

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

*UNIVERSITÉ FELIX HOUPHOUËT BOIGNY DE COCODY
UFR BIOSCIENCES*



ANNEE UNIVERSITAIRE 2014-2015

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

*Dr KOUAME Désiré : Maitre- Assistant
& Dr KOUAKOU Privat : Assistant*

*ANALYSES
MICROBIOLOGIQUES
DES ALIMENTS :
PRINCIPES,
METHODES DE RECHERCHE
DES GERMES PATHOGENES,
ET CRITERES MICROBIOLOGIQUES*

PRINCIPES ET BUT DE L'ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

Les aliments sont en général contaminés par les microorganismes contenus dans l'environnement. Si les conditions sont favorables à l'aliment, les microorganismes vont se multiplier et provoquer deux types d'altérations à savoir : la qualité marchande et la qualité hygiénique.

I/ - LES DIFFERENTS TYPES D'ALTERATION

A/ - Altération de la qualité marchande

Les microorganismes provoquent des troubles des « caractères organoleptiques et physico-chimiques » sans rendre l'aliment dangereux pour le consommateur. Sa mise en évidence se fait par le dénombrement de la « flore totale ».

Exemple N°1 : *Pseudomonas marginalis* est rencontré sur les feuilles de salade et sur l'ensemble des feuilles. Il fait partie de la flore normale des végétaux mais, sa multiplication excessive peut entraîner un pourrissement de ces feuilles. **Ex N°3 :** Les Levures se développent bien sur les végétaux sucrés et acides.

Ex. N°2 : Les bactéries lactiques dont le *Leuconostoc mesenteroïdes* est le germe d'altération fréquent sur les produits riches en sucre comme la carotte râpée

B/ - Altération de la qualité hygiénique

Dans ce cas, le microorganisme en se multipliant rend l'aliment dangereux pour la santé publique soit par sa charge, soit par la toxine qu'elle produit. **Ex.N°1 :** les volailles sont souvent contaminées par *Salmonella sp.* avec des sources nombreuses (sol, poussière, matières fécales des animaux). Leur multiplication (*S. enteritidis*) peut entraîner une infection salmonellaïque chez le consommateur **Ex N°2 :** les *Staphylococcus* et le *Vibrio cholerae* sont dangereux

II/ - ANALYSE MICROBIOLOGIQUE

L'analyse microbiologique d'un produit alimentaire a pour but, de déceler et de prévenir ces deux types d'altérations. Il est cependant nécessaire de distinguer deux types d'analyses qui sont : l'analyse du produit fini et, l'analyse du produit en cours de fabrication.

1/ - Analyse du produit fini qui a pour but de mettre en évidence les deux types d'altération. Ce sont des analyses réalisées par les laboratoires officiels de contrôle ou par des entreprises. Elles nécessitent l'application des « méthodes normalisées » (ISO,AFNOR, CODINORM ...) et, permettent de vérifier la conformité du produit à des critères.

2/ - Analyse du produit en cours de fabrication, il s'agit d'un contrôle de bonnes pratiques de fabrication ou hygiénique. Elle a un but préventif où l'utilisation de nombreux guides sont plus sévères que les critères réglementaires. Quel que soit le type d'analyse, l'analyse microbiologique peut être complète ou partielle en fonction de la demande du client ou du contenu des cahiers des charges.

III/ - ANALYSE MICROBIOLOGIQUE COMPLETE DES PRODUITS FINIS

Quatre groupes de microorganismes sont habituellement recherchés : les germes d'altération de la qualité marchande, les pathogènes, les germes témoins de contamination fécale et les indicateurs technologiques.

1/ - les germes capables d'altération de la qualité marchande de l'aliment

* **Exemple N°1 :** Les Produits acides, pour les laits et yaourts, l'on a les microorganismes à 30°C, les Levures et Moisissures, les *Lactobacillus* et les Bactéries lactiques tels les *Leuconostocs*

* **Ex N° 2 :** Les Conserves, l'on a plutôt les *Clostridium* (bombage des boîtes) et les *Bacillus*

2/ - les germes potentiellement pathogènes pour le consommateur

Ce sont principalement : * *Salmonella spp.* * *Staphylococcus aureus* * *Shigella*
* Anaérobies sulfitoréducteurs (*Clostridium perfringens/ botulinum*) * *Bacillus cereus*
* *E. coli* * *Yersinia enterocolitica* * *Listeria monocytogenes* * *Campylobacter jejuni* ect ...

3/ - les germes « témoins » de contamination fécale :

* *E. coli* * Coliformes (*Klebsiella, Citrobacter, Enterobacter*) * Entérocoques (eaux – coquillages)

4/ - les germes indicateurs technologiques : * Coliformes * Entérobactéries

NB : Les « germes témoins » sont des marqueurs dont la recherche ou le dénombrement permet de supposer la présence d'un germe cible. Deux situations peuvent se présenter : celle de l'index et de l'indicateur.

Mais avant d'envisager la recherche ou le dénombrement des germes, il est indispensable d'échantillonner, de prélever et de transporter convenablement l'aliment à analyser.

**ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE, TECHNIQUES
D'ENSEMENCEMENT ET CULTURE DES BACTERIES**

A/ - ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE

Les milieux de culture sont des produits solides ou liquides permettant l'étude des micro-organismes en dehors de leur milieu naturel. Les milieux aident à l'isolement, l'identification, la numération, la conservation des bactéries. Le choix d'un milieu doit être adapté à la bactérie que l'on recherche.

1/ - Conditions optimales selon les espèces bactériennes

- pH optimum : 7, 4
- Isotonicité : 9 g/l de NaCl
- Humidité : présence de l'eau
- Potentiel d'oxydoréduction (Rh), selon le type respiratoire
- Température

2/ - Classification

- Composition : * Naturels (d'origine animale et végétale)
 - * Synthétiques (corps chimiques)
 - * Semi-synthétiques (naturels et chimiques)
- Mode de préparation : * M. stérilisables (sans albumine) * M. non stérilisables (albumine)
- Utilisation des milieux : * Milieu de base * Isolement * Identification * Conservation

3/ - Différentes sortes de milieux existants

- Milieu prêt à l'emploi conditionné (boîte et tube) - Ingrédients de milieu
- Milieu prêt à l'emploi non conditionné (flacon) - Milieu déshydraté (flacon de 500 g)

4/ - Technique de préparation

4.a. / - Préparation d'un milieu à partir de la base déshydratée

Il faut toujours suivre les recommandations du fabricant

- * Pesée (40 grammes de milieu déshydraté)
- * Dissolution (Ex : 40 gr. de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée)
- * Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète
- * Ajustage de pH
- * Conditionnement : Répartition en tube ou flacons
- * Bouchage
- * Stérilisation (autoclaver à 120° C pendant 15 minutes)
- * Conditionnement final : tube (culot, pente), boîte de répartition
- * Etiquetage et stockage à 3°C en chambre froide ou au réfrigérateur

4. b. / - Préparation d'un milieu de culture à partir d'ingrédients

- * Pesée de chaque ingrédient pour 1000 ml (1 l) d'eau distillée stérile
- * Dissolution complète par ébullition
- * Répartition en tubes ou flacons
- * Stérilisation : autoclaver à 120° C pendant 15 mn.
- * Coulage en boîte de Pétri et conservation à 3°C en chambre froide ou au réfrigérateur

5/ - Procédure de stérilisation à l'autoclave

- Remplir les récipients à stériliser au $\frac{3}{4}$ et les disposer les ouvertures tournées vers le haut
- Vérifier le niveau d'eau dans l'autoclave - Placer à l'intérieur le panier chargé de milieux
- Fermer le couvercle de l'autoclave et serrer 2 à 2, les boulons diamétralement opposés ainsi que le robinet d'échappement
- Mettre l'appareil en marche et laisser la pression monter
- Faire la purge à 3 reprises et, fermer le robinet de purge
- Laisser la pression monter à la valeur requise et, déclencher le chronomètre
- Arrêter la stérilisation au terme du temps et, laisser descendre la pression à zéro
- Ouvrir l'autoclave et, sortir les milieux

6/ - Consignes générales - Vérifier la date limite d'utilisation

- Conserver les milieux déshydratés à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans le flacon d'origine, avec le bouchon hermétiquement fermé
- Stériliser selon le mode indiqué dans la fiche technique

B/ - LES TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

I/ - DEFINITIONS

- **Ensemencement** : Opération qui consiste à déposer des bactéries sur un milieu de culture ou, dans un milieu, et également à réaliser le transfert de microorganismes d'un milieu à un autre.
- **Repiquage** : Transplantation d'une culture pure de microorganisme sur un milieu neuf
- **Isolement** : Ensemencement effectué dans un but de séparation de façon à obtenir à partir des bactéries présentes des colonies nettement distinctes. On isole une bactérie pour l'obtenir en culture pure.

Au niveau des règles générales, ces techniques doivent : - être pratiquées dans des conditions « d'asepsie parfaite » - être effectuées sur des milieux favorables aux études envisagées et, dans les conditions adaptées aux souches recherchées.

II/ - TRANSFERT STERILE

II. 1. / - Techniques de base de la réalisation du transfert stérile

Le transfert stérile est réalisé soit à l'aide : d'une pipette pasteur stérile, d'un ensementeur automatisé, d'une öse ou anse de platine.

- Stériliser l'extrémité à la flamme du bec Bunsen - Laisser refroidir quelques minutes
- Prélever : une öse de produit liquidien, un aliquote (morceau) du produit alimentaire à analyser, ou une colonie isolée sur gélose.

NB : La zone stérile autour du bec Bunsen est de 15 cm environ, manipuler donc dans cette zone.

II. 2 / - Produit à étudier

- Produits naturels : eau de boissons, lait, fruits et légumes, viandes, conserves, plats cuisinés...
- Souches bactériennes : en milieu liquide, en milieu solide
- Certains produits pathologiques d'origine humaine et animale

III/ - TECHNIQUES DE DISSEMINATION

Plusieurs techniques d'ensemencement sont utilisées en pratique courante mais, selon le type d'examen, certaines sont plus employées que d'autres. Nous pouvons citer les techniques suivantes :

- l'ensemencement par stries d'épuisement
- l'ensemencement par incorporation en milieu solide en simple ou double couche, en milieu semi-solide et en milieu liquide.
- l'ensemencement par étalement, par inondation, par touche ...

La méthode dite par « **épuisement** » est la plus utilisée : c'est la technique de base. Les géloses sont coulées soit en tube (gélose inclinée), soit en boîte de Pétri.

1/ - Technique par épuisement : Isolement en boîtes, méthode des « quadrants »

- Tenir la boîte de Pétri dans la main gauche, ouverte vers la flamme du bec Bunsen, dans la zone stérile
- L'inoculum est déposé en point périphérique de la surface du milieu, la gélose doit être sèche
- L'inoculum est disséminé en stries parallèles très rapprochées dans la moitié de la boîte
- Faire des stries perpendiculaires aux premières dans le 3^{ème} quadrant
- Faire encore des stries obliques (à 45°) dans le 4^{ème} quadrant, mais en espaçant plus les stries
- Refermer la boîte avec le couvercle
- La boîte ensemencée doit toujours reposer couvercle vers le bas dans l'étuve ou sur la paille
- Existence de beaucoup d'autres variantes de la technique

2/ - Technique d'ensemencement par incorporation

- A partir d'une suspension microbienne ou de colonies sur géloses, l'on ensemence par incorporation un milieu de culture solide, liquide ou rendu liquide.
- A partir de la source microbienne, l'on réalise dans la masse une incorporation par piqure centrale ou une strie longitudinale dans un milieu en culot **Ex : Gélose Mannitol – mobilité**
- A partir de la suspension microbienne, **un inoculum de 1 ml** va être déposé dans une boîte de Pétri vide dans laquelle la gélose en surfusion à 47° C sera coulée (12 à 15 ml) et homogénéisée réalisant ainsi l'ensemencement dans la masse. Après solidification de la gélose, l'incubation est réalisée.

3/ - Technique d'ensemencement par étalement

A partir d'une suspension microbienne, l'on dépose **0,1 ml d'inoculum** à la surface d'une gélose que l'on étale à l'aide d'un étaleur stérile. L'on laisse sécher et on met à incuber.

4/ - Autres techniques d'ensemencement

a/ - Par inondation

L'on inonde la surface d'une gélose avec une suspension bactérienne, attendre environ une minute d'imprégnation et éliminer le surplus. L'on laisse sécher et on met à incuber

b/ - Par touches : à partir d'une colonie, toucher un point d'une gélose

c/ - Par strie transversale : Milieu coulé en pente

d/ - Par étoile ou par strie radiaire

IV/ - INCUBATION

Les boîtes de gélose ou les tubes ensemencés sont placées à l'étuve à **37 °C** pendant **18 à 24 heures**. La durée d'incubation varie en fonction des bactéries : 24 h, 48 h, 72 heures ou plus pour certains germes anaérobies stricts.

L'atmosphère d'incubation peut être différente :

*** en aérobiose * anaérobiose * en microaérophilie * en atmosphère enrichie en CO₂**

Elle dépend de l'espèce bactérienne recherchée. Exemples : - Entérobactérie ==> Aérobiose
- *Campylobacter* ==> Microaérophilie - Pneumocoque ==> CO₂

C. / - DESCRIPTION DES COLONIES ET BOUILLONS

Après incubation pendant un temps déterminé, à température constante favorable au développement des colonies bactériennes, les milieux gélifiés et liquides sont examinés.

1/ - Instruments de lecture

- A l'œil nu le plus souvent - A la loupe à main - Au stéréo microscope (loupe binoculaire)

2/ - La forme : - ronde - ovale - asymétrique - irrégulière

3/ - La surface : - brillante lisse (humide, grasse)

- mate (sèche, rugueuse) mais aussi ridée, plissée - cérébriforme (chou-fleur)

4/ - La taille : - petite (< 1 mm) - moyenne (1,5 à 3 mm) - grande (> 3 mm)

5/ - Le contour : - net - échancré - lobé - dentelé- filamenteux - arborescent

6/ - Le relief

- bombé - plat - globulaire - mamelonné - ombiliqué - acuminé - cratériforme

7/ - La consistance : - pâteuse (molle) - solide (cohérente) détachable en bloc ou non détachable - élastique - filante ou visqueuse avec les colonies ne pouvant se diviser.

8/ - La couleur : observable que sur les géloses nutritives, sans sucre et sans inhibiteur
- verte (*Pseudomonas aeruginosa*) - jaune (*Staph aureus*) - rouge (*Serratia*) - noir (*Bacteroides*)
Le pigment produit peut être diffusible ce qui donne des colonies et le milieu de culture pigmentés
ou, non diffusible ce qui donne des colonies pigmentées mais, le milieu de culture inchangé.

9/ - L'odeur

- Végétal (terre) == > *Nocardia / Serratia odorifera*
- Aromatique == > *P. aeruginosa*
- Ammoniacque == > *Proteus*
- Métallique == > *Clostridium perfringens*
- Fruité ===== > *Alcaligenes*
- Laiterie == > *Lactobacillus*
- Putréfaction == > Anaérobies

10/ - Le type de colonie

a/ - Colonie S (Smooth = lisse)

- Bords irréguliers, souvent bombés, surface lisse, consistance crémeuse, suspension homogène dans l'eau

b/ - Colonie R (Rough = rugueux)

- Bords réguliers, souvent plates, surface rugueuse, consistance sèche, suspension hétérogène

c/ - Colonie M (Muqueuse)

- Bords lisse et réguliers, bombés, surface lisse, brillante, consistance filante, suspension hétérogène

d/ - Colonie naine : Taille < 1 mm

e/ - Colonie envahissante *Proteus*

- DESCRIPTION DES BOUILLONS

On peut constater au niveau des bouillons : un trouble, un aspect en mie de pain, un dépôt visqueux ou un voile

1/ - **Trouble** : homogène ou hétérogène

2/ - **Aspect en mie de pain**

3/ - **Dépôt visqueux** : l'agitation torsade le dépôt

4/ - **Voile** : * en haut du tube * adhérent plus ou moins aux parois * flottant ou immergé

LES METHODES DE DENOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

I/- GENERALITES

L'analyse microbiologique des aliments a pour objectif de contrôler : la qualité marchande des denrées alimentaires et la qualité hygiénique.

Le but du dénombrement est de déterminer le nombre de microorganismes appartenant à un ensemble donné dans un volume donné soit en milieu liquide, soit en milieu solide.

Les méthodes bactériologiques vont permettre de dénombrer certes, mais aussi de rechercher et identifier tous les microorganismes. Pour cela une étude quantitative de la flore est nécessaire : -soit par un dénombrement de la flore totale (aérobie revivifiable)
-soit par un dénombrement d'un groupe bactérien correspondant à une contamination déterminée. Il en est de même d'une recherche orientée comme les bactéries pathogènes.

II/- MATERIEL

- Boîtes de Pétri (90 mm de diamètre) - Pipettes graduées stériles (1 ml, 2 ml, 10 ml)
- Etuves (30. C, 37 C, 44 C, 46 C et 55 C) -Broyeur « Stomacher » (Homogénéisateur)
- Bain-marie (100 C pour l'ébullition des milieux gélosés et 45 C pour leur surfusion)
- Balance de précision - Compteur de colonies -Microscope -Autres

III/- PREPARATION DES DILUTIONS DECIMALES

Ce sont des dilutions successives à partir d'un produit brut (liquide) ou d'une « **suspension mère** » (produit solide et dilué). Le but est de réduire progressivement la charge microbienne du produit brut ou de la solution mère afin de rendre les colonies dénombrables.

Il s'agit de séries logarithmiques caractérisées par une progression géométrique.

Les liquides de dilution utilisés sont : l'eau peptonnée tamponnée, la tryptone sel, la solution de Ringer au 1/4

IV/- DENOMBREMENT EN MILIEU SOLIDE

1/- PRINCIPE

Toute bactérie vivante introduite dans la masse d'un milieu gélosé favorable et, une température convenable, donne naissance à une colonie repérable macroscopiquement. Le nombre total des colonies en surface et dans la profondeur du milieu correspond au nombre des bactéries présentes dans l'inoculum. Toutefois, les bactéries aérobies strictes se développent mal dans la masse de la gélose, par contre les bactéries anaérobies strictes ne se développent pas en surface et, certaines bactéries vivantes peuvent être incapables de se multiplier.

2/- METHODES

2.1.- Dénombrement par incorporation

À l'aide d'une pipette stérile, transférer « **1 ml** » du produit brut ou de la suspension mère et, chaque dilution (10⁻¹ à 10⁻⁴) dans une boîte de Pétri. Ensemencer deux (2) boîtes par dilution. Couler dans chaque boîte « **15 ml d'une gélose fondue** » et refroidie à 45 C

Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu et, laisser se solidifier sur un plan horizontal. Après solidification complète, on peut couler à la surface du milieu ensemencé « **4 ml de gélose** » et cela en fonction du microorganisme recherché : c'est « **l'ensemencement en double couche** ».

Exemples : * Gélose blanche pour les germes aérobies mésophiles (GAM)

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

*VRBL pour les coliformes *MRS pour les Lactobacillus

Les boîtesensemencées sont mise à l'étuve, retournées. La température et, le temps d'incubation sont fonction du microorganisme.

Exemples : * 30 C pendant 72 h pour les GAM

* 30 C et 44 C pendant 24 à 48 h pour les coliformes.

Expression des résultats

Prendre en compte les boîtes contenant « **15 à 150 colonies** » caractéristiques pour les « **coliformes** » et « **30 à 300 colonies** » pour les germes aérobies mésophiles (**GAM**)

Exprimer le résultat définitif en fonction de la dilution.

<u>Dilutions</u>	<u>Nombre de colonies</u>	<u>Moyenne</u>	<u>Nombre de bactéries / ml de produit pur</u>
Produit pur Dilution 10-0	Trop nombreuses Non dénombrables	Résultat non interprétable	Résultat non interprétable
Dilution 10-1 1ère Boîte 2ème Boîte	308 293	301	301 X 10 = 3010
Dilution 10-2 1ère Boîte 2ème Boîte	35 33	34	34 X 100 = 3400
Dilution 10-3 1ère Boîte 2ème Boîte	07 01	Résultat non interprétable	Résultat non interprétable

NB : - Si le rapport n'excède pas « 2 », faire la moyenne des valeurs provenant des diverses dilutions

- - Si le rapport excède « 2 », prendre le nombre le plus faible

2.2/- Dénombrement par étalement en surface

Il consiste à faire un ensemencement en surface d'un milieu sélectif solide, coule en boîte de Pétri, avec une quantité déterminée de l'échantillon : « **0,1 ml** » ou de la suspension mère et autant pour les autres dilutions.

Ex : * Baird-parker pour *S. aureus* * OGA pour les levures et moisissures

Les boîtesensemencées sont retournées, mise a l'étuve a une température et un temps fonction du germe recherché.

Expression des résultats

Prendre en compte les boîtes contenant « **15 à 150 colonies** » caractéristiques pour les « **Staphylocoques** ». Exprimer le résultat définitif en fonction de la dilution.

2.3.- Dénombrement sur membrane filtrante

Il consiste à faire passer un certain volume d'échantillon (liquide) a travers une membrane filtrante (millipore de diamètre connu) sur laquelle se trouvent donc retenues les bactéries recherchées. Le filtre est ensuite posé sur le milieu de culture gélosé pré-coulé spécifique pour le microorganisme. Après incubation à la température et, au temps convenable : l'on va dénombrer les colonies sur le filtre.

Cette méthode a plusieurs avantages : - utilisation d'un volume plus important d'échantillon d'où, une plus grande précision - une meilleure numération des bactéries -une identification plus facile des différentes espèces mais, le cout de cette méthode est élevé.

Technique de dénombrement des principaux microorganismes

(GAM, Coliformes, ASR, Staphylocoques, Salmonelles).

On va prendre ou, prélever « 10 g d'aliment mélangé dans 90 ml d'eau » et broyé dans un broyeur stomacher. On obtient une solution homogène représentant la solution. Cela peut se réaliser avec « 25 g d'aliment et 250 ml d'EPT » : d'eau peptonée tamponnée

❖ **Dilution décimale**

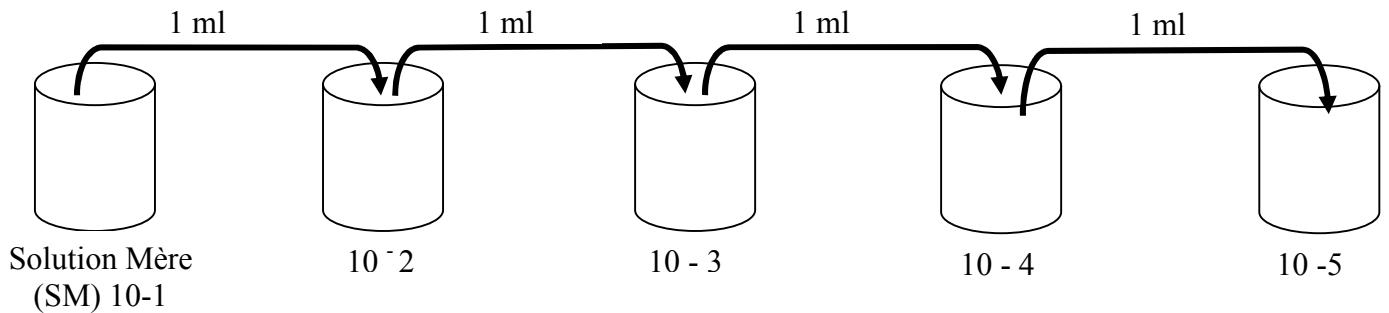
On utilisera comme diluant l'eau peptonée on prélève « 1 ml du broyat » (solution mère) dans « 9 ml de typtone sel », ce qui correspond à la dilution 10⁻²

❖ **A l'aide d'une pipette de 1ml**

Prélever 1 ml du tube marqué 10⁻² et l'introduire dans le tube d'eau peptone tamponnée marqué 10⁻¹ et homogénéiser. On obtient ainsi la dilution 10⁻³

Reprendre la même opération du 10⁻³ au tube 10⁻⁴ et, ainsi de suite jusqu'à la valeur de dilution souhaitée en changeant de pipette après chaque dilution.

Jeter chaque fois la pipette utilisée dans le bac d'eau de javel



SCHEMA D'ENSEMBLE

GERMES	MILIEU	TEMPERATURE ET DUREE D'INCUBATION	ASPECT
GAM : Germes Aérobie Mésophile	PCA	30° C pendant 72 h +/- 3 h	Toutes les colonies
Coliformes	VRBL	43,5°C +/- 0,5 pendant 24 h	Colonies roses ou rouges de diamètre > 0,5
Staphylocoques	Baird -parker	37° C pendant 24 h et 48 h	Colonies noires avec halo clair et zone opaque
ASR	TSN /TSC	46°C pendant 24 h	Colonies noires

RECHERCHE DES PRINCIPAUX MICROORGANISMES PATHOGENES DES ALIMENTS

Les critères établis pour la microbiologie alimentaire comportent à de rares exceptions près toujours les mêmes microorganismes. Ainsi a-t-on choisi de présenter, l'ensemble des bactéries retenus et non retenues d'intérêt, leur signification et les méthodes d'analyses recommandées.

I/ - LES GERMES AEROBIES MESOPHILES

I/ - CARACTERISTIQUES

Le terme de germes aérobies mésophiles (**GAM**) regroupe les bactéries, les levures, les moisissures se développant en aérobiose à une température caractéristique, il s'agit de la « flore totale » mésophile et psychrophile. Ces microorganismes sont des germes qui contaminent souvent les aliments et qui peuvent être néfastes pour la qualité des produits alimentaires.

Ces « GAM » sont des indicateurs d'hygiène. Ils sont tolérés dans la limite d'une certaine quantité au delà de laquelle, ils constituent un problème hygiénique.

Le dénombrement des « GAM » est couramment utilisé dans le domaine alimentaire en matière de contrôle qualité. Il permet une évaluation relative de la salubrité des procédés à l'usine et / ou de la préparation des aliments dans les établissements alimentaires. Il nous renseigne également sur l'efficacité des contrôles de température lors de la manipulation des produits, leur transport et leur entreposage.

Les « GAM » présentent les caractères communs aux levures, moisissures et bactéries. Ils se développent en aérobiose c'est à dire en présence d'oxygène. Ils se développent entre 30° - 37° C. Tous ces germes sont cultivés sur milieux ordinaire.

II/ - DENOMBREMENT ET IDENTIFICATION DES « GAM » (ISO 4833)

1/ - **Prise d'essais** : on prend **25** grammes d'aliment

2/ - **Pré - enrichissement** : il permet de revivifier les germes présents

Les 25 g. d'aliment sont mis dans **225 ml** ou **250 ml** d'eau peptonnée tamponnée (EPT)

3/ - **Dilution décimale et ensemencement**

A partir de la suspension mère (225 ml EPT/25 g d'aliment), des dilutions décimales sont réalisées et, **1 ml** de chaque dilution est utilisé pour un ensemencement en boîte de Pétri par incorporation en double couche avec le **milieu PCA**. (Palt Count Agar) : agar à la peptone de caseine au glucose et l'extrait de levure. La gelose blanche est utilisée par la 2ème couche

4 / - **Incubation** (Cf: Photo No 1)

Après cet ensemencement, les boîtes sont incubées: mise à l'étuve à **30° C** pendant 72 heures, après ces trois jours, on va dénombrer toutes les colonies (on compte entre 30 et 300).

5/ - **Expression des résultats**

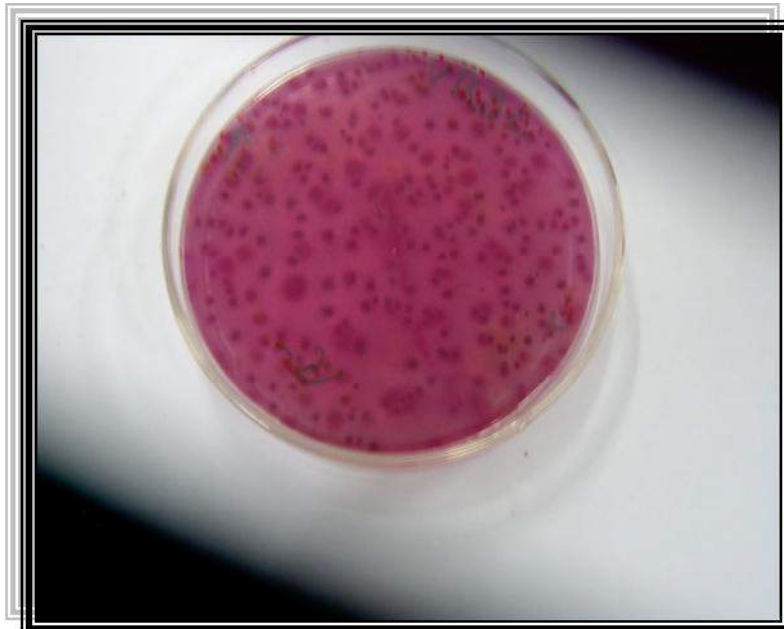
Ce sont des critères microbiologiques d'appréciation, seuil limite **ICSMF** (International Commission Microbiological Specification Foods) et le Codex Alimentarius.

Si l'on utilise ces deux critères, on distingue deux types de limite : une valeur «**m**» correspondant au seuil d'acceptabilité en dessous duquel le produit est de qualité microbiologique satisfaisante, et un seuil limite «**M**» supérieur à «**m**» correspondant au rejet du produit. Ce seuil «**M**» étant un multiple du seuil «**m**», la qualité du produit est inacceptable.

**PHOTO N° 1 : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT
DES GERMES AEROBIES MESOPHILES (G.A.M) SUR MILIEU « P.C.A. »**



**PHOTO N° 2 : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT
DES COLIFORMES SUR MILIEU DESOXYCHOLATE LACTOSE « DCL »**



II/ - LES COLIFORMES TOTAUX, COLIFORMES FÉCAUX, ESCHERICHIA COLI (E. coli)

I/ - CARACTERISTIQUES

Les coliformes constituent un groupe bactérien sans signification taxonomique. Il regroupe en théorie, les coliformes totaux et les coliformes fécaux présents dans les matières fécales. Pratiquement, on retrouve dans ce groupe des *Escherichia coli* dont le dénombrement est réalisable sans difficulté technique reflète sans ambiguïté la contamination fécale. C'est une espèce bactérienne dont certains types sérologiques sont pathogènes. Bactérie considérée dans le cadre de la microbiologie alimentaire comme un indicateur de contamination fécale et donc indicateur de bactérie pathogènes.

Escherichia coli est toujours dénombré en faible quantité ; elle est même souvent absente dans les aliments de qualité microbiologique correcte. La présence de cette bactérie hors critère indique que les règles d'hygiène n'ont pas été respectées (souillures par les fèces) ou au cours des manipulations. Le dénombrement est réalisé selon la norme AFNOR NF V08 017 par comptage des colonies ou par toute autre méthode donnant des résultats équivalents.

Les Coliformes sont en fait des Entérobactéries. Ce sont des bacilles Gram(-), mobiles péritriche ou immobiles, acapsulés, asporulés, pas de cytochrome oxydase, possèdent une catalase, réduisent les nitrates en nitrites, et réduisent le glucose.

Les Coliformes selon les normes ISO sont des bacilles Gram(-), aéro-anaérobie facultatifs (AAF), capables de se multiplier en présence de sels biliaries et, capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures à 35 – 37° C.

L'on classe ces bactéries entériques en trois (3) groupes : les **Coliformes Totaux (C.T.)** qui se développent entre 30-35°C , les **Coliformes Thermotolérants (C. Th.)** ou **Coliformes Fécaux (C.F)** qui ont la faculté de se développer à des températures élevées entre 44-45°C et, les bactéries *Escherichia coli* (E. coli) excluant tous les pathovars.

Ces germes sont à l'origine d'infections alimentaires sous formes de gastroentérites et des diarrhées après une incubation allant de 5 à 24 heures. Les aliments impliqués sont : les fromages, bœuf haché saignant, viandes et volailles, eau, crudités ...

II/ - DENOMBREMENT ET IDENTIFICATION

- **Prélèvement et prise d'essai** : chez l'homme,, on peut prélever *E. coli* dans les selles dans l'environnement, l'eau de boisson et certains aliments. L'on prend 25 gramme d'aliment

-**Pré-enrichissement** : pour donner du tonus à la bactérie, on utilise l'eau peptonnée tamponnée(EPT), ;cette étape peut toute fois être sautée chez les *E. coli*

- **Enrichissement** : importante chez les *E. coli* car, elle se développerait de façon anormale Les bouillons d'enrichissement sélectifs sont : * bouillon Lactosé au Bromocresol Pourpre * bouillon Lactosé Bilié au vert brillant * bouillon Mac Conkey * bouillon au glutamate ...

- **Isolement** : réalisé sur les milieux de culture, en général en double couche sur les géloses suivantes : * au Desoxycholate Lactose 1% * EMB (Eosine au bleu de méthylène)

* milieu SS * VRBL (violet-cristal rouge neutre bilié lactosé) * gélose lactosée de Driglaski ...

- **Incubation**: 30°C pour les coliformes totaux et, 44°C pour les thermotolérants pendant 24 à 48 h

-**Denombrement** : Les coliformes apparaissent « rouges foncés », seules les colonies de diametre supérieur à 0,5 mm sont denombrees (Cf : photo No 2)

- **Identification** : elle se fait sur « 5 » colonies avec le « **portoir réduit de Leminor** »

III/ - LES STREPTOCOQUES FECaux

I/ - CARACTERISTIQUES

Les Streptocoques fécaux sont des bactéries ubiquitaires, commensales du tube digestif de l'homme et des animaux, saprophytes de l'environnement (eau usée, eau douce, eau de mer, dans le sol, sur les végétaux). Ce sont des indicateurs de contamination fécale. En effet, la présence des streptocoques fécaux (*S. faecalis*) dans les eaux de boissons est considérée comme un signe de contamination fécale.

Les entérocoques sont susceptibles de contaminer les aliments comme le lait et les produits laitiers, les viandes et produits de pêche. Notons qu'*Enterococcus faecalis* participe à la maturation du fromage, et est considéré comme un ferment d'arôme.

Certaines souches d'*Enterococcus* sont utilisées comme levain ou ferment

II - DENOMBREMENT DES STREPTOCOQUES « D »

II. A/ - MILIEUX DE CULTURE

1/ - **Gélose BEA** (*Bile Esculine Azide*) ou Gélose D- Cocosel

Sa composition est : la bile comme inhibiteur des bactéries Gram (+) sauf les Streptocoques D, l'azide de sodium comme inhibiteur des bactéries Gram (-), l'esculine comme composé glucidique, c'est un hétéroside dont l'hydrolyse libère le glucose et le di hydroxyde d'ammonium qui donne une coloration noire. La présence de colonie noire met en évidence la caractère esculine positif

2/ - **Milieu liquide de Rothe** : C'est un milieu sélectif utilisé en général pour le dénombrement des Streptocoques des eaux d'alimentation, l'on recherche l'aspect trouble

3/ - **Autres milieux** : * Milieu solide de Slanetz – Bartlez * Milieu de Litsky * Milieu OAA (*Oxalique, Acide, Azide*) * Gélose Esculine Azide Canomycine

***Milieu solide de Slanetz-Bartlez** : utilisé pour le sénombrement des Enterococcus dans les eaux Il contient l'azide de Na, du glucose, du triphenyl tetrazolium de chlorure (TTC) qui est indicateur de potentiel redox pouvant être réduit par les bactéries avec formation d'éléments violet ou rouge brique. L'on a donc des colonies caractéristiques rouge, marron ou rose.

***Milieu OAA** qui contient : l'acide oxalique, l'azide de Na, l'esculine, le citrate de fer ammoniacal, le glucose et l'extrait de levure. Il fournit des colonies noires entourées d'halo noir.

II. B/ - METHODOLOGIE

En général, les Streptocoques fécaux seront recherchés dans les eaux

- **Prise d'essai** : dans le cas de l'eau on prend 1 à 10 litres. Cette quantité est filtrée sur membrane, c'est un filtrat qui va servir à faire l'ensemencement.

- **Dilution décimale, ensemencement et résultats**

Des dilutions décimales sont réalisées avec de l'EPT et on ensemence sur milieu Rothe.

Ce milieu est un test présomptif :

1/ - si on a un Rothe positif (+) c'est à dire d'aspect trouble, on peut aussi ensemencer sur milieu BEA pour dénombrer les colonies

2/ - s'il y a des « **colonies noires** », on suspecte des streptocoques D. A partir des colonies sur BEA, on peut faire l'identification à partir des critères morphologiques, biochimiques et d'autres tests biochimiques

- A partir de BEA (+) ===== > Tellurite de K⁺ (+) : *Enterococcus faecalis*

- A partir de BEA (+) ===== > Bouillon Hypersalé (+) : Strep. du groupe D (Enterocoque)

IV/ - LES STAPHYLOCOCCUS AUREUS

I/ - CARACTERISTIQUES

C'est une espèce bactérienne, une bactérie pathogène pouvant être présent sur le cuir et dans les mamelles et dans le tractus digestif et génital des animaux vivants. Elle peut provenir aussi de pollutions d'origine humaine (manipulation, rhume, etc.).

Staphylococcus aureus est toujours dénombré en faible quantité ; il est même souvent absent sur les produits de qualité microbiologique correcte. La présence de cette bactérie à des taux supérieurs aux critères proposés indique que les règles d'hygiène n'ont pas été respectées.

II/ - DENOMBREMENT ET IDENTIFICATION

Le dénombrement est réalisé selon la norme AFNOR V08 014 modifié : ensemencement de 0,1 ml de suspension mère ou de dilution à la surface du milieu Baird – Parker. Incubation à 37° C. Lecture des boîtes après 24 à 28 heures d'incubation. Toute autre méthode donnant des résultats équivalents peut être utilisée.

- **Prise d'essai** : on prend 25 grammes d'aliment ou d'échantillon

- **Enrichissement** : il permet de revivifier les germes présents les 25g d'aliment sont mis dans 225ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) pour une suspension mère qui est diluée au 1/10

- **Dilution décimale et ensemencement** : à partir de la suspension mère (225 EPT/25g d'aliment), des dilution décimale sont réalisés. Ensuite 0,1ml de chaque dilution est utilisé pour un ensemencement par étalement sur **milieu Baird Parker** coulé en boîte de Pétri. Le milieu Baird Parker est le milieu sélectif avec trois agents sélectifs : la glycine, le tellurite de potassium et le chlorure de lithium. L'on va assister au métabolisme lipidique des germes avec la production de lécithine.

-**Identification** : après cet ensemencement, les boîtes sont incubées mises à l'étuve à 37°C pendant 45 à 48 heures. Après ces deux jours, on va dénombrer les colonies de *Staphylocoque aureus* qui se présentent sous forme de « **colonies noires** » brillantes, bombées. Leur diamètre est compris entre 0,5 et 2mm entouré d'un halo clair ou, une auréole transparente s'étendant dans le milieu opaque et, traduisant la digestion des lipoprotéines. L'examen microscopique confirme l'existence de *Staphylococcus* regroupé en grappe de raisin.

En général, on choisit les géloses contenant les boîtes ayant entre 20 à 200 colonies suspectes.

Quant à la pathogénicité de *Staphylococcus*, le test de la « **thermonucléase** » est effectué : L'on homogénéise quelques colonies suspectes du milieu Baird-Parker dans le bouillon cœur-cerveau puis l'on chauffe à 100°C pendant 15 mn. L'on introduit ensuite quelques gouttes dans des puits faits dans la gélose à l'ADN au bleu de toluidine et, l'on incube la boîte sans la retourner pendant quatre (4) heures. La présence d'une « aureole rose » autour des puits traduit la présence d'une thermonucléase.

Les *Staphylococcus* présumés pathogènes toxigènes sont également « **thermonucléases positives** »

V/ - LES ANAEROBIES SULFITE – REDUCTEURS (ASR)

I/ - CARACTERISTIQUES

C'est une espèce bactérienne pathogène. Elle peut être présente sous forme de spore, en très petite quantité. C'est une bactérie anaérobie stricte, mésophile ne se développant pas dans les aliments quand les règles de bonnes pratiques des opérations de transformation et de conservation ne sont pas respectées. La dose minimale infectante de *Clostridium perfringens* ne paraît pas connue. D'autre part on peut toujours craindre une croissance de cette bactérie au cours de refroidissement mal conduit de produits après cuisson (temps de refroidissement trop long à des températures entre 50°C et 15°C).

En théorie, le dénombrement des spores et des cellules végétatives de *Clostridium* est considéré comme révélant la présence de *Clostridium perfringens*.

II/ - DENOMBREMENT ET IDENTIFICATION DES A.S.R

C'est en fait le dénombrement des spores des « ASR » qui peuvent être isolées en utilisant des milieux gélosés contenant du sulfite reparti dans des tubes.

Le milieu doit contenir environ 0.45% de sulfite. Ex : *milieu TSN (tryptone –Sulfite-Neomycine) / *milieu TSC (Tryptone –Sulfite-Cycloserine).

Ces milieux seront chauffés pendant 10 mn. dans de l'eau bouillante puis, refroidis à 45°C.

Un (1) ml de la suspension mère et, des autres dilutions sont portés successivement dans les tubes régénérés et refroidis. L'inoculum et le milieu sont mélangés en évitant d'introduire de l'air.

Après solidification de la gélose, les tubes sont incubés à 46°C à l'étuve pendant 24 à 48 heures. Les bactéries anaérobies ne possèdent pas d'oxyde disulfitase, pas d'oxydase, catalase et de peroxydase. Elles sont identifiées par la présence de « colonies noires » floconneuses avec un diamètre supérieur à 1 mm.

On peut réaliser la confirmation en repiquant, les colonies noires sur une boîte de gélose à l'œuf de Willis.

PHOTO N°3 : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES « ASR » SUR MILIEU TSN



VI/ - LES SALMONELLA

I/ - CARACTERISTIQUES

C'est une espèce bactérienne, une bactérie pathogène pouvant être présent sur le cuir et dans le tractus digestif de l'animal vivant porteur sain, rarement décelé à l'intérieur des masses musculaires. Elle peut se trouver sur les carcasses après abattage : lors des opérations d'abattage, elle passe directement ou indirectement du cuir à la carcasse pour les bovins, ovins et équins.

Les conditions de ressuage, la conservation à des températures de réfrigération ou de congélation n'entraînent pas la destruction de cette bactérie. Elle est mésophile, ne se développant ni sur le cuir, ni dans la viande au cours des opérations de transformation et de conservation si les règles de bonnes pratiques sont respectées.

SALMONELLA peut donner lieu à des contaminations croisées tout au long de la chaîne de fabrication des produits « viande » et ultérieurement en cuisine.

II/ - RECHERCHE ET IDENTIFICATION

Détection selon la norme AFNOR NF V08 013 ou toute autre méthode donnant des résultats équivalents. La recherche dans 10 gr a été substituée à celle dans 25 gr car la méthode actuellement utilisée (milieu Rappaport - Vassiliadis) s'est révélée deux fois plus sensible que l'ancienne technique (milieu Müller-Kauffmann)

-- **Prise d'essai ou échantillonnage** : la recherche se fait sur 25 grammes d'aliment en général

-- **Pré-enrichissement** : c'est la préparation de la suspension mère qui se fait avec 225 ml d'eau peptonnée tamponnée (EPT) et, l'on met à l'étuve à 37°C pendant 16 à 20 heures. Il favorise la revivification des bactéries et, leur croissance. Ce milieu n'est toutefois pas sélectif

- **Enrichissement** : il est réalisé en ensemençant dans les bouillons d'enrichissement sélectifs pendant 24 à 48 heures avec : * bouillon de Séléline à 37°C * bouillon Mueller Kauffman à 43°C * bouillon Rappaport Vassiliadis à 43°C pendant 4 heures

Ces milieux ont la propriété de favoriser la croissance de Salmonella et, de limiter celle des autres germes de la famille des Entérobactéries.

- **Isolement** : Ensemencement par quadrat sur géloses sélectives notamment le milieu « SS » et incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures

- **Identification** : sur au moins 5 colonies isolées, ensemençer sur **portoir réduit de Leminor**

A partir des colonies caractéristiques sur les géloses SS et Hektoen on ensemece le **portoir réduit de Leminor** comprenant les milieux suivant incubés à 37°C pendant 24 h :

Urée indole de Fergusson, Kligler-Hajna, Lysine de fer, Clark et Lubs, Mannitol mobilité et, Citrate de Simons .

***Milieu Urée-Indole** : milieu synthétique qui permet de rechercher simultanément : L'uréase, la production d'indole et le tryptophane désaminase (TDA)

***Milieu Kligler Hajna** : il est coulé en tube incliné avec un culot d'au moins 3 cm et une pente. Il est ensemençé en profondeur par piqure centrale et, sur la pente en strie.

* **Milieu Lysine de fer** : l'ensemencement est fait par piqure centrale et en strie sur la pente. Il permet l'étude de la décarboxylation et de la désamination de la lysine.

***Milieu Clark et Lubs**, il sert à l'étude de deux caractères : la réaction au rouge de méthyl (RM) et, la réaction de Voges-Proskauer (VP)

***Milieu Mannitol-Mobilité**, ensemençé par piqure centrale et utilisé pour la recherche de la mobilité, de la fermentation du mannitol et, la nitrate-réductase (NR)

***Milieu Citrate de Simmons**, ensemençer par strie longitudinale sur la pente du milieu pour rechercher l'utilisation du citrate.

MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Les caractères biochimiques des *Salmonella* sont : *Lactose - *Citrate + * H₂S+/-
1/- Caractères de Famille : * Oxydase (-) *Catalase (+) *Nitrate (+) * AAF * Glucose (+)
2/- Caractères de Genre : * Portoir réduit de Leminor * Plaque API 20 E

Urée - Indole	Kligler - Hajna	Lysine de fer	Mannitol - Mobilité	Citrate de Simmons
Urease (-)	Glucose (+)	LDC (+)	Mobilité (+)	Citrate (+)
Indole (-)	Lactose (-) Gaz (+/-)	LDA (-)	Mannitol (+) NR (+) = Réduction de Nitrate en Nitrite	
TDA (-)	H₂S +/-	H₂S +		

NB * H₂S + sauf *S. paratyphi A* et *S. choleraesuis* qui sont négatifs
 *GAZ (+) sauf *S. typhi* et *S. gallinarum* qui sont négatifs

La présence de *SALMONELLA* dans un aliment doit le faire considérer comme un
 « **aliment corrompu** »

VII/ - LES VIBRIO

I/ - CARACTERISTIQUES

Ce sont des bactéries retrouvées dans l'environnement principalement dans les eaux, dans les aliments (poissons, crustacés ...) L'homme est le principal réservoir.

L'agent responsable du cholera est le *VIBRIO cholerea O :1* qui est très dangereux, entraînant la mort en quelques heures.

Le *VIBRIO parahemolyticus* (VP+) est fréquent dans les crustacés et dans certains poissons. Tous les *VIBRIO* ne donnent pas de diarrhées, ils aiment tous le sel soit donc les lagunes et, les eaux de mer.

II/- RECHERCHE DES VIBRIO DANS LES ALIMENTS

1/- Prélèvements :

On peut rechercher *VIBRIO* dans les eaux et, les aliments tels que les poissons et les crustacés. Pour le prélèvement de l'eau, l'on a la méthode par « filtration sur membrane » ayant un diamètre de l'ordre de 0,2 um. L'on peut également prendre directement 500 ml d'eau pour les mélanger avec de l'eau peptonée alcaline. (EPA)

2/- Enrichissement

Dans l'eau peptonée tamponnée contenant du chlorure de sodium (NaCl) qui joue le rôle de sélectivité, en inhibant les autres bactéries. C'est une bactérie à multiplication rapide (30 mn)

3/- Isolement

L'ensemencement permet d'avoir des colonies isolées, il est réalisé à la surface par stries. A partir de l'eau peptonée alcaline (EPA), on ensemence sur le « milieu TCBS » : Thiosulfate Citrate Bile Saccharose qui est de couleur verte et également, sur de la gélose alcaline blanchâtre.

La bile va inhiber la croissance des bactéries Gram (+) et Gram (-). Ces deux milieux sont mis à l'étuve à 37 C pendant 18 à 24 heures.

4/- Lecture et Identification

-Sur « TCBS », l'on aura des colonies jaunes qui fermentent le saccharose. Ce sont de grosses colonies de 2 mm de diamètre. Les colonies vertes sont dites « saccharose négatif (-) ».

L'indicateur colore permet de vérifier l'utilisation d'un élément dans le milieu de culture : le bleu de bromothymol de couleur verte.

-Sur la « gélose nutritive alcaline » : l'on a de grosses colonies qui sont translucides bleutées et, dotées de plusieurs caractères spécifiques.

a/- Caractères morphologiques :

* Examen à l'état frais : mobilité polaire * Coloration de Gram : B. Gram (-) incurvé en virgule

b/- Caractères biochimiques : * Aérobie – Anaérobie Facultative (AAF) * Oxydase positif (+)

* Catalase (+) * Réduction Nitrates * Fermentation du glucose * Lactose (-) * ONPG (+)

c/- Caractères antigéniques : * Ag O / * Ag H

Ag O : serotypage avec l'immuno-sérum anti-VIBRIO cholerea O : 1 qui induit une agglutination

VIII/ - LES LISTERIA

I/ - CARACTERISTIQUES

On peut les retrouver dans les pays tempérés, dans les produits d'origine animale et, dans tous les aliments. Elle se développe de 25 à 30 C, on peut les trouver dans le milieu extérieur, dans le sol, les eaux d'égouts, eaux courantes, poussières, les végétaux en particulier les ensilages de maïs.

C'est une bactérie qui ne donne pas d'intoxications alimentaires mais, donne plutôt des « septicémies » : présence de bactéries dans le sang. Elle est d'autant plus grave chez la femme enceinte.

II/ - RECHERCHE DE LISTERIA DANS LES ALIMENTS

1/- Prélèvement et prise d'essai : La quantité prélevée d'aliment est de 25 g

2/- Pre-enrichissement : avec de l'eau peptonee tamponnée

3/- Enrichissement : il permet d'avoir une multiplication des bactéries sur les bouillons sélectifs pour *LISTERIA* nous avons : le bouillon Fraser, le LEB (B. d'enrichissement de Listeria)

4/- Isolement : réalisé avec des géloses sélectives pour Listeria et, l'ensemencement se fait en surface par strie. *Gélose Palcam +++ * Gélose Oxford *Gélose Mac Bride

5/- Identification

a/- Caractères morphologiques: * Bacille Gram (-), acapsulé, mobilité péritriche en pirouette

b/- Caractères biochimiques : *Oxydase négatif (-) * Catalase positif (+)

Il existe des méthodes rapides avec des techniques d'immuno-enzymatiques basées sur la recherche d'une protéine spécifique du genre *LISTERIA*.

L'on a également des techniques moléculaires qui peuvent être spécifiques du genre et d'autres qui sont spécifiques de l'espèce. *L. monocytogenes* qui est pathogène par excellence

RECHERCHE DES PRINCIPAUX GERMES
FERMENTAIRES DANS LES PRODUITS DE 4^{ème} GAMME

A/- GENERALITES

Les produits de 4^{ème} gamme sont définis par Jouve (1993), comme étant des produits végétaux conditionnés en unités ménagères ou collectives, crus, frais, prêts à l'emploi à la consommation humaine, ayant fait l'objet d'un épluchage, coupage ou toute autre opération touchant à leur l'intégrité.

Les micro-organismes fermentaires sont des êtres dont les potentialités sont très utilisées dans l'alimentation et l'industrie alimentaire. D'une façon générale, nous distinguons deux (2) types de micro-organismes fermentaires : **les Champignons et les Bactéries**.

Les **Champignons** sont essentiellement les **Levures et les Moisissures**, tandis qu'au niveau des **Bactéries** nous avons :

les **bactéries « acétiques »** (*Acetomonas*, *Acetobacter*, *Gluconobacter*) qui transforment l'alcool éthylique en acide acétique par oxydation;

les **bactéries « lactiques »** (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Streptococcus*) très utilisées en industrie alimentaire; elles sont les agents de fermentation lactique.

Les **bactéries « propioniques »** qui correspondent au genre *Propionobacterium* et, qui appartiennent au groupe des « **Actinobactéries** »

Dans les **produits sucrés de 4^{ème} gamme**, les micro-organismes fermentaires à rechercher sont : **les Levures, les Moisissures et les Leuconostocs**. Bien qu'altérant la qualité marchande des produits, ils n'induisent pas de risque sanitaire pour le consommateur.

B/ - PROTOCOLE MICROBIOLOGIQUE

Les analyses microbiologiques doivent s'effectuer dans un milieu aseptique crée par la flamme du bec Bünsen permettant ainsi d'éviter la contamination du produit par le manipulateur ou l'environnement.

Cinq (5) étapes majeures sont accomplies avant l'isolement et le dénombrement des germes fermentaires ; ce sont :

la préparation des milieux de culture. la préparation de l'échantillon et de la suspension mère. la préparation des dilutions décimales

L'ensemencement des milieux spécifiques et. l'incubation aux températures spécifiques. Les deux dernières étapes constituent l'étape de la recherche des germes.

I/- PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Une certaine quantité de milieu de culture est pesée et, dissoute dans un volume précis d'eau. Un chauffage est réalisé pour assurer l'homogénéisation du milieu. Ceux-ci sont répartis dans des tubes à vis ou dans des flacons. Ils sont autoclavés par la suite.

II/- PREPARATION DE L'ECHANTILLON ET DE LA SUSPENSION MERE

Après avoir trempé les fruits dans de l'eau de javel, l'on réalise une dissection de l'épicerie avec un couteau stérile. Dix grammes de la pulpe sont pesés et mis dans un sachet Stomacher stérile où l'on ajoute 90 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). L'ensemble est soumis à l'action d'un broyeur Stomacher et, après homogénéisation l'on obtient une solution qui est appelée: « **suspension mère** » ; cette solution homogène est à 10^{-1}

III/ - PREPARATION DES DILUTIONS DECIMALES

La tryptone sel utilisée comme diluant, est répartie aseptiquement dans des tubes à essai en raison de 9 ml. par tube. L'on prélève 1 ml. de la suspension mère, que l'on transfère dans un autre tube contenant 9 ml. de diluant. Après homogénéisation l'on obtient une suspension qui est à 10^{-2} .

L'on prélève ensuite 1 ml. de la suspension 10^{-2} qu'on met dans un autre tube à essai contenant 9 ml. diluant. Après homogénéisation, l'on obtient une autre suspension qui est à 10^{-3} . Par la même technique on obtient les dilutions à 10^{-4} , à 10^{-5} , à 10^{-6} ...

IV/ - RECHERCHE DES GERMES FERMENTAIRES

IV. 1./ - Ensemencement des milieux de culture

L'on réalise un ensemencement par inondation à la surface des différents milieux spécifiques coulés en boîte de Pétri avec 0,1 ml. de la suspension mère et de chacune des dilutions retenues. Ces milieux spécifiques étant :

- le milieu « **OGA** » pour la recherche des « **Levures et Moisissures** »
- le milieu « **Hypersaccharosé** » pour la recherche des « **Leuconostocs** »
- le milieu « **MRS** » pour la recherche des « **Lactobacillus** »

IV.2/ - Incubation 48 à 72 heures aux températures spécifiques

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à l'étuve à 30°C . pendant 48 à 72 heures.

V/ - IDENTIFICATION DES GERMES

V.1./ - LES LEUCONOSTOCS

Après incubation, l'on recherche à la surface du « milieu hypersaccharosé » de grosses colonies transparentes muqueuses et coulantes. La coloration de Gram fait apparaître des Cocci Gram positif (C.G. +) en diplocoques et en chaînettes.

V.2. / - LES LEVURES ET MOISSURES

Après incubation, on observe à la surface du milieu glucosé à l'oxytétracycline des colonies crémeuses blanche ou blanchâtre qui caractérisent les Levures et, les colonies duveteuses spécifiques aux Moisissures.

Une vérification de ces résultats est faite à partir des colonies, par une coloration de Gram pour la mise en évidence, permettant de relever des Cocci Gram positif (C.G. +) lancéolés et operculés caractéristiques. Pour les Moisissures, ce sont des germes filamenteux pluri-segmentés qui sont recherchés.

La détermination du genre et, de l'espèce des Levures isolées est réalisée à l'aide des galeries API 20 C AUX.

**PHOTO N° 4 : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT
DES LEVURES SUR MILIEU «O G A»**



**PHOTO N° 5 : ISOLEMENT ET DENOMBREMENT DES LEVURES
ET DES MOISSURES SUR MILIEU «O G A»**



A partir des colonies isolées de souche pure, l'on fait 3 à 5 suspensions dans de l'eau distillée (2 ml.) contenue dans des tubes à hémolyse. Ces suspensions sont utilisées pour transférer 100 µl, soit 3 gouttes d'une pipette Pasteur dans une ampoule de C Médium afin d'ensemencer une galerie 20 C AUX. pour l'identification des levures isolées. Une fois les galeries ensemencées, elles sont incubées pendant 48 à 72 heures à une température de 30°C.

Une première lecture des galeries est effectuée après 24 heures d'incubation. Les cupules plus troubles que le témoin, indiquent des réactions positives sont notées sur la fiche de résultats. Une seconde lecture des galeries est effectuée après 48 heures d'incubation à 30°C. pour une meilleure analyse des réactions positives et une identification plus précise des genres et des espèces. Une troisième lecture est enfin réalisée après 72 heures d'incubation pour déterminer le « **profil numérique** » afin d'identifier la Levure.

Toutes les réactions positives et négatives sont notées sur la fiche de résultats. Grâce à cette fiche de résultats, l'on obtient un « profil numérique » pour l'identification du genre et de l'espèce des colonies isolées ce à l'aide du catalogue API 20 C AUX.

Quant aux Moisissures, on réalise une coloration avec une solution de bleu de méthylène . Un examen à l'état frais entre lame et lamelle est ainsi réalisé. On note ensuite les aspects macroscopiques des colonies.

Il existe à l'heure actuelle environ 50.000 espèces connues de Moisissures. Ces champignons possèdent certaines particularités qui fait naître dans le domaine agroalimentaire des espérances: leur teneur en protéine est très élevée, mais aussi des inquiétudes, car elles ont le pouvoir d'élaborer des substances toxiques: raison de leur identification.

V.3. / - LES LACTOBACILLUS

Après incubation , l'on observe des colonies circulaires, opaques, incolores ou blanchâtres et de 0,5 à 1 mm de diamètre.

La coloration de Gram révèle des bacilles Gram positif (B. G. +) non sporules longs et flexueux.

**LES CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES ALIMENTS
PRODUITS DE 4^{ème} GAMME, PLATS CUISINES, EAU DE BOISSON**

I/ - INTRODUCTION

Les microorganismes sont des composants extrêmement nombreux et actifs de notre environnement. Cependant à cause de leur petite taille, on a souvent tendance à les ignorer ou les sous estimer. Il existe pourtant deux domaines où ils nous concernent de façon particulière : celui de la santé et celui de l'alimentation. En effet ils sont la cause des altérations des produits alimentaires et des infections bactériennes et fongiques et mycosiques que nous contractons.

La détermination des microorganismes s'avère nécessaire pour permettre une maîtrise de la qualité et, une prévention des risques infectieux au niveau des matières végétales alimentaires. Ainsi pour protéger la santé des consommateurs, l'Association Française de Normalisation (AFNOR) a définie des critères microbiologiques obligatoires pour les différents types d'aliments depuis les eaux jusqu'aux plats cuisinés en passant par les fruits et légumes

II/ - CRITERES DE QUALITE DES FRUITS ET LEGUMES

Les Fruits et Légumes sont des produits végétaux dits de la 4^{ème} gamme. L'analyse microbiologique de ces produits est essentiellement dirigée vers la recherche des germes fermentaires qui, à un taux élevé altèrent la qualité marchande et des fois la qualité hygiénique lorsqu'il y a productions des « mycotoxines » telles l'aflatoxine et l'ochratoxine dans le cacao.

Les microorganismes recherchés sont :

- les « **Levures** » ou champignons unicellulaires
- les « **Moisissures** », (champignons pluricellulaires ou, thalles filamenteux)
- les « **Lactobacillus** » responsables des goûts aigres et piquants
- les « **Leuconostocs** » qui sont des bactéries hétéro-fermentaires et muqueuses

Au stade de la production, les critères de qualité des normes AFNOR adoptés par le Comité Ivoirien de Normalisation (CODINORM) pour les Levures et Moisissures sont les suivants :

- valeur limite minimale « **m** » = 1. 000 microorganismes / ml.
- valeur limite maximale « **M** » = 10. 000 microorganismes / ml

Tableau N°1 : Critères microbiologiques liés aux fruits au stade de la production

Micro-organismes recherchés	Nombre de germes / ml (Valeur limite minimale: m)	Nombre de germes / ml (Valeur limite maximale: M)
* <i>Levures</i>	« m » = 1. 000	« M » = 10. 000
* <i>Moisissures</i>	« m » = 1. 000	« M » = 10. 000
* <i>Leuconostocs</i>	Absence	Absence
* <i>Lactobacillus</i>	Absence	Absence

* m = Valeur limite minimale

* M = Valeur limite maximale

* **M** = Valeur limite maximale ou, seuil d'acceptabilité au-delà duquel les résultats sont considérés comme « non satisfaisants » pour la qualité marchande. Sans pour autant que ces produits soient considérés comme toxiques.

A partir de ces critères énoncés, les différents commentaires assignés à la qualité des fruits au stade de la production sont les suivants :

1/ - **Qualité Microbiologique Satisfaisante** : « **QMS** » lorsque les résultats en milieu solide, sont tous inférieurs ou égaux à trois (3) fois « **m** ».

2/ - **Qualité Microbiologique considérée comme Acceptable** : « **QMA** » lorsque les résultats obtenus sont compris entre trois (3) fois « **m** » et « **M** », soit dix (10) fois « **m** »

3/ - **Qualité Microbiologique Non Satisfaisante** : « **QMNS** » quand les résultats sont supérieurs à « **M** »

III/ - CRITERES DE QUALITE DES PLATS CUISINES

Tableau N°2 : Critères microbiologiques liés aux plats cuisinés (AFNOR / CODINORM)

Microorganisme recherché	*****	Valeur limite minimale : m
- Germes Aérobie Mésophile à 30°C. (G.A.M.)		300.000 germes / g
- Coliformes Totaux à 30° C. (C.T.)		1.000 germes / g
- Coliformes Thermotolérants (C. Fécaux : C.F.)		10 germes / g
- Staphylococcus aureus (Staph.)		100 germes / g
- Anaérobies Sulfito-Réducteurs (A.S.R.)		30 germes / g
- Streptocoques Fécaux (Strep. D)		Pas de critère
- Salmonella (Sal.)		Absence dans 25 g

A partir de ces critères énoncés, les différents commentaires assignés à la qualité des plats cuisinés sont les suivants :

1/ - **Qualité Microbiologique Satisfaisante** : « **QMS** » lorsque tous les dénombrements sont inférieurs à trois (3) fois le critère « **m** » avec, absence de *Salmonella*.

2/ - **Qualité Microbiologique considérée comme Acceptable** : « **QMA** » lorsque un des dénombrements est compris entre trois (3) fois « **m** » et « **M** », soit dix (10) fois « **m** » avec, absence de *Salmonella*

3/ - **Qualité Microbiologique Non Satisfaisante** : « **QMNS** » quand plusieurs dénombrements sont compris entre 3 et 10 fois le critère « **m** » avec, absence de *Salmonella*

4/ - « **Aliment Corrompu** » : lorsqu'il y a présence de *Salmonella* et, quand les dénombrements sont compris entre 500 et 1000 fois le critère « **m** »

PS : Index / Indicateur

a/ - Index : c'est un germe dont la présence en nombre supérieur aux valeurs définies indique la présence possible d'un pathogène d'écologie similaire.

b/ - Indicateur : c'est un germe dont la présence en nombre supérieur aux valeurs définies indique un défaut d'adhésion aux bonnes pratiques de fabrications reconnues.

Tableau N° 3 : COMMENTAIRE DES CRITERES DES PLATS CUISINES

GERMES	Q.M.S. *	Q.M.A. *	Q.M.N.S *	Aliment corrompu
G.A.M.	900.000	900.000 – 3.000.000	900.000 – 3.000.000	
C. Totaux	3.000	3.000 – 10.000	3.000 – 10.000	
C. Fécaux	30	30 - 100	30 - 100	
A.S.Réducteurs	90	90 - 100	90 - 100	
Staph. aureus	300	300 – 1.000	300 – 1.000	
Salmonella	Absence / 25 g.	Absence / 25 g.	Absence / 25 g.	Présence dans 25 g.
	Tous les dénombrements sont inférieurs à «3» fois le critère avec absence de <i>Salmonella</i>	Un des dénombrements est compris entre « 3 et 10 » fois le critère avec absence de <i>Salmonella</i>	Plusieurs dénombrements sont compris entre « 3 et 10 » fois le critère avec absence de <i>Salmonella</i>	Susceptibilité de toxicité. Egalement lorsque les dénombrements sont compris entre « 500 et 1000 » fois le critère

* 1/ - Q.M.S. : Qualité Microbiologique Satisfaisante

* 2/ - Q.M.A. : Qualité Microbiologique Acceptable

* 3/ - Q.M.N.S. : Qualité Microbiologique Non Satisfaisante

* 4/ - Aliment Corrompu

IV/ - CRITERES DE QUALITE EAUX DE BOISSONS (AFNOR / CODINORM)

Tableau N°4 : Critères microbiologiques liés aux eaux de boissons

Valeur limite minimale : m	
- Germes Aérobie Mésophile (G.A.M.)	* 22°C 100 germes / ml * 37°C 200 g / ml
- Coliformes Totaux à 30° C. (C.T.)	< à 1 germe / 100 ml
- Coliformes Thermotolérants (C. Fécaux : C.F.)	< à 1 germe / 100 ml
- Anaérobies Sulfito-Réducteurs (A.S.R.)	1 germe / 20 ml
- Streptocoques Fécaux (Strep. D)	< à 1 germe / 100 ml
- Salmonella (Sal.)	Absence dans 100 ml

