

<p style="text-align: center;"><b>Master ICMV</b></p> <p style="text-align: center;"><b>TP option microbiologie alimentaire</b></p> <p style="text-align: center;"><b>Année 2012-2013</b></p>
---

Compte Rendu : 1 par binôme à rendre en fin de séance 6

**1) Analyse microbiologique d'un aliment**

**Objectif :**

Dénombrer et identifier les microorganismes présents dans un aliment conservé dans différentes conditions

Exprimer les résultats en fonction des normes françaises

**2) Observation et identification de moisissures d'origine alimentaire**

**Objectif :**

Observation macroscopique, culture et observation microscopique d'une moisissure

Identification du genre et/ou de l'espèce en fonction de leurs caractéristiques morphologiques

**3) Prélèvement et analyse d'échantillons de l'environnement**

**Objectif :**

Réaliser trois prélèvements dans l'environnement (eau, sol, aération...)

Observer et identifier la flore potentiellement contaminante de l'environnement

**4) Dénombrement de la flore de différents produits laitiers**

**Objectif :**

Observer, dénombrer et comparer les microorganismes présents dans 3 produits laitiers différents : yaourt classique, yaourt au bifidus, actimel

Fabrication d'un yaourt et suivi d'une contamination par *S. aureus*

# Jour 1

## 1) Analyse microbiologique d'un aliment

- Peser 1g de vos trois échantillons d'aliment (A, B et C) que vous transvaserez dans un tube de 9 ml d'eau peptonée additionnée de billes de verre. Vortexer pour obtenir une suspension homogène.
- Pour chaque échantillon, réaliser les dilutions jusqu'à  $10^{-5}$  dans un volume final de 1 mL (100  $\mu$ l de la dilution précédente à 900  $\mu$ l de diluant) dans des tubes à hémolyse stériles. Bien vortexer chaque tube.
- Ensemencement des géloses : prévoir une boîte pour 2 dilutions. Ensemencer 0.1 mL des dilutions indiquées sur les milieux suivants : PCA, Drigalski, Chapman, Hektoen. Ensemencer 0.1 mL de la dilution  $10^{-1}$  sur milieu Sabouraud.

Milieu gélosé	Dilutions	Intérêt	T°	Durée
<b>PCA</b>	-1 à -6	Toutes bactéries AAF et AS mésophiles	30° C	24 à 48h
<b>Drigalski</b>	-1 à -4	Bacilles Gram- AAF et AS (enterobactéries)	37°C	24 à 48h
<b>Chapman</b>	-1 à -4	Staphylocoques (microcoques)	37°C	24 à 48h
<b>Hektoen</b>	-1 à -4	<i>Salmonella, Shigella, Yersinia.</i>	37°C	24 à 48h
<b>Sabouraud</b>	-1	champignons - levures	30°C	48h

## 2) Observation et identification de moisissures d'origine alimentaire

- Prélever à l'aide d'un écouvillon un peu de moisissure que l'on déposera au centre d'une gélose Sabouraud. Mettre à incuber. Faire l'observation macroscopique.

## Jour 2

### 1) Analyse microbiologique d'un aliment

- Dénombrer les colonies sur les différentes boites. En déduire le nombre d'ufc / g d'aliment. Exprimer les résultats en fonction des normes françaises (plan à 2 ou 3 classes) pour chaque type d'analyse.

$$N = \frac{\sum \text{colonies}}{V_{mL} \times (n_1 + 0.1n_2) \times d_1}$$

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

$\Sigma$ colonies : Somme des colonies des boites interprétables

V (ml) : volume de solution déposée (1ml)

n1 : nombre de boites considérées à la première dilution retenue

n2 : nombre de boites considérées à la seconde dilution retenue

d1: facteur de la première dilution retenue

- Sur les éventuelles colonies se développant sur milieu Chapman ou Hektoen, procéder aux tests d'identification qui vous sembleraient nécessaire (Gram, catalase, coagulase...). Réisoler en gélose TS et en bouillon en vue de tests d'identification en galerie API.

## Jour 3

### 1) Analyse microbiologique d'un aliment

- Ensemencement de galerie API : Staphylocoques ou Bacilles Gram- selon les résultats des tests effectués au Jour 2

### 2) Observation et identification de moisissures d'origine alimentaire

- Prélever à l'aide d'un écouvillon ou d'un morceau de scotch un peu de moisissure à différents stades de développement que l'on déposera sur une goutte d'eau déposée sur lame de verre. Ajouter une goutte de bleu de méthyle, ajouter une lamelle et observer au microscope.

### 3) Prélèvement et analyse d'échantillons de l'environnement

- A l'aide d'un écouvillon, faire trois prélèvements dans l'environnement à des endroits représentant pour vous des sources de contamination potentielles pertinentes. Etaler sur gélose TS et Sabouraud. Mettre à incuber.

- Aller prélever quelques ml d'eau de l'extérieur (flaque, mare ...). Faire un état frais. Déposer une goutte d'eau sur lame de verre et ajouter une goutte de Lugol. Mettre une lamelle et observer au microscope. Comparer avec une goutte d'eau du robinet. Conclure.

## **Jour 4**

### **1) Analyse microbiologique d'un aliment**

- Lecture de la galerie API.
- Conclusions sur la qualité microbiologique de chaque échantillon

### **4) Dénombrement de la flore de différents produits laitiers**

- Peser 1g ou prélever 1 ml de vos trois produits laitiers : yaourt « normal », yaourt au bifidus, lait fermenté probiotique que vous transvaserez dans un tube de 9 ml d'eau peptonée. Vortexer pour obtenir une suspension homogène.

- Pour chaque échantillon, réaliser les dilutions jusqu'à  $10^{-6}$  dans un volume final de 1 mL (100  $\mu$ l de la dilution précédente à 900  $\mu$ l de diluant) dans des tubes à hémolyse stériles. Bien vortexer chaque tube.

- Ensemencement des géloses : prévoir une boîte pour 2 dilutions. Ensemencer 0.1 mL des dilutions  $10^{-1}$  à  $10^{-6}$  sur gélose MRS. Incuber les boîtes à 30°C.

- Etaler sur lame de verre 1 anse de chaque yaourt diluée dans un peu d'eau. Faire une coloration de Gram et estimer le % de chaque type de bactéries. Comparer les observations faites pour chaque type de yaourt.

### **Fabrication de yaourt et suivi de contamination par *S. aureus***

- Transvaser 10 ml de lait dans 4 bouteilles bouchon rouge.

Bouteille 1, mettre une spatule de yaourt de votre choix

Bouteille 2 : ajouter 100  $\mu$ l de culture de *S. aureus*

Bouteille 3 : une spatule de yaourt et 100  $\mu$ l de culture de *S. aureus*

Bouteille 4 : témoin. A l'aide d'un papier pH prendre le pH initial du lait

- Prélever 1 ml du produit obtenu dans les bouteilles 2 et 3 après homogénéisation (vortex). Réaliser les dilutions jusqu'à  $10^{-4}$  dans un volume final de 1 mL (100  $\mu$ l de la dilution précédente à 900  $\mu$ l de diluant) dans des tubes à hémolyse stériles. Bien vortexer chaque tube. Etaler 0.1 ml de chaque dilution sur gélose Chapman. Mettre à incuber à 37°C.

- Mettre à incuber les 4 bouteilles à 30°C

## Jour 5

### **3) Prélèvement et analyse d'échantillons de l'environnement**

- Observation des résultats des prélèvements dans l'environnement.  
Pour moisissures / levure faire une observation après coloration au bleu de méthyle.  
Pour bactéries faire une observation après coloration de Gram  
Conclure

### **4) Dénombrement de la flore de différents produits laitiers**

- Dénombrement des géloses MRS. Evaluer le nombre de cfu/g d'aliment pour chaque type de yaourt. Comparaison des résultats obtenus pour les 3 types de produits. Observation d'un Gram sur les colonies caractéristiques.  
Conclure

### **Fabrication de yaourt et suivi de contamination par *S. aureus***

- Observation des 4 bouteilles, prendre le pH à l'aide d'un papier pH.  
Qu'observez-vous dans les 3 premières bouteilles ? quels sont les mécanismes mis en jeu ?
- Peser 1 g du produit obtenu dans les bouteilles 2 et 3. Réaliser les dilutions jusqu'à  $10^{-4}$  dans un volume final de 1 mL (100  $\mu$ l de la dilution précédente à 900  $\mu$ l de diluant) dans des tubes à hémolyse stériles. Bien vortexer chaque tube. Etaler 0.1 ml de chaque dilution sur gélose Chapman. Mettre à incuber à 37°C.

## Jour 6

### **4) Dénombrement de la flore de différents produits laitiers**

- Dénombrement des étalements sur géloses Chapman.  
Comparaison des résultats obtenus et conclusion.

# Finalisation et remise des CR

## Le compte-rendu

Le compte-rendu contiendra les résultats détaillés de chaque étape d'identification, les dessins des Gram et des colorations de bleu de méthyle, le % de chaque type de bactéries et les calculs de dénombrement. Notez et analysez vos observations et résultats.

La note obtenue tient compte de votre pratique pendant les séances (qualité des colorations, des isolements et des dénombrements, organisation, tenue des instruments, compréhension) autant que de la qualité du CR.

### Annexe : Normes

Désignation	Aerobies mésophiles /g		Enterobactéries /g		Staphylocoque coagulase + /g		Salmonelles /g
	m	M	M	M	m	M	
Plats cuisinés	5. 10 <sup>5</sup>	5. 10 <sup>6</sup>	500	5000	100	1000	Absence
Jambon	10 <sup>4</sup>		Absence		Absence		Absence
Fromage au lait cru	10 <sup>6</sup>	10 <sup>7</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	10 <sup>4</sup>	10 <sup>5</sup>	Absence
Ovoproduits	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	10	100	Absence		Absence
Produits de la mer cuits	10 <sup>5</sup>	10 <sup>6</sup>	1	10	100	1000	Absence