

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية  
République Algérienne Démocratique et Populaire

Ministère de l'Enseignement  
Supérieur et de la Recherche  
Scientifique

وزارة التعليم العالي والبحث العلمي

Université BATNA 2



جامعة باتنة 2

Faculté des Sciences de la  
Nature et de la Vie

كلية علوم الطبيعة والحياة

Département de Microbiologie  
et de Biochimie

قسم ميكروبيولوجيا وبيوكيمياء

## Polycopié pédagogique

# Travaux Pratiques de microbiologie alimentaire

Préparé par

**Dr. Lotfi LOUCIF**

Polycopié destiné aux étudiants de

Licence (spécialité/niveau) : **Microbiologie/3<sup>ème</sup> Année**

Année universitaire : 2022-2023

# Avant-propos

Ce polycopié regroupe un ensemble de travaux pratiques de la matière microbiologie alimentaire destinés essentiellement aux étudiants de la troisième année licence (L3, LMD) microbiologie. Ce document a été préparé dans l'objectif de simplifier la réalisation des travaux pratiques en question à travers la présentation de leur objectif, le matériel nécessaire, le mode opératoire ainsi que la lecture, l'interprétation et l'expression des résultats. Ces travaux pratiques ont été sélectionnés en se référant au programme de la matière pour permettre aux étudiants de se familiariser avec les techniques de laboratoire utilisées pour le contrôle microbiologique des aliments.

Ce polycopié (fichier PDF) est accessible en ligne via le lien suivant :

[http://staff.univ-batna2.dz/loucif\\_lotfi/classes/polycopi%C3%A9-des-travaux-pratiquesmati%C3%A8re-microbiologiealimentairetroisi%C3%A8me-ann%C3%A9e](http://staff.univ-batna2.dz/loucif_lotfi/classes/polycopi%C3%A9-des-travaux-pratiquesmati%C3%A8re-microbiologiealimentairetroisi%C3%A8me-ann%C3%A9e)

# Sommaire

Avant-propos

Liste des figures

Liste des tableaux

## **TP N°1 :Analyse microbiologique du lait pasteurisé**

Introduction

1. Objectif.....	1
2. Matériel/réactifs.....	1
3. Mode opératoire.....	2
3.1. Préparation de l'échantillon.....	2
3.2. Préparation des dilutions décimales.....	2
3.3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30°C.....	3
3.3.1. Expression des résultats.....	4
3.4. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux.....	4
3.4.1. Expression des résultats.....	5
a. Sélection des boîtes.....	5
b. Mode de calcul.....	5
3.5. Dénombrement de <i>Staphylococcus</i> .....	5
3.5.1. Sélection des boîtes et choix des colonies.....	6
3.5.2. Epreuve de la coagulase.....	6
a) Interprétation.....	7
3.5.3. Expression des résultats.....	7
3.6. Recherche des Salmonelles.....	7
3.6.1. Enrichissement.....	7
3.6.2. Isolement.....	8
Références bibliographiques.....	11

## **TP N°02 :Dénombrement de la flore de produits laitiers : cas du yaourt**

Introduction

1. Objectif.....	12
2. Matériel/réactifs.....	12
3. Mode opératoire.....	13

3.1. Préparation de l'échantillon.....	13
3.2. Examen microscopique.....	13
3.3. Préparation de la suspension mère.....	13
3.4. Préparation des dilutions décimales.....	14
3.5. Ensemencement.....	14
3.5.1. Isolement de <i>Streptococcus thermophilus</i> .....	14
3.5.2. Isolement de <i>Lactobacillus bulgaricus</i> .....	14
3.5.3. Incubation.....	15
3.5.4. Lecture.....	15
3.5.5. Confirmation.....	15
4. Expression des résultats.....	16
4.1. Méthode de calcul.....	16
4.2. Exemple de calcul.....	17
Références bibliographiques.....	19

### **TPN° 3 : recherche de *Listeria monocytogenes* dans le fromage**

#### Introduction

1. Objectif .....	20
2. Matériel/réactifs.....	20
3. Mode opératoire.....	21
3.1. Enrichissement primaire et secondaire.....	21
3.2. Isolement primaire et sélection des colonies pour confirmation.....	21
3.3. Tests de confirmation.....	23
3.3.1. Observation morphologique des colonies.....	23
3.3.2. Test de catalase.....	24
a) Interprétation.....	25
3.3.3. Test d'hémolyse.....	26
a) Interprétation.....	26
3.3.4. CAMP test.....	26
3.3.4.1. Principe.....	26
3.3.4.2. Technique.....	27
3.3.4.3. Interprétation.....	27
4. Expression des résultats.....	28
Références bibliographiques.....	31

## **TPN°4 : Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes dans les glaces et crèmes glacées**

Introduction	
1. Objectif .....	32
2. Matériel/réactifs.....	32
3. Mode opératoire.....	34
3.1. Technique de prélèvement.....	34
3.2. Préparation des dilutions.....	34
3.3. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes.....	34
3.4. Mise en évidence de la coagulase.....	34
3.4.1. Principe.....	34
3.4.1.1. Technique de la coagulase libre.....	35
a) Interprétation.....	35
3.4.1.2. Technique de la coagulase liée.....	36
a) Interprétation.....	37
3.5. Mise en évidence de la phosphatase.....	37
3.5.1. Technique.....	37
a) Interprétation.....	38
3.5.2. Autre technique de mise en évidence de la phosphatase.....	38
3.5.2.1. Première technique.....	38
a) Interprétation.....	38
3.5.2.2. Ensemencement sur Baird-Parker.....	38
a) Interprétation.....	39
3.6. Recherche de type respiratoire.....	39
Interprétation.....	39
Références bibliographiques.....	42

## **TPN°5 : Recherche de la flore d'altération de la viande (*Pseudomonas aeruginosa*)**

Introduction	
1. Objectif.....	43
2. Matériel/réactifs.....	44
3. Mode opératoire.....	44

3.1. Prélèvement.....	44
3.2. Préparation de la suspension mère.....	45
3.3. Préparation des dilutions décimales.....	45
3.4. Ensemencement.....	46
4. Comptage et sélection des colonies.....	47
4.1. Confirmation.....	47
4.1.1. Recherche de l'oxydase.....	47
4.1.2. Interprétation.....	48
5. Expression des résultats.....	48
Références bibliographiques.....	50

## **TPN° 6 : détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau de robinet après filtration sur membrane**

### Introduction

1. Objectif.....	51
2. Principe de filtration sur membrane.....	52
3. Matériel/réactifs.....	52
4. Mode opératoire.....	52
4.1. Méthode de prélèvement.....	52
4.2. Filtration sur membrane.....	53
4.3. Dénombrement des colonies.....	53
4.4. Confirmation.....	53
4.4.1. Test oxydase.....	55
a) Interprétation.....	55
4.4.2. Milieu de King B.....	56
4.4.3. Bouillon d'acétamide.....	56
5. Dénombrement des colonies.....	56
6. Expression des résultats.....	57
Références bibliographiques.....	58

## **TPN° 7 : dénombrement des coliformes en milieu liquide (cas de l'eau de robinet)**

### Introduction

1. Objectif.....	59
2. Principe.....	59
3. Matériel/réactifs.....	60
4. Mode opératoire.....	61
4.1. Prélèvement.....	61
4.2. Technique.....	61
4.2.1. Préparation de dilutions décimales.....	61
4.2.2. Test présomptif.....	61
4.2.3. Test de confirmation.....	62
4.3. Interprétation des résultats.....	63
4.4. Calcul et expression des résultats.....	63
5. Dénombrement d' <i>Escherichia coli</i> présumés.....	63
5.1. Culture et incubation du milieu sélectif (bouillon EC).....	63
5.2. Inoculation et incubation de l'eau peptonée exempte d'indole.....	64
5.3. Test de la production d'indole.....	64
5.4. Interprétation.....	64
Références bibliographiques.....	65

## **TP N°8 : Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices (clostridia)**

### Introduction

1. Objectif.....	66
2. Principe.....	66
3. Matériel/réactifs.....	67
4. Mode opératoire.....	67
4.1. Méthode par enrichissement en milieu liquide.....	67
4.1.1. Sélection des spores.....	67
4.1.2. Inoculation et incubation.....	67

4.1.3. Interprétation.....	68
4.1.4. Expression des résultats.....	68
4.2. Méthode par incorporation en gélose.....	68
4.2.1. Destruction des formes végétatives.....	68
4.2.2. Préparation du milieu.....	68
4.2.3. Inoculation et incubation.....	69
4.2.4. Lecture et expression des résultats.....	69
Références bibliographiques	

## Liste des figures

<b>Figure 1</b> : schéma explicatif de la méthode de préparation des dilutions décimales.....	3
<b>Figure 2</b> : schéma explicatif de la méthode d'ensemencement dans la masse.....	4
<b>Figure 3</b> : schéma explicatif de la méthode d'isolement de <i>S. aureus</i> .....	6
<b>Figure 4</b> : schéma explicatif du principe du test de coagulase.....	7
<b>Figure 5</b> : aspect des colonies de <i>Salmonella</i> sur la gélose au sulfite de bismuth.....	9
<b>Figure 6</b> : technique d'ensemencement du bouillon d'enrichissement.....	21
<b>Figure 7</b> : aspect macroscopique des colonies de <i>Listeria</i> sur milieu PALCAM.....	22
<b>Figure 8</b> : schéma explicatif de la méthode de purification.....	22
<b>Figure 9</b> : schéma explicatif d'un examen après coloration de Gram.....	24
<b>Figure 10</b> : observation microscopique de <i>Listeria</i> spp. après une coloration de Gram.....	24
<b>Figure 11</b> : schéma explicatif du test de la catalase.....	25
<b>Figure 12</b> : résultat du test de la catalase.....	25
<b>Figure 13</b> : schéma explicatif du test d'hémolyse.....	26
<b>Figure 14</b> : ensemencement des boîtes pour le CAMP test.....	27
<b>Figure 15</b> : résultat du CAMP test.....	28
<b>Figure 16</b> : schéma explicatif du test de la coagulase libre.....	35
<b>Figure 17</b> : résultat du test de la coagulase libre.....	36
<b>Figure 18</b> : schéma explicatif du test de la coagulase liée.....	36
<b>Figure 19</b> : résultat du test de la coagulase liée. A : coagulase négative, B : coagulase positive .....	37
<b>Figure 20</b> : les différents types respiratoires.....	39
<b>Figure 21</b> : exemple de gabarit.....	45
<b>Figure 22</b> : schéma explicatif de la méthode d'isolement de <i>P. aeruginosa</i> .....	46
<b>Figure 23</b> : schéma explicatif du test de l'oxydase.....	47
<b>Figure 24</b> : schéma explicatif de la technique de filtration sur membrane.....	54
<b>Figure 25</b> : schéma explicatif du test de l'oxydase.....	55
<b>Figure 26</b> : résultat du test de l'oxydase.....	55
<b>Figure 27</b> : schéma explicatif de la méthode d'ensemencement du milieu King B.....	56
<b>Figure 28</b> : schéma explicatif du test présomptif sur BCPL.....	62
<b>Figure 29</b> : résultats après incubation du test confirmatif du test NPP.....	63

<b>Figure 30</b> : résultat du test d'indole.....	64
<b>Figure 31</b> : résultat positif de la mise en évidence de la présence des spores sulfito-réductrice sur le milieu VF .....	69

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1 :</b> normes algériennes (critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires : lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés).....	9
<b>Tableau 2 :</b> caractéristiques de <i>Listeria</i> selon la norme EN/ISO 11290-1.....	28
<b>Tableau 3 :</b> critères microbiologiques applicables pour <i>L. monocytogenes</i> .....	29
<b>Tableau 4 :</b> critères microbiologiques applicables aux laits et produits laitiers.....	40
<b>Tableau 5 :</b> critères microbiologiques applicables à la viande et aux produits carnés.....	48
<b>Tableau 6 :</b> étapes requises pour la confirmation des colonies se développant sur la gélose cétrimide.....	57

## TP N°1 : Analyse microbiologique du lait pasteurisé

### Introduction

Le lait est un aliment hautement nutritif en raison de sa richesse en plusieurs composés à savoir : glucides, lipides, protéines, sels minéraux et vitamines, mais peut néanmoins causer un danger pour le consommateur lorsqu'il renferme des microorganismes pathogènes ou d'altérations capables d'abaisser significativement sa qualité sanitaire et commerciale, respectivement. La qualité du lait peut être affectée par de nombreux facteurs tels que les contaminations au cours et après la traite et la présence d'infections mammaires ainsi que l'adultération. Le contrôle microbiologique du lait pasteurisé est indispensable, car la plupart s'imaginent, à tort, que tout lait pasteurisé peut être consommé sans danger.

Les contrôles officiels au niveau des marchés se limitent à la constatation des falsifications ou simplement les altérations visibles à l'œil nu. Ces contrôles doivent être suivis par le contrôle microbiologique au laboratoire. Les germes concernés sont : les microorganismes aérobies à 30°C (Flore Totale Aérobie Mésophile, FTAM), coliformes totaux et fécaux, *Staphylococcus aureus* et Salmonelles.

### 1. Objectif

Dénombrement et identification des microorganismes recherchés pour le contrôle microbiologique du lait pasteurisé.

### 2. Matériel/réactifs

- Etuve bactériologique.
- Portoir pour tubes à essai.
- Tubes à essai en verre (16 x 160 mm).
- Tube à hémolyse.
- Boîtes de Pétri.
- Agitateur Vortex.
- Étaleur en verre.
- Anse de platine.
- Pipette Pasteur.

- Pipette graduée.
- Poire de sécurité.
- Alcool à 70°.
- Bouillon tryptone-sel.
- Plasma du lapin.
- Bouillon cœur-cervelle.
- Bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant.
- Gélose de dénombrement (PCA).
- Gélose lactosée à 0,5% de désoxycholate de sodium.
- Gélose Baird Parker.
- Gélose au vert brillant et au rouge de phénol.
- Gélose au sulfite de Bismuth.
- Lait écrémé à 1%.

### **3. Mode opératoire**

#### **3.1. Préparation de l'échantillon**

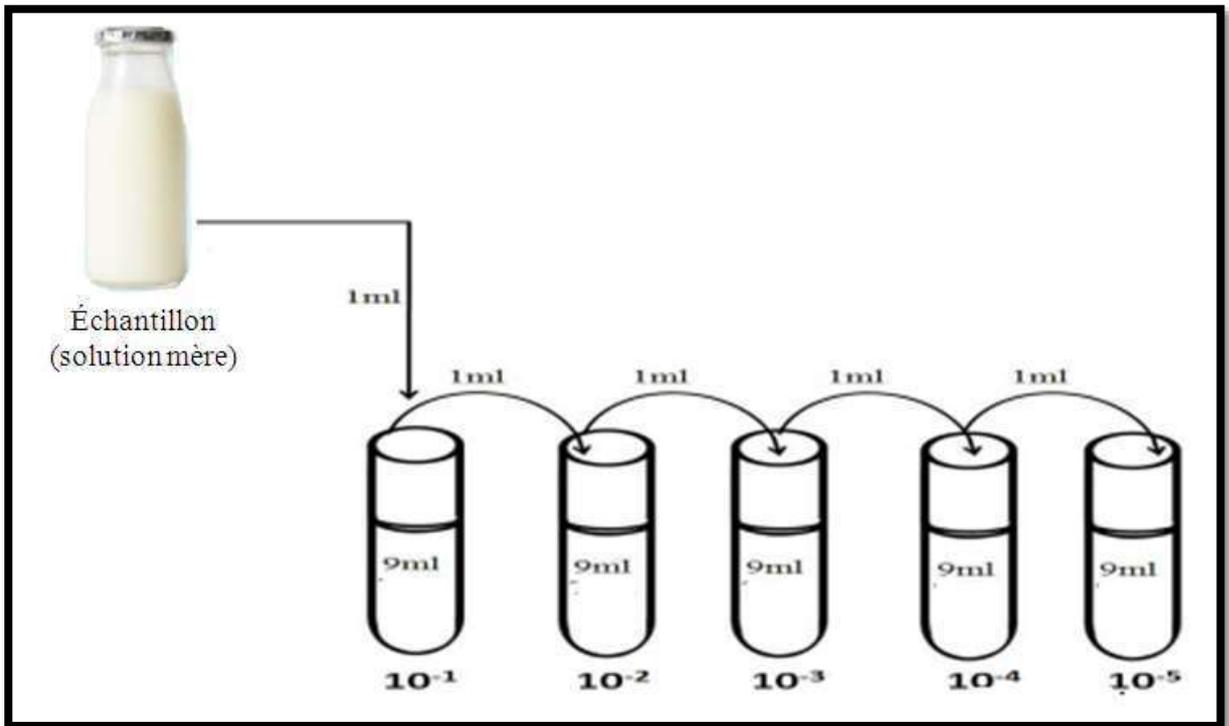
Une étape d'homogénéisation de l'échantillon est nécessaire avant chaque analyse afin de garantir une répartition uniforme des microorganismes. Par exemple, agiter soigneusement en inversant rapidement 25 fois le préemballage tout en évitant la formation de la mousse. Désinfecter la surface d'ouverture à l'alcool, puis ouvrir aseptiquement le préemballage. Procéder à l'analyse bactériologique dans un délai n'excédant pas trois minutes. L'échantillon doit être conservé à 6°C jusqu'au moment de l'analyse.

#### **3.2. Préparation des dilutions décimales**

La préparation des dilutions décimales est réalisée dans du tryptone-sel comme diluant (peptone pancréatique de caséine (tryptone) 1 g/l, chlorure de sodium 8,5 g/l).

Au moment de l'emploi, répartir aseptiquement le diluant stérile à raison de 9 ml dans des tubes stériles. Une dilution au 1/10 est obtenue en transférant aseptiquement 1 ml du lait à l'aide d'une pipette graduée de 1 ml stérile dans 9 ml du diluant à une température ambiante. Une dilution au 1/100 est obtenue en transférant 1 ml de la dilution au 1/10 à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 ml stérile dans un deuxième tube de diluant. Procéder de la même

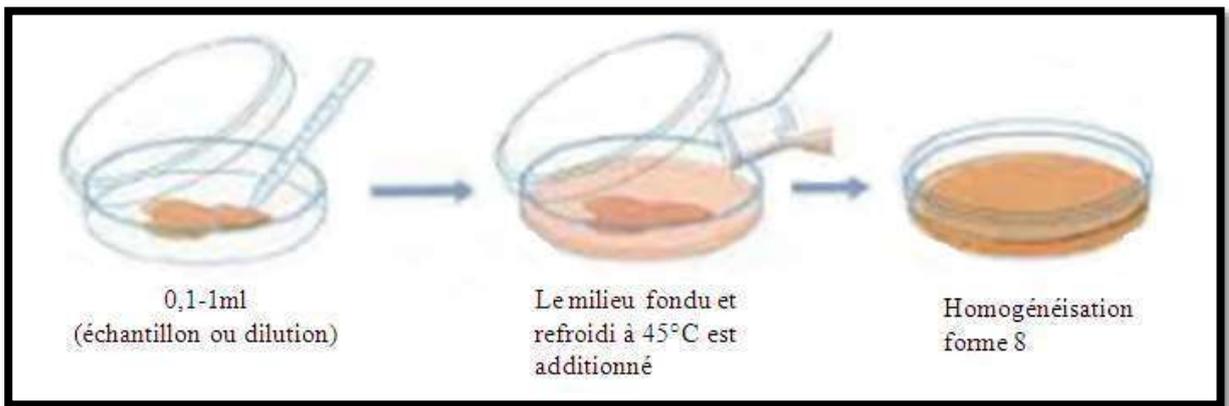
manière pour les dilutions suivantes (figure 1). Homogénéiser soigneusement chacune des dilutions pendant 5 à 10 secondes à l'aide d'un agitateur Vortex au moment de leur préparation et avant les ensemencements.



**Figure 1** : schéma explicatif de la méthode de préparation des dilutions décimales.

### 3.3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30°C

Transférer 1 ml des dilutions sélectionnées dans des boîtes de Pétri vides et stériles (trois exemplaires). Couler 12 à 15 ml de la gélose de dénombrement (PCA) additionnée du lait écrémé à 1% (peptone pancréatique de caséine (tryptone) 5 g/l, extrait de levure déshydratée 2,5 g/l, glucose anhydre 1g/l, lait écrémé en poudre exempt de substances inhibitrices 10 g/l ou lait écrémé exempt de substances inhibitrices 10 ml/l, agar-agar 12 à 18 g/l), fondue au préalable puis refroidie à une température de 45°C dans un bain-marie (figure 2). Homogénéiser soigneusement. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et plane. Incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ± 1 pendant 72h ± 2h. Le temps entre la préparation des dilutions et l'ensemencement dans la masse ne doit pas excéder 15 minutes.



**Figure 2 :** schéma explicatif de la méthode d'ensemencement dans la masse.

### 3.3.1. Expression des résultats

Les boîtes de pétri prises en considération pour le dénombrement sont uniquement celles présentant entre 10 et 300 colonies. Il est préférable d'utiliser un compteur de colonie muni d'une loupe.

Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre du lait à l'aide de la formule suivante :  $\sum c / (n1 + 0,1 \times n2) \times d$

c : somme totale des colonies comptées.

n1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de la première dilution.

Exemple :

Dilution  $10^{-1}$  : 252 (1<sup>ière</sup> boîte) et 264 colonies (2<sup>ième</sup> boîte)

Dilution  $10^{-2}$  : 26 (1<sup>ière</sup> boîte) et 30 colonies (1<sup>ière</sup> boîte)

Nombre/ml :  $252+264+26+30 / (2+0,1 \times 2) \times 10^{-1} = 572 / 0,22 = 2600 = 2,6 \times 10^3$  UFC/ml.

(UFC : Unité Formant Colonie).

Le résultat final du dénombrement doit être exprimé en un nombre arrondi à deux chiffres significatifs. Lorsque le chiffre qui doit être arrondi est 5. Arrondir de sorte que la valeur indiquée juste à gauche soit paire.

### 3.4. Dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux

Transférer en double exemplaire 1 ml du lait et 1 ml de la dilution à 1/10 dans deux boîtes de Pétri vides et stériles. Couler 12 ml de la gélose lactosée à 0,5% de désoxycholate

de sodium (peptone 10 g/l, lactose 10 g/l, désoxycholate de sodium 0,5 g/l, chlorure de sodium 5 g/l, citrate de sodium 2 g/l, agar agar 12 à 15 g/l, rouge neutre 0,03 g/l). Homogénéiser soigneusement. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et plane. Après solidification du milieu, couler environ 4 ml du milieu non ensemencé puis laisser solidifier à nouveau. Incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C pendant 24 heures pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

### **3.4.1. Expression des résultats**

#### **a. Sélection des boîtes**

Les boîtes de pétri prises en considération pour le comptage sont uniquement celles présentant moins de 150 colonies caractéristiques avec une taille d'au moins 0,5 mm de diamètre et de couleur rouge foncé.

#### **b. Mode de calcul**

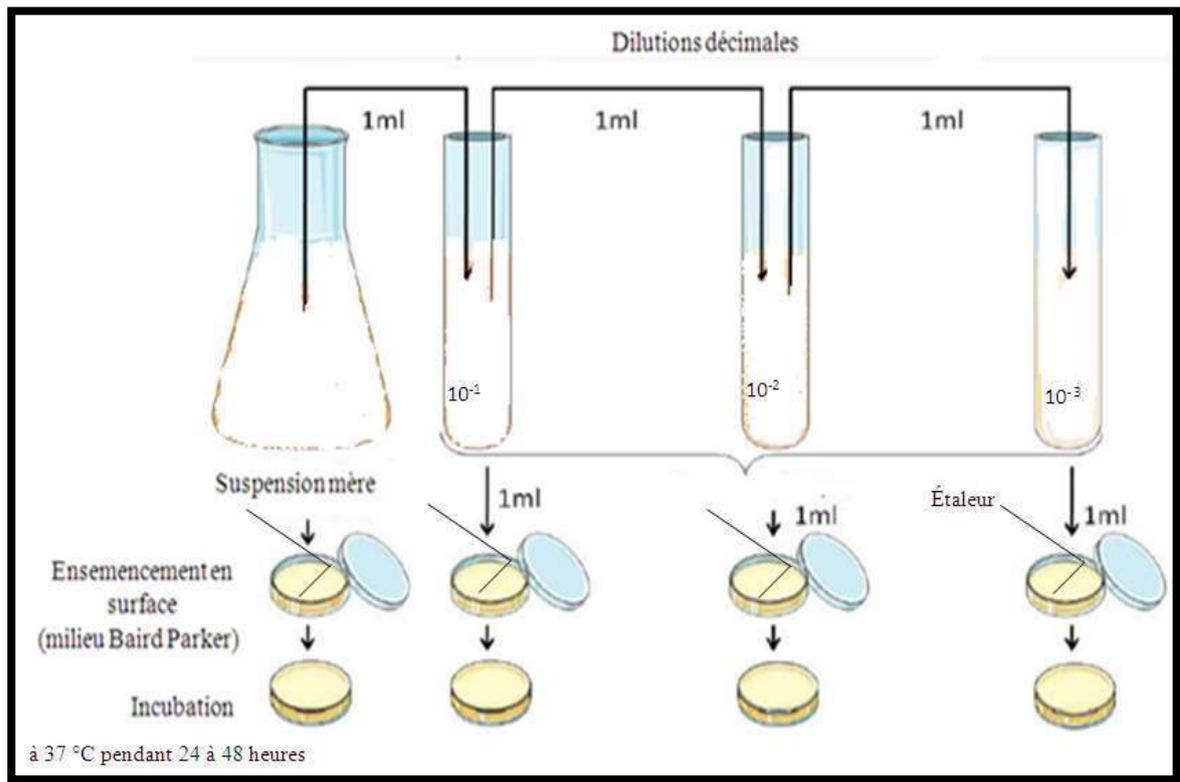
Exprimer le résultat des coliformes par millilitre de lait analysé après avoir calculé la moyenne arithmétique des colonies comptées sur les boîtes retenues.

Le résultat est la moyenne arithmétique des valeurs issues de l'analyse de 1 ml du lait et la dilution décimale sauf lorsque le rapport de la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce cas, prendre en considération la valeur la plus faible comme résultat final.

Si les valeurs prises en considération sont celles de la dilution décimale, multiplier par l'inverse du facteur de dilution. Le résultat peut être donné sous forme d'un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10<sup>x</sup>, où «x» est la puissance de 10 appropriée.

### **3.5. Dénombrement de *Staphylococcus***

Répartir 1 ml du lait à analyser à la surface du milieu Baird Parker (Peptone pancréatique de caséine (tryptone) 10 g/l, extrait de levure 1 g/l, extrait de viande 5 g/l, glycine 12 g/l, chlorure de lithium 5 g/l, agar-agar 12 à 20 g/l) en trois exemplaires (trois boîtes de Pétri), puis étaler en utilisant le même étaleur pour les trois boîtes (figure 3). Attendre 15 minutes avant d'incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 37 °C pendant 24 à 48 heures.



**Figure 3** : schéma explicatif de la méthode d'isolement de *S. aureus*.

### 3.5.1. Sélection des boîtes et choix des colonies

Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 90 mm. Après 24 et 48 heures d'incubation. Les colonies caractéristiques présentent la description suivante :

Colonies noires, convexes, brillantes, entourées d'une zone transparente ou translucide avec un anneau opalescent sont apparues sur la surface des boîtes.

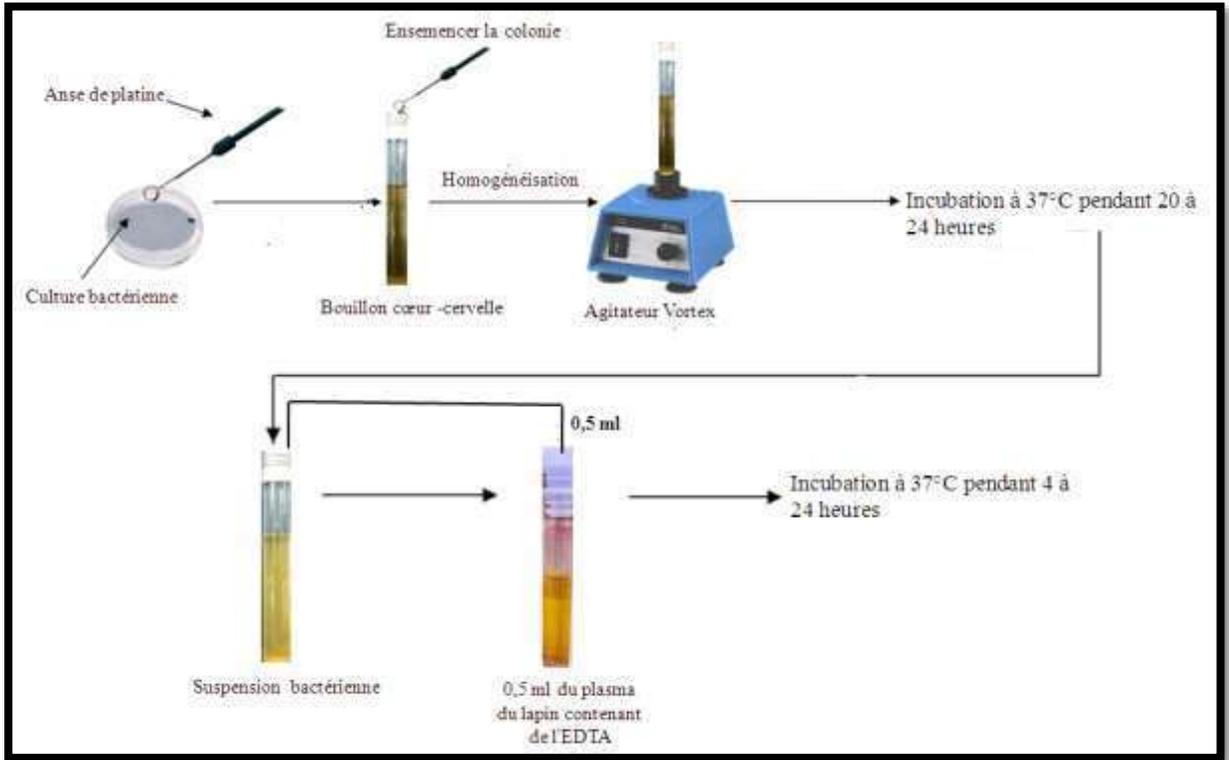
Pour le test de la coagulase, prélever cinq colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques au maximum.

### 3.5.2. Epreuve de la coagulase

Prélever une colonie typique ou atypique retenue à l'aide d'une anse de platine et transférer dans un tube de bouillon cœur-cervelle (protéose-peptone 10g/l, infusion de cervelle de veau 12.5 g/l, infusion de cœur de bœuf 5 g/l, chlorure de sodium 5 g/l, phosphate disodique 2,5 g/l, glucose 2 g/l). Incuber le tube dans une étuve à 37°C durant 20 à 24 heures.

Introduire 0,5 mL du plasma du lapin contenant de l'EDTA (acide éthylène diamine tétra-acétique) à une concentration finale de 0,1 % dans un tube à hémolyse avec 0,5 mL du

bouillon cœur-cerveille. Incuber les boîtes à 37°C et vérifier la coagulation du plasma après 4 à 24h (figure 4).



**Figure 4** : schéma explicatif du principe du test de la coagulase.

#### a) Interprétation

Le résultat positif se traduit par la formation d'un coagulum qui occupe plus des trois quarts du volume initial.

#### 3.5.3. Expression des résultats

Si au moins 80 % des colonies testées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies comptées correspond à *Staphylococcus aureus*, sinon, exprimer le résultat global en tenant compte des proportions (colonies caractéristiques et colonies non caractéristiques). Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10 x, « x » étant la puissance de 10 appropriée.

### 3.6. Recherche des Salmonelles

#### 3.6.1. Enrichissement

L'étape de pré-enrichissement n'est pas nécessaire. Ajouter aseptiquement 25 ml du lait à 225 ml du bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant (extrait de

viande 5 g/l, peptone 10g/l, chlorure de sodium 3g/l, carbonate de calcium 45g/l); incuber à 43 °C± 0,5 pendant 18 à 24 heures.

### 3.6.2. Isolement

L'isolement est réalisé à partir du bouillon d'enrichissement. Ensemencer en surface à l'aide d'une anse deux milieux sélectifs solides. Utiliser la gélose au vert brillant et au rouge de phénol (extrait de viande 5 g/l, peptone 10 g/l, extrait de levure 3 g/l, phosphate disodique 1 g/l, phosphate monosodique 600 mg/l, saccharose 10 g/l, lactose 10 g/l, rouge de phénol 90 mg/l, vert brillant 5 mg/l, agar 12 g/l) et la gélose au sulfite de Bismuth (Peptone 10 g/l, extrait de bœuf 5 g/l, glucose 5,0 g, hydrogène-orthophosphate disodique 4,0 g/l, sulfate de fer (II) 0,3 g/l, citrate de bismuth d'ammonium 1,85 g/l, sulfite de sodium 6,15 g/l, vert brillant 0,025 g/l, agar-agar 20,0 g/l).

Déposer le bouillon d'enrichissement et les boîtes retournées dans une étuve à 37 ± 1°C pendant 18 à 24 heures et 20 à 24 heures, respectivement.

Après incubation, répéter les étapes d'ensemencement et d'incubation déjà décrites au-dessus. La lecture se fait par examination des boîtes après incubation afin de rechercher la présence des colonies typiques du genre *Salmonella*. Dans le cas où le développement est insuffisant, prolonger l'incubation pendant 18 à 24 heures.

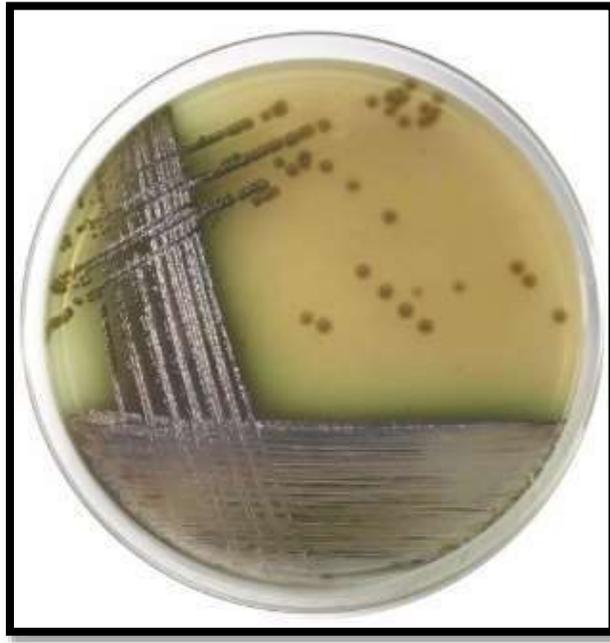
Les colonies typiques de *Salmonella* peuvent être caractérisées comme suit :

**a-** sur gélose au vert brillant/rouge de phénol :

Colonies roses à bords rouges.

**b-** sur gélose au sulfite de bismuth :

Colonies brunes ou noires avec un éclat métallique. Certaines souches donnent des colonies vertes (figure 5).



**Figure 5** : aspect des colonies de *Salmonella* sur la gélose au sulfite de bismuth.

À partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs utilisés prélever 5 colonies typiques ou suspectes pour confirmation de l'identification après caractérisation à l'aide des galeries biochimiques classiques et tests sérologiques.

Les critères microbiologiques applicables au lait pasteurisé et autres produits laitiers sont présentés dans le tableau 1.

**Tableau 1** : normes algériennes (critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires : lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés) (4).

Catégories des denrées alimentaires	Microorganismes	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
		n	c	m	M
Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés	Germes aérobies à 30°C	5	2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
	Enterobacteriaceae	5	0	10	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml	

- **n** : nombre d'unité constituant l'échantillon.
- **m** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.
- **M** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable.
- **c** : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

### Références bibliographiques

- [1] Aggad H, Mahouz F, Ahmed Ammar Y, Kihal M. Evaluation de la qualité hygiénique du lait dans l ouest algérien. Rev Méd Vét 2009;160:590-595.
- [2] Bonnefoy C: Microbiologie et qualité dans les industries agro-alimentaires. Doin, 2002. p 85.
- [3] Guiraud JP: *Microbiologie alimentaire*. Dunod, Paris. 2003.p 652.
- [4] Journal officiel de la république Algérienne N° 70 du 24 Ramadhan 1425 correspondant au 7 novembre 2004. Arrêté du 26 Rajab 1425 correspondant au 11 septembre 2004 rendant obligatoire une méthode de contrôle microbiologique pour le lait pasteurisé. Partie annexe.
- [5] Journal officiel de la république Algérienne N° 39 du 08 Chaoual 1438 correspondant au 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires. Annexe 1.

## **TP N°02 : dénombrement de la flore de produits laitiers : cas du yaourt**

### **Introduction**

Le yaourt est un produit laitier à texture lisse avec une saveur douce, aigre et agréable. Il résulte de la fermentation lactique de *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* se trouvant en nombre considérable dans le produit fini. Ce dernier présente une meilleure valeur nutritionnelle avec des propriétés probiotiques assurées par les ferments lactiques en question à savoir les fonctions immuno-régulatrices.

### **1. Objectif**

Dénombrement de la flore lactique du yaourt.

### **2. Matériel/réactifs**

- Etuve bactériologique.
- Microscope optique.
- Boîtes de Pétri.
- Agitateur.
- Portoir pour tubes à essai.
- Lame.
- Tubes à essai (16 x 160 mm).
- Scalpel stérile.
- Pipettes graduées (1ml).
- Poire de sécurité.
- Éthanol 70°.
- Bleu de méthylène.
- Hydrolysats trypsiques de caséine.
- Hydrolysats trypsiques de viande.

- Gélose M17.
- Gélose MRS acidifié.

### 3. Mode opératoire

#### 3.1. Préparation de l'échantillon

Premièrement, il faut désinfecter la surface extérieure du pot de yaourt avec de l'éthanol à 70% (V/V) avant d'ouvrir le pot pour éviter toute contamination. Dans le cas du yaourt sans fruits ; mélanger avec soin le contenu du pot de yaourt à l'aide d'une spatule stérile puis peser  $10 \pm 0,1$  g de l'échantillon de yaourt dans un récipient stérile et tarré. Dans le cas du yaourt aux fruits ; agiter le contenu total d'une boîte du yaourt pendant 1 minute en utilisant un agitateur puis peser  $10 \pm 0,1$  g de l'échantillon.

Durant cette étape, il est nécessaire d'obtenir non seulement une suspension homogène, mais aussi une fragmentation des chaînes de lactobacilles et de streptocoques en cellules isolées ou en courtes chaînes, donc les résultats obtenus soient reproductibles et représentatifs (nombre total des bactéries/gramme du produit).

#### 3.2. Examen microscopique

Pour estimer d'une manière grossière la densité de *Streptococcus thermophilus* et de *Lactobacillus bulgaricus* et décider ainsi la gamme appropriée de dilutions à utiliser pour le dénombrement de chaque bactérie, effectuer une observation microscopique préliminaire à partir d'un frottis de l'échantillon du yaourt, préalablement coloré au bleu de méthylène (par exemple à l'aide d'une solution éthanolique de bleu de méthylène ayant une concentration de 6 g/l).

#### 3.3. Préparation de la suspension mère

Ajouter le diluant contenant de la peptone 1 : hydrolysate tryptique de caséine (0,5g/l) et peptone 2 : hydrolysate tryptique de viande (0,5 g/l) jusqu'à ce que la masse du yaourt

prélevé et du diluant soit de 50 g puis agiter le mélange pendant 1 minute à l'aide d'un agitateur. Après homogénéisation, compléter le volume à 100 g en utilisant le même diluant.

### 3.4. Préparation des dilutions décimales

À partir de la première dilution  $10^{-1}$ , une série de dilutions décimales est réalisée où 1 ml de la dilution précédente est transféré dans 9 ml du diluant à l'aide d'une nouvelle pipette graduée stérile jusqu'à ce que la série de dilutions nécessaires soit obtenue.

### 3.5. Ensemencement

#### 3.5.1. Isolement de *Streptococcus thermophilus*

Transférer 1 ml de chaque dilution sélectionnée dans des boîtes de Pétri vides et stériles (2 exemplaires par dilution au minimum) puis, verser 12 à 15 ml du milieu M17 (hydrolysate tryptique de caséine 2,50 g/950 ml, hydrolysate peptique de viande 2,50g/950 ml, hydrolysate papaénique de soja 5,00 g/950 ml, extrait de levure déshydratée 2,50g/950 ml, extrait de viande 5,00g/950 ml,  $\beta$ -glycérophosphate (sel disodique) 19,00 g/950 ml, sulfate de magnésium heptahydraté 0,25 g/950 ml, acide ascorbique 50 g/950 ml, agar-agar 9-18 g/950 ml) fondu, et maintenu à 45°C dans les boîtes de Pétri préalablement inoculées. Homogénéiser soigneusement l'inoculum avec le milieu et laisser solidifier sur une surface fraîche et plane.

#### 3.5.2. Isolement de *Lactobacillus bulgaricus*

Transférer 1 ml de chaque dilution dans des boîtes de Pétri vides et stériles (2 exemplaires par dilution au minimum) puis, verser 12 à 15 ml du milieu MRS acidifié (peptone 10 g/l, extrait de viande 10 g/l, extrait de levure déshydraté 5 g/l, glucose 20 g/l, tween 80 1 ml/l, hydrogène-orthophosphate dipotassique 2g/l, acétate de sodium, trihydraté 2g/l, citrate d'ammoniaque 2g/l, sulfate de magnésium heptahydraté 0,2 g/l, sulfate de manganèse tétrahydraté 0,05 g/l, agar-agar 9-18 g/l) fondu et refroidi à une température de

45° C. Homogénéiser soigneusement l'inoculum avec le milieu et laisser solidifier sur une surface fraîche et plane.

### 3.5.3. Incubation

- a. *Strptococcus thermophilus*, incuber les boîtes à  $37 \pm 1^\circ \text{C}$  pendant 48h.
- b. *Lactobacillus bulgaricus*, incuber les boîtes à  $37^\circ\text{C}$  pendant 72h en anaérobiose dans un incubateur anaérobie ou en une atmosphère anaérobie créée par les générateurs d'anaérobiose comme les gaz pack.

### 3.5.4. Lecture

Après incubation, compter les colonies présentant les caractéristiques de chacun des deux bactéries sur les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies.

- a. *Strptococcus thermophilus* : des colonies lenticulaires de 1 à 2 mm de diamètre.
- b. *Lactobacillus bulgaricus*: des colonies de 1 à 3 mm de diamètre, lenticulaires généralement en forme d'étoile.

Le comptage des colonies doit être effectué sous une lumière tamisée, pour faciliter le comptage, on peut utiliser un compteur approprié. Eviter d'embrouiller des matières précipitées ou des particules non dissoutes d'échantillon avec des colonies de la taille d'une pointe d'épingle. Examiner les colonies douteuses obtenues en utilisant une loupe de grossissement, afin de différencier entre les colonies et les particules étrangères. Procéder à des dilutions dans le cas où le nombre de colonies dépasse 300.

### 3.5.5. Confirmation

Le nombre de colonies à sélectionner dans les différentes boîtes utilisées pour le comptage est égal à la racine carrée du nombre total de colonies obtenues.

Pour confirmer les colonies caractéristiques des deux bactéries, réaliser une coloration de Gram pour ces colonies et confirmer qu'elles se présentent sous forme de bâtonnets

généralement courts mais quelquefois de forme allongée, non sporulés, Gram positif, dans les cas des cultures sur milieu MRS pour *L. bulgaricus* et qu'elles forment des cellules sphériques ou ovoïdes par paires ou en chaînes longues, Gram-positif, dans le cas des cultures sur milieu M17 pour *S. thermophilus*.

## 4. Expression des résultats

### 4.1. Méthode de calcul

Calculer le nombre de micro-organismes par gramme d'échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$\sum C / (n_1 + 0,1n_2) \times d$$

$\sum C$  : la somme des colonies comptées sur les boîtes retenues.

$n_1$  : le nombre de boîtes comptées pour la dilution la plus faible.

$n_2$  : le nombre de boîtes comptées pour la dilution la plus élevée.

$d$  : facteur de la première dilution.

S'il y a plus de deux ou trois dilutions à compter, la formule doit être modifiée pour prendre en compte la dilution suivante:

$$\sum C / (n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3) \times d$$

Pour la première formule, arrondir les résultats obtenus à deux chiffres significatifs. Pour un nombre de 3 chiffres, arrondir le 3ème chiffre au zéro le plus proche.

Si le 3ème chiffre est 5, arrondir au chiffre inférieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre pair, et au chiffre supérieur dans le cas où les 2 premiers chiffres forment un nombre impair.

**Exemple** : pour 234 arrondir à 230

235 arrondir à 240

225 arrondir à 220

245 arrondir à 240

Dans le cas où tous les dénombrements sont inférieurs à 10, signaler que le nombre des bactéries (*Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus*) par gramme d'échantillon est inférieur à  $10 \times 1/d$ .

Où d : facteur de la dilution la plus faible.

Dans le cas où tous les dénombrements sont supérieurs à 300, calculer un nombre estimé à partir des boîtes ayant un nombre de colonies le plus proche de 300 et le multiplier par l'inverse de la valeur correspondant à la dilution la plus élevée.

Le résultat est exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par  $10^x$  où x est la puissance appropriée de 10.

### Remarque

Le nombre total de micro-organismes caractéristiques par gramme de yaourt est donné par la formule suivante :  $NL + NS$

où : NL et NS représentent le nombre de *L. bulgaricus* et *S. thermophilus* par gramme respectivement, calculé selon la première formule.

### 4.2. Exemple de calcul

Pour un échantillon donné de yaourt, le dénombrement de *L. bulgaricus* donne le résultat suivant (deux boîtes de Pétri ont étéensemencées pour chaque dilution). Dilution  $10^{-4}$  : 185 et 235 colonies ;  $10^{-5}$  : 35 et 50 colonies ;

$$\begin{aligned} \Sigma C / (n_1 + 0,1 n_2) d &= 185 + 235 + 35 + 50 / (2 + 0,1 \times 2) 10^{-4} \\ &= 505 / 2,2 \times 10^{-4} = 229,54 \times 10^4 \text{ cela correspondant à } 230 \times 10^4 \end{aligned}$$

Le nombre estimé de *L. bulgaricus* présents dans l'échantillon de yaourt est donc  $2,3 \times 10^6/g$ .

Si le nombre estimé de *S. thermophilus*, est de  $4,3 \times 10^6$ /g de yaourt, le nombre total de micro-organismes caractéristiques par gramme de yaourt est égal à :  $(2,3 \times 10^6) + (4,3 \times 10^6) = 6,6 \times 10^6$  cela correspondant à  **$6,6 \times 10^6$ /g de yaourt.**

### Références bibliographiques

- [1] Sarwar A, Aziz T, Al-Dalali S, Zhao X, Zhang J, Chen C, Cao Y, Yang Z. Physicochemical and Microbiological Properties of Synbiotic Yogurt Made with Probiotic Yeast *Saccharomyces boulardii* in Combination with Inulin. *Foods* 2019;8:468.
- [2] Suzuki T, Nishiyama K, Kawata K, Sugimoto K, Isome M, Suzuki S, Nozawa R, Ichikawa Y, Watanabe Y, Suzutani T. Effect of the *Lactococcus Lactis* 11/19-B1 Strain on Atopic Dermatitis in a Clinical Test and Mouse Model. *Nutrients* 2020;12:763.
- [3] Journal officiel de la république Algérienne N° 70 du 24 Ramadhan 1425 correspondant au 7 novembre 2004. Arrêté du 4 Rabie Ethani 1425 correspondant au 24 mai 2004 rendant obligatoire une méthode de dénombrement des micro-organismes caractéristiques par une technique de comptage des colonies à 37° C dans le yaourt.

## TPN° 3 : recherche de *Listeria monocytogenes* dans le fromage

### Introduction

Les espèces du genre *Listeria* sont des bactéries à Gram positif, anaérobie facultatif, non sporulées parmi lesquelles l'espèce *Listeria monocytogenes* est le principal agent pathogène humain. Cette dernière est un agent pathogène d'origine alimentaire qui est largement répandu dans l'environnement, il provoque des infections potentiellement mortelles chez les populations animales et humaines à risque. L'infection humaine peut entraîner une maladie grave et potentiellement mortelle connue sous le nom de listériose où l'infection est principalement causée par l'ingestion d'aliments contaminés.

La distribution omniprésente de cette bactérie dans l'environnement, sa capacité à se développer à basse température et sa pathogénicité rendent cet agent particulièrement préoccupant pour la sécurité des aliments réfrigérés et prêts-à-manger ou consommés sans réchauffage, cuisson, ou les deux. Plusieurs éclosions de listériose ont été attribuées aux aliments prêts-à-manger contaminés et conservés à basse température, y compris les légumes, les produits carnés et les produits laitiers comme le fromage.

### 1. Objectif

Recherche de l'espèce *Listeria monocytogenes* dans un prélèvement du fromage.

### 2. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Portoir pour tubes à essai.
- Tubes à essai (16 x 160 mm).
- Pipettes Pasteur.
- Anse de Platine.
- Lames.
- Bouillon Fraser-demi.
- Bouillon Fraser.
- Gélose Oxford ou PALCAM.
- Gélose tryptone soja extrait de levure (TSYEA).

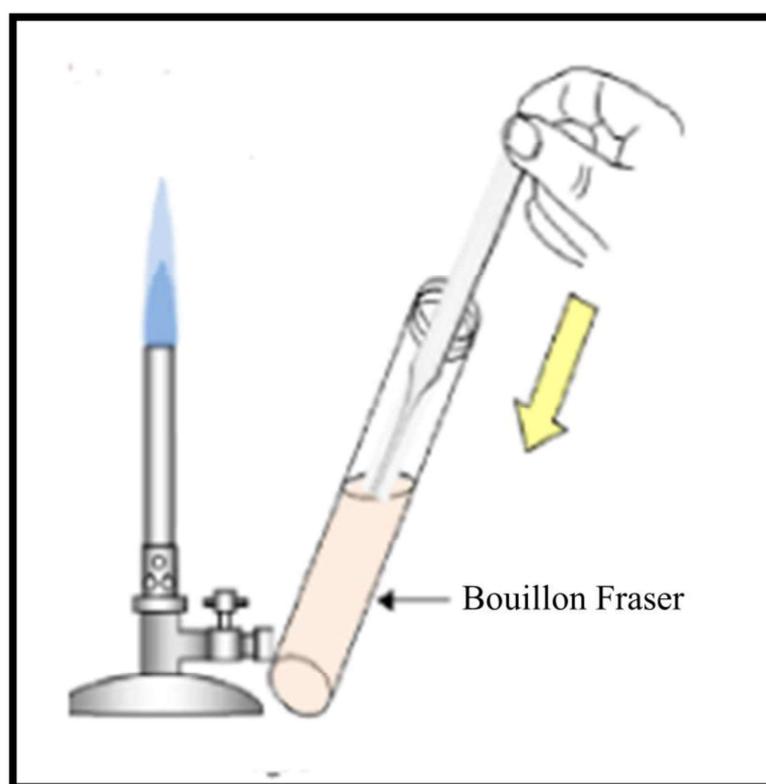
- Gélose au sang à 5%.
- Péroxyde d'hydrogène à 3%.

### 3. Mode opératoire

#### 3.1. Enrichissement primaire et secondaire

Peser aseptiquement dans un récipient stérile 25 g d'un échantillon de fromage puis ajouter 225 ml du bouillon Fraser-demi (pré-enrichissement). Après homogénéisation, incuber les flacons ensemencés à 30°C pendant 24 h.

Après la période d'incubation, procéder à un enrichissement secondaire de 0,1 ml du bouillon Fraser pré-enrichi dans 10 ml du bouillon Fraser et incuber les tubes pendant 48 h à une température d'incubation de 37 °C (figure 6).



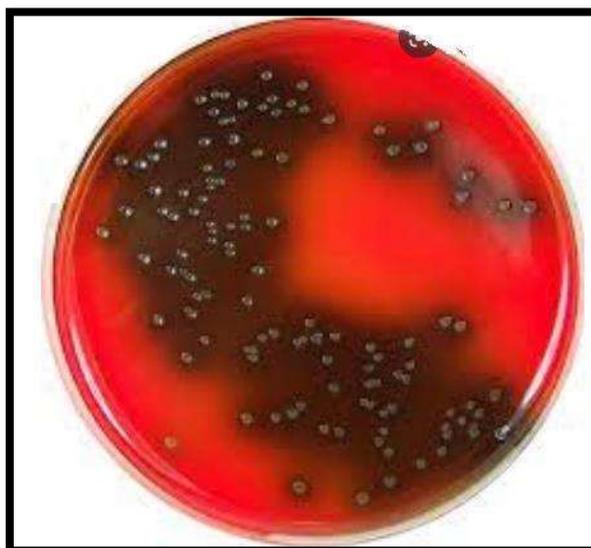
**Figure 6** : technique d'ensemencement du bouillon d'enrichissement.

#### 3.2. Isolement primaire et sélection des colonies pour confirmation

Après la procédure d'enrichissement, l'inoculum est ensemencé par stries sur une gélose Oxford ou PALCAM puis incuber pendant 24h-48h à 37°C. La plupart des géloses sélectives utilisées pour l'isolement et l'identification des espèces du genre *Listeria* reposent sur la réaction de l'esculinase basée sur l'activité  $\beta$ -D-glucosidase pour différencier *Listeria*

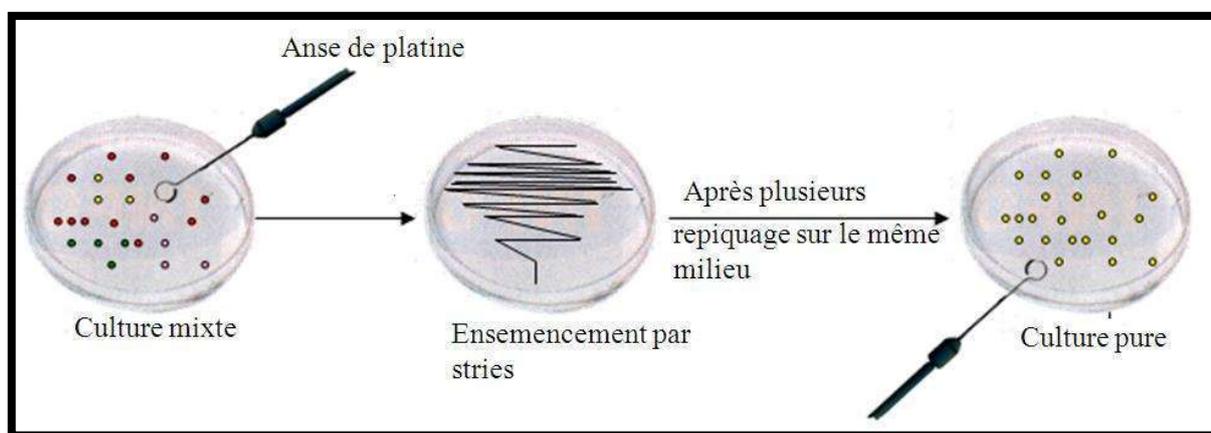
des autres bactéries. Ces milieux contiennent également d'autres agents sélectifs pour inhiber la croissance de la plupart des autres organismes.

Les colonies typiques du genre *Listeria* apparaissent noires ou grises entourées par des halos noirs ou bruns foncés (figure 7).



**Figure 7:** aspect macroscopique des colonies de *Listeria* sur milieu PALCAM.

À partir de chaque boîte, sélectionner trois à cinq colonies caractéristiques ou suspectes sur la gélose PALCAM. S'il y a moins de cinq colonies, sélectionner toutes les colonies pour confirmation. Ensemencer par stries les colonies sélectionnées sur la surface de la gélose tryptone soja extrait de levure (TSYEA) en vue d'une purification (figure 8). Incuber les boîtes dans une étuve réglée à 37° C pendant 24 h.



**Figure 8:** schéma explicatif de la méthode de purification.

### 3.3. Tests de confirmation

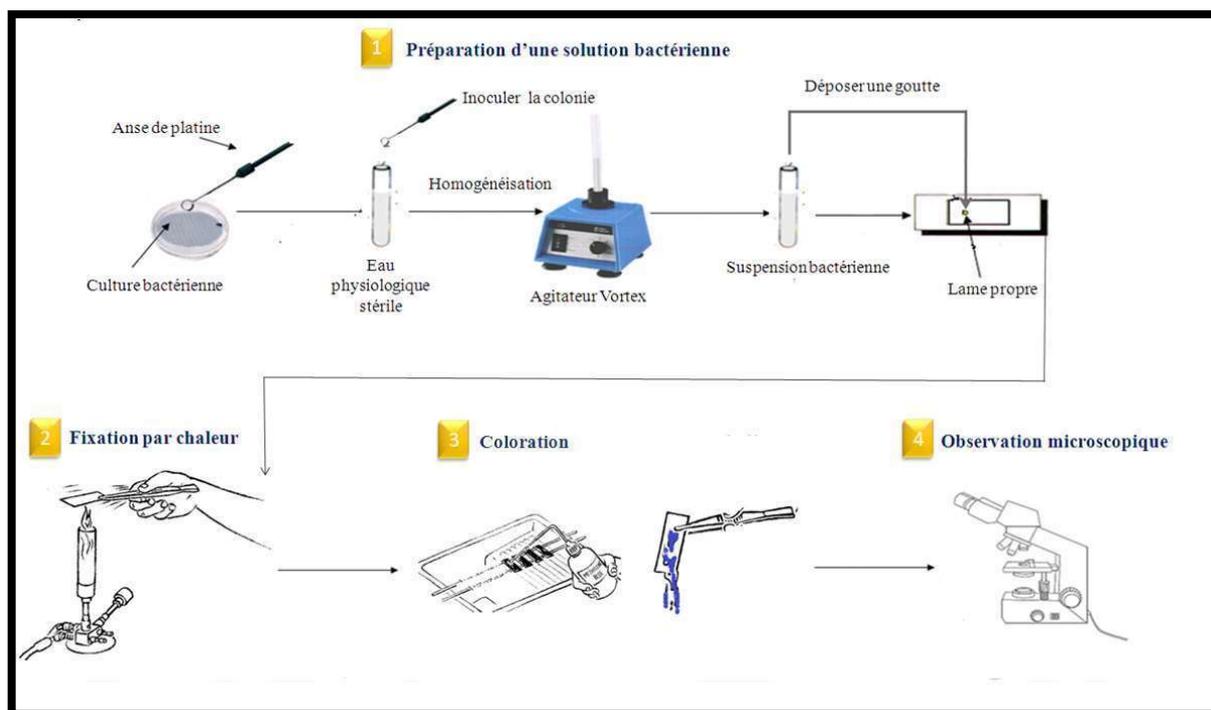
Après la purification des colonies caractéristiques obtenues, procéder d'abord à l'identification du genre *Listeria* en se basant sur : l'aspect morphologique des colonies, la coloration de Gram, et le test de catalase. En revanche, l'identification de l'espèce *Listeria monocytogenes* est basée essentiellement sur le test d'hydrolyse de l'esculine, la mobilité à 22-25°C, et le Camp-test.

Les bactéries suspectes sont généralement classées comme *Listeria* si elles présentent les caractéristiques suivantes: bâtonnets à Gram positif, aérobies et anaérobies facultatifs, non sporulés, catalase-positif (rarement catalase négatif), oxydase négatif, fermentaire sans production de gaz.

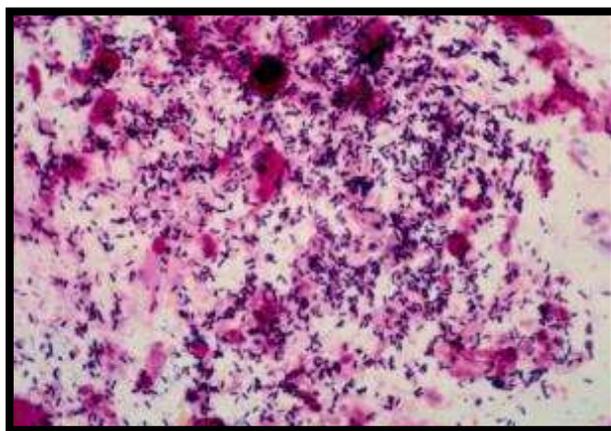
#### 3.3.1. Observation morphologique des colonies

Ensemencer les cultures suspectes sur la gélose trypticase soja et incuber à 37°C pendant 24 h, puis examiner les colonies en utilisant un éclairage oblique (un faisceau de lumière blanche). C'est une technique permettant d'observer des colonies réticulées avec une couleur bleue distincte et caractéristique de *Listeria*.

Procéder à une observation microscopique à l'état frais et après coloration de Gram (figure 9), où *Listeria* spp. se présentent sous forme de minces bacilles courts, Gram positif possédant une mobilité lente en pirouette (figure 10).



**Figure 9** : schéma explicatif d'un examen après coloration de Gram.



**Figure 10** : observation microscopique de *Listeria* spp. après une coloration de Gram (8).

### 3.3.2. Test de catalase

Déposer sur une lame une goutte de solution de peroxyde d'hydrogène (eau oxygénée) à 3% à l'aide d'une pipette pasteur. Mélanger avec cette dernière un fragment de la colonie à tester prélevé à l'aide d'une anse (figure 11).

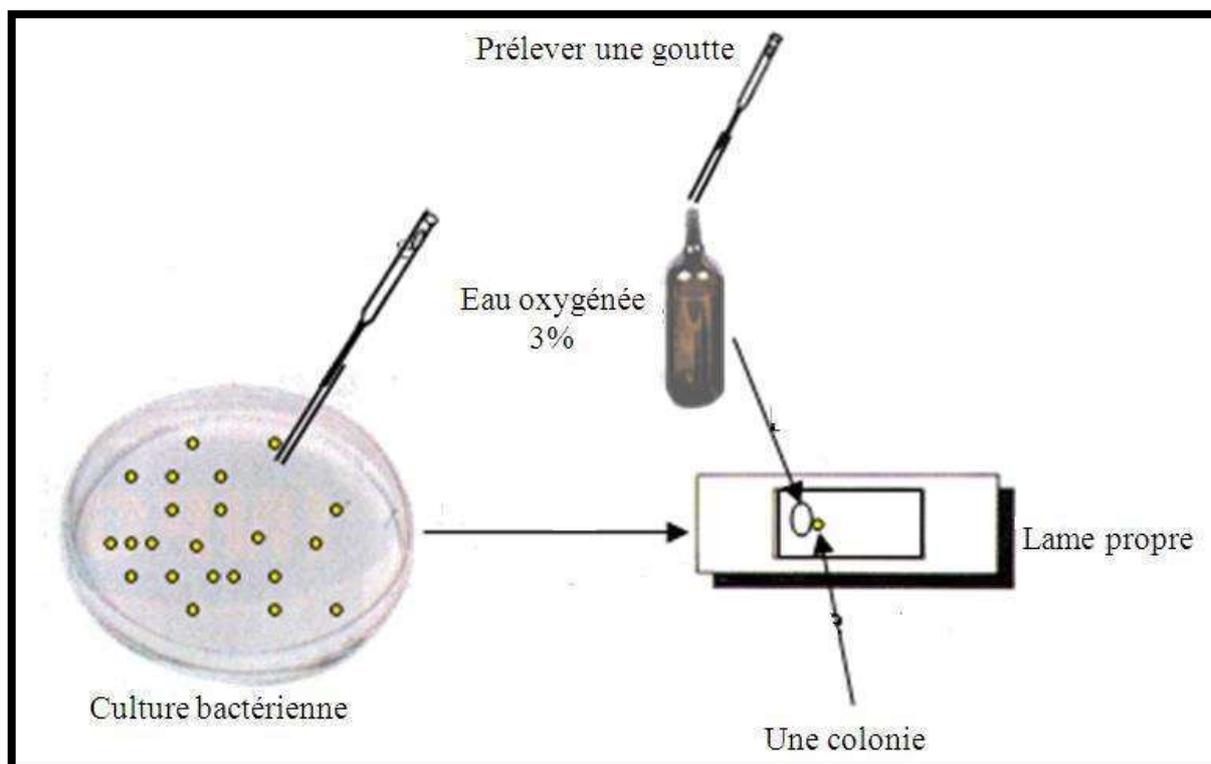


Figure 11 : schéma explicatif du test de la catalase.

**a) Interprétation**

Le dégagement immédiat de bulles de gaz est considéré comme un résultat positif (présence d'une catalase) (figure 12).

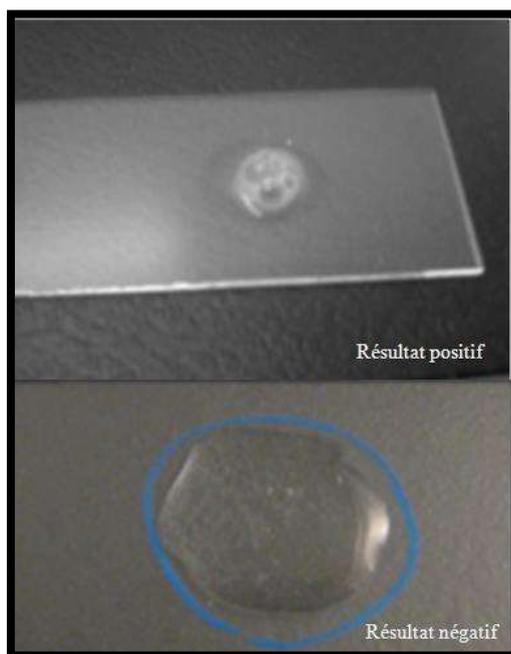


Figure 12 : résultat du test catalase (1).

### 3.3.3. Test d'hémolyse

Si les résultats du test de la catalase et les caractéristiques morphologiques indiquent la présence de *Listeria* spp., il est nécessaire de déterminer la réaction hémolytique des souches testées.

À partir de la gélose TSYEA, ensemencer en stries les colonies suspectes sur la gélose au sang à l'aide d'un fil d'ensemencement. Incuber les boîtes à 37°C pendant 48 h (figure 13).

#### a) Interprétation

Après incubation, examiner les boîtes sous lumière. Les souches de *L. monocytogenes* montrent des zones claires, étroites et légères d'hémolyse de type bêta (zone transparente ou jaune claire).

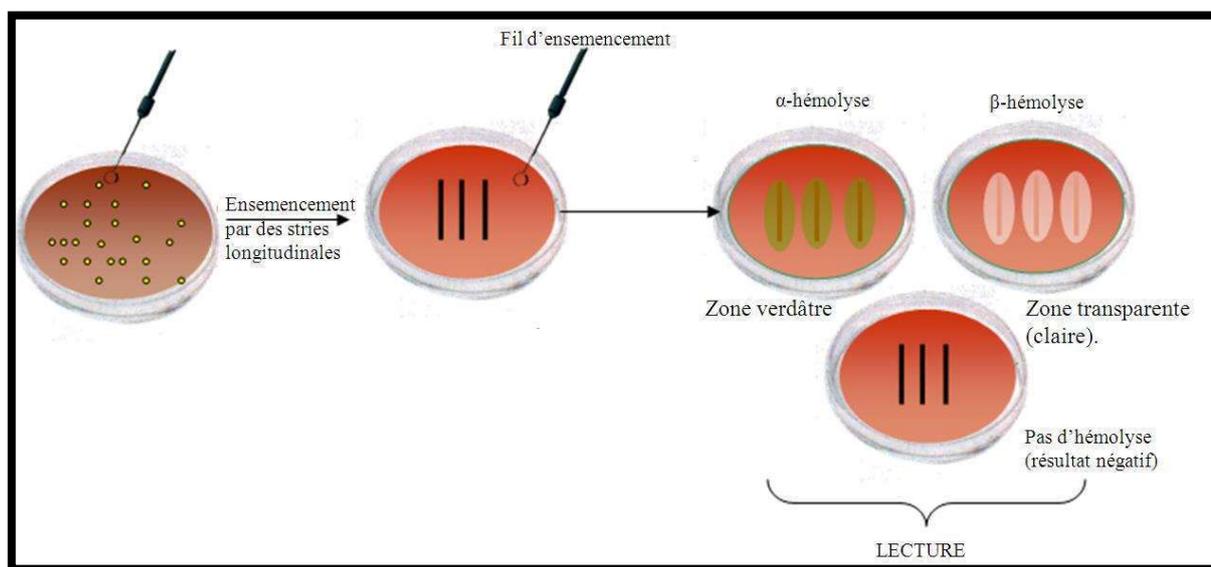


Figure 13: schéma explicatif du test d'hémolyse.

### 3.3.4. CAMP test

#### 3.3.4.1. Principe

Le CAMP test (Christie-Atkins-Munch-Pertersen) peut être utilisé pour différencier *L. monocytogenes* des autres espèces du genre *Listeria* à savoir ; *L. ivanovii*, *L. grayi* et *L. seeligeri* (tableau 2). Ce test est effectué en ensemencant en une seule strie sur gélose au sang la souche en question et les deux souches de référence : *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* productrices de  $\beta$ -hémolysine (augmentation de la zone d'hémolyse de type bêta) comme décrit ci-dessous et schématisé dans la figure 14.

### 3.3.4.2. Technique

Ensemencer en stries une souche de *Staphylococcus aureus* et de *Rhodococcusequi* en lignes simples sur la gélose au sang de telle sorte que les 2 cultures soient parallèles et diamétralement opposées. Ensemencer en stries la souche suspecte de façon similaire perpendiculairement à ces cultures de telle sorte que la souche suspecte et les deux souches ensemencées ne se touchent pas mais soient séparées avec une distance d'environ 1 mm à 2 mm. Sur la même boîte, plusieurs souches peuvent être testées simultanément avec un témoin positif en les ensemenant par des stries parallèles (figure 14). Incuber les boîtes à 37°C pendant 18 h à 24 h.

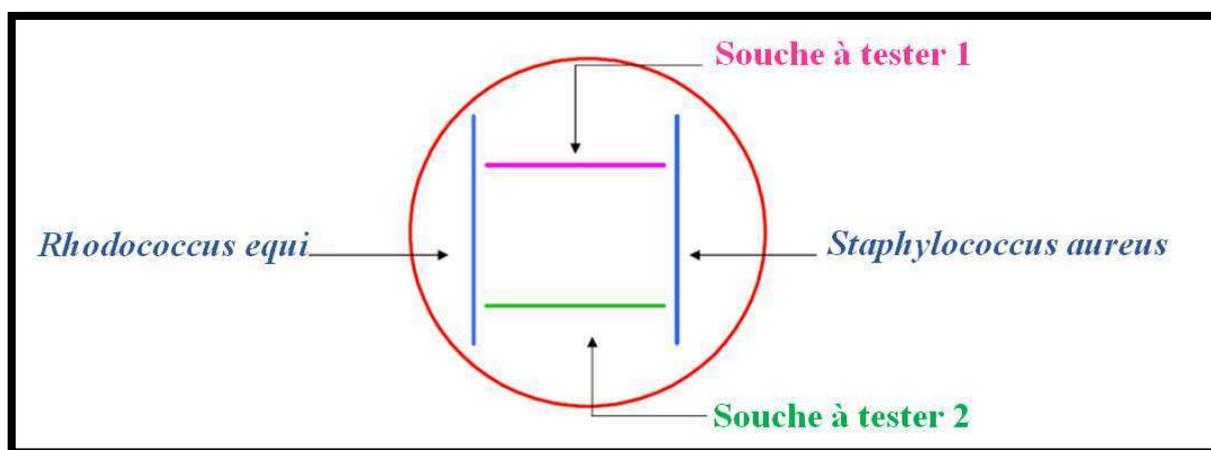


Figure 14 : ensemencement des boîtes de Pétri pour le CAMP test.

### 3.3.4.3. Interprétation

Un Camp-test positif se traduit par la formation d'une zone d'hémolyse à l'intersection de la souche testée et de la souche de référence de *S. aureus* pour *L. monocytogenes*. Un résultat positif avec la souche *R. equi* se traduit par la présence d'une large zone d'hémolyse «tête de flèche». Ceci se traduit par une petite zone arrondie d'hémolyse, s'étalant sur presque 2 mm à partir de la souche testée et à l'intérieur de la zone faiblement hémolytique.

L'absence d'une grande zone d'hémolyse est considérée comme un résultat négatif (figure 15).

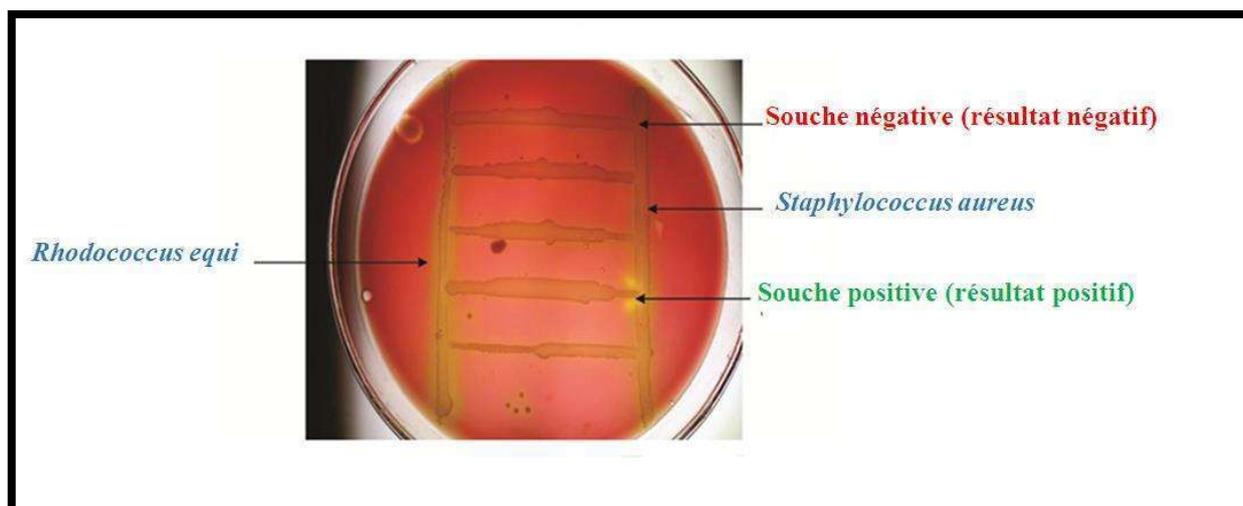


Figure 15 : résultat du CAMP test.

Tableau 2 : caractéristiques de *Listeria* selon la norme EN/ISO 11290-1 (1).

Espèces du genre <i>Listeria</i>	Hémolyse	CAMP test	
		<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Rhodococcus equi</i>
<i>L. monocytogenes</i>	+	+	-
<i>L. innocua</i>	-	-	-
<i>L. grayi</i>	-	-	-
<i>L. ivanovii</i>	+	-	+

#### 4. Expression des résultats

Selon les résultats des tests de confirmation, signaler la mise en évidence de *L. monocytogenes* dans la prise d'essai, en spécifiant le volume en millilitres ou la masse en grammes de l'échantillon analysé.

Les critères microbiologiques applicables pour *L. monocytogenes* sont présentés dans le tableau 3.

**Tableau 3** : critères microbiologiques applicables pour *L. monocytogenes* (2).

Catégories des denrées alimentaires	Bactérie	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
- Lait cru					
- Fromages au lait cru					
- Fromages à base de lait ayant subi un traitement thermique moins fort que la pasteurisation					
- Fromages à pâte molle non affinés (fromages frais)	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	100	
- Crème au lait cru					
-Crèmes glacées et desserts lactés congelés					
-Beurre cru et pasteurisé					
-Yaourts ou yoghourts					
- Carcasses, demi- carcasses, quartier ou pièces de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	Absence dans 25 g	
- Charcuteries cuites ne contenant pas de féculents					
Abats rouges entiers	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	2	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>
Abats rouges tranchés	<i>Listeria monocytogenes</i>	5	2	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>

- **n** : nombre d'unité constituant l'échantillon.
- **m** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.
- **M** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable.
- **c** : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

### Références bibliographique

- [1] Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R: Bactériologie médicale. Elsevier Health Sciences France, 2012.
- [2] Dromigny E: Les critères microbiologiques des denrées alimentaires: Réglementation, agents microbiens, autocontrôle. Tec & Doc-Lavoisier, 2011. P 75.
- [3] Gasanov U, Hughes D, Hansbro PM: Methods for the isolation and identification of *Listeria* spp. and *Listeria monocytogenes*: a review. FEMS microbiology reviews 2005;29:851-875.
- [4] Jemmi T, Stephan R: *Listeria monocytogenes*: food-borne pathogen and hygiene indicator. Rev Sci Tech 2006;25:571-580.
- [5] Journal officiel de la république Algérienne N°03 du 18 Dhou El Hidja 1426 correspondant au 18 janvier 2006. Arrêté du 21 Chaâbane 1426 correspondant au 25 septembre 2005 rendant obligatoire la méthode de recherche de *Listeria monocytogenes* dans le lait et les produits laitiers.
- [6] Journal officiel de la république Algérienne N°39 du 8 Chaoual 1438 correspondant au 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
- [7] Kathariou S: *Listeria monocytogenes* virulence and pathogenicity, a food safety perspective. Journal of food protection 2002;65:1811-1829.
- [8] Lanotte P, Pasquier C : Bactériologie - Virologie: Tout le programme en fiches. Elsevier Health Sciences, 2022. P75.
- [9] Nayak DN, Savalia CV, Kalyani IH, Kumar R, Kshirsagar DP: Isolation, identification, and characterization of *Listeria* spp. from various animal origin foods. Veterinary world 2015;8:695.
- [10] Ragon M, Wirth T, Hollandt F, Lavenir R, Lecuit M, Le Monnier A, Brisse S: A new perspective on *Listeria monocytogenes* evolution. PLoS Pathogens 2008;4:e1000146.

## **TPN°4 : recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes dans les glaces et crèmes glacées**

### **Introduction**

Les agents pathogènes d'origine alimentaire tels que *Listeria monocytogenes* et *Staphylococcus aureus* sont le principal problème de la salubrité des aliments. *Staphylococcus aureus* est une bactérie aérobie ou anaérobie facultative à Gram positif. C'est la cause fréquente des intoxications d'origine alimentaire grâce à sa forte capacité de tolérance à une large gamme de pH, de température et d'humidité. Les souches de *S. aureus* produisent une ou plusieurs protéines extracellulaires, appelées entérotoxines staphylococciques (SE) (SEA, SEB, et SEC, etc).

L'intoxication d'origine alimentaire staphylococcique est l'une des maladies d'origine alimentaire les plus courantes et à grande importance. Cette maladie causée par l'espèce *Staphylococcus aureus* est caractérisée par l'apparition rapide des symptômes après l'ingestion d'aliments contaminés (généralement 3 à 5 heures). Cela est dû à la production d'une ou plusieurs toxines par les bactéries lors de la croissance à des températures permissives cependant, la période d'incubation de la maladie dépend de la quantité de la toxine ingérée. Les aliments favorables à l'intoxication staphylococcique sont généralement la viande, les produits carnés, les produits de boulangerie (farine, produits céréaliers) et le lait et les produits laitiers tels que les glaces et les crèmes glacées (particulièrement en cas de mammite).

### **1. Objectif**

Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes dans les glaces et les crèmes glacées.

### **2. Matériel/réactifs**

- Etuve bactériologique.
- Boîte de Pétri.

- Tube à essai (16 x 160 mm).
- Portoir pour tubes à essai.
- Pipettes pasteur.
- Pipettes graduée (volume 1ml).
- Poire de sécurité.
- Anse de platine.
- Lames.
- Bocal en verre.
- Vortex.
- Etaleur.
- Eau physiologique stérile.
- Bouillon tryptone-sel.
- Plasma traité à l'EDTA.
- Milieu Chapman.
- Bouillon nutritif.
- Gélose nutritive.
- Gélose Baird-Parker.
- Milieu à l'extrait de viande et de levure (VL).
- Eau distillée stérile.
- Acétate de sodium.
- Para-nitro-phényl-phosphate.
- Comprimé du substrat  $\alpha$ -naphtylphosphate acide sodique.
- Orthodiamine bis azotée.
- Sulfamézathine.
- Le réactif nitrophényl phosphate-disodique.
- Tampon Tris pH 8.

### **3. Mode opératoire**

#### **3.1. Technique de prélèvement**

Les prélèvements de crèmes glacées et de glaces doivent être réalisés en prenant toutes les précautions d'asepsie, particulièrement pendant l'ouverture et la fermeture des bouchons.

Mettre l'échantillon de la glace dans un bocal en verre stérile après ouverture aseptique de l'emballage. Couper le bâtonnet aseptiquement au ras des glaces type sucette.

#### **3.2. Préparation des dilutions**

La préparation des dilutions décimales jusqu'à 1/100000 est réalisée dans du tryptone-sel comme diluant (voir TPN°1).

#### **3.3. Recherche et dénombrement des staphylocoques pathogènes**

Étaler à la surface du milieu Chapman 0,1 ml de la suspension mère et des dilutions sélectionnées d'une manière homogène. Incuber les boîtes à 37°C pendant 24h à 48h. Après incubation, on retiendra les colonies blanches ou jaunes entourées d'un halo jaune.

L'identification des colonies de *S. aureus* s'effectue par le biais du test de la coagulase (libre et liée), de la phosphatase et par fois la recherche du type respiratoire aérobiose ou anaérobiose doit être effectuée comme test complémentaire. Dans le cas où le test de phosphatase est positif, la recherche du type respiratoire devient nécessaire pour pouvoir faire la différence entre *Micrococcus* (aérobies stricts) et *Staphylococcus* (anaérobie facultatif) (certains micrococci possèdent une phosphatase).

#### **3.4. Mise en évidence de la coagulase**

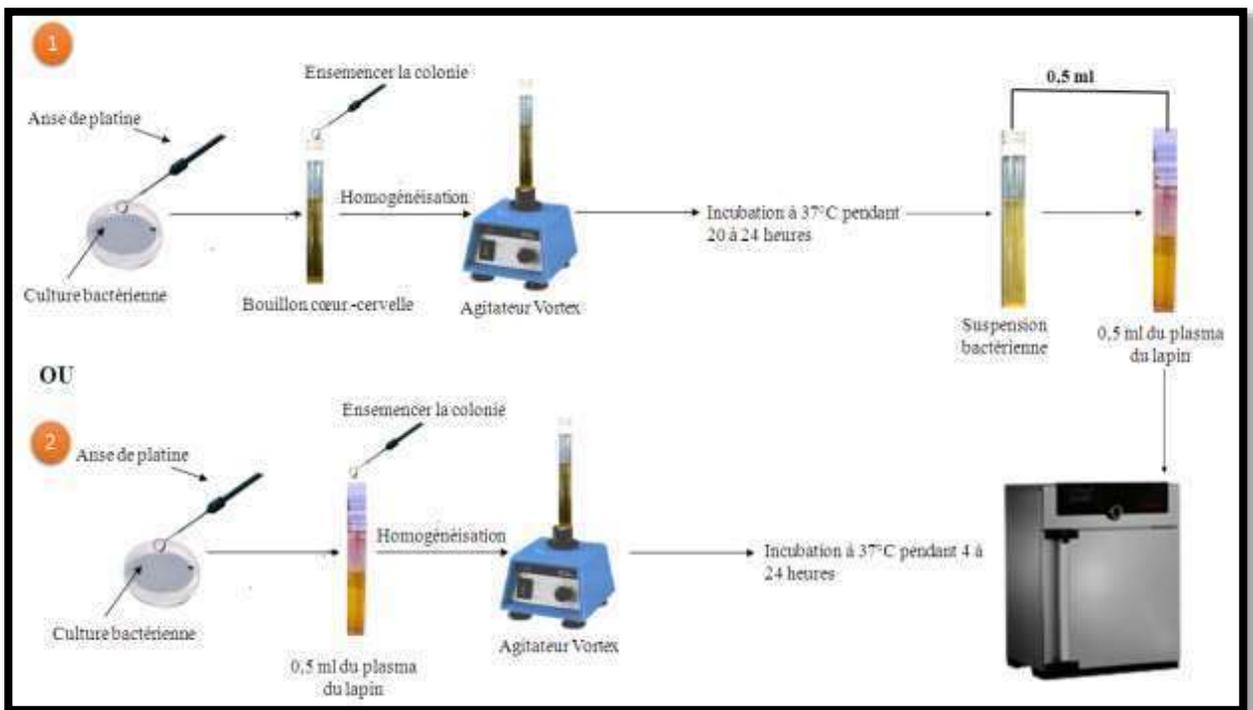
##### **3.4.1. Principe**

Le test de coagulase permet de différencier les souches de *Staphylococcus aureus* de celles de *S. epidermidis* et d'autres espèces à coagulase négative. Les souches de *S. aureus* sont généralement capables de coaguler le plasma traité à l'EDTA en tube et sous forme d'amas sur lame.

### 3.4.1.1. Technique de la coagulase libre

Le test de la coagulase en tube (coagulase libre) est effectué en mélangeant quelques colonies bactériennes ou 0,5 ml de la suspension dense de la bactérie à tester avec 0,5 ml de plasma du lapin dans un petit tube à essai. Incuber les tubes à 37°C pendant 4 à 24h (figure 16).

Les souches de *S. aureus* provoquent la coagulation du plasma, généralement lors des premières heures.



**Figure 16** : schéma explicatif du test de la coagulase libre.

#### a) Interprétation

Au fur et à mesure que les bactéries se multiplient dans le plasma, elles sécrètent de la staphylocoagulase. La staphylocoagulase initie la coagulation sanguine par l'activation de la prothrombine. La staphylocoagulase adhère au fibrinogène formant ainsi un complexe qui clive le fibrinogène en fibrine, ce qui provoque directement la formation d'un caillot de fibrine.

Toute formation d'un caillot dans les 24 heures est considérée comme un résultat positif (figure 17). Pour une interprétation correcte de ce test, un témoin négatif et positif sont nécessaires.

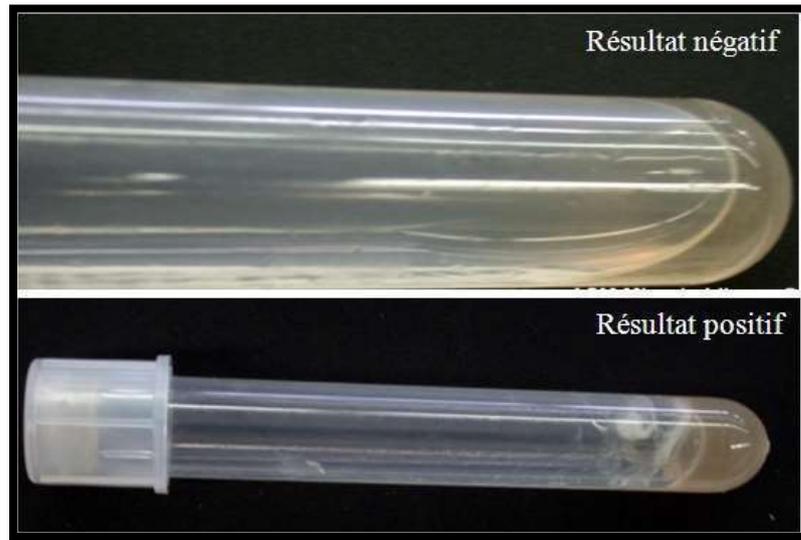


Figure 17 : résultat du test de la coagulase libre (6).

### 3.4.1.2. Technique de la coagulase liée (recherche du facteur d'affinité pour le fibrinogène)

Ce test est réalisé sur lame où une goutte de la suspension bactérienne est émulsionnée dans une goutte de plasma du lapin traité à l'EDTA (figure 18). La présence de la coagulase liée à la surface des cellules bactériennes provoquera une agglutination. Cette dernière se produira grâce à la présence d'un facteur d'agglutination (adhésine), qui provoque la liaison des cellules au fibrinogène du plasma.

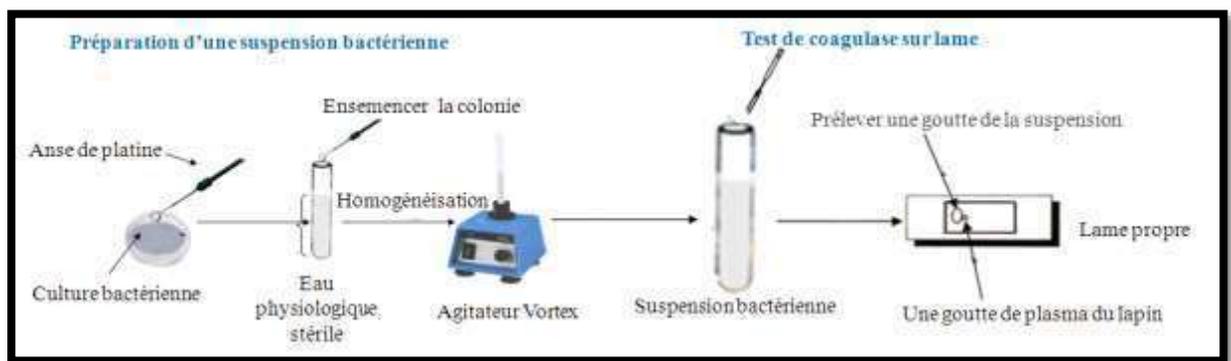
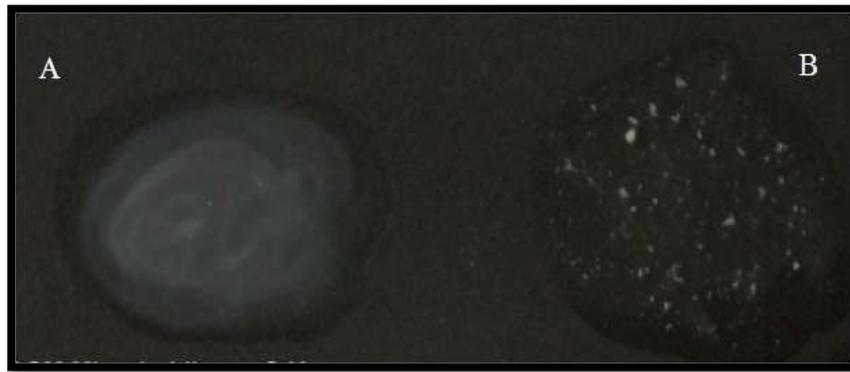


Figure 18 : schéma explicatif du test de la coagulase liée.

### a) Interprétation

Une agglutination visible des cellules bactériennes sur la lame est considérée comme un résultat positif (figure 19).



**Figure 19** : résultat du test de la coagulase liée. A : coagulase négative, B : coagulase positive (6).

### 3.5. Mise en évidence de la phosphatase

Les phosphatases sont des enzymes recherchées pour l'identification précise de *S. aureus*, elles catalysent l'hydrolyse de divers esters phosphates organiques. La mise en évidence de cette enzyme se fait à l'aide des substrats artificiels comme le 4-nitro-phényl-phosphate (para-nitro-phényl-phosphate).

#### 3.5.1. Technique

À partir de la culture en bouillon et à l'aide d'une anse, faire un ensemencement en gélose inclinée (tryptone 10 g/L, extrait de viande de bœuf 5g/L, extrait de levure 1 g/L, chlorure de lithium 5 g/L, agar 20 g/L, solution de sulfarmézathine à 0,2% 25 ml/L). Incuber les tubes ensemencés à 37°C pendant 24h.

Après incubation et à partir de la culture obtenue, préparer une émulsion dense (quelques colonies mélangées avec 20 gouttes d'eau physiologique stérile) dans un tube à hémolyse. Dans un autre tube à hémolyse mélanger 0,25 ml d'une solution d'acétate de sodium avec 0,25 ml de la solution de para-nitro-phényl-phosphate, puis mélanger le contenu des 2 tubes et incuber à 37°C pendant 20 minutes. Un témoin négatif (solution de

paranitrophényl phosphate disodique à 4% dans de l'eau distillée) et positif (souche de *S. aureus* ATCC 25923 sont nécessaires.

**a) Interprétation**

La présence d'une phosphatase se traduit par une coloration jaune (présence de 4-nitro-phénol). Certaines souches de *S. aureus* peuvent perdre leur coagulase, mais la détection d'une phosphatase avec un type respiratoire anaérobie facultatif confirme l'identification de *S. aureus*.

**3.5.2. Autres techniques de mise en évidence de la phosphatase**

**3.5.2.1. Première technique**

Dans un tube à hémolyse, dissoudre un comprimé du substrat  $\alpha$ -naphtylphosphate acide sodique dans 0,50 ml d'eau distillée puis agiter en utilisant un vortex. Ensuite inoculer cette dernière avec la culture à tester. Incuber les tubes à 37° C pendant 30 minutes.

**a) Interprétation**

Après 30 minutes d'incubation, ajouter une solution d'orthodiamine bis azotée préalablement préparée en utilisant un comprimé de cette substance dissout dans 0,5 ml d'eau distillée.

La présence d'une phosphatase est traduite par l'apparition d'une coloration rouge grenat produite par l' $\alpha$ -naphtol libéré, tandis que, en absence d'une phosphatase, la teinte jaune initiale persiste. L'identification de ce caractère doit effectuer sur un nombre suffisant de colonies (5 colonies et plus, dans le cas où 50 colonies sont suspectes; sinon 10 colonies et plus, dans le cas où plus de 50 colonies sont suspectes).

**3.5.2.2. Ensemencement sur Baird-Parker (deuxième technique)**

Le milieu Baird-Parker à la sulfamézathine est utilisé pour la recherche et le dénombrement de *S. aureus*. Les boîtes ensemencées par étalement sont incubées à 37°C pendant 24h à 48h. Après incubation, les colonies caractéristiques de *S. aureus* présenteraient les caractéristiques culturelles suivantes : colonies noires (réduction du tellurite), convexes, brillantes, entourées d'une zone transparente (protéolyse) qui peut être translucide. L'ajout de l'agent sélectif sulfamézathine inhibe le développement de l'espèce *Proteus hauseri* (donne des colonies identiques à celles de *S. aureus*).

### a) Interprétation

Mettre le réactif nitrophényl phosphate-disodique en solution dans un tampon tris pH 8: (121 g/l) puis verser le réactif à la surface du milieu Baird-Parker sur lequel les colonies caractéristiques sont développées. Après une incubation pendant 30 min à 30°C, les souches de *S. aureus* présentant une phosphatase positive apparissent avec une coloration jaune autour de leurs colonies.

### 3.6. Recherche de type respiratoire

Inoculer le milieu à l'extrait de viande et de levure (VL) préalablement fondu, régénéré, et ramené à 48°C - 50°C avec une pipette Pasteur fermée préalablement trempée dans la culture à tester en bouillon. L'ensemencement se fait sur toute la hauteur du tube. Incuber les tubes à 37°C pendant 24 heures.

### a) Interprétation

En fonction de la position de la culture en tube du bas (culot) vers le haut (surface) le type respiratoire est déterminé. La figure 20 présente les différentes positions des cultures en tube (VL) des différents types respiratoires.

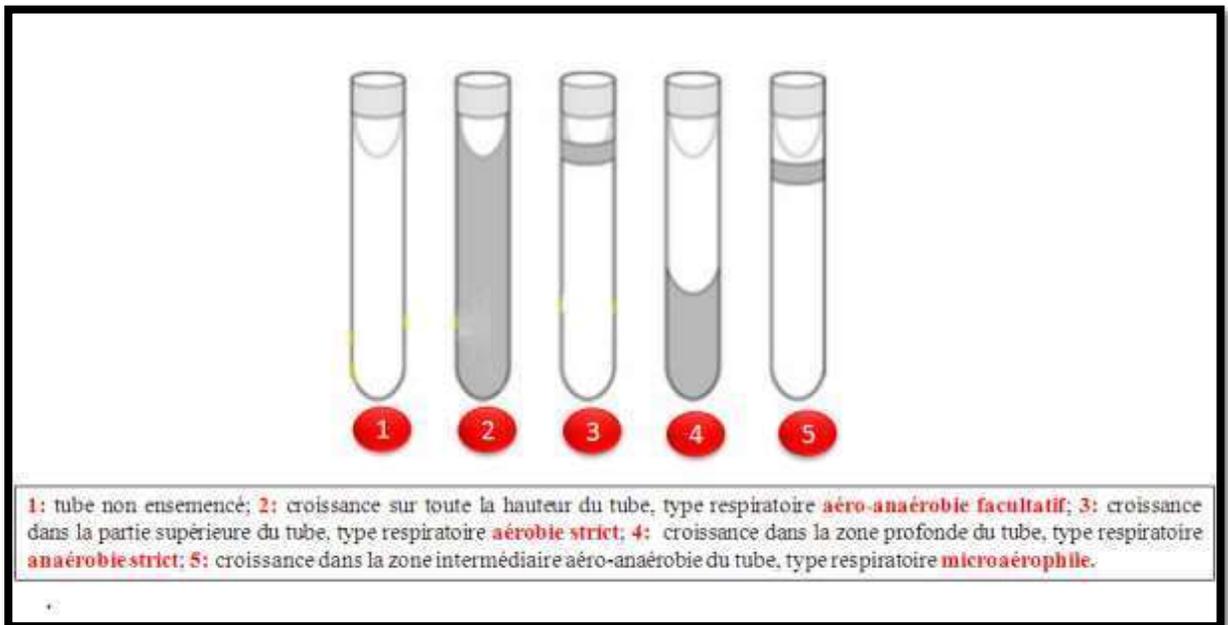


Figure 20 : les différents types respiratoires (1).

Les critères microbiologiques applicables aux laits et produits laitiers sont présentés dans le tableau 4.

**Tableau 4** : critères microbiologiques applicables aux laits et produits laitiers (4).

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Lait cru	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Lait en poudre et lactosérum en poudre	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 <sup>2</sup>
Fromages au lait cru	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Crème au lait cru	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
Crème pasteurisée	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 <sup>2</sup>
Crèmes glacées et desserts lactés congelés	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 <sup>2</sup>
Beurre cru	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
Beurre pasteurisé	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 <sup>2</sup>

Beurre concentré	Staphylocoques à coagulase +	5	0	Absence	
Laits fermentés	Staphylocoques à coagulase +	5	2	$3.10^2$	$3.10^3$
Yaourts ou yoghourts et desserts lactés	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	$10^2$
Caséines-caseinates	Staphylocoques à coagulase +	5	0	Absence	

- **n** : nombre d'unité constituant l'échantillon.
- **M** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable.
- **m** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.
- **c** : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

### Références bibliographiques

- [1] Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R: Bactériologie médicale. Elsevier Health Sciences France, 2012.
- [2] Huang Z, Yu X, Yang Q, Zhao Y, Wu W: Aptasensors for *Staphylococcus aureus* risk assessment in food. *Frontiers in Microbiology* 2021;12:714265.
- [3] Joffin JN, Leyral G: Microbiologie technique: Dictionnaire des techniques. Centre régional de documentation pédagogique d'Aquitaine, 2014.
- [3] Journal officiel de la république Algérienne N°42 du 8 Joumada El Oula 1426 correspondant au 15 juin 2005. Arrêté du 13 Dhou El Hidja 1425 correspondant au 23 janvier 2005 rendant obligatoire une méthode de prélèvement d'échantillons et d'analyse bactériologiques des glaces et crèmes glacées.
- [4] Journal officiel de la république Algérienne N°39 du 8 Chaoual 1438 correspondant au 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
- [5] Kadariya J, Smith TC, Thapaliya D: *Staphylococcus aureus* and staphylococcal food-borne disease: an ongoing challenge in public health. *BioMed research international* 2014;2014.
- [6] Katz DS: Coagulase test protocol. American Society for Microbiology Laboratory Protocols Available online: <https://www.asmscience.org/content/education/protocol/protocol> 2010;3220.

## **TPN°5 : recherche de la flore d'altération de la viande** **(*Pseudomonas aeruginosa*)**

### **Introduction**

La viande est le produit de transformation du muscle après la mort de l'animal, elle s'agit d'un aliment complexe et composite. Sur le plan nutritionnel, la viande est un aliment riche en eau, lipides et en protéines de haute valeur nutritionnelle, présentant ainsi une niche très favorable pour la croissance d'un grand nombre des microorganismes. La viande est une denrée très périssable et considérée comme vecteur de plusieurs pathogènes chez l'homme.

La qualité de la viande prend en compte quatre composantes dont: la qualité organoleptique, la qualité technologique, la qualité nutritionnelle et la qualité hygiénique. Cette dernière est essentiellement liée aux dangers pour la santé publique et elle représente un critère fondamental pour la sécurité sanitaire du consommateur. De même, la transformation de l'animal vivant en carcasse ensuite en viande s'accompagne couramment d'une contamination par des microorganismes. Toutes les étapes de transformation (l'abattage et de la découpe, etc.) ainsi que le stockage, et la distribution peuvent être à l'origine de contamination. En effet, l'abattoir représente l'un des points critiques principaux de l'hygiène des viandes car l'opération d'abattage est considérée comme l'étape où le risque de contamination est important. Parmi ces micro-organismes on peut citer les bactéries qui peuvent altérer les caractères organoleptiques des carcasses comme *Pseudomonas* spp. ce genre est principalement utilisé comme indicateur d'altération des viandes fraîches.

### **1. Objectif**

Recherche et dénombrement de *Pseudomonas* spp. dans la viande fraîche.

## 2. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique.
- Boîtes de pétri.
- Pipettes graduées (1ml).
- Poire de sécurité.
- Pipettes Pasteur.
- Étaleur.
- Anse bouclée en platine.
- Tube à essai (16 x 160 mm).
- Portoir pour tubes à essai.
- Papier-filtre.
- Réactif d'oxydase (N-diméthylparaphénylène diamine)
- Bouillon Tryptone-sel
- Gélosé au cétrimide
- Fusidate de sodium
- Céphalothine en poudre

## 3. Mode opératoire

### 3.1. Prélèvement

Pour la recherche de *P. aeruginosa*, les échantillons sont prélevés sans cautériser la surface exposée. A l'aide d'un scalpel stérile, inciser le long des bords internes d'un gabarit (cadre métallique ou en plastique de dimensions appropriées permettant la délimitation de la surface à prélever, figure 21). Utiliser ensuite des pinces stériles pour soulever la prise d'essai (la viande), découper la surface délimitée à une profondeur de 2 à 3 mm et placer les morceaux dans un sac en plastique ou un récipient stérile qui est ensuite soigneusement fermé et scellé.

Les prélèvements doivent être transportés au laboratoire le plus rapidement possible. Pour ces types de prélèvements (prélèvement en surface), il convient d'enregistrer à quoi correspond la dilution initiale. Par exemple, 25 cm<sup>2</sup> de surface de l'échantillon est dilué dans 100 ml (volume final) de sorte que 1 ml de cette suspension renfermera les microorganismes présents dans 0,25 cm<sup>2</sup>.

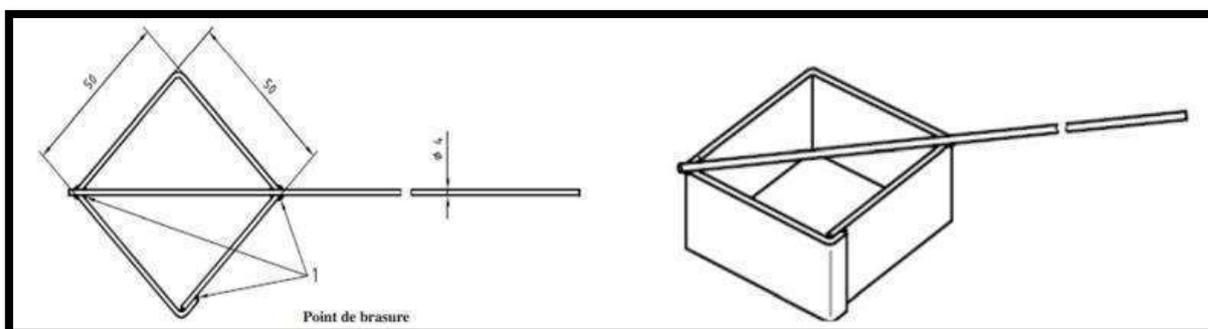


Figure 21 : exemple de gabarit (6).

### 3.2. Préparation de la suspension mère

Pour obtenir une suspension mère, peser la prise d'essai et additionner neuf fois sa masse d'un diluant adéquat. Différents diluants peuvent être utilisés par exemple; la solution de tryptone-sel (digestat enzymatique de caséine 1 g/l, chlorure de sodium (NaCl) 8,5 g/l) et l'eau peptonée tamponnée (digestat enzymatique de tissus animaux 10 g/l, chlorure de sodium (NaCl) 5 g/l, hydrogénophosphate disodique dodécahydraté 9 g/l, dihydrogénophosphate de potassium 1,5 g/l).

### 3.3. Préparation des dilutions décimales

À partir de la première dilution 10<sup>-1</sup>, une série de dilutions décimales est réalisée, où 1 ml de la suspension mère (dilution 10<sup>-1</sup>) est transféré dans un tube contenant 9ml du diluant à l'aide d'une pipette graduée stérile (dilution 10<sup>-2</sup>). Procéder de la même manière avec les dilutions suivantes jusqu'à ce que la série de dilutions nécessaires soit obtenue.

### 3.4. Ensemencement

Une boîte de Pétri pour chaque dilution doit être utilisée avec, au moins, deux dilutions successives. Si une seule dilution est réalisée, deux boîtes de Pétri doivent alors être utilisées. Répartir 0,1 ml de la suspension mère et de la première dilution ( $10^{-2}$ ) à la surface des boîtes de Pétri contenant le milieu gélosé au cétrimide, au fusidate de sodium et à la céphalothine (CFC) (digestat enzymatique de gélatine 16 g/l, digestat enzymatique de caséine 10 g/l, sulfate de potassium ( $K_2SO_4$ ) 10 g/l, chlorure de magnésium ( $MgCl_2$ ) 1,4 g/l, sel de sodium de céphalothine 0,1%, fusidate de sodium 0,1%).

Répéter ces opérations avec les dilutions suivantes, en utilisant une pipette stérile pour chaque dilution décimale. Puis étaler le liquide en utilisant un étaleur stérile pour chaque boîte de Pétri jusqu'à ce que la surface soit complètement sèche. Incuber les boîtes de Pétri à une température de  $25\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant  $44\text{ h} \pm 4\text{ h}$  (figure 22).

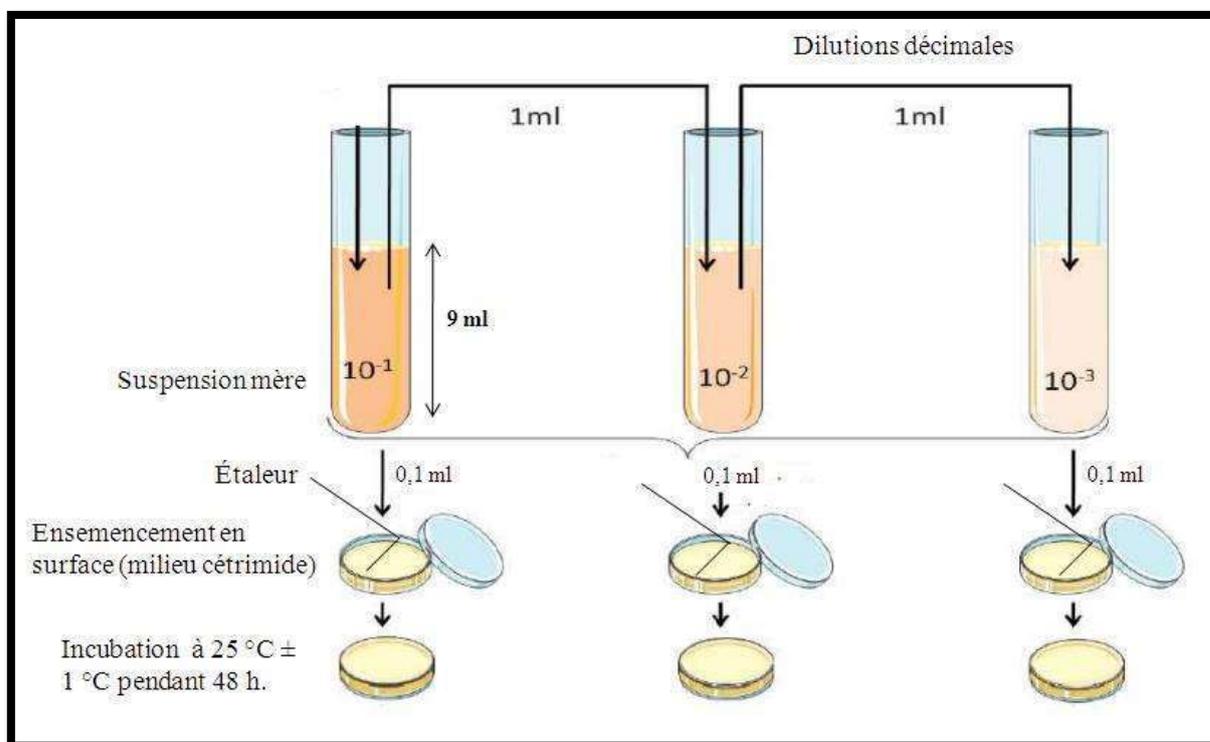


Figure 22: schéma explicatif de la méthode d'isolement de *P. aeruginosa*.

## 4. Comptage et sélection des colonies

Après incubation, retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies inférieur à 150. En vue de l'épreuve de l'oxydase, prélever au hasard et à partir de chacune des boîtes de Pétri retenues, cinq colonies représentatives.

### 4.1. Confirmation

#### 4.1.1. Recherche de l'oxydase

Le test de l'oxydase permet de mettre en évidence une enzyme : cytochrome oxydase chez les bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas*.

Verser 2 ou 3 gouttes du réactif pour la recherche de l'oxydase sur un morceau de papier-filtre placé dans une boîte de Pétri. À l'aide d'une pipette Pasteur ou anse en plastique (pas en Nichlechrome), frotter une partie de la culture sur le papier-filtre préparé et imbibé par le réactif de l'oxydase (N-diméthylparaphénylène diamine) (figure 23).

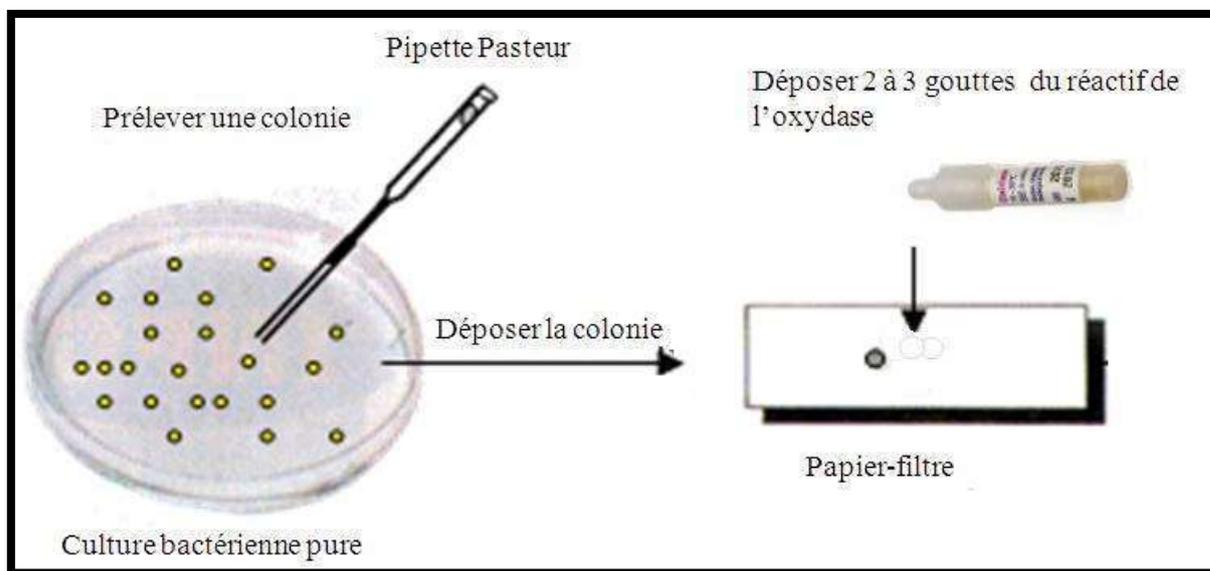


Figure 23 : schéma explicatif du test de l'oxydase.

#### 4.1.2. Interprétation

La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleue-pourpre foncée apparaît dans les 30s. Tandis qu'une réaction négative est traduite par l'absence d'une coloration ou une coloration au-delà de 30 secondes.

### 5. Expression des résultats

Les résultats sont exprimés selon différents modes de calcul fixés par les méthodes reconnues à l'échelle internationale et ce, selon le cas.

Les critères microbiologiques applicables à la viande et aux produits carnés sont présentés dans le tableau 5.

**Tableau 5** : critères microbiologiques applicables à la viande et aux produits carnés (5).

Catégories des denrées alimentaires	Bactérie	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Carcasses, demi-carcasses, quartier ou pièces de bovins, d'ovins, de caprins et d'équidés.	<i>Pseudomonas</i>	5	2	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>
Portion unitaire de viande rouge, réfrigérée ou congelée	<i>Pseudomonas</i>	5	2	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>
Abats rouges entiers	<i>Pseudomonas</i>	5	2	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>
Abats rouges tranchés	<i>Pseudomonas</i>	5	2	5.10 <sup>6</sup>	5.10 <sup>6</sup>

**n** : nombre d'unité constituant l'échantillon.

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

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

**c** : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

### Références bibliographiques

- [1] Bennani L, Berrada S, Salame B, Aabouch M, Lalami AEO: Evaluation de la qualité hygiénique des viandes et de certains produits carnés prélevés de la ville de Fès, Maroc. International Journal of Innovation and Applied Studies 2016;15:547.
- [2] Dennai N, Kharrati B, El Yachoui M: Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. Ann Méd Vét 2001;145:270-274.
- [3] Journal officiel de la république Algérienne N°11 du 5 Joumada Ethania 1439 correspondant au 21 février 2018. Arrêté du 12 Rabie Ethani 1439 correspondant au 31 décembre 2017 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique des viandes et des produits carnés.
- [4] Journal officiel de la république Algérienne N°38 du 24 Chaâbane 1435 correspondant au 22 juin 2014. Arrêté du 28 Rajab 1435 correspondant au 28 mai 2014 rendant obligatoire la méthode de préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique.
- [5] Journal officiel de la république Algérienne N°39 du 8 Chaoual 1438 correspondant au 2 juillet 2017. Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.
- [6] Journal officiel de la république Algérienne N°38 du 9 Chaoual 1440 correspondant au 12 juin 2019. Arrêté du 16 Joumada El Oula 1440 correspondant au 23 janvier 2019 rendant obligatoire la méthode de dénombrement des *Pseudomonas. spp* présomptifs dans les viandes et les produits carnés.
- [7] Salifou CFA, Boko KC, Ahounou GS, Tougan PU, Kassa SK, Houaga I, Farougou S, Mensah GA, Clinquart A, Youssao AKI: Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. International Journal of Biological and Chemical Sciences 2013;7:1351-1369.

## **TPN° 6 : détection et dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau de robinet après filtration sur membrane**

### **Introduction**

Au cours de tous le processus de la fabrication et transformation des produits agroalimentaires, l'eau est utilisée d'une manière courante. Cette eau peut s'avérer la source majeure presque de toute contamination et altération lorsque les conditions d'hygiène, de salubrité et de bonnes pratiques ne sont pas respectées. À l'échelle mondiale, 4% de décès et 5,7% de morbidité sont dues à des maladies infectieuses d'origine hydrique. Les bactéries telles que les Cyanobactéries, *Aeromonas*, *Burkholderia pseudomallei*, *Legionella*, et *Pseudomonas aeruginosa* peuvent persister et adapter à toutes les conditions physicochimiques de l'eau.

Les bactéries oligotrophes telles que *Pseudomonas* sont capables de se reproduire et de former des biofilms dans des conditions qui sont généralement considérées comme étant restreintes en nutriments. De tels organismes sont trouvés dans des environnements à faible teneur en éléments nutritifs tels que l'eau potable, les eaux souterraines et les eaux de surface.

*Pseudomonas aeruginosa* est une bactérie aérobie stricte à Gram négatif, en forme de bâtonnet, c'est l'espèce la plus virulente du genre *Pseudomonas*. C'est la principale cause d'otite externe (otite du nageur) chez les nageurs et peut également causer des infections de la peau, des plaies, des voies urinaires et des voies respiratoires.

La prévalence de *P. aeruginosa* dans les eaux de surface telles que les lacs et les rivières est approximativement de 10 à 1000 UFC/100 mL, mais on ne le trouve généralement pas dans l'eau potable traitée. La détection de *P. aeruginosa* est un moyen d'évaluation de la qualité hygiénique de l'eau potable, et elle fournit une indication de la propreté générale du système de distribution d'eau.

### **1. Objectif**

Détection et dénombrement de l'espèce *Pseudomonas aeruginosa* dans des échantillons d'eau de robinet après filtration sur membrane.

## 2. Principe de filtration sur membrane

Un volume donné de l'échantillon d'eau ou d'une dilution de l'échantillon est filtré sur une membrane filtrante stérile de porosité 0,45 µm. La membrane filtrante est ensuite placée sur le milieu d'isolement sélectif et incubée dans les conditions spécifiques à l'espèce bactérienne en question.

## 3. Matériel/réactifs

- Étuve bactériologique
- Flacons en verre d'un volume de 1L
- Lampe à souder portative
- Rampe de filtration
- Pompe à vide
- Membranes filtrantes de porosité 0,45 µm
- Pipettes Pasteur
- Boîtes de Pétri
- Tubes à essai (16 x 160 mm)
- Portoir pour tube à essai
- Pince Brucelle
- Lampe UV avec une longueur d'onde de  $360 \pm 20$  nm.
- Thiosulfate de sodium
- Réactif de l'oxydase (N-diméthylparaphénylène diamine)
- Gélose cétrimide
- Gélose King B
- Bouillon d'acétamide

## 4. Mode opératoire

### 4.1. Méthode de prélèvement

Le prélèvement à analyser peut être effectué à partir d'un des robinets du laboratoire pédagogique où va se dérouler ce TP.

- Laver soigneusement les mains et avant-bras, décontaminer à l'alcool et laisser sécher.

- Flamber le robinet à l'aide d'une lampe à souder portative.
- Ouvrir le robinet et laisser l'eau couler pendant 3 à 5 minutes avant d'effectuer le prélèvement.
- Ouvrir le flacon du prélèvement déjà stérilisé par autoclavage est contenant 17,5mg//L de thiosulfate de sodium dans la zone de la flamme prêt du robinet.
- Remplir le flacon du prélèvement tout en maintenant la lampe à souder allumée puis fermer aseptiquement les flacons.

#### 4.2. Filtration sur membrane

Dans le respect des conditions d'asepsie et en utilisant une rampe de filtration adaptée (autoclavable), filtrer sous-vide 100 mL de l'échantillon prélevé à travers une membrane filtrante en cellulose-nitrate stérile de porosité 0,45  $\mu\text{m}$  (diamètre : 47 mm). Puis, les membranes filtrantes sont immédiatement retirées avec des pinces stériles et placée sur la surface de la gélose cétrimide pour la détection sélective et le dénombrement de *P. aeruginosa* (figure 24). Incuber les boîtes de Pétri à 37°C pendant 48 h.

#### 4.3. Dénombrement des colonies

Le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* présumés est celui des colonies caractéristiques obtenues à la surface des membranes de filtration après incubation. Les colonies produisant une pigmentation bleu-vert (pyocyanine) sont considérées comme *Pseudomonas aeruginosa* confirmés tandis que les colonies avec une couleur brun rougeâtre ou celles produisant une fluorescence sous rayonnement ultraviolet (une longueur d'onde de  $360 \pm 20$  nm) nécessitent une confirmation.

La confirmation des colonies avec une fluorescence s'effectue en utilisant le bouillon d'acétamide en revanche, les autres colonies présentant une pigmentation brune-rougeâtre sont confirmées par le bouillon d'acétamide, test oxydase, et le milieu de King B.

#### 4.4. Confirmation

Ensemencer toutes les colonies nécessitant une confirmation sur gélose nutritive. Après incubation, les cultures qui ne présentaient initialement pas de fluorescence sont soumises au test de recherche de l'oxydase, par la suite les cultures oxydase positive

feront l'objet du test de production de fluorescéine et examinées pour déceler leur capacité à produire de l'ammoniac en utilisant le bouillon d'acétamide. Tandis que, les cultures qui présentaient au début une fluorescence sont testées pour détecter leur capacité à produire de l'ammoniac à partir d'acétamide. En revanche, les colonies initialement brunes-rougeâtres sont soumises au test de l'oxydase.

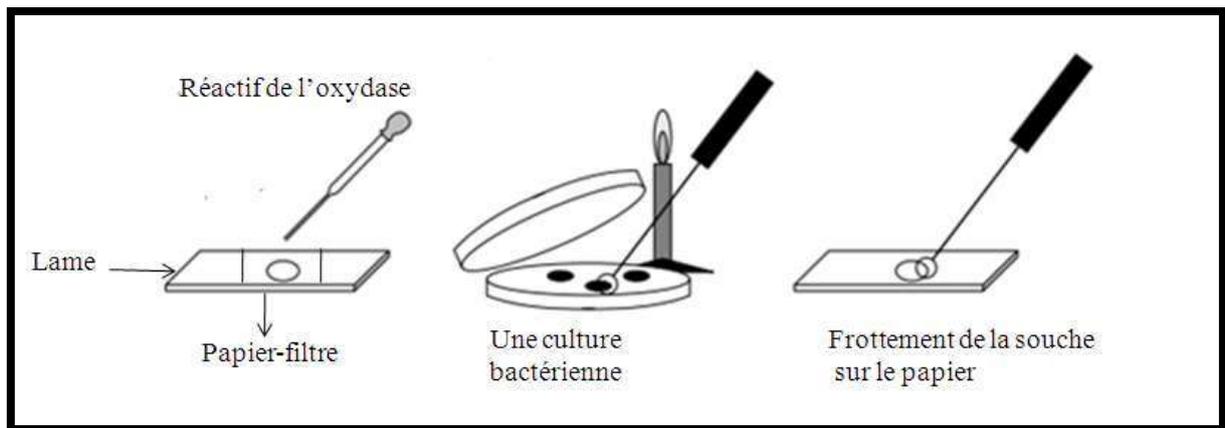


**Figure 24** : schéma explicatif de la technique de filtration sur membrane.

#### 4.4.1. Test d'oxydase

Le test de l'oxydase permet de mettre en évidence une enzyme : cytochrome oxydase chez les bactéries à Gram négatif telles que *Pseudomonas*.

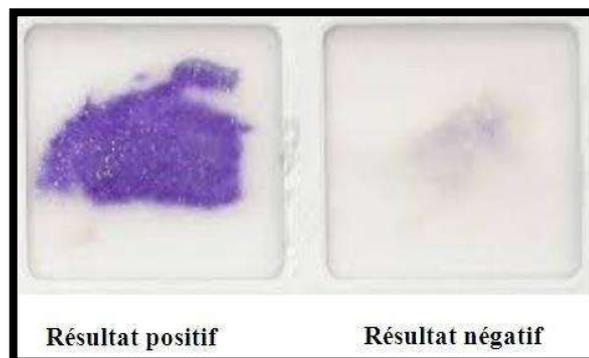
Verser 2 ou 3 gouttes du réactif pour la recherche de l'oxydase sur un morceau de papier-filtre placé sur une lame propre. À l'aide d'une pipette Pasteur ou anse en plastique (pas en Nichlechrome), frotter une partie de la culture sur le papier-filtre préparé et imbibé par le réactif de l'oxydase (N diméthylparaphénylène diamine) (figure 25).



**Figure 25** : schéma explicatif du test de l'oxydase.

##### a) Interprétation

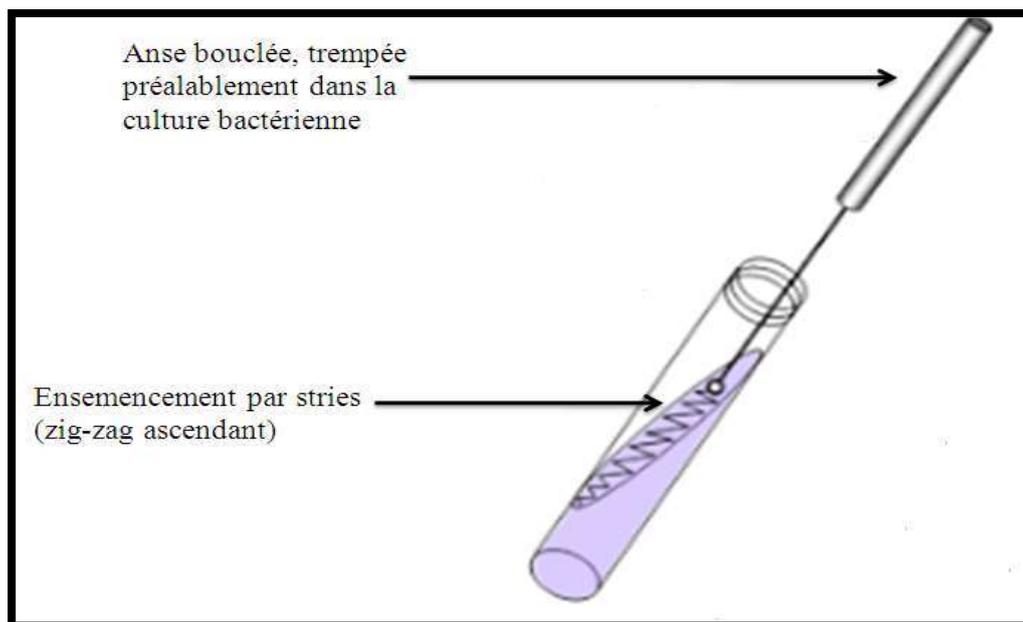
La réaction est considérée comme positive lorsqu'une coloration bleu-pourpre foncée apparaît dans les 30s. Tandis qu'une réaction négative est traduite par l'absence d'une coloration ou une coloration au-delà de 30 secondes (figure 26).



**Figure 26** : résultat du test de l'oxydase.

#### 4.4.2. Milieu de King B

Ensemencer les colonies brunes rougeâtres présentant une oxydase positive sur le milieu de King B (gélose inclinée en tube) puis incuber les tubes ensemencés à une température de  $36 \pm 2^\circ\text{C}$  pendant cinq jours au plus (figure 27). La présence d'une éventuelle fluorescence doit être examinée quotidiennement en exposant les tubes ensemencés sous une lampe UV (longueur d'onde de  $360 \pm 20$  nm). Toute fluorescence apparue dans les cinq jours est considérée comme un résultat positif.



**Figure 27** : schéma explicatif de la méthode d'ensemencement du milieu King B.

#### 4.4.3. Bouillon d'acétamide

Ensemencer un tube du bouillon d'acétamide à partir des cultures de la gélose nutritive puis incuber à  $37^\circ\text{C}$  pendant 24 h.

Après incubation, ajouter 1 ou 2 gouttes de réactif de Nessler et examiner les tubes afin de détecter une production éventuelle d'ammoniac. Cette dernière se traduit par l'apparition d'une coloration allant du jaune au rouge brique en fonction de la concentration.

### 5. Dénombrement des colonies

De plus des colonies obtenues sur la première membrane et qui présentent une pigmentation bleu-verte (toujours oxydase positive), compter toutes les colonies avec une oxydase positive, et une fluorescence sous rayonnement UV et capables de produire de l'ammoniac à partir d'acétamide (Tableau 6).

**Tableau 6 :** étapes requises pour la confirmation des colonies se développant sur la gélose cétrimide (4).

Description des colonies	Production d'oxydase	Fluorescence sur milieu King B	Ammoniac à partir d'acétamide	Confirmées comme <i>Pseudomonas aeruginosa</i>
Bleu-vert	NT	NT	NT	Oui
Fluorescence	NT	NT	+	Oui
Brun rougeâtre	+	+	+	Oui
Autres types	NT	NT	NT	Non

NT : non testé

## 6. Expression des résultats

Après confirmation, le nombre total des colonies de *Pseudomonas aeruginosa* est exprimé en UFC/ volume filtré. Le volume de l'échantillon analysé pour l'eau minérale, l'eau de source, les eaux en bouteille est de 250ml. Tandis que, pour les autres types d'eaux, le volume est généralement de 100 ml. Le nombre de *Pseudomonas aeruginosa* par volume d'échantillon d'eau est calculé comme suit :

$$N = P + F ({}^cF / {}^nF) + R ({}^cR / {}^nR)$$

**N**: le nombre de colonies comptées

**P** : le nombre de colonies bleu-vert;

**F** : le nombre de colonies fluorescentes ;

**R** : le nombre de colonies brun rougeâtre ;

**{}^nF** : le nombre de colonies fluorescentes ayant fait l'objet d'une détection de production d'ammoniac ;

**{}^cF** : le nombre de colonies fluorescentes ayant produit de l'ammoniac ;

**{}^nR** : le nombre de colonies brun rougeâtre ayant fait l'objet d'une recherche de l'oxydase, d'une détection de production d'ammoniac, et de fluorescence sur le milieu de King B ;

**{}^cR**: le nombre de colonies brun rougeâtre ayant produit de l'ammoniac, oxydase positive et fluorescentes sur le milieu de King B.

Les résultats peuvent être aussi exprimés d'une manière qualitative en indiquant la présence ou l'absence de *Pseudomonas aeruginosa* dans le volume d'eau analysée.

## Références bibliographiques

- [1] Al-Qadiri HM, Al-Holy MA, Lin M, Alami NI, Cavinato AG, Rasco BA: Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006;54:5749-5754.
- [2] Bekkari H, Touijer H, Berrada S, Ettaybi M, Benchemsi N, Maniar S, Lalami AEO: Evaluation de la contamination des eaux utilisées en milieu hospitalier: Effets d'antibiotiques et de désinfectant usuels sur les germes isolés (Surveillance of bacteriological quality and resistance to disinfectants and antibiotics in a provincial hospital in Morocco). *J Mater Environ Sci* 2016;1:1-8.
- [3] Benyahya F, Bendahou A, Essadqui FZ, El Behhari M, El Mamoune AF, Ghailani NN, Mechita MB, Barakat A: Etude de la qualité bactériologique de l'eau utilisée dans l'industrie agroalimentaire dans le Nord du Maroc. *Pan African Medical Journal* 2017;26:1-7.
- [4] Journal officiel de la république Algérienne N° 51 du 8 Dhou El Hidja 1434 correspondant au 13 octobre 2013. Arrêté du 21 Moharram 1434 correspondant au 5 décembre 2012 rendant obligatoire la méthode de détection et de dénombrement de *Pseudomonas aeruginosa* dans l'eau par filtration sur membrane.
- [5] Ngwa GA, Schop R, Chow J, Lukic L, McKague K: Comparative detection and recovery of *Pseudomonas aeruginosa* by membrane filtration and a Most Probable Number technique. *Journal of microbiological methods* 2017;133:76-81.

## **TPN° 7 : dénombrement des coliformes en milieu liquide (cas de l'eau de robinet)**

### **Introduction**

La qualité de l'eau potable a toujours été un problème majeur dans de nombreux pays, en particulier dans les pays en développement. L'Organisation Mondiale de la Santé dans ses lignes directrices concernant la qualité de l'eau potable a mis en évidence au moins dix-sept genres différents et majeurs de bactéries pouvant être trouvées dans l'eau de robinet et qui sont capables d'affecter gravement la santé humaine.

La transmission des maladies d'origine hydrique est encore un problème vital de nos jours, malgré de multiples efforts à l'échelle mondiale pour assurer une meilleure qualité d'eau potable. Cette dernière peut être atteinte suite à la contamination par des bactéries hétérotrophes y compris des agents pathogènes capables de causer des infections pour l'homme comme les enterobactéries à savoir le groupe des coliformes.

La présence de coliformes telles que *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Serratia* et *Yersinia* dans l'eau potable témoigne d'un traitement inadéquat, une contamination post-traitement, ou un excès d'éléments nutritifs. Les normes exigent l'absence totale des coliformes dans 100 mL d'eau potable.

### **1. Objectif**

La recherche et le dénombrement des coliformes totaux et fécaux en milieu de culture liquide par la méthode du nombre le plus probable (NPP) dans un échantillon d'eau de robinet.

### **2. Principe**

La présente méthode cible la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et fécaux (coliformes thermo-tolérants) en particulier *Escherichia coli* présumé par culture en milieu liquide. La technique du nombre le plus probable (NPP) consiste en l'inoculation d'un bouillon permettant la multiplication des bactéries recherchées dans un volume bien déterminé de l'échantillon à analyser.

Si la bactérie recherchée est présente, un résultat positif est obtenu après un temps d'incubation approprié traduit par une turbidité du milieu de culture ou par virage de la couleur de l'indicateur de croissance bactérienne. L'inoculation de plusieurs exemplaires d'un bouillon avec différents volumes de l'échantillon permet d'estimer statistiquement la concentration initiale des coliformes. Cette technique peut être appliquée à tous les types d'eau, même ceux contenant une quantité appréciable de particules en suspension.

Les coliformes totaux sont des bactéries à Gram négatif qui fermentent le lactose avec production de gaz, d'acides et d'aldéhyde, etc. à une température d'incubation de 30°C ou 37°C pendant 24 h. Tandis que, les coliformes thermotolérants (coliformes fécaux) peuvent assurer le même type de fermentation à une température de 44°C.

### 3. Matériel/réactifs

- Portoir pour tubes à essai.
- Poire de sécurité.
- Flacons en verre d'un volume de 1L.
- Lampe à souder portative.
- Etuve bactériologique.
- Tubes à essai (16 x 160 mm).
- Cloches de Durham.
- Pipettes graduées de différents volumes (1ml, 10ml).
- Anse bouclée.
- Thiosulfate de sodium.
- Eau physiologique (diluant à 0,9% de NaCl).
- Bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (BCPL).
- Bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB).
- Eau peptonée exempte d'indole.
- Bouillon sélectif EC.
- Réactif de Kovacs.

## 4. Mode opératoire

### 4.1. Prélèvement

Le prélèvement à analyser peut être effectué à partir d'un des robinets du laboratoire pédagogique où va se dérouler ce TP.

- Laver soigneusement les mains et avant-bras, décontaminer à l'alcool et laisser sécher.
- Flamber le robinet à l'aide d'une lampe à souder portative.
- Ouvrir le robinet et laisser l'eau couler pendant 3 à 5 minutes avant d'effectuer le prélèvement.
- Ouvrir le flacon du prélèvement déjà stérilisé par autoclavage est contenant 17,5 mg/L de thiosulfate de sodium dans la zone de la flamme prêt du robinet.
- Remplir le flacon de prélèvement tout en maintenant la lampe à souder allumée puis fermer aseptiquement les flacons.

### 4.2. Technique

#### 4.2.1. Préparation des dilutions décimales

Réaliser un nombre suffisant des dilutions afin d'assurer que tous les tubes de la dernière dilution donneront un résultat négatif (voir TP N°1).

#### 4.2.2. Test présomptif

Il est courant d'utiliser une combinaison de trois tubes pour chacune des séries de dilutions, mais pour plus de précision et/ou pour certains produits, il peut être nécessaire d'inoculer une série de plus de trois tubes par dilution (par exemple cinq tubes par dilution).

A l'aide de pipettes graduées (10 ml) stériles, inoculer une série de trois tubes du milieu présomptif d'enrichissement (bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol, BCPL) à double concentration munis d'une cloche de Durham à raison de 10 ml/tube de la suspension mère (échantillon à analyser) ainsi que ses dilutions. Par ailleurs, dans les mêmes conditions, ensemercer trois tubes du même bouillon à simple concentration avec 1 ml de la suspension mère ainsi que ses dilutions et de la même manière trois autres tubes avec 0,1 ml.

Par la suite les tubes sont incubés à 30°C ou à 37°C pendant 24 h ± 2 h puis ils sont examinés après 24 h et 48 h pour vérifier la présence (résultat positif) ou l'absence (résultat négatif) d'une éventuelle croissance bactérienne (figure 28).

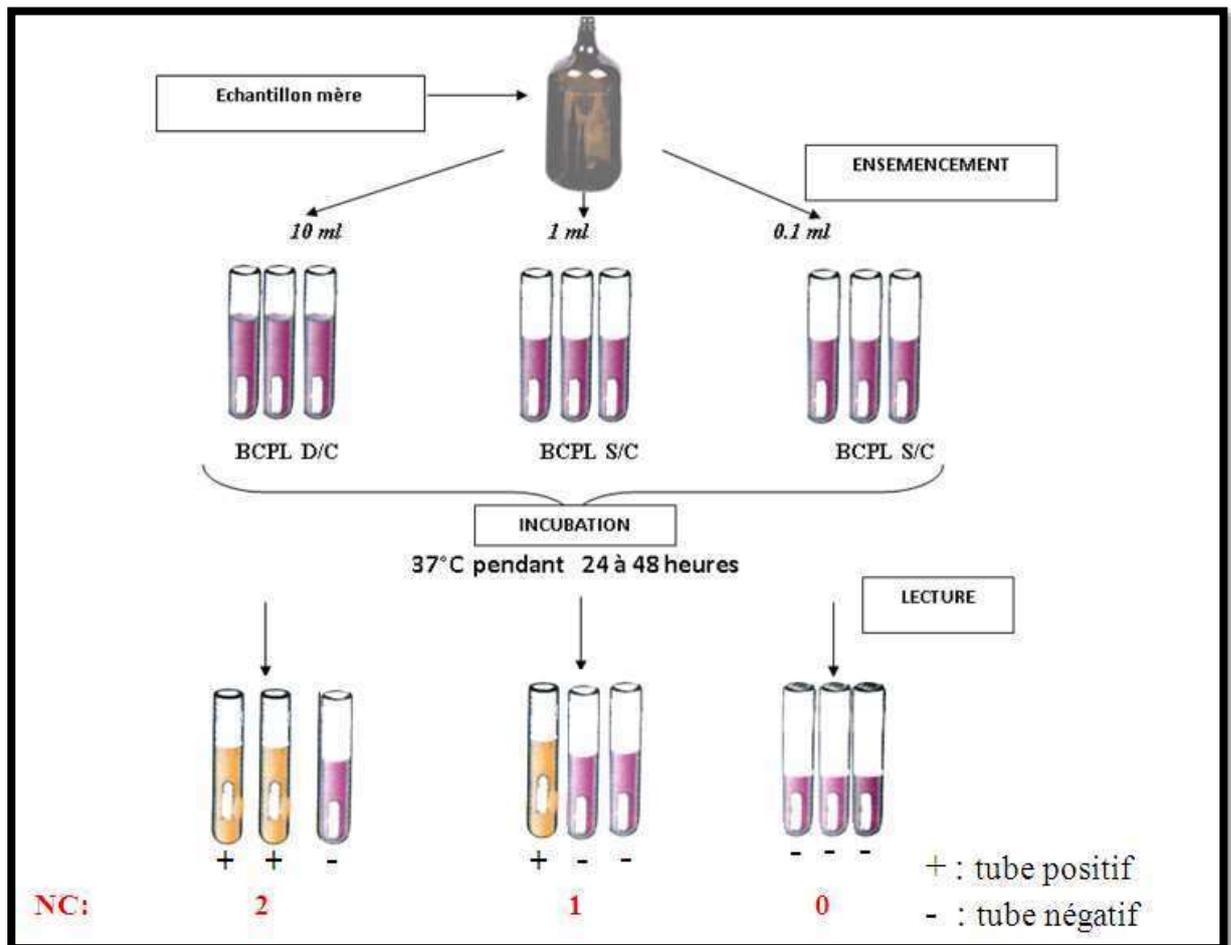


Figure 28 : schéma explicatif du test présomptif sur BCPL.

#### 4.2.3. Test de confirmation

Après incubation, à partir de chaque tube présentant un test présomptif positif traduit par virage de la couleur du violet vers le jaune (fermentation du lactose) et un dégagement gazeux détectable dans la cloche, ensemencer à l'aide d'une anse bouclée un tube du bouillon lactosé bilié au vert brillant (milieu de confirmation). Les tubes sont ensuite incubés à 30°C ou à 37 °C pendant 24 h ± 2 h, si la production de gaz n'est pas observée, prolonger la période d'incubation jusqu'à 48h. De la même manière une deuxième série de tubes de ce

milieu estensemencée pour être incubées à 44°C pendant 48 h en vue de confirmer la présence des coliformes fécaux (thermotolérants).

#### 4.3. Interprétation des résultats

La présence des coliformes est confirmée dans le cas où un trouble et/ou une production de gaz est détectée dans les tubes du test confirmatif au BLBVB (figure 29).

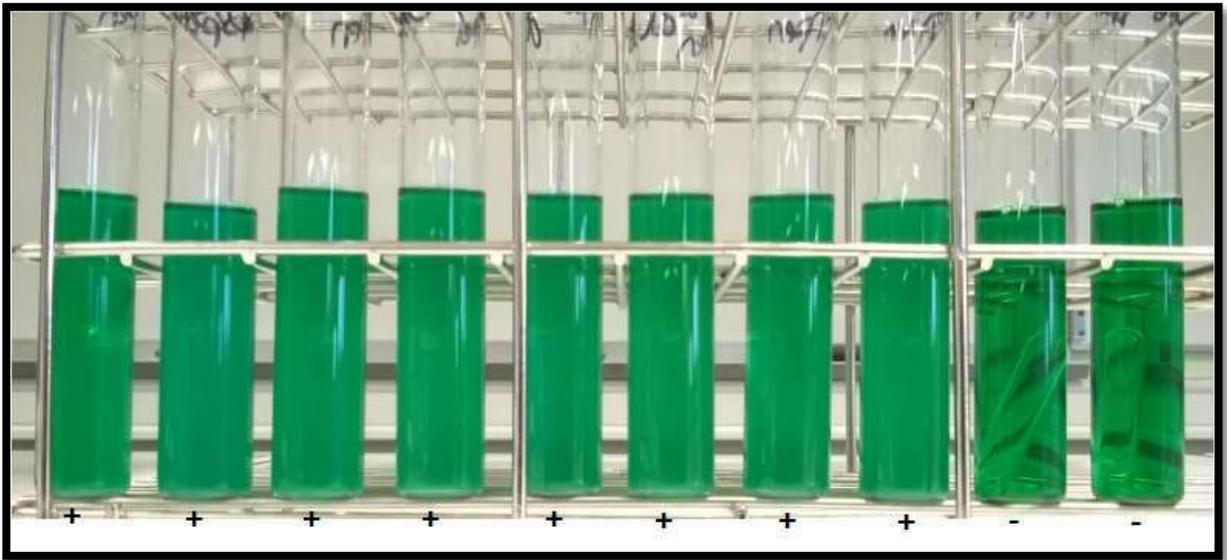


Figure 29 : résultats après incubation du test confirmatif du test NPP.

#### 4.4. Calcul et expression des résultats

Pour chaque dilution, compter le nombre total des tubes BLBVB positifs après 24 h et éventuellement après 48 h d'incubation à une température de 37 °C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux. Cette lecture permettra la détermination du nombre caractéristique composé de trois chiffres. Ce dernier servira pour le calcul du NPP en se référant au tableau de MacGrady pour pouvoir exprimer les résultats de l'analyse quantitative de l'échantillon d'eau en question (voir cours de techniques d'analyse microbiologique).

### 5. Dénombrement d'*Escherichia coli* présumés

#### 5.1. Culture et incubation du milieu sélectif (bouillon EC)

À partir de chaque tube d'enrichissement présentant un résultat positif, effectuer une subculture dans un tube du bouillon EC en utilisant une anse bouclée. Incuber les tubes à

44°C pendant 24 h. Dans le cas d'absence de production de gaz visible dans le bouillon EC, prolonger l'incubation jusqu'à 48h.

### 5.2. Inoculation et incubation de l'eau peptonée exempte d'indole

Après incubation, les tubes du bouillon EC positifs (production de gaz) sont utilisés pour l'inoculation des tubes contenant le bouillon d'eau peptonée exempte d'indole à l'aide d'une anse bouclée puis incuber les tubesensemencés à 44°C pendant 48 h ± 2 h.

### 5.3. Test de la production d'indole

Dans l'objectif de vérifier la capacité à produire de l'indole à partir du tryptophane, ajouter quelques gouttes du réactif de Kovacs aux tubes d'eau peptonée exempte d'indole. La formation d'un anneau rouge indique la présence d'indole signifiant la présence d'*Escherichia coli* (figure 30).

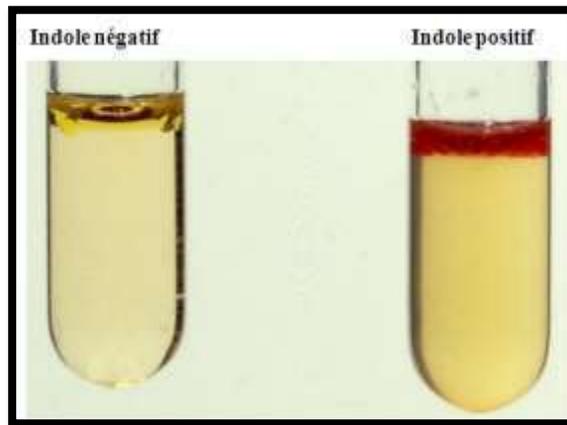


Figure 30 : résultat du test d'indole (8).

### 5.4. Interprétation

Les tubes, présentant un résultat positif pour le milieu d'enrichissement sélectif, le bouillon EC et pour l'eau peptonée exempte d'indole incubés à 44°C, sont considérés comme positifs pour la présence d'*Escherichia coli*. Le nombre le plus probable d'*E. coli* présumé est déterminé par référence au tableau de Mac Grady en prenant en considération les tubes positifs pour chacune des dilutions.

### Références bibliographiques

- [1] Al-Qadiri HM, Al-Holy MA, Lin M, Alami NI, Cavinato AG, Rasco BA: Rapid detection and identification of *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli* as pure and mixed cultures in bottled drinking water using Fourier transform infrared spectroscopy and multivariate analysis. *Journal of agricultural and food chemistry* 2006;54:5749-5754.
- [2] Fella H, Nawel H, Fatouma B, Hichem K, Abdelmalek B: Suivi de la qualité bactériologique de l'eau de consommation produite par l'APC de Soumaa (Blida-Algérie) depuis la source jusqu'au consommateur. *Membres du comité de lecture* 2013;40-46.
- [3] Gourmelon M, Derrien A, Crenn I, Loaec S: Dénombrement des coliformes thermotolérants ou des *Escherichia coli* dans des sédiments cotiers vaseux. 2002. Ifremer.
- [4] Journal officiel de la république Algérienne N° 58 du 24 Moharram 1439 correspondant au 15 octobre 2017. Arrêté du 20 JomadaEthania 1438 correspondant au 19 mars 2017 rendant obligatoire la méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des coliformes par la technique du nombre le plus probable (NPP).
- [5] Journal officiel de la république Algérienne N° 64 du 18 Safar 1439 correspondant au 7 novembre 2017. Arrêté du 18 Ramadhan 1438 correspondant au 13 juin 2017 rendant obligatoire la méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherechia coli* présumés par la technique du nombre le plus probable (NPP).
- [6] Kurup R, Persaud R, Caesar J, Raja V: Microbiological and physiochemical analysis of drinking water in Georgetown, Guyana. *Nature and Science* 2010;8:261-265.
- [7] Muhammad MS, Abdul-Wahab MF, Saidin MAR, Asraf MH, Malek NANN: Microbiological analysis of drinking water from water vending machines. *Malaysian Journal of Fundamental and Applied Sciences* 2020;16:186-189.
- [8] Rodier J, Legube B, Merlet N: L'analyse de l'eau. Dunod, 2009, P 723, 754, 761, 764.

## **TP N°8 : recherche et dénombrement des spores des bactéries sulfito-réductrices (clostridia)**

### **Introduction**

Les bactéries sporo-formatrices peuvent survivre dans les conditions se trouvant dans les installations de transformation des aliments en raison de leur capacité naturelle à résister à des conditions défavorables assurée par leur forme sporulée rentrant ainsi dans une phase de dormance. Ces formes résistent aux conditions hostiles, y compris la disponibilité réduite des nutriments, les pHs extrêmes, températures défavorables et humidité réduite. En parallèle de ce pouvoir sporogène, de nombreuses bactéries sporo-formatrices peuvent former des biofilms qui améliorent encore leur capacité à persister dans des conditions environnementales défavorables.

Les *Clostridium* sulfito-réducteurs sont parmi les bactéries recherchées dans le cadre du contrôle de la qualité microbiologique de l'eau d'alimentation. Ils sont généralement considérés comme des indicateurs de pollution fécale où leurs spores sont beaucoup plus résistantes que les formes végétatives des streptocoques fécaux et des coliformes fécaux d'où ils peuvent témoigner d'une contamination fécale ancienne ou intermittente.

### **1. Objectif**

Recherche et dénombrement des spores de bactéries anaérobies sulfito-réducteurs (clostridia) dans l'eau de robinet.

### **2. Principe**

Cette méthode est basée sur un traitement thermique suivi d'un enrichissement dans un milieu liquide et une incubation pour détecter les spores viables. La réduction du sulfite en sulfure entraîne la formation du sulfure de fer qui colore uniformément en noir les milieux liquides ou qui forme un halo noir autour des colonies obtenues sur milieu solide. Ce principe est applicable à tous les types d'eau, y compris les eaux troubles.

### 3. Matériel/réactifs

- Bain-marie.
- Etuve bactériologique.
- Flacons avec bouchons à vis avec différents volumes (200 mL, 50 mL, 25 mL).
- Des tubes à essai (220 × 22 mm).
- Portoir pour tubes.
- Thermomètre.
- Pipettes Pasteur.
- Pipettes graduées (10 mL, 1mL).
- Poire de sécurité.
- Bouillon différentiel renforcé pour les *Clostridium* (DRCM).
- Gélose viande-foie.
- Citrate de fer (III).
- Sulfite de sodium.
- Sulfate d'ammonium et de fer (alun de fer).

### 4. Mode opératoire

#### 4.1. Méthode par enrichissement en milieu liquide

##### 4.1.1. Sélection des spores

Cette technique consiste en chauffage de l'échantillon pendant une période suffisante afin de détruire les cellules végétatives. L'échantillon d'eau doit être chauffé dans un bain d'eau à 80°C pendant 15 min à partir du moment où cette température a été atteinte au cœur de l'échantillon en se référant à un échantillon témoin contenant la même quantité d'eau avec un thermomètre permettant de suivre de manière permanente la température.

##### 4.1.2. Inoculation et incubation

Ajouter 50 ml d'échantillon traité à un flacon avec bouchon à vis contenant 50 mL du bouillon différentiel renforcé pour les *Clostridium* (DRCM) à double concentration (contenant 2 mL d'un mélange (A) composé de volumes égaux de la solution de citrate de fer (III) à 7% et celle de sulfite de sodium à 4%).

Ajouter 10 mL de l'échantillon après traitement thermique à une série de cinq flacons de 25 mL contenant 25 mL du bouillon en double concentration (contenant 1 mL d'un mélange A). Une série de cinq flacons avec bouchons à vis de 25 mL contenant 25 mL du milieu DRCM simple concentration doit recevoir 1 mL de l'échantillon et 0,5 mL du mélange A pour chaque flacon. Si nécessaire, ajouter 1 mL d'une dilution au 1/10 de l'échantillon à une série de cinq flacons contenant 25 mL du milieu simple concentration. Incuber les flacons inoculés dans des conditions anaérobies généralement à une température de 37°C pendant 48 h.

Si une très faible concentration de spores de bactéries sulfito-réductrices est attendue, par exemple dans le cas d'eau embouteillée ou potable, procéder à un test qualitatif sur 100 mL d'échantillon traité dans un flacon de 200 mL contenant 100 mL de milieu double concentration sans définir le NPP.

#### **4.1.3. Interprétation**

Les spores des *Clostridium* anaérobies sulfito-réducteurs après germination peuvent réduire le sulfite en sulfure de fer (II). La précipitation de ce dernier se traduit par un noircissement considéré comme résultat positif.

#### **4.1.4. Expression des résultats**

Exprimer les résultats en nombre le plus probable de spores de bactéries anaérobies sulfito-réductrices dans 100 mL (méthode NPP, voir TPN°7).

### **4.2. Méthode par incorporation en gélose**

#### **4.2.1. Destruction des formes végétatives**

Verser 25 mL d'eau à analyser dans un tube de 220 × 22 mm, le porter au bain d'eau à 80 °C pendant 10 minutes. Refroidir rapidement à environ 55 °C.

#### **4.2.2. Préparation du milieu**

Placer dans un bain marie bouillant quatre tubes contenant chacun 20 mL du milieu viande-foie. Maintenir 10 minutes dans ce bain d'eau pour s'assurer de l'élimination des gaz dissous.

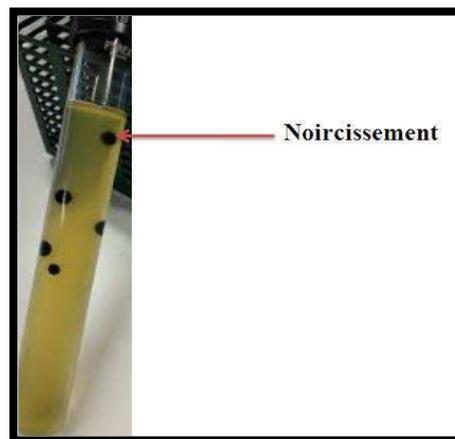
Refroidir à une température de 55°C environ puis ajouter à chaque tube 4 gouttes de la solution d'alun de fer et 1 mL de la solution de sulfite de sodium et mélanger toute en évitant la formation des bulles.

#### 4.2.3. Inoculation et incubation

Répartir à raison de 5 mL d'eau traitée dans quatre tubes stériles puis ajouter dans chacun des tubes le contenu d'un tube du milieu VF. Mélanger doucement le contenu des tubes tout en évitant la pénétration de l'air et refroidir sous l'eau du robinet. Incuber les tubes à une température de 37°C pendant 24 (une première lecture) à 48h (une deuxième lecture).

#### 4.2.4. Lecture et expression des résultats

Considérer comme un résultat positif d'une spore de bactérie anaérobie sulfito-réductrice toute colonie noire entourée d'un halo noir (figure 31). Exprimer le résultat en nombre de spores par 100 mL.



**Figure 31** : résultat positif de la mise en évidence de la présence des spores sulfito-réductrice sur le milieu VF(4).

### Références bibliographiques

- [1] Journal officiel de la république Algérienne N°36 du 9 Ramadhan 1434 correspondant au 18 juillet 2013. Arrêté du 23 Rajab 1433 correspondant au 13 juin 2012 rendant obligatoire la méthode de recherche et de dénombrement des spores de micro-organismes anaérobies sulfito-réductrices (Clostridia).
- [2] Kent DJ, Chauhan K, Boor KJ, Wiedmann M, Martin NH: Spore test parameters matter: Mesophilic and thermophilic spore counts detected in raw milk and dairy powders differ significantly by test method. *Journal of dairy science* 2016;99:5180-5191.
- [3] McHugh AJ, Feehily C, Hill C, Cotter PD: Detection and enumeration of spore-forming bacteria in powdered dairy products. *Frontiers in Microbiology* 2017;8:109.
- [4] Rodier J, Legube B, Merlet N: *L'analyse de l'eau*. Dunod, 2009, P 723, 754, 761, 764.
- [5] Watterson MJ, Kent DJ, Boor KJ, Wiedmann M, Martin NH: Evaluation of dairy powder products implicates thermophilic sporeformers as the primary organisms of interest. *Journal of dairy science* 2014;97:2487-2497.