

TP 3 : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE D'UN PRODUIT CEREALIER (FARINE)

Principe :

- Numération des propagules de moisissures dans une farine
- Recherche, dans les grains de céréales, de moisissures susceptibles de représenter un danger
- Identification des 3 genres importants : *Aspergillus*, *Penicillium* et *Fusarium*.

1- Numération des propagules de moisissures dans les farines

• Principe

Les moisissures se trouvent sous différentes formes susceptibles de donner naissance à un nouveau mycélium :

- spores de toutes sortes,
- fragments de filament,
- touffes de filaments, etc.

Chacun de ces éléments est une unité de propagation ou **propagule**.

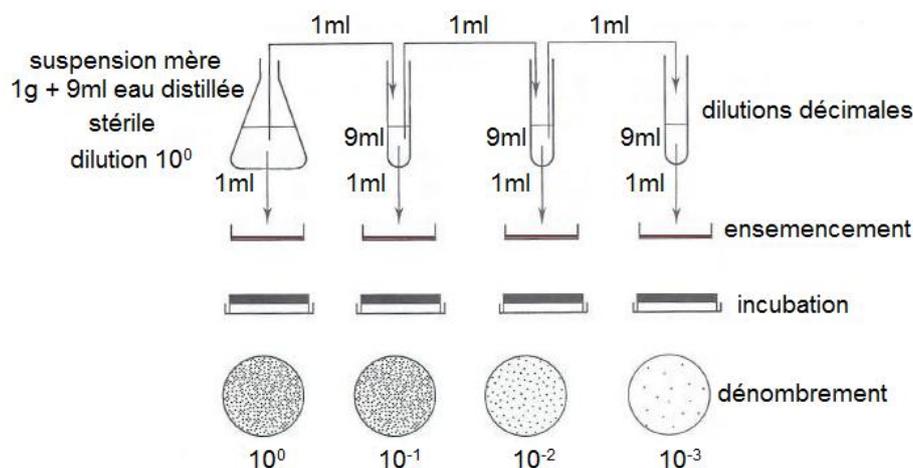
La technique de numération consiste à :

- suspendre une quantité donnée de farine dans un milieu liquide dispersant;
- ensemercer des dilutions successives de cette suspension mère dans un milieu nutritif gélosé favorable
- incuber (température, durée)
- compter le nombre de « thalles » qui proviennent, en principe, chacun d'un propagule.

• Mode opératoire

- Bien homogénéiser l'échantillon de farine avant de commencer l'analyse
- Dans un récipient stérile, peser aseptiquement 1g de cette farine
- Ajouter 9 ml d'eau physiologique stérile (8,5 g de NaCl/l) avec 0,1% de tween 80 (favorise la dispersion des spores) : 1ml de cette suspension mère représente 0,1g de farine
- Agiter fortement

Procéder à une série de dilutions décimales de la suspension mère dans des tubes à essais contenant 9 ml d'eau physiologique stérile au tween 80 (le nombre de dilutions dépendra de la charge présumée de la farine en moisissures)



- Dans une série de boîtes de Petri, répartir 1ml de chacune des dilutions préparées précédemment

- Couler aseptiquement dans chaque boîte 15 à 20 ml de milieu gélosé stérile ramené à 45-48°C, puis bien homogénéiser : les milieux utilisés sont le milieu de Sabouraud Agar, le milieu MEA (Malt Extract Agar) ou le Czapeck-Dox Agar
- Après solidification, incuber les boîtes 6j à 25°C ou 4j à 30°C

- **Lecture et interprétation**

- Sélectionner les boîtes avec un nombre de colonies n tel que $m < n < M$
- Le minimum m et le maximum M varient selon la taille moyenne des colonies concernées, généralement:
 - pour les bactéries, entre 30 et 300
 - pour levures et moisissures, entre 10 et 100

$$[N] \text{ ou (UFC/ml)} = \frac{\sum c}{(n_1 + 0,1n_2)d.V}$$

- **[N]** : la concentration en microorganismes
- **$\sum c$** : la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues,
- **V** : le volume inoculum appliqué à chaque boîte (généralement 1ml en masse et 0.1ml en surface),
- **n_1** : le nombre de boîtes retenues à la première dilution (en général 2).
- **n_2** : le nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution (en général 2).
- **d** : le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2)d}$$

2 dilutions successives
retenues

$$N = \frac{\sum C}{(n_1 + 0,1n_2 + 0,01n_3)d}$$

3 dilutions successives
retenues

- **Expression des résultats**

- Le chiffre trouvé est arrondi à 2 chiffres significatifs (ex.: 28350 à 28000; 11500 à 12000)
- le nombre d'UFC/g ou/ml trouvé est converti en un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par 10^x, (ex. 28000 converti en 2,8.10⁴)