

Camille Delarras

Microbiologie pratique pour le laboratoire

d'analyses ou de contrôle sanitaire

Aliments • Produits cosmétiques • Eaux • Produits pharmaceutiques

A collection of petri dishes containing various bacterial cultures, including a large orange-red one, a yellow one, and several smaller ones with different colored colonies.

Editions
TEC
& **DOC**

EM
inter

Lavoisier

Table des matières

Remerciements.....	III
Sigles et abréviations.....	XV
Avant-propos.....	XIX
Introduction.....	XXV

Première partie

Le laboratoire de microbiologie

Chapitre 1

Conception du laboratoire, fonctionnement et sécurité

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

Chapitre 2

Matériel principal du laboratoire de microbiologie

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

Chapitre 4

Méthodes de travail en microbiologie

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. Estérases	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 A_w	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

Chapitre 3 *Campylobacter*

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

Chapitre 4 *Clostridium*

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

Annexe générale 1 – Lexique de microbiologie	429
--	-----

Annexe générale 2 – Des agents biologiques pathogènes	433
---	-----

Annexe générale 3 – Classification phylogénique des bactéries	435
---	-----

Annexe générale 4 – Procédures de travail	439
---	-----

Annexe générale 5 – Paramètres recommandés par une équipe HACCP en fonction du niveau de risque	445
--	-----

Annexe générale 6 – Notions sur les antibiotiques	447
---	-----

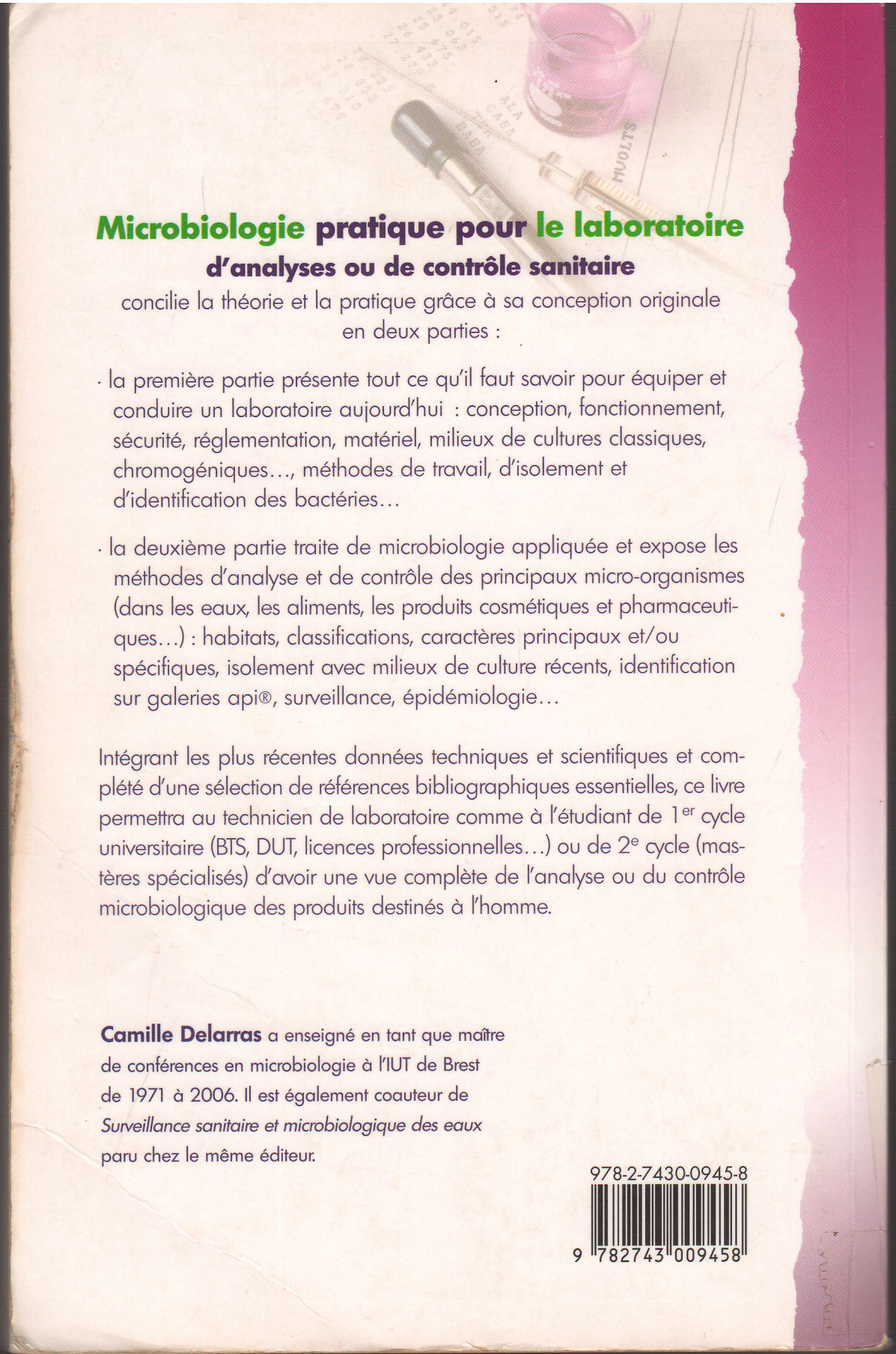
Annexe générale 7 – Milieux de culture utilisés en Pharmacopée ...	451
--	-----

Annexe générale 8 – Quelques adresses utiles de sociétés commercialisant du matériel de microbiologie	453
--	-----

Bibliographie	455
---------------------	-----

Index	463
-------------	-----

DGCCRF	Direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes
DOSV	Direction départementale des services vétérinaires
DGAL	Direction générale de l'alimentation
DO SANCO	Directorat général de la commission européenne pour le commerce 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^{er} cycle universitaire (BTS, DUT, licences professionnelles...) ou de 2^e cycle (mastères 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