

Méthode d'analyse microbiologique

Les méthodes traditionnelles d'identification

1- La coloration de Gram

Elle repose sur des différences de comportement des structures de la paroi des bactéries à une suite de coloration et décoloration.

La première étape après réalisation d'un frottis bactérien est la coloration des cellules par une solution de violet gentiane (Le colorant entre dans les cellules)

Le colorant en excès est éliminé par rinçage à l'eau (distillée ou du robinet) et le frottis recouvert par du lugol afin de fixer la coloration.

Le lugol en excès est éliminé par un lavage à l'eau et le frottis placé dans de l'alcool. L'alcool peut traverser les membranes et le colorant ressort de la bactérie, la laissant incolore après cette étape s'il y a une absence de l'acide téichoïque.

Après élimination de l'alcool par lavage à l'eau, les bactéries subissent une deuxième étape de coloration par la fuschine. Après cette étape les bactéries à Gram- sont roses, les bactéries à Gram+ sont intensément colorées en violet foncé.

En général la lecture de la coloration de Gram dite coloration différentielle renseigne sur la composition de paroi (différentiation entre les bactéries selon la composition de la paroi en G+ et G-), sur la forme des bactéries (coque, bacille, cocobacille ... etc), ainsi que le mode d'association (isolée, diplocoque, chaînette : *Streptococcus*, tétrade : *Sarcina*, *Pediococcus* , amas : *Staphylococcus*), après une observation microscopique à l'objectif 100 avec l'huile à immersion.

2- La mobilité

A l'observation au microscope

La culture doit-être jeune car souvent les bactéries perdent les flagelles quand la culture est un peu vieille. Il ne faut pas agiter la culture avant de faire le prélèvement, en effet les flagelles sont des structures fragiles qui sont facilement cassées par la turbulence du liquide.

Pour un bon résultat on peut préférer une culture en milieu gélosé sur un tube incliné et relever délicatement le liquide qui se condense à l'intersection entre les parois du tube et la pente du milieu.

La suspension bactérienne est déposée entre lame et lamelle et observée telle qu'elle. Les bactéries sont considérées comme mobiles si elles traversent le champ du microscope.

Au culture

Milieu mannitol mobilité, c'est un milieu gélosé pour permettre le mouvement des bactéries. Il est inoculé par piqûre centrale et mis à incuber 18 à 24 heures, lorsque les bactéries sont

mobiles, elles diffusent dans le milieu et forment un halo autour de la piqûre, et lorsque sont immobiles, la croissance sera au niveau de la piqûre seulement.

3- Les spores

La recherche des spores est alors effectuée après 2, 4 jours ou plus de culture.

L'épuisement du milieu de culture est un facteur déclenchant de la sporulation, parfois une simple coloration de Gram suffit à détecter la présence des spores.

On peut vérifier leur morphologie par une coloration spécifique des spores, avec vert de malachite à chaud et de la safranine comme contre-colorant.

Les corps végétatifs sont colorés en rose et les spores en vert. Les spores peuvent être centrales ou sub-terminales ou terminales, déformantes ou non.

On peut également utiliser un test de détection si les spores sont rares et difficilement observables. Après inoculation d'un milieu de culture on porte le milieu au bain-marie bouillant pendant 10 minutes. Le milieu est ensuite refroidi rapidement et mis à incuber. Si des spores sont présentes, elles résistent au traitement thermique et une culture se développera dans le tube.

4- La température

De manière générale les bactéries se développent entre 5 et 60°C (psychrotrophe, psychrophile, mésophile, thermophile, et hyperthermophile)

5- Comportement vis à vis de l'oxygène.

Un milieu gélosé VF (viande foie) est réparti dans des tubes fins et hauts : 8 mm de diamètre pour 7 cm de hauteur de milieu. Les tubes sont inoculés à la pipette Pasteur.

Après culture on observe un développement en surface seulement pour une bactérie aérobie stricte ; dans tout le milieu pour une bactérie aérobie-anaérobie facultative, seulement dans le fond du tube pour une bactérie anaérobie.

Certaines bactéries dites microaérophiles se développeront dans une zone située en dessous de la surface de milieu.

6- Le type métabolique

Milieu peptoné, ajusté à pH 7,1 ; additionné d'un indicateur coloré, le bleu de bromothymol et de glucose à 1% en final. Le milieu est inoculé par piqûre centrale.

Trois tubes sont prévus dont l'un ne contient pas de sucre, il servira de témoin ne devra jamais montrer d'acidification. L'un des deux autres tubes sera recouvert de vaseline ou huile de paraffine stérile pour éviter le contact avec l'oxygène, trois types de réponses sont attendus :

Les bactéries sont fermentatives : les deux tubes contenant du sucre deviennent jaunes, il peut y avoir de plus production de gaz, ce qui soulève le bouchon de vaseline.

Les bactéries sont oxydatives : elles ne se développent qu'en surface du tube dit « ouvert » et le métabolisme oxydatif produisant peu d'acides, seule la surface du milieu va virer au jaune vert. Le tube fermé ne change pas de couleur. Il n'y a jamais production de gaz.

Bactéries inertes : certaines *Pseudomonas* ou *Alcaligenes*, ne produisent pas d'acide du tout et le pH du milieu ne changera pas de couleur.

7- Les sources de carbone

Les sucres

Une eau peptonée, dont le pH est 7,6 et qui contient un indicateur coloré, du bleu de bromothymol, et le sucre (0,5 à 1%) dont on veut connaître l'utilisation.

Le milieu est réparti dans des tubes contenant une cloche en verre à l'envers, si la bactérie utilise le sucre par voie fermentaire, des acides et du CO₂ seront produits et l'indicateur coloré change de couleur. Les sucres dont on recherche le plus souvent sont : galactose, arabinose, xylose, lactose, maltose, saccharose, cellobiose, mannitol, inositol, sorbitol, dextrines et amidon.

8- Les sources d'azote

Les protéines

Un milieu nutritif gélosé additionné de lait, inoculé par une strie unique, après culture 3 à 4 jours, l'hydrolyse de la caséine du lait se lit par un éclaircissement du milieu aux abords de la culture.

Les méthodes d'identification rapides

De conception plus récente, elles permettent de détecter la bactérie recherchée dans un bouillon de pré-enrichissement, parfois dans une préparation de l'aliment. Elles font appel à l'immunologie ou à la biologie moléculaire.

La méthode ELISA de type sandwich

Des anticorps hautement purifiés, spécifiques de la bactérie recherchée, sont adsorbés sur les puits d'une plaque pour microtitration.

Les échantillons à analyser sont répartis dans ces puits. Dans le cas d'une réaction positive, la bactérie recherchée s'associe aux anticorps et reste ainsi, après lavage, fixée à la surface du puits. La révélation est réalisée par addition des mêmes anticorps marqués avec une enzyme (technique sandwich), puis, après lavage, par addition du substrat de l'enzyme.

Dans le cas d'un résultat positif, la réaction entre l'enzyme fixée et son substrat libère des produits colorés. L'interprétation du test fait appel à des témoins positif et négatif.

L'immunoséparation magnétique et l'IMS-ELISA

Cette technique consiste en une immunocapture des bactéries recherchées par des billes de polystyrène magnétiques sur lesquelles sont adsorbés les anticorps spécifiques. Les billes sont ensuite récupérées et rassemblées sur une plaque aimantée, puis lavées et concentrées.

Utilisation de sondes nucléiques

Des fragments d'ADN ou d'ARN simple brin, d'origine microbienne, sont capables de s'hybrider avec des fragments complémentaires, les sondes, pour former des duplex stables. La mise en évidence de l'hybridation entre la sonde et l'acide nucléique cible est effectuée par détection directe ou par détection indirecte de l'hybride nucléique.

Utilisation de l'amplification génique (amplification en chaîne par polymérase (PCA) ou polymerase chain reaction (PCR))

La PCR consiste à amplifier spécifiquement une séquence d'ADN double brin par l'action cyclique d'une ADN polymérase thermostable. L'initiation de la synthèse d'ADN est réalisée par une enzyme au niveau de courtes séquences oligonucléotidiques (amorces), ajoutées au milieu réactionnel, spécifiques de la séquence d'ADN que l'on souhaite amplifier. La PCR consiste ensuite en l'enchaînement cyclique de trois processus :

- la dénaturation de l'ADN : le mélange est placé à une température comprise entre 90 et 100 °C pendant une à deux minutes. Elle permet la séparation des deux brins d'ADN ;
- l'hybridation des amorces : la température est ramenée à 50-60 °C pendant une à deux minutes
- l'extension des amorces par une ADN polymérase thermostable, le plus souvent la Taq polymérase extraite de *Thermus aquaticus*. Le milieu réactionnel est placé alors à une température de 72 °C, valeur optimale d'activité de l'enzyme. L'ensemble des opérations est réalisé dans un appareil automatique : le thermocycleur.

Le contrôle microbiologique des produits alimentaires

Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale

1 ml de la suspension mère et de ses dilutions estensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération. Il est recommandé de ne pas attendre plus de 15 minutes entre la préparation de la suspension mère et ses dilutions et le moment où la gélose est coulée. Cette numération peut être réalisée par étalement en surface au moyen d'un râteau, de 100 µl du produit et de ses dilutions ; l'étalement au moyen du râteau doit être effectué immédiatement avant que ces 100 µl ne soient absorbés en totalité dans la gélose. La lecture se fait après 72 heures d'incubation à 30°C.

Dénombrement des coliformes

La colimétrie : la numération des coliformes, peut être réalisée soit en milieu liquide, soit en milieu solide (par ensemencement dans la gélose ou après filtration). Le test de différenciation entre les coliformes totaux et les coliformes fécaux est le test de Mac Conkey qui repose sur l'incubation des milieux à deux températures (30 et 44,5°C).

Dénombrement en milieu liquide

La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1 ml de l'aliment (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon lactosé bilé au vert brillant (BLBVB) avec cloche de Durham pour piéger la formation éventuelle de gaz.

Les essais sont effectués en double ou en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady.

Le vert brillant inhibe les Gram+, et la bile, par son fort pouvoir tensioactif lié à la présence de sels biliaires, inhibe la plupart des germes qui ne sont pas d'origine intestinale.

Après ensemencement, les milieux sont incubés à 30°C pendant 24 h-48 h.

Sont considérés comme positifs les tubes dans lesquels il y a une croissance et une production de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche). La numération des coliformes fécaux est effectuée avec le même milieu mais après 48 heures d'incubation à 44,5°C.

Milieu BCP : bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (colimétrie de l'eau)

Répartir à raison de 10 ml par tube avec cloche de Durham.

10 ml de bouillon à double concentration + 10 ml d'eau à analyser ou les dilutions

10 ml bouillon à simple concentration + 1 ml d'eau à analyser ou les dilutions

L'incubation est de 48 heures à 30°C. Le lactose est l'agent sélectif.

Le milieu BCPL est employé pour la recherche et le dénombrement de coliformes. Ces derniers, en fermentant le lactose, provoquent le virage de l'indicateur colorée et la production de gaz dans la cloche. En effet la fermentation du lactose se manifeste par la production de l'acide qui provoque le virage du bromocrésol pourpre au jaune.

Test de Mac KENZIE : une öse d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée ; si après incubation à 44°C pendant 48h il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs) on peut soupçonner la présence d'*E. coli*.

Dénombrement en milieu solide

La numération des coliformes peut être effectuée par ensemencement de 1 ml de produit (ou de la suspension mère) et de ses dilutions dans le milieu gélosé bilié au cristal violet et au rouge neutre (VRBL) ou en milieu gélosé désoxycholate - citrate - lactose (DCL).

Milieu VRBL

C'est un milieu spécifique des coliformes. En effet le cristal violet inhibe la croissance des Gram + : ce qui rend le milieu sélectif à des Gram -. L'indicateur coloré Rouge neutre permet de différencier les coliformes lactose + (coloration rouge foncé) des autres entérobactéries lactose - (coloration jaune).

Le lactose apportant une source de carbone et les peptones apportant la source azotée. Les sels biliaires et les extraits de levures apportent les facteurs de croissances nécessaires aux coliformes fécaux. Seule la température d'incubation permet de sélectionner les coliformes uniquement thermotolérants des coliformes totaux.

Colimétrie par filtration

Il est possible de réaliser la colimétrie par la méthode de numération après filtration.

Gélose lactosée au tergitol 7 et au TTC

Déposer la membrane sur la gélose et incuber 24 h à 37°C (coliformes totaux) ou 24 h à 44°C (Coliformes fécaux). Colonies violettes : réduisent le TTC (chlorure de 2,3,5, triphényltétrazolium). Colonies jaunes: non réductrices. Ce milieu permet la recherche et le dénombrement des coliformes, il est plus particulièrement utilisé pour la colimétrie des eaux, par la méthode des membranes filtrantes.

Identification d'*Escherichia coli*

Une à deux öses du milieu BLBVB ou BCPL sont inoculées sur un milieu EMB (gélose lactose éosine bleu de méthylène) coulé dans une boîte de Pétri. Après 24 h d'incubation à 37°C, la ou les colonies lactose + sont identifiées par la méthode classique (IMViC).

Les colorants contenus dans le milieu (bleu de méthylène et éosine jaunâtre) inhibent la majeure de la flore Gram-positive ; bien que les entérobactéries lactose-négative puissent s'y développer, la culture des entérobactéries lactose-positives y est nettement favorisée, le repérage et la différenciation de leurs colonies y sont facilités.

En effet les colonies de bactéries lactose-positives sont violettes foncés. Les colonies de bactéries lactose- négative sont des colonies grisâtres.

Test IMViC (Indode/ Méthyle rouge/ Voges Proskauer/ inositol/ Citrate)

Le test IMViC va nous permettre de confirmer la présence d'*Escherichia coli*.

Recherche de l'indole : Après incubation pendant 24h à 37°C d'une suspension bactérienne dans un milieu Urée Indole, 0.5 mL de réactif de Kovacs sont ajoutés.

L'apparition d'une couleur rouge témoigne de la production d'indole.

Rouge de méthyle et Voges Proskauer : Un milieu Clark et Lubs estensemencé. Après incubation pendant 24h à 37°C, on ajoute une goutte de rouge de méthyle dans la suspension bactérienne transféré dans un tube à hémolyse, la formation d'une couleur rouge montrant une

acidification. Dans un autre tube à hémolyse, on ajoute 0,1mL d'alpha naphthol et 0,1mL d'hydroxyde de potassium. La formation d'une teinte rose montre une réaction positive.

Recherche de l'utilisation du citrate : Une gélose inclinée de citrate de Simmons est ensemencée en surface puis incubé pendant 24h à 37°C. Ce milieu constitué de Bleu de Bromotymol (indicateur de pH) et de citrate permet de montrer l'utilisation du citrate dans le métabolisme bactérien comme seule source de carbone.

Une acidification du milieu entraînera une teinte jaune témoignant de la dégradation du citrate par la bactérie.

Numération des streptocoques fécaux

Numération en milieu liquide

Test présomptif

Ce test est effectué par ensemencement d'un milieu de Rothe. Ce milieu contient de l'azide de sodium qui inhibe la plupart des microorganismes. Ce milieu est peu favorable à la croissance des Streptocoques fécaux et la plupart des autres bactéries n'y cultivent pas. Le milieu de Rothe est cependant moins sélectif que le milieu de Litsky, ce qui le fait utiliser d'abord, les germes adaptés à l'effet inhibiteur de l'azide étant ensuite à même de s'adapter à la présence d'éthyl violet. 1 ml de la suspension mère (et de ses dilutions) est ensemencé dans 10 ml de milieu. Après 24 h ou 48 h d'incubation à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un trouble bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

Test confirmatif

Le milieu de LITSKY utilisé est en fait de milieu de Rothe additionné de 0,5 mg d'éthyl violet par litre. Ce milieu est ensemencé à partir d'une öse prélevée dans les milieux de Rothe positifs. Après 24 h d'incubation ou 48 h à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un trouble bactérien avec parfois formation d'un culot violet.

Numération en milieu solide

Cette méthode n'est utilisable qu'en présence d'un grand nombre de streptocoques fécaux (méthode par filtration). Milieu de Slanetz et Bartley, Après inoculation, incubé pendant 24 h ou 48 h à 37°C. Les streptocoques fécaux donnent sur ce milieu des petites colonies rouges ou marron.

Ce milieu contient de l'azide de sodium, agent sélectif, et du chlorure de triphényltétrazolium dont la réduction se traduit par une coloration rouge des colonies.

Recherche de spores de *Clostridium* sulfito-réducteur

Pour les spores il faut chauffer préalablement la suspension mère 10 minute à 80°C. Cette étape de chauffage permet de préparer les spores à la germination. On appelle cette étape l'activation.

Milieu viande foie (VF) au sulfite de sodium

Certains *Clostridium* forment de l'hydrogène sulfuré au cours de leur métabolisme. L'apport de soufre se fait grâce au sulfite de sodium qui joue aussi le rôle d'inhibiteur vis-à-vis de certains *Clostridium* non sulfito-réducteurs.

L'H₂S ainsi obtenu, va réagir avec les sels de fer provenant de l'alun, pour former du sulfure de fer qui précipite, entourant les colonies d'un halo noir. Comme les colonies sont de petites tailles par rapport au halo, cela donne l'impression que les colonies sont noires.

Numération des levures et moisissures

Milieu gélosé à la pomme de terre (PDA) ou milieu gélosé glucosé à l'oxytétracycline (OGA) : Ensemencer en surface par étalement à partir de 100 µl de produit ou de ses dilutions et incuber 3 à 5 jours à 20-25°C.

Recherche et numération de *Staphylococcus aureus*

Enrichissement

La recherche des staphylocoques nécessite parfois un enrichissement préalable sur des milieux liquides tels que le milieu de Zebovitz. Le milieu de Chapman liquide peut aussi être utilisé pour l'enrichissement des staphylocoques.

Numération sur milieu de Chapman

Le milieu est ensemencé en surface par 0,1 ml du produit ou des dilutions. La boîte est incubée pendant 24 h à 37°C. Les colonies de *Staphylococcus aureus* sont rondes, régulières, bombées, opaques et pigmentées en jaune-doré; elles sont entourées d'un halo jaune correspondant à une acidification à partir du mannitol (mannitol +).

Numération sur milieu de Baird Parker (BP)

C'est un milieu sélectif des *Staphylococcus* à coagulase positive et en particulier de *Staphylococcus aureus*. Le milieu est constitué de : Glycocolle et pyruvate de sodium : pour accélérer la croissance.

Tellurite de potassium : le milieu Baird Parker met en évidence les colonies noires de *Staphylococcus aureus* de par la réduction de la tellurite en tellure (Fe³⁺ en Fe²⁺).

Jaune d'oeuf : les colonies de *S. aureus* sont entourées d'un halo de précipitation témoignant de la dégradation de la lécithine du jaune d'oeuf par la lécithinase. Sulfaméthazine : inhibe la croissance de *Proteus*.

Confirmation

Test de coagulase : Après avoir incubé une colonie dans un bouillon coeur cervelle (utilisé pour revivifier les bactéries), 0.1mL de la suspension obtenue est incubée dans du plasma. Si la bactérie a développé une coagulase dans le bouillon coeur cervelle celle-ci va transformer le fibrinogène en fibrine et ainsi former un caillot dans le culot du tube.

Test d'ADNase

Test réalisé en milieu contenant l'ADN et bleu de toluidine. Remplir de bouillon un puits de 4 mm de diamètre environ, préalablement creuse dans la gélose. Incuber pendant 4 h minimum à 37°C. Réaliser en parallèle un puits témoin négatif rempli de bouillon stérile. L'apparition d'une teinte rose autour d'un puits révèle la libération des polynucléotides résultant de l'hydrolyse de l'ADN du milieu.

Recherche de *Salmonella*

La mise en évidence des *Salmonella* nécessite plusieurs phases: un pré-enrichissement puis un enrichissement sélectif et un isolement sélectif.

Pré-enrichissement : 25 g d'aliment sont broyés dans 225 ml de milieu eau peptonée tamponnée pendant 2 minutes. L'incubation est réalisée pendant 16 h au moins et 24 h au plus à 37°C.

Enrichissement

10 ml de milieu de pré-enrichissement sont ajoutés à 100 ml de bouillon au sélénite et à la cystine.

Isolement

A partir d'une öse ou d'une goutte d'un des milieux d'enrichissement on réalise un isolement sur milieu SS (*Salmonella Shigella*). Après 48 h d'incubation à 37°C, les colonies se présentent sous les aspects suivants: colonies incolores lactose- (*Salmonella, Shigella*) ou colonies à centre orangé (*Proteus*)

Recherche de *Listeria monocytogenes*

Milieux d'enrichissement : formule de Fraser

Les agents sélectifs sont représentés par l'acide nalidixique, l'acriflavine et le chlorure de lithium. Les cultures obtenues sur les milieux d'enrichissement sont ensuite inoculées sur des milieux sélectifs gélosés.

Milieux d'isolement sélectif

Milieu Oxford

Les *Listeria* forment en 24h des colonies grises ou gris verdâtre, luisantes, d'environ 1 mm de diamètre, entourées d'un halo brun-noir. Après 48 heures d'incubation, elles ont 2 mm de diamètre, sont incrustées dans la gélose.

Milieu Palcam

Les colonies de *Listeria* ont un aspect voisin de celui observé sur gélose Oxford, mais sont de couleur verdâtre.

Examen des colonies sur milieu Tsaye (tryptone soya agar yeast extract)

Les colonies de *Listeria* mesurent environ 1 mm de diamètre, elles sont translucides, non pigmentées. Soumises à un éclairage oblique par-dessous (45°, illumination de Henry) et examinées par-dessus, les colonies de *Listeria* sont de couleur bleue et présentent une surface granuleuse.

Recherche de la catalase

Recherche de la mobilité

Coloration de Gram

Camp-test

Ensemencer chacune des deux cultures de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* en une strie simple sur la gélose trypticase-soja au sang de mouton, de manière à ce que les deux stries soient parallèles et diamétralement opposées et ensemer la souche d'essai de sorte que la souche d'essai et celles de *Staphylococcus aureus* et *Rhodococcus equi* ne se touchent pas, mais ne soient séparées que de 1 à 2 mm. Plusieurs souches peuvent être testées sur la même boîte, et incuber à 37 °C pendant 18 à 24 h. La réaction est considérée comme positive si l'on observe une augmentation de la zone de β -hémolyse à l'intersection de chacune des souches d'essai et de celles des cultures de *Staphylococcus aureus* ou *Rhodococcus equi*. *Listeria monocytogenes* ne donne un Camp-test positif qu'avec *Staphylococcus aureus*.