

BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

1^{ère} PARTIE : GENERALITES

- | | |
|--|---------------|
| 1/ - SECURITE AU LABORATOIRE | page 2 |
| 2/ - PERCEPTION DU MONDE MICROBIEN | page 4 |
| 3/ - MILIEUX DE CULTURE, TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT | page 7 |

2^{ème} PARTIE

- | | |
|--|----------------|
| 1/ - METHODES DE PRELEVEMENTS ET DE DENOMBREMENT | page 11 |
| 2/ - ACTIVITE REDUCTASE DU LAIT | page 13 |
| 3/ - FACTEURS DE MULTIPLICATION DES MICROORGANISMES | page 17 |

3^{ème} PARTIE

page 23

- ETUDE DE LA MICROFLORE FERMENTAIRE DES FRUITS**
(ANALYSE DES PRODUITS DE 4^{ème} GAMME : Fruits et Légumes)

4^{ème} PARTIE

page 31

- ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS**

5^{ème} PARTIE

page 42

- 1/ - FERMENTATION ALCOOLIQUE**
(PRODUCTION D' ETHANOL A PARTIR DE FRUITS TROPICAUX)
- 2/ - FERMENTATION LACTIQUE**

6^{ème} PARTIE

page 50

- PRODUCTION DE PROTEINE UNICELLULAIRE**

INTRODUCTION : LA SECURITE AU LABORATOIRE ET LA PAILLASSE DU MICROBIOLOGISTE

A / - LA SECURITE AU LABORATOIRE

Un biotechnologue est avant tout, un microbiologiste qui doit être conscient de ses responsabilités et des conséquences graves que peuvent entraîner un résultat erroné transmis par le laboratoire. Il est donc de son devoir d'éviter les erreurs aussi bien dans les protocoles techniques que dans l'interprétation des résultats obtenus : ceci sous-entend que l'architecture et l'organisation fonctionnelle du laboratoire de Microbiologie doivent répondre à certaines caractéristiques.

Les microorganismes sont soit des pathogènes, soit des contaminants, soit des germes opportunistes jouant un rôle de surinfection notamment sur les terrains immunodéprimés.

Qu'ils soient d'authentiques pathogènes ou de simples contaminants passifs, ils font l'objet d'attention de la part du microbiologiste ce dernier devant par son travail arriver non seulement à les identifier mais aussi à conclure ou non à leur pouvoir pathogène.

Il convient également de savoir que ces microbes sont aisément transportables et transportés par les microbiologistes, bien sûr, mais aussi par les aliments, le personnel d'entreprise, les agents d'entretien et les visiteurs.

Les microbiologistes représentent donc un maillon important dans la circulation des microorganismes. Il est donc nécessaire qu'ils connaissent les moyens et méthodes pour lutter contre la dissémination de ces microbes.

En effet, toute personne étant amenée à manipuler des microorganismes doit avoir un comportement particulier visant trois (3) objets :

- | |
|--|
| 1/ - Ne pas se contaminer |
| 2/ - Ne pas contaminer le produit à analyser |
| 3/ - Ne pas contaminer l'environnement. |

Quels sont ces microorganismes ?

Les espèces sont très nombreuses mais on peut les regrouper en quatre grands ensembles :

- **Les Champignons** (levures, moisissures)
- **Les Parasites** (œufs, kystes, larves)
- **Les Bactéries** (aérobies strictes, aéro-anaérobies, anaérobies strictes)
- **Les Virus** (parasites de cellules humaines, animales ou végétales)

Il est donc indispensable de former, d'informer et d'éduquer le personnel pour la bonne pratique des règles élémentaires suivantes en matière d'hygiène agroalimentaire et industrielle, pour éviter la dissémination :

- | | |
|---|-------------------------------------|
| - Se laver soigneusement les mains (savon désinfectant) | - Port de la bouse obligatoire |
| - Portes et fenêtres de la salle de travail doivent être fermées | - Ne pas manger, ni boire, ni fumer |
| - Pièces de travail soignées et tenues propres | - Pipetage non protégé interdit |
| - Sur les paillasses, seuls doivent figurer les objets indispensables | - Cheveux longs attachés |
| - Chacun doit lutter contre le manquement à cette discipline pour lui et pour les autres. | |

B / - PAILLASSE DU BACTERIOLOGISTE

I/ - RAPPEL :

- Ensemencement - Isolement - Contamination : source de contamination
- Poste de Travail par excellence : * lieu privilégié * lieu d'adoration * lieu « sacré » à respecter

II/ - CARACTERISTIQUES

- 1/ - Dimensions :** - 75 cm profondeur - 130 cm largeur - 75 à 80 cm hauteur
Travail aisé en position assise et, lieu sûr en fonction du tabouret.

2/ - Equipement

2. 1. / - Equipement fixe

- Deux arrivées de gaz par poste de travail : * butane * air – Co2
- Une évacuation d'eau
- Plusieurs prises de courant électrique
- Une alimentation d'eau
- Un bec Bunsen

2. 2. / - Matériel indispensable sur la paillasse

Matériel indispensable aux différentes manipulations stériles et de manière permanente :

- * Matériel mobile
- * Récipients pour les micro-organismes
- * Instruments de prélèvement et de transfert
 - Portoirs (rangement des milieux à ensemercer)
 - Pipettes Pasteur
 - Anse de platine (manche Pasteur, support intermédiaire, fil nichrome et boucle)
 - Tubes à essai (16 x 160 ou 18 x 180) vis ou coton
 - Boîtes de Pétri (90 mm et/ ou 45 mm de diamètre)
 - Bocal antiseptique à large ouverture avec javel diluée (au fond) à usage quotidien
 - Panier métallique (autoclavage des tubes pour milieux de culture)
 - Boîtes pour les déchets non contaminés (emballage)
 - Bac à coloration et support de lames
 - Pince métallique sans griffes
 - Bocal à lames et lamelles
 - Batteries de colorant
 - Pissettes à alcool et eau de javel
 - Support de lames colorées
- * Disposition : tenue pendant la manipulation
- * Etat hygiénique du bactériologiste : - blouse – mains – cheveux
- * Apport élément étranger à la paillasse (manger, boire , cure-dent ...)
- * Prévoir tout avant toute manipulation.

III/ - ENTRETIEN

- Par le titulaire de la paillasse
- Périodicité (à la prise de service et à la fin du service)
- **Nettoyage et Désinfection : comment ?**

1/ - **Nettoyage** : Propreté visuelle (détergent) diminue les souillures et le nombre de microbes

- Facteurs mécaniques : * température * temps de contact * action mécanique * concentration

2/ - **Rinçage** : Propreté chimique, élimine le produit de nettoyage

3/ - **Désinfection** : Propreté bactériologique, détruit les microbes restants

Le résultat dépend de : * concentration du produit * temps de contact * température

C/ - CONCLUSION

Pour aboutir à un contrôle de qualité et un traitement des produits agroalimentaires, en conformité avec les spécifications, qu'elles soient internes ou externes, l'accent doit être mis sur la responsabilisation dans les domaines suivants : les locaux et le matériel, l'organisation générale du laboratoire, le personnel et sa formation, l'assurance de la qualité.

- Bonne pratique des règles d'hygiène, non-respect des règles élémentaires → catastrophes
- Réglementer le service (formation continue et information du personnel)
- Respecter le « **S. V. P.** » : * **Savoir** (danger, geste technique)
- * **Vouloir** (volonté administrative et politique) * **Pouvoir** (moyen : argent – homme)
- Respecter sa paillasse, c'est connaître la formule de l'hygiène

F. H. = - (+ / X)

F H = Formule de l'Hygiène = - : Assainir + : Contamination **X** : Multiplication

Le travail du microbiologiste n'est donc possible, que lorsqu'il est appuyé sur une conscience professionnelle sans défaut.

PERCEPTION DU MONDE MICROBIEN

A/ - LE MICROSCOPE OPTIQUE A FOND CLAIR

La morphologie des microorganismes est étudiée par suite d'un examen en microscopie.

Il est donc important de connaître le microscope qui est le premier outil du microbiologiste.

L'instrument le plus utile et le plus employé au laboratoire de microbiologie est le microscope.

Il grossit ou agrandit de façon relative, les microorganismes et les structures invisibles à l'œil nu.

Les microscopes optiques ou photoniques utilisent un faisceau d'ondes lumineuses pour produire le grossissement. En plus des microscopes à fond clair, il existe des microscopes à fond noir, des microscopes à fluorescence et ceux à contraste de phase.

Le microscope optique à fond clair est constitué de quatre (4) systèmes :

1/ - Système de support. Il comprend : * le pied * la potence * le revolver porte-objectif * la platine * le chariot qui permet le déplacement lent de la lame de verre avec sa préparation.

2/ - Système de grossissement. Il est constitué par une combinaison de lentilles fixées de part et d'autre du tube optique avec en haut, les oculaires et en bas, les objectifs.

2. 1. / - Les objectifs

Pour chaque objectif, le grossissement est indiqué par le chiffre marqué sur la monture (X 10, 40, 100).

- l'objectif 10 grossit 10 fois (objectif à sec) - l'objectif 40 grossit 40 fois (objectif à sec)
- l'objectif 100 grossit 100 fois (objectif à immersion)

Un autre chiffre est gravé à côté du grossissement : * 0,3 pour X 10 * 0,65 pour X 40 * 1,30 pour X 100

Le pouvoir séparateur d'un bon microscope de recherche est de 0,25 µm alors que celui de l'œil humain est de 0,25 mm. L'huile à immersion permet d'augmenter le pouvoir séparateur en empêchant les pertes de lumière dues à la diffraction que l'on constate avec les objectifs à sec.

2. 2. / -Les oculaires Le grossissement est indiqué sur l'oculaire (X 4, 6, 10 et 15).

- L'oculaire 4 grossit 4 fois - L'oculaire 6 grossit 6 fois - L'oculaire 10 grossit 10 fois
- L'oculaire 15 grossit 15 fois

* oculaire X 10 + objectif X 100 == == ➔ objet grossi 1000 fois

* oculaire X 4 + objectif X 100 == == ➔ objet grossi 400 fois

* oculaire X 6 + objectif X 40 == == ➔ objet grossi 240 fois

Les microscopes utilisés au laboratoire de recherche grossissent de 50 à 1000 fois. Ils peuvent être monoculaires avec un seul oculaire ou, binoculaires avec deux oculaires; les premiers sont éclairés par la lumière du jour, les seconds avec un éclairage électrique intégré ou externe.

3/ - Système d'éclairage :

Il est doté d'une source lumineuse, un miroir, un condenseur et un diaphragme

- **La source lumineuse** : il s'agit de la lumière du jour ou de la lumière électrique
- **Le miroir** : il sert à renvoyer la lumière sur la préparation à examiner
- **Le condenseur** : il sert à concentrer les rayons de la lumière et à les diriger sur

la préparation à examiner. Il doit être centré et réglé correctement.

- **Le diaphragme** : Il est placé dans le condenseur et sert à en diminuer ou à en augmenter l'angle et par conséquent à modifier la quantité de lumière qui passe dans le condenseur.

Plus il est large, plus l'angle est ouvert et plus les détails perçus sont petits, mais l'image est contrastée

B/ - EXAMEN DES MICROORGANISMES**B. I./ - EXAMEN A L'ETAT FRAIS (culture jeune de 18 – 24 h)****1/ - Préparation de l'étalement**

- Dégraissage de la lame porte objet et la lamelle couvre objet
- Porter une goutte de bouillon à l'aide d'une pipette pasteur
- Recouvrir d'une lamelle
- Lecture (objectif à sec)

2/ - Résultats : * Vitalité * Abondance * Type de mobilité immobile, péritriche, polaire ...)

B. II./ - EXAMEN APRES COLORATION**1/ - PREPARATION DU FROTTIS**

- Dégraissage de la lame porte objet et la lamelle couvre objet
- Etaler en couche mince et régulière
- Fixer (à l'alcool ou à la chaleur)
- Sécher (à la température du laboratoire)
- Colorer

2/ - COLORATION AU BLEU DE METHYLENE

- 2. 1. / - Technique** - Recouvrir la lame de colorant et laisser agir une minute
- Laver, sécher
- Examiner à l'immersion
- 2. 2. / - Résultat** - Bactéries bleues sur un fond clair
- 2. 3. / - Préparation du colorant**

* Solution - mère < ===== - Bleu de méthylène (poudre) : 10 g / - Alcool à 90 : 100 ml

* A diluer au 1/10 avec de l'eau phéniquée à 2,5 %

3/ - COLORATION DE GRAM**3. 1. / - Technique**

- Recouvrir la lame de violet de gentiane et laisser agir 1 à 2 minutes
- Rincer à l'eau du robinet et égoutter
- Recouvrir la lame de lugol et laisser agir 1 minute
- Rincer à l'eau du robinet et égoutter
- Décolorer à l'alcool (30 secondes) jusqu'à ce que celui-ci coule incolore
- Laver à l'eau et égoutter
- Recouvrir de fuschine phéniquée ou de safranine et laisser agir 30 à 60 secondes
- Laver à l'eau et égoutter
- Laisser sécher à l'air
- Observer à l'objectif X 100 dans l'huile à immersion

3. 2. / - Résultats

La coloration de Gram permet de classer les bactéries en deux groupes :

- **Gram positif** : colorées en bleu -violet - **Gram négatif** : colorées en rose ou rouge

On peut distinguer : * le type de Gram * la morphologie des bactéries * leur mode de groupement

3. 3. / - Principe

- Le violet colore toutes les bactéries en violet foncé

- Le lugol : agent mordant, fixe le violet sur les bactéries

- L'alcool à 95° C : décolore certaines bactéries où le violet n'est pas fixé et, n'en décolore pas d'autres où le violet est bien fixé par la solution iodée

- La fuschine recoloré en rose les bactéries décolorées par l'alcool mais, n'agit pas sur les autres bactéries qui restent violet foncé en fonction de la composition des parois

3. 4. / - Causes d'erreurs

- **Faux Gram positif** : * Etalement fixé avant d'être sec * Etalement trop épais

* Dépôt de colorant dans le flacon de violet de gentiane * Décoloration mal réalisée (trop brève)

- **Faux Gram négatif** : * Solution de lugol laissée trop peu de temps au contact de la lame

* Alcool laissé trop longtemps et suffisamment rincé.

3. 5. / - Préparation des solutions ou réactifs**a/ - Violet de gentiane**

* Solution –mère : dissoudre 10 g de violet de gentiane dans 100 ml d'éthanol à 95° C

* A diluer au 1/10 avec de l'eau phéniquée à 2,5% (25 g de phénol / 1000 ml d'eau distillée)

b/ - Fuschine phéniquée

* Solution - mère < ===== - Fuschine basique : 10 g / - Alcool à 95 : 100 ml

* A diluer au 1/10 avec de l'eau phéniquée à 5 % (50 g de phénol / 1000 ml d'eau distillée)

c/ - Lugol * Iodure de potassium : 10 g + Iode bisublimé : 5 g + Eau distillée : 1000 ml

* Triturer dans un mortier l'iode et l'iodure puis ajouter progressivement l'eau distillée

C/ - ETUDE MORPHOLOGIQUE DES BACTERIES**I/ - Les bactéries de forme ronde**

1. / - Coques Gram négatif (C.G.-) : * Neisseriaceae

2. / - Coques Gram positif (C.G. +) : * Micrococcaceae * Streptococcaceae

II/ - Les bactéries de forme allongée

1. / - Bacilles Gram négatif (B.G. -) aérobies facultatifs

* Vibrio * Entérobactéries * Haemophilus

2. / - Bacilles Gram négatif (B. G. -) aérobies stricts : * Pseudomonadaceae

3. / - Bacilles Gram positif (B.G. +)

- Sporulés : * Bacillaceae - Asporulés : * Lactobacillaceae - Listeria

III/ - Les Bactéries de forme hélicoïdale

* Spirillaceae * Spirochaetaceae

Cf : Copie des morphologies des Bactéries

ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE, TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT ET CULTURES DES BACTERIES

A/ - ETUDE DES MILIEUX DE CULTURE

Les milieux de culture sont des produits solides ou liquides permettant l'étude des micro-organismes en dehors de leur milieu naturel. Les milieux aident à l'isolement, l'identification, la numération, la conservation des bactéries. Le choix d'un milieu doit être adapté à la bactérie que l'on recherche.

1/ - Conditions optimales selon les espèces bactériennes

- pH optimum : 7, 4 - Isotonicité : 9 g/l de NaCl - Humidité : présence de l'eau
- Potentiel d'oxydoréduction (Rh), selon le type respiratoire - Température

2/ - Classification

- Composition : * Naturels (d'origine animale et végétale)
- * Synthétiques (corps chimiques) * Semi-synthétiques (naturels et chimiques)
- Mode de préparation : * M. stérilisables (sans albumine) * M. non stérilisables (albumine)
- Utilisation des milieux : * Milieu de base * Isolement * Identification * Conservation

3/ - Différentes sortes de milieux existants

- Milieu prêt à l'emploi conditionné (boîte et tube) - Ingrédients de milieu
- Milieu prêt à l'emploi non conditionné (flacon) - Milieu déshydraté (flacon de 500 g)

4/ - Technique de préparation

4.a. / - Préparation d'un milieu à partir de la base déshydratée

Il faut toujours suivre les recommandations du fabricant

- * Pesée (40 grammes de milieu déshydraté)
- * Dissolution (Ex : 40 gr. de milieu déshydraté dans 1 litre d'eau distillée)
- * Porter à ébullition jusqu'à dissolution complète * Ajustage de pH
- * Conditionnement : Répartition en tube ou flacons * Bouchage
- * Stérilisation (autoclaver à 120° C pendant 15 minutes)
- * Conditionnement final : tube (culot, pente), boîte de répartition
- * Etiquetage et stockage à 3°C en chambre froide ou au réfrigérateur

4. b. / - Préparation d'un milieu de culture à partir d'ingrédients

- * Pesée de chaque ingrédient pour 1000 ml (1 l) d'eau distillée stérile
- * Dissolution complète par ébullition * Répartition en tubes ou flacons
- * Stérilisation : autoclaver à 120° C pendant 15 mn.
- * Coulage en boîte de Pétri et conservation à 3°C en chambre froide ou au réfrigérateur

5/ - Procédure de stérilisation à l'autoclave

- Remplir les récipients à stériliser au $\frac{3}{4}$ et les disposer les ouvertures tournées vers le haut
- Vérifier le niveau d'eau dans l'autoclave - Placer à l'intérieur le panier chargé de milieux
- Fermer le couvercle de l'autoclave et serrer 2 à 2, les boulons diamétralement opposés ainsi que le robinet d'échappement - Mettre l'appareil en marche et laisser la pression monter
- Faire la purge à 3 reprises et, fermer le robinet de purge
- Laisser la pression monter à la valeur requise et, déclencher le chronomètre
- Arrêter la stérilisation au terme du temps et, laisser descendre la pression à zéro
- Ouvrir l'autoclave et, sortir les milieux

6/ - Consignes générales - Vérifier la date limite d'utilisation

- Conserver les milieux déshydratés à l'abri de la lumière et de l'humidité, dans le flacon d'origine, avec le bouchon hermétiquement fermé - Stériliser selon le mode indiqué dans la fiche technique

B/ - LES TECHNIQUES D'ENSEMENCEMENT

I/ - DEFINITIONS

- **Ensemencement** : Opération qui consiste à déposer des bactéries sur un milieu de culture ou, dans un milieu, et également à réaliser le transfert de microorganismes d'un milieu à un autre.
- **Repiquage** : Transplantation d'une culture pure de microorganisme sur un milieu neuf
- **Isolement** : Ensemencement effectué dans un but de séparation de façon à obtenir à partir des bactéries présentes des colonies nettement distinctes. On isole une bactérie pour l'obtenir en culture pure.

Au niveau des règles générales, ces techniques doivent : - être pratiquées dans des conditions « d'asepsie parfaite » - être effectuées sur des milieux favorables aux études envisagées et, dans les conditions adaptées aux souches recherchées.

II/ - TRANSFERT STERILE

II. 1. / - Techniques de base de la réalisation du transfert stérile

Le transfert stérile est réalisé soit à l'aide : d'une pipette pasteur stérile, d'un ensemencement automatisé, d'une öse ou anse de platine.

- Stériliser l'extrémité à la flamme du bec Bünsen - Laisser refroidir quelques minutes
- Prélever : une öse de produit liquidien, un aliquote (morceau) du produit alimentaire à analyser, ou une colonie isolée sur gélose.

NB : La zone stérile autour du bec Bünsen est de 15 cm environ, manipuler donc dans cette zone.

II. 2 / - Produit à étudier

- Produits naturels : eau de boissons, lait, fruits et légumes, viandes, conserves, plats cuisinés...
- Souches bactériennes : en milieu liquide, en milieu solide
- Certains produits pathologiques d'origine humaine et animale

III/ - TECHNIQUES DE DISSEMINATION

Plusieurs techniques d'ensemencement sont utilisées en pratique courante mais, selon le type d'examen, certaines sont plus employées que d'autres. Nous pouvons citer les techniques suivantes :

- l'ensemencement par stries d'épuisement
- l'ensemencement par incorporation en milieu solide en simple ou double couche, en milieu semi-solide et en milieu liquide.
- l'ensemencement par étalement, par inondation, par touche ...

La méthode dite par « **épuisement** » est la plus utilisée : c'est la technique de base.

Les géloses sont coulées soit en tube (gélose inclinée), soit en boîte de Pétri.

1/ - Technique par épuisement : Isolement en boîtes, méthode des « quadrants »

- Tenir la boîte de Pétri dans la main gauche, ouverte vers la flamme du bec Bunsen, dans la zone stérile
 - L'inoculum est déposé en point périphérique de la surface du milieu, la gélose doit être sèche
 - L'inoculum est disséminé en stries parallèles très rapprochées dans la moitié de la boîte
 - Faire des stries perpendiculaires aux premières dans le 3^{ème} quadrant
 - Faire encore des stries obliques (à 45°) dans le 4^{ème} quadrant, mais en espaçant plus les stries
 - Refermer la boîte avec le couvercle
 - La boîte ensemencée doit toujours reposer couvercle vers le bas dans l'étuve ou sur la paillasse
 - Existence de beaucoup d'autres variantes de la technique

2/ - Technique d'ensemencement par incorporation

- A partir d'une suspension microbienne ou de colonies sur géloses, l'on ensemence par incorporation un milieu de culture solide, liquide ou rendu liquide.

- A partir de la source microbienne, l'on réalise dans la masse une incorporation par piqûre centrale ou une strie longitudinale dans un milieu en culot *Ex : Gélose Mannitol – mobilité*

- A partir de la suspension microbienne, **un inoculum de 1 ml** va être déposé dans une boîte de Pétri vide dans laquelle la gélose en surfusion à 47° C sera coulée (**12 à 15 ml**) et homogénéisée réalisant ainsi l'ensemencement dans la masse. Après solidification de la gélose, l'incubation est réalisée.

3/ - Technique d'ensemencement par étalement

A partir d'une suspension microbienne, l'on dépose **0,1 ml d'inoculum à la surface** d'une gélose que l'on étale à l'aide d'un étaleur stérile. L'on laisse sécher et on met à incuber

4/ - Autres techniques d'ensemencement**a/ - Par inondation**

L'on inonde la surface d'une gélose avec une suspension bactérienne, attendre environ une minute d'imprégnation et éliminer le surplus. L'on laisse sécher et on met à incuber

b/ - Par touches : à partir d'une colonie, toucher un point d'une gélose

c/ - Par strie transversale : Milieu coulé en pente

d/ - Par étoile ou par strie radiaire

IV/ - INCUBATION

Les boîtes de gélose ou les tubes ensemencés sont placées à l'étuve à **37 °C** pendant **18 à 24 heures**. La durée d'incubation varie en fonction des bactéries : 24 h, 48 h, 72 heures ou plus pour certains germes anaérobies stricts.

L'atmosphère d'incubation peut être différente :

* en aérobiose * en anaérobiose * en microaérophilie * en atmosphère enrichie en CO₂

Elle dépend de l'espèce bactérienne recherchée. Exemples : - Entérobactérie ==> Aérobie

- *Campylobacter* ==> Microaérophilie

- Pneumocoque ==> CO₂

C. / - DESCRIPTION DES COLONIES BACTERIENNES ET BOUILLONS

Après incubation pendant un temps déterminé, à température constante favorable au développement des colonies bactériennes, les milieux gélosés et liquides sont examinés.

1/ - Instruments de lecture

- A l'œil nu le plus souvent - A la loupe à main - Au stéréo microscope (loupe binoculaire)

2/ - La forme : - ronde - ovale - asymétrique - irrégulière

3/ - La surface : - brillante lisse (humide, grasse)

- mate (sèche, rugueuse) mais aussi ridée, plissée - cérébriforme (chou-fleur)

4/ - La taille : - petite (< 1 mm) - moyenne (1,5 à 3 mm) - grande (> 3 mm)

5/ - Le contour : - net - échancré - lobé - dentelé- filamenteux - arborescent

6/ - Le relief

- bombé - plat - globulaire - mamelonné - ombiliqué - acuminé - cratériforme

7/ - La consistance : - pâteuse (molle) - solide (cohérente) détachable en bloc ou non détachable - élastique - filante ou visqueuse avec les colonies ne pouvant se diviser.

8/ - La couleur : observable que sur les géloses nutritives, sans sucre et sans inhibiteur

- verte (*Pseudomonas aeruginosa*) - jaune (*Staph aureus*) - rouge (*Serratia*) - noir (*Bacteroides*)

Le pigment produit peut être : diffusible ce qui donne des colonies et le milieu de culture pigmentés ou, non diffusible ce qui donne des colonies pigmentées mais, le milieu de culture inchangé.

9/ - L'odeur

- Végétal (terre) == > *Nocardia / Serratia odorifera* - Fruité ===== > *Alcaligenes*
- Aromatique == > *P. aeruginosa* - Laiterie == > *Lactobacillus* - Ammoniacque == > *Proteus*
- Putréfaction == > Anaérobies - Métallique == > *Clostridium perfringens*

10/ - Le type de colonie**a/ - Colonie S (Smooth = lisse)**

- Bords irréguliers, souvent bombés, surface lisse, consistance crémeuse, suspension homogène dans l'eau

b/ - Colonie R (Rough = rugueux)

- Bords réguliers, souvent plates, surface rugueuse, consistance sèche, suspension hétérogène

c/ - Colonie M (Muqueuse)

- Bords lisse et réguliers, bombés, surface lisse, brillante, consistance filante, suspension hétérogène

d/ - Colonie naine : Taille < 1 mm**e/ - Colonie envahissante *Proteus*****- DESCRIPTION DES BOUILLONS**

On peut constater au niveau des bouillons : un trouble, un aspect en mie de pain, un dépôt visqueux ou un voile

1/ - Trouble : homogène ou hétérogène

2/ - Aspect en mie de pain

3/ - Dépôt visqueux : l'agitation torsade le dépôt

4/ - Voile : * en haut du tube * adhérent plus ou moins aux parois * flottant ou immergé

METHODES DE PRELEVEMENTS ET DE DENOMBREMENTS

A./ - Méthode de prélèvement

A.1./ - Echantillonnage

Il existe deux (2) types d'échantillons:

- Les prélèvements d'éléments supposés défectueux en vue de mettre en évidence les micro-organismes responsables (nécessité seulement de faire un prélèvement judicieux).
- Les prélèvements sur des éléments supposés normaux pour le contrôle de la qualité (ce type d'échantillon doit être statistiquement significatif).

A.2./ - Prélèvement

A.2.1./ - Prélèvement des produits (solides, liquides et homogènes)

La taille ou le volume de l'échantillon pour laboratoire d'un produit de même nature doit être:

- 500 g, soit 5 fois 100 g. Ces 100 g peuvent être fournis par une ou plusieurs pièces.
- 5 unités de 100 g chacune pour les emballages individuels

A.2.2./ - Prise d'essai

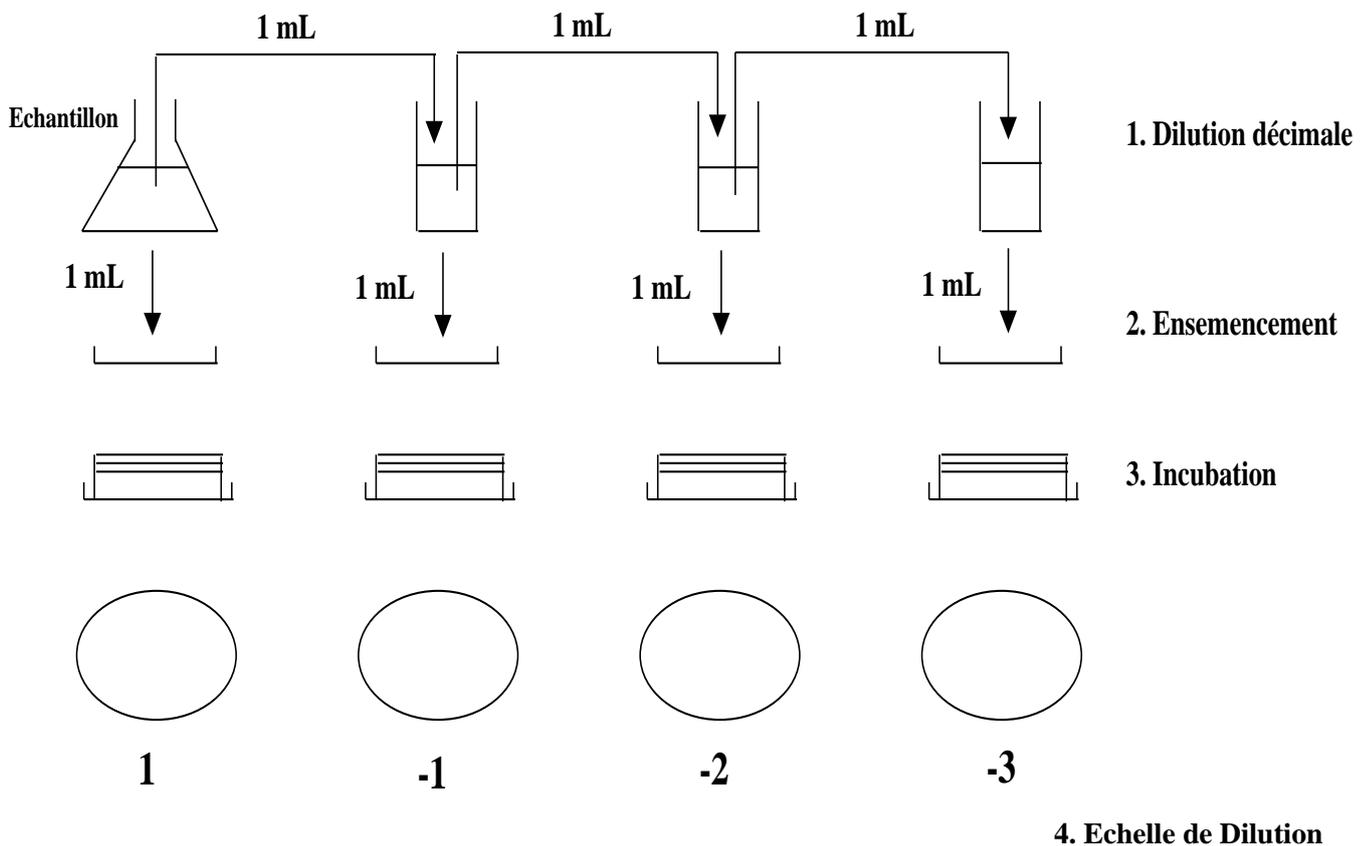
- 10 g dans 90 mL de diluant (ou de solvant)
- Ensemencement: solution mère et dilutions décimales.

B./- Etude comparative des différentes techniques de dénombrement

- Produit noté...
- Préparation de la solution mère (SM au 1/10)
- Les dilutions se font dans la tryptone-sel

A partir de la solution mère, effectuer les dénombrements suivants:

- 1) - Dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM) selon la technique par « étalement » à la surface d'un milieu solide. Exemple: milieu PCA
- 2) Dénombrement des germes aérobies mésophiles (GAM) selon la technique par « incorporation » en double couche d'un milieu solide: milieu PCA



ETUDE DE L'ACTIVITE MICROBIENNE DANS LE LAIT

PAR REDUCTION DU BLEU DE METHYLENE

A./ - Généralités

Le lait est, de par sa composition, un aliment de choix. Il contient des matières grasses, du lactose, des protéines, des sels minéraux, des vitamines et 87% d'eau.

Avec un pH de 6,6, le lait est un substrat très favorable au développement des micro-organismes. Le lait cru contient peu de micro-organisme (moins de 10^3 germes/ml) lorsqu'il est prélevé dans de bonnes conditions à partir d'un animal sain.

La plupart des micro-organismes se multipliant dans le lait sont capables, grâce à l'action de leur réductase, d'abaisser le potentiel d'oxydoréduction jusqu'à décoloration d'un indicateur redox. Plus le temps de réduction de l'indicateur est court, plus le lait est chargé en micro-organismes.

Comme indicateur redox, on utilise souvent le bleu de méthylène dont la forme réduite est incolore ou la résazurine dont la couleur varie du bleu au blanc en passant par le rose, alors que le potentiel redox varie de + 0,20 à + 0,05 V.

C'est une méthode d'estimation approximative. En effet, l'activité réductrice des cellules microbiennes dépend non seulement de leur nombre, mais également des espèces présentes et de leur état physiologique.

(RQ: Les Streptocoques des mammites ne décolorent pas le bleu de méthylène).

Il faut savoir que les tests de réduction perdent de leur valeur lorsqu'ils sont appliqués à des réfrigérés, sauf pour la mise en évidence de laits très contaminés.

B./ - Equipements et matériel

- Etuve à 37°C ou bain-marie à 37°C
- Tubes à vis ou à essais stériles de 18 ml
- Pipettes graduées stériles de 2 mL et 10 ml
- Boîtes d'allumettes
- Lait cru (A, B, C)

C./ - Réactifs

Solution de bleu de méthylène à 0,005% (c'est-à-dire à 0,5 ml/100 ml).

Préparation: Dissoudre 10 mg de bleu de méthylène dans 200 ml d'eau distillée stérile puis filtrer sur filtre millipore 0,45µm.

D./ Manipulation

- Introduire stérilement 10 ml de lait cru dans un tube à essai ou à vis stérile,
- Ajouter stérilement dans le tube, 1 ml de solution de bleu de méthylène à 0,005%,
- Agiter manuellement par retournement,
- Placer le tube à 37° C
- Observer la coloration des tubes toutes les 30 minutes et agiter chaque 1 heure.

RQ: Il faut négliger l'anneau bleu pâle qui peut persister en surface du fait de la réoxydation au contact de l'air.

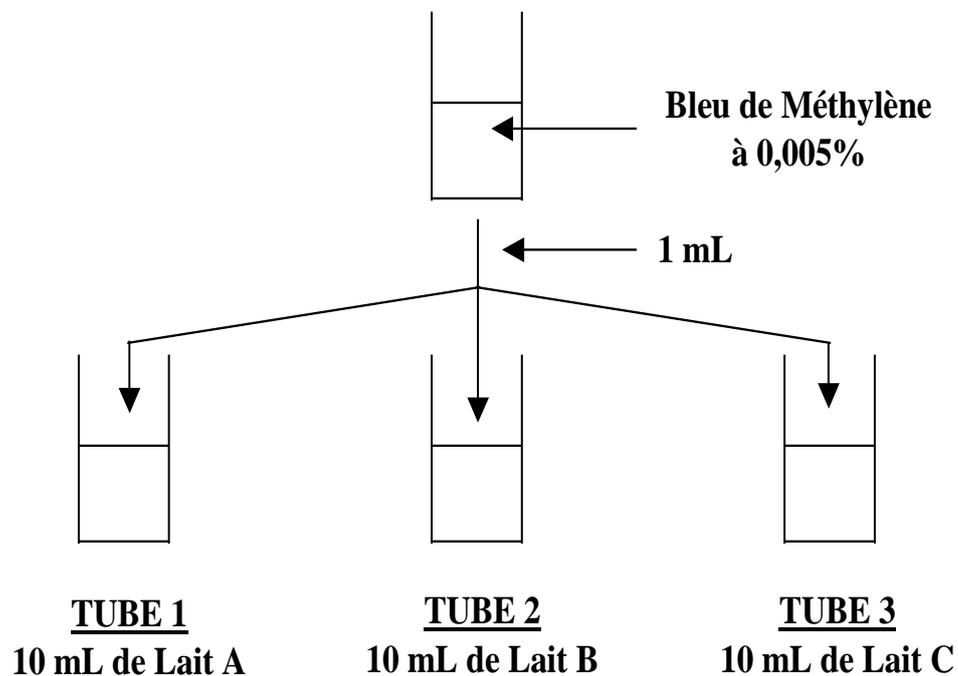


Schéma: protocole expérimental

Note	Qualité du lait (par rapport aux micro-organismes)	Temps de réduction du bleu de méthylène
1	Lait beaucoup chargé	t < 2 heures (< 1H30)
2	Lait peu chargé	2H < t < 4H (1H30 < t < 4H)
3	Lait de bonne qualité	t > 4H (t > 3H)

NB

- Temps de décoloration inférieur à 30 minutes: Très forte contamination
- 30 minutes < Temps de contamination < 60 minutes: Forte contamination

Note: une décoloration dans un temps inférieur à une heure (1 h) correspond à une population microbienne de 2×10^6 à 10^7 germes/ml.

QUESTIONNAIRE : METHODES DE DENOMBREMENT
DES MICROORGANISMES ET ACTIVITE REDUCTASE DU LAIT
(Compte – rendu à retirer pour le Professeur)

I / - 1^{ère} Partie : Méthodes de dénombrement

- 1) - Quel est le nombre de bactéries obtenu après la technique par étalement et celle par incorporation
- 2) - Commentez vos résultats

II/ - 2^{ème} Partie : Activité réductase du lait

- 1) - Pourquoi filtre-t-on sur millipore 0,45 μm ?
- 2) - Commentez vos résultats ?
- 3) - Déterminez la qualité microbiologique des différents laits ?
- 4) - Quelles sont vos conclusions ?

FACTEURS DE MULTIPLICATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

A. / - Influence de la température sur la multiplication des micro-organismes

Produit noté:.....Lait

A.1./ - Lait cru

- Dénombrer la flore totale du produit sur gélose PCA + gélose blanche (double couche)
- 1 ml, 1 ml 10⁻¹, 1 ml 10⁻².....1 ml 10⁻⁴
- Incuber à 30°C pendant 72 H
- Lecture et interprétation

A.2./ - Lait cru pasteurisé (10, 20 et 30 minutes à 63°C)

- Dénombrer la flore totale du produit chauffé sur gélose PCA + gélose blanche (double couche)
- 1 ml, 1 ml 10⁻¹ , 1 ml 10⁻² et 1 ml 10⁻³
- Incuber à 30°C pendant 72 H ± 3 H
- Lecture et interprétation

A.3./ - Lait fermenté (Yaourt)

«Idem que pour le Lait cru »

B./ - Influence du pH sur la multiplication des micro-organismes dans les aliments

*** Produit noté : Jus de fruit contaminé en « levures »**

B.1. / - Dénombrement au temps T 0 jour sur milieu « OGA » (gélose ordinaire à l'oxy-tétracycline)

- 1 ml, 1 ml 10⁻¹ , 1 ml 10⁻² et 1 ml 10⁻³
- Incuber à 30°C pendant 48 H.
- Lecture et interprétation

B.2./ - Dénombrement après 3 jours à 20°C sur milieu « OGA »

- 1 ml 10^{-3} , 1 ml 10^{-4} , 1 ml 10^{-5} , 1 ml 10^{-6} , 1 ml 10^{-7} et 1 ml 10^{-8}
- Incuber à 30°C. pendant 48 heures.
- Lecture et interprétation

*** Produit noté: Jus de fruit contaminé en « Salmonella »****B.3./ - Dénombrement au temps T 0 jour sur milieu « PCA » (double couche)**

- 1 ml , 1 ml 10^{-1} , 1 ml 10^{-2} et 1 ml 10^{-3}
- Incuber à 30°C pendant 72 heures \pm 3 H
- Lecture et interprétation

B.4./ - Dénombrement après 3 jours à 20°C sur milieu « PCA » (double couche)

- 1 ml , 1 ml 10^{-1} , 1 ml 10^{-2} et 1 ml 10^{-3}
- Incuber à 30°C pendant 72 H \pm 3 H
- Lecture et interprétation

*** Produit noté: Poisson****B.5./ - Dénombrement au temps T 0 jour sur milieu « PCA » (double couche)**

- 1 ml , 1 ml 10^{-1} , 1 ml 10^{-2} et 1 ml 10^{-3}
- Incuber à 30°C pendant 72 H \pm 3 H
- Lecture et interprétation

B.6./ - Dénombrement sur milieu « PCA » , après cuisson à 100°C. pendant 30 minutes

- 1 ml , 1 ml 10^{-1} et 1 ml 10^{-2}
- Incuber à 30°C pendant 72 H \pm 3 H
- Lecture et interprétation

C. / - Influence de l'AW (activité en eau) sur la multiplication des micro-organismes dans les aliments

Action du sel sur le développement de la flore microbienne d'une viande hachée.

- 10 g de viande hachée dans 90 ml de Tryptone sel (SM)
- Les dilutions se font dans la Tryptone sel

C.1./ - Dénombrement des germes aérobies mésophiles (G.A.M.) dans la viande hachée sur milieu « PCA », témoin T 0

- 1 ml , 1 ml 10⁻¹ , 1 ml 10⁻² , 1 ml 10⁻³ ,et .1 ml 10⁻⁵
- Incuber à 30°C pendant 72 heures ± 3 H.
- Lecture et interprétation

C.2./ - Dénombrement des « G.A.M. » dans la viande hachée contenant 15% NaCl et conservée 4 jours à 4°C, sur milieu « PCA »

- 1 ml...1 ml 10⁻¹ , 1 ml 10⁻² , 1 ml 10⁻³,.....et.1 ml 10⁻⁵
- Incuber à 30°C pendant 72 heures ± 3 H.
- Lecture et interprétation

C.3./ - Dénombrement des « G.A.M. » dans la viande hachée témoin conservée 4 jours à 4°C, sur milieu « PCA »

- 1 ml 10⁻³ , 1 ml 10⁻⁴ , 1 ml 10⁻⁵ , 1 ml 10⁻⁶...,et.1 ml 10⁻⁸
- Incuber à 30°C pendant 72 heures ± 3 H.
- Lecture et interprétation

D. / - Influence de la réfrigération sur la multiplication des micro-organismes dans les produits alimentaires

Une manipulation pour tous

- Empreintes de viandes réfrigérées sur lame porte objet.
- Des viandes ont été entreposées à 4°C pendant des temps différents:
T 0, T 3 heures, T 24 heures et, T 48 heures
 - Appliquer une lame porte objet à la surface de la viande
 - Laisser sécher
 - Fixer le frottis à la flamme
 - Colorer au bleu de méthylène pendant une (1) minute
 - Rincer à l'eau
 - Sécher
 - Observer et noter la charge bactérienne

Résultats

- **T 0** = RAS (ou très rares) bacilles
- **T 3 heures** = Quelques bacilles
- **T 24 heures** = (+) bacilles
- **T 48 heures** = (++) bacilles

* NB : Flore aérobie stricte de type *Pseudomonas*.

QUESTIONNAIRE : FACTEURS DE MULTIPLICATION
DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS
(Compte - rendu à retirer pour le Professeur)

I/ - Donner les nombres de colonies obtenus après les périodes d'incubation des différentes manipulations : « **A, B, et C** »

II/ - Interpréter vos différents résultats

III/ - Donner la charge bactérienne en fonction du temps de la réfrigération

ETUDE DE LA MICROFLORE FERMENTAIRE DES FRUITS ET LEGUMES : PRODUITS DE 4^{ème} GAMME

INTRODUCTION

Les produits de 4^{ème} gamme sont définis par Jouve (1993), comme étant des produits végétaux conditionnés en unités ménagères ou collectives, crus, frais, prêts à l'emploi à la consommation humaine, ayant fait l'objet d'un épluchage, coupage ou toute autre opération touchant à leur l'intégrité.

Les micro-organismes fermentaires sont des êtres dont les potentialités sont très utilisées dans l'alimentation et l'industrie alimentaire.

D'une façon générale, nous distinguons deux (2) types de micro-organismes fermentaires : **les Champignons et les Bactéries.**

Les **Champignons** sont essentiellement les **Levures et les Moisissures**, tandis qu'au niveau des **Bactéries** nous avons :

- les **Bactéries « acétiques »** (*Acetomonas* , *Acetobacter*, *Gluconobacter*) qui transforment l'alcool éthylique en acide acétique par oxydation;
- les **Bactéries « lactiques »** (*Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus* , *Streptococcus*) très utilisées en industrie alimentaire; elles sont les agents de fermentation lactique.
- Les **Bactéries « propioniques »** qui correspondent au genre *Propionobacterium* et, qui appartiennent au groupe des « Actinobactéries »

Dans les **produits sucrés de 4^{ème} gamme**, les micro-organismes fermentaires à rechercher sont : **les Levures, les Moisissures et les Leuconostocs**. Bien qu'altérant la qualité marchande des produits, ils n'induisent pas de risque sanitaire pour le consommateur.

A./ - IDENTIFICATION DES LEVURES

I/- CARACTERISTIQUES CULTURALES

I.1./ - Aspect des cultures en milieu liquide

Noter les caractères : - Dépôt - Anneau - Ilot - Voile lisse ou ondulé, suspension.

I.2./ - Croissance en milieu solide : OGA= Gélose Ordinaire à l'Oxytétracycline ou Gélose Sabouraud

Noter les caractères : -Taille des colonies - Forme (ronde, ovale , asymétrie)
- Contours (nets, irréguliers) - Relief (convexes, concaves, plats)
- Aspect (mat, brillant) - Pigmentation (blanches , transparentes) .

II./ - CARACTERISTIQUES MORPHOLOGIQUES

II.1./ - A partir des cultures en milieu liquide

Réaliser un examen entre lame et lamelle

Noter: - la forme des cellules - la taille - Le mode de reproduction

II.2./ - Formation de pseudo mycélium (boîte de Riz,Agar,Tween = RAT)

Examiner au microscope et noter formation de pseudo mycélium ou de mycélium vrai.

Noter la présence de spore.

III./ - GALERIE D'IDENTIFICATION RAPIDE

Ensemencer une galerie API 20 C AUX (Auxanogramme 20 C.)

Incuber 24 à 48 heures à 30°C.

Lecture et interprétation

B/ - IDENTIFICATION DES MOISSURES

Il existe à l'heure actuelle environ 50.000 espèces connues de moisissures.

Ces champignons possèdent certaines particularités qui fait naître dans le domaine agroalimentaire des espérances: leur teneur en protéine est très élevée, mais aussi des inquiétudes, car elles ont le pouvoir d'élaborer des substances toxiques: raison de leur identification.

A partir d'une souche distribuée sur gélose glucosée à l'oxytétracycline « OGA » :

1/ - Examen macroscopique : Observer les colonies

2/ - Effectuer un examen microscopique.

Prélever le bord des colonies et observer à l'état frais pour confirmation

3/ - Croissance sur milieux ordinaires et enrichis

N.B.: Genres fréquents : - *Penicillium* - *Aspergillus* (Ex . *A. fumigatus*)

C/ - PROTOCOLE MICROBIOLOGIQUE

Les analyses microbiologiques doivent s'effectuer dans un milieu aseptique crée par la flamme du bec Bünsen permettant ainsi d'éviter la contamination du produit par le manipulateur ou l'environnement. Cinq (5) étapes majeures sont accomplies avant l'isolement et le dénombrement des germes fermentaires ; ce sont :

- la préparation des milieux de culture
- la préparation de l'échantillon et de la suspension mère
- la préparation des dilutions décimales
- l'ensemencement des milieux spécifiques
- et l'incubation aux températures spécifiques.

Les deux dernières étapes constituent l'étape de la recherche des germes.

I/- PREPARATION DES MILIEUX DE CULTURE

Une certaine quantité de milieu de culture est pesée et, dissoute dans un volume précis d'eau. Un chauffage est réalisé pour assurer l'homogénéisation du milieu. Ceux-ci sont répartis dans des tubes à vis ou dans des flacons. Ils sont autoclavés par la suite.

II/- PREPARATION DE L'ECHANTILLON ET DE LA SUSPENSION MERE

Après avoir trempé les fruits dans de l'eau de javel, l'on réalise une dissection de l'épicarpe avec un couteau stérile. Dix grammes de la pulpe sont pesés et mis dans un sachet Stomacher stérile où l'on ajoute 90 ml d'eau peptonée tamponnée (EPT). L'ensemble est soumis à l'action d'un broyeur Stomacher et, après homogénéisation l'on obtient une solution qui est appelée: « **suspension mère** » ; cette solution homogène est à 10^{-1}

III/ - PREPARATION DES DILUTIONS DECIMALES

La tryptone sel utilisée comme diluant, est répartie aseptiquement dans des tubes à essai en raison de 9 ml. par tube. L'on prélève 1 ml. de la suspension mère, que l'on transfère dans un autre tube contenant 9 ml. de diluant. Après homogénéisation l'on obtient une suspension qui est à 10^{-2} .

L'on prélève ensuite 1 ml. de la suspension 10^{-2} qu'on met dans un autre tube à essai contenant 9 ml. diluant. Après homogénéisation, l'on obtient une autre suspension qui est à 10^{-3} . Par la même technique on obtient les dilutions à 10^{-4} , à 10^{-5} , à 10^{-6} ...

IV/ - RECHERCHE DES GERMES FERMENTAIRES

IV. 1./ - Ensemencement des milieux de culture

L'on réalise un ensemencement par inondation à la surface des différents milieux spécifiques coulés en boîte de pétri avec 0,1 ml. de la suspension mère et de chacune des dilutions retenues.

Ces milieux spécifiques étant :

- le milieu « **OGA** » pour la recherche des « **Levures et Moisissures** »
- le milieu « **Hypersaccharosé** » pour la recherche des « **Leuconostocs** »
- le milieu « **MRS** » pour la recherche des « **Lactobacillus** »

IV.2/ - Incubation 48 à 72 heures aux températures spécifiques

Après ensemencement, les boîtes sont incubées à l'étuve à 30°C . pendant 48 à 72 heures.

V/ - IDENTIFICATION DES GERMES

V.1./ - LES LEUCONOSTOCS

Après incubation, l'on recherche à la surface du « milieu hypersaccharosé » de grosses colonies transparentes muqueuses et coulantes. La coloration de Gram fait apparaître des Cocci Gram positif (C.G. +) en diplocoques et en chaînettes.

V.2. / - LES LEVURES ET MOISSURES

Après incubation , on observe à la surface du milieu glucosé à l'oxytétracycline des colonies crémeuses blanche ou blanchâtre qui caractérisent les Levures et, les colonies duveteuses spécifiques aux Moisissures.

Une vérification de ces résultats est faite à partir des colonies, par une coloration de Gram pour la mise en évidence, permettant de relever des Cocci Gram positif (C.G. +) lancéolés et operculés caractéristiques. Pour les Moisissures, ce sont des germes filamenteux pluri-segmentés qui sont recherchés.

La détermination du genre et, de l'espèce des Levures isolées est réalisée à l'aide des galeries API 20 C AUX.

A partir des colonies isolées de souche pure, l'on fait 3 à 5 suspensions dans de l'eau distillée (2 ml.) contenue dans des tubes à hémolyse. Ces suspensions sont utilisées pour transférer 100 µl, soit 3 gouttes d'une pipette Pasteur dans une ampoule de C Médium afin d'ensemencer une galerie 20 C AUX. pour l'identification des levures isolées. Une fois les galeries ensemencées, elles sont incubées pendant 48 à 72 heures à une température de 30°C.

- Une première lecture des galeries est effectuée après 24 heures d'incubation. Les cupules plus troubles que le témoin, indiquent des réactions positives sont notées sur la fiche de résultats.

- Une seconde lecture des galeries est effectuée après 48 heures d'incubation à 30°C. pour une meilleure analyse des réactions positives et une identification plus précise des genres et des espèces.
- Une troisième lecture est enfin réalisée après 72 heures d'incubation pour déterminer le « **profil numérique** » afin d'identifier la Levure.

Toutes les réactions positives et négatives sont notées sur la fiche de résultats. Grâce à cette fiche de résultats, l'on obtient un « profil numérique » pour l'identification du genre et de l'espèce des colonies isolées ce à l'aide du catalogue API 20 C AUX.

Quant aux Moisissures, on réalise une coloration avec une solution de bleu de méthylène .

Un examen à l'état frais entre lame et lamelle est ainsi réalisé. On note ensuite les aspects macroscopiques des colonies.

P.S. : Cas de recherche des Lactobacillus.

Après incubation l'on observe des colonies circulaires, opaques, incolores ou blanchâtres et de 0,5 à 1 mm de diamètre. La coloration de Gram révèle des bacilles Gram positif (B. G. +) non sporules longs et flexueux.

VI / - CRITERES DE QUALITE DES FRUITS

Ces travaux pratiques s'effectuent suivant les critères des normes AFNOR : Association Française de Normalisation ; liés aux fruits au stade de la production. Ces critères étant adoptés par le Comité Ivoirien de Normalisation : CODINORM.

Les critères liés aux Levures et Moisissures sont :

- pour la valeur limite minimale « **m** » = **1000 germes / ml.**
- et pour la valeur limite maximale « **M** » = **10.000 germes / ml**

TABLEAU DES CRITERES LIES AUX FRUITS AU STADE DE LA PRODUCTION

Micro-organismes recherchés	Nombre de germes / ml (Valeur limite minimale)	Nombre de germes / ml (Valeur limite maximale)
Levures	« m » = 1. 000	« M » = 10. 000
Moisissures	« m » = 1. 000	« M » = 10.000
Leuconostocs	Absence	Absence
Lactobacillus	Absence	Absence

* **m** = Valeur limite minimale

* **M** = Valeur limite maximale

* **M** = Valeur limite maximale, ou seuil d'acceptabilité au delà duquel les résultats sont considérés comme non satisfaisants, pour la qualité marchande. Sans pour autant que ces produits soient considérés comme toxiques.

A partir de ces critères énoncés, les différents commentaires assignés à la qualité des fruits au stade de la production sont les suivants :

1/ - Qualité microbiologique satisfaisante (QMS) lorsque les résultats en milieu solides, sont tous inférieurs ou égaux à trois (3) fois « m ».

2/ - Qualité microbiologique considérée comme **acceptable (QMA)** lorsque les résultats obtenus sont compris entre trois (3) fois « m » et « M », soit dix (10) fois « m »

3/ - Qualité microbiologique non satisfaisante (QMNS) quand les résultats sont supérieurs à « M »

QUESTIONNAIRE: ETUDE MICROBIOLOGIQUE**DES PRODUITS DE 4^{ème} GAMME**

(Compte rendu à retirer pour le Professeur)

A/ - IDENTIFICATION DES LEVURES ET MOISSURES

- I/ - Présenter les caractéristiques des « Levures » en milieu liquide et sur milieu gélosé « OGA »
- II/ - Présenter les caractères macroscopiques des « Moisissures » sur milieu gélosé « OGA »
- III/ - Réaliser des examens microscopiques à l'état frais des « Levures et des Moisissures » ;
présenter les caractéristiques morphologiques de ces germes
- IV/ - Donner la charge en « Levures et Moisissures » présentes dans le fruit que vous avez analysé.
- V/ - Identifier les « Levures » majoritaires étudiées à l'aide de galeries API 20 C Auxanogramme

B/ - IDENTIFICATION DES LEUCONOSTOCS ET LACTOBACILLUS

- I/ - Présenter les caractères cultureux et macroscopiques des Leuconostocsensemencés sur milieu spécifique « Hypersaccharosé à 150 %/00 »
- II/ - Présenter les caractères cultureux et macroscopiques des Lactobacillusensemencés sur milieu spécifique « MRS »
- III / - Présenter les caractères microscopiques à l'état frais et, après coloration de Gram des Leuconostocs et des Lactobacillus.
- IV/ - Donner la charge en « Leuconostocs et Lactobacillus » présents dans le fruit que vous avez analysé.

C/ - DETERMINATION DE LA QUALITE MICROBIOLOGIQUE DES FRUITS

- I/ - Quelle est la qualité microbiologique de ces fruits et, pourquoi ?

ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DES ALIMENTS

CAS D'UN PLAT CUISINE

INTRODUCTION

Les plats cuisinés sont des préparations cuites ou précuites (braisage , rôissage, grillage) à base de viande de boucherie, volailles ,abats, de gibiers, de poissons, de crustacés, de mollusques, d'œufs, accompagnés de sauces farces hachis ou légumes.

Chaque jour nous mangeons au moins une fois un plat dit cuisiné. Ce dernier peut constituer avec :

- les matières premières utilisées pour sa préparation,
- le temps passé entre sa préparation et son ingestion,
- son mode de conservation,

un milieu favorable pour le développement de germes pathogènes notamment les coliformes, les staphylocoques, les germes aérobies sulfite-réducteurs et surtout les germes entéro-pathogènes du genre *Salmonella*.

Ces germes sont à l'origine de toxi-infections causes d'importants troubles digestifs : déshydratations sévères, diarrhées aiguës, d'hyperthermie, d'atteinte de l'état général ...

L'analyse microbiologique d'un plat cuisiné a donc pour objectifs :

- la recherche et le dénombrement de germes pathogènes
- et la détermination de la qualité microbiologique de ce plat cuisiné.

SCHEMA GENERAL DE L'ANALYSE D'UN PLAT CUISINE

- Peser 25 grammes de produit dans un sachet stérile
- Diluer dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée
- Broyer au Stomacher et homogénéiser. Le produit est dilué au 1/10^{ème}
(Suspension mère = S.M.)
- Prélever 10 ml. et, vider dans un tube à essai placé dans un bain marie glacé.
- A partir des 10 ml. placés en tube, réaliser les différentes dilutions décimales de la suspension mère dans de la tryptone-sel
- Ensemencer les milieux de culture.

N.B. : Toutes les opérations doivent être réalisées de manière aseptique.

1/ - Recherche des Germes Aérobie Mésophile (GAM) sur gélose « P.C.A. » :

Agar à la Peptone de Caséine au glucose et à l'extrait de levure

Ensemencer sur gélose PCA en double couche

1 ml de la S.M. et 1 ml. des différentes dilutions jusqu'à 10⁻⁴

Incuber 2 à 3 jours : 72 heures à 30 °C.

2/ - Recherche des Coliformes Totaux et Coliformes « Thermotolérants »

sur gélose Désoxycholate Lactosé 1 0/00

Ensemencer sur en profondeur en double couche sur désoxycholate lactosé 1 °/00

(ou sur du VRBL : Violet, Rouge neutre, Bile et Glucose)

Pour les Coliformes Totaux

1 ml de la S.M. et 1 ml. des différentes dilutions jusqu'à 10 – 2

Incuber 24 heures à 30 °C.

Pour les Coliformes Thermotolérants

1 ml de la S.M. et 1 ml. de la dilution 10 – 1. Incuber 24 heures à 44 °C.

3/ - Recherche de Staphylococcus aureus sur gélose Baird Parker

Ensemencer par étalement 0,1 ml de la S.M. et 0,1 ml de la dilution 10^{-1}

Incuber 24 à 48 heures à 37 °C.

4/ - Recherche d'Anaérobies Sulfito-Réducteurs sur Tryptone Sulfite Cyclosérine (TSC) ou Néomycine (TSN) en tube

Ensemencer en profondeur 1ml. de la S.M. et 1 ml. de la dilution 10^{-1}

Incuber 24 à 48 heures à 46 °C.

5/ - Recherche de Salmonella

a/ - Pré-enrichissement : Incuber le reste du broyat 25 g + 225 ml. d'eau peptonnée tamponnée à 37 °C. pendant 16 à 18 heures

b/ - Enrichissement

c/ - Isolement

d/- Identification

6/ - Recherche des Levures et Moisissures sur Gélose Glucosé à l'Oxytétracycline : OGA

Ensemencer par étalement sur OGA, 0,1 ml de la S.M et 0,1 ml de la dilution 10^{-1} .

Incuber 24 à 48 heures à 30 °C.

7/ - Recherche des Streptocoques du groupe « D »

Ensemencer 1 ml de la S.M. et 1 ml. des différentes dilutions jusqu'à 10^{-4} de la masse sur bouillon Rothe.

Incuber à 37 °C. pendant 24 à 48 heures pour le test de présomption

Réaliser l'isolement à partir des «Rothe» positifs sur gélose Bile Esculine Azide (B.E.A.).

Incuber 24 à 48 heures.

4/- Dénombrement de Staphylococcus aureus à 37°C. sur gélose Baird Parker par étalement

- Ensemencer par étalement sur Baird Parker gélosé précoulé et séché
- 0,1 ml de la Suspension Mère et 0,1 ml de la dilution 10^{-1}
- Incuber 24 et 48 heures à 37 °C.
- Lecture : Compter entre 15 et 150 colonies caractéristiques : noires avec un halo clair (action de la lécithine) et une zone d'opacité (action de la lipase).

5/ - Dénombrement des Anaérobies Sulfito-Réducteurs à 46° C. sur milieu Tryptone Sulfite Néomycine (TSN) ou Cyclosérine (TSC) en tube

- Ensemencer en profondeur 1ml. de la S.M. , 1 ml. de la dilution 10^{-1} et 10^{-2}
- Incuber 24 et 48 heures à 46 °C.
- Lecture : Compter entre 15 et 150 colonies noires. Tenir compte de la dilution

6/ - Recherche de Salmonella à 37° C.

- Pré-enrichissement : Incuber le reste du broyat 25 g + 225 ml. d'eau peptonnée tamponnée à 37 °C. pendant 16 à 18 heures

7/ - Dénombrement des Levures et Moisissures (L.M.) à 30° C. sur Gélose Glucosé à l'Oxytétracycline (OGA)

- Ensemencer par étalement sur OGA : 0,1 ml de la Suspension mère et 0,1 ml des dilutions 10^{-1} et 10^{-2} .
- Incuber 24 à 48 heures à 30 °C.
- Lecture : Compter entre 15 à 150 colonies caractéristiques ; Levures : blanches, crémeuses, transparentes et Moisissures: duveteuses , rugueuses.

8/ - Dénombrement des Streptocoques du groupe « D »

- Ensemencer de la masse sur bouillon Rothe 1 ml de la S.M. et 1 ml. des différentes dilutions jusqu'à 10^{-3} .
- Incuber à 37 °C. pendant 24 à 48 heures pour le test de présomption

JOUR J. + 1

1/ - Coliformes Totaux et Coliformes «Thermotolérants» sur gélose

Désoxycholate Lactosé 1 0/00

- Lecture et interprétation des géloses incubées à 30°C. et 44°C.

Compter les colonies rouges d'un diamètre de 0,5 mm. et, si possible les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies.

2/ - Anaérobies Sulfito-Réducteurs sur Tryptone Sulfite Néomycine (TSN)

- Lecture et interprétation du TSN ou du TSC , compter les colonies noires.

3/ - Salmonella

- Enrichissement : ensemencer le pré-enrichissement dans du :

* Milieu de Rappaport de Vassiliadis : 2 X 0,1 ml.

* Bouillon Sélénite : 2 X 2 ml.

* Bouillon Tétrathionate : 2 X 2 ml.

Incuber chacun des deux milieux pendant 24 h. à 37°C. et à 43°C.

4/ - Streptocoques D.

Réaliser l'Isolement à partir des milieux « Rothe » positifs sur la gélose Bile Esculine Azide (B.E.A.). Incuber 24 à 48 heures à 37°C pour l'observation de petites colonies noirâtres.

JOUR J. + 2

1/ - Staphylococcus aureus

Lecture et interprétation du dénombrement sur Baird Parker.

A partir des colonies caractéristiques : noires avec en général un halo clair et une zone d'opacité ; réaliser une coloration de Gram pour confirmation de Cocci. Ensemencer un bouillon Cœur-cervelle avec les colonies noires . Incuber 18 h. à 37°C.

2/ - Salmonella

Isolement : Isoler chaque tube de Sélénite et de Rappaport sur deux géloses :

a/ Hektoen b/ gélose lactosée au vert brillant et rouge de phénol.

Incuber à 37° C. pendant 24 heures

3/ - Levures et Moisissures

Lecture et interprétation du dénombrement sur OGA, compter entre 15 et 150 colonies caractéristiques. Tenir compte de la dilution .

Réaliser un examen entre lame et lamelle pour confirmation.

Pour l'identification du genre et d'espèce; faire l'auxanogramme à l'aide des galeries API 20 C AUX.

4/ - Streptocoques D.

A partir des colonies noirâtres sur milieu BEA, réaliser une confirmation par une coloration de Gram avec l'obtention de Cocci Gram positif en courtes chaînettes

JOUR J.+ 3**1/ - Germes Aérobie Mésophiles**

Lecture et interprétation du dénombrement sur PCA en comptant les boîtes contenant 30 à 300 colonies.

2/ - Staphylococcus aureus

A partir du bouillon cœur-cerveille faire: une coagulase et une thermonucléase

*** Test de la coagulase :**

Mettre 0,5 ml. de plasma de lapin oxalaté et 0,5 ml. de bouillon cœur-cerveille . Incuber 2 h. à 37°C. puis 24 h. à 37°C. Une coagulase positive se traduit par une coagulation totale ou partielle du plasma.

*** Test de la thermonucléase :**

Chauffer 1 ml. de bouillon cœur-cerveille 15 mn. à 100°C. ; déposer 10 µl. de bouillon chauffé dans un puits d'inoculation sur une gélose ADN au bleu de toluidine. Incuber 4 h. à 37°C. Une réaction positive se traduit par la présence d'un halo rose autour du puits d'inoculation.

3/- Salmonella

A partir des isollements, repiquer les colonies caractéristiques sur Portoir réduit de Lemnitor et incuber 24 heures à 37°C. Ou faire un test API Z et incuber 2 h. à 37°C.

Si suspicion de Salmonella , poursuivre l'identification et ensemencer une galerie API 20 E. et une gélose ordinaire. Incuber 24 heures à 37° C.

Relever les caractères biochimiques, donner le nom du genre après avoir discuter le résultat (famille – groupe – genre – espèce)

JOUR J + 4**1/ - Salmonella**

Lire la galerie API 20 E, si suspicion de salmonella , faire un sérotypage de la souche à partir de la gélose ordinaire.

«CRITERES MICROBIOLOGIQUES DES PLATS CUISINES»

Critères de l'Association Française de Normalisation (**A.F.N.O.R.**)
adoptés par le Comité Ivoirien de Normalisation (**CODINORM**)

- Germes Aérobie Mésophile à 30°C. (G.A.M.)	300.000 germes / g
- Coliformes Totaux à 30° C. (C.T.)	1.000 germes / g
- Coliformes Thermotolérants (C. Fécaux: C.F.)	10 germes / g
- Staphylococcus aureus (Staph.)	100 germes / g
- Anaérobies Sulfite-Réducteurs (A.S.R.)	30 germes / g
- Streptocoques Fécaux (Strep. D)	Pas de critère
- Salmonella (Sal.)	Absence dans 25 g

COMMENTAIRE DES CRITERES

GERMES	Q.M.S. *	Q.M.A. *	Q.M.N.S *	Aliment Corrompu
G.A.M. Germes Aérobie Mésophiles	900.000	900.000 – 3.000.000	900.000 – 3.000.000	
Coliformes Totaux	3.000	3.000 –10.000	3.000 –10.000	
Coliformes Fécaux	30	30 - 100	30 - 100	
A. S. Réducteurs	90	90 - 100	90 - 100	
Staphylococcus aureus	300	300 – 1.000	300 – 1.000	
Salmonella	Absence / 25 g.	Absence / 25 g.	Absence / 25 g.	Présence dans 25 g.
	Tous les dénombrements sont inférieurs à 3 fois le critère avec absence. de <i>Salmonella</i>	Un des dénombrements est compris entre 3 et 10 fois le critère avec abs. de <i>Salmonella</i>	Plusieurs dénombrements sont compris entre 3 et 10 fois le critère avec abs. de <i>Salmonella</i>	Susceptibilité de toxicité. Egalement lorsque les dénombrements sont compris entre 500 et 1000 fois le critère

*1/ - **Q.M.S.** : Qualité microbiologique satisfaisante

* 2/ - **Q.M.A.** : Qualité microbiologique acceptable

* 3/ - **Q.M.N.S.** : Qualité microbiologique non satisfaisante

* 4/ - **Aliment corrompu**

QUESTIONNAIRE : ANALYSE MICROBIOLOGIQUE D'UN PLAT CUISINE

(*Compte rendu à retirer pour le Professeur*)

I/ - Les Germes Aérobie Mesophiles (GAM)

- 1/ - Présenter les caractères macroscopiques des germes isolés du milieu «PCA»
- 2/ - Effectuer le dénombrement des GAM présents sur les boîtes de Pétri appropriées et donner le nombre exact des germes existants dans le plat analysé

II/ - Les Coliformes : Coliformes Totaux (C.T.) et Coliformes Fécaux (C.F.)

- 1/ - Présenter les caractères macroscopiques des germes isolés du milieu « Désoxycholate lactose 1°/00 »
- 2/ - Effectuer le dénombrement des coliformes totaux et fécaux présents sur les boîtes de Pétri appropriées et donner le nombre exact de ces germes existants dans le plat cuisiné analysé

III/ - Les Anaérobies Sulfito-Réducteurs (ASR)

- 1/ - Présenter les caractères macroscopiques des germes isolés du milieu «TSN »
- 2/ - Effectuer le dénombrement des ASR présents dans les tubes appropriés et donner le nombre exact de ces germes existants dans le plat cuisiné analysé

IV/ - Staphylococcus aureus

- 1/ - Présenter les caractères macroscopiques des germes isolés du milieu spécifique « Baird Parker »
- 2/ - Présenter leurs caractères microscopiques après une coloration de Gram
- 3/ - Présenter les caractères biochimiques de la coagulase et de la thermonucléase
- 4/ - Dénombrer les *Staphylococcus aureus* présents sur les boîtes de Pétri appropriées et préciser le nombre de ces germes existants dans le plat analysé

V/ - Streptocoques Fécaux (S.F.) : Streptocoques D

- 1/ - Présenter les caractères macroscopiques des germes isolés du milieu «BEA»
- 2/ - Présenter les caractères microscopiques après une coloration de Gram des germes isolés du milieu spécifique «BEA»
- 3/ - Dénombrer les Streptocoques D présents sur les boîtes de Pétri appropriées et préciser le nombre de ces germes existants dans le plat analysé

VI/ - Salmonella

- 1/ - Présenter les caractères biochimiques issus des repiquages de colonies suspectes sur portoir réduit de Leminor, plaque API 20 E et donner le nom du genre et de l'espèce du germe analysé.

VII/ - Détermination de la « Qualité Microbiologique » du plat cuisiné

- En expliquant et commentant vos différents résultats, déterminer la qualité microbiologique du plat cuisiné analysé suivant les normes AFNOR et CODINORM

PRODUCTION D'ETHANOL A PARTIR DE JUS DE FRUITS TROPICAUX

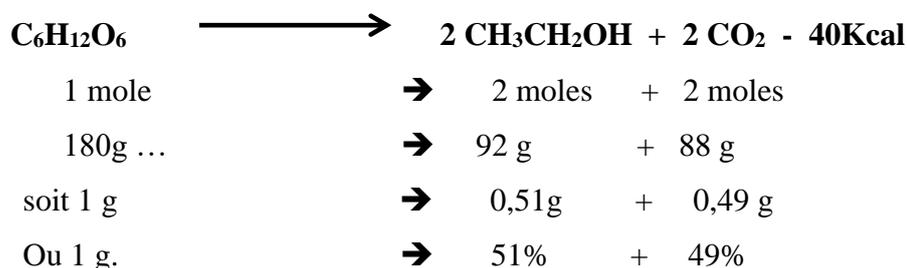
I-INTRODUCTION

La fermentation alcoolique est un processus anaérobique qui aboutit à une dégradation partielle des glucides fermentescibles (milieux de fermentation).

En fin de chaîne, on obtient :

- du gaz carbonique qui est dégagé,
- de l'alcool éthylique,
- de l'énergie utilisée par la Levure.

Equation de production d'éthanol selon Guay-Lussac:



Selon **TABERA**, il existe une relation étroite entre la variation de poids du substrat de fermentation liée au dégagement de gaz carbonique et la quantité d'éthanol produite au cours d'une fermentation. Il a établi une formule permettant de déterminer la quantité d'éthanol produit au cours d'une fermentation comme suit :

QUANTITE D'ETHANOL PRODUIT =

Variation de poids du système de fermentation après chaque temps fixé X = 1,045

Le facteur **1,045** est le rapport entre la quantité produite d'éthanol et celle du gaz carbonique obtenu.

II/ - CALCUL DES RENDEMENTS ET DES PRODUCTIVITES

Selon l'équation ci-dessus, 1 gramme de glucose produit 0,51 gramme d'éthanol et 0,49 gramme de gaz carbonique pour un rendement théorique de 100%. Mais compte tenu des pertes en sucres par transformation en sous-produits (glycérol) et en biomasse du glucose, le rendement ne peut être atteint. Les rendements effectivement observés lors d'une fermentation ne représentent que 90 à 95% de la valeur théorique.

Les termes utilisés dans les tableaux de résultats sont définis comme suit :

- **So = concentration initiale en sucres totaux dans le substrat en gramme par litre (g/l)**

- **Sr = concentration résiduelle de sucres totaux en g/l après une période de temps de fermentation.**

- **S = So – Sr = concentration de sucre consommé ou converti en alcool en g/l.**

- **Pourcentage du sucre consommé (Z) : $Z = S / So \times 100$**

- **Production observée = concentration d'éthanol produit en g/l à partir de la formule de TABERA (1985) = Variation du poids du système de fermentation x 1,045 .**

- **Production théorique = concentration théorique d'alcool à obtenir ou concentration limite théorique d'éthanol à être produite en g/l = $S \times 0,511$**

- **Production pratique = concentration limite pratique d'éthanol produite en g/l
= $S \times (0,511 \times 90 \%) = S \times 0,460.$**

Rendements:

- **R. o.** = rendement observé après fermentation en

$$\mathbf{R.o.} = \frac{P.\text{observée}}{S} \times 100$$

- **R.Lt.** = rendement obtenu par rapport au rendement théorique en pourcentage

$$\mathbf{R.Lt.} = \frac{P.\text{observée}}{P.\text{théorique}} \times 100$$

- **R.Lp.** = rendement obtenu par rapport au rendement limite pratique en pourcentage.

$$\mathbf{R.Lp} = \frac{P.\text{observée}}{P.\text{pratique}} \times 100$$

Productivité (Pr.)

- **Pr.** = productivité exprimée en g/l/heure ou g/l/ min.

$$\mathbf{Pr.} = \frac{P.\text{observée}}{T}$$

III / – EXPERIMENTATION**III-1/ - MATERIEL*****III-1-1/ - Matériel biologique ou substrat ou milieu de fermentation***

Le milieu est constitué de **trois (3) lots de jus** dont les teneurs en sucre fixées à **10%, 15% et 20%** (100 g/l, 150 g/l et 200 g/l). Ces jus bruts sont stérilisés à l'autoclave et constituent les milieux utilisés pour les différents essais de fermentation.

III-1-2/ - Matériel microbiologique (l'inoculum)

Dans cette expérimentation la levure de boulangerie : *Saccharomyces cerevisiae* sera utilisée.

III.2. /- MANIPULATIONS

III.2.1 / - Préparation de l'inoculum

L'inoculum est préparé en mettant 1 g. de levure de boulangerie dans des tubes à essai contenant 10 ml. de solution de glucose de différentes concentrations. Les tubes sont placés dans des bains-marie thermostatés agités pendant 30 minutes.

III-2-2/ - Matériel de fermentation

Les essais de fermentation sont réalisés en utilisant des systèmes d'erlenmeyers placés dans des bains-marie agités thermostatés .

Le système composé:

- d'un erlenmeyer de 250 ml de volume utile
- d'un bouchon de fermeture doté d'une voie de sortie
- et d'un tube en " S" en pyrex inséré dans la voie de sortie et doté de trois renflements.

Chaque système contient alors « **90ml de substrat de fermentation** », d'une concentration en sucre déterminée et **10ml d'inoculum** de souche de levure. Les renflements de tube en " S" sont remplis de 5ml d'acide sulfurique concentré pour créer les conditions d'anaérobiose.

Ces systèmes sont placés dans des bains à la température retenue pour les essais qui est de **35°C**.

Les essais de fermentations sont réalisés en duplicata, pendant 30 minutes, 1 heure, 1 heure 30 mn et 2 heures. Trois séries d'essais sont effectuées afin d'obtenir des résultats plus fiables.

III-3 / - METHODES ANALYTIQUES

Les analyses sont essentiellement effectuées pour :

- le potentiel d'hydrogène (**pH**)
- la concentration en sucres totaux (**So. ; Sr. ; S..**)
- la concentration en alcool produit (**Po. ; Pt.**).

Ces dosages permettent ensuite la détermination :

- des rendements du produit (**R.Lt. / R.Lp.**)
- de la productivité du microorganisme (**Pr.**) .

III-3-1/ - Le potentiel d'hydrogène (pH)

Il est mesuré au début et à la fin de chaque période de fermentation à l'aide d'un pH-mètre de précision de type E 510.

Ces résultats seront consignés dans des tableaux et analysés.

III-3-2/ - La concentration en sucres totaux**a- Principe**

Le dosage des sucres totaux est réalisé par la **méthode de DUBOIS (1965)** ou méthode au phénol-sulfurique. En effet, en présence de phénol et d'acide sulfurique concentré, les sucres forment des composés phénoliques complexes de coloration jaune dont l'intensité est proportionnelle à la concentration des sucres totaux présents dans le milieu.

Le dosage est réalisé par la « **spectrophotométrie** » à 490 nm. Et, la détermination qualitative se fait à partir d'une courbe d'étalonnage standard.

b- Dosage

Le dosage de sucres totaux des substrats de jus brut de fruit pour les fermentations, est fait sur des solutions diluées 1/10, 1/100, 1/1000 afin de permettre une meilleure lecture des densités optiques au spectrophotomètre à 490 nanomètres par rapport au témoin.

Les différentes densités optiques (DO) obtenues sont ensuite reportées sur la courbe étalon établie selon des concentrations de 0,02 mg/ml ; 0,04 mg/ml ; 0,06 mg/ml ; 0,08 mg/mL ; 0,10 mg/ml.

A la fin de la fermentation , la quantité restante ou résiduelle en sucre (**Sr**) est également dosée et la quantité de sucre consommée est calculée comme suit :

$$\boxed{S = S_0 - S_r} .$$

QUESTIONNAIRE : PRODUCTION D'ETHANOL
A PARTIR DE JUS DE FRUITS TROPICAUX
(Compte - rendu à retirer pour le Professeur)

1/- Quelles sont les pH naturels des milieux qui ont été donnés pour l'expérimentation ?

2/- Quelles sont les variations du pH à 35°C. à la fin de l'expérimentation ?

3/- Quelle est la concentration résiduelle de sucre (**Sr**) après la période de fermentation ?

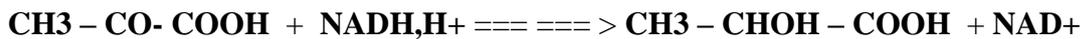
4/- Calculer les valeurs suivantes :

- La Charge microbienne dans l'inoculum
- La Quantité de sucre consommé (**Z**)
- La Production d'éthanol observé
- La Production théorique (**Pt.**)
- La Production pratique (**Pp.**)
- Le Rendement par rapport au Rendement limite théorique (**RLt**)
- Le Rendement par rapport au Rendement limite pratique (**RLp**)
- La Productivité à chaque période de temps de fermentation

FERMENTATION LACTIQUE

La fermentation lactique se résume au niveau biochimique par la transformation du glucose qui conduit à deux (2) molécules de pyruvate par la voie de la glycolyse : voie d'Embden –Meyerhof.

Ces deux molécules d'acide pyruvique vont être réduites en acide lactique par la lactate déshydrogénase, selon la réaction suivante : c'est la fermentation lactique



Les principales « **bactéries lactiques** » sont: les *Lactobacillus*, les *Streptococcus*, les *Pediococcus*, les *Leuconostocs* , les *Lactococcus* et, les *Enterococcus*

Tous le monde sait que les fermentations lactiques nous apportent de nombreux bienfaits.

Les prolongements économiques sont impressionnants : yaourts, fromages, beurre, divers produits ...

Il y a deux raisons à cela : tout d'abord, les bactéries lactiques font partie de la flore intestinale chez les hommes en bonne santé et les formes pathogènes sont rares. Ensuite l'acide lactique formé, le pH acide et les conditions réductrices entravent la croissance des germes concurrents qui sans cela se développeraient dans les aliments fermentés en communiquant un goût repoussant. Un antagonisme supplémentaire est exercé par certains *Lactobacilles* utilisées pour la fabrication des yaourts par l'émission de substances bactériostatiques appelées « **lantibiotiques** ». L'on a en effet par exemple : **l'acidophiline** sécrétée par *Lactobacillus acidophilus* et, la **bulgaricine** produite par *L. bulgaricus* ...

Une telle profusion de lantibiotiques n'est pas sans intérêt sur le plan pratique, car elle permet d'envisager des applications dans la protection des aliments en écartant des espèces indésirables en toute sécurité.

Mais afin de réaliser des fermentations lactiques au laboratoire, trois catégories de lait seront choisies : * lait cru * lait stérilisé demi-écrémé * lait stérilisé UHT

- des dosages des taux de sucres totaux seront effectués au début et à la fin des fermentations
- des essais de fermentation sont réalisés en utilisant des systèmes d'erlenmeyers placés dans des bains-marie agités thermostatés . Chaque système contient alors « **90ml de lait** », d'une concentration en sucre déterminée et **10ml d'inoculum** de souche de *Lactobacillus*.

Les analyses essentiellement effectuées seront : - le potentiel d'hydrogène (**pH**)

- la concentration en sucres totaux (**So. ; Sr. ; S.**) - la concentration en acide lactique produit .

QUESTIONNAIRE : FERMENTATION LACTIQUE
(Compte - rendu à retirer pour le Professeur)

1/- Quelles sont les pH naturels des milieux qui ont été donnés pour l'expérimentation ?

2/- Quelles sont les variations du pH à 35°C. à la fin de l'expérimentation ?

3/- Quelle est la concentration résiduelle de sucre (**S_r**) après la période de fermentation ?

En vous référant à la concentration initiale de sucre (**S_o**) au début de la fermentation, calculer la quantité de sucre consommé

4/- Calculer les quantités d'acide lactique produit en suivant la méthode de dosage acidimétrique

PRODUCTION DE PROTEINE UNICELLULAIRE

I/ - INTRODUCTION

La protéine est une substance importante pour le développement, la construction et la réparation des tissus du corps. Les différentes positions des acides aminés dans la chaîne peptidique donnent à chacune des protéines leurs caractéristiques physico-chimiques et nutritionnelles dans leur utilisation selon les sources tant animales que végétale.

De nos jours, des protéines peuvent être produites par la voie de la biotechnologie en utilisant des micro organismes non pathogènes et naturellement comestibles. Un exemple particulier est la levure de boulangerie.

Des bactéries telles que les *Lactobacillus*, les *Acetobacter*, les algues unicellulaires sont produites pour des utilisations commerciales comme beaucoup d'autres micro organismes.

L'amélioration de la qualité alimentaire sur le plan nutritionnel conduit à la production de protéines unicellulaires pour une alimentation animale tel dans la production de bétail. L'utilisation de ces protéines se situe actuellement au niveau des populations humaines pour enrichir de nombreux aliments pauvres en protéines. Ceci aidera les pays pauvres en quête de source protéique moins onéreuses et riche en acides aminés essentiels.

Cette expérimentation est établie afin de permettre aux étudiants d'acquiescer quelques techniques de base des productions de « Protéines Unicellulaires »

II/ - MATERIEL

II.1./ - Matériel Biologique

A/ - Matériel microbiologique

- Levure de boulangerie (a)
- Lactobacillus (b)

B/ - Milieu de culture

- Milieu brut: Mélasse (1) (10 g/l)
- Résidu de Manioc (2) (10 g/l)

II.2./ - Appareils et équipement de Laboratoire

- Trois Bain - marie : 30°C, 35°C, et 37°C
- Thermomètre
- Centrifugeuse de paillasse
- Tubes à centrifuger graduée
- Balance de précision (0,001)
- Tube en « S »
- Erlenmeyer (200 – 250ml) ...

III/ - EXPERIMENTATION

1. Peser dans chaque erlenmeyer à essai, 100 ml des milieux de Mélasse (1) ou de résidu de Manioc (2)
2. Préparer trois (3) erlenmeyers à essai pour chaque milieu ;
3. Mettre le tube en « S » au dessus de chaque erlenmeyer et fermer hermétiquement ;
4. Mettre dans chaque tube en « S », 5 ml de H₂SO₄ concentré;
5. Mettre tout le système à l'autoclave et stériliser à 120°C pendant 15 mn
6. Laisser tout le système refroidir après stérilisation, à la température de la salle
7. Après refroidissement ensemencer chaque milieu avec une anse de microorganismes sélectionnés
8. **Peser chaque système** respectifs préparé et noter les poids;
9. Mettre successivement les systèmes au bain marie à **30, 35°, et 37°C** respectivement pour **30 mn, 1 heure, 1h 30 et 2 heures** de temps;
10. A la fin de ces périodes de temps, repeser chaque systèmes et noter les nouveaux poids respectifs;
11. Enlever les tubes en «S» des systèmes;
12. De chaque erlenmeyer prélever 3 fois «**10 ml du milieu**» et les mettre dans des tubes à essais gradué;
13. Centrifuger les tubes à centrifuger à 1500 tours/min pendant 5 min;
14. Lisez et noter le volume de chaque résidu issu des différents tubes

IV/ - RESULTATS:

1. Donner le volume de chaque résidu de microorganisme à 30°, 35°et 37°C après 30 mn, 1 H, 1 H 30 et 2 H de temps d'incubation;
2. Tracer des courbes dans chaque cas de figure;
3. Interpréter les résultats.

QUESTIONNAIRE : PRODUCTION D'UNE PROTEINE UNICELLULAIRE

(Compte - rendu à retirer pour le Professeur)

1/ - Donner le volume de chaque résidu de microorganisme à 30°, 35°et 37°C après 30 mn, 1 H, 1 H 30 et 2 H de temps d'incubation;

2/ - Tracer des courbes dans chaque cas de figure;

3/ - Interpréter les résultats.

ASSURANCE QUALITE

***AUCUNE ACTIVITE HUMAINE NE PEUT ETRE TOTALEMENT
DEPOURVUE DE RISQUE, Y COMPRIS
L'ACTION DE BOIRE OU DE MANGER***

MOSSEL, 1972

***UN BON ARBRE NE PEUT PORTER DE MAUVAIS FRUITS,
NI UN MAUVAIS ARBRE DE BONS FRUITS,
VOUS LES RECONNAÎTREZ DONC A LEURS FRUITS***

MATHIEU 7, 18-20



Vendredi 18 Mars 2011

INFORMATION : 4^{ème} ANNEE PHARMACIE

TRAVAUX PRATIQUES

BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE

LES ETUDIANTS INSCRITS EN 4^{ème} ANNEE DE PHARMACIE SONT INFORMES QUE LES TRAVAUX PRATIQUES DE « BIOTECHNOLOGIE ALIMENTAIRE » DE L'ANNEE UNIVERSITAIRE 2010 – 2011 VONT DEMARRER CE « MARDI 22 MARS 2011 » A PARTIR DE 13 HEURES .

CES TRAVAUX PRATIQUES SERONT EFFECTUES AU LABORATOIRE DE « MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE » DU L'UFR BIOSCIENCES (Bâtiment PRO V : 1^{er} Etage)

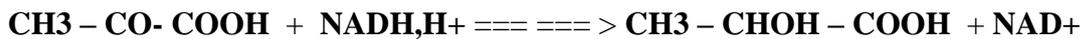
NB : La présence de tous les étudiants inscrits est exigée

Dr KOUAME Désiré

FERMENTATION LACTIQUE

La fermentation lactique se résume au niveau biochimique par la transformation du glucose qui conduit à deux (2) molécules de pyruvate par la voie de la glycolyse : voie d'Embden –Meyerhof.

Ces deux molécules d'acide pyruvique vont être réduites en acide lactique par la lactate déshydrogénase, selon la réaction suivante : c'est la fermentation lactique



Les principales « **bactéries lactiques** » sont : les *Lactobacillus*, les *Streptococcus*, les *Pediococcus*, les *Leuconostocs*, les *Lactococcus* et, les *Enterococcus*

Tous le monde sait que les fermentations lactiques nous apportent de nombreux bienfaits.

Les prolongements économiques sont impressionnants : yaourts, fromages, beurre, divers produits ...

Il y a deux raisons à cela : tout d'abord, les bactéries lactiques font partie de la flore intestinale chez les hommes en bonne santé et les formes pathogènes sont rares. Ensuite l'acide lactique formé, le pH acide et les conditions réductrices entravent la croissance des germes concurrents qui sans cela se développeraient dans les aliments fermentés en communiquant un goût repoussant. Un antagonisme supplémentaire est exercé par certains *Lactobacilles* utilisées pour la fabrication des yaourts par l'émission de substances bactériostatiques appelées « **lantibiotiques** ». L'on a en effet par exemple : **l'acidophile** sécrétée par *Lactobacillus acidophilus* et, la **bulgaricine** produite par *L. bulgaricus* ...

Une telle profusion de lantibiotiques n'est pas sans intérêt sur le plan pratique, car elle permet d'envisager des applications dans la protection des aliments en écartant des espèces indésirables en toute sécurité.

Mais afin de réaliser des fermentations lactiques au laboratoire, trois catégories de lait seront choisies : * lait cru * lait stérilisé demi-écrémé * lait stérilisé UHT

- des dosages des taux de sucres totaux seront effectués au début et à la fin des fermentations
- des essais de fermentation sont réalisés en utilisant des systèmes d'erlenmeyers placés dans des bains-marie agités thermostatés . Chaque système contient alors « **90ml de lait** », d'une concentration en sucre déterminée et **10ml d'inoculum** de souche de *Lactobacillus*.

Les analyses essentiellement effectuées seront : - le potentiel d'hydrogène (**pH**)

- la concentration en sucres totaux (**So. ; Sr. ; S..**) - la concentration en acide lactique produit .

