

Tp N° 2 : Techniques de recherche et de dénombrement de flores**1. La numération des germes totaux** (ou flore totale ou germes aérobies mésophiles hétérotrophes neutrophiles).

Le dénombrement des germes totaux concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles revivifiables après 72h d'incubation à 30°C dans un milieu de culture bien défini ; il est en effet presque impossible de réaliser en un seul test le dénombrement de la flore totale réelle (composition du milieu, température d'incubation, atmosphère etc...).

Ce dénombrement effectué dans l'analyse type d'un aliment constitue un indicateur de la qualité sanitaire et reflète l'**HISTOIRE** du produit naturel. La plupart des aliments d'origine animale ou végétale non soumis à des traitements de conservation sont normalement porteurs de certains germes. Il est ainsi possible de prédire les types microbiens que l'on a le plus de chance de rencontrer tout au long de leur histoire. Ce nombre de germes totaux pourra représenter l'état de fraîcheur ou l'état de décomposition du produit. Sur le produit manipulé ou soumis à divers traitements technologiques, le dénombrement des germes totaux permettra de juger de la qualité des opérations de production, transport, entreposage etc.

Il est très important de savoir qu'un nombre peu élevé de germes peut ne pas correspondre à un produit sain (présence de germes pathogènes, présence de toxines actives dans des conditions pour lesquelles les cellules qui les ont produites n'ont pas survécu) ; par ailleurs un nombre très élevé de germes totaux peut correspondre à un produit sain (lait fermenté, choucroute, etc...). Ce dénombrement est généralement réalisé en milieu solide.

1.1. Méthodologie

1ml de la suspension mère et de ses dilutions est ensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération (15ml de milieu en surfusion à 45-47°C, 12ml suffisent pour le lait). Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes entre la préparation de la suspension mère et ses dilutions et le moment où la gélose est coulée.

Il est également recommandé de couler à la surface du milieu ensemencé (après solidification) une mince couche de gélose blanche ou gélose non nutritive (4ml de gélose à 1,5%).

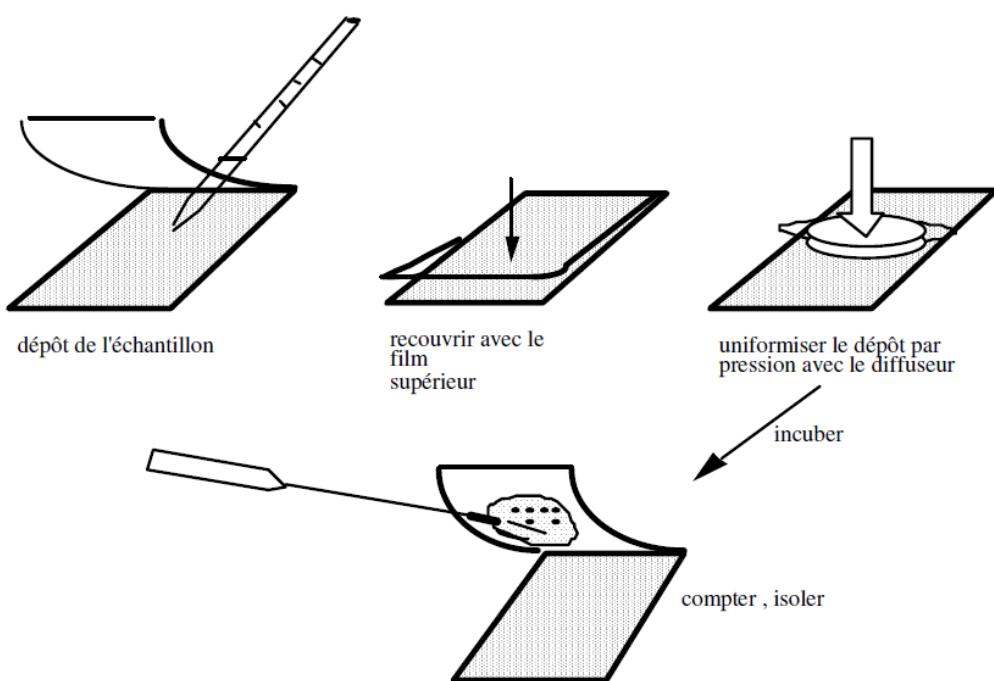
1.2. Milieux préconisés : gélose pour dénombrement ou PCA (plate count agar)

Cette numération peut être réalisée par la méthode de filtration (pour l'eau en particulier). Dans ce cas le filtre au travers duquel est passé un volume donné d'échantillon ou de sa dilution est déposé sur le milieu de culture préalablement coulé dans la boîte de Pétri, surface porteuse des germes vers le haut et les colonies formées sont comptées après 48 à 72heures d'incubation à 30°C (boîte retournée pour éviter les phénomènes de condensation).

➤ Dénombrement de la flore totale aérobie au moyen du Pétrifilm

Il s'agit d'un système de culture / numération à "usage unique" qui peut être utilisé dans le cas d'analyses microbiologiques peu nombreuses.

Le Pétrifilm SM contient les éléments nutritifs du PCA, ainsi qu'un agent gélifiant soluble dans l'eau froide. Pour réaliser la numération, il faut déposer le film sur une surface plate et dans une zone stérile, soulever le film supérieur et déposer lentement 1ml de l'échantillon ou de ses dilutions au centre du film inférieur. Celui-ci est alors recouvert délicatement avec le film supérieur en évitant l'introduction de bulles d'air. La répartition homogène de l'inoculum est obtenue au moyen d'un applicateur avec lequel on exerce une légère pression sur le diffuseur. Le film est alors incubé horizontalement, le film supérieur vers le haut (il est possible d'empiler une vingtaine d'unités). Après 48 à 72h d'incubation à 30°C, le comptage des colonies est effectué.



2. Recherche d'une contamination d'origine fécale

2.1. La colimétrie

Les **coliformes** sont des entérobactéries (bacilles gram -, asporulés, glucose+ (F), oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz à 30°C. Il s'agit d'un groupe disparate non défini sur le plan taxonomique qui comprend les genres *Escherichia* (avec les espèces *coli*, *intermedium*, *freudii*), *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*.

Les **coliformes fécaux**, donc d'origine intestinale, sont des coliformes qui fermentent le lactose avec production de gaz à 44°C (Tests de MAC CONKEY ou d'EIJKMAN). On les assimile souvent aux **coliformes thermotolérants**.

Escherichia coli dont il existe de nombreux sérotypes, certains étant entéropathogènes, est identifiable dans le groupe des coliformes fécaux par le test de MACKENZIE (production d'indole à 44°C).

Le dénombrement des **coliformes “totaux”** est encore considéré comme un indice de contamination fécale. Or s'il s'avère que leur présence dans l'eau constitue un bon indice de contamination fécale récente, leur survie étant de courte durée dans ce milieu, il n'en est pas de même dans de nombreux aliments. Ainsi des coliformes ont été retrouvés dans d'autres sources que les matières fécales.

Le dénombrement des **coliformes fécaux (ou thermotolérants)** considérés comme des germes indicateurs de la qualité hygiénique de l'aliment, constitue par contre un bon indice de contamination à partir des matières fécales de l'homme et des animaux. Ces bactéries sont souvent associées à des entérobactéries pathogènes comme les *Salmonella* et les *Shigella*. Ces coliformes représentent environ 1% de la flore intestinale et ne provoquent généralement pas de maladie chez l'homme adulte ; leur nombre est voisin de 10^8 par g de matière fécale. La croissance de certains de ces germes est possible sur un très grand nombre de milieux ou d'aliments entre -2 et 50°C, entre pH 4,4 et 9.

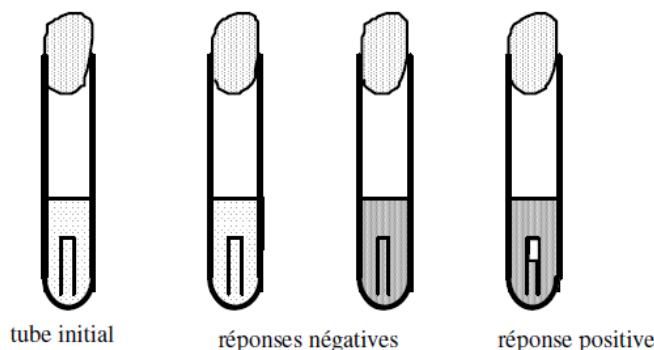
- ✓ **Colimétrie**, c'est à dire la numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide, soit en milieu solide (par ensemencement dans la gélose ou après filtration).

a. Dénombrement en milieu liquide

La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1ml de l'aliment (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon lactosé bilé au vert brillant (BLBVB). Les essais sont effectués en double ou en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady.

- Milieu BLBVB (utilisé pour la plupart des produits alimentaires)

Après ensemencement, les milieux sont incubés à 30°C pendant 24h puis 48h. Sont considérés comme positifs les tubes dans lesquels il y a croissance et une production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).



La numération des coliformes fécaux (ou *E. coli* présomptifs) est effectuée avec le même milieu mais après 48heures d'incubation à 44,5°C.

➤ **Test de Mac KENZIE :** une ose d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée ; si après incubation à 44°C pendant 48h il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d'*E. coli*.

- Milieu BCP : bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (colimétrie de l'eau).

b. Dénombrement en milieu solide

La numération des coliformes peut être effectuée par ensemencement de 1ml de produit (ou de la suspension mère) et de ses dilutions dans 15ml de milieu gélosé bilié au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) en milieu gélosé désoxycholate - citrate - lactose (DCL).

c. Colimétrie par filtration

Il est possible de réaliser la colimétrie par la méthode de numération après filtration. Il est ainsi possible de réaliser la numération des coliformes ou des coliformes fécaux. Les milieux les plus souvent utilisés sont : la gélose lactosée au TTC et au tergitol ou le milieu d'ENDO ou autre.

d. Colimétrie par le système Pétrifilm VRB

Le milieu inférieur contient un gélifiant à froid associé à un milieu bilié au cristal violet et au rouge neutre. Le film supérieur sert de support à un agent gélifiant à froid et à du chlorure de triphényltétrazolium. La fermentation du lactose par les coliformes s'accompagne de production de gaz. Celui-ci piégé par le film supérieur s'accumule autour des colonies de coliformes qui sont colorées en rouge. La numération des coliformes totaux et celle des coliformes fécaux est réalisable par incubation respective à 37 et 44°C.

2.2. Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield

Les streptocoques du groupe D ou 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...) et de ce fait leur présence dans un aliment n'indiquera pas forcément une contamination d'origine fécale.

Parmi les streptocoques du groupe D on rencontre les espèces suivantes : *Streptococcus faecalis*, *S. faecalis* variété *liquefaciens*, *S. faecalis* var. *zymogenes*, *S. faecium* et *S. durans*.

Certains auteurs ont proposé d'inclure les espèces *S. bovis*, *S. equinus* et *S. mitus* dans le groupe des streptocoques fécaux.

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, à la salaison, à la dessiccation et à un séjour dans l'eau. De ce fait ces bactéries peuvent se multiplier dans un grand nombre d'aliments (produits acides, salés, réfrigérés etc..) qu'elles peuvent ainsi altérer.

Les streptocoques fécaux sont moins souvent associés aux germes pathogènes que les coliformes fécaux. Leur croissance est faible sur les milieux de culture (colonies de petit diamètre) ; elle est possible entre 0 et 50°C, entre pH 5 et 9,6, en présence de bile (40%) et de chlorure de sodium (6,5%). Ces germes sont micro-aérophiles.

Le groupe des streptocoques D ne renferme pas d'espèce considérée pathogène au point de vue alimentaire. Cependant, après prolifération abondante dans l'aliment, ces germes peuvent être à l'origine de tox infections bénignes qui sont toutefois exceptionnelles.

Remarque : le rapport coliformes fécaux / streptocoques fécaux est en général supérieur à 1 si la contamination est d'origine humaine, et inférieur à 1 si elle est d'origine animale.

a. Numération en milieu liquide : Cette numération se fait en deux étapes :

1) test présomptif

Ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de ROTHE (surtout pour l'analyse de l'eau). Ce milieu contient de l'azide de sodium (NaN_3) qui inhibe la plupart des microorganismes (inhibiteur des phénomènes respiratoires). Ce milieu est peu favorable à la croissance des Streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries n'y cultivent pas. Le milieu de ROTHE est cependant moins sélectif que le milieu de LITZKY, ce qui le fait utiliser d'abord, les germes "adaptés" à l'effet inhibiteur de l'azide étant ensuite à même de s'adapter à la présence d'éthyl violet.

1ml de la suspension mère (et de ses dilutions) est ensemencé dans 10ml de milieu. Après 24h (ou 48h) d'incubation à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

b. Numération en milieu solide

Cette méthode n'est utilisable qu'en présence d'un grand nombre de streptocoques fécaux.

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

L'isolement se fait sur :

- Milieu de BARNES INGRAM ;
- Milieu D – CoccoSel.

3. Recherche et numération des anaérobies sulfito-réducteurs (*Clostridium* surtout)

Ces 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 (**bactéries telluriques**) et dans les matières organiques en cours de putréfaction. Ces germes sont très résistants en raison de leur caractère sporulé.

Ils sont souvent, quelques fois avec d'autres germes sporulés, les seuls survivants d'une contamination ancienne de l'aliment. Parmi les *Clostridium* sulfito-réducteurs, *C. perfringens* occupe une place très importante : en effet, ce germe est très souvent à l'origine de toxi-infections d'origine alimentaire.

Il est possible de réaliser une numération sélective des spores ou des formes végétatives (les spores résistent bien à un traitement thermique de 5 à 10 minutes à 80 ou 85°C).

La présence de ces germes dans un aliment reflète, quand ils ne sont pas associés ni aux coliformes ni aux streptocoques fécaux, une contamination d'origine organique, plus rarement tellurique.

Les **aliments cuits** constituent d'excellents milieux pour ces germes car la teneur en oxygène est faible et leur survie sous forme sporulée est sélective après élimination des autres germes présents sous leur forme végétative.

3.1. Dénombrement des spores et des formes végétatives

Ce dénombrement est réalisé en anaérobiose (en tube ou dans une jarre) et repose sur l'appréciation de la réduction du sulfite en H₂S dont la mise en évidence est obtenue par addition au milieu de sels de fer. La réaction est la suivante :



- **milieu viande-foie sulfité (VF).**
- **milieu de WILSON-BLAIR.**

❖ Ensemencement

0,1ml (ou 1ml) de milieu ou de ses dilutions est introduit dans le tube en surfusion à 45°C. Le tube est alors vissé et le mélange effectué par retournement lent. Il faut éviter d'oxygéner le milieu au cours de cette phase. Dès qu'un tube est ensemencé, il faut le refroidir par immersion dans l'eau froide. Les tubes sont alors incubés à 37°C pendant 18 à 24 heures.

❖ Lecture

Les colonies des bactéries sulfito-réductrices sont très nettement noires ; leur taille varie selon l'espèce. *Clostridium perfringens* produit des colonies de grande taille en houpe noire de 3 à 5mm de diamètre.

3.2. Numération des spores

La suspension mère à analyser est chauffée à 80°C pendant 5 ou 10 minutes au bain marie. Il y a, dans ces conditions, destruction des formes végétatives. Les techniques déjà décrites sont alors applicables à cette suspension (dilutions puis ensemencement) et permettent le dénombrement sélectif des spores des bactéries anaérobies sulfito-réductrices.

3.3. Recherche et dénombrement de *Clostridium perfringens*

Il s'agit d'un bacille Gram+, sporulé, anaérobiose strict. Le bacille ($4\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$) se présente isolé, par paires ou en courtes chaînettes. Il est immobile et capsulé.

Le germe possède un pouvoir réducteur élevé (réduction rapide du sulfite en H_2S). La résistance de sa spore est très grande dans le sol, l'eau, l'eau de mer, l'air, les viandes, les légumes, les semi-conserves etc. La sporulation intervient peu dans les milieux de culture utilisés pour leur numération ou dans les aliments. C'est un germe que l'on rencontre fréquemment dans les produits cuits puis refroidis lentement.

Parmi les milieux de numération, le milieu TSN et le milieu TSC sont les plus utilisés. Ces milieux sont rendus sélectifs par l'addition d'antibiotiques tels que la néomycine, la polymyxine B ou la D cyclosérine.

3.3.1. Milieux de numération

a. Milieu trypticase - sulfite - néomycine (TSN)

Ce milieu incubé à 46°C est le milieu qui donne les meilleurs résultats qualitatifs et quantitatifs pour la numération ou l'isolement de *Clostridium perfringens*. Ce germe donne des colonies entourées d'une auréole noire caractéristique.

b. Milieu tryptose - sulfite - cyclosérine (TSC)

Ce milieu est utilisé pour la numération des ASR et de *Clostridium perfringens* (également par filtration).

c. Milieu de WILLIS

Ce milieu permet d'isoler et de compter les *Clostridium* Lactose+ et Lactose- et de détecter leur lécithinase.

d. Tests de confirmation

A partir d'une colonie prélevée sur TSN ou TSC ou Willis, procéder à des repiquages sur les milieux viande-levure, gélatine-lactose et nitrate mobilité.

4. Recherche et numération de *Staphylococcus aureus*

Tous les staphylocoques présents dans les aliments ne sont pas entérotoxinogènes. Ce n'est que depuis peu que l'on admet le rôle de *S. aureus* comme germe indicateur de contamination humaine (ou animale ou originelle) dans les aliments (aliments crus en particulier). Cette notion permet donc d'accepter des staphylocoques en petit nombre dans les aliments.

Ces germes sont naturellement présents sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux avec des charges qui peuvent largement dépasser les 100 000 germes par cm^2 .

Dans les aliments le risque d'entérotoxicose devient grand quand leur nombre atteint ou dépasse les 10 000/g.

4.1. Enrichissement

La recherche des staphylocoques coagulase + nécessite parfois un enrichissement préalable sur des milieux liquides tels que le milieu de ZEBOVITZ.

Le milieu de CHAPMAN liquide peut aussi être utilisé pour l'enrichissement des staphylocoques.

4.2. Numération sur milieux solides

Cette numération sur milieu n'est possible que si le nombre de staphylocoques dans le produit est supérieur à 10/g ou ml.

4.2.1. Numération sur milieu de CHAPMAN

Ce milieu n'est sélectif que des germes aérobies halophiles. Ainsi de nombreuses espèces de *Bacillus* peuvent y cultiver.

Le milieu, réparti à raison de 18ml par boîte de Pétri, est ensemencé en surface par 0,1ml du produit ou des dilutions. La boîte est incubée 24h à 37°C. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré ; elles sont entourées d'un halo jaune correspondant à une acidification à partir du mannitol (mannitol +).

4.2.2. Numération sur milieu de Baird Parker

Ensemencer en surface à partir de 0,1ml de suspension mère ou de ses dilutions et incuber 24h à 37°C.

S. aureus donne des colonies noires, brillantes, convexes, de 1,5mm de diamètre, entourées d'un halo clair (protéolyse) de 2 à 5mm de diamètre. Des zones opaques peuvent apparaître plus tardivement dans le halo clair ; elles sont dues à l'activité lipolytique et lécithinolytique du germe.

4.3. Numération en milieu liquide

Cette méthode est à utiliser si le nombre supposé de germes est inférieur à 10 par g ou ml d'aliment.

✓ milieu trypticase - soja

Ensemencer avec 1ml (ou 10ml) de suspension mère ou de ses dilutions (essais en double ou en triple, méthode de Mac Grady). Incuber 48h à 37°C. Transférer une ose de chaque tube positif sur milieu de Baird Parker. Incuber les boîtes 30h à 37°C. Identifier la présence de colonies de staphylocoques. Réaliser la numération par la méthode du NPP.

4.4. Identification

Le germe est un coque Gram +, groupé en amas (mosaïque à partir de milieux solides), **catalase positive**, glucose + (F), halophile. Son identification repose surtout sur la recherche de l'activité coagulase et ADNase (thermonucléase) et sur la recherche de protéines à activités particulières.

4.4.1. Recherche de l'activité coagulase

Parmi les coques Gram+, catalase+, seuls les *Staphylococcus aureus* possèdent un plasma coagulase (coagulation de plasma oxalaté de lapin en moins de 24h). La production de coagulase permet de différencier *S. aureus* de *S. epidermidis* et des *Micrococcus*.

On ensemence d'abord un bouillon cœur-cervelle dans lequel le staphylocoque excrètera la coagulase. Après 24h d'incubation à 37°C, 0,5ml de milieu est mélangé à 0,5ml de plasma de lapin oxalaté. Le mélange est incubé à 37°C et observé toutes les 30minutes. La prise en masse du plasma est généralement totale au point que le tube peut être renversé.

4.4.2. Recherche de l'activité ADNase

La gélose à l'ADN est ensemencée par strie unique. Incuber 24heures à 37°C.

Inonder la surface de la gélose avec une solution d'acide chlorhydrique N, ou avec une solution à 0,1 % de bleu de toluidine. Après 5minutes on observe dans les cas d'une réaction positive :

- avec l'acide chlorhydrique une zone claire autour de la strie (placer la boîte sur fond noir)
- avec le bleu de toluidine une zone rose autour de la strie, le reste de la boîte étant bleu.

La thermonucléase est recherchée par cette méthode après traitement de l'inoculum à 100°C pendant 15minutes et dépôt de 5 à 10µl d'inoculum dans des puits creusés à l'emporte-pièce.

Après 4h d'incubation à 37°C, la gélose ADN préalablement additionnée de 3ml de bleu de toluidine 0,1M par litre devient rose autour des puits contenant la thermonucléase.

Les souches de *Staphylococcus* pathogènes coagulent en général le plasma de lapin et les staphylocoques coagulase négative ne produisent qu'exceptionnellement des entérotoxines.

La présence d'une ADNase thermostable semble être en bonne corrélation avec le pouvoir entérotoxinogène des germes.

4.4.3. Staphyslide-test

Principe : *S. aureus* possède un récepteur protéique pour un fragment du fibrinogène.

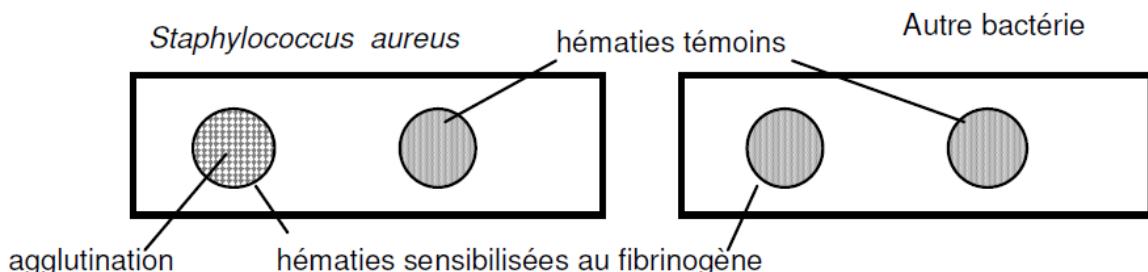
Ce récepteur est présent sur 96% des souches humaines et sur la plupart des autres biotypes.

Dans ce test, des hématies de moutons sensibilisées par du fibrinogène sont agglutinées en présence d'une souche de *S. aureus* porteuse du récepteur.

Réalisation : sur une lame déposer une goutte d'hématies témoins (-) et une goutte d'hématies sensibilisées (+) sur une lame. Dans ces gouttes, disperser 1 à 2 colonies à l'aide de l'anse ou d'une pipette Pasteur boutonnée ; donner à la lame un léger mouvement de rotation.

Lire la réponse après 15 secondes. Une réponse positive correspond à une agglutination massive avec les hématies sensibilisées. Cette réponse est obtenue avec 99% des *S. aureus*.

Une réponse négative est observée avec *Micrococcus* et les autres *Staphylococcus*.



4.4.4. Recherche de la protéine A

Principe : La protéine A est un antigène spécifique de quelques biotypes de *S. aureus*, porté par 90% des souches d'origine humaine. Cette protéine A peut fixer un fragment Fc des immunoglobulines de lapin ou de l'homme. Des hématies de mouton sensibilisées par du sérum de lapin anti-hématies de mouton sont agglutinées en présence de *Staphylococcus* porteurs de protéine A. La méthode permet de détecter 90% de *S. aureus* porteurs de protéine A ce qui permet un screening rapide.

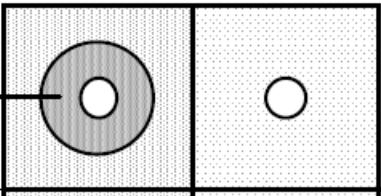
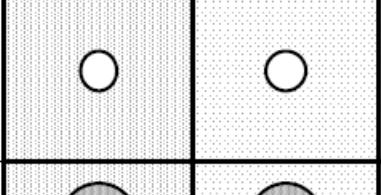
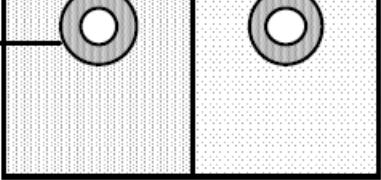
Réalisation : Le test est réalisé à partir du milieu GNO ou ADNase (pas Chapman ni gélose au sang). Sur une lame déposer une goutte de suspension d'hématies témoins et une goutte d'hématies sensibilisées ; ajouter une colonie en agitant pour obtenir une suspension.

Agiter la lame par rotation. Observer en lumière rasante : la réponse + correspond à une agglutination en moins de 2 minutes

4.4.5. Détection immunologique de la DNase thermostable : test d'inhibition en gélose.

✓ **Principe :** *S. aureus* possède une nucléase thermostable d'une grande spécificité antigénique. Le test consiste à comparer l'activité ADNasique d'une culture bactérienne sur une plaque gélosée contenant ou non un anticorps antinucléase, l'antisérum étant en quantité suffisante pour inhiber cette activité. En présence de bleu de toluidine et d'ADN dans la gélose, une activité nucléasique provoque la formation d'un halo rose.

✓ **Réalisation :** Sur une plaque gélosée contenant de l'ADN et du bleu de toluidine et de l'antisérum sur sa moitié, introduire 7µl de la culture à tester dans les puits. Incuber à 37°C pendant 2h.

partie sans antisérum (fond bleu violet)	partie avec antisérum (fond bleu clair)	
halo rose de diamètre $> 4 \text{ mm}$		<i>Staphylococcus aureus</i>
		<i>Staphylococcus aureus</i> ou autre espèce ne produisant pas de nucléase
halos roses		<i>Staphylococcus non aureus</i> ou autre espèce produisant une nucléase de spécificité antigénique différente

5. Recherche de *Salmonella* (et de *Shigella*)

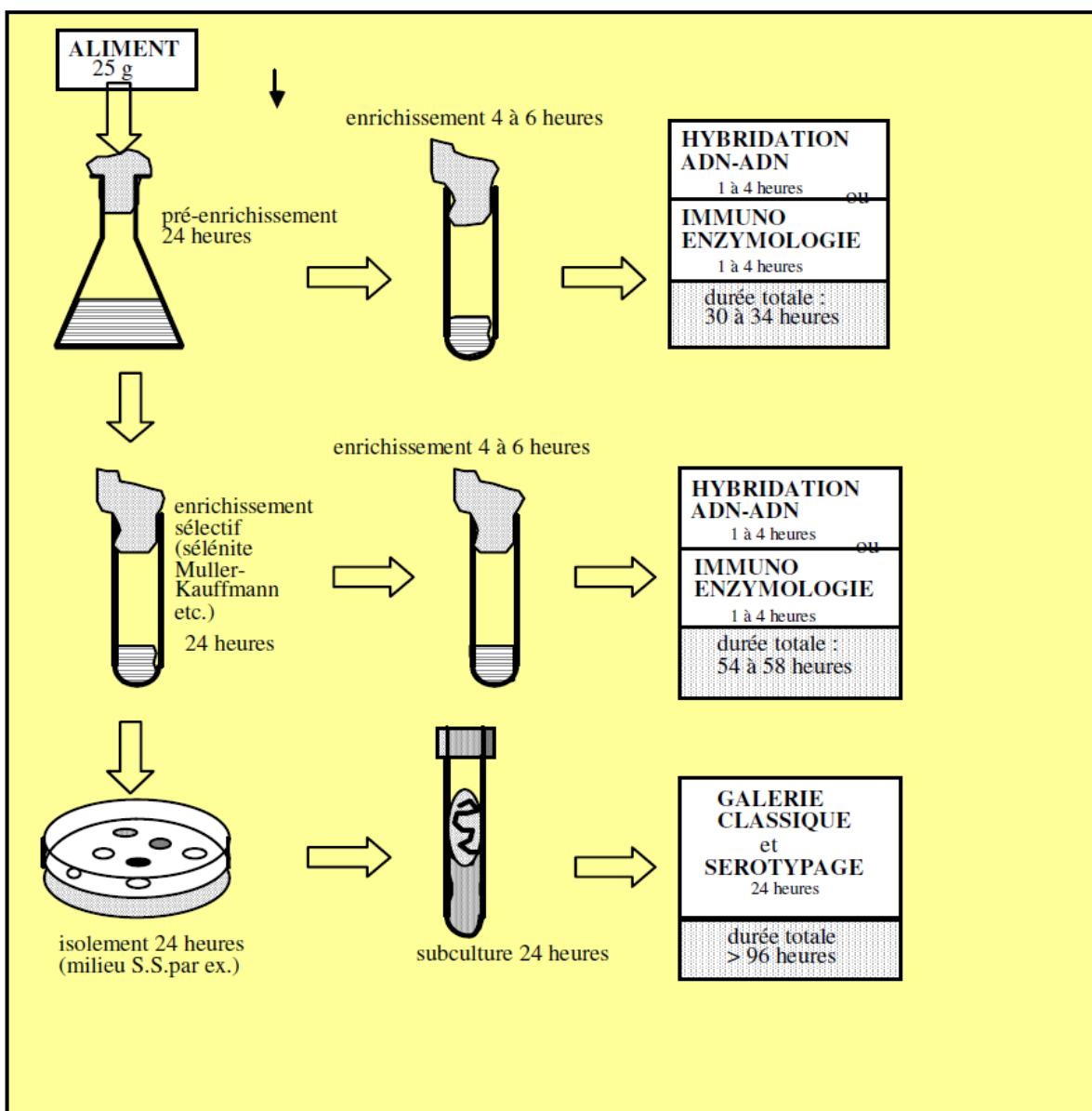
La mise en évidence des *Salmonella* par la méthode “traditionnelle” nécessite plusieurs phases :

- un pré-enrichissement (revivification) qui est facultatif pour les produits non soumis à certains types de traitements technologiques susceptibles de “stresser” les bactéries :
- un enrichissement sélectif (obligatoire) ;
- un isolement sélectif ;
- une identification biochimique ;
- un sérotypage.

5.1. Pré-enrichissement

Milieu eau peptonée tamponnée

25g d'aliment sont broyés dans 225ml de milieu pendant 2minutes. L'incubation est réalisée pendant 16h au moins et 24h au plus à 37°C.



5.2. Enrichissement

Plusieurs milieux d'enrichissement sont utilisables :

- milieu de MULLER KAUFFMANN au tétrathionate ;
- bouillon au sélénite et à la cystine (milieu mieux adapté au contrôle des aliments).

5.3. Isolement

A partir d'une ose ou d'une goutte d'un des milieux d'enrichissement on réalise un isolement sur milieu SS ou milieu gélosé sulfite bismuth ou sur **gélose au vert brillant et au rouge de phénol** ou sur DCL selon HYNES.

5.4. Identification biochimique

La reconnaissance des colonies ne permet pas d'identifier *Salmonella* mais donne une bonne présomption (leur aspect peut varier en fonction des souches isolées, mais aussi en fonction du mode de préparation des milieux).

La recherche du biotype se fait par la méthode classique (Kligler, urée-indole, LDC, β -galactosidase, Clark et Lubs, citrate) ou par un minisystème de type API.

5.5. Sérotypage

Sa réalisation au laboratoire n'est généralement pas nécessaire. En effet, cette détermination requiert des anti-sérum dont la durée de vie est limitée et de coût élevée. Par ailleurs le fait de connaître ce sérotype ne changera en rien les démarches à réaliser par rapport au produit ou au milieu dans lequel cette bactérie a été détectée.

6. Recherche de *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes est un petit bacille Gram + à bouts arrondis de 0,5 à 2 μ m de longueur sur 0,4 à 0,5 μ m de diamètre pouvant s'associer en palissade. Asporulé, parfois coccobacillaire, oxydase -, catalase +, cette bactérie est aéro-anaérobie 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. Le genre *Listeria* fait partie des *Lactobacillaceae*. Sept espèces sont décrites dans le genre (*L. ivanovii*, *L. innocua*, *L. seeligeri*, *L. welshimeri*, *L. gravi* et *L. murrayi* et *L. monocytogenes*).

Chez l'homme, ce germe opportuniste qui n'est virulent que si les défenses naturelles de l'organisme deviennent déficientes peut provoquer une méningo-encéphalite, une septicémie, l'avortement de la femme enceinte avec mortalité ou la naissance d'enfants infectés. Les malades sont le plus souvent des personnes âgées, des enfants de moins de 15ans, des adultes immunodéprimés (malades hépatiques, diabétiques, cancéreux, sidaïques). En pathologie humaine le sérotype le plus souvent rencontré est le 4b. L'hémolysine est la toxine majeure.

La contamination directe par contact avec des animaux ou des hommes malades est rare. Ce n'est qu'en 1985 que la relation entre la listériose et la consommation de fromage a été indiscutablement établie.

La relation plante-sol, comme pour la plupart des autres germes de la famille des *Lactobacillaceae* permet la constitution d'un réservoir (source primaire). Le germe se rencontre dans les produits laitiers non pasteurisés ou recontaminés. Le changement des habitudes alimentaires avec augmentation de la consommation de produits végétaux crus, réfrigérés est aussi à l'origine de l'augmentation du nombre de cas de listérioses.

La recherche des *Listeria* s'effectue suivant la démarche suivante :

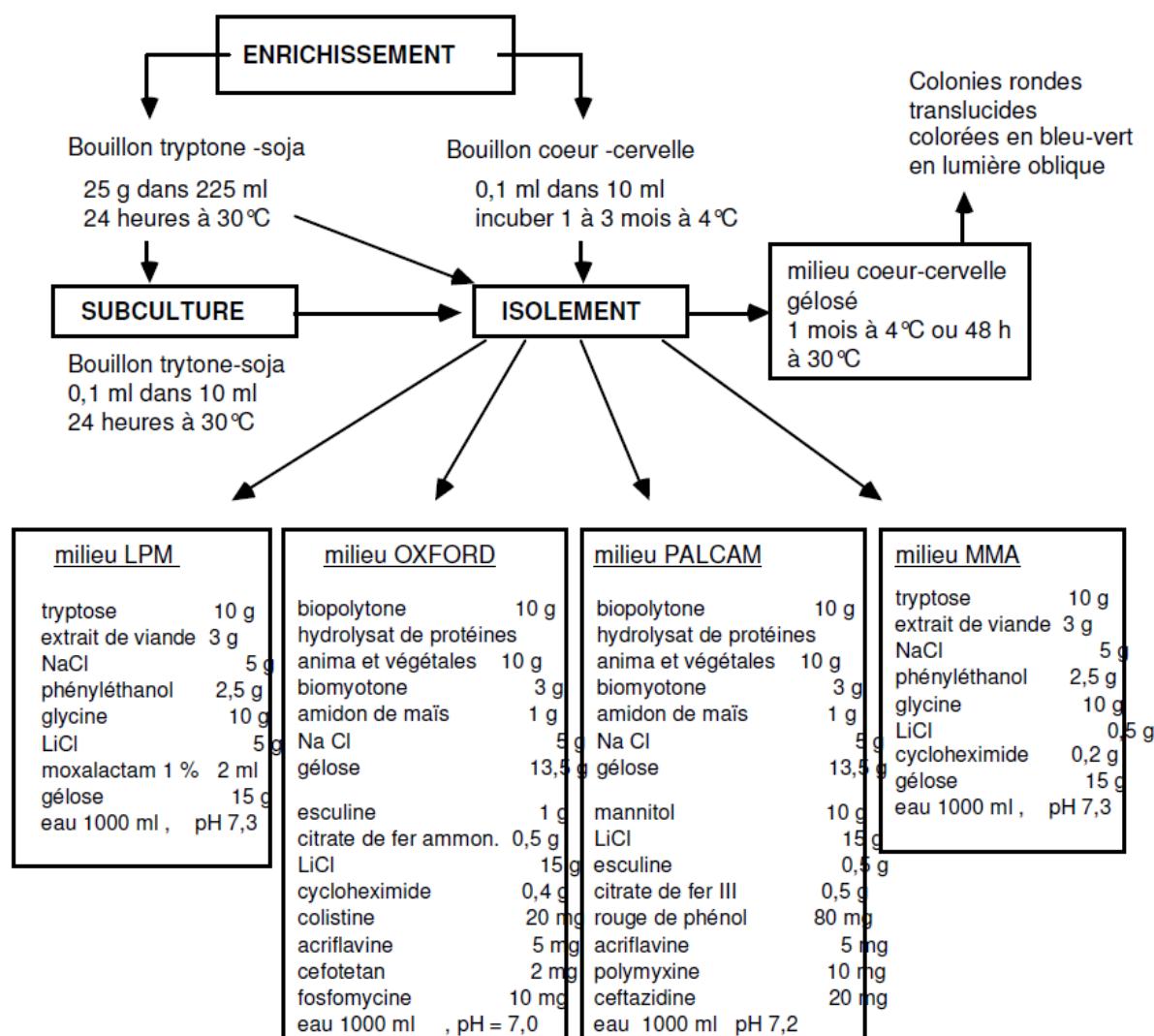


Tableau A . Les milieux d'isolements sont incubés à 35°C pendant 24 à 72 heures.

Sur les géloses MMA et LPM, la bactérie forme des colonies qui apparaissent bleutées par transi-lumination en lumière blanche incidente avec un angle de 45°C.

Un repiquage est alors réalisé sur milieu gélosé trypticase-soja (trypticase -soja – gélose BioMérieux) additionné de 0,6% d'extrait de levure (24 à 48heures à 30°C). L'identification est effectuée par la recherche de certains caractères morphologiques et biochimiques tels que :

- l'état frais (mobilité en pirouettes) ;
- catalase + ;
- coloration de Gram ;
- gélose au sang (gélose trypticase - soja - extrait de levure 0,6 % - sang de mouton défribriné 7%). *L. monocytogenes*: hémolyses avec petites zones claires; *L. ivanovii* zones claires nettes.

7. Recherche et numération de *Bacillus cereus* et de *Bacillus sp*

Bacillus cereus est un bacille Gram+ sporulé rencontré dans de nombreux aliments crus (en générale les aliments amylacés) ou traités et sur les végétaux. Cette bactérie peut par ailleurs se développer dans de nombreux aliments cuits et mal réfrigérés, les conserves de pommes de terre et de légumes, la viande hachée, les saucisses, les poudres de cacao, les potages etc... et y excréter une phospholipase C.

La choline phosphorylée résultant de l'action de la phospholipase est à l'origine, après consommation de l'aliment dans lequel elle a été formée, des signes cliniques de la toxi-infection.

On peut alors supposer qu'il existe un grand nombre de bacilles dans l'aliment (plus de 10^6 UFC/g).

7.1. Numération sur milieu de Mossel

Extrait de viande	1g
Peptone	10g
Mannitol	10g
NaCl	10g
Rouge de phénol	25mg
Gélose	15g
Eau distillée	900ml

pH = 7,2. Autoclaver 15 minutes à 121°C.

Au milieu ramené à 45°C ajouter 100ml d'émulsion de jaune d'œuf à 20% et 10ml d'une solution de sulfate de polymyxine à 1mg/ml stérilisés par filtration.

Inoculer 0,1ml de la suspension mère et de ses dilutions sur la surface séchée du milieu. Incuber 48h à 32°C.

B. cereus donne des colonies rouges plates, rugueuses, sèches, avec un fond coloré en violet, entourées d'un halo de précipité blanchâtre dû à l'activité lécithinolytique. Il est possible de compter séparément les formes végétatives et les spores. Pour cela traiter la suspension mère à 80°C pendant 10minutes (contrôler la température dans un tube témoin).

B. cereus est mannitol- ; la teneur en mannitol du milieu permet de séparer la flore secondaire mannitol + (jaune). L'addition de polymyxine permet d'inhiber une partie de la flore secondaire. *B. cereus* synthétise une lécithinase : les produits d'hydrolyse insolubles formés à partir de lécithine s'accumulent en formant un précipité blanc

8. Numération des levures et moisissures

La contamination des aliments par les moisissures est actuellement considérée avec beaucoup d'attention en raison des mycotoxines que ces microorganismes sont capables de synthétiser.

Plus de 100 mycotoxines différentes ont été identifiées à ce jour et il est vraisemblable, qu'avec des méthodes d'analyse plus élaborées, d'autres le seront bientôt. Les moisissures sont très largement répandues dans la nature (air, sol...) et elles peuvent très facilement contaminer les aliments en cours de fabrication. Elles peuvent sporuler au cours d'opérations technologiques comme la déshydratation, l'acidification, la réfrigération, l'abaissement de l'activité de l'eau.

Leurs enzymes peuvent être à l'origine d'altérations diverses dans les aliments.

Les levures acidophiles, psychrotropes ou osmophiles peuvent induire des altérations profondes dans les aliments (structure, propriétés organoleptiques etc.). La plupart d'entre elles ne sont pas pathogènes.

Ces germes peuvent être dénombrés sur des milieux rendus sélectifs par acidification ou addition de substances antibactériennes (antibiotiques).

❖ Milieu gélosé à la pomme de terre (PDA)

Infusion de pommes de terre	200g
Glucose	20g
Gélose	15g
Eau distillée	1000ml

Autoclaver à 121°C pendant 15minutes. Ajuster le pH à 3,5 par addition d'acide tartrique à 10%. Ensemencer en surface par étalement à partir de 100µl de produit ou de ses dilutions. Incuber 3 à 5 jours à 20-25°C.

❖ Milieu gélosé glucosé à l'oxytétracycline (OGA)

Extrait de levure	5g
Glucose	20g
Gélose	16g
Eau distillée	1000ml
pH = 6,8. Autoclaver 10 minutes à 121°C.	

Après régénération ajouter au milieu, ramené à 50°C, 100ml d'une solution stérile d'oxytétracycline à 1mg/ml ou 100ml d'une solution stérile fraîchement préparée de gentamycine à 0,5%. Avec le milieu PDA l'ensemencement est réalisable dans la masse avec une prise d'essai de 1 ml. En général la numération est effectuée après étalement de 0,1 ml de suspension mère ou de ses dilutions à la surface du milieu.

Le nombre de levures et moisissures est évalué après 3 à 5 jours d'incubation à 20-25°C.