

édits : 4  
efficients : 2



# Microbiologie alimentaire appliquée

**Dr Amel DOUMANDJI**  
**Professeur**

**Université de Blida 1**

**Faculté de s Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département agro-alimentaire**



**Isolement et identification de  
bactéries et de leurs toxines  
dans les aliments**

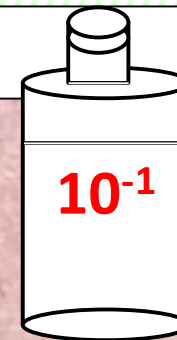
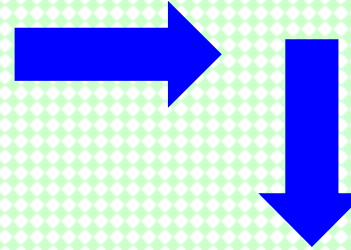
# Préparation des dilutions décimales à partir de l'échantillon à analyser

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

Échantillon  
introduit dans  
un flacon  
stérile

25 g d'échantillon sont  
additionnés avec  
225 mL de TSE

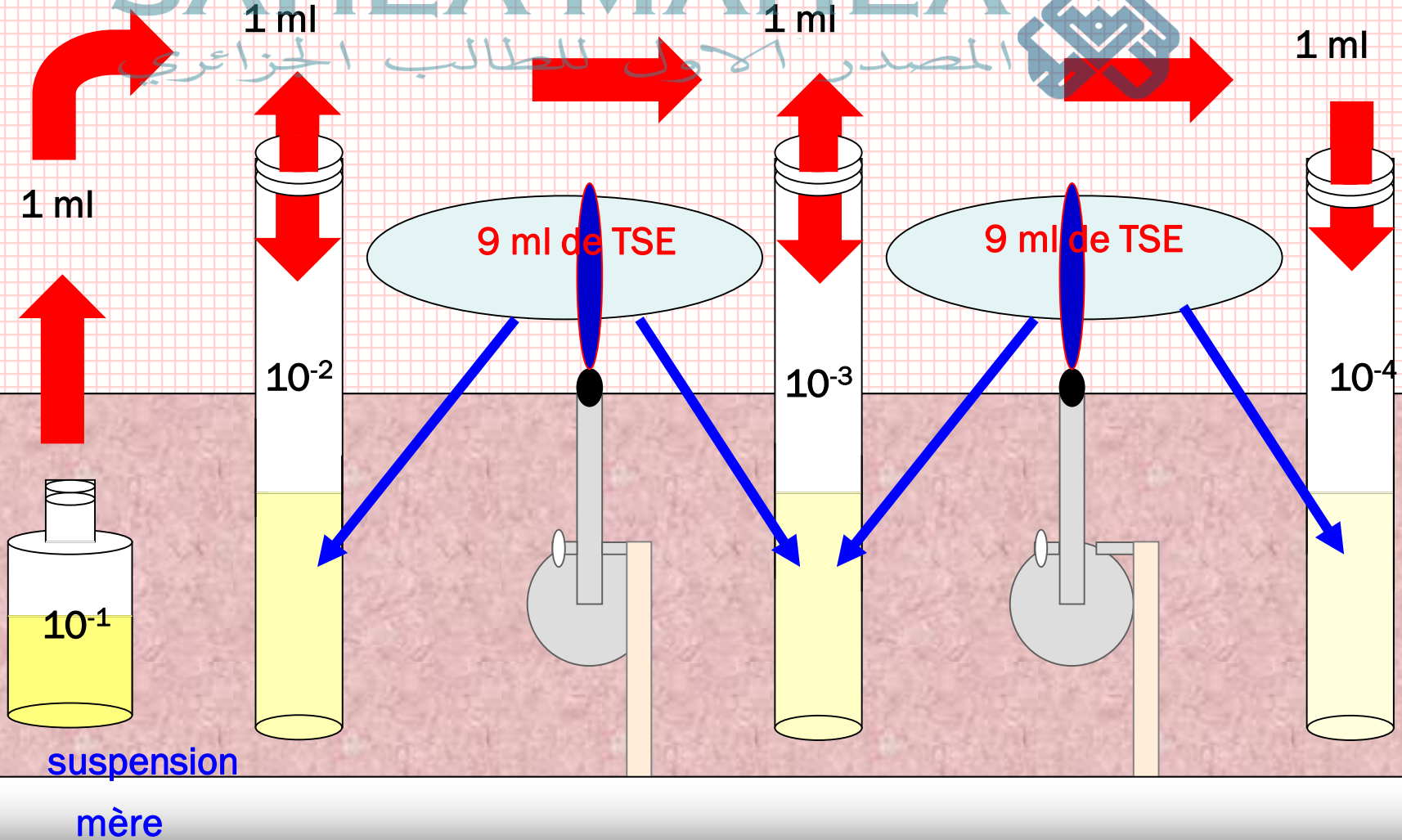


Suspension mère

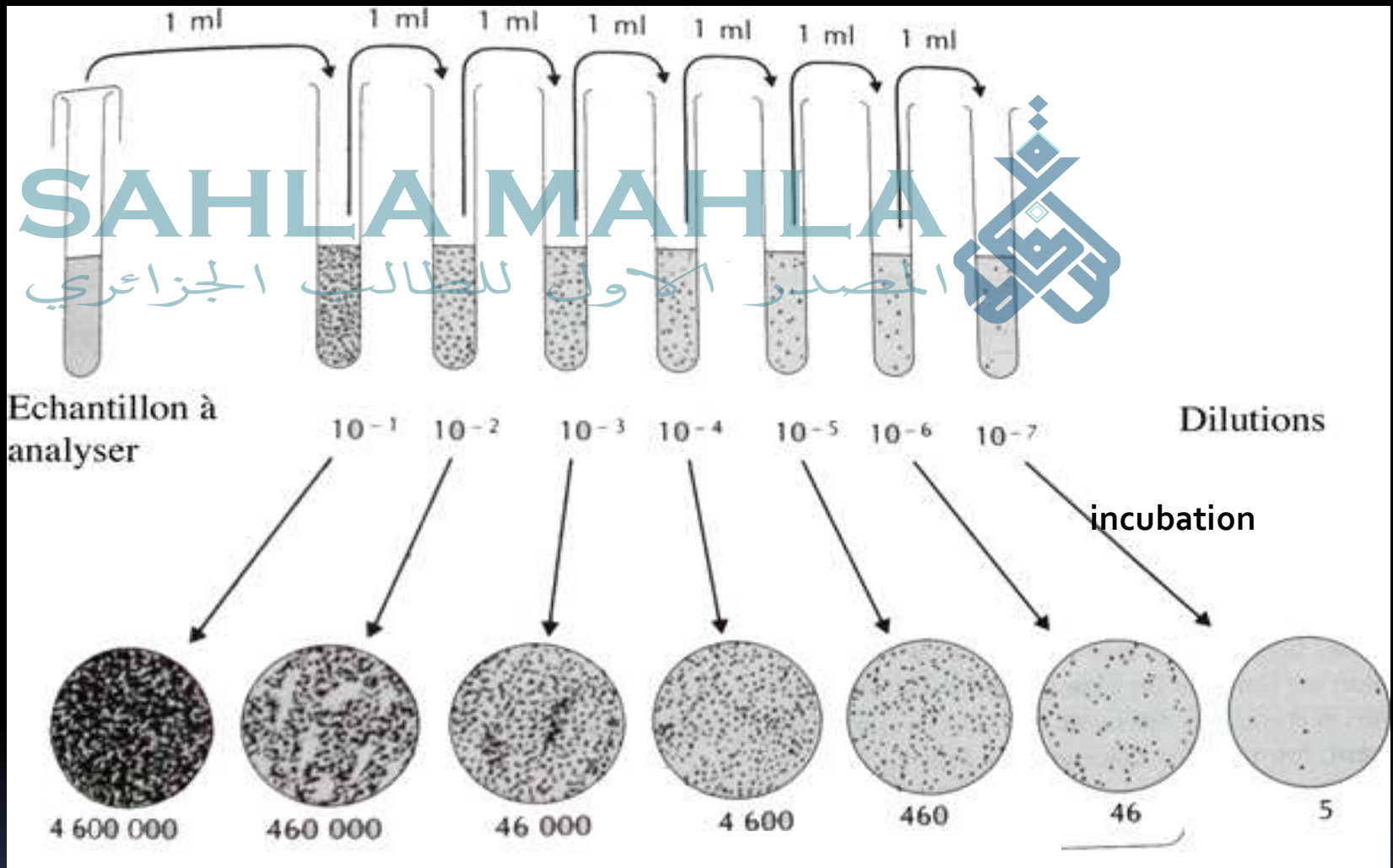
# TSE (Tryptophane Sel Eau)

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



## La numération sur gélose en boîte de Pétri



Après incubation on compte le nombre des colonies (choisir les boites contenant entre 30 et 300 colonies). Comme une colonie provient d'une seule cellule ou d'un amas de cellules, on exprime le résultat en UFC/ volume de l'échantillon. (ne pas oublier le facteur de dilution) .

• **Le milieu TSE** (Tryptophane Sel Eau) est utilisé pour l'enrichissement de tous les germes recherchés (sauf les salmonelles).

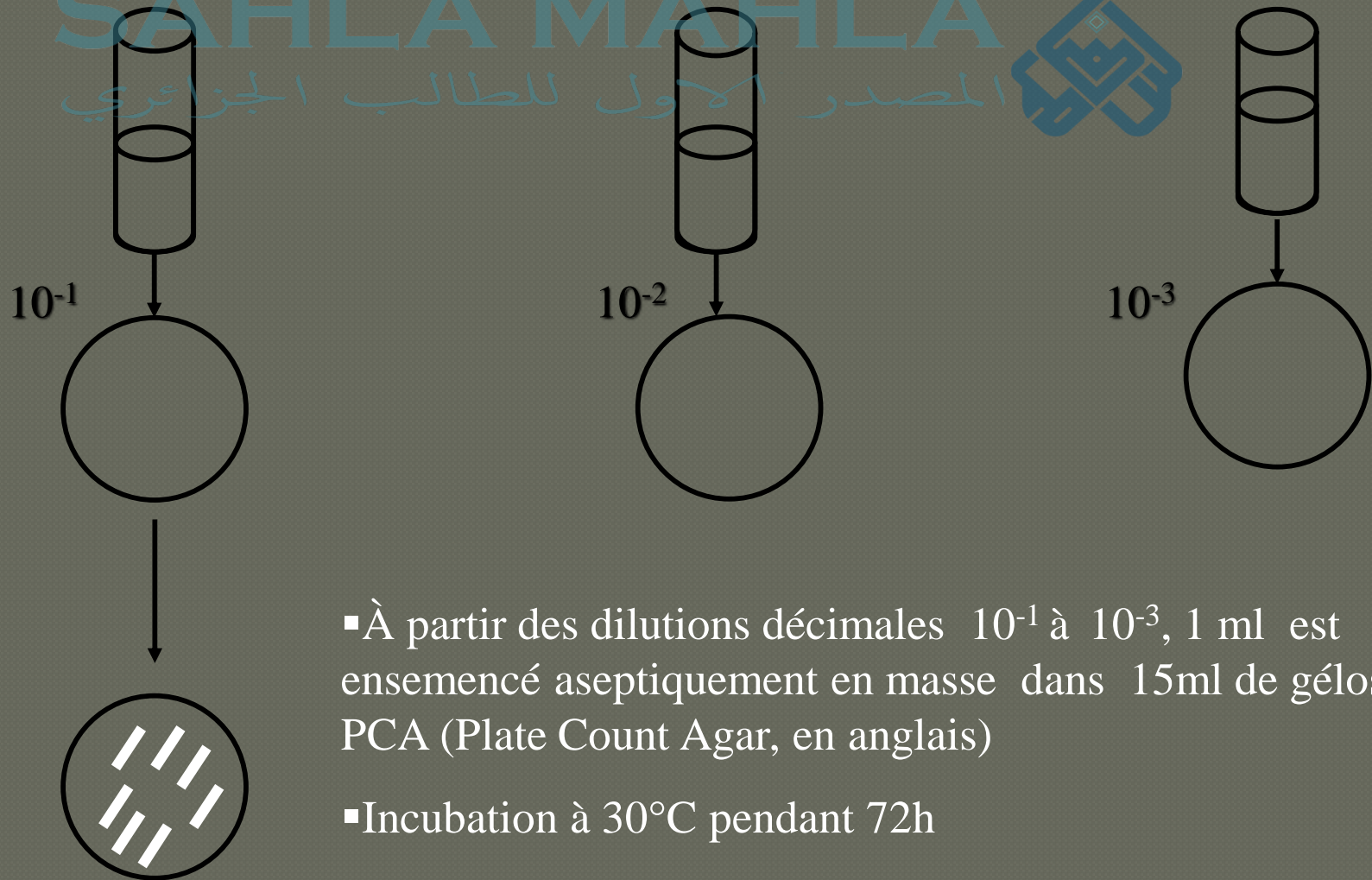
المصدر الاول للطالب الجزائري

Composant	Quantité
Peptone bactériologique	10 g
<b>Chlorure de sodium</b>	<b>5 g</b>
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,2 ±0,2

Les **peptones** constituent la source essentielle de molécules organiques azotées

## Recherche et dénombrement de la flore aérobie mésophile totale (NA 1207)

FAMT peuvent se développer dans un milieu nutritif non sélectif. Incubés à 30°C pendant 72h. Apparaissent sous forme de colonies de taille et de formes différentes (Petranxiene et Laped, 1981)



- À partir des dilutions décimales  $10^{-1}$  à  $10^{-3}$ , 1 ml estensemencé aseptiquement en masse dans 15ml de gélose PCA (Plate Count Agar, en anglais)
- Incubation à 30°C pendant 72h
- Dénombrer les colonies lenticulaires

**Gélose PCA** (Plate Count Agar) est utilisée pour la recherche et le dénombrement des germes aérobies mésophiles totaux (GAMT).

Composant	Quantité
Digestat enzymatique de caséine	5 g
Extrait de levure	2,5 g
Glucose	1 g
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,0 ± 0,2



Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre d'échantillon à l'aide de la formule suivante :

**Nombre/ml = Nombre total de colonies comptées / Volumeensemencé de l'échantillon**

### Expression des résultats:

Calculer le nombre de micro-organisme par ml d'échantillon à l'aide de la formule suivante :

$$N = \sum c / V. (n1+0,1 n2+...)d$$

D'où :

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

$\sum c$  : somme totale des colonies comptées.

n2 : nombre de boites comptées dans la première dilution.

n1 : nombre de boites comptées dans la seconde dilution.

d : le facteur de dilution à partir du quel les premiers comptages ont été obtenus.

v : le volume de solution déposée.

Nous considérons que vous avez obtenu les résultats suivants pour l'analyse de 25 g de yaourt.

	Échantillon pur	Dilution $10^{-1}$	Dilution $10^{-2}$	Dilution $10^{-3}$	Dilution $10^{-4}$
Boite 1	Indénombrable	Indénombrable	295	34	3
Boite 2	Indénombrable	Indénombrable	280	31	4

Il est impossible de compter une boîte contenant plus de 300 colonies. Le risque d'erreur est trop important donc elles sont écartées.

Les boîtes contenant moins de 30 colonies sont elles aussi écartées, les colonies sont trop rares et peuvent induire en erreur.

# Application numérique:

المصدر الأول للطالب الجزائري



$$N = \sum c / V. (n1+0,1 n2+...)d$$

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

$\sum c$  : somme totale des colonies comptées.

n2 : nombre de boites comptées dans la première dilution.

n1 : nombre de boites comptées dans la seconde dilution.

d : le facteur de dilution à partir du quel les premiers comptages ont été obtenus.

v : le volume de solution déposée.

N = 29092 UFC pour 25 gramme de yaourt, soit  $1.2 \cdot 10^3$  par gramme

SAHLA MAHLA

المصدر الأول لطالب الجزائري



$$N = \sum c / V. (n1+0,1 n2+...)d$$

$$N = (295 + 280 + 34 + 31) / 1 \times (2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}$$

N= 29092 UFC pour 25 gramme de yaourt, soit  $1.2 \times 10^3$  par gramme

# Recherche et dénombrement des Coliformes



Les coliformes totaux sont des bâtonnets, à Gram négatif, aéro-anaérobis facultatifs, non sporulés. (**Guiraud et Galzy, 1980**).

Les coliformes fécaux se distinguent des coliformes totaux par leur température de prolifération qui est de 44° C (**Lapied et Petransxiene, 1981**).

**A- En milieu Solide**  
**(gélose VRBL)**

## Gélose VRBL (gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre)

### Principes:

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

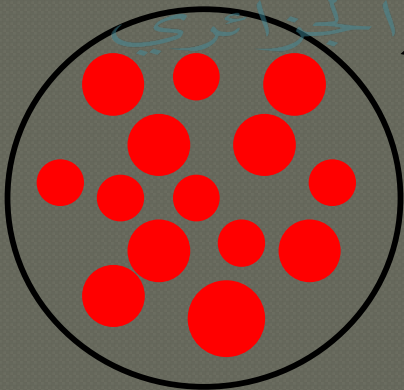


- La présence simultanée de **cristal violet** et de **sels biliaires** assure l'inhibition des bactéries à Gram positif.
- La fermentation du lactose se traduit par une acidification, révélée par le virage au rouge de l'indicateur pH (rouge neutre), et par la précipitation d'acides biliés autour des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



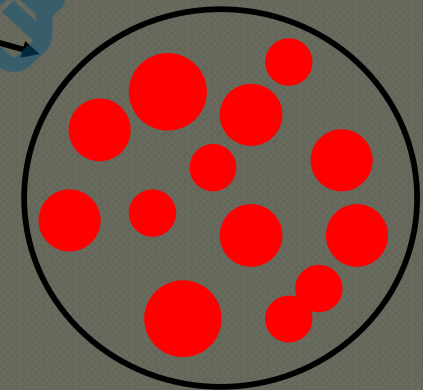
1 ml de chaque dilution

37°C



**Coliformes totaux**

44°C



**Coliformes fécaux**

- Déposer 1ml de dilution dans la boîte de Pétri
- Couler dessus environ 18 ml de gélose VRBL fondue et refroidie à 45°C
- Faire des mouvements circulaires pour bien mélanger la gélose à l'inoculum
- Laisser solidifier
- Incuber pendant 24 à 48h

Les coliformes (totaux et fécaux) apparaissent sous forme de petites colonies rouges

**Recherche et dénombrement des coliformes totaux et des coliformes fécaux**

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري





**Gélose VRBL (Violet Red Bile Lactose)** est utilisée pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants

Composant	Quantité
Peptone	7 g
Extrait de levure	3 g
Chlorure de sodium	5 g
Sels biliaires	1,5 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	30 mg
Cristal violet	2 mg
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,4 ±0,2

# Recherche et dénombrement de *Staphylococcus aureus*

(NA 2696)

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



*Staphylococcus aureus* réduit le tellurite (colonies noires),

Provoque la protéolyse du jaune d'oeuf (halo clair autour des colonies),

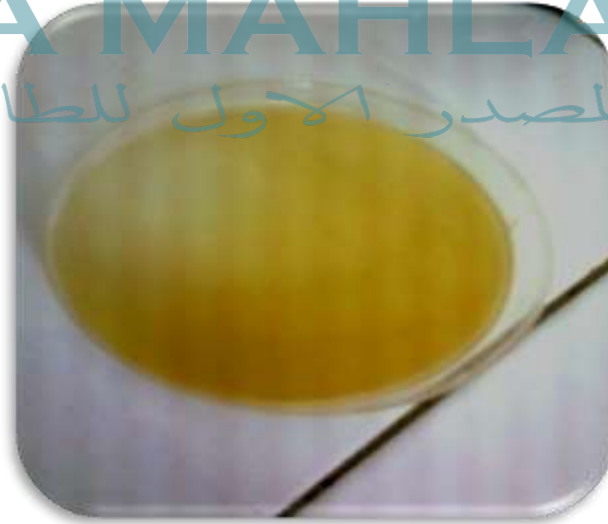
opacifier la zone de protéolyse (activité des lipases).

**Milieu utilisé:**

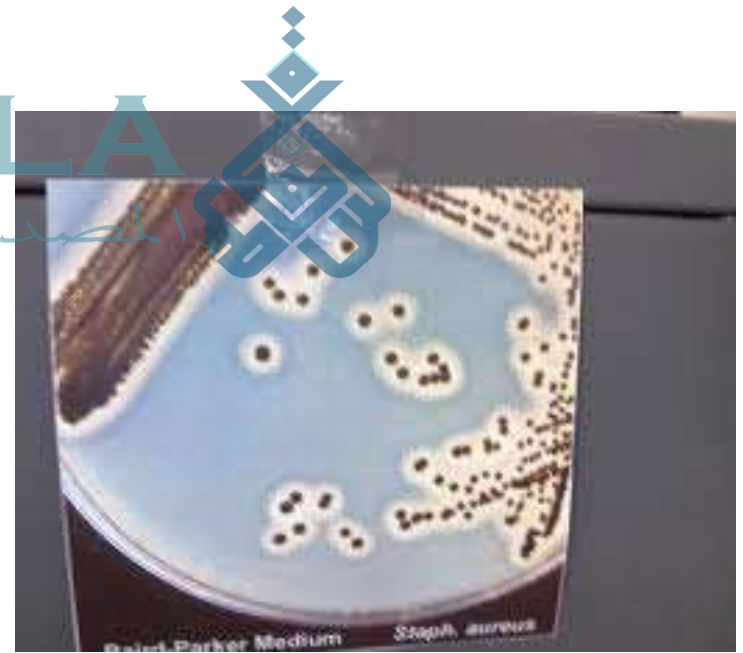
gélose Baird Parker

## Mode opératoire

- 0,1 mL de la solution mère et 0,1 mL de chacune des dilutions décimales sont étalés à l'aide d'un râteau stérile à la surface de la gélose Baird Parker
- Incubation à 37 °C pendant 24 h.



**Recherche du *Staphylococcus aureus* (gélose Baird Parker)**



Les Staphylocoques à coagulase positive présumés forment **des colonies noires**

:

\* **Un halo clair autour de la colonie** qui correspond à une zone de protéolyse (éclaircissement du jaune d'œuf).

• Des zones opaques qui peuvent apparaître plus tardivement dans le halo clair, elles sont dues à l'action de lipases.

## Gélose Baird Parker est utilisé pour la recherche et le dénombrement de *Staphylococcus aureus*

Composant	Quantité
Peptone pancréatique de caséine	10 g
Extrait de levure	1 g
Extrait de viande	5 g
<b>Chlorure de lithium</b>	<b>5 g</b>
Agar	16 g
L – Glycine	12 g
Pyruvate de sodium	10 g
<b>Tellurite de potassium</b>	<b>0,1 g</b>
Emulsion de jaune d'oeuf	10 ml
Sulfaméthazine	0,05 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,2 ±0,2

Le milieu est rendu inhibiteur vis-à-vis des autres bactéries par le chlorure de lithium et le tellurite de potassium.



# Recherche de *Clostridium* sulfito-réducteurs

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



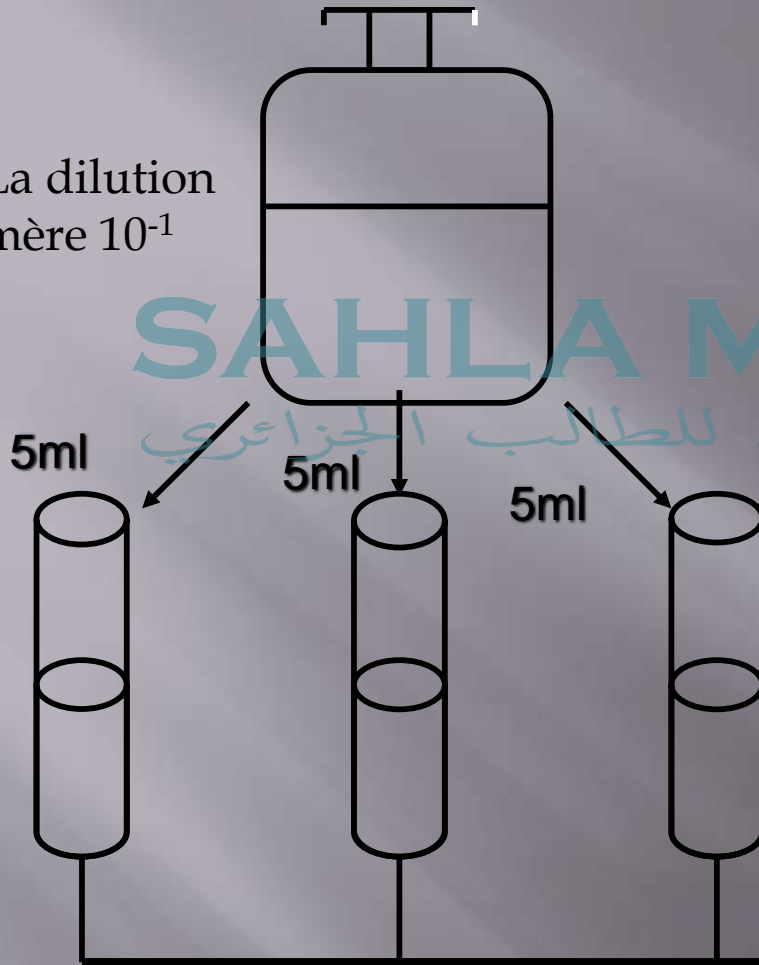
**Principe:** *Clostridium* sulfito-réducteur et *Clostridium perfringens* réduisent les sulfites en sulfures.

*Clostridium* sulfito-réducteurs (ou leurs spores):

- bactéries commensales de l'intestin ou saprophytes du sol;
- comme test de contamination fécale éventuellement ancienne vu la résistance des spores à l'extérieur. (**Joffin et Joffin ,1993**)

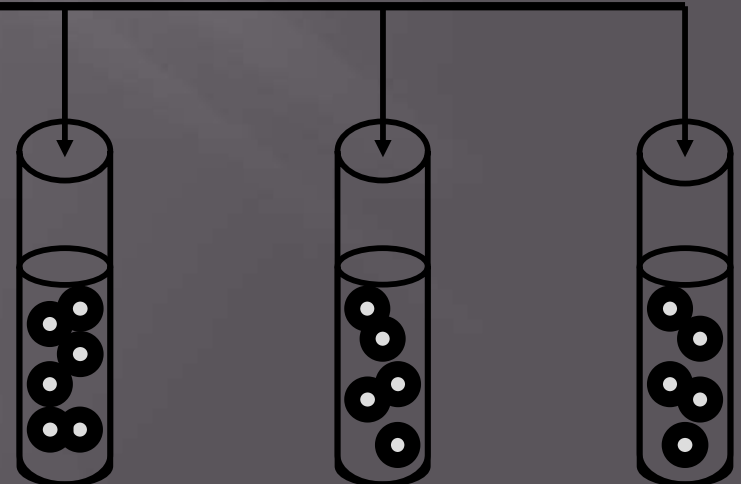
# RECHERCHE ET DÉNOMBREMENT DE CLOSTRIDIIES SULFITO-RÉDUCTEURS

La dilution mère  $10^{-1}$



- Chauffage au bain Marie à  $80^{\circ}\text{C}$  pendant 10 min
- Refroidir à l'eau du robinet
- Couler aseptiquement la gélose **VF** fondue à  $45^{\circ}\text{C}$  additionnée de sulfite de sodium et alun de fer
- Ensemencer la gélose VF avec 1 ml d'échantillon

ajouter quelques gouttes d'huile de paraffine pour créer l'anaérobiose, incuber à  $46^{\circ}\text{C}$  pendant 48h.



**Apparition de colonies claires  
entourées d'un halo noir.**

SAHLA MAHLA

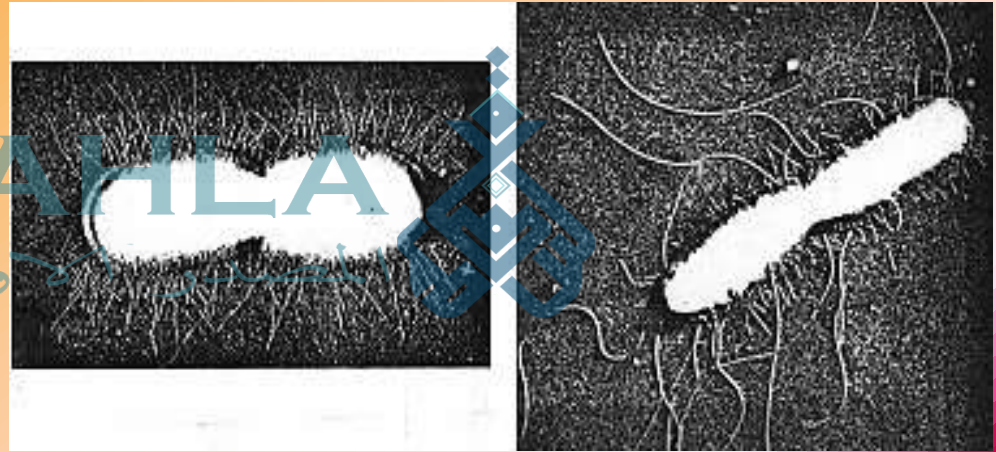
المصدر الاول للطالب الجزائري





## Recherche de *Salmonella* (NA 2688)

SAHLA MAHLA  
المصدر الأول للطالب الجزائري



### Le principe

Le nombre de *salmonella* est généralement faible dans un échantillon, il est nécessaire de procéder à un pré-enrichissement puis à un enrichissement dans un milieu sélectif (Christiane et Jean-Noël, 1999).

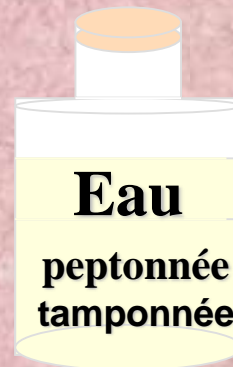
# Le 1<sup>er</sup> jour: pré-enrichissement non sélectif

## Étape de pré-enrichissement:

SAHLA MAHLA



Introduire 25 mL d'échantillon dans 100 mL  
d'Eau Peptonée Tamponnée  
16- 20h à 37°C.



**INCUBER à 37°C /16- 20h**

## Étape d'enrichissement:

1 mL de la culture de pré-enrichissement estensemencée dans 10 mL de bouillon  
Sélénite Cystéine

**Incuber 24h à 37°C**

1 mL de la culture de pré-enrichissement dans  
10 ml de milieu RVS (Rappaport-Vassiliadis Soja)

puis incuber à 42 °C pendant 24 h.



Sélénite Cystéine



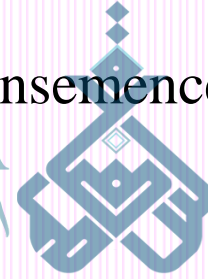
RVS

L'enrichissement sélectif pour la recherche du *Salmonella*.

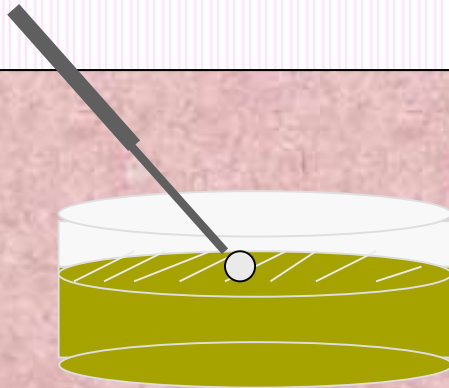
## Le 3<sup>ème</sup> jour: isolement sur la gélose DCL (Désoxycholate Citrate Lactose)

1 mL des deux milieux d'enrichissement sélectif est ensemencé en stries sur gélose DCL

المصدر الاول للطلاب الجزائري



**L'anse de platine**



### Lecture

L'apparition des colonies bien développées et incolores indique la présence probable des *Salmonella*.

# SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



*Salmonella*

## Les bouillons Sélénite Cystéine et RVS (Rappaport Vassiliadis Soja)

Composant	Quantité
Tryptone	5 g
Lactose	4 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> , 12H <sub>2</sub> O	10 g
L-cystine	10 mg
Bisélenite de sodium	4 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,0± 0,1

### Gélose DCL (Désoxycholate Citrate Lactose)

Composant	Quantité
Peptone Bactériologique	5 g
Extrait de viande	5 g
Citrate de sodium	8,5 g
Thiosulfate de sodium	5,4 g
Citrate ferrique	1 g
Désoxycholate de sodium	5 g
Lactose	10 g
Rouge neutre	20 mg
Agar	12 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	7,3±0,2

# SAHILAH MAHILAH

المصدر الأول للطالب الجزائري

## Recherche et denombrement des levures et des moisissures (ISO 6611)

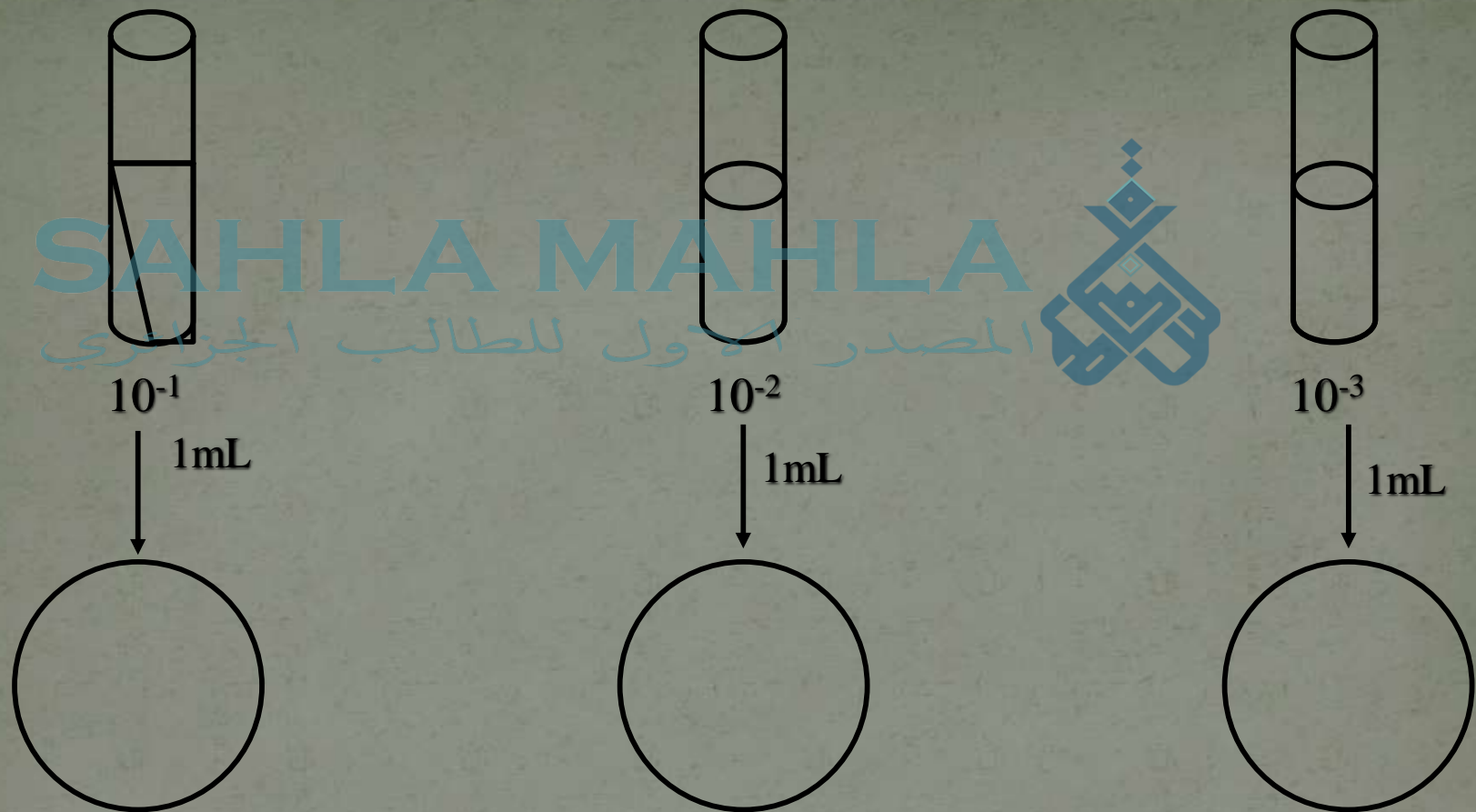
### Milieu utilisé:

**Gélose YGC (gélose Glucosée à l'Extrait de Levure et au Chloramphénicol)**

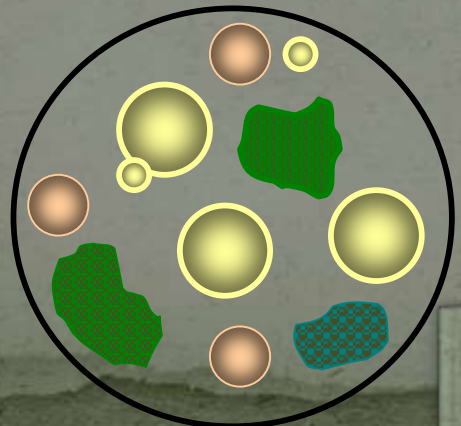
**La présence de chloramphénicol, antibiotique thermostable, à large spectre permet d'inhiber la croissance des bactéries contaminantes.**

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



12 à 15 ml de milieu YGC sont coulés puis incubation à 25 °C pendant 5 jours



*Lecture:* les colonies de levures sont rondes brillantes et bombées.

Les moisissures ont un aspect velouté et plus grand

**Recherche et dénombrement des levures et moisissures**





*Lecture:* les colonies de levures sont rondes brillantes et bombées.

Les moisissures ont un aspect velouté et plus grand

## YGC (Yeast-Glucose-Chloramphénicol)

Composant	Quantité
Extrait de levure	5 g
Glucose	20 g
Chloramphénicol	0,1 g
Agar	16 g
Eau distillée	1000 ml
pH (25°C)	6,6± 0,2

Chloramphénicol, antibiotique thermostable, à large spectre permet d'inhiber la croissance des bactéries contaminantes.

Autres milieux sélectifs:

PDA (potato dextrose agar acidifié à 4,5)  
Sabouraud au chloramphénicol)



# Conditions de culture pour la recherche des germes

Micro-organisme recherché	Conditions de culture
<b>La flore aérobie mésophile totale</b>	Milieu PCA (potatoes dextrose agar) à 37 °C./ 24h
<b>Coliformes totaux</b>	Gélose aux désoxycholate à 1‰ à 37 °C./24h
<b>Coliformes fécaux</b>	Gélose aux désoxycholate à 1‰ à 44 °C./24h
<i>Escherichia coli</i>	Gélose aux désoxycholate à 1‰ à 44 °C./24h
<b>Streptocoques fécaux</b>	Milieu Roth ou Litsky à 37 °C./ 24h
<b><i>Clostridium</i> sulfito-réducteur</b>	Milieu VF (viande-foie) après un chauffage de l'échantillon à 80 °C. pendant 10 min
<b>Levures et moisissures</b>	Oxytetracycline glucose agar (OGA) à ./ 1 semaine
<i>Aspergillus niger</i>	Milieu PCA (potatoes dextrose agar) à 27 °C./ 72h

# *Escherichia coli*

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري



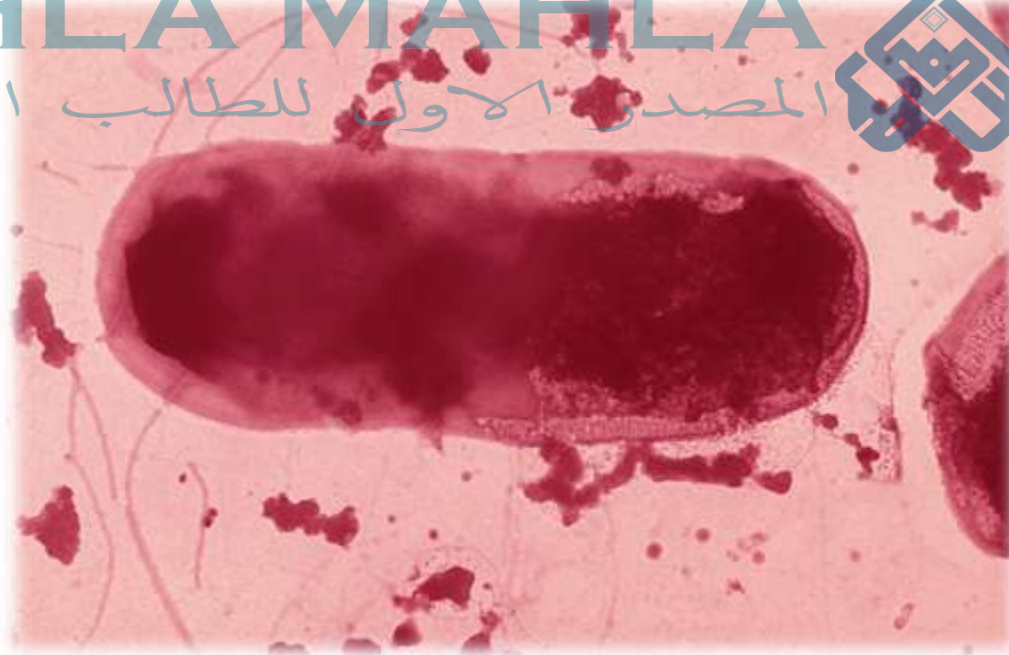
**De quels  
pathotypes?**



# *Escherichia coli* en pathologie digestive

SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطلاب الجزائري



Découverte en 1885 par Theodor Escherich, dans des selles de chèvres, c'est un coliforme fécal généralement commensal. Cependant, certaines souches d'*E. coli* peuvent être pathogènes, entraînant alors des gastro-entérites, infections urinaires, méningites,

On définit une **diarrhée** par l'émission d'au moins trois selles non moulées par jour (poids supérieur à 300 g/j). المصدر الأول للطالب الجزائري

Les diarrhées ne sont pas toutes infectieuses, elles traduisent quelquefois des troubles de la digestion (malabsorption) ou des intolérances alimentaires.

Seules les diarrhées infectieuses seront développées ici ; elles sont dues à **des bactéries, virus ou parasites.**

# *Escherichia coli*

Les principaux pathotypes intestinaux, décrits en fonction des signes cliniques engendrés et des facteurs de pathogénicité exprimés, sont:

- *Escherichia coli* entérotoxigènes (ETEC),
- *Escherichia coli* entérotoxigènes (EPEC),
- *Escherichia coli* entéroagrégatifs (EAgg),
- *Escherichia coli* entérohémorragiques (EHEC)
- *Escherichia coli* entéroinvasifs (EIEC).



SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Seules quelques bactéries peuvent suffire à déclencher une infection. Les personnes âgées et les enfants sont les plus sensibles à *E. coli*.

Dans le cas d'une intoxication alimentaire certaines déclinaisons de la bactérie peuvent provoquer de graves troubles intestinaux ou rénaux.



*Escherichia coli*, un agent pathogène important en bactériologie médicale, présente la particularité - par rapport à d'autres espèces pathogènes - d'être responsable de diverses infections intestinales. Six pathovars de *E. coli* associés à des diarrhées ont été décrits sur la base de la production de facteurs de pathogénicité spécifiques.



# SAHLA MAHLA

*Escherichia coli* : exemple type

المصدر الأول للطالب الجزائري



Entérobactérie commensale habituelle du côlon, prédominante au sein de la flore aérobie-anaérobie facultative de l'intestin

Mais certaines souches (**pathovars ou pathotypes**) sont de véritables pathogènes intestinaux en provoquant différents types de syndromes gastro-intestinaux.

# Les différents pathovars d' *E. coli*

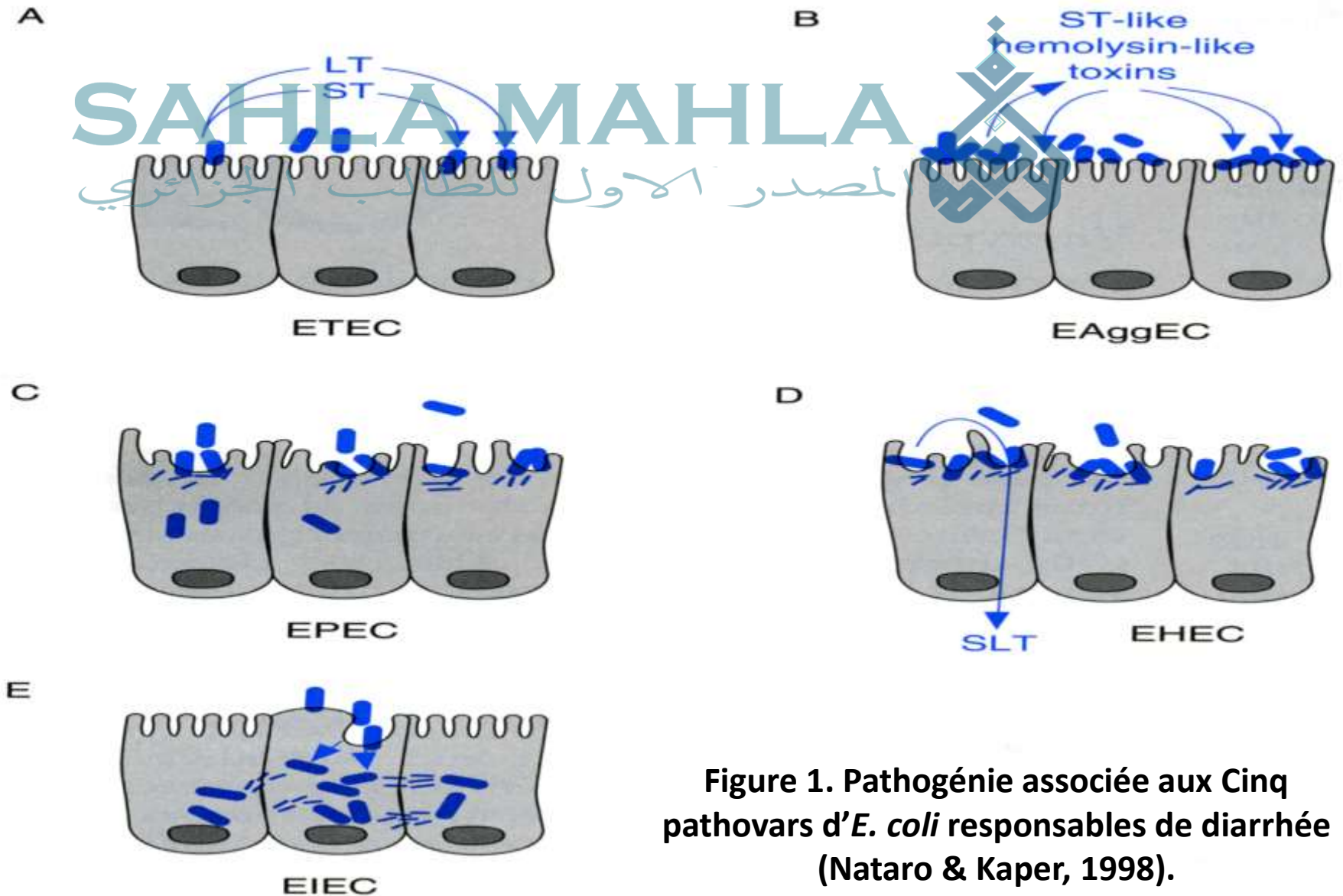


Figure 1. Pathogénie associée aux Cinq pathovars d' *E. coli* responsables de diarrhée (Nataro & Kaper, 1998).

## Les pathovars d'*Escherichia coli*

Cinq pathovars sont usuellement décrits:

- E. coli* entérotoxinogènes (ETEC),
- E. coli* entéro-aggrégatives (EaggEC),
- E. coli* entéro-pathogènes (EPEC),
- E. coli* entéro-hémorragiques (EHEC),
- E. coli* entéro-invasives (EIEC).



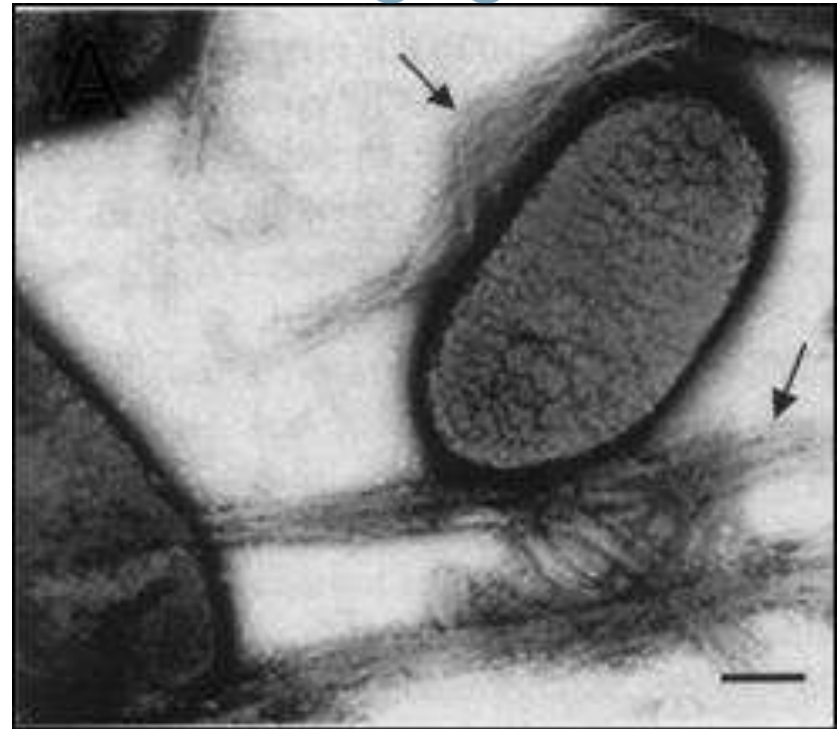
## EPEC

*E. coli*  
entéropathogènes  
ou GEI

Les EPEC sont les agents causals de gastro-entérites infantiles dans les maternités et dans les crèches. Taux de mortalité élevé (30 %).

### Virulence:

- Présence de facteurs d'adhésion
- Présence de facteurs d'attachement-effacement
- Absence de facteurs entérotoxiques





Dans un premier temps, les EPEC adhèrent aux microvillosités des entérocytes grâce à **une adhésine plasmidique (BFP= Bundle Forming Pilus)**.



Cette adhésion initiale induit un signal permettant ensuite aux bactéries d'adhérer de façon **plus intime** (**on parle d'attachement**). Cet attachement met en jeu une protéine de la membrane externe appelée **intimine** et des récepteurs spécifiques présents à la surface des entérocytes.



Les EPEC injectent alors dans l'entérocyte différentes molécules responsables d'un effacement des microvillosités, lesquelles sont remplacées par un « piédestal » sous les bactéries. La disparition des microvillosités entraîne une diminution de la surface d'échange entre l'entérocyte et la lumière intestinale. La diarrhée s'explique par un défaut de réabsorption de l'eau.



SAHLA MAHLA

المصدر الأول للطالب الجزائري



Travaux de Cleary *et al.* (2004)

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal Epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin

Microbiology **150** , 2004, 527-538

## ETEC

*E. coli*  
**entérotoxigènes**

Les ETEC sont les agents causals de la classique **diarrhée du voyageur** (*turista*). Ces souches produisent **deux entérotoxines**: l'entérotoxine **thermolabile (LT)** et l'entérotoxine **thermostable (ST)**, et provoquent une diarrhée cholériforme.

Cette diarrhée est en général peu sévère, faite de selles hydriques, associée à des douleurs abdominales, des nausées, parfois des vomissements et peu ou pas de fièvre.



Syndrome cholériforme : diarrhée aqueuse sans fièvre.

*Escherichia coli* Entérotoxino-gène se transmet **par voie oro-fécale** (nourriture et eau souillées par des selles contenant la bactérie).

L'infection à ECET peut se combattre avec des antibiotiques. Sous sa forme la plus grave, elle peut entraîner la mort, surtout chez le jeune enfant.

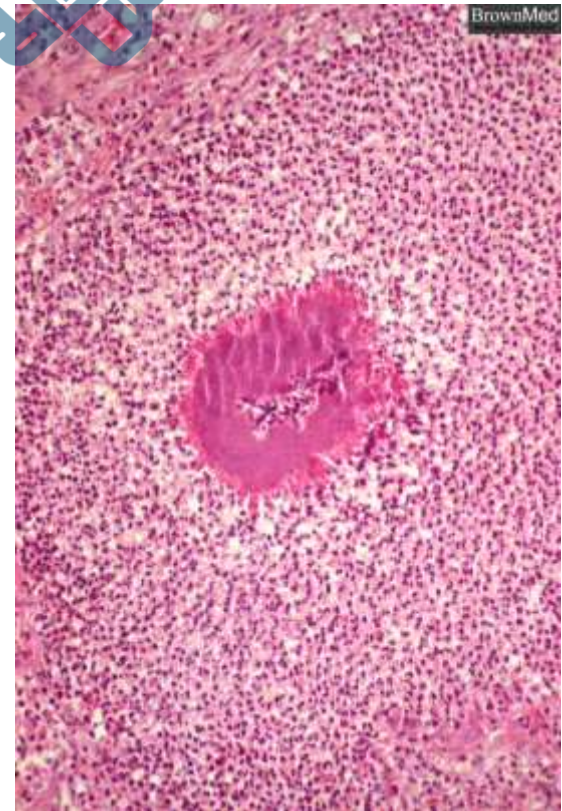
À noter : il existe un vaccin contre la diarrhée du voyageur mais il n'est pas efficace à 100%. Des précautions alimentaires doivent donc être prises durant la totalité du séjour malgré la vaccination.

## EIEC

*E. coli* entéro-  
invasives

Les EIEC sont principalement responsables chez l'enfant et l'adulte de syndromes dysentériques, avec fièvre et diarrhée sanglante et purulente, analogues à ceux provoqués par les *Shigella*.

Comme *Shigella* ils possèdent un plasmide codant pour le pouvoir invasif. Elles envahissent les cellules épithéliales du gros intestin, s'y multiplient et causent des réactions inflammatoires localisées pouvant aboutir à des ulcérations.



Un syndrome dysentérique se définit par des évacuations glaireuses et sanglantes pouvant être dissociées des matières fécales

SAHLA MAHLA



*Escherichia coli*  
entérohémorragique  
(EHEC ou VTEC/STEC)

*Escherichia coli* entéro-hémorragique (ECEH),  
*Escherichia coli* producteur de vérotoxine (ECVT),  
*Escherichia coli* producteur de toxine de Shiga (ECTS)

## EHEC

*E. coli* entéro-hémorragiques

aussi appelées :

**STEC**

Shigalike toxin *E. coli*

## VTEC

Vero Toxin  
*Escherichia coli*

Les EHEC sont des souches responsables de diarrhées rapidement hémorragiques (syndrome hémolytique et urémique).

Les EHEC produisent une toxine protéique: la **Shigalike toxin**, dont la séquence primaire présente plus de 95 % d'homologie avec la **toxine produite par *Shigella dysenteriae***. L'action de cette toxine rend compte de l'intense réaction inflammatoire touchant la muqueuse intestinale.

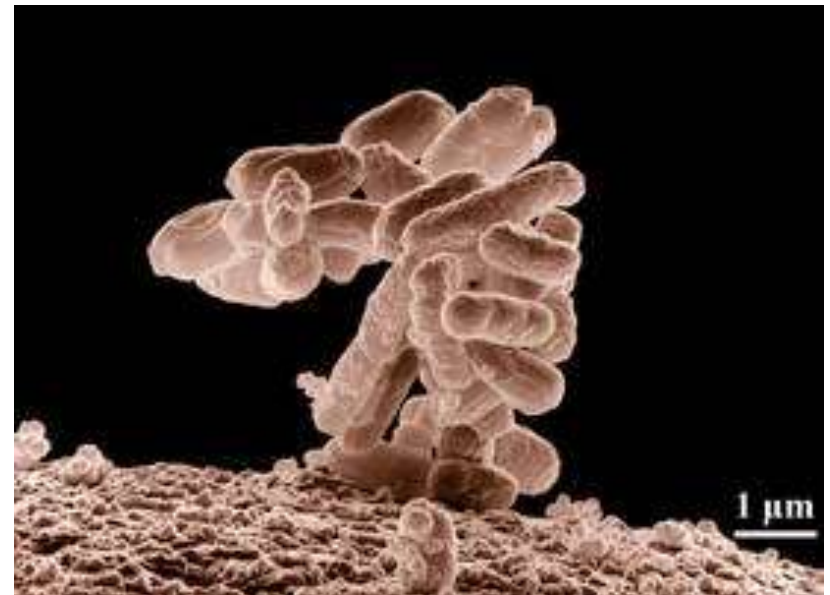
Les EHEC sont appelés aussi **STEC** : Shigalike Toxin *Escherichia coli*. Cette toxine est par ailleurs très étudiée pour ses propriétés de lyse *in vitro* des cellules Véro, d'où le nom de VTEC (Vero Toxin *Escherichia coli*) utilisé pour dénommer les EHEC.

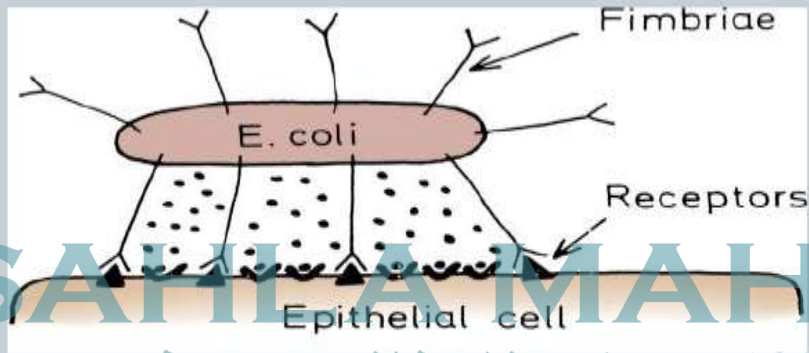
Le syndrome hémolytique urémique (SHU), communément appelé « maladie du hamburger », est une maladie qui touche les reins et d'autres organes. Il est l'une des principales causes de **l'insuffisance rénale aiguë et chronique**.

## Eagg EC

### *E. coli* entéro-agrégatives

Les EaggEC sont responsables dans les pays pauvres de diarrhées chez les nourrissons et le jeune enfant, présentant les mêmes signes que celles dues aux EPEC mais qui s'en distinguent par **leur persistance**. Ces souches sont caractérisées notamment par des propriétés **d'adhésion particulières aux cultures cellulaires avec formation d'agrégats**.





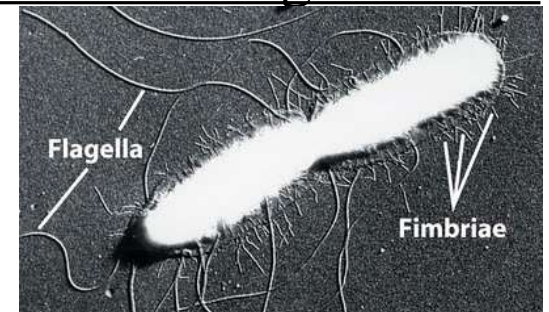
**Bacterial adherence**  
Adhesins on pili (fimbriae) attach to specific epithelial cell receptors

(Wein et al., 2002)



Cette adhésion est dite

« **auto-agrégative** » en « **briques empilées** » à l'aide d'adhésines fimbriaires appelées «aggregative adherence fimbriae » (AAFs) et formant des biofilms épais provoquant des dommages à la muqueuse intestinale.



Les EAEC sécrètent plusieurs toxines dont **la Shigella enterotoxin 1 (ShET1)** et la toxine EAST1 (« EnteroAggregative heat-Stable Toxin 1 »)