

**REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE**  
**MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE**  
**Université d'Oran des Sciences et de la Technologie Mohamed Boudiaf USTO-MB**

**Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie**  
**Département du Vivant et de L'environnement**



## **Cours: Technique de contrôle microbiologique**

**A l'usage des étudiants de 3ème Année Licence**

**Spécialité : Microbiologie**

**Présenté par : Dr. MERZOUK Yamina**

(Enseignante-chercheuse à l'Université d'USTO-MB-)

**2021-2022**

## **Préambule**

La recherche de la qualité au sens large est actuellement une préoccupation fondamentale pour l'industrie agroalimentaire. La qualité se définit à partir de système de référence, exemple : normes, labels, appellation. Elle s'obtient par l'application de procédures bien définies et maîtrisées. Elle se contrôle par des systèmes de vérification et des techniques d'analyses standardisées. Au niveau microbiologique, l'hygiène est une donnée fondamentale. Les objectifs de la sécurité servent à identifier et valider la nature et l'efficacité des suivis de fabrication, tels que surveillance renforcée à certains points critiques de maîtrise, et d'investigations microbiologiques approfondies. L'ensemble de ces activités visant à réduire la variabilité des résultats obtenus et la probabilité de mettre sur le marché des produits non satisfaisants. Dans ce contexte l'analyse microbiologique des produits finis reste indispensable, car elle permet avec une certaine inertie d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation. Ce type de contrôles est souvent pratiqué par des laboratoires officiels.

## Table des matières

Listes des abréviations	
Listes des figures	
Listes des tableaux	
Introduction.....	01
I- Objectifs du contrôle microbiologique.....	02
I.1 - Définition de la qualité.....	02
I.1.1 Qualité hygiénique.....	02
a. Infections alimentaires.....	03
b. Toxi-infections alimentaires.....	03
c. Intoxications alimentaires.....	03
I.1.2 Qualité technologique.....	04
II. Politique de contrôle.....	04
II.1 Niveaux de contrôle.....	04
II.2 Fréquence des contrôles.....	04
II.3 Paramètres à contrôler.....	05
II.3.1 Microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique.....	05
a. Bactéries pathogènes.....	05
b. Bactéries témoins de contamination.....	05
II.3.2 Microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande.....	05
II.4 Méthodes de contrôle.....	06
II.4.1 Techniques microbiologiques de culture.....	06
II.4.2 Techniques microscopiques.....	06
II.4.3 Techniques microbiologiques.....	06
III. Prélèvement, transport et préparation des échantillons.....	06
III.1 Les aliments solides.....	07
a. Prélèvement en bateau.....	07
b. Prélèvement dans les citernes (Wagons ou dans des camions).....	07

III.2 Les aliments liquides.....	08
III.3 Échantillonnage en surface.....	09
III.4 Techniques de dilution.....	10
IV. Techniques classiques de numération des microorganismes.....	12
IV.1 Numération microscopique.....	12
a. Utilisation des cellules à numération.....	12
b. La méthode de Breed.....	13
c. Technique de filtration à épifluorescence directe (DEFT).....	14
d. Numération après passage sur un milieu d'enrichissement.....	14
IV. 2 Numération sur milieu solide.....	15
a. Dans la masse (pour plate).....	15
b. Étalement en surface (spread plate) .....	15
c. Étalement en surface en spirale (spiral plate) .....	15
d. Filtration sur membrane.....	15
e. Dénombrement par culture en milieu solide.....	16
IV.3 Numération sur milieu liquide.....	19
V Techniques récentes de numérations.....	22
V.1 la methode ELISA de type sandwich.....	23
V.2 L'immunoséparation magnétique et l'IMS-ELISA.....	24
V.3 Utilisation de sondes nucléiques.....	25
V.4 Utilisation de l'amplification génique (amplification en chaîne par polymérase (PCA) ou polymerase chain reaction (PCR).....	25
V.5 ATP-métrie.....	26
VI. Identification phénotypique des germes.....	27
VI.1 Caractères cultureux.....	27
VI.2 Caractères morphologiques et structuraux.....	29
a. Coloration de Gram.....	29
b. Coloration de Ziehl-Neelsen (acid-fast stain).....	30
c. Coloration de la capsule .....	30
d. Coloration des endospores (sporulation) .....	30
VI.3 Caractères biochimiques et physiologiques .....	30
a. Demande en O <sub>2</sub> .....	30
a.1 Aérobie strict.....	30

a.2 Anaérobie strict.....	30
a.3 Anaérobie aérotole <span>ra</span> nt.....	30
a.4 Anaérobie facultatif.....	30
a.5 Microaérophile.....	30
b. Oxydation-fermentation est assimilation des sucres .....	31
c. Types fermentaires (tests RM / VP).....	31
d. Accepteurs de l'H <sub>2</sub> .....	32
d.1 La sulfite réduction.....	32
d.2 La réduction des nitates.....	32
e. Enzymes respiratoire .....	32
e.1 Catalase.....	32
e.2 Cytochrome oxydase.....	32
f. Dégradation des acides aminés .....	33
f.1 TDA, Tryptophanase et PDA.....	33
f.2 L'Ornithine-Décarboxylase (ODC), la Lysine-Décarboxylase (LDC) et l'Arginine-Décarboxylase (ADH).....	34
g. Dégradation du lactose ONPG.....	34
h. Dégradation de l'urée Uréase .....	34
i. Caractères biochimiques et physiologiques divers .....	34
i.1 Mobilité.....	34
i.2 Températures de croissance, halophilie-osmophilie et Ph.....	34
i.3 Résistance aux antibiotiques et aux inhibiteurs.....	34
i.4 Caractères immunologiques (sérologique).....	35
i.5 Pouvoir pathogène .....	35
- Coagulase.....	35
- Hémolysines $\alpha$ , $\beta$ et $\gamma$ .....	36
- ADNase.....	36
i.6 Galeries API.....	37
- Choix de la galerie.....	37
- Technique.....	38
VII. Réalisation du contrôle.....	39
VII.1 Contrôle des matières premières .....	39
V.II.2 Contrôle de la fabrication Dans les industries de fermentation.....	40

VII.3 Contrôle du nettoyage et de la désinfection .....	40
VII.4 Contrôle des produits finis.....	41
Conclusion.....	43
Références bibliographiques.....	44

## Liste Des Abréviations

**AFNOR** : Association Française de Normalisation

**ISO** : Organisation Internationale de Normalisation

**NA** : Norme Algérienne

**H%** : Teneur en eau

**MS%** : Matière sèche

**pH** : Potentiel d'hydrogène

$2\sqrt{\quad}$  : Racine carrée

$3\sqrt{\quad}$  : Racine cubique

**SM** : Solution mère

**DM** : Dilution mère

**G** : Gramme

**ml** : Millilitre

**mm** : Millimètre

**mm<sup>3</sup>** : Millimètre cube

**cm<sup>2</sup>** : Centimètre cube

**min** : Minute

**s** : Seconde

**DEFT** : Direct Epi- fluorescent Filter Technique

**UFC** : unité formant colonie

**NPP** : Nombre le plus probable

**BAAR** : Bacilles Acido Alcoolo Résistants

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>** : Eau oxygénée

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**CO<sub>2</sub>** : Dioxyde de carbone

**C** : Carbone

**TSE** : Tryptone sel eau

**VF** : Gélose viande foie

**PCR** : Amplification *in vitro* de l'ADN (Polymerase Chain Reaction)

**BCPL** : Bromocresol Purple Lactosé

**RM-VP** : Rouge de Methyl-Vogs Proskauer

**ONPG** : Ortho-Nitrophényl- $\beta$ -Galactopyranoside

*St* : *Staphylococcus*

*E* : *Enterococcus*

*S* : *Streptococcus*

## Liste des figures

## Liste des tableaux

Titre	Page
<b>Figure 1 :</b> Matériels d'échantillonnage : a. Grande pelle et pelle à main b. et c sonde cylindrique	19
<b>Tableau 1 :</b> Résultats de dénombrement sur milieu solide	08
<b>Tableau 2 :</b> Représentation des résultats de recherche des <i>coliformes totaux</i> dans le lait	20
<b>Figure 2 :</b> Echantillonnages : (a) Boîtes de contact, (b) et (d) lames d'immersion (c) écouvillons.	20
<b>Tableau 3 :</b> Table de Mac Grady de trois tube par dilution donne pour chaque nombre caractéristique le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de la dilution	10
<b>Figure 3 :</b> Protocole expérimental d'une dilution successive de facteur 10.	11
<b>Tableau 4 :</b> Dénombrement sur milieu liquide, cas de la série de deux tubes	21
<b>Figure 4 :</b> Les broyeurs de laboratoire : (a) Broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur électrique à pédale type stomacher, (c) broyeur électrique type mortier et pilon, (d) broyeur électrique type à couteaux	22
<b>Figure 5 :</b> Représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de THOMA (b) cellule de THOMA.	13
<b>Figure 6 :</b> Représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de MALASSEZ. (b) cellule de MALASSEZ	13
<b>Figure 7 :</b> Filtration sur membrane : a. montage de filtration, b. filtre membrane après culture	16
<b>Figure 8 :</b> Compteur de colonies	18
<b>Figure 9 :</b> Culture bactérienne (colonies)	18
<b>Figure 10 :</b> Protocole du test ELISA	24
<b>Figure 11 :</b> Représentation schématique indiquant les différents points où peut être ajoutée l'ADN compétiteur au cours d'un protocole d'isolation d'ADN à partir d'un échantillon environnemental.	26
<b>Figure 12 :</b> Appareil d'ATPmétrie	27
<b>Figure 13 :</b> Représentation schématique des caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne.	29
<b>Figure 14 :</b> Croissance des bactéries selon la demande en O <sub>2</sub> . 1. Aérobic strict ; 2. Aero-anaérobie facultative ; 3. Microaérophile ; 4-anaérobie stricte	31
<b>Figure 15 :</b> Interprétation du types fermentaires (tests RM / VP)	32
<b>Figure 16 :</b> Test de coagulase	36
<b>Figure 17 :</b> Test d'hémolysine (Colonies bêta-hémolytiques de streptocoques du groupe A)	36
<b>Figure 18 :</b> Test ADNase	37
<b>Figure 19 :</b> Guide de choix de la galerie Api (A- Guide pour les bacilles Gram négatif ; B- Guide pour les bacilles Gram positif ; C- Guide pour les cocci Gram positif et négatif).	38



## **Introduction**

Le contrôle microbiologique est l'opération de vérification de la qualité intrinsèque des produits alimentaires et non alimentaires, destinés à la consommation et l'utilisation humaine et animale.

Cette opération est la recherche et le dénombrement des microorganismes d'altération et pathogènes dont la réalisation impose le recours aux méthodes d'analyses en utilisant des milieux de culture, des réactifs et d'autres équipements.

Le but du contrôle est de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande et de minimiser les pertes. Il permet d'éviter la présence de microorganismes pathogènes dans les produits afin de ne pas risquer une altération de la qualité hygiénique des produits finis ou, au moins de détecter ces microorganismes s'ils sont présents dans les produits finis avant leur commercialisation. Une altération de la qualité hygiénique met en cause la santé du consommateur (intoxications alimentaires).

Une altération de la qualité marchande modifie les caractéristiques plastiques et organoleptiques du produit. Elle n'est pas dangereuse mais rend le produit non commercialisable. Elle intervient généralement lentement au cours du stockage (levures osmophiles, par ex.).

Les objectifs visés par cette matière sont la connaissance de l'ensemble des techniques de contrôle des activités microbiennes (examen microbiologique des prélèvements et des liquides biologiques, contrôle de qualité, ...), l'utilisation et l'amélioration de leurs propriétés lorsqu'elles sont bénéfiques (levures, yaourt, antibiotiques, vaccins, ...).

Ce manuscrit débute par une introduction, ensuite il traite la notion qualité et ses deux composantes (hygiénique et marchande), ainsi que la politique qualité.

Après, il décrit le prélèvement, le transport et la préparation des échantillons, une fois terminé, une section est consacrée aux techniques classiques de numération (microscopiques, en milieux solides et en milieux liquides), mais aussi aux techniques de détection rapide, cette dernière est non parfaite sans la section ultérieure traitant l'identification phénotypique des microorganismes en rassemblant les caractères cultureux, morphologiques, biochimiques et physiologiques. Après cela une autre section dévoile le contrôle des matières premières, des levains, de la fabrication, de nettoyage et de la désinfection et des produits finis. Enfin, une section faite aperçu sur la caractérisation et l'évolution de l'analyse microbiologique.

## **I- Objectifs du contrôle microbiologique**

Le contrôle microbiologique des aliments a pour objectifs de contrôler les caractères moins apparents mais fondamentaux d'un produit alimentaire.

### **I.1 - Définition de la qualité**

- La qualité c'est la valeur d'une chose" (langage courant).
- La qualité c'est le degré d'excellence possédé par un produit" (dictionnaire).
- La qualité c'est assurer la conformité d'un produit par rapport à ce qui a été prévu" (entreprise).
- La qualité est inversement proportionnelle à la variabilité des résultats" (statistique).
- La qualité c'est satisfaire les besoins du consommateur" (M. DEMING).
- La qualité c'est l'aptitude d'un produit à satisfaire ses utilisateurs" (AFNOR).
- La qualité c'est l'aptitude d'un ensemble de caractéristiques intrinsèques à satisfaire des exigences" (ISO 9000 : 2005).

Donc l'utilisateur d'un aliment (le consommateur), attend plusieurs satisfactions (besoins, exigences), d'où on a plusieurs composantes (aspects) de la qualité d'un produit alimentaire, qui sont en nombre de huit principales composantes :

- **Les 4 S** (Sécurité : hygiénique, Santé : nutritionnelle, Saveur : organoleptique et Service : usage)
- **Les 2 R** (Régularité et Rêve) ;
- **La T et la E** (Technologique et Etique).

#### **I.1.1 Qualité hygiénique**

L'absence de microorganismes pathogènes ou leurs toxines susceptibles de nuire à la santé du consommateur.

La présence de tels microorganismes et de ses composés toxiques conduit à des maladies de type alimentaire. Suivant la nature de microorganismes en cause, trois cas de maladie peuvent se présenter :

- **Infections alimentaires**
- **Toxi-infections alimentaires**
- **Intoxications alimentaires**

**a. Infections alimentaires :** ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de microorganismes altérants vivants dans le produit alimentaire ou dans l'eau. Entéropathogènes ou virus : *Salmonella enterica* (Salmonellose), *Shigella* spp. (Dysenterie Bacillaire), *Yersinia enterocolitica* (Yersiniose), *E. coli* entéropathogène, et infections virales.

**b. Toxi-infections alimentaires :** ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de microorganismes pathogènes vivants dans le produit alimentaire et la sécrétion après ingestion d'une toxine. C'est le cas par exemple de : *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* (Gastro-entérite) et *Vibrio cholerae* (Choléra).

**Symptômes :** Ces deux derniers se manifestent par :

Diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et sont associés avec de la fièvre et des troubles apparaissant après une période moyenne à longue.

**c. Intoxications alimentaires :** ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de toxine présente dans le produit alimentaire, le produit est dangereux à consommer, même si le microorganisme pathogène n'est plus vivant dans le produit. C'est le cas par exemple des *Staphylococcus aureus*, *Clostridium botulinum* (Botulisme), *Aspergillus flavus*, *Penicillium citrinum*.

**Symptômes:** diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, signes neurologiques, sans fièvre et les troubles apparaissent rapidement

Le contrôle microbiologique de la qualité hygiénique vise à éviter la présence de microorganismes pathogènes dans le produit alimentaire afin de ne pas risquer sa qualité hygiénique, ou au moins de détecter ces microorganismes s'ils sont présents avant sa commercialisation.

### **I.1.2 Qualité technologique**

La qualité technologique (marchande) d'un produit alimentaire est l'aptitude de ce produit à la transformation et à la distribution.

Le contrôle microbiologique de la qualité technologique vise à détecter la présence de microorganismes pouvant altérer la qualité marchande de produit fini, et de vérifier l'efficacité de la technologie après leur application, afin de stocker et de commercialiser des produits alimentaires microbiologiquement stables.

## **II. Politique de contrôle**

Le contrôle microbiologique de la fabrication des produits destinés à la consommation humaine et / ou animale fait partie d'un système de régulation, dont la fonction est de détecter, le plutôt possible, toute anomalie de ce système de façon à permettre une réaction préventive destinée à empêcher toute évolution défavorable de la qualité.

### **II.1 Niveaux de contrôle**

On a trois niveaux de contrôle : **avant, en cours et après la fabrication** du produit.

- **Contrôle préventif** : effectué, avant la fabrication, sur les matières premières et les adjuvants.
- **Contrôle en cours de fabrication** : effectué sur le produit mais aussi sur le matériel, les locaux, et le personnel.
- **Contrôle sur les produits finis** : effectué sur le produit fini afin de conclure sa conformité aux normes.

### **II.2 Fréquence des contrôles**

La fréquence de contrôle est établie sur la base de l'expérience et les moyens disponibles et en fonction de type de produit (type de fabrication), même selon le type d'usine (unité de production). Un contrôle répété permet de déterminer les points critiques.

#### **Exemple:**

**Cas des laiteries** : le contrôle hygiénique officiel des ateliers de traitement prévoit pour le contrôle du lait selon la quantité de lait traitée et selon les fréquences suivantes

- 2 fois par jours si quantité de lait traitée  $\leq 5000$  l/j
- 3 fois par jours si quantité de lait traitée comprise entre 5000 et 10 000 l/j

- 5 fois par jours si quantité de lait traitée  $\geq 10\ 000$  l/j

**Remarque :** Les échantillons doivent être prélevés à des intervalles de temps supérieurs à 15 min.

### II.3 Paramètres à contrôler

Les microorganismes à contrôler varient suivant la technologie et les caractéristiques physicochimiques du produit en cours de fabrication et du produit fini, mais cependant, on peut les répartir en deux groupes :

#### II.3.1 Microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique

**a. Bactéries pathogènes :** *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *St. aureus*, Streptocoques fécaux, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*.

**b. Bactéries témoins de contamination :** *St. aureus* (témoin d'une contamination cutanéomuqueuse, Streptocoques fécaux, et coliformes fécaux (témoins d'une contamination fécale).

#### II.3.2 Microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande

Levures dans les produits sucrés ou les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés, bactéries lactiques et acétiques dans les produits acides.

Dans l'industrie agro-alimentaire, ce contrôle concerne :

- La matière première avant son entrée à l'usine.
- L'eau utilisée pour le lavage et la transformation des produits.
- Les surfaces des locaux et des ustensiles qui intervient dans le stockage, la découpe ou tout autre processus de transformation.
- L'air ambiant dans les ateliers de transformation de traitement et des hangars de stockage.
- Le personnel de l'unité qui intervient depuis la réception de la matière première jusqu'au stockage du produit fini.
- Le matériel de conditionnement et emballage.

## II.4 Méthodes de contrôle

Les méthodes de contrôles sont devisées en deux :

**II.4.1 Techniques microbiologiques de culture** qui sont longues, couteuses, et demandent un délai de réponse très important ;

**II.4.2 Techniques microscopiques** (état frais, coloration simple : de bleu de méthylène et double de Gram) qui sont simples, rapides, et de faible cout. Toutefois, la sensibilité de ces derniers n'étant pas toujours suffisante, donc il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par les techniques microbiologiques de culture dites classiques.

**II.4.3 Les techniques microbiologiques** de culture peuvent, quelques fois, être efficacement remplacées par le contrôle de paramètres physicochimiques liés à la présence de microorganismes à l'instar de :

1. La teneur en eau (H%),
2. La matière sèche (MS%),
3. Le potentiel d'hydrogène (pH) et l'acidité.

## III. Prélèvement, transport et préparation des échantillons

Il est important que le laboratoire d'analyse microbiologique reçoit un échantillon représentatif du lot de produit, non endommagé ou modifié lors du transport et du stockage. Et dès lors, il sera utile de donner les définitions suivantes :

- **Produit** : la matière qu'on veut analyser.
- **Lot** : l'ensemble d'individus d'un produit de caractéristiques uniformes.
- **Échantillon** : une ou plusieurs unités d'échantillonnage prélevées.
- **Échantillon global** : l'ensemble des unités d'échantillons prélevés du même lot.
- **Échantillon pour laboratoire** : nombre réduit d'unités de l'échantillon global, de quantité représentative nécessaire pour analyse au laboratoire (cinq (5) unités pour l'analyse microbiologique, et trois (3) unités pour l'analyse physicochimique).
- **Non endommagé ou modifié** : l'échantillon doit être gardé protégé contre toute contamination provenant de l'environnement, et même conservé dans des conditions réduisant toute modification du nombre de microorganismes présents.

Selon les normes ISO et les normes Algériennes (NA), la majorité des techniques utilisées pour l'échantillonnage des produits se présentant sous forme préemballée peuvent être résumées dans trois techniques :

1. **Technique des pourcentages** : pour les lots considérés très importants (1 % s'agit d'un grand lot, 10 % lorsqu'il s'agit d'un lot plus au moins petit).
2. **Technique de la racine carrée ( $2\sqrt{\phantom{x}}$ )** : pour les lots considérés pas très grands ( $2\sqrt{\phantom{x}}$  de l'effectif du lot).
3. **Technique de la racine cubique ( $3\sqrt{\phantom{x}}$ )** : pour les lots considérés assez grands ( $3\sqrt{\phantom{x}}$  de l'effectif du lot).

**Exemple:** il est réalisé en prélevant un nombre d'échantillons égal à la  $\sqrt{V}$  du nombre de divisions élémentaires, du produit à analyser. Exemple pour un lot de 10 000 boîtes de conserves, le nombre d'échantillons est égal à 100.

Toutefois, ce nombre demeure toujours excessif.

### III.1 Les aliments solides

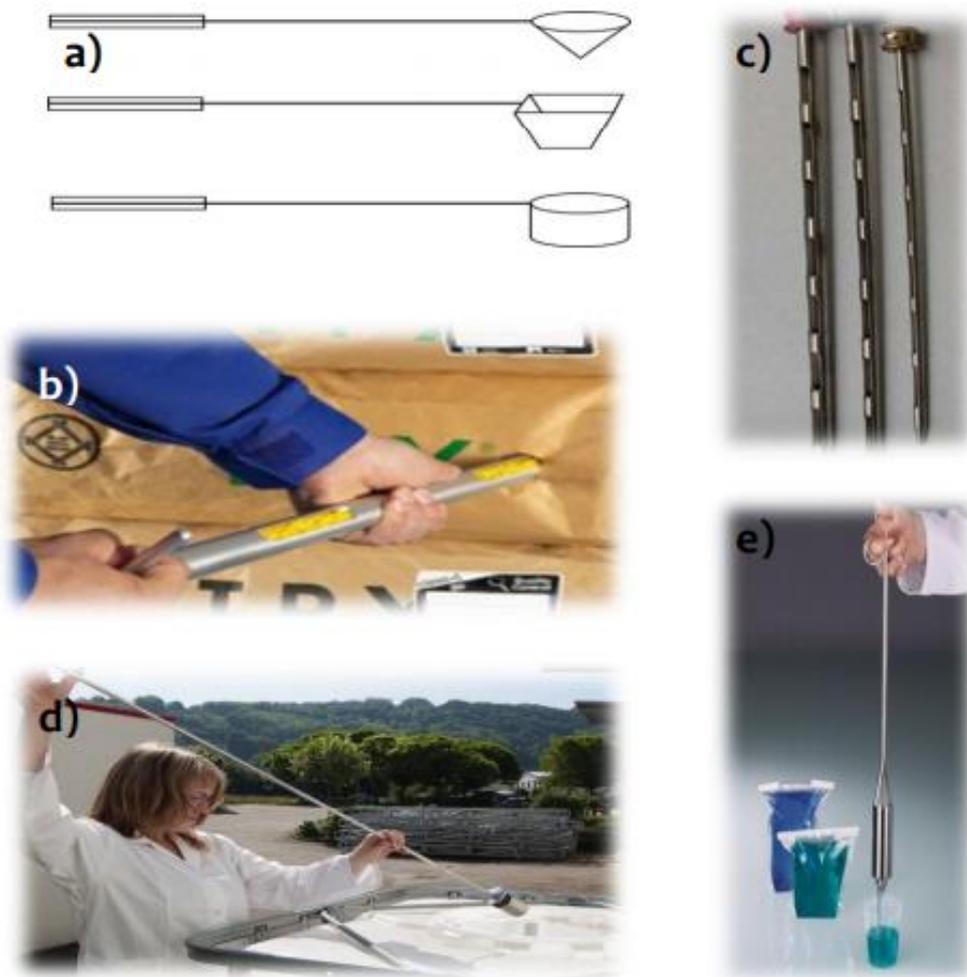
Pour mieux expliquer la procédure d'échantillonnage des produits en vrac solide on prend l'exemple des grains, dont l'échantillonnage se fait avec le matériel suivant : grandes pelle et pelle à main, sonde cylindrique.

**a. Prélèvement en bateau** : se fait pendant l'opération de déchargement en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés, ainsi à partir de l'échantillon global, on réalise l'échantillon de laboratoire.

**b. Prélèvement dans les citernes (Wagons ou dans des camions)** : se fait dans toute la hauteur de la couche à l'aide d'une sonde cylindrique, et à des endroits de prélèvement au centre et à environ 50 cm des parois.

### III.2 Les aliments liquides

La procédure d'échantillonnage des produits en vrac liquides se fait à l'aide d'un échantillonneur de fond ou à soupape, à partir de : Citernes (fixes, wagons, camions, navire) : sur un produit homogène et à différents niveaux, et à partir de l'échantillon global on obtient l'échantillon de laboratoire. Si, le produit n'est pas homogène, on doit réaliser des prélèvements, séparés par intervalle de temps, de haut en bas. Dans le cas des citernes navires, l'échantillonnage s'effectue en cours de transvasement, par de prises fréquentes à intervalle régulier.



**Figure 1** : Matériels d'échantillonnage : (a) grande pelle et pelle à main (b, c) sonde cylindrique (d, e) échantillonnage de fond ou à soupape

L'échantillonnage destiné à une analyse microbiologique revêt une précaution supplémentaire par rapport au prélèvement destiné à un contrôle physico-chimique. Celle d'être réalisé en conditions stériles :

- Flacon stérile, rempli sans toucher l'échantillon avec les mains ni un quelconque matériel (broc, entonnoir, pipette...) à moins d'avoir été désinfecté ; dans le cas d'une désinfection chimique, attention aux résidus de produit ;
- Bouchon stérile ;
- Flambage du col de la bouteille. Après le prélèvement, maintien de l'asepsie ;
- Interdiction stricte d'ouvrir le flacon jusqu'à l'analyse ;
- Ouverture de l'échantillon seulement sous hotte à flux laminaire ou à proximité directe de la flamme bleue du bec Bunsen ;
- Aucune culture microbienne, en tube ou en boîte de Pétri, ne doit être ouverte à l'air libre.
- Pour les prélèvements réalisés sur une chaîne technologique, prélever au niveau de chacun des équipements de façon à diagnostiquer toute source de contamination possible : par exemple, pour une chaîne de mise en bouteille, on réalise un prélèvement d'échantillon à l'entrée puis à la sortie du filtre.

Les échantillons doivent avoir un transport rapide et un stockage bref ; Les températures suivantes sont recommandées durant le transport :

- Produits stables : température ambiante (inférieure à 40 °C) ;
- Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;
- Autres produits non stables à température ambiante : de 1 °C à 8 °C.

Les températures suivantes sont recommandées durant le stockage :

- Produits stables : température ambiante (de 18 °C à 27 °C) ;
- Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;
- Autres produits non stables à température ambiante : 3 °C ± 2 °C.

### **III.3 Échantillonnage en surface**

Dans certains cas, on réalise un échantillonnage en surface : En règle générale on met la surface à analyser en contact avec un diluant stérile, puis on prélève la suspension microbienne ; Par écouvillonnage de la surface, à l'aide d'un écouvillon qui est ensuite mis en suspension dans un diluant stérile, ou directement étalé sur un milieu gélosé ; Au moyen de boîtes de contact ou

lames d'immersion remplies du milieu gélosé, qui est pressé contre la surface à soumettre à l'essai.



**Figure 2 :** Echantillonnages : **(a)** boîtes de contact, **(b, d)** lames d'immersion **(c)** écouvillons.

### III.4 Techniques de dilution

Une fois arrivés au laboratoire, les échantillons doivent être préparés en vue du contrôle microbiologique.

Pour l'échantillon liquide, il constitue la solution mère (SM) et si nécessaire des dilutions décimales sont réalisées dans un diluant stérile (eau peptonnée ou l'eau physiologique), et utilisées pour la recherche et le dénombrement de microorganismes selon les méthodes de dénombrement de (s) groupe (s) de microorganisme (s) à rechercher.

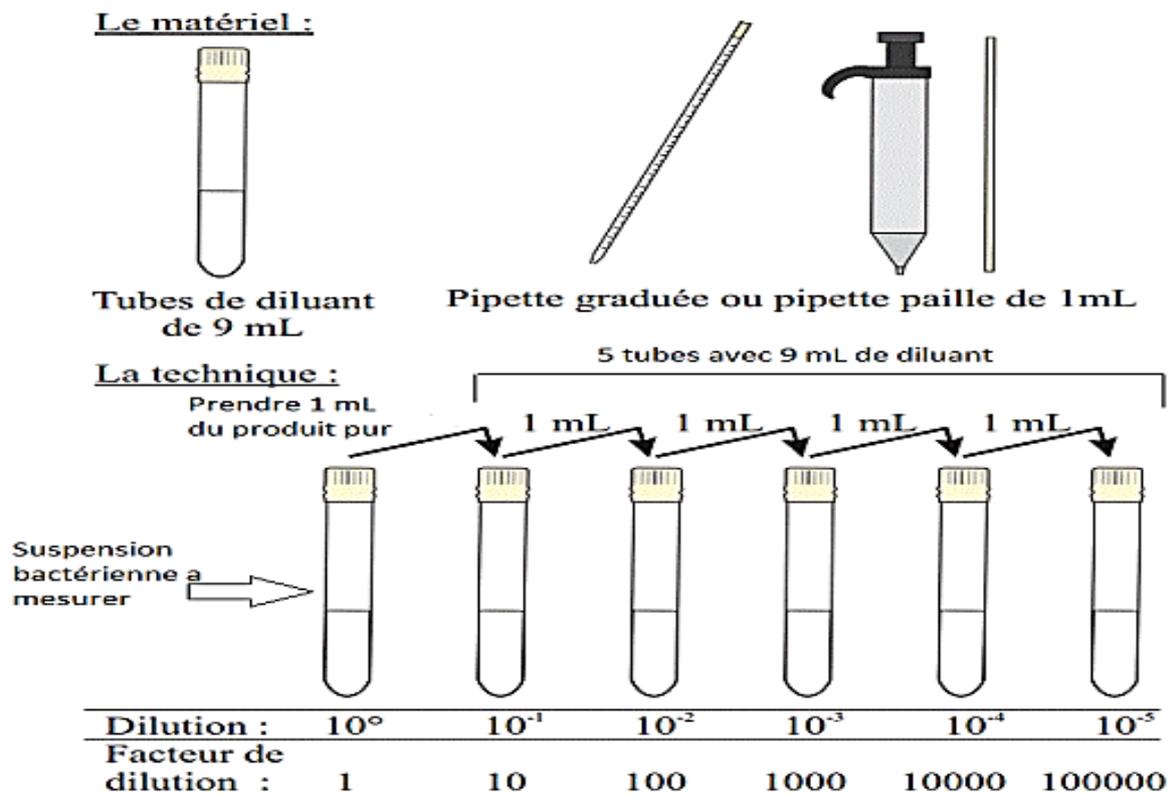
Quant à l'échantillon solide, celui-ci nécessite un broyage dans un diluant stérile à l'aide des broyeurs de laboratoire (Figure 4), cet ensemble (échantillon et diluant) constitue la dilution mère (DM), et si nécessaire d'autres dilutions décimales sont réalisées.

**Le titre des dilutions est calculé de la manière suivante :  $T = P / V$ , avec**

**P:** est le poids et/ou le volume de l'aliment,

**V:** est le volume total de l'aliment plus le diluant.

Dans les deux cas (solide et liquide) plusieurs rapports de dilution sont pratiqués (**25:225, 10:90, 5:45, 3:27, 1:9, 0.5:4,5**), dont le principe est le rapport **1:9**. Une partie de l'échantillon, neuf parties de diluant.



**Figure 3 :** Protocole expérimental d'une dilution successive de facteur 10



**Figure 4** : Les broyeurs de laboratoire : (a) Broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur électrique à pédale type stomacher, (c) broyeur électrique type mortier et pilon, (d) broyeur électrique type à couteaux.

## IV. Techniques classiques de numération des microorganismes

### IV.1 Numération microscopique

Les techniques de numération microscopique offrent une possibilité de détecter les microorganismes lors de contrôle de produits, simplement en regardant un échantillon directement sous microscope optique.

Bien qu'il soit relativement facile de repérer, avec soin et patience, les bactéries, les levures et les moisissures à l'état frais, il est possible de réaliser des **colorations afin de rendre ces microorganismes plus facilement visibles**, ainsi les deux colorations couramment employées sont la coloration simple au bleu de méthylène et la coloration complexe (double) de Gram.

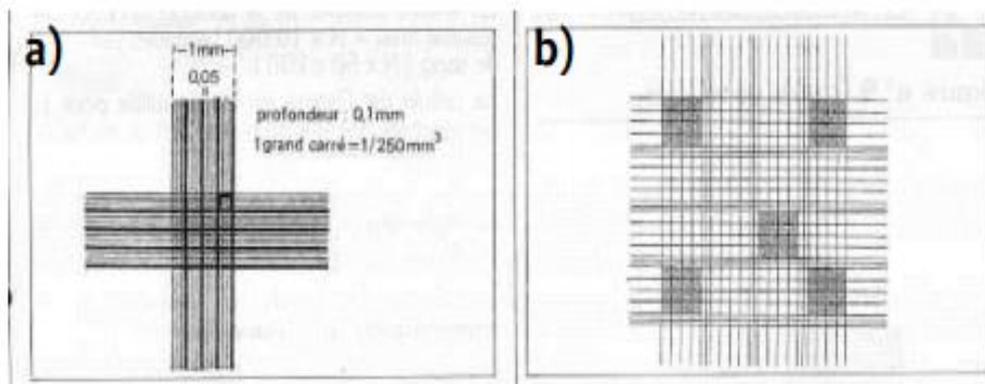
#### a. Utilisation des cellules à numération

**Les lames type hématimètre** comme les cellules de THOMA et de MALASSEZ, pourraient être employées pour le dénombrement des microorganismes.

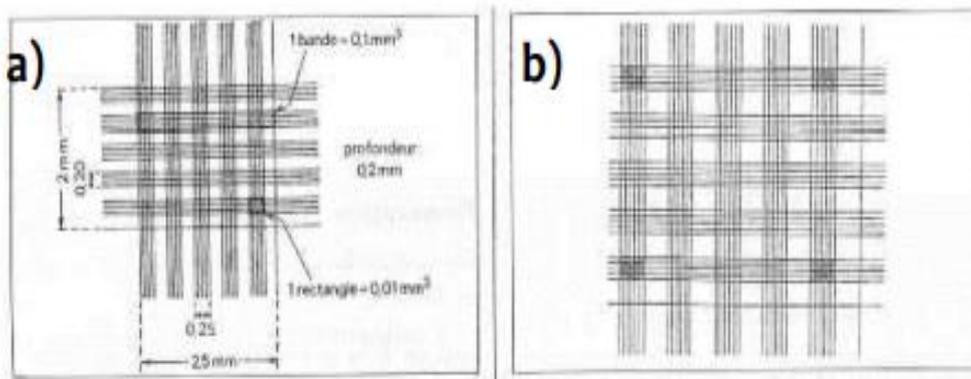
Ces lames sont conçues en verre de 2 à 3 mm d'épaisseur comportant une surface délimitée et quadrillée et recouverte d'une lamelle de sorte qu'elle emprisonne une quantité connue de la solution-dilution de l'aliment à examiner.

**a.1 Cellule de THOMA** : d'une taille de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.1 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm<sup>3</sup>. La cellule est formée de seize (16) grands carrés, composés chacun de seize (16) petits carrés.

**a.2 Cellule de MALASSEZ** : d'une taille de de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.2 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm<sup>3</sup>. La cellule comporte cinq (5) bandes horizontales de cinq (5) lignes chacune et cinq (5) bandes verticales de six (6) lignes chacune.



**Figure 5** : Représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de THOMA (b) cellule de THOMA.



**Figure 6** : Représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de MALASSEZ (b) cellule de MALASSEZ.

## b. La méthode de Breed

Cette méthode utilise des lames comportant une zone délimitée d'un centimètre cube (1 cm<sup>3</sup>) sur laquelle on dépose 0.01 ml de la suspension de l'aliment à examiner.

Après séchage, fixation et coloration au bleu de méthylène ou éventuellement la coloration de Gram, les microorganismes sont comptés dans 30 à 50 champs microscopiques.

- La méthode est rapide et bien adaptée pour le comptage des bactéries.
- Toutefois, elle ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes. L'existence des amas de cellules sont comptés comme une seule cellule ce qui diminue de la précision de la méthode.

Après avoir choisis la boîte on dénombre les colonies puis on applique la formule suivante :

$$N = n \times 1/D \times 10 \text{ UFC/ml}$$

**N** : le nombre dans la solution mère ;

**n** : le nombre des colonies compté sur la boîte ;

**D** : facteur de dilution ; 10 volumeensemencé 0,1ml ;

L'unité utilisée est l'Unité Formant Colonie (U.F.C.) : c'est une unité plus précise que l'unité bactéries/ml dans ce cas. Car on compte le nombre d'unités qui forment des colonies, quelque fois, plusieurs bactéries côte à côte pouvant donner une même colonie. Il est donc plus exact de parler du nombre d'unités formant colonies que de nombre de bactéries.

### **c. Technique de filtration à épifluorescence directe (DEFT)**

C'est une technique de numération microscopique, qui est appliquée pour le dénombrement des microorganismes dans toutes sortes de produits.

Elle permet d'obtenir une sensibilité nettement accrue de  $10^3$  à  $10^4$  microorganismes par ml, suite à une concentration des microorganismes contenus dans la suspension de l'aliment à examiner sur un filtre à membrane, suivie d'une coloration à orange d'acridine.

Les microorganismes retenus sur la membrane sont comptés directement sous le microscope à épifluorescence.

### **d. Numération après passage sur un milieu d'enrichissement**

Cette technique non quantitative est utilisée pour des espèces déterminées (Lactobacilles, Salmonelles, etc.) ou il existe une corrélation entre le nombre de microorganismes au début et à l'issue de l'incubation.

Une suspension de l'aliment à examiner dans un milieu d'enrichissement sélectif est réalisée, suivie par une incubation aux temps et température appropriés du microorganisme, puis une numération sur lame au microscope optique.

## **IV. 2 Numération sur milieu solide**

### **a. Dans la masse (pour plate)**

- ❖ C'est la méthode standard d'énumération des germes aérobies, dont l'utilisation nécessite un milieu de croissance claire pour permettre le comptage des colonies au moyen d'un compteur de colonies.
- ❖ Les germes anaérobies ont besoin d'une deuxième couche de gélose qui permet de maintenir un environnement anaérobie (**méthode de la double couche**).

### **b. Étalement en surface (spread plate)**

Cette méthode est préférable lorsque des milieux sélectifs sont utilisés pour le dénombrement de groupe spécifique de microorganismes aérobies, car elle permet la manifestation de propriétés coloniales de ces microorganismes, telles que : morphologie, pigmentation, hémolyse, halos de précipitation, ou changements de couleur du milieu de culture

### **c. Étalement en surface en spirale (spiral plate)**

Pour cette technique, une machine distribue un petit volume entre 0.05 et 0.4 ml de la suspension de l'aliment à examiner, à la surface des boîtes qui sont en rotation, ceci en suivant une distribution spirale à partir du centre vers la périphérie de la boîte, ou bien dans d'autres cas dans le sens inverse à partir de la périphérie vers le centre de la boîte.

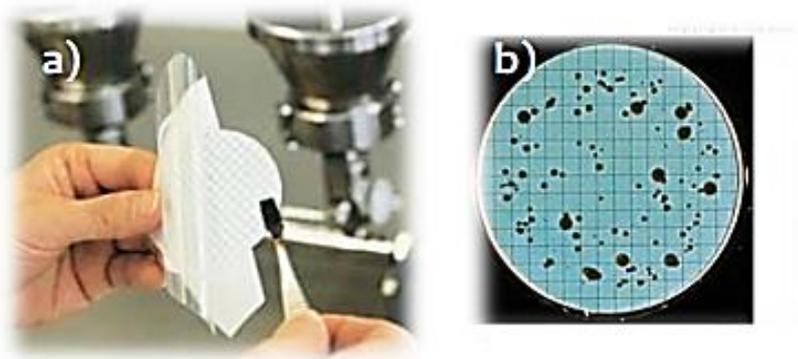
Après incubation, le comptage des colonies se fait à l'aide d'un compteur de colonies muni d'une grille de visualisation ou avec un compteur de colonies à laser

### **d. Filtration sur membrane**

Cette technique est utilisée pour estimer le nombre de microorganismes lors du contrôle des liquides alimentaire (l'eau, boissons...).

Elle consiste à une concentration de microorganismes sur membrane au moyen d'un appareil de filtration mono ou pluri-postes.

Les filtres utilisés sont conçus à partir de : mélange d'esters de cellulose ; de polymères similaires (nitrate de cellulose, acétate de cellulose).



**Figure 7** : Filtration sur membrane : a. montage de filtration, b. filtre membrane après culture

**Le nombre de colonies N par ml d'échantillon** est calculé de la manière suivante :

$$N = n / v, \text{ avec}$$

**n** : nombre de colonies,

**v** : est le volume de l'échantillon qui est égal, généralement, à 100ml.

#### **e. Dénombrement par culture en milieu solide**

Principe de la méthode se base sur le fait que chaque colonie macroscopiquement visible provient d'une cellule microbienne ou UFC (Unité Formant Colonie). La technique employée est choisie en fonction du rapport du germe à dénombrer avec l'oxygène. Elle peut être réalisée en boîtes de Pétri ou en tubes.

##### **- Dénombrement en boîtes de Pétri**

Le dénombrement est réalisé en masse lorsque le germe à dénombrer est aérotolérant ou micro-aérophile et en double couche lorsque le germe est anaérobie strict.

Dans ce cas le milieu peut être additionné d'un agent réducteur tel que le chlorhydrate de L cystéine.

Dans tous les cas, le milieu gélosé doit être suffisamment mou c'est à dire additionné de 2% d'agar seulement pour permettre aux colonies qui se situent dans la masse d'atteindre leur taille normale.

- **Le mode opératoire**

- À partir des dilutions et éventuellement de la suspension mère, ensemercer dans la masse, au moins 2 boîtes de Petri par dilution.
- Mettre 1 ml de la suspension dans une boîte de Petri vide, et ajouter 10 à 15 ml de milieu gélosé en surfusion de 40 à 45 °C.
- Homogénéiser le mélange par des mouvements circulaires.
- Laisser le mélange se solidifier à la température du laboratoire.
- Si le micro-organisme est anaérobie stricte, couler une seconde couche assez épaisse sur la première pour assurer l'anaérobiose.

- **Cas ou le germe est aérobic strict**

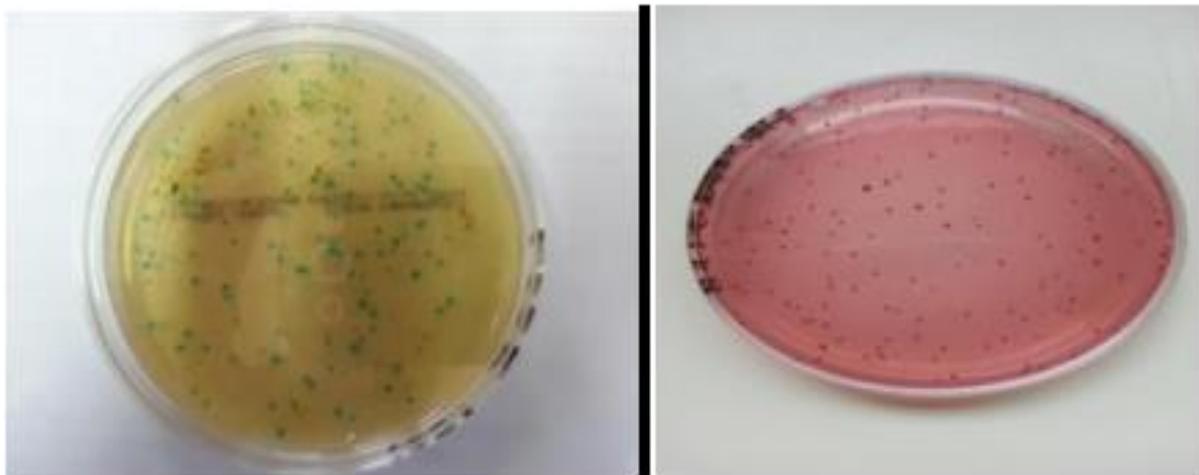
- 0,1 ml de la suspension mère ou de ses dilutions sont déposés au centre de la boîte de Pétri préalablement coulée avec le milieu de culture adéquat et étalés uniformément sur toute la surface de la gélose.
- L'étalement est réalisé à l'aide d'un râteau étaleur.
- Cette méthode est bien adaptée pour la numération des aérobies stricts.
- Toutefois sa précision est faible car il y a un risque que des microorganismes adhérents au râteau étaleur.

Incuber les boîtes dans les conditions optimales de croissance du germe à dénombrer.

- **Lecture :** Le dénombrement est réalisé par comptage des colonies à l'aide d'un compteur de colonies.



**Figure 8 :** Compteur de colonies



**Figure 9 :** Culture bactérienne (colonies)

Les boîtes dénombrables sont celles dont le nombre de colonie est compris entre 30 et 300 ou 25 et 250

Déterminer le nombre de cellules vivantes par ml de la suspension mère (CFU/ml) en appliquant la formule suivante :

$$N \text{ (CFU / ml)} = \frac{\Sigma c}{(n1+n2 \cdot 0,1)d}$$

$\Sigma c$  = Nombre totale des colonies comptées dans les boites dont le nombre de colonies est compris entre 20 et 300.

$n_1$  : nombre de boites de Petri comptées de la 1<sup>ère</sup> dilution

$n_2$  : nombre de boites de Petri comptées dans la seconde dilution.

$d$  : facteur de dilution à partir duquel les 1<sup>er</sup> comptages ont été fait.

### Exemple

**Tableau 1** : résultats de dénombrement sur milieu solide

Boite ensemencées  dilution	Boite1	Boite 2
$10^{-2}$	278	290
$10^{-3}$	33	28

$$N \text{ (UFC/ml)} = \frac{\Sigma c}{(n_1+n_2+0,1)d} = \frac{278+290+33+28}{(2+2+0,1)10^{-2}}$$

$$N=285,91 \cdot 10^2 = 28,59 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$$

### IV.3 Numération sur milieu liquide

- Cette numération en milieu liquide est connue sous le nom de la méthode du nombre le plus probable (NPP) de Mc GRADY.
- Elle est utilisée, généralement, pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux, et Streptocoques fécaux dans l'eau.
- Permet d'étudier un caractère difficilement mis en évidence sur milieu solide comme la production d'un gaz.
- En utilisant des milieux peu sélectifs (présomption), elle permet d'effectuer un dénombrement avec une phase de réanimation, c'est-à-dire que le milieu est favorable pour le développement même des germes en mauvais état physiologique.
- **Les tubes positifs** sont alors repiqués sur un milieu plus sélectif (**confirmation**).

**Exemple :** Nous considérons que vous avez obtenu les résultats suivants pour l'analyse de 1 ml de lait

Lecture des résultats de la recherche des coliformes totaux

**Tableau 2 :** Représentation des résultats de recherche des coliformes totaux dans le lait

Dilutions	$10^{-1}$			$10^{-2}$			$10^{-3}$			$10^{-4}$					
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)															
Résultats	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-	-	
Nombre de résultats +	3			3			2			1					
Regroupement	332			321			210								



**Lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady et en déduire la concentration des bactéries dans l'échantillon.**

**Tableau 3 :** Table de Mac Grady de trois tubes par dilution donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de la dilution

3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	0.7	221	3.0	321	15.0
102	1.1	222	3.5	322	20.0
110	0.7	223	4.0	323	30.0
111	1.1	230	3.0	330	25.0
120	1.1	231	3.5	331	45.0
121	1.5	232	4.0	332	110.0
130	1.6	300	2.5	333	140.0
200	0.9	301	4.0		

**Exemple :**

**Tableau 4 :** Dénombrement sur milieu liquide, cas de la série de deux tubes

+ : positif, - : négatif

Dilution d'ensemencement	1	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>
Dilution de la culture	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>	10 <sup>-5</sup>	10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-7</sup>
Résultat	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
Nombre de tube positifs	2	2	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0

**Nombre caractéristique à trois chiffres : 210**

**Interprétation :** Elle est basée sur des données statistiques. Des tables dites de **Mac Grady** donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de la dilution qui a servi à ensemencer les tubes correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique. Dans le présent exemple et selon la table de Mac Grady 210 correspond à 6,0 (NPP)

- La dilution utilisée pour ensemencer les tubes correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique étant: 10<sup>-2</sup>. Donc : la dilution 10<sup>-2</sup> (d) contient probablement 6 germes/ ml. Déterminer le nombre de germe (N) de la suspension de départ ;

$$N = \text{NPP} \times 1/d = 6 \times 10^2 \text{ germes/ml}$$

**Tableau 5 :** Table de Mac Grady de deux tubes par dilution donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de la dilution

<i>2 tubes par dilution</i>	
Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0
001	0.5
010	0.5
011	0.9
020	0.9
100	0.6
101	1.2
110	1.3
111	2.0
120	2.0
121	3.0
200	2.5
201	5.0
210	6.0
211	13.0
212	20.0
220	25.0
221	70.0
222	110.0

## V. Techniques récentes de numérations

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

Les techniques dites rapides permettent, selon les cas, de réduire le délai de réponse ou de simplifier les manipulations, ce qui en fait des outils très précises dans l'industrie agro-alimentaire. Parmi les principales techniques rapides utilisées en microbiologie des aliments, on peut citer :

- Les méthodes immunologiques, pour la plupart de type E.L.I.S.A.;
- Les techniques de biologie moléculaire, hybridation sur colonies ou polymérase chain reaction ;
- Le dosage par bioluminescence de l'adénosine triphosphate (A.T.P.) cellulaire ou A.T.P. métrie;
- Les procédés d'analyse d'image après filtration et coloration des échantillons et la cytométrie de flux.

Certaines de ces méthodes font l'objet d'une validation officielle, lorsqu'il est démontré que les résultats qu'elles fournissent présentent une bonne corrélation avec les résultats obtenus par les méthodes de référence. De toutes ces méthodes, seule l'A.T.P. métrique fournit une réponse quasi-immédiate. Pour les autres techniques, le résultat est au mieux obtenu en 24 à 36 heures.

### **V.1 La méthode ELISA de type sandwich**

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

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

Dans le cas d'un résultat positif, la réaction entre l'enzyme fixée et son substrat libère des produits colorés. L'interprétation du test fait appel à des témoins positif et négatif (Figure .10).

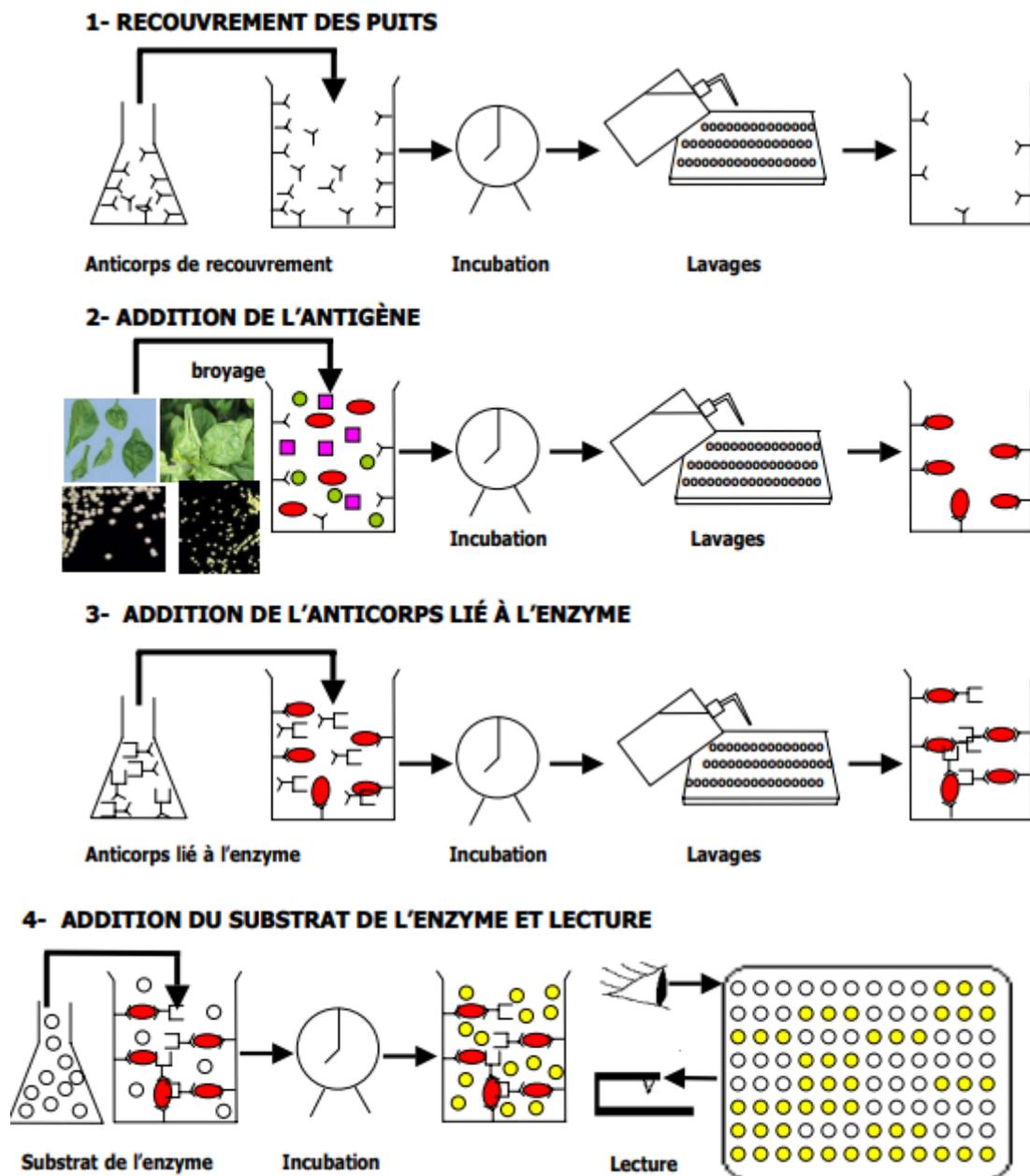


Figure 10 : Protocole du test ELISA

## V.2 L'immunoséparation magnétique et l'IMS-ELISA

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

L'intérêt des supports magnétiques en microbiologie clinique, alimentaire ou environnementale est grandissant. La nécessité de disposer des résultats très rapidement et de pouvoir concentrer et détecter des germes pathogènes à partir d'échantillons variés (sang, aliments, eau...) explique en grande partie cet attrait. Ainsi, la détection de *Escherichia coli* O157 (100 -1000 bactéries /

ml) et *Salmonella thyphimurium* (1000 - 2000 bactéries / ml) à l'aide de support magnétique est rendue possible en moins de 60 minutes.

### **V.3 Utilisation de sondes nucléiques**

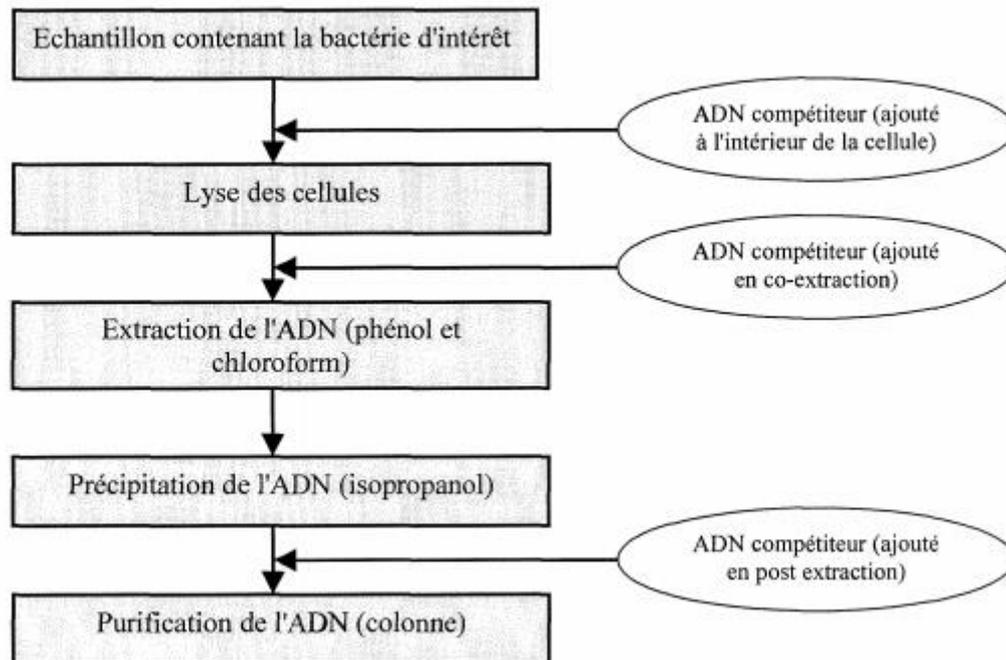
Des fragments d'ADN ou d'ARN simple brin, d'origine microbienne, sont capables de s'hybrider avec des fragments complémentaires, les sondes, pour former des duplex stables. La mise en évidence de l'hybridation entre la sonde et l'acide nucléique cible est effectuée par détection directe ou par détection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

### **V.4 Utilisation de l'amplification génétique (Polymerase Chain Reaction (PCR))**

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

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

La PCR, Polymerase Chain Reaction, est utilisée pour reconnaître l'ADN des levures du genre *Brettanomyces*. Cette méthode, présente l'avantage d'obtenir en 24-48 heures le résultat, alors qu'il faut attendre 7 jours pour la méthode de mise en culture sur boîte de Pétri. La numération des *Brettanomyces* par PCR peut s'avérer utile tout au long du processus d'élaboration.



**Figure 11 :** Représentation schématique indiquant les différents points où peuvent être ajoutés l'ADN compétiteur au cours d'un protocole d'isolation d'ADN à partir d'un échantillon environnemental.

## V.5 ATP-métrie

Cette technique permet le contrôle microbiologique de toutes les surfaces. Elle présente deux gros avantages :

Le premier est de conduire à un résultat instantané.

Le second réside dans la simplicité de mise en œuvre de la mesure.

On fait appel à cette technique, notamment dans les cas suivants :

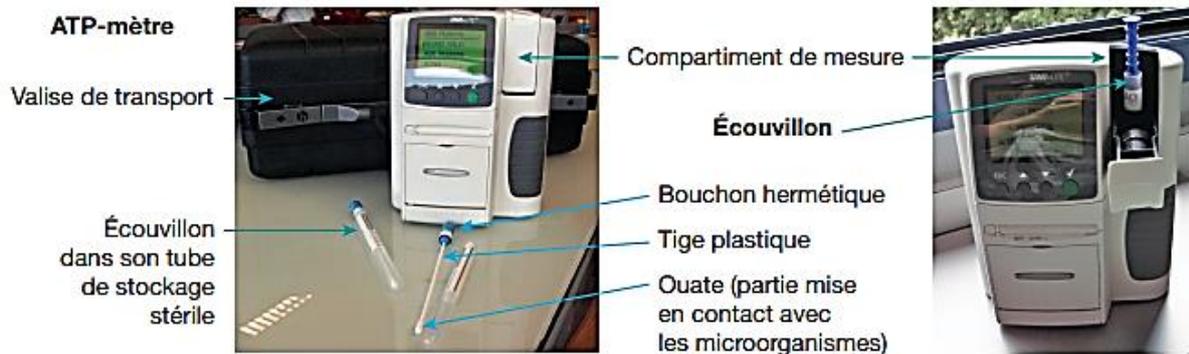
- Contrôle d'hygiène des équipements, notamment de la chaîne de conditionnement. On s'intéresse à chaque élément qui compose le circuit suivi par l'échantillon : cuve de stockage, robinet de dégustation, joint et raccord de tuyauterie, pompe (entrée et sortie) et chaque matériel assurant l'opération contrôlée ; par exemple, pour le conditionnement : filtre, rinceuse, tireuse, boucheuse... Ce diagnostic hygiène est également intéressant à chaque étape de la récolte, de l'élevage et du stockage.

- Contrôle de l'eau utilisée dans le chai pour les opérations de nettoyage, notamment contrôle de l'eau du dernier rinçage, très bon indicateur de la procédure de nettoyage mise en œuvre.

- Contrôle des matières sèches lors du conditionnement de l'échantillon : bouteilles, bouchon...

Cette technique utilise l'adénosine triphosphate (ATP), molécule présente dans toutes les

cellules vivantes, notamment les cellules microbiennes. L'ATP est la forme universelle de stockage et de transfert de l'énergie dans la cellule. Elle conditionne donc toutes les activités vitales des organismes vivants. À la mort de la cellule, cette molécule est rapidement dégradée. L'ATP est donc un excellent marqueur de la présence d'un microorganisme vivant.



**Figure 12:** Appareil d'ATPmètrie

## VI. Identification phénotypique des germes

De nombreux caractères phénotypiques sont exploités pour identifier une bactérie, déjà isolée à l'état pur. (Culturaux, morphologiques, biochimiques et physiologiques, immunologiques, et pouvoir pathogène).

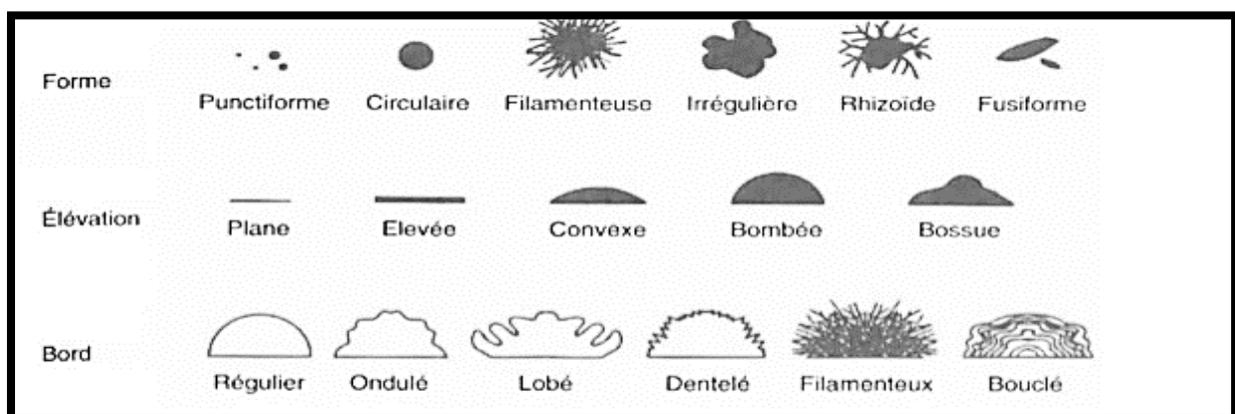
### VI.1 Caractères culturaux

- La taille, la forme, la couleur, l'opacité, la surface, la consistance, l'odeur, et évidemment tout changement produit à la surface du milieu solide, sont les caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne (amas de cellules).
- À l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, les colonies sont observées par transparence, réflexion ou transillumination oblique, ceci en lumière naturelle et / ou artificielle.
- **La taille ou le diamètre :** peut-être mesurée à l'aide d'une règle millimétrique graduée ;
- **L'aspect de la surface :** peut-être lisse ou rugueux ;

- **La forme** : (plan, relief, bord) centre parfois surélevé, ombiliqué en creux ;
- **L'opacité** : les colonies sont décrites comme : opaques (ne laissent pas passer la lumière) ; translucides (laisse passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, transparentes (laisse passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre) ;
- **La consistance** : au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont : grasses / crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes) ; sèches / muqueuses ;
- **La couleur (pigmentation)** : sur des géloses ordinaires, les colonies sont habituellement de couleur crème, alors que sur des milieux sélectifs, les colonies, sont d'une couleur différente, ceci est due à divers pigments de couleur jaune, rouge, orange, violet, etc. ;
- **Odeur** : une odeur caractéristique peut être présente (*Pseudomonas aeruginosa*, odeur fruitée associée à celle des pommes vertes).

Trois types de colonies peuvent être distingués :

1. **Colonie S (Smooth - lisse)** : à surface lisse et bords réguliers, bombés, de consistance crémeuse et donnant des suspensions homogènes ;
2. **Colonie R (Rough - Rugueux)** : à surface rugueuse et bords dentelés, plats, de consistance sèche et donnant des suspensions hétérogènes ;
3. **Colonie M (Muqueuse)** : à surface lisse et bords réguliers, bombés, filants sous l'anse, et donnant des suspensions hétérogènes.



**Figure 13:** Représentation schématique des caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne.

## VI.2 Caractères morphologiques et structuraux

### a. Coloration de Gram

- La coloration de Gram (le premier test à réaliser) permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : celles à paroi type **Gram+**, et celles à paroi type **Gram-**.
- Cette méthode est basée sur la structure et la composition de la paroi.
- Les lipides assez forts chez les Gram- que les Gram+, sont extraits par l'action de l'alcool entraînant, ensuite, une augmentation de la perméabilité et l'extraction du complexe violet de gentiane-iode, ceci lui permettant de prendre la couleur de la safranine (fuschine).

Ce test permet de diviser les bactéries selon leurs formes en deux grands groupes : Cocci et bacille, et il fournit de précieuses informations en ce qui concerne le mode de groupement qui peut être en : diplocoques, chainettes, tétrades, et amas. Il est à noter que même sans ce type de coloration (coloration complexe et / ou double), à l'état frais la forme, le groupement et la mobilité peuvent être observés.

### **b. Coloration de Ziehl-Neelsen (acid-fast stain)**

La coloration de Ziehl-Neelsen est spécialement désignée pour les Mycobactéries qui sont caractérisées par leur aptitude à ne pas être décolorées par les acides dilués et l'alcool, après avoir été colorées par la safranine ou la fuchsine. Ils sont dits bacilles acido-alcool-résistants (BAAR), exemple : *Mycobacterium tuberculosis*, qui apparaît rose-rouge, souvent parlé et légèrement incurvée.

### **c. Coloration de la capsule**

La présence d'une capsule est révélée par la coloration à **l'encre de Chine**, sa mise en évidence est un indice important pour identifier les microorganismes en deux groupes : les capsulés et ceux acapsulés, exemple : des diplocoques Gram+ entourés d'une capsule importante, ceci évoque *Streptococcus pneumoniae*.

### **d. Coloration des endospores (sporulation)**

La sporulation permet de diviser les bactéries en deux groupes : sporulées et asporulées, ce test est réalisé soit par coloration au vert de malachite solution à 5 %, soit tout simplement par essai de culture après pasteurisation. La position de la spore permet l'identification des bactéries en groupes à l'intérieur de la même famille.

## **VI.3 Caractères biochimiques et physiologiques**

### **a. Demande en O<sub>2</sub> :**

Ce caractère permet de classer les bactéries, selon leurs réponses de croissance en présence et en absence d'oxygène, en 5 groupes :

**a.1 Aérobie strict** : l'accepteur final de l'hydrogène est obligatoirement l'O<sub>2</sub> de l'air, exemple : *Pseudomonas aeruginosa* ;

**a.2 Anaérobie strict** : l'accepteur est de nature différente et l'O<sub>2</sub> est toxique ;

**a.3 Anaérobie aérotolérant** : sont capables de croître en présence ou en l'absence d'O<sub>2</sub>, l'accepteur est de nature différente et l'O<sub>2</sub> n'est pas toxique, exemple : *Campylobacter jejuni* ;

**a.4 Anaérobie facultatif (aéroanaérobie)** : la bactérie se développe indifféremment dans des conditions d'aérobie ou d'anaérobiose mais se développe mieux en sa présence, exemple : Entérobactéries ;

**a.5 Microaérophile** : ont besoin d'O<sub>2</sub> mais à un niveau acceptable.

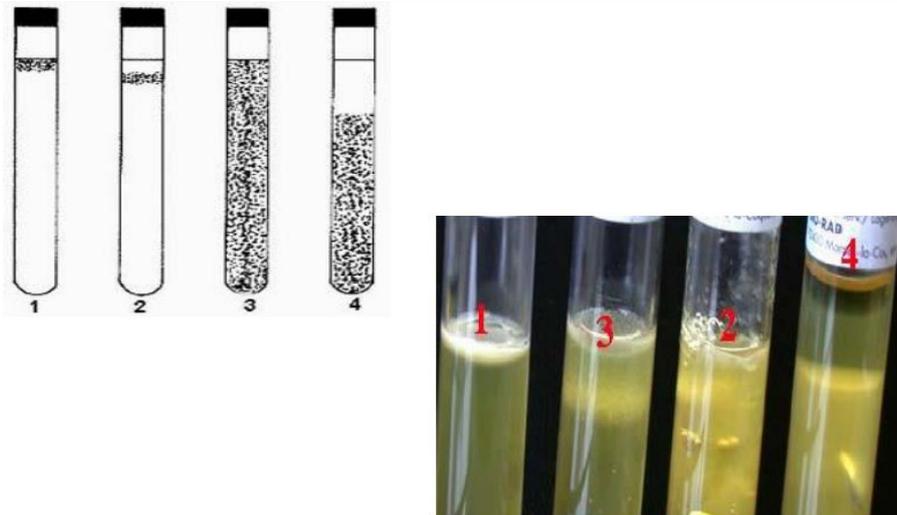


Figure 14 : croissance des bactéries selon la demande en O<sub>2</sub>

(1) Aérobie strict ; (2) Aero-anaérobie facultative ; (3) Microaérophile ; (4) anaérobie stricte ;

### b. Oxydation-fermentation est assimilation des sucres

- ❖ La détermination de l'oxydation-fermentation et la possibilité que d'autres sucres soient assimilés comme seule source de carbone sont importantes à des fins taxinomiques.
- ❖ Les bactéries assimilent le (s) sucre (s) en produisant de l'acide et fréquemment du CO<sub>2</sub> en présence ou en absence d'O<sub>2</sub>. L'acidification du milieu est détectée par changement de couleur du milieu dû à la présence d'un indicateur coloré (BCPL, rouge de phénol, bleu de bromothymol, etc.).
- ❖ Le CO<sub>2</sub> est révélé par l'élévation de la cloche du Durham car il est libéré au fond du tube (cas de la voie oxydative il est produit en surface donc n'y a pas élévation de la cloche).

### c. Types fermentaires (tests RM / VP)

Ces deux tests sont de grande utilité en identification.

- ❑ La réaction au Rouge de Méthyle caractérise **le type fermentaire acide mixte** de la fermentation butylène glycolique chez les Entérobactéries.
- ❑ La réaction de Voges Proskauer caractérise la voie d'acétoïne chez les Entérobactéries et autres groupes. Les deux sont réalisés sur milieu glucosé Clark et Lubs.

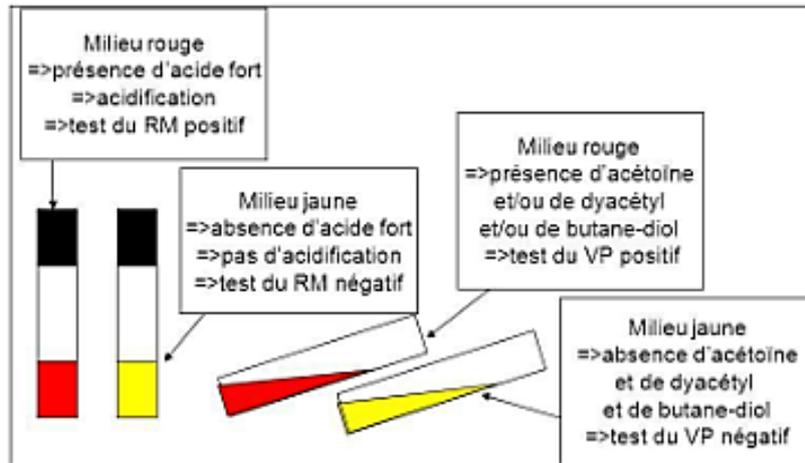


Figure 15 : Interprétation du types fermentaires (tests RM / VP)

#### d. Accepteurs de l' $H_2$ :

**d.1 La sulfito-réduction** : les anaérobies sulfito-réducteurs sont capables d'utiliser les sulfites comme accepteurs d' $H_2$  en les réduisant en sulfures.

Ce test est réalisé sur milieux solides (**VF**) ou bien semi-solide contenant de **Sulfite de Sodium** et l'**Alun de Fer**.

Après incubation la réduction se traduit par un noircissement (la production d' $H_2S$ ).

#### d.2 La réduction des nitrates :

Les anaérobies sont, aussi, capables d'utiliser les nitrates comme accepteurs d' $H_2$  en les réduisant en nitrites.

Ce test est réalisé sur milieux solides ou bouillons à 1 % de nitrate de potassium.

Après incubation, la réduction nitrates en nitrites est révélée par l'ajout de 0.1 ml du réactif NiT1 et NiT2. Une coloration instantanée rouge ou rose indique la réduction des nitrates. Un résultat négatif doit être vérifié par l'addition de poudre de zinc.

#### e. Enzymes respiratoire

**e.1 Catalase** : Une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène ( $H_2O_2$ ) en eau et en oxygène (un dégagement de bulles d'air, instantanément, indique sa présence).

- Ce test réalisé, généralement par deux techniques, constitue un bon élément de différenciation et divise les bactéries en deux groupes celles à catalase+ et à celles catalase-.
- La catalase est un test clé communément utilisé pour l'identification des bactéries à Gram+. Exemple : Staphylocoques ; *Listeria monocytogenes* sont catalase+ / Streptocoques est catalase- ;

**e.2 Cytochrome oxydase :** la dernière enzyme de la chaîne respiratoire, elle catalyse le transfert de l'H<sub>2</sub>O sur l'O<sub>2</sub>, elle est mise en évidence par la réaction d'oxydation de l'oxalte de diméthyl-paraphénylène-diamine, ce substrat est incolore sous forme réduite est rouge sous forme oxydée. Inversement à son précédant, l'oxydase est un test clé communément utilisé pour l'identification des bactéries à Gram-. Exemple : *Pseudomonas* spp. et *Neisseria* spp. Sont Oxydase+ / *Acinetobacter* spp. est Oxydase-.

## **f. Dégradation des acides aminés**

**f.1 TDA, Tryptophanase et PDA :** enzymes utilisées en identification bactérienne.

- Le tryptophane-désaminase (TDA) catalyse la réaction de la désamination du tryptophane en acide indole-pyruvique et ammoniac.
- Tandis que la tryptophanase catalyse la réaction de dégradation du tryptophane en indole, acide pyruvique, et ammoniac.
- L'addition de chlorure de fer III (FeCl<sub>3</sub>) réagit avec l'acide indole-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron et l'addition de réactif de Kovacs réagit avec l'indole en donnant un anneau rouge en surface.

**Exemple :** *E. coli* est **Indole+**.

- Alors que, la phényl-alanine-désaminase (PDA) catalyse la réaction de la désamination de la phénylalanine en acide phénylpyruvique et ammoniac.
- L'activité de la phényl-alanine-désaminase(PDA) est réalisée sur gélose inclinée à la phényl-alanine. L'acide phényl pyruvique (APP) donne une teinte verte en présence de chlorure de fer III.

## **f.2 L'ornithine-décarboxylase (ODC), la lysine-décarboxylase (LDC) et l'arginine-déhydrolase (ADH) :**

La possession de ces enzymes est un caractère souvent étudié en identification des bacilles Gram- notamment les Entérobactéries et les *Pseudomonas*. Les milieux les plus utilisés, en anaérobiose, sont ceux de Falkow (dont la technique a été étendue par Möller), ces milieux contiennent, le glucose, un indicateur coloré (généralement le BCPL) et ne renferment qu'un seul acide aminé, celui dont on veut étudier l'utilisation.

## **g. Dégradation du lactose ONPG :**

- La possession de la  $\beta$  galactosidase est un caractère couramment utilisé pour l'identification des bactéries, il est particulièrement pratiqué pour les Entérobactéries uniquement ceux à lactose-.
- Cette enzyme hydrolyse un analogue du lactose : l'ortho-nitro-phényl-galactopyranoside (ONPG) en galactose et ortho-nitro-phénol qui présente une couleur jaune.

**h. Dégradation de l'urée Uréase :** hydrolyse l'urée en ammoniac et carbonate d'ammonium aboutit à l'alcalinisation du milieu, qui est décelable par changement de couleur du milieu dû à la présence d'un indicateur coloré (généralement le rouge de phénol).

Ce test permet d'identifier certaines espèces d'entérobactéries, *Corynebacterium urealyticum*, et *Helicobacter pylori*.

## **i. Caractères biochimiques et physiologiques divers**

**i.1 Mobilité :** est recherchée sur milieu semi-solide (en culot). L'ensemencement est réalisé par piqûre centrale, après incubation la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu.

**i.2 Températures de croissance, halophilie-osmophilie et pH :** l'évaluation de l'habilité de croissance dans des conditions hostiles, présente parfois un grand intérêt en identification. L'habilité à croître à différentes températures, à différentes concentrations en NaCl ou en saccharose et à différentes valeurs de pH est réalisée sur milieux liquides ou solides.

## **i.3 Résistance aux antibiotiques et aux inhibiteurs :**

- L'habilité à croître en présence de certains antibiotiques ou agents inhibiteurs est largement utilisée en taxonomie.

- La présence ou l'absence de multiplication indique la sensibilité ou la résistance de la bactérie.
- Ce test est réalisé sur milieux liquide ou solide.
- Il est important de souligner que, contrairement aux Gram-, les Gram+ sont sensibles avec exception (*Enterococci*, *Lactobacilli*, *Leuconostoc* et *Pediococcus* spp.) à la vancomycine.
- En revanche, les **Gram-** sont sensibles aux colistine et polymyxine, alors que les **Gram+** ne le sont pas.

#### **i.4 Caractères immunologiques (sérologique)**

**Les réactions sérologiques** : de type bactérie-anticorps (réaction d'agglutination) ou de type antigène-anticorps (réaction de précipitation) sont utilisées en taxinomie essentiellement pour les **Entérobactéries** dont contiennent trois types d'antigènes : H, O, et K ; et **les streptocoques** dont le plus important est le type C : A, B, C, D, N.

Ces tests sérologiques se font principalement suivant la technique de Lancefield basée sur l'utilisation de polysaccharides (notamment la polyside C) de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigène.

#### **i.5 Pouvoir pathogène**

- **Coagulase** : ce caractère permet seul d'affirmer la présence de *St. aureus* qui est coagulase+ des autres *Staphylococcus* qui sont à coagulase- (*St. epidermidis*, *St. saprophyticus*). *St. aureus* produit deux types de coagulase :

- Coagulase libre (enzyme extracellulaire)
- Coagulase liée (protéine associée à la paroi). Les deux enzymes sont capables in vitro de coaguler le plasma de lapin (la formation d'un caillot de fibrine insoluble).



**Figure 16 :** Test de coagulase

- **Hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$**  : enzymes responsables de la lyse des hématies, ils sont mises en évidence par culture sur gélose au sang.

- Hémolysines  $\alpha$  (zone verdâtre due à la metmyoglobine, exemple : *S. pneumonia* ;
- Hémolysines  $\beta$  (auréole claire due à la libération de l'hémoglobine, exemple : *St. aureus*) ;
- Hémolysines  $\gamma$  (pas de modification, pas d'hémolyse autour des colonies, exemple : *E. faecalis*).



**Figure 17 :** Test d'hémolysine (Colonies bêta-hémolytiques de streptocoques du groupe A)

- **ADNase** : enzyme qui détruit le noyau des cellules, elle est mise en évidence sur milieux contenant de l'ADN. L'hydrolyse de l'ADN est caractérisée par une zone claire, exemple : *St. aureus*+ et *St. epidermidis*-



**Figure 18 :** Test ADNase

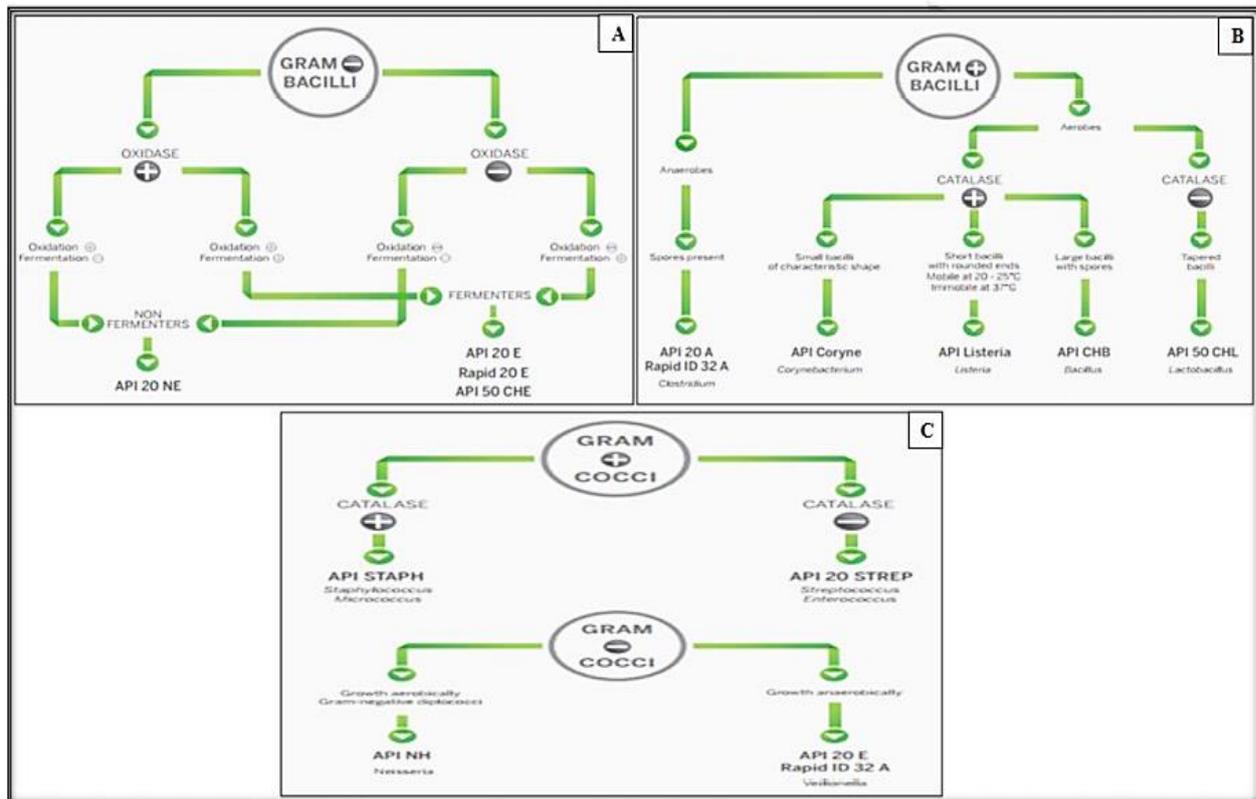
### **i.6 Galeries API**

Une galerie API (Analytical Profile Index) est un ensemble de petits tubes miniaturisés sous nommés tubules contenant des substrats déshydratés prêts à l'emploi permettant l'identification de microorganismes par la réalisation de tests biochimiques majoritairement glucidique, protidique et enzymatique. Chaque type de galerie est muni d'un mode d'emploi et d'une fiche d'interprétation des résultats. Les galeries API les plus connues sont : 20 E, 20 Staph, 10 NH, 50 CHB et 20 NE (BioMérieux, Lyon, France). Cependant, il est nécessaire d'humidifier la galerie par ajout des gouttes d'eau stérile dans les cupules de la boîte, cela empêche l'assèchement des tests.

#### **- Choix de la galerie**

Le choix du type de galerie à utiliser repose sur les caractères suivants (Figure19) :

- La forme : cocci ou bacille ;
- Le type de Gram : Gram positif ou négatif ;
- Le test de catalase ;
- Le test de cytochrome-oxydase ;
- La présence de spore (pour les bacilles Gram positif).



**Figure 19:** Guide de choix de la galerie Api (**A-** Guide pour les bacilles Gram négatif ; **B-** Guide pour les bacilles Gram positif ; **C-** Guide pour les cocci Gram positif et négatif).

### - Technique

- Recueillir fond et couvercle d'une boîte d'incubation (support en plastique) et répartir de l'eau dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide ;
- Déposer stérilement la galerie dans la boîte d'incubation
- Préparer l'inoculum ou la suspension bactérienne dans une ampoule pré-fournie ou dans un tube d'eau distillée physiologique selon les recommandations de la galerie (turbidité = 0,5 McFarland) ;
- Introduire la suspension dans les tubes de la galerie en évitant la formation des bulles ;
- Pour les caractères soulignés, remplir les cupules d'huile de paraffine ;
- Pour les caractères encadrés, remplir les tubes et les cupules ;
- Pour les caractères non spécifiés, seul le tube doit être rempli ;

- Après incubation, la lecture de la galerie doit se faire en se référant au tableau de lecture dédié à chaque galerie ;
- Effectuer les tests nécessitant l'ajout de réactifs

## **VII. Réalisation du contrôle**

La maîtrise de la qualité microbiologique (hygiénique obligatoire et marchande souhaitée par le fabricant mais aussi le consommateur) passe par un ensemble de démarches qui vont du contrôle (des matières premières brutes, en cours de transformation ou de produit fini) aux pratiques de bonnes fabrications en passant par l'identification des principaux points critiques du système de production / distribution, le plus souvent par une démarche HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point ou système d'analyse des dangers et points critiques). Ces analyses prennent aujourd'hui largement place dans la plupart des usines et des réseaux de distribution et permettent (par la réalisation de contrôles judicieux, une bonne évaluation de la qualité et une mise en évidence d'éventuelles contaminations) les actions correctives qui en découlent.

### **VII.1 Contrôle des matières premières**

Le contrôle microbiologique des matières premières doit permettre de vérifier que celles-ci ne renferment pas de microorganismes risquant de gêner le déroulement de la fabrication ou, de microorganismes qui, ne pouvant être éliminés par les technologies mises en œuvre, pourraient altérer le produit fini. Il faut distinguer les biotechnologies comprenant une étape de fermentation ou non :

- Avec fermentation, pour qu'une fermentation se déroule dans de bonnes conditions, il faut, théoriquement, ensemercer le levain dans un milieu stérile, sauf dans des cas particuliers où la fermentation est conduite avec des microorganismes indigènes. Le contrôle des matières premières dans les industries de fermentation est ramené le plus souvent, à un contrôle de stérilité ou à un contrôle de propreté microbiologique du milieu. En effet, si pour certaines industries (antibiotiques, acides aminés, ...), le milieu doit être stérile, pour d'autres, comme la brasserie, un milieu faiblement contaminé peut être utilisé, mais il ne faut pas qu'il renferme de microorganismes spécifiquement dangereux pour cette industrie.
- Sans fermentation, dans le cas de bio-industries ne mettant pas en œuvre une fermentation (technologie enzymatique), la qualité microbiologique doit être maintenue à l'aide des facteurs physico-chimiques habituels : pH, activité de l'eau (Aw), température. Au niveau des matières

premières, les contrôles microbiologiques consistent à rechercher les microorganismes potentiellement dangereux.

### **V.II.2 Contrôle de la fabrication Dans les industries de fermentation :**

Les contrôles consistent essentiellement à apprécier l'évolution des populations microbiennes dans le milieu au cours du temps, aussi bien le développement du levain que l'apparition et le développement des contaminants. Pour ces contrôles, les techniques microscopiques sont les plus utilisées : La technique du compte-cellule permet de faire une numération approximative des cellules de levain et donc permet de vérifier son développement. Les techniques de coloration (Gram, bleu de méthylène) permettent d'évaluer une contamination bactérienne dans le cas de levains à champignons (levures ou moisissures) mais aussi dans le cas des levains bactériens par les différences de formes ou de Gram des contaminants par rapport aux bactéries du levain. La technique d'immunofluorescence peut être utilisée pour la recherche de contaminations bactériennes dans les moûts de fermentation. La cytométrie de flux permet de détecter plusieurs types de microorganismes séparément (ex, des bactéries et des levures). Cela peut être appliqué au suivi de fermentation en culture pure (détection de contaminants) ou en culture mixte (évaluation simultanée du développement de chaque population). - les méthodes de culture peuvent être utilisées quand un délai de réponse est toléré. Dans les industries utilisant des cultures aérées, des contrôles sur l'efficacité des systèmes de filtration stérilisante de l'air sont nécessaires. Dans les industries ne présentant pas une étape de fermentation, les paramètres de transformation (s'ils sont bien maîtrisés) ne permettent que quelques développements microbiens. Au cours de ces processus, le contrôle microbiologique porte sur la recherche de germes dangereux.

### **VII.3 Contrôle du nettoyage et de la désinfection**

Entre deux fabrications, les locaux et les installations doivent être nettoyés et désinfectés avant d'être réutilisés. Les barèmes de désinfection (nature du produit, concentration/temps de contact) sont définis en fonction de la nature et du nombre de microorganismes à détruire. Différentes techniques sont applicables suivant les matériels à contrôler. - Pour les contrôles microbiologiques des surfaces, les techniques les plus utilisées sont les techniques par impression. Elles consistent à prélever les germes de ces surfaces par contact direct avec le milieu de culture qui sert à les révéler. Cette technique peut être mise en œuvre avec les boîtes « contact » ou tampon de gélose ou avec les lames gélosées. Ces lames existent avec différents milieux de culture selon le type de microorganismes recherchés. Lames gélosées pour le

contrôle de dispositifs moins accessibles (robinet, canules, ...), il est recommandé d'utiliser la technique d'écouvillonnage : l'écouvillon imprégné de liquide stérile est frotté sur le dispositif à contrôler puis immergé et agité dans un liquide stérile. L'analyse de ce liquide est effectuée par des techniques classiques et donne des indications sur le niveau de contamination et la nature des germes présents. La technique d'ATP métrie est bien adaptée au contrôle des traitements de nettoyage-désinfection. Dans ce cas, un écouvillonnage est effectué sur le matériel ou la surface à contrôler. L'ATP est ensuite mesurée sur la solution de rinçage de l'écouvillon. Cette valeur représente aussi bien l'ATP microbien que l'ATP de cellules animales ou végétales et est donc un indice de propreté de la surface contrôlée. - l'air renferme des particules (poussières) sur lesquelles les microbes (levures et moisissures le plus souvent à l'état de spores et aussi des bactéries) sont adsorbés. Selon leur concentration (nombre de microorganismes/unité de volume d'air), ils représentent un risque plus ou moins élevé de contamination secondaire. Différents phénomènes sont à l'origine de la contamination de l'air : la manipulation de certaines matières (ex. les graines) qui émettent une grande quantité de poussière. Les emballages sont souvent des sources importantes de contamination. Les personnes sont aussi responsables de la dissémination de particules certaines étant chargées de microorganismes. Il est donc intéressant de faire des contrôles microbiologiques sur l'air ambiant. La technique la plus simple consiste à déposer des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé, ouvertes aux endroits à contrôler. Cette technique, si elle est appliquée à des intervalles de temps réguliers, de suivre une évolution et donc mettre en évidence une augmentation de la charge microbienne de l'air. En outre, il existe des appareils utilisés pour le contrôle de l'air de façon plus rationnelle. Toutes les techniques de contrôle de la désinfection du matériel et de l'air ambiant ne conduisent pas à des valeurs absolues. Il convient donc de standardiser les délais opératoires pour que les résultats aient une signification relative et donnent une idée de l'évolution de la qualité microbiologique des matériels et des locaux.

#### **VII.4 Contrôle des produits finis**

Les contrôles microbiologiques des produits finis portent sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande, et sont plus ou moins importants suivant la nature des produits et leur destination. En effet, dans certains cas, le contrôle est ramené à une recherche de quelques microorganismes dangereux pour le produit mais dans d'autres cas, le produit devant être stérile (produits destinés aux injections intraveineuses, par exemple) les contrôles sont beaucoup plus nombreux et sévères. Par ailleurs, il existe pour certains produits des normes ou des critères de qualité microbiologique : les contrôles porteront alors sur ces paramètres. L'analyse

microbiologique traditionnelle des produits finis est quand même indispensable car elle permet avec une certaine inertie d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation. Ce type de contrôle souvent pratiqué par des laboratoires officiels (Contrôle et Répression des Fraudes) n'est pas préventif et ne permet pas de maîtriser la qualité microbiologique des produits fabriqués. Utilisé seul, il se révèle sans grand intérêt et souvent même inutile si sa mise en œuvre est longue et sans suite.

## Conclusion

Les techniques microbiologiques classiques sont longues et demandent un délai de réponse trop important pour être utilisées couramment pour un contrôle de la fabrication. Les méthodes mises en œuvre doivent être simples, donner une réponse suffisamment rapide pour qu'une correction soit éventuellement possible dans la fabrication, et doivent être peu coûteuses, de façon à pouvoir multiplier les contrôles et mieux surveiller la fabrication, sans alourdir excessivement les coûts de production. Les techniques microscopiques (observation directe, coloration de Gram ou immunofluorescence) présentent des caractéristiques de simplicité, rapidité et faible coût et sont donc à mettre en œuvre, si cela est possible, chaque fois qu'une réponse rapide est indispensable. Toutefois la sensibilité des techniques microscopiques n'étant pas toujours suffisante, il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par des méthodes classiques de culture, sur les produits finis. Quand un grand nombre d'échantillons doit être analysé, la méthode peut être automatisée avec un système d'analyse d'image ; appareil permettant la préparation d'échantillon (filtration sur membrane et marquage à l'acridine) et le comptage automatique des bactéries marquées sur la membrane. L'observation microscopique est, en particulier, utilisable dans toutes les biotechnologies faisant intervenir une phase de fermentation : cette étape peut alors être contrôlée efficacement par la recherche des contaminants sur des préparations microscopiques, à l'aide d'anticorps spécifiques ou des sondes nucléiques couplés à des fluorochromes. La cytométrie en flux permet d'obtenir un résultat très rapide puisque le comptage des microorganismes est effectué en une minute après un marquage de 10 à 15 minutes. La sensibilité de la méthode est de l'ordre de  $10^2$  à  $10^3$  /ml pour les levures et de  $10^4$  /ml à  $5.10^4$  /ml pour les bactéries, dépendant de la présence de particules autofluorescentes dans le milieu. Pour les contrôles en cours de fabrication, les techniques microbiologiques classiques peuvent, quelquefois être efficacement remplacées par des contrôles physico-chimiques liés à la présence de contaminants comme le pH. Si les méthodes par culture doivent être employées, il faut les automatiser pour accélérer les lectures.

## Références bibliographiques

**BALEDENT.F. (2002).** Les cellules hématimètres Biologiste, hôpital de Saint-Denis, France.  
H. PRESCOTT., Laboratory Exercises in Microbiology, 5ème Edition, 449 pp.

**BONNEFOY. C., GUILLET F., LEYRAL G., E VERNE-BOURDAIS. (2002).**  
Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Série Sciences des aliments.  
France. Collection Biosciences et Techniques; 248p.

**BOURGEOIS C. M. et LEVEAU J. Y. (1980).** Techniques d'analyse et de contrôle dans les  
industries agro-alimentaire, vol.3, Le contrôle microbiologique, édition Technique et  
documentation, Lavoisier, pp 278, 279,280.

**BOURGEOIS C., MESCLE J. F., ZUCCA J. (1996).** In Microbiologie Alimentaire: Aspect  
Microbiologique de la Sécurité et de la Qualité des Aliments. La microflore de la viande (336-  
345). Lavoisier Tec & Doc: Paris; 672 p.

**CAPET M. (2011).** Identification rapide et spécifique des bactéries responsables de mammite  
par méthode PCR (Polymérase Chain Reaction). Renc. Rech. Ruminants.18. Oxygen  
Laboratoires d'Analyses, 840, rue Curie, 62161 Maroeuil, France

**CARRY JANET E.L., CURTIS G.D.W., BAIRD R.M. (2003).** Handbook of culture media  
for food Microbiology volume 37, Nutricia Netherlands. Elsevier Science.

**CLARK, M.F. ET A.N. ADAMS. (1977).** Characteristics of the microplate method of  
enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. J. Gen. Virol. 34 : 475-  
483.

**DAUPHIN A, DARBORD JC. (1998).** Hygiène hospitalière pratique - - Ed. Médicales  
Internationales. 2 èmeEd-2°T. 736 p.

**DRASS RHONE-ALPES-COTEREHOS., (1995)** « l'eau et ses usages ". Comité technique  
régional de l'environnement hospitalier. 39 pages.

**FANNY S. (2011).** Optimisation du protocole de recherche des *Escherichia coli* producteurs  
de Shigatoxines (STEC) dans les aliments. Thèse de Doctorat en Sciences agricoles. Université  
de Bourgogne, France, p198.

**GIRARD R, MOUNET D, FABRY J. (1993).** Guide technique d'hygiène hospitalière - Sud-  
Est - Ed. Fondation Marcel Mérieux. Lyon, France. 335 pages.

**GROUPE EAU SANTE (1998).** Eau à Usage Médical - Définitions et interprétations pratiques – Janvier (ASTA MEDICA).

**GUIRAUD J., GALZY P. (1980).** L'analyse microbiologique dans les industries agro-alimentaire, Collection génie alimentaire. Les éditions de l'usine nouvelle, Paris, France, 239p.

**LAMRIRI N. (2000).** Quantification bactérienne par techniques de biologie moléculaire. Rapport de recherche bibliographique. ENSSIB. Parc de Tourvoie.p32

**LEBRES E et MOUFFOK F. (1999).** Guide pratique d'analyses microbiologiques des denrées alimentaires : Service de bactériologie alimentaire., institut Pasteur d'Algérie, p24.

**MAROUF.A. (2005).** Analyse instrumentale à l'usage des biologistes. Editions DAR EL GHARB 2ème édition. Algérie. p 251.

**MERZOUK Y. – CHAHROUR W. – ZAROOUR K. – ZERGUI A. – SAIDI N. – HENNI J. E. – KIHAL, M. (2013).** Physico-chemical and microbiological analysis of Algerian raw camel's milk and identification of pre-dominating thermophilic lactic acid bacteria. Journal of Food Science and Engineering, 3 :55–63

**MERZOUK Y. (2015).** Optimisation des conditions de fermentation et de préservation du lait cru de chamelle par les bactéries lactiques adaptées aux conditions de stress. Thèse de Doctorat en Contrôle microbiologique et Hygiène alimentaire Université d'Oran.107 pages.

**PETRANSXIENE.D ET LAPIED.L. (1981).** Qualité bactériologique du lait et des produits laitiers -analyse et test-technique et documentation. Deuxième édition. P 228. Lavoisier. Paris.

**ROBERTS D., GREENWOOD M. (2003).** Practical food microbiology, 3ème edition. Blackwell Publishing. p36. London.

**VERNOZY-ROZAND C. (1999).** Méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire. Collection série technique de l'ingénieur. 6 p. France.

**WINTER P.C. HICKEY G.I. FLETCHER H.L. (2006).** L'essentiel en génétique. BERTI Edition. P 401. Paris France.

**YU H and BRUNO JG. (1996).** Immunomagnetic-electrochemiluminescent detection of *E coli* O157 and *Salomella thyphimurium* in foods and environmental water samples. Applied and environmental microbiology , 62 (2): 587-592.

**FONDATION NATIONALE DE LA SANTE. (2013).** Manuel Pratique d'Analyse de l'Eau. Funasa Brésil. 4ème édition. P146.

**FRANÇOIS B. (2017).** Techniques de prélèvement des échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments et de l'eau. Leaa-REF-MIC-540 ; Quebec.p30.