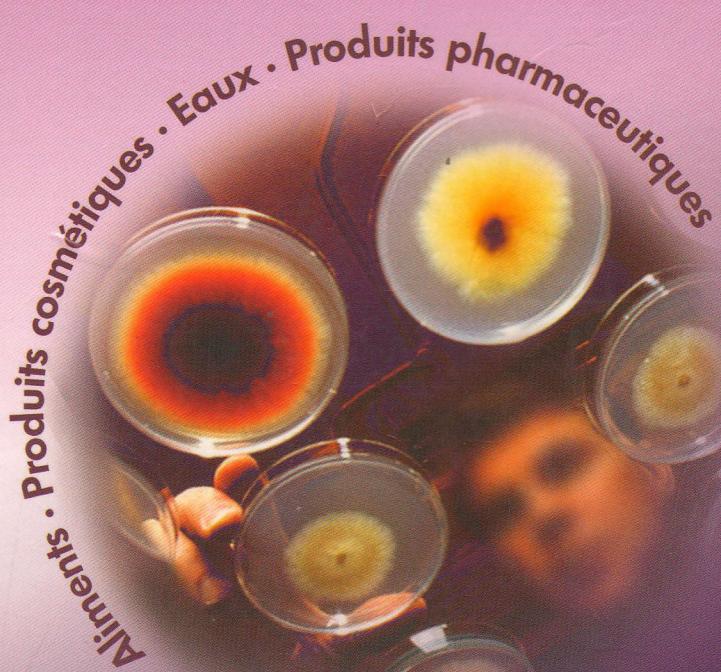


Camille Delarras

# Microbiologie pratique pour le laboratoire

d'analyses ou de contrôle sanitaire



Editions  
**TEC**  
& **DOC**

**M**  
inter

*Lavoisier*

# Table des matières

<b>Remerciements</b> .....	III
<b>Sigles et abréviations</b> .....	XV
<b>Avant-propos</b> .....	XIX
<b>Introduction</b> .....	XXV
<i>Première partie</i>	
<b>Le laboratoire de microbiologie</b>	
<i>Chapitre 1</i>	
<b>Conception du laboratoire, fonctionnement et sécurité</b>	
1. Conception du laboratoire .....	3
1.1. Laboratoires de recherche, de développement et d'enseignement .....	3
1.2. Laboratoires d'analyses microbiologiques des aliments et des eaux .....	8
1.3. Laboratoires d'analyses de biologie médicale .....	9
1.4. « Le principe de la marche en avant » .....	9
2. Fonctionnement .....	13
2.1. Le « système qualité » .....	13
2.2. Laboratoires d'analyses microbiologiques (eaux, aliments...) .....	13
2.3. Laboratoires d'analyses de biologie médicale .....	14
2.4. Salles de travaux pratiques de microbiologie .....	15
3. Sécurité et travail .....	15
3.1. Dans un laboratoire d'analyses microbiologiques des aliments .....	15
3.2. Dans un laboratoire d'analyses de biologie médicale .....	16
3.3. Dans une salle de travaux pratiques de microbiologie .....	16
3.4. En conclusion .....	18
4. Sécurité et législation .....	18
4.1. Agents pathogènes .....	18
4.2. Santé et sécurité des travailleurs .....	21
<i>Chapitre 2</i>	
<b>Matériel principal du laboratoire de microbiologie</b>	
1. Appareils d'équipement principaux du laboratoire .....	23
1.1. Hotte à flux laminaire et poste de sécurité microbiologique (PSM) .....	23
1.2. Étuves .....	28
1.3. Autoclaves .....	30
1.4. Bains-marie ou bains thermostatés .....	32

1.5. Réfrigérateurs, glacières et congélateurs .....	32
1.6. Lyophilisateurs .....	34
2. Matériel d'équipement de la paillasse .....	34
2.1. PSM .....	34
2.2. Becs de gaz, becs électriques.....	34
2.3. Plaques chauffantes .....	35
2.4. Matériel utilisé pour les ensemencements .....	36
2.5. Loupes binoculaires et microscopes optiques .....	37
2.6. Compteurs de colonies .....	38
3. Matériel pour la préparation des échantillons .....	39
3.1. Agitateurs, broyeurs-homogénéisateurs .....	39
3.2. Diluteurs d'échantillons .....	40
3.3. Appareils à filtration .....	40
3.4. Centrifugeurs .....	41
4. Appareils intervenant dans la préparation des milieux de culture .....	41
4.1. Balances .....	41
4.2. pH-mètres .....	42
4.3. Four à micro-ondes .....	42
4.4. Appareils à répartir les milieux de culture .....	42
4.5. Autoclaves pour la stérilisation des milieux de culture .....	42
4.6. Autopréparateurs ou préparateurs de milieux de culture .....	43
5. Récipients en verre et en matériaux plastiques .....	43
6. Automates de microbiologie .....	45

### Chapitre 3

#### Préparation et stérilisation du matériel et des milieux de culture

1. Préparation du matériel courant .....	47
1.1. Lavage des récipients .....	47
1.2. Bouchage des récipients .....	47
1.3. Boîtes de Petri .....	48
1.4. Pipettes graduées et pipettes Pasteur .....	48
2. Préparation des milieux de culture .....	48
2.1. À partir de leurs constituants chimiques .....	48
2.2. À partir des milieux déshydratés .....	52
2.3. Contrôle de qualité des milieux et des réactifs .....	52
2.4. Classification des milieux de culture .....	55
3. Stérilisation du matériel et des milieux de culture .....	59
3.1. L'autoclavage .....	60
3.2. Autres procédés de stérilisation .....	62
4. Utilisation des milieux de culture .....	63
4.1. Milieux d'usage courant .....	63
4.2. Milieux d'isolement .....	68
4.3. Milieux d'identification et galeries biochimiques d'identification .....	76

	<i>Chapitre 4</i>	206
	<b>Méthodes de travail en microbiologie</b>	207
1.	Techniques d'ensemencement des micro-organismes . . . . .	83
1.1.	Travail sur paillasse avec des becs Bunsen de sécurité . . . . .	83
1.2.	Travail sous PSM . . . . .	86
1.3.	Exemples d'ensemencement de micro-organismes . . . . .	86
2.	Techniques d'isolement des bactéries . . . . .	88
2.1.	Préparation et ensemencement des milieux de culture en boîtes de Petri . . . . .	88
2.2.	Méthode des quadrants . . . . .	89
3.	Dénombrement des micro-organismes . . . . .	92
3.1.	Technique générale des dilutions et applications . . . . .	92
3.2.	Techniques de dénombrement . . . . .	94
4.	Techniques d'observation des bactéries . . . . .	101
4.1.	Examen macroscopique des bactéries . . . . .	101
4.2.	Examen microscopique des bactéries . . . . .	105
4.3.	Techniques de coloration . . . . .	108
5.	Contrôle d'hygiène des surfaces de travail . . . . .	118
5.1.	Problématique . . . . .	118
5.2.	Boîtes contact . . . . .	119
5.3.	Lames gélosées . . . . .	122

*Chapitre 5***Milieux de culture et tests biochimiques pour l'identification bactérienne**

1.	Milieux de culture et tests biochimiques du métabolisme respiratoire . . . . .	126
1.1.	Les quatre types respiratoires des bactéries . . . . .	126
1.2.	Recherche de la catalase – Test catalase . . . . .	128
1.3.	Recherche de l'oxydase – Test oxydase . . . . .	129
1.4.	Recherche des nitrate-réductases (NR) . . . . .	130
1.5.	Mesure de l'activité de la réductase microbienne – Application . . . . .	132
2.	Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des glucides . . . . .	133
2.1.	Milieux de culture pour l'étude de la voie d'attaque des glucides . . . . .	133
2.2.	Milieux glucidiques pour bactéries fermentatives . . . . .	137
2.3.	Milieux de culture pour la voie d'attaque de certains glucides . . . . .	147
2.4.	Milieux de culture pour l'étude des dérivés de l'acide pyruvique . . . . .	149
2.5.	Milieu de culture pour l'utilisation du citrate de sodium . . . . .	152
3.	Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des protéines . . . . .	154
3.1.	Milieux de culture pour bactéries protéolytiques . . . . .	154
3.2.	Milieux de culture pour bactéries dégradant les acides aminés . . . . .	157
3.3.	Milieux de culture pour les bactéries dégradant des acides aminés particuliers . . . . .	164
3.4.	Milieux de culture pour la dégradation de l'urée . . . . .	166
3.5.	Milieux de culture mixtes . . . . .	167
4.	Milieux de culture et tests biochimiques du catabolisme des lipides . . . . .	170
4.1.	Estérasées . . . . .	170
4.2.	Lipases . . . . .	171
4.3.	Lécithinases . . . . .	172

*Deuxième partie***Principaux micro-organismes recherchés en microbiologie  
d'analyse ou de contrôle sanitaire***Chapitre 1***Principaux micro-organismes recherchés en routine  
(aliments, eaux, produits cosmétiques, produits pharmaceutiques...)**

1.	Analyses et/ou contrôles microbiologiques sanitaires . . . . .	177
1.1.	Paramètres ou critères microbiologiques des produits destinés à l'homme . . . . .	177
1.2.	Surveillance sanitaire des produits destinés à l'homme . . . . .	182
1.3.	Contrôles microbiologiques des produits . . . . .	184
2.	Conditions physicochimiques de culture des micro-organismes . . . . .	187
2.1.	Température . . . . .	187
2.2.	pH . . . . .	188
2.3.	Pression osmotique . . . . .	189
2.4.	Humidité ou Aw . . . . .	190
3.	Micro-organismes totaux . . . . .	191
3.1.	Définitions . . . . .	191
3.2.	Milieux de recherche et de dénombrement . . . . .	193

*Chapitre 2***Bacillus et ex-Bacillus**

1.	Habitats. . . . .	195
2.	Classifications . . . . .	196
2.1.	Classification de Bergey (1994) . . . . .	196
2.2.	Classification phylogénique . . . . .	196
3.	Groupes phénotypiques . . . . .	196
3.1.	Groupe I. <i>B. polymyxa</i> groupe . . . . .	196
3.2.	Groupe II. <i>B. subtilis</i> groupe . . . . .	197
3.3.	Groupe III. <i>B. brevis</i> groupe . . . . .	197
3.4.	Groupe IV. <i>B. sphaericus</i> groupe . . . . .	197
3.5.	Groupe V. Thermophiles . . . . .	197
3.6.	Groupe VI. Thermophiles acidophiles . . . . .	198
3.7.	Espèces non classées . . . . .	198
3.8.	Nouveaux genres . . . . .	198
4.	Caractères principaux . . . . .	198
5.	Milieux d'isolement . . . . .	199
5.1.	Composition chimique et mode d'action du milieu de culture . . . . .	199
5.2.	ensemencement et incubation du milieu . . . . .	200
5.3.	Lecture et interprétation du milieu . . . . .	200
5.4.	Contrôle de qualité du milieu . . . . .	201
6.	Identification biochimique . . . . .	201
6.1.	Tests de caractérisation . . . . .	201
6.2.	Galerie api® 50 CH bioMérieux® SA . . . . .	201
7.	Surveillance et épidémiologie . . . . .	206

7.1. <i>Bacillus cereus</i> . . . . .	206
7.2. <i>Bacillus anthracis</i> . . . . .	207
<i>Chapitre 3</i>	
<b>Campylobacter</b>	
1. Habitats . . . . .	209
2. Classifications . . . . .	209
2.1. Classification de Bergey (1994) . . . . .	209
2.2. Classification phylogénique . . . . .	209
2.3. Espèces de <i>Campylobacter</i> et pouvoir pathogène . . . . .	210
3. Caractères principaux . . . . .	211
4. Isolement . . . . .	211
4.1. En bactériologie clinique . . . . .	211
4.2. En microbiologie alimentaire . . . . .	213
5. Identification biochimique . . . . .	219
5.1. Composition de la galerie . . . . .	220
5.2. Préparation, inoculation et incubation de la galerie . . . . .	220
5.3. Lecture de la galerie . . . . .	221
5.4. Interprétation . . . . .	223
6. Surveillance . . . . .	224
6.1. Organisation mondiale de la santé (OMS) . . . . .	224
6.2. Eurosurveillance . . . . .	224
6.3. Centres nationaux de référence . . . . .	225
7. Épidémiologie . . . . .	225
<i>Chapitre 4</i>	
<b>Clostridium</b>	
1. Classifications . . . . .	227
1.1. Classification de Bergey (Bergey, 1994) . . . . .	227
1.2. Classification phylogénique . . . . .	227
2. Espèces principales . . . . .	227
2.1. Groupes physiologiques . . . . .	228
2.2. Espèces pathogènes . . . . .	228
2.3. <i>Clostridia</i> sulfitoréducteurs . . . . .	230
3. Caractères principaux . . . . .	232
4. Isolement . . . . .	232
4.1. En bactériologie médicale . . . . .	232
4.2. En bactériologie des eaux . . . . .	234
4.3. En bactériologie alimentaire . . . . .	234
4.4. En Pharmacopée . . . . .	238
5. Identification . . . . .	240
5.1. Présentation de la galerie Rapid ID 32 A . . . . .	240
5.2. Composition de la galerie . . . . .	240
5.3. Préparation, inoculation et incubation de la galerie . . . . .	241
5.4. Lecture de la galerie . . . . .	241
5.5. Interprétation . . . . .	243
6. Surveillance et épidémiologie . . . . .	243

6.1. Botulisme .....	243
6.2. Tiac à <i>Clostridium perfringens</i> .....	245
6.3. Tétanos .....	245

*Chapitre 5*  
***Enterobacteriaceae (entérobactéries)***

1. Classifications .....	247
1.1. Classification de Bergey (Bergey, 1994) .....	247
1.2. Classification phylogénique .....	247
2. Entérobactéries courantes et rares .....	248
2.1. Entérobactéries courantes .....	248
2.2. Entérobactéries rares ou récemment décrites .....	252
3. Caractères des entérobactéries .....	253
3.1. Caractères principaux .....	253
3.2. Caractères communs .....	254
3.3. Coliformes .....	254
4. Milieux de culture pour entérobactéries .....	255
4.1. Milieu d'enrichissement sélectif liquide .....	255
4.2. Milieux d'isolement sélectifs .....	257
5. Milieux de culture pour <i>Salmonella</i> et <i>Shigella</i> .....	264
5.1. Milieux d'enrichissement sélectifs liquides .....	264
5.2. Milieux d'isolement sélectif solides .....	268
6. Milieux d'isolement pour <i>Yersinia</i> .....	276
6.1. Milieux de culture .....	276
6.2. En bactériologie médicale .....	278
6.3. En bactériologie alimentaire .....	279
7. Identification biochimique .....	279
7.1. Milieux chromogéniques ou fluorogéniques d'identification pour <i>Escherichia coli</i> .....	279
7.2. Identification des <i>Salmonella</i> par <i>polymerase chain reaction</i> ..	286
7.3. Galeries API bioMérieux® SA .....	287
8. Surveillance et épidémiologie .....	290
8.1. Surveillance .....	290
8.2. Épidémiologie .....	294

*Chapitre 6*  
***Listeria***

1. Habitats .....	297
2. Classifications .....	297
2.1. Classification de Bergey (1994) .....	297
2.2. Classification phylogénique .....	297
2.3. Espèces .....	298
3. Caractères .....	298
3.1. Caractères principaux .....	298
3.2. Caractères spécifiques de <i>Listeria monocytogenes</i> .....	299
4. Recherche et dénombrement .....	300
4.1. Milieux de culture .....	300

4.2. Détection conventionnelle .....	305
4.3. Dénombrement conventionnel .....	306
4.4. Confirmation des colonies de <i>Listeria</i> .....	307
5. Identification .....	308
5.1. Identification biochimique par microméthode .....	308
5.2. Identification des <i>Listeria</i> par <i>polymerase chain reaction</i> .....	311
6. Surveillance et épidémiologie de la listériose humaine .....	312
6.1. Organismes de surveillance .....	312
6.2. épidémiologie et surveillance des aliments .....	313

*Chapitre 7***Levures et moisissures**

1. Champignons .....	317
1.1. Propriétés principales .....	317
1.2. Champignons microscopiques .....	318
2. Levures .....	320
2.1. Classification .....	320
2.2. Propriétés principales .....	320
2.3. Levures utiles, nuisibles et pathogènes .....	321
2.4. Normes microbiologiques – Autres applications .....	322
3. Milieux pour la culture des levures et moisissures .....	323
3.1. Milieux de culture classiques .....	323
3.2. Gélose Sabouraud .....	323
4. Isolement, dénombrement des levures, moisissures et autres champignons .....	324
4.1. En bactériologie clinique .....	324
4.2. En bactériologie alimentaire .....	325
4.3. En bactériologie industrielle .....	328
5. Identification des levures .....	332
5.1. Milieux d'identification pour <i>Candida</i> dont <i>Candida albicans</i> .....	332
5.2. Identification biochimique des levures .....	334

*Chapitre 8****Pseudomonas* et ex-*Pseudomonas***

1. Habitats .....	339
2. Classifications .....	339
2.1. Classification de Bergey (1994) .....	339
2.2. Classification phylogénique .....	339
2.3. Espèces de <i>Pseudomonas</i> et ex- <i>Pseudomonas</i> .....	340
3. Caractères principaux et production de pigments .....	342
3.1. Caractères principaux .....	342
3.2. Production de pigments .....	343
4. Isolement de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	344
4.1. Milieux pour entérobactéries .....	344
4.2. Milieux spécifiques .....	344
5. Identification de <i>Pseudomonas</i> et ex- <i>Pseudomonas</i> .....	349
5.1. Milieux de confirmation .....	349

5.2. Galeries biochimiques d'identification .....	351
6. Surveillance et épidémiologie .....	355

### Chapitre 9

#### ***Staphylococcus, Micrococcus et ex-Micrococcus***

1. Habitats .....	357
2. Classifications .....	357
2.1. Classification de Bergey (1994) .....	357
2.2. Classification phylogénique des staphylocoques .....	357
2.3. Classification phylogénique des microcoques et ex-microcoques .....	358
3. Espèces .....	358
3.1. Espèces de staphylocoques .....	358
3.2. Espèces de microcoques et ex-microcoques .....	360
4. Caractères principaux et milieux de culture .....	361
5. Isolement .....	362
5.1. Milieu d'enrichissement .....	362
5.2. Milieux d'isolement sélectifs .....	364
6. Identification .....	371
6.1. Confirmation des souches de <i>Staphylococcus aureus</i> .....	371
6.2. Pré-identification .....	374
6.3. Identification biochimique .....	376
7. Surveillance et épidémiologie .....	381
7.1. Surveillance .....	381
7.2. épidémiologie .....	384

### Chapitre 10

#### ***Streptococcus et Enterococcus***

1. Habitats .....	387
1.1. Habitat des streptocoques .....	387
1.2. Habitat des entérocoques .....	387
2. Classifications des streptocoques et des entérocoques .....	388
2.1. Classification de Bergey (1994) .....	388
2.2. Classification phylogénique des streptocoques .....	388
2.3. Classification phylogénique des entérocoques .....	388
2.4. Classification sérologique de Lancefield .....	388
3. Espèces de streptocoques et d'entérocoques .....	389
3.1. Streptocoques .....	389
3.2. Entérocoques .....	391
3.3. Streptocoques du groupe D .....	391
3.4. Pouvoir pathogène .....	391
4. Caractères principaux .....	393
5. Isolement et/ou dénombrement des streptocoques et des entérocoques .....	394
5.1. Milieux de culture et d'isolement pour streptocoques .....	394
5.2. Milieux de culture pour entérocoques .....	396
6. Identification des streptocoques et des entérocoques .....	401
6.1. Milieux de confirmation et d'identification pour entérocoques .....	401
6.2. Identification par microméthode .....	404

7. Surveillance des streptocoques du groupe D .....	407
7.1. Dans les eaux .....	408
7.2. Dans les aliments .....	408

### *Chapitre 11*

#### **Contrôle microbiologique des produits cosmétiques**

1. Législation des produits cosmétiques.....	409
1.1. Directive « cosmétique » 76/768/CEE (1976) .....	409
1.2. Autres directives européennes .....	411
1.3. Textes réglementaires français .....	411
1.4. Dossier d'information sur les produits cosmétiques .....	412
2. Surveillance des produits cosmétiques.....	412
2.1. Réglementation .....	412
2.2. Contrôles en laboratoire .....	413
2.3. Inspection .....	413
2.4. Évaluation de la sécurité des produits .....	413
3. Contrôle microbiologique et normes microbiologiques.....	413
3.1. Sources de contamination potentielles .....	414
3.2. Paramètres et normes microbiologiques .....	416
4. Méthodes d'analyse microbiologique des produits cosmétiques.....	417
4.1. Préparation des échantillons .....	417
4.2. Micro-organismes ou bactéries aérobies mésophiles .....	420
4.3. Micro-organismes spécifiques .....	422
5. « Challenge-test ».....	427
<b>Annexe générale 1 – Lexique de microbiologie .....</b>	<b>429</b>
<b>Annexe générale 2 – Des agents biologiques pathogènes .....</b>	<b>433</b>
<b>Annexe générale 3 – Classification phylogénique des bactéries .....</b>	<b>435</b>
<b>Annexe générale 4 – Procédures de travail .....</b>	<b>439</b>
<b>Annexe générale 5 – Paramètres recommandés par une équipe HACCP en fonction du niveau de risque .....</b>	<b>445</b>
<b>Annexe générale 6 – Notions sur les antibiotiques .....</b>	<b>447</b>
<b>Annexe générale 7 – Milieux de culture utilisés en Pharmacopée .....</b>	<b>451</b>
<b>Annexe générale 8 – Quelques adresses utiles de sociétés commercialisant du matériel de microbiologie .....</b>	<b>453</b>
<b>Bibliographie .....</b>	<b>455</b>
<b>Index .....</b>	<b>463</b>
DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DGSV	Direction départementale des services vétérinaires
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DG SANCO	Directeur général de la commission européenne pour la santé et la protection du consommateur
DGS	Direction générale de la santé



## **Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyses ou de contrôle sanitaire**

concilie la théorie et la pratique grâce à sa conception originale en deux parties :

- la première partie présente tout ce qu'il faut savoir pour équiper et conduire un laboratoire aujourd'hui : conception, fonctionnement, sécurité, réglementation, matériel, milieux de cultures classiques, chromogéniques..., méthodes de travail, d'isolement et d'identification des bactéries...
- la deuxième partie traite de microbiologie appliquée et expose les méthodes d'analyse et de contrôle des principaux micro-organismes (dans les eaux, les aliments, les produits cosmétiques et pharmaceutiques...) : habitats, classifications, caractères principaux et/ou spécifiques, isolement avec milieux de culture récents, identification sur galeries api®, surveillance, épidémiologie...

Intégrant les plus récentes données techniques et scientifiques et complété d'une sélection de références bibliographiques essentielles, ce livre permettra au technicien de laboratoire comme à l'étudiant de 1<sup>er</sup> cycle universitaire (BTS, DUT, licences professionnelles...) ou de 2<sup>e</sup> cycle (mastes spécialisés) d'avoir une vue complète de l'analyse ou du contrôle microbiologique des produits destinés à l'homme.

**Camille Delarras** a enseigné en tant que maître de conférences en microbiologie à l'IUT de Brest de 1971 à 2006. Il est également coauteur de *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux* paru chez le même éditeur.

978-2-7430-0945-8



9 782743 009458