

TP : Recherche d'une contamination d'origine fécale.
« Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux »

Colimétrie : est l'ensemble des méthodes permettant la recherche et le dénombrement des coliformes, qui indique une contamination fécale.

La numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide, soit en milieu solide (par ensemencement dans la gélose ou après filtration).

Coliformes : sont des entérobactéries :

- ✓ Bacille à Gram - ;
- ✓ Asporulés ;
- ✓ Oxydase -
- ✓ Nitrate réductase +
- ✓ Aérobie anaérobie facultatif ;
- ✓ **Fermentent le lactose avec production de gaz à 30°C.**

Il s'agit d'un groupe hétérogène qui comprend les genres :

- *Escherichia* « avec les espèces *coli*, *intermedium*, *freudii* » ;
- *Citrobacter* ;
- *Enterobacter* ;
- *Klebsella*.

Coliformes fécaux : d'origine intestinale, sont des coliformes qui fermentent le Lactose avec production de gaz à 44°C « coliformes thermotolérants ».

N.B. : la résistance des coliformes « totaux » et des coliformes « fécaux » aux conditions extérieures défavorables est faible.

Dénombrement des coliformes en milieu liquide

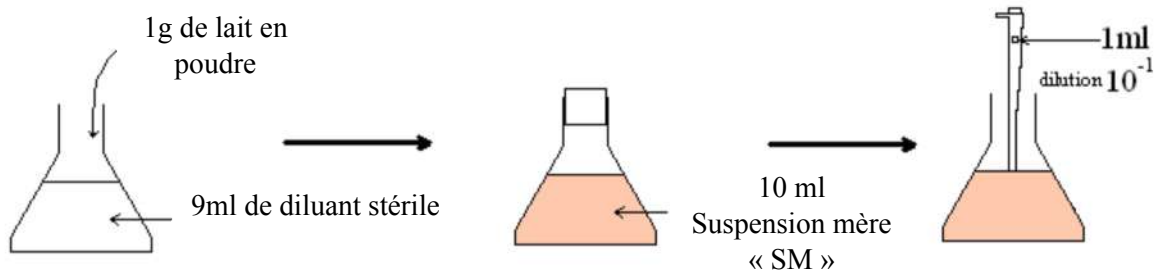
Mode opératoire

Produit analysé : Lait en poudre.

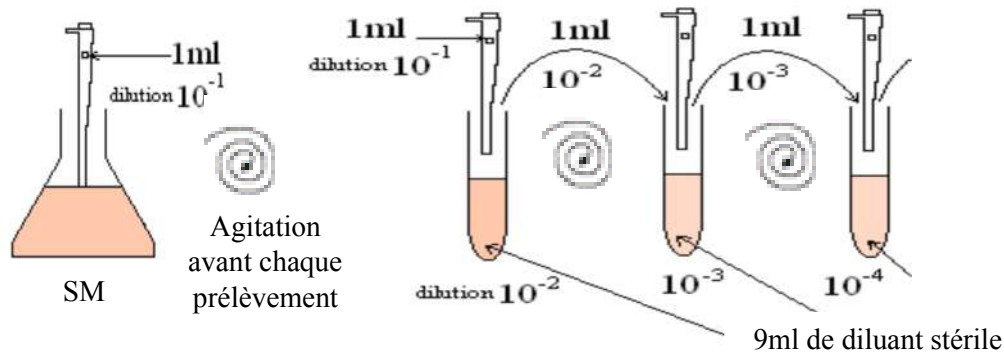
- 10g du lait en poudre sont additionnés de 90ml de diluant Trypton-sel. Agiter 10 minutes à 45°C.

- Coliformes et *E.coli* (1ml : 10^{-4}).
- **Norme** : Coliformes totaux : $m=10 / M=100$
Coliformes fécaux : $m=1 / M=10$.

1- Préparation de la solution mère



2- Préparation des dilutions décimales « jusqu'à 10^{-4} »



3- Ensemencement en milieu liquide

- Milieu de culture : « **BLBVB** » : **B**ouillon **L**actosé **B**ilié au **V**ert **B** brillant.

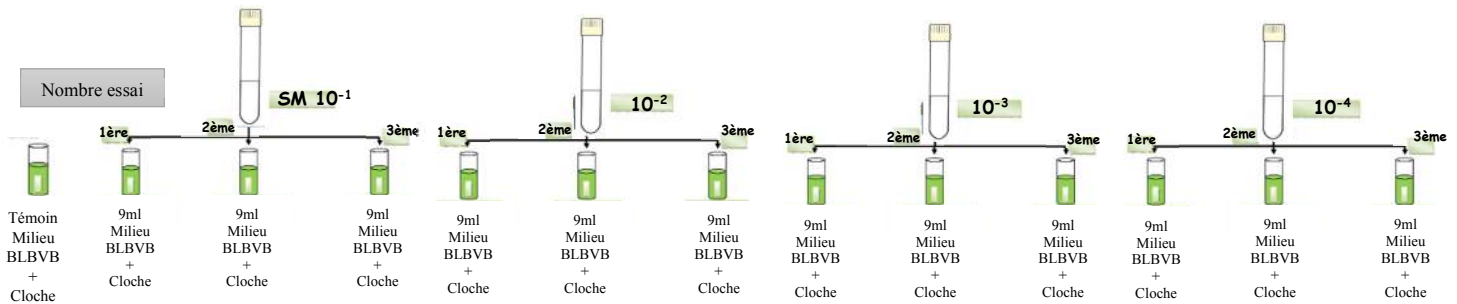
Milieu BLBVB : « utilisé pour la plupart des produits alimentaires »

- Peptone pancréatique de caseine10g
- Lactose.....10g « fermentation + production de gaz»
- Bile de bœuf déshydratée.....20g
- Vert brillant.....13mg
- Eau distillée.....1000ml
- pH = 7,2

Remarque : - Vert brillant : inhibe les germes à Gram +

- **La bile** : par son fort pouvoir tensioactif lier à la présence de sels biliaries :
inhibe la plupart des germes **qui ne sont pas** d'origine intestinale.

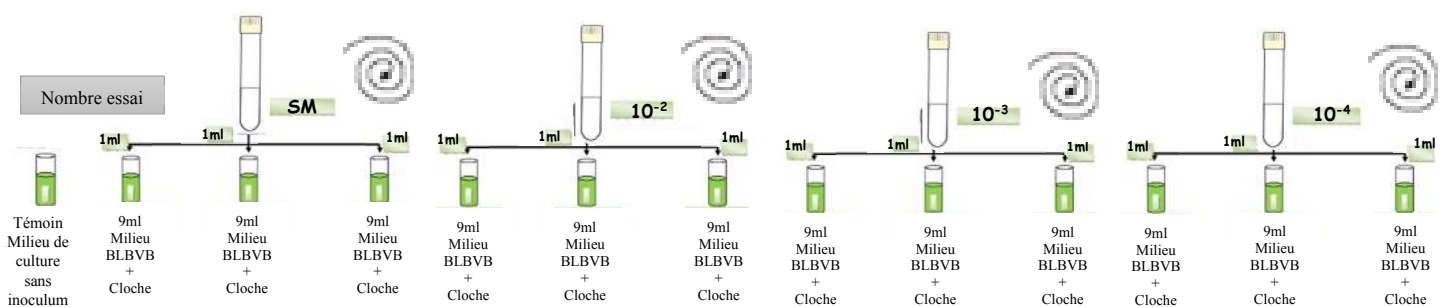
- Les essais sont effectués **en double** ou en **triple** et les résultats sont analysés par la méthode de **Mac Grady**.
- **Préparer le milieu de culture dans des tubes à essais :**
 - a- Répartir à raison de 9ml par tube et chaque tube est préalablement muni d'un petit tube à essai renversé « cloche de Durham » (destiné à piéger la formation éventuelle de gaz)
 - b- Stériliser les tubes par l'autoclave « à 120°C pendant 20min avec une pression 1bar ».



Stérilisation par l'autoclavage à 120°C pendant 20min avec une pression de 1bar

- **Ensemencement de l'inoculum dans le milieu de culture :**

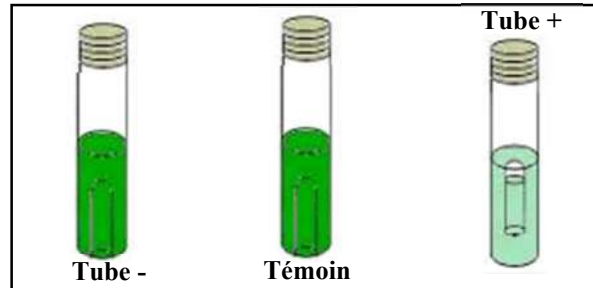
Ensemencer 3 tubes à essais contenant le milieu liquide BLBVB (avec cloche de Durham) avec 1ml de la dilution mère « SM » et la même chose pour les autres dilutions décimales (10^{-2} ; 10^{-3} et 10^{-4}).



Après l'ensemencement les tubes sont incubés à

- ✓ 30°C pendant 24h à 48h pour la recherche des coliformes totaux

- **Lecture des résultats** : après 24h puis 48h d'incubation.
- **Résultats** : sont considérés comme **positifs**, les tubes dans lesquels il y'a une **croissance** bactérienne et une **production notable de gaz** (au moins 1/10 du volume de la cloche) comparant avec le tube témoin.



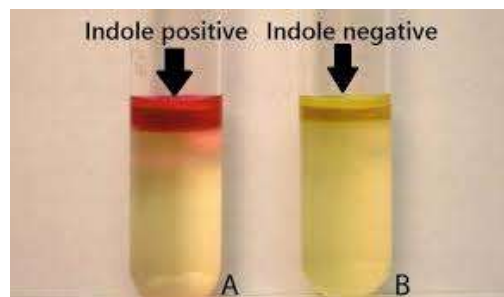
✓ **La recherche des coliformes fécaux « coliformes thermotolérants »**

On fait le test de Mac Kanzia (est basé sur la recherche des coliformes thermotolérants parmi lesquels on redoute surtout la présence de *E.coli*)

- ✚ Si le tube est positif est inoculé dans deux autres tubes :
 - Un tube à essai contient le milieu de culture BLBVB avec une cloche de Durham stérile.
 - Et l'autre tube à essai contient l'eau péptonée.
- ✚ Après l'ensemencement, on les incube à **44°C** pendant 48h.
- ✚ Lecture des résultats après 24h et 48h.
- ✚ **Résultats** : résultat positif :

-**Croissance bactérienne et production de gaz** dans le milieu de culture BLBVB (présence des coliformes fécaux);

-**Production d'indole** (décomposition des protéines) : mise en évidence par addition de réactif de **Kovacs** dans le tube de l'eau péptonée ➡ formation d'un anneau rouge « Indole +, dégradation de péptone ». (Redoute surtout la présence de *E.coli*)



-Remarque : Confirmation de présence de *E.coli* se fait par l'isolement et l'identification des bactéries productrices de gaz + Indole + (isolement sur EMB : gélose Eosine Bleu de Méthylène, ce milieu sert à l'isolement des bacilles à Gram-)

- **Calculer** le nombre des coliformes totaux et le nombre des coliformes fécaux dans l'échantillon (nombre d'UFT/g) et **interpréter les résultats obtenus** (juger la qualité microbiologique de cet aliment).

Exemple : Nous considérons que vous avez obtenu les résultats suivants pour l'analyse de 1 g du lait en poudre.

Lecture des résultats de la recherche des coliformes totaux.

Dilutions	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)				
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -
Nombre de résultats +	3	3	2	1
Regroupement	332	321	210	-

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP	Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	< 0,3	230	2,9
001	0,3	300	2,3
010	0,3	301	4
020	0,6	302	6
100	0,4	310	4
101	0,7	311	7
110	0,7	322	12
111	1,1	320	9
120	1,1	321	15
121	1,5	322	21
200	0,9	323	29
201	1,4	330	20
210	1,5	331	50
211	2,0	332	110
220	2,1	333	>110
221	2,8		

Lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady et en déduire la concentration des bactéries dans l'échantillon.

- ✚ Choix de la dilution : **10⁻²** ; (Fd = 10²)
- ✚ Détermination du NPP : regroupement choisi : 321 et dans la table de Mac Grady le NPP correspondant à 321 est **15** ;
- ✚ **Calcul :**

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} \times Fd$$

N = 15/1 x 10² = 1,5 x 10³ UFT/g

- ✚ Interprétation des résultats, on les compare avec la norme :

Coliformes totaux : **m= 10 / M = 100**

Interprétation des résultats :

- ✓ Si le nombre des colonies < m = 10UFT/g, le produit est juger satisfaisants « acceptable sans réserve ».
- ✓ Si le nombre des colonies entre m et M le produit est acceptable mais avec une limite ; il faut confirmer les résultats.
- ✓ Si le nombre des colonies > M=100 ; le produit est inacceptable (la qualité microbiologique est inacceptable), le produit est dégradé, décomposé et impropre à la consommation (le produit est rejeté). (Le cas de notre exemple).

✚ Lecture des résultats de la recherche des coliformes fécaux

Dilutions	10 ⁻¹ (SM)	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Résultats des coliformes totaux	+++	+++	++-	+--
Résultats des coliformes fécaux	++-	+--	---	---
Nombre de résultat +	2	1	0	0
Regroupement	210	100	000	000



Lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady et en déduire la concentration des bactéries dans l'échantillon.

- ✚ Choix de la dilution : 10⁻¹ (SM) Fd = 10;
- ✚ Détermination du NPP : regroupement choisi : 210 et dans la table de Mac Grady le NPP correspondant à 210 est 1,5 ;

✚ Calcul :

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} \times Fd$$

N = 1,5/1 x 10¹ = 1,5 x 10 UFT/g

- ✚ Interpretation des résultats, on les compart avec la norme :

Coliformes fécaux : **m= 1 / M = 10**

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	< 0,3
001	0,3
010	0,3
020	0,6
100	0,4
101	0,7
110	0,7
111	1,1
120	1,1
121	1,5
200	0,9
201	1,4
210	1,5
211	2,0
220	2,1
221	2,8

Interprétation des résultats :

- ✓ Si le nombre des colonies < m = 1UFT/g, le produit est juger satisfaisants « acceptable sans réserve ».
- ✓ Si le nombre des colonies entre m et M le produit est acceptable mais avec une limite ; il faut confirmer les résultats.
- ✓ Si le nombre des colonies > M= 10 ; le produit est inacceptable (la qualité microbiologique est inacceptable), le produit est dégradé, décomposé et impropre à la consommation (le produit est rejeté). (Le cas de notre exemple).