

Chapitre VI

I. Contrôle microbiologique de l'eau

I.1. Prélèvement des échantillons

- Les eaux doivent être prélevées dans des flacons en verre pyrex munis d'un large col et d'un bouchon en verre rodé ;
- L'analyse de l'eau doit être effectuée au moins 8 heures après prélèvement. En aucun cas l'analyse ne doit être effectuée lorsque ce délai dépasse 24 h ;
- Si la température extérieure est très élevée il peut être nécessaire de procéder à une réfrigération modérée de l'ensemble à l'aide de la glace ; la température optimale est dans ce cas de 4 à 6°C ;
- Les prélèvements sont placés au froid dès leur arrivée ou au laboratoire avant le début de l'analyse ou le contrôle.

I.2. Technique de prélèvement

Prélèvement dans une citerne, un réservoir, un puits

- **En l'absence d'une pompe**, le prélèvement est effectué au moyen d'un flacon lesté muni d'une chainette ou d'une corde graduée, ou au moyen d'un « flacon Miquel » ;
- Il faut prélever à au moins 30 cm au-dessous de la surface ;
- **En présence d'une pompe**, le bec de la pompe est stérilisé après au moins 5 mn de pompage. Le flacon est ensuite rempli après au moins 5 mn de refroidissement réalisé par un nouveau pompage.

Prélèvement à une vanne, un robinet, chez l'usager

- Les brises-jets ou tuyaux de caoutchouc doivent être supprimés ;
- L'orifice de sortie est flambé énergiquement après 5 min au moins de débit ;
- Le prélèvement est réalisé aseptiquement après refroidissement par l'eau 5 min.

Volume et fréquence des prélèvements

- a- Lorsqu'il s'agit d'une eau inconnue la multiplicité des analyses à effectuer peut exiger un prélèvement abondant (1 litre ou plus) ;
- b- Lorsqu'il s'agit d'une analyse de surveillance ou de routine, il suffit de 250 à 350 ml.

I.3. Schémas de contrôle microbiologique : analyse sanitaire complète pour une eau inconnue destinée à l'exploitation ou en cas d'épidémie

- Dénombrement des germes « totaux » sur gélose pour dénombrement avec 72 h d'incubation à 20°C ; même opération avec 24 h d'incubation à 37°C.
- Dénombrement des coliformes avec identification d'*Escherichia coli*, par méthodes en milieu liquide ;
- Dénombrement des Streptocoques fécaux par méthode en milieu liquide (Roth-Litzky) ;
- Dénombrement des *Clostridium* sulfitoréducteurs sur milieu solide sulfité (VF ou Wilson- Blair) ;
- La caractérisation de *Clostridium perfringens* est nécessaire ;
- Recherche des bactériophages fécaux (analyse recommandée) ;
- Recherche de germes pathogène (à l'origine d'épidémies), *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*.

Recherche des bactériophages fécaux

- Mélanger dans deux ballons 50 ml d'eau à analyser et 50 ml d'eau peptonée ;
- Après agitation, l'un reçoit 20 gouttes d'une culture fraîche en eau peptonée d'une souche d'*E.coli* et l'autre 20 gouttes d'une culture fraîche en eau peptonée d'une souche de *Shigella*. Ces souches doivent être sensibles aux bactériophages ;
- Après incubation 10 heures à 37°C pour multiplier les phages, 5 à 6 ml de chaque ballon sont prélevés dans un tube stérile et chauffés à 30 min à 56°C pour détruire les corps bactériens ;
- Réaliser en suite deux cultures en boites de Petri contenant de la gélose nutritive ordinaire par ensemencement massif à partir des cultures en eau peptonée, respectivement de *E.coli* et *Shigella* (deux ou trois gouttes de culture sont étalées à l'étaleur de verre ; la culture doit être confluente) ;
- Laisser sécher puis déposer à la surface en un point précis l'ose de la suspension chauffée ;
- Laisser sécher 20 à 30 min à l'obscurité et incuber à 37°C ;
- Après 12 à 24 heures d'incubation, observer la présence éventuelle de plage de « non culture » bactérienne aux endroits inoculés à l'ose. Le résultat est déclaré positif ou négatif pour 50 ml.

II. Contrôle microbiologiques du lait et produits laitiers

II.1. Prélèvement des échantillons

L'échantillonnage pour les contrôles de routine dans les laiteries peut s'effectuer systématiquement sur les bacs ou cuves de transport ou de stockage ou bien hasard sur les lots de bidons de chaque producteur. Les échantillons (10 ml) sont prélevés à la pipette dans les bidons choisis. Ils sont analysés séparément.

- ***Bidon***

Le prélèvement est effectué à l'aide d'une pipette de grande dimensions (contenance 100 ml, longueur au moins 60 cm).

- Flamber l'ouverture du bidon ;
- déboucher ;
- Homogénéisation à l'aide de la pipette (30 s);
- Plonger la pointe de la pipette à 3 ou 4 cm de profondeur dans le lait ;
- Aspirer et rejeter rapidement les premier pipetage ;
- Prélever ensuite 10 ml du lait par tube (25 ml par flacon stérile) ;
- Identifier l'échantillon.

- ***Citerne avec agitation mécanique***

- Réaliser une agitation pendant 15 à 30 min ;
- Appliquer la même technique cité pour le prélèvement de l'eau à partir d'un robinet ;
- Le prélèvement est réalisé dans des flacons ou ballons en pyrex de 125 à 150 ml de capacité.

- ***Citerne sans agitation***

- Appliquer la même procédure que celle d'un prélèvement d'une citerne munie d'une agitation mécanique, mais il faut réaliser une agitation avant chaque prélèvement ;
- Réaliser aux moins le prélèvement en 3 endroit différents.

- ***Lait en poudre***

- Ecartez la couche superficielle à l'aide d'un instrument stérile ;
- Prélever à la louche ou à l'aide d'une sonde stérile dans un endroit proche du centre (50

à 100 g) ;

- Placer l'échantillon dans un récipient stérile fermé hermétiquement contenant éventuellement de bille de verre ;
- Identifier l'échantillon.

II.2. Schémas de contrôle microbiologique

II.2.1. Contrôle de qualité du lait cru à la production

A partir des livraisons individuelles, les analyses et examens suivants peuvent être réalisées :

- Dénombrement de la flore totale ;
- Epreuve de la réductase par la méthode au bleu de méthylène ou à la rézazurine ;
- Dénombrement sur gélose glucosée au lait écrémé en boite de Petri à 30°C ;
- En cas de mammite, il est possible de rechercher les germes responsables qui sont le plus souvent des streptocoques hémolytique ;
- La recherche des bacilles acido-alcoolo-résistants et le test de *Brucella* peuvent être exceptionnellement réalisés ;
- Pour les laits destinés à l'industrie fromagère il peut être nécessaire d'effectuer la recherche des antibiotiques.

Des contrôles de qualité généralement sont effectués en milieu industriel sur le lait refroidi en vrac pour orienter son utilisation ; contrôler sa conservation ou rechercher la cause d'altération. Il s'agit des tests suivants :

- Epreuve de la réductase (au bleu de méthylène ou la rézasurine) ;
- Dénombrement de la flore totale par culture en boite de Petri à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-6}) ;
- Colimétrie sur milieu lactosé au vert brillant à 30-37°C (dilution jusqu'à 10^{-3} , parfois plus) ;
- Dénombrement des germes indogènes et putrides par culture sur eau peptonée à 37°C (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- Dénombrement de la flore psychrophile à 5°C (pour contrôler la conservation au froid) ;
- Dénombrement de la flore thermophile, de la flore thermorésistantes et des sporulés aérobies (dans le cas des laits destinés à la conservation après traitement thermique) ;
- Dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs, des levures et moisissures, de la flore lipolytique, des streptocoques fécaux, ou de flores diverses (en cas d'accidents de

conservation) ;

- Recherche des antibiotiques (en cas d'utilisation fromagère) ;

II.2.2. Contrôle du lait cru mis en vente en l'état

Les analyses à effectuer sont les suivantes :

- Epreuve de filtration ;
- Epreuve de la réductase (bleu de méthylène) ;
- Dénombrement de la flore totale par culture en boîte de Petri à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-6})
- Dénombrement des coliformes à 37°C avec caractérisation (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- Exceptionnellement recherche des germes pathogènes (staphylocoques entérotoxiques coagulase+, germes acido-alcool-o-résistants, *Brucella*), caractérisation de *Cl.perfringens* à partir des *Cl.sulfito-réducteurs* ;

II.2.3. Contrôle du lait pasteurisé

Le test principal consiste à déterminer l'efficacité du chauffage, essentiellement par l'épreuve de la phosphatase et de la peroxydase. En outre les épreuves suivantes sont nécessaires :

- Epreuves de filtration ;
- Dénombrement des germes « totaux » par culture à 30°C sur gélose glucosé au lait, écrémé (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- Colimétrie par culture à 37°C sur gélose au désoxycholate (dilution jusqu'à 10^{-2}) ;
- Eventuellement recherche des germes pathogènes.

Il est intéressant au niveau industriel de réaliser les études complémentaires suivantes :

- Dénombrement des bactéries thermorésistantes ;
- Dénombrement des sporulés aérobies ;
- Dénombrement des bactéries psychrophiles (en cas de conservation du lait traité au froid) et éventuellement de la flore indologène et putride. Ces études permettent la mise en évidence d'une insuffisance de la pasteurisation ou des contaminations survenant après elle.

III. Analyse du beurre et des matières grasses

III.1. Prélèvement et préparation des échantillons

III.1.1. Echantillonnage

L'échantillonnage pour la crème est identique à celui pratiqué pour le lait. Pour le beurre ou la margarine il est recommandé d'échantillonner 1% des pièces dans le cas d'un très grand nombre d'emballages.

III.1.2. Techniques de prélèvement

a) Beurre et margarine en vrac

Les échantillons doivent être d'au minimum 200g ; ils sont formés à l'aide de deux ou trois prélèvements effectués à la sonde.

Dans le cas de grands emballages la sonde est enfoncée obliquement, puis verticalement jusqu'au fond ; dans le cas de mottes elle l'est obliquement jusqu'au fond. La partie fractionnée est introduite dans un flacon stérile à l'aide d'un couteau stérile. La portion externe est conservée pour reboucher le trou de prélèvement.

b) Beurre ou margarine conditionnés

L'échantillon est constitué de un ou plusieurs emballages intacts.

c) Autre matières grasses

Le prélèvement est effectué selon le cas à la sonde, à la cuillère métallique ou à la pipette en respectant les précautions classiques.

III.1.3. Techniques de prélèvement

Pour les produits conservés au froid (beurre, margarine) les échantillons doivent être maintenus à + 5°C sauf s'ils sont constitués par un récipient étanche. Dans ce cas, ainsi que pour tous les autres produits, la conservation et le transport au laboratoire peuvent avoir lieu à température ambiante. Le contrôle bactériologique doit intervenir dans les 24 h.

III.1.4. Préparation des échantillons

a) Beurre et margarine

L'échantillon est fondu au bain-marie à 45°C puis homogénéisé par agitation manuelle. Une dilution au 1/10^e est préparée en pipetant 10 ml de produit fondu et en les transférant dans un flacon de 200 ml contenant 90 ml de solution de Ringer au 1/4 additionnée de 0,1% de gélose pour stabiliser l'émulsion. Le diluant et les pipettes doivent être à 45°C. Après homogénéisation d'autres dilutions peuvent être préparées.

Les inoculations sont réalisées dans les 10 min qui suivent.

b) Crème

L'échantillon de crème (5 g) est placé dans un récipient stérile avec 20 ml ou 45 ml de solution Ringer au 1/4 (dilution au 1/5^e ou 10⁻¹). L'ensemble est homogénéisé et sert à préparer les autres dilutions.

c) Autre produits

Leur analyse est rare. En cas de besoin on utilisera, en les adaptant, les techniques décrites pour le beurre et la margarine.

III.2. Schémas d'analyse

a) Crème

Dans le cas de crème fraîchement recueillie la qualité bactériologique générale sera déterminée par :

- test de réductase
- mesure rapide de l'activité acidifiante

Pour une analyse plus complète de la qualité bactériologique on effectuera pour l'aspect sanitaire :

- épreuve de la phosphatase pour la crème pasteurisé
- colimétrie sur milieu solide ou liquide avec caractérisation d'*E.coli* (dilution jusqu'à 10⁻³)
- recherche des germes pathogènes (*Salmonella* et

staphylocoques) Du point de vue de la qualité on effectuera également :

-
- dénombrement de la flore « totale » sur PCA, 3 jours à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-4})
 - dénombrement de la flore psychrophile sur PCA 10 jours à 5°C
 - dénombrement de la flore lipolytique sur gélose au bleu Victoria. 3 jours à 30°C et 10 jours à 5°C (dilutions jusqu'à 10^{-4}).

b) beurre et margarine

On effectuera pour une étude sanitaire les tests indiqués pour la crème, soit :

- épreuve de la phosphatase pour le beurre pasteurisé ;
- colimétrie sur milieu solide ou liquide avec caractérisation d'*E.coli* (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- recherche des germes pathogènes (*Salmonella*- *Shigella* et staphylocoques). Une étude microbiologique complète comportera en outre :
- dénombrement de la flore « totale » sur PCA à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-4}) ;
- dénombrement de la flore lipolytique sur gélose au bleu Victoria, 3 jours à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-4}) ;
- dénombrement de la flore caséolytique, 3 jours à 30°C (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- dénombrement des levures et moisissures sur OGA terramycine 3 jours à 25°C (dilutions jusqu'à 10^{-2}) ;
- dénombrement des indologènes (dilution jusqu'à 10^{-3}) ;
- dénombrement de la flore psychrophile sur PCA, 10 jours à 5°C (dilution jusqu'à 10^{-4}).

IV. Analyse de la viande et des produits carnes

IV.1. Prélèvements des échantillons destinés à l'analyse

IV.1.1. Echantillonnage

a) Viande crues à l'abattage

Le prélèvement en vue de l'examen microbiologique des viandes fraîches s'effectue après l'abattage dans des cas précis :

- Examen macroscopique douteux et présomption d'une maladie microbienne
- Affection de l'appareil digestif ou génital

- Abattage d'urgence.

Les échantillons prélevés sont obligatoirement un fragment de muscle, sauf si l'animal est trop petit et facultativement un os long et la rate (si l'on suspecte une septicémie ou une affection de l'appareil digestif), des ganglions lymphatiques, des articulations, des lambeaux de surface, un rein.

b) Viande crues à la distribution

Au niveau de la distribution, des échantillons de viande crue peuvent être prélevés pour contrôler leur qualité bactériologique, en particulier lorsqu'il s'agit de viande hachée ou conditionnée.

Le prélèvement d'une viande hachée est constituée de 100g de viande ou dans le cas de « steacks » constitués par deux unités.

c) Les produits carnés divers

Selon le cas le prélèvement st constitué par un sachet sous pellicule plastique ou tout autre emballage, une unité ou un fragment de produit sous boyau, un cube de 5cm de côté ou un tranche...

d) Œufs

L'échantillonnage pour analyse bactériologique des œufs entiers en coquille est exceptionnel : il s'effectue au hasard ou en cas de présomption d'altération microbienne. Dans le cas d'ovoproduits en vrac (œufs cassés entiers, jaunes, blanc) réfrigérés, congelés ou séchés, l'analyse est plus fréquente. Dans le cas d'une expertise officielle, l'échantillonnage portera sur 10% des récipients pour les lots de moins de 100 unités et sur la racine carrée du nombre de récipients pour les lots de plus de 100 unités.

IV.1.2. Technique de prélèvement

Des techniques particulières s'appliquent surtout aux prélèvements de viandes fraîches.

a) Prélèvement de viandes fraîches

- **Prélèvement au niveau d'un muscle Plusieurs méthodes sont utilisées :**

- Prélèvement d'un bloc de viande

Un cube de viande de 10cm de côté est prélevé dans une masse musculaire compacte et homogène à l'aide d'un couteau ou d'un scalpel et il est placé immédiatement dans un emballage individuel stérile (bocal ou sac plastique ligaturé).

- Technique au myectome

Contrairement à la technique précédente le myectome qui un trocard de gros calibre permet d'effectuer directement le prélèvement destiné à l'analyse et évite donc un prélèvement secondaire au laboratoire. Il faut dans ce cas assurer la cautérisation de la surface de la viande avant de prélever : cette cautérisation est réalisée à l'aide d'un tampon métallique que l'on chauffe au bec portatif et que l'on applique dans la zone du prélèvement.

Le myectome stérile est enfoncé perpendiculairement sur 10 cm, incliné de 45° à droite, enfoncé de 1 cm, incliné de 45° à gauche, enfoncé de 1 cm, puis retiré et remis dans son tube protecteur.

- Technique particulière du bloc paraffiné

Le cube de viande est plongé dans un bain de paraffine chaude pendant 3 à 5 min aussitôt après le prélèvement. Il est ensuite récupéré, refroidi sur une toile métallique et enveloppé dans un papier aluminium. Le paraffinage constitue une protection contre les contaminations, évite l'exsudation de la viande et permet de procéder à un enrichissement par étuvage dans de bonnes conditions.

• Prélèvement d'autres éléments

L'os long prélevé sera débarrassé des éléments musculaires et tendineux mais sans léser le périoste : il sera enveloppé dans un linge propre ou du papier aluminium.

Les autres échantillons (rein, rate, ganglions....) seront enveloppés de la même manière sans traitement préalable.

Des lambeaux de tissus musculaires ou conjonctifs de revêtement de la carcasse et de la paroi et de la paroi de la cavité intestinale peuvent être prélevés sans cautérisation ; à l'aide d'un ciseau flambés. Ils sont placés dans un bocal stérile. Les viandes hachées sont prélevées soit sous forme d'emballage individuel soit à la cuillère ou à la spatule stérile. Dans ce dernier cas 100g de viande sont placés dans un bocal stérile.

Chapitre VII

Tous les germes pathogènes qui peuvent être transmis par les aliments et les espèces de microorganismes capables d'altérer les aliments sont à considérer. Il en est de même des produits toxiques résultant de la présence des microorganismes (toxines, métabolites toxiques).

Parmi les germes importants en microbiologie alimentaire on peut citer les germes suivants :

I. La flore totale aérobie mésophile (FTAM)

Il s'agit de l'ensemble de micro-organismes capables de se multiplier en aérobiose à des températures optimales de croissances comprises entre + 20°C et + 45°C.

Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération variés.

Ainsi en microbiologie alimentaire on recherche et dénombre des microorganismes aptes à cultiver en 72 heures à 30°C.

II. Les entérobactéries

Quatre groupes bactériens de cette famille sont utilisés comme **germes indicateurs de contamination fécale** : les coliformes, les coliformes fécaux assimilés souvent aux coliformes thermotolérants, *Escherichia coli* et les "entérobactéries". Cependant, si les coliformes et *E. coli* sont des indicateurs valables de la pollution bactérienne des eaux, ils sont utilisés différemment pour les tests applicables aux aliments. La recherche de *E. coli* et des coliformes fécaux est réalisée pour surveiller la contamination d'origine fécale d'aliments n'ayant pas subi de traitements destinés à détruire les entérobactéries.

La recherche des coliformes est actuellement effectuée dans des aliments transformés (produits pasteurisés, etc). Elle permet de mettre en évidence l'insuffisance du processus ou de mauvaises conditions de fabrication (re-contamination par exemple). Pour leur recherche dans le lait la température d'incubation est abaissée à 30°C pour inclure davantage d'espèces d'origine non fécale.

L'acceptation du terme fécal peut être large et la recherche des coliformes peut constituer un indicateur de la présence de germes Gram négatif (les bactéries Gram positif et lactose négatif sont exclues). La recherche des entérobactéries dans laquelle ne sont

exclus que quelques bactéries Gram négatif mais tous les bacilles et coques Gram positif est souvent réalisée. Dans cette recherche le milieu contient du glucose (et non du lactose) et on dénombre ainsi certains germes lactose négatifs (*Salmonella*, *Shigella*) et certaines souches d'*E. coli* entéropathogènes qui ne sont pas retrouvées par colimétrie. Inversement cette épreuve permet de détecter des souches de *Salmonella* lactose positif qui échappent à la plupart des méthodes de recherche de *Salmonella*.

Pour le contrôle de la conformité aux normes, la numération de ces germes se fait en milieux solide (DCL) ou liquide (BLBVB et estimation du NPP). Trois séries de milieux sont utilisées pour les épreuves des coliformes, des coliformes fécaux et de *E. coli*. Parmi les milieux liquides, le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB) et le bouillon tryptose au lauryl sulfate sont les plus utilisés.

***Escherichia coli* enteropathogene**

Ce germe est bien connu comme étant l'agent de maladies transmissibles par les aliments. Il n'existe cependant pas de techniques et de tests de pathogénicité standardisés. Le sérotype O157 H7 provoque une colite hémorragique sévère.

Salmonella-Shigella

Les nombreuses espèces de Salmonelles diffèrent énormément entre elles quant à leur pouvoir pathogène. Bien que la plupart des espèces puissent se retrouver dans les aliments, les normes visent en général celles qui sont à l'origine de toxi-infections plutôt que celles qui sont à l'origine des maladies infectieuses graves (fièvres typhoïdes et paratyphoïdes).

La recherche des germes est complexe et il n'existe pas encore de technique standard rapide. Ainsi la nature du milieu de pré-enrichissement, celle du milieu d'enrichissement, la température d'incubation de ces milieux, la nature de la gélose sélective et les méthodes d'identification biochimique sont encore l'objet de nombreuses controverses.

De plus, certains plans d'échantillonnage requièrent l'examen d'une cinquantaine d'échantillons. Ces échantillons peuvent être mélangés et soumis au pré-enrichissement ou bien traités individuellement.

Parmi les nouvelles méthodes d'isolement et d'identification (non encore retenues) on peut citer : l'utilisation du phage général pour *Salmonella* (Felix 0-1), l'usage de sérum polyvalents pour les tests d'agglutination, la technique d'immunofluorescence ou immunoenzymatique et enfin les techniques par hybridation ADN-ADN déjà commercialisées sous forme de kits qui semblent très prometteuses.

Shigella sp sont souvent traités avec *Salmonella* en ce qui concerne les normes. Ces bactéries sont cependant plus souvent présentes que les *Salmonella* dans l'eau et les légumes frais exposés à une contamination fécale.

Yersinia enterocolytica

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.

III. Streptocoques (fecaux)

Les maladies provoquées par les streptocoques hémolytiques sont fréquemment transmises par les aliments, mais leur fréquence est faible. Ainsi les normes visant *Streptococcus pyogenes* sont rares.

IV. *Staphylococcus aureus* et l'enterotoxine staphylococcique

Ce germe Gram positif halophile est souvent isolé ou dénombré dans des milieux fortement salés (Chapman). Cependant les cellules "stressées" au cours des traitements technologiques ne sont pas récupérées quantitativement sur les milieux salés (liquides ou solides) ce qui a conduit à l'adoption d'autres milieux comme le milieu de BAIRD PARKER.

Les *Staphylococcus aureus* coagulase positive souvent recherchés ne sont pas forcément entérotoxinogènes; par contre ceux qui sont coagulase négative ne synthétisent souvent pas de toxine.

Le nombre de staphylocoques tolérés dans les aliments est généralement peu élevé, ce qui nécessite l'utilisation de milieux liquides (milieux de GIOLOTTI CANTONI ou bouillon de soja - trypticase - 10 % NaCl).

La recherche de l'entérotoxine devrait être effectuée dans des produits où la production de toxines est suivie de la mort des staphylocoques. On estime à l'heure actuelle qu'il faut au moins 5.10^5 Staphylocoques par g ou ml de produit pour engendrer une maladie. Pour déceler les entérotoxines on utilise les techniques de diffusion en milieu gélosé (sur lame); il faut dans une première étape concentrer la toxine de plus de 100 fois. Les épreuves radioimmunologiques peuvent être utilisées dans les analyses de routine (méthode coûteuse), de même que la technique ELISA. Ces méthodes sont spécifiques des diverses

toxines et il est possible que certaines entérotoxines n'aient pas encore été identifiées. Toute norme devrait donc préciser les toxines à rechercher. **La recherche d'une ADNase thermostable pourrait constituer une indication de la présence de staphylocoques entérotoxinogènes.**

V. *Clostridium botulinum* et *Clostridium perfringens*

Ce germe fait courir un très grand risque de contamination bactérienne à de nombreux aliments, notamment les conserves (boîtes et bouteilles) qui subissent un traitement thermique insuffisant. Cependant les tests de routine permettant de le rechercher ne sont que très rarement réalisés : il ne peut exister aucun plan d'échantillonnage satisfaisant pour assurer une protection adéquate, et ce, en raison de la très grande toxicité de l'exotoxine synthétisée par le germe.

Le contrôle est obtenu au moyen de spécifications à effectuer en cours de fabrication ou pendant l'entreposage (caractères de l'aliment tels que pH, activité de l'eau, addition de nitrites, stérilisation si possible, température d'entreposage, etc).

Le germe peut être recherché dans un aliment soupçonné d'être à l'origine d'une intoxication. L'aliment est mis en culture et on évalue la toxicité du filtrat (ou du surnageant de centrifugation) par injection à la souris, en utilisant les antitoxines appropriées pour les tests de protection. Actuellement la recherche des germes au moyen d'anticorps fluorescents est au point et la mise en évidence de la toxine peut être effectuée par électro-immunodiffusion.

Clostridium perfringens, germe tellurique anérobie strict très largement répandu dans l'environnement et responsable de toxi-infections. Les viandes sont fréquemment contaminées; ce germe ne présente dans la plupart des cas de risques pour le consommateur qu'après mauvaise manutention/gestion d'un aliment après cuisson. Ce germe produit au cours de sa sporulation une entérotoxine qui est libérée au moment de sa germination. Cette toxine est décelable par diverses méthodes (anticorps fluorescents, hémagglutination). Actuellement on réalise surtout l'isolement ou la numération des formes végétatives et des spores de ce microorganisme. Parmi les principaux milieux utilisés on peut citer : la gélose au sang au sulfate de néomycine, la gélose tryptone sulfite à la néomycine et la gélose sulfite à la polymyxine et à la sulfadiazine (SPS). *C. perfringens* est toléré dans les aliments en nombre relativement faible (entre 1 et 100 par g ou ml). Le recours à des méthodes d'enrichissement est envisagé pour certains produits (aliments diététiques et de régime). Des méthodes de recherche par hybridation ADN-ADN sont mis au point.

VI. *Vibrio*

VI.1. *Vibrio cholerae*

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.

VI.2. *Vibrio parahaemolyticus*

Ce germe d'origine marine est de plus en plus largement reconnu comme responsable d'une toxin infection alimentaire par suite de la consommation de produits de la mer. La recherche de ce germe halophile est réalisable après enrichissement (bouillon salé à la colistine); pour sa numération on utilise un milieu gélosé (gélose saccharosée, aux sels biliaires, au citrate et au thiosulfate : TCBS).

La réaction de KANAGAWA (mise en évidence d'une β-hémolyse sur milieu de WAGATSUMA additionnée de chlorure de sodium) permet la mise en évidence du germe.

VI.3. *Vibrio sp* non agglutinants

La maladie attribuée à ces vibrions inspire des préoccupations croissantes en rapport avec des aliments provenant de certaines régions d'extrême Orient. Aucune norme visant ces germes n'est encore envisagée.

VII. *Bacillus cereus*

Ce germe est très largement répandu dans l'environnement. Les risques liés à la présence de ce germe apparaissent quand l'aliment est mal manutentionné au cours de sa préparation finale avant consommation. Pour sa numération, on utilise la polymyxine comme agent sélectif. L'observation de ses caractères lécithinase + et de mannitol - permet une numération sélective.

VIII. *Listeria monocytogenes*

La listériose est une maladie provoquée par la consommation de lait et surtout de fromages contaminés mal pasteurisés. Ce germe est capable de survivre longtemps dans des conditions défavorables et son caractère cryophile le rend particulièrement dangereux dans les produits réfrigérés. La recherche du germe par les méthodes traditionnelles est fastidieuse

et longue. La recherche par hybridation ADN-ADN, les méthodes immuno-enzymatiques réalisées après enrichissement sont des techniques de recherche actuelles et dont la « modernisation » est continue.

IX. *Campylobacter jejuni*

La campylobactérose est une maladie très répandue provoquée par cette bactérie qui est un hôte normal de l'intestin de nombreux animaux comme le poulet ou la dinde dans l'intestin desquels la charge microbienne est de l'ordre de 10^6 et plus. Ce sont surtout les aliments d'origine animale (volailles plus particulièrement) mal cuits qui sont à l'origine de la maladie. Ce germe est sensible aux traitements thermiques et ne se multiplie pas en-dessous de 30°C.

X. Levures et moisissures

X.1. Champignons microscopiques eucaryote

- a) Moisissures (thalle filamenteux, croissance polarisée = allongement des axes, ramification)
- b) Levures (thalle levuriforme, croissance dépolarisée)

X.2. Les conditions physico-chimiques nécessaires au développement

- a) **Température** : la majorité des espèces sont mésophiles (15°C-25°C), mais il existe des espèces thermophiles (*Chaetomium thermophile* (62°C) et psychrotropes (*Cladosporium herbarum* (-6°C)).
- b) **Le pH** : très tolérants (< 3 ; 5,5-6,0 ; > 9).
- c) **Activité de l'eau (Aw)** : L'activité de l'eau (A_w) de l'aliment représente sa disponibilité en eau. Plus un aliment aura une A_w proche de 1, plus il sera sensible aux altérations.
- d) **Besoin en oxygène** : ce sont des espèces tolérantes (2-21%), les moisissures sont des aérobies, alors que les levures sont des aérobies et/ou anaérobies.

X.3. Levures et moisissures agent de détérioration des aliments

Les levures et moisissures sont des agents importants de détérioration des aliments acides ou à faible activité d'eau. Les mycotoxines qu'ils excretent et présentes dans les aliments inspirent des préoccupations croissantes.

Ces microorganismes sont souvent isolés et dénombrés sur des milieux acidifiés (gélose glucosée à la pomme de terre, gélose à l'extrait de malt). Le pH bas de ces milieux n'inhibe pas toutes les bactéries et il peut même inhiber certaines levures ou moisissures.

Certains milieux contiennent des antibiotiques ou autres agents antibactériens :

- gélose glucosée à l'oxytétracycline et extrait de levure (OGA) ;
- gélose à la chlortétracycline et au rose de bengale (RBC).

L'interprétation du comptage des levures dans les aliments est simple. Par contre la signification des dénombremens des moisissures est considérablement influencée par les Technique de contrôle : cas de levures et moisissures traitements d'homogénéisation et la forme principale sous laquelle se présente la moisissure : développement mycélien ou au contraire sporulation vigoureuse.

X.4. Numération des levures et moisissures

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 | 200 g |
| Glucose | 20 g |
| Gélose | 15 g |
| Eau D | 1000 ml |

Autoclaver à 121°C pendant 15 minutes. Ajuster le pH à 3,5 par addition d'acide tartrique

à 10%. - Ensemencer en surface par étalement à partir de 100 µl 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 | 5 g |
| Glucose | 20 g |
| Gélose | 16 g |
| Eau D | 1000 ml |

pH = 6,8.

Autoclaver 10 minutes à 121°C.

Après régénération ajouter au milieu, ramené à 50°C, 100 ml d'une solution stérile d'Oxytétracycline à 1 mg / ml ou 100 ml 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.

Gélose Sabouraud (avec chloramphénicol)

La gélose de Sabouraud constitue un milieu classique pour la culture, **l'isolement et l'identification des levures et des moisissures saprophytes ou pathogènes**.

Elle est recommandée essentiellement pour l'isolement des moisissures dans les prélèvements peu chargés en bactéries, les contrôles de stérilité des produits pharmaceutiques, cosmétiques ou alimentaires, la culture des moisissures en vue de réaliser leur identification.

Dans le cas de prélèvements fortement contaminés, il est préférable d'utiliser la gélose **Sabouraud + Chloramphénicol**.

Composition

Formule en g.L⁻¹ d'eau distillée :

| | |
|----------------------------|--------|
| Peptone pepsique de viande | 10 g |
| Glucose | 20 g |
| Chloramphénicol | 0, 5 g |

Agar

15 g

pH = 7,0

Principe

La gélose de Sabouraud est un milieu peptoné et glucosé **permettant la croissance des levures et des moisissures**, et en particulier des dermatophytes.

La gélose de Sabouraud peut servir de base à la préparation de milieux spéciaux par addition d'antibiotiques, de sang ou de vitamines.

L'ajout de triphényltétrazolium à raison de 100 mg par litre en fait un milieu de différenciation pour les Candida.

ensemencement

- Transférer l'échantillon à analyser sur le milieu.
- Etaler l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur en verre stérile.
- Incuber à 20 - 25°C de 3 à 5 jours.