

TP 1 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DU LAIT

Le lait de par sa composition est un aliment complet renfermant des graisses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et une forte proportion en eau. De ce fait, ce milieu constitue un substrat favorable au développement des microorganismes. Des germes pathogènes peuvent se retrouver dans le lait comme des entérobactéries redoutées (*Salmonella*, *Shigella*), des staphylocoques, des brucelles, des streptocoques pyogènes ou encore le bacille de la tuberculose.

L'industrie alimentaire est un secteur où le contrôle microbiologique doit intervenir de façon rigoureuse à différents stades : depuis celui de la collecte jusqu'à celui de la consommation de produits finis.

L'analyse portera sur la qualité de différents types de lait : lait cru, lait pasteurisé, lait en poudre en recherchant la flore totale, les coliformes fécaux et les staphylocoques et éventuellement les microorganismes pathogènes entériques si le lait ne satisfait pas aux normes microbiologiques.

I. MATERIEL ET MILIEUX :

Gélose nutritive, gélose de MacConkey ou de Drigalski, gélose de Hektoen, Gélose de Chapman, étaloir, pipettes de 1 ml et 5 ml, tubes de dilution, tubes vides stériles, bécher stérile.

II. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

1. Analyse du lait cru et du lait pasteurisé : Dans le cas de lait cru, récupérer celui-ci dans un flacon stérile à vis de préférence en faisant attention à la contamination extérieure. Pour le lait pasteurisé, homogénéiser le sachet ou la bouteille et le couper aseptiquement avec un couteau ou un ciseau préalablement stérilisé. Avec une pipette stérile, verser plusieurs ml de lait dans un tube vide stérile et procéder aux analyses en effectuant un ensemencement par étalement comme suit :

- Recherche de la flore totale (gélose nutritive) sur une dilution du lait au 1/100^{ième}.
- Recherche des coliformes (gélose de Mac Conkey ou de Drigalski) sur le lait non dilué.
- Recherche des staphylocoques (gélose de Chapman) sur le lait non dilué.
- Recherche des bactéries entériques pathogènes (gélose Hektoen) sur lait non dilué si confirmation de coliformes fécaux.

2. Analyse du lait en poudre : L'analyse est précédée d'une préparation d'une solution mère au 1/10^{ième} : peser 10 g de poudre dans un bécher stérile et ajuster à 100 ml par de l'eau physiologique stérile. Après homogénéisation du mélange, faites les mêmes analyses que précédemment.

RESULTATS ET INTERPRETATIONS

Incuber les milieux ensemencés à 37°C pendant 24 à 48 H et interpréter vos résultats. Comparer les divers types de lait.

III. NORMES

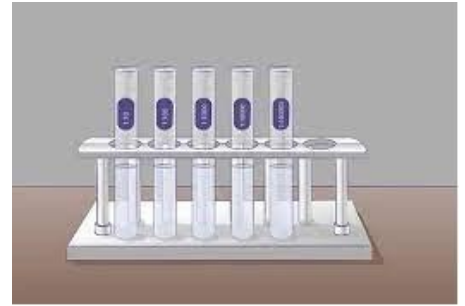
- 1. Lait pasteurisé :**
- flore totale < 3×10^4 microorganismes/ml
 - coliformes < 10/ml
- 2. Lait sec :**
- flore totale < 5×10^4 /g
 - coliformes < 10/g



Mortier + pilon,



sable de Fontainebleau



tubes de dilutions,



pipettes de 1ml et 5ml,



étaioir de verre,



gélose nutritive,



gélose de Chapman,



gélose de Mac Conkey ou de Drigalski,



Drigalski



bouillon de Rappaport

bouillon de Rappaport,



gélose de Hektoen,



gélose viande-foie,



eau physiologique stérile.



alun de fer,



sulfite de sodium,

CALCUL DE LA CHARGE MICROBIENNE

1- Cas d'un aliment liquide

Les résultats des dénombrements sont généralement exprimés en nombre de germes/ml ou encore en nombre d'unités formant colonies/ml (UFC/ml). Le principe repose sur le fait qu'une colonie provient d'un microorganisme ensemencé mais une colonie peut résulter aussi occasionnellement de l'association de 2 cellules ou de plusieurs cellules (agrégat) d'où le terme UFC plus approprié. Pour avoir une bonne appréciation de la contamination d'un aliment donné, il est impératif de bien homogénéiser le produit à analyser ou ses dilutions ; ceci dans un double but : assurer une répartition homogène des microorganismes et réduire au maximum les agrégats.

La charge microbienne dépend de la **quantité** d'aliment ensemencée et du **facteur de dilution** et s'exprime par les formules suivantes :

1. Méthode par ensemencement en masse :

$$\text{Nombre de microorganismes /ml} = N \times 10^n$$

2. Méthode par étalement :

$$\text{Nombre de microorganismes/ml} = N \times 10 \times 10^n$$

3. Méthode par filtration :

$$\text{Nombre de microorganismes/ml} = N/V \times 10^n$$

Avec

- **N** : nombre de colonies lues/boîte ou sur membrane
- **V** : volume filtré
- **n** : facteur de dilution

2- Cas d'un aliment solide

Les résultats sont généralement exprimés en nombre de germes/g ou en nombre UFC/g. Un aliment solide doit être mis en suspension avant d'être analysé. Il faut tenir compte de cette suspension dans les formules.

1. Méthode d'ensemencement en masse :

$$\text{Nombre de microorganismes/g} = N \times [(v + V)/p] \times 10^n$$

2. Méthode par étalement

$$\text{Nombre de microorganismes/g} = N \times [(v + V)/p] \times 10 \times 10^n$$

Avec

- **N** : nombre de colonies lues par boîte
- **p** : poids de l'aliment analysé
- **v** : volume correspondant au poids p
- **V** : volume du milieu de suspension ou de dilution
- **n** : facteur de dilution

LECTURE DE MILIEUX ENSEMENCES. INTERPRETATION DES RESULTATS

- 1- Gélose de Chapman :** Pour la mise en évidence des staphylocoques pathogènes, contient du sel de sodium comme inhibiteur ; *Staphylococcus* dégrade le mannitol en acide qui fait virer au jaune l'indicateur de pH à savoir le rouge de phénol. Incuber plus de 3 jours à 37°C.

Colonies	Microorganismes
- avec halo jaune - petites et sans virage	- mannitol positif : <i>Staphylococcus aureus</i> - mannitol négatif : la plupart de staphylocoques coagulase-négatif

- 2- Gélose de Mac Conkey :** Pour l'isolement des coliformes, des salmonelles et des shigelles, contient comme inhibiteur des sels biliaires et du cristal violet. Le rouge neutre sert à mettre en évidence la dégradation du lactose. Incuber 18 à 24 H à 37°C.

Colonies	Microorganismes
- incolores - grandes, rouges, halo trouble - grandes, roses, visqueuses - minuscules, opaques	- salmonelles, shigelles et autres - <i>E. coli</i> - <i>Enterobacter</i>, <i>Klebsiella</i>, Enterocoques, Staphylocoques, autres

- 3- Gélose de Drigalski :** Milieu sélectif des entérobactéries, contient comme inhibiteur du cristal violet. La fermentation du lactose se manifeste par une production d'acide qui entraîne le virage du bleu de bromothymol au jaune. Incuber 18 à 24 H à 37°C.

Colonies	Microorganismes
- Jaunes - bleu-verdâtres ou bleu-roi	- <i>E. coli</i>, <i>Klebsiella</i>, <i>Enterobacter</i> - Salmonelles, shigelles, <i>Proteus</i> et autres

- 4- Gélose de Hektoen :** Ce milieu allie les qualités nutritives et un pouvoir sélectif pour la recherche des *Salmonella* et *Shigella*. La présence de sels biliaires inhibe les bactéries Gram-positives et certains bacilles Gram-négatifs. La richesse du milieu permet une croissance excellente des bactéries entériques pathogènes qui donnent des colonies plus volumineuses et surtout plus nombreuses que les milieux sélectifs précédents. Les bacilles fermentant au moins un des sucres contenus dans ce milieu donnent des colonies de teinte jaune saumon, ceux ne fermentant aucun sucre, des colonies bleues ou vertes. La production de sulfure d'hydrogène se traduit par un noircissement du centre de la colonie.

Colonies	Microorganismes
- saumon - saumon à centre noir - bleues à centre noir - vertes	- <i>Klebsiella</i>, <i>Escherichia Serratia</i>, <i>Enterobacter</i>, <i>Citrobacter</i>, <i>Arizona</i> - <i>Proteus vulgaris</i> - <i>Proteus mirabilis</i>, <i>Salmonella</i> - <i>Shigella</i>, <i>Providencia</i>, <i>Pseudomonas</i>

- 5- Gélose de Slanetz et Bartley :** Pour la mise en évidence des entérocoques ou *Streptococcus faecalis*, contient comme inhibiteur de l'azide de sodium. Les colonies d'entérocoques réduisent le TTC (triphényl 2, 3, 5, tétrazolium chlorure) qui les colorent en rouge. Incuber plus de 48 H à 37°C. Les colonies roses à marron avec un diamètre de 0,5 à 2 mm sont habituellement des entérocoques.

- 6- Gélose viande-foie avec sulfite de sodium et alun de fer :** Pour la caractérisation des clostridium sulfito-réducteurs. Ensemencement en tube pour garantir l'anaérobiose. Les germes sulfito-réducteurs réduisent le sulfite de sodium en sulfure d'hydrogène qui va réagir avec l'alun de fer (citrate de fer ammoniacal) pour donner un sel de fer noir. Incuber 1 à 2 jours à 37°C. Les clostridium sulfito-réducteurs apparaissent sous forme de grosses colonies noires.

compte rendu

Date :

Noms et Prénoms

1-.....

2-.....

3-.....

4-.....

Poste :

Groupe :

Titre :

Objectif :

- **Produit à analyser** : lait pasteurisé (en sachet) ou lait cru, lait en poudre

1. Préparation de la suspension mère**1.1.1. Matériel**

- flacon stérile à vis
- ciseaux ou couteau stériles
- pipettes (5ml et 10ml) stériles
- tubes à essai vides stériles
- Balance
- Bécher (100ml) stérile
- Ethanol pharmaceutique + coton
- Bec bunsen + briquet
- Eau physiologique stérile

1.1.2. Procédure

- Désinfecter la surface du sachet du lait
- homogénéiser le sachet
- Couper du côté par un ciseau ou couteau stériles
- Verser quelques dizaines de ml dans un flacon stérile.
- verser plusieurs ml de lait dans un tube vide stérile

2. Ensemencements et incubation**2.1. Matériel**

- Tubes de dilution
- Pipettes (1ml) stérile
- Micropipette réglable 100-1000 µl + embouts stériles (1000µl)
- Tube stérile pour la gélose VF
- Agitateur Vortex
- Etaloir en verre

2.2. Milieux de culture en boîtes de Pétri

- Gélose nutritive
- Milieu de Mac Conkey ou de Drigalski
- Gélose de Chapman
- Gélose Hektoen

2.3. Procédure**2.3.1. Lait cru et du lait pasteurisé**

2.3.1.1. Dénombrement de la flore totale: dilution du lait au $1/100^{\text{ième}}$ et ensemencement de 0.1ml sur gélose nutritive.

2.3.1.2. Dénombrement des conformes fécaux par ensemencement de 0.1ml du lait non dilué sur gélose de Mac Conkey ou de Drigalski.

2.3.1.3. Dénombrement de Staphylocoques par ensemencement de 0.1ml du lait non dilué sur gélose de

Chapman.

2.3.1.4. Dénombrement des des bactéries entériques pathogènes par ensemencement de 0.1ml du lait non dilué sur gélose Hektoen si confirmation de coliformes fécaux.

2.3.2. Lait en poudre

2.3.2.1. préparation d'une solution mère au 1/10^{ième}

- peser 10 g de poudre dans un becher (100ml) stérile
- ajuster à 100 ml par de l'eau physiologique stérile
- homogénéiser le mélange
- faites les mêmes analyses que précédemment (2.3.1.)

RESULTATS ET INTERPRETATION

Incuber les milieux ensemencés à 37°C pendant 24 à 48 H et interpréter vos résultats. Comparer les divers types de lait.

NORMES

- | |
|--|
| <ol style="list-style-type: none">1. Lait pasteurisé :<ul style="list-style-type: none">- flore totale < 3×10^4 microorganismes/ml- coliformes < 10/ml2. Lait sec :<ul style="list-style-type: none">- flore totale < 5×10^4/g- coliformes < 10/g |
|--|