

## TP 01 : Dénombrement de la flore mésophile aérobie totale (FMAT) et des coliformes totaux (CT) et fécaux (CF) dans le yaourt

### Introduction

Le contrôle de la qualité microbiologique des aliments est essentiel pour éviter la commercialisation et la consommation de produits dangereux. Les normes réglementaires nationales et internationales exigent souvent que les aliments soient exempts de germes pathogènes et de toxines microbiennes, et qu'ils aient une faible quantité de flore totale. Les critères de qualité incluent la numération des germes totaux, des germes indicateurs de contamination fécale tels que les coliformes fécaux, ainsi que la recherche de germes ubiquitaires et d'origine humaine ou animale tels que *Staphylococcus aureus*.

### Objectif

Rechercher différentes flores sur une denrée alimentaire et comparer les résultats obtenus aux normes afin de juger de sa conformité.

### Mode opératoire

#### 1- Préparation de la suspension mère et dilutions

- A l'aide d'une pipette stérile, transférer 1 ml de la suspension mère dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile.
- Mélanger soigneusement la prise d'essai et le diluant.
- Répéter ces opérations sur les dilutions décimales suivantes en utilisant à chaque dilution une nouvelle pipette stérile afin d'obtenir des dilutions jusqu'à  $10^{-4}$

#### 2- Recherche de la Flore Totale Aérobie Mésophile (FTAM)

Le dénombrement des germes totaux dans un produit alimentaire permet de juger sa qualité hygiénique (flore indicatrice d'hygiène : témoin d'un défaut de production ou de conservation)

### Mode opératoire

#### 2.1. Ensemencement

- À l'aide d'une pipette stérile, transférer, dans chacune des boîtes de pétri stériles, 1 ml de l'échantillon pour essai si le produit est liquide (suspension mère).
- Recommencer l'opération avec les dilutions suivantes, à l'aide d'une nouvelle pipette stérile, pour chaque dilution décimale.
- Couler, dans chaque boîte de Petri, environ 12 ml à 15 ml de la gélose pour dénombrement, entre 44 °C et 47 °C. Le temps qui s'écoule entre la fin de la préparation de la suspension mère (ou de la dilution  $10^{-1}$  dans le cas d'un produit liquide) et le moment où les dilutions sont coulées sur le milieu de culture ne doit pas dépasser 45 min.
- Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture en faisant tourner les boîtes de Petri de façon à obtenir une répartition homogène des microorganismes dans la masse du milieu, laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.
- Retourner les boîtes ainsi préparées et les placer à l'étuve à  $30\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$  pendant 72 h.

#### 2.2. Comptage des colonies

- Après la période d'incubation spécifiée, procéder, au comptage des colonies.
- Les colonies envahissantes doivent être comptées comme une seule colonie.

### 3. Dénombrement des coliformes

#### 3.1. Ensemencement et incubation

- Transférer 1 ml à l'aide d'une pipette stérile de liquide ou les dilutions appropriées au centre de chaque boîte. Utiliser une nouvelle pipette stérile pour inoculer chaque dilution dans les boîtes.

- Verser environ 15 ml du milieu VRBL, de 44 °C à 47 °C, dans chaque boîte de Petri. Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu de culture et laisser le mélange se solidifier en posant les boîtes de Petri sur une surface fraîche et horizontale.
- Après solidification complète, couler à la surface du milieuensemencé environ 4 ml du milieu VRBL, de 44 °C à 47 °C. Laisser solidifier.
- Retourner les boîtes ainsi préparées et les incuber pendant 24 h dans l'étuve réglée à :
  - ✓ 37° C pour les coliformes totaux
  - ✓ 44° C pour les coliformes fécaux

### 3.2. Dénombrement

- Après la période d'incubation spécifiée, sélectionner les boîtes de Petri ayant, si possible, 10 ou plus de 10 et moins de 150 colonies.
- Procéder au comptage des colonies violacées ayant un diamètre minimal de 0.5 mm (parfois entourées d'une zone rougeâtre due à la précipitation de sels biliaires). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent pas de confirmation.

### 4. Expression des résultats

Pour qu'un résultat soit valable, on estime en général qu'il est nécessaire de compter les colonies sur au moins une boîte contenant au minimum 15 colonies.

Calculer le nombre N de microorganismes présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir de deux dilutions successives, à l'aide de la formule:

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2) d}$$

Où :

- $\sum C$  : est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont au moins une contient 15 colonies;
- V : est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;
- $n_1$  : est le nombre des boîtes retenues à la première dilution;
- $n_2$  : est le nombre des boîtes retenues à la seconde dilution;
- d : est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs. Pour cela, si le dernier chiffre est inférieur à 5, le chiffre précédant n'est pas modifié ; si le dernier chiffre est supérieur ou égal à 5, le chiffre précédant est augmenté d'une unité. Procéder de proche en proche jusqu'à ce que l'on ait deux chiffres significatifs.

Retenir comme résultat le nombre de microorganismes par millilitre (produits liquides) ou par gramme (autres produits), exprimé par un nombre compris entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Exemple :

$$N = \frac{\sum C}{V(n_1 + 0.1 n_2) d} = \frac{168 + 215 + 14 + 25}{1(2 + 0.1 \times 2) \times 10^{-2}} = \frac{422}{0.022} = 19\ 182$$

N = 19182 : En arrondissant le résultat tel que prescrit ci-dessus, le résultat est 19 000 ou  $1,9 \times 10^4$  microorganismes par gramme de produit.

### 5. Interprétation des résultats

Arrêté interministériel du 2 Moharram 1438 correspondant au 4 octobre 2016 fixant les critères microbiologiques des denrées alimentaires.