

UNIVERSITÉ MOHAMMED SEDDIK BEN YAHIA- JIJEL
FACULTÉ DES SCIENCES DE LA NATURE ET DE LA VIE
DÉPARTEMENT DE MICROBIOLOGIE APPLIQUÉE ET SCIENCES
ALIMENTAIRES

MASTER 2 CONTRÔLE DE QUALITÉ DES PRODUITS ALIMENTAIRES

MATIÈRE: FORMATION TECHNIQUE DE CONTRÔLE DE
QUALITÉ

Chargée de cours:
Dr Boussof Lilia

CONTENU DE LA MATIÈRE

I. Les milieux de culture et dilutions

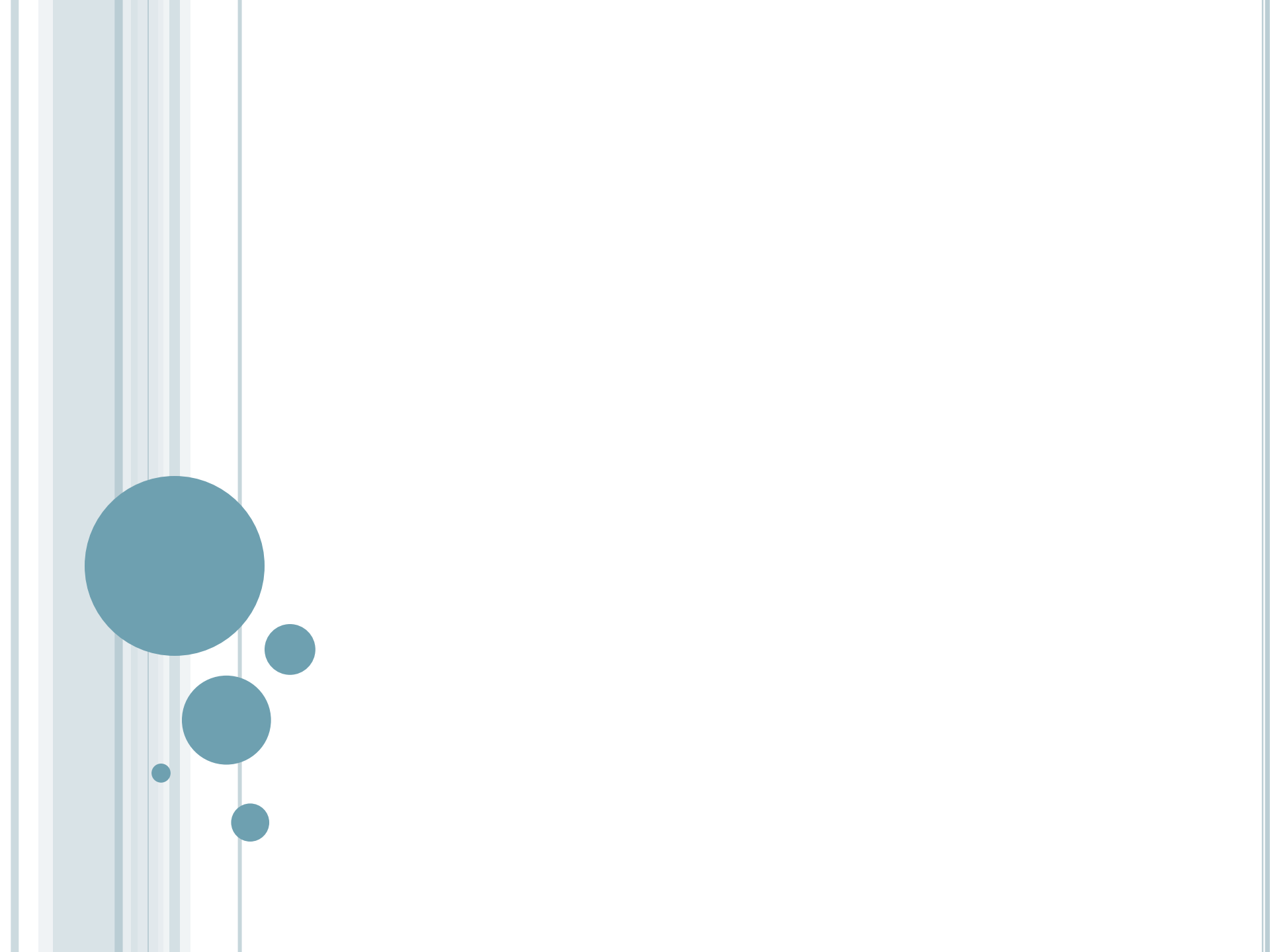
II. Techniques générales de prélèvement, transport et préparation du produit pour l'analyse

III. Les principales espèces bactériennes rencontrées dans le milieu alimentaire

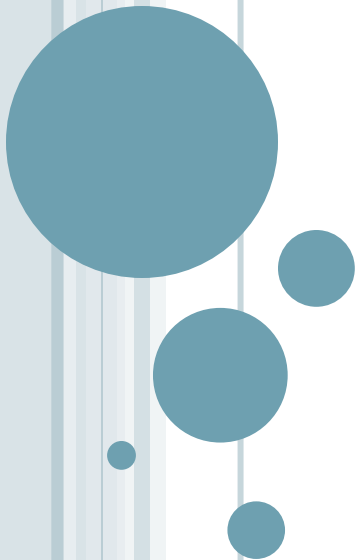
IV. Identification phénotypique des espèces microbiennes rencontrées dans le milieu alimentaire

V. Pratiquer un dosage microbiologique d'un antibiotique (CMI, CMB ...)

VI. La conservation des produits alimentaires



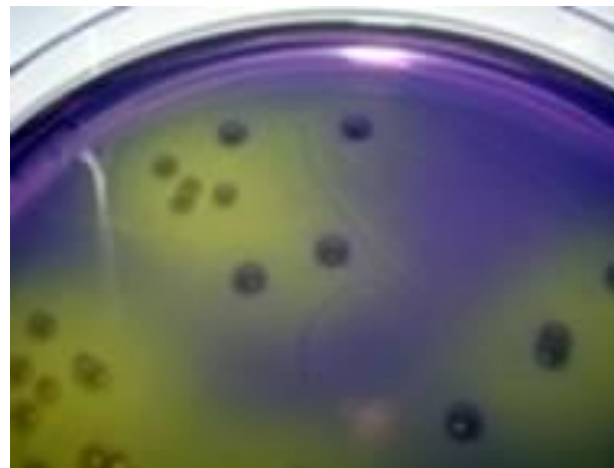
PARTIE 1: LES MILIEUX DE CULTURE ET DILUTIONS





INTRODUCTION:

- En microbiologie, il existe différents moyens d'identifier les microorganismes.
- On utilise différents milieux, avec des compositions et aspects divers, que ensuite nous ensemençons avec plusieurs méthodes.



Milieu BCP avant et après ensemencement



- Toutes les bactéries n'ont pas les mêmes exigences
- Nutriment
 - Simple -> complexe « Facteur de croissance »
 - Culture cellulaire « intra-cellulaire »
 - Non cultivable
- Atmosphère : concentration en oxygène
 - Aérobie strict à anaérobie strict
- Température 37°C
- Temps de multiplication (min à jour)

I : LES DIFFERENTS MILIEUX

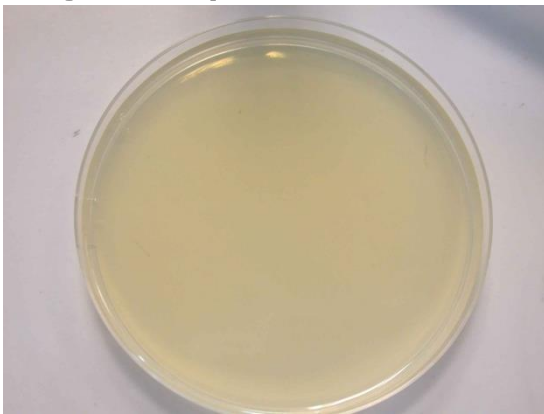
A) DÉFINITIONS :

- Un milieu de culture est une préparation au sein de laquelle des micro-organismes peuvent se multiplier. Il doit donc satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié ce qui implique :
 - couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone et d'énergie ;
 - présenter un pH voisin du pH optimal ;
 - présenter une force ionique optimale (le milieu peut être isotonique mais ce n'est pas obligatoire).



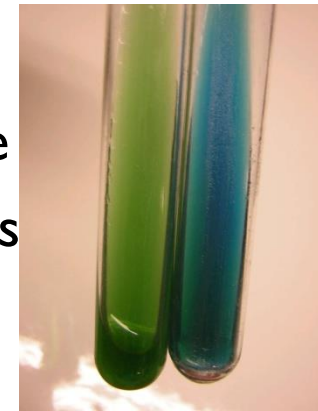
LES MILIEUX SOLIDES :

- Les milieux solides sont obtenus à partir de milieux liquides, auxquels on ajoute un gélifiant: le plus souvent de l'agar ou de la gélose.
- Parmi ces milieux, certains sont coulés en boîtes de Pétri ou en tube avec une teneur en gélose d'environ 15 g/L, alors que les géloses molles ou semi-solides, ont une teneur de 3 à 5 g/L et présentent une consistance intermédiaire.



Boîte GNO

Tube Citrate
de Simmons



LES MILIEUX LIQUIDES :

- Ces milieux sont la plupart du temps des bouillons nutritifs ordinaires. Ils ont trois composants principaux: les peptones, les extraits de viandes et les extraits de levures.
- Les peptones sont des hydrolysats enzymatiques de protéines animales ou végétales riches en acides aminés et en peptides.
- Les extraits de viandes apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides.
- Les extraits de levure eux représentent une source d'acides aminés et des vitamines hydrosolubles.

Milieu Urée Tryptophane



MILIEUX SYNTHÉTIQUES

Milieu qui doit fournir une source d'énergie et des éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre, le phosphore et des facteurs de croissance.

La composition exactement connue, qualitativement et quantitativement. Ces milieux sont surtout utilisés pour l'étude des bactéries autotrophes ou pour étudier les besoins nutritifs d'un germe. Ils sont rarement utilisés en routine à l'exception de quelques uns : Citrate de Simons, Urée-Tryptophane...

MILIEUX COMPLEXES

Aussi appelés milieux empiriques.

Contiennent des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

composition connue seulement avec approximation car dépendant des matières premières utilisées : extrait de viande ou de levure, peptones, sucres et éventuellement liquides biologiques (sérum, sang...) mais qui conviennent aux micro-organismes étudiés. Ce sont les milieux les plus employés aujourd'hui. Exemple : Columbia, Tryptycase soja, Chocolat

INGRÉDIENTS DES MILIEUX COMPLEXES

Extrait de levure (source de vitamine B)

Extrait de viande (vitamines et facteurs de croissance)

Peptones (source d'azote)

Sang (élément nutritif +observation des propriétés hémolytiques de certaines bactéries)

NaCl : isotonie

Phosphates: tampon

Eau : hydratation du milieu.

INDICATEURS DE PH

- indiquent une activité enzymatique qui produit un métabolite acide ou alcalin

	pH	Acide	Alcalin
Rouge de phénol	6.8 à 8.3	jaune	rouge
Rouge de méthyl	4.2 à 6.3	rouge	jaune
Bromothymol bleu	6.0 à 7.6	jaune	bleu
Bromocrésol pourpre	5.6 à 6.8	jaune	pourpre

DESCRIPTION DE QUELQUES MILIEUX

Les milieux non sélectifs

On regroupe sous ce vocable tous les milieux ne contenant aucune molécule inhibitrice. Ils sont en général de préparation assez simple

Exemple : *La gélose Mueller-Hinton*

Infusion de viande de bœuf	300 ml.L ⁻¹
Peptone de caséine	17.5 g.L ⁻¹
Amidon de maïs	1.5 g.L ⁻¹
Agar	17 g.L ⁻¹

LES MILIEUX NON SÉLECTIFS ENRICHIS



- Contiennent des substances organiques complexes (sang, infusions, extraits de levure).
- Permettent la croissance des bactéries plus exigeantes.
Ex : gélose au sang

GÉLOSE SANG

L'ADDITION DE SANG AU MILIEU DE BASE PEUT AVOIR PLUSIEURS BUTS :

- **APPORTER DES FACTEURS DE CROISSANCE NÉCESSAIRE AU MICRO-ORGANISME ÉTUDIÉ**
- **NEUTRALISER CERTAINS INHIBITEURS CONTENUS DANS LES PETONES DES MILIEUX**
- **NEUTRALISER, DU FAIT DE L'ACTION PEROXYDASIQUE ET CATALASIQUE DE L'HÉMOGLOBINE, DES IONS SUPEROXYDES OU DES PEROXYDES TOXIQUES PRODUITS PAR LE MICRO-ORGANISME (INTÉRESSANT EN PARTICULIER POUR LES BACTÉRIES CATALASE – COMME LES *STREPTOCOCCACEAE*)**

GÉLOSE SANG (COMPOSITION)

Infusion de cœur de bœuf

Peptone

NaCl

Agar

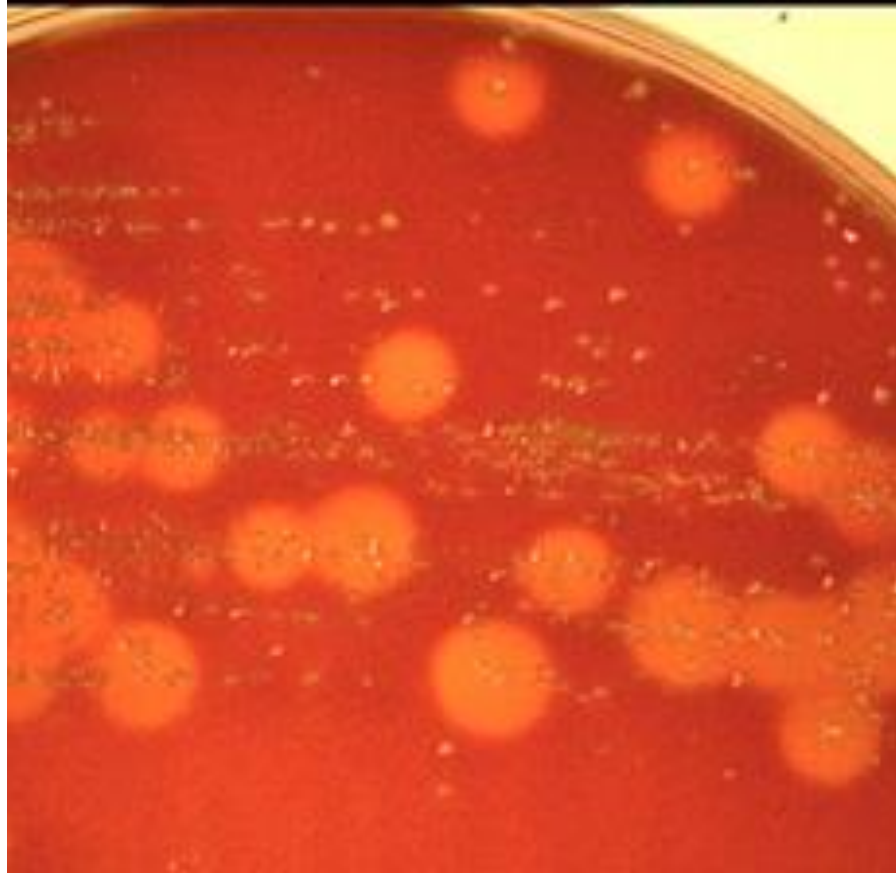
**Sang défibriné de mouton ou de cheval en
concentration de 5 à 10%**

Utilité: visualiser l'hémolyse

TYPES D'HÉMOLYSE



- Alpha (α) : hémolyse incomplète (partielle)
- Zone verdâtre autour de la colonie



- Bêta (β) : hémolyse complète (complète)
- Zone transparente autour de la colonie

Autres additifs:

Extrait globulaire : Ajouté dans les milieux de base 10%, sa caractéristique fondamentale est sa richesse en hémine (facteur X).

Sérum : Ajouté à 5-10% dans les milieux Gélose au sérum coagulé pour *Corynebacterium*

Ascite : Il contient les mêmes éléments que le sérum, mais moins de glucose et d'enzymes

Jaune d'oeuf : additionné aux milieux usuels pour permettre la recherche de la lécithinase (milieu Baird-Parker pour *Staphylococcus aureus*)

Lait : Utilisé pour l'isolement et le dénombrement des bactéries lactiques, pour la recherche de l'hydrolyse de la caséine.

MILIEU SÉLECTIF

- **Inhibe la croissance des bactéries indésirables et stimule celle des microbes recherchés**
- **Contiennent des agents inhibiteurs (Ab, sel, colorant)**

Ex : cristal violet et sels biliaires dans la gélose

MacConkey



MILIEU DIFFÉRENTIEL OU D'ORIENTATION ET IDENTIFICATION



- Facilite la distinction entre les colonies de la bactérie recherchée et les autres colonies présentes sur le même milieu.

La lecture de ces milieux peut :

➤ -soit se faire directement :

- virage d'un indicateur de pH indiquant la consommation d'un sucre (milieu **BCP** pour le lactose chez les Enterobacteries, **Chapman** pour le mannitoi chez les Staphylococcus ...)

- présence d'ions fer III qui révèlent la production d'H₂S par apparition d'un précipité noir (milieu **Hajna-Kligler**, milieu **SS...**)

➤ -soit se faire après addition de réactifs :

- addition d'acide sulfanilique et d'α-naphtylamine pour révéler la réduction des nitrates dans le **bouillon nitrate**

- addition de perchlorure de fer pour révéler la présence d'une tryptophane désaminase en **milieu Urée-Indole ...**

MILIEUX SÉLECTIF-DIFFÉRENTIEL

Possède les caractéristiques des milieux sélectifs et différentiels

Ex : MacConkey

mannitol salt

GÉLOSE MACCONKEY

COMPOSITION



- Peptones
- Lactose (sucre) : élément différentiel
- Sels biliaires et cristal violet : éléments sélectifs
- NaCl
- Agar
- Rouge neutre: indicateur de pH
- Utilité: isolement et distinction des bactéries Gram (-)

GÉLOSE MANNITOL SALT COMPOSITION

Extrait de boeuf

Peptones

NaCL 7.5% : élément sélectif

Mannitol: élément différentiel

Rouge de phénol: indicateur de pH

**Utilité: isolement des bactéries halophiles
comme les Staphylocoques.**

MILIEUX D'ENRICHISSEMENT

Un milieu d'enrichissement réunit deux caractéristiques :

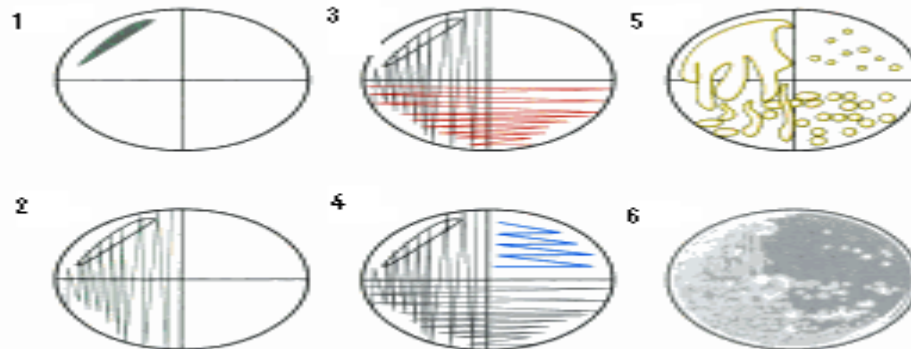
- ❑ **il contient des molécules à action sélective inhibant totalement ou partiellement la culture des micro-organismes non recherchés ou utilise une température d'incubation particulière, ou encore une atmosphère particulière ;**
- ❑ **il est liquide (bouillon) afin que son action sélective s'exerce sur une population importante et homogène.**

II - LES DIFFÉRENTS TYPES D'ENSEMENCEMENTS

A - ENSEMENCEMENTS SUR MILIEUX SOLIDES:

I- LES BOÎTES DE PÉTRI:

- A l'aide d'une ose, on prélève une goutte de suspension, que l'on dépose sous forme de stries sur la surface du milieu. Il existe plusieurs façons de faire les stries. Par exemple, il y a la méthode des quadrants, voir ci-dessous:

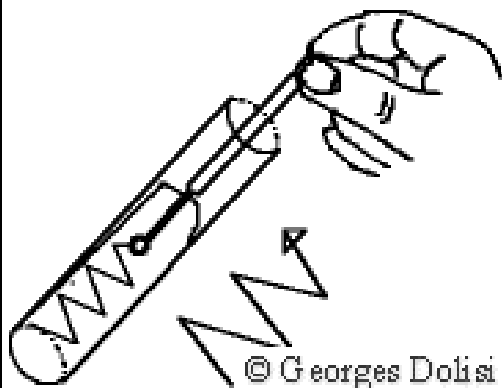


- On peut aussi utiliser des billes de verres que l'on dépose sur le milieu avec des gouttes de suspension. Puis, on agite la boîte et on enlève les billes.
- Il existe aussi l'ensemencement à l'aide d'un râteau, qui consiste à faire un beurrage du milieu. On dépose un volume défini sur la gélose, et avec ce qu'on appelle un râteau, on étale toute la suspension sur la gélose.
- Enfin, souvent utilisé pour le dénombrement des colonies, on peut faire un ensemencement en masse. On dépose une goutte de suspension dans une boîte de pétri vide, et ensuite, on coule la gélose par-dessus. Il faut agiter pour bien que la suspension se répartisse.

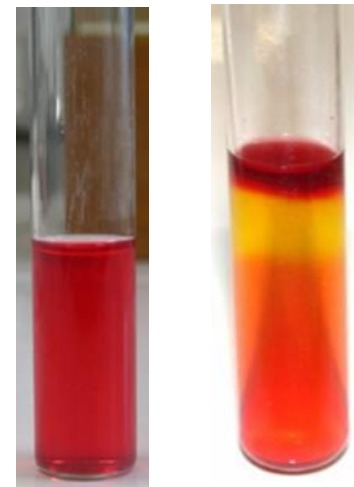


2- LES MILIEUX EN TUBES:

- La plupart des ensemencements solides en tubes, se font part des stries en surfaces le long de la gélose. Pour certains milieux soit il suffit juste d'une piqûre centrale dans la gélose, ou alors, en plus des stries, il faut ajouter une piqûre centrale pour compléter l'ensemencement.
- Certains milieux, on les ensemence avec une piqûre centrale, et on remonte ensuite en tournant dans tout le tube (Viande Foie, Mevag...).



Milieu Mannitol
Mobilité Nitraté avant
et après ensemencement



B- LES ENSEMENCEMENTS EN MILIEUX LIQUIDES

- Il existe deux types d'ensemencement en milieu liquide :
- Soit on réalise d'abord une suspension, c'est à dire que l'on prélève des colonies sur une gélose que l'on place dans de l'eau distillée puis on prend quelque goutte de cette suspension que l'on met dans notre milieu à ensemercer à l'aide d'une pipette.
- Soit on a déjà un bouillon nutritif ordinaire, cette fois la suspension n'a pas à être faite, on prend directement des gouttes du bouillon.

Milieu hypersalé



LES MILIEUX SELECTIFS DES ENTEROBACTERIES

Le Milieu de Mac Conkey

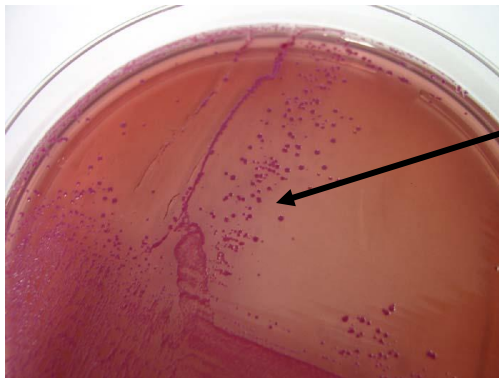
Composition

Peptone de caséine
Peptone de viande
Lactose
Mélange de sels biliaires
Chlorure de sodium
Rouge neutre
Cristal violet
Agar (gélose)
ED

17 g → Source de C et N
3g → Source de C, N,
10 g → Source énergétique de C
1,5 g → Inhibiteur
5 g → Équilibre ionique
0,03 g → Indicateur de pH
0,001 g → Inhibiteur
13,5 g
qsp 1 L

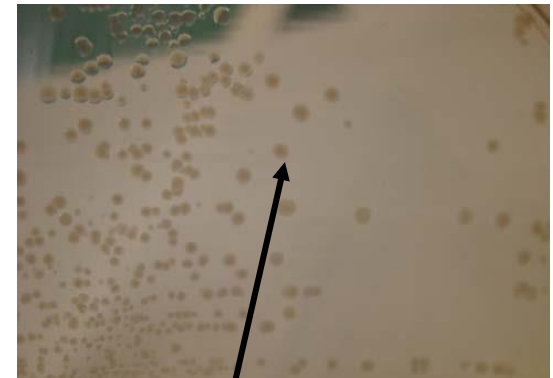
pH = 7,1

Lecture



Colonies rouges → le pH est acide .

Les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides: **LACTOSE +**

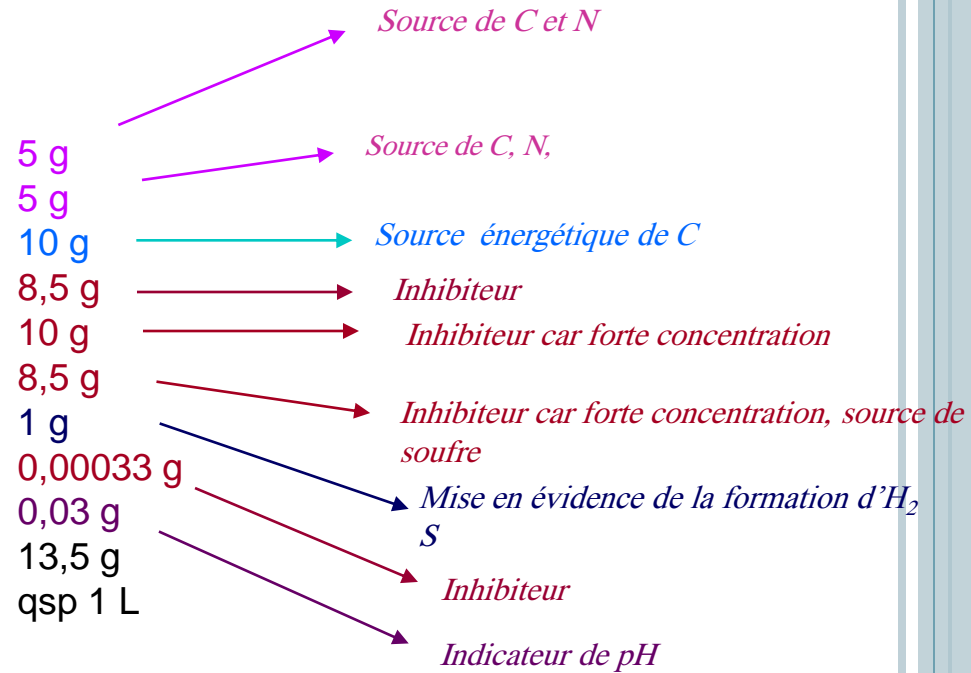


Colonies incolores → le pH est neutre ou basique .

Les bactéries ne fermentent pas le lactose: **LACTOSE -**

Composition

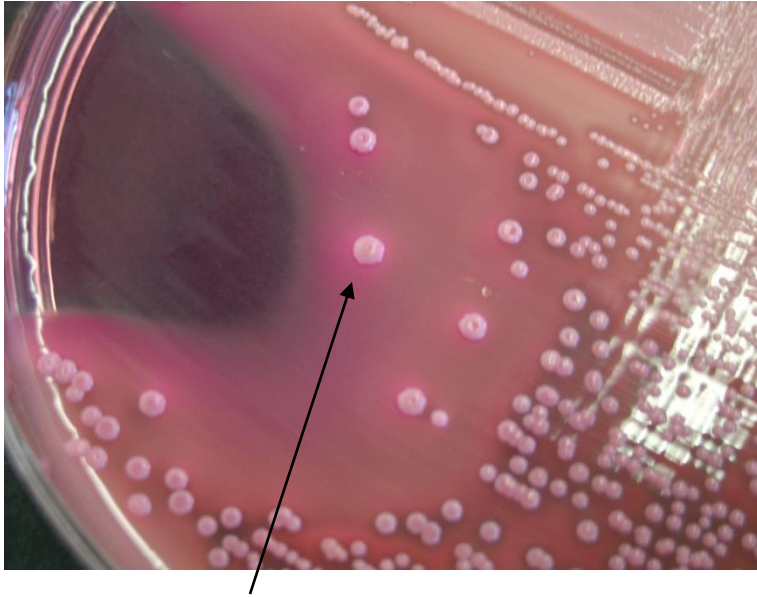
- Extrait de viande de boeuf
- polypeptone
- Lactose
- Sels biliaires
- Citrate de sodium
- Thiosulfate de sodium
- Citrate ferrique
- Vert brillant
- Rouge neutre
- Agar (gélose)
- ED



pH = 7



Lecture

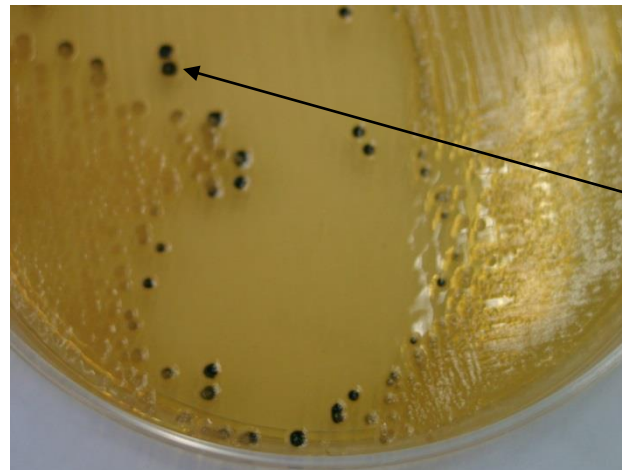
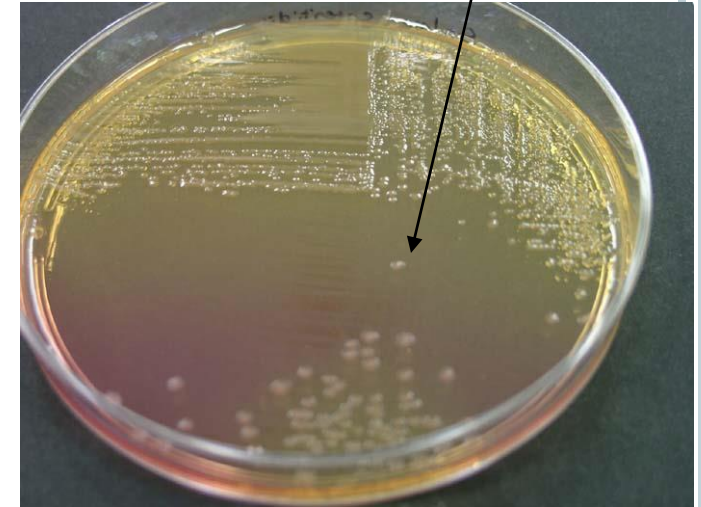


Colonies rouges → le pH est acide .

Les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides: **LACTOSE +**

Colonies incolores → le pH est neutre ou basique .

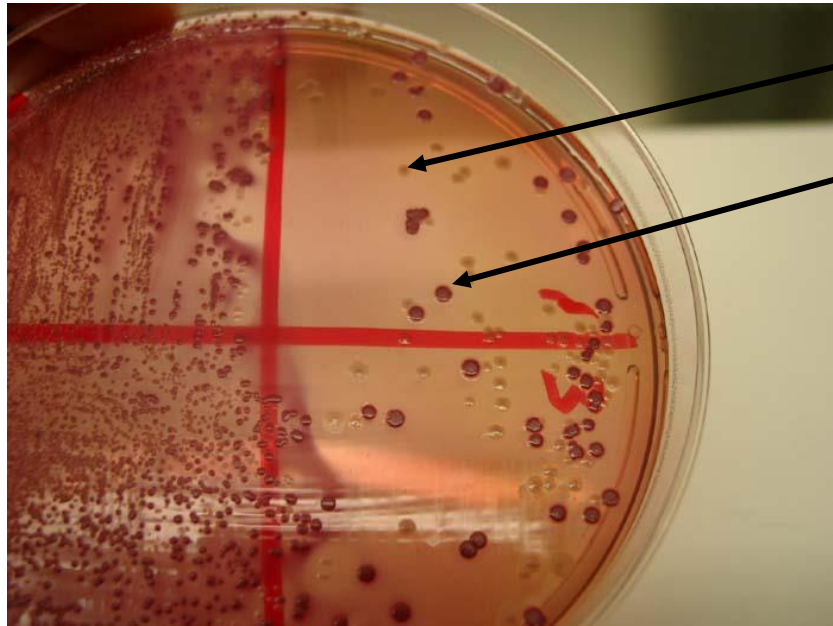
Les bactéries ne fermentent pas le lactose : **LACTOSE -**



Colonies avec centre noir → précipité de sulfure de fer.

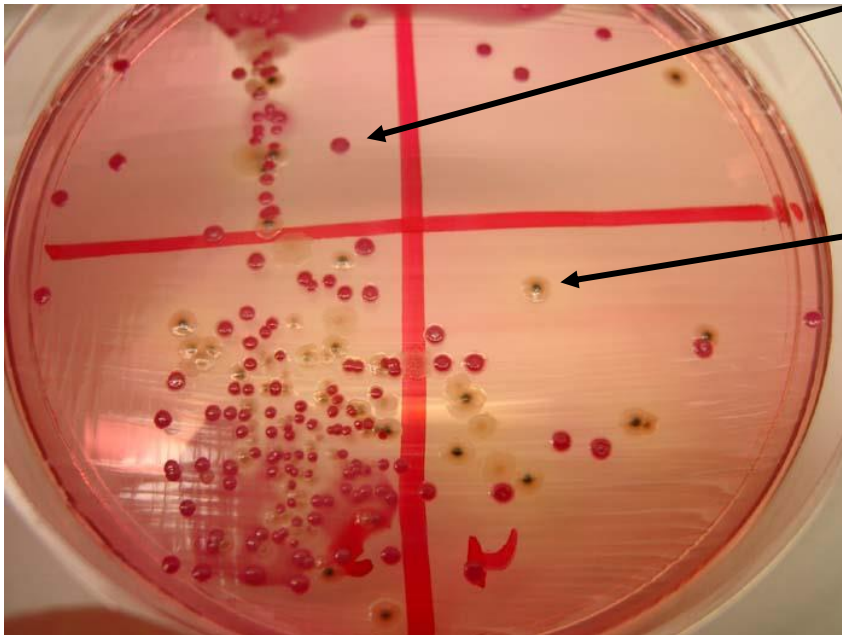
Les bactéries ont produit de l' H_2S : **$H_2S +$**





Colonie incolore → le pH est neutre ou basique
 Les bactéries n'utilisent pas le lactose : LACTOSE -
 Absence de centre noir : H₂S -

Colonie rose → le pH est acide .
 Les bactéries fermentent le lactose en
 produisant des acides : LACTOSE +
 Absence de centre noir : H₂S -



Colonie rose → le pH est acide .
 Les bactéries fermentent le lactose en
 produisant des acides : LACTOSE +
 Absence de centre noir : H₂S -

Colonie incolore → le pH est acide .
 Les bactéries n'utilisent pas le lactose :
 LACTOSE -
 Présence d'un centre noir : H₂S +
 Suspicion de Salmonella



Le Milieu EMB

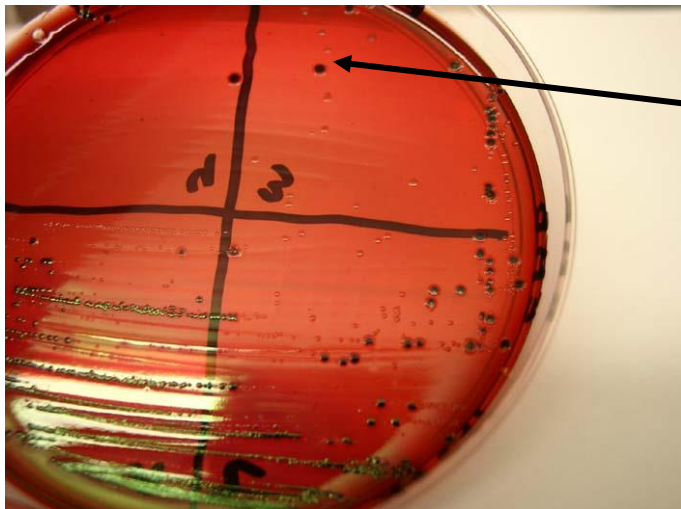
Composition

Peptone de viande ou de gélatine
Lactose
Phosphate dipotassique
Eosine jaunâtre
Bleu de méthylène
Agar (gélose)
ED

10 g → Source de C, N,
10 g → Source énergétique de C
2 g → Sels minéraux
0,4 g → Inhibiteur
0,067 g → Inhibiteur
13,5 g
qsp 1 L

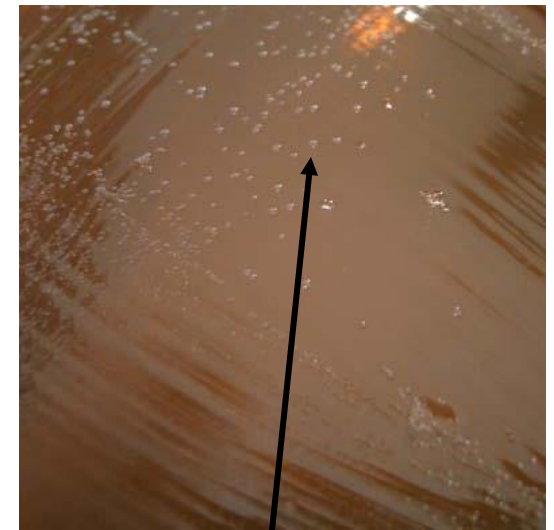
pH = 6,8 à 7

Lecture



Colonies violet foncé → le pH est acide .

Les bactéries fermentent le lactose en produisant des acides: **LACTOSE +**
En dos de scarabée (noir luisante) suspicion d'E. coli



Colonies grisâtres → le pH est neutre ou basique .

Les bactéries ne fermentent pas le lactose : **LACTOSE -**

Le Milieu HEKTOEN

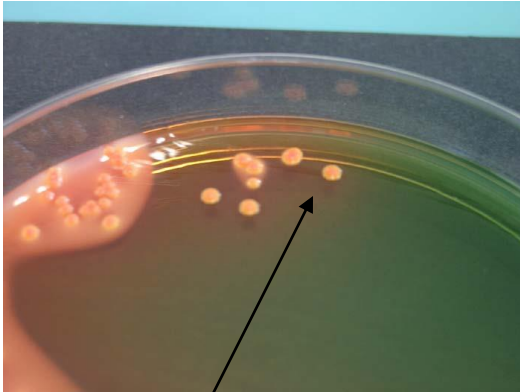
Composition

Peptone de viande ou de gélatine	10 g	}	→	<i>Source de C, N,</i>
Extrait de levure	3 g			
Chlorure de sodium	5 g	→	<i>Sels minéraux</i>	
Thiosulfate de sodium	5 g	→	<i>Source de soufre</i>	
Sels biliaires	9 g	→	<i>Inhibiteur</i>	
Citrate de fer ammoniacal	1,5 g	→	<i>Témoin de la production d'H₂S</i>	
Salicine	2 g	}	→	<i>Sources énergétiques de C</i>
Lactose	12 g			
Saccharose	12 g			
Fushine acide	0,1 g	→	<i>Rôle mal défini</i>	
Bleu de bromothymol	0,065 g	→	<i>Indicateur de pH</i>	
Agar (gélose)	14 g			
ED	qsp 1 L			

pH = 7,5

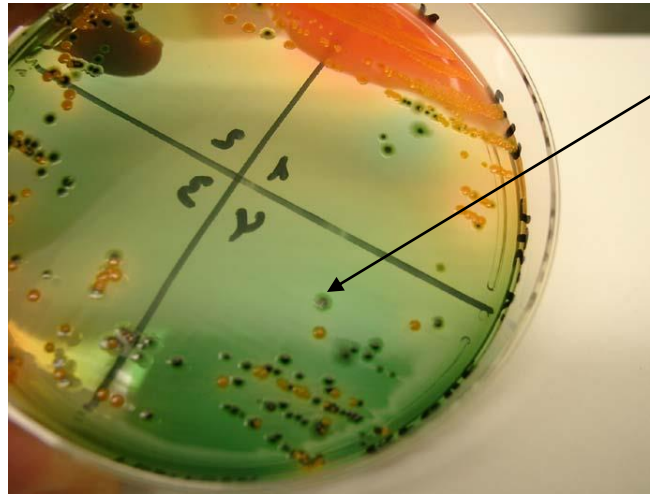


Lecture



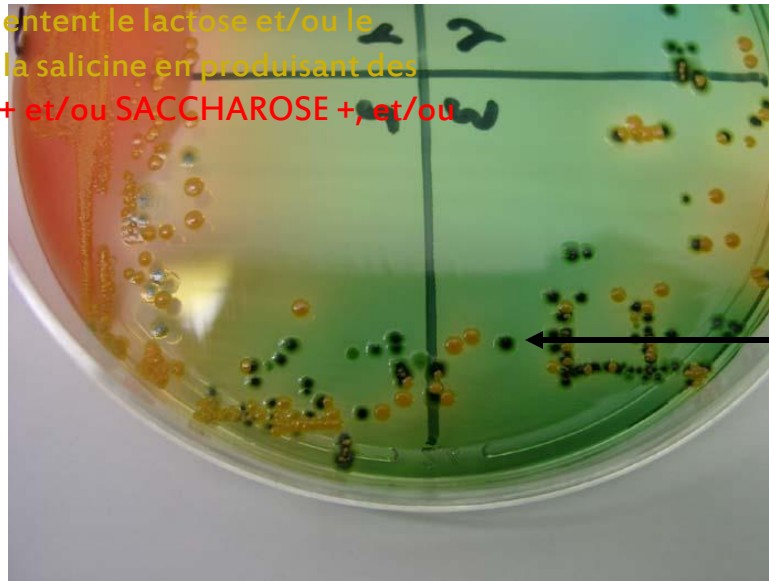
Colonies saumons → le pH est acide (couleur due au mélange de fushine et la couleur jaune du BBT acide)

Les bactéries fermentent le lactose et/ou le saccharose, et/ou la salicine en produisant des acides: LACTOSE + et/ou SACCHAROSE +, et/ou SALICINE +.



Colonies transparentes, vertes ou bleues → le pH est neutre ou basique .

Les bactéries ne fermentent ni le lactose, ni le saccharose ni la salicine : LACTOSE -, SACCHAROSE - ET SALICINE -



Colonies à centre noir → formation d'un précipité de sulfure ferrique.

Les bactéries produisent de l' H_2S : H_2S +

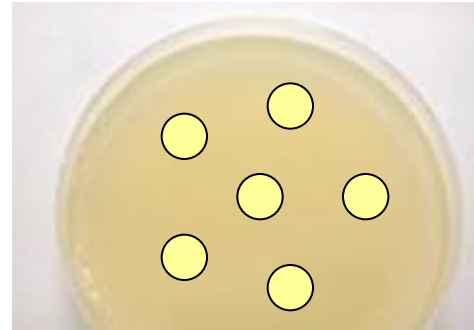


LES MILIEUX DE CULTURE DES BACILLUS

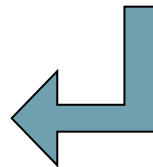
Gélose nutritive à 1% d'amidon de riz ou de pomme de terre



Ensemencer par une strie centrale à partir d'une suspension bactérienne.
Ou en faisant 5 ou 6 dépôts d'ose sur la gélose

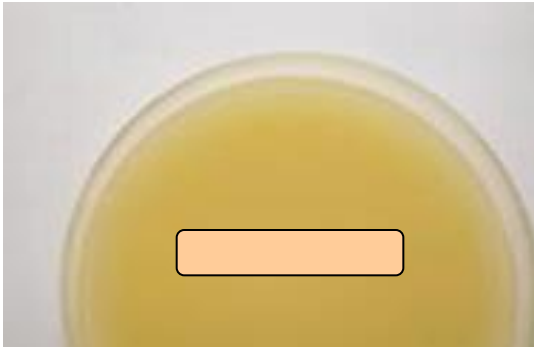


Incuber 24 heures à 37°C

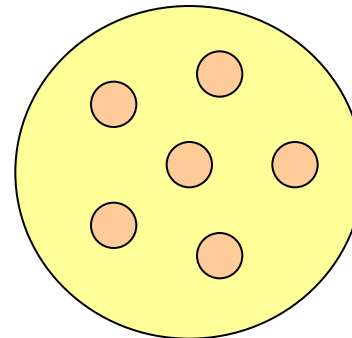


Gélose à l'œuf

Gélose trypticase-soja à 10% de jaune d'œuf stérile



Ensemencer par une strie centrale à partir
d'une suspension bactérienne.
Ou en faisant 5 ou 6 dépôts d'ose sur la gélose



Incuber 24 heures à 37°C



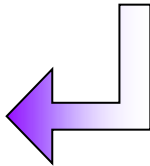
Milieu TCA

Composition

Peptone tryptique de caséine
Chlorure de sodium
Sulfite de sodium
Cystine
Rouge de phénol
Gélose
ED

20 g → Source N
5 g → Sources minérales
0,5 g
0,5 g → Source de C et N
0,017 g
2,5 g → Indicateur de pH
qsp 1 L

$pH = 6,8 \text{ à } 7$



Ensemencement

- Régénérer les milieux 20 min au BM à 100°C.
- Refroidir les tubes à 45°C.
- Incorporer le sucre désiré pour une concentration finale de 1% (10g.L⁻¹).
- Solidifier les milieux sous l'eau froide.
- Ensemencer par piqûre centrale.
- Incuber 24 heures à 37°C.



Milieu de Mossel

Composition

Extrait de viande

Peptone

Mannitol

Chlorure de sodium

Rouge de phénol

Agar

ED

$pH = 7,1$

1 g

10 g

10 g

10 g

0,025 g

12 g

qsp 1 L

Source N

Sources de carbone

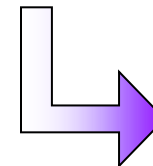
Sources minérales

Indicateur de pH

Au moment de l'emploi, ajouter à 90 mL de milieu:

- 10 mL de jaune d'œuf dilué au ½ dans de l'eau physiologique
- 1, 2, 5 ou 10 mL de polymyxine à 1 mg/mL (**Inhibiteur**)

C'est un milieu d'isolement sélectif des *Bacillus* de l'espèce *Bacillus cereus* à partir des aliments ou des selles.



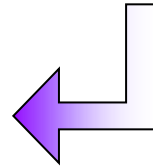
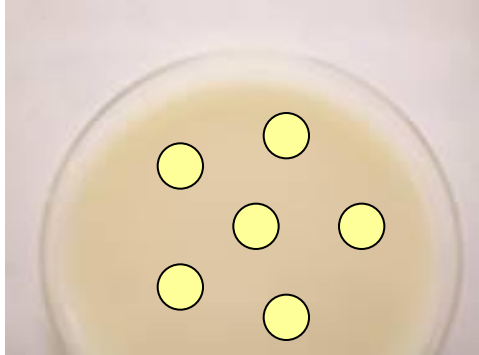
Ensemencement

Isolement par la technique des quadrants.



Gélose au lait

Gélose blanche à 2,5 à 3% d'agar en solution dans l'eau dans laquelle on ajoute la même quantité de lait stérile.



Ensemencer en faisant 5 ou 6 dépôts d'ose sur la gélose

Incuber 24 heures à 37°C



Lecture des milieux

Gélose à l'amidon

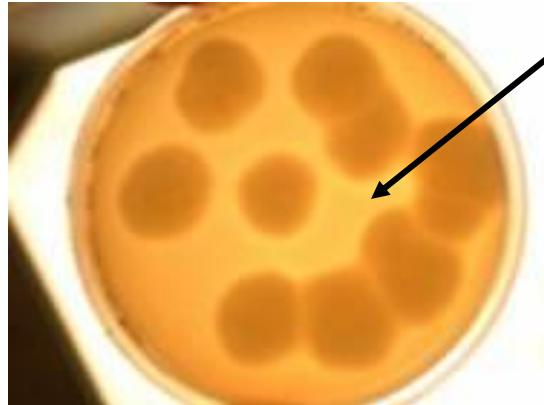
Recouvrir de lugol la gélose après culture



Pas de coloration noire autour des cultures:
absence d'amidon → **il a été hydrolysé par les bactéries**, test positif

Coloration noire autour des cultures:
présence d'amidon → **test négatif**

Gélose à l'œuf



Lecture directe:

Éclaircissement du milieu de culture → **les bactéries ont hydrolysé les lécithines du jaune d'œuf**, test positif

Pas de changement du milieu → **test négatif**



Gélose Mossel



Colonies rouges entourées d'un halo opaque et blanchâtre → suspicion de *Bacillus cereus*, LECITHINASE +++

Colonies rouges → pas d'utilisation de mannitol par les bactéries → MANNITOL -

Présence d'un halo: hydrolyse des lécithines par une **lécithinase**, en choline soluble et **diglycéride insoluble** qui précipite dans le milieu en formant un trouble.



Gélose au lait

Lecture directe après culture



Halo clair autour de la culture →
hydrolyse de la caséine, test positif

Pas de modification du milieu autour de la
culture → **test négatif**, la caséine n'est pas
hydrolysée.



- Il existe donc différents types de milieux avec leur différents ensemencements, mais ce sont les plus couramment utilisés. En effet, il y a de nombreux types de milieux avec des ensemencement divers.
- Pour pouvoir identifier une bactérie, il faut connaître ses exigences, pour connaître les milieux à ensemer, car parmi les différents milieux solides et liquides, chacun ont leurs propres propriétés: synthétique, empirique, sélectif, ...

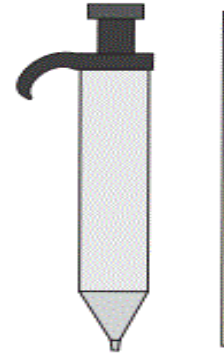


PRÉPARATION DES DILUTIONS

Le matériel :



Tubes de diluant
de 9 mL



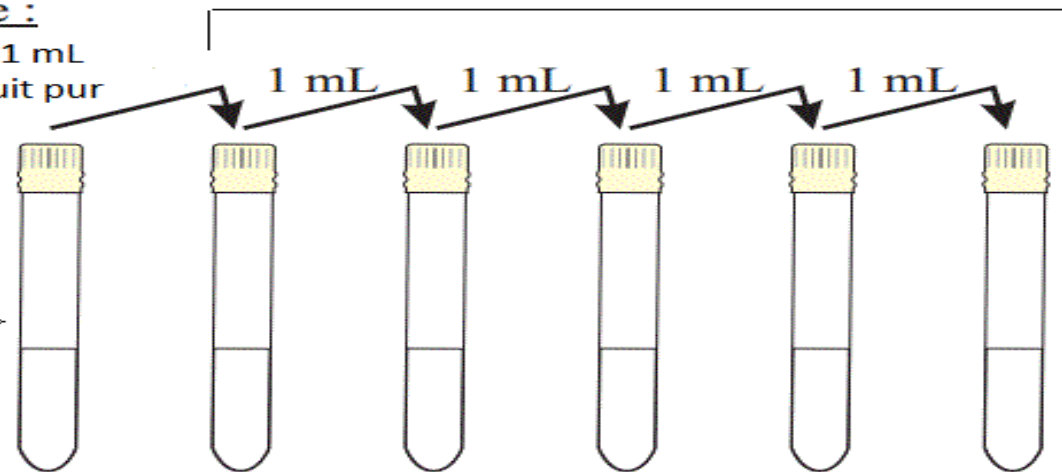
Pipette graduée ou pipette paille de 1 mL

La technique :

Prendre 1 mL
du produit pur

5 tubes avec 9 mL de diluant

Suspension
bactérienne à
mesurer



Dilution :	10^0	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
Facteur de dilution :	1	10	100	1000	10000	100000