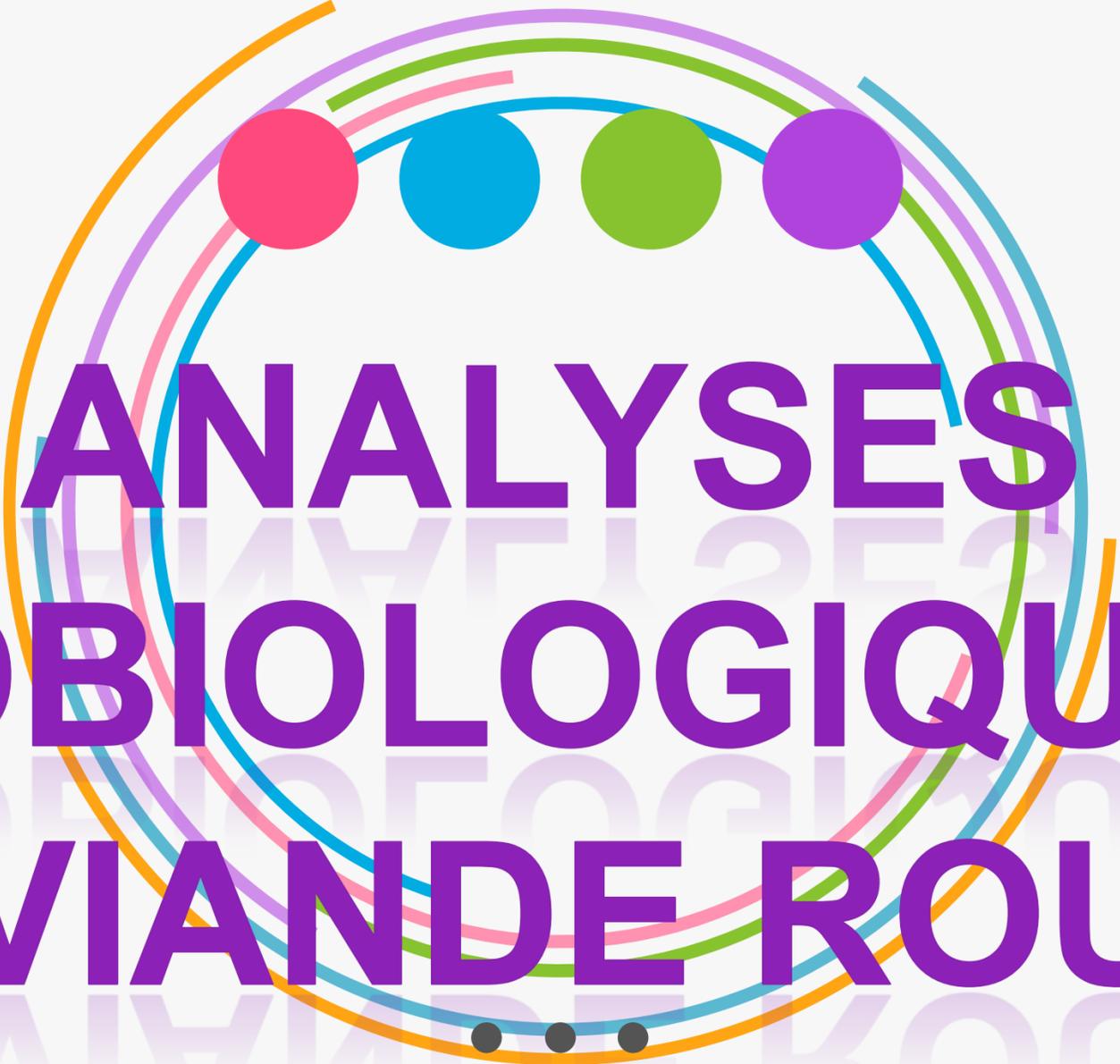




TP .ANALYSES MICROBIOLOGIQUES DE LA VIANDE ROUGE

Mr Harir Mohammed



**ANALYSES
MICROBIOLOGIQUES DE
LA VIANDE ROUGE**

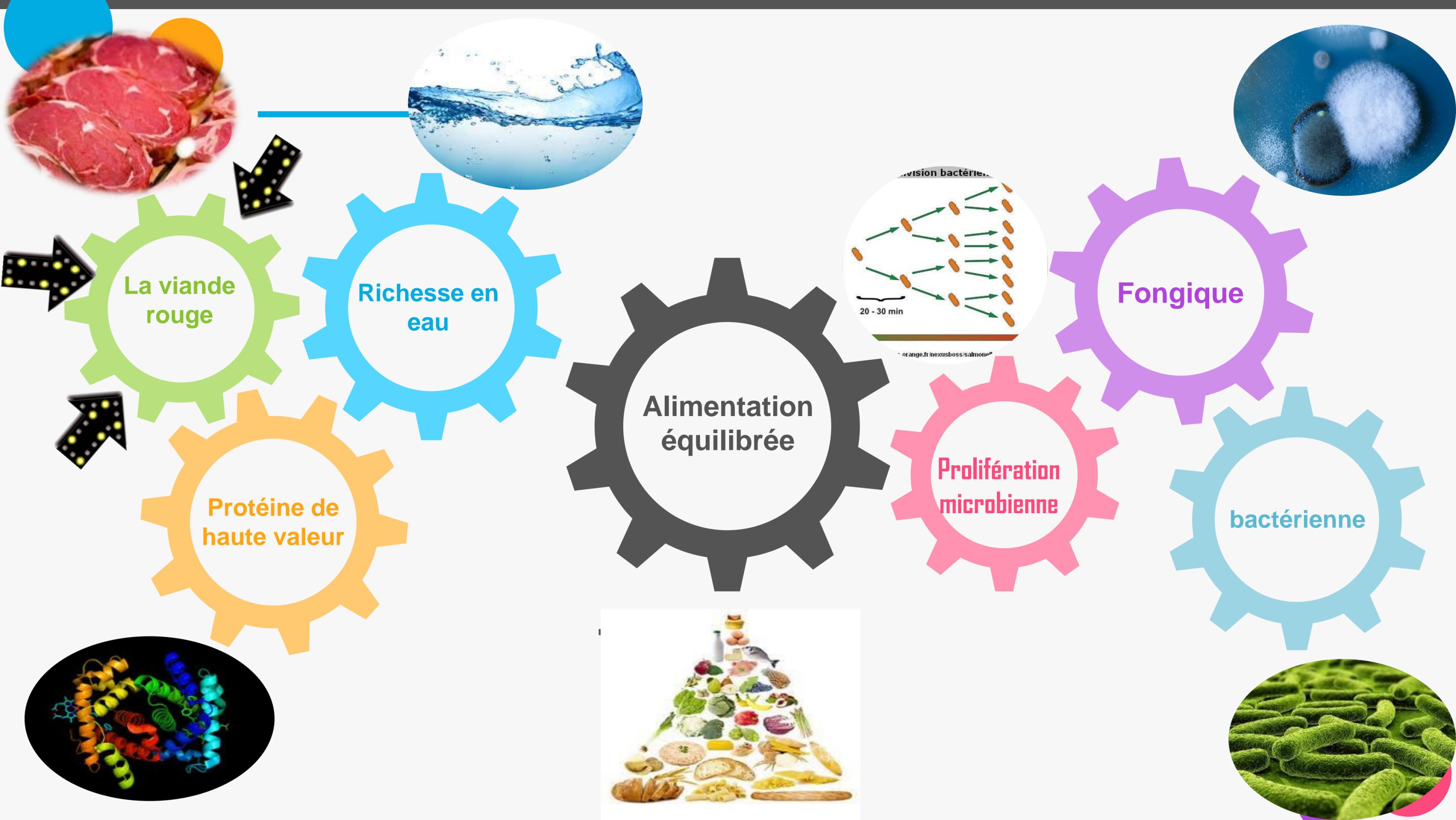
Bien venu



Introduction :

La viande est considérée comme un aliment de choix en raison de sa valeur nutritive. Sa richesse en protéines et la nature de celle-ci en font un aliment difficilement remplaçable. Cependant, en raison même de ses qualités nutritionnelles, la viande constitue un terrain très favorable à la plupart des contaminations microbiennes.

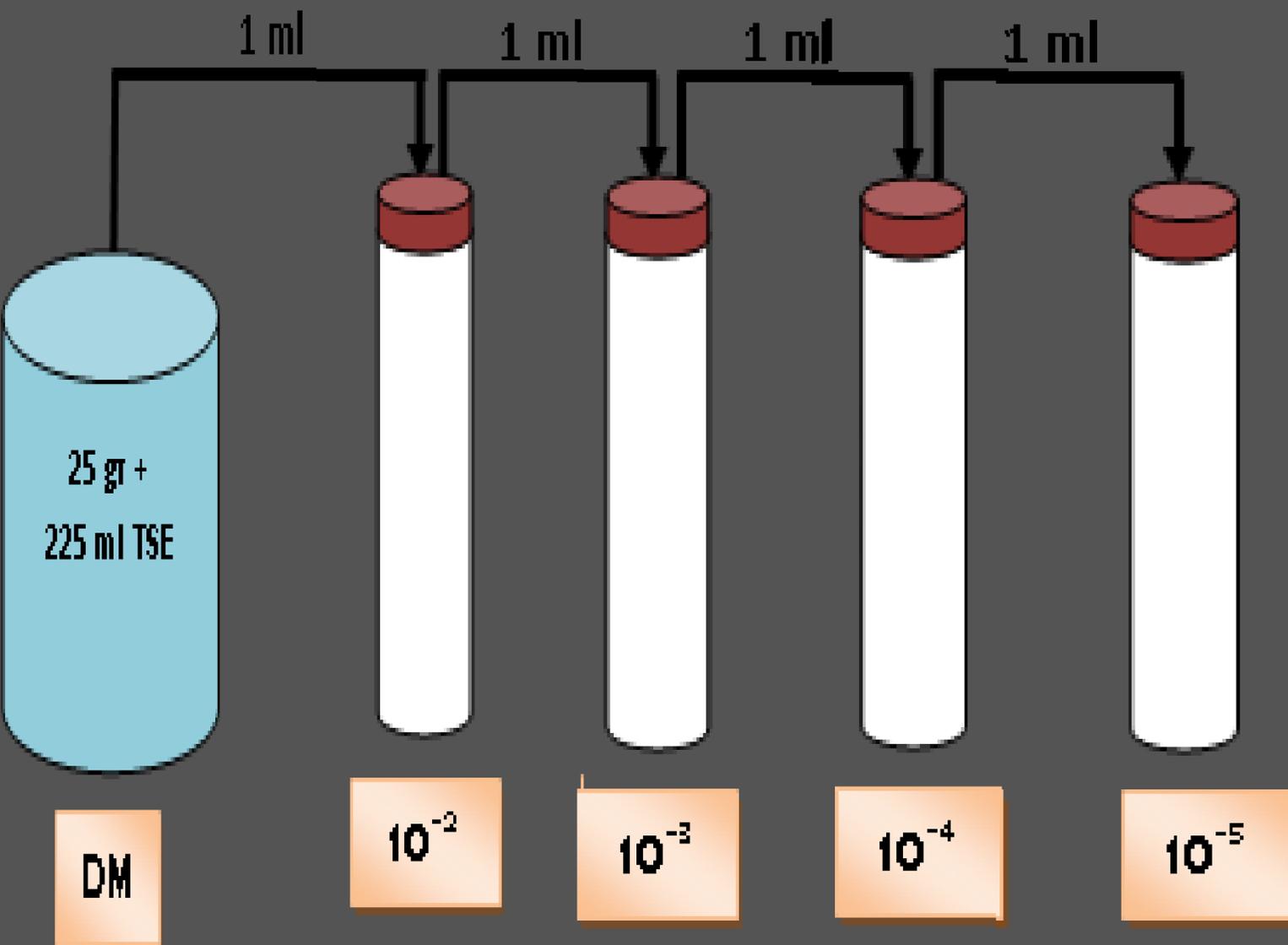






**Préparation de la suspension mère et les dilutions
décimales :**

Figure 1 : Préparation des dilutions décimales



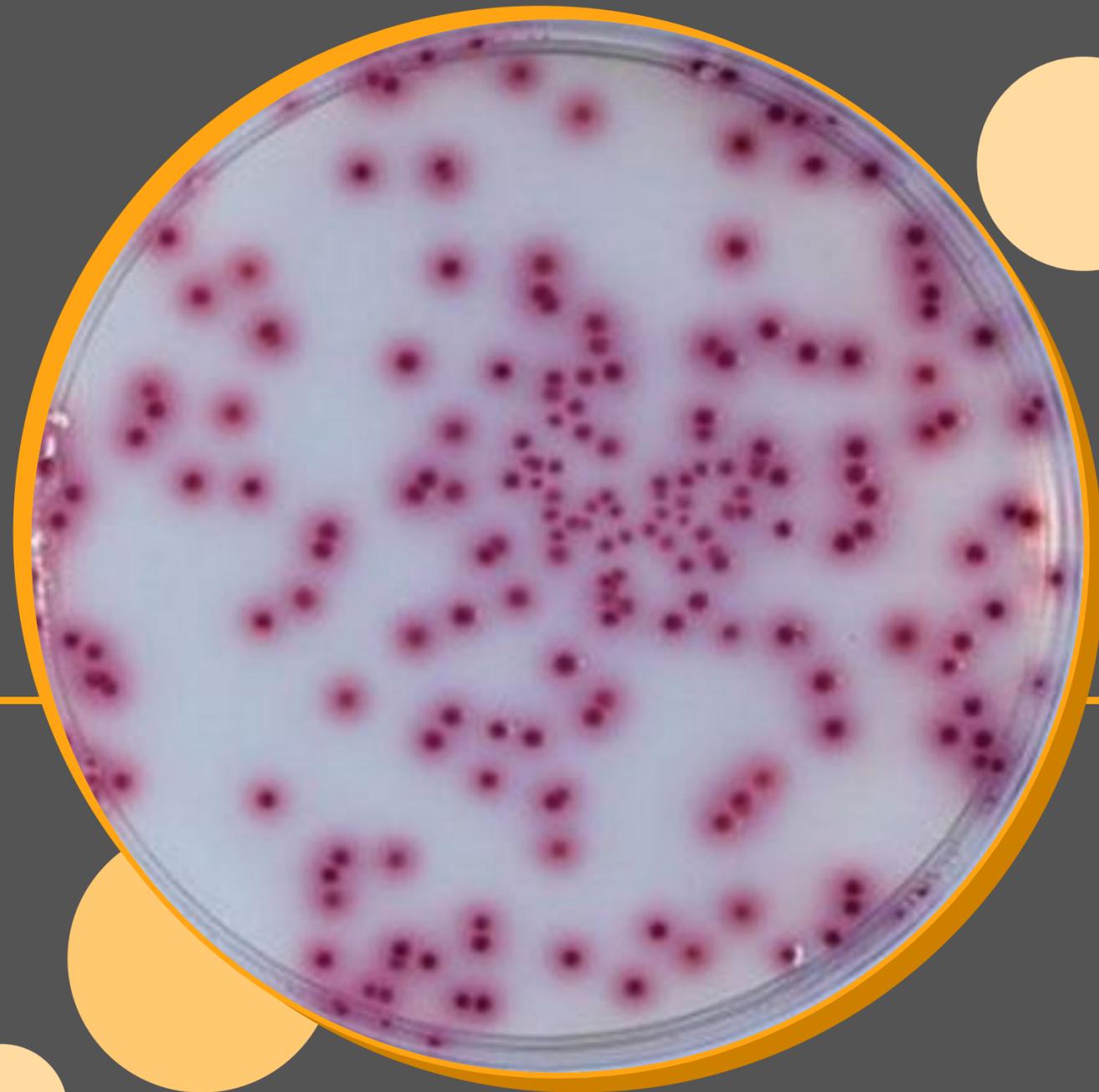
La suspension mère est la première dilution préparée à partir d'un produit solide (la viande).

- Les **25 g** de viande sont placés dans le bol d'un mixeur en présence de **225 ml** du diluant TSE (Tryptone Sel Eau).
- L'homogénéisation a été assurée à l'aide d'un agitateur.
- La solution homogène obtenue est considérée comme **dilution 10^{-1}**
- A partir de de **la dilution 10^{-1}** (considéré comme solution mère), on a procédé à des séries de dilutions formant une progression géométrique de **10^{-1}** (c'est-à-dire 10^{-1} , 10^{-2} , ... et 10^{-5}), en prenant le soin d'agiter énergiquement et longtemps chaque échantillon avant de le diluer, et chaque dilution avant le préparer, à partir d'elle, la dilution suivante (**Figure 1.**).

Les résultats de l'analyse microbiologique sont exprimés par le nombre de bactéries recherchées par gramme d'échantillon à étudier.



- Ces résultats ont été déterminés par un **dénombrement direct des colonies** après ensemencement, de façon aseptique, dans des boîtes de pétri une quantité donnée d'échantillon à analyser dans un milieu solide, nutritif et stérile et incubation de ces boîtes à la température correspondante pendant un temps déterminé (J.O)

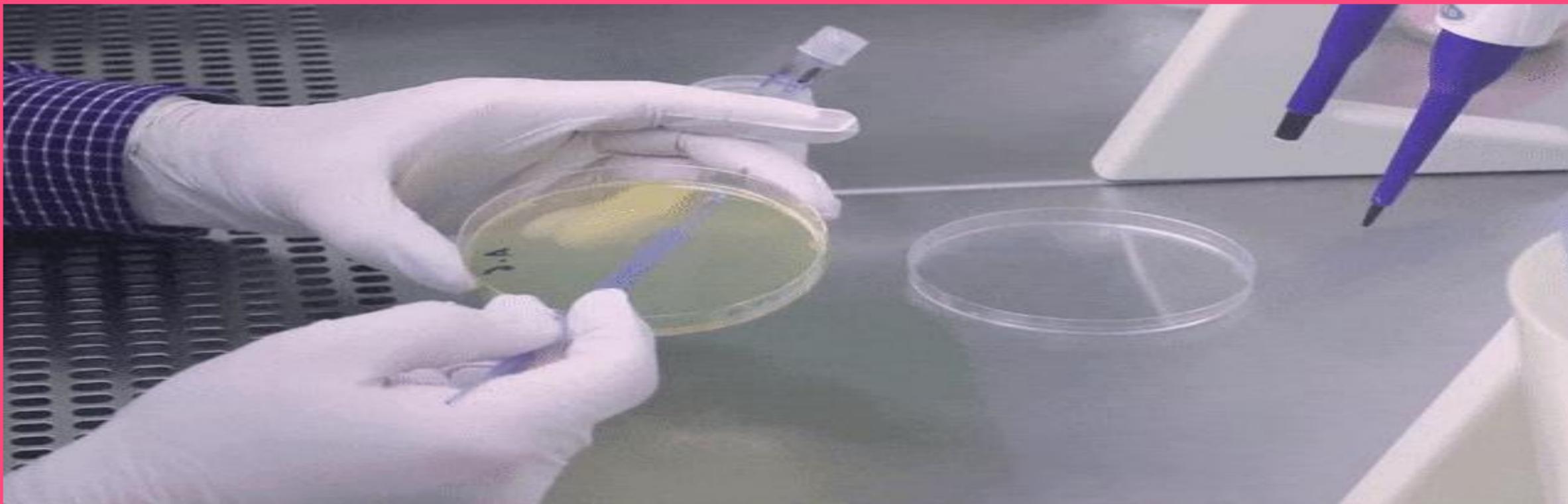


Dénombrement de la
flore aérobie
mésophile totale :



Le milieu de culture: utilisé est le plate count agar (**PCA**) contenant un digeste enzymatique **caséine**, de l'extrait de levure et du glucose avec **incubation à 30°C pendant 72 h**





• On porte aseptiquement **1 mL de la solution mère** et **des dilutions décimales** est mis en culture en profondeur dans **des boîtes de Pétri** stériles et vides préparées à cet usage .

Ensemencement et incubation

• **1 ml de la solution mère** ou **des dilutions décimales** successives allant de 10^{-1} à 10^{-5} sont déposés dans des boites de pétri stériles à l'aide d'une pipettes stériles.

• 15ml de milieu **PCA** refroidit à 45°C , sont coulés dans chaque boite de Pétri. L'inoculum est soigneusement mélangé au milieu de culture par des mouvements circulaires et de « va-et-vient » ou en forme de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale. Après solidification, les boites ainsi préparées sont incubées dans l' étuve réglée à 30°C pendant 72h

Lecture et interprétation :

chaque boite retenue devra contenir au plus **300** colonies et au moins **15** colonies.

-Le nombre de micro organismes par gramme de produit est calculé à partir des boites retenues au niveau de deux dilutions successives à l'aide de la formule suivante:



$$N = \sum C / (N1 + 0,1N2) / D$$

N : le nombre de micro organismes par gramme de produit .

C : Colonies comptées sur les boites retenues ;

N1 : le nombre de boites retenues à la première dilution .

N2 : le nombre de boites retenues à la deuxième dilution .

D : le taux de dilution correspondant à la première dilution.

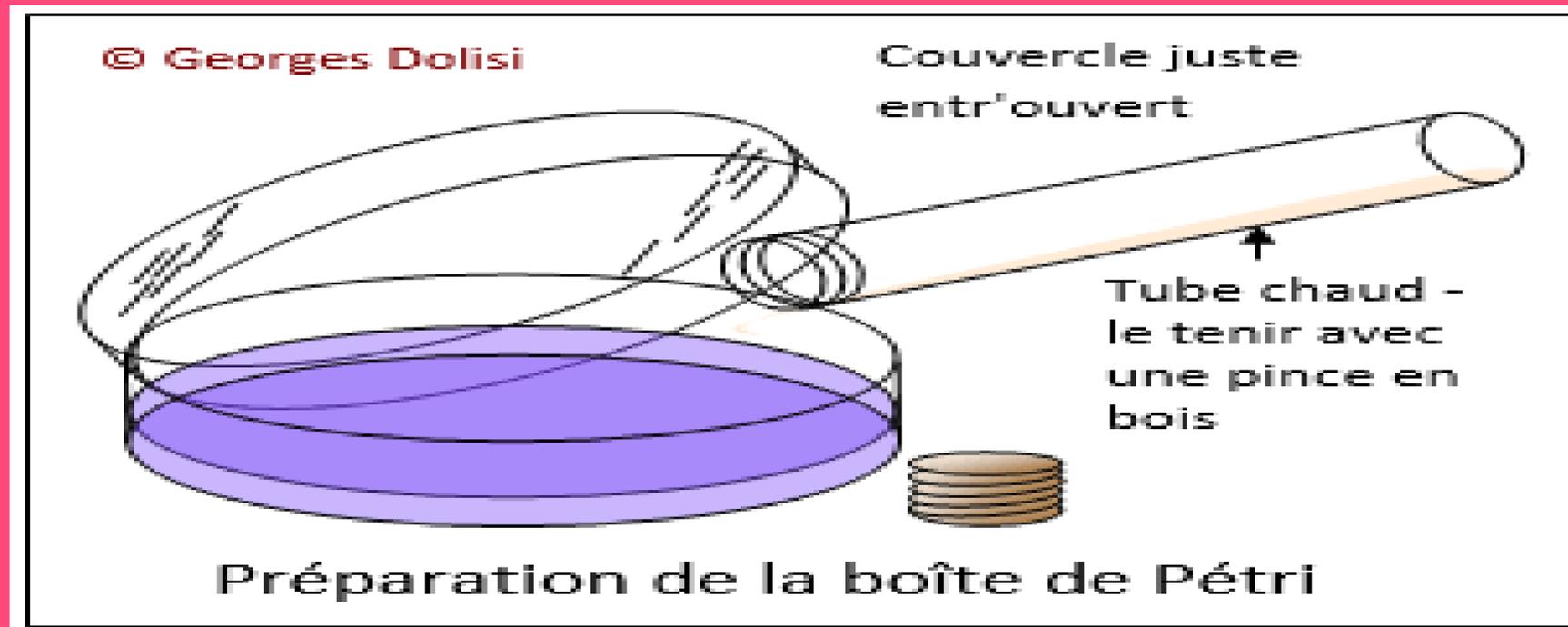


2. Recherche et dénombrement des coliformes:

A. Dénombrement des germes totaux :

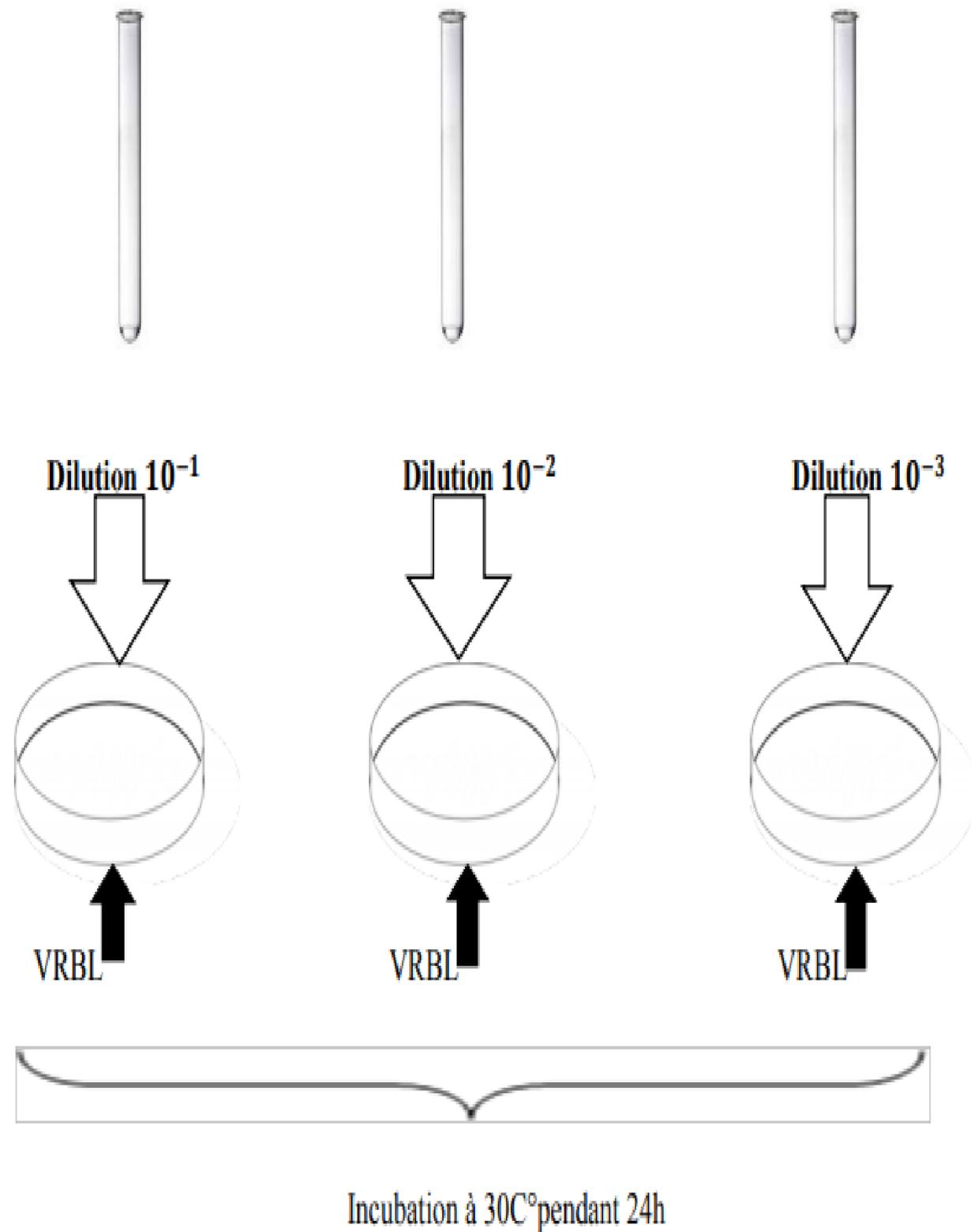


- Le dénombrement des coliformes totaux par comptage des colonies obtenues respectivement à 37°C,
- Les coliformes totaux sont isolés et dénombrés sur un milieu gélosé sélectif le VRBL.



Les prélèvements sont dilués jusqu'à 10^{-5} .

- On porte aseptiquement 1 ml de la solution mère et des dilutions décimales dans des boîtes de Pétri vides préparées et numérotées à cet usage.
- On complète ensuite avec environ 15 ml de gélose VRBL fondue.
- On homogénéise le contenu en effectuant des mouvements circulaires et de «va-et-vient» en formes de «8» sur une surface fraîche et horizontale pour permettre à l'inoculum de se mélanger à la gélose.



B. Dénombrement des Coliformes Fécaux:

-**Milieu de culture** :les Coliformes fécaux sont thermorésistants qui forment des colonies caractéristiques dans **la gélose VRBL**.

-**ensemencement et incubation** : -on ensemence à partir des dilutions 10⁻¹, 10⁻² et 10⁻³.

1ml de chaque dilution est prélevé puis introduit dans des boites de pétrie stériles à l'aide de pipettes stériles, puis on verse 15ml de milieu VRBL refroidit à 45C°.

-L'inoculum est soigneusement mélangé au milieu de culture par des mouvements circulaires et en formes de « 8 » sur une surface fraîche et horizontale.

-après solidification les boites de pétries ainsi préparées sont incubées dans une étuve réglé à 30C° pendant 24h

Figure: dénombrement des Coliformes fécaux



Parmi les Coliformes Fécaux on à rechercher les E. coli :

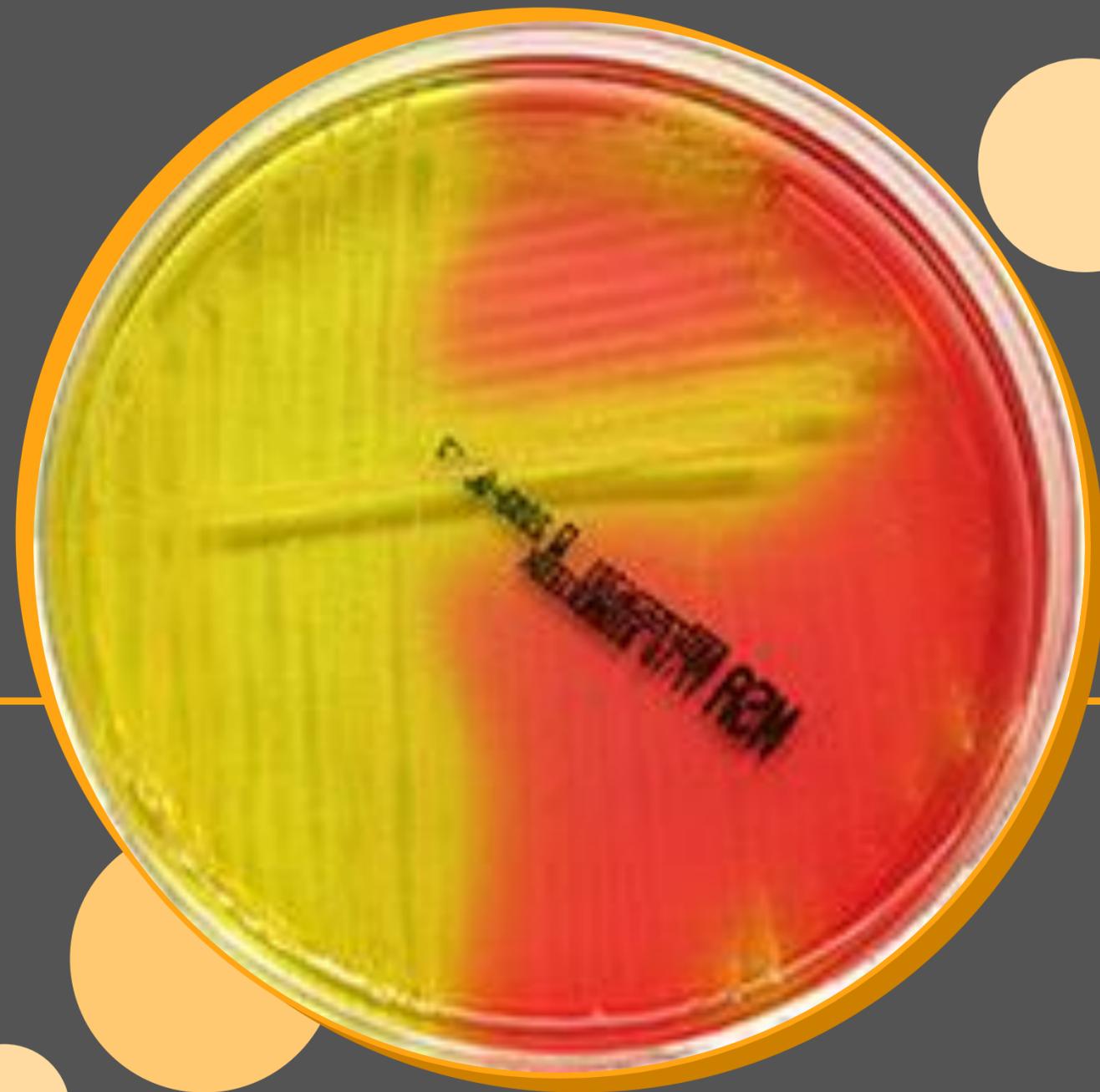
Repiquage d'une colonie suspect dans un tube contient le milieu Schubert.
Incubation à 44C° pendant 24h.

On ajoute 3 gouttes de Kovax au inoculum

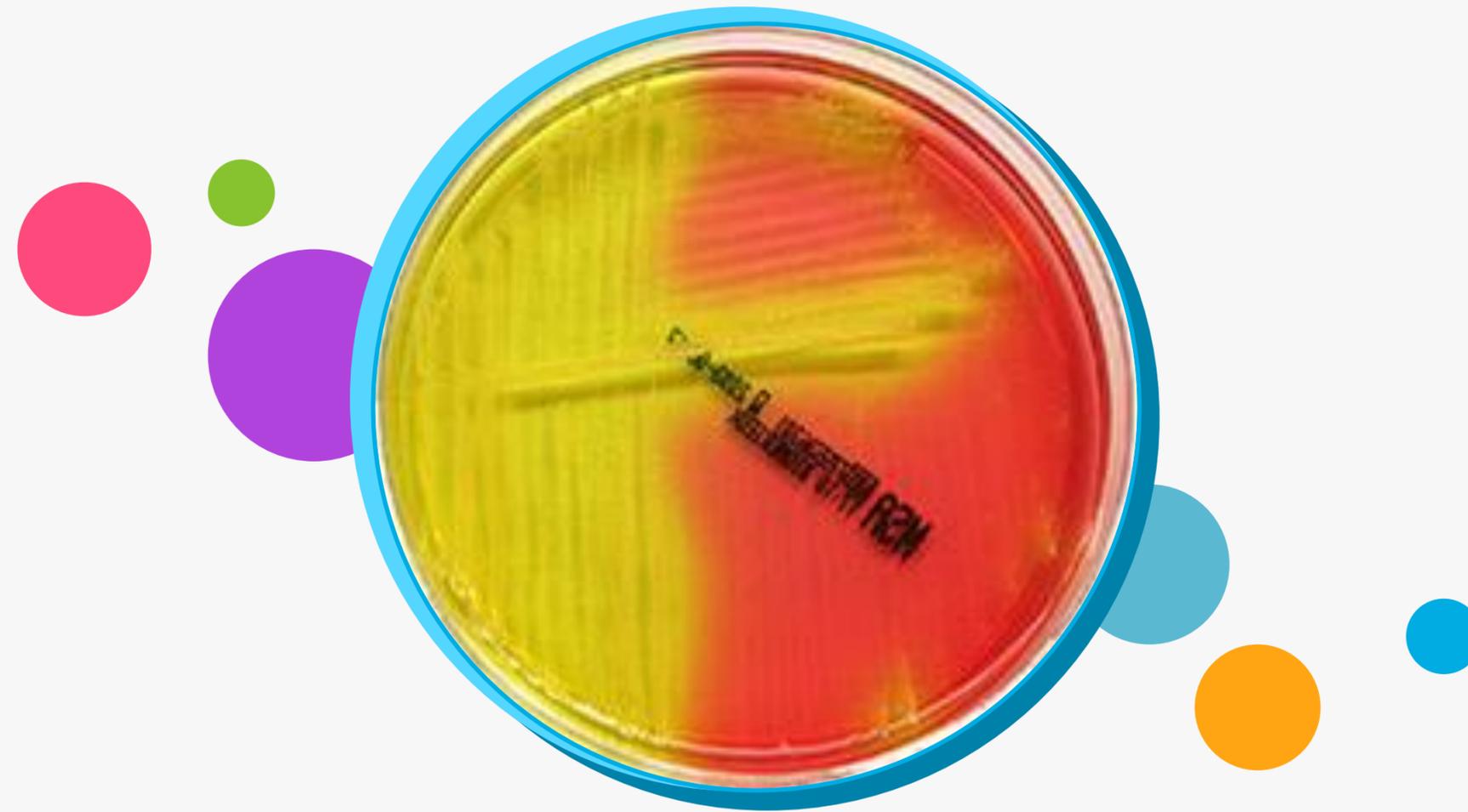
Anou rouge $\geq 2/3$
Présence d'E.coli

Anou rouge
Absence d'E.coli

Figure : recherche et dénombrement des E. coli



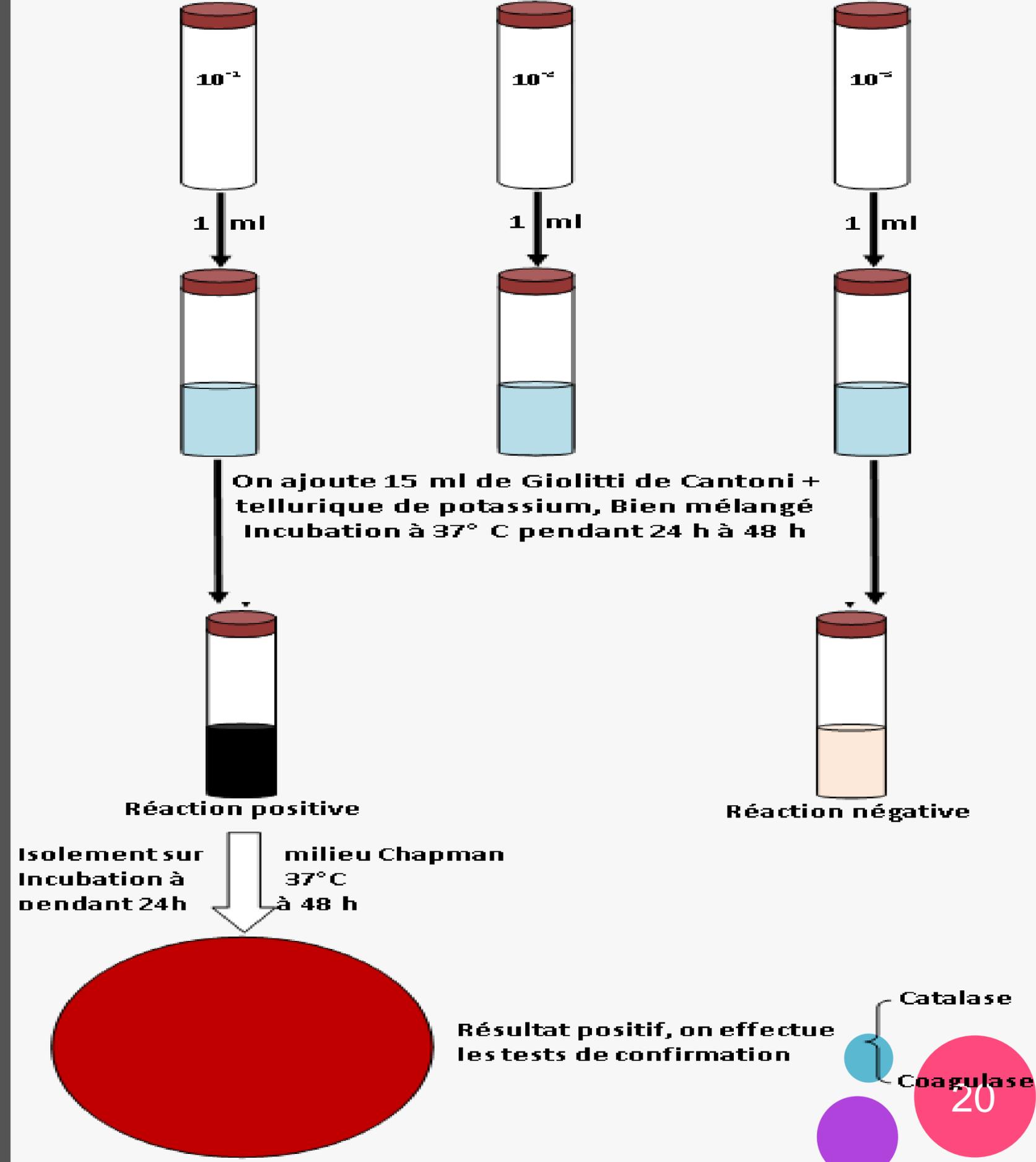
3. Recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*:



Le dénombrement des staphylocoques est réalisé par un ensemencement en surface sur le milieu sélectif ; **Chapman.**
L'incubation a été de **24 à 48 heures à 37°C.**

A partir de la solution mère ou des dilutions décimales, on porte aseptiquement 0,1ml dans les boîtes de Pétri contenant préalablement le milieu solide, on étale l'inoculum en surface à l'aide d'un étaleur ensuite, les boîtes sont portées à une température de 37°C pour incubation pendant 48 heures.

Après 48 heures d'incubation, on retient pour comptage, les boîtes contenant moins de 300 colonies caractéristiques (1 à 2 mm de diamètre produisant parfois un pigment jaune et constituées de cocci à Gram (+) en amas) par boîte

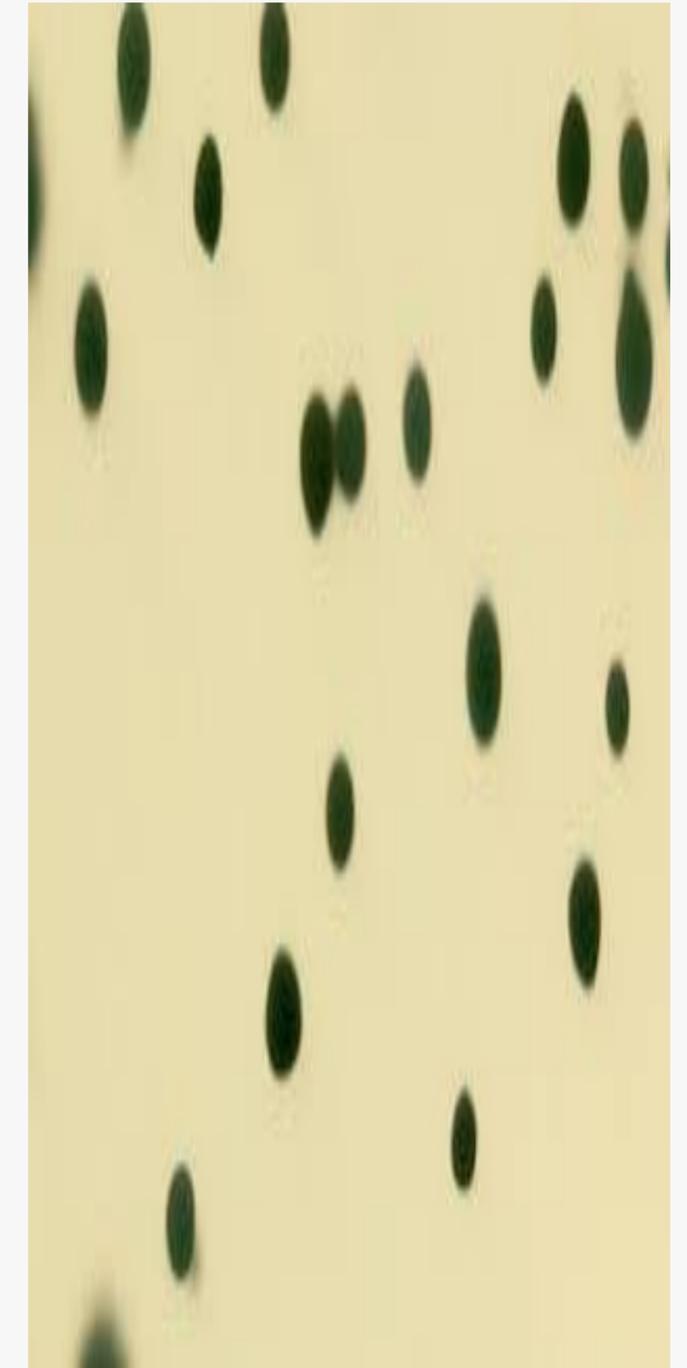


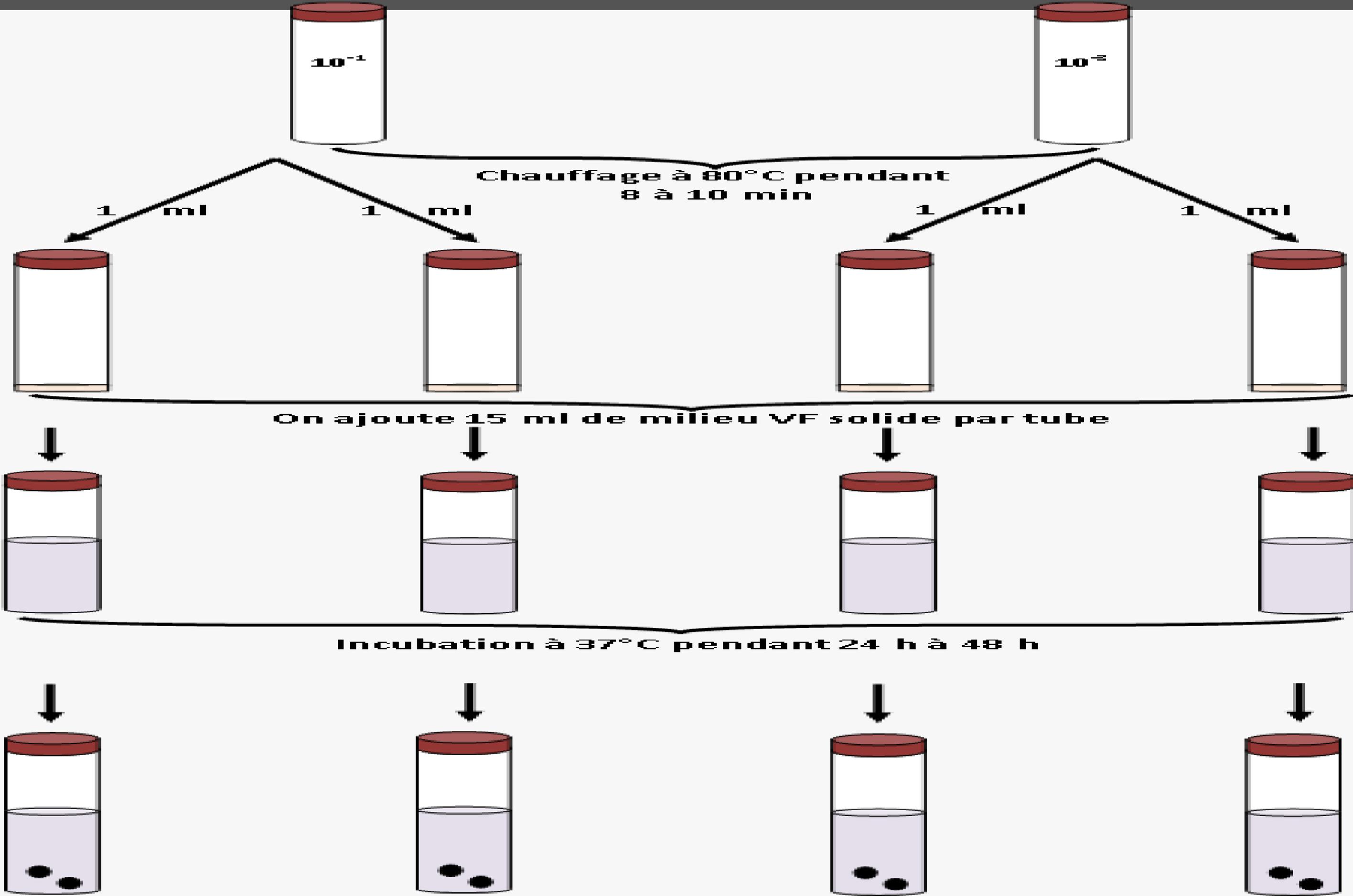


4 . Recherche des
spores de *Clostridium*
sulfito-réducteurs:

Le dénombrement est réalisé en anaérobiose et repose sur l'appréciation de la réduction du sulfite en H₂S dont la mise en évidence est obtenue par addition au milieu d'alun de fer. A 20 mL de **gélose viande-foie (VF)** régénérée et ramenée à 50°C, on ajoute 0,5 ml d'une solution aqueuse de sulfite de Na (à 5%), 0,2 ml d'une solution aqueuse d'alun de fer (à 5%), 1ml de la solution mère et des dilutions 10⁻¹ et 10⁻⁵ est introduit dans le tube en surfusion. Après refroidissement et incubation à 37°C pendant 24 heures.

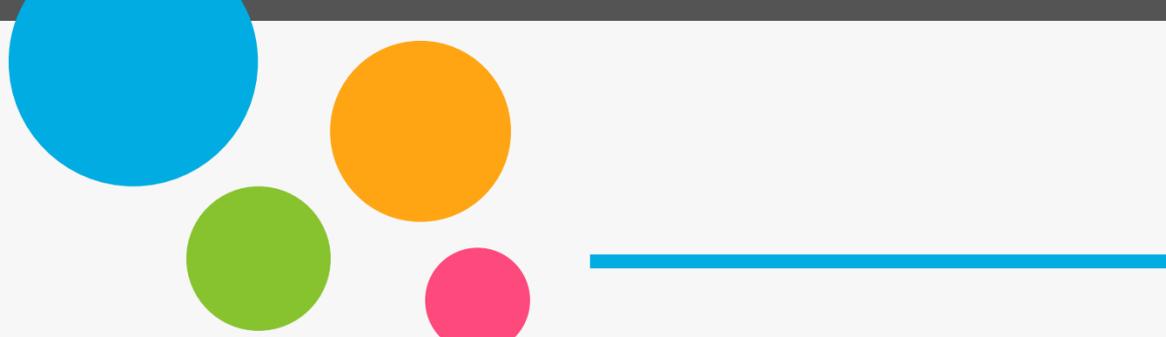
Les colonies des bactéries sulfitoréductrices sont **noires** ; leur taille varie selon l'espèce .







5. Recherche de *Salmonella*:



01 Pré-enrichissement

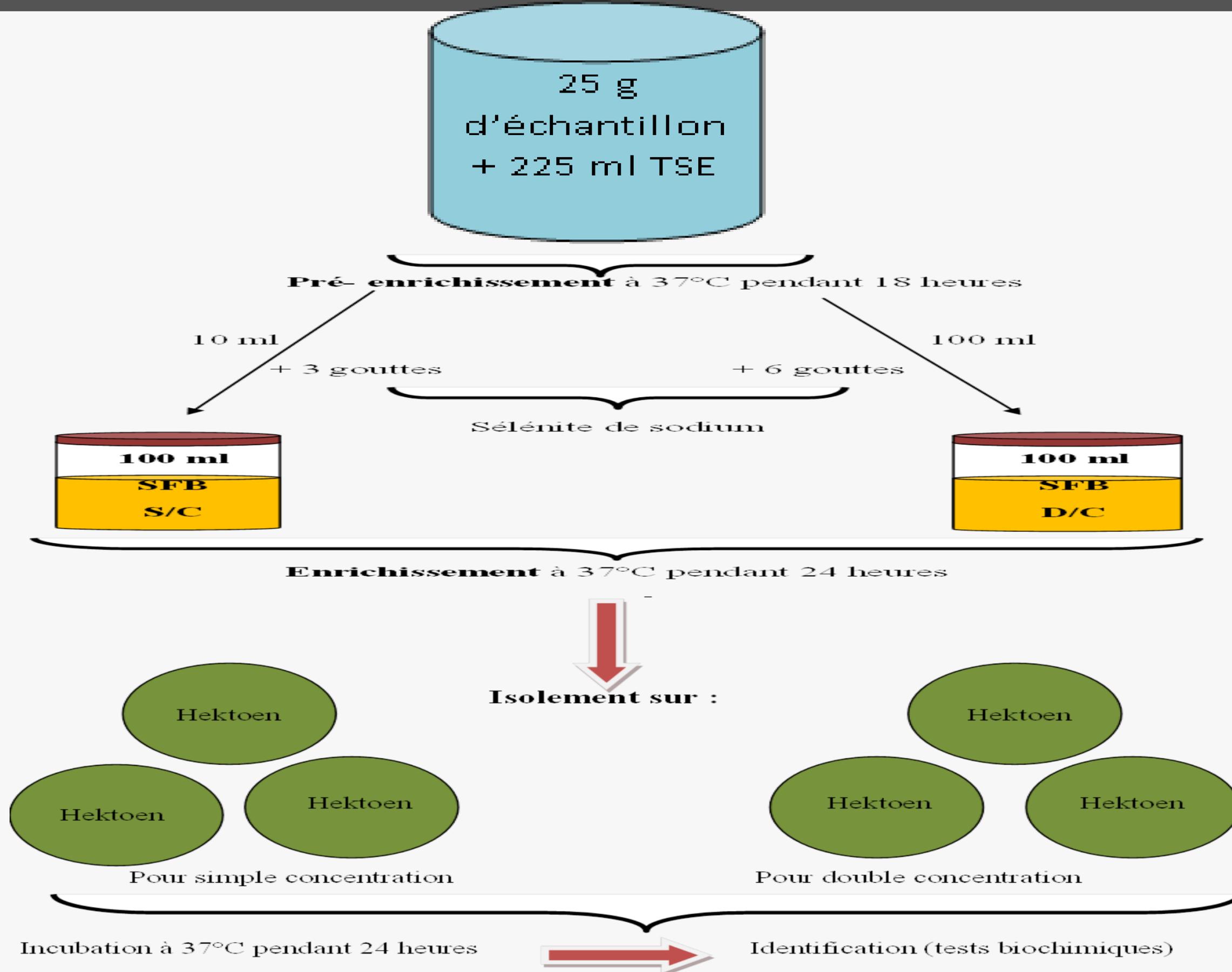
Cette étape consiste à incuber à l'étuve à **37°C** la solution mère pendant **20 h**.

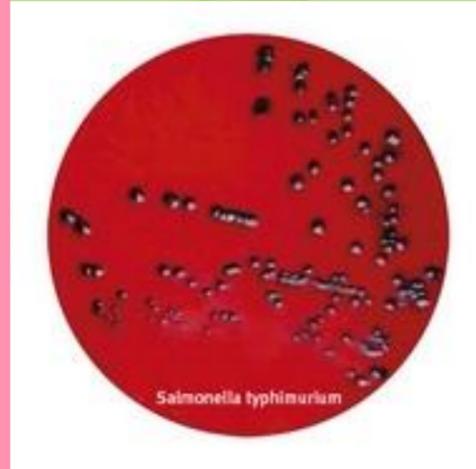
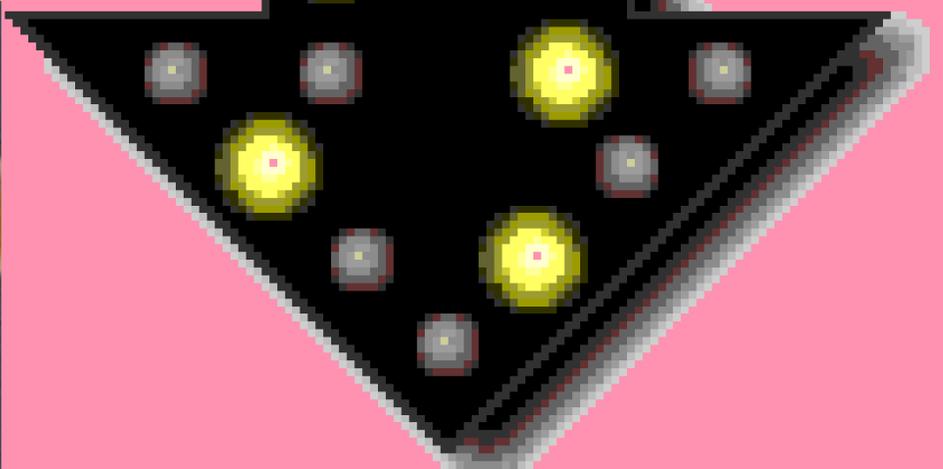
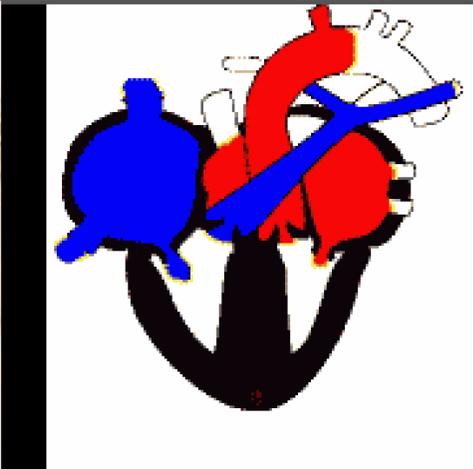
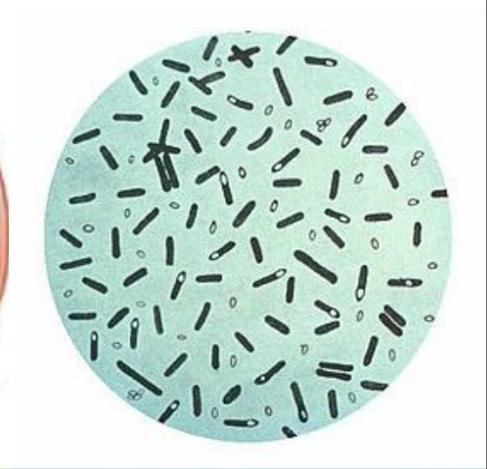
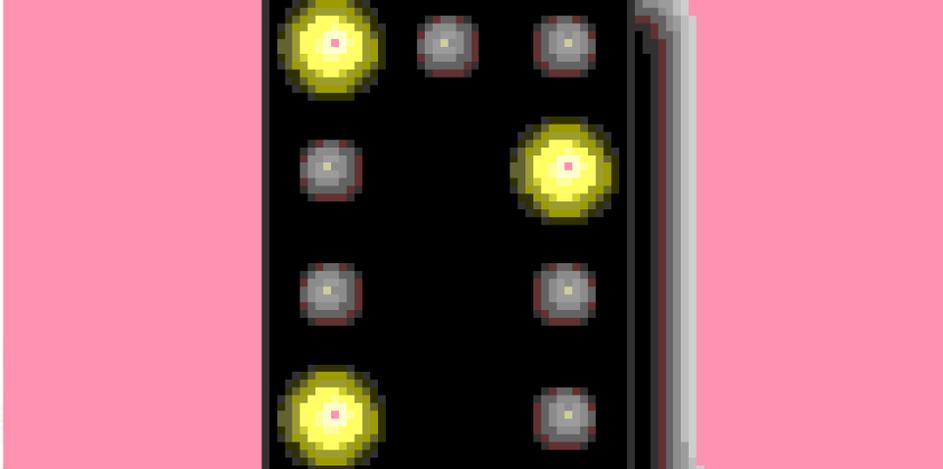
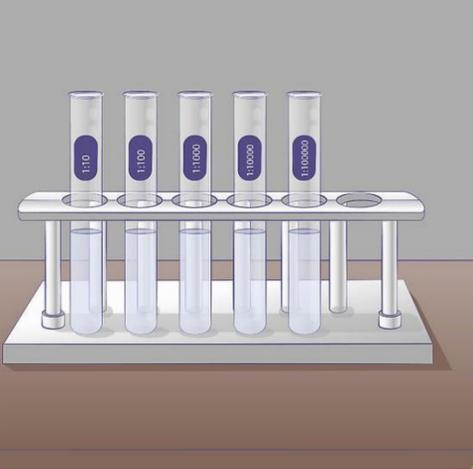
02 Enrichissement :

L'enrichissement est réalisé sur le milieu sélectif SFB réparti en : 10 ml pour le flacon **SFB** simple concentration (**S/C**) ; 100 ml pour flacon **SFB** double concentration (**D/C**) ; Incubation se fait à l'étuve à 37°C pendant 24 heures.

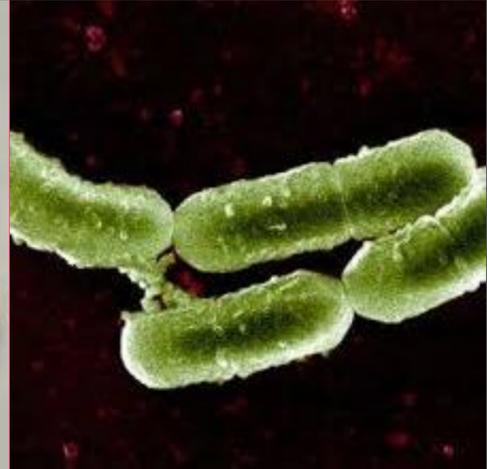
Isolement:

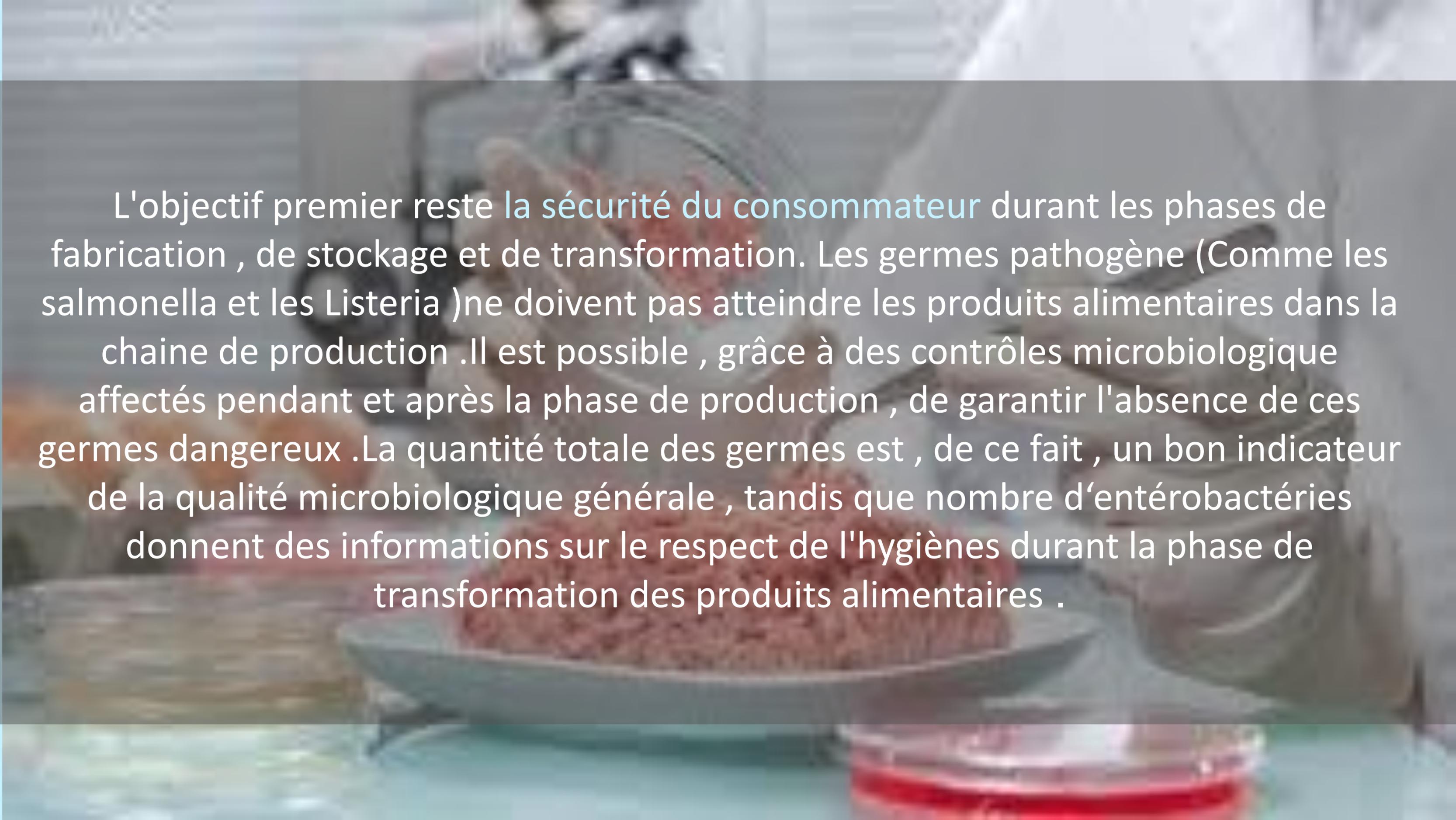
est réalisé par ensemencement en surface du milieu sélectif solide : **Hektoen** à partir du bouillon d'enrichissement. ---Les boîtes sont incubées à 37°C pendant 18 à 24 heures et parfois même pendant 48 heures, en absence de colonies caractéristiques (colonies bleues) après la première lecture





conclusion



A laboratory setting with a balance scale and petri dishes. The background is slightly blurred, showing a person in a white lab coat. The foreground features a balance scale with a weighing pan containing a red powder. To the right, there are several petri dishes, one of which contains a red liquid. The text is overlaid on the image in white with a light blue shadow.

L'objectif premier reste la **sécurité du consommateur** durant les phases de fabrication , de stockage et de transformation. Les germes pathogène (Comme les salmonella et les Listeria)ne doivent pas atteindre les produits alimentaires dans la chaine de production .Il est possible , grâce à des contrôles microbiologique affectés pendant et après la phase de production , de garantir l'absence de ces germes dangereux .La quantité totale des germes est , de ce fait , un bon indicateur de la qualité microbiologique générale , tandis que nombre d'entérobactéries donnent des informations sur le respect de l'hygiènes durant la phase de transformation des produits alimentaires .

BIBLIOGRAPHIE:

<http://e-biblio.univ-mosta.dz/bitstream/handle/123456789/3399/M%C3%A9moire%20final.pdf?sequence=1&isAllowed=y>

http://bibfac.univ-tlemcen.dz/snvstu/opac_css/doc_num.php?explnum_id=2584

Microbiologie alimentaire, Technique de laboratoire Jean – Paul Larpent coordinateur.

Journal officiel de la République Algérienne N°35 Aouel Safar 1419,27mai1998,