

TP n°01 : Analyse microbiologique de lait et de jus de fruits pasteurisés

Le contrôle de la qualité microbiologique de nos aliments reste indispensable car il permet d'éviter la commercialisation et la consommation de produits dangereux ou non conformes. Ceci ce fait par des analyses règlementées et régit par normes (nationales ou internationales) qui souvent imposent que l'aliment soit exempt de tous germe pathogène ou de toxine microbienne et que la flore totale soit peu abondante.

La qualité sanitaire du produit fini se base sur la numération des germes totaux (FTAM et coliformes totaux) , les germes indicateurs d'une contamination fécale qui sont les coliformes fécaux (souvent associés aux pathogènes tels que : *Salmonella* et *Shigella*), Streptocoques fécaux (ou Entérocoques), les germes indologènes, les germes indicateurs d'une contamination tellurique (sol) comme les anaérobies sulfito-réducteurs ainsi que la recherche des germes ubiquitaires et d'origine humaine ou animales comme *Staphylococcus aureus* (qui aussi toxigène).

A travers ce travail pratique, nous allons rechercher ces différentes flores sur deux denrées alimentaires ayant subi une pasteurisation et comparer les résultats obtenus aux normes afin de juger de leur conformité.

Mode opératoire :

Recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM) : Après une dilution décimale, 1ml de la solution mère et de ces dilutions est ensemencé en masse sur une gélose ordinaire (GNO ou PCA) et l'incubation se fait 24h à 30°C ou bien 72h à 22°C. Ce test est effectué pour les deux denrées.

Lecture : comptage de toutes colonies ayant poussé peu importe leur aspect. Le dénombrement sera suivi d'un calcul du nombre des microorganismes selon la formule :
$$N = \frac{\sum c}{d.V}$$

$\sum c$ =nombre de colonies comptée sur les boites retenus, d= taux de dilution, V= volume ensemencé

Norme : 3.10⁴ UFC/mL

Recherche des Coliformes Totaux et Fécaux (CT-CF) : Elle se fait sur milieu BLBVB (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant) qui est sélectif des bacteries intestinales et qui permet de détecter la fermentation du lactose chez les entérobactéries avec production de gaz emprisonné dans la cloche de durham. La recherche des coliformes se fait en deux étapes selon le test de Mackensie ; la 1^{ère} est présomptive pour la recherche des CT (1ml de la solution mère ou des dilutions est ensemencé dans un bouillon, incubé 24h à 30°C) suivie d'une étape confirmative pour la recherche des CF (1ml du 1^{er} tube transféré dans ce dernier et incubé à 44°C puisqu'ils sont thermotolérants). Ce test est fait aux deux denrées.

Lecture : le test est considéré positif s'il y'a formation d'un trouble + gaz dans la cloche (vol. +1/10)

Norme : 10 UFC/ml pour les CT et 1UFC/mL pour les CF (à la date limite de consommation : 100 CT et 10 CF)

Recherche des Indologènes : le milieu utilisé est l'eau peptonée tamponnée exempte d'indole, ensemencée par inoculation d'un mL de la solution mère ou ces dilutions puis l'incubation à 37°C/ 24h. cette flore est recherchée dans le lait.

Lecture : 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs sont additionnés pour détecter l'indole (anneau rouge formé).

Norme : /

Recherche de *Staphylococcus aureus*

Un milieu sélectif est utilisé, c'est le Baird Parker enrichi au jaune d'œuf (émulsion stérile dans de l'eau physiologique à 30%) et additionné de téllurite de potassium. L'ensemencement se fait par étalement en surface d'un mL de la solution mère et l'incubation se fait à 37°C 24h. Ce test est fait aux deux denrées.

Lecture : les colonies noires avec halo sont celles de *Staphylococcus aureus* et seront dénombrées.

Norme : 1 UFC/ml (à la date limite de consommation : 10 UFC/ml)

Recherche de *Salmonella*

Elle se fait en 3 étapes : un pré-enrichissement (10 mL de solution mere dans 90 ml eau physiologique stérile) incubé 4 à 16h à 37°C, suivi d'un enrichissement (10 mL du 1^{er} vers un bouillon sélénite) incubé aussi à 37°C. La 3^{ème} étape est un isolement sélectif sur gélose Salmonella-Shigella (S-S), qui sera ensemencée par striation et incubée à 37°C durant 24h. Cette flore est recherchée dans le lait.

Lecture : Les colonies incolores à centre noir ou pas (Lac-, H₂S +/-) sont celles de *Salmonella sp.*

Norme : 0 dans 250 mL

Recherche des Streptocoques fécaux

Ce test se fait en 2 étapes ; une présomptive (bouillon Rothe ensemencé et incubé à 37°C pour 24h) et une confirmative (bouillon Eva-litsky inoculé à partir de Rothe et incubé à 37°C 24h). Cette flore est recherchée dans le jus.

Lecture : la présence d'un trouble indique que la bacterie est présente

Norme : absence dans 1mL

Recherche des anaérobies sulfite-réducteurs ASR (*Clostridium perfringens*)

Elle s'effectue sur gélose Viande –Foie (VF) en surfusion coulée dans des tubes stériles à raison de 20ml par tube additionné de sulfite de sodium et alun de fer (0,5ml + 0,2ml respectivement pour 20ml du milieu). 1ml de la solution mère est déposé à la surface de la gélose en tube et l'ensemencement se fait par retournement doux du tube plusieurs fois tout en évitant de créer des bulles d'air. Le tube est passé sous flux d'eau froide pour la solidification de la gélose et incubé à 46°C pour 24h. Cette flore est recherchée dans le jus.

Lecture : Les colonies des SR sont de couleur noire, donc s'il y'a noircissement au fond du tube VF alors ils sont présents.

Norme : toléré dans les aliments en nombre relativement faible (entre 1 et 100 par mL)

Expression et interprétation des résultats obtenus

Les résultats obtenus sont rapportés sur le tableau du compte rendu, exprimés en unité formant colonie/mL en cas de dénombrement sur gélose, et absence ou présence en cas de détection des flores en question. Ils seront par la suite comparés aux normes élaborés.

Une conclusion est tirée sur la conformité ainsi que la densité microbienne de l'aliment.