

DS n°2

Dénombrements – Germes indices de contaminations fécale - colimétrie

1. Dénombrement en milieu solide

On souhaite préparer 100 ml d'une suspension S de levures pour des tests ultérieurs : la norme impose une suspension calibrée à 5.10³ levures par mL. Le nombre de cellules dans la culture initiale est de l'ordre de 2.10⁷ levures par mL.

Le dénombrement de la suspension S est réalisé par étalement en surface de 0.1mL de suspension S et des ses dilutions sur une gélose Sabouraud. Voici les résultats :

Dilution de S	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²
Nombre de colonies	>150	68	4
	>150	49	5

1. Expliquer une façon de préparer la suspension S
2. Quel est le nombre de levures dénombrées dans la suspension S ? (utiliser la fiche technique 2). Est-ils satisfaisant ?

2. Dénombrement par la méthode du NPP

On réalise un dénombrement après culture en milieu liquide des conformes dans une viande hachée (NF ISO 4831 indice de classement V 08-016 de juillet 1991) Le milieu utilisé est un bouillon nommé milieu MLL (tryptose + lauryl sulfate + lactose) : double et simple concentration, avec cloche de Durham. La suspension mère (SM) est réalisée par broyage de 10g de viande hachée dans 90 mL de diluant tryptone sel. Les ensemencements suivants sont réalisés :

	Milieu double concentration	Milieu simple concentration				
Dilution	Suspension mère Sm	Sm	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵
inoculé(mL)	10	1	1	1	1	1
Nombre de tubes	3	3	3	3	3	3
Résultats positifs	3	2	1	0	0	0

Les tubes sont incubés 24h à 30°C

1. Comment définir « pratiquement » un coliforme à l'aide de ce protocole ? qu'est ce qu'un tube « positif », qu'est ce qu'un tube négatif ?
2. Comment pourrait-on vérifier la présence du coliforme E. coli dans chaque tube?
3. Calculer la concentration en conformes par gramme de quenelles (utiliser la méthode du NPP). [*fiche technique n°3*]
4. Quelle est la limite de détectabilité de cette méthode ?
5. Quelle signification peut-on donner à la présence de coliformes dans la viande hachée ? La présence d'*E.coli* apporte t-elle des informations supplémentaires ? L'origine des coliforme dans la viande hachée peut-elle être endogène ? exogène ? Justifier la réponse.

3. Dénombrement des spores d'anaérobies sulfitoréducteurs dans une eau

Voici le protocole retenu:

A - Régénérer 4 tubes de milieu Viande Foie Glucosée, ajouter dans chacun 1,5mL de sulfite de sodium 5% et 0,5 mL d'alun de fer 5%.

B - Placer 5 mL d'eau à analyser dans 4 tubes stériles et les porter à 80°C pendant 10 minutes.

C - Verser le milieu dans chaque tube d'eau chauffée. Mélanger sans faire de bulles et solidifier sous l'eau froide.

D - Incuber 24 à 48 heures à 37°C.

On dénombre alors les colonies noires dans les quatre tubes: respectivement 7; 5; 4; 12 colonies.

1. Expliquer l'intérêt de chaque étape A, B, C et D du protocole.
2. Donner le résultat du dénombrement pour 20 mL d'eau ; quelle signification peut-on donner à la présence de ces spores ?

4. Questions de cours 1ère année

1. Une bactérie pathogène présente un pouvoir toxique et/ou un pouvoir invasif. Expliquer ce que représente le « pouvoir invasif » ; préciser les facteurs qui conditionnent un pouvoir invasif chez une bactérie.
2. Qu'est ce qu'une endotoxine bactérienne ? (donner ses principales caractéristiques)