Université Paris 12
IUP SIAL
Mlle ROUX

17/11/03
NOVELLO Célia
TAP Julien

TP de microbiologie :
ANALYSES PLATS CUISINES

I. Introduction

Le but de ce TP est d'analyser un plat cuisiné, le hachis Parmentier, afin de vérifier sa conformité vis-à-vis des normes en vigueur.
Pour cela nous allons effectuer un dénombrement de flore mésophile, des coliformes thermotolérants du type *E. coli*, de *Staphylococcus aureus* (à coagulase positive) et des anaérobies sulfito-réductrices (*Clostridium perfringens*).

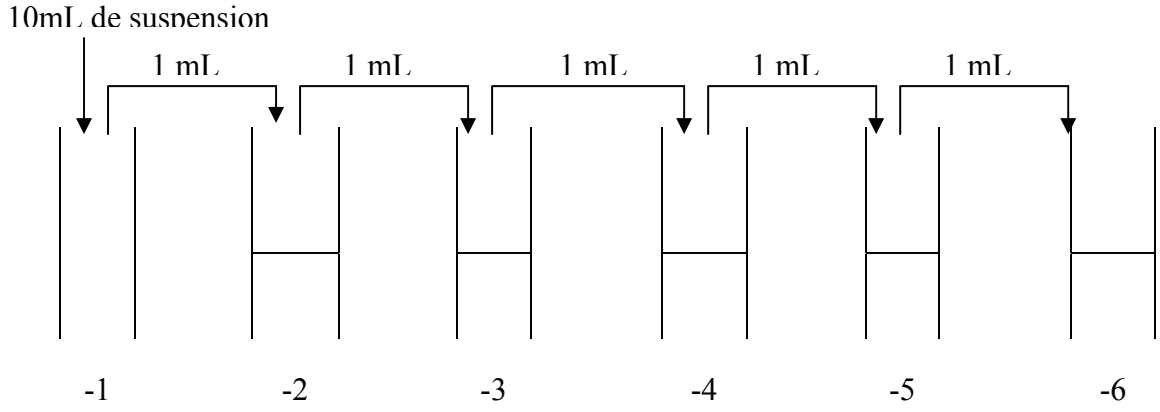
II. Matériels et méthodes

A. Broyage

Pour pouvoir analyser un plat préparé il faut tout d'abord mettre le hachis Parmentier en solution. Pour cela on pèse de manière stérile 11 grammes d'aliments que l'on place dans un sac stomacher sous une hotte à flux laminaire auquel on rajoute 100ml d'eau peptonée tamponnée, qui va permettre de revitaliser les microorganismes présents. On scelle ensuite ce sac pour qu'il puisse être utilisé dans le stomacher. Cet appareil, par une action mécanique, va permettre de dissoudre le hachis Parmentier en solution. On a donc à la fin de cette étape une solution mère à la dilution $10^{-1.}$

B. Méthode de dilution :

On prélève dans le sac à stomacher 10ml de la solution mère que l'on place dans un tube à essai à l'aide d'une pipette stérile. On prépare 5 tubes contenant chacun 9ml de trytone-sel. On prélève du tube contenant la solution mère 1ml que l'on place dans un des tubes contenant les 9ml de trytone-sel, on homogénéise la solution avec le vortex, puis on prélève 1ml de ce tube pour le mettre dans un troisième tube et ainsi de suite jusqu'au sixième tube. Entre chaque il faut changer de pipette pour éviter les contaminations des milieux les plus dilués.



Afin de dénombrer le nombre de microorganismes contenus dans le hachis Parmentier on suit le tableau suivant :

Bactéries	Milieux utilisés	dilutions	Conditions d'incubation
Microorganismes aérobie mésophiles	PCA ensemencement en profondeur	1ml des solutions -1 à –6	30°C pendant 72h
Coliformes fécaux et *Escherichia coli*	VRBL ensemencement en profondeur double couche	1ml des solutions -1 à –6 2 lots	44°C pendant 24h
Staphylococcus aureus	Baird-Parker ensemencement en surface	0,1ml des solutions -1 à –4	37°C pendant 24-48h
Bactéries sulfito-réductrices en anaérobiose	TSC ensemencement dans un tube	1ml des solutions-1 à -4	46°C pendant 24h

C. Méthodes d'ensemencements

Pour effectuer un ensemencement on commence toujours par la solution la plus diluée. Ce qui nous permet de garder la même pipette pour tous les prélèvements sans pour autant contaminer les prélèvements suivants.

Pour l'ensemencement en profondeur, on met le volume de solution nécessaire dans la boite de pétri, puis on le recouvre de milieu de culture. Cette méthode à pour but d'éviter que les colonies s'étalent. Ce qui permet un meilleur dénombrement.

Pour l'ensemencement en profondeur double couche, procède de la même manière, mais après que la gélose soit à peut près solide on rajoute une seconde couche de gélose.

Pour l'ensemencement en surface, on coule déjà le milieu que l'on laisse refroidir, puis on étale la solution à l'aide d'un étaleur stérile.

Pour l'ensemencement dans un tube, le milieu est en surfusion (=Etat d'un corps qui reste liquide au-delà de sa température de solidification.) On ajoute la suspension dans la gélose, puis on la refroidi sous l'eau.

D. Description des milieux utilisés

1. PCA :

C'est une gélose standard universelle utilisée pour le dénombrement des microorganismes saprophytes. En effet le milieu contient des peptones comme sources d'azotes et du glucose comme source de carbones, les extrait de levures apportant tout les facteur de croissance nécessaire à la croissance des microorganismes.

2. VRBL (Violet cristal /Rouge neutre/sels Biliaires/gélose Lactose) :

C'est un milieu spécifique des coliformes. En effet le cristal violet inhibe la croissance des Gram + : ce qui rend le milieu sélectif des Gram -. L'indicateur coloré Rouge neutre permet de différencier les coliformes lactose + (coloration rouge foncé) des autres entérobactéries lactose – (coloration jaune). Le lactose apportant une source de carbone et les peptones apportant la source azotée. Les sels biliaires et les extraits de levures apportent les facteurs de croissances nécessaires aux coliformes fécaux. Seule la température d'incubation permet de sélectionner les coliformes uniquement thermotolérants des coliformes totaux.

3. BAIRD PARKER :

C'est un milieu sélectif des staphylococcus à coagulase positive et en particulier de *Staphylococcus aureus*. En effet supplémenté en tellurite de potassium et en jaune d'œuf, le milieu BAIRD PARKER met en évidence les colonies noires de *Staphylococcus aureus* de part la réduction de la tellurite en tellure (Fe3+ en Fe2+) et entourées d'un halo de précipitation témoignant de la dégradation de la lécithine du jaune d'œuf par la lécithinase produite.

4. TSC (Tryptone/ Sulfite /Cyclosérine) :

Ce milieu est utilisé pour le dénombrement des anaérobies strictes sulfito-réducteurs particulièrement *Clostridium perfringens*.

En effet la Cyclosérine est un inhibiteur et les colonies comme *Clostridium perfringens* apparaissent noires témoignant de la réduction des sulfites en sulfures. Le milieu doit être incubé en anaérobiose et à 46°C renforçant ainsi la sélectivité du milieu vis-à-vis de *Clostridium perfringens*.

III. Résultats et discussion

A. Microorganismes aérobies mésophiles

1. Dénombrement

Le dénombrement des différentes boites nous donne le tableau suivant :

Dilutions	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Nombre de colonies	>300	>300	>300	>300	300	133

2. Résultats

On en déduit le nombre d'aérobie mésophile par grammes d'aliment :
$(300/10^{-5} + 133/10^{-6}) /2 = 8{,}15 * 10^{7}$

$8{,}15 * 10^{7}$ bactéries par grammes d'aliments.

B. Coliformes thermotolérants

1. Dénombrement

Le dénombrement des différentes boites nous donne le tableau suivant :

Dilutions	-1	-2	-3	-4	-5	-6
Nombre de colonies lot1	>300	>300	>300	>300	>300	63
Nombre de colonies lot2	>300	>300	>300	>300	>300	99

Les colonies caractéristiques des coliformes fécaux thermotolérants comme *Escherichia coli* sont rouges car lactose + donc acidification du milieu donc l'indicateur coloré passe du rouge au rouge foncé.

2. Résultat

On en déduit le nombre de coliformes thermotolérants par grammes d'aliment :
$(63/10^{-6} + 99/10^{-6})/2 = 8{,}1 * 10^{7}$
$8{,}1 * 10^{7}$ bactéries par grammes d'aliments.

3. Vérification

Afin de vérifier si les colonies dénombrer sont *Escherichia coli*, 3 colonies sont repiqués sur 3 géloses EMB (gélose lactose éosine bleu de méthylène) et incubation pendant 24h. Apres incubation, les colonies de chaque boites sont plates, violet foncé avec reflet métallique : ce sont des colonies caractéristiques de *Escherichia coli*. Avant une confirmation par le test IMVIC on repique une colonie par boite sur gélose nutritive pour revivifier la bactérie.

4. Test IMVIC (Indode/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/ Citrate)

Le test IMVIC va nous permettre de confirmer la présence de *Escherichia coli*.

- Recherche de l'indole :

Apres incubation pendant 24h à 37°C d'une suspension bactérienne dans un milieu Urée Indole, 0.5 mL de réactif de Kovacs sont ajoutés.

L'apparition d'une couleur rouge dans la phase alcoolique du réactif témoigne de la production d'indole.

- Rouge de méthyle et Voges Proskauer :

Un milieu « Clark et Lubs » est ensemencé. Après incubation 24h à 37°C, on ajoute une goutte de rouge de méthyle dans la suspension bactérienne transféré dans un tube à hémolyse, la formation d'une couleur rouge montrant une acidification montre une réaction positive. Dans un tube à hémolyse, on ajoute 0,1mL d'alpha naphtol et 0,1mL d'hydroxyde de potassium. La formation d'une teinte rose montre une réaction positive.

- Recherche de l'utilisation du citrate :

Une gélose inclinée de citrate de Simmons est ensemencée en surface puis incubé 24h à 37°C. Ce milieu constitué de Bleu de Bromotymol (jaune = acidification et bleu = basification) et de citrate permet de montrer l'utilisation du citrate dans le métabolisme bactérien. Une acidification du milieu entraînera une teinte jaune témoignant de la dégradation du citrate par la bactérie.

Les différents tests donnent les résultats suivants :

Tests	Indole	MR	VP	Citrate
Tube 1	+	+	-	-
Tube 2	+	+	-	-
Tube 3	+	+	-	-

Ce tableau nous montre que dans les trois tubes présentent les caractéristiques biochimiques de *E. coli*. Ainsi 100% des bactéries dénombrés dans l'aliment sont du type *Escherichia coli*.

C. Staphylococcus aureus

1. Dénombrement

Le dénombrement des différentes boites nous donne le tableau suivant :

Dilutions (0,1 mL)	-1	-2	-3	-4
Nombre de colonies caractéristiques	227	22	1 (<15)	<15

Les colonies caractéristiques sont noires avec autour la présence d'un halo de précipitation.

2. Résultat

On en déduit le nombre de colonies caractéristiques :
$(227/10^{-1}+22/10^{-2})/0.2 = 22350$ bactéries par grammes d'aliments.

3. Vérification

Maintenant il faut caractériser ces bactéries. Un test de coagulase est réalisé. Après avoir incuber une colonie dans un bouillon cœur cervelle, 0.1mL de la suspension obtenue est incubé dans du plasma de lapin. Si la bactérie a développé une coagulase dans le bouillon cœur cervelle celle-ci va transformer le fibrinogène en fibrine et ainsi former un caillot dans le culot du tube.

Les trois colonies repiquées donne des réactions positives donc elles ont une coagulase. Ainsi on peut dire que 100% des bactéries dénombrés sont des *Staphylococcus aureus*.

On a donc 22350 *Staphylococcus aureus* par grammes d'aliments.

D. Bactéries sulfito-réductrices en anaérobiose à 46°C (C. perfringens)

Apres incubation, on n'observe aucune colonie noire caractéristique. Il y a donc moins de 10 *Clostridium perfringens* par grammes d'aliments.

Ce résultat n'est pas significatif car on n'a pas rajouté au TSC de cyclosérine, et de plus les tubes n'ont pas était mis dans des conditions d'anaérobiose. Ce qui pourrait expliquer ce résultat.

E. Discussions

1. Normes

Récapitulatifs des normes : Nombre de bactérie par grammes d'aliment

	Conforme	Acceptable	Non conforme	Corrompu
Flore totale		$9*10^5$	$3*10^6$	$3*10^8$
Coliformes totaux		3000	10^4	10^6
Coliformes thermotolérants		10	100	10000
S. aureus		300	1000	$5*10^4$
Bactéries sulfito-réductrices		30	100	10000

2. Récapitulatifs des résultats

Bactéries	Résultats (nombre de bactérie/g d'aliment)	
Microorganismes aérobie mésophiles	$8,15 * 10^7$	Non conforme
Coliformes fécaux et *Escherichia coli*	$8,1 * 10^7$	Corrompu
Staphylococcus aureus	22350	Non conforme
Bactéries sulfito-reductrices en anaérobiose	<10	Conforme

IV. Conclusion

Les résultats sont supérieurs à la limite de conformité M, le plats cuisiné est donc impropre à la consommation. L'importance de coliforme montre qui il y eu une contamination fecco orale.