



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**

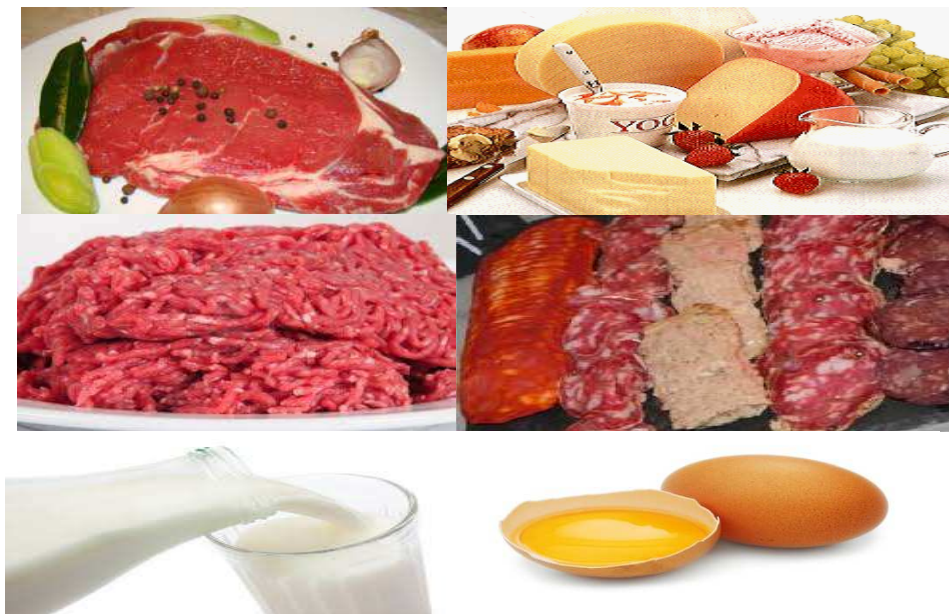


**Projet de Fin d'Etudes**

**Licence en Biotechnologie, Hygiène et sécurité des Aliments**

# Analyse Microbiologique des Aliments

**Réalisé Par : Awatif QAJIA**



**Soutenu le 12-06-2013**

**Pr.M.ATMANI**

**Faculté des sciences et techniques Fés**

**Président**

**Dr.C.BELBACHIR**

**Laboratoire régionale d'analyse et de recherche**

**Encadrant**

**De l'office National de sécurité sanitaire des aliments**

**Année universitaire 2012-2013**



-OUJDA-

Pr.J.EIYAMANI

Faculté des sciences et techniques Fès

Examineur

# sommaire

-INTRODUCTION.....	1
-Chapitre I : Laboratoire Régional d'Analyse et de recherche D'Oujda .....	3
I. 1 Historique .....	3
I. 2 Organigramme .....	3
I. 3 les fonctions du laboratoire .....	4
I.4-Présentation de la section microbiologique .....	5
-Chapitre II : Les groupes des produits alimentaires traités .....	7
1-Lait crus .....	7
2-Produits laitiers .....	7
3-Viande et produits à base de viande .....	8
4 -Produit de charcuterie .....	8
5-Produit de la pêche .....	8
-Chapitre III: Microorganismes Recherchés dans Les Aliments.....	10
III .1 .Flore Mésophile Aérobie Totale .....	10
III.2 .Flore Fongique .....	10
III.3. Coliformes Totaux et Coliformes Fécaux.....	11
III.4. Anaérobies Sulfite Réducteurs .....	11
III.5.Staphylococcus aureus .....	12
III .6.Salmonella .....	12



III .7. <i>Listeria monocytogenes</i> .....	13
-ChapitreVI: MATERIEL ET METHODES .....	14
1-Etapes avant l'analyse .....	14
2- MATERIEL .....	15
3-Méthode utilisée.....	16
- Procédure de préparation du milieu de culture .....	17
- Recherche de la Flore Mésophile Aérobic Totale .....	20
- Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux.....	21
- Recherche des anaérobies sulfitoréducteurs .....	22
- Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	23
- Recherche de <i>Salmonella</i> .....	24
- Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	27
-Chapitre V : L'interprétation des résultats.....	29
- Conclusion et recommandations.....	32



## *INTRODUCTION*

Les microorganismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer des modifications organoleptiques, altérer les qualités marchandes des produits ou constituer un danger pour la santé publique.

L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de la contamination des denrées alimentaires. Il est très largement utilisé, dans le cadre du contrôle officiel et des autocontrôles mis en œuvre par les industriels, pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent.

La mise en place progressive des principes de l'assurance sécurité dans l'ensemble de l'industrie agroalimentaire et l'évolution récente du cadre réglementaire conduisent, cependant, à s'interroger sur l'intérêt réel des examens microbiologiques des aliments. Il s'avère nécessaire de prendre en compte les principes des techniques de tels examens et les limites de leur emploi, pour optimiser leur utilisation dans ce contexte et parvenir à garantir la protection de la santé du consommateur.

La sécurité alimentaire, dont la qualité microbiologique des aliments en est une composante essentielle, représente un enjeu considérable. Sur le plan du commerce international, la sécurité alimentaire a un rôle évident à jouer, dans la prévention des maladies d'origine alimentaire et par voie de conséquence, elle participe à la maîtrise des dépenses de santé.

La maîtrise des risques microbiologiques repose sur le respect des règles d'hygiène, tout au long des filières de production, de transformation et de distribution et sur la validation des pratiques industrielles, par l'analyse du produit fini. La sécurité alimentaire n'étant pas négociable et l'exigence d'innocuité microbiologique toujours plus forte, la parfaite maîtrise de la contamination est indispensable. Elle repose sur une bonne connaissance du monde microbien et fait appel au génie des procédés pour prendre en compte et maîtriser les phénomènes microbiens de façon très rigoureuse et à chaque étape de la production, ceci, de la matière première à la distribution.



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



En effet, par rapport aux autres agents de contamination chimique ou particulaire, les microorganismes ont propriété importante et remarquable, car ils sont capables de se reproduire, surtout, lorsque les conditions sont favorables à cette reproduction, ce qui est souvent le cas pour les microorganismes des produits naturels et alimentaires.

Ainsi, pour de telles raisons, les microbiologistes s'intéressent aux aliments, et principalement pour quatre d'entre elles :

- Pour des raisons économiques, puisque pendant leur fabrication ou leur stockage, les aliments sont altérés par l'oxydation, l'action des enzymes qui y sont présents et par des microorganismes (bactéries, virus, parasites, champignons, invertébrés...) qui s'y multiplient et les rendent impropres à la consommation. En effet l'altération microbienne est la plus fréquente, car tous les aliments sont des substrats éventuels pour les microbes. Il est donc nécessaire de suivre la qualité microbiologique des aliments pour éviter des pertes de production, pour les industriels, ou une mauvaise publicité, lors d'intoxications alimentaires.
- Pour des raisons de santé publique, puisque les aliments peuvent devenir toxiques, sous l'action de certains microorganismes, ce qui aura donc des conséquences sur la santé des consommateurs. En effet la qualité microbiologique des aliments est donc surveillée par des organismes compétents, afin d'éviter des intoxications alimentaires.
- Pour respecter la législation, car diverses lois imposent des contrôles réglementés.
- Pour le suivi ou la sélection de « microbes utiles », dans le cas de processus industriels, pour leur utilisation dans la production d'aliments (yoghourt, fromage, pain,.....).



## **Chapitre I : Laboratoire Régional d'Analyse et de recherche vétérinaire D'Oujda**

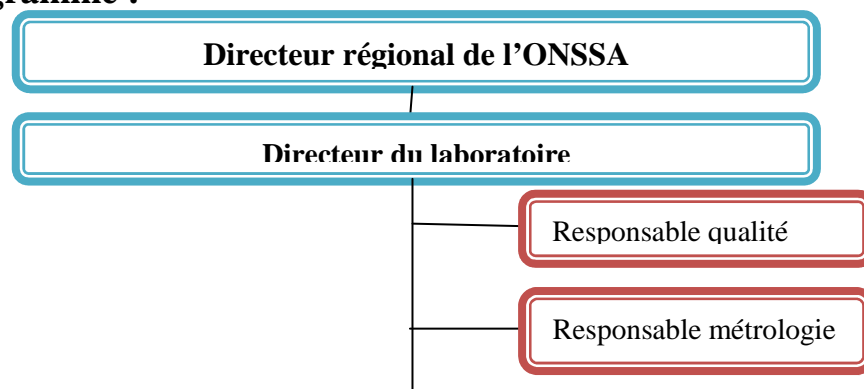
### **I. 1 Historique**

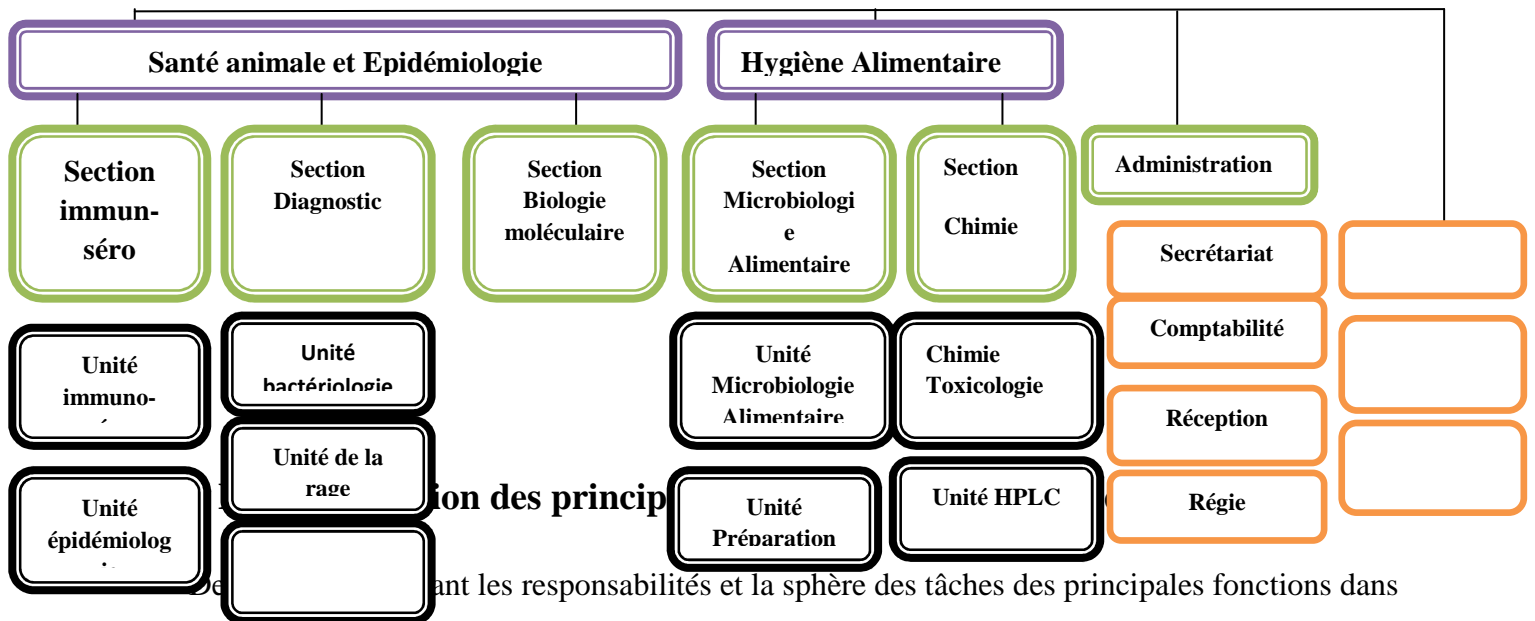
Créé en 1982, le laboratoire Laboratoire Régional d'Analyse et de recherche vétérinaire (LRARVO) est un service public rattaché à la direction de l'élevage du ministère de l'agriculture et du développement rural. Il est chargé d'effectuer dans des conditions de qualité, de confidentialité et d'indépendance requises, les prestations demandées par les services publics et les particuliers.

Le laboratoire régional d'analyses et de recherches vétérinaires est implanté à Oujda, la capitale économique de l'oriental.

La zone de son action s'étend sur l'ensemble des territoires de la wilaya d'Oujda (province Oujda-Angad, Berkane, Taourirt et Jérada) et des provinces de Nador, Al-Hoceima, Taza et Figuig.

### **I. 2 Organigramme :**





...ant les responsabilités et la sphère des tâches des principales fonctions dans le LRARVO sont établies.

- Le Directeur ;
- Le chef de la section de microbiologie alimentaire ;
- Le chef de la section de chimie ;
- Le chef de la section sérologie épidémiologie ;
- Le chef de la section de diagnostic ;
- Le responsable qualité ;
- La commission qualité.

#### **I.4 Domaine d'activité :**

Le domaine d'activité du laboratoire s'étend sur deux secteurs :

- La santé animale :
  - Les professionnels de l'élevage font appel au laboratoire en matière de diagnostic des entités pathologiques ;
  - Il collabore avec d'autres structures dans le cadre du programme d'épidémiologie-surveillance des maladies légalement contagieuses ;
  - Il est chargé aussi de mener des études des problèmes liés aux pathologies des élevages.
- L'hygiène alimentaire :

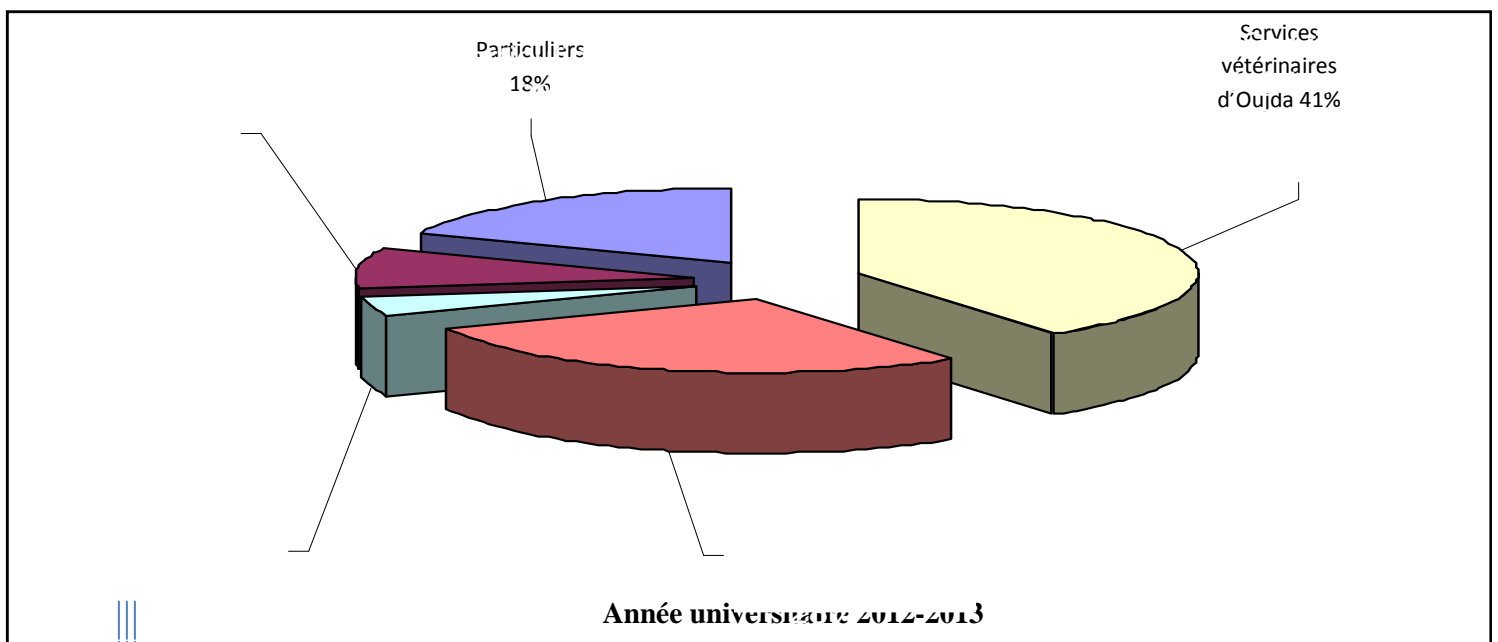
Le secteur d'Hygiène Alimentaire a été créé au sein du LRARVO pour répondre aux besoins de la région du Maroc Oriental en matière d'études et de contrôle sanitaires des denrées alimentaires. Le contrôle microbiologiques des denrées alimentaires vise des objectifs principaux sont les suivants :

- L'assurance de la qualité hygiénique du produit fini , afin que ne présente pas de risque pour la santé du consommateur ;
- L'assurance de la qualité commerciale (ou marchande) pour éviter le risque d'altération.
- Participation aux plans de surveillance mis en place par la direction de l'élevage.

### **I. 5 Origine de prélèvement :**

Les différents produits analysés parviennent de différents services à savoir :

- Le service vétérinaire ;
- L'Office Régional de la Mise en Valeur Agricole de Moulouya (ORMVAM) ;
- Le service de la Répression des Fraudes ;
- Les abattoirs ;
- Les particuliers ;
- Les contrôles inter-laboratoire.







**Figure 1 :** représentation graphique de l'origine de prélèvement (1)

## **II-Présentation de la section microbiologique :**

La section de microbiologie alimentaire où j'ai effectué mon stage, a été créée en 1986 au sein du Laboratoire d'Analyses et de Recherches Vétérinaires d'Oujda pour répondre aux besoins de la région du Maroc Oriental en matière d'études de recherches et de contrôle sanitaires des denrées animales ou d'origine animale.

### **II.1 Locaux:**

- Unité de préparation des milieux de culture :
  - Salle de préparation et de stérilisation des milieux de cultures : S25
- Unité d'analyses microbiologiques :
  - Salle de préparation des échantillons pour l'essai : S24
  - Salle de suivi et d'identification et de lecture des résultats : S23

### **II.2 Mission de la section de Microbiologie Alimentaire :**

Les attributions de la section sont **le contrôle et l'assurance de la qualité** des produits alimentaires destinés à la consommation locale ainsi que ceux destinés à l'exportation.

Les groupes de produits alimentaires traités au niveau de la section sont :

- Lait et produits laitiers ;
- Produits de pêche ;
- Viandes et produits à base de viande ;
- Produits de charcuterie ;
- Eaux.

### **II.3 Nature des essais effectués par la section microbiologique alimentaire :**

Le dénombrement des indicateurs de contamination :



- Numération des bactéries Aérobie Mésophile.
- Coliformes Totaux, Coliforme Fécaux.
- Staphylocoque pathogènes.
- Levures moisissures ...

La recherche des germes pathogènes :

- Salmonelles.
- Listéria monocytogenese.

## ***Chapitre II : Les groupes des produits alimentaires traités***

### **I-Lait crus :**

Le lait est un système colloïdal constitué d'une solution aqueuse de lactose, des matières salines et des plusieurs autres éléments à l'état dissous, dans laquelle se trouvent des protéines à l'état de suspension et des matières grasses à l'état d'émulsion. L'extrait sec total du lait est en moyenne de 13,1% et l'extrait sec dégraissé (sans matière grasse) est de 9,2%. La composition générale du lait de vache est présentée au Tableau 1, dont les données sont des approximations quantitatives, qui varient en fonction d'une multiplicité des facteurs : races animales, alimentation et état de santé de l'animal, période de lactation, ainsi qu'au cours de la traite. Il reste que la composition exacte d'un échantillon de lait ne peut s'obtenir que par analyse.(2)

**Tableau 1 :** composition général du lait crus ( vache) (2)

<i>Constituant</i>	<i>composition moyenne</i>
--------------------	----------------------------



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



Eau	86.9%
Matières grasse	3.9%
Protéines et composés azotés non protéiques	3.2%
Glucides	5.1%
Matières salines	0.9%
<b>Constituants mineurs :</b>  Enzymes, vitamines, pigments (carotènes, xanthophylles, riboflavine) cellules , diverses (cellules épithéliales, leucocytes, bactéries, leucocytes, bactéries, levures, moisissures) Éléments divers (bioxyde de carbone ; oxygène ; azote et autres gaz)  matières étrangers	

## **II-Produits laitiers :**

### 1- Lait de consommation :

Les laits de consommation se caractérisent notamment par le traitement thermique qui leur est Appliqué pour leur conservation, et le taux de matière grasse.

Ne sont autorisés que la modification de la teneur naturelle en matière grasse du lait par prélèvement ou adjonction de crème ou par addition de lait entier, demi-écrémé ou écrémé, afin de respecter les teneurs en matière grasse prescrites pour le lait de consommation, l'enrichissement du lait en protéines issues du lait, en sels minéraux ou en vitamines et la réduction de la teneur du lait en lactose par sa conversion en glucose et galactose.(3)

- **Lait entier :**

Le lait entier est un lait traité thermiquement , en ce qui concerne sa teneur en matière grasse, répond à l'une des formules suivantes :

**Lait entier normalisé :** un lait dont la teneur en matière grasse s'élève à 3,50 % m/m(voir annexe) au minimum. Toutefois, les États membres peuvent prévoir une catégorie supplémentaire de lait entier dont la teneur en matière grasse est supérieure ou égale à 4,00 % (m/m).

**Lait entier non normalisé :** un lait dont la teneur en matière grasse n'a pas été modifiée depuis le stade de la traite, ni par adjonction ou prélèvement de matières grasses du lait, ni par



mélange avec du lait dont la teneur naturelle en matière grasse a été modifiée. Toutefois, la teneur en matière grasse ne peut être inférieure à 3,50 % (m/m).(4)

- **Le lait demi-écrémé :**

Est un lait traité thermiquement dont la teneur en matière grasse a été ramenée à un taux qui s'élève à 1,50 % (m/m) au minimum et à 1,80 % (m/m) au maximum.(4)

- **Le lait écrémé :**

Est un lait traité thermiquement dont la teneur en matière grasse ne peut excéder 0,50 % .(4)

- **Le lait pasteurisé :**

La dénomination « lait pasteurisé » est réservée au lait :

a) obtenu par un traitement mettant en œuvre une température élevée pendant un court laps de temps (au moins 72°C pendant quinze secondes ou toute combinaison équivalente) ou par un procédé de pasteurisation utilisant des combinaisons différentes de temps et de température pour obtenir un effet équivalent ;

b) immédiatement refroidi après pasteurisation pour être ramené, dans les meilleurs délais, à une température ne dépassant pas 6°C;

c) présentant une réaction négative au test phosphatase.

- **Le lait stérilisé UHT**

Le lait UHT peut être entier, demi-écrémé ou écrémé. On le trouve dans le commerce sous le nom « lait stérilisé UHT ». Il se conserve à température ambiante, tant que l'emballage n'a pas été ouvert.(4)

## **2-Crèmes lactières**

### **3-Yaourts (ou yoghourts) :**

Produit vivant, 100 g de yaourt (ou yoghourts) nature contiennent en moyenne 6 g de glucides, 4 g de protides, et de 0 à 3,5 g de lipides, selon le lait utilisé. On y trouve encore du calcium, des sels minéraux (phosphore, potassium) et des vitamines produites par les bactéries : B1, B2, et PP.

- Yaourt (ou yoghourt) « ferme »
- Yaourt (ou yoghourts) « brassé »
- Yaourt (ou yoghourt) « à boire »



#### **4- Fromages :**

Fromages blancs (dont frais)

Fromages à pâte molle

Fromages à pâte pressée ; Fromages fondus...(4)

#### **II-Viande et produits à base de viande :**

- **Viande haché :**

Les viandes hachées sont des viandes qui ont été seulement soumises à une opération de hachage en fragments ou à un passage dans un hachoir à vis sans fin, auxquelles a été éventuellement ajouté un maximum de sel. Tout ajout d'eau est interdit.

Seules peuvent être utilisées pour la fabrication de viandes hachées les viandes provenant d'animaux de boucherie d'une seule des espèces suivantes : bovine , ovine et caprine. (5)

#### **III-Produit de charcuterie :**

La charcuterie désigne l'ensemble des préparations [alimentaires](#) principalement à base de [viande](#) , crues ou cuites, et ayant souvent le [sel](#) comme agent de conservation La charcuterie utilise l'ensemble des parties du [porc](#). Elle emploie également d'autres viandes, Le nombre de spécialités est très élevé, les plus importantes sont les [jambons](#), les [pâtés](#), les [saucisses](#) et [saucissons](#). (6)

#### **VI-Produit de la pêche**

- Crevette
- Poulpe
- Poissons frais ou congelés
- Poissons tranchés
- Semi conserves do poissons

## ***Chapitre III: Microorganismes Recherchés dans***

### ***Les Aliments***

Trois types des microorganismes sont conventionnellement recherchés, lors de l'analyse microbiologique des denrées alimentaires. Il s'agit des microorganismes responsables de



l'altération, des microorganismes indicateurs de la contamination fécale et des microorganismes pathogènes responsables toxi-infections alimentaires.(7)

Parmi les microorganismes responsables de l'altération des aliments, se trouvent la flore Mésophile Aérobie Totale(FMAT) et la Flore Fongique constituée par les Levures et Moisissures.

Les microorganismes dits indicateurs de contamination fécale sont les Coliformes Totaux et les Coliformes Fécaux. Les microorganismes pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires sont les Anaérobies SulfiteRéducteurs (ASR), *Staphylococcus aureus*, *Salmonella sp*, *Listeria monocytogenes*, *campylobacter coli*, *Vibrio cholerae* et *Vibrio parahaemolyticus*

### **III .1 .Flore Mésophile Aérobie Totale**

La Flore Mésophile Aérobie Totale (FMAT) est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre d'Unité Formant Colonie (UFC) présent dans un produit ou sur une surface. L'unité de dénombrement est l'Unité Formant Colonie, car une colonie observable, sur la surface du milieu gélosé est le résultat d'un microorganisme vivant isolé à partir d'une spore ou encore d'une association de microorganismes.

Théoriquement, il s'agit alors de rechercher la flore thermophile dont la température optimale de croissance se situe à +45°C, la flore mésophile dont la température optimale de croissance se situe entre +20°C et +40°C et la flore psychrophile dont la température optimale de croissance se situe à +20°C. Leur isolement se faisant sur un milieu gélosé dit ordinaire ou nutritif, la plupart des microorganismes se développe, sauf les microorganismes exigeants et les microorganismes anaérobies stricts. Il est donc préférable de parler de Flore Mésophile Aérobie à + 30°C, plutôt que de « Flore Totale ».(8)

### **III.2 .Flore Fongique**

Les levures sont des organismes unicellulaires qui se divisent par fission et par bourgeonnement.



Etant donné leur grande capacité d'adaptation à nombreux substrats, les levures sont très largement répandues dans l'environnement et se retrouvent de façon normale dans le lait. Ce sont des champignons, chez les lesquels la forme unicellulaire est prédominante. Elles sont classées par genre et par espèce et sont regroupées au sein de famille, selon leur morphologie et leur mode de reproduction. Parmi elles se trouvent, notamment, *Geotrichum Candidum* et *Saccharomyces cerevisiae*.

Les moisissures sont des organismes pluricellulaires qui se propagent leurs spores. Tout comme les levures, les moisissures peuvent être véhiculées par l'environnement et se retrouver dans le lait et dans le fromage. Ce sont des microorganismes filamenteux qui sont disséminés par l'émission de la spore. Les concentrations de moisissures ambiantes ne causent pas d'effets sur la santé de la majorité des personnes. Cependant, dans des situations où ces concentrations sont anormalement élevées ou dans le cas de certaines personnes souffrant de problèmes respiratoires ou ayant un système immunitaire déficient, l'exposition aux moisissures peut favoriser l'apparition de symptômes de maladies. Les effets ressentis dépendent des espèces présentes, leurs produits métaboliques, de la concentration et de durée de l'exposition ainsi que de la susceptibilité individuelle.

Les principaux effets sur la santé associés à une exposition aux moisissures sont les réactions d'hypersensibilité, les infections et l'irritation. Mais il s'agit de transmission par aérosols et non de d'infection par contamination alimentaire (9)

### **III.3. Coliformes Totaux et Coliformes Fécaux**

Les coliformes fermentent le lactose à +30 °C, avec production de gaz. La fermentation du lactose avec production de gaz est recherchée dans un milieu nutritif spécifique additionné de sels biliaires et de vert brillant. Parmi les coliformes totaux, les coliformes thermo tolérants ou fécaux fermentent le lactose, à la température de +44°C.

Les coliformes sont recherchés dans les aliments, car ce sont de bons marqueurs de l'hygiène de leurs manipulations d'origine fécale, ils sont retrouvés dans les eaux usées et le sol. Etant des bactéries vivant dans les intestins d'animaux ou de l'Homme leur présence indique alors une pollution fécale, dans milieu hydrique. Ainsi ils connurent comme étant des organismes



indicateurs de la qualité de l'eau. Cependant, ils ne provoquent pas d'intoxication alimentaire à l'exception d'*Escherichia coli* O157:H7 qui est un sérotype particulier responsable de plusieurs pathologies, dont la colite hémorragique, le syndrome hémolytique et urémique (SHU), et le purpura thrombotique thrombocytopénique (PTT). Cette bactérie potentiellement mortelle se trouve généralement à l'intérieur des intestins des bovins. Elle est ainsi responsable de beaucoup d'intoxications alimentaires causés par la viande hachée dites « maladie du hamburger ». (10)

### **III.4. Anaérobies Sulfito Réducteurs**

Les anaérobies sulfitoréducteurs sont des microorganismes qui se multiplient en absence d'air au cœur des produits, leur résistance à la cuisson étant alors remarquable. *Clostridium perfringens* est l'exemple typique de microorganismes anaérobies sulfitoréducteurs.

Elles deviennent pathogènes quand elles pénètrent accidentellement dans l'organisme par voie cutanée ou intestinale et y produisent leur toxine qui va ensuite altérer les fonctions de défense de l'organisme. *Clostridium perfringens* est une bactérie très ubiquitaire largement répandue dans tout l'environnement (sol, sédiments, cadavres, poussières, etc.). Elle est responsable d'intoxication alimentaire qui survient uniquement, après la consommation d'aliment fortement contaminés par une souche entérotoxigène. Une partie des bactéries ingérées est tuée au niveau de l'estomac (pH très acide, milieu riche en protéases, inhibition par la flore digestive résidente. Mais l'ingestion d'un nombre important de *Clostridium perfringens* entraîne sa multiplication dans le contenu de l'intestin grêle  $10^8$  -  $10^9$  UFC.g<sup>-1</sup>). Ensuite leur sporulation synthétise l'entérotoxine qui libérée après lyse de la paroi bactérienne, interagit avec les entérocytes provoquant une fuite d'eau et d'électrolytes. De ce fait *Clostridium perfringens* est retrouvé en nombre supérieur à  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup> dans les selles des malades. (11)

#### **III.4.1. Sources de contamination**

Dans les aliments, l'intoxication alimentaire est généralement liée avec des arrangements impliquant de grandes quantités de nourriture, particulièrement de plats de viande et de volaille, généralement préparés à l'avance et laissés refroidir lentement, ou insuffisamment





réfrigérés. Les viandes produites laminés, les volailles farcies et les tartes offrent des conditions de croissance favorables au transfert de la contamination. La cuisson des potages, des ragouts et des sauces créent des conditions anaérobies idéales, pendant le refroidissement, pour la germination des spores.

La maladie est le plus souvent due à l'ingestion de produits carnés, particulièrement les viandes réchauffées qui ont été cuites préalablement en masse dans les lieux de restauration rapide.(12)

### **III.5.Staphylococcus aureus**

*Staphylococcus aureus* est comme tous les staphylocoques, une bactérie sous forme *cocci* à Gram+, de 1µm, apparaissant en amas à l'examen microscopique. Il est immobile non sporulé et ne présente pas de capsule visible au microscope optique.

Les enzymes nécessaires aux fonctions métaboliques décrites ci-dessus, *Staphylococcus aureus* à la capacité de synthétiser plusieurs enzymes telles que la catalase qui existe chez tous les *Micrococaceae*, la coagulase, la désoxyribonucléase, la phosphatase, la hyaluronidase, la fibrinolysine, la lipase et la protéolysine.

La présence d'une coagulase identifie en pratique courante l'espèce *Staphylococcus aureus*.

Le pouvoir pathogène tient également à la production d'un grand nombre de substances diffusibles, l'hémolysine  $\alpha$  ou, staphylolysine  $\alpha$  est cytotoxique et cytolytique.(13)

### **III .6.Salmonella**

Les salmonelles (*Salmonella*) forment un genre de protéobactéries appartenant à l'ordre des entérobactéries. Elles mesurent 0,7 à 1,5 µm de diamètre, pour 2 à 5 µm de longueur avec une flagelle .

Elles provoquent des maladies telles que la fièvre typhoïde, la fièvre paratyphoïde et la toxi-infection alimentaire.

Ce sont des entérobactéries bacilles à Gram négatifs, mobiles pour la plupart (ciliature péritriche)mais certaines sont immobiles, aéro-anaérobies facultatifs, oxydase -, nitrate



réductase +, fermentative du glucose, lactose -, H<sub>2</sub>S + (ou -), [uréase](#) -, lysine décarboxylase +, utilisant la voie des acides mixtes, indole-, ne possédant pas la bêta-galactosidase, à forte contagiosité, responsables de [gastro-entérites](#), [toxi-infections](#) alimentaires et des fièvres [typhoïde](#) et [paratyphoïde](#) (*S. typhi* et *S. paratyphi*).

On connaît aujourd'hui plus de 2.000 [espèces](#) de salmonelles, mais une minorité est responsable de la majorité des maladies humaines à salmonelles. Les sérotypes *Typhimurium* et *Enteritidis* sont impliquées dans les gastro-[entérites](#), alors que les sérotypes *Typhi* et *Paratyphi* sont impliquées dans les fièvres.

Les premières sont confinées au système digestif, alors que les secondes sont capables de traverser la barrière intestinale pour coloniser les tissus [lymphoïdes](#). Les [endotoxines](#) synthétisées par les salmonelles sont responsables de leur [pathogénicité](#).(16)

### III.7.Source de contamination

**Aliments.** Dans plus de 90 % des cas, c'est la consommation d'un aliment contaminé par des excréments animaux qui est en cause. Les aliments contaminés par *Salmonella* ne présentent pas nécessairement d'altération visible ni d'odeur suspecte. Il s'agit principalement des **œufs** (et les produits qui en contiennent), de la **viande** et de la **volaille** consommés **crus** ou insuffisamment cuits. Cependant, tout aliment - y compris les fruits et les légumes - est susceptible de véhiculer la salmonelle, notamment s'il est lavé avec de l'eau contaminée ou s'il entre en contact avec une viande crue contaminée.

Même si une viande a été congelée adéquatement, elle peut présenter des risques. En fait, dès que la chaîne de froid est brisée, il y a des risques de contamination. C'est d'ailleurs pourquoi l'été est plus propice à la contamination par la salmonelle. Seule la **cuisson** peut avoir raison de la bactérie. Une **hygiène** impeccable lors de la préparation des repas est donc essentielle pour se prémunir contre la contamination (voir la section Prévention).

**Animaux domestiques.** La salmonelle est naturellement présente dans l'intestin des animaux. Beaucoup de cas de salmonellose chez les enfants ont été associés à des **oiseaux** ou des **reptiles** (surtout les tortues et les iguanes mais aussi les lézards et les serpents) qui leur



servaient d'animaux de compagnie. La contamination peut s'effectuer simplement en touchant l'animal (la peau des reptiles est souvent contaminée) ou ses excréments mais ce n'est pas toujours le cas. Le seul fait de toucher un objet entré en contact avec l'animal peut suffire.

**Transmission d'une personne à l'autre.** Le risque est plus élevé lorsque la personne infectée prépare un repas pour d'autres personnes. De façon générale, la salmonelle peut se retrouver un peu partout dans une maison étant donné qu'il s'agit d'une bactérie résistante qui peut survivre pendant un certain temps à l'extérieur d'un hôte vivant.(14)

### **III .7.Listeria monocytogenes**

*Listeria monocytogenes* est une bactérie de type Gram positif, mobile et qui ne produit pas de spores. Cellule de 1 à 4 [micromètres](#) sur 0,5 micromètre, elle se présente sous forme de chaînes courtes ou de petits amas.

Son [génom](#)e est composé d'un [chromosome](#) d'environ 3 millions de paires de bases, codant pour 3.000 [protéines](#).

Cette bactérie est capable de se multiplier entre 1°C et 45°C, en présence ou en absence d'oxygène (anaérobie facultative). Relativement résistante au sel et au dessèchement, elle est aisément détruite par la chaleur.

- **Source de contamination**

Il existe plusieurs sources possibles de transmission de la maladie. Chez l'homme la transmission de la mère au fœtus par la voie hématogène peut se faire par voie digestive ou par voie respiratoire, une transmission indirecte se fait par l'intermédiaire d'un vecteur inanimé comme les produits d'origine animale.(15)



## **Chapitre VI: MATERIEL ET METHODES**

### **I-Etapes avant l'analyse :**

- **Réception :**

Si le produit soumis à analyse parvenant au laboratoire n'est pas approprié à l'analyse demandée ou ne satisfait pas aux exigences de conservation et d'acheminement, le laboratoire doit soit refuser de réaliser les analyses, soit les réaliser sous le régime de dérogation et émettre des réserves sur la signification des résultats

- **Enregistrement :**

Les commémoratifs concernant le produit soumis à analyse doivent être consignés

Sur le rapport manuel ou informatique ou sont consignés les commémoratifs il est recommandé d'y faire figurer les informations suivantes : date de prélèvement, date de réception, référence du demandeur, nom de la personne l'ayant réceptionné, identification du prélèvement, espèce animale d'origine, nature et état du prélèvement, température à respecter et lieu de stockage, recherche à réaliser.

- **Stockage/Conservation :**

Le produit soumis à analyse doit être maintenu dans des conditions évitant toute contamination et altération.



## **II-Matériel :**

Les analyses en microbiologie alimentaires nécessitent un matériel adapté qui permet de :

- Faciliter le travail au manipulateur
- Protéger le personnel des germes pathogènes
- Assurer une asepsie totale au cours des différentes manipulations
- Assurer des résultats fiables et précis

Ainsi, la liste suivante n'est pas exhaustive. Elle peut être revue en fonction des rénovations technologiques dans le domaine des techniques de laboratoire

- Hotte laminaire à surpression.
- Four micro-onde
- Autoclave – stérilisateur
- pH mètre électronique
- Agitateur automatique
- Pipteur électrique
- Micro-onde
- Etuves à 22°C, 30°C, 37°C, 40°C, 42°C, 44°C et 46°C

## **III-Méthode utilisée :**

Depuis le prélèvement jusqu'au traitement de l'échantillon, en vue de l'analyse microbiologique, il faut tout mettre en œuvre pour stabiliser qualitativement et quantitativement la flore microbienne présente au moment du prélèvement. Le prélèvement doit se faire de façon aseptique et le délai entre le prélèvement et le traitement de l'échantillon doit se faire aussi court que possible.

De même l'échantillon doit être conservé à température basse (0 à 5°C) pendant le transport et le stockage ultérieur, à l'exception des conserves de poissons stérilisées à la chaleur, des produits sèches salés qui peuvent être transportés et stockés respectivement à température ambiante.



Le control microbiologique officiel préconise le prélèvement de 5 échantillons par lot à inspecter, alors que pour le contrôle en cours de fabrication , il faut essayer de prélever des échantillon avec une fréquence qui soit aussi représentative que possible des condition de fabrication.

### **- Procédure de préparation du milieu de culture :**

Les milieux de culture déshydratés sont réalisés sous forme de poudre. Ces milieux sont stockés dans un local de stockage sous des conditions favorables (température, humidité), ils ont une durée de vie de 3 à 5 ans, mais une fois ouverte les milieux doivent être utilisés dans les six mois au maximum. Danc il faut noter la date d'ouverture sur la boîte du milieu de culture.

#### **1 -Pesé :**

Cette étape doit être effectuée dans des conditions plus précises, de puis la vérification de la balance jusqu'à l'obtention d'un mélange (milieu de culture déshydraté + eau).

#### **2-Réhydratation :**

- La qualité de poudre nécessaire est mise en solution dans une partie du volume total d'eau distillée.
- Une fois mélangé, le reste d'eau distillée est en rinçant les parois du récipient.
- Il est possible d'accélérer la dissolution en utilisant de l'eau à 45°C – 50°C. le chauffage est parfois nécessaire pour obtenue une mise en solution complète. Dans ce cas, le mélange eau poudre est mis sous agitation dans le cas des milieux gélosés, on attend 5min en agitant fréquemment avant de porter à ébullition.

Le chauffage est parfois nécessaire pour certains milieux contenant de l'agar, de la cystine ou de la gélatine jusqu'à l'ébullition à l'aide d'un agitateur magnétique chauffant.

#### **3-La distribution des milieux de culture :**

La distribution des milieux préparés est effectuée soit manuellement soit à l'aide d'un distributeur automatique avec une précision des volumes.

#### **4-Identification des milieux de culture (étiquetage) :**



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



Les milieux préparés sont identifiés à l'aide d'un marquage indélébile et ceci avant leur stérilisation à l'autoclave, ainsi une étiquette est collée sur le flacon contenant le milieu de culture, cette étiquette spéciale pour la stérilisation et sur laquelle apparaît la mention (sterilised), et comprend les renseignements :

- ❖ Nom du milieu de culture ;
- ❖ Date de fabrication ;
- ❖ Quantité ;
- ❖ Numéro du lot de fabrication ;

**5-stérilisation des milieux de culture :**

Certains milieux ne s'auto clavent pas !

La stérilisation des milieux de culture (pour ceux qui doivent être autoclaves) est effectuée par autoclavage (généralement en 15min à 121°C « programme 6 » pour les volumes inférieurs à 1Litre sauf pour certains milieux qui ne nécessitent qu'une simple ébullition. Dans tous les cas les instructions du fabricant sont suivies scrupuleusement. La qualité de la stérilisation est assurée par l'utilisation d'un papier indicateur de stérilisation et postérieurement par le test de stérilité et de péremption sont notés sur l'enregistrement.

**6-Ajustement du pH :**

Les milieux sont normalement ajustés au pH normal d'utilisation.

Les valeurs trouvées dépendent :

- ❖ De la température du milieu au moment de la lecture,
- ❖ Du traitement thermique appliqué au cours de la reconstitution et de l'autoclavage.

On ne tiendra compte que des pH mesurés après autoclavage et refroidissement à la température d'utilisation ambiante, soit approximativement 25°C.

**7-Préparation des milieux en boîtes de pétri :**

Les milieux gélosés seront coulés dans les boîtes de pétri à des températures ne dépassant pas 50°C afin d'éviter la formation de fines gouttelettes d'eau de condensation dans les couvercles. Le milieu gélosé est laissé ensuite refroidir et solidifier en plaçant les boîtes de pétri avec les couvercles sur une surface horizontale. Avant d'ensemencer en surface, les



boites seront séchées à l'étuve à 37°C de 20 min à 1 heure, en position inversée, couvercle retourne.

### **8-Stockage des milieux préparés :**

La stabilité et la validité des milieux sont limitées dans le temps. Ceux –ci peuvent se conserver de quelques jours à plusieurs mois dans les conditions idéales fixées pour chacun d'entre eux.

On ne doit pas conserver les milieux gélifiés à des températures inférieures à 0°C. Les boites de pétri seront conservées dans des emballages étanches, protégés de la lumière. La liste des différents milieux stockés est automatiquement affichée au niveau du local de stockage. L'enregistrement relatif au contrôle de la température du local de stockage.

### **9-Destruction des milieux contaminés :**

Il est nécessaire de détruire les milieux contaminés (notamment par des germes pathogènes) au moyen d'un traitement thermique approprié, avant de procéder au nettoyage éventuel de la verrerie ou de l'évacuation des déchets plastiques. La destruction thermique des cultures en boites de pétri peut se pratiquer par autoclavage pendant 1heure à 120°C dans des sacs plastiques à point de fusion élevé, pour les tubes contaminés, utiliser l'autoclavage dans les mêmes conditions.

### **10- Les différents types de milieux :**

**Un milieu sélectif :** est un milieu qui favorise la croissance de certaines bactéries au détriment des autres. Ce sont des milieux qui permettent la croissance du microorganisme que l'on recherche en inhibant le développement des autres germes. Ces milieux contiennent donc des agents sélectifs que l'on appelle encore des inhibiteurs tel le cristal violet, le vert brillant, les sel biliaries, les antibiotiques, ainsi quelque substance qui donne l'effet inhibiteur comme le cas des milieux hypertoniques NaCl (régler l'osmolarité d'un milieu), exemple milieu gélose désoxylate-citrate, bouillon de MacConkey, XLD contient le thiosulfate de sodium, trois sucres (lactose, le xylose et le sucrose) et la lysine.

**Milieux naturels ou « empiriques » :** ils ont des composition mal définie. L'exemple le plus simple est celui du bouillon nutritif pour bactéries. Ce sont des milieux de bases.





**Milieux d'enrichissement** : permet à certaines espèces d'en supplanter d'autre, en favorisant la croissance de l'organisme voulu et/ou en inhibant celle des organismes indésirable. Un exemple en est le milieu bouillon sélénite

**Milieux d'isolement** : sont des milieux solides de composition simple sur lesquels de nombreux micro-organismes peuvent se développer. Le plus répandu pour l'isolement des bactéries est sans conteste la gélose nutritive que l'on prépare à partir d'un bouillon nutritif et d'un agent de solidification l'agar ou gélose. Cette substance extraite de certaines algues marines possède la propriété de fixer une grande quantité d'eau (jusqu'à 500 fois son volume) ; soluble dans l'eau à 100°C, elle se gélifie à 40°C. Les bactéries disséminées à la surface d'une gélose nutritive forment autant de colonies qu'il y avait initialement de cellules. Ces colonies, lorsqu'elles sont isolées, permettent de préparer des cultures pures ; elles sont le point de départ d'une étude systématique aboutissant à l'identification.

**Milieux d'identification** : sont des milieux qui servent à mettre en évidence une ou plusieurs propriétés chez un micro-organisme précédemment isolée. Ils existent en grand nombre : certains permettent de rechercher l'utilisation ou la fermentation d'un sucre, la production de gaz (hydrogène sulfuré), la formation d'indole, d'acétylméthylcarbinol (acétoïne).

## **-Recherche de la Flore Mésophile Aérobie Totale (16)**

La recherche de (FMAT) se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution ; l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

### **Pesée , Dilution et Homogénéisation**

- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile, 225ml du milieu liquide Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à l'unité d'analyse.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

### **Isolement et Dénombrement**

- Déposer 1ml de la suspension dans un boîte de pétri stérile.
- Ajouter, par incorporation 15ml du milieu gélosé nutritif Plate Count Agar(PCA)
- Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Recouvrir, l'ensemble ainsi obtenu d'une deuxième couche dite protectrice de 5 ml du gélosé blanche.
- Laisser se solidifier.
- Incuber, l'ensemble ainsi préparé à +30°C durant 24 Heures.
- Dénombrer les colonies petites et blanches caractéristiques de (FMAT) sur (PCA) : Les substances nutritives apportées par la tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose utilisé comme source énergétique favorisent la croissance de la plupart des bactéries.



**Photo N1** : Flore Mésophile Aérobie Totale sur Plate Count Agar (PCA) « LRAVO 2013 »

### **-Recherche des coliformes totaux et des coliformes fécaux(16)**

La recherche des coliformes se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution ; l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

### **Pesée, Dilution et Homogénéisation**

- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile, 225ml du milieu liquide Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à l'unité d'analyse.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

### **Isolement et Dénombrement**

- Déposer 1ml de la suspension dans un boîte de pétri stérile.
- Ajouter, par incorporation 15ml du milieu gélosé sélectif nutritif Gélose lactosée Bilice au cristal violet (VRBL)
- Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Recouvrir, l'ensemble ainsi obtenu d'une deuxième couche dite protectrice de 5 ml du milieu gélosé (VRBL).
- Laisser se solidifier.
- Incuber, l'ensemble ainsi préparé à +44°C durant 24 Heures.
- Dénombrer les colonies violet caractéristiques des coliformes sur (VRBL) : La présence simultanée de cristal violet et des sels biliaries assure l'inhibition des bactéries Gram+ , la fermentation du lactose se traduit par un acidification révélée par le virage au rouge de l'indicateur PH (rouge neutre) et par la précipitation d'acide biliaries autour des colonies.



**Photo N2 :** Coliformes sur Gélose lactosée Bilice au cristal violet (VRBL) « LRAVO 2013 »

### **-Recherche des anaérobies sulfitoréducteurs : (16)**

La recherche des anaérobies sulfitoréducteurs se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution ; l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement.

### **Pesée, Dilution et Homogénéisation**

- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile, 225ml du milieu liquide Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à l'unité d'analyse.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

#### **Isolement et Dénombrement**

- Déposer 1ml de la suspension dans un boîte de pétri stérile.
- Ajouter, par incorporation 15ml du milieu gélosé sélectif Tryptone Sulfite Cyclosérine
- Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Laisser se solidifier.
- Les boîtes doivent être incubées en jarre d'anaérobiose 24h à 37°C.
- Dénombrer les colonies entourées d'un halo noir : la flore contaminant est presque totalement inhibée par la D-cyclosérine qui diminue la taille des halos noir diffus se développe autour des colonies.



**Photo N 3** : Coliformes sur milieu gélosé sélectif Tryptone Sulfite Cyclosérine « LRAVO 2013 »

#### **VIII- Recherche de Staphylococcus aureus: (16)**

La recherche des anaérobies sulfitoréducteurs se fait selon quatre étapes qui sont la pesée, la dilution ; l'homogénéisation, l'isolement et le dénombrement et la confirmation.

#### **Pesée, Dilution et Homogénéisation**

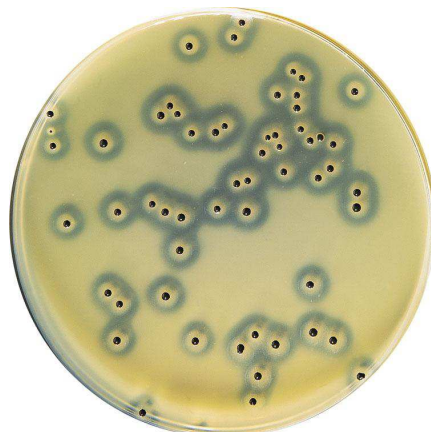
- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile, 225ml du milieu liquide Eau Peptonée Tamponnée (EPT) à l'unité d'analyse.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.

#### **Isolement et Dénombrement**

- Déposer 1ml de la suspension dans un boîte de pétri stérile.
- Ajouter, par incorporation 15ml du milieu gélosé sélectif Baird Parker+jaune d'œuf
- Mélanger l'inoculum au milieu et laisser se solidifier.
- Laisser se solidifier.
- Les boîtes doivent être incubées à 37°C pendant 24h.
- Dénombrer les colonies noires, brillante, entourées d'un halo clair présomptives de *staphylococcus aureus* sur le milieu (BP) : la croissance des staphylocoques est favorisée par les pyruvate de sodium et la glycine, la microflore secondaire est inhibée en présence de chlorure de lithium de tellurite de potassium ainsi que par la forte concentration en glycine, l'enrichissement au jaune d'œuf aide à 'identification en démontrant l'action de la lécithinase. Les caractérisations des *staphylococcus aureus* qui présentent des colonies par réduction du tellurite en tellure et sont entourées d'un halo déclairissent du jaune d'œuf.

### Test de Confirmation

- Repiquer cinq colonies caractéristiques de *staphylococcus aureus* dans le bouillon BHI.
- Incuber, l'ensemble ainsi préparé et bien homogénéisé à 36 °C, pendant 18 Heures/
- Effectuer le Test de Coagulase en transférant 0,5ml de culture BHI ainsi incubé à 0,5 ml de plasma de lapin
- Incuber, à +36°C
- Lire , après 1Heure, 2 Heures,.....
- Si il y a formation d'un culot ferme, le test de la coagulase est dit positif, il y a donc présence de *staphylococcus aureus* et si il y a absence de culot le test de la coagulase est alors négatif, ce qui note l'absence de *staphylococcus aureus* dans l'échantillon analysé.





**PhotoN4** : *staphylococcus aureus* sur du milieu gélosé sélectif Baird Parker« LRAVO 2013 »

### **-Recherche de *Salmonella*: (16)**

La recherche de *salmonella* à partir des aliments, nécessite quatre étapes obligatoires qui sont le pré enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification biochimique et sérologique.

#### **Pré enrichissement**

- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile 225 ml du milieu liquide Eau Peptonnée Tamponnée à l'unité d'analyse préalablement pesée.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
- Incuber l'ensemble ainsi préparé à +36°C, pendant 8 Heures à 12 Heures.

#### **Enrichissement**

L'enrichissement en milieu sélectif liquide ou semi-solide permet de multiplier sélectivement .

les salmonelles dans le cas générale dans cette méthode on utilise 2 milieux sélectifs :le milieu semi-solide Rappaport –vassiliadis (MSRV) qui détecte uniquement les salmonelles mobiles et le bouillon tétrathionate pour les salmonelles peu mobil (Muller –Kauffman).

- Transférer à l'aide d'une pipette stérile 0,1 ml du liquide pré enrichi dans 50 ml de milieu liquide sélectif Rappaport-Vassiliadis(MSRV).

- Transférer à l'aide d'une pipette stérile 1ml du liquide pré enrichi dans 50ml de milieu liquide sélectif Tétrathionate+ 1ml de iodeine + 0.5 ml Novobiocine
- Incuber milieu Rappaport-Vassiliadis(MSRV) à +42°C pendant 18 Heures à 24 Heures , et milieu Tétrathionate 37°C

### Isolement

#### *Isolement du MSR V :*

A partir de la culture obtenue en gélose semi solide de Rappaport vassiliadis si une migration est obtenue sur la boîte de MSR V un isolement est effectuée :

Soit d'emblée sur les deux géloses sélectives :

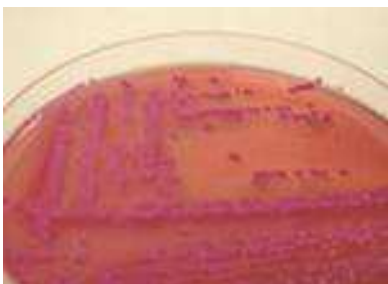
- o gélose xylose de lysine désoxycholate XLD dans ce milieu la désoxycholate assure l'inhibition de la flore contaminante gram+, le xylose est fermenté par presque tous les germes entéropathogène à l'exception des shigella qui sont ainsi différenciées des autres bactéries après avoir utilisé le xylose les salmonelles décarboxylent la lysine en cadavirine ce qui provoque une augmentation de PH en milieu devenu alcalin les colonies de couleur rouge en présence de l'indicateur le rouge de phénol, en milieu alcalin et par réduction de citrate ferrique ammoniacal les germes pathogène producteurs de sulfure d'hydrogène se manifestent par un noircissement qui est du à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies .
- o en autre milieu sélectif solide appropriée c'est GVB

*L'isolement pour tétrathionate se fait comme MSR V*

Puis l'incubation pendant 24h +/- 3 h à 37c° +/- 2c°

Les colonies sont petites, lisse, de couleur rose ou transparente avec virage du milieu au rouge.

Par contre Sur XLD, les colonies sont: rouges à centre noir





**PhotoN5** :colonie de salmonella sur GVB

**PhotoN6**:colonies de salmonella sur XLD

### **-Recherche de *Listeria monocytogenes* :**

La recherche de *Listeria monocytogenes* à partir des aliments, nécessite quatre étapes obligatoires qui sont le pré enrichissement, l'enrichissement, l'isolement et l'identification biochimique et sérologique.

#### **Pré enrichissement**

- Prélever aseptiquement 25g de l'échantillon à analyser.
- Ajouter aseptiquement dans un sac en plastique stérile 225 ml du Fraser Demi à l'unité d'analyse préalablement pesée.
- Mélanger au stomacher, pendant 4 minutes à 5 minutes jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.
- Incuber l'ensemble ainsi préparé à +36°C, pendant 8 Heures à 18Heures.

#### **Enrichissement**

- Transférer à l'aide d'une pipette stérile 0.1 ml du milieu liquide pré enrichissement dans 10 ml de milieu liquide sélectif dit Fraser.
- Incuber l'ensemble ainsi préparé à +36°C pendant 18 Heures.

#### **Isolement Sélectif**

- Ensemencer une oese du milieu liquide enrichissement par striation sur un milieu gélosé sélectif dit Palcam
- Incuber la boites ainsi préparée à +36°C pendant 24 Heures à cinq jours.

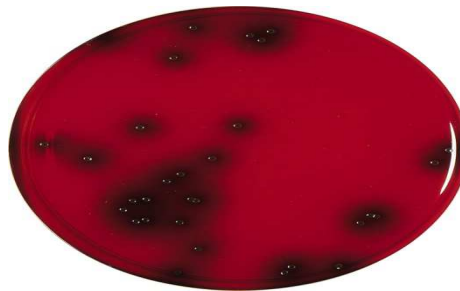


Les colonies caractéristiques de *Listeria monocytogenes* sur le milieu Palcam sont noires et incurvées.

-la polypetone favorise l'excellente croissance des *listeria*

-l'extrait de levure est une source du complexe vitaminique B.

-les *listeria* hydrolysent l'esculine en glucose et en esculetine produite forme un complexe noir en présence des ions ferriques apportés par le citrate de fer.-la microflore secondaire est inhibée par l'association entre le chlorure de lithium la polymyxine et l'acriflavine.



**Photo7** :*Listeria monocytogenes* sur le milieu Palcam « LRAVO 2013 »

## Chapitre V : L'interprétation des résultats

La lecture des boîtes de pétries se fait après l'incubation .

On considère que les colonies sont dénombrables si leur nombre est compris entre 30 et 300. Au dessus 300, elles sont indénombrables, en dessous 30 on considère qu'elles sont trop rares pour être dénombrées.

**-Expression des résultats en Unité Formant une Colonie /g:**



$$N = \frac{\sum C}{1,1d}$$

C :le Nombre de colonie

$\sum C$  :c'est la somme des colonies comptés

-d :le Taux de dilution correspondant à la première dilution

$N$  : Nombre d'UFC par gramme ou par ml de produit initial

### ***1. Le plan a deux classes :***

Deux réponses sont possibles:

présence ou absence d'un micro organisme dans une quantité donnée d'aliment (10 ou 25 g) ce type de réponse concerne certaines bactéries très pathogènes et plus particulièrement dans le cadre des critères de sécurité alimentaire. Aucun tolérance par exemple ni acceptée pour les salmonelles : la qualité d'une denrée ne peut être jugée satisfaisante qu'en l'absence de salmonelle dans 25 g selon les denrées ceci dans les toutes les unités de prélèvement il en est de même pour listeria monocytogenes dans les denrées destinées aux nourrissons ou les autres denrées prêtes à être consommées dans lesquelles listeria est susceptible de se développer de même L'absence d'enterotoxine staphylococcique est exigée pour certains fromages et produits laitier.

### ***2. le plan a trois classes :***

L'interprétation des résultats prend en compte quatre paramètres:

- n: le nombre d'unités de prélèvement
- m et M les limites fixées pour la concentration des microorganismes recherché.



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



- c: le nombre maximum d'unité de prélèvement pour lequel la concentration microbienne peut se situer entre m et M.

Première cas : toutes les valeurs obtenues sont inférieures ou égale à m : la qualité de la denrée sur ce critère est satisfaisante

(Satisfaisante, valeur  $\leq m$ )

Deuxième cas : un maximum de c/n, les valeurs sont comprises entre m et M : la qualité de la denrée est considérée comme acceptable.

(acceptable,  $m \leq \text{valeur} \leq M$ )

Troisième cas : plus de c/n, les valeurs sont supérieures à M : la qualité est considérée insatisfaisante

( non satisfaisante, valeur  $\geq M$ )

**✚ Résultats et discussion :**

**Résultat 1 :** les produits de pêche (crevettes), dilution  $10^{-1}$  :

- Pour FMAT

Les échantillons	I1	I2	I3	I4	I5	Résultat
FMAT	N=10 <sup>3</sup> UFC/g	N=10 <sup>2</sup> UFC/g	N=10 <sup>2</sup> UFC/g	N=10 <sup>3</sup> UFC/g	N=10 <sup>3</sup> UFC/g	Satisfaisant
	N ≤ m	N ≤ m	N ≤ m	N ≤ m	N ≤ m	

La norme est :

$m= 10^5$  et  $M= 10^6$  et  $c= 2$ , Donc les résultats sont Satisfaisants par ce que le nombre d' Unité Formant une Colonie /g est inférieure à m

- Pour les Coliformes fécaux

Les échantillons	I1	I2	I3	I4	I5	Résultat
Coliformes	N=0UFC/g	N=10	N=8	N=20	N=40	Acceptable
Fécaux	$N \leq m$	UFC/g $N = m$	UFC/g $N \leq m$	UFC/g $m \leq N \leq M$	UFC/g $m \leq N \leq M$	

La normes est :

$$m= 10 \quad \text{et} \quad M= 10^2 \quad \text{et} \quad c= 2$$

Donc le résultat est Acceptable par ce qu'on a 2 échantillons entre m et M

- Pour les Staphylococcus aureus

Les échantillons	I1	I2	I3	I4	I5	Résultat
<u>Staphylococcus aureus</u>	N=0UFC/g $N \leq m$	N=0UFC/g $N \leq m$	N=0UFC/g $N \leq m$	N=0UFC/g $N \leq m$	N=0 UFC/g $N \leq m$	Satisfaisant

La norme est :

$$m= 10^2 \quad \text{et} \quad M= 10^3 \quad \text{et} \quad c= 2$$

Donc le produit est Satisfaisant par ce que tous les résultats sont inférieure à m

- Pour les anaérobies sulfite réducteur :

Les échantillons	I1	I2	I3	I4	I5	Résultat
anaérobies sulfite	N=10 <sup>4</sup> UFC/g	N=10 <sup>4</sup> UFC/g	N=10 <sup>2</sup> UFC/g	N=10UFC/g $N \leq m$	N=10 UFC/g	insatisfaisant



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



réducteur	$N \geq M$	$N \geq M$	$N = m$		$N \leq m$	
-----------	------------	------------	---------	--	------------	--

La norme est :

$$m= 10 \text{ et } M= 10^2 \text{ et } c= 2$$

Donc le produit est insatisfaisant par ce que 2 résultats sont supérieure à M .

- Pour les Salmonelles :

Les échantillons	I1	I2	I3	I4	I5	Résultat
Salmonelles	Absence	Absence	Absence	Absence	Absence	satisfaisant

Absence des salmonelles donc le produit est satisfaisant.

**Remarque :** les résultats des autres produits traités pendant la période de stage sont Satisfaisants.

✚ Tableau 3 :Les normes microbiologiques relatives au lait :(17)

DESIGNATION		MICROORGANISME	Coliforme 30° dans 1ml	Coliforme Fécaux 44° dans 1ml	Staphylo- coccus Aureus dans 1ml	Salmo- nella dans 250ml	Escheri- chia coli dans 1ml
Lait cru de vache destiné à la consommation	m	300000	50000	10 <sup>2</sup>	100 UFC/ml	Absen- ce	10 <sup>2</sup>
	M	3000000 n=5, c=2	1000000	10 <sup>3</sup> n=5, c=2	500 UFC /ml n=5 ,c=2	Absen- ce n=5, c=0	10 <sup>3</sup> n=5, c=2

Tableau 4 : Normes microbiologiques relatives aux produits de la pêche (17)

Désignation		Micro- organismes aérobies 30°C /gr	Coliformes 30°C /gr	Coliformes fécaux 44°C /gr	Staphylo- coccus aureus (/gr)	ASR 46°C (/gr)	Salmonella dans 26 gr
Crevettes	m	10 <sup>5</sup>	-	10	10 <sup>2</sup>	10	Absence

cuites décortiquées réfrigérées, congelées ou surgelées	M	$10^6$	-	$10^2$	$10^3$	$10^2$	Absence
		n = 5 ; c = 2		n = 5 ; c = 2	n = 5 ; c = 2	n = 5 ; c = 2	n = 5 ; c = 0

Tableau 5 : Normes microbiologiques relatives aux laits pasteurisés :( 17)

Désignation		Micro-organismes aérobies 30°C /gr	Coliformes 30°C /gr	Coliformes fécaux 44°C /gr	Staphylo- coccus aureus (/gr)	Salmonella dans 26 gr
Lait pasteurisé	m	$3.10^4$	10	Absence	10	Absence
	M	$3.10^5$	$10^2$	Absence	10	Absence
		n = 5 ; c = 2	n = 5 ; c = 2	n = 5 ; c = 0	n = 5 ; c = 0	n = 5 ; c = 0



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



### ***Conclusion et recommandations***

Le contrôle et l'assurance qualité des produits alimentaires comportent toutes les activités entreprises pour assurer la qualité, la sécurité sanitaire et la loyauté des aliments à toutes les étapes, depuis la production primaire, la transformation, le stockage, jusqu'à la commercialisation et la consommation. Ce système a été utilisé pour décrire un effort national complet englobant une approche intégrée qui implique gouvernement et tous les segments et secteurs de l'industrie alimentaire, le contrôle alimentaire est lié à l'amélioration de la santé des populations, du potentiel de développement économique du pays et la réduction de l'altération et pertes de produits alimentaires.

Mon stage s'engage d'une part à la limite des analyses microbiologiques des denrées alimentaires qui constitue un des niveaux très important pour la protection du consommateur et permet des échanges commerciaux sur des bases saines, et d'autre part a pour objectif de faire bénéficier l'étudiant d'une expérience professionnelle d'un laboratoire officiel, à travers notamment la connaissance de son fonctionnement général, et la mise en œuvre dans un cadre professionnel des connaissances acquises dans un domaine spécifique.





**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



Les dix commandements permettant le respect de l'hygiène alimentaire sont prévenir , assainir, puis prévenir et assainir(Tableau6) :

Tableau 6 : Les dix commandements permettant le respect de l'hygiène alimentaire(19)

Prévenir	Eviter les apports En microorganismes	<p>-(Ou) Ne mettre en œuvre qu'un équipement adapté (locaux et matériels) et en parfait état.</p> <p>-(Quoi) N'utiliser que des produits sains et les protéger attention aux mélanges de denrées d'origines différentes. Produits animaux, denrées crues, toujours suspects.</p> <p>-(Qui) Surveiller étroitement la santé et l'hygiène du personnel (porteurs sains, plaies aux mains, hygiène corporelle et vestimentaire, propreté, danger fécal).</p> <p>-(Comment) Eviter le contact des denrées saines avec les secteurs souillés, manipuler correctement, ne pas parler, ne pas fumer, ne pas cracher, savoir goûter et se laver .</p> <p>-(Temps) Denrées de conservation limitée, la consommation doit être la plus rapprochée possible de la préparation.</p>
----------	---	---



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



	Limitier la Multiplication	<p>-(Anti-tiède) la zone de danger (de+65°C à +10°C) doit être traversée dans les deux sens très rapidement (moins de deux heures).</p> <p>-(chaud) respecter la chaine du chaud, maintenir la température supérieure à +65°C de la cuisson à la consommation.</p> <p>-(Froid) respecter la chaine du froid, maintenir la température entre 0°C et 3 °C pour les produits réfrigérés et au-dessous de -18°C pour les produits surgelés (longue conservation ne pas recongeler après décongélation).</p>
Assainir	Détruire les microorganismes	-Respecter les conditions de cuisson ( temps- température) stérilisation ou la pasteurisation.
Prévenir Et Assainir	Conditions Nécessaires à L'application	<p>-Réglementation</p> <p>Contrôle de toute al chaine :produits, matériels, processus, personnel.....).</p> <p>Formation (et information) du personnel en vue de le motiver et de l'impliquer(responsabilisation).</p>



## **Références :**

- (1) Communication privé fournie par le chef de service.
- (2) Règlement (CE) n°213/2001 du 9 janvier 2001 concernant les méthodes pour l'analyse et l'évaluation de la qualité des produits laitiers.
- (3) Loi du 29 juin 1934 relative à la protection des produits laitiers (*Journal Officiel du 1er juillet 1934*)
- (4) [www.universalis.fr/encyclopedie/technologie-agroalimentaire/](http://www.universalis.fr/encyclopedie/technologie-agroalimentaire/)
- (5) Règlement n° 1760/2000/CE du 17 juillet 2000 établissant un système d'identification et d'enregistrement des bovins et concernant l'étiquetage de la viande bovine et des produits à base de viande bovine.
- (6) [fr.wikipedia.org/wiki/Charcuterie](http://fr.wikipedia.org/wiki/Charcuterie)
- (7) -ANONYME : micro-organisms in foods, Their significance and methods of enumeration, 434 pages, University of Toronto Press Editeur, Toronto 1978.
- (8) [http://fr.wikibooks.org/analyse\\_microbiologique\\_des\\_aliments](http://fr.wikibooks.org/analyse_microbiologique_des_aliments).  
-Arrêté du 22 janvier 1993 relatif aux conditions hygiéniques et sanitaires de production.
- (9) American Conference of Governmental Industrial Hygienists (1999)
- (10) Jean-Yves LEVEAU , Marielle BOUIX, jean-paul LARPENT 2001'Sécurité microbiologique des procédés alimentaires).
- (11) -[http://fr.wikibooks.org/analyse\\_microbiologique\\_des\\_aliments](http://fr.wikibooks.org/analyse_microbiologique_des_aliments)
- (12) [http://www.infectiologie.com/site/medias/\\_documents/officiels/afssa/Cperff090207.pdf](http://www.infectiologie.com/site/medias/_documents/officiels/afssa/Cperff090207.pdf)
- (13) <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/bv.fcgi?rid=mmed.section>. 1929. Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- (14) RA GGiannella( 1996). « Salmonella ». in Baron S et al (eds). Baron's Medical Microbiology(4<sup>th</sup> ed). Baron S et al(eds). Baron de la microbiologie médicale.Univ of Texas Medical Branch. ISBN 0-9631172-1-1.
- (15) Conjugated action of two species-specific invasion proteins of fetoplacental listeriosis
- (15)Les groupes microbiens d'intérêt laitier 1992 coordonné par j.Hermier,j.Lenoir et F. Weber.Edition
- (16) Norme ISO 7218 :2007, Microbiologie des aliments règles générales pour les exams microbiologiques.



**Université Sidi Mohamed Ben Abdella**  
**Faculté des sciences et Technique**  
**Département des Sciences de La Vie**



(17) <http://www.onssa.gov.ma/onssa/fr/Redec8.php>

(18) BOKAR DIAGNOSTIC MICROBIOLOGIQUE 5 édition

(19) D'après un document de R.ROSSET du CNERPAC (In :25)