

TP 1 Colimétrie en milieu solide et en milieu liquide (méthode du NPP)

Application à la colimétrie du lait

La colimétrie désigne le dénombrement des coliformes dans un produit suivi (ou non) de leur identification.

1. But du TP

- réaliser un dénombrement en milieu solide et interpréter les résultats en utilisant la norme AFNOR de 1996
- réaliser un dénombrement en milieu liquide et interpréter les résultats par la méthode statistique du NPP
- Connaître les milieux utilisés en colimétrie
- Identifier un coliforme « présumé ».

2. Manipulations

Dénombrement des coliformes sur 3 échantillons de lait :

- Un lait cru (1x) : LC
- Un lait pasteurisé (1x) : LP
- Un lait UHT, donc stérile au départ, maisensemencé volontairement modifié (2x) : LAA

Identification d'un coliforme

2. 1. Préparation du lait pasteurisé « modifié »

Introduire stérilement dans 100mL de lait UHT un volume (considéré négligeable) de suspension de E. coli de 18h, éventuellement diluée.

La concentration finale en cellules de E. coli dans le lait doit être de environ $10^3 \cdot \text{mL}^{-1}$.

Analyses effectuées

	LC	LP	LM
Coliforme milieu solide	$10^{-1}; 10^{-2}; 10^{-3}$	$10^0; 10^{-1}; 10^{-2}$	$10^0; 10^{-1}; 10^{-2}$
Coliforme milieu liquide	$10^{-3}; 10^{-4}; 10^{-5}$	$10^0; 10^{-1}; 10^{-2}$	$10^{-2}; 10^{-3}; 10^{-4}$

2.2. Protocole du dénombrement des coliformes dans le lait

On suivra les directives de la norme FIL 73A :1985 (Fédération Internationale de Laiterie), identiques à celles de la norme ISO 5541/1-1986, dont voici les extraites essentiels :

Prélèvement de l'échantillon

...Agiter vigoureusement l'échantillon pour essai, afin de s'assurer d'une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes, en inversant rapidement 25 fois le récipient contenant l'échantillon. L'intervalle entre le mélange et le prélèvement de doit pas dépasser 3 minutes...

Dilutions...effectuer les dilutions décimales en tryptone sel (pour 1L peptone: 1g; NaCl: 8,5g) ,ou solution de Ringer diluée au 1/4, en tampon phosphate...) ou en eau physiologique.

Milieux de culture préconisés et ensemencement :

- dénombrement en milieu solide : gélose VRBL au violet, au rouge neutre, à la bile et au lactose, considéré en pratique comme équivalent
- à la gélose DCL à $1\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (désoxycholate lactose): une boîte par dilution: 1mL incorporé dans

12mL de milieu + surcouche de 4mL

- dénombrement en milieu liquide : bouillon BLBVB + cloche par la méthode du NPP, 3 tubes par dilution testée. Introduire 1mL d'inoculum par tube de BLBVB.

Comptage: retenir les boîtes qui contiennent entre 10 et 150 colonies ; ne compter que les colonies rouges foncées d'au moins 0,5 mm de diamètre, caractéristiques des coliformes...

Compte rendu

- 1) *Justifier l'aspect des coliformes sur la gélose utilisée et l'aspect d'un BLBVB positif.*
- 2) *Présenter tous les résultats bruts sous forme d'un tableau*
- 3) *Exploiter ces résultats pour les trois types de lait en donnant le résultat par mL de lait pour la colimétrie en milieu solide et celui pour la colimétrie en milieu liquide. Comparer aux normes fournies. On assimilera le lait modifié à un lait cru destiné à la consommation.*

2.3. Identification d'un coliforme présumé

L'isolement fourni sur gélose EMB a été réalisé à partir d'une colonie suspecte d'être un coliforme sur gélose VRBL.

Réaliser une suspension de la souche et ensemercer une galerie enjube_ permettant l'identification du coliforme présumé.

Compte rendu:

- 4) *Décrire l'aspect des colonies sur EMB.*
- 5) *Lecture des milieux et identification du coliforme*
- 6) *On suppose que 5 colonies sur les 47 colonies suspectes présentes ont été ainsi testées et identifiées : elles ont toutes conduit au même résultat. Que peut-on conclure quant au dénombrement ? Utiliser pour le calcul la norme ISO 7218.*

ANNEXE

Lait à la vente :

Le lait cru livré en l'état et destiné à la consommation humaine doit satisfaire aux critères suivants (arrêté du 6 août 1985) :

- absence de micro-organismes pathogènes et de toxines,
- absence de Salmonella dans 1 litre,
- absence de streptocoques β -hémolytiques dans 0,1 mL,
- cellules somatiques $< 4 \cdot 10^5$ /mL,
- flore aérobie mésophile $< 9 \cdot 10^4$ (jour de conditionnement ou de production) et $< 3 \cdot 10^5$ (DLC),
- coliformes $< 10^2$ (jour de conditionnement ou de production) et $< 10^3$ (DLC),
- épreuve de l'ébullition négative (DLC),
- acidité comprise entre 1,4 et 1,8g d'acide lactique/L (14 à 18° Dornic) (DLC),
- absence de résidus antimicrobiens.

Les critères microbiologiques donnés par l'arrêté 30 mars 1994 sont les suivants et modifient ou complètent les précédents (lait lors de leur mise sur le marché) :

- absence de Salmonella dans 25 g (plan à 2 classes : n = 5, c = 0),
- absence de streptocoques β -hémolytiques (groupes A, B, C, G et L de Lancefield) dans 0,1 mL (plan à 2 classes : n = 5, c = 0),
- absence d'autres germes pathogènes et de toxines,
- *Staphylococcus aureus* $< 10^2$ /mL (plan à classes: n=5, c=2, m= 10^2 , M= $5 \cdot 10^2$),
- coliformes (à 30°C) $< 10^2$ /mL (plan à 3 classes n = 5, c = 2, m = 10^2 , M = 10^3),
- flore aérobie mésophile «globale» (FAMT) à 30°C $< 5 \cdot 10^4$ (moyenne géométrique constatée sur une période de 2 mois avec au moins 2 prélèvements par mois, si nécessaire l'aptitude à la conservation peut être estimée après incubation à 55°C).

Lait pasteurisé :

Le lait pasteurisé conditionné doit satisfaire aux critères suivants (arrêté du 21 juin 1982 modifié par les arrêtés des 3 janvier 1985 et 30 décembre 1988) :

- épreuve de la phosphatase négative,
- épreuve de l'ébullition négative (à la DLC),
- acidité comprise entre 1,4 et 1,8 g/L d'acide lactique (14 à 18° Dornic) (à la DLC),
- absence de Salmonella dans 250 mL,
- absence d'autres micro-organismes pathogènes et de toxines.
- flore aérobie mésophile $< 3 \cdot 10^4$ de j à j + 4,
- coliformes < 10 /mL de j à j + 4 et $< 10^2$ /mL (à la DLC),
- coliformes thermotolérants (« fécaux ») < 1 /mL

Les critères microbiologiques donnés par l'arrêté du 30 mars 1994 sont les suivants et modifient ou complètent les précédents (laits lors de leur mise sur le marché) :

- absence de Salmonella et de Listeria monocytogenes dans 25 g (plan à 2 classes : n = 5, c = 0).
- absence d'autres germes pathogènes et de toxines,
- absence de coliformes (à 30°C) dans 1 mL (plan à 3 classes : n = 5, c = 1, m = 0, M = 5).
- flore «globale» (FAMT à 21°C après incubation 5 jours à 6°C) $< 5 \cdot 10^4$ /mL (plan à 3 classes : n= 5, c= 1, m= $5 \cdot 10^4$, M= $5 \cdot 10^5$).

En milieu industriel, on considère pour le lait pasteurisé destiné à être transformé, les standards suivants :

- flore aérobie $< 10^4$ germes/mL,
- absence d'indologènes et de putrides dans 1 mL,
- absence de coliformes dans 1 mL.
- absence de Clostridium sulfito-réducteurs dans 50 mL.