

## 1. Généralités

### 1.1 Origine et nature de la flore microbienne des aliments

La présence de micro-organismes dans les aliments n'ayant pas subi de traitement antimicrobien est tout à fait normale. Sauf exceptions (quelques produits comme l'intérieur de l'œuf sont naturellement stériles), la matière alimentaire brute contient des micro-organismes, la charge microbienne pouvant être relativement élevée, de l'ordre de  $10^2$  à  $10^6$ /g. La matière alimentaire brute est d'origine végétale ou animale et la flore qui lui est associée est donc respectivement celle naturellement présente sur les plantes et les animaux. Par ailleurs, de nombreux apports exogènes peuvent accroître la charge microbienne. La flore originelle est constituée la plupart du temps de micro-organismes commensaux saprophytes ; cependant on peut y rencontrer des germes effectivement ou potentiellement pathogènes (plantes ou animaux malades ou « porteurs sains »). Les aliments sont confrontés à différentes sources de contaminations microbiennes. Par exemple, les végétaux sont contaminés par l'air, le sol, l'eau, les engrais, etc. Les manipulations et les traitements technologiques sont également impliqués. Les manipulateurs sont responsables de contaminations de contact ou de contaminations indirectes. Si la présence d'une flore originelle peut être difficile à éviter, celle liée aux contaminations peut être fortement réduite par l'hygiène. Au cours des opérations de fabrication, la flore évolue qualitativement et quantitativement. Certains traitements sont réalisés dans le but d'inhiber ou de détruire en totalité ou en partie la flore (traitements antimicrobiens).

#### 1.1.1 Flore issue des animaux et des végétaux

On peut distinguer la flore normale, rencontrée chez les sujets sains (flore commensale) et la flore pathogène rencontrée chez les sujets malades. Les flores commensales des animaux et des végétaux sont de type sensiblement différent. Cependant, la flore de surface peut présenter des similitudes car elle provient de contaminants de l'environnement : air, eau, sol, etc. La flore pathogène est totalement différente : la flore végétale a un métabolisme plutôt orienté vers les glucides, alors que celle des animaux l'est vers les protéines. Les végétaux ont une flore microbienne riche en levures {*Saccharomyces*, *Rhodotorula*, *Candida*, etc.) et en moisissures {*Saprolegnia*, *Plasmodiophora*, *Mucor*, *Rhizopus*, *Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*, etc.}. Les bactéries qu'ils contiennent appartiennent essentiellement au groupe des bacilles Gram - (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Flavobacterium*, *Acetobacter*, *Enterobacter*, *Erwinia*, etc.) et à celui des bacilles Gram + asporulés (*Corynebacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, etc.).

Les animaux possèdent différents types de flores commensales. Les plus importantes sont la flore de surface (microcoques, corynebactéries, *Listeria*, bactéries sporulées aérobies, etc.) et la flore intestinale (coliformes, entérocoques, bactéries sporulées anaérobies, mais aussi bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, etc.). L'intestin de l'homme ou des animaux contient jusqu'à  $10^{11}$  germes/g. Les voies respiratoires et génitales et la mamelle contiennent aussi une flore abondante (bactéries lactiques). Les flores phytopathogènes sont souvent de type fongique, mais quelques genres bactériens jouent un rôle important (*Pseudomonas*, *Erwinia*, *Corynebacterium*, etc.). La flore pathogène des animaux est essentiellement composée de bactéries (*Mycobacterium*, *Brucella*, *Listeria*, *Staphylococcus aureus*, certains *Streptococcus* et Entérobactéries pathogènes comme *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, etc.). Il existe des différences sensibles entre les différents types de plantes et d'animaux. Certaines espèces microbiennes sont typiques d'un hôte particulier, aussi bien pour les germes saprophytes que pathogènes. La flore varie également en fonction de l'âge (ou du stade de développement), des conditions nutritives, de l'environnement, des traitements (médicamenteux pour les animaux, phytosanitaires pour les plantes).

### 1.1.2 Contamination par les manipulateurs

Les flores commensales et pathogènes de l'homme sont proches de celles des animaux. La contamination peut provenir aussi bien de personnes saines que malades ou guéries (porteurs sains). La peau en général, les cheveux et autres pilosités sont très riches en micro-organismes ( $10^2$  à  $10^4$  germes/cm<sup>2</sup> pour la peau). Les contaminations par manipulation sont d'abord des contaminations de contact, essentiellement au niveau des mains. Les germes incriminés sont surtout *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Galkya*, etc. qui sont véhiculés par une peau saine ou par des plaies, abcès ou furoncles. Le manque d'hygiène peut entraîner la présence sur la peau de bactéries intestinales (contamination fécale : *Salmonella*). Des contaminations par aérosols (toux, éternuement, mais tout simplement aussi respiration) peuvent également avoir lieu : germes d'angines, de sinusites, aussi bien bactériens (streptocoques, staphylocoques, etc.) que viraux. Par ailleurs, la contamination peut être liée aux vêtements.

### 1.1.3 Contaminants par l'environnement

L'air et surtout le sol sont riches en micro-organismes. L'air contient des poussières chargées de spores ou de conidies fongiques, de spores bactériennes (*Bacillus*) et de formes bactériennes non sporulées (microcoques). Le sol et en particulier la terre végétale contiennent un très grand nombre d'espèces microbiennes de types très divers (*Bacillus*, *Clostridium*, *Streptomyces*, *Corynebacterium*, spores et conidies de *Penicillium*, *Aspergillus*, *Mucor*, *Fusarium*, etc.). L'eau douce et l'eau salée contiennent un nombre variable de micro-organismes en fonction de l'intensité de la pollution. Leur flore naturelle est constituée de bactéries aérobies Gram - dont des *Pseudomonas*, *Vibrio*, *Aeromonas*, *Zooglea*, etc. L'eau est utilisée abondamment dans l'industrie alimentaire : cette eau peut contenir des micro-organismes variés et être à l'origine de contaminations. Les micro-organismes rencontrés dans l'eau en plus de la flore hydrique normale peuvent avoir des origines diverses : sol (*Streptomyces*, *Bacillus*, etc.), matières fécales (Entérobactéries, streptocoques, etc.), plantes (spores et conidies fongiques), animaux, etc. L'eau peut être le vecteur de micro-organismes pathogènes : *Salmonella*, *Shigella*, *Yersinia*, *Vibrio*, *Listeria*, virus, protozoaires, etc. L'apport des micro-organismes issus de l'environnement peut se faire directement ou par l'intermédiaire de vecteurs (insectes). Les eaux usées sont de véritables bouillons de culture microbiens avec des flores d'origines diverses et généralement un fort taux de germes fécaux. .

### 1.1.4 Contaminants industriels

Le matériel industriel est une source de contamination, en particulier les surfaces poreuses (plans de travail), les outils et machines, les tissus (torchons, toiles diverses), etc., de même que le sol et les murs. Les contaminations industrielles sont en général spécifiques d'une industrie donnée. Les habitudes de nettoyage et la nature des produits utilisés ont parfois une grande importance : ils peuvent permettre la sélection d'un contaminant donné. Lors de la préparation de produits à partir de matières premières diverses, certaines de celles-ci constituent un apport privilégié de micro-organismes : certains trouvent dans le mélange réalisé des conditions favorables qu'ils ne rencontraient pas auparavant (par exemple contamination par les épices, contamination d'un produit animal par un produit végétal, etc.). Les traitements peuvent induire ou favoriser la dispersion d'une flore : par exemple la mouture d'une graine pour faire de la farine va mettre la flore de surface au contact de l'intérieur : le hachage d'une viande ou son attendrissage mécanique pourront avoir le même résultat. En boucherie, l'abattage et l'extraction provoquent une bactériémie importante s'ils ne sont pas réalisés de manière satisfaisante. Les conditions de fabrication

vont également «sélectionner» diverses catégories de micro-organismes : thermophiles, thermorésistants, psychrophiles, acidophiles, etc. Les conditions de stockage et de conservation influent par les conditions physico-chimiques et par la possibilité de contaminations nouvelles.

Les déchets industriels sont aussi une source potentielle de contamination particulièrement importante. Il faut prendre soin de bien séparer les différentes phases de fabrication et d'isoler ces déchets.

## 1.2 Évolution de la flore

### 1.2.1 Facteurs d'évolution

Le comportement de la flore microbienne va dépendre de plusieurs types de facteurs :

- le niveau de la contamination initiale : plus elle est élevée et plus l'activité sera précoce et importante (le temps de latence est raccourci) ;
- les propriétés et exigences du micro-organisme : aptitude à la dégradation des substrats (qui dépend de l'espèce incriminée, mais aussi de l'équipement enzymatique et de l'orientation du métabolisme ; il peut y avoir des phénomènes d'adaptation) , exigences nutritives (certains micro-organismes ont des exigences faibles, prototrophie ou complexes, auxotrophie) , conditions de développement , résistance ou sensibilité à divers facteurs ou produits, aptitude à la compétition avec les autres flores, etc. Certains micro-organismes ne peuvent se développer que sur certaines catégories de produit, d'autres ont un «spectre de développement» beaucoup plus large ;

**Un prototrophe** est un organisme vivant capable de proliférer dans un milieu de base sans nécessiter la présence de facteurs de croissance particuliers, il synthétise lui-même les substance nécessaire a sa prolifération.

- la nature de l'aliment : structure (présence de téguments ou de structures protectrices, texture interne, viscosité, diffusivité par rapport aux gaz, aux produits, etc.), teneur en eau (activité d'eau, pression), composition en éléments nutritifs (caractère «pauvre», «riche», équilibré, nature de la source principale de carbone et d'azote, présence de vitamines et de facteurs de croissance) , présence d'inhibiteurs naturels ou artificiels (de nombreux produits contiennent des inhibiteurs naturels, tanins, polyphenols, acides organiques, huiles essentielles, etc.) , pH (ce paramètre est un facteur fondamental : un bas pH est en général défavorable au micro-organismes pathogènes, etc. Certains aliments permettent un

développement facile pour de nombreuses catégories de micro-organismes, alors que d'autres sont des milieux hostiles ne permettant le développement que de flores spécialisées;

- les conditions de l'environnement : nature de l'atmosphère, humidité, température, etc. ;

- les traitements technologiques : ces traitements vont souvent modifier la texture, le pH, la teneur en eau et parfois la composition de l'aliment ; par ailleurs, ils peuvent modifier les conditions de l'environnement.

### **1.2. Activité des micro-organismes**

Le développement d'un micro-organisme va affecter la qualité intrinsèque de l'aliment et donc sa valeur commerciale. Les modifications ne sont pas toujours néfastes, et lorsqu'elles le sont, elles ne sont pas nécessairement dangereuses pour la santé du consommateur.

Le nombre de micro-organismes dans un aliment ne peut pas être considéré obligatoirement comme un indice de mauvaise qualité sanitaire. Un développement abondant a parfois des conséquences intéressantes. Certains micro-organismes sont utiles et même indispensables : ils participent à l'élaboration ou à la transformation de l'aliment, assurent le développement de qualités organoleptiques particulières ou participent à la conservation et favorisent la qualité hygiénique en empêchant le développement de germes dangereux. D'autres germes sont néfastes pour la qualité propre de l'aliment au niveau de la fabrication ou de la conservation.

Ce sont les germes banaux de contamination qui peuvent poser de graves problèmes dans l'industrie. Les germes utiles, levures et bactéries lactiques essentiellement, mais aussi bactéries acétiques, propioniques et certaines moisissures, sont très rarement impliqués dans des accidents sanitaires. Les germes banaux, ne participant pas aux fermentations utiles, peuvent avoir des actions néfastes variées qui affectent la valeur alimentaire et commerciale des produits (modification de texture et d'aspect, altération de la valeur alimentaire, altération des qualités organoleptiques, dégradation du conditionnement, etc.). Ces germes peuvent aussi dans certaines conditions se révéler dangereux pour la santé en étant responsables d'intoxications dues à la formation de substances toxiques (amines), ou même d'infections ou toxi-infections intestinales bénignes: ces germes strictement pathogènes sont dangereux même en faible quantité et en l'absence de développement ou de dégradation induite dans l'aliment.

## 2. Objectif du contrôle microbiologique

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

Il s'agit de la salubrité c'est-à-dire l'absence d'action toxique, de microorganismes pathogènes ou toxigènes ainsi que le niveau des populations des germes d'altération. Par ailleurs, dans le cas des conserves, il contrôle la stabilité des produits c'est-à-dire l'aptitude du produit à ne pas s'altérer trop rapidement si les conditions de stockage sont respectées.

En conséquence, le contrôle vise à déceler les lots de produits alimentaires dont le niveau de populations de la flore de contamination dépasse le seuil toléré par les normes en vigueur. Etant donné que la stérilité biologique est impossible au risque d'altérer les valeurs nutritionnelles du produit, le facteur quantitatif intervient au niveau de l'analyse de cette flore. Le plus souvent, la connaissance qualitative de la composition de la flore est inutile sauf dans les circuits de fabrication pour déceler l'agent responsable de l'accident de fabrication.

La présence de germes pathogènes est totalement indésirée dans les produits alimentaires en raison du risque sanitaire que ce genre de produit pose pour le consommateur. Dans ce cas, c'est l'analyse qualitative qui prime. Et la détection d'un seul germe pathogène, rend le produit impropre à la consommation (analyse de sécurité).

De ce fait, le contrôle vise à évaluer la qualité des produits

### 2.1. Définition de la qualité

La qualité est ce qui caractérise (qualifie) un objet, un être vivant, sans précision d'ordre moral, sans appréciation positive ou négative... La notion de qualité intègre de nombreuses facettes, comme peut le nécessiter la description d'éléments aussi divers que le vin, le diamant, un comportement, la beauté ou la laideur, ... (Encart « Les différentes facettes de la qualité »). Et pourtant, depuis le XVI<sup>e</sup> siècle déjà, et à l'exception des usages philosophique et logique, le mot qualité a pris des connotations positives, comme dans les expressions récentes « qualité de la vie » ou « rapport qualité-prix ». Cette extension du sens, presque un abus de langage, est largement utilisée dans le langage courant actuel, et particulièrement dans le domaine publicitaire

Entre plusieurs partenaires. Implicite ou explicite, elle servira de base à l'établissement d'une norme, d'une valeur, d'un prix, déterminés à partir de caractéristiques définies dans la transaction. De ce fait, il n'existe pas une mais de multiples qualités, pas nécessairement définies comme positives. La notion de qualité n'a rien d'absolu, elle est relative et mouvante, intimement liée aux évolutions industrielles, aux mouvements économiques et, plus largement, à l'histoire des sociétés.

Dans le cas de l'alimentation, la qualité peut concerner de multiples éléments, extrêmement différents : l'origine, la composition, le procédé de fabrication, la rareté, les aspects sensoriels, la sécurité, l'encadrement réglementaire, etc. Cette liste est, bien sûr, loin d'être exhaustive, et chacun des éléments est caractéristique d'une qualité dès lors qu'elle est définie

## 2.2. Composantes de la qualité

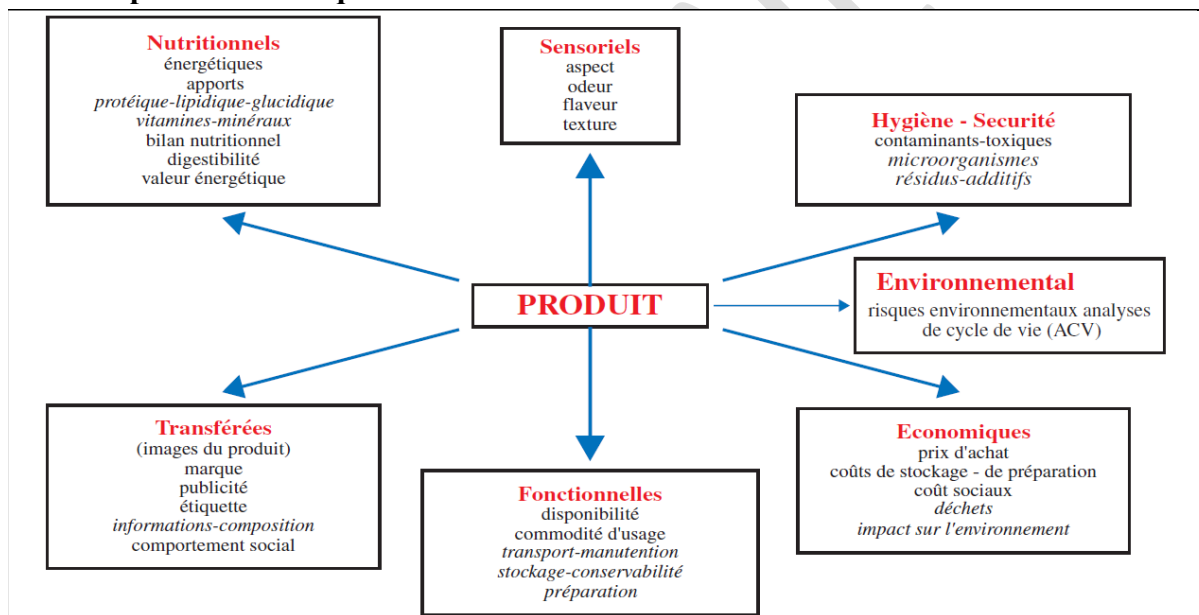


Figure 01 : Les composantes de la qualité

### 2.2.1. Qualité Hygiénique

La qualité hygiénique d'un produit alimentaire est 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** : ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de microorganismes altérants vivants dans le produit alimentaire ou dans l'eau. C'est le

cas par exemple des Entéropathogènes ou virus : *Salmonella enterica* (salmonellose), *Shigella spp.* (dysenterie bacillaire), *Yersinia enterocolitica* (yersiniose), *E. coli* entéropathogène, et infection viral.

**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).

Ces deux derniers se manifestent par des diarrhées, vomissements, douleurs abdominales et sont associés avec de la fièvre et des troubles apparaissant après une période moyenne à longue.

**Intoxication alimentaire** : ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité d'une 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*.

Cette intoxication alimentaire se manifeste par des diarrhées, vomissements, douleurs abdominales, signes neurologiques, mais elle est sans fièvre et les troubles apparaissent rapidement.

### 2.2.2. Qualité technologique (marchande)

La qualité technologique (marchande) d'un produit alimentaire est l'aptitude de ce produit à la transformation et à la distribution. Étant donné que le consommateur n'est pas le seul utilisateur, or la qualité est la satisfaction de tous les utilisateurs (fabricant et distributeurs), le produit alimentaire doit être apte à survivre tout le long de la chaîne de distribution. L'altération de sa qualité marchande modifie ses caractéristiques plastiques et organoleptiques et le rend non commercialisable.

Cette altération se produit :

- Lorsque la technologie mise en œuvre pour assurer la stabilité microbiologique du produit alimentaire est défaillante. Exemple : développement des levures osmophiles (gonflement) dans un produit sucré à activité de l'eau faible, si cette dernière n'a pas été parfaitement maîtrisée.
- Lentement au cours du stockage.

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.

### **3. Politique du contrôle microbiologique :**

Pendant de nombreuses années, le contrôle de cette qualité a consisté à vérifier l'innocuité des produits finis, c'est-à-dire leur conformité bactériologique et chimique avec la législation. Cet examen était effectué par le fabricant avant la distribution, et, éventuellement, par des laboratoires officiels de contrôle au niveau des détaillants.

Ce contrôle des produits finis présentait le désavantage majeur de nécessiter l'attente des résultats des analyses avant de pouvoir intervenir sur la chaîne de fabrication, ce qui entraînait un coût supplémentaire. Il devenait souhaitable de pouvoir anticiper d'éventuels résultats non satisfaisants par un procédé mieux adapté, ou d'intervenir sur le procédé par des rectifications en amont du produit fini. Il fallait donc effectuer des contrôles en cours de fabrication. Les industries de production alimentaire ont donc commencé à développer un système qualité permettant d'assurer un produit fini conforme à la qualité définie pour ce produit par l'entreprise elle-même : en fonction de la qualité qu'elle souhaite pour le produit qu'elle fabrique, elle conçoit et réalise son procédé de fabrication en se référant au système qualité qu'elle a elle-même établi.

Aujourd'hui, pour les entreprises, le terme de qualité est donc employé avec un sens différent, il signifie : assurer la conformité d'un produit ou d'un service par rapport à ce qui a été prévu. Le système qualité s'est aussi étendu aux laboratoires d'analyses et concerne le fonctionnement et les résultats fournis par ces laboratoires. Le but est d'assurer que la fabrication ou les prestations réellement effectuées par l'entreprise sont bien en tous points conformes à ce qui a été choisi et décrit par l'industrie de transformation ou le laboratoire d'analyses et d'essais.

Ces analyses ont été souvent l'apanage de laboratoires spécialisés car il est bien connu que l'évaluation de la qualité hygiénique de nos denrées alimentaires nécessite beaucoup de matériel, un personnel qualifié et reste encore lourde, longue et coûteuse. En conséquence, cette évaluation est encore difficilement applicable à un nombre d'échantillons représentatifs d'un lot ou d'une production.

La maîtrise de **la qualité microbiologique** (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 l'aliment 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. 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 sans pour autant trop alourdir les charges.

C'est l'objectif de la démarche **HACCP** (Hazard Analysis Critical Control Point) : analyse des risques pour la maîtrise des points critiques. Ce système vise à contrôler la fabrication du produit depuis l'achat des matières premières jusqu'à la consommation du produit. Le procédé de fabrication peut mettre en jeu jusqu'à 80 étapes différentes et il est impossible de les contrôler toutes. Il s'agit donc de localiser les étapes les plus dangereuses potentiellement pour pouvoir ensuite les maîtriser.

L'analyse des risques permet de déterminer à quel moment il peut y avoir danger potentiel par déviation d'une procédure « normale » (point critique). L'évaluation du risque consiste à déterminer la probabilité d'une conséquence inacceptable de cette déviation. Il faut donc utiliser des connaissances techniques. Un danger est considéré comme inacceptable s'il permet la croissance et la survie d'un organisme pathogène ou la contamination par un tel organisme ou s'il induit la fabrication ou la persistance de toxines microbiennes dans le produit alimentaire ou son environnement.

Cette analyse des risques conduit à l'identification des points critiques à contrôler et à maîtriser. Un point critique est un lieu, une pratique ou un procédé dont on peut maîtriser les facteurs afin de diminuer les risques potentiels.

### **HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point) :**

Le système HACCP comprend :

- l'analyse des risques : identification des risques et évaluation de leur gravité (exemple : contamination par Salmonella lors de la fabrication du lait en poudre) ;

- la détermination des points critiques ou les contrôles sont nécessaires pour maîtriser les risques identifiés (exemple : contamination du lait frais, contamination lors de le stockage, contamination lors du transport à la fabrique) ;
- la spécification des critères indicatifs pour l'efficacité du contrôle permettant la maîtrise du risque et des limites de tolérance. Un critère est défini comme limite (de nature physique, chimique ou biologique) ou caractéristique spécifique (exemple : absence de Salmonella dans 100 ml) ;
- l'exécution d'actions correctives lorsque les critères ne sont pas atteints.

L'application d'une démarche HACCP permet d'intégrer l'hygiène dans une démarche qualité. Les résultats d'une étude HACCP sont spécifiques des produits et du type de chaîne de production.

### **3.1. Niveau du contrôle et les paramètres à contrôler :**

#### **3.1.1 Contrôle des matières premières**

Cet autocontrôle effectué par l'entreprise doit permettre de vérifier le niveau de contamination général et la présence de microorganismes particuliers susceptibles de gêner la fabrication ou d'altérer le produit fini lorsqu'ils ne sont pas détruits lors de la fabrication (cuisson, salage...). La qualité microbiologique des matières premières doit donc être conforme au cahier des charges. Celui-ci pourra être différent pour une transformation mettant en jeu une fermentation; dans ce cas, on peut tolérer un milieu faiblement contaminé.

#### **3.1.2. Autocontrôle en cours de fabrication**

L'objectif recherché ici est de contrôler le procédé de fabrication du point de vue microbiologique pour mieux le maîtriser. Il faut donc localiser les points de la chaîne où il y a le plus de risques de contamination. Cette analyse des points critiques fait partie de l'étude HACCP conduite pour l'ensemble du procédé de fabrication. Ils doivent permettre de mettre en évidence rapidement un problème de fabrication afin de pouvoir modifier une partie du procédé et d'améliorer les résultats de l'analyse au < point critique >. Le résultat d'une analyse peut être supérieur au point de consigne (limite acceptable pour ce paramètre : < 100 coliformes/mL, par exemple). Dans ce cas, une action corrective est déclenchée en amont au niveau de la chaîne de production (amélioration du nettoyage et désinfection d'un accessoire de fabrication, par exemple). L'efficacité de l'action corrective est vérifiée par l'obtention d'un résultat devenu satisfaisant pour le paramètre choisi (résultat < 100

coliformes/mL). Il faut que les autocontrôles soient rapides et le moins coûteux possible afin d'être effectués avec une grande fréquence. Il faut, de plus, tester une catégorie de microorganisme représentant un bon indice du risque de contamination à ce stade précis pour le produit considéré. C'est la fréquence élevée des autocontrôles qui permet de déceler le plus tôt possible une défaillance du système de production.

### **3.1.3. Contrôle du produit fini**

C'est un contrôle effectué a posteriori pour évaluer la qualité d'un produit après sa fabrication et avant sa distribution.

Au titre d'autocontrôle, il est commandité par l'industriel pour valider la production et libérer les stocks pour la distribution. Il ne peut avoir qu'une incidence limitée sur la chaîne de production car les résultats demandent souvent 24 à 48 heures au minimum. Lorsque, au cours de ce contrôle terminal, une défaillance conduisant à la suppression du produit défectueux est détectée, la modification de la chaîne de production entraîne alors des délais d'intervention sur la fabrication du produit beaucoup plus longs que lors d'un autocontrôle en cours de fabrication.

Les contrôles officiels de routine sont effectués de façon systématique pour vérifier la conformité des produits fabriqués aux critères microbiologiques officiels afin de protéger le consommateur. Il s'agit alors d'un contrôle de nature répressive.

### **3.1.4. Contrôle des levains**

Lorsqu'un levain est utilisé pour la fabrication, sa qualité est contrôlée avant l'ensemencement de la cuve de fermentation. On cherche à détecter un contaminant, même présent en faible quantité car, après ensemencement de la cuve, celui-ci serait susceptible de se multiplier plus rapidement que le ferment sélectionné. Les levures peuvent être contaminées par des levures sauvages ou des bactéries lactiques ou acétiques ; les moisissures par des bactéries ; les levains lactiques par des bactéries à développement plus rapide ou par des bactériophages.

### **3.1.5. Contrôle de l'hygiène des locaux et du personnel**

Les conditions de fabrication elles-mêmes peuvent être contrôlées. Ceci concerne les locaux, dont la conception même doit assurer de bonnes conditions d'hygiène (contrôle de surface, contrôle de l'air ambiant). Effectués à intervalles de temps réguliers, ces contrôles peuvent faire évoluer le dispositif mis en place dans le cadre de l'assurance qualité.

Le matériel de fabrication doit être conçu de façon à éviter les zones de prolifération microbienne (angles morts). Enfin, le personnel, source majeure de contamination, doit admettre des règles d'hygiène très rigoureuses.

### 3.2. Fréquence du contrôle :

La fréquence d'analyse dépend plutôt de la typologie du produit. Les produits ne subissant pas d'assainissant au cours de leur fabrication et dont la consommation est destinée à se faire à leur état sont contrôlés par analyse microbiologique une fois par semaine.

La fréquence d'analyse des autres gammes de produits dont la consommation est estimée à moindre risque (assainissant au cours de la fabrication, consommation prévue après cuisson) est encore plus faible :

- Une fois tous les deux mois pour chaque gamme de produits avec traitement assainissant et dont la consommation se fait après cuisson ;

B N• Une fois par an pour chaque gamme de produits traités thermiquement dans leur conditionnement final.

La fréquence des contrôles est aussi déterminée par la capacité de production de l'usine et du niveau ou fluctuation du niveau de contamination. Ces fréquences sont définies par des textes réglementaires propres à chaque pays et à chaque produit. ( ISO 9001:2000 )

#### Exemple1

Dans le cas d'une adduction d'eau publique, la fréquence est liée au nombre d'habitants. L'OMS préconise d'effectuer des prélèvements à l'entrée du réseau selon les fréquences suivantes :

- ✓ Moins de 20000 habitants au moins tous les mois.
- ✓ Entre 20 000 et 50 000 habitants au moins tous les 15 jours.
- ✓ Entre 50 000 et 100 000 habitants au moins tous les 4 jours.
- ✓ Plus de 100 000 habitants tous les jours

Remarque : si l'eau est traitée, les prélèvements doivent être effectués tous les jours avant et après traitement. Dans tous les cas, la fréquence doit être adaptée Au risque et au volume d'eau captée

### Exemple 2

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 quantité de lait traitée  $\leq 5000$  l /j
- ✓ 3 fois par jours quantité de lait traitée comprise entre 5000 et 10 000 l / :
- ✓ 5 fois par jours quantité de lait traitée  $\geq 10\ 000$  l /j

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

### **3.3. Les méthodes de contrôle :**

Les méthodes d'analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans nos aliments afin d'en maîtriser leur présence ou absence (dans le cas de germes dangereux responsables de maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas de germes peu dangereux, contaminants ou hôtes normaux des matières premières composant la denrée).

(ne jamais perdre de vue qu'il faut absolument garantir la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes dangereux ou éventuellement de métabolites toxiques ou de toxines microbiennes et assurer au produit une bonne qualité et une bonne conservation).

Au plan sanitaire la liste des bactéries "dangereuses" responsables de maladies après consommation d'aliments contaminés a tendance à s'accroître : aux *Salmonella* diverses, *Shigella*, *Staphylococcus aureus* entérotoxigènes et *Clostridium perfringens* sont venus s'ajouter *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entéropathogènes ou encore des bactéries des genres *Streptococcus*, *Listeria*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Brucella* etc.

Le contrôle microbiologique de routine d'un produit alimentaire solide ou liquide consiste le plus souvent, en absence d'information sur l'éventuelle implication de ce produit à une maladie infectieuse, une toxi-infection ou une intoxication, en :

- un contrôle de stérilité pour des produits soumis à des traitements antimicrobiens de stabilisation (température, additifs, etc.).

- une estimation du nombre des contaminants (flore aérobie mésophile totale, coliformes, anaérobies sulfito-réducteurs) ou leur détection - identification (*Salmonella*, *Listeria* etc).

Ce contrôle est actuellement long (plusieurs jours), ce qui implique souvent :

- de stocker le produit en attendant la réponse (impossible pour les produits très périssables)
- de diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.

#### **4. Prélèvement, transport et préparation des échantillons**

##### **4.1. Conditions du prélèvement**

Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont d'abord le respect des règles d'asepsie (travail correct du microbiologiste) et la non modification des flores présentes dans le produit. Dans la mesure du possible, les échantillons du produit à analyser doivent être amenés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine, ce qui évite certaines contaminations. Si le produit se présente sous forme de grands volumes (réservoirs à lait etc...) s'assurer de la bonne homogénéité de la répartition des micro-organismes ; une partie représentative du produit sera prélevée stérilement. Il est parfois nécessaire de réaliser des prélèvements à divers niveaux de l'aliment (surface, profondeur d'un aliment solide) ou après broyage et homogénéisation. Les manipulations effectuées au cours du prélèvement ne doivent en aucun cas être à l'origine d'une contamination : nécessité d'utiliser des instruments stériles et de travailler stérilement. Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement. Le trempage dans l'alcool et le flamage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée. Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, étanches, à col large stérilisés au four Pasteur (160°C - 10 mn) ou par autoclavage à 121°C pendant 30 min ou encore à usage unique et stériles ; leur taille doit être adaptée au volume de l'échantillon. Les récipients peuvent être en verre, en métal ou en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate, polypropylène); dans ce dernier cas il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid (radiations). Dans tous les cas les récipients de prélèvement doivent posséder un système de fermeture hermétique. Le prélèvement d'un

produit emballé doit être réalisé dans la zone de stérilité d'un bec bunsen ou d'un système équivalent.

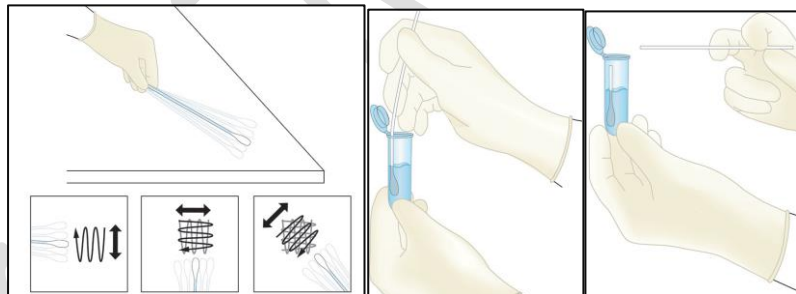
## 4.2. Procédure générale de prélèvement des aliments

Une fois le plan d'échantillonnage déterminé, le matériel préparé et le site de prélèvement identifié, procéder au prélèvement de l'aliment de façon aseptique.

Prélever en tout temps, à moins de spécification particulière, un minimum de 300 g ou ml. Il est important de considérer l'état physique du produit (liquide, solide) et sa température de conservation (température ambiante, de réfrigération ou de congélation). Si ce minimum ne peut être atteint, en prendre note sur la demande d'analyse. Pour les produits en vrac, le 300g doit être prélevé à environ cinq endroits différents dans le lot ou le contenant.

### 4.2.1. Prélèvement en surface

#### - Ecouvillonnage



**Figure 02:** Technique d'écouvillonnage d'une surface

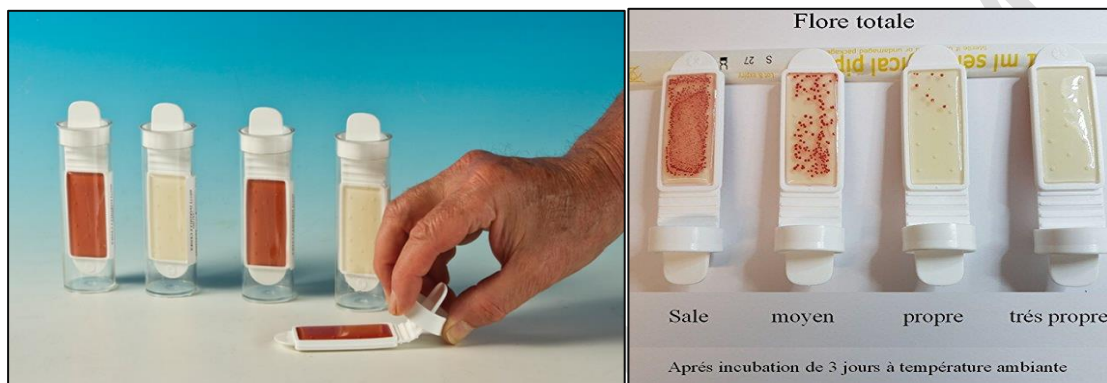
Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile de Ringer au 1/4 ou dans un bouillon tryptone-sel additionné de Tween (0,5<sup>o</sup>/°°). Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit ; l'écouvillon est alors immergé dans 10 ml de Ringer au 1/4 ou 10 ml de bouillon tryptone-sel. L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

- **Rinçage:** cette méthode est utilisée dans le cas de récipients ou de tuyauteries; un volume connu de solution stérile est introduit dans le matériel à analyser. Après agitation, le liquide est récupéré et soumis à l'analyse.



- **Méthode des empreintes** : un ruban adhésif préalablement stérilisé par les UV est appliqué sur la surface à étudier. Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies.

Cette technique peut aussi être remplacée par l'utilisation des lames gélosées prêtes à être mise en contact direct avec la surface que l'on désire analyser, et incubée directement. (Figure 03).



#### 4.2.2. Prélèvement de produits liquides

La technique varie avec le produit, le volume et la forme du contenant. Il faut néanmoins toujours s'assurer de la parfaite homogénéisation du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette (ou avec un flacon testé stérile ou autre) le volume nécessaire à l'analyse.

#### 4.2.3. Prélèvement de produits solides

Selon le produit, le prélèvement sera effectué au scalpel, à la sonde (fromages et produits mous) ou à la pipette harpon. La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) Il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement.

#### 4.2.4. Produits congelés

Utiliser des instruments coupants tels : couteau, sonde ou mèche stérilisée, si requis. Pour les essais microbiologiques, à moins de spécifications contraires, les échantillons congelés peuvent parvenir au laboratoire décongelé pourvu que la température soit égale ou inférieure à 4°C pendant la décongélation. La décongélation peut se faire pendant le transport. La décongélation et la recongélation doivent être évitées en ce qui concerne les essais

microbiologiques. La glace sèche ne doit être utilisée que dans le cas où l'état de congélation est nécessaire à la validité du résultat.

#### **4.2.5. Contenants originaux- Produits finis**

Autant que possible, lorsque les unités d'échantillonnage sont petites, prélever les contenants originaux fermés afin de minimiser les risques de contamination. Les contenants devraient être placés dans des sacs de plastique propres, si leur étanchéité peut être facilement compromise (exemple : tous les produits emballés seulement avec une pellicule plastique de type « Saran »). Les contenants ouverts, brisés ou endommagés ne doivent pas être échantillonnés.

### **4.3. Traitement de l'échantillon**

#### **4.3.1. Transfert de l'échantillon au laboratoire**

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé il faut identifier immédiatement le produit avec une étiquette ou une référence. Il est souhaitable de ne pas utiliser de crayons feutres sur des films plastiques (PVC) car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse. Noter la température initiale l'heure du prélèvement, la date et la température de transport. Amener alors les échantillons le plus rapidement possible au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. L'analyse devrait être réalisée dans l'heure qui suit le prélèvement.

Dès réception au laboratoire l'échantillon accompagné de sa fiche signalétique est enregistré.

Si l'échantillon doit être transporté il faut réduire au maximum le délai avant l'analyse. Il est souvent nécessaire de réfrigérer (mais non congeler) le produit au cours de son transport; certains germes fragiles peuvent disparaître au cours de cette réfrigération. Si un produit est déshydraté ou en conserve il ne doit pas être réfrigéré.

Pour un produit congelé s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant 1 mois avant d'être analysé). La congélation d'un produit provoque une diminution plus ou moins importante du nombre de germes qu'il contient. Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à -18°C, transporter le produit à cette température et décongeler à l'air ambiant à température voisine de 20°C pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permette le prélèvement. (nature, date, heure, provenance du prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées, autre indications utiles).

#### 4.3.2. Préparation de l'échantillon

Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution. Pour les produits liquides (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

Pour les produits solides diverses techniques de "broyage" sont utilisables :

**1) broyage manuel** au Potter ou en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)

**2) broyage mécanique** avec un broyeur électrique à couteaux de type VIRTIS . Au cours du broyage les germes doivent être dispersés mais non détruits; la température ne doit pas trop s'élever (le récipient peut être placé dans de la glace). Le broyage s'effectue en général avec 10 volumes (ou 9) de diluant pour 1 "volume" de produit (par exemple 10 g de produit et 100 ml (ou 90) de diluant stérile). Le diluant peut être de l'eau distillée, de l'eau physiologique, du Ringer au 1/4 ou une solution tryptone-sel , etc. .

- avec un broyeur du type STOMACHER. Cet appareil permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant. De plus il n'est pas nécessaire, comme dans le cas de l'utilisation d'un broyeur de type Virtis, de stériliser les récipients entre deux utilisations. En effet, le Stomacher (digesteur) utilise des sacs plastiques stériles à usage unique. La prise d'essai est le plus souvent de 10 g (ou 25) d'aliment et de 90 ml (ou 250) de diluant.

#### 4.4. Techniques de dilution

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu: ainsi *Staphylococcus aureus* est "tué" en quelques heures dans de l'eau distillée de même que la plupart des entérobactéries (*E.coli*); il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou dans du Ringer au 1/4 et pour *Escherichia coli* dans de l'eau salée à 8,5%. Actuellement il paraît souhaitable, sauf indication afférente à un type donné d'aliment, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de

typtone sel. En absence d'information le choix se fera en fonction de la composition du produit à analyser : si le produit est riche en protéine et en minéraux, Ringer ou eau physiologique suffisent et même une solution de phosphate à 2% et pH 7,4 dans le cas des fromages frais, crèmes fraîches et caséinates.

**Tableau 01 : Les différents types de diluants utilisés**

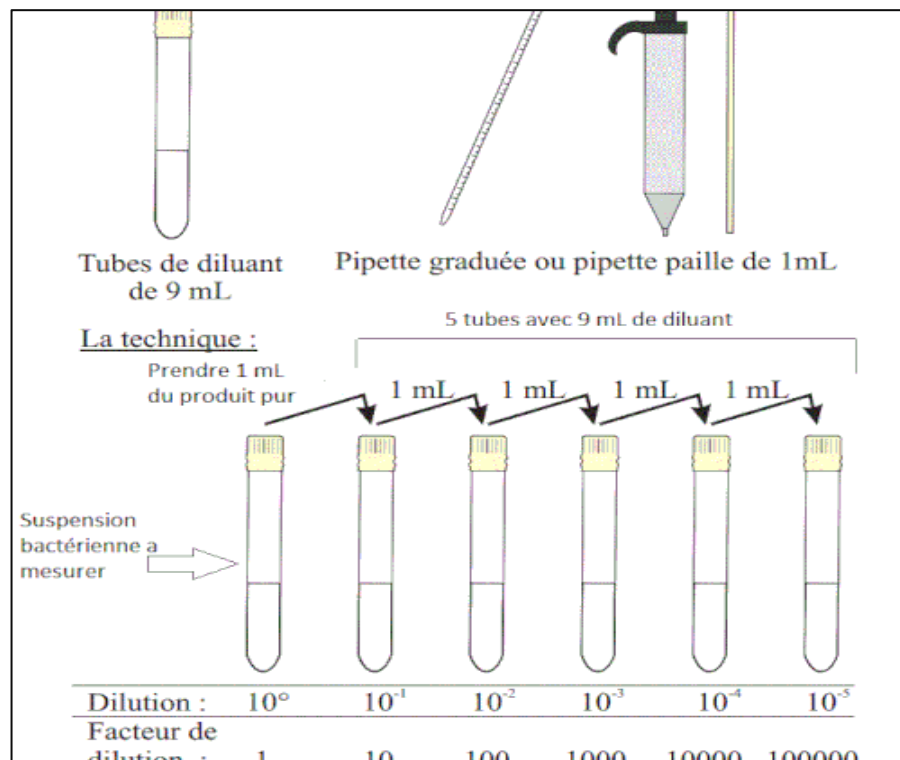
tryptone sel	Ringer (solution mère)	Eau physiologique	Eau peptonée tamponnée
tryptone 1 g NaCl 8,5 g eau D 1000 ml pH = 7	NaCl 9 g KCl 0,42 g CaCl <sub>2</sub> 0,48 g  NaHCO <sub>3</sub> 0,2 g eauD 1000 ml	NaCl 9 g eau D 1000 ml	bacto peptone 20 g NaCl 5 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 9 g  K H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 1,5 g eau D 1000 ml pH = 7,2

Tous ces diluants sont stérilisés à 121°C pendant 20 minutes.

Il faut noter que les milieux tryptone-sel et eau peptonée tamponnée permettent, dans des conditions particulières (température, temps), de réaliser une revivification. L'eau peptonée tamponnée est utilisée avec certains produits acides au fort pouvoir tampon comme les yaourts.

**Les dilutions** nécessitent la présence de nombreux tubes à essais contenant le plus souvent 9 ml de diluant stérile et de nombreuses pipettes stériles de 1 et 10 ml. Les pipettes peuvent être remplacées par des systèmes de pipetage automatique munis de cônes à usage unique. Toutes les manipulations sont à effectuer avec toutes les précautions d'asepsie exigées en microbiologie. L'introduction éventuelle d'un contaminant ou la contamination de l'opérateur doivent ne jamais se produire. Le récipient contenant le liquide à diluer est agité manuellement avec précaution pour éviter les projections pendant une dizaine de secondes. On prélève stérilement 1 ml de ce liquide (aspirer et refouler une fois avant le prélèvement) que l'on introduit dans un tube contenant 9 ml de diluant stérile. Le tube est agité par des mouvements de rotation ou au moyen d'un Vortex. On obtient ainsi une dilution au 1/10. Avec une nouvelle pipette de 1 ml on prélève 1 ml de

cette dilution que l'on introduit dans un nouveau tube de diluant de 9 ml ; on obtient une dilution au 1/100 et ainsi de suite jusqu'au niveau de dilution recherché.



**Figure 04** Technique de dilution

#### 4.5. La revivification

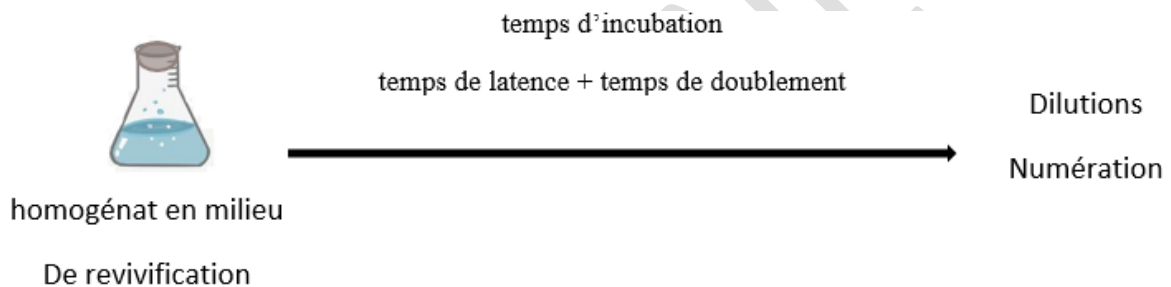
Les micro-organismes sont souvent “endommagés” mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillissement. Ces altérations se reflètent dans certaines de leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaries, colorants, sels etc.). En général ces altérations sont réversibles et après leur disparition les bactéries récupèrent leurs propriétés initiales, en particulier au niveau de leur croissance ou de leur pouvoir pathogène. La nécessité de faciliter le “rétablissement” des cellules ayant subi des altérations sub-létales, c’est-à-dire leur “réanimation” ou encore leur revivification, s’impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d’inhibiteurs.

En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu’il n’y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque

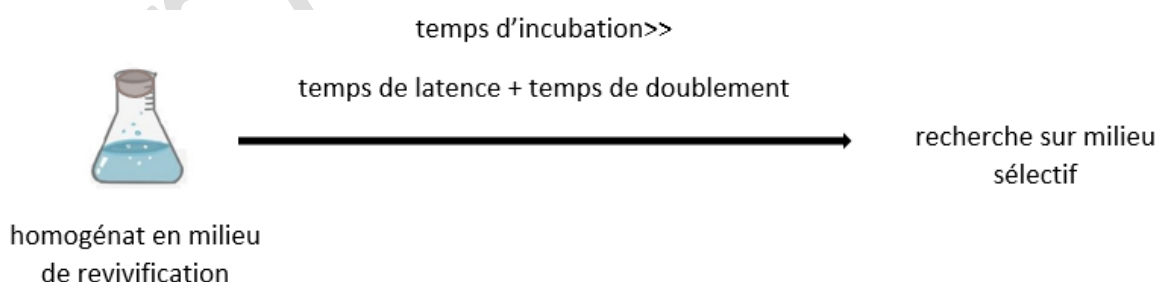
pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s'agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.

#### 4.5.1. Revivification en milieu liquide

La revivification peut être réalisée dès la première étape de l'analyse au cours de laquelle le produit est additionné de diluant. Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d'incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps qui variera en fonction du type d'analyse réalisé, temps qui est le plus souvent voisin du temps de latence du germe "normal". Si la durée de revivification est supérieure au temps de latence, il se produira une multiplication des germes non altérés ce qui conduira, selon les techniques de numération utilisées par la suite, à une surévaluation du nombre de germes. Après cette phase préalable de revivification la numération est réalisable soit en milieu liquide soit en milieu solide.

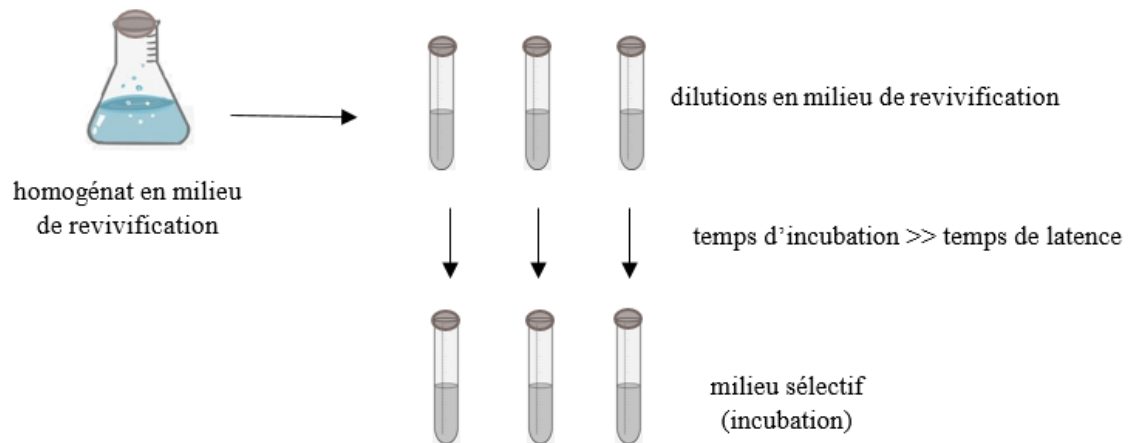


Dans les épreuves du type présence ou absence, la revivification est obtenue par un pré-enrichissement dans un milieu favorable (ex. Recherche des *Salmonella*). La durée d'incubation peut être relativement longue car la multiplication des germes à rechercher est dans ce cas très souhaitable.



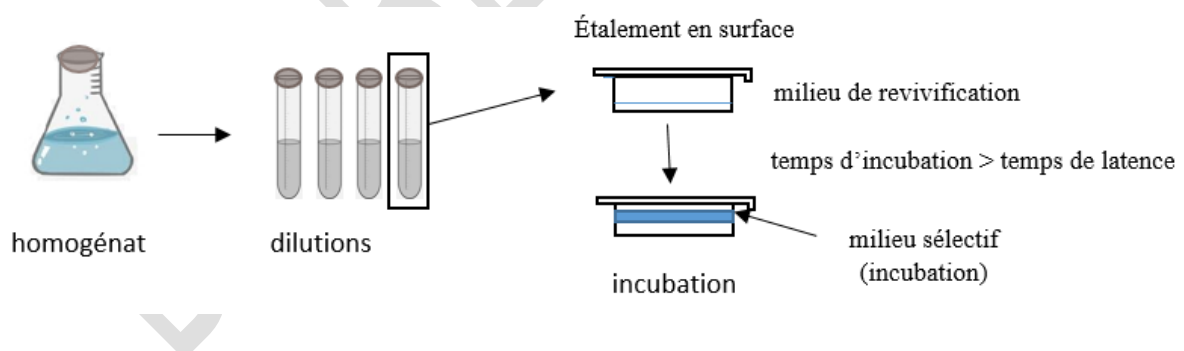
Dans le cas où la numération des germes doit être réalisée deux autres méthodes sont encore envisageables :

- Quand la numération est effectuée en milieu liquide, la revivification est réalisable dans des milieux non sélectifs ensemencés à partir des différentes dilutions. C'est à partir de ces milieux que sont ensuite ensemencés les milieux sélectifs (de tube à tube).



#### 4.5.2. Revivification sur milieu solide

- Quand la numération est effectuée sur milieu solide, la revivification peut être obtenue par une pré-culture sur une gélose non sélective favorable avec un temps d'incubation supérieur au temps de latence, mais ne permettant pas la formation de colonies macroscopiques visibles. Après revivification, la surface de la gélose est recouverte de gélose sélective.



- Quand la numération est réalisée après filtration sur membrane, la membrane sur laquelle se trouvent les germes est d'abord placée à la surface d'un milieu de revivification pendant un temps permettant éventuellement plusieurs divisions cellulaires normales puis le filtre est placé à la surface d'un milieu sélectif. A titre d'exemple, les conditions optimales de revivification par cette méthode de germes "stressés" sont les suivantes :

**Tableau 02** : Méthode de revivification de quelques genre bactérien

Traitement	Germe	Revivification	
		Temps h	T
<b>Chaleur</b>	Coliformes	5	35
<b>Congélation</b>	Coliformes	4	35
	Entérocoques	4.5	35
<b>Acide</b>	Coliformes	4	35
<b>Séchage</b>	Coliformes	2	25
	Entérocoques	4	25

## 5. Principales techniques de numération

En microbiologie alimentaire l'intérêt de l'étude à la fois quantitative et qualitative de la flore présente dans un aliment est considérable. Bien que de nombreuses techniques de numération soient utilisables, il n'existe pas à l'heure actuelle de technique parfaite. Certaines méthodes ne permettent pas de différencier les germes vivants des germes morts, d'autres s'avèrent incapables de compter individuellement les cellules microbiennes lorsque celles-ci sont associées (Staphylococcus, Streptococcus, mycélium etc..) et permettent d'évaluer des unités formant colonies (UFC) ou des unités formant trouble (UFT).

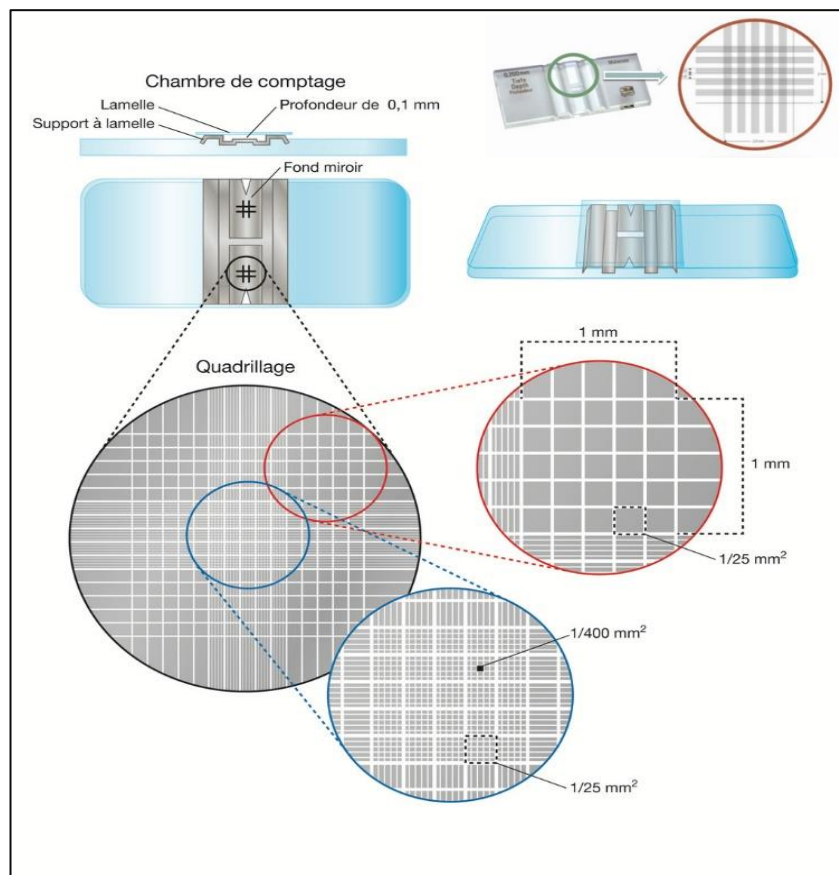
### 5.1. Les méthodes générales directes

#### 5.1.1. Comptage direct

Il s'effectue au microscope à l'aide de microchambres graduées de volume connu (cellules de Thoma, de Malassez, etc...) après dilution en eau physiologique pour les germes morts, en eau formolée à 10 % pour les germes vivants. Ce type de comptage peut être automatisé (compteurs de particules). Il est également possible d'estimer au microscope le nombre de micro-organismes d'un produit donné après étalement et coloration d'une quantité connue du produit (de l'ordre de quelques microlitres) sur une lame. Enfin, un comptage direct est réalisable après filtration du produit (ou de ses dilutions) sur membrane, coloration de la membrane et observation microscopique. Cette dernière technique permet l'évaluation, après coloration par l'acridine orange et observation en épifluorescence, des micro-organismes vivants et morts (DEFT). Ce colorant est un



intercalant des acides nucléiques avec lesquels il forme des complexes fluorescents verts (ADN) ou orange (ARN)



**Figure 05:** Cellule de comptage

**5.1.2. Détermination du poids sec,** ou dosage des protéines microbiennes ou dosage des acides nucléiques

### 5.1.3. Néphélométrie

La turbidité d'un milieu est, dans certaines conditions, proportionnelle au nombre de micro-organismes présents dans ce milieu. Il est par ailleurs possible de comparer visuellement la turbidité du milieu avec une gamme étalon d'albumine (méthode de Mestrezat : ainsi l'opacité d'une suspension de 5.10<sup>9</sup> staphylocoques par ml est identique à celle d'une suspension d'albumine à 0,5 g par litre).

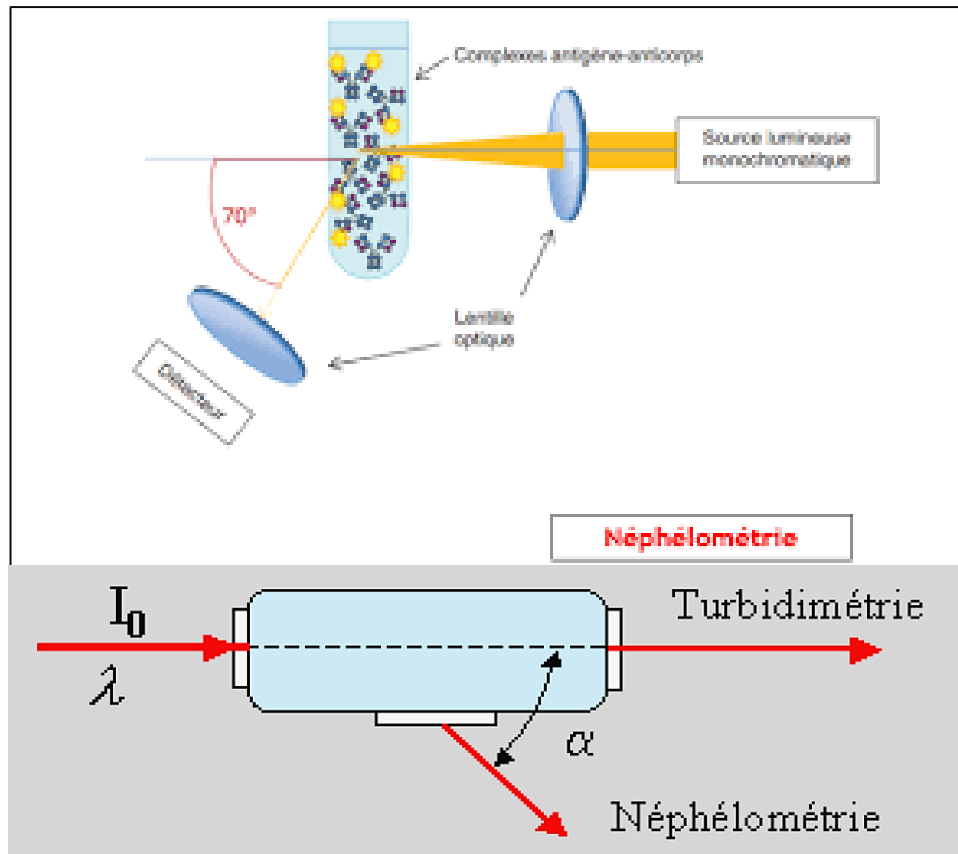


Figure 06 : principe de la néphélométrie

#### 5.1.4. Système luciférine - luciférase

Cette méthode permet le comptage des micro-organismes vivants par dosage de l'ATP intracellulaire, la teneur en ATP intracellulaire étant sensiblement constante pour un micro-organisme donné ; cette teneur est égale à 0 si le germe est mort.

### 5.2. Les méthodes générales indirectes

#### 5.2.1. Dosage d'un métabolite primaire synthétisé, ou dosage de la quantité d'un substrat consommé.

Ces méthodes ne sont applicables que dans des conditions bien définies (phase exponentielle de croissance, température, milieu etc...).

#### 5.2.2. Réduction d'un colorant

Certains micro-organismes modifient le potentiel d'oxydo-réduction des milieux dans lesquels ils se trouvent ; la vitesse de cette modification est à la fois fonction du nombre de micro-organismes, de leur activité métabolique (réductrice le plus souvent) et d'autres paramètres tels que la nature du milieu, le germe, la température etc...

Parmi les indicateurs disponibles le bleu de méthylène et la résazurine sont les plus utilisés.

### 5.2.3. Dilution et culture

Cette technique permet en principe la numération des germes vivants. La culture est réalisée soit en milieu liquide (1 germe ou un groupe de germes donne après inoculation et incubation 1 culture positive) soit en milieu solide (1 germe ou un groupe de germes donne naissance à une colonie). Dans ce dernier cas l'ensemencement peut se faire dans la masse de la gélose ou en surface.

#### 5.2.3.1. Numération à partir d'un milieu solide : UFC

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de Pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC présents dans l'inoculum. De nombreuses critiques à cette méthode peuvent être formulées. Ainsi, les bactéries aérobies strictes se développent mal dans la masse de la gélose, tandis que les bactéries anaérobies strictes ne s'y développeront que dans des conditions d'incubation appropriées (jarre anaérobie par exemple). Il peut aussi exister certains antagonismes bactériens (bactériocines etc...). Par ailleurs si la température de mélange du milieu gélosé mélange à l'inoculum est supérieure à 45 - 47°C, il peut y avoir inactivation de microorganismes. Cette méthode de culture dans la masse conduit néanmoins à des dispersions homogènes dans la gélose et donc à une distribution homogène des colonies. Dans cette méthode des germes se trouveront dans la masse et d'autres en surface, les colonies formées étant, compte tenu des contraintes stériques imposées par le réseau gélifié, alors différentes pour un même micro-organisme. Cet inconvénient est éliminé par la technique de la double couche.

La numération en surface n'est réalisable que sur une surface de milieu parfaitement sèche. L'opération d'étalement au râteau reste à maîtriser (adsorption de germes sur le râteau) et le volume d'inoculum déposé ne peut en aucun cas excéder 0,5 ml avec des boîtes de 9 cm de diamètre (des volumes supérieurs ne sont pas absorbés par le gel d'agar et l'eau qui reste en surface rend impossible toute numération en raison de la formation d'une nappe). Cette méthode donne de bons résultats avec les germes aérobies et aéro-anaérobies.



**Figure 07 :** Différentes méthodes de comptage

#### **a. Technique de numération dans la masse de la gélose**

Les milieux gélosés (répartis en erlenmeyer ou en flacon de 15 ml) sont liquéfiés au bain-marie bouillant ou mieux au four à micro-ondes, puis maintenus en surfusion dans un bain-marie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ . 1 ml du liquide dans lequel on veut connaître le nombre de micro-organismes est introduit au centre de la boîte de Pétri posée bien à plat dans la zone de protection du bec Bunsen. L'inoculum peut être réparti en gouttes sur le fond de la boîte. Afin de n'utiliser qu'une seule pipette stérile pour toutes ces opérations il est recommandé de commencer l'ensemencement par la dilution la plus grande pour terminer avec le liquide non dilué.

Noter avec soin sur chaque boîte l'origine de l'analyse, le milieu utilisé et la dilution correspondante (sur le côté de façon à ne pas être gêné par la suite pour le comptage).

On procède de la même façon pour chaque dilution en réalisant, dans la mesure du possible, deux essais par dilution. Le milieu gélosé en surfusion dans lequel l'inoculum sera incorporé doit être à  $45^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ . Si sa température est supérieure à cette valeur il se produira une destruction partielle de la flore ; au contraire, si sa température est inférieure à  $45^\circ\text{C}$  le milieu se solidifiera irrégulièrement et ne se mélangera pas de façon homogène avec l'inoculum. Pour réaliser l'introduction du milieu gélosé : retirer le milieu du bain marie à  $45^\circ\text{C}$ , essuyer le récipient, l'ouvrir aseptiquement, flamber son ouverture et couler le milieu dans la boîte de Pétri contenant l'inoculum après l'avoir entrouverte dans la zone stérile. Ne pas appuyer le récipient sur la boîte. Mélanger rapidement par agitations circulaire et alternative horizontales ; éviter les mouvements brusques qui risquent de projeter le milieu inoculé sur les bords ou même à l'extérieur de la

boîte. Laisser refroidir les boîtes bien à plat jusqu'à solidification complète (environ 30 minutes). Retourner les boîtes et les placer à l'étuve dans cette position à la température requise.

Pour éviter la formation de colonies de grande taille en surface (par rapport à celles qui se développeront dans la masse de la gélose) on peut couler à la surface de la gélose ensemencée une fine couche de milieu de culture identique à celui déjà présent dans la boîte ou couler à la surface une mince couche de gélose non nutritive (technique de la double couche). (Figure 08)

#### **b. Technique de numération en surface de la gélose**

100 à 500 microlitres (pipette graduée ou mieux pipette automatique) du milieu à analyser sont déposés à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme à la surface du milieu au moyen d'un enseigneur stérile du type pipette râteau. La pipette râteau est "stérilisée" entre deux étalements par immersion dans de l'éthanol. l'éthanol adsorbé sur le verre étant ensuite enflammé (cette opération ne déforme pas l'enseigneur).

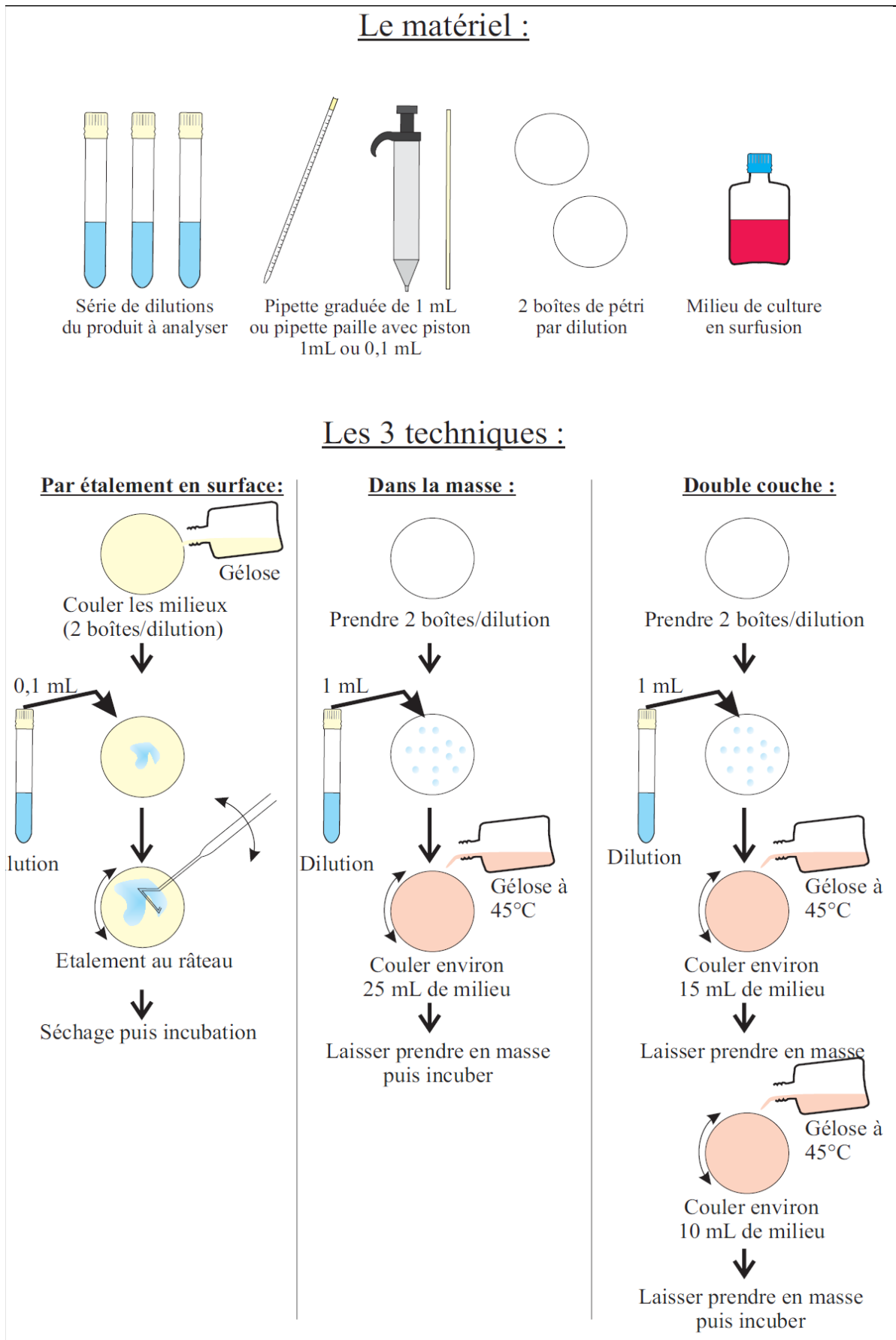


Figure 08 : Les techniques de dénombrement en milieu solide

### 5.2.3.2. Numération en milieu liquide : UFT

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification. Cette méthode repose sur le fait qu'un inoculum contenant au minimum 1 germe (UFT) donnera, après introduction dans un milieu liquide donné, une culture positive. Dans cette technique, la disponibilité des nutriments pour le micro-organisme est excellente.

#### a. fractionnement de grands volumes liquides

Pour éviter l'accumulation de produits de dégradation qui pourraient avoir une action inhibitrice, on ensemence 1 ml d'inoculum dans 100 ml de milieu de culture. Ce milieu est ensuite réparti aseptiquement dans 10 tubes à essais à raison de 10 ml par tube, puis incubé. En supposant une distribution homogène des micro-organismes, on peut conclure à la présence de 1 à 10 micro-organismes dans l'inoculum initial de 1 ml.

- Si tous les tubes cultivent.....plus de 10 germes/ml
- Si 9 tubes cultivent..... plus de 9 germes/ml
- Si 1 tube cultive..... plus d'un germe/ml.

#### b. Méthode de Mac Grady (Technique du nombre le plus probable NPP)

Cette méthode permet de révéler de plus faibles quantités de germes que la plupart des méthodes de numération en milieu solide. Elle repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des nombres les plus probables (NPP). Il existe de nombreuses variantes à la méthode en fonction de la charge microbienne à évaluer. Cette méthode suppose que le micro-organisme est normalement distribué dans le milieu et donc qu'un même volume d'échantillon contient en moyenne le même nombre de microorganismes (en réalité il en contient un peu plus ou un peu moins) ; le nombre le plus probable correspond à la valeur moyenne. Si le nombre de micro-organismes est faible l'écart par rapport à la moyenne peut être élevé et inversement.

Exemple : un produit liquide contient 100 micro-organismes / 100 ml

Des prélèvements de 10 ml contiennent en moyenne 10 germes avec des tubes à plus de 10 et peu à moins de 1. Des prélèvements de 1 ml contiennent en moyenne 1 germe avec des tubes à plus de 1 et des tubes négatifs.

Des prélèvements de 0,1 ml conduisent à 1 tube positif pour 10 tubes et de nombreux tubes sont négatifs.

#### **-Numération de charges microbiennes comprises entre 0 et environ 15 pour 100 ml**

Dans ce cas 50 ml de produit sont introduits dans un erlenmeyer avec 50 ml de milieu de culture adapté à double concentration, et 5 fois 10 ml introduits dans 5 tubes contenant 10 ml de milieu de culture également à double concentration. Après incubation les tubes positifs sont identifiés et le NPP pour 100 ml de produit est déterminé en utilisant la table suivante:

<b>Erlenmeyers positifs</b>	<b>Tubes de 10 ml positifs</b>	<b>NPP/100ml</b>
0	0	0
0	1	1
0	2	2
0	3	4
0	4	5
0	5	7
1	0	2
1	1	3
1	2	6
1	4	9
1	5	16
1	6	+de 18

#### **-Numération de charge microbienne comprise entre 0 et 100 germes par ml**

Dans ce cas 1 ml de la suspension mère puis de ses dilutions est introduit dans des tubes contenant le milieu de culture choisi mais en réalisant chaque essai en double (ou en triple ou plus suivant le niveau de précision souhaité).

Avec l'essai comportant deux tubesensemencés par dilution on note, après incubation, les réponses positives ou négatives et on affecte :

- le chiffre 2 à deux tubes positifsensemencés avec la même dilution
- le chiffre 1 si l'un des deux tubes donne une réponse positive à une dilution donnée
- le chiffre 0 si la culture est négative pour les deux tubes.



## Exemple

	produit pur		dilutions							
			10 <sup>-1</sup>		10 <sup>-2</sup>		10 <sup>-3</sup>		10 <sup>-4</sup>	
	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2	tube 1	tube 2
résultat après incubation	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
affectation	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0
nombre par dilution	2		2		1		1		0	
nombre de trois chiffres										

Les chiffres adjacents sont groupés par 3; on obtient des nombres de 3 chiffres qui sont 221, 211, 110. Le nombre le plus petit et pour lequel, si possible, le chiffre des unités est un 0 (110 ici) est choisi. Pour ce nombre, la table de Mac Grady donne le nombre le plus probable de bactéries par ml ou de produit pur et ce évidemment pour l'essai à deux tubes par dilution. Le chiffre des centaines (1 dans le cas de 110) correspond à la dilution à considérer pour donner le NPN par ml de produit. Ainsi dans l'exemple choisi 110 correspond à la dilution "-2" ce qui donne, d'après la table de Mac Grady, 1,3 bactéries (UFT) par ml. Ce NPP correspond donc à la dilution 10<sup>-2</sup>, soit à un NPP de 130 bactéries (UFT) par ml de produit non dilué.

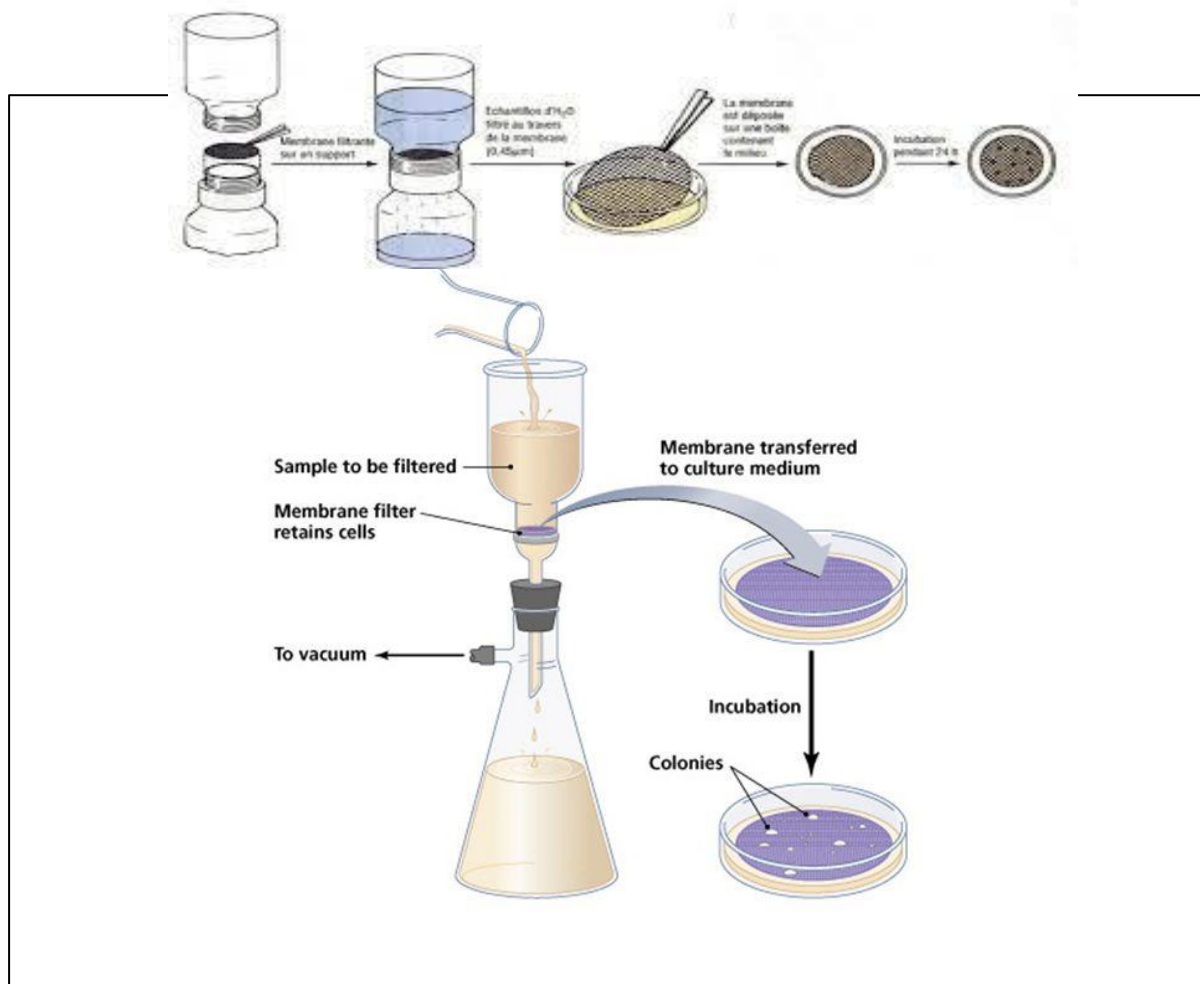
Il existe des tables de Mac Grady pour les essais à 3 ou à 5 tubes avec des volumes d'inoculum de 1 ou 10 ml et même 50 ml.

#### 5.2.4. Numération par filtration

Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon ou de ses dilutions au travers d'une membrane filtrante (par exemple une membrane Millipore ou Sartorius ou ...de 47 mm de diamètre et dont la porosité moyenne est de 0,45 µm à 0,22 µm) sur laquelle sont retenus les micro-organismes recherchés.

Après filtration, on rince l'entonnoir supérieur avec de l'eau distillée stérile ou avec une solution tamponnée stérile afin de récupérer la totalité des germes et d'éliminer du filtre lui-même d'éventuels agents microbicides. Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu de numération imbibant un filtre adéquat ou sur un milieu gélosé spécifique du germe à rechercher, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation,

comme dans le cas de la numération en milieu gélosé, on compte les colonies formées à la surface du filtre.



**Figure 09** : Technique de comptage par filtration

Cette méthode présente certains avantages par rapport aux méthodes déjà écrites. Ainsi, le temps d'incubation est généralement plus court (18 heures au lieu de 24 heures), le volume d'échantillon analysable plus grand (jusqu'à plusieurs litres, ce qui permet de réaliser des numérations de germes dans des liquides en contenant très peu tels que certaines eaux) ; il n'y a aucune interférence entre micro-organismes (séparés à la surface du filtre et nourris par diffusion du milieu de culture au travers des pores) et les agents microbicides associés au produit sont éliminés (chlore, antibiotiques, conservateurs etc.).

Les différences existant entre les résultats des numérations spécifiques d'un micro-organisme donné ont le plus souvent comme origine la nature du milieu de culture choisi ainsi que la méthode utilisée, la température et la durée de l'incubation sans omettre les variations liées au manipulateur

### **5.3. Interprétation des numérations**

#### **5.3.1. Calcul de la charge microbienne du produit**

Il faut, à partir du nombre d'unités formant colonies ou du NPP déterminé pour une dilution donnée, "remonter" au produit analysé. Dans le cas d'un produit liquide, cela ne présente aucune difficulté puisqu'il suffit de multiplier le nombre ou le NPP trouvé à une dilution donnée par l'inverse de celle-ci. Si par exemple 256 colonies ont été comptées dans la boîte ensemencée à partir de 0,1 ml de dilution  $10^{-3}$  du produit, le nombre d'UFC par ml de produit est égal à :

$$256 \times 1 / 0,1 \times 1 / 10^{-3} \text{ soit de } 256.104 \text{ UFC / ml.}$$

Dans le cas d'un produit solide, le broyage ou la mise en suspension initiale est considérée comme une dilution dont il faut tenir compte. Si par exemple 10 g de produit ont été mis en suspension dans 90 ml de bouillon tryptone-sel, on considère que 1 ml de cette suspension correspond à 0,1 g de produit. Il s'agit là d'une approximation car en toute rigueur, il faudrait procéder à la mise en suspension en prenant un poids donné de produit et en complétant à un volume précis par du diluant. Il est possible parfois de prendre en considération la teneur en eau du produit.

### **5.4. Les techniques récentes de numération**

Les procédés précédemment étudiés nécessitent une phase de multiplication assez longue pour rendre chaque cellule individuellement accessible à l'observation, le plus souvent sous la forme d'une colonie visible à l'œil nu.

#### **5.4.1. La spectroscopie**

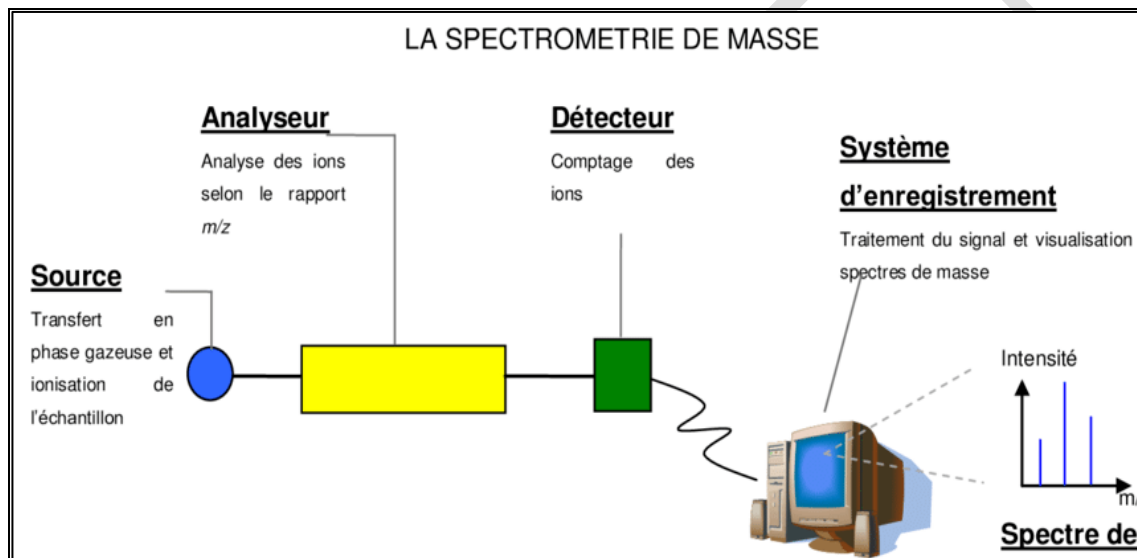
##### **5.4.1. 1. La spectrométrie de masse MALDI-TOF**

Comme son nom l'indique, la spectrométrie de masse s'intéresse à la mesure de la masse de molécules ou d'atomes présents dans un échantillon. Le principe de cette mesure repose sur la possibilité pour un flux d'ions d'être dévié par un champ électrique et/ou magnétique, les trajectoires étant proportionnelles à la masse et à la charge de chacun des

ions. Ce principe impose aux molécules et atomes d'un échantillon d'être préalablement transformés en ions en phase gazeuse, avant d'être analysés par un spectromètre de masse.

Un spectromètre de masse comporte toujours (Figure 10) :

- une source d'ionisation : passage de l'échantillon en phase gazeuse et ionisation des molécules
- un analyseur : séparation des ions en fonction de leur rapport masse/charge ( $m/z$ )
- un détecteur : il permet une détection des ions préalablement triés et fournit un signal électrique proportionnel au nombre d'ions détectés.
- un système de traitement informatique du signal pour visualiser les spectres



**Figure 10:** Principe de la technique Maldi-Tof

#### 5.4.1. 2. La spectrophotométrie

#### 5.4.2. Mesure des variations du potentiel d'oxydo-réduction

Les microorganismes, en se multipliant dans un milieu, en absorbant l'oxygène et y rejettent des substances réductrices qui en abaissent le potentiel d'oxydo-réduction. L'observation visuelle du délai de virage de colorants redox tels que le bleu de méthylène est un procédé très employé d'appréciation de la flore totale. Cette observation peut se faire à l'aide d'un spectrophotomètre.

### 5.4.3. Mesure de l'activité enzymatique

Le principe repose sur le fait que les enzymes sont des molécules catalytiques et que la mesure de l'activité enzymatique repose sur le dosage des produits de la réaction enzymatique. On cite comme exemple :

- **Le dosage de l'activité phosphatidique** (thermorésistante) en laiterie pour apprécier la qualité du lait destiné à la fromagerie. C'est un bon indice de l'activité bactérienne bien qu'elle peut survivre après la destruction des cellules bactérienne. Donc ce test peut être utilisé pour le contrôle du traitement thermique. Donc un lait correctement pasteurisé ne doit pas contenir la phosphatase alcaline.

### 5.4.4. Dosage des constituants cellulaires : système ATP-luciférine-luciférase

### 5.4.5. Techniques électrochimique

Diverses caractéristiques chimiques du milieu, liées à l'activité microbienne, peuvent être mesurées électriquement et constituer des signaux indicateurs de la présence des microorganismes.

#### 5.4.5.1. Potentiométrie

La baisse du potentiel d'oxydo-réduction corrélative du développement microbien, et dont nous avons vu qu'elle pouvait être apprécié par spectroscopie, peut l'être aussi par la mesure potentiométrique du dégagement d'hydrogène ou de l'absorption d'oxygène.

#### 5.4.5.2. Ph

Par la mesure directe avec un pH mètre ou par titrimétrie pour déterminer l'acidité totale exprimée en quantité d'acide. C'est ainsi que l'acidité du lait est considérée comme un indice de sa qualité bactériologique.

#### 5.4.5.3. La concentration de certains ions

Certains ions, rejetés dans le milieu par les microorganismes, peuvent constituer des indicateurs de la nature et de l'importance de la contamination, voire même de la durée de conservation. Parmi on cite la variation de la concentration du lactate et les ions ammonium en laiterie.

#### 5.4.5.4. Ampérométrie

Ce procédé repose sur le fait que les microorganismes eux-mêmes sont des particules chargées négativement et que si l'on plonge dans une suspension une électrode constituée d'une anode de platine et d'une cathode de peroxyde d'argent, les microorganismes perdent leurs électrons au contact de l'anode de platine et régénèrent leur charge à partir des composants du milieu. Ce processus engendre un courant que l'on mesure.

#### 5.4.6. Autres procédés

##### 5.4.6.1. Chromatographie

La chromatographie en phase gazeuse (CPG) semble la plus adéquate mais moins utilisée. Son importance réside dans le fait qu'elle peut analyser plusieurs substances à la fois et par la suite elle peut caractériser le microorganisme par un spectre des acides gras qu'il **rejette** par exemple. Ce qui permet à la fois de **détecter** la présence microbienne et d'en approcher l'identification. Et ceci en analysant les produits de son métabolisme tel que les alcools, acides gras ect.

##### 5.4.6. 2. La microcalorimétrie

Le principe repose sur le fait que l'activité microbienne libère de l'énergie calorifique, par suite si l'on introduit un produit alimentaire ou un milieu nutritif, contaminés dans un calorimètre très sensible, et qu'on compare la thermogénèse à celle observée dans un témoin stérile, il est possible d'y détecter la présence de petits nombres de microorganismes.

## 6. Identification bactérienne

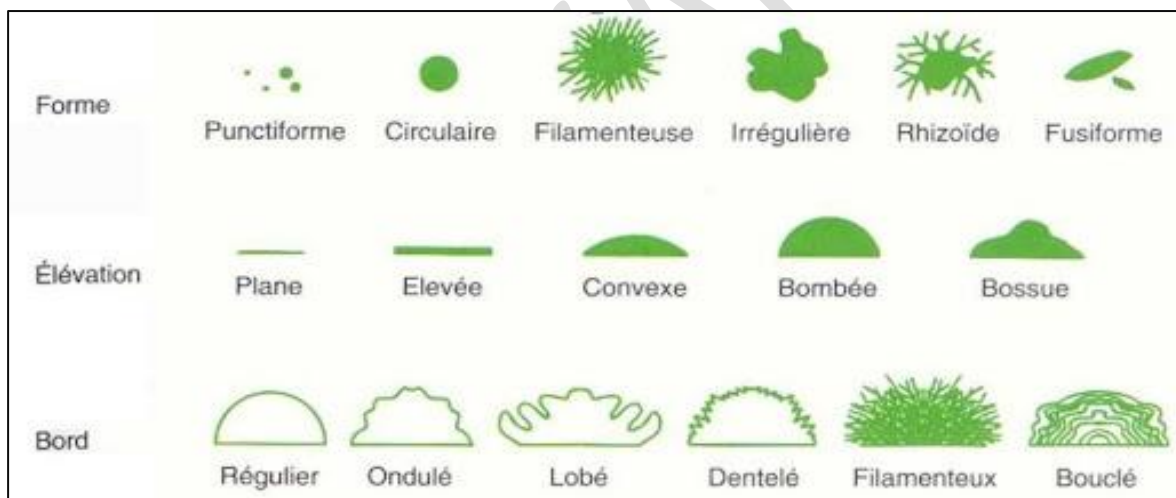
### 6.1. Caractères culturels, morphologiques et structuraux

#### 6.1.1. Caractères culturels

##### ➤ Examen macroscopique des caractères culturels

L'aspect des colonies dépend du milieu, de la durée et la température d'incubation. Il ne pourra être décrit convenablement qu'à partir des colonies bien isolées. La description des colonies doit mentionner plusieurs éléments :

- La taille
- La forme : bombée, plate, ombiliquée, à centre surélevé.
- L'aspect de la surface : lisse, rugueux.
- L'opacité : opaque, translucide, transparent.
- La consistance : grasse, crémeuse, sèche, muqueuse.
- Pigmentation.



**Figure 11:** caractéristiques des colonies

#### 6.1.2. Caractères morphologiques

##### ➤ Examen microscopique après coloration de Gram

L'examen microscopique après une coloration de Gram nécessite au départ une préparation d'un frottis. Une colonie bien isolée d'une culture en milieu solide sera prélevée et mise en suspension dans une goutte d'eau distillée stérile. L'observation se fait à l'objectif x100.

Cette coloration permet de différencier les bactéries selon deux critères :

- leur forme (bacille, Cocci,...etc.),
- leur affinité pour les colorants, en Gram positif et Gram négatif.

Elle se déroule en plusieurs étapes qui se succèdent et consiste à :

- 1- Fixer un frottis.
- 2- Recouvrir le frottis de la solution de cristal violet. Laisser agir 1 minute.
- 3- Verser le colorant. Laver à l'eau.
- 4- Recouvrir la préparation de Lugol. Laisser agir 1 minute.
- 5- Verser le Lugol. Laver à l'eau.
- 6- Décolorer à l'alcool 95°.
- 7- Rincer à l'eau courante.
- 8- Recouvrir la lame de la solution de Fuchsine diluée. Laisser agir quelques secondes et rejeter la Fuchsine.
- 9- Laver abondamment à l'eau, égouttée, sécher entre deux feuilles de papier buvard très propres.

❖ **Résultats**

Après ce traitement, les bactéries Gram positif sont bien colorées en violet, et les bactéries Gram négatif sont colorées en rose.



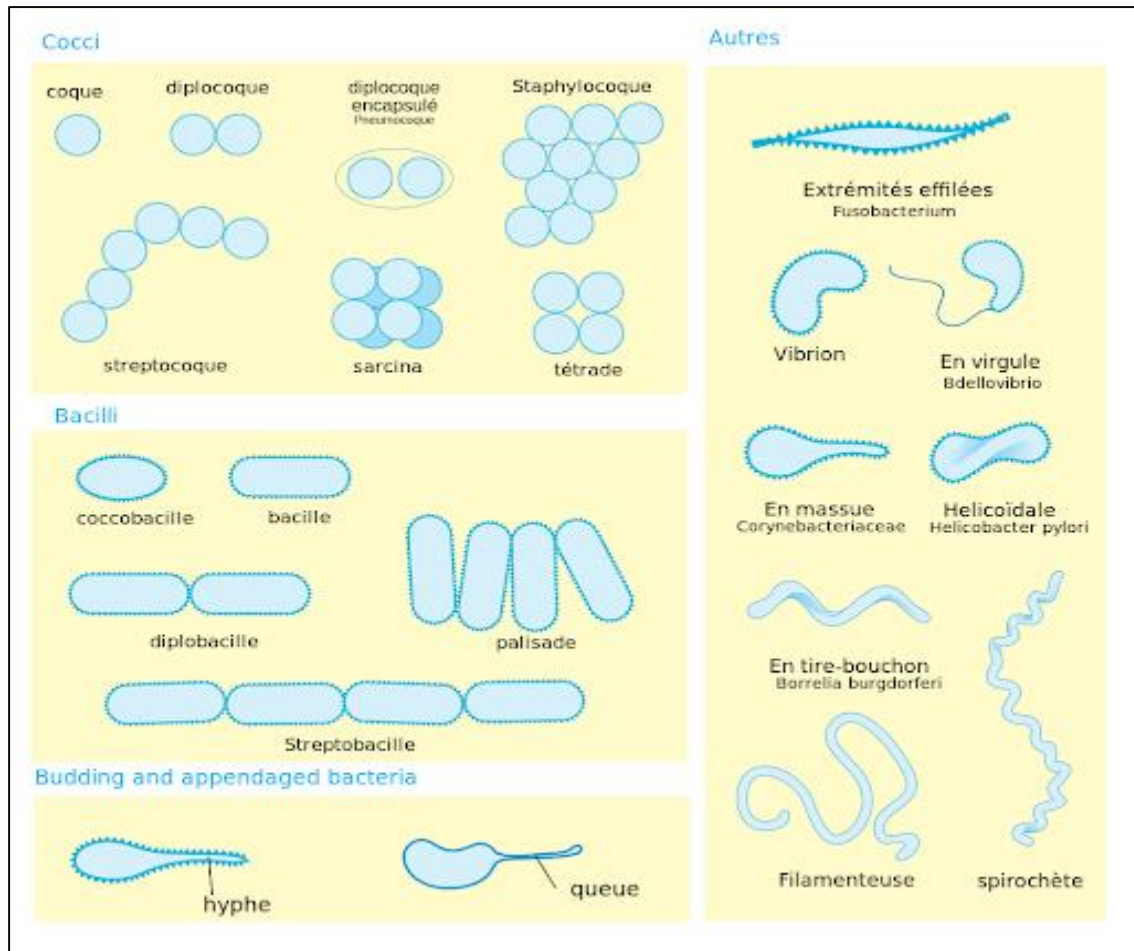


Figure 12: Les différentes formes cellulaires bactériennes

## 6.2. Caractères physiologiques et biochimiques

### 6.2.1. Type respiratoire

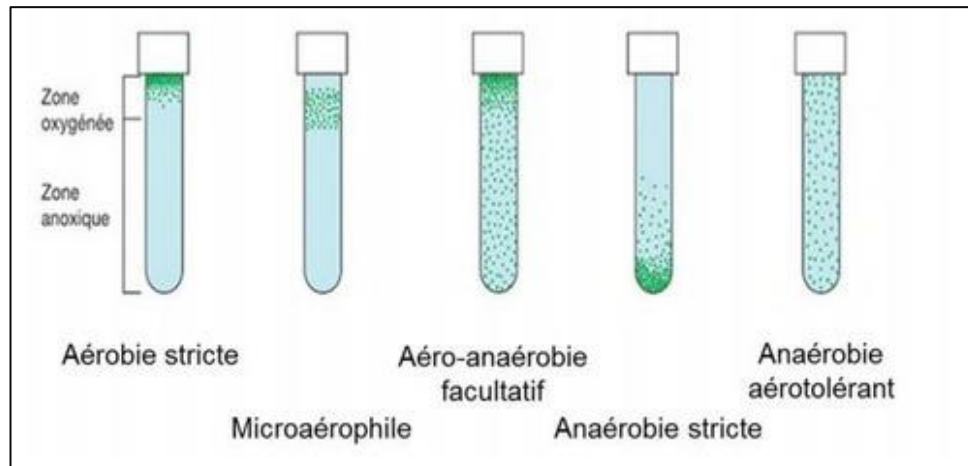
L'étude du type respiratoire d'un micro-organisme permet de définir ses rapports avec l'oxygène (certaines bactéries nécessitent l'O<sub>2</sub>, d'autres l'absence d'O<sub>2</sub>). Le milieu utilisé est la gélose viande-foie, conditionnée dans le tube de Prévot, un gradient de pression partielle en oxygène est créé. Cette gélose est dépourvue de nitrates ce qui empêche le développement des bactéries aérobies strictes ayant une nitrate réductase, en condition d'anaérobiose.

#### 6.2.1.1. Mode opératoire

- Régénérer le milieu pendant 20 min au bain-marie (bouchon légèrement dévissé).
- Laisser refroidir jusqu'à 45° C (milieu en surfusion).
- Réaliser un ensemencement en spirale dans la masse, à l'aide d'une pipette Pasteur chargée de la suspension bactérienne à étudier.

- Laisser solidifier puis incubé pendant 24h à une température optimale avec bouchon dévissé.

Le type respiratoire peut donc être observé à travers le tube incubé qui aurait permis la croissance des bactéries à différents endroits du tube selon la figure ci-dessous.



**Figure 13 : Croissance microbienne selon le besoin en oxygène**

### 6.2.2. Mannitol-Mobilité

Ce milieu permet l'étude de la fermentation du mannitol (caractère biochimique) et la mobilité de la souche (caractère morphologique). Ce milieu est utilisable uniquement pour les bactéries fermentatives. La présence d'une faible teneur d'agar (géluse molle) rend possible le déplacement des bactéries mobiles autour de la piqûre centrale (le milieu est ensemencé à l'aide d'un fil de platine ou une pipette Pasteur à bout fermée et incubé à 37°C pendant 18-24 heures). La lecture de l'utilisation du mannitol est possible grâce à la présence d'un indicateur de pH, le rouge de phénol. L'utilisation du mannitol acidifie le milieu qui peut ainsi être révélé par le virage de l'indicateur de pH à sa teinte acide (jaune).

### 6.2.3. 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.

#### 6.2.4. Résistance aux antibiotiques et aux inhibiteurs :

L'aptitude 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 (Entérococci, 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.

#### 6.2.5. Caractères enzymatiques

##### ➤ Test de catalase (pour les staphylocoques)

C'est une enzyme décomposant l'eau oxygénée en eau et en oxygène gazeux. La méthode consiste à prélever une colonie du germe à étudier sur l'extrémité d'une pipette Pasteur fermée que l'on plonge ensuite dans un millilitre d'eau oxygénée. Le dégagement de bulles gazeuses signe la présence de l'enzyme (Figure 14).

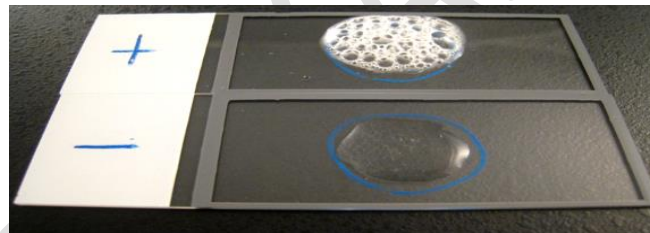


Figure 14 : Test de catalase (+)

##### ➤ Test de coagulase (pour les staphylocoques)

Le test mettant en évidence l'aptitude des bactéries à coaguler le plasma est le principal test caractérisant *S. aureus*.

Le test de détection consiste à incuber pendant 4 heures à 37°C un mélange de plasma oxalaté de l'homme et de la souche à tester, de préférence à partir d'une culture en gélose Chapman.

L'apparition d'un caillot est observée en inclinant le tube à 90°C. Le test de la coagulase, il existe de très rares souches de *S. aureus* non sécréteurs de coagulase. (Figure 15).

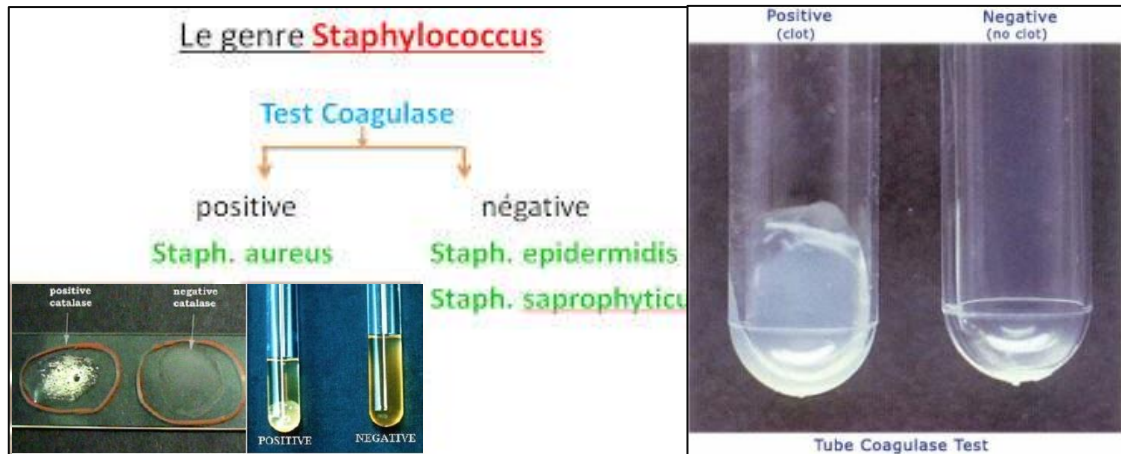


Figure 15 : Test de coagulase.

### ➤ Test d'oxydase

La recherche de l'oxydase s'effectue avec des disques prêts à l'emploi du commerce. Déposer le disque sur une lame porte-objet, l'humidifier avec deux gouttes d'eau distillée stérile et écraser la colonie testée sur le disque. Une réaction positive se traduit par un virage rapide du réactif de l'incolore au violet (Figure 16)

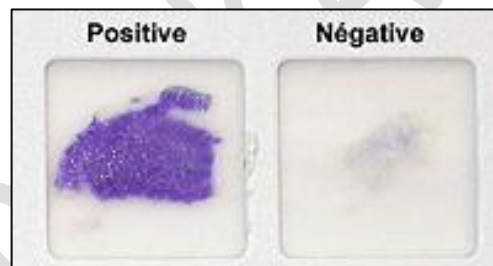


Figure 16 : Test d'oxydase

## 6.2.6. Caractères biochimiques

### 6.2.6.1. Galeries de tests biochimiques miniaturisés (galerie Api)

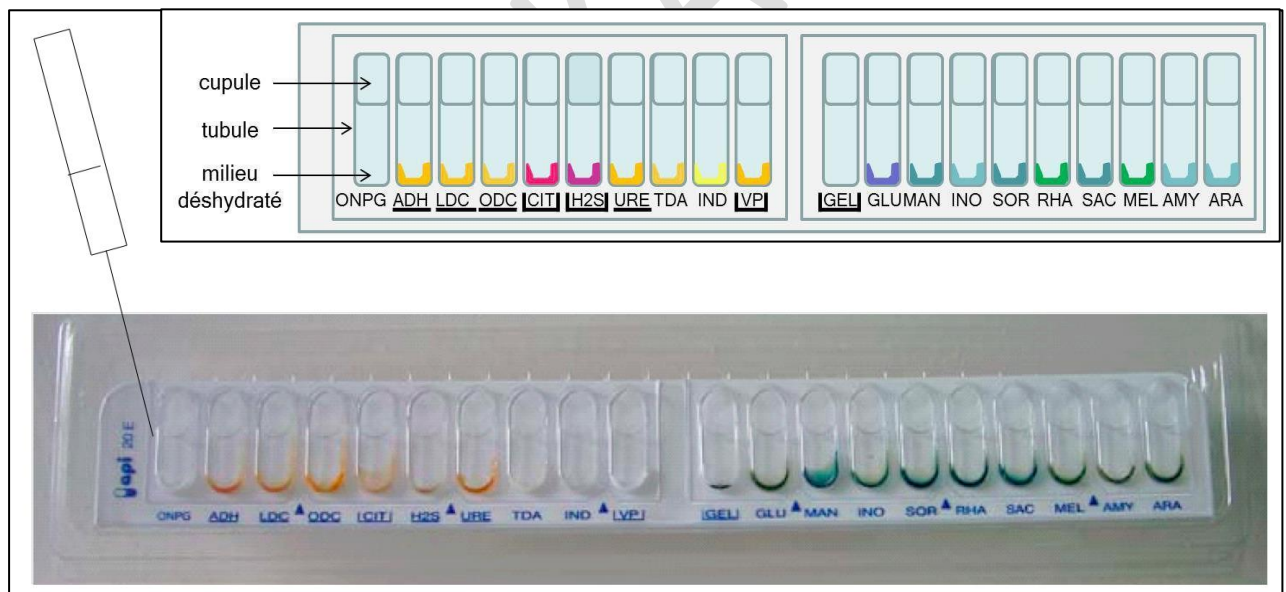
Là où les techniques classiques nécessitaient une à trois semaines, les gammes miniaturisées permettent l'obtention des résultats sous 18 à 72 heures (rapide). Elles permettent, en outre, l'identification d'environ 700 bactéries et levures, ce qui couvre pratiquement une bonne partie des micro-organismes pathogènes et près de 1000 tests biochimiques différents d'usage courant. Les galeries Api (analytical profile index) sont aussi de réalisation facile et de haute performance (résultat fiable).

Elles se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment.

Lorsqu'une suspension bactérienne de densité convenable est répartie dans les différentes alvéoles qui composent la microgalerie (contenant de substrats déshydratés), les métabolites produits durant la période d'incubation se traduisent par des changements de couleur spontanés ou révélés par addition de réactifs.

Elle comprend généralement 20 tests biochimiques.

La première galerie qui a été utilisée est la galerie Api 20 E (Figure17), destinée à l'identification des entérobactéries. Actuellement dans les laboratoires de bactériologie médicale des galeries Api 20 E, Api 20 NE, Api Staph et Api 20 Strep sont aussi utilisées.



**Figure 17:** Galerie Api 20 E.

### 6.2.6.2 Choix de la galerie

Le choix de la galerie à ensemercer dépend des résultats de l'étude des caractères morphologiques, culturels et biochimiques qui ont été étudiés précédemment (oxydase, catalase...) et qui sont indispensables pour l'interprétation de la galerie Api.

-La galerie Api 20 NE est destinée à l'identification des coques ou bacilles Gram négatif, peu exigeants (bacilles autres que les entérobactéries) et oxydase positif (*Pseudomonas* et apparentés, *Vibrionaceae*, *Aeromonadaceae*).

-La galerie Api Staph permet l'identification des staphylocoques et des microcoques.

-La galerie Api 20 Strep assure l'identification des streptocoques, entérocoques et les bactéries apparentées (notamment quelques espèces du genre *Listeria*) en 4 ou 24 heures

-Pour la galerie Api 20 E, les entérobactéries (bacilles Gram négatif, peu exigeants et oxydase négatif) sont facilement identifiées par le biais de cette galerie. Les *Vibrionaceae*, *Pseudomonas* et les *Aeromonadaceae* sont également d'identification possible avec cette galerie.

### 6.2.6.3. Mode opératoire

L'opération d'ensemencement des kit Api s'effectue selon les étapes suivantes :

- Réunir fond et couvercle d'une boîte d'incubation et répartir environ 5 ml d'eau distillée dans les alvéoles pour créer une atmosphère humide.
- Remplir tubes et cupules des tests : [CIT], [VP], [GEL], avec la suspension bactérienne.
- Remplir uniquement les tubes (et non les cupules) des autres tests.
- Créer une anaérobiose dans les tests : ADH, LDC, ODC, URE, H<sub>2</sub>S en remplissant leurs cupules avec l'huile de paraffine.
- Refermer la boîte d'incubation, coder et placer à 37 °C pendant 18-24 heures.

### 6.2.6.4. Lecture

Noter sur la fiche de résultat toutes réactions spontanées. Si le glucose est positif et/ou si 3 tests ou plus sont positif : révéler les tests nécessitant l'addition de réactifs.

-Test VP : ajouter une goutte de réactif VP1 et VP2. Attendre au minimum 10 minutes. Une couleur rose franche ou rouge indique une réaction positive.

-Test TDA : ajouter une goutte de réactif TDA. Une couleur marron foncée indique une réaction positive.

-Test IND : ajouter une goutte de réactif de Kowacks. Un anneau rouge obtenu en 2minutes indique une réaction positive.

La lecture de ces réactions se fait selon le profil numérique à l'aide du catalogue analytique API 20E.























Microtube	Substrat	Caractere recherché	Lecture directe ou indirecte (Test si nécessaire)	Résultat +	Résultat -
ONPG	Ortho-Nitro-Phényl-Galactoside	$\beta$ -galactosidase	Lecture directe		
ADH LDC ODH	Arginine Lysine Ornithine	Arginine dihydrolase Lysine décarboxylase Ornithine décarboxylase	Lecture directe		
CIT	Citrate	Utilisation du citrate	Lecture directe		
H <sub>2</sub> S	Thiosulfate de sodium	Production d'H <sub>2</sub> S	Lecture directe		
URE	Urée	Uréase	Lecture directe		
TDA	Tryptophane	Tryptophane désaminase	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de Perchlorure de Fer		
IND	Tryptophane	Production d'indole	Lecture indirecte Test : ajouter 1 goutte de réactif de Kovacs		
VP	Pyruvate de sodium	Production d'acétoïne	Lecture indirecte (Attendre 10 minutes) Test : ajouter 1 goutte de KOH et d' $\alpha$ -naphthol		
GEL	Gélatine emprisonnant des particules de charbon	Gélatinase	Lecture directe		
GLU à ARA	Substrat carboné	Utilisation de substrat carboné	Lecture directe		
NO <sub>2</sub> / N <sub>2</sub>	Nitrates (NO <sub>3</sub> )	Nitrate réductase	Lecture indirecte dans la cupule GLU Test : ajouter 1 goutte de réactif de Griess Ajouter de la poudre zinc en cas de résultat négatif		

Figure 18 : Table de lecture de la galerie Api

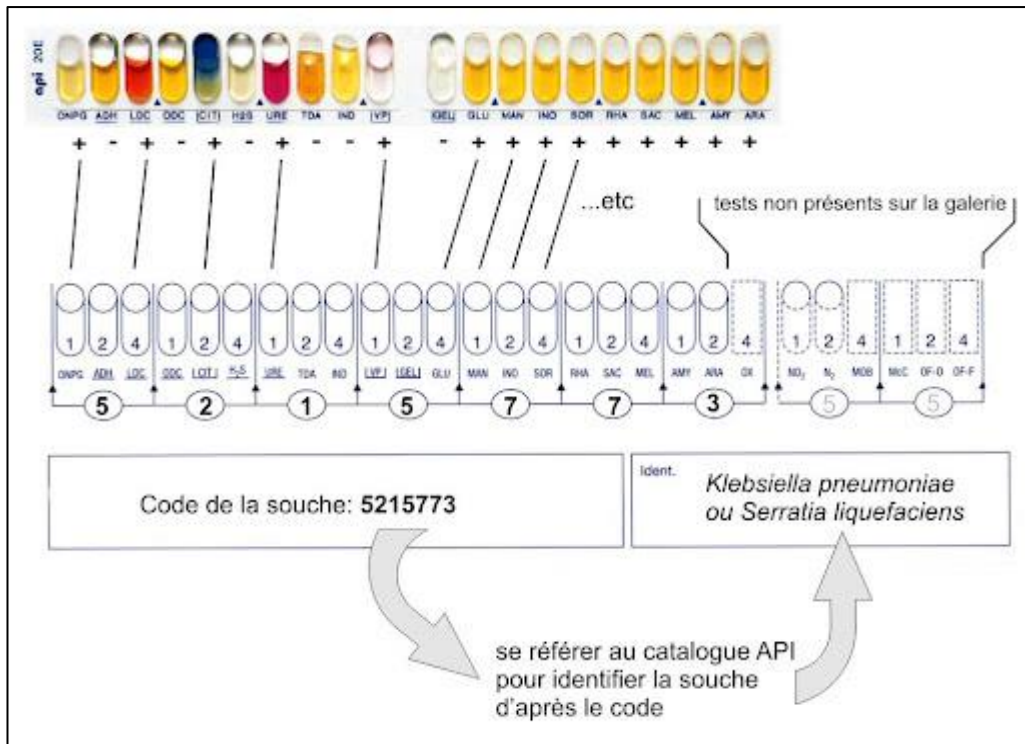


Figure 19: Interprétation des résultats de la galerie Api

### 6.3. Caractères immunologiques

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.

### 6.4. 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 : (1) coagulase libre (enzyme extracellulaire) et (2) la 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).



## 6.5. Identification génomique

Depuis que des progrès énormes ont été réalisés en génétique moléculaire, la bactériologie dispose d'un nouveau moyen d'identification d'une souche : la réaction de polymérisation en chaîne ou méthode PCR (de l'anglais « polymérase chain reaction »).

Cette méthode est basée sur la recherche et la multiplication d'un fragment spécifique d'ADN de la bactérie.

Cependant, elle est réservée à quelques souches seulement car elle représente un investissement non négligeable en matériel et réactifs.

### Le Principe

Une identification par PCR se déroule en 3 parties.

La première étape consiste à synthétiser des fragments d'ADN ayant des séquences identiques à celles qui flanquent la séquence recherchée (= la partie spécifique). Ceci peut être réalisé à l'aide d'un synthétiseur automatique et les fragments obtenus, appelés « primers », servent d'amorce à la synthèse d'ADN. Ils ont généralement une longueur d'environ 20 nucléotides.

La seconde étape est la réaction PCR proprement dites. Elle consiste en trois étapes, répétées de nombreuses fois, afin d'obtenir environ 1 million de copies du fragment spécifique.

- **Dénaturation** de l'ADN bactérien par la chaleur. Les deux brins d'ADN se séparent
- **Hybridation** des brins d'ADN avec les primers. En effet, on a pris soin d'ajouter ceux-ci en excès afin que la probabilité d'hybridation ADN/primers soit supérieure à la probabilité de rattachement ADN/ADN
- **Elongation** des nouveaux brins d'ADN à l'aide de nucléotides triphosphate et d'une ADN polymérase non sensible à la chaleur (Taq polymérase, enzyme extrait d'une archéobactérie vivant dans les sources chaudes : *Thermophilus aquaticus*).

Ce cycle, habituellement réalisé dans un appareil spécial, le thermocycleur, est répété généralement une trentaine de fois.

La dernière étape est la révélation. Dans la plupart des cas, on utilise la propriété du bromure d'éthidium de se lier de façon permanente à l'ADN et d'être fluorescent sous les UV. Vu

que la séquence, donc la taille, du fragment spécifique est connue, il suffit de vérifier que l'on a une « bande » à la taille voulue pour conclure.

**Hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$**  : enzymes responsables de la lyse des hématies, ils sont mis en évidence par culture sur gélose au sang. Hémolysines  $\alpha$  (zone verdâtre due à la metmyoglobine, exemple : *S. pneumoniae*; 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*).

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

## 7. Réalisation du contrôle

### 7.1 Contrôle des matières premières

Le contrôle microbiologique des matières premières doit permettre de vérifier que celles-ci ne fermentent ni les microorganismes risquant de gêner le déroulement de la fabrication, ni les microorganismes pouvant altérer le produit. Il faut distinguer, ici :

Les industries de fermentation, où le contrôle est le plus souvent un contrôle de stérilité du milieu / un contrôle de propreté microbiologique du levain ; Les autres industries, où le contrôle consiste à rechercher les microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux...), et à analyser les paramètres physicochimiques habituels (H%, MS%, pH et acidité...).

### 7.2. Contrôle des levains

Le contrôle des levains doit permettre de détecter des contaminants présents à des taux souvent très faibles par rapport aux cellules de cultures. Trois grands types de levains sont utilisés dans les industries de fermentation et la recherche de contaminants se fait par les techniques de culture ou par les techniques microscopiques.

(1) Les levains à *Saccharomyces* : les contaminants les plus fréquents sont les levures sauvages, les bactéries lactiques et acétiques ;

- (2) Les levains à levures et moisissures : les contaminants les plus fréquents sont les bactéries;
- (3) Les levains bactériens : les contaminants sont fréquemment d'autres bactéries et bactériophages.

### 7.3. Contrôle de la fabrication

Le contrôle de la fabrication consiste à suivre le processus de fabrication :

Les industries de fermentation, où le contrôle consiste essentiellement à suivre, aussi bien le développement du levain que l'apparition et le développement des contaminants (les techniques microscopiques les plus utilisées : technique de numération et technique de coloration) ;

Les autres industries, où le contrôle consiste essentiellement à surveiller les paramètres de transformations, mais aussi de rechercher et dénombrer les microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux, etc...).

### 7.4. Contrôle de nettoyage et de la désinfection

Le nettoyage et la désinfection se font généralement, soit de façon systématique, soit entre deux fabrications successives. Dans les deux cas, le contrôle est pour vérifier l'efficacité de l'opération du nettoyage et de la désinfection à détruire les microorganismes indésirables. Pour cela différentes techniques sont utilisées : boîtes de contacts et lames pour le contrôle microbiologique des surfaces, écouvillonnage pour le contrôle microbiologique de dispositifs moins accessibles (vannes, robinets, canules...).

L'air ambiant est aussi sujet de contrôle microbiologique, ceci tout simplement par utilisation des boîtes de Pétri remplies de milieu de culture, qu'on laisse ouvertes pendant maximum 15 min.

### 7.5. Contrôle Des Produits finis

Le contrôle microbiologique des produits finis porte sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande. Ce contrôle consiste à la recherche et au dénombrement des microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures,

*Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux...) et porte pour conclure la conformité de produit vis-vis les normes (critères ou spécifications microbiologiques).

Dr ABERKANE.M