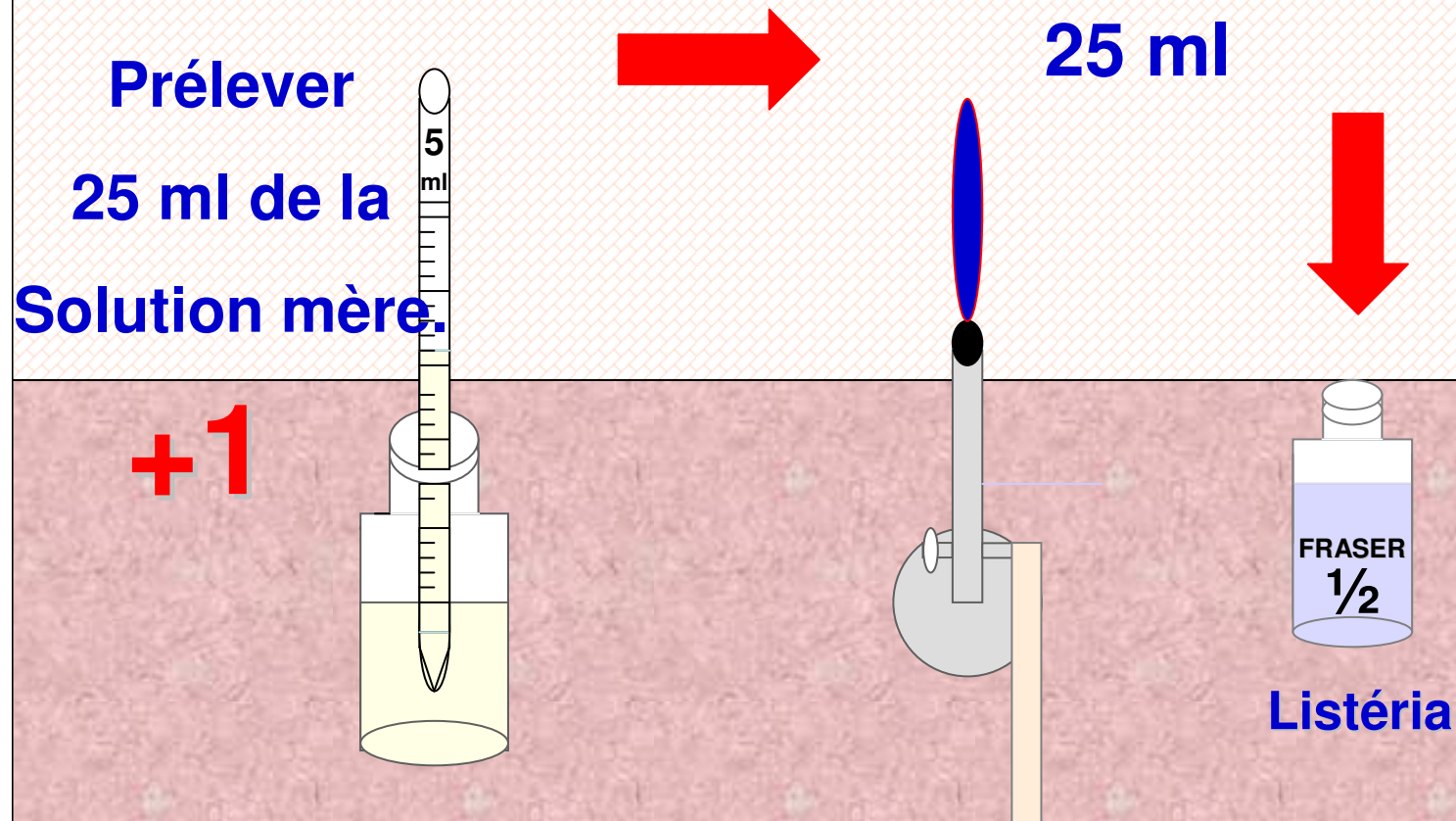
La prise d'essai pour la recherche de Listéria.

a - cas de produit solide:

- Verser le bouillon Fraser dans le sachet stérile contenant 25 gr de produit à analyser.
- Broyer l'aliment 6 à 8 minutes.
- Verser le contenu dans le flacon.



b – cas de produit liquide:

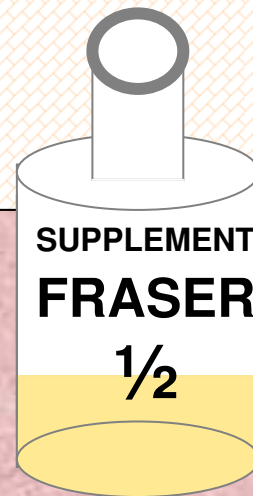
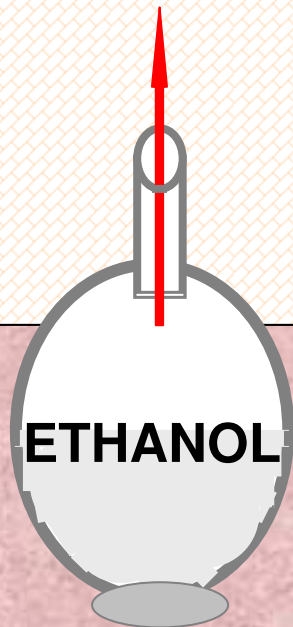


PREPARATION DU BOUILLON

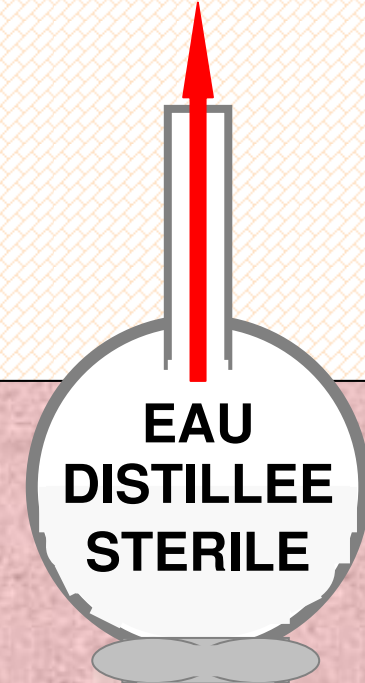
FRASER 1/2.

a – Reconstituer le supplement Fraser 1/2:

11.25 ml

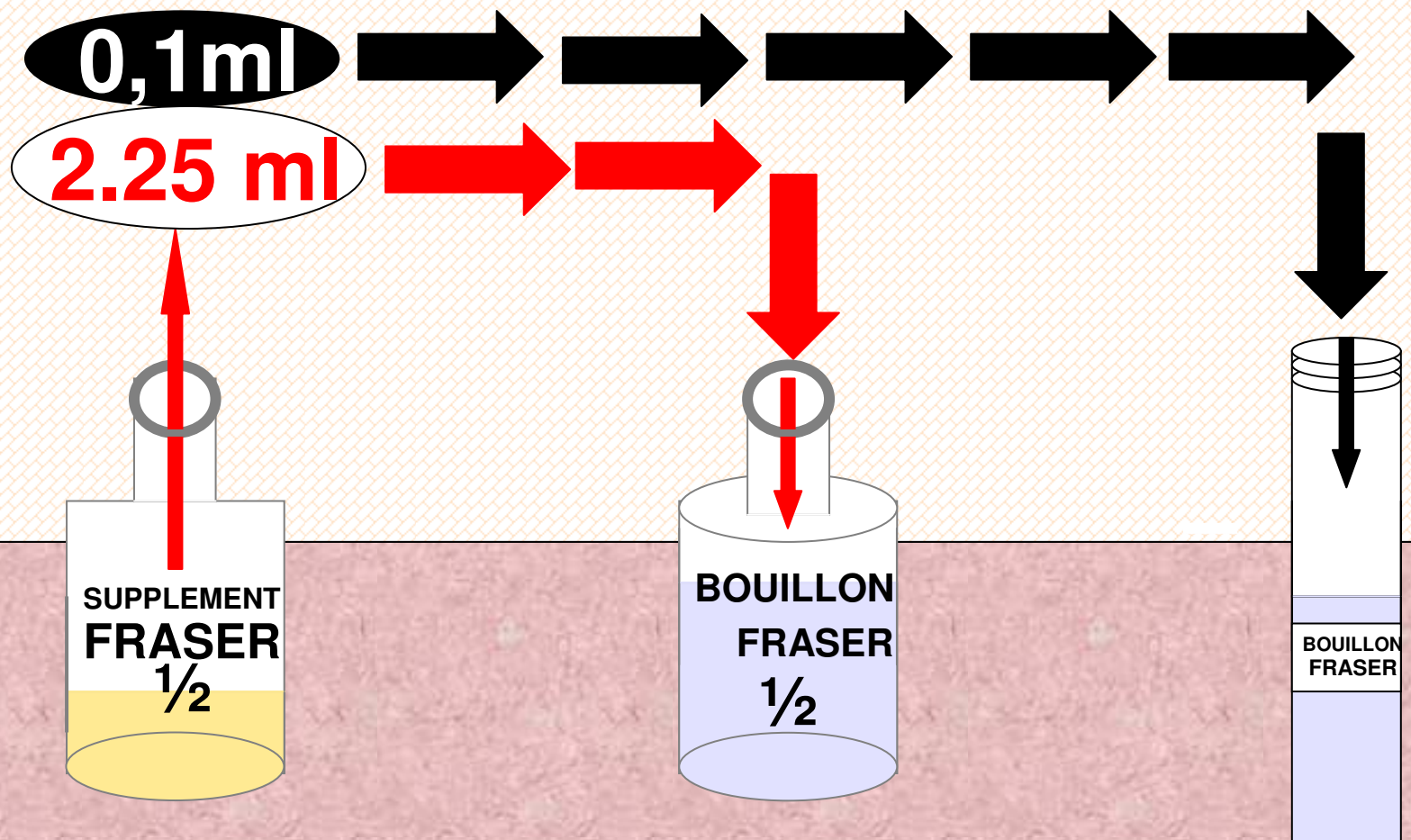


11.25 ml



Acriflavine+Acide nalidixique+citrate de fer ammoniacal

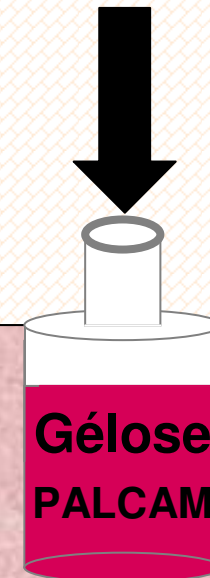
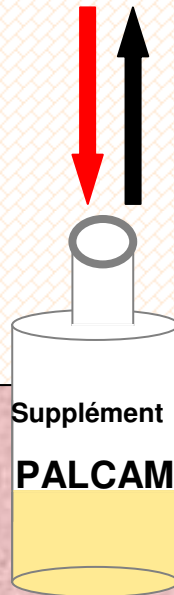
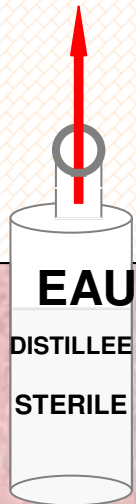
b- additionner le supplément.



PREPARATION DE LA GELOSE PALCAM.

5 ml →

2,25 ml →



Sulfate de polymyxine B + Ceftazine + Acriflavine

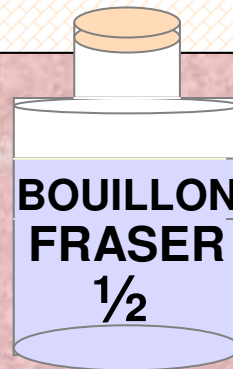
1^{ère} étape:

■ Enrichissement primaire.

Incuber le bouillon ensemencé

FRASER 1/2

18-24h à 30°C.



INCUBER 18-24h à 30°C

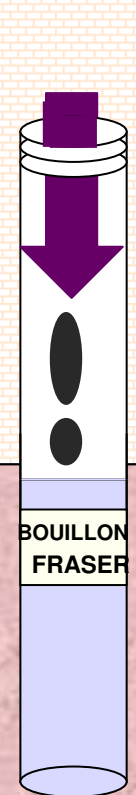
2^{ème} étape:

■ **Enrichissement secondaire**
sur milieu Fraser 1/2 en tube.

■ **1^{er} Isolement sur gélose**

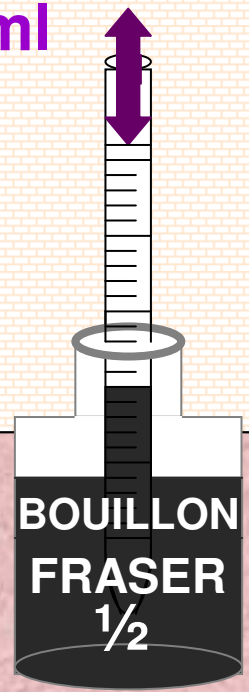
Palcam.

0,1ml

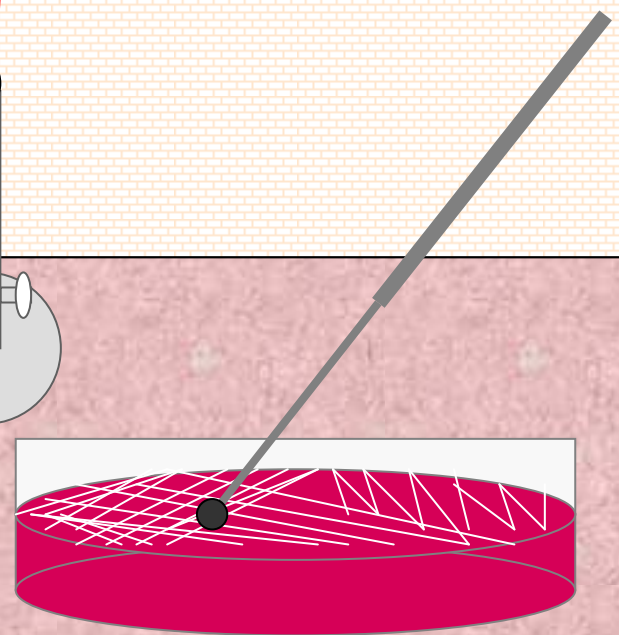
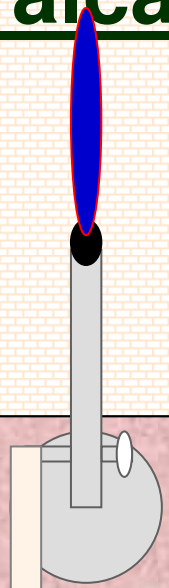


Incuber 24h à 37°C

FRASER



Enrichissement I

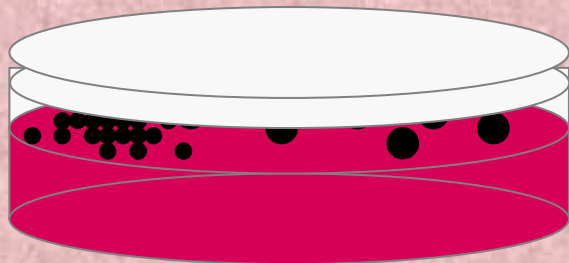


Incuber 24-48h à 37°C

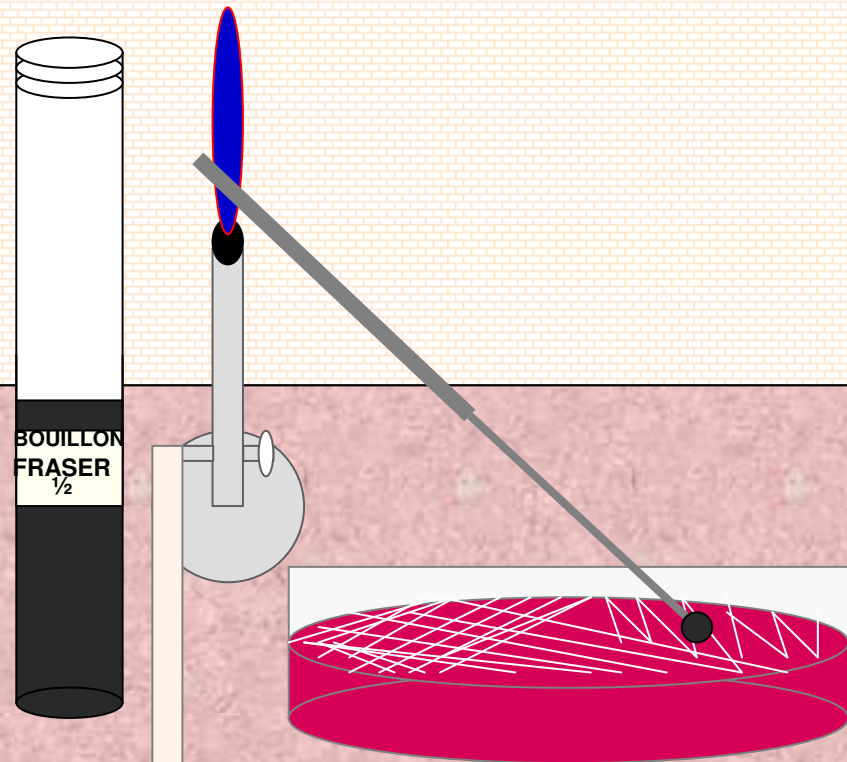
PALCAM 1

3^{ème} étape:

- 2^{ème} isolement sur la gélose Palcam.
- Lecture de la boîte Palcam 1.



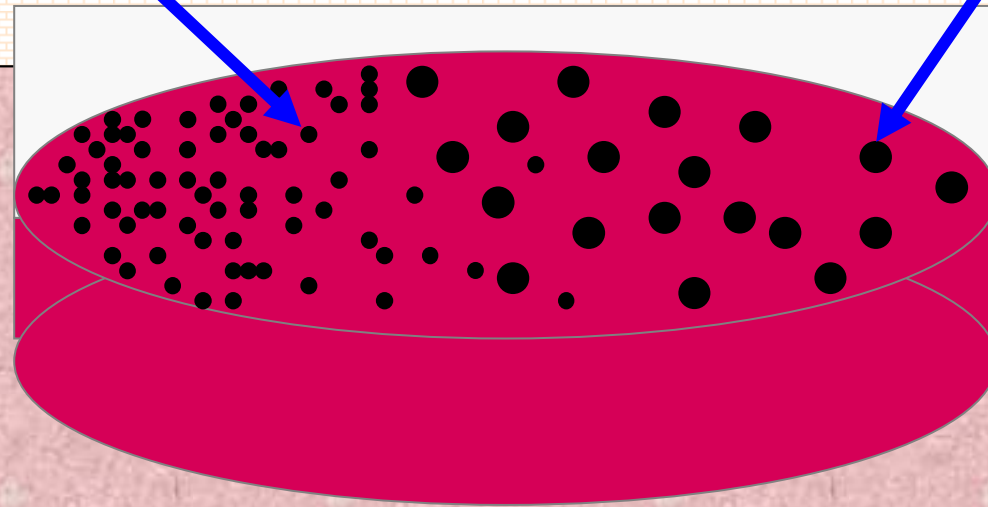
PALCAM 1



Incuber 24-48h à 37°C

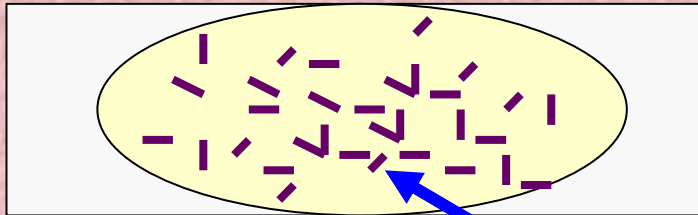
PALCAM 2

Colonies caractéristiques de Listéria sur la gélose Palcam.

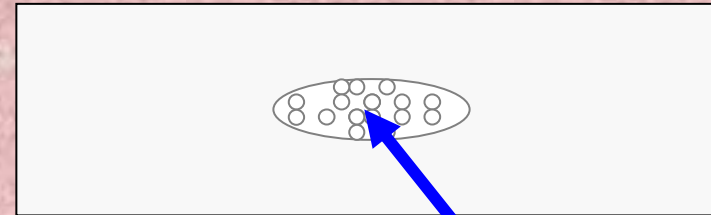


Identification du genre *Listéria*:

- Coloration de gram.
- Catalase.



Bacilles gram +

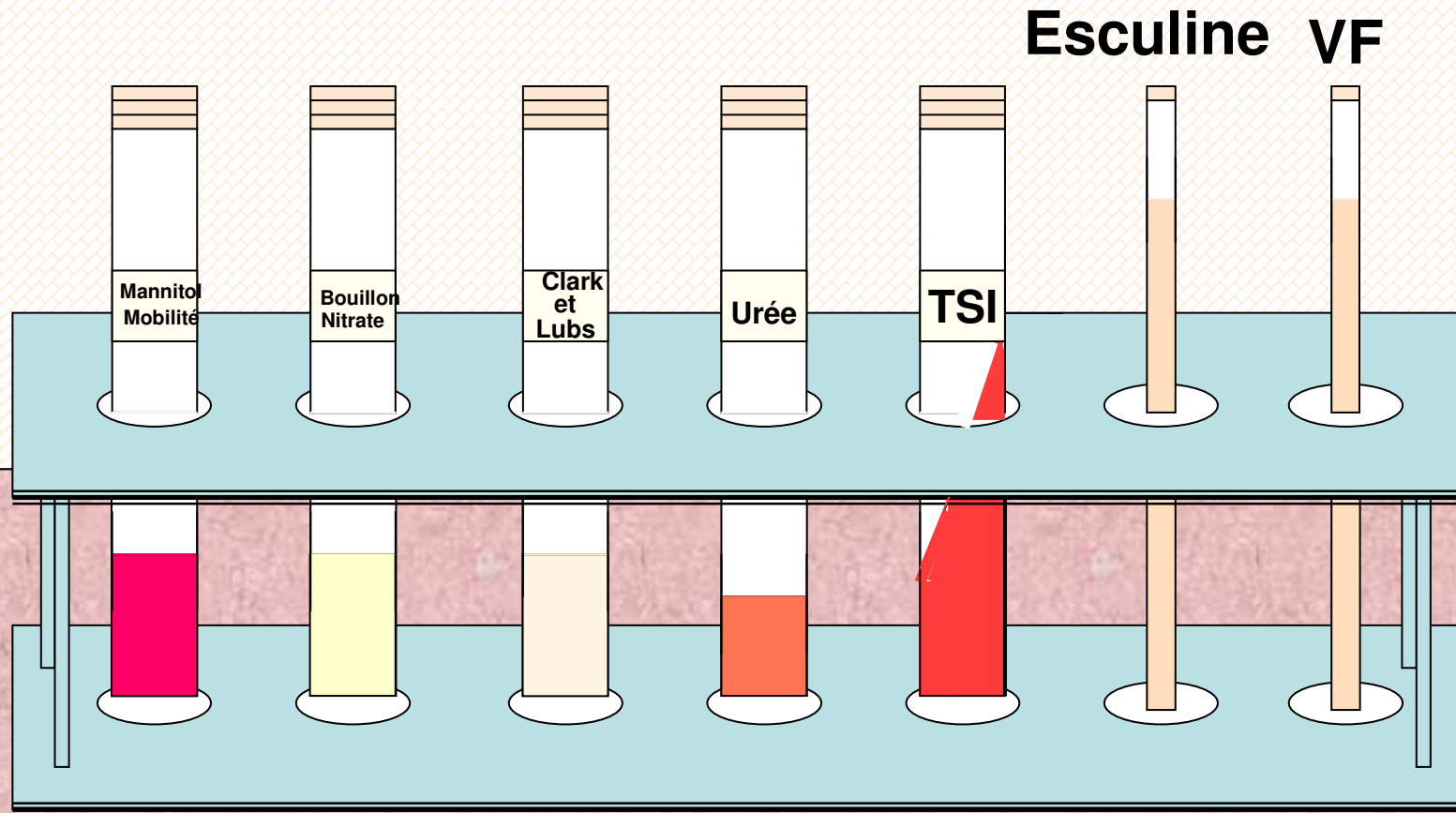


Catalase +

Identification de l'espèce: **ensemencer une galerie biochimique.**

- **Mobilité.**
- **Oxydase.**
- **Nitrate réductase.**
- **Urée.**
- **Indole.**
- **TDA.**
- **VP.**
- **RM.**
- **ESCULINE.**
- **VF : voir type respiratoire (aéro-anaérobie facultatif).**
- **TSI : (voir glucose + H₂S).**

ENSEMENCER UNE GALERIE BIOCHIMIQUE.



Incuber 24h à 37°C.

Lecture de la galerie biochimique.

Mobilité +

Nitrate -

Glucose +

H₂S -

Gaz -

Esculine +

Urée -

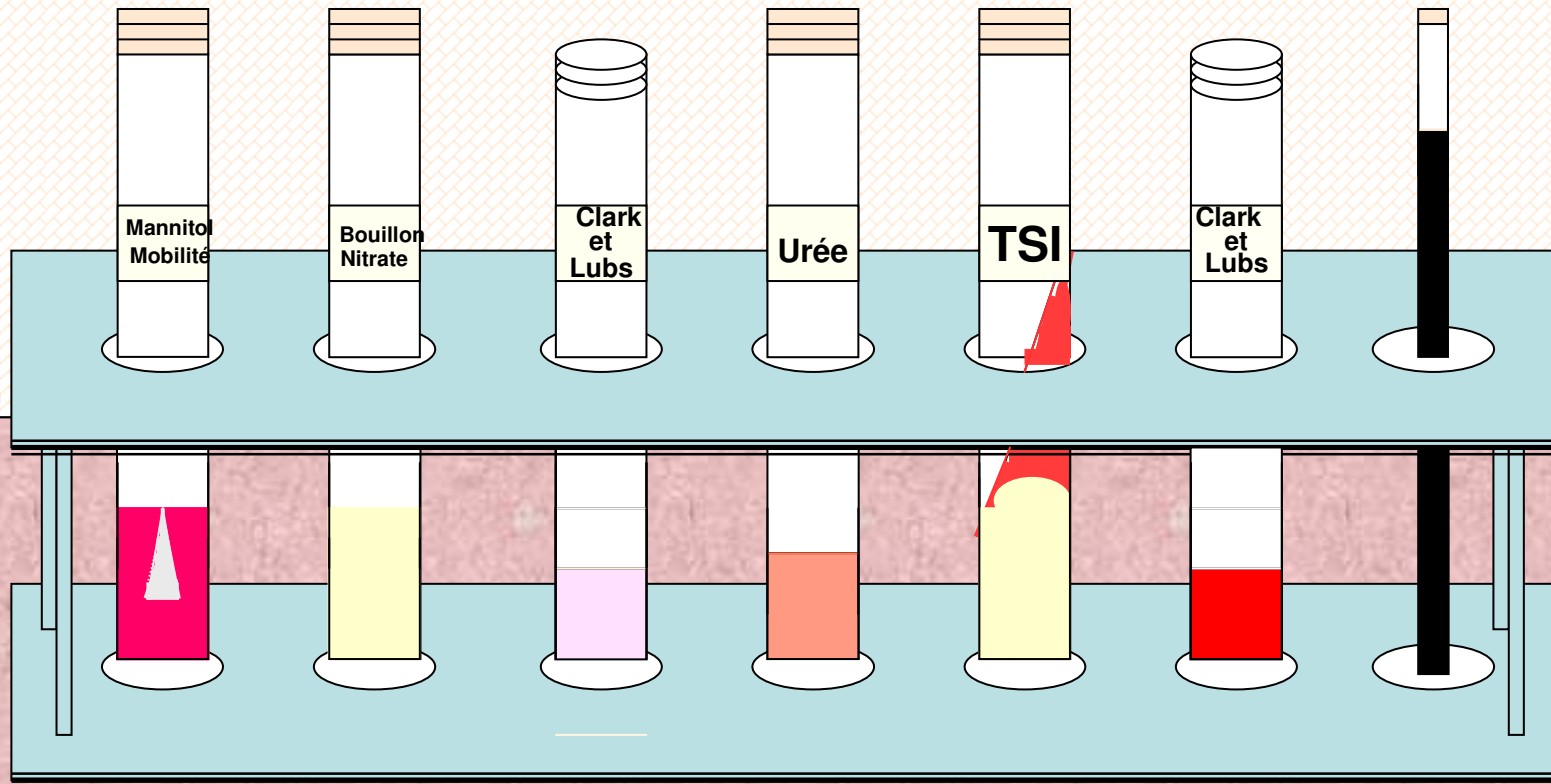
Indole -

TDA -

VP +

RM +

Esculine



**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DE
CLOSTRIDIUM PERFRINGENS
PAR COMPTAGE DES COLONIES
A 37 °C DANS LES LAITS
ET PRODUITS LAITIERS**

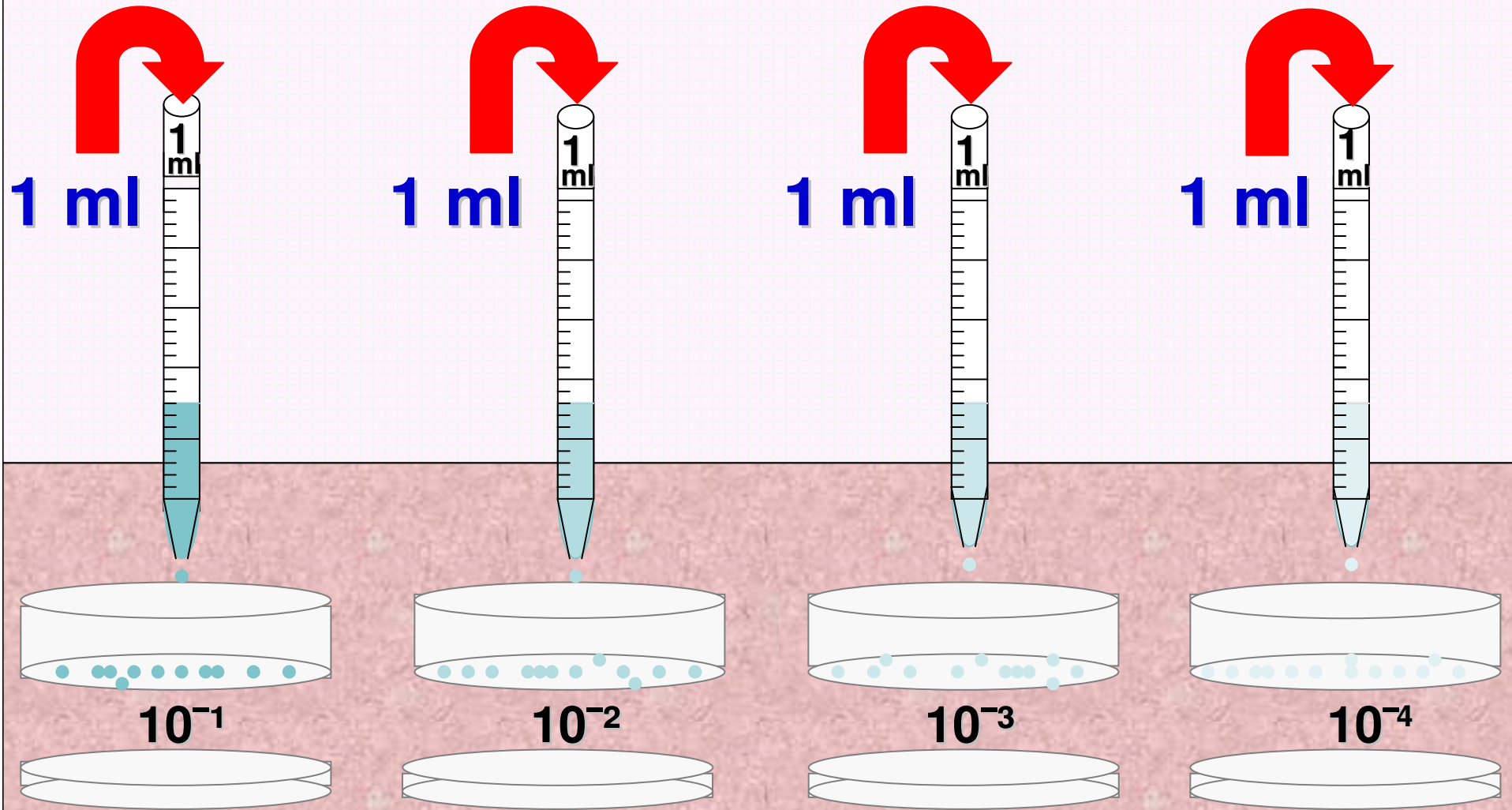
Milieu utilisée:

Tryptone Sulfite Cyclosérine

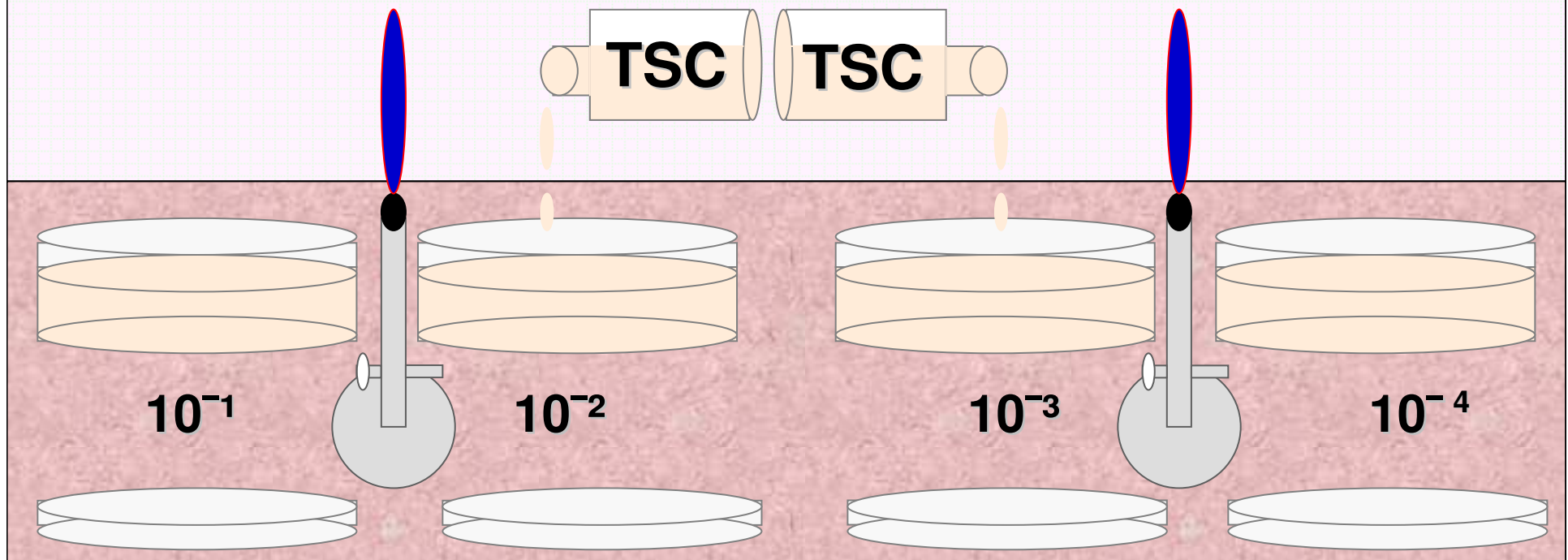
Références

- Norme XP V 08 – 061 relative au dénombrement en anaérobiose des bactéries Sulfite – Réductrices par comptage des colonies à 46 °C. Méthode de routine.
- Norme V 08- 056 relative au dénombrement des *Clostridium perfringens* par comptage des colonies .
- Norme NF V 08 – 019 relative au dénombrement des *Clostridium perfringens* par comptage des colonies .
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

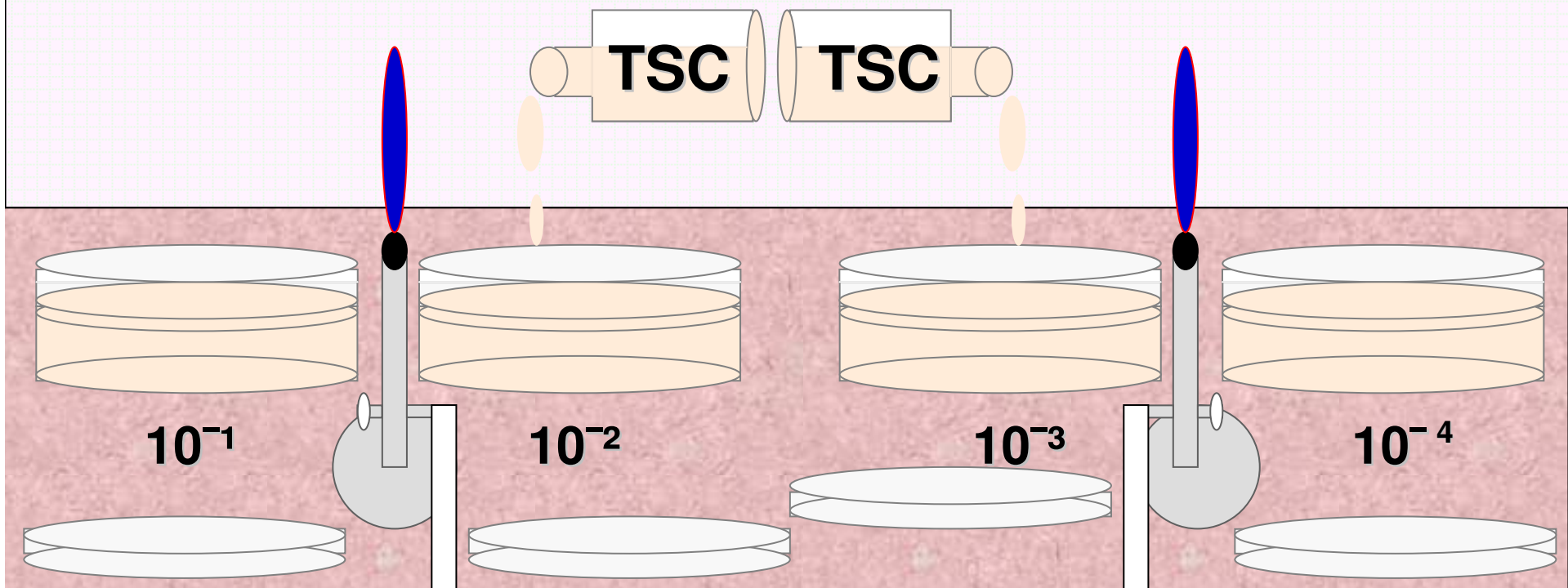
Inoculer les boites de pétri avec 1 ml des différentes dilutions.



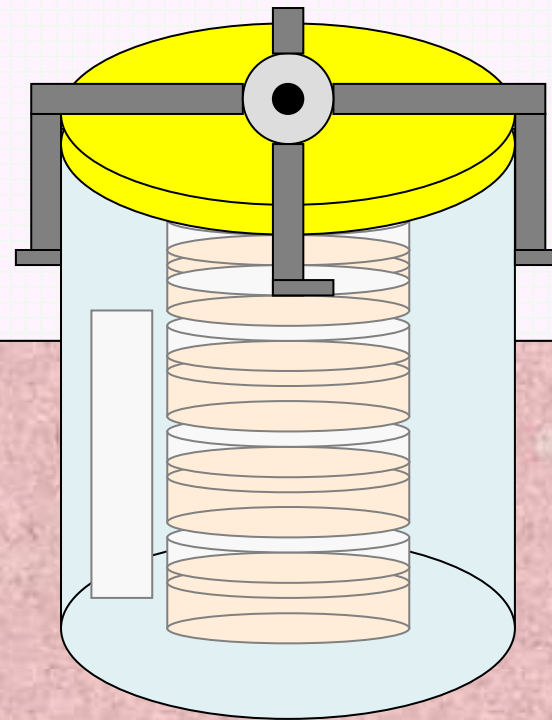
- Couler la gélose TSC ≈ 15 ml.
Mélanger et laisser solidifier.



- Couler une deuxième couche de gélose
TSC ≈ 10 ml, refroidie $\approx 47 \pm 2^\circ\text{C}$.
 - Laisser solidifier.

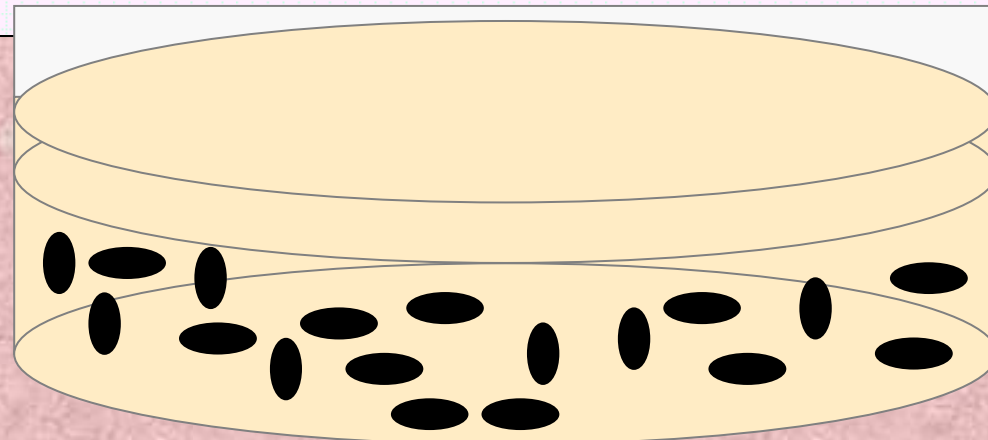


- Incuber $20 \pm 2\text{h}$ à 37°C dans une atmosphère riche en CO_2 .

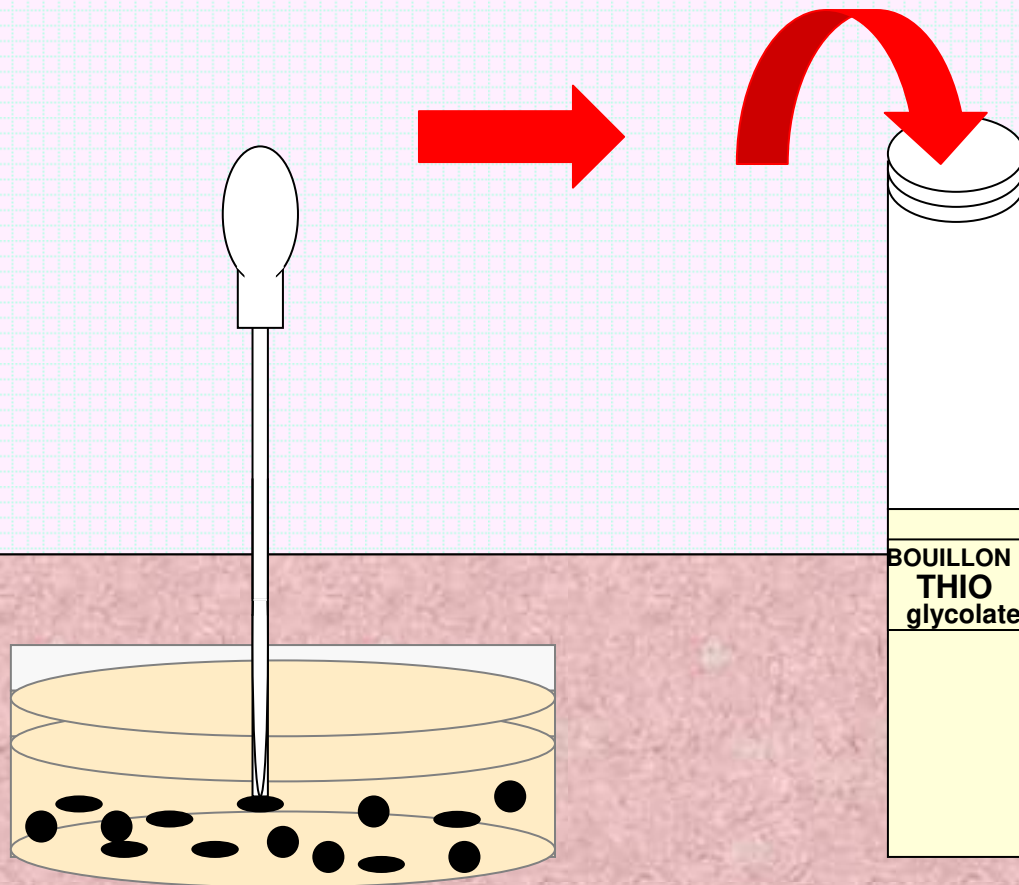


Jarre

Dénombrer les colonies noires
caractéristiques qui poussent en
profondeur.



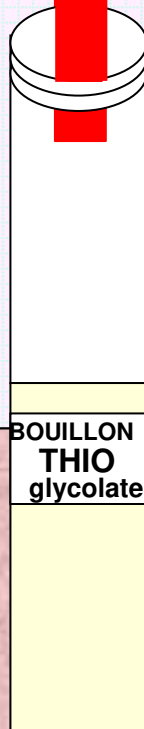
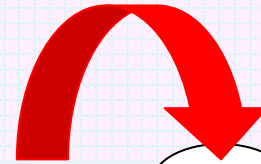
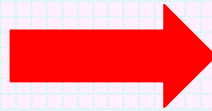
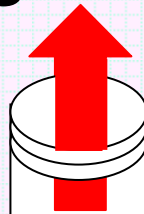
Ensemencer de 1 à 3 colonies suspectes
sur le bouillon Thioglycolate.



**Incuber 20 ± 2 h en
anaérobiose à 37°C**

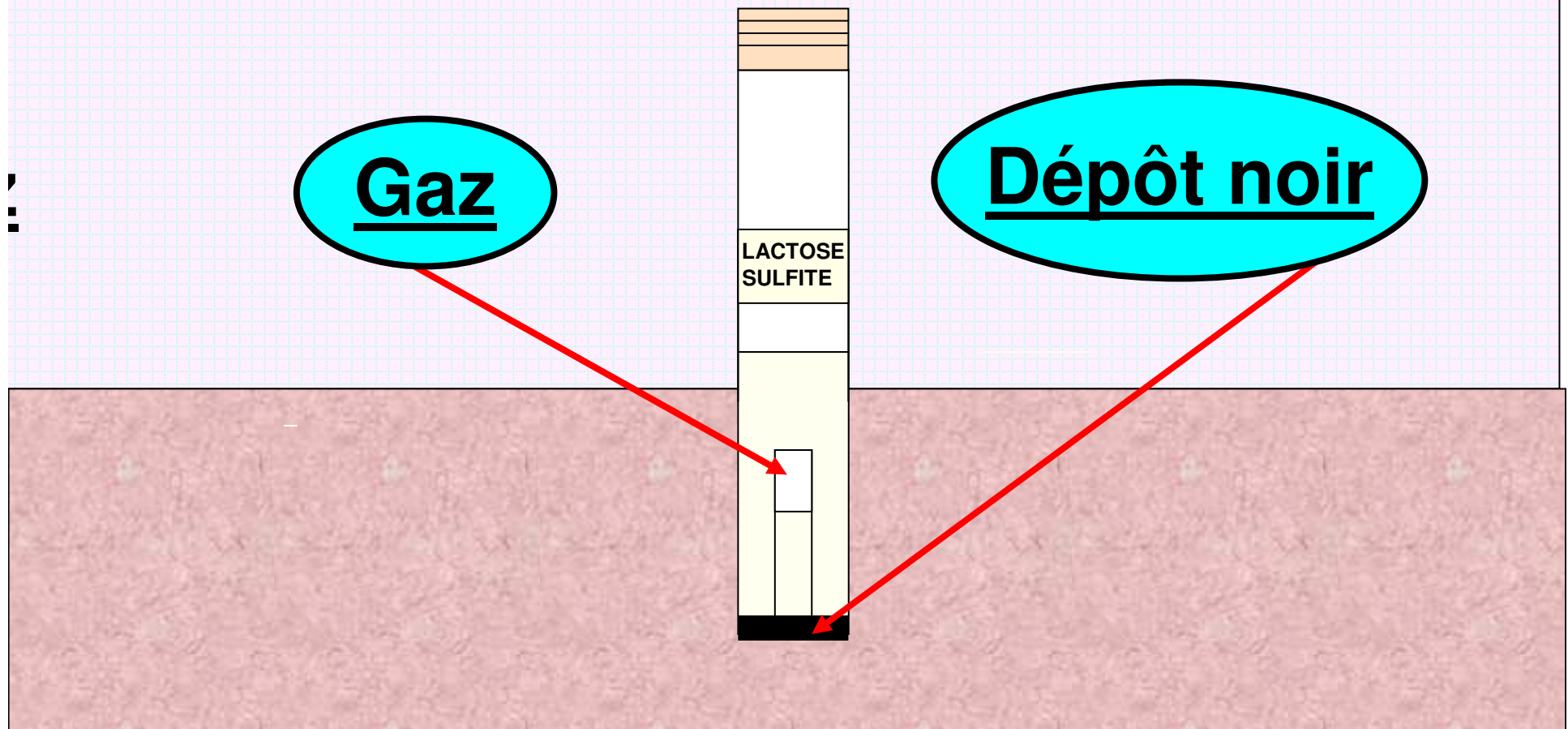
Repiquer 5 gouttes sur le bouillon Lactose Sulfite + cloche à partir du bouillon Thioglycolate.

2 gouttes



Incuber 24 ± 2h en anaérobiose

Voir un dégagement de gaz dans la cloche et un précipité noir au fond du tube.



Lecture et interprétation.

Formule: $a = \frac{b \times c}{A}$

b : Nombre de colonies caractéristiques +

c : Nombre total de colonies caractéristiques.

A : Nombre de colonies caractéristiques repiqués.

a : Nombre de Clostridium Perfringens identifiés.

Lecture et interprétation.

$$N = \frac{\sum a}{1,1 d} \text{ /gr ou ml}$$

$\sum a$: La somme des colonies +.

d : Le taux de dilution de la 1^{ère} dilution retenue.

NB: retenir 2 boites de dilutions successives contenant entre 15 et 150 colonies caractéristiques.

**RECHERCHE ET
DENOMBREMENT DES
COLIFORMES, COLIFORMES
THERMOTOLERANTS ET
ESCHERICHIA COLI DANS LES
DENREES ALIMENTAIRES**

Méthode en milieu liquide (VBL + Cloche)

Vert brillant

Bouillant

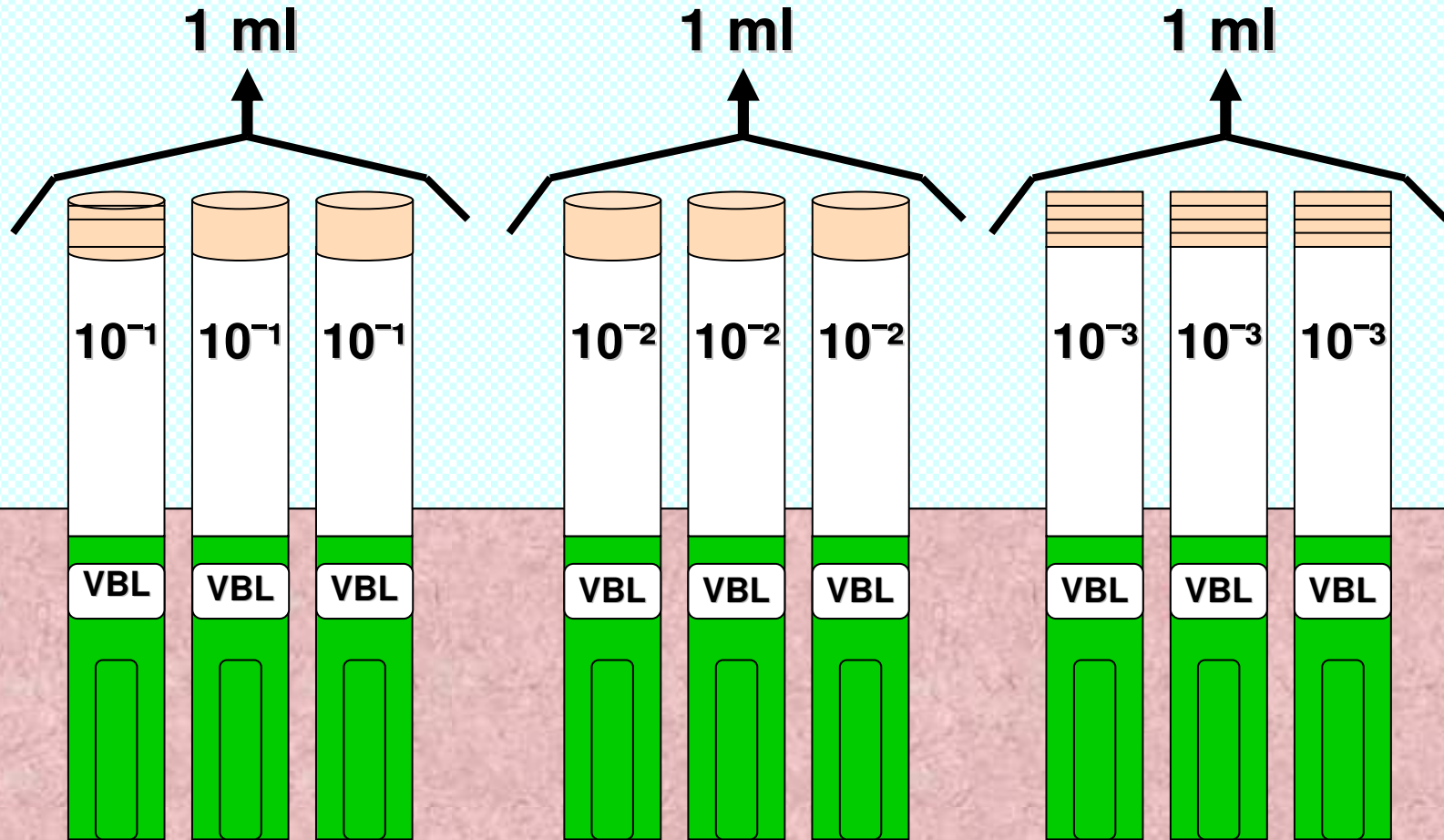
Lactosé

a - Test de présomption

Référentiels

- Norme NF ISO 4831 relative au dénombrement des coliformes – technique du nombre le plus probable après incubation à 30°C.
- Norme NF V 08 - 050 relative au dénombrement des coliformes – méthode par comptage des colonies obtenues à 30°C.
- Norme NF V 08 – 017 relative au dénombrement des coliformes fécaux et d'*Escherichia coli* (annexe à NF V 08 – 015 et NF V 08 -016).
- Norme NF ISO 17025 relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

- Introduire 1ml des différentes dilutions dans chaque tube.
Chasser le gaz présent dans les cloches avant l'incubation.

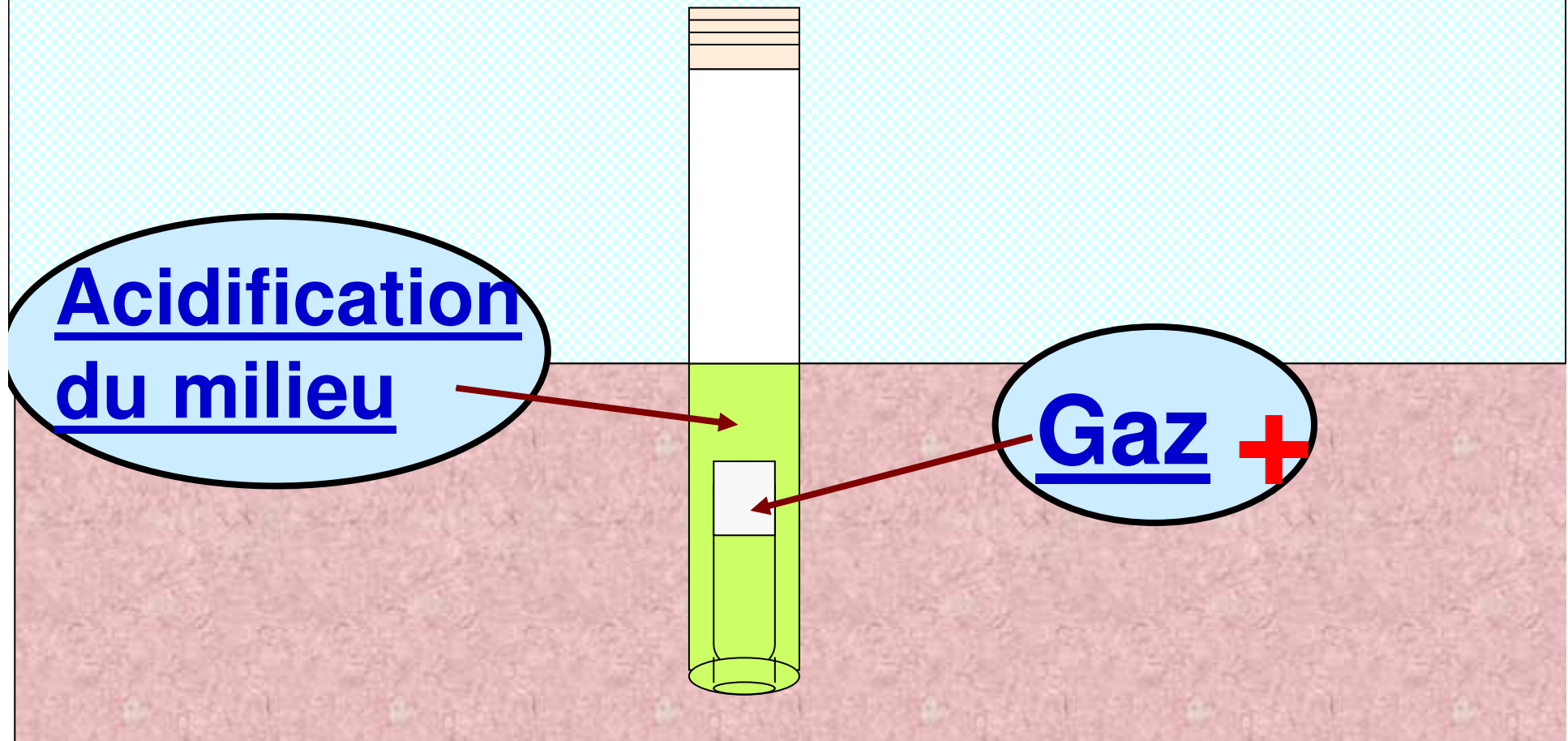


Incuber 24 - 48h à 37°C

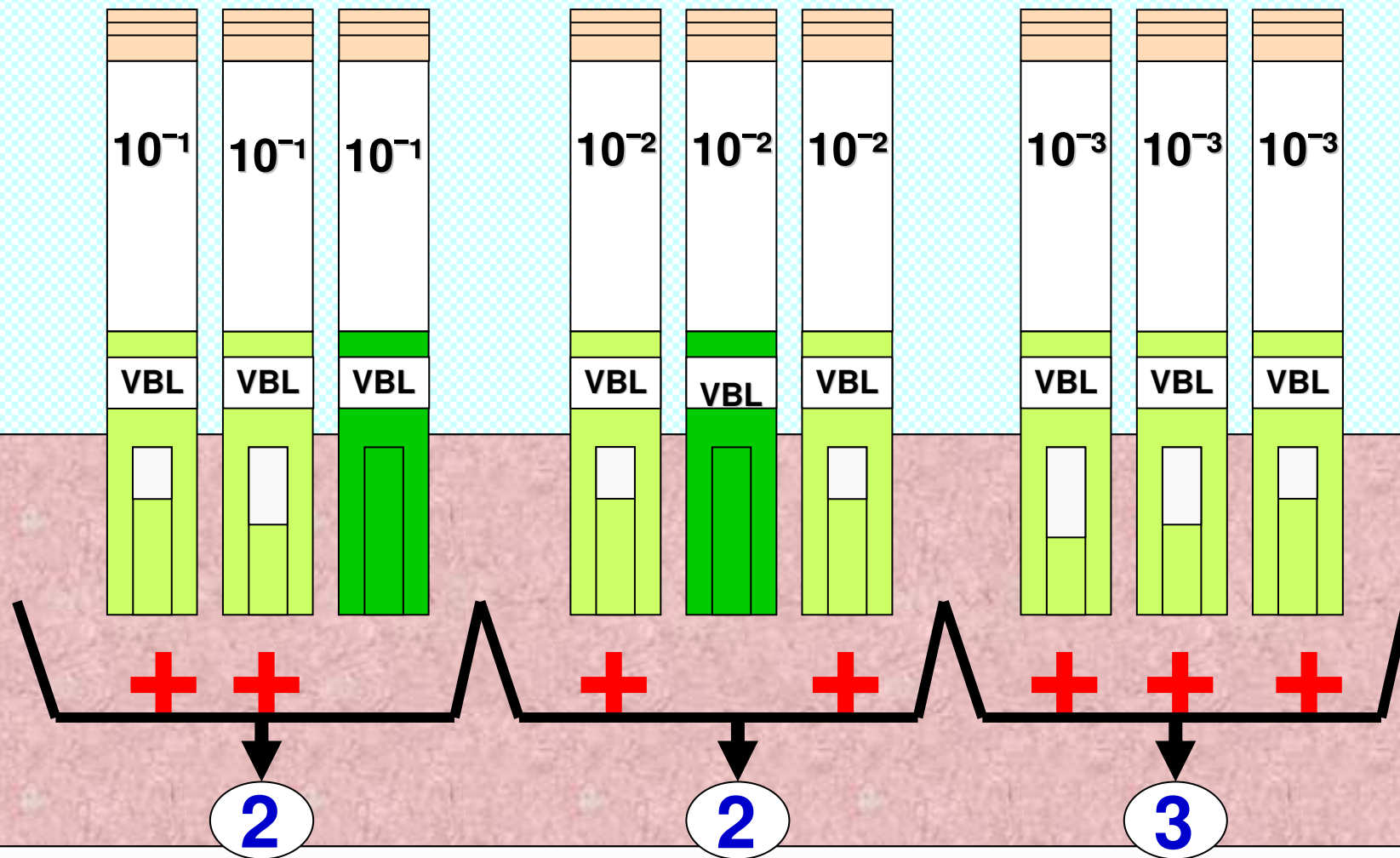
Lecture des coliformes totaux

à 37°C:

Aspect d' un tube de milieu VBL + cloche **positif.**



Noter le nombre de tubes positifs à 37°C et se référer à la table de NPP.



RECHERCHE ET DENOMBREMENT DES COLIFORMES THERMOTOLERANTS ET *Eschérichia coli*

b- Test de confirmation:

**coliformes thermotolérants ou
coliformes fécaux**

Définition:

- **Les coliformes thermotolérants ou coliformes fécaux sont un sous-groupe des coliformes totaux**
- **capables de fermenter le lactose à une température de 44°C**

Définition d' *Escherichia coli*

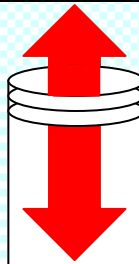
Définition:

- *Escherichia coli*: Il s'agit là de coliformes thermotolérants qui produisent , en outre , de l'indole à partir du tryptophane à 44°C .
- La bactérie *E. coli* représente toutefois 80 à 90 % des coliformes thermotolérants détectés

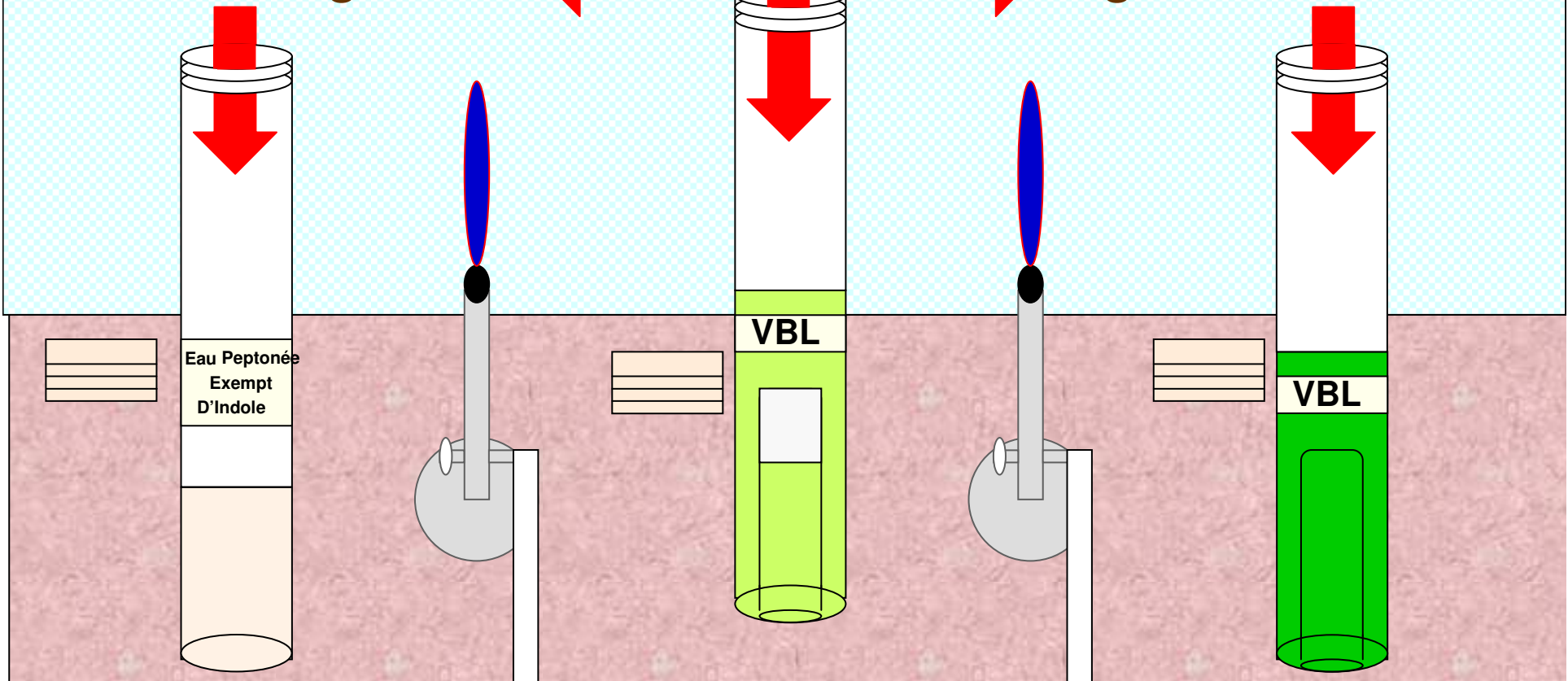
Repiquer chaque tube de milieu VBL + sur un autre tube de VBL et un tube d'Eau Peptonée

Exempt d'Indole.

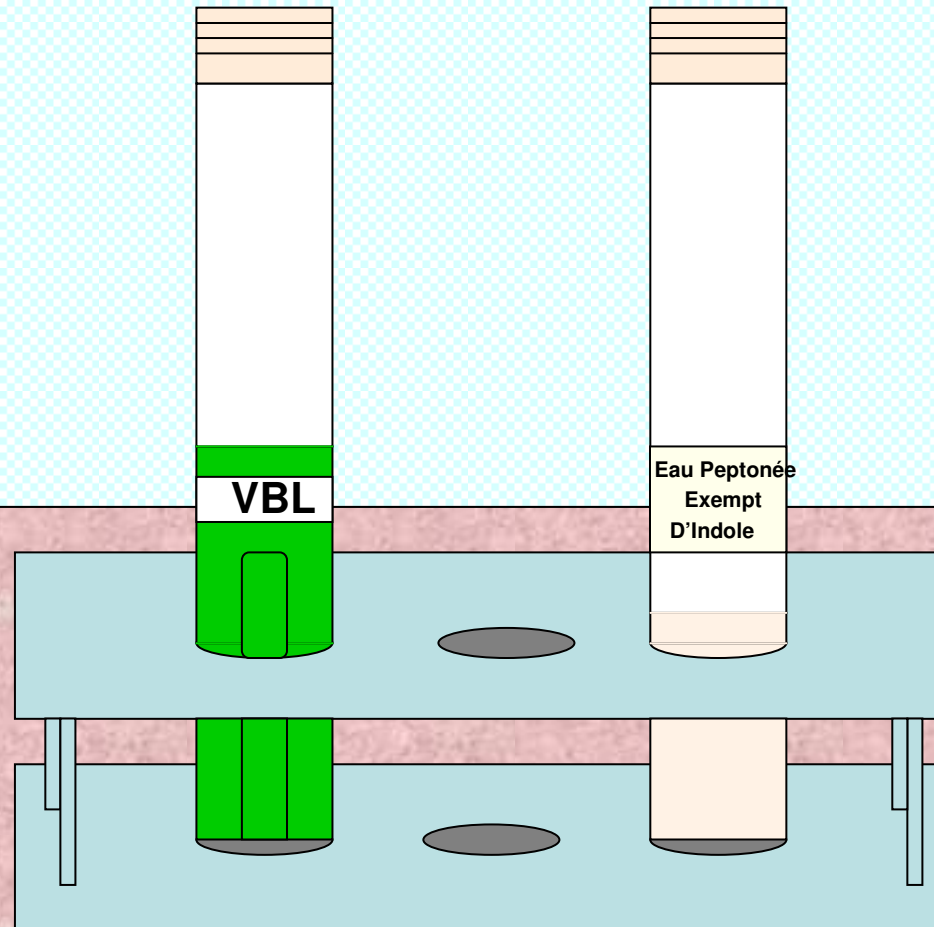
2 gouttes



2 gouttes

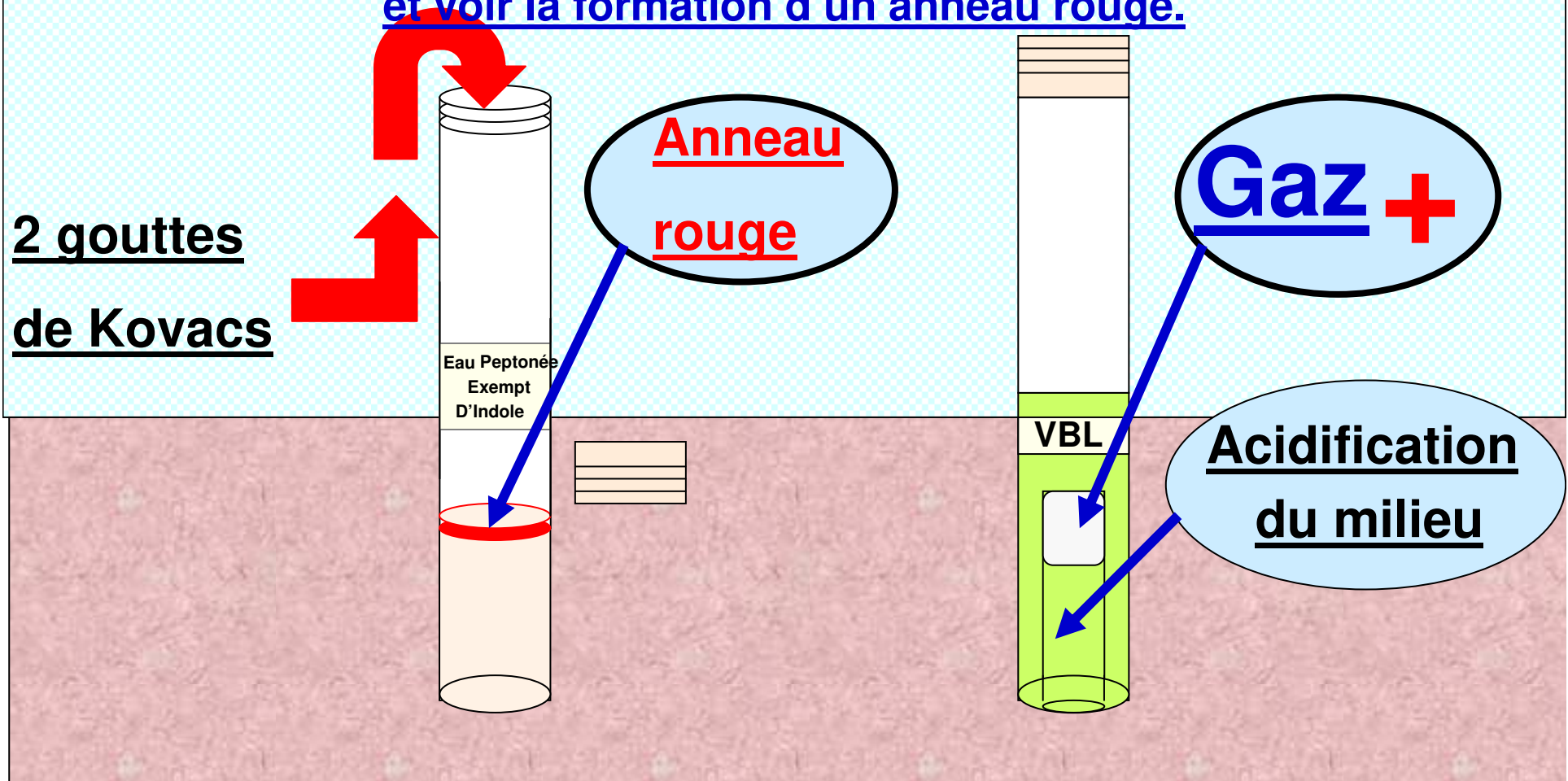


Chasser le gaz présent dans la cloche
avant l'incubation.
Incuber 24h à 44°C.



-voir acidification du milieu VBL et le dégagement de gaz dans la cloche.

-Ajouter le milieu Kovacs au tube d'Eau Peptonée Exempt d'Indole et voir la formation d'un anneau rouge.



Noter le nombre de tubes positifs
pour chaque série de dilutions et se
référer à la table de NPP.

