

Procédure de contrôle bactériologique d'un produit.

Il s'agit de dénombrer la flore aérobie totale (ensemble de tous les micro-organismes présents) et les coliformes (Entérobactéries). Cette flore est un indicateur sanitaire qui permet d'évaluer le nombre de contaminants d'un produit testé.

Un produit fabriqué est jugé non-conforme si le nombre de contaminants dépasse la limite fixée par les normes.

1- Produits testés par ce contrôle :

Tous les produits peuvent être testés par cette technique, seules changent les normes auxquelles les résultats seront comparés.

Trois dénombrements sont effectués :

- Flore aérobie totale sur milieu PCA à 30°C,
- Coliformes totaux sur milieu Désoxycholate à 30°C,
- Coliformes thermo-tolérants (coliformes fécaux) à 44°C.

2- Protocole du contrôle bactériologique d'un produit.**2-1 : Matériel nécessaire à la réalisation du contrôle :**

- Un poste de sécurité microbiologique (PSM) équipé (portoir, bac à eau de Javel, petit matériel),
- Balance sous PSM ou en zone stérile,
- Un agitateur type Vortex sous PSM ou en zone stérile.
- 3 tubes d'eau physiologique 9,0 mL,
- 12 boîtes de Pétri vides,
- 150 mL de milieu PCA en surfusion,
- 300 mL de milieu Désoxycholate (DC) en surfusion,
- 4 pipettes de 1 mL stériles,
- Une poire d'aspiration,
- Le produit à analyser.
- Spatule propre et désinfectée (si le produit à analyser est un solide pâteux) ou pipette de 5 mL stérile (si le produit à analyser est un liquide),
- petite quantité de produit à tester.

2-2 : Mode opératoire :

Toutes les opérations se font sous le PSM, ou en zone stérile.

2-2-1 : Réalisation de la gamme de dilution.

- Marquer les 3 tubes de 9,0 mL d'eau physiologique stérile: 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} .
- Prélever exactement 1,0 g de produit à tester à l'aide d'une spatule, et l'introduire dans le tube 10^{-1} ,
- Agiter vigoureusement au Vortex, on réalise ainsi la dilution au $1/10^{\text{ème}}$,
- A l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, prélever 1,0 mL du tube 10^{-1} , l'introduire dans le tube 10^{-2} .
- Agiter vigoureusement au Vortex, on réalise ainsi la dilution au $1/100^{\text{ème}}$,
- A l'aide d'une pipette stérile de 1 mL, prélever 1,0 mL du tube 10^{-2} , l'introduire dans le tube 10^{-3} .
- Agiter vigoureusement au Vortex, on réalise ainsi la dilution au $1/1000^{\text{ème}}$,
- Mettre le tube 10^{-1} (dilution au $1/10^{\text{ème}}$) de côté, il ne sera pasensemencé.

2-2-2 : Ensemencement des milieux :

- Marquer toutes les boites avec le N° de lot du produit testé, la date et votre code opérateur,
- Numéroté les boites de 1 à 12.
- Prendre 2 pipettes de 1 mL stérile (une pour la dilution 10^{-2} , et l'autre pour la dilution 10^{-3}).
- Réaliser le protocole illustré dans le tableau ci-dessous :

Boite N°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Introduire 1,0 mL de la dilution :	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}	10^{-3}
Couler le milieu suivant :	PCA	PCA	DC	DC	DC	DC	PCA	PCA	DC	DC	DC	DC
Homogénéiser les boites												
Laisser prendre en masse												
Incuber 24h à	30°C	30°C	30°C	30°C	44°C	44°C	30°C	30°C	30°C	30°C	44°C	44°C

2-2-3 : Dénombrement :

Après incubation compléter le tableau ci-dessous (Fiche de résultats de dénombrement):

- sur PCA compter toutes les colonies.
- Sur milieu DC, compter seulement les colonies rouges d'au moins 0,5 mm de diamètre.

Attention les numéros des boites ne sont pas dans l'ordre.

Boite N° :	1	2	7	8	3	4	9	10	5	6	11	12
Milieu ensemencé	PCA	PCA	PCA	PCA	DC	DC	DC	DC	DC	DC	DC	DC
Température d'incubation	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	30°C	44°C	44°C	44°C	44°C
Dilution effectuée (= d)	100 (10^{-2})	100 (10^{-2})	1000 (10^{-3})	1000 (10^{-3})	100 (10^{-2})	100 (10^{-2})	1000 (10^{-3})	1000 (10^{-3})	100 (10^{-2})	100 (10^{-2})	1000 (10^{-3})	1000 (10^{-3})
Nb de colonies comptées	n_1	n_2										
Nb moyen de colonies par dilution (= n)	$n = (n_1 + n_2) / 2$											
Nb de germes / g de produit testé (N= n x d)	$N1 = n \times 100$		$N2 = n \times 1000$									
Nb moyen de germes / g de produit testé.	$= (N1 + N2) / 2$											

3 - Expression et analyse des résultats :

- Sur milieu PCA à 30°C, on dénombre la flore totale aérobie.
- Sur milieu désoxycholate (DC) à 30° C, on dénombre les coliformes totaux.
- Sur milieu désoxycholate (DC) à 44°C, on dénombre les coliformes fécaux.

Analyser et interpréter les résultats en fonction des normes suivantes.

Critères sanitaires (extrait pour les produits fabriqués au lycée).*(Normes Arr. 21 décembre 1979, art. 6 modifié par Arr. 11 mars 1998 – d'après Lamy Dehove Mai 2000).*

Type de produit testé	Flore totale aérobie à 30°C / g	Coliformes Totaux à 30°C / g	Coliforme fécaux à 44°C / g
Viande conditionnée sous vide, réfrigérée ou congelée	5.10 ⁴	-	10 ²
Plat cuisiné à l'avance	3.10 ⁵	10 ³	10
Produit de charcuterie cuit	3.10 ⁵	10 ³	10
Pâtisserie	3.10 ⁵	10 ³	1
Beurre	5.10 ²	Absence	Absence
Lait pasteurisé	3. 10 ⁴	10	Absence
Yaourt	10 ³	10	1
Produit gélifié (crème dessert)	10 ³	10	1
Crème pasteurisée	3.10 ⁴	10	-
Glace et crème glacée	3.10 ⁵	10 ²	1
Légumes surgelés	5.10 ⁵	10 ³	15
Légumes déshydratés (purée en flocons)	3.10 ⁴	-	3
Plantes médicinales	10 ⁶	-	-
Emulsion alimentaire (mayonnaise)	3.10 ⁵	10 ²	1
Produits cosmétiques d'usage externe	3.10 ⁵	10 ²	1
Produits pharma d'usage externe	3.10 ⁵	10 ²	1
Collyres, injectables, ampoule	Absence	Absence	Absence
Produit pharma Formes sèches.	3.10 ⁴	-	3