**TP N° 1 : analyse microbiologie de lait pasteurisé**

**1.Introduction.** Le lait est défini comme étant le produit de la sécrétion mammaire normale, obtenue par une ou plusieurs traites sans aucune addition ou soustraction et n’ayant pas été soumis à un traitement thermique (Arrêté de 18/08/1993, décret du 27/10/1993). Le lait est un aliment riche en nutriments, il contient des sucres(lactose), protéines(caséines), matières grasses, vitamines et sels minéraux surtout le calcium. Il est le compagnon indispensable d’une alimentation équilibrée. Cependant, la richesse du lait en nutriments lui rend un milieu favorable pour la multiplication des germes pathogènes ou d’altérations capables de réduire drastiquement sa qualité hygiénique et organoleptique en portant ainsi un danger pour le consommateur. Les germes indésirables peuvent provenir à partir de plusieurs sources de contamination tels que l’état sanitaire des animaux, le personnel ou l’environnement.

Les microorganismes du lait sont répartis selon leur importance en deux grandes classes à savoir, la flore indigène ou originelle (les bactéries lactiques) et la flore contaminante. Cette dernière est subdivisée en deux sous classes : la flore d’altération (coliformes, les flores thermorésistantes et les psychrotrophes) et la flore pathogène (Staphyloques, Salmonelle...ect). Le journal officiel Algérien a fixé les germes à dénombrer et à rechercher pour le lait pasteurisé et sont comme suit : Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30° C, Dénombrement des coliformes à 30 ° C et des coliformes fécaux, Dénombrement de staphylococcus, Recherche des *Salmonella*. Les résultats d’analyse sont ensuite comparés aux normes fixées par le gouvernement pour en jugé sa qualité.

**2. Objectif du TP** : Contrôle microbiologique d’un lait pasteurisé.

**3. Mode opératoire :**

**3.1. Préparation de l'échantillon pour essai**

Il est nécessaire de rendre l'échantillon homogène avant chaque analyse, par exemple, agiter soigneusement **en inversant** rapidement 25 fois le préemballage, ou appliquer des techniques appropriées donnant des résultats identiques. Ouvrir aseptiquement le préemballage après avoir nettoyé à l'éthanol la surface d'ouverture. Procéder à l'analyse bactériologique dans un délai n'excédant pas trois minutes. Jusqu'au moment de l'analyse, conserver l'échantillon à 6° C.

**3.2. Préparation des dilutions décimales**

La préparation des dilutions décimales est réalisée dans du tryptone-sel comme diluant (peptone pancréatique de caséine (tryptone) 1 g/l, NaCl 8,5 g/l).

Au moment de l'emploi, distribuer aseptiquement le diluant à raison de 9 ml dans des tubes stériles de 20 x 200 mm. Pour la préparation des dilutions, utiliser le diluant à température ambiante. Une dilution au 1/10 est obtenue en transférant aseptiquement 1 ml de lait à l'aide d'une pipette de 1 ml stérile dans 9 ml de diluant. Une dilution au 1/100 est obtenue en transférant 1 ml de la dilution au 1/10 à l'aide d'une nouvelle pipette de 1 ml stérile dans un second tube de d

iluant. Procéder de manière identique pour les dilutions suivantes. Mélanger soigneusement chacune des dilutions pendant 5 à 10 secondes au moyen d'un agitateur mécanique à mouvement de rotation excentré au moment de leur préparation et avant les ensemencements.

**3.3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30° C.**

Transférer 1 ml des dilutions sélectionnées dans des boîtes de Pétri vides et stériles. Couler 12 à 15 ml de la gélose de dénombrement additionné du lait écrémé à 1%

(peptone pancréatique de caséine (tryptone) 5 g/l, extrait de levure déshydratée 2,5 g/l, glucose anhydre 1 g/l, lait écrémé en poudre exempt de substances inhibitrices 10 g/l ou lait écrémé exempt de substances inhibitrices 10 ml/l, agar-agar 12 à 18 g/l), fondu au préalable puis refroidi à une température de 45°C dans un bain-marie. Homogénéiser soigneusement. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et plane. Incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ± 1 pendant 72h ± 2h. Le temps entre la préparation des dilutions et **l’ensemencement dans la masse** ne doit pas excéder **15 minutes.**

**3.3.1. Expression des résultats**

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre 10 et 300. Utiliser, si nécessaire, un compteur de colonies équipé d’une loupe. **Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre du lait à l'aide de la formule suivante :**

∑ c/ (n1 + 0,1×n2) ×dxV

c : Somme totale des colonies comptées.

n1 : Nombre de boîtes comptées dans la première dilution.

n2 : Nombre de boîtes comptées dans la seconde dilution.

d : Facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages ont été obtenus.

Exemple :

Exemple : Dilution 10-2 278 et 290 colonies.

 Dilution 10-3 33 et 28 colonies. Nombre/ml : 278 + 290 + 33 + 28 / (2 + 0,1 x 2) 10-2

629/ 0,022= 28590

Pour exprimer le nombre de microorganismes, arrondir le nombre à deux chiffres significatifs.

Quand le chiffre qui doit être arrondi est 5, arrondir de manière que la valeur indiquée immédiatement à gauche soit paire.

Dans l'exemple, le résultat devra être arrondi à 29 000

2,9 x 104

si les boîtes contiennent moins de 10 colonies donner le nombre de micro-organismes par mL sous la **forme moins de 10 x d, « d » étant l'inverse du facteur de dilution le plus faible.**

**3.4. Dénombrement des coliformes à 30° C et des coliformes fécaux.**

Transférer en double 1 ml de lait et 1 ml d'une dilution au 1/10 dans les boîtes de Pétri stériles de 90 ou 100 mm de diamètre.Couler 12 ml de la gélose lactosée à 0,5 ‰ de désoxycholate de sodium (peptone 10 g/l, lactose 10 g/l, désoxycholate de sodium 0,5 g/l, NaCl 5 g/l, citrate de sodium 2 g/l, agar agar 12 à 15 g/l, rouge neutre 0,03 g/l). Homogénéiser soigneusement. Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et plane. Lorsque le milieu est solidifié, couler environ 4 ml du milieu non ensemencé. Laisser solidifier à nouveau. Incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ± 1°C pendant 24h ± 2 h pour les coliformes totaux et à **44°C ± 1°C pour les coliformes fécaux.**

**3.4.1. Expression des résultats**

**a. Sélection des boîtes**

Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant moins de 250 colonies caractéristiques rouge foncé d’un diamètre d’au moins 0,5 mm.

**b. Mode de calcul**

Exprimer le résultat des coliformes par mL du lait après avoir calculé la moyenne arithmétique des colonies comptées sur les boîtes ensemencées par le même volume de l'échantillon. Le résultat peut être obtenu également à partir de la moyenne arithmétique entre les valeurs obtenues par l'examen de 1 ml du lait et dilution décimale, sauf lorsque le rapport de la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible. Si les valeurs sont obtenues depuis une dilution décimale, multiplier par l'inverse du facteur de dilution. Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10x, «x » étant la puissance de 10 appropriée.

**3.5. Dénombrement de *Staphylococcus***

Répartir 1 ml du lait à la surface du milieu **Baird Parker** (Peptone pancréatique de caséine (tryptone) 10 g/l, extrait de levure 1 g/l, extrait de viande 5 g/l, glycine 12 g/l, chlorure de lithium 5 g/l, agar-agar 12 à 20 g/l) de trois boîtes de Pétri (90 mm) en de trois fractions sensiblement égales, puis étaler en utilisant le même étaleur pour les trois boîtes. Attendre 15 minutes avant d’incuber les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 37 °C pendant 24 à 48 heures.

**3.5.1. Sélection des boîtes et choix des colonies**

Après 24 et 48 heures d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques. Colonies caractéristiques : Colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies. Colonies non caractéristiques : Colonies noires, brillantes convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (exceptées certaines colonies gris noirâtre). Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de 250 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 140 mm ; 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boite de 90 ou 100 mm.

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase un nombre maximum de cinq colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques en tenant compte de leur nombre respectif. De manière identique, dix colonies au maximum seront prélevées dans le cas d'un volume réparti en trois fractions ou en double

**3.5.2. Epreuve de la coagulase**

Ensemencer la colonie dans un bouillon cœur cervelle (protéose-peptone 10g/l, infusion de cervelle de veau 12.5 g/l, infusion de cœur de bœuf 5 g/l, chlorure de sodium 5 g/l, phosphate disodique 2,5 g/l, glucose 2 g/l) puis incuber le tube dans une étuve à 37°C durant 20 à 24 heures. Un plasma du lapin contenant de l'EDTA (acide éthylène diamine tétraacétique) à une concentration finale de 0,1 % est utilisé pour l’épreuve de la coagulase. Le résultat positif se traduit par la formation d’un coagulum qui occupe plus des trois quarts du volume initial.

**3.5.3. Expression des résultats**

Si au moins 80 % des colonies testées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies comptées correspond à Staphylococcus aureus, sinon, exprimer le résultat global en tenant compte des proportions (colonies caractéristiques et colonies non caractéristiques). Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10 x, « x » étant la puissance de 10 appropriée.

**3.6. Recherche des Salmonella**

**3.6.1. Enrichissement**

L’étape de pré-enrichissement n’est pas nécessaire. Ajouter aseptiquement 25 ml du lait à 225 ml du bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant (extrait de viande 5 g/l, peptone 10g/l, chlorure de sodium 3g/l, carbonate de calcium 45g/l) ; incuber dans un bain-marie à 43 °C± 0,5 pendant 18 à 24 heures.

**3.6.2. Isolement**

L’isolement est réalisé à partir du bouillon d’enrichissement.

Ensemencer en surface à l’aide d’une anse deux milieux sélectifs solides. Utiliser la gélose au vert brillant et au rouge de phénol (extrait de viande 5 g/l, peptone 10 g/l, extrait de levure 3 g/l, phosphate disodique 1 g/l, phosphate monosodique 600 mg/l, saccharose 10 g/l, lactose 10 g/l, rouge de phénol 90 mg/l, vert brillant 5 mg/l, agar 12 g/l) et la gélose au sulfite de Bismuth (Peptone 10 g/l, extrait de bœuf 5 g/l, glucose 5,0 g, hydrogéno-orthophosphate disodique 4,0 g/l, sulfate de fer (II) 0,3 g/l, citrate de bismuth ammoniacal 1,85 g/l, sulfite de sodium 6,15 g/l, agar-agar 20,0 g/l, vert brillant 0,025 g/l). Remettre le bouillon d'enrichissement et les boîtes retournées dans une étuve à 37 ± 1°C pendant 18 à 24 heures et 20 à 24 heures, respectivement. Après incubation des flacons, répéter les étapes d'ensemencement et d'incubation déjà décrites au-dessus. La lecture se fait par examination des boîtes après incubation afin de rechercher la présence des colonies typiques du genre Salmonella. Dans le cas où le développement est insuffisant, prolonger l’incubation pendant 18 à 24 heures. Les colonies typiques de Salmonella peuvent être caractérisées comme suit

**a-** sur gélose au vert brillant/rouge de phénol : Colonies roses bordées de rouge.

**b-** sur gélose au sulfite de bismuth : Colonies brunes ou noires avec un éclat métallique.

Certaines souches donnent des colonies vertes.

À partir de chaque boîte de chacun des milieux sélectifs, prélever 5 colonies typiques ou suspectes pour confirmation après caractérisation à l’aide des galeries biochimiques classiques et tests sérologiques.

**4. Normes algériennes** (critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires : lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés) :



**n** : nombre d’unité constituant l’échantillon.

**m** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante.

**M** : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable. –

**c** : nombre maximal d’unités d’échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.