

## Chapitre 2 : les grands groupes microbiens

### Points essentiels

---

Plusieurs bactéries sont capables de contaminer de nombreux produits alimentaires provoquant l'altération du produit. Ce qui peut engendrer des maladies graves pour le consommateur par leur pouvoir pathogène. Par contre d'autres bactéries sont bénéfiques pour l'Homme et sont utilisées dans le domaine agro-alimentaire.

- ☐ **Pouvoir infectieux** (pouvoir de contamination, pouvoir de multiplication et de pénétration, activité enzymatiques néfastes, utilisation des métabolites de l'hôte, libération de toxines : souvent endotoxines)
- ☐ **Pouvoir pathogène**
- ☐ **Virulence**
- ☐ **Pouvoir toxique** (intoxications, Intoxinations, toxi-infection et toxinogénèse liée à la virulence).

### Bactéries à Gram-/Entérobactéries

On appelle coliforme tout bacille Gram-négatif, non sporulant, AAF, capable de fermenter le lactose en 48 heures (BLBVB/cloche), avec formation d'acide et de gaz à 37/30°C.

-*Escherichia coli* est un coliforme typique, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella* (germes témoins d'une contamination fécale).

-En microbiologie alimentaire les coliformes sont une flore indicatrice de contamination fécale et de bons marqueurs de la qualité hygiénique générale d'un aliment.

-*Salmonella*, *Shigella*... ne répondent pas à cette définition de coliformes (germes potentiellement pathogènes).

-Les coliformes qui peuplent l'intestin peuvent être identifiés par leur tolérance à une température de 44-45 °C.

-La présence de ces coliformes thermotolérants est une preuve indiscutable d'une contamination par matières fécales. L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien, *E. coli* et dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*.

**NB:** - Identification: (I, r, M, V, p, C).

-Indicateurs de contamination fécale : tels que les coliformes sont souvent associés à des flores pathogènes comme les *Salmonella* ou les *Shigella*.

### ❖ *Escherichia*

Il existe plusieurs espèces d'*Escherichia*, la plus importante est *E. coli*. Mobile, indole +, lactose +, citrate -, uréase -, VP-/RM+, H<sub>2</sub>S-, LDC+,ODC-, ADH-, glucose + avec production de gaz, ONPG+ et gélatine-.

-C'est un hôte normale de l'intestin de l'homme et des animaux, et est très abondant dans les matières fécales.

-Certains sérotypes peuvent être pathogènes et provoquent des troubles digestifs spécifiques.

***Escherichia coli* O157:H7**: pathogène (AFNOR). Provoque une colite hémorragique sévère.

- Une entérotoxine est une substance toxique (macroprotéines) produite par une bactérie capable de provoquer des troubles intestinaux lors de sa diffusion dans le système digestif. Ces toxines adhèrent à l'épithélium intestinal de l'intestin grêle et empêchent l'absorption des ions Na<sup>+</sup> et Cl<sup>-</sup> favorisant une fuite hydrique : diarrhées associées ou non à des dommages tissulaires.

- Ces molécules agissent principalement dans l'intestin, d'où le terme «entérotoxine» utilisé pour les définir.

- Les infections sont le plus souvent causées par la consommation de viande de bœuf contaminée et insuffisamment cuite, mais peuvent également être dues à la consommation d'eau, de lait cru, de fruits, légumes, etc.

### ❖ *Citrobacter*

AAF, bacilles/coccobacilles (de 0,3 à 1 µm de diamètre et de 0,6 à 6 µm de long), mobiles, glucose +, réduction des nitrates en nitrites +, indole -, ONPG +, urease -, VP -, LDC-,ODC+, ADH+, lactose +, citrate+ et H<sub>2</sub>S +/-.

-Ces bactéries peuvent être trouvées dans le sol, l'eau, les eaux usées, l'intestin humain. Entraînent des infections des voies urinaires, des bactériémies, des abcès cérébraux ainsi que des pneumonies et d'autres infections néonatales (la méningite).

### ❖ *Enterobacter*

Bacilles, mobiles, glucose +, réduction des nitrates en nitrites +, indole -, ONPG +, urease -, VP+, LDC+,ODC+, ADH-, lactose +, citrate+ et H<sub>2</sub>S-.

-L'habitat est l'intestin de l'Homme et des animaux, aussi trouvé dans les selles, les eaux d'égouts, le sol, les produits laitiers.

-Les souches du genre *Enterobacter* sont souvent responsables d'infections nosocomiales d'infections urinaires ou de plaies et de méningites.

### ❖ *Klebsiella*

Asporulé, immobiles, glucose +, lactose +, saccharose +, mannitol +avec production de gaz, uréase +, VP +/RM -, indole -, H<sub>2</sub>S- et gélatinase -.

-Saprophytes des voies aériennes supérieures et digestives de l'homme et des animaux. Responsable de bronchite, d'angine, d'otite et d'infection des voies urinaires et digestives.

### ❖ *Salmonella*

Mobile, Glucose + sans production de gaz, lactose -, citrate +,ONPG-, VP- , indole -, H<sub>2</sub>S+, RM+, LDC+, ODC+, ADH-, uréase-.

-Les salmonelles certaines ont un pouvoir entéro-invasif et pénètrent dans les cellules de la muqueuse intestinale.

-Les fièvres typhoïde et paratyphoïde dues à *Salmonella Typhi*, Para A, Para B et Para C.

-Les *Salmonella* sont la cause de gastro-entérite.

### ❖ *Shigella*

Les *Shigella* sont des entérobactéries à faible pouvoir métabolique. Elles sont génotypiquement très voisines des *Escherichia*. Spore-, immobile, citrate-, glucose+ sans production de gaz, lactose-, gélatinase-, ONPG+/-, H<sub>2</sub>S-, RM+, VP-, uréase-, catalase-, indole-, LDC-, ODC-, ADH-.

-Strictement humain (TD). *Shigella dysenteriae*: toxine (Shiga-toxine cfr EHEC). Les *Shigella* sont donc des bactéries entéro-invasives. Les *Shigella* sont l'agent de la **dysenterie bacillaire**. Il s'agit d'une infection intestinale localisée essentiellement au **gros intestin** où le germe se multiplie en provoquant **une inflammation de la muqueuse**. Le syndrome dysentérique comprend : des douleurs abdominales violentes, une diarrhée parfois sanglante, de la fièvre.

### ❖ *Yersinia*

Les *Yersinia*, mobile (22°C) , citrate-, glucose+, lactose-, ONPG+, H<sub>2</sub>S-, VP+, urée +, indole +/-.

- Réservoir naturel: sol, eau, animaux et végétaux. Ingestion d'aliments souillés (lait, coquillages, viandes , volailles). Il existe 57 antigènes O et 16 antigènes H, dont principalement les types O :3, O :9 et O :8 sont trouvés dans les infections humaines. Un plasmide de virulence thermosensible est responsable du caractère entéro-invasif des souches.

## Bactéries à Gram-/ *Vibrio*

### ❖ *Vibrio cholerae*

Bacilles incurvés en virgule, mobile, NR+, catalase +, indole+, LDC+, AAF, oxydase +, spore-, capsules-, protéolytique et peu glucidolytique. -Milieux alcalins (pH=9,2) et salés à 3% de NaCl (eau peptonée alcaline salée).

-Le choléra est une maladie grave qui, est le plus souvent, transmise par l'eau. La recherche de ce germe ne se fait que dans des aliments soupçonnés d'être à l'origine de la maladie ou dans des régions à risque élevé.

-Entérotoxine cholérique.

### ❖ *Vibrio parahaemolyticus*

Ce germe d'origine marine est de plus en plus largement reconnu comme responsable d'une toxoinfection alimentaire par suite de la consommation de produits de la mer.

## Bactéries à Gram-/ Brucelles

### ❖ *Brucella*

Coccobacilles Gram-, asporulés, immobiles, aérobies stricts, uréase +, indole -, catalase +, nitrate réductase +.

-La brucellose est une maladie infectieuse grave liée à la consommation d'aliments bien particuliers, le fromage de chèvre étant souvent mis en cause.

## Bactéries à Gram-/ *Pseudomonas*

### ❖ *Pseudomonas*

Bacilles Gram négatif mobiles, aérobies stricts, oxydase +, catalase +, présence d'une nitrate réductase.

-Cette flore banale par sa présence massive, provoquer des altérations de la viande.

-Le genre *Pseudomonas*, a été isolé sur les viandes et les volailles.

## Bactéries à Gram+/ Streptocoques

Les streptocoques fécaux font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux ; leur nombre varie de  $10^5$  à  $10^7$  par g de matière fécale. Ces germes sont par ailleurs abondamment répandus dans la nature (végétaux etc...). De toutes les bactéries non sporogènes, ces germes sont parmi ceux qui résistent le mieux à des conditions de milieu défavorables. Ces germes résistent mieux que les coliformes et *E. coli* à la réfrigération, à la congélation, au chauffage et à la salaison. De ce fait ces bactéries peuvent se multiplier dans un grand nombre d'aliments (produits acides, salés, réfrigérés etc..) qu'elles peuvent ainsi altérer.

## Bactéries à Gram+/ Staphylocoques

### ❖ *S. aureus*

- ✓ Fermente le mannitol
- ✓ NaCl 75 g/l
- ✓ Entérotoxines + Leucocidine + Hémolysines
- ✓ Coagulase + Thermonucléase

## Bactéries à Gram+/ Anaérobies sulfito-réducteurs

Les bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, mais on les rencontre fréquemment dans la nature et en particulier dans le sol et dans les matières organiques en cours de putréfaction.

- ❖ *Clostridium perfringens*
- ❖ *Clostridium butulinum*
- ❖ *Bacillus cereus* (autre bactérie sporulante, AAF).

## Bactéries à Gram+/ *Listeria*

### ❖ *Listeria monocytogenes*

Un petit bacille Gram + à bouts arrondis de 0,5 à 2  $\mu\text{m}$  de longueur sur 0,4 à 0,5  $\mu\text{m}$  de diamètre pouvant s'associer en palissade, asporulé, oxydase -, catalase +, esculine +, mésophile (cultive entre +3 et +45°C avec un optimum à 37°C). La bactérie reste viable après plusieurs années d'entreposage à 4°C.

## PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES BACTERIES DANS LES ALIMENTS

### ❖ Les méthodes générales directes

Comptage direct : il s'effectue au microscope de volume connu (cellules de Thoma, de Malassez).

### ❖ Les méthodes générales indirectes

Dosage d'un métabolite primaire synthétisé, ou dosage de la quantité d'un substrat consommé, Réduction d'un colorant et **Dilution et culture.**

❖ **Numération à partir d'un milieu solide (UFC) : technique de numération dans la masse de la gélose, technique de numération en surface de la gélose** (Dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (voir le TP), Dénombrement des coliformes totaux/fécaux : technique de double couche (voir le TP, support colimétrie).

❖ **Numération en milieu liquide (Méthode de Mac Grady), technique du nombre le plus probable NPP :** (voir le TP).

❖ **Test de MacKENZIE** (voir le TP, support colimétrie).

❖ **Colimétrie par filtration :** cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon ou de ses dilutions au travers d'une membrane filtrante (de 0,45 mm à 0,22 µm) sur laquelle sont retenus les microorganismes recherchés. Les milieux les plus souvent utilisés sont : la gélose lactosée au TTC (Triphenyl Tetrazolium Chloride) et au tergitol.

❖ **Milieu sélectif chromogène**

Le milieu chromogénique sélectif pour dénombrement d'*E. coli* et les autres coliformes dans les produits alimentaire. Le milieu repose sur la mise en évidence simultanée de deux enzymes : la Bêta-D-Glucuronidase (GLUC) et la Bêta-D-Galactosidase (GAL).

❖ **Recherche des *Salmonella***

- Pré-enrichissement, qui est facultatif le milieu de pré-enrichissement est un bouillon qui va permettre à la bactérie de se régénérer avant la mise en culture ou l'isolement.
- Enrichissement sélectif (obligatoire) : augmenter la représentation (proportion) des microorganismes.
- Isolement sélectif
- Identification biochimique
- Sérotypage

❖ **Recherche des *Shigella***

La recherche de ces germes est réalisable avec la même méthodologie que celle utilisée avec *Salmonella*. Le sérotypage est effectué à partir d'une culture sur gélose ordinaire. Les Shigelles possèdent des antigènes O et quelques fois des antigènes K ; elles n'ont pas d'antigènes H.

❖ **Recherche de *Yersinia enterocolytica***

- Pré-enrichissement
- Enrichissement
- Isolement

**NB :** la yersiniose est une maladie provoquée par cette bactérie ingérée le plus souvent avec des aliments crus (lait, coquillages, viandes, volailles). Seules certaines souches sont pathogènes ; ce germe est très sensible à la chaleur et est facilement détruit par cuisson ou pasteurisation.

❖ **Streptocoques**

❖ **Numération en milieu liquide** (test présomptif + test confirmatif)

- Test présomptif : ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de ROTHE.
- Test confirmatif : le milieu de LITZKY utilisé est le milieu de Rothe additionné de 0,5 mg d'éthyl violet par litre.

#### ❖ Numération en milieu solide

- Milieu de **SLANETZ** et **BARTLEY** (méthode par filtration).
- Milieu **KF streptocoque**
- Isolement

#### ❖ Recherche/numération de *S. aureus*

- Enrichissement (voir le TP).
- Numération sur milieux solides (voir le TP).

#### ❖ Recherche/numération *Clostridium perfringens*

- Milieu trypticase - sulfite - néomycine (TSN)
- Milieu tryptone - sulfite - cyclosérine (TSC)
- Tests de confirmation
- Numération de *C. perfringens* par titrage de l'  $\alpha$ - toxine

#### ❖ Recherche de la toxine botulinique par la méthode des souris (voir le polycopie).

#### ❖ Recherche/numération de *Bacillus cereus* et de *Bacillus* sp

- Numération sur milieu de Mossel
- Identification
- Dénombrement des spores de *Bacillus*

#### ❖ *Listeria monocytogenes*

#### ❖ Recherche/numération (voir le TP).

## LEVURES ET MOISSURES

#### ❖ Levure

Unicellulaires, se reproduisant par bourgeonnement, capables de produire des transformations biologiques à l'air libre ou en milieu clos (fermentations). A part quelques troubles gastro-intestinaux légers lors d'une absorption massive, les levures sont inoffensives pour l'être humain. Leur prolifération accidentelle dans les aliments riches en sucres peut cependant provoquer une altération grave: odeur, dégagement de CO<sub>2</sub>..... .Aussi des levures utiles (fermentation alcoolique)

#### ❖ Moisissures

Champignons inférieurs de structure complexe, doués du pouvoir de sporulation, se développant à la surface des denrées alimentaires en raison de leur caractère aérobic. A de rares exceptions près, elles sont en soi inoffensives pour le consommateur. Par contre, ce sont des facteurs d'altération qui rendent impropres à la consommation les aliments, lors d'un développement massif; elles sont alors visibles à l'oeil nu. Aussi des moisissures utiles (maturation des fromages..). Certaines moisissures sont capables de synthétiser des métabolites toxiques, les mycotoxines. Les mycotoxines les plus toxiques sont celles produites par la moisissure *Aspergillus flavus*; appelées **aflatoxines B1, B2, G1 et G2**, ces substances sont hautement cancérigènes (tumeur cancéreuse du foie). Les aliments les plus concernés sont les arachides et le maïs, produits dans les régions à climat tropical/subtropical dont la température et l'humidité sont favorables à la biosynthèse des aflatoxines.

❖ **Dénombrement** (Voir le TP).

## **BACTERIES LACTIQUES** (Résumé)

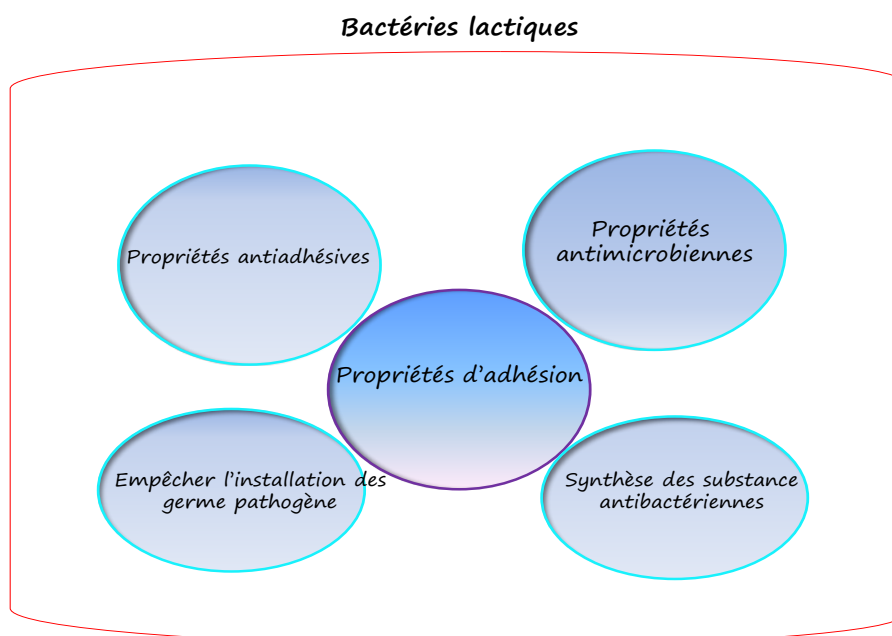
- **Généralités**

-Les bactéries lactiques sont des cocci ou des bâtonnets Gram+, catalase-, l'absence de catalase est caractéristique, mais certaines espèces acquièrent une pseudocatalase (voir le cours de la systématique des procaryotes).

-Elles synthétisent leur ATP grâce à la fermentation lactique des glucides.

-Les bactéries lactiques sont en général aérotolérantes. Cependant certaines espèces, habitants le tube digestif des animaux sont anaérobies strictes.

-Selon l'espèce bactérienne et les conditions de culture, le catabolisme du glucose peut suivre une voie homofermentaire ou une voie hétérofermentaire.



- **Principaux genres**

-Les *Enterococcus*, *Streptococcus* (non hémolytique), *Lactococcus*, *Pediococcus* et *Leuconostoc* sont des cocci sphériques ou ovoïdes, en paires, en chaînettes ou en tétrades, en général immobiles (sauf quelques espèces ex : *Ec. casseliflavus*). Le métabolisme est fermentaire et peut donner à partir des glucides, de l'acide lactique ou un mélange d'acide lactique, acétique, formique de l'éthanol et du CO<sub>2</sub>.

-Les genres *Streptococcus*, *Lactococcus*, *Enterococcus* sont des germes anaérobies facultatifs, généralement microaérophiles. Ils se développent bien à 37 C°, de nombreuses espèces sont saprophytes. Certaines espèces sont abondamment utilisées dans les industries de fermentation lactique: laiterie, beurrerie, fromagerie, mais aussi saumures et salaisons. Ce sont les agents d'acidification et de coagulation lactiques.

-Les *Leuconostoc* sont non mobiles, asporulées, anaérobies facultatives. En anaérobiose, elles fermentent le glucose principalement en acide lactique, éthanol et CO<sub>2</sub> (fermentation hétérolactique). Elles sont généralement capsulées ce qui entraîne l'apparition d'une viscosité dans le milieu. Elles ne sont pas hémolytiques ni pathogènes, dans certains fromages (bleus) elles facilitent l'ouverture par la production de CO<sub>2</sub>.

-*Lactobacillus* sont des agents de fermentation lactique intervenant dans de nombreuses industries (ou rencontrés comme contaminants). Il s'agit de bacilles souvent allongés ou coccobacilles, Gram+, asporulés, parfois groupés en paires ou en chaînes, généralement immobiles. Anaérobies, microaérophiles ou aérobies facultatifs. Catalase- (certains ont une pseudocatalase). Certains sont homofermentaire obligés (*Lactobacillus delbrueckii*), d'autres sont hétérofermentaires (*Lb. brevis*) et d'autres sont hétérofermentaires facultatifs (*Lb. casei*). Ils sont acidophiles, peut protéolytiques et peut lypolytiques. Se trouvent sur la végétation, dans la microflore naturelle de l'homme et dans divers produits alimentaires fermentés.

-*Bifidobacterium* sont des bâtonnets de morphologie variées, cellules courtes, coccoidales, cellules ramifiées, isolées ou en chaînes, disposition en V ou en palissade. Ces bactéries sont Gram+, non acido-alcool-résistantes, non sporulées, immobiles, anaérobies, bien que quelques espèces tolèrent l'O<sub>2</sub> en présence de CO<sub>2</sub>. La température optimale de croissance ne dépasse pas 39 °C pour les espèces d'origine humaine, alors que les espèces d'origine animale préfèrent 43-45°C. *Bifidobacterium bifidus* meurt à 60 °C. La croissance des *Bifidobacterium* n'est pas possible à pH 4,5-5 et pH 8-8,5. Ces bactéries sont glucidolytiques et donnent de l'acide acétique et lactique; elles produisent de petites quantités d'acide formique, d'éthanol et d'acide succinique. *Bifidobacterium* anciennement- *Lactobacillus bifidus* est utilisé dans certains yaourts «probiotiques».

### • Milieux de culture/recherche et dénombrement

- Streptocoques : Elliker ; M 17.

-Lactocoques: Elliker, M 17.

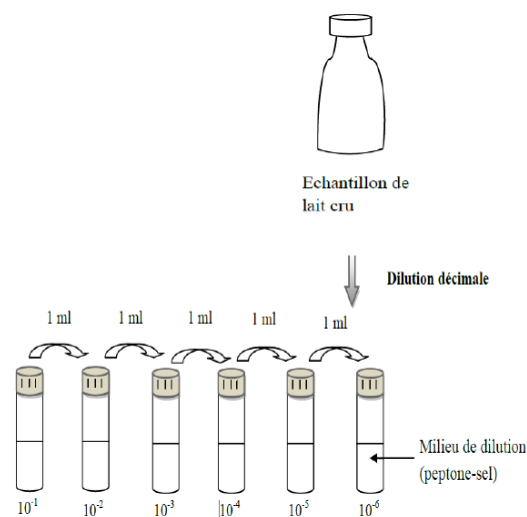
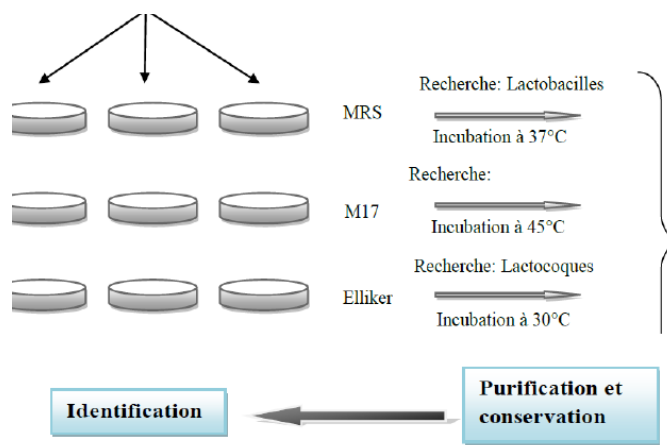
-Lactobacilles: MRS; MRS acidifié.

-Pediocoques: MRS ; MRS + NaCl 4 %.

-Bifidobacterium: TPY (*Tryptone Phytone Yeast extract*), atmosphère riche en CO<sub>2</sub> après une incubation à 40 °C pendant 72 h.

-*Leuconostoc*: Gélose de Mayeux.

Ensemencement : masse/surface





**En plus**

## COLIMÉTRIE

La colimétrie correspond aux méthodes de dénombrement des coliformes. Les techniques de colimétrie ont pour objectif le dénombrement et, éventuellement, l'identification des coliformes totaux, des coliformes thermotolérants (ou coliformes fécaux) ou d'*Escherichia coli* en particulier. L'intérêt de ces manipulations est de déterminer pour le produit testé une contamination fécale et d'en apprécier l'ampleur, car les coliformes sont des bactéries vivant principalement dans les intestins.

De plus, les coliformes thermotolérants et *Escherichia coli* survivant difficilement hors de l'intestin traduiront donc une contamination fécale récente.

- **Témoins de contamination fécale**

- **Coliformes totaux**

Un coliforme est une entérobactérie fermentant le lactose à 30 ou 37 °C avec production de gaz.

- **Coliformes thermotolérants**

Un coliforme thermotolérant est une entérobactérie fermentant le lactose à 44 °C avec production de gaz.

- ***Escherichia coli***

*Escherichia coli* est une entérobactérie fermentant le lactose à 44 °C avec production de gaz et produisant de l'indole à 44 °C.

- **Principe de base des techniques de dénombrement**

Tous les milieux utilisés contiennent du lactose. Les milieux liquides possèdent une cloche afin de mettre en évidence la production de gaz. Un certain nombre de milieux utilisent des agents sélectifs, inhibiteurs des bactéries Gram + : vert brillant, cristal violet, désoxycholate,... Des milieux récents chromogènes permettent le dénombrement direct d'*Escherichia coli* par mise en évidence de l'activité  $\beta$ -glucuronidase.

- **Dénombrement des coliformes**

Le dénombrement des coliformes peut se faire, selon les produits, par des techniques en milieux liquides ou solides. La démonstration de la nature « coliforme » n'est jamais parfaite mais le principal est de suivre les normes permettant la standardisation des méthodes.

- **En milieu liquide**

- **Milieu utilisé : BLBVB + cloche (Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant)**

Ce milieu contient deux agents sélectifs : la bile (ou désoxycholate) et le vert brillant. Il contient des peptones et du lactose (caractère biochimique). Il n'y a pas d'indicateur de pH. La production de gaz se fait à partir de l'utilisation du lactose.

- **Ensemencement**

1 ml de chaque dilution est introduit dans un tube de BLBVB + cloche.

Homogénéiser l'inoculum afin qu'il se répartisse dans tout le tube, cloche comprise.

- **Incubation** 24 heures à 30°C.

- **Lecture**

- Si un tube par dilution**

La présence d'un trouble (culture) et la production de gaz dans la cloche (au moins 1/10 du volume de la cloche) permet de conclure à la présence d'au moins un coliforme dans le ml d'inoculum de la dilution testée. **Si 2 ou 3 tubes par dilution** on utilise la table de Mac Grady afin de déterminer statistiquement la quantité de coliformes présents dans un mL

- **En milieu solide**

- **Milieux utilisés : gélose au désoxycholate ou gélose VRBL**

Ces deux milieux contiennent du désoxycholate qui inhibe les bactéries Gram +, du lactose utilisé comme source de carbone et d'énergie et du rouge neutre (indicateur de pH permettant la lecture du caractère « lactose » : colonies rouges lactose +).

Le milieu VRBL est plus sélectif du fait de la présence de cristal violet en plus du désoxycholate.

#### **-Ensemencement-incubation**

Le dénombrement est réalisé dans la masse des milieux pré cités en double couche. Incubation 24 heures à 30/44°C.

#### **-Lecture**

Toutes les colonies rouges (lactose +) d'un diamètre minimum de 0,5 mm en 24 heures sont considérés comme étant des coliformes.

#### **• Dénombrement d'*Escherichia coli* : test de Mackenzie**

Le test de Mackenzie permet un dénombrement d'*Escherichia coli* après avoir dénombré les coliformes totaux en milieu liquide (BLBVB à 30 ou 37°C). Il utilise la propriété d'*Escherichia coli* de produire de l'indole à 44°C et de fermenter le lactose à 44°C.

#### **- Milieux utilisés**

- Un tube de BLBVB
- Un tube d'eau peptonée

#### **-Ensemencement**

Pour chaque tube positif où l'on soupçonne la présence de coliformes en BLBVB, on prélève une anse de culture que l'on reporte dans un BLBVB et dans une eau peptonée.

#### **-Incubation**

24 à 48 h à 44°C

#### **- Lecture**

Le résultat se rapportera au tube initial. Le tube BLBVB est positif s'il présente un trouble et que la cloche présente du gaz (au moins un 1/10 du volume de la cloche).

La lecture du caractère « indole » s'effectue après ajout du réactif de Kovacs : la présence d'un anneau rouge permet de conclure à « indole + ».

#### **• Isolement et identification des coliformes**

#### **- Isolement des coliformes**

#### **-Milieu utilisé : EMB (éosine – bleu de méthylène)**

Ce milieu ne contient pas d'agents sélectifs très puissants (éosine et bleu de méthylène ne font qu'inhiber partiellement la culture des Gram +) ni d'indicateur de pH.

#### **-Ensemencement**

Isoler classiquement à partir d'un tube de BLBVB positif ou à partir d'un bouillon contenant des coliformes présumés.

#### **- Incubation**

24 à 48 h à 37°C.

#### **-Lecture**

Genres bactériens probables	Aspect obtenu
<i>E. coli</i>	Colonies de 2 à 3 mm de diamètre, plates, violet très foncé, avec très souvent un reflet métallique
<i>Klebsiella</i>	Colonies grosses de 4 à 6 mm de diamètre, convexes, roses avec un centre violet, muqueuses
<i>Citrobacter</i>	Colonies violet pâle avec un centre et un reflet métallique peu marqué
Autres bacilles Gram –	Petites colonies grises.....

- **Identification**

Les principaux genres appartenant aux coliformes sont :

- *Escherichia*
- *Citrobacter*
- *Klebsiella*
- *Enterobacter*