



Projet de fin d'études

Licence sciences et techniques

«Bioprocédés, hygiène et sécurité alimentaires»

*ANALYSES MICROBIOLOGIQUES ET PHYSICO-
CHIMIQUES D'UN ALIMENT TRADITIONNEL :*

KHLIÛ

Au sein de l'Office National de sécurité sanitaire
des produits alimentaires

Présenté par :

-Mlle **Btissame Ferjil**

Encadré par :

-Pr **Mohammed Iraqui**

-Mme **Fadma Gharrabi**

Soutenu le :

Devant le jury composé de :

- Pr **Mohammed Iraqui**

-Mme **Rachida Tlémçani**

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier Allah, le Tout Puissant et le Miséricordieux, de m'avoir donné la santé, la volonté et la patience pour mener à terme ma formation de licence.

Je tiens à présenter mon respect, ma gratitude et mes remerciements à mes encadrants de stage :

- **Professeur Mohammed Iraqui**, pour sa gentillesse, sa disponibilité, son orientation avisée, ses enseignements ainsi ses remarques et ses conseils précieux m'ont beaucoup aidé.
- **Madame Fadma** chef d'unité de microbiologie alimentaire du laboratoire d'ONSSA, pour toute l'aide qu'il m'a apportée pour la réalisation de ce projet, sa compréhension, son accueil.

Mes vifs et sincères remerciements s'adressent au membre du jury, d'avoir accepté de juger ce travail: **Mme Rachida Tlémçani**, professeure à la FST Fès.

Je tiens tout particulièrement à remercier l'équipe du laboratoire, qui m'a beaucoup aidé pour bien mener les missions qui m'ont été confiées ; et surtout pour tout ce que nous avons partagé, notamment leur bonne humeur.

Enfin, un grand merci et une profonde reconnaissance à tous nos professeurs de la FST de Fès pour leurs efforts d'enseignements et de collaboration et pour leur soutien inconditionnel qu'ils nous ont témoigné pendant cette période d'études.

Merci infiniment



Dédicaces

A ma très chère mère Atika

Quoi que je fasse ou que je dise, je ne saurai point de remercier comme il se doit, pour ton aide permanente, ton sacrifice infini et ton affection.

A mon très cher père Aziz

*Tu as toujours été à mes côtés pour me soutenir et m'encourager
Que ce travail traduit ma gratitude et mon affection.*

A tous mes professeurs

*Qui ont réussi à m'inspirer, à me donner confiance en moi et en avenir.
Merci infiniment pour tout ce que vous avez fait.*

A toute ma famille

*Qui m'a accompagné tout au long de mes études, je n'oublierai jamais
l'encouragement et le soutien qu'elle m'a apporté.*

Mes amis et mes copains sans oublier mes collègues

*A ceux qui ont été toujours près de moi.
Merci pour vos soutiens qui m'ont fait une main-forte.
Merci pour être à mes côtés tout au long des moments difficile.*

*Et à tous ceux qui me sont chères,
Je dédie ce travail...*



Résumé

Le Maroc, comme d'autres pays du Maghreb, est connu par des produits carnés traditionnels. Ces produits constituent l'un des anciens patrimoines culturels, à titre d'exemple Lkhliî une recette riche en éléments nutritifs, dotée d'un goût particulièrement délicieux, il est jugé plus sain et peut diminuer les risques des maladies cardiovasculaires. Cependant c'est un aliment périssable, puisqu'il est fabriqué à base de viande (lieu favorable pour la prolifération des microorganismes) ce qui implique un risque potentiel pour les consommateurs.

L'objectif de ce travail est de mettre en évidence la qualité microbiologique et physico-chimique de Lkhliî, pour cette raison 6 échantillons ont été prélevés de différents points de vente (marché traditionnel, des vendeurs dans la ville de Fès), puis transférés au laboratoire ONSSA pour effectuer les analyses microbiologiques, par le dénombrement de la flore mésophile aérobie totale, des entérobactéries, des coliformes totaux et fécaux, des anaérobis-sulfito-réducteurs, *Staphylococcus aureus*, et la recherche des *Salmonelles*. Les deux paramètres suivants ont été également analysés: l'humidité et le taux de protéines.

Les résultats ont montré que Lkhliî présente une humidité moyenne de 31,50 %, ce qui est en accord avec les taux des microorganismes fongique et les levures trouvés ($8,5 \cdot 10^4$ ufc/g), le taux de protéines a été estimé à 40,03 %. Le niveau de contamination de tous les échantillons de Lkhliî varie entre $7,3 \cdot 10^6$ et $1,2 \cdot 10^3$ UFC / g pour la flore mésophile aérobie totale, et entre $5,4 \cdot 10^4$ Ufc/g et $7,4 \cdot 10^6$ Ufc/g pour les staphylocoques.

Ces résultats expliquent l'importance de surveiller la qualité du produit, ainsi de contrôler les conditions de Bonnes Pratiques d'Hygiène (BPH) au cours de processus de fabrication, et la nécessité de mettre en œuvre le plan HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) au niveau des zones de production.

Mots clés : Produit carnés traditionnels, Lkhliî, étude microbiologique, étude physico-chimique

Summary

Morocco, like other Maghreb countries, is known for traditional meat products. These products are one of the ancient cultural heritages, for example Lkhliî a recipe rich in nutrients, with a particularly delicious taste. It is considered healthier and can reduce the risk of cardiovascular disease. However it is a perishable food, since it is made from meat (favorable place for the proliferation of microorganisms) which implies a potential risk for consumers.

The objective of this work is to study the microbiological and physicochemical quality of Lkhliî, for this reason 6 samples were taken from different outlets (traditional market, vendors in the city of Fez), then transferred to ONSSA laboratory to carry out their microbiological analyzes, by enumeration of total aerobic mesophilic flora, enterobacteria, total and faecal coliforms, anaerobic-sulphito-reducers and *Staphylococcus aureus* and *Salmonella* search. Thus the analysis of two physicochemical parameters: moisture and protein content.

The results of the physico-chemical study showed that the average moisture content was 31.50%, which is in agreement with the fungal microorganism and yeast levels found. And the protein level is 40.03%. The level of contamination of all lkhliî samples varies between $7.3 \cdot 10^6$ and $1.2 \cdot 10^3$ CFU / g for the total aerobic mesophilic flora, and between 5.4×10^4 cfu / g, and 7.4×10^6 cfu / g, respectively staphylococci.

These results explain the importance of monitoring the quality of the product, thus controlling the conditions of Good Hygiene Practices (GHP) during manufacturing processes, and the need to implement the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) plan.), at the level of production areas.

Key words: Traditional meat products, microbiological study, physicochemical study

Liste des tableaux

Tableau 1 : Classification des aliments en fonction de leur activité de l'eau et de leur teneur en eau (Leistner et Rôdel, 1976)

Tableau 2 : Normes microbiologiques en vigueur appliquées à la viande et produits carnés crus (bulletin officiel 2004)

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des milieux et conditions de cultures bactériennes

Tableau 4 : Résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et de l'analyse statistique

Tableau 5 : Résultats des deux caractéristiques physico-chimiques des échantillons de Ikhlî

Tableau 6 : Résultats de dénombrement des levures et moisissures

Liste des figures

Figure 1 : Les domaines de recherche et d'analyse au niveau de l'ONSSA

Figure 2 : Etiquette du premier échantillon de Ikhlî

Figure 3 : Schéma de préparation du Ikhlî selon Bennani, 2003

Figure 4 : L'homogénéisation pendant 30s au Stomacher

Figure 5 : Préparation des dilutions décimales

Figure 6 : L'échantillon après séchage à 102°C

Figure 7 : Colonies de la FMAT de l'échantillon 2

Figure 8 : Lecture des résultats des entérobactéries sur le décompteur

Figure 9 : Photos des boîtes de pétri après incubation à 30°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

Figure 10 : Résultats des ASR après incubation à 46°C pendant 24h

Figure 11 : Colonies caractéristiques des staphylocoques sur le milieu BP

Figure 12 : Résultats de la lecture des levures et moisissures

Liste des abréviations

ONSSA : Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires

EPT : Eau Peptonée Tamponnée

FMAT : La flore mésophile aérobie totale (FMAT)

PCA: Plate Count Agar

BP: Baird Parker

VRBG : Violet Red Bile Glucose.

BPH : Bonnes Pratiques d'Hygiène

C : Conforme

NC: Non Conforme

FAO: Food and Agriculture Organization

FISA: Fédération Interprofessionnelle du Secteur Avicole

HACCP: Hazard Analysis Critical Control Point

ISO : International Standard Organisation

OMS: Organisation Mondiale de Santé

UFC: Unité Formant Colonie

TIA : Toxi-infection Alimentaire

St.aureus : *Staphylococcus aureus*

XLD : Xylose-Lysine-Désoxycholate

Sommaire

Introduction.....	1
Présentation de l'établissement d'accueil.....	2
Partie Bibliographique.....	5
I. Généralité sur le produit : Khliî :	5
1. Présentation du produit	5
Historique.....	5
Définition.....	5
2. Valeur nutritionnelle du Khliî	5
II. Transformation de la viande en Khliî (comme méthode de conservation)	6
1. Les opérations unitaires de fabrication du Khliî.....	6
Déshydratation (séchage).....	6
Salaison.....	7
Cuisson	7
2. Les étapes de préparation du Khliî	7
III. Les Germes recherchés dans Lkhliî.....	9
1. La flore mésophile aérobie totale (FMAT)	9
2. Les Entérobactéries.....	9
3. Les coliformes	9
4. Les anaérobies sulfite-réducteurs.....	9
5. <i>Staphylococcus aureus</i>	10
6. Salmonelle	10
7. Levures et moisissure.....	11
IV. Normes microbiologiques d'acceptation de la viande et produits carnés	11
Matériel et méthodes	13
I. Échantillonnage :	14
II. Méthode d'analyse microbiologique :	14
1. Préparation des échantillons :.....	14
2. Préparation des dilutions décimales :.....	15
3. Ensemencement :	15
5. Dénombrement des germes recherchés dans lkhliî:.....	15
6. Expression des résultats de dénombrement :.....	18
III. Méthodes d'analyse physico-chimique de lkhliî :	19
1. Taux d'humidité	19
2. Dosage des protéines.....	19
Résultats et discussion.....	21
I. Résultats et discussion de l'analyse microbiologique du Khliî :	22
II. Résultats et discussion de l'analyse physico-chimique du lkhliî :.....	26
Conclusion	28
Références bibliographiques.....	29
Annexes	30

Introduction

Pour de nombreux pays à travers le monde et depuis plusieurs siècles, les produits carnés traditionnels reflètent une partie intégrale du patrimoine gastronomique et alimentaire. Ils présentent un bien culturel avant d'être une ressource économique. Et le plus important, leurs pratiques de préparation contribue à l'augmentation de la durée de conservation, et à l'amélioration de la saveur ainsi de la qualité nutritionnelle des produits.

Lkhlî est l'exemple le plus répandu au Maroc, il est préparé à partir des morceaux désossés de viande de bœuf, d'agneau, ou de dromadaire. Donc Lkhlî constitue une source importante de protéines animales, ainsi une teneur très élevée en matière grasse. Cependant, lkhlî est un produit plus ou moins périssable. Il peut être une niche très favorable au développement des microorganismes, et souvent associées à des toxi-infections alimentaires. Ceci nécessite de prendre des mesures, afin d'assurer sa salubrité pour garantir la sécurité sanitaires des consommateurs.

De ce fait, mon document s'articule autour de trois parties :

La première partie est consacrée à l'état des connaissances et comporte trois chapitres ; Le premier chapitre pour la présentation du produit analysé, et ses principales caractéristiques. Puis, les opérations unitaires et les étapes de transformation traditionnelles de la viande en Khlî sont détaillées dans le deuxième chapitre. Enfin, les germes recherchés dans le produit sont développées dans le troisième chapitre.

La seconde partie représente la description de la méthodologie adoptée pour la réalisation de l'analyse microbiologique et physico-chimique du produit au sein du laboratoire ONSSA.

Les résultats obtenus sont ensuite exposés et discutés dans la troisième partie et nous achevons notre étude avec une conclusion.

Présentation de l'établissement d'accueil



L'Office National de Sécurité Sanitaire des Produits Alimentaires (ONSSA) est un établissement public doté de la personnalité morale et de l'autonomie financière créée par la loi n° 25-08 et placé sous la tutelle de l'Etat. Il exerce, pour le compte de l'Etat, les attributions relatives à la protection de la santé du consommateur et à la préservation de la santé des animaux et des végétaux. Il est appelé à appliquer la politique du gouvernement en matière de sécurité sanitaire des végétaux, des animaux et des produits alimentaires depuis les matières premières jusqu'au consommateur final, y compris les aliments pour animaux.

L'ONSSA, dispositif institutionnel, a été créé pour appuyer les orientations stratégiques tracées par le Plan Maroc Vert qui ambitionne de faire de l'agriculture un moteur de croissance essentiel dans l'économie marocaine. L'une des composantes de cet ambitieux plan consiste à accompagner la profonde mutation que connaît le système agro-alimentaire et à assurer la sécurité sanitaire des produits alimentaires afin de les rendre plus compétitifs aussi bien sur le marché national qu'international.

Lieu de stage

L'ONSSA possède un organigramme bien détaillé qui se présente comme suit.

A. Section Santé animale

La section Santé Animale, qui se compose de l'unité Biologie Moléculaire, de l'unité Diagnostic Bactériologique, de l'unité Parasitologie-Entomologie, de l'unité Diagnostic de la Rage, et de l'unité Sérologie-Immunologie, assure le diagnostic étiologique des maladies animales, d'origine bactérienne, virale ou parasitaire.

Les principales maladies recherchées sont : les brucelloses, la tuberculose, la paratuberculose, les salmonelles, la pasteurellose, la listériose, les entéro-toxémies, le charbon bactériodiques, la maladie des abcès, les mammites, les métrites, les infections colibacillaires, les loques Européenne et Américaine et les différentes septicémies bactériennes.

B. Section Hygiène alimentaire

La section Hygiène Alimentaire, qui se compose de l'unité Microbiologie Alimentaire, et de l'unité Chimie-Toxicologie alimentaire, assure le contrôle de la qualité microbiologique, et chimique des denrées alimentaires (Autocontrôles et Contrôles officiels).

Activités en Microbiologie Alimentaire

Recherches et dénombrements des germes pour le contrôle microbiologique des aliments tels que le lait et produits laitiers, les produits carnés (tel que Ikhlî notre produit de recherche pour ce mémoire), les produits de la pêche et de la pisciculture, ainsi que les analyses bactériologiques des eaux utilisées dans l'industrie agro-alimentaire ou dans les élevages avicoles et piscicoles.

Activités en Chimie –Toxicologie Alimentaire

Contrôle de la qualité chimique des aliments et recherche de la composition chimique des denrées alimentaires (Laits et produits laitiers, produits carnés, produits de la pêche, Conserves et semi-conserves, Eaux, les aliments des animaux,.....)

Lieu de stage



Figure 1: Les domaines de recherche et d'analyse au niveau de l'ONSSA

Partie Bibliographique

I. Généralité sur le produit : lkhlî

1. Présentation du produit

Historique

Dans les temps anciens, avant l'introduction du réfrigérateur, sans le froid il fallait trouver une méthode pour la conservation de la viande. La solution était de fabriquer certains produits qui font augmenter la durée de conservation tels que : le Khliî, le Gddid, ...etc.

Lkhlî est connu dans plusieurs pays d'Afrique du nord. C'est un produit carné salé, séché, et cuit, préparé le plus souvent après la fête de l'Aïd El Adha. Fabriqué à base de viande, il est en fait une spécialité de la ville de Fès ; jusqu'à nos jours, les familles fassi préparent chaque année leur stock de Khliî. Dans la ville ancienne de Fès, vous trouverez d'innombrables marchands de Khliî.

Définition

Le Khliî est un produit de charcuterie marocain salé, séché et cuit. C'est un aliment de prestige surtout dans certaines villes comme Fès, Moulay Idriss, Marrakech, etc. Il est constitué de deux sortes de matières premières ; les denrées d'origine animale et les ingrédients (Bennani, 2003). Lkhlî est constitué de lanières de viande immergées dans la graisse animale fondue, stockées dans des récipients en verre ou en plastique et conservées à température ambiante.

2. Valeur nutritionnelle du Khliî

La valeur nutritionnelle diffère d'un échantillon à autre, elle dépend de la nature et la masse de la matière première (viande, matière grasse, ingrédients), et de la technique suivie lors de la préparation. Selon l'étiquette de l'un des échantillons analysés, la valeur énergétique est de 2468 KJ pour 100g du Khliî, il contient 20.92g protéines, 57.1g lipides, 1g glucides, 2,2g sel.



Valeurs Nutritionnelles pour 100g		
Humidité / الرطوبة		19g
Glucides / السكريات		1g
Protéines / البروتينات		20.92g
Lipides / الدهون		57.1g
Sodium / صوديوم		0.862g
Sel / الملح		2.2g
Valeur Énergétique / قيمة السعرات الحرارية		2468kj

À conserver à température ambiante, puis au réfrigérateur après ouverture.
D.D.P. - voir date figurant sur la boîte

7, Quartier Industriel Ain Chkef - Fes

Figure 2 : Etiquette du premier échantillon du Khliî

Les viandes, volailles et produits carnés présentent les intérêts nutritionnels des protéines: les protéines animales ont la particularité d'apporter l'ensemble des acides aminés indispensables que l'organisme ne peut fabriquer, d'où l'importance d'effectuer l'analyse de ce paramètre physico-chimique afin d'évaluer la qualité du produit (lkhliî dans notre étude).

II. Transformation de la viande en Khliî (comme méthode de conservation)

La viande est un produit très périssable, de ce fait plusieurs traitements de conservation et de transformation de la viande permettent de prolonger sa durée d'utilisation et de diversifier sa présentation, tels que le séchage, le salage, le fumage, la fermentation, la maturation, la cuisson...etc. C'est pourquoi une large gamme de produits carnés est présente sur les marchés mondiaux afin de satisfaire les demandes des consommateurs.

La majorité des produits à base de viande est soumise à une combinaison de plusieurs étapes de transformation de base avant d'atteindre leur forme finale.

1. Les opérations unitaires de fabrication du Khliî

Déshydratation (séchage)

La déshydratation est l'un des procédés les plus anciens de conservation de la viande. Pratiqué dans les pays d'Afrique et d'Amérique, souvent en association avec la salaison (J.P. Girard.1988).

Au Maroc, la déshydratation combinée avec le salage est appliquée à deux types de produits carnés, kaddid et lkhlî. Elle peut être plus ou moins poussée. Les aliments peuvent être

Partie bibliographique

classés en 3 catégories selon la teneur et l'activité de l'eau (Leistner et Rôdel, 1976), les aliments à haute humidité, les aliments à humidité intermédiaire et les aliments à faible humidité (tableau1).

Tableau 1 : Classification des aliments en fonction de leur activité de l'eau et de leur teneur en eau (Leistner et Rôdel, 1976).

Désignation des aliments	aw	Teneur en eau
à haute humidité	0,9-1,0	50-100
à humidité intermédiaire	0,6-0,9	20-50
à faible humidité	0,0-0,6	0-20

Salaison

Parmi les différents procédés de conservation de la viande, la salaison est l'un des plus anciennement utilisée. Elle consiste en l'incorporation de sel, associé à divers ingrédients ou additifs, dans la viande. Elle est généralement, accompagnée d'un ou plusieurs autres traitements comme : le séchage et la cuisson, qui ont un rôle complémentaire de celui du sel, à savoir l'abaissement du pH, diminution de l'activité de l'eau (R. Goutefongia, 1988).

L'objectif du séchage est de retirer l'eau qui selon le produits, s'élève de 30 à 55%. On vise donc une baisse de la valeur de l' a_w en dessous de 0,93, ceci inhibe la croissance des microorganismes et surtout ceux qui nécessitent une grande teneur en eau. La durée d'entreposage des produits carnés séchés est de 2 à 4 mois (Nguyet, 2008).

Cuisson

La cuisson est le plus souvent appliquée aux viandes et produits carnés dans une phase ultime de préparation avant la consommation. Ce traitement thermique ménager ou industriel, doit être considéré comme une opération de traitement part entière (M.LAROCHE.1983).

2. Les étapes de préparation du Khliû

Le protocole de fabrication se base sur **le salage** et **le séchage**, et **la cuisson** (Bennani, 2003). Brièvement, la viande désossée coupée en lanières est mélangée avec *Sharmula*, qui contient le sel, le cumin, l'huile, la coriandre et l'ail écrasé. Le mélange est conservé à un endroit frais avec un malaxage occasionnel pendant 24 – 36h. La viande marinée est suspendue et laissée sécher au soleil (5 – 7 jours). Après **séchage**, la viande est **cuite** dans une marmite contenant

Partie bibliographique

de l'eau, de la graisse animale et éventuellement de l'huile d'olive avec agitation fréquente jusqu'à l'évaporation complète de l'eau.

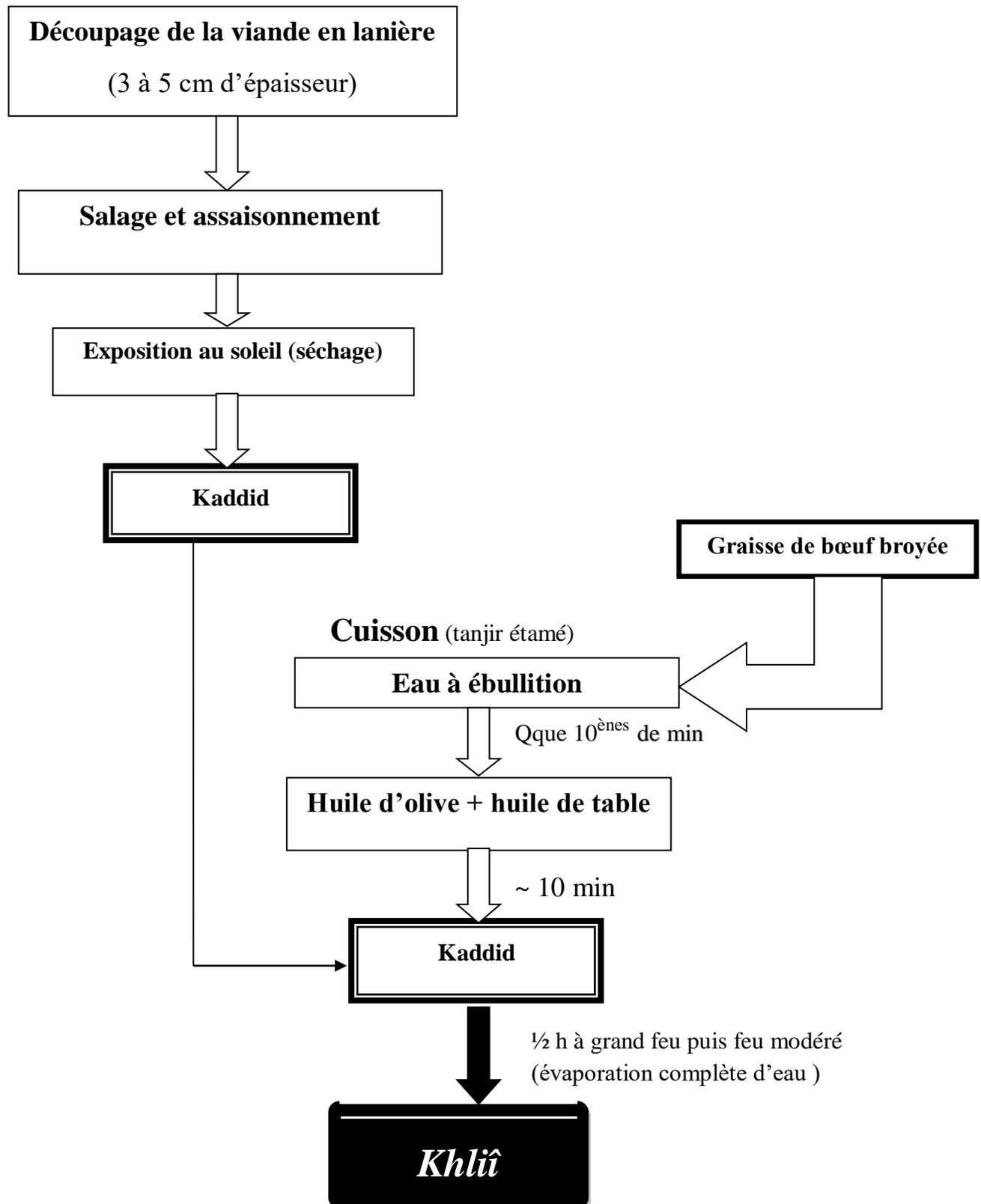


Figure 3 : Schéma de préparation du Ikhlî selon Bennani, 2003

III. Les Germes recherchés dans Lkhliî

Trois types de microorganismes sont conventionnellement recherchés, lors de l'analyse microbiologique de tous les produits alimentaires. Il s'agit des microorganismes responsables de l'altération, des microorganismes indicateurs d'une contamination fécale et des microorganismes pathogènes responsables des toxi-infections alimentaires (TIA).

Parmi les microorganismes responsables de l'altération de notre produit (lkhliî), se trouvent la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et la flore fongique constituée par les levures et les moisissures. Et pour les microorganismes dits indicateurs de contamination fécale, on note les coliformes totaux et fécaux, et dernièrement les pathogènes qui sont les ASR, *staphylococcus aureus*, *salmonelle*.

1. La flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore mésophile aérobie totale est constituée d'un ensemble de microorganismes variés correspondant aux germes banals de contamination qui n'agissent pas sur l'aliment et n'ont de répercussion du point de vue qualitatif (altérations du produit) et hygiénique (santé du consommateur) qu'au-delà d'une certaine quantité. Il est possible d'en tolérer un certain nombre (Guiraud, Rosec. AFNOR.2019)

2. Les Entérobactéries

Les entérobactéries sont des bacilles ou coccobacilles asporulés Gram-. La plupart des espèces sont mobiles grâce à une ciliature et d'autres sont capsulées. Les espèces pathogènes possèdent des pili communs, qui sont des facteurs d'adhésion.

Elles sont des aéro-anaérobies, oxydase-, fermentent le glucose et réduisent le nitrate. Elles se répartissent en deux groupes métaboliques selon leur type de fermentation : fermentation acide mixte ou butylène glycolique.

3. Les coliformes

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Ils se développent à une température spécifique, forment des colonies rouge dans la gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL).

4. Les anaérobies sulfite-réducteurs

Les anaérobies sulfite-réducteurs se présentent sous forme de bactéries Gram (+), se développant en 24h sur une gélose Viande Foie en donnant des colonies typiques réduisant le

Partie bibliographique

sulfite de sodium (Na_2SO_3) qui se trouve dans le milieu, en sulfure qui en présence de Fe^{2+} donne FeS (sulfure de fer) de couleur noire.

5. *Staphylococcus aureus*

Les staphylococcus sont des coques à Gram positif d'un diamètre d'environ un micron groupés en amas à l'examen microscopique. Ils sont immobiles non sporulés et non capsulés.

Staphylococcus aureus se cultive facilement sur milieux ordinaire, en aérobiose comme en anaérobiose ; sur milieu solide, il forme des colonies bombées, lisses, luisantes et plus ou moins pigmentées en jaune or d'où l'appellation de staphylocoque « doré » (aureus). Il n'a pas d'exigences particulières et tolère de grandes variations de conditions de croissance, les conditions idéales étant une température de 37°C et un pH de 7.

Les *St. aureus* expriment des caractères qui les différencient des autres staphylocoques : ils possèdent notamment une coagulase. Ils sont des germes pyogènes responsables d'infection de la peau et des muqueuses qui sont parfois le point de départ de suppurations profondes ou d'infection générales.

Le principal réservoir du germe est constitué par la peau et les muqueuses de l'homme, malades ou non : on trouve 30 à 50 % de porteurs sains.

Les aliments dangereux sont nombreux (en générale, ils sont riches en protéines) : viandes, produits carnés, fromages, produits à base de lait ou d'œufs... Ce type d'intoxication est un des plus courants dans l'alimentation

6. Salmonelle

Le germe salmonelle appartient à la famille des *Enterobactériaceae*, ce sont des bacilles Gram négatifs, aéro-anaérobies facultatifs, souvent mobiles grâce à leur ciliature péritriche et non sporulés. ils fermentent le glucose avec production de gaz, réduisent les nitrates en nitrites et possèdent la catalase mais ne possèdent pas le cytochrome oxydase (Lrpent et Larpent-Gourgand, 1985)

Salmonelle utilise le glucose comme source de carbone, c'est-à-dire Glu+. Par contre elle n'utilise pas le lactose comme source de carbone, donc elle est Lac-.

Le principal réservoir des salmonelles est surtout animal, mais aussi humain.

Partie bibliographique

7. Levures et moisissure

Les levures et les moisissures sont largement répandues dans l'environnement. On les trouve, entre autres, dans l'eau, le sol, les débris organiques, sur les plantes et les produits de plante, les grains, les fruits, les légumes et les noix... etc. Certaines d'entre elles font partie de la flore normale de divers produits alimentaires. On les utilise dans les processus de fermentation de boissons, de charcuteries, de fromages et de pain, ainsi que pour la production d'antibiotiques. Elles se développent sur des substrats variés, habituellement peu favorables à la croissance bactérienne : aliments de pH acide, à faible teneur en eau, à haute teneur en sucre ou en sel, etc.

Lorsqu'elles prolifèrent dans les aliments et que leurs populations atteignent des niveaux excessifs, les levures et les moisissures peuvent occasionner la détérioration des produits (goût, texture, apparence) et entraîner des pertes économiques importantes.

Certaines espèces de moisissures synthétisent des métabolites toxiques, les mycotoxines (aflatoxines, lactones, certains stéroïdes), dans certaines conditions, ce qui les rend potentiellement pathogènes pour l'homme. Des cas d'intoxication alimentaire ont été attribués à des mycotoxines. Certaines mycotoxines seraient aussi cancérigènes. La gravité dépend aussi de l'importance et de la durée de l'exposition.

Certaines spores de levures et de moisissures résistent à la chaleur, à la congélation, aux antibiotiques et à l'irradiation. Il s'avère essentiel de contrôler la qualité des produits alimentaires et de leur origine.

IV. Normes microbiologiques d'acceptation de la viande et produits carnés

Le but principal de l'établissement des normes microbiologiques est de protéger la santé des consommateurs. En effet, la sécurité des consommateurs et la durée de conservation des denrées alimentaires, sont étroitement liées à leur flore microbienne. Ainsi ces normes jouent un rôle très important lors des échanges commerciaux de ces produits entre pays.

Pour la viande et produits carnés, les normes marocaines en vigueur sont celles décrites dans le bulletin officiel sous le titre « Denrées animales-normes microbiologiques », arrêté conjoint du ministre de l'agriculture et du développement rural, du ministre de la santé et du ministre de l'industrie du commerce et des télécommunications n° 5214, P 727 du 17 Safar 1425 (08 avril 2004).

Partie bibliographique

Le tableau au ci-dessous résume les normes correspondant à la viande et produit carné:

Tableau 2 : Normes microbiologiques en vigueur appliquées à la viande et produits carnés crus (bulletin officiel 2004)

<i>Désignation</i>		<i>Germes</i>	<i>Coliformes</i>	<i>Coliformes</i>	<i>S.</i>	<i>ASR</i>	
		<i>totaux</i>	<i>totaux</i>	<i>fécaux</i>	<i>aureus</i>	<i>ufc/g</i>	<i>Salmonella</i>
		<i>ufc/g</i>	<i>ufc/g</i>	<i>ufc/g</i>	<i>ufc/g</i>		
<i>Viande et produits carnés crus</i>	M	5.10^6	-	5.10^2	5.10^2	10^2	<i>Absence</i>
<i>charcuteries crus</i>	M	-	-	10^3	5.10^3	5.10^2	<i>Absence</i>
<i>charcuterie cuite</i>	M	3.10^6	10^4	10^2	10^3	3.10^2	<i>Absence</i>

M : Limite maximale de conformité

Matériel et méthodes

Partie pratique

I. Échantillonnage :

Le prélèvement a été mené à Fès de différents points de vente. 6 échantillons de Ikhlif ont été ramenés au Laboratoire Régional d'Analyses et de recherches-Meknès.

II. Méthode d'analyse microbiologique :

L'analyse ou la recherche des microorganismes dans notre produit nécessite sept étapes qui sont **la pesée, la solubilisation, l'homogénéisation, la dilution, l'isolement, l'incubation et le dénombrement.**

1. Préparation des échantillons :

Préparation de la suspension mère :

La suspension mère est la première dilution $1/10$ (10^{-1}) préparée à partir d'un produit solide (la viande du Khlif). C'est l'étape de la solubilisation.

En générale, 25g d'aliment sont broyés dans 225 ml du milieu liquide : Eau Peptonée Tamponnée (*EPT*), puis Mélangés au Stomacher (agitateur), pendant 30s, jusqu'à l'obtention d'un mélange homogène.



Figure 4 : L'homogénéisation pendant 30s au Stomacher

Les trois premières étapes (pesage, solubilisation et homogénéisation) sont communes pour l'analyse de tous les germes.

Après l'homogénéisation des échantillons au Stomacher, on les laisse une période de 30 min pour la revivification des germes.

Partie pratique

2. Préparation des dilutions décimales :

A partir de la solution mère, 1ml est introduit dans un tube contenant 9ml de Tryptone Sel (TS), à l'aide d'une pipette graduée stérile, C'est la dilution 1/100 (10^{-2}). La dilution 1/1000 (10^{-3}) sera préparée de la même façon mais à partir de la dilution précédente. Il est souvent nécessaire d'aller jusqu'à la dilution 10^{-5} .

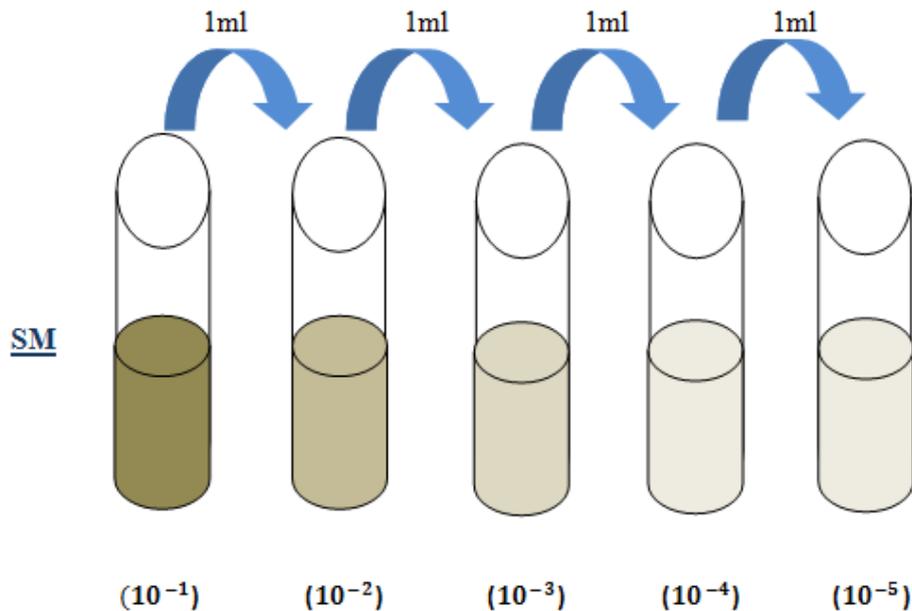


Figure 5 : Préparation des dilutions décimales

3. Ensemencement :

On ensemence 1ml de l'échantillon dans chaque boîte de pétri (ensemencement en profondeur), puis on coule le milieu de culture spécifique au germe analysée.

Lors de la recherche de *salmonelle*, l'ensemencement est effectué par la méthode des stries.

4. Incubation:

Chaque germe analysé se caractérise par une température optimum d'incubation.

5. Dénombrement des germes recherchés dans Ikhlî:

5.1/ Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (NF EN ISO 4833-1)

Ces flores sont isolées et dénombrées sur milieu de culture gélosés PCA (*plat count Agar*) après ensemencement en profondeur selon le protocole suivant:

On porte aseptiquement 1 ml des dilutions décimales allant jusqu'au 10^{-5} dans des boites de Pétri, on complète ensuite avec environ 15 ml de gélose PCA fondue et refroidie

Partie pratique

préalablement. On homogénéise le contenu en effectuant des mouvements circulaires et de « va-et-vient » en forme de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale de façon stérile (travail dans l'hôte à flux laminaire), pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose. Une fois la gélose refroidie, les boîtes sont incubées couvercles en bas à 30 °C durant 72 heures.

5.2/ Dénombrement des entérobactéries

Cette méthode est basée sur le dénombrement de toutes les entérobactéries viables fermentant le lactose sur gélose VRBG (Violet Red Bile Glucose).

On porte aseptiquement 1 ml de la solution mère et des dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles préparées et numérotées. Puis on coule environ 15 ml de gélose VRBG fondue, et on laisse se refroidir. Après solidification du milieu, les boîtes sont incubées pendant 24h à 37°C couvercles en bas.

5.3/ Dénombrement des coliformes

Pour ce dénombrement on utilise le milieu gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL). Le protocole est le même pour les entérobactéries, cependant l'incubation se fait à 30°C pour les coliformes totaux (NM ISO 4832), et à 44°C pour les fécaux (NF V 08-060).

5.4/ Recherche et dénombrement des Anaérobies sulfito-réducteurs (NF V 08-061)

Dans des tubes contenant 20 ml du milieu TSC, on ajoute 0,2 ml du D-Cyclosérine (supplément), puis on introduit 1ml de la solution mère ou des dilutions décimales, ensuite on les incube à 46°C, pendant 24h.

5.5/ Recherche de *Staphylococcus aureus* (NM ISO 6888-2)

Dans des boîtes de pétri contenant le milieu gélosé sélectif *Baird Parker* (BP), auquel on a ajouté le jaune d'œuf (supplément), 0,1 ml de la suspension mère ou des dilutions décimales est étalé. Ensuite, on incube les boîtes ainsi préparées, à 37°C pendant 24 heures.

Les colonies sont noires, brillantes, entourées d'un halo clair, présomptives de *Staphylococcus aureus* sur le milieu BP.

Confirmation

On a réalisé le test coagulase comme étape principale pour confirmer qu'il s'agit de *staphylococcus aureus*, suivi par la galerie Api.

Partie pratique

5.6/ Recherche des Salmonelles (NM ISO 6579)

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

Pré-enrichissement

Cette étape de pré-enrichissement consiste à incuber le broyât (de 25 g d'échantillon dans 225 ml de milieu eau peptonée tamponnée) à 37 °C pendant 24 heures.

Enrichissement

On transfère, à l'aide d'une pipette stérile, 0,1 ml du milieu liquide pré-enrichi dans 10 ml de milieu liquide sélectif *Rappaport-Vassiliadis* (RV) et 1ml dans 10ml de milieu liquide sélectif *MKTTn* (*bouillon de müller-kauffmann au tétra-thionate-novobiocine*) ; on ajoute 0.2 ml *iodine* +0.1 ml de *Novobiocine*. Et puis on incube à 37 °C pendant 24 heures. Les colonies incolores et jaunâtres, de diamètres supérieurs à 5 mm, avec ou sans centre noir (production de H₂S) sont des colonies présomptives de *Salmonella* (CUQ, 2007).

Isolement sélectif

On ensemence, une petite quantité des deux milieux liquide enrichi, sur le milieu gélosé sélectif *Hektoen* et sur le milieu *XLD* (Xylose-Lysine-Désoxycholate), puis on incube les boîtes de Petri à 37°C, pendant 24 Heures. Les colonies caractéristiques de Salmonella sur le milieu gélosé sélectif *Hektoen* sont de couleur bleu vert avec ou sans centre noir, et sur l'autre milieu *XLD* sont des colonies rouges avec un précipité noir de sulfure de fer au centre.

Identification

L'identification des colonies caractéristiques de Salmonella est basée sur la recherche des caractères biochimiques (oxydase, catalase etc.). Puis on confirme par l'Api 20 E.

5.7/ Dénombrement de la flore fongique et levures (NM ISO 6611)

Après ensemencement en surface de 0.1ml de la solution mère et des dilutions décimales successives et incubation des boîtes de pétri à 25°C pendant 2 à 5 jours. Le dénombrement est réalisé par comptage des colonies ayant poussé sur milieu OGA. Toutes les colonies d'aspect lisse ou filamenteux sont comptées.

Partie pratique

Tableau 3 : Tableau récapitulatif des milieux et conditions de cultures bactériennes :

Germe recherché	Milieu de culture	Condition d'incubation T°C/temps	Aspect des colonies
FMAT	PCA	30 °C / 72h	Colonies Blanches
Entérobactéries	VLBG	37 °C / 24h	Colonies Rouges
Coliforme Totaux	VLBR	30 °C / 24h	Colonies Rouges
Coliforme Fécaux	VLBR	44 °C / 24h	Colonies Rouge
<i>Staphylococcus aureus</i>	BP + jaune d'œuf	37 °C / 24h	Colonies jaunes
ASR	TSC + D- Cyclosérine	46 °C / 24h	Noire entourées d'un halo
Levures- moisissures	OGA	25 °C / 5jrs	Lisses, filamenteux

6. Expression des résultats de dénombrement :

Pour l'expression des résultats de dénombrement on utilise la formule ci-dessous :

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n1 + 0,1 \times n2)d}$$

C : somme des colonies comptées sur deux boîtes de deux dilutions successive

V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

n1 : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;

n2 : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;

d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue (d=1 pour l'échantillon non dilué, d=0,01 pour 1/100ième etc.).

III. Méthodes d'analyse physico-chimique de Ikhlî :

1. Taux d'humidité

L'humidité représente la quantité d'eau contenue dans l'échantillon.

Mode opératoire

On pèse 2g de chaque échantillon, la quantité pesée est placée dans une capsule, et séchée à 102°C jusqu'à poids constant.



Figure 6 : l'échantillon après séchage à 102°C

Les échantillons sont à nouveau pesés et l'humidité de chacun est ainsi déterminée selon la formule suivante :

$$\text{Humidité \%} = \frac{P(\text{avant}) - P(\text{après})}{P(\text{prise d'essai})} \times 100$$

$P(\text{avant})$: Poids avant séchage = poids vide du capsule + prise d'essai

$P(\text{après})$: Poids après séchage

$P(\text{prise d'essai})$: Poids de la quantité pesée (2g)

2. Dosage des protéines

Méthode de KJELDAHL :

La détermination de la teneur en protéines a été effectuée par la méthode de référence de *KJELDAHL* suivant la méthode AOAC (AOAC, 2000). Il s'agit de déterminer cette teneur de façon indirecte, par calcul à partir de la teneur en azote. Le principe du dosage est décrit ci-dessous.

Sous l'effet de la chaleur, l'échantillon est minéralisé par l'acide sulfurique en présence d'un catalyseur.

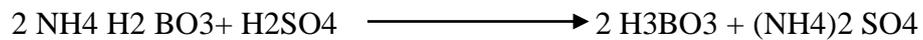
Partie pratique



L'ammoniac est distillé puis fixé dans une solution d'acide borique à 4% avec un indicateur coloré après alcalisation du minéralisât à l'aide d'une base forte (NaOH, 40%).



Le titrage est réalisé par l'acide sulfurique (0,1 N) en présence d'un indicateur coloré.



Pour quantifier la teneur en matières azotées totales, la teneur en azote estimée par digestion de l'ensemble de l'échantillon est multipliée par le coefficient 6,25 (AOAC, 2000).

Les deux formules de calcul sont les suivantes :

$$\% \text{ Azote} = \frac{V \times 0,1 \times 1,4}{m}$$

$$\% \text{ Protéine} = \% \text{ Azote} \times 6,25$$

Résultats et discussion

I. Résultats et discussion de l'analyse microbiologique du Khliï :

1. La flore mésophile aérobie totale (FMAT)

La flore mésophile aérobie totale inclut toutes les bactéries capables de se développer en aérobiose et à températures moyennes, ce sont des microorganismes indicateurs d'hygiène des aliments, et leur dénombrement donne une idée générale sur la flore présente dans l'aliment (lkhliï pour notre étude).

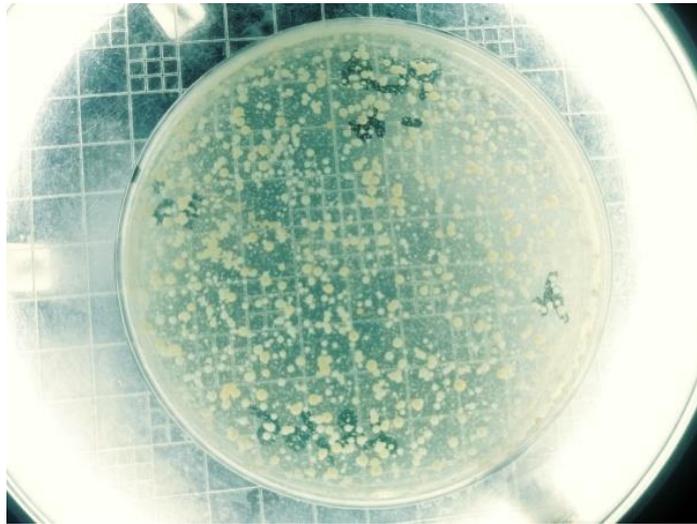


Figure 7 : colonies de la FMAT de l'échantillon 2

Les résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale sont représentés dans le tableau3

Tableau 4 : Résultats de dénombrement de la flore mésophile aérobie totale et de l'analyse statistique

Les échantillons prélevés	1	2	3	4	5	6
Dénombrement	$6,2 \times 10^4$	$7,3 \times 10^6$	$3,4 \times 10^3$	$5,2 \times 10^5$	$4,6 \times 10^3$	$1,2 \times 10^3$

La moyenne de contamination en FMAT de tous les échantillons est de l'ordre de $2,2 \cdot 10^6$ UFC/g. Elle est plus supérieure à celle trouvée par Bennani en 2003. En principe ce taux doit

Partie pratique

s'annuler après la cuisson que subit le Khliif. Ce qui suggère que la contamination du Ikhlif par ces microorganismes est survenue après sa fabrication.

2. Les Entérobactéries

Le taux des entérobactéries est nul dans tous les échantillons de Ikhlif.

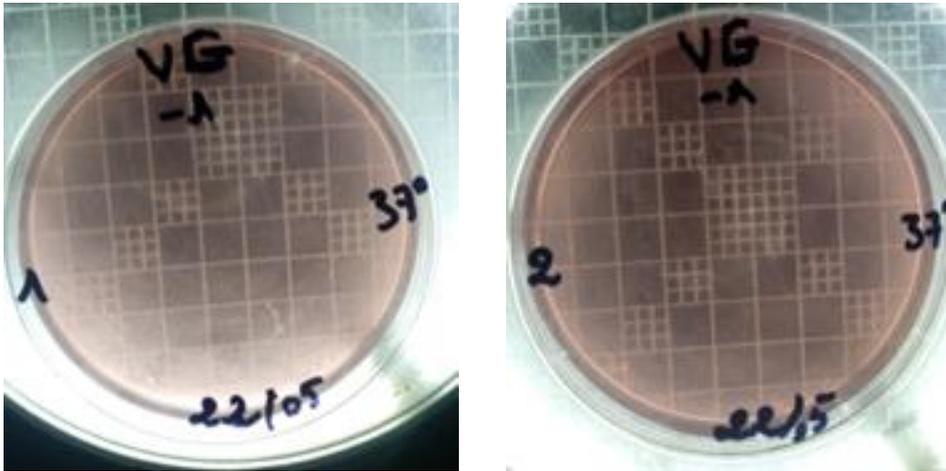


Figure 8 : lecture des résultats des entérobactéries sur le décompteur

Le résultat du dénombrement des entérobactéries témoigne des bonnes conditions hygiéniques dans lesquelles la viande a été transformée. Cependant le résultat obtenu par Bennani est élevé par rapport à celui-ci.

3. Les coliformes

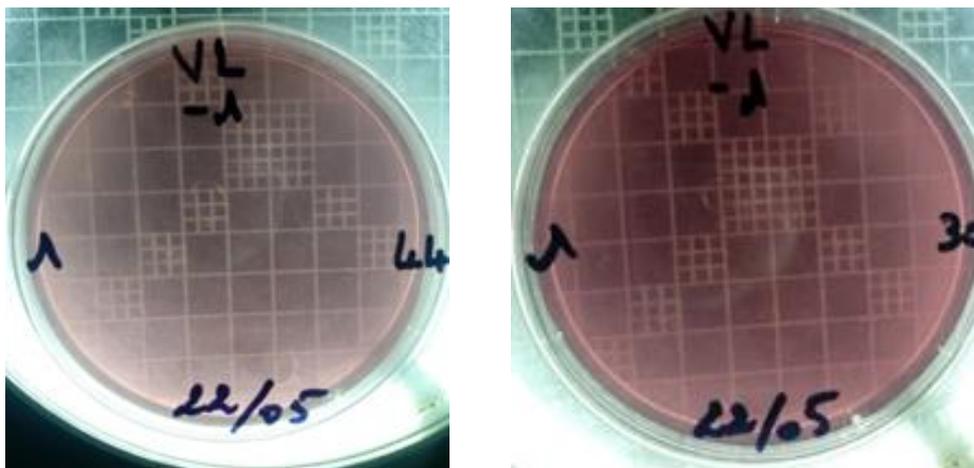


Figure 9 : photos des boîtes de pétri après incubation à 30°C pour les coliformes totaux et à 44°C pour les coliformes fécaux.

Partie pratique

Ces résultats montrent un niveau de population des microorganismes d'origine fécale relativement bas dans les quatre échantillons, et nul dans les autres échantillons.

4. Les anaérobies sulfite-réducteurs

Les anaérobies sulfite-réducteurs n'ont pas été détectés dans les échantillons du lkhlî.

Le même résultat a été trouvé par Bennani en 2003.

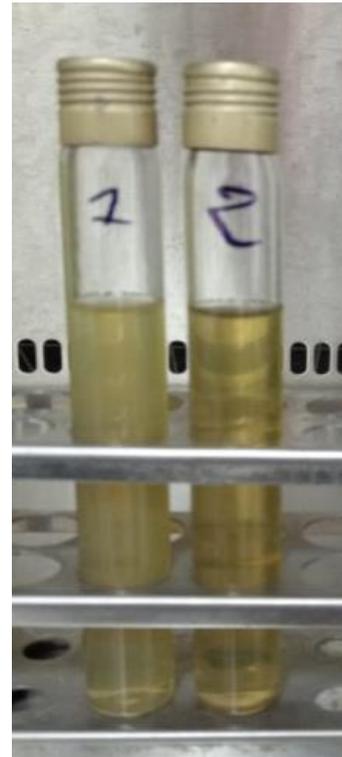


Figure 10 : résultats des ASR après incubation à 46°C pendant 24h

5. *Staphylococcus aureus*

Les staphylocoques sont des microorganismes ubiquitaires qui se trouvent naturellement sur les aliments, surtout crus. Ces microorganismes ne sont pas dangereux quand ils sont ingérés dans les aliments, mais quand ils se multiplient dans l'aliment au cours de l'entreposage, ils peuvent devenir dangereux par les toxines qu'ils secrètent (Bennani, 2003).

Les staphylocoques pathogènes sont représentés surtout par l'espèce *St.aureus* qui présentent contrairement aux autres espèces non pathogènes, une enzyme qui coagule le plasma.

Dans notre étude la flore staphylocoque dans les échantillons de lkhlî est importante. En effet, la valeur minimale détectée au niveau de l'échantillon 6 est de 5.4×10^4 Ufc/g, alors que la valeur maximale est de $7,4 \times 10^6$ Ufc/g au niveau de l'échantillon 2, ce qui peut témoigner d'un danger potentiel d'intoxication par ces microorganismes.

Partie pratique

Les titres bactériens détectés sont très élevés par rapport à ceux trouvés par Bennani en 2003, on peut les expliquer par la thermostabilité. En effet une simple cuisson reste inefficace pour la destruction de ces germes.

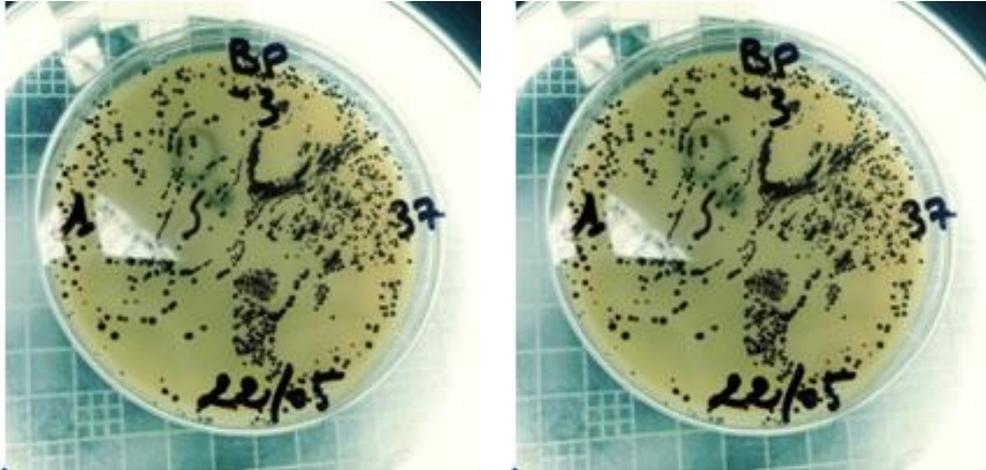


Figure 11 : colonies caractéristiques des staphylocoques sur le milieu BP

6. Salmonelle

Les Salmonelles n'ont pas été détectées dans les échantillons de Ikhlî analysés.

7. Levures et moisissures



Figure 12 : résultats de la lecture des levures et moisissures

Tableau 5 : Résultats de dénombrement des levures et moisissure

	1	2	3	4	5	6
Levures	$2,5 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^3$	$1,2 \cdot 10^5$	$3,5 \cdot 10^5$	$1,2 \cdot 10^4$	$1,6 \cdot 10^3$
Moisissure	40	10	60	10^2	25	8

Partie pratique

Ces résultats montrent que le taux de ses germes est élevé par rapport à celui trouvé par Benanni en 2003, ce qui pourrait être expliqué par une humidité élevée des échantillons, celle-ci est due principalement à une mauvaise application des procédés de séchage et de cuisson. En plus des conditions de stockage, effectivement une simple exposition du produit à l'air peut être à l'origine d'une éventuelle réhydratation permettant l'augmentation de l' a_w et par conséquent la croissance des microorganismes.

Discussion et conclusion

Ces contaminations par différents germes, la FMAT, les *S. aureus*, les levures et moisissures, peuvent avoir des sources multiples. La chaîne de fabrication alimentaire étant complexe, chaque étape de cette chaîne contribuera à son tour à la contamination du produit. Lors de la préparation des différents produits carnés, le fabricant ou le préparateur commence par le traitement des abats. Au cours de cette opération il est difficile d'éviter le contact entre les abats frais mis à l'air et ceux qui sont préalablement souillés. De plus, il faut mentionner que la matière première peut se contaminer pendant le transport, stockage ou même au point de vente à l'air libre et à température ambiante.

II. Résultats et discussion de l'analyse physico-chimique du Ikhlî :

Les résultats des analyses physico-chimiques des échantillons de Ikhlî commercialisé sont résumés dans le tableau suivant :

Tableau 6 : Résultats des deux caractéristiques physico-chimiques des échantillons de Ikhlî :

Échantillons	%Protéines	%Humidité
1	34,17	31,34
2	37,55	29,96
3	44,47	34,81

Partie pratique

4	39,00	36,93
5	43,33	30,50
6	41,69	25,5

Humidité :

Le tableau 4 montre que, l'humidité de l'ensemble des échantillons de lkhlî est comprise entre 25,5 % et 36,93 %, soit une valeur moyenne de 31,50 %. Cette variation de l'humidité entre les différents échantillons est expliquée par le degré du séchage de chaque échantillon de lkhlî, et aussi par le degré d'évaporation de l'eau au moment de la cuisson. En effet lkhlî qui subit un bon séchage et une bonne cuisson doit présenter une humidité faible (échantillon6), par contre une humidité élevée indique que l'échantillon (échantillon4) n'a pas subit une bonne déshydratation, ou bien sa cuisson n'était pas achevée jusqu'à évaporation complète de l'eau.

Protéines :

D'après le tableau 4, le taux moyen en protéines est de 40,03 %. Cette teneur est largement supérieure par rapport à celles d'autres produits carnés du marché marocain.

Du point de vue qualitatif, le procédé de transformation (séchage, fermentation, cuisson, fumage) et l'utilisation des épices provoquent des modifications physiques, mécaniques et biochimiques entraînant une dénaturation des protéines. Ceci pourrait expliquer la différence de la teneur en protéines dans les produits carnés.

Conclusion

Cette étude concerne l'évaluation de la qualité microbiologique et physico-chimique du KHLII vendu dans la ville de Fès, par le dénombrement de la flore indicatrice des conditions d'hygiène (FMAT) et la recherche des bactéries pathogènes représentées par les salmonelles, et les *St.aureus*.

Le choix du KHLII pour l'analyse est basé sur des critères, d'une part sa forte consommation au Maroc, et d'autre part, c'est un aliment périssable et apte à être contaminé facilement par plusieurs germes.

La méthode utilisée pour mettre en évidence la présence des germes pathogènes et indicateurs d'hygiène est basée sur la culture et le dénombrement des colonies. Cette étude s'est intéressée également à la détermination du taux d'humidité et au dosage des protéines des six échantillons KHLII analysés.

Les résultats obtenus montrent une forte contamination des échantillons analysés par les microorganismes (FMAT, staphylocoques, levures et moisissures), ce qui constitue un danger potentiel qui peut menacer la santé publique. En plus, les taux d'humidité détectés pour les différents échantillons ont été très importants, ce qui traduit une mauvaise opération de séchage lors de la préparation et peut favoriser le développement des microorganismes. Ces résultats montrent qu'il faut renforcer le contrôle dans les différents points de fabrication, ainsi de vente.

Références Bibliographies

Références bibliographiques

Joseph-Piere Guiraud, Jean-Philippe Rosec. AFNOR.2004. Pratique des normes en microbiologie alimentaire.

J.P. GIRARD. Technique et Documentation – Lavoisier, 1988. INRA. Technologie de la viande et des produits carnés

Laila BENNANI. 2013. Thèse. Qualité de certains produits carnés traditionnels marocains : Etude microbiologique, physico-chimique et amélioration de la technologie de fabrication

LEISTNER & RODEL. The stability of intermediate moisture food with respect to microorganisms, 1976.

LARPENT J.P & LARPENT-GOURGAND M. Elément de microbiologie. 1985. Herman éditeur des sciences et des arts

AOAC (Association of Official Analytical Chemists), 2000. Official methods of analysis of AOAC international (17th edition). USA.

Nguyet Thu HO Thi. THÈSE, UNIVERSITÉ BORDEAUX 1 ECOLE DOCTORALE DE SCIENCE DE LA VIE ET DE LA SANTE, Décembre 2008

Annexes

Tryptone-sel

Domaine d'utilisation : Le bouillon Tryptone-sel est un diluant destiné à la préparation des suspensions mères de laits en poudre et concentrés, de produits laitiers et d'autres produits alimentaires en vue de leur analyse microbiologique. Il est également utilisé pour effectuer les dilutions décimales.

Principes : La Tryptone assure la revivification des microorganismes ayant subi des traitements sublétaux. Le chlorure de sodium permet d'obtenir une solution isotonique.

Formule-type : Pour 1 litre de milieu :

- Peptone..... 1,0 g
- Chlorure de sodium.....8,5 g



Gélose pour dénombrement (PCA)

Domaine d'utilisation : La gélose glucosée à l'extrait de levure, appelée par les Anglo-Saxons « Plate Count Agar » ou PCA, est utilisée en bactériologie alimentaire pour le dénombrement des bactéries aérobies psychrotrophes, mésophiles dans le lait, les viandes, les produits à base de viande, les autres produits alimentaires, ainsi que pour l'analyse des produits pharmaceutiques, des produits cosmétiques et de leurs matières premières.

Principes : Les substances nutritives apportées par la Tryptone, les facteurs vitaminiques de l'extrait de levure et le glucose (source énergétique) favorisent la croissance de la plupart des bactéries à dénombrer.

Formule – type : Pour 1 litre de milieu :

- Tryptone 5,0 g
- Extrait auto-lytique de levure..... 2,5 g
- Glucose 1,0 g
- Agar agar bactériologique 12,0 g



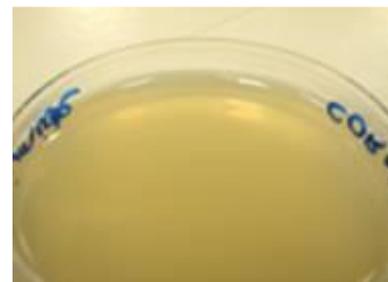
Gélose glucosée à l'oxytétracycline (base OGA)

Domaine d'utilisation : La gélose glucosée à l'oxytétracycline est utilisée pour la recherche et le dénombrement des levures et des moisissures dans les produits alimentaires et les produits cosmétiques.

Principes : La croissance des levures et des moisissures est favorisée en présence de glucose et d'extrait de levure. L'addition extemporanée d'oxytétracycline ou de chloramphénicol ou de chloramphénicol + gentamicine ou d'oxytétracycline + gentamicine permet d'inhiber les bactéries, y compris les lactobacilles (microorganismes acidophiles qui sont susceptibles de représenter la flore dominante de certains produits alimentaires).

Formule - type (avec oxytétracycline) : Pour 1,1 litre de milieu :

- Extrait auto-lytique de levure.....5,0 g
- Glucose.....20,0 g
- Oxytétracycline.....0,1 g
- Agar bactériologique.....15,0 g



Gélose de BAIRD-PARKER RPF

Domaine d'utilisation : La gélose de Baird-Parker avec plasma de lapin et fibrinogène (RPF = Rabbit Plasma fibrinogène) permet la détection et numération directes des staphylocoques pathogènes. Ce milieu présente l'avantage de réduire le nombre de tests de confirmation lorsque la présence de staphylocoques à coagulase positive ne se manifeste pas de façon évidente sous l'aspect de colonies bien typiques sur d'autres milieux sélectifs. Dans la plupart des cas, le milieu permet d'effectuer à la fois le dénombrement et la confirmation en une seule opération.

Principes : La croissance des staphylocoques est favorisée par le pyruvate de sodium et la glycine. La coloration noire des colonies de *Staphylococcus aureus* est due à la réduction du tellurite de potassium en tellure. De plus, la présence de tellurite favorise l'inhibition de la microflore contaminant à Gram positif.

Formule-type : Pour 950 ml de milieu de base :

- Tryptone.....10,0 g
- Extrait de viande.....5,0 g
- Extrait auto-lytique de levure.....1,0 g
- Pyruvate de sodium10,0 g
- Glycine.....12,0 g
- Chlorure de lithium.....5,0 g
- Agar agar bactériologique.....15,0 g

Pour un flacon de supplément ou réactif R2 (*Supplément Plasma de Lapin Fibrinogène*) à rajouter dans 90 ml de milieu de base :

- Plasma de lapin, EDTA.....2,5 ml

Annexes

- Fibrinogène bovin0,5 g
- Inhibiteur de trypsine2,5 mg
- Tellurite de potassium2,5 mg

Lecture : Les staphylocoques à coagulase positive sont caractérisés par la formation de colonies grises ou noires entourées d'un halo opaque de fibrine net, stable et bien visible. Procéder au comptage des boîtes contenant moins de 100 colonies caractéristiques. Il n'est pas nécessaire de procéder à la confirmation des résultats par le test de la coagulase en tube. Pour le contrôle des eaux, lorsque la lecture est réalisée avec la membrane de filtration, il convient de procéder au dénombrement ou à la confirmation des colonies caractéristiques en soulevant délicatement la membrane de quart en quart sans la retirer afin de vérifier la présence (ou non) de halos de fibrine.

Gélose VRBL

Domaine d'utilisation : La gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) est un milieu sélectif utilisé pour la recherche et dénombrement des coliformes dans l'eau, le lait, les produits laitiers et les autres produits alimentaires.

Principes : La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries à Gram positif. La fermentation du lactose se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliaires autour des colonies.

Formule – type : Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande7,0 g
- Extrait auto-lytique de levure3,0 g
- Lactose10,0 g
- Sels biliaires.....1,5 g
- Chlorure de sodium5,0 g
- Rouge neutre.....30,0 mg
- Cristal violet2,0 mg
- Agar agar bactériologique.....12,0 g



Lecture : Les coliformes présentent des colonies violacées de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm après 24 heures d'incubation. Les entérobactéries lactose-négatif sont incolores. Dans le cadre du protocole opératoire décrit par la norme NF ISO 4832, il pourra s'avérer nécessaire de confirmer les colonies atypiques éventuellement obtenues, en recherchant leur caractère gazogène en bouillon lactosé bilié au vert brillant

Gélose VRBG

Domaine d'utilisation : La gélose VRBG (gélose glucosée biliée au cristal violet et au rouge neutre) est utilisée pour la recherche et le dénombrement des entérobactéries dans les produits laitiers, les viandes, les charcuteries et les autres produits alimentaires. Ce milieu peut être

Annexes

utilisé dans le cadre de la Pharmacopée pour la recherche des bactéries Gram négatives résistantes aux sels biliaires lors du contrôle microbiologique des produits non stériles.

Principes : La présence simultanée de cristal violet et de sels biliaires assure l'inhibition des bactéries à Gram positif. La dégradation du glucose en acide est révélée par le virage au rouge de l'indicateur de pH, le rouge neutre.

Formule-type : Pour 1 litre de milieu :

- Digestat enzymatique de tissus animaux..... 7,0 g
- Extrait auto-lytique de levure..... 3,0 g
- Glucose 10,0 g
- Sels biliaires 1,5 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Rouge neutre 30,0 mg
- Cristal violet..... 2,0 mg
- Agar agar bactériologique 13,0 g



Lecture : Les entérobactéries présentent des colonies violettes, entourées ou non d'un halo violet de sels biliaires précipités.

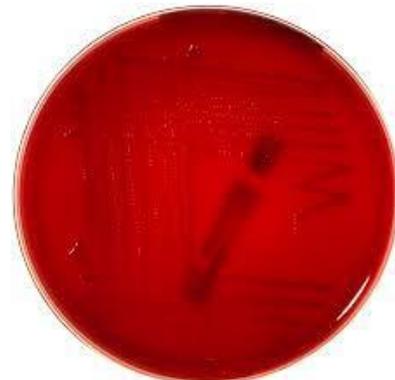
Gélose XLD

Domaine d'utilisation : La gélose XLD (Xylose-Lysine-Désoxycholate) est utilisée pour l'isolement des entérobactéries pathogènes et notamment des *Shigella* et des *Salmonella* dans les produits pharmaceutiques et les produits alimentaires.

Principes : Le désoxycholate de sodium assure l'inhibition de la flore contaminant à Gram positif. La xylose est fermentée par presque tous les germes entéropathogènes, à l'exception des *Shigella* qui sont ainsi différenciées des autres bactéries. Après avoir utilisé la xylose, les salmonelles décarboxylent la lysine en cadavérine, ce qui provoque une augmentation de pH. En milieu devenu alcalin, les colonies de salmonelles se présentent sous le même aspect que les shigelles. Les colonies qui se développent sont de couleur rouge en présence de l'indicateur, le rouge de phénol.

Formule – type : Pour 1 litre de milieu :

- Extrait auto-lytique.....3,0 g
- L- Lysine.....5,0 g
- Lactose7,5 g
- Saccharose7,5 g
- Xylose3,5 g
- Désoxycholate de sodium.....2,5 g
- Chlorure de sodium.....5,0 g
- Thiosulfate de sodium.....6,8 g
- Citrate ferrique ammoniacal.....0,8 g
- Rouge de phénol.....80,0 mg
- Agar agar bactériologique.....13,5 g



Lecture : *Shigella*, *Providencia*, *Edwardsiella* et *Salmonella* Para typhi fermentent la xylose lentement ou pas du tout, contrairement aux autres bactéries. Les *Salmonella* sont

Annexes

différenciées par leur aptitude à décarboxylé la lysine. La production de sulfure d'hydrogène en milieu alcalin provoque la formation de colonies à centre noir, tandis qu'en milieu acide la coloration noire n'apparaît pas.

Bouillon de Müller-kauffmann au Tetrathionate-Novobiocine (MKTTn)

Domaine d'utilisation : Le bouillon MKTTn est l'un des deux milieux d'enrichissement sélectifs, avec le bouillon RVS, utilisé pour la recherche des salmonelles suivant la méthode horizontale décrite dans la norme internationale ISO 6579. Associé au MSRV, il fait également partie du protocole mis en oeuvre pour les isollements et identification des salmonelles dans l'environnement des productions animales, chez les oiseaux et chez les mammifères. Le bouillon MKTTn est aussi utilisé comme second milieu d'enrichissement sélectif pour la recherche de *Salmonella* dans les eaux suivant le protocole décrit dans la norme NF ISO 19250.

Principes : Les sels biliaires et le vert brillant inhibent principalement le développement des microorganismes à Gram positif. La production extemporanée de tétra-thionate, résultant de l'action de la solution iodo-iodurée sur le thiosulfate de sodium, provoque l'inhibition des coliformes et de la plupart des bactéries intestinales. La novobiocine inhibe le développement des *Proteus*. Le carbonate de calcium neutralise l'acide sulfurique qui est produit lorsque le tétra-thionate est réduit. L'effet résultant est de favoriser le maintien du pH.

Formule-type : Pour 1005 ml d'eau purifiée :

- Tryptone	8,6 g
- Extrait de viande.....	4,3 g
- Sels biliaires	4,78 g
- Chlorure de sodium.....	2,6 g
- Carbonate de calcium	38,7 g
- Thiosulfate de sodium anhydre	30,45 g
- Vert brillant.....	9,6mg
- Novobiocine.....	0.040 g
- Iode	4 g
- Iodure de potassium.....	5 g



Bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS)

Domaine d'utilisation : Le bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja (RVS) est utilisé pour l'enrichissement sélectif des *Salmonella* dans le lait, les produits laitiers, les autres produits alimentaires, l'eau et dans le cadre des analyses en Santé Animale chez les mammifères.

Principes : La forte concentration en chlorure de magnésium ainsi que la présence de vertes malachites ralentissent la croissance des germes autres que les salmonelles. - La culture de *Salmonella* Typhi et des *Shigella* est inhibée par le vert de malachite. L'utilisation en parallèle de bouillon au sélénite et de bouillon Rappaport-Vassiliadis Soja MKTTn est recommandée pour les prélèvements contaminés par *Salmonella* typhi, *Salmonella choleraesuis* et par d'autres sérotypes de salmonelles.

Formule-type : Pour 1 litre de milieu :

Annexes

- Peptone papainique de soja.....4,50 g
 - Chlorure de sodium7,20 g
 - Phosphate monopotassique1,26 g
 - Phosphate dipotassique0,18 g
 - Chlorure de magnésium anhydre13,40 g
 - Vert malachite (oxalate).....36,0 mg
- pH du milieu prêt-à-l'emploi à 25°C : 5,2 ± 0,2.



Gélose HEKTOEN

Domaine d'utilisation : La gélose Hektoen est un milieu sélectif permettant les isolations et différenciation des entérobactéries pathogènes à partir des prélèvements biologiques d'origine animale, des eaux, des produits laitiers et des autres produits alimentaires. Elle est également utilisée dans le domaine de la santé animale dans le cadre de la recherche des salmonelles chez les mammifères. Ce milieu est particulièrement adapté à la culture des *Shigella*. Il évite l'envahissement par les *Proteus*.

Principes : L'inhibition de la flore à Gram positif est due à la présence des sels biliaires qui peuvent également inhiber légèrement la croissance de quelques souches de microorganismes à Gram négatif. Le milieu contient trois glucides : lactose, saccharose et salicine. La forte concentration en lactose favorise la visualisation des entérobactéries en évitant le problème des fermentations tardives. Les autres glucides ont été introduits afin d'assurer une différenciation plus performante et de réduire la toxicité engendrée par les indicateurs colorés, de manière à obtenir une excellente récupération des *Shigella*. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène réduisent le citrate ferrique ammoniacal et se manifestent par un noircissement dû à l'apparition de sulfure de fer au centre des colonies. Le système d'indicateurs colorés, composé de bleu de bromothymol et de fuchsine acide permet de colorer en jaune orangé les entérobactéries lactose-positif et en bleu vert les lactose-négatif.

Formule – type : Pour 1 litre de milieu :

- Peptone pepsique de viande..... 12,0 g
- Extrait auto-lytique de levure..... 3,0 g
- Lactose..... 12,0 g
- Saccharose 12,0 g
- Salicine..... 2,0 g
- Sels biliaires 9,0 g
- Chlorure de sodium..... 5,0 g
- Thiosulfate de sodium 5,0 g
- Citrate ferrique ammoniacal 1,5 g
- Bleu de bromothymol 65 mg
- Fuchsine acide40 mg
- Agar agar bactériologique 13,5 g



Lectures : Le principe de lecture est fondé sur la fermentation éventuelle des 3 glucides présents dans le milieu (lactose, saccharose, salicine). Les microorganismes qui fermentent au moins l'un d'entre eux forment des colonies de couleur "saumon", les autres donnant des colonies bleues ou vertes. En présence de thiosulfate de sodium, les microorganismes producteurs de sulfure d'hydrogène donnent, avec le citrate ferrique, des colonies à centre noir.

Annexes
