

**Contrôle
microbiologique**
des denrées alimentaires,
des boissons et des pro-
duits pharmaceutiques

Introduction

Dans de très nombreux domaines, le contrôle microbiologique des produits constitue soit un impératif de sécurité comme dans les domaines pharmaceutiques, médicaux ou hospitaliers, soit plus simplement, un critère de qualité. Les établissements hospitaliers sont tenus de contrôler régulièrement la contamination microbiologique de leur eau ou de l'air. Ils peuvent aussi être amenés à effectuer des analyses microbiologiques de liquides biologiques.

De même, dans l'industrie pharmaceutique, la sécurité de la production impose de multiples contrôles bactériologiques dans les différents sites de production, de stockage ainsi que sur les matières premières et les produits finis.

Les industries alimentaires doivent aussi faire face aux exigences toujours croissantes du consommateur en matière de qualité et de conservation des denrées alimentaires et des boissons. Ces branches de l'industrie ne peuvent pas se limiter à un contrôle du produit final, c'est-à-dire de la boisson en bouteille ou du plat cuisiné ; au contraire, elles doivent, si elles veulent éviter les pertes financières et les réclamations, soumettre les matières premières à un contrôle constant et surveiller l'ensemble du processus de production. Les examens microbiologiques et hygiéniques jouent alors un rôle prépondérant.

Les exigences auxquelles sont soumises les méthodes d'examens microbiologiques ont pour résultat une excellente reproductibilité des analyses concernant la présence et le dénombrement des germes recherchés ainsi que l'optimisation des moyens mis en œuvre en routine. La méthode de dénombrement au moyen de membranes filtrantes satisfait totalement à ces exigences.

Cette méthode a pour principe la concentration des micro-organismes à partir de volumes d'échantillons importants sur la surface de la membrane filtrante. La culture des germes s'effectue sur des milieux de culture sur carton (NKS) ou sur agar nutritif.

La méthode avec membrane filtrante

Description

Une membrane filtrante de seuil de rétention connu est posée dans l'appareil de filtration puis l'échantillon est filtré. Les micro-organismes présents sont récupérés sur la surface de la membrane par le phénomène du tamisage. Les substances inhibant ou retardant la croissance peuvent être éliminées en rinçant le filtre avec de l'eau stérile. Puis la membrane filtrante est posée sur un milieu de culture et mise à incuber. Il peut y avoir échange entre substances nutritives et produits du métabolisme grâce au système poreux de la membrane filtrante. Les colonies qui se sont développées sur la surface de la membrane sont comptées et leur évaluation se fait en fonction du volume de l'échantillon filtré.

Les avantages :

- Comparativement à la méthode directe, de plus grands volumes d'échantillons peuvent être analysés. L'effet de concentration augmente l'exactitude du dénombrement.
- La membrane filtrante sur laquelle se sont développées les colonies constitue un document que vous pouvez archiver, puis consulter à tout moment.
- Il est possible d'évaluer les colonies qui se sont développées directement en fonction du volume.
- Les résultats sont quantitatifs.

Pas d'inhibiteurs

Les inhibiteurs tels que les huiles essentielles ou les désinfectants peuvent être rincés de la membrane filtrante après la filtration.

Qualité BPF

Les membranes filtrantes Sartorius sont fabriquées conformément aux conditions BPF, ce qui permet de garantir une qualité constante et une reproductibilité élevée lot après lot et à l'intérieur même d'un lot.

Les milieux de culture

Les contaminations microbiennes peuvent être analysées par différents procédés.

Les méthodes de dénombrement microscopique ou après culture permettent leur mise en évidence et les méthodes biochimiques et sérologiques servent à caractériser précisément la nature des micro-organismes.

Pour la mise en évidence par la culture, on se sert de milieux de culture liquides ou solides dans ou sur lesquels les micro-organismes se multiplient, jusqu'à former des colonies visibles.

On ne peut faire d'appréciation quantitative qu'avec un milieu de culture solide car on peut alors compter les colonies qui se développent.

Pour la croissance de la colonie, on peut utiliser les milieux de culture suivants :

- **Les milieux de culture sur carton :** Ils sont décrits à la page suivante et offrent certainement la manière la plus facile d'appliquer la méthode avec membranes filtrantes.

Les milieux de culture sur carton permettent une utilisation optimale de la méthode avec membrane filtrante.

Ils rationalisent et standardisent les procédés de recherche microbiologique.

Ils réduisent et facilitent le travail en laboratoire.

Ils permettent les gains de temps et d'argent.

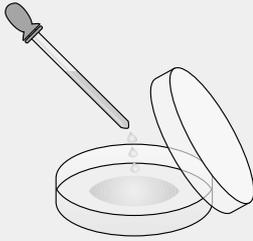
- **Les disques de carton à imbiber avec un milieu de culture liquide.**
- **Les milieux de culture avec agar ou gélatine comme solidifiant, bouillon nutritif.**

Méthodes de dénombrement des germes

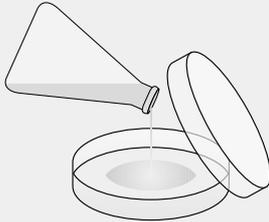
Méthodes de dénombrement des germes

Méthode directe

L'échantillon à analyser est mis dans une boîte de Pétri avec une pipette...



...puis il est mélangé avec le milieu de culture et mis à incuber.

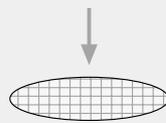
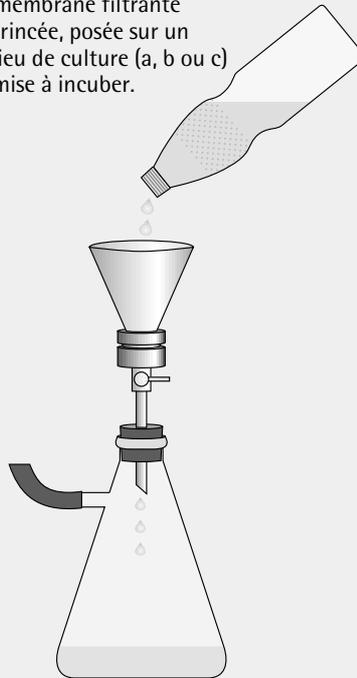


Méthode avec membrane filtrante

L'échantillon à analyser est filtré à travers une membrane filtrante.

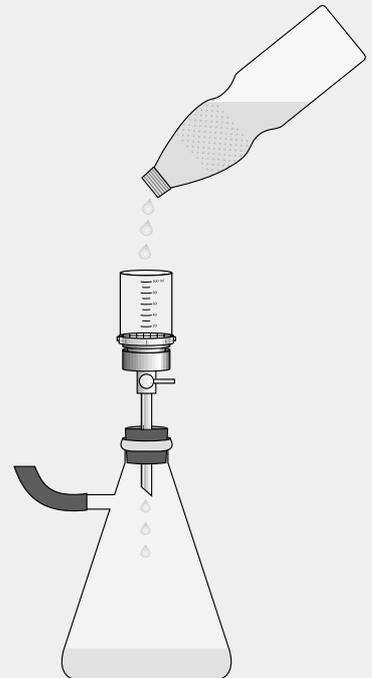
Méthode avec membrane filtrante standard

La membrane filtrante est rincée, posée sur un milieu de culture (a, b ou c) et mise à incuber.

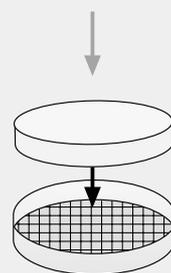


- a) Sur un milieu de culture sur carton (NKS) humidifié avec de l'eau stérile.
- b) Sur un disque de carton imbibé avec un milieu de culture liquide.
- c) Sur un milieu de culture avec agar.

Méthode avec membrane filtrante avec Biosart 100



Après la filtration, ajouter le milieu de culture par le haut et faire brièvement le vide (< 1 sec.). Fermer le fond du Biosart 100 avec le bouchon livré avec l'unité. Enlever l'entonnoir et assembler le couvercle et le fond pour former une boîte de Pétri.



Les milieux de culture sur carton (NKS)

Les milieux de culture sur carton, aussi appelés NKS, sont utilisés avec succès depuis 20 ans dans la méthode avec membranes filtrantes. Ils simplifient et facilitent de nombreux procédés d'examen microbiologique grâce à leur manipulation particulièrement aisée.

Les NKS sont des milieux stériles déshydratés. Pour les utiliser immédiatement, il suffit de les humidifier avec 3-3,5 ml d'eau stérile et déminéralisée.

Le taux d'humidité est optimal lorsqu'un excédent d'eau est visible autour du milieu de culture.

Tous les types de NKS sont vendus avec les membranes filtrantes correspondantes qui sont également stériles et emballées individuellement. Les membranes filtrantes, conçues pour répondre aux exigences spécifiques de la mise en évidence des germes, ont un diamètre de 47 ou 50 mm. Le paquet standard comprend 100 milieux de culture sur carton (dix rangées de dix boîtes de Pétri contenant chacune un NKS stérile) et 100 membranes filtrantes stériles en emballage individuel.

Conseils d'utilisation

Procédure générale

Afin d'obtenir des résultats fiables lors des contrôles microbiologiques, il est nécessaire de travailler dans des conditions excluant toute contamination provoquée par des micro-organismes susceptibles de fausser les résultats.

C'est pourquoi vous devez travailler près de la flamme d'un bec Bunsen dans une pièce protégée des courants d'air. Avant de commencer à travailler, il faut nettoyer la surface de travail avec une solution désinfectante (par ex. alcool à 70°).

Avant l'emploi, il est nécessaire de stériliser les appareils de filtration, les pincettes et les ciseaux selon une des méthodes standard, par exemple à la flamme pour des travaux de routine.

Les avantages pour l'utilisateur

Economie

Finies les préparations de milieux de culture (stérilisation, nettoyage, etc...) longues et compliquées.

- Une fois humidifiés avec 3,5 ml d'eau distillée, les NKS sont immédiatement prêts à l'emploi.

Manipulation aisée

Les NKS peuvent être utilisés dans les laboratoires qui ne possèdent pas d'équipement microbiologique complet. L'eau stérile pour l'humidification est disponible sous forme d'unidoses prêtes à l'emploi.

- N'importe quel opérateur peut utiliser les NKS.

Qualité constante

Au cours de la fabrication, les propriétés favorisant la croissance de chaque lot de milieu de culture sur carton sont comparées à l'agar correspondant. Cette procédure garantit une qualité constante et des résultats reproductibles.

- Les NKS sont validés. Par rapport à l'agar dont la quantité et la hauteur peuvent varier, les NKS fournissent toujours des résultats constants.

Stockage

Les milieux de culture sur carton peuvent être stockés pendant une période de 9 à 24 mois à température ambiante et dans un endroit sec et sans lumière.

- Pas de gaspillage.

Flexibilité

Les milieux de culture sur carton peuvent être modifiés par des additifs mélangés à la solution d'imprégnation utilisée ; par exemple, des NKS moût ou sérum à l'orange imprégnés avec 5% d'éthanol favorisent la croissance de bactéries acétiques.

- Souplesse d'utilisation.

Manipulation des micro-organismes

Les cultures de micro-organismes doivent toujours être manipulées avec extrême précaution. L'utilisateur doit toujours partir du principe qu'elles peuvent être pathogènes.

La manipulation de micro-organismes n'est pas dangereuse si l'on observe les règles de sécurité suivantes :

Bien se laver les mains avant et après avoir travaillé dans un laboratoire.

Ne pas manger ni boire dans un laboratoire.

Ne pas toucher les matières bactériennes avec les mains.

Ne jamais pipetter les suspensions bactériennes à la bouche. Toujours utiliser des aides mécaniques (par ex. poire d'aspiration en caoutchouc).

Avant et après usage, il faut stériliser à la flamme les ensemencateurs et les aiguilles d'inoculation jusqu'à ce qu'ils soient chauffés au rouge.

Tous les instruments de laboratoire qui ont été en contact avec des bactéries doivent être stérilisés.

Afin de protéger les personnes et les animaux contre des maladies contagieuses ou des intoxications, il faut détruire les cultures vivantes avant de nettoyer ou de jeter les récipients. Il est par exemple possible de les recouvrir de produits désinfectants ou de les autoclaver dans des récipients appropriés.

Conseils d'utilisation des milieux de culture sur carton



Désinfecter la surface de travail.



Découper le sachet pour l'ouvrir et prendre le nombre de milieux de culture nécessaire.



Humidifier les NKS avec 3,5 ml d'eau stérile et distillée ou déminéralisée.



Stériliser à la flamme l'entonnoir en acier inoxydable.



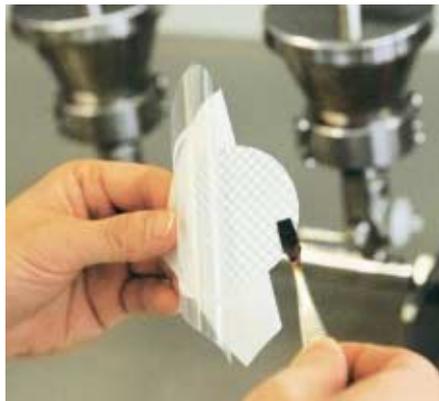
Stériliser le fritté à la flamme.



Stériliser le couvercle et l'intérieur de l'entonnoir.



Stériliser les pincettes à la flamme et les laisser légèrement refroidir.



Retirer la membrane de son emballage.



Mettre le filtre sur le fritté du support de filtre et jeter le papier jaune (pas représenté ici).



Filtrer l'échantillon. Ensuite, rincer l'intérieur du support de filtre avec de l'eau stérile ou de l'eau salée physiologique.



Déposer le filtre sur le NKS en faisant attention qu'il n'y ait pas de bulles d'air.



Laisser les NKS incuber dans des boîtes de Pétri avec le couvercle vers le haut.

Exemples d'applications

Produit	Détection/Détermination de...	Type de milieu de culture
Aliments	Bactéries mésophiles et sporulants thermophiles	Glucose tryptone
	Germes totaux	Standard TTC, Standard, Caso
	Entérobactéries	Endo, Teepol, M-FC, Tergitol TTC, ECD, MacConkey, Chromocult
	Levures et moisissures	Moût, extrait de malt
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cétrimide
	Salmonelles	Sulfite de bismuth
	Staphylocoques	Chapman
	Streptocoques	Azide
Bière	Levures et moisissures	Moût, extrait de malt
	Levures sauvages	Lysine
	Pédiocoques et lactobacilles	VLB-S7-S
Boissons non alcoolisées	Bactéries lactiques	VLB-S7-S, Sérum Orange
	Bactéries favorisant les dépôts mucilagineux (<i>Leuconostoc</i>)	Weman
	Germes totaux	Standard, Standard TTC
	Germes acido-tolérants	Sérum Orange
	Levures et moisissures	Moût, Schaufus-Pottinger, extrait de malt
Eau	Germes totaux	Standard TTC, Standard, R2A, extrait de levure
	<i>E. coli</i> et coliformes	Endo, Tergitol TTC, Teepol, M-FC, ECD
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cétrimide
	Streptocoques fécaux	Azide
Lait	<i>E. coli</i> et coliformes	Endo
	Salmonelles	Sulfite de bismuth
	Streptocoques	Azide
Produits pharmaceutiques et cosmétiques	<i>Candida albicans</i>	Sabouraud
	Germes totaux	Caso, R2A
	Entérobactéries	MacConkey
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Cétrimide
	<i>Staphylococcus aureus</i>	Chapman
	Streptocoques fécaux	Azide
Sucre	Bactéries favorisant les dépôts mucilagineux (<i>Leuconostoc</i>)	Weman
	Bactéries mésophiles et sporulants thermophiles	Glucose tryptone
	Levures et moisissures	Moût, Schaufus-Pottinger, extrait de malt
Vin	Acétobacter	Moût, Sérum Orange, tous les deux imprégnés avec de l'éthanol à 3-5%
	Bactéries lactiques	Sérum Orange
	Bactéries lactiques (particulièrement <i>Leuconostoc oenos</i>)	Jus de tomate
	Levures et moisissures	Moût, Schaufus-Pottinger, extrait de malt

Description et exemples de résultats

NKS Standard TTC

Référence 14055

Milieu à l'extrait de viande et peptones, modifié par l'adjonction de TTC pour la numération des germes totaux, selon «Trinkwasser-VO» et «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» – 1998.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

48 heures à 30 °C. Suivant la nature de l'échantillon, le temps d'incubation et la température peuvent varier.

Interprétation

Sur ce milieu de culture poussent en majorité des bactéries. Les colonies réduisant le TTC sont colorées en rouge.

NKS Standard

Référence 14064

Milieu à l'extrait de viande et peptones pour la numération des germes totaux, selon «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» – 1998.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

48 heures à 30 °C. Suivant la nature de l'échantillon, le temps d'incubation ainsi que la température peuvent varier.

Interprétation

Sur ce milieu de culture poussent en majorité des bactéries qui présentent des colonies de formes et de couleurs variées.

NKS-Caso

Référence 14063

Milieu à la peptone de caséine et soja pour la recherche et le dénombrement des germes totaux selon l'USP.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

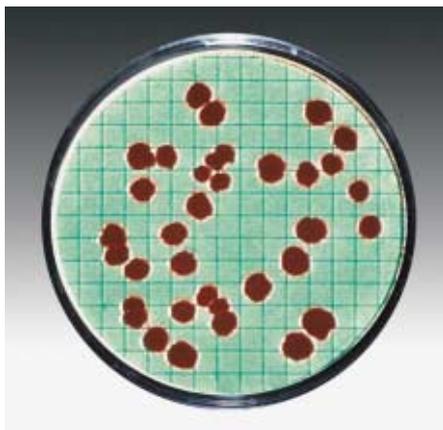
Conditions d'incubation

24–72 heures à 30–37 °C, suivant l'échantillon analysé.

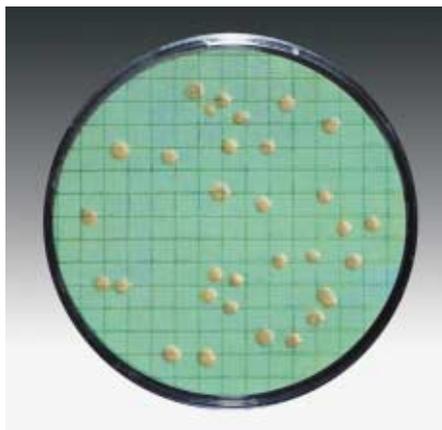
Interprétation

En fonction du but recherché, on pourra changer le milieu de culture en remplaçant la solution d'imprégnation par une solution à 10% de sérum sur laquelle se développe toute une gamme de bactéries pathogènes, par exemple, des bactéries de la famille des Pneumococcus, Neisseria, Streptococcus, Corynebacterium, Erysipelothrix et Brucella.

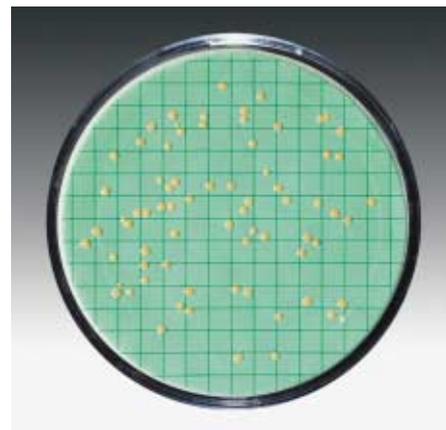
Flore totale



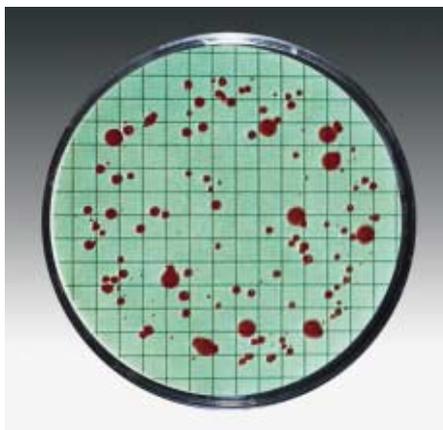
Bacillus subtilis



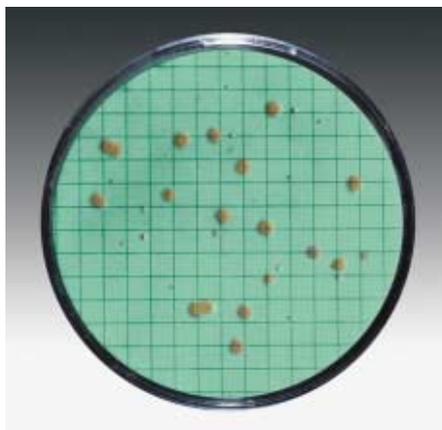
Escherichia coli



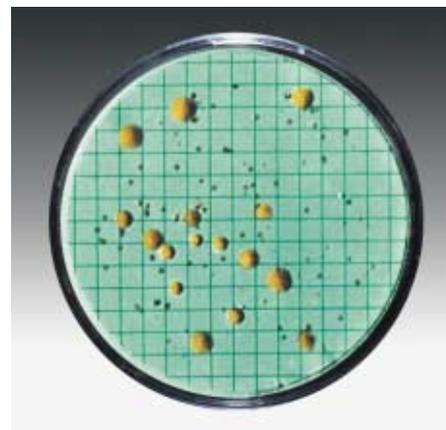
Staphylococcus aureus



Différentes colonies d'une eau de puits



Différentes colonies d'eau de boisson



Différentes colonies d'une eau de process

Description et exemples de résultats

NKS Extrait de levure Référence 14090

Milieu à l'extrait de levure et de peptone pour le dénombrement des germes totaux dans l'eau, selon «Trinkwasser VO» et EN ISO 6222.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

44 ± 4 heures à 36 ± 2 °C ; 68 ± 4 heures à 22 ± 2 °C selon EN ISO 6222

Interprétation

Des bactéries, des levures et des moisissures peuvent pousser sur ce milieu de culture. Comme il n'y a pas de colorant, la plupart des colonies, surtout les bactéries, sont incolores.

NKS R2A Référence 14084

Milieu pour le dénombrement des germes totaux de micro-organismes hétérotrophes et pour la subculture de bactéries dans de l'eau de boisson, selon «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» – 1998. La croissance optimale pour des bactéries qui sont adaptées à des conditions ambiantes dans de l'eau extrêmement pauvre en substances nutritives.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

72 heures à 35 °C ; 5 jours à 20 °C ou à 28 °C

Interprétation

Sur ce milieu de culture poussent en majorité des colonies de bactéries de différentes tailles et de différentes couleurs, qui sont toutefois surtout blanches ou incolores et d'un diamètre inférieur à 1 mm.

NKS Chromocult Référence 14087

Milieu pour le dénombrement de coliformes totaux et de E. coli dans de l'eau et des denrées alimentaires.

Membrane filtrante

Réf. 13706 (0,45 micron ; blanche quadrillée noire)

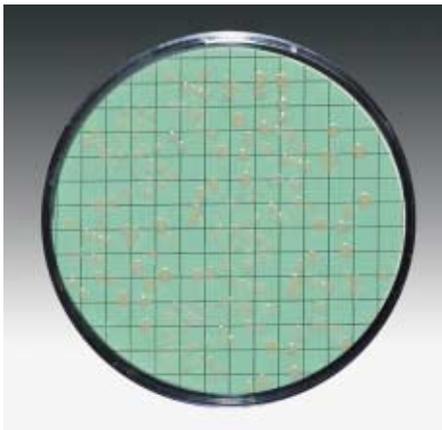
Conditions d'incubation

24 heures à 36 ± 1 °C ; une durée d'incubation plus longue gêne le comptage des colonies

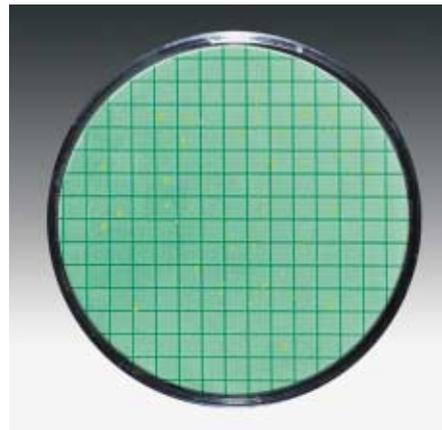
Interprétation

E. coli pousse sous forme de colonies bleu foncé à violettes. Les coliformes forment des colonies roses-rouges. D'autres colonies gram négatif sont incolores, quelques-unes avec une activité bêta-glucuronidase sont bleu clair à turquoise. Pour confirmer E. coli, il faut ajouter une goutte de réactif d'Erlich Kovacs sur les colonies bleu foncé à violettes. Les colonies E. coli deviennent rouge cerise.

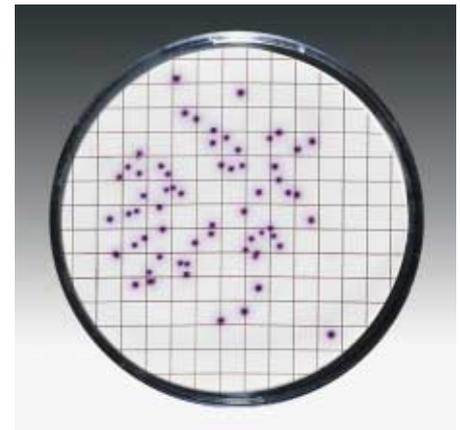
Flore totale



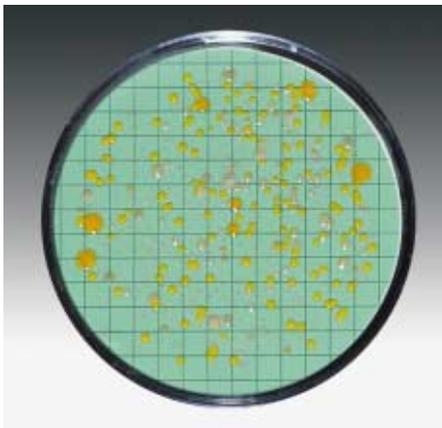
Escherichia coli



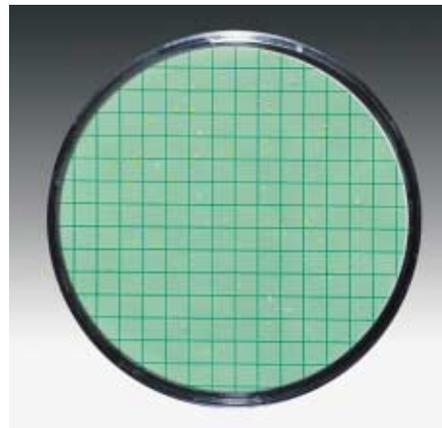
Escherichia coli



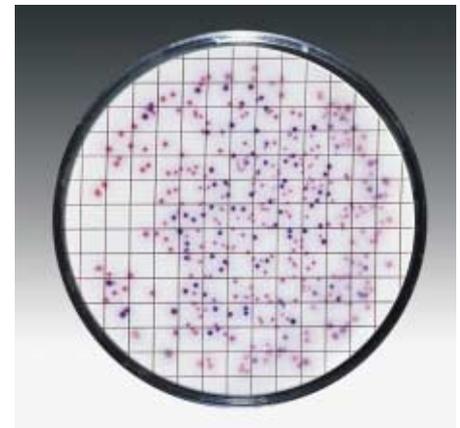
Escherichia coli



Différentes colonies d'eau de rivière



Différentes colonies d'eau de boisson



Différentes colonies d'eau de boisson

Description et exemples de résultats

NKS Endo

Référence 14053

Milieu sélectif pour la mise en évidence d'E. coli et des bactéries coliformes selon «Trinkwasser-VO» du 31.1.1975 et «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» – 1998.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

24 heures à 37 °C

Interprétation

E. coli et coliformes se développent sous forme de colonies rouge sombre au contour fortement marqué. E. coli ont un éclat métallique vert châtoyant (reflet de la fuchsine). Au dos de la membrane filtrante, on voit un point rouge violacé. Pour un diagnostic parfait, il faudra soumettre les colonies douteuses à un examen biochimique plus approfondi.

NKS-M-FC

Référence 14068

Met en évidence E. coli et les coliformes fécaux (dans des boîtes de Pétri fermées hermétiquement) d'après Geldreich et al., recommandé par «Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater» – 1998.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

20 ±4 heures à 37 °C dans l'étuve ou à 44,5 °C au bain-marie

Interprétation

E. coli et coliformes fécaux poussent en colonies bleues d'un diamètre de 1–2 mm. Les colonies d'une autre couleur ne seront pas prises en considération.

NKS-Teepol

Référence 14067

Mise en évidence d'E. coli et coliformes fécaux d'après Burman, N.P. (1967).

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

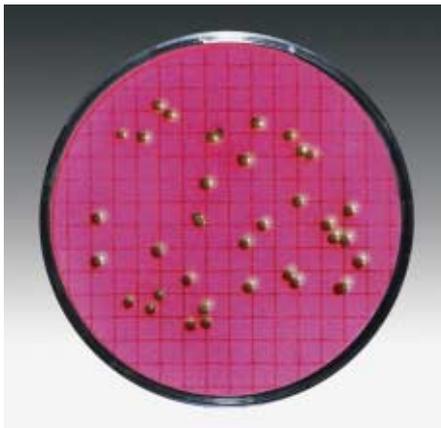
Conditions d'incubation

18–24 heures à 37 °C

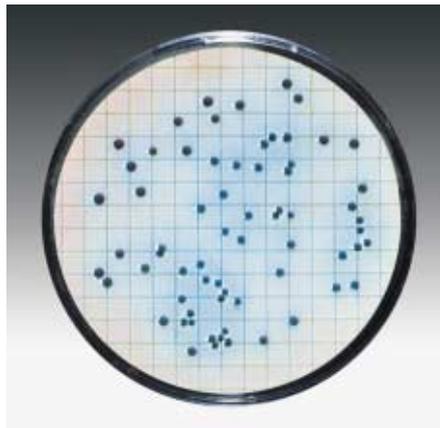
Interprétation

E. coli forme des colonies jaunes de 1 à 2 mm avec un halo jaune. Les bactéries qui ne fermentent pas le lactose ainsi que les germes coliformes se développent sous forme de colonies rouge foncé de différents diamètres.

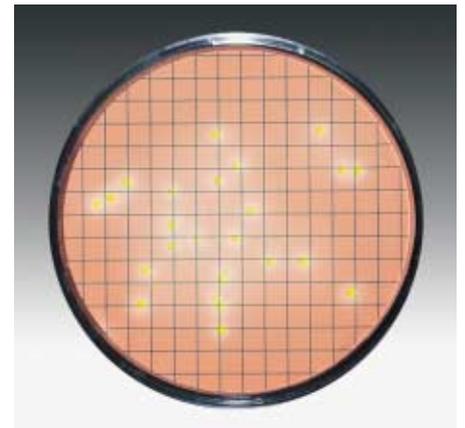
E. coli et Coliformes



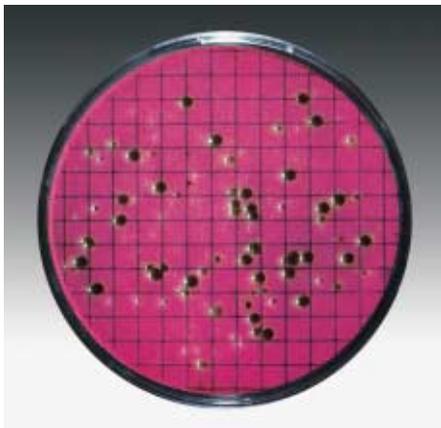
Escherichia coli



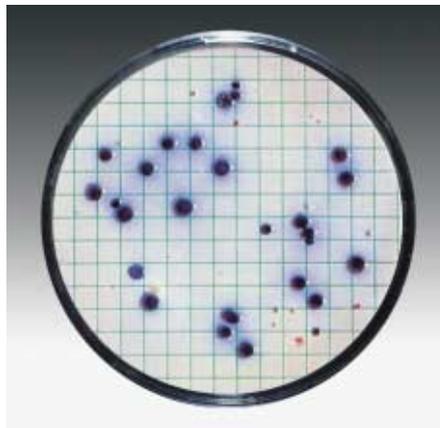
Escherichia coli



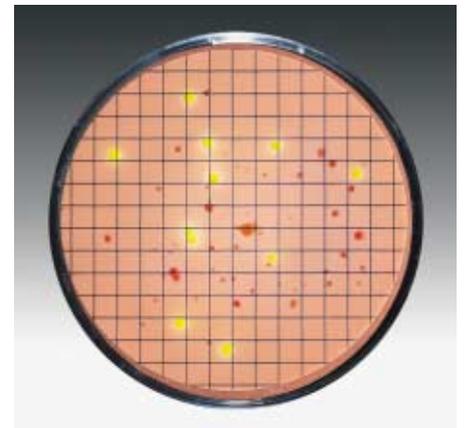
Escherichia coli



E. coli et Coliformes dans une eau de rivière



E. coli et Coliformes d'une eau résiduaire



E. coli et Coliformes d'une eau résiduaire

Description et exemples de résultats

NKS-ECD

Référence 14082

Milieu de culture sélectif pour la détection et l'identification de *E. coli*.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

18 ± 24 heures à 37 °C

Interprétation

Les sels biliaires inhibent la croissance des germes gram positif ou non adaptés au milieu intestinal. Les colonies d'*E. coli* fluorescent en bleu clair sous UV. La coloration rouge avec le réactif d'Erlich Kovacs donne la confirmation (indole +) de la présence d'*E. coli*.

NKS-MAC CONKEY

Référence 14097

Pour l'isolement et la différenciation des entérobactéries d'après le DAB 10, EP II et l'USP XXV et le paragraphe 35 LMBG.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

18 ± 24 heures à 37 °C

Interprétation

E. coli pousse sous forme de grosses colonies rouges à rougeâtres. Les coliformes apparaissent sous forme de grosses colonies roses et visqueuses. Les entérobactéries lactose négatif sont incolores. La prolifération des germes gram positif est fortement ralentie par la présence de sels biliaires et de cristal violet.

NKS Tergitol TTC

Référence 14056

Met en évidence les bactéries coliformes et *E. Coli* d'après Pollard, modifié Chapman (ISO 9308-1).

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

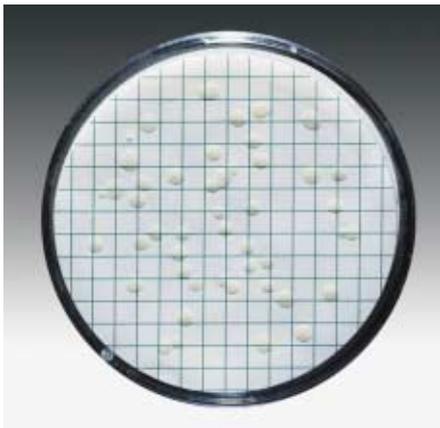
Conditions d'incubation

21 ± 3 heures à 36 °C ± 2 °C ou
44 ± 4 heures à 36 °C ± 2 °C
possibilité d'incubation à 44 °C

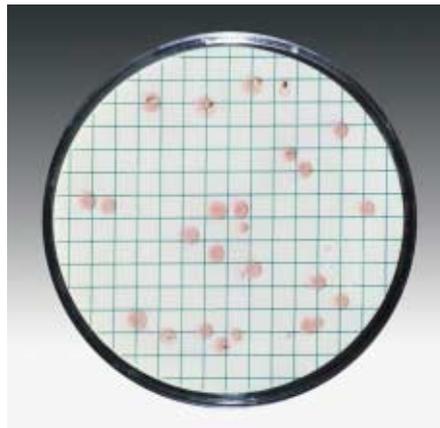
Interprétation

Les coliformes forment des colonies rouges avec ou sans halo jaune. Les colonies d'*E. coli* et *Enterobacter* aérogènes sont oranges à jaunes avec un halo jaune. Ce milieu empêche la prolifération des *Proteus*.

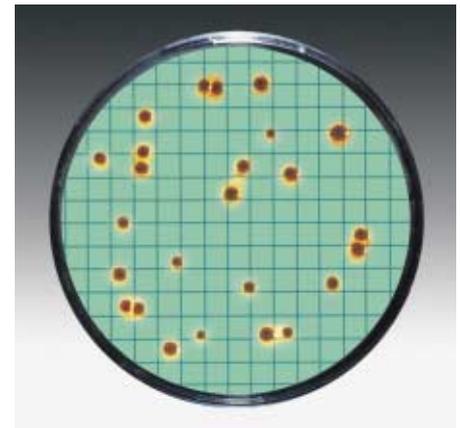
E. coli et Coliformes



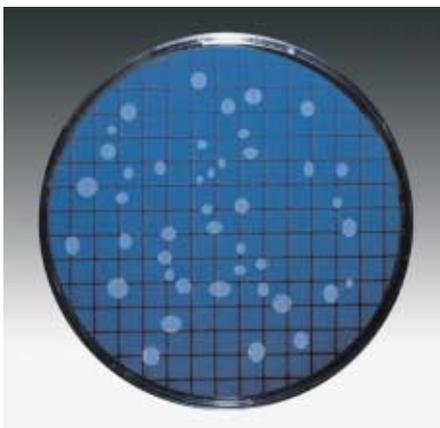
Escherichia coli



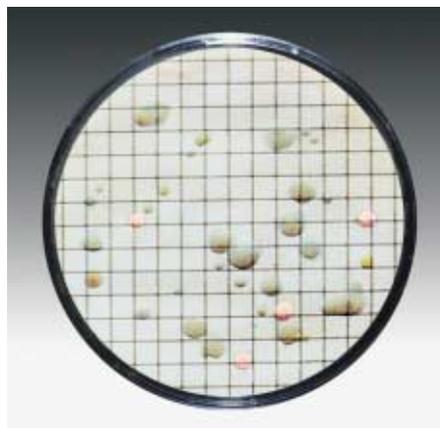
Escherichia coli



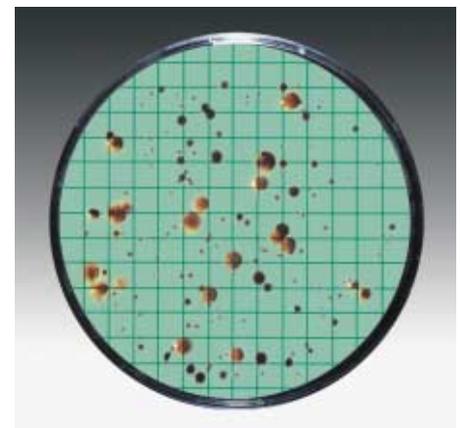
Escherichia coli



Colonies fluorescentes d'*E. coli* sous lampe UV



E. coli et Coliformes d'une eau de rivière



E. coli et Coliformes d'une eau résiduaire

Description et exemples de résultats

NKS Moût

Référence 14058

Permet de mettre en évidence les levures et moisissures selon la pharmacopée allemande. Ce milieu pourra être utilisé entre autres pour le contrôle de la qualité et de la production dans l'industrie alimentaire, pharmaceutique et cosmétique.

Membrane filtrante

Réf. 13005 (0,65 micron ; grise quadrillée blanche)

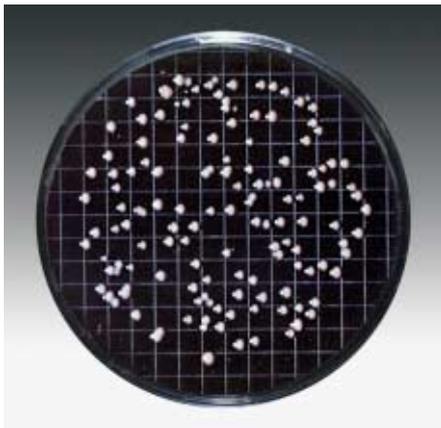
Conditions d'incubation

2-3 jours à 25 °C

Interprétation

La plupart des levures forment des colonies lisses blanches ou légèrement teintées. La plupart des moisissures forment des colonies veloutées ou cotonneuses, celles-ci sont blanches au début, puis peuvent prendre différentes couleurs après formation des conidies.

Levures et moisissures



Saccharomyces cerevisiae

NKS Schaufus-Pottinger

a) Référence 14070 c) Référence 14080
b) Référence 14072 d) Référence 14083

Permet de mettre en évidence et de dénombrer les levures et moisissures dans les boissons et les sirops, d'après Schaufus et Pottinger.

Membrane filtrante

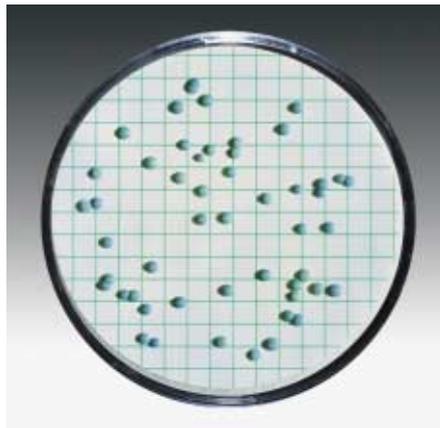
a) Réf. 13905 (0,65 micron ; blanche quadrillée verte)
b) Réf. 13903 (1,2 micron ; blanche quadrillée verte)
c) Réf. 13004 (0,8 micron ; grise quadrillée blanche)
d) Réf. 13005 (0,65 micron ; grise quadrillée blanche)

Conditions d'incubation

2-3 jours à 28-30 °C

Interprétation

Les moisissures se développent sous forme de colonies veloutées ou sous forme de tampon de ouate blanchâtre ou verdâtre qui, après formation de conidies, peuvent prendre différentes couleurs. Les levures et les colonies bactériennes ont une surface lisse. La couleur des bactéries qui fermentent le sucre et qui favorisent les dépôts d'acide varie du blanchâtre au jaunâtre. En revanche, la couleur des bactéries qui ne favorisent pas les dépôts d'acide varie du verdâtre au bleu verdâtre.



Torula lipolytica

NKS Sabouraud

Référence 14069

Il permet la culture de levures et moisissures, bactéries acido-tolérantes et acidophiles. De plus, il met en évidence les levures et moisissures dans les boissons et jus de fruits, lors du contrôle de stérilité en industrie pharmaceutique, et lors de l'isolement des champignons et des levures pathogènes de la peau (USP XXV).

Membrane filtrante

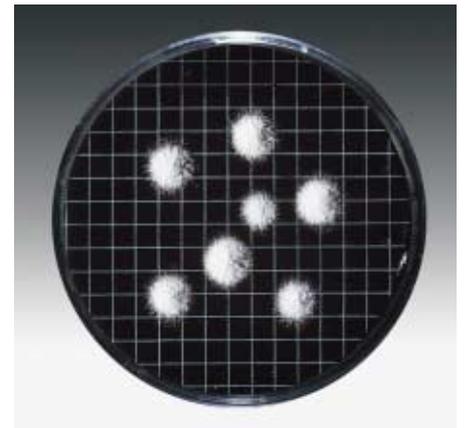
Réf. 13005 (0,65 micron ; grise quadrillée blanche)

Conditions d'incubation

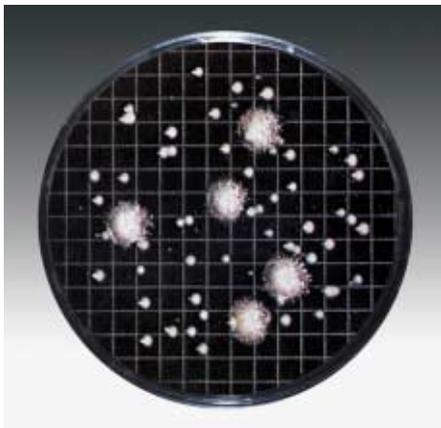
2-5 jours à 25-30 °C

Interprétation

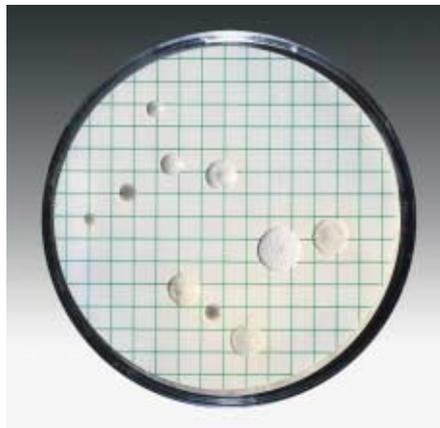
La plupart des levures forment des colonies lisses, blanches ou colorées. La plupart des moisissures forment des colonies veloutées ou cotonneuses.



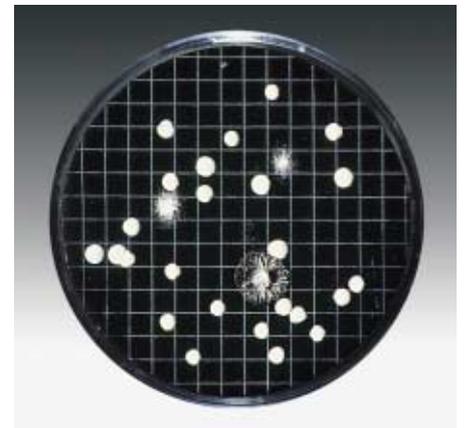
Alternaria humicola



Levures et moisissures des bières dégradées



Différentes colonies provenant d'une limonade



Levures et moisissures d'un sirop pour la toux

Description et exemples de résultats

NKS Extrait de malt

Référence 14086

Milieu pour la détermination des levures et des moisissures, recommandé par l'AOAC et l'APHA. Spécialement pour l'utilisation dans le secteur des boissons et des denrées alimentaires.

Membrane filtrante

Réf. 13005 (0,8 micron ; grise quadrillée blanche)

Conditions d'incubation

2-3 jours à 25-30 °C, ou modifié en fonction de la détermination

Interprétation

Les levures se développent habituellement sous forme de colonies blanches, rarement colorées. Les moisissures forment généralement au début des colonies blanches veloutées ou cotonneuses qui ensuite peuvent prendre différentes couleurs après formation des conidies. La faible valeur de pH empêche la croissance de bactéries.

NKS Azide

Référence 14051

Met en évidence les entérocoques d'après Slanetz et Bartley. Les entérocoques sont les germes indicateurs d'une contamination d'origine fécale. Du fait qu'ils sont moins sensibles aux produits chimiques qu'E. coli, ils sont détectables plus longtemps dans les eaux résiduaires et les eaux chlorées.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

24-48 heures à 37 °C

Interprétation

Les entérocoques apparaissent sous forme de petites colonies (1 mm de diamètre) rouges à rouge marron et à bord lisse.

NKS Sulfite de bismuth

Référence 14057

Milieu de culture sélectif pour mettre en évidence les salmonelles dans l'eau, dans les denrées alimentaires et dans la nourriture pour animaux d'après Wilson and Blair, recommandé par l'USP 25. Si une très légère contamination à la salmonelle est suspectée, il est conseillé de préparer une culture enrichie avec du bouillon au sélénite ou au tétrathionate de potassium et ensuite d'étaler (stries avec un ensemenceur) l'échantillon sur la membrane filtrante du NKS.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée verte)

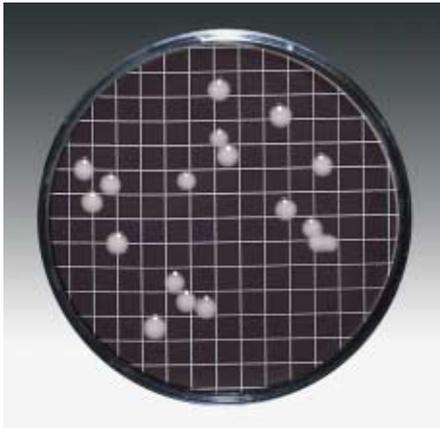
Conditions d'incubation

18-48 heures à 37 °C

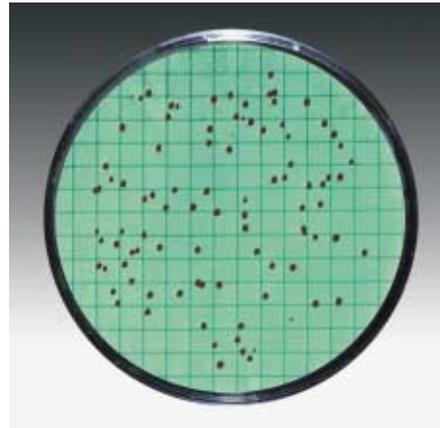
Interprétation

La plupart des salmonelles forment des colonies légèrement colorées avec un centre marron à noir entouré d'une auréole noire avec un reflet métallique («œil de poisson»). Certaines espèces de salmonelles se développent uniformément sous forme de colonies marron foncé à noires où l'auréole peut manquer.

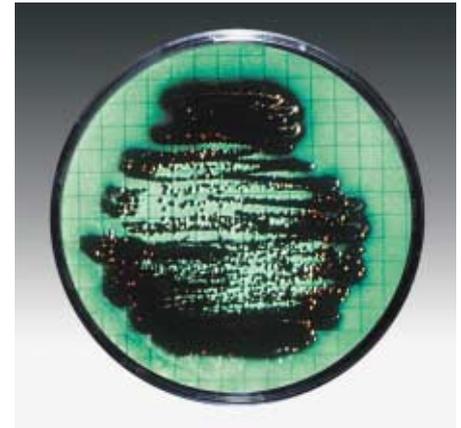
Levures et moisissures



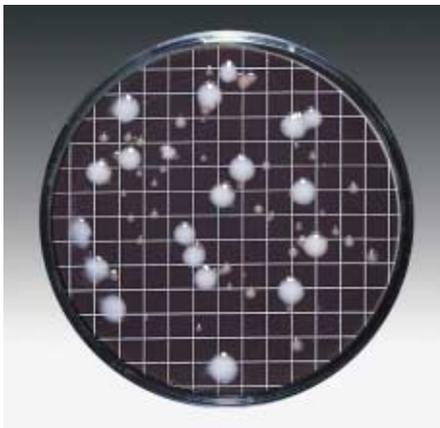
Saccharomyces cerevisiae



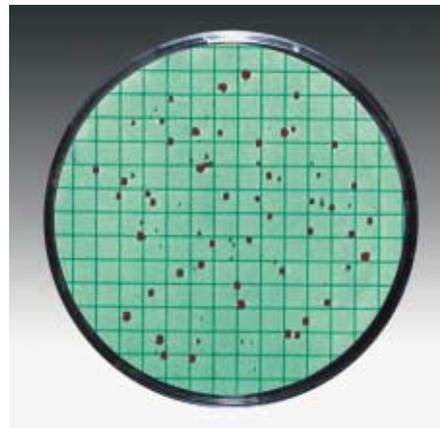
Streptococcus faecalis



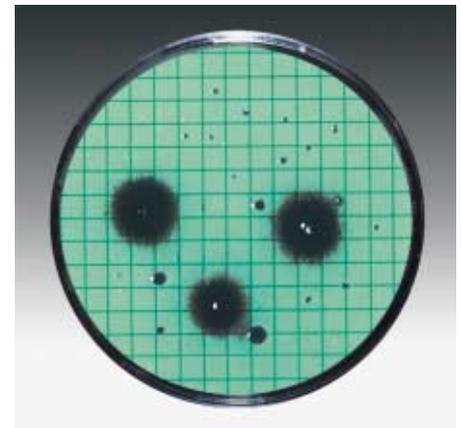
Salmonella typhosa, stries



Différentes colonies de Saccharomyces et de Rhodotorula



Streptocoques d'une eau résiduaire



Salmonelles d'une eau résiduaire

Description et exemples de résultats

NKS VLB-S7-S Référence 14059

Permet de mettre en évidence les pédiocoques et lactobacilles pour le contrôle microbiologique en brasserie d'après Emeis, modifié Rinck et Wackerbauer.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

Anaérobie (microaérophilie) 2-3 jours à 25-28 °C pour la mise en évidence rapide des microcolonies (dénombrement au microscope), 5-7 jours pour le développement de colonies macroscopiques.

Interprétation

Les pédiocoques forment de petites colonies rondes (1 mm de diamètre) à contour net et de couleur vert pâle. Les lactobacilles se présentent sous forme de colonies vert clair au début puis vert foncé. Leur diamètre est d'environ 2 mm. Leur contour est irrégulier et frippé.

NKS Sérum Orange

a) Référence 14062
b) Référence 14096 (pH 3,2)

Met en évidence les germes acido-tolérants, d'après «Methods for the Microbiological Examination of Foods (1966) de l'APHA».

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

En aérobie ou anaérobie (microaérophilie), 2-3 jours à 25-28 °C

Interprétation

Ce milieu permet de faire une culture spécifique des germes acido-tolérants telle que la microflore des jus de fruits. Les microorganismes les plus fréquents sont les lactobacilles, Leuconostoc, Bacillus, levures et moisissures.

NKS Lysine

Référence 14061

Milieu sélectif pour la mise en évidence des «levures sauvages» en brasseries selon Morris et Eddy.

Membrane filtrante

Réf. 13805 (0,65 micron ; verte quadrillée vert foncé)

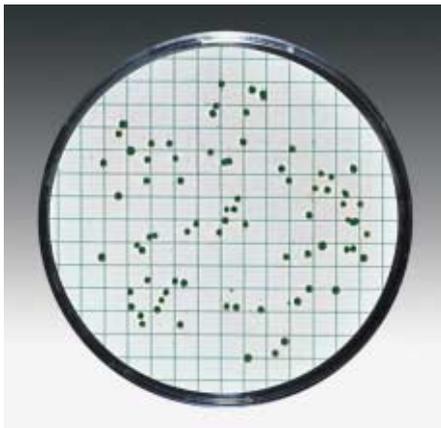
Conditions d'incubation

En aérobie, 2-5 jours à 25-28 °C

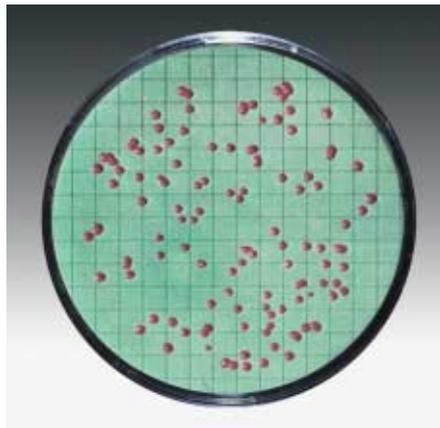
Interprétation

Seules les «levures sauvages» dégradant la lysine peuvent se développer sur ce milieu. Elles forment pour la plupart des colonies blanches ou crème.

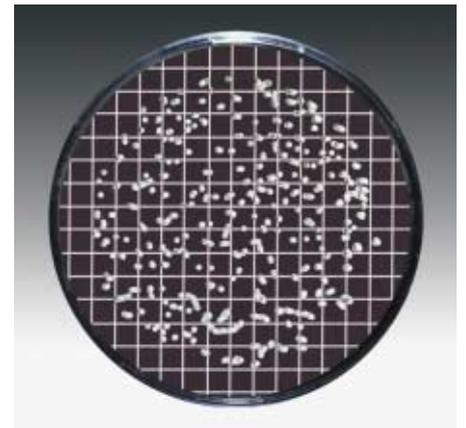
Contaminants divers



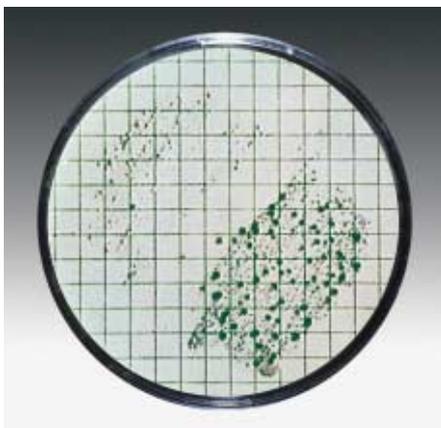
Lactobacillus pastorianus



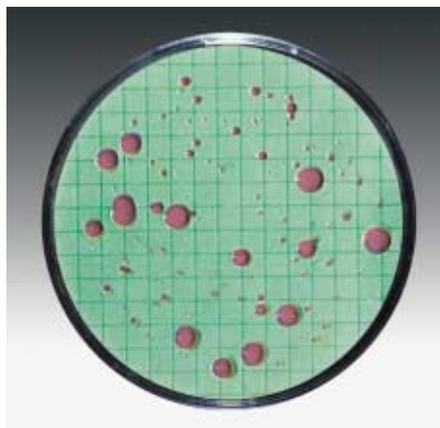
Rhodotorula spec.



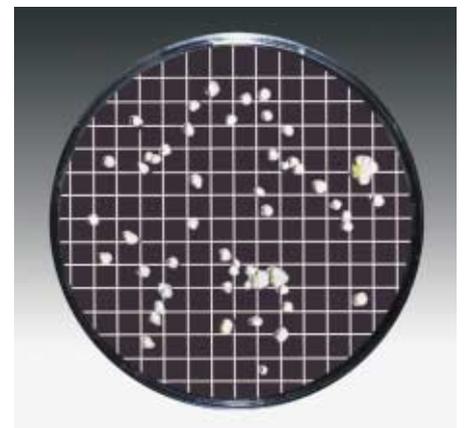
Torulopsis spec.



Lactobacilles et pédiocoques provenant de sédiment, stries



Différentes colonies provenant d'un jus de fruit



«Levures sauvages» de bière stockée

Description et exemples de résultats

NKS Weman Référence 14065

Permet la recherche et le dénombrement des colonies de bactéries mésophiles favorisant les dépôts mucilagineux, selon Wemann, modifié (Lorenz, S., 1961 : Zucker, 14).

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

2-3 jours à 28-30 °C

Interprétation

Une partie des colonies de bactéries mésophiles favorisant les dépôts mucilagineux ont un diamètre supérieur à 5 mm, elles sont lisses, rondes et souvent incolores, transparentes ou translucides.

NKS Jus de tomate Référence 14079

Permet de mettre en évidence les bactéries (lactobacilles, leuconostoc, pédiocoques entre autres) causant l'altération du vin et des jus de fruits d'après Dubois, Bindan et Lafon-Lafourcade.

Membrane filtrante

Réf. 13806 (0,45 micron ; verte quadrillée vert foncé)

Conditions d'incubation

Microcrophilie 4-6 jours à 25-30 °C (un contrôle supplémentaire après 10 jours est nécessaire pour pouvoir également dénombrer les bactéries qui se développent plus lentement).

Interprétation

Les lactobacilles forment des colonies compactes, de couleur blanche à jaune pâle d'un diamètre de 1 à 3 mm. Les pédiocoques sont légèrement plus petites d'environ 1 mm de diamètre, et de couleur blanchâtre à marron pâle. *Leuconostoc oenos* forme des colonies incolores à blanches de diamètre inférieur à 1 mm.

NKS Glucose tryptone Référence 14066

Permet la recherche et le dénombrement des germes mésophiles et thermophiles sporulants dans les denrées alimentaires d'après Williams. On utilisera des boîtes de Petri hermétiquement closes. Ce milieu est recommandé par la NCA (National Canners Association, USA 1956) et l'ICUMSA (International Commission for Uniform Methods of Sugar, 1974).

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; banche quadrillée verte)

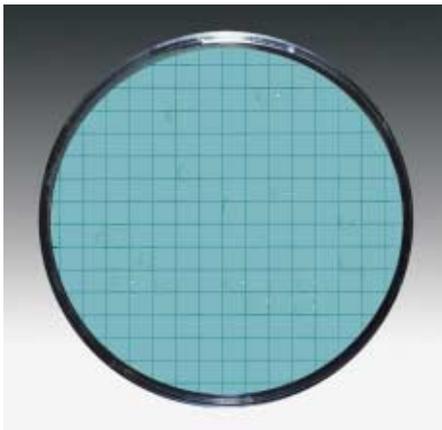
Conditions d'incubation

Germes mésophiles : 2-3 jours à 28-30 °C.
Germes thermophiles sporulants : 1-2 jours à 55 °C

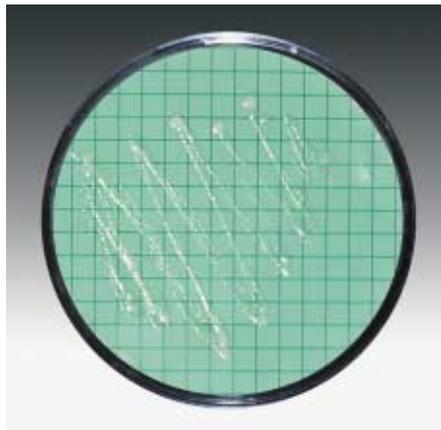
Interprétation

Les germes qui fermentent le glucose et forment de l'acide, se développent sous forme de colonies jaunes à vertes. Les colonies typiques «Flat sour» (*Bacillus coagulans*, *Bacillus stearothermophilus*) ont un diamètre de 2-5 mm, sont rondes avec un bord lisse, de couleur jaune verdâtre avec halo jaune.

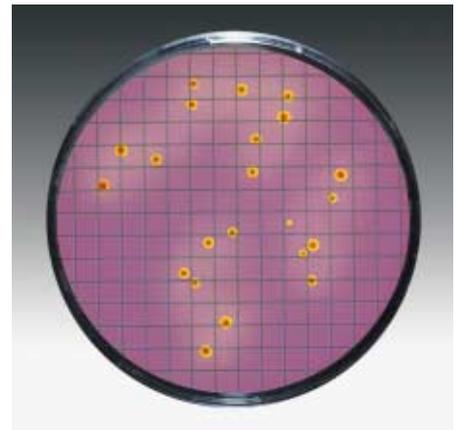
Contaminants divers



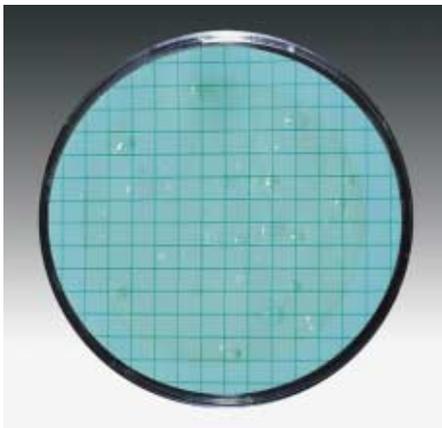
Leuconostoc mesenteroides



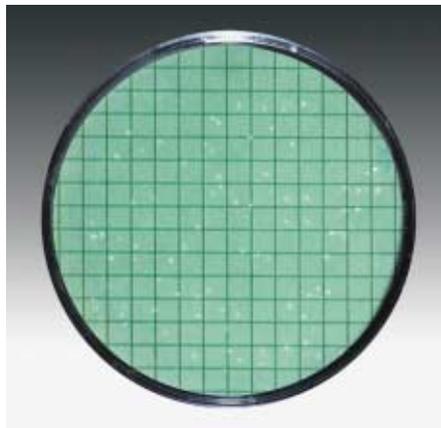
Bactéries lactiques, stries



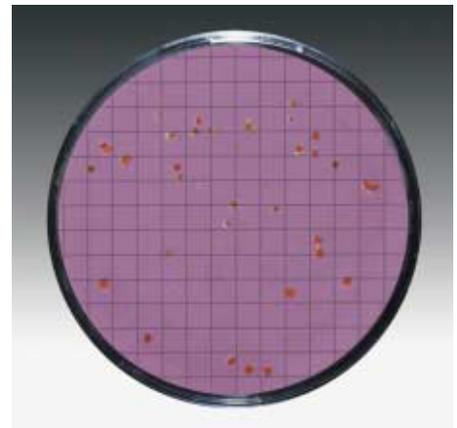
Bacillus coagulans



Différentes colonies à partir d'un sirop de sucre



Leuconostoc oenos provenant de vin



Différentes colonies d'une conserve de légumes

Description et exemples de résultats

Chapman-NKS

Référence 14074

Milieu au mannitol-chlorure de sodium-rouge de phénol qui met en évidence les staphylocoques pathogènes dans les denrées alimentaires et autres produits selon Chapman (1945), modifié. Recommandé par l'USP et l'APHA.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; blanche quadrillée verte)

Conditions d'incubation

48 heures à 37 °C

Interprétation

Les *Staphylococcus aureus* forment des colonies dont la couleur varie entre le jaune d'or et l'orange avec un halo jaune (mannitol positif). Les *Staphylococcus epidermidis* forment des colonies blanchâtres.

NKS Cétrimide

Référence 14075

Permet la recherche et le dénombrement des *Pseudomonas aeruginosa* selon Lowbury (1951). Ce milieu suit les recommandations de l'USP et de l'APHA.

Membrane filtrante

Réf. 13906 (0,45 micron ; banche quadrillée verte)

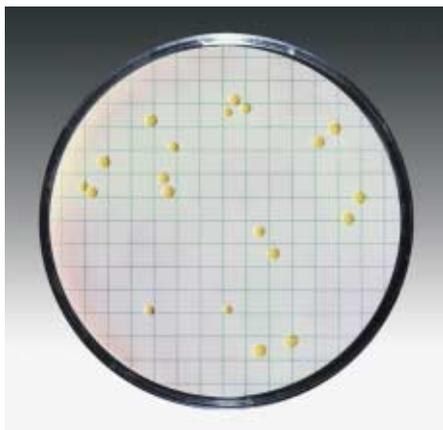
Conditions d'incubation

48 heures à 37 °C

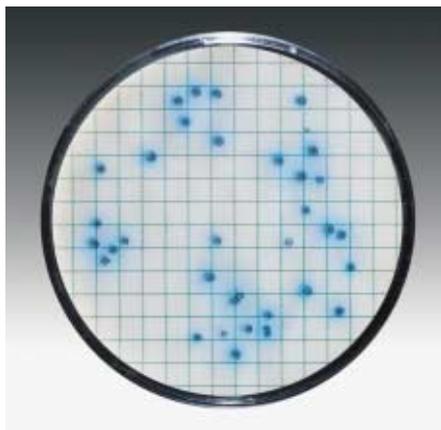
Interprétation

Les *Pseudomonas aeruginosa* forment en général des colonies de couleur bleue de 1 à 2 mm de diamètre avec un halo bleu. Il arrive qu'il y ait des colonies bleu gris, jaune vert ou incolores. D'autres *Pseudomonas* forment des colonies blanchâtres.

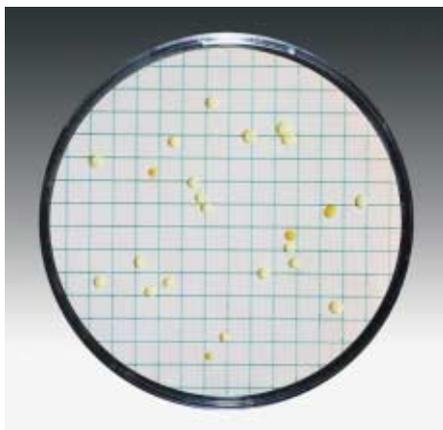
Contaminants non fécaux



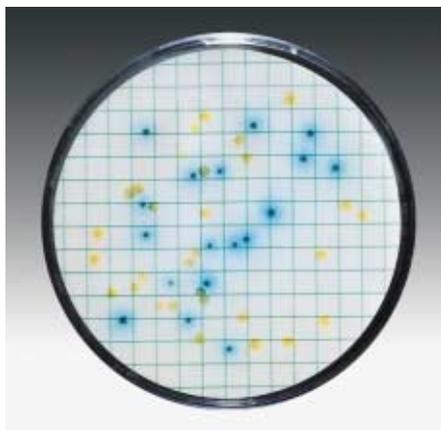
Staphylococcus aureus



Pseudomonas aeruginosa



Différents types de staphylocoques

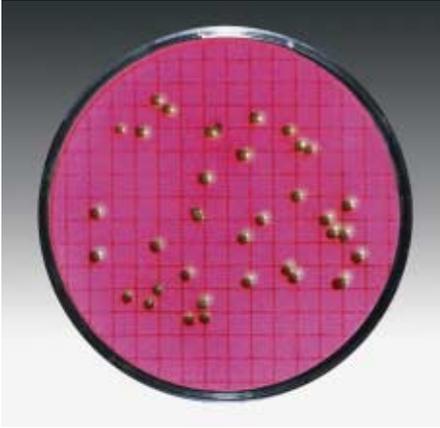


Différents types de *Pseudomonas*

Comparaison de croissance

Une variation trop importante dans la répartition de la taille des pores peut limiter l'apport en substances nutritives.

Croissance de *E. coli* sur NKS endo



Membrane Sartorius en nitrate de cellulose

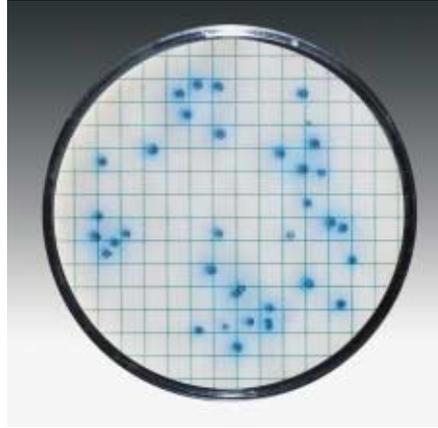


Membrane en mélange d'esters

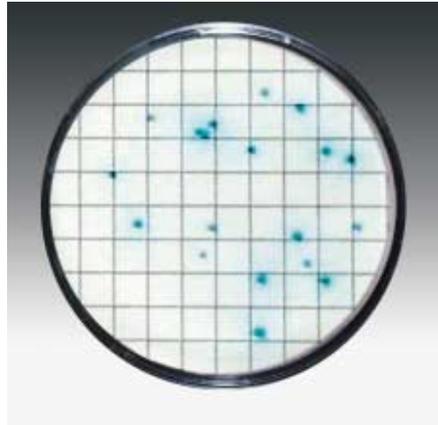
E. coli ne présente pas de reflet métallique sur la membrane en mélange d'esters. Dans ce cas, il est très difficile de faire la différence entre *E. coli* et des coliformes sans tests supplémentaires. La couleur rouge du filtre montre que les colonies se répandent. Une conclusion quantitative est difficile.

La taille des pores n'est pas uniquement un critère significatif. Un essai comparatif de la membrane en nitrate de cellulose avec une membrane en mélange d'esters révèle des différences de croissance significatives.

Croissance de *Pseudomonas aeruginosa* sur NKS cétrimide



Membrane Sartorius en nitrate de cellulose



Membrane en mélange d'esters

Les *Pseudomonas* se développent sous forme de colonies bleues avec un halo bleu facile à reconnaître sur la membrane Sartorius en nitrate de cellulose. Sur la membrane en mélange d'esters, on constate qu'il y a moins de colonies qui se forment et qu'en grande partie elles n'ont pas de halo bleu. Une variation trop importante dans la répartition de la taille des pores peut limiter l'apport en substances nutritives. Cela peut entraîner des résultats faussement négatifs.

Les erreurs possibles

De mauvaises manipulations peuvent fausser les résultats.

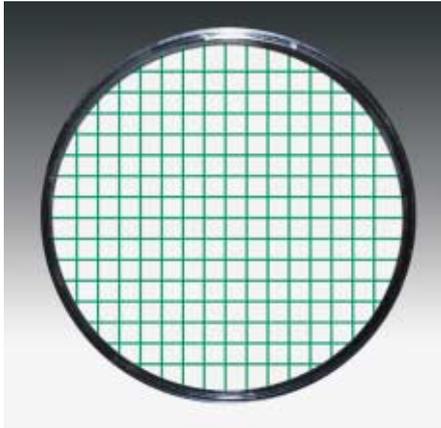
1. Pousse inhibée, petites colonies : le disque en carton n'a pas été suffisamment imbibé : le volume d'eau nécessaire à l'humidification du carton est insuffisant.
2. Colonies noyées : carton trop humidifié, film d'eau sur la membrane. Le volume d'eau est trop important sur le NKS. Les colonies de germes mobiles (*Bacillus*, *Proteus*, etc. ...) s'écoulent souvent, même avec une humidification correcte. Un enrichissement en NaCl (émulsifiant) empêche ce phénomène.
3. Contamination par le bas : pousse des colonies inhibée, trouble de l'excédent d'eau, changement fréquent de couleur du disque en carton :
 - a) Face quadrillée posée vers le bas.
 - b) Non stérilité de la solution d'humidification.
 - c) Infection pendant la préparation (infection par l'air ou par contact).
 - d) Contamination de la membrane filtrante par des germes qui n'ont pas été totalement aspirés à la fin de la filtration ou à cause d'une boîte de Petri inclinée.
 - e) Support filtre non stérile.
 - f) Pincettes brucelles non stériles.
4. Pousse partielle : position inclinée de la boîte de Pétri dans l'incubateur.
5. Répartition des germes sur la membrane trop dense ou trop faible (optimum entre 20 et 200 germes par filtre) : mauvaise dilution ou mauvais choix de la quantité à filtrer.
6. Répartition non uniforme sur la membrane : échantillon de moins de 5 ml filtré sans addition d'un diluant ou mélange insuffisant avec le diluant stérile.

Membranes filtrantes pour l'utilisation sur milieux nutritifs gélosés ou sur NKS

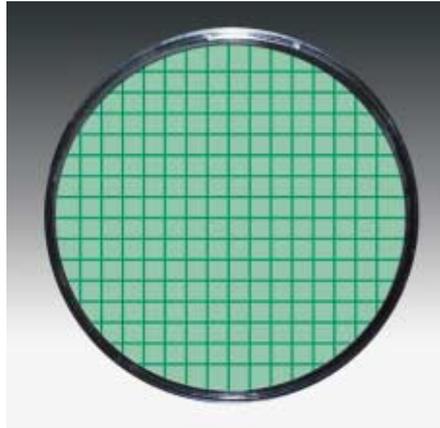
Si, à la place des NKS, vous utilisez des milieux gélosés ou des disques de carton à imbiber avec des milieux de culture liquides, nous vous recommandons de vous servir des types de membranes suivants. Il ne doit évidemment pas y avoir de germes sur les membranes que vous utilisez. Vous pourrez donc, soit les faire bouillir, soit les autoclaver. Il est cependant plus facile et plus pratique de se servir de membranes pré-stérilisées et emballées individuellement (voir le tableau).

Préfiltres en nitrate de cellulose

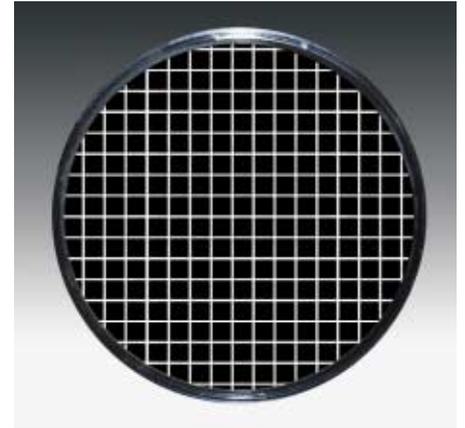
La membrane filtrante blanche Réf. 11301 avec des pores de 8 µm sert de préfiltre lors de recherches bactériologiques et est placée dans un accessoire spécial (Réf. 16807). Cette membrane filtrante, qui retient les grosses particules, laisse passer les micro-organismes. Ces derniers seront arrêtés par la membrane filtrante qui se trouve en dessous.



Pour la détection de bactéries dans des milieux contenant des colorants.



Vous obtiendrez un contraste optimal pour les colonies de bactéries claires ou transparentes lors du dénombrement des germes.



Mise en évidence de levures et de moisissures.

Taille des pores	Couleur de la membrane	Couleur du quadrillage	Référence des membranes en emballage individuel stérile*	
			Paquet de 100 unités	Paquet de 1000 unités
0,45 µm	blanche	verte		13906-050 ACR**
0,45 µm	verte	vert foncé	13806-050 ACN**	13806-050 ACR**
0,45 µm	verte	blanche	13006-050 ACN**	13006-050 ACR**
0,65 µm	grise	blanche	13005-050 ACN**	13005-050 ACR
0,8 µm	grise	blanche	13004-050 ACN**	-
8 µm	blanche	-	11301-050 ACN**	-

* Egalement disponible en emballage, non stérile.

Référence identique. Cependant : pour les paquets de 100, remplacer ACN par N, pour les paquets de 1000, remplacer ACR par R.

** Egalement disponible en diamètre 47 mm.

Accessoires



Référence : 16201 Support de filtre
16692 Pompe à vide



Référence : 16612 Pompe à vide
16610 Flacon de Woulff



Référence : 16807 Entonnoir en acier inoxydable avec
dispositif de préfiltration



Référence : 16842 Rampe 3 postes en acier inoxydable
16401-47-06-K Biosart 100



Référence : 16842 Rampe 3 postes en acier inoxydable
16407-25-ALK Biosart 250



Référence : 16843 Rampe 6 postes en acier inoxydable



Référence : FDIEAUSTER134N Eau stérile



Référence : 17649 Stylo compteur de colonies



Référence : 15410-47-ALR Cartons adsorbants



Référence : 16757 MD8 AirPort pour le contrôle
microbiologique de l'air



Référence : 16746 MD8 Airscan pour le contrôle
microbiologique de l'air



Référence : 16671 Incubateur anaérobie

Guide d'achat

Un paquet standard contient 100 milieux de culture sur carton stériles, 10 sachets de 10 boîtes de Pétri, et 100 membranes en emballage individuel stérile.

Les milieux de culture sur carton sont des milieux de culture déshydratés stériles d'un diamètre de 50 mm. Dès qu'ils sont humidifiés avec 3–3,5 ml d'eau stérile déminéralisée ou distillée, ils sont prêts à l'emploi.

Les membranes filtrantes sont conçues pour répondre aux exigences particulières de la détection microbiologique. Elles sont disponibles avec un diamètre de 50 mm (voir tableau ci-dessous) ou de 47 mm (même référence que pour 50 mm, mais remplacer 50N par 47N).

Type de NKS	Référence	Pour la détermination de...	Types de membrane (Seuil de rétention, Couleur/quadrillage)	Références
Azide	14051-47 N	Entérocoques	0,45 µm, vert/vert	*3, 20
Caso	14063-47 N	Dénombrement des germes totaux	0,45 µm, vert/vert	*2, 3, 5, 9, 10, 12, 18, 19, 20
Cétrimide	14075-47 N	Pseudomonas aeruginosa	0,45 µm, vert/vert	*5, 6, 9, 10, 19, 20
Chapman	14074-47 N	Staphylococcus aureus	0,45 µm, blanc/vert	*3, 10, 19
Chromocult	14087-47 N	E. coli et bactéries coliformes	0,45 µm, blanc/noir	
ECD	14082-47 N	Escherichia coli	0,45 µm, blanc/vert	*3, 6, 15, 18
Endo	14053-47 N	Escherichia coli et coliformes	0,45 µm, blanc/vert	*3, 14, 18
Extrait de levure	14790-47 N	Dénombrement des germes totaux	0,45 µm, vert/vert	*3
Extrait de malt	14086-47 N	Levures et moisissures	0,8 µm, gris/blanc	*2, 3, 13
Glucose tryptone	14066-47 N	Bactéries mésophiles et bactéries thermophiles sporulantes	0,45 µm, blanc/vert	*2, 11, 13
Jus de tomate	14079-47 N	Bactéries causant une altération	0,45 µm vert/vert	
Lysine	14061-47 N	Levures sauvages	0,65 µm, vert/vert	
Mac Conkey	14097-47 N	Entérobactéries	0,45 µm, blanc/vert	*2, 3, 5, 9, 15, 18, 19
Moût	14058-47 N	Levures et moisissures	0,65 µm, gris/blanc	
M-FC	14068-47 N	E. coli et bactéries coliformes	0,45 µm, blanc/vert	*3, 10, 14, 18
Sérum à l'orange	14062-47 N	Micro-organismes acido-tolérants	0,45 µm, vert/vert	*3, 13, 17
Sérum à l'orange pH 3,2	14096-47 N	Micro-organismes acido-tolérants	0,45 µm, vert/vert	
R2A	14084-47 N	Dénombrement des germes totaux	0,45 µm, vert/vert	*3, 9
Sabouraud	14069-47 N	Levures et moisissures	0,65 µm, gris/blanc	*3, 9, 19, 20
Schaufus Pottinger	14070-47 N	Levures et moisissures	0,65 µm, blanc/vert	*19
	14072-47 N	Levures et moisissures	1,2 µm, blanc/vert	*19
	14080-50 N	Levures et moisissures	0,8 µm, gris/blanc	*19
	14083-47 N	Levures et moisissures	0,65 µm, gris/blanc	*19
Standard	14064-47 N	Dénombrement des germes totaux	0,45 µm, vert/vert	*3
Standard TTC	14055-47 N	Dénombrement des germes totaux	0,45 µm vert/vert	*3
Sulfite de bismuth	14057-47 N	Salmonelles	0,45 µm, vert/vert	*1, 2, 3, 6, 10, 12, 14, 18, 19, 20
Teepol	14067-47 N	E. coli et bactéries coliformes	0,45 µm, blanc/vert	*1, 2, 4, 8, 10, 14, 18, 19
Tergitol TTC	14056-47 N	E. coli et bactéries coliformes	0,45 µm, blanc/vert	*14, 20
VLB-S7-S	14059-47 N	Lactobacilles et pédiocoques	0,45 µm, vert/vert	*7, 16
Weman	14065-47 N	Bactéries mucilagineuses	0,45 µm, vert/vert	*11

Références NKS

* 1 = AFNOR

Association Française de Normalisation

2 = AOAC

Association of Official Analytical Chemists

3 = APHA

American Public Health Association

4 = BS

British Standards

5 = DAB

Deutsches Arzneibuch

6 = DIN

Deutsches Institut für Normung

7 = EBC

European Brewery Community

8 = EPA

Environmental Protection Agency

9 = EP

European Pharmacopeia

10 = FDA

Federal Drug Administration

11 = ICUMSA

International Commission for Uniform Methods of Sugar Analysis

12 = IDF

International Dairy Federation

13 = IFU

14 = ISO

International Standards Organisation

15 = LMBG

Lebensmittel- und Bedarfsgegenstände-gesetz der Bundesrepublik Deutschland, Bundesgesundheitsamt

16 = MEBAK

Mitteleuropäische Brauereitechnische Analysenkommission

17 = SMWW

Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater

18 = USDA

US Department of Agriculture

19 = USP

US Pharmacopeia

20 = TVO

Verordnung über Trinkwasser und über Wasser für Lebensmittelbetriebe

Sartorius S.A.
4, rue Emile Baudot
91127 Palaiseau, France

Phone +33.1.69192100
Fax +33.1.69200922

www.sartorius.com

Sous réserve de modifications techniques.
Imprimé en Allemagne sur papier non blanchi
au chlore.
W/sart-119a - G
N° de publication : SM-4017-f03111
Référence : 85030-519-46