

**République Algérienne Démocratique Et Populaire**

**Ministère De L'enseignement Supérieur Et De La Recherche Scientifique**



*Université Akli Mohand Oulhadj, Bouira*  
Faculté des sciences de la vie et de la terre  
Département de biologie

## **Techniques d'analyse microbiologique industrielle**

**Cours licence biotechnologie microbienne**



Réalisé par Dr. Ait Mimoune Nouara

**Année universitaire : 2019/2020**

## Sommaire

Introduction.....	1
<b>Chapitre I. Objectifs des techniques de contrôle .....</b>	<b>1</b>
1. Risques à contrôler.....	1
2. Les contrôles en industrie alimentaire .....	2
3. La maîtrise de la qualité microbiologique .....	3
3.1. Analyse des dangers : HACCP .....	4
3.2. Principes de base de l'HACCP .....	7
4. Techniques de contrôle général .....	8
4.1. Étude quantitative de la flore microbienne .....	8
4.2. Recherche orientée des microorganismes .....	9
<b>Chapitre II. Techniques d'échantillonnage .....</b>	<b>12</b>
1. Définitions .....	12
2. Préparation des échantillons .....	15
3. Méthodes d'échantillonnage .....	16
3.1. Échantillonnage aléatoire simple .....	16
3.2. Échantillonnage systématique .....	16
3.3. Échantillonnage stratifié .....	16
3.4. Échantillonnage sélectif .....	17
3.5. Échantillonnage subjectif .....	17
4. Analyse des données .....	17
5. Entreposage des échantillons .....	17
6. Techniques et outils de prélèvement .....	18
6.1. Le prélèvement aseptique .....	19
6.2. Outils d'échantillonnage .....	20
7. Exemples de prélèvement de produits alimentaires .....	26
7.1. Beurre .....	26
7.2. Fromage .....	26
7.3. Méthodes de prélèvement aseptique des conserves .....	27
<b>Chapitre III. Techniques de dénombrement .....</b>	<b>29</b>
1. Techniques de dénombrement indirect .....	29
1.1. Dénombrement après filtration sur membrane .....	29
1.2. Dénombrement en milieu solide .....	31
1.3. Dénombrement en milieu liquide (méthode du nombre le plus probable) .....	34
2. Choix des milieux de culture .....	36
3. Dénombrement direct des cellules .....	37
3.1. La cytométrie .....	37
3.2. Détermination de la masse cellulaire .....	40

<b>Chapitre IV. Techniques d'identification des micro-organismes .....</b>	<b>42</b>
1. Identification morphologique .....	43
1.1. Caractères macroscopiques .....	43
1.2. Caractères microscopiques .....	44
2. Identification biochimiques .....	45
2.1. Principaux tests d'orientation .....	46
2.2. Galeries miniaturisées et automates d'identification bactérienne .....	50
<b>Chapitre V. Méthodes rapides et nouvelles d'analyse.....</b>	<b>53</b>
1. Analyse de la charge microbienne.....	53
2. Identification des microorganismes.....	57
<b>Chapitre VI. Contrôle microbiologique d'un produit industriel .....</b>	<b>59</b>
1. Contrôle du lait .....	59
2. Contrôle des conserves .....	65
3. Contrôle de la viande .....	68
Conclusion .....	71

## Liste des figures

<b>Figure 1.</b> Les sept principes de l'HACCP .....	7
<b>Figure 2.</b> Aspect macroscopique des colonies de <u>Clostridium perfringens</u> sur milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine.....	10
<b>Figure 3.</b> Aspect macroscopique des colonies des coliformes sur gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 .....	11
<b>Figure 4.</b> Schéma des étapes du prélèvement d'un échantillon de grain représentatif .....	14
<b>Figure 5.</b> Éléments d'un plan d'échantillonnage.....	14
<b>Figure 6 .</b> Sondes manuelles simples .....	21
<b>Figure7.</b> Sondes manuelles à double tube.....	22
<b>Figure 8.</b> Diviseur de type Bœrner.....	23
<b>Figure 9.</b> Points de prélèvement des échantillons sur le produit en vrac à l'arrêt.....	24
<b>Figure10.</b> Schéma d'un système de sonde pneumatique à embout conique .....	25
<b>Figure 11.</b> Préleveur de fromage .....	26
<b>Figure 12.</b> Procédé de la filtration sur membrane.....	31
<b>Figure 13.</b> Technique de l'ensemencement en profondeur .....	32
<b>Figure 14.</b> Principe de la méthode NPP.....	35
<b>Figure15.</b> Lame Malassez et schéma de son quadrillage.....	38
<b>Figure16.</b> Cellule Thoma et schéma de sa surface quadrillée .....	39
<b>Figure 17.</b> Comptage des cellules vivantes après coloration .....	40
<b>Figure 18.</b> Différents caractères morphologiques bactériens.....	44
<b>Figure 19.</b> Principaux caractères microscopiques d'identification bactérienne .....	45
<b>Figure 20.</b> Test de catalase (technique sur lame) .....	47
<b>Figure 21.</b> Test de la réduction des nitrates .....	48
<b>Figure 22.</b> Lecture de la production de SH <sub>2</sub> .....	48
<b>Figure 23.</b> Mise en évidence de la production d'indole.....	49
<b>Figure 24.</b> Recherche de la production de l'uréase.....	49
<b>Figure 25.</b> Procédures de l'identification bactérienne .....	51
<b>Figure 26.</b> Inoculation de la galerie API 20 E .....	52
<b>Figure 27.</b> La microscopie à épifluorescence.....	54
<b>Figure 28.</b> Schéma réactionnel de la conversion de l'ATP en lumière par le système luciférine-luciférase.....	55
<b>Figure 29.</b> Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux .....	56
<b>Figure 30.</b> Principales étapes d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF..	58

## Liste des tableaux

<b>Tableau 1.</b> Dangers et risques possibles dans les produits alimentaires.....	4
<b>Tableau 2.</b> Choix des sacs pour l'échantillonnage. ....	20
<b>Tableau 3.</b> Dénombrement en milieu solide de la flore totale mésophile aérobie du lait cru.....	34
<b>Tableau 4.</b> Table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution.....	36
<b>Tableau 5.</b> Principaux tests biochimiques utilisés en pratique.....	46
<b>Tableau 6.</b> Exemple de galeries API (bioMérieux®) et bactéries identifiables.....	52
<b>Tableau 7.</b> Milieux de cultures et conditions de cultures des microorganismes recherchés dans le lait.....	62
<b>Tableau 8.</b> Critères microbiologiques applicables aux laits. ....	64
<b>Tableau 9.</b> Critères microbiologiques applicables aux viandes rouges hachées.....	70

## **Introduction**

Les denrées alimentaires représentent une source de contamination microbienne permanente. La prolifération des microorganismes peut affecter la qualité organoleptique des produits et avoir des conséquences néfastes sur la santé du consommateur.

Le contrôle de l'innocuité et de la qualité des aliments fait partie intégrante des programmes nationaux de développement. Ces systèmes de contrôle des denrées alimentaires visent à protéger la santé et le bien-être des consommateurs, à faciliter le commerce des produits alimentaires et à protéger les intérêts des producteurs.

Depuis les années soixante, la sécurité sanitaire des aliments a évolué parallèlement au développement considérable des industries agro-alimentaires dans les pays développés. Les différentes crises alimentaires ont également obligé la réglementation à répondre aux inquiétudes des consommateurs. C'est au début des années quatre-vingt-dix que la sécurité alimentaire des aliments a commencé à faire l'objet d'une attention au niveau international. L'organisation pour l'alimentation et l'agriculture (FAO) et l'organisation de la santé ont créé un programme mixte : le *Codex alimentarius*. Ce dernier, élabore des codes d'usage internationaux recommandés en matière d'hygiène et définit les principes essentiels d'hygiène alimentaire applicables d'un bout à l'autre de la chaîne alimentaire pour s'assurer que les aliments soient surs et propre à la consommation.

Les principes généraux d'hygiène alimentaire du codex constituent une base solide pour garantir l'hygiène alimentaire. Ils s'appliquent à la chaîne alimentaire depuis la production primaire jusqu'au consommateur, et mettent l'accent sur les contrôles d'hygiène à chaque stade.

## **Chapitre I. Objectifs des techniques de contrôle**

### **1. Risques à contrôler**

Les contrôles alimentaires permettent de produire des aliments salubres et propres à la consommation humaine grâce à l'élaboration des critères à respecter dans la fabrication et la manutention des matières premières, la transformation, la distribution et l'utilisation finale. Mais aussi la conception, le suivi et la révision de systèmes de contrôle efficaces.

Les dangers liés aux aliments doivent être maîtrisés en appliquant des programmes de sécurité alimentaire qui permettent :

- L'identification de toutes les étapes décisives pour la sécurité des aliments,
- La mise en œuvre des procédures de contrôle efficaces à chacune de ces étapes,
- Le suivi des procédures de contrôle afin d'anticiper les situations d'urgences,
- Élaborer des procédures de rappel,
- Passer en revue périodiquement les procédures de contrôle appliquées tout au long de la chaîne des contrôles alimentaire afin de vérifier la salubrité du produit pendant toute sa durée de conservation (la contamination microbiologique/ les intoxications alimentaires, la contamination chimique et physique).

## 2. Les contrôles en industrie alimentaire

Les contrôles qui sont réalisés dans les industries alimentaires sont de deux types :

Il y'a ceux qui sont établis par **des organismes administratifs** ou des associations afin de vérifier la conformité a un critère établis d'une matière première ou d'un produit fini mis sur le marché. Ces contrôles peuvent être officiels (ou réglementaires) et permettent d'autoriser la distribution du produit s'il est conforme ou de sanctionner et d'interdire sa vente dans le cas contraire.

Les contrôles peuvent également être réalisés **au sein de l'entreprise** et concernent certaines étapes de la fabrication du produit : ce sont les **autocontrôles**. Ils sont effectués par des laboratoires internes de l'entreprise ou sous-traités par des laboratoires externes, ils font alors partie de la construction de la qualité dans l'entreprise.

Un plan d'autocontrôle est l'ensemble des mesures prises par l'entreprise pour pouvoir garantir la qualité et la conformité des denrées qu'elle produit. Ce plan décrit un ensemble de paramètres comme les mesures de température, la traçabilité de la matière premières, la désinfection des équipements ou encore les analyses microbiologiques réalisées sur le produit final. La mise d'un système d'autocontrôle est obligatoire pour les entreprises agroalimentaires. Pour les entreprises qui ont une politique qualité, l'administration donne des instructions pour la mise en œuvre de ces contrôles. Publiés dans les notes de service du **Journal officiel**, ces instructions sont différentes selon la nature du produit.

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 les aliments afin de 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).

Le contrôle microbiologique de routine d'un produit alimentaire solide ou liquide consiste le plus souvent par:

- 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 sulfite-réducteurs) ou leur 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) et de diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.

### **3. La maîtrise de la qualité microbiologique**

Un laboratoire d'analyse microbiologique doit disposer des procédures opératoires validées et approuvées afin d'assurer la qualité et l'intégrité des données obtenues au cours d'une étude. Ces procédures décrivent la liste et la chronologie des analyses prévues pour chaque produit. Le laboratoire d'analyse microbiologique doit permettre :

- La réalisation des analyses de routine (contrôle de qualité par rapport à une norme, évaluation de la qualité des matières premières),
- La recherche et maîtrise des éventuels points critiques,
- L'évaluation de l'efficacité des traitements antimicrobiens de conservation, d'emballage ou de nettoyage, etc.

### 3.1. Analyse des dangers : HACCP

Un danger d'origine alimentaire est, selon la définition du Codex, un agent biologique, chimique ou physique présent dans un aliment, ou état de cet aliment pouvant avoir un effet adverse pour la santé.

L'HACCP est l'abréviation anglaise de «Hazard Analysis Critical Control Points», c'est-à-dire «l'Analyse des risques, points critiques pour leur maîtrise». Il s'agit d'une méthode servant à identifier, à évaluer et à contrôler les dangers qui menacent la salubrité des produits alimentaires. L'HACCP est en train de devenir une caractéristique fondamentale de la réglementation publique en matière d'innocuité des produits alimentaires. Sa flexibilité en est le principal attrait : il s'agit d'un certain nombre de principes généraux de gestion qui sont posés et peuvent ensuite être adaptés à toutes les situations.

Le respect des règles d'hygiène et la mise en place des méthodes HACCP est indispensable pour lutter efficacement contre les germes pathogènes dans l'industrie agroalimentaire. L'HACCP s'intéresse à trois classes de dangers pour l'hygiène des aliments, à savoir, les dangers biologiques, chimiques et physiques (**Tableau 1**).

**Tableau 1.** Dangers et risques possibles dans les produits alimentaires

<b>Dangers</b>	<b>Exemple</b>	<b>Risques possibles</b>
Microbiologiques	Bactéries infectieuses, organismes produisant des toxines, moisissures, parasites, prions.	Risque d'intoxication alimentaire plus ou moins grave en fonction du type du micro-organisme, la quantité ingérée et la sensibilité du consommateur.
Chimiques	Toxines naturellement présentes, additifs alimentaires, résidus de pesticides, contaminants de l'environnement, allergènes.	Risque d'allergie alimentaire pour les personnes sensibles, risques cancérigènes et toxiques.
Physiques	Morceaux de métal, débris provenant des machines, morceaux de verre, pierre.	Risque de coupure ou d'étouffement dans le cas des corps étrangers. Risque cancérigène ou mutagène dans le cas de la radioactivité.

### **3.1.1/ Les dangers biologiques (virus, bactéries...)**

Les contaminations d'origine microbiennes sont le plus souvent invisibles, mais le manipulateur peut, par son comportement les réduire fortement, la formation peut donc avoir un impact déterminant sur ces contaminations. En effet, ces agents pathogènes peuvent être transférés d'un aliment à un autre par contact direct (manipulation d'aliments, surface de contact, l'air). Les aliments crus, non transformés devraient être efficacement séparés des aliments prêts à consommer.

Concernant les denrées d'origine animale et végétales, les critères microbiologiques sont définis par le règlement (CE) 2073-2005. Les critères de ce règlement concernent notamment la recherche de *Salmonelles* et de *Listeria* ainsi que d'autres germes pathogènes (en fonction du produit analysé).

- ***Salmonella***

Il s'agit de l'une des principales causes d'intoxication alimentaire. Elles contaminent des aliments comme les viandes, le lait ou les œufs. La plupart des personnes infectées souffrent de crampes au ventre, de diarrhée et de fièvre.

- ***Shigella***

La shigellose survient suite à la consommation des boissons ou des aliments contaminés par la bactérie *Shigella*. La shigellose se traduit par une diarrhée glaireuse et sanguinolente.

- ***Clostridium perfringens***

Les viandes contaminées sont à l'origine de nombreuses épidémies. Les spores de *C. perfringens* survivant parfois à la cuisson, peuvent germer et produire des toxines. Les symptômes observés dans ces cas sont: fatigue, perte d'appétit et de poids, douleurs musculaires, nausée, diarrhée aqueuse et abondante.

- ***Staphylococcus aureus***

Les intoxications alimentaires sont dues à une entérotoxine produite dans l'aliment ingéré. Les aliments à risque de contamination sont la viande, crème glacée, etc. La toxine est responsable de troubles importants de la digestion.

- **Listeria**

La listériose peut être mortelle chez certaines populations à risque (femmes enceintes, personnes âgées, immunodéprimés). Elle contamine certains produits laitiers (fromages au lait cru) et conduit à des séquelles neurologiques.

La liste des bactéries dangereuses responsables des maladies a tendance à s'accroître. On retrouve dans cette catégorie, *Bacillus cereus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entéropathogènes ou encore des bactéries de genres *Streptococcus*, *Campylobacter*, *Yersinia*, *Brucella*, etc.

### **3.1.2. Les dangers chimiques**

Les contaminations d'origine chimique sont souvent liées aux matières premières déjà contaminées et sur lesquelles il y'a peu de contrôle, à moins de s'approvisionner chez des fournisseurs fiables.

Les toxines rencontrées dans les matières premières, sont principalement d'origine industrielle (dioxines, métaux lourds...) ou agricole (pesticides, résidus de médicaments vétérinaire ...). Les matières premières représentent la principale source de résidus toxiques (environ 80%) détectés dans les produits finis. Le procédé de fabrication est considéré comme la seconde source importante de résidus toxiques (solvant, hydrocarbures ...).

Les substances chimiques présentes dans les aliments n'engendrent pas toutes le même risque pour le consommateur. Les substances allergisantes sont en première position par l'ampleur du risque, viennent ensuite par ordre décroissant, les mycotoxines et toxines naturelles, les métaux lourds, les dioxines et autres polluants organiques persistants, les résidus de pesticides...etc.

### **3.1.3. Les dangers physiques**

Les aliments peuvent contenir parfois des facteurs de risque physique pour le consommateur. Ce sont des corps étrangers solides comme des débris de verre, de métal ou de plastique. La radioactivité est également classée dans les dangers physiques, on retrouve dans cette catégorie des éléments comme le césium, l'iode et le strontium.

Les corps étrangers sont la première source de réclamation dans l'industrie agroalimentaire. Des efforts considérables sont déployés pour la sécurité et l'hygiène des produits alimentaires. Les dangers physiques sont souvent plus facilement discernables par le producteur, par conséquent, plus faciles à éliminer.

Il existe d'importantes dissemblances entre les dangers de différentes catégories, c'est pourquoi il faut avoir recours à des démarches différentes pour l'analyse des risques. Certains dangers chimiques, en particulier ceux qui peuvent être étroitement contrôlés dans la filière alimentaire, tels que les additifs alimentaires, les résidus pesticides agricoles, sont l'objet de *risque zéro* (absence). En revanche, les dangers microbiologiques sont liés habituellement à la présence de microorganismes qui peuvent se reproduire dans les aliments et qui sont omniprésents dans l'environnement. Dans ce cas une approche différente est appliquée. Ces stratégies visent à contenir les risques dans les limites tolérables, plutôt qu'à les éliminer complètement.

### 3.2. Principes de base de l'HACCP

Le système HACCP peut être appliqué de la production primaire jusqu'à la consommation et consiste à suivre sept principes (**Figure 1**):



**Figure 1.** Les sept principes de l'HACCP

- **Principe 1 :** Procéder à une analyse des risques

Identifier les risques potentiels associés à chaque étape de la production, évaluer la probabilité que ces risques se concrétisent et identifier les mesures permettant de les contrôler.

- **Principe 2 :** Déterminer les points critiques pour la maîtrise (CCP)

Définir les points, les procédures ou les étapes opérationnelles du processus qui peuvent faire l'objet d'une intervention afin d'éliminer les risques ou bien de réduire à un niveau acceptable la probabilité de leur occurrence.

- **Principe 3 :** Fixer le ou les seuil(s) critique(s)

Établir des seuils critiques permettant de garantir que les CCP sont maîtrisés.

- **Principe 4 :** Mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP grâce à des analyses ou des observations programmées.
- **Principe 5 :** Déterminer une ou des mesure(s) corrective(s).

Déterminer quelles sont les mesures correctives à prendre lorsque la surveillance révèle qu'un CCP donné n'est pas maîtrisé.

- **Principe 6 :** Appliquer des procédures de vérification qui comprennent des analyses et des procédures supplémentaires afin de confirmer que le système HACCP fonctionne efficacement.
- **Principe 7 :** Etablir des registres et les conserver.

Constituer un dossier dans lequel figureront toutes les procédures et tous les relevés concernant ces principes et leur mise en application.

#### **4. Techniques de contrôle générales**

##### **4.1. Étude quantitative de la flore microbienne**

Cette étape est effectuée par le dénombrement d'une flore microbienne donnée caractérisée par un ensemble de propriétés physiologiques communes.

La numération de la flore *aérobic mésophile* revivifiable sur milieu de type gélose nutritive ordinaire est souvent réalisée. On retrouve dans cette catégorie les *germes*

*hétérotrophes peu exigeants*, **mésophiles** (la température d'incubation est voisine de 30°C avec une durée d'incubation généralement inférieure à 72 heures), **neutrophiles** (le pH du milieu de culture est voisine de 7), **aérobie** ou **aéro-anaérobie** (l'incubation est réalisée en présence d'oxygène).

D'autre part, la numération des levures et moisissures confondues (germes acidophiles, aérobies pour la plupart, mésophiles "bas" etc.), la numération des anaérobies sulfito-réducteurs (germes hétérotrophes, réduisant les sulfites en sulfure d'hydrogène, mésophiles, anaérobies stricts) doit également être réalisée.

#### **4.2. Recherche orientée des microorganismes**

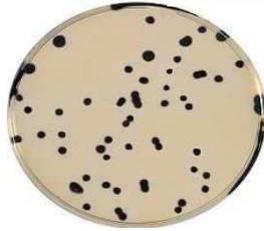
Elle concerne certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Listeria*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, etc. Cette recherche exige l'utilisation de méthodes spécifiques hautement sélectives.

##### **4.2.1. Recherche des bactéries anaérobies sulfito-réductrices**

Ce sont des formes résistantes d'organismes anaérobies (qui n'ont pas besoin d'oxygène pour survivre), dont les plus fréquentes et les plus faciles à mettre en évidence sont les Clostridies.

Elles sont normalement présentes dans les sols, rivières et dans les systèmes digestifs des animaux ainsi que dans les matières fécales, mais en plus petites quantités que les *Escherichia coli*. Leur dénombrement peut être réalisé sur milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine, indicateur d'hygiène générale. Ce milieu est composé de tryptose, de peptone de farine de soja et d'extrait de levure qui assurent aux clostridies les meilleures possibilités de développement. Le citrate de fer ammoniacal et le sulfite de sodium présents dans ce milieu permettent de mettre en évidence les colonies productrices d'H<sub>2</sub>S (apparition de pigments noirs) (Figure 2).

De plus, la présence d'un antibiotique, la D-cyclosérine dans ce milieu, lui procure une sélectivité vis-à-vis de *Clostridium perfringens* et diminue en même temps la taille des halos noirs diffus et gênants autour des colonies de *Clostridium perfringens*. Les colonies noires qui poussent en profondeur sont des *Clostridium* sulfito-réducteurs. La croissance à 46°C indique *Clostridium perfringens*.



**Figure 2.** Aspect macroscopique des colonies de *Clostridium perfringens* sur milieu Tryptone Sulfite Cyclosérine

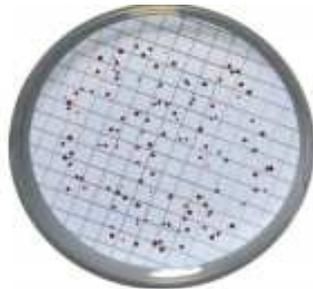
La présence des bactéries d'origine fécale ou tellurique comme *Clostridium* dans les aliments, témoigne d'un manque d'hygiène et d'un défaut de rigueur technique et peut laisser craindre la présence concomitante dans le produit de bactéries entéropathogènes en nombre difficilement détectable après un temps d'analyse important.

#### 4.2.2. Recherche des bactéries coliformes

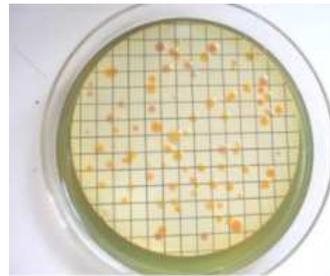
Les coliformes totaux constituent un groupe de bactéries que l'on retrouve fréquemment dans l'environnement, par exemple dans le sol ou la végétation, ainsi que dans les intestins des mammifères, dont les êtres humains. *Escherichia coli* fait partie du groupe des coliformes totaux et constitue le seul membre de ce groupe que l'on trouve exclusivement dans les matières fécales des humains et des animaux. Sa présence indique non seulement une contamination récente par des matières fécales, mais aussi la présence possible de bactéries et protozoaires pathogènes.

La numération des coliformes sont des analyses "communes" à tous (ou presque tous) les produits alimentaires. La gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7 permet d'effectuer la recherche et le dénombrement des *Escherichia coli* et des bactéries coliformes dans les eaux, par la méthode des membranes filtrantes. Sa sélectivité est donnée par la présence de Tergitol 7 (heptadécylsulfate de sodium) et de 2, 3,5-triphenylterazoliumchloride (TTC) qui inhibe la plupart des bactéries à Gram positif. Le tergitol 7 permet de sélectionner les coliformes et inhibe également l'envahissement par les bactéries du genre *Proteus*. Le TTC indique le pouvoir réducteur des bactéries qui se manifeste par la pigmentation des colonies.

Le milieu TTC est utile pour la reconnaissance rapide d'*Escherichia coli* et d'*Enterobacteraerogenes*. Ces microorganismes produisent des colonies jaunes entourées d'un halo jaune, tandis que les autres bactéries *Gram négatif* (incluant *Proteus* et *Pseudomonas*) donnent des colonies rouge foncé (Figure 3).



*Proteus,*  
*Pseudomonas*



*Escherichia coli*  
*Enterobacteraerogenes*

**Figure 3.** Aspect macroscopique des coliformes sur gélose lactosée au TTC et au Tergitol 7

## **Chapitre II. Techniques d'échantillonnage**

La microbiologie des aliments présente un intérêt certain dans la démarche d'assurance-sécurité, en tant que moyens d'appréciation du respect des résultats fixés aux professionnels de l'agroalimentaire. Son emploi connaît cependant des limites, liées à la méthodologie de l'échantillonnage et de l'analyse.

Pour évaluer les programmes de sécurité alimentaire, il convient de mener différentes enquêtes sur le terrain, pour récolter des informations spécifiques. Cependant, tout travail d'analyse et toute interprétation des résultats s'avèrent inutiles si l'échantillon n'est pas représentatif du lot dont il est issu.

L'échantillonnage représente une étape très importante de la chaîne analytique qui permet de s'assurer de l'intégrité et de la représentativité des échantillons. Cette étape de préparation des échantillons comprend les étapes qui vont de l'arrivée des échantillons au laboratoire de microbiologie jusqu'au broyage des échantillons (pour l'obtention de la suspension-mère). Afin d'éviter l'apparition de faux résultats, les échantillons doivent être en tout temps minutieusement manipulés en respectant l'ensemble des règles d'asepsie de manière à éviter toute contamination externe.

### **1. Définitions**

- **Échantillonnage**

Activités entreprises pour la sélection et la collecte des aliments définis en termes de nombre, poids et de nature de matériau à analyser.

- **Lot**

Le terme « lot » désigne un mélange homogène produit dans des conditions uniformes et ayant des caractéristiques communes (origine, variété, emballer ou expéditeur). Toutes les unités du lot proviennent du même mélange et sont conditionnées et emballées dans les mêmes conditions.

- **Plan d'échantillonnage**

Appelé aussi protocole d'échantillonnage, c'est la procédure préétablie pour la sélection, le prélèvement, la conservation et la préparation de l'échantillon.

- **Caractéristique**

Propriété ou constituant qui doit être mesuré ou noté.

- **Homogénéité**

Degré de répartition uniforme d'une propriété ou d'un constituant.

- **Échantillon global**

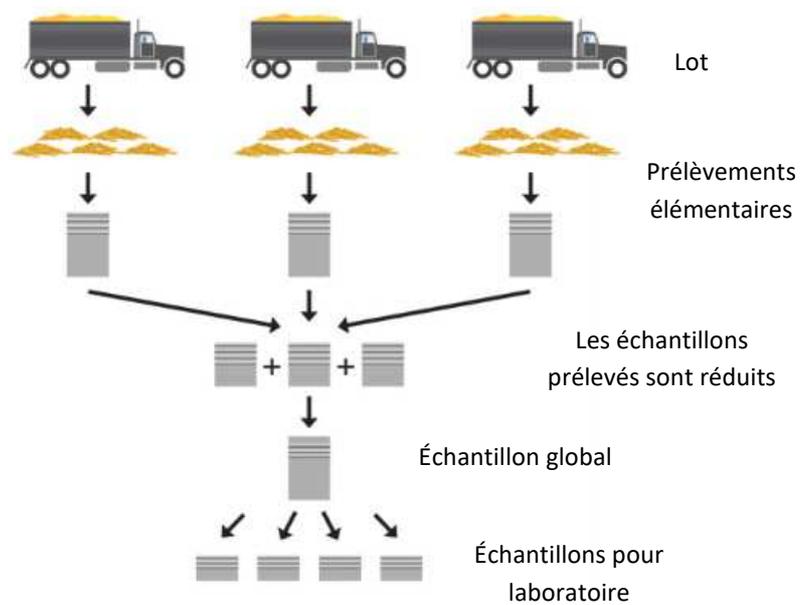
L'échantillon global se compose de plusieurs sous échantillons issus du lot. Les sous-échantillons prélevés doivent être de la même taille. Ils peuvent être prélevés de plusieurs façon, en faisant couler continuellement une petite partie du lot dans l'appareil d'échantillonnage ou en prélevant une série de sous-échantillons à intervalles fixes. Les sous-échantillons ainsi prélevés sont réunis dans un récipient. Le produit présent est soigneusement mélangé. L'échantillon final est prélevé dans cet échantillon global ainsi formé (**Figure 4**). Une certaine quantité est conservée dans un sachet ou un pot (fermé et muni d'une étiquette). Le nombre de sous-échantillons et la quantité dépendent du tonnage du produit à échantillonner.

- **Échantillon final**

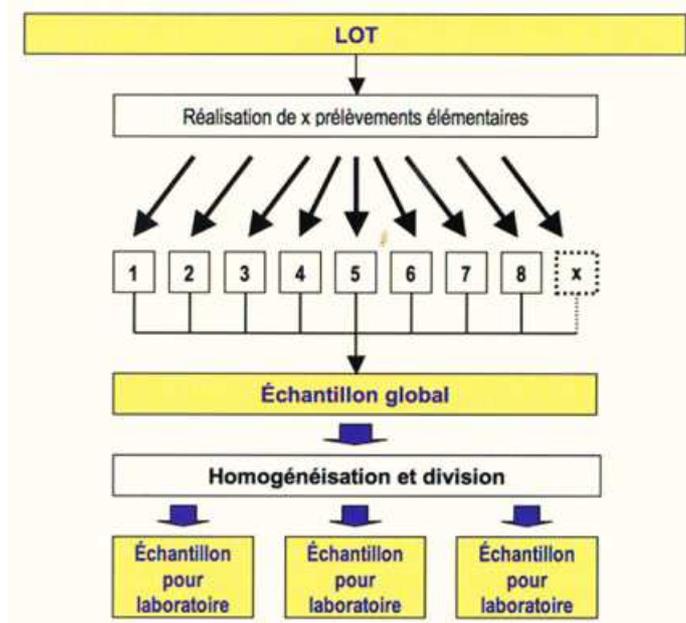
L'échantillon final (Échantillons pour laboratoire) se compose de plusieurs sous échantillons issus de l'échantillon global. Compte tenu du nombre et de la masse des prélèvements élémentaires (de 600g à 2kg), la masse d'échantillon global est souvent importante. Il est alors nécessaire d'homogénéiser l'échantillon global et de le réduire pour obtenir l'échantillon pour analyse ou l'échantillon de laboratoire (**Figure 5**).

- **Échantillon représentatif**

Un bon échantillon doit être représentatif du lot. La représentativité existe lorsque le système de prélèvement utilisé donne une probabilité non nulle de prélever tous les éléments constitutifs d'un lot, sans apporter de modification de la structure des éléments.



**Figure 4.** Schéma des étapes du prélèvement d'un échantillon de grain représentatif



**Figure 5.** Les éléments d'un plan d'échantillonnage

Cette définition d'échantillon représentatif diffère selon le plan d'échantillonnage (probabiliste ou non probabiliste). Un plan probabiliste fournit un échantillon représentatif dès lors que chaque individu de la population a une probabilité connue et non nulle d'être inclus dans l'échantillon. Un plan non probabiliste fournit un échantillon représentatif si la structure de l'échantillon pour certaines variables clés est similaire à celle de la population cible. Par exemple, on peut vouloir construire un échantillon pour lequel les proportions de catégories d'individus soient similaires dans l'échantillon à celles de la population cible (c'est le principe de la méthode dite des quotas).

L'obtention d'un échantillon représentatif permet d'extrapoler les résultats issus du traitement statistique de l'échantillon à la population.

## **2. Préparation des échantillons**

L'opération d'échantillonnage est souvent la principale source d'erreur dans l'évaluation de la qualité sanitaire d'un lot de production, dont les conséquences sont à la fois commerciales (déclassement du produit) et sanitaires (mise sur le marché d'un produit présentant un risque pour la santé).

La méthode d'échantillonnage englobe deux éléments qui sont ; le plan d'échantillonnage et le protocole opératoire. Dans le cas du contrôle de la qualité sanitaire des productions agricoles, un plan d'échantillonnage rigoureux doit définir au minimum les points suivants :

- La taille du lot sur lequel est confectionné l'échantillon ;
- La taille et le nombre de prélèvements élémentaires à prendre ;
- Les points où seront effectués ces prélèvements élémentaires ;
- Les outils de prélèvement ;
- La taille de l'échantillon global (ensemble des prélèvements élémentaires) ;
- Les conditions d'homogénéisation et de division de l'échantillon global ;
- Les outils d'homogénéisation et de division ;
- Le nombre et la taille des échantillons réduits (échantillons pour laboratoire) ;
- Le conditionnement et l'étiquetage de l'échantillon pour laboratoire. Ce plan devra également prendre en compte sous quelle forme est conditionné (sac ou vrac) et stocké le produit à échantillonner (benne, wagon, silo, etc.).

### **3. Méthodes d'échantillonnage**

Choisir le plan d'échantillonnage consiste à choisir de quelle manière les données seront recueillies sur le terrain, donc choisir une méthode pour localiser les échantillons. Il conditionne aussi le mode de traitement des données et donc les résultats. Les modalités de l'échantillonnage sont souvent déjà incluses dans les protocoles standards.

L'emploi de techniques d'échantillonnage inadéquates peut entraîner la production de résultats d'analyse non représentatifs, qui ne sont pas un reflet du milieu ou de la matrice ayant fait l'objet de l'échantillonnage. Cela peut mener à la formulation de conclusions erronées et invalides, et à l'application de mesures de gestion inappropriées.

#### **3.1. Échantillonnage aléatoire simple**

L'échantillonnage aléatoire simple est une méthode d'échantillonnage statistique où les échantillons sont répartis au hasard. Elle est fondée sur l'égalité des probabilités de sélection et a pour objectif l'extrapolation du niveau d'erreur observé dans l'échantillon à l'ensemble de la population. Chaque point étudié a donc une chance égale d'être échantillonné. Elle est destinée à extrapoler le niveau d'erreur observé dans l'échantillon à l'ensemble de la population.

#### **3.2. Échantillonnage systématique**

Ce type d'échantillonnage consiste à répartir les échantillons de manière régulière (tous les «x» mètres par exemple). Il est moins demandeur en temps qu'un échantillonnage aléatoire. On utilise habituellement un quadrillage. Les points d'échantillonnage sont ainsi faciles à localiser à chaque relevé, c'est un avantage considérable dans le cadre d'un suivi permanent.

#### **3.3. Échantillonnage stratifié**

Il consiste à subdiviser une population hétérogène en sous-populations ou strates plus homogènes. Il est particulièrement utilisé quand l'aire étudiée est divisée en zones différenciées. Les strates peuvent correspondre à des divisions administratives, des unités de gestion ou à des zones à topographie. On parle d'échantillon stratifié lorsque la fraction de sélection diffère en fonction de certaines caractéristiques (région, saisons, points de vente, etc.). On stratifie pour permettre que toutes les catégories de la population qui nous

intéressent soient représentées en nombre suffisant. La stratification s'impose lorsque les résultats sont recherchés au niveau de chacune des sous-populations.

### **3.4. Échantillonnage sélectif**

Dans ce cas, on prélève les échantillons selon un plan qui exclut des aliments présentant certaines caractéristiques ou ceux qui représentent des caractéristiques bien précises. Le plus souvent, il est utilisé pour l'analyse des contaminants.

### **3.5. Échantillonnage subjectif**

C'est la forme la plus simple et la plus intuitive d'échantillonnage. L'observateur juge les emplacements représentatifs et choisit comme échantillons les zones qui lui paraissent particulièrement homogènes et représentatives d'après son expérience.

## **4. Analyse des données**

Une fois les données de l'enquête pour le suivi et/ou l'évaluation du programme réunies et saisies dans une base de données informatique, on procède à leur analyse. Pour cela, il faut calculer les divers indicateurs mesurés dans les enquêtes et évaluer l'ampleur et de la signification statistique des changements dans le temps et/ou différences entre les groupes de comparaison.

Tester la signification statistique des changements observés demande que l'on estime l'ampleur de l'erreur d'échantillonnage associée aux estimations d'enquête appelées couramment les erreurs types. L'estimation de l'erreur type peut être complexe suivant le plan de sondage utilisé pour collecter les données. Plus les plans de sondage deviennent complexes, plus les procédures pour estimer les erreurs types deviennent compliquées. Quand des analyses intensives des données d'évaluation d'un programme sont nécessaires, il faut utiliser des logiciels qui sont capables de tenir compte de plans d'échantillonnage complexes (exemple, STATA ou SUDAAN).

## **5. Entreposage des échantillons**

Les échantillons de produits alimentaires doivent être stockés de manière que les résultats de l'analyse originelle soient le moins possible modifiés. L'idéale c'est d'analyser les échantillons immédiatement, ou dans le plus court délai après leur réception au laboratoire. La portion analysée ultérieurement doit donner un résultat analogue à celui de la première

analyse. La quantité réservée doit être suffisante pour permettre une seconde analyse, ainsi qu'une analyse de confirmation effectuée par un tiers.

Des changements physiques ainsi que des réactions chimiques et biochimiques peuvent se produire dans le récipient à échantillon entre le moment du prélèvement et celui de l'analyse en laboratoire. Le fait d'entreposer les échantillons dans un contenant d'expédition frais et obscur, comme une glacière, aide à réduire ces possibles problèmes.

Si l'analyse doit être reportée, les échantillons doivent être entreposés à -20 °C, à température de la pièce ou à 4 °C, selon leur nature. L'interprétation des résultats devra tenir compte de cette période d'entreposage. Cependant, dans le cas des *Campylobacters* thermotolérants et les bactéries anaérobies strictes, ainsi que pour tout autre microorganisme dont la survie est susceptible d'être fortement compromise par des conditions d'entreposage prolongées ou par une congélation, l'analyse doit absolument être effectuée immédiatement après leur réception.

- ***Entreposage de 0 à 4 °C***

Les échantillons d'aliments périssables ne doivent pas être entreposés plus de 36 heures à une température variant de 0 à 4 °C entre le prélèvement et l'analyse au laboratoire. Tout aliment périssable dont l'absence de la maîtrise de la température pendant une courte période peut présenter un risque microbien pour le consommateur.

- ***Entreposage à -20 °C***

Les aliments reçus congelés au laboratoire doivent être entreposés à -20 °C.

- ***Entreposage à température de la pièce***

Les produits non périssables, les conserves ou les aliments secs, doivent être conservés à température de la pièce dans un endroit réservé à cette fin.

## **6. Techniques et outils de prélèvement**

Lors du prélèvement des échantillons primaires et au cours de toutes les opérations consécutives, les outils et équipements nécessaires à l'échantillonnage doivent permettre d'éviter la contamination des échantillons ou toutes autres altération qui pourraient modifier les résultats analytiques.

## **6.1. Le prélèvement aseptique**

Le prélèvement aseptique est obligatoire pour tous les échantillons à analyser. Il consiste à empêcher toute contamination des échantillons et de l'équipement soumis à l'échantillonnage. Pour ce faire, du matériel propre doit être utilisé et une méthodologie de travail garantissant un prélèvement dans les meilleures conditions d'hygiène possible doit être mise en place.

Le nettoyage efficace de l'équipement d'échantillonnage, prévient, réduit et limite les risques de contamination croisée des échantillons pendant l'échantillonnage. Cela revêt une importance particulière lorsque l'échantillonnage porte sur des paramètres traces comme les métaux lourds ou les constituants organiques présents à l'état de traces. Le nettoyage sert aussi à éliminer les résidus de fabrication, dans le cas d'un nouvel équipement, et à éliminer la poussière et tout autre corps étranger dans le cas d'équipement ayant subi un entreposage ou un transport de longue durée et demandant un nettoyage.

- **Exemple de prélèvement d'un échantillon solide**

1. Ouvrir les sacs, emballages, barils, conteneurs, etc.
2. Fermer de nouveau les conteneurs.
3. Étiqueter le conteneur pour indiquer qu'un échantillon y a été prélevé.
4. Stocker, conserver et préserver l'échantillon.
5. Étiqueter le conteneur de rétention et de stockage.
6. Mettre en œuvre des précautions requises en fonction de la nature des méthodes d'analyse microbiologique.

Avant de procéder à l'échantillonnage, on doit s'assurer que surface d'échantillonnage (table, comptoir, etc.) est propre et sèche. Il convient donc de vaporiser la surface avec un désinfectant efficace en respectant le temps de contact recommandé par le fabricant, puis essuyer avec un papier absorbant propre. Si l'extérieur du conteneur prélevé est sale ou risque d'entraîner une contamination du contenu, il doit être bien lavé et désinfecté avant l'échantillonnage.

Pour éviter la contamination de l'échantillon par le manipulateur, le lavage des mains ou l'utilisation de gants jetables est requis lors de l'échantillonnage.

## 6.2.Outils d'échantillonnage

### 6.2.1. Échantillons en sacs

L'échantillonnage des aliments stockés dans des sacs se fait classiquement au moyen d'une sonde qui perce le sac et qu'on enfonce et déplace à l'intérieur de façon à extraire une petite quantité représentative du contenu. Ces sondes ont diverses formes mais ont le même principe de fonctionnement, leur diamètre étant fonction de la taille des grains à échantillonner.

Il est clair qu'il n'est pas possible d'échantillonner chacun des sacs d'une grande pile, ni d'obtenir un échantillon représentatif à partir de quelques sacs. C'est pourquoi, le nombre de sacs qui doivent être prélevés, est également défini par des règles (**Tableau 2**).

**Tableau 2.**Choix des sacs pour l'échantillonnage

Nombre de sacs dans le lot	Nombre de sacs à échantillonner
Jusqu'à 10	Tous les sacs
De 11 à 100	10 choisis au hasard
Plus de 100	Racine carrée (approximativement) du nombre total de sacs choisis au hasard.

#### 1/ Sondes simples

Les sondes sont les instruments dont on se sert le plus couramment pour prélever des échantillons sur des sacs, car ils sont simples, rapides et peu coûteux (**Figure 6**). Les sondes ont différents diamètres, en général, les sondes ayant un diamètre extérieur maximum d'environ 12mm sont conçues pour des petits grains comme le blé, alors que celles faisant 25mm de diamètre conviennent pour des grains plus gros.

La sonde conique pénètre facilement dans le sac et permet un échantillonnage plus homogène. Toutefois, elle prélève des parties inégales de grains le long de la ligne de pénétration, ce qui peut fausser les évaluations qualitatives.

L'inconvénient du sondage avec ces instruments est qu'il n'est pas conforme aux principes fondamentaux de l'échantillonnage représentatif. Si les matières étrangères ou les grains défectueux sont distribués dans le sac d'une façon inégale, il y'a un risque de fausser l'évaluation de la qualité.



**Figure 6.** Sondes manuelles simples

## **2/ Sondes à double tube**

Ces sondes se composent de deux tubes métalliques, étroitement emboîtés l'un dans l'autre et munis de plusieurs fentes communes (**Figure 7**). La sonde à double tube est généralement construite en laiton ou en aluminium et elle est disponible en différentes dimensions. Leur longueur varie de 45 cm à 3,5 m et leur largeur de 12 à 50 mm. Lorsqu'on fait tourner le tube intérieur, les fentes s'ouvrent ou se ferment et recueillent ainsi le grain d'une section transversale du sac. Ces sondes servent surtout à prélever verticalement des échantillons de grains en vrac, cependant il existe des petits modèles pour l'échantillonnage du grain en sac.

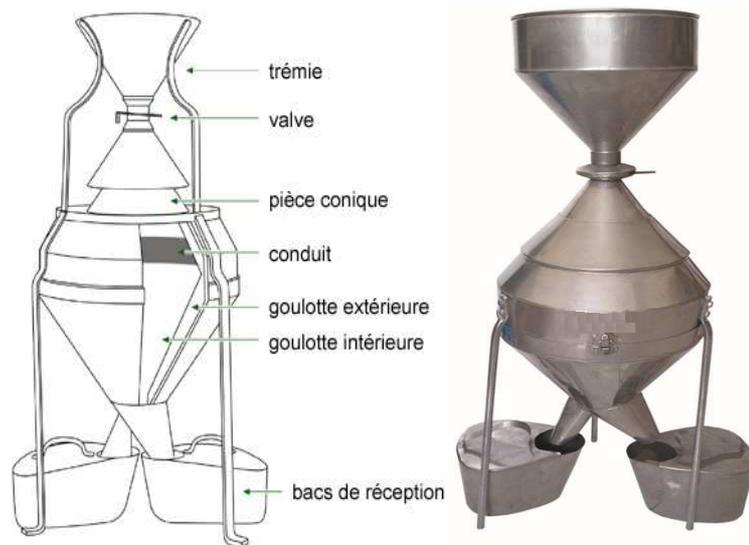


**Figure 7.** Sondes manuelles à double tube

- **Procédure d'échantillonnage à l'horizontale** (avec une sonde à double tube)
  1. Introduire doucement la sonde fermée en diagonale en position fermée, ouverture du tube extérieur orienté vers le haut, dans le plan horizontal, jusqu'à ce qu'elle atteigne le coin opposé de l'emballage.
  2. Tourner le tube intérieur jusqu'à ce que les ouvertures intérieures et extérieures de la sonde soient alignées.
  3. Agiter légèrement la sonde pour remplir les ouvertures.
  4. Fermer la sonde doucement.
  5. Lorsqu'une résistance se fait sentir ; retirer la sonde de l'emballage et recueillir l'échantillon dans un contenant propre.

### **3/ Échantillonneur diviseur**

Cet appareil a été conçu pour l'échantillonnage représentatif du grain en sacs. Le grain versé, tombe dans un cône, placé de manière à ce que le débit soit uniformément distribué. Une partie du grain est recueillie par des ouvertures à la périphérie de la base du cône et acheminée par une goulotte séparée, jusqu'à un collecteur d'échantillons (**Figure 8**). La taille de l'échantillon dépend des dimensions des ouvertures qui sont interchangeables. L'échantillonnage d'un sac de 100 kg se fait en 20 secondes.



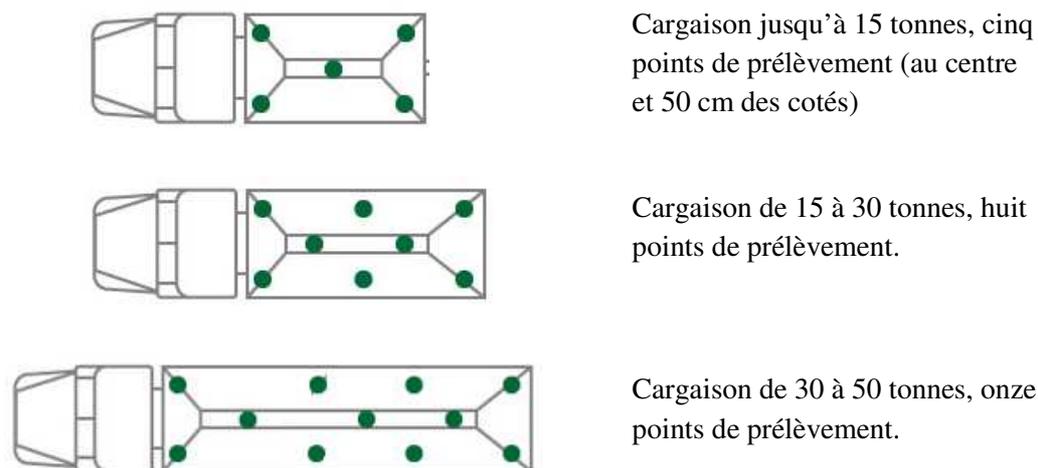
**Figure 8.** Diviseur de type Bœrner

### 6.2.2. Prélèvement sur des produits en vrac

Lorsque les marchandises en vrac sont transportées dans des wagons ou des camions, les échantillons sont prélevés à partir de chaque wagon ou compartiment. Dans ce cas, certains points spécifiques sont choisis de manière à s'assurer qu'un échantillon représentatif est prélevé dans toutes les parties de l'envoi.

L'échantillonnage des grains livrés en vrac se fait à l'arrêt (ex : sur un camion, dans un silo), ou sur produit en mouvement (ex : pendant les opérations de déchargement). Dans ce cas l'échantillonnage s'effectue au hasard. Pour un produit donné chaque prélèvement doit comporter au moins 5 échantillons (**Figure 9**). Chaque échantillon élémentaire est ensuite vidé dans un contenant propre prévu à cet effet pour en vérifier l'uniformité. Cette procédure d'échantillonnage est répétée pour chaque unité à échantillonner, le nombre de fois nécessaire pour obtenir le nombre minimal d'échantillons élémentaires requis. L'ensemble des échantillons élémentaires prélevés sont mélangés pour obtenir un échantillon global homogène.

Parfois, il est nécessaire de réduire la taille à l'aide d'un diviseur mécanique ou manuellement pour obtenir des échantillons finaux représentatifs dont le poids varie de 500 g à 2kg.



**Figure 9.** Points de prélèvement des échantillons sur le produit en vrac à l'arrêt

## 1. Matériel d'échantillonnage sur produit à l'arrêt

- **Sonde à double tube**

On se sert couramment de sondes de 1,8 m de long et de 3,5 cm de diamètre extérieur, pour échantillonner le grain dans des camions profonds. La sonde doit toujours être introduite un peu à l'oblique des fentes étant en position vers le haut. Celles-ci ne doivent être ouvertes qu'une fois la sonde arrivée au point voulu et refermées avant le retrait de la sonde.

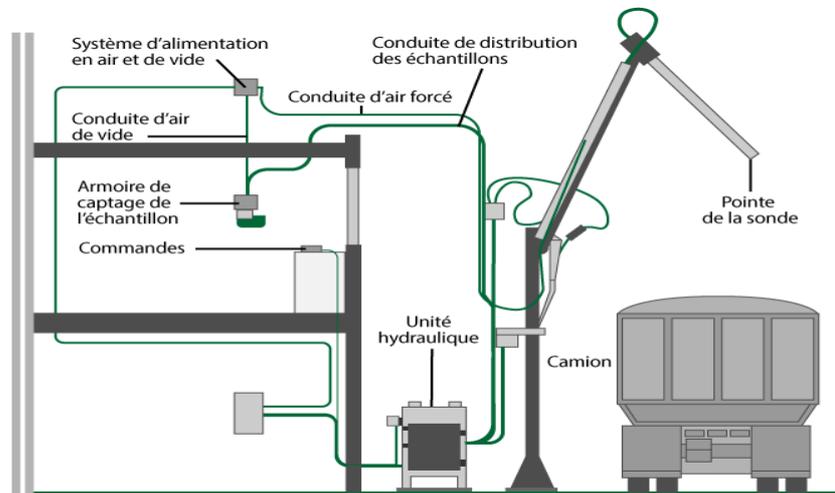
- **Sondes manuelles pour échantillonnage en cellules profondes**

La plus simple comporte une extrémité creuse, qui sert à l'échantillonnage, et une soupape à ressort bandé fixée sur une tige en métal ou en bois d'un mètre de long. Des tiges à ralonges sont jointes pour accroître la profondeur de la pénétration. Une fois atteint le point de sondage, une légère traction de la tige vers le haut soulève la soupape de l'extrémité de la sonde, laissant passer le grain dans l'auget. On retire alors complètement la sonde et on enlève l'échantillon. Un seul passage de la sonde donne un échantillon de grain de 300 g.

- **Échantillonneurs pneumatiques**

Les systèmes d'échantillonnage à l'aide d'une sonde pneumatique sont utilisés pour prélever des échantillons dans des camions à l'aide d'une sonde d'échantillonnage (compartimentée ou à embout conique) insérée dans un lot de grain en vrac (**Figure 10**). Ces

appareils pallient les principaux inconvénients des opérations manuelles en utilisant la succion mécanique pour pénétrer la masse statique des grains. Ils sont plus rapides que les sondes manuelles et peuvent être utilisés pour prélever des échantillons à la base et sur les côtés des conteneurs de grains en vrac.



**Figure10.** Schéma d'un système de sonde pneumatique à embout conique

- **Échantillonneur à vis**

Il s'agit d'un tube d'environ 1,4 mètre de long et de 5 cm de large, ouvert à la base et contenant une vis entraînée par moteur. Le grain élevé par la vis est recueilli dans un sac à la goulotte de sortie. Pour obtenir un échantillon du produit, il faut introduire le dispositif à l'oblique dans le grain. Il n'existe pas de rallongement permettant de sonder au-delà d'une profondeur de 50 cm.

## 2. Matériel d'échantillonnage sur produit en mouvement

- **Échantillonneur pelican**

Il se compose d'une poche en cuir fixé à un cadre métallique à l'extrémité d'une poignée en bois ou tube métallique. On s'en sert pour prélever des échantillons du grain en chute libre. Pour obtenir un bon échantillon, il est recommandé de placer l'appareil de part et d'autre de la masse en mouvement.

- **Échantillonneur de type ventouse**

Cet appareil est fixé par des crampons ou des écrous à l'extrémité de la goulotte d'arrivée. Un tube est introduit par le trou pratiqué dans la paroi de la goulotte. Ce tube

généralement ouvert à ses deux extrémités, est muni d'une fente à sa partie supérieure qui pénètre dans la masse de grain en mouvement.

## 7. Exemples de prélèvement de produits alimentaires

### 7.1. Beurre

Le prélèvement est réalisé à partir du produit en vrac ou à partir d'un produit emballé contenant au moins 1 kg de produit, après avoir, si nécessaire, maintenu le produit à une température de 8 °C environ pour qu'il ait atteint une fermeté permettant son prélèvement.

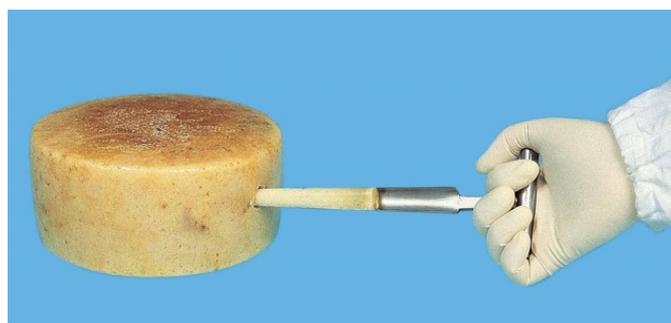
Dans le cas d'un emballage de moins de 1 kg, c'est l'emballage dans son **entier** qui constitue l'échantillon. L'échantillonnage est réalisé à l'aide d'une sonde et consiste d'abord à enlever, à l'aide d'une spatule stérilisée, la couche de surface de la zone d'échantillonnage sur une épaisseur ne dépassant pas 5 mm. La sonde stérilisée est enfoncée *en diagonale dans le produit*, sans atteindre la surface opposée ; faire pivoter la sonde qui contient le noyau d'un tour complet et la retirer. Le noyau est introduit dans un récipient stérile pour échantillon.

### 7.2. Fromage

Dans le cas des échantillons de fromage (à pâte dure, demi dure, ou molle), la méthode est la suivante :

Les échantillons sont prélevés soit à l'aide d'une **sonde stérilisée**, soit en coupant une portion à l'aide d'un scalpel stérilisé, ou bien directement en prenant le fromage entier non ouvert dans son emballage. L'échantillon doit comprendre la surface du fromage.

Pour effectuer le prélèvement, enfoncer une première sonde jusqu'à 25 mm de profondeur et retirer un noyau, puis enfoncer dans le canal réalisé une seconde sonde de diamètre inférieur, la faire pivoter et retirer le noyau.



**Figure 11.** Préleveur de fromage

### 7.3. Méthodes de prélèvement aseptique des conserves

Ces méthodes sont élaborées selon la norme AFNOR (Association française de normalisation) V 08 403. Les conserves peuvent se présenter sous différents emballages : boîtes métalliques, bocaux en verre, barquettes, sachets.

La conserve est un produit sur lequel on peut être amené à effectuer des analyses lorsqu'on recherche des causes de défauts de fabrication. Les analyses doivent être conduites en asepsie pour diminuer la proportion de contamination exogène (« faux positifs »).

Les analyses menées sur les conserves donnent des résultats « **tout ou rien** » : un résultat positif indique la présence de microorganismes, un résultat négatif, l'absence de microorganisme. La verrerie et les outils utilisés sont stérilisés. Une enceinte à écoulement d'air unidirectionnel (hotte à flux laminaire) est préconisée.

- **Avant prélèvement**

- 1) Un examen préalable des caractéristiques (figurant sur l'emballage) de l'échantillon sont notées, de même que l'aspect.
- 2) Le récipient est brossé avec une solution de détergent dans le cas de boîtes métalliques ou de bocaux. Un séchage est effectué à l'aide de papier absorbant.
- 3) Une **désinfection de l'emballage** sous la hotte à flux laminaire est indispensable. À l'aide de cotons hydrophiles : désinfecter à l'eau de Javel puis, après 10 minutes, recommencer l'opération avec de l'éthanol à 95° et laisser sécher.

- **Ouverture de l'emballage**

- 1) Faire attention aux risques de projection et travailler sous hotte.
- 2) Immédiatement avant l'ouverture, passer un coton imbibé d'éthanol à 95 à l'endroit où va se pratiquer l'ouverture.
- 3) Perforer la boîte à l'aide d'un poinçon et d'un marteau à manche métallique stérilisés au préalable et, si nécessaire, agrandir l'ouverture à l'aide d'un ouvre-boîte à découpe circulaire.
- 4) S'il s'agit d'un bocal à couvercle en verre avec joint de caoutchouc, ouvrir normalement.

- **Prélèvement du contenu**

- 1) Le matériel utilisé dépend de la nature liquide ou solide du produit. Si le produit est mixte (liquide et solide), les deux phases doivent être prélevées.
- 2) Placer le prélèvement dans un flacon stérile et conserver à 4°C jusqu'à l'analyse. Procéder à une homogénéisation si nécessaire (pour former un lot).

## **Chapitre III. Techniques de dénombrement**

Depuis presque un siècle, les méthodes bactériologiques traditionnelles sont fondées presque exclusivement sur l'utilisation de milieux spécifiques pour isoler et dénombrer les cellules bactériennes. Par ces techniques, seuls les micro-organismes vivants sont comptabilisés.

La croissance sur un milieu de culture implique que l'organisme est capable de se multiplier, on parle de cultivabilité. Cependant, il existe des micro-organismes viables mais non cultivables. Ces micro-organismes sont caractérisés par un état métabolique actif, mais associé à une perte des capacités de multiplication. Le nombre et la variété de bactéries qui se multiplient sont influencés par des facteurs tels que la durée d'incubation, la concentration partielle en oxygène, le pH du milieu, la présence de matières nutritives spécifiques dans le milieu de culture, la compétition entre les bactéries pour les nutriments, etc.

La composition physico-chimique des aliments est également très variable ; liquide, solide, semi-solide et d'autres formes mixtes. Ces différences de viscosité peuvent également gêner la réalisation de prises d'essai homogènes assurant une analyse alimentaire reproductible.

Certains micro-organismes pathogènes exigent des protocoles complexes, longs et fastidieux. Les méthodes alternatives à la microbiologie classique se développent de plus en plus avec l'objectif de gain de temps. Certaines visent à dénombrer toutes les cellules viables, d'autre se fondent sur la détection de matériel génétique qui est présent dans la cellule.

### **1. Techniques de dénombrement indirect**

#### **1.1. Dénombrement après filtration sur membrane**

Cette méthode sert à recueillir, identifier et dénombrer les micro-organismes par filtration sur membrane et indique la présence possible d'organismes pathogènes dans un milieu. Son principe consiste à concentrer les microorganismes potentiellement présents dans un produit filtrable sur une membrane qui sera mise en contact avec un milieu nutritif approprié permettant la croissance microbienne en colonie visible à l'œil nu (**Figure 12**).

La filtration sur membrane est très utilisée pour dénombrer les coliformes totaux dans les eaux usées, les eaux souterraines et à l'eau de surface. Les échantillons doivent toujours être prélevés avec toutes les conditions d'asepsie nécessaires dans des contenants stériles de verre ou de polypropylène à large ouverture.

Le produit à analyser est d'abord filtré sur une membrane de porosité de 0,45 µm. Une attention toute particulière doit être apportée au matériau constituant la membrane. En effet, le produit à examiner ou l'un de ses constituants ne doit pas modifier l'efficacité de la rétention bactérienne. La membrane est ensuite rincée avec un diluant stérile, avant d'être mise en contact avec un milieu nutritif approprié au développement des bactéries. La boîte de milieu gélosé est incubée à température appropriée (35°C pendant 48h dans le cas des bactéries). Le nombre d'UFC est ensuite compté à la surface de chaque boîte. Le résultat s'exprime en UFC/ml ou UFC/g.

Le nombre de colonies sur la membrane (colonies présentant les caractères biochimiques caractéristiques de la flore recherchée en fonction du milieu utilisé) permet de calculer la concentration bactérienne (N) en nombre d'Unité Formant Colonies (UFC) par mL selon la formule suivante :

$$N \text{ (UFC/mL)} = n/v.$$

n : nombre de colonies sur la membrane ; V : volume de produit filtré (en mL).

- **Avantages**

Méthode sensible, la limite de détection est de 1 UFC (unités formant colonies) par volume.

- **Inconvénients**

C'est une technique utilisée pour des produits filtrables uniquement. De plus, la présence de matière en suspension dans l'échantillon peut colmater la membrane. Ces matières en suspension peuvent aussi entraver l'observation des colonies en masquant ou en inhibant la croissance des bactéries. Le nombre total de colonies de toutes sortes doit être inférieur à 200 par membrane. Lorsqu'il y a une croissance abondante d'organismes, spécifique ou non, le résultat peut être non quantifiable.



**Figure 12.** Procédé de la filtration sur membrane

## 1.2. Dénombrement en milieu solide

Cette technique est basée sur la capacité d'un micro-organisme viable cultivé sur un milieu nutritif solide approprié à se multiplier en donnant lieu à une colonie visible à l'œil nu ; c'est la notion de l'UFC (Unité Formant Colonie). Des dilutions successives, décimales et croissantes de l'échantillon sont réalisées. Puis un volume fixe d'échantillon et de ses dilutions est étalé en surface d'un milieu gélosé ou incorporé dans la masse du milieu en surfusion. Après incubation, le dénombrement des colonies formées sur le milieu, permet de déterminer la population bactérienne initiale de l'échantillon.

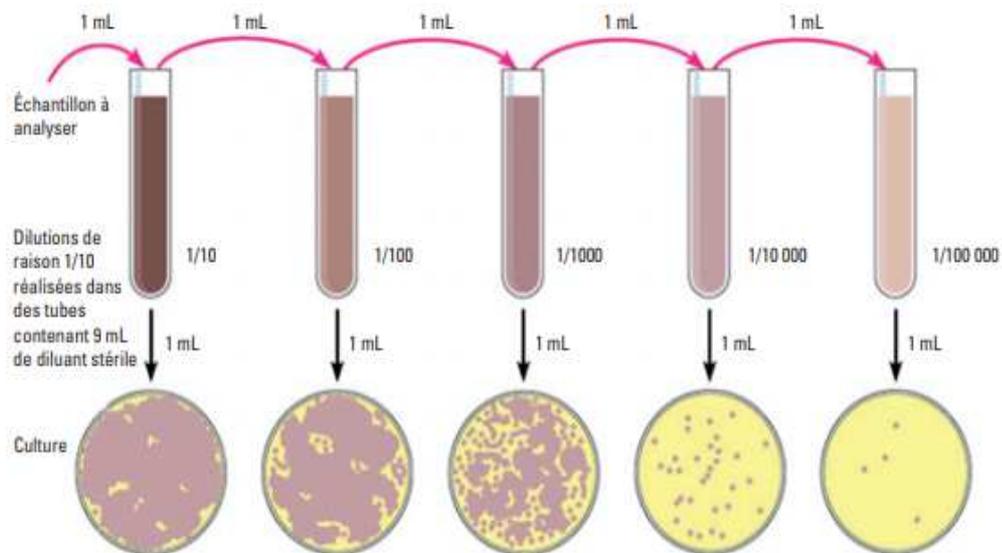
### 1.2.1. Dénombrement par ensemencement en profondeur (masse)

Cette méthode est appropriée pour les produits non filtrables. Elle consiste à dénombrer les micro-organismes viables présents dans une portion d'échantillon. Elle s'effectue en déposant 1 mL d'un échantillon pur ou dilué dans une boîte de Pétri à laquelle est ajoutée un

milieu gélosé en surfusion (environ 45 °C) et adapté à la culture des bactéries (**Figure 13**). La ou les boîtes de Pétri sont ensuite agitées doucement afin de répartir uniformément les bactéries dans tout le volume de milieu disponible.

Une fois le milieu refroidit et solidifié, une incubation à 35°C pendant 48 heures est réalisée. L'incubation dans ces conditions permet à chaque bactérie viable de se multiplier et de former un amas de cellules (colonie) permettant leur dénombrement à l'aide d'un compteur de colonies. Le dénombrement s'effectue sur les boîtes présentant le plus grand nombre de colonies *inférieur à 300*. La moyenne des dénombrements permet le calcul du nombre d'unités formant colonie par gramme ou par millilitre (UFC/g ou UFC/mL).

Cette méthodologie a de multiples applications : elle est particulièrement utilisée pour les dénombrements des microorganismes mésophiles aérobies.



**Figure 13.** Technique de l'ensemencement en profondeur

- **Avantages**

1. La nature des produits testés peut être très variable (visqueuse, opaques).
2. Permet le dépôt d'un volume important (1 mL) de l'échantillon testé pur ou dilué.
3. Sensibilité = 300 UFC/ boîte.

4. Possibilité d'utiliser tous les milieux de culture standards.
5. Possibilité d'incubation en atmosphère spécifique (CO<sub>2</sub>, anaérobie)

- **Inconvénients**

Méthode longue (préparation importante) qui impose la préparation des boîtes Pétri au moment de l'analyse.

- **Exploitation des résultats**

Choisir les dilutions avec un nombre minimum de 10 colonies par boîte et, un nombre maximal de 300 pour les bactéries. Pour les levures et les moisissures, on retient pour le calcul les dilutions présentant entre **10 et 150** colonies par boîte.

Le calcul de la concentration bactérienne en UFC par ml ou par g de produit se fait selon l'équation :

$$N = \frac{\text{moyenne des colonies comptées sur les boîtes retenues}}{\text{volume de l'inoculum (1mL en masse, 0,1 ml en surface)}} \times \frac{1}{d}$$

### 1.2.2. Dénombrement par étalement en surface

Un volume de 100 µL d'échantillon est étalé à la surface de boîtes de Pétri avec un milieu de culture approprié. Tout comme dans le cas de l'ensemencement en profondeur, deux boîtes de Pétri par milieu et par dilution sont préparées. De même, les conditions d'incubation et les calculs sont effectués comme précédemment (en masse).

- **Avantages**

Cette méthode permet de dénombrer des germes dans des produits non filtrables.

Volume testé = 100 µL.

Sensibilité (entre 10 UFC/mL et 1000 UFC/mL).

Possibilité d'utiliser tous les milieux précoulés disponibles dans le commerce.

Possibilité d'incubation en atmosphère spécifique (CO<sub>2</sub>, anaérobie).

- **Inconvénients**

Ne peut pas être utilisé pour les produits visqueux, épais.

Pas très précis pour les prélèvements peu contaminés.

### Application :

On considère deux échantillons et dans chacun des cas, pour un inoculum de 1 mL des dilutions réalisées, les résultats attendus (nombre de colonies par boîte) sont les suivants :

**Tableau 3.** Dénombrement en milieu solide de la flore totale mésophile aérobie du lait cru

Dilutions	$10^{-1}$	$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$
Lait n°1	$5 \cdot 10^4$	$5 \cdot 10^3$	$5 \cdot 10^2$	50	3
Lait n°2	$2,6 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^3$	$4 \cdot 10^2$	66	8

- Calculez le nombre d'UFC/mL dans les deux échantillons ?
- D'après les normes, le critère microbiologique acceptable est :  $N < 5 \cdot 10^4$  UFC/mL de lait.
- Le dénombrement se réalise à partir de boîtes donnant un nombre de colonies compris entre **15 et 300**, les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$ ,  $10^{-5}$  ne permettront pas de différencier les deux laits, pour ce qui concerne la concentration en microorganismes.
- Dans ce cas, la dilution  $10^{-4}$  peut, à elle seule, permettre d'obtenir une réponse.

### 1.3. Dénombrement en milieu liquide (méthode du nombre le plus probable : NPP)

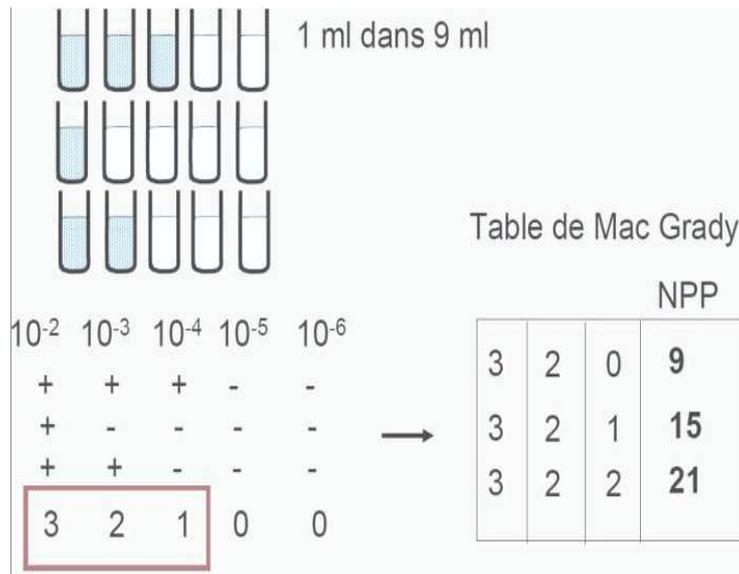
Cette méthode ne doit être utilisée que lorsque l'emploi des autres approches est impossible du fait d'une fidélité et d'une exactitude inférieure. De plus, les résultats obtenus pour le dénombrement des moisissures manquent de précision.

La méthode est lourde à mettre en œuvre et repose sur une série d'au moins trois dilutions successives du produit réalisées au 1/10. La méthode consiste à préparer de nombreuses répliques de plusieurs dilutions d'une culture et à les ajouter à des tubes contenant un milieu liquide approprié. On prélèvera ainsi trois fois 1 ml de chaque dilution qui seront transférés dans trois tubes contenant chacun 9 à 10 ml d'un milieu liquide approprié additionné si nécessaire d'un tensio-actif ou agent neutralisant (**Figure 14**).

Les tubes sont ensuite incubés à 30-35°C pendant 5 jours. Après incubation on examine chaque tube pour vérifier s'il y'a eu croissance. Pour chaque dilution, on notera le nombre de tubes présentant une croissance microbienne. Pour chaque série de culture issue de la même

dilution on compte le nombre de tubes positifs (3 séries identiques). On compose le nombre caractéristique, et la lecture de la table de Mac Grady nous donne le Nombre le Plus Probable : NPP(**Tableau4**). Le calcul de la concentration en micro-organismes par mL de produit pur [N] se fait par l'équation suivante :

$$[N] = (\text{NPP} / V \text{ inoculum}) \times Fd \text{ (Fd : facteur de dilution)}$$



**Figure 14.** Principe de la méthode NPP

Dans le cas de cet exemple (Figure 14), on choisit 321 (car < 330) pour la dilution 10<sup>-2</sup>. On choisit le nombre le plus grand possible et si possible inférieur à 330. Dans la table de Mac Grady, le NNP correspondant à 321 est 15.

$$[N] = 15 \cdot 10^2 = 1,5 \cdot 10^3 \text{ micro-organismes par mL.}$$

Ce résultat est une évaluation de la concentration en micro-organismes présent dans 1 mL de produit pur.

**Tableau4.**Table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions retenus			NPP
0	0	0	< 0,3	2	2	1	2,8
0	0	1	0,3	2	3	0	2,9
0	1	0	0,3	3	0	0	2,3
0	2	0	0,6	3	0	1	4
1	0	0	0,4	3	0	2	6
1	0	1	0,7	3	1	0	4
1	1	0	0,7	3	1	1	7
1	1	1	1,1	3	1	2	12
1	2	0	1,1	3	2	0	9
1	2	1	1,5	3	2	1	15
1	3	0	1,6	3	2	2	21
2	0	0	0,9	3	2	3	29
2	0	1	1,4	3	3	0	20
2	1	0	1,5	3	3	1	50
2	1	1	2,0	3	3	2	110
2	2	0	2,1	3	3	3	> 110

## 2. Choix des milieux de culture

Les milieux solides sont plus utilisés que les milieux liquides. Ces derniers sont employés essentiellement pour des microorganismes dont la culture directement sur milieu solide présenterait des difficultés.

Les milieux solides permettent quant à eux une différenciation des types de microorganismes dénombrés, par l'aspect des colonies obtenues, résultant de l'utilisation d'un composant du milieu ou de la production d'un métabolite spécifique.

Dans le cas où les germes que l'on recherche à dénombrer représentent une **population globale**, le milieu de dénombrement choisi est suffisamment riche pour permettre la croissance de la plupart des microorganismes potentiellement présents (ex : Gélose au lait

écrémé pour le dénombrement de la flore mésophile aérobie du lait et des produits laitier ; Gélose Wallerstein (WL) nutritive pour le dénombrement des microorganismes des boissons fermentées).

Dans le cas où les microorganismes recherchés représentent une **population spécifique**, le milieu de dénombrement choisi permet la culture de cette population mais aussi, le plus souvent, sa sélection par rapport aux autres germes présents dans l'aliment, et sa caractérisation selon un caractère mis en évidence sur le milieu (ex : Gélose Baird-Parker pour le dénombrement des *Staphylococcus aureus* ; gélose lactosée au désoxycholate de sodium dans le cas des coliformes thermotolérants).

### **3. Dénombrement direct des cellules**

La détection des bactéries viables est généralement rapide du fait de l'absence des étapes d'incubation, mais elle est aussi non spécifique, puisque toutes les cellules (bactéries, levures) viables présentent dans l'échantillon sont dénombrées.

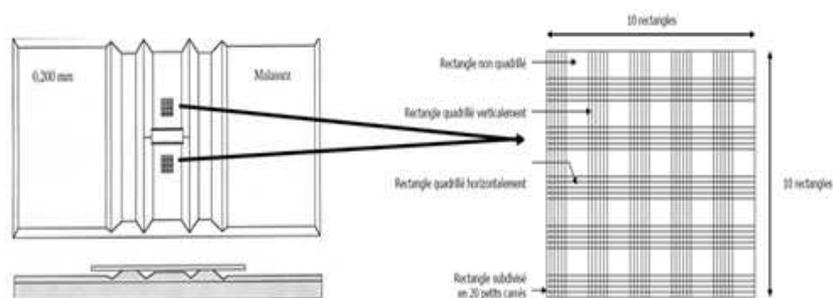
#### **3.1. La cytométrie**

La façon la plus évidente de déterminer le nombre de cellules est de faire un comptage direct au moyen d'une chambre de comptage. La cytométrie permet, en particulier, de dénombrer les levures et les bactéries présentes dans une suspension et de mesurer certaines caractéristiques des cellules vivantes ou mortes. Il est possible de différencier les cellules vivantes des cellules mortes par utilisation d'un colorant. Les cellules vivantes restent incolores et on identifie donc comme mortes celles qui sont colorées. Toutes ces méthodes requièrent de travailler sur un échantillon représentatif de la suspension, obtenu par prélèvement après homogénéisation, éventuellement sur plusieurs échantillons. Compte tenu de la taille microscopique des cellules, il est toujours nécessaire d'effectuer un grossissement à l'aide d'un microscope optique pour pouvoir les observer et les dénombrer.

Les chambres de comptage sont des lames et couvre-objets spécialement conçus. De nombreuses cellules de numération existent, présentant chacune un quadrillage différent. Chaque cellule de numération a donc son propre mode de calcul pour parvenir au résultat de dénombrement final.

Selon le quadrillage de la partie centrale, on retrouve les lames Malassez, Neubauer, Bürker, Fuchs Rosenthal, Thoma, ou Bürker Türk. Les deux cellules de comptage les plus utilisées pour la numération des germes sont la cellule de Thoma et la cellule de Malassez.

- Les lames Malassez : généralement utilisées pour le comptage d'échantillons à forte densité cellulaire. Ces lames permettent le comptage d'une majorité d'échantillons et sont donc les plus répandues en laboratoire.
- Les lames Thoma : plutôt réservées pour le comptage d'hématies et de leucocytes.
- Les lames Neubauer : dédiées au comptage d'érythrocytes et de thrombocytes.
- Les lames Bürker : utilisées pour le comptage de leucocytes.
- Les lames Fuchs Rosenthal : ont une surface plus grande que les autres lames, et sont adaptées pour le comptage d'échantillons tel que le liquide céphalorachidien.
- Les lames Bürker Türk : sont une combinaison des lames Bürker et Thoma.



**Figure 15.** Lame Malassez et schéma de son quadrillage

## 1. Détermination des concentrations et calculs

### 1.1. Calcul du volume

- **Cellule de Thoma**

Elle est constituée de 16 grands carrés de 16 petits carrés chacun.

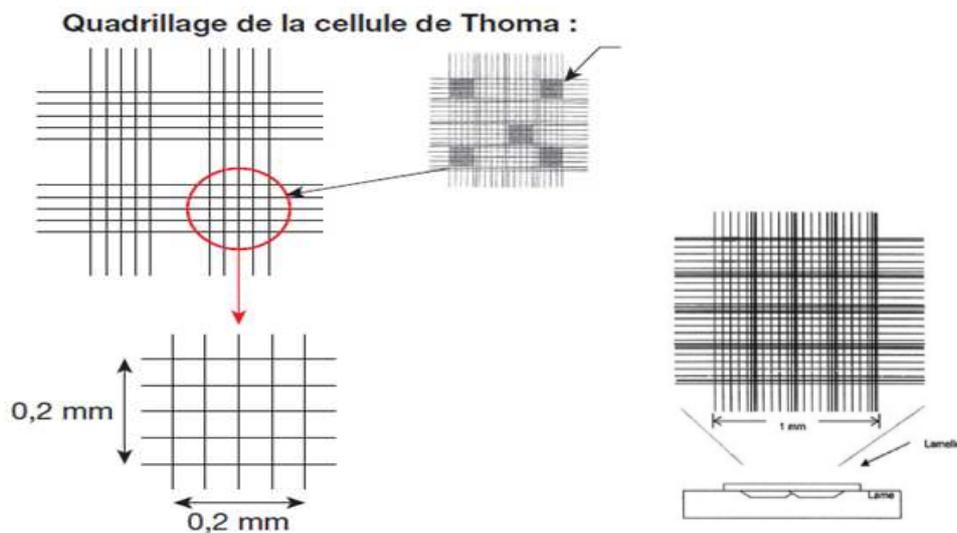
L'écartement entre lame et lamelle = 0,1 mm (H).

La longueur = largeur = 0,2 mm

Volume d'un grand carré = 0,004 mm<sup>3</sup>

Volume = longueur × largeur × hauteur (hauteur = épaisseur entre lame et lamelle)

$$= 0,000\ 004\ \text{ml soit } (4 \cdot 10^{-6}\ \text{ml})$$



**Figure 16.** Cellule Thoma et schéma de sa surface quadrillée

- **Cellule de Malassez**

Écartement entre lame et lamelle H= 0,2 mm

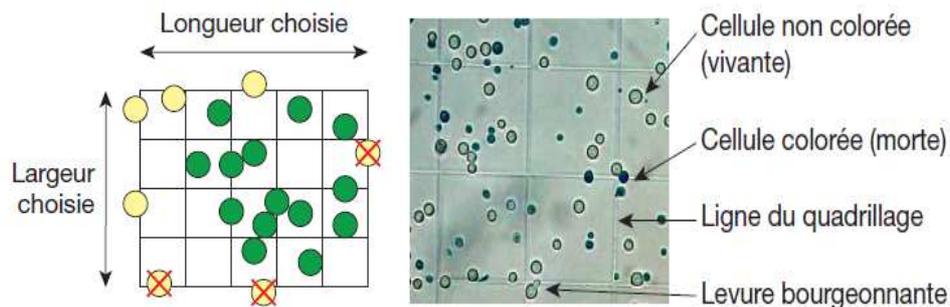
Volume d'un grand rectangle = 0,01 mm<sup>3</sup>

Volume = longueur × largeur × hauteur (hauteur = épaisseur entre lame et lamelle)

$$= 0,00001\ \text{ml} = 10^{-5}\ \text{ml}$$

## 1.2. Calcul du nombre moyen de germes par grand carré ou par grand rectangle

Cette étape est réalisée sur un certain nombre de grands carrés du quadrillage de la cellule de Thoma ou de la cellule de Malassez. Cela permet d'assurer une plus grande fiabilité du résultat. Le nombre de répétitions est entre 3 et 5 et leur emplacement dans la cellule de comptage est choisi au hasard. À la fin de ce comptage, on fait le calcul de la moyenne des dénombrements (n moyen) par grand carré.



**Figure 17.** Comptage des cellules vivantes après coloration

## 1.3. Calcul du nombre de germes par millilitre

- **Pour la cellule de Thoma :**

Nombre de germes/mL = n moyen/ volume d'un grand carré de la cellule de comptage (mL).

$$= n/ 4.10^{-6}$$

- **Pour la cellule de Malassez :**

Nombre de germes/mL = n moyen/volume d'un grand rectangle de la cellule de comptage (mL).

$$= n/10^{-5}$$

## 3.2. Détermination de la masse cellulaire

Les techniques de mesure des variations de la masse permettent également de déterminer la taille de la population. C'est le cas de la détermination du poids sec des micro-organismes. Les cellules après leur croissance sur milieu liquide sont récoltées par centrifugation puis lavées, séchées dans un four et pesées. Cette technique est surtout utilisée pour la mesure de la croissance des champignons filamenteux. Elle est cependant très longue et peu sensible.

La spectrophotométrie est une technique plus sensible et plus rapide de mesure de la masse cellulaire. Elle est basée sur le fait que les cellules microbiennes dispersent la lumière incidente. Comme dans une population bactérienne, les cellules ont presque la même taille, la quantité de lumière diffractée est directement proportionnelle à la masse cellulaire et indirectement à la concentration en cellules. Lorsque la suspension bactérienne atteint un million de cellules ( $10^6$ ) par millilitre, le milieu apparaît légèrement trouble.

L'absorbance du milieu (densité optique) est mesurée dans un spectrophotomètre. La croissance d'une population microbienne peut être facilement mesurée à condition qu'elle soit suffisamment dense pour donner une turbidité détectable.

## **Chapitre IV. Techniques d'identification des micro-organismes**

Les intoxications alimentaires sont la première cause d'hospitalisation dans le monde. En 2016, l'Autorité européenne de sécurité des aliments (EFSA) et le Centre européen de prévention et de contrôle des maladies ont signalé environ 360 000 hospitalisations dues à des infections alimentaires confirmées et près de 500 cas mortels dans l'Union européenne.

Les méthodes de détection et d'identification des bactéries à partir des matrices alimentaires sont traditionnellement basées sur la culture sur des boîtes d'agar. Ces méthodes sont sensibles et sélectives mais peu adaptées aux besoins de l'industrie alimentaire et aux agences de contrôle à cause du long temps d'analyse et de leurs coûts élevés.

Aujourd'hui, il existe essentiellement deux modalités d'identification, fondées pour la plus ancienne sur des critères phénotypiques et pour la plus récente sur des critères moléculaires. Cette dernière est actuellement prédominante, en particulier pour la détermination des pathogènes, et essentielle pour la majorité des organismes non cultivables ou extrêmement difficiles à cultiver dans les conditions de laboratoire. Les méthodes d'analyses moléculaires basées sur la détection des acides nucléiques (ADN ou ARN) s'imposent comme méthodes de choix. Elles permettent de détecter les agents pathogènes de manière spécifique, rapide et robuste et ainsi de répondre aux enjeux sanitaires et économiques.

Le choix d'une méthode doit être considéré en fonction de l'utilisation prévue : pratique (bactériologie médicale, microbiologie industrielle) ou théorique (classification selon l'histoire évolutive).

## 1. Identification morphologique

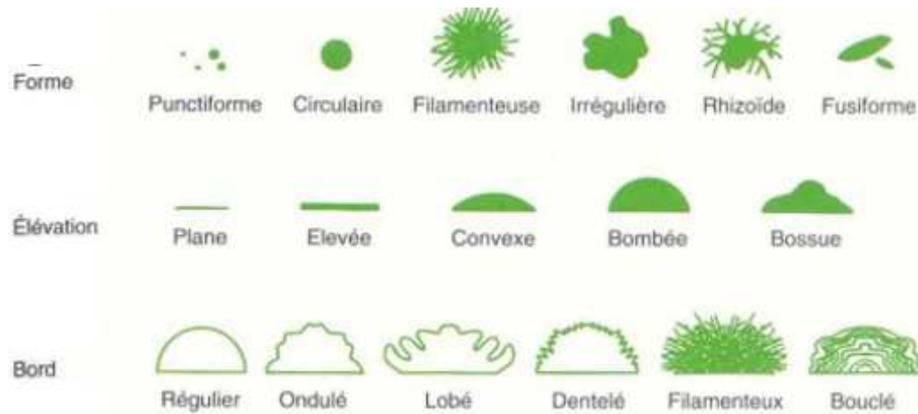
Les premiers efforts d'identification bactérienne sont nés des expériences de Louis Pasteur en 1870 et se sont fondés sur les caractéristiques morphologiques, biochimiques et physiologiques. Les bactéries sont observées au microscope avec ou sans coloration. Leur forme, leur mobilité, les propriétés de leur paroi sont ainsi caractérisées.

L'étude de la morphologie bactérienne permet une orientation préliminaire dans l'identification des microorganismes d'intérêt. La procédure d'identification phénotypique utilise un large éventail de caractères : aspect externe (morphologie, coloration de Gram ou autres, motilité, formation de spores, aspects des colonies), capacités culturales (aérobiose ou anaérobiose, températures et pH possibles et optimaux), capacités métaboliques (présence d'enzymes telles que catalase, oxydase, etc.), nature des antigènes de surface (sérogroupe), sensibilité à des bactériophages (lysotypie), etc.

### 1.1. Caractères macroscopiques

La première étape du diagnostic bactérien d'une souche est la description macroscopique des colonies isolées qui concerne les caractéristiques des colonies après culture sur différents milieux solides. Parfois cette seule étape permet d'identifier le germe en question car les colonies sont typiques.

La morphologie de la colonie et des cellules permet d'obtenir une identification initiale d'un micro-organisme. Cela s'effectue par des méthodes simples de culture et par l'observation visuelle subséquente. Les propriétés morphologiques comprennent : la taille, couleur et/ou pigmentation, forme, contours, odeur, hémolyse, consistance et/ou adhérence, etc (**Figure 18**).

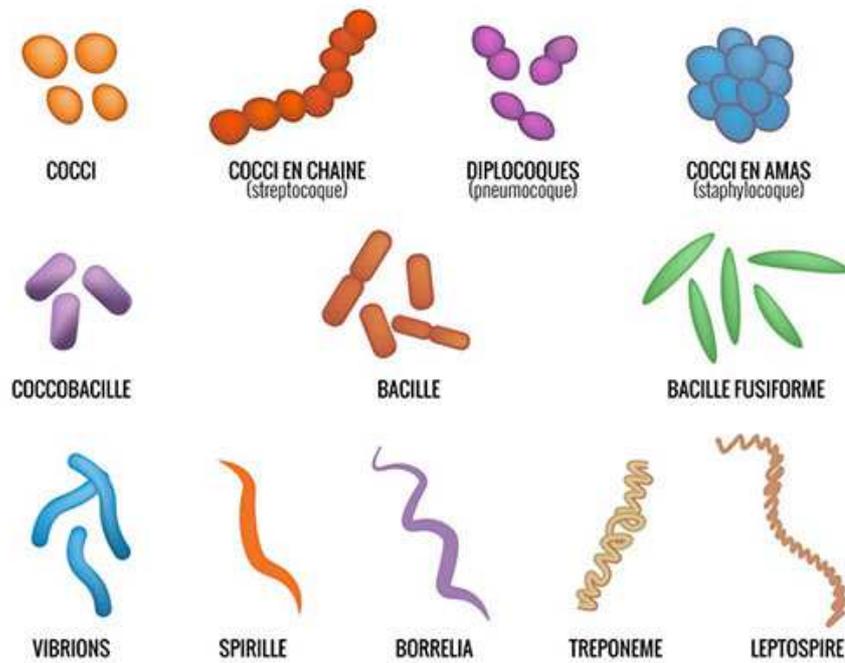


**Figure 18.** Différents caractères morphologiques bactériens

## 1.2. Caractères microscopiques

L'examen microscopique peut se faire soit à l'état frais, soit après une coloration. L'observation d'une culture en milieu liquide entre lame et lamelle permet de réaliser un état frais. Le but est d'apprécier la forme (coques ou bacilles), le mode de groupement (isolées, en chainettes), la mobilité bactérienne et le type de Gram (bactéries à Gram-positif ou négatif). Certaines espèces bactériennes sont dites mobiles c'est à dire qu'elles peuvent se déplacer de manière autonome en plus des mouvements Browniens. Les différents types de mobilité permettent de distinguer les bactéries entre elles.

L'examen microscopique après coloration de Gram repose sur une méthode de coloration au violet de gentiane ou cristal violet puis une décoloration à l'alcool et enfin une contre-coloration à la safranine ou fuchsine. Cette méthode permet de distinguer, en utilisant les propriétés de la paroi bactérienne, les bactéries à Gram positif (couche épaisse de peptidoglycane) des bactéries à Gram négatif (fine couche de peptidoglycane surmontée d'une membrane externe). Elle permet aussi d'apprécier la forme de la bactérie (coques ou bacilles) (**Figure 19**).



**Figure 19.** Principales formes et modes de regroupement des bactéries

## 2. Identification biochimiques

Les microorganismes sont caractérisés par un ensemble de traits biochimiques qui leurs sont propres et qui permettent de les distinguer. Des tests biochimiques conventionnels du métabolisme respiratoire, glucidique ou protéique sont utilisés pour la différenciation des bactéries (**Tableau 5**). Différentes caractéristiques biochimiques sont explorées telles que la production de catalase, cytochrome oxydase, nitrate réductase, l'étude du métabolisme glucidique, etc. Ces tests d'orientation sont nécessaires avant de réaliser une identification manuelle (galeries API, bioMérieux®) ou automatisée (Vitek2, bioMérieux®, BD Phoenix®, etc.). Ces tests permettent de distinguer les groupes bactériens entre eux.

**Tableau 5.** Principaux tests biochimiques utilisés en pratique

Métabolisme	Test biochimique
Respiratoire	Catalase
	Oxydase
	Nitrates réductases
Glucidique	Test ONPG-hydrolase
	Test esculine
	Test IMVIC
Protéique	Test indole
	Test H <sub>2</sub> S
	Lysine décarboxylase (LDC)
	Test coagulase

## 2.1. Principaux tests d'orientation

### 1. Recherche de la catalase

La catalase est une enzyme présente chez la plupart des bactéries aérobies strictes et anaérobies facultatives. Elle a la propriété de décomposer l'eau oxygénée avec dégagement d'oxygène. Son action directe est mise en évidence dans la masse bactérienne. Pour réaliser ce test, une culture bactérienne à tester, est émulsionnée dans de l'eau oxygénée sur lame (**Figure 20**). La présence d'une catalase se manifeste par l'apparition d'une mousse renseignant sur la présence de bulles d'oxygène selon la réaction :



La recherche de cette enzyme est utile pour différencier les bactéries appartenant aux familles des *Micrococcaceae*, *Staphylococcaceae*, *Streptococcaceae* et *Enterococcaceae*. Parmi les bactéries Gram positives, seule les *Streptococcaceae*, les *Lactobacillus*, les *Erysipelothrix* et les *Clostridium* sont dépourvues de catalase.



**Figure 20.** Test de catalase (technique sur lame)

## 2. Cytochrome oxydase

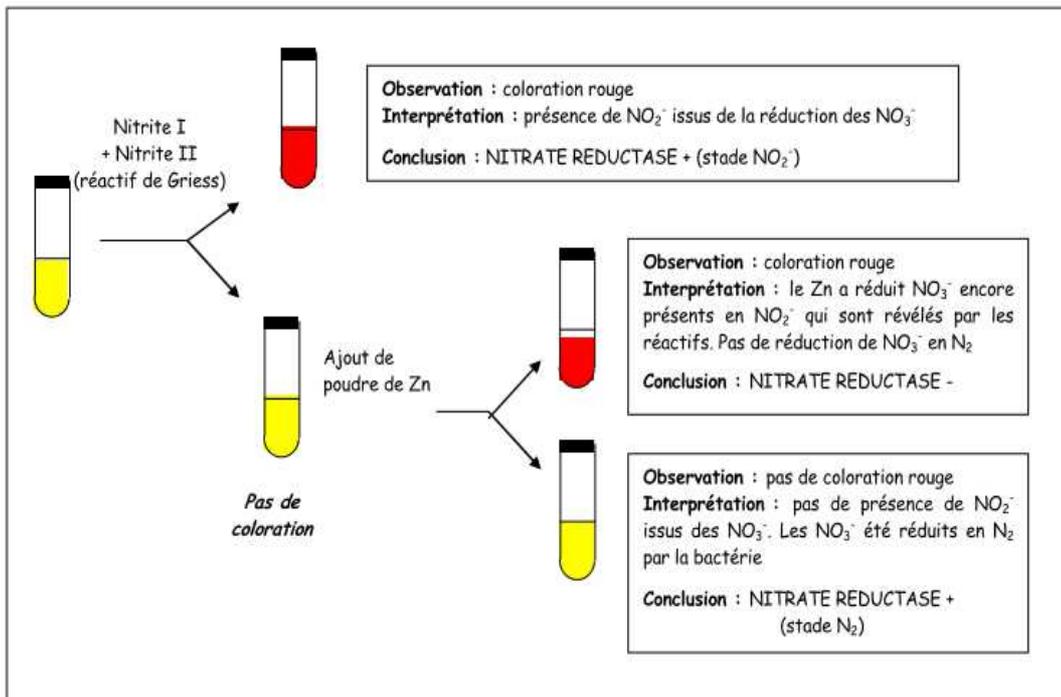
Les bactéries qui possèdent une chaîne respiratoire complète sont dotées d'une cytochrome oxydase. En présence d'oxygène atmosphérique et de cytochrome C, cette enzyme oxyde le réactif pour former un composé coloré, l'idophénol. La mise en évidence de cette oxydase est effectuée en présence d'une solution aqueuse à 1% de chlorure de diméthylparaphénylène diamine qui forme un complexe violet au contact de cette enzyme.

## 3. Nitrate réductase

En l'absence d'oxygène, certaines bactéries peuvent obtenir leur énergie par respiration anaérobie. Cette respiration est liée à l'activité d'enzymes localisées dans la membrane plasmique bactérienne. Certaines bactéries (*Pseudomonas*, enterobactéries...) ont la capacité de réduire les nitrates.

Les nitrate-réductases sont des enzymes qui catalysent la réduction des nitrates. Dans la respiration nitrate, le  $\text{NO}_3$  est utilisé comme accepteur final d'électrons provenant de l'oxydation d'un composé organique (ex : glucose). Le  $\text{NO}_3$  est réduit par la nitrate réductase suivant deux types de réaction ; une réaction assimilatrice sous la dépendance d'une nitrate réductase assimilatrice type (B) et une respiration nitrate en anaérobiose sous la dépendance de la nitrate-réductase A ou nitrate-réductase dissimilatrice.

Dans la pratique on met en évidence la réduction des nitrates en recherchant les nitrites formés en utilisant le réactif de Griess. Cette étape est complétée par l'épreuve de Zo-Bell (en ajoutant la poudre de zinc) pour certaines bactéries qui réduisent les nitrates au-delà du stade nitrites (**Figure 21**).



**Figure 21.** Test de la réduction des nitrates

#### 4. Production de SH<sub>2</sub> (hydrogène sulfuré)

La production de SH<sub>2</sub> par les microorganismes est mise en évidence par incorporation du fer ou de plomb dans le milieu de culture. Ce substrat soufré est réduit en présence d'une enzyme qui aboutit à la production d'hydrogène sulfuré, celui-ci se combine avec un sel de fer (citrate de fer) pour donner un précipité noir de sulfure de fer ou de plomb (**Figure 22**).



**Figure 22.** Lecture de la production de SH<sub>2</sub>

#### 5. Production d'indole

Se fait sur milieu urée tryptophane, appelé improprement milieu Urée Indole. Le milieu Urée Tryptophane est un milieu synthétique (milieu dont la composition est connue exactement tant qualitativement que quantitativement). C'est un milieu complexe qui fournit

un ensemble de résultats utiles à l'identification de nombreux germes bactériens, notamment parmi les *Enterobacteriaceae*.

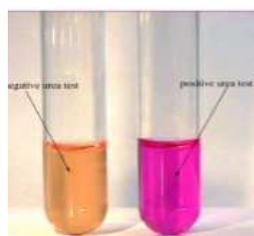
Le tryptophane est décomposé en présence d'une tryptophanase en indole et autres produits. L'ajout du **paradiméthylaminobenzaldéhyde** (retrouvé dans les réactifs d'Ehrlich's et Kovac's) en milieu acide et donne un anneau rouge qui remonte en surface (test indole +), dans le cas contraire elle est de couleur jaune et le test est indole (-) (**Figure 23**).



**Figure 23.** Mise en évidence de la production d'indole

## 6. Test Uréase

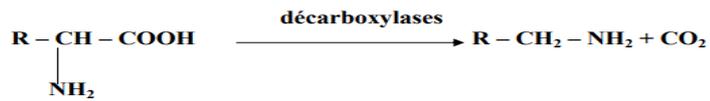
La recherche d'une uréase s'effectue sur milieu urée tryptophane. Ce milieu contient du tryptophane, de l'urée et le rouge de phénol (indicateur de PH). L'urée, sous l'action d'une uréase bactérienne se transforme en carbonate d'ammonium alcalin entraînant une coloration rouge donc **uréase+**. Si le milieu reste orange alors pas d'alcalinisation et le test est **uréase -** (**Figure 24**).



**Figure 24.** Recherche de la production de l'uréase

## 7. Recherche des décarboxylases

Les décarboxylases scindent les acides aminés, entraînant la formation de l'amine correspondante et la libération de CO<sub>2</sub> suivant la réaction :



Il s'agit d'enzymes induites dont la synthèse est favorisée par un pH acide (pH optimum : 3,5 à 5,5) et des conditions anaérobioses. Trois décarboxylases sont fréquemment recherchées ; la lysine décarboxylase (LDC), l'ornithine décarboxylase (ODC) et l'arginine dihydrolase (ADH).

Le test peut être effectué sur milieu Taylor contenant l'acide aminé recherché (la lysine, l'ornithine ou l'arginine), du glucose et un indicateur coloré (le rouge phénol). Chez les bactéries la réaction s'effectue en deux étapes. La fermentation du glucose entraîne une baisse de pH suffisante pour favoriser la synthèse de l'enzyme, ce qui se traduit par un virage du milieu au jaune. Ensuite, lorsque l'acide aminé est décarboxylé, l'alcalinité due à l'amine entraîne le virage de l'indicateur au violet après une courte phase de jaunissement. Après 18 heures à 37°C, un milieu violet trouble correspond à une réaction positive. Si la bactérie étudiée ne possède pas de décarboxylases, le milieu restera acide, donc jaune.

Le diagnostic différentiel des espèces appartenant aux familles des *Enterobacteriaceae*, *Vibrionaceae* et *Pseudomonadaceae*, est souvent facilité par la recherche de la lysine décarboxylase (LDC), de l'ornithine décarboxylase (ODC) et de l'arginine dihydrolase (ADH).

## 8. Type fermentaire

Elle permet d'apprécier le métabolisme énergétique utilisé, par une espèce bactérienne, pour la dégradation d'un substrat carboné. Deux voies cataboliques sont possibles : la voie hétérofermentaire qui s'accompagne avec un dégagement gazeux (CO<sub>2</sub>) et la voie homofermentaire qui se produit sans gaz.

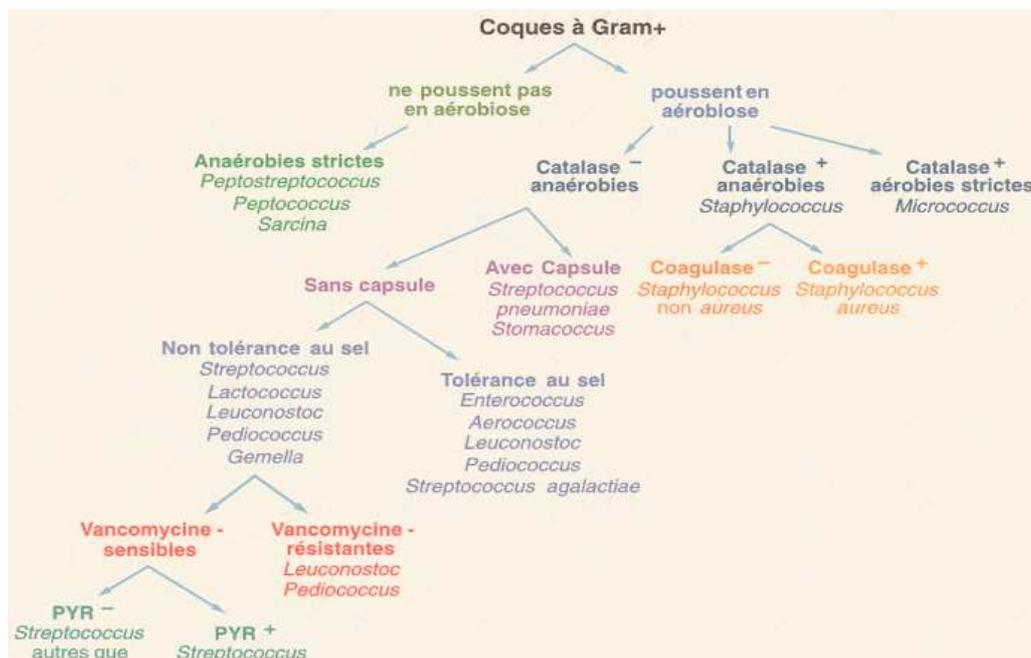
### 2.2. Galeries miniaturisées et automates d'identification bactérienne

Les tests effectués en tubes ont été progressivement remplacés depuis de nombreuses années par des tests miniaturisés en galerie dans lesquels les différents substrats étaient déshydratés. Les industriels ont commercialisé des galeries d'identification telles que les galeries API (bioMérieux®) (**Tableau 6**). Ces dernières sont constituées d'alvéoles contenant des substrats déshydratés dans lesquels on distribue une suspension bactérienne de densité

standardisée. Ces tests sont fondés sur l'étude d'une dizaine, d'une vingtaine ou de 32 caractères en fonction des genres et espèces bactériens à identifier.

L'inoculation de la galerie peut-être manuelle ou automatique à l'aide d'un inoculateur (**Figure 26**). Les réactions produites se traduisent par la détection d'une croissance bactérienne ou bien des virages colorés, spontanés ou révélés par l'ajout de réactifs. Des appareils de lecture peuvent être utilisés afin de faciliter l'interprétation de ces tests colorimétriques et bénéficier l'utilisateur d'un logiciel d'interprétation et d'identification.

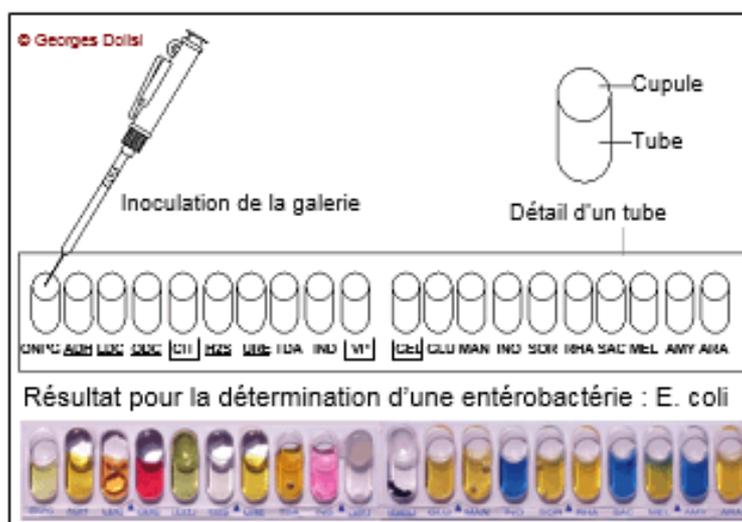
Actuellement, les tests biochimiques d'identification sont effectués plus souvent sur des automates. Les systèmes Vitek utilisent des cartes plastiques renfermant des microcapsules, chaque capsule contenant un substrat spécifique déshydraté. Une quarantaine de substrats sont testés. L'inoculum de départ doit être voisin de 0,5 McFarland et le délai de l'obtention du résultat variable de 2 à 10 heures.



**Figure 25.** Procédures de l'identification bactérienne

**Tableau 6.** Exemple de galeries API (bioMérieux®) et bactéries identifiables

Galleries API	Nombre de tests biochimiques	Temps d'incubation (heures)	Bactéries identifiées
API® 20A	20	24	Bactéries anaérobies ( <i>Clostridium</i> )
Rapid ID 32 A2	29	4	
API® 20 NE	20	24	Bacilles Gram-
API® 50 CH	50	24 à 48	<i>Bacillus</i>
ID 32 GN <sup>2</sup>	32	24	Entérobactéries et bactéries à Gram – ( <i>Pseudomonas</i> )
API® campy	20	24	<i>Campylobacter</i>
API 10 S	11	18 à 24	<i>Enterobacteriaceae</i> et bacilles à Gram-
API 20 E <sup>TM</sup>	21	18 à 24	
Rapid 20 E®	20	4	<i>Enterobacteriaceae</i>



**Figure 26.** Inoculation de la galerie API 20 E

## Chapitre V. Méthodes rapides et nouvelles d'analyses

Les méthodes traditionnelles, très manuelles sont particulièrement sujettes aux erreurs humaines. Elles nécessitent la réalisation de tâches très répétitives. Ces erreurs humaines peuvent survenir au cours de la production, lors du prélèvement de l'échantillon ou au laboratoire lors de la réalisation de l'analyse. Les échantillons peuvent également être détériorés lors du transfert entre le lieu de prélèvement et le lieu d'analyse. Les coûts associés aux erreurs humaines sont difficiles à quantifier mais sont bien connus des industries de production d'où l'avantage d'utiliser des **méthodes alternatives**.

### 1. Analyse de la charge microbienne

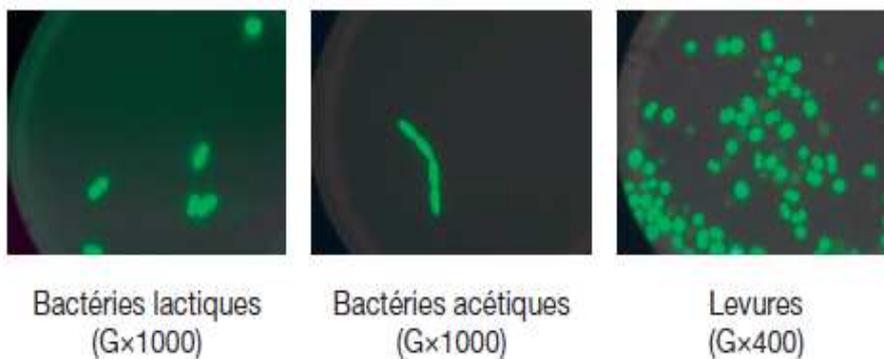
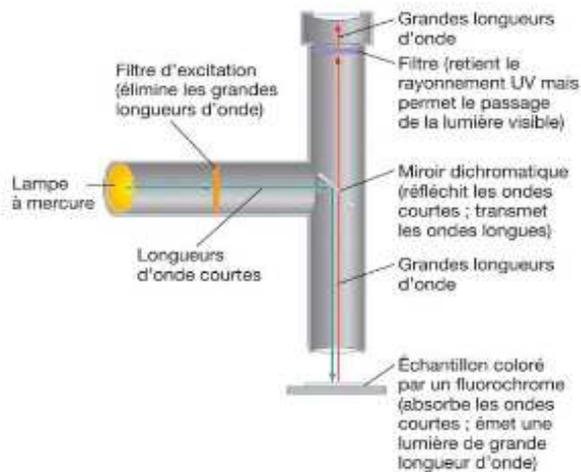
#### 1.1. Comptage par épifluorescence

La méthode par épifluorescence est une technique récente qui présente l'avantage d'un diagnostic rapide : dans la journée-même, contre 7 jours au minimum pour la méthode sur boîte de Pétri.

Cette technique est utilisée aussi bien pour les levures que pour les bactéries, mais elle nécessite un équipement particulier du microscope ; l'objectif à épifluorescence, une lampe bleu et un filtre. Le principe est de rendre visibles les cellules viables en utilisant l'activité estérase intracellulaire. Les cellules sont incubées dans un tampon qui contient le substrat de l'estérase, l'acétate de fluorescéine, fluorescente sous l'effet de la lumière. Les cellules vivantes apparaissent très nettement vert vif sur un fond noir (**Figure 27**).

L'échantillon est prélevé en conditions stériles et filtré sur membrane. La membrane filtrante est mise en contact avec un fluorochrome, (molécule ayant des propriétés fluorescentes). Au contact du fluorochrome, seuls les microorganismes vivants sont capables de devenir fluorescents, les microorganismes morts n'émettent aucune fluorescence.

Avec un microscope adapté, on peut ainsi dénombrer les levures ou les bactéries vivantes rendues fluorescentes. Le seuil de détection est relativement bas : 10 à 100 germes par millilitre. Cette technique est notamment conseillée pour le diagnostic des fermentations languissantes lors de la fermentation alcoolique ou de la fermentation malolactique, les contrôles avant chaque filtration et avant le conditionnement du vin.



**Figure 27.** La microscopie à épifluorescence

## 1.2. Comptage par auto-fluorescence

Le principe d'auto-fluorescence est basé sur la capacité des cellules vivantes à absorber la lumière et à émettre naturellement de la lumière grâce à ces constituants cellulaires (flavines et ses dérivés, pigments photosynthétiques...). Les méthodes alternatives utilisant le principe d'autofluorescence permettent de détecter les micro-organismes, après culture sur un milieu gélosé, avant qu'il ne soit visible à l'œil nu.

Après filtration des échantillons, la membrane est placée sur une gélose, puis incubée. Pendant l'incubation, un laser excite les micro-colonies à auto-fluorescence, qui sont automatiquement dénombrées par un système d'imagerie. Les particules qui ne montrent pas de croissance (pas de modification de la taille) au fil du temps sont écartées par le logiciel.

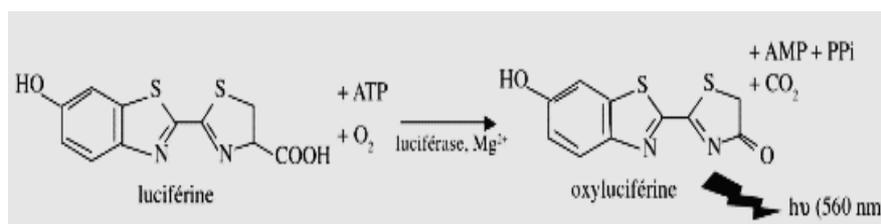
### 1.3. ATP métrie ou bioluminescence

C'est une technique permettant de détecter la présence de cellules viables en un temps très court. Elle repose sur le dosage instantané de l'adénosine triphosphate (ATP), molécule de stockage et de transfert d'énergie présente dans toutes les cellules vivantes. À la mort de la cellule, l'ATP est rapidement dégradée, c'est donc un excellent marqueur de la présence d'un microorganisme vivant.

Pour doser la molécule d'ATP, on la fait intervenir dans une **réaction bioluminescente**. Cette réaction biochimique met en œuvre un *pigment*, la luciférine et une *enzyme* spécifique à la réaction, la luciférase. Lorsqu'on injecte de l'ATP dans un mélange luciférine-luciférase-Mg<sup>2+</sup>, il se produit une émission lumineuse ; elle est maximale au bout de quelques secondes et s'annule au bout d'une minute environ (**Figure 28**). L'intensité lumineuse est proportionnelle à la quantité d'ATP mise en jeu dans la réaction. La quantité de lumière émise est mesurée à l'aide d'un luminomètre et exprimée en RLU (Relative Light Unity).

Cette technique permet le contrôle microbiologique. Lors du contrôle du taux de contamination microbienne d'une surface, c'est l'ATP des cellules vivantes qui déclenche la réaction de bioluminescence, proportionnellement au nombre de germes présents sur la surface.

Cette méthode présente des caractéristiques similaires à la cytométrie de flux mais elle représente une sensibilité plus faible. Elle présente deux avantages : le premier est de conduire à un résultat instantané. Le second réside dans la simplicité de mise en œuvre de la mesure.



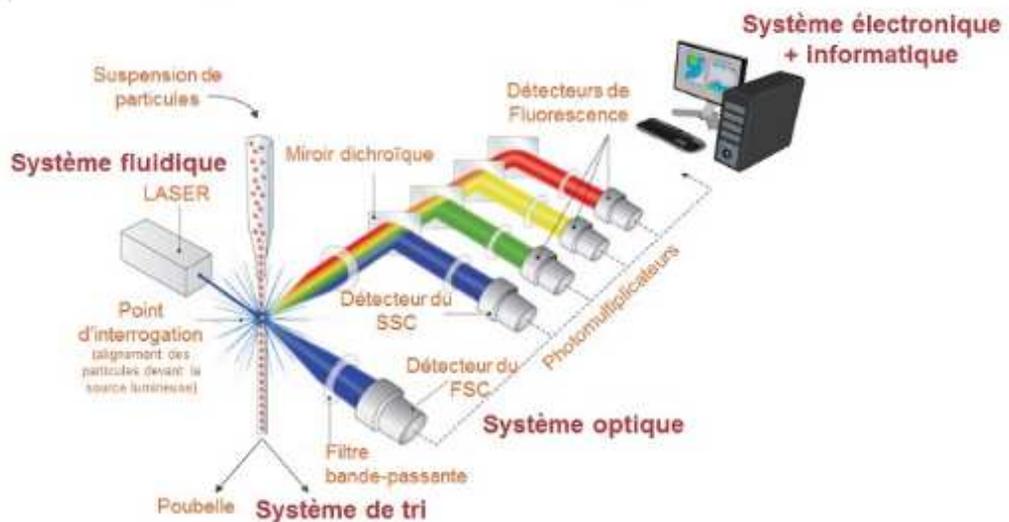
**Figure 28.** Schéma réactionnel de la conversion de l'ATP en lumière par le système luciférine-luciférase

### 1.4. Cytométrie en flux (CMF)

C'est une méthode récente et rapide de dénombrement et d'analyse d'échantillons qui fait appel à un appareil complexe : le cytomètre en flux. Elle est de plus en plus utilisée pour compter directement les micro-organismes et obtenir des informations les concernant.

Cette méthode consiste à la numération de particules passant à travers un faisceau lumineux. Le cytomètre de flux crée un flux de cellules tellement étroit qu'une seule cellule passe à la fois dans un rayon laser (**Figure 29**). Le passage des cellules diffracte la lumière. Les impulsions lumineuses sont comptabilisées et traduites en concentration cellulaire.

L'utilisation des marqueurs de viabilités permet de ne compter que les micro-organismes vivants. Ces marqueurs sont des molécules fluorescentes se fixant aux acides nucléiques. Le marqueur peut aussi être substrats de viabilité devenant fluorescents lorsqu'ils sont métabolisés dans la cellule. Une fois internalisées, ces molécules sont clivées par des enzymes cellulaires et des dérivés fluorescents sont libérés. Dans ce cas, seules les cellules ayant des enzymes intracellulaires actives sont comptabilisées. L'intensité de fluorescence reflète l'état physiologique des cellules.



**Figure 29.** Principe de fonctionnement de la cytométrie en flux

### 1.5. L'impédancemétrie

Cette méthode permet de détecter et de dénombrer divers micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) de façon automatisée, dans un délai court et à moindre coût. Elle est fondée sur la mesure des variations d'impédance (ou de conductance) dans un milieu de culture où se développent des micro-organismes. La conductivité est l'aptitude d'un matériau à conduire le courant électrique. L'impédance, quant à elle mesure l'opposition d'une portion de circuit électrique au passage d'un courant.

L'activité métabolique et la croissance des micro-organismes dans un milieu de culture entraînent la transformation des nutriments présents dans le milieu (glucides, lipides...) peu ou pas chargés électriquement en produit finaux du métabolisme fortement chargés (acide organiques,  $\text{NH}_4^+$ , ions  $\text{HCO}_3^-$  ...). Cette transformation liée à l'activité microbienne entraîne une augmentation de la conductivité du milieu de culture et une diminution de l'impédance qui peut être mesurée au moyen d'un dispositif approprié.

Plusieurs types d'appareils sont actuellement commercialisés : le Bactometer® (bioMérieux), et le Malthus® (Malthus Diagnostics). Les modifications électriques vont être mesurées, à partir de récipients reliés à des électrodes contenant l'échantillon à analyser. Le temps de détection est inversement proportionnel à la quantité de micro-organismes initialement présents dans l'échantillon.

## **2. Identification des microorganismes**

### **2.1. Identification moléculaire**

Les méthodes traditionnelles d'identification bactérienne par la détermination des caractéristiques phénotypiques et l'appréciation de quelques propriétés physiologiques ont montré leurs limites, en particulier pour la détection des micro-organismes non ou difficilement cultivables.

De nombreuses méthodes d'identification moléculaire, fondées sur l'analyse de l'ADN ou des protéines, ont été développées pour contourner certaines limites de l'identification phénotypique, dont la non-cultivabilité en laboratoire.

La méthode moléculaire fondée sur l'analyse de l'ADN, consiste à séquencer un gène ou une portion de génome, et à comparer cette séquence avec celles d'une banque de référence. Chaque base de l'ADN peut être considérée comme un caractère en soi, ce qui rend très informative une séquence même de 1000 paires de bases (taille moyenne d'un gène procaryote). Le gène de l'ARNr de la petite sous-unité ribosomale (codant l'ARNr 16S ou 18S chez les procaryotes et Eucaryotes, respectivement), présent chez tous les organismes, a des caractéristiques qui en font un excellent marqueur d'identification des micro-organismes.

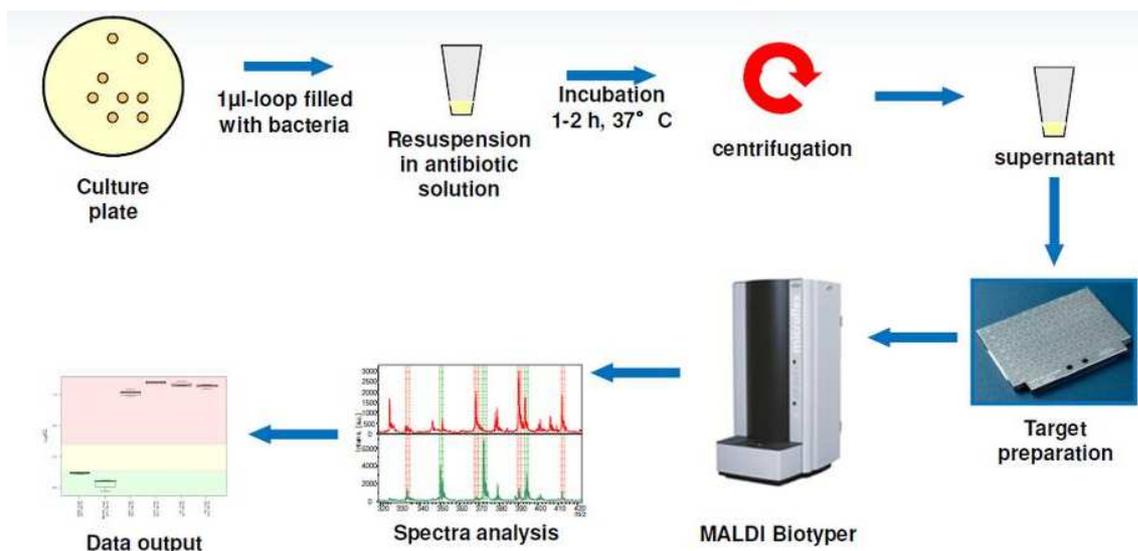
### **2.2. Identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF**

Les méthodes de spectrométrie de masse reposent sur la détermination du rapport masse sur charge de molécules qui permet de les identifier et de les quantifier. Depuis la seconde

moitié du XX<sup>ème</sup> siècle, elles ont un large champ d'applications en pharmacologie, biochimie, toxicologie, etc.

La spectrométrie de masse par technique MALDI-TOF (Matrix-Associated Laser Desorption/Ionization - time of flight) associant une source MALDI avec un analyseur TOF est devenue un outil majeur d'identification bactérienne dans les laboratoires de microbiologie. En raison de sa simplicité, de sa rapidité et de sa grande capacité de traitement, cette nouvelle technologie est de plus en plus utilisée pour l'identification régulière des microbes. Cette technique permet l'analyse des protéines bactériennes, en majorité des protéines ribosomiques.

La SM MALDI-TOF d'un microorganisme donné produit un spectre caractéristique, appelé « empreinte de masse peptidique », qui reflète le profil protéinique unique propre au microorganisme en question (qui peut contenir jusqu'à 2000 protéines). Le logiciel de SM MALDI-TOF compare ensuite cette empreinte de masse peptidique au contenu d'une base de données de référence interne, qui contient les spectres des microorganismes connus. Puisque la composition protéique varie d'une espèce bactérienne à l'autre, la production du spectre permet une identification précise (**Figure 30**).



**Figure 30.** Principales étapes d'identification par spectrométrie de masse MALDI-TOF

## **Chapitre VI. Contrôle microbiologique d'un produit industriel**

Les producteurs de denrées alimentaires doivent suivre les règles d'hygiène pour s'assurer de la qualité de leurs produits finis. Les analyses microbiologiques apportent au producteur des informations précieuses sur la stabilité et la qualité technologique de son produit, et également sur le respect des bonnes pratiques d'hygiène tout au long de la chaîne de production.

Le contrôle de l'innocuité des aliments est basé sur les microorganismes pathogènes mais également sur les microorganismes indicateurs de bonnes pratiques d'hygiène puisque la recherche de tous les microorganismes pathogènes ne peut être réalisée systématiquement. En effet, ces derniers, lorsque présents, sont généralement en très faible concentration dans les aliments. Ainsi, la recherche de l'ensemble des microorganismes pathogènes sans analyse de risque préalable est inefficace vu leur très faible incidence dans les aliments.

Les micro-organismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer des modifications organoleptiques et altérer les qualités marchandes des produits, ou constituer un danger pour la santé publique en raison de leur pouvoir pathogène pour l'homme. Les microflore étudiées doivent refléter la qualité sanitaire et la qualité marchande du produit. La flore totale mésophile aérobie est un indice du niveau de contamination globale de l'aliment.

### **1. Contrôle du lait**

Le lait est une denrée alimentaire riche en nutriments mais très périssable. Les industries laitières l'utilisent pour la fabrication d'aliments connus sous le nom de produits laitiers via des procédés technologiques telle que la fermentation lactique. Cette dernière assure d'une part, une sécurité alimentaire par acidification et par production de bactériocines antagonisant la croissance des bactéries pathogènes et d'autre part, une amélioration de la qualité finale des produits laitiers par production de composés aromatiques.

Le lait et les produits laitiers sont des matières premières riches, de sorte que de nombreux micro-organismes y trouvent un milieu de culture idéal pour leur multiplication. Les bactéries peuvent se multiplier rapidement et rendre un produit impropre à la consommation. Cependant, certains traitements comme le refroidissement et l'acidification

peuvent ralentir la croissance bactérienne. L'acidification (ex. yaourt) permet de ralentir ou de stopper la croissance de nombreuses bactéries. La déshydratation ou la congélation permet de stopper la croissance (ex. poudre de lait ou glace). Le chauffage permet de tuer de nombreuses bactéries (ex. pasteurisation, stérilisation). Les contrôles qualité sont effectués sur les matières premières mais aussi sur les produits finis.

### **1.1. Échantillonnage**

Les échantillons doivent être prélevés de façon aseptique dans des flacons stériles et étiquetés, selon des méthodes standards. Les prélèvements doivent être enregistrés et codifiés en mentionnant le nom du produit, la date de fabrication, la date limite de consommation et la date et l'heure de prélèvement.

Les échantillons sont transportés dans une glacière contenant des accumulateurs de froid et conservés à une température maintenue autour de +4°C. Le temps entre le prélèvement et les premières analyses ne doit pas dépasser les 48 heures.

### **1.2. Dangers physiques**

Il s'agit de la présence de corps étrangers dans un produit : cheveux, sable, insectes morts, particules métalliques, caoutchouc provenant de joints, etc. Les pollutions physiques sont souvent la cause d'une contamination microbiologique. C'est ainsi que les cheveux représentent une source importante de contamination microbiologique.

### **1.3. Recherche des inhibiteurs bactériens dans le lait (dangers chimiques)**

Les dangers chimiques typiques des produits laitiers sont la présence d'antibiotiques et de résidus de produits de nettoyage et de désinfection. La présence d'antibiotiques dans le lait n'est pas autorisée. D'une part, cela cause un problème de santé publique et, d'autre part des problèmes peuvent surgir au moment de la préparation de produits fermentés (par ex. yaourt, fromage, beurre, ...). Lorsque l'exploitation transforme le lait de ses propres animaux, il suffit de respecter les délais d'attente après avoir administré les antibiotiques. Le producteur peut démontrer au moyen d'un registre de médicaments qu'il n'a pas transformé du lait d'animaux traités. Il est éventuellement possible de réaliser des tests de détection des résidus d'antibiotiques sur le lait d'animaux traités. Ces tests sont surtout recommandés en cas d'usage cumulé et combiné d'antibiotiques car cela peut modifier les délais d'attente.

L'une des techniques utilisées pour cette analyse est basée sur l'inhibition de la croissance de *Bacillus stearothermophilus* var. calidolactis, bactérie très sensible à de nombreux antibiotiques et aux sulfamides. Ce test se présente sous forme d'ampoules contenant un milieu géloséensemencé de spores de *B. stearothermophilus* et enrichi en éléments nutritifs de croissance. Dans chaque ampoule identifiée préalablement, 100 µL d'un échantillon de lait sont déposés à l'aide d'une micropipette. Les ampoules sont mises au bain-marie à  $64 \pm 1$  °C pendant trois heures. Dès leur retrait, la couleur de la gélose est examinée à l'œil nu. Si l'échantillon vire nettement du violet au jaune, cela signifie que l'échantillon ne contient pas d'inhibiteurs bactériens. En présence d'inhibiteurs bactériens, la couleur violette persiste.

#### **1.4. Recherche et dénombrement des germes de contamination (Dangers microbiologiques)**

La présence de micro-organismes (bactéries, levures et moisissures) constitue le principal danger lors de la transformation du lait. Pour s'assurer de la maîtrise de sa production, il faudra tenir compte des critères de sécurité alimentaire et des critères d'hygiène.

##### **1. Préparation des dilutions**

Les dilutions décimales sont réalisées à partir de la solution mère. A l'aide d'une pipette stérile transférer 10 mL de lait dans 90 mL de diluant stérile (ex : Tryptone sel) en veillant à ne pas enfoncer l'extrémité de la pipette de plus d'un centimètre au-dessous de la surface. Puis 1 mL de la solution mère est incorporé à 9 mL de diluant pour la dilution successive. Les dilutions obtenues sontensemencées sur les milieux gélosés spécifiques aux germes recherchés (**Tableau 7**). L'isolement et le dénombrement des germes sont réalisés suivant des normes internationales.

**Tableau 7.** Milieux de cultures et conditions de cultures des microorganismes recherchés dans le lait

Germe	Milieu de culture	Incubation	
		Température (°C)	Temps (heure)
Flore aérobie Mésophile	Plate Count Agar (PCA)	30	72
Coliformes totaux	Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)	30	72
Coliformes fécaux	Bouillon Lactosé Bilié au Vert Brillant (BLBVB)	44	48
Anaérobies sulfito- réducteurs <i>(Clostridium perfringens)</i>	Tryptone sulfite	37	48
<i>Staphylococcus aureus</i>	Baird Parker	37	48
Streptocoques fécaux	Rothe	30	48
<i>Salmonella</i> sp.	Hektoen	37	24
Levures, moisissures	Sabouraud au chloramphénicol	30	72

## **2. Dénombrement des germes totaux**

Un nombre trop élevé de germes indicateurs témoigne d'une mauvaise application des bonnes pratiques d'hygiène. Le nombre total de germes (exprimé en UFC ou UFC/ml) permet d'évaluer la qualité microbiologique du lait ou de certains produits laitiers.

Pour le lait obtenu à partir d'animaux sains et dans de bonnes conditions d'hygiène, le nombre total de germes ne doit pas dépasser 5000 UFC/ml. Pour le lait cru de vaches le nombre total de germes acceptable est de 100.000 UFC/ml. Dans le cas du lait cru d'autres animaux, un nombre total de germes de 1.500.000 UFC/ml est accepté quand il y a un traitement thermique ultérieur et 500.000 UFC/ml si ce n'est pas le cas.

### **2.1. Principe**

Une série de dilution de l'échantillon est préparée puisensemencé sur le milieu de culture prescrit dans des boîtes de Pétri. Pour cela, verser dans chaque boîte 10 à 12 ml du milieu en surfusion (température de 45 à 47 °C). Immédiatement après avoir versé le milieu, le mélanger par cinq mouvements de va-et-vient, suivis de cinq mouvements circulaires dans le sens des aiguilles d'une montre suivis de cinq mouvements de va-et-vient exécutés perpendiculairement aux premiers et suivis enfin de cinq mouvements circulaires dans le sens contraire des aiguilles d'une montre. Au moins deux boîtes à partir de chaque dilution sont préparées.

Laisser reposer les boîtes jusqu'à la solidification du milieu, les retourner et les placer dans l'étuve. Les boîtes sont mises à incuber, leur fond étant tourné vers le haut à 30°C pendant 72 heures.

Les colonies doivent être comptées dans les 4 heures qui suivent la fin de la période d'incubation pour faciliter la numération. Il est recommandé d'utiliser un appareil de comptage lumineux muni d'une loupe et d'un compteur-enregistreur.

Pour exprimer les résultats des dénombrements, ne tenir compte, que des boîtes dans lesquelles se sont développées de 20 à 300 colonies.

## 2.2. Normes

Le résultat de l'analyse microbiologique est satisfaisant lorsque les exigences suivantes sont remplies :

1. la valeur moyenne observée est inférieure ou égale à « m » ;
2. aucune valeur observée ne dépasse la limite « M » (**Tableau 8**).

**Tableau 8.** Critères microbiologiques applicables aux laits

Micro-organismes/ métabolites	Limites microbiologiques (ufc/g)	
	m	M
<b>Lait cru</b>		
Germes aérobies à 30 °C	$3 \cdot 10^5$	$3 \cdot 10^6$
Staphylocoques à coagulase +	$10^2$	$10^3$
Coliformes thermotolérants	$5 \cdot 10^2$	$5 \cdot 10^3$
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 ml	
Antibiotiques	Absence dans 1 ml	
<i>Listeria monocytogenes</i>	100	
<b>Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés</b>		
Germes aérobies à 30 °C	$10^4$	$10^5$
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 ml	

## 2. Contrôle des conserves

Le traitement nécessaire pour conférer au produit la stabilité biologique devrait être déterminé sur la base de facteurs tels que : la flore microbienne, dont *Clostridium botulinum* et les microorganismes d'altération de l'aliment ; le niveau et nature des agents conservateurs ; pH d'équilibre ; le temps nécessaire pour atteindre le pH d'équilibre ; l'activité de l'eau, etc.

La croissance microbienne est l'une des principales causes de la détérioration des aliments. Les bactéries sporulantes présentent un réel problème de l'industrie. Ces bactéries occupent une place de premier plan parmi les microorganismes préjudiciables particulièrement à la conserve alimentaire en raison de leur ubiquité et de leur capacité à produire des spores thermorésistantes qui les rendent particulièrement adaptées aux aliments traités thermiquement.

Les bactéries sporulées les plus rencontrées dans les conserves appartiennent aux genres *Clostridium* et *Bacillus*. Les espèces pathogènes et toxigènes pour l'Homme sont *Cl. perfringens* et *B. cereus*. La présence de spores dans les ingrédients ou dans l'environnement de traitement défie sévèrement le processus de préservation puisque leur résistance thermique peut être très haute.

### 2.1. Analyses physicochimiques des conserves

La stabilité d'une conserve se vérifie à plusieurs niveaux, et cela quelle que soit la norme suivie. Premièrement, l'emballage ne doit présenter aucun défaut ou modification comme par exemple, une déformation due à la production de gaz provenant d'un développement microbien. Les bactéries d'altération provoquent la production d'odeur forte et une perte de couleur ou de texture. Cette altération peut provenir d'une contamination initiale très faible.

Dans le cas où l'emballage est conforme, la conserve est ouverte et le produit ne doit pas présenter de modification par rapport à l'échantillon témoin. A ce niveau, il faut observer les modifications de textures, de couleur ou d'odeur. Puis vient la validation de l'absence de développement microbien par la mesure du pH.

- **Mesure du PH**

Le potentiel hydrogène est une expression globale de l'acidité d'un produit. Cette expression a une valeur aussi bien physico-chimique que microbiologique puisqu'une

classification officielle des conserves alimentaires d'origine végétale est faite justement sur la base de ce paramètre. Les mesures de pH sont réalisées grâce à un pH-mètre.

- **Les chlorures**

Les chlorures expriment le taux de salinité du produit alimentaire. L'addition de sel en tant que conservateur augmente le Brix du produit. Le dosage peut se faire selon une méthode normalisée (CEE, 1764/86) par addition d'un excès de nitrate d'argent et d'acide nitrique pour précipiter le chlorure d'argent. L'excès de  $\text{AgNO}_3$  est titré avec du thiocyanate d'ammonium avec de l'alun ferrique ammoniacal comme indicateur.

- **La couleur**

L'analyse de la couleur est effectuée à travers l'emploi d'un colorimètre. Le colorimètre détermine les valeurs des paramètres : (L) luminosité, (a) la couleur rouge et (b) la couleur jaune puis le rapport recommandé par les normes a/b.

- **La viscosité**

La viscosité est un facteur technologique important qui est en relation avec la teneur en substances insolubles dans l'alcool : protéines, pectines, polysaccharides. Elle est l'effet combiné des liquides, matière soluble, insoluble en suspension qui contribuent à la consistance générale.

## **2.2. Analyses microbiologiques**

L'analyse du contenu des boîtes passe par l'ouverture aseptique de la conserve. Les conserves doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité / stérilité. Ces épreuves consistent en deux étuvages de 5 échantillons à 37°C pendant 7 jours (ou à 30°C pendant 10 jours) et à 55°C pendant 7 jours. A l'issue de ces épreuves on observe l'éventuel bombage ou fuitage.

Les examens et analyses microbiologiques complémentaires à réaliser sont la recherche et le dénombrement des micro-organismes suivants :

- flore aérobie totale ;
- staphylocoques ;
- coliformes ;
- *Salmonella* ;
- *Lactobacillus* ;

- *Bacillus thermoacidurans* et *B. stearothermophilus* ;
- levures et moisissures.

### **1/ Recherche de la toxine botulinique**

Cette recherche n'est qu'exceptionnellement réalisée par des laboratoires spécialisés. Elle est effectuée par ELISA. Il existe 6 toxines (A, B, C, D, E, F et quelques sous-groupes) qui ont une action toxique identique mais qui sont antigéniquement différentes, chaque type de toxine n'étant neutralisé que par le sérum spécifique contenant les anticorps correspondants. Les types les plus fréquents sont les types A, B, E (A et B dans les conserves de légumes, conserves de viande, B et E dans les poissons et produits dérivés).

### **2/ Recherche et numération de *Bacillus cereus***

*Bacillus cereus* est un bacille Gram+ sporulé rencontré dans de nombreux aliments crus ou traités et sur les végétaux. Cette bactérie peut par ailleurs se développer dans de nombreux aliments cuits et mal réfrigérés, les conserves (de pommes de terre et de légumes, la viande hachée, les saucisses, les poudres de cacao, les potages, etc.) et y excréter une phospholipase C.

La choline phosphorylée résultant de l'action de la phospholipase est à l'origine des signes cliniques de la toxiinfection, après consommation de l'aliment dans lequel elle a été formée. On peut alors supposer qu'il existe un grand nombre de bacilles dans l'aliment (plus de  $10^6$  /g).

La recherche de *Bacillus cereus* se fait sur un milieu de culture à base de jaune d'œuf et d'une solution de sulfate de polymyxine à 1 mg/ml. Un volume de 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions est inoculé à la surface séchée du milieu. L'incubation se fait pendant 48 h à 32°C. *B. cereus* donne des colonies rouges plates, rugueuses, sèches, avec un fond coloré en violet, entourées d'un halo de précipité blanchâtre due à l'activité lécithinolytique.

Il est possible de compter séparément les formes végétatives et les spores. Pour cela traiter la suspension mère à 80°C pendant 10 minutes.

### **3. Contrôle de la viande**

La viande est le produit de transformation du muscle après la mort de l'animal. Sa qualité prend en compte 4 composantes : la qualité technologique, la qualité organoleptique, la qualité nutritionnelle et la qualité hygiénique.

L'altération des viandes est un phénomène d'apparition progressive. Les premières manifestations de ce phénomène sont discrètes : odeur dite de relent et modification de l'aspect de la viande. Au-delà du seuil  $10^8$  bactéries/cm, la viande se couvre progressivement d'une couche poisseuse et devient grise ou brune. L'oxydation des lipides lui confère une odeur de rancissement. Ces phénomènes sont liés à l'activité oxydative et protéolytique de la flore aérobie.

Les altérations de la couleur de la viande fraîche dues aux microbes proviennent de diverses origines et peuvent prendre différentes formes. En raison des nombreuses manipulations nécessaires à leur préparation, les viandes découpées sont très exposées aux contaminations bactériennes. Or, le suc musculaire libéré consécutivement au découpage des viandes constitue un milieu propice au développement bactérien surtout lorsque les paramètres physiques tels que le pH ou la température sont favorables. Les viandes découpées sont davantage sensibles à la putréfaction que les carcasses et les grosses unités de découpe. Par ailleurs, plus les viandes découpées sont exposées à des températures élevées et plus les phénomènes de putréfaction seront d'apparition précoce et d'intensité importante.

#### **3.1. L'échantillonnage**

L'échantillon doit être représentatif, non endommagé ou modifié lors du transport et de l'entreposage.

L'échantillon destiné au laboratoire de microbiologie doit être constitué de 5 prélèvements d'au moins 100 grammes du produit à analyser. Ces unités doivent être issues d'un même lot de fabrication et prélevées stérilement au hasard. Elles doivent être conditionnées individuellement et transportées à température réglementaire jusqu'au laboratoire, en précisant le numéro de lot.

#### **3.2. Préparation des diluants**

La préparation des diluants d'emploi général et pour les besoins particuliers doit s'effectuer conformément à la méthode d'analyse relative à la préparation des échantillons, de

la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique, fixée par la réglementation en vigueur.

### **3.3. Analyses microbiologiques**

Les critères microbiologiques réglementaires applicables aux viandes hachées et aux préparations de viandes hachées sont ceux définis par le règlement (CE) n° 2073/2005. Ils diffèrent selon que les produits sont destinés à être consommés crus ou cuits. Deux catégories de critères sont retenues, les critères de sécurité et les critères d'hygiène des procédés.

L'objectif de l'analyse microbiologique des viandes consiste à rechercher et/ou à dénombrer :

- ✓ La flore microbienne en profondeur d'échantillons ;
- ✓ La flore microbienne en surface ;
- ✓ La flore microbienne globale (surface et profondeur).

Pour réaliser l'analyse d'une viande hachée, une quantité de 5g de l'échantillon sont broyés dans 45 ml de diluant. Après préparation des dilutions, des ensemencements sur des milieux de culture appropriés sont effectués.

- ***Recherche des critères de sécurité***

Ils regroupent les bactéries pathogènes pour le consommateur, leur présence nécessite le retrait et la destruction du produit. Parmi ces bactéries figurent les *Salmonella* pour les viandes et les produits à base de viande et *Listeria monocytogenes* pour les produits de la charcuterie cuite tranchés prêts à la consommation directe.

- ***Recherche des critères d'hygiène des procédés***

Ils regroupent les bactéries banales qui témoignent du respect des bonnes pratiques d'hygiène et de fabrication ou qui renseignent sur la durabilité des produits (**Tableau 9**). Parmi ces bactéries figurent la « Microflore aérobie mésophile totale », « *Escherichia coli* bêtaglucuronidase positive », « Staphylocoques à coagulase positive non entérotoxigènes » et les « Anaérobies sulfite-réducteurs ». Leur présence n'entraîne pas automatiquement le retrait du lot de produits analysés.

**Tableau 9.** Critères microbiologiques applicables aux viandes rouges hachées

Micro-organismes/ métabolites	Limites microbiologiques (ufc/g)	
	m	M
Germes aérobies à 30 °C	$5.10^5$	$5.10^6$
<i>Escherichia coli</i>	50	$5.10^2$
Staphylocoques à coagulase +	$10^2$	$10^3$
<i>Salmonella</i>	Absence dans 25 ml	

## Conclusion

Le contrôle de la qualité des aliments en générale et le contrôle microbiologique en particulier dans l'industrie agroalimentaire depuis la production jusqu'à la distribution sont des étapes indispensables pour assurer la qualité des aliments.

L'examen microbiologique est un outil incontournable d'évaluation du niveau de contamination des denrées alimentaires et de la nature de leur microflore. Il est très largement utilisé dans le cadre du contrôle officiel ainsi que dans des auto-contrôles mis en œuvre par les industriels pour garantir la salubrité des denrées qu'ils commercialisent.

Les évolutions technologiques des méthodes microbiologiques, dans les domaines du prélèvement et/ou de l'analyse, ont ainsi une place de choix à la surveillance microbiologique dans le secteur industriel par les différents atouts qu'elle apporte au gestionnaire de cet environnement (points critiques mieux étudiés, actions correctives plus rapides...).

Les méthodes traditionnelles utilisées à cet effet ont l'avantage d'être simple et peu coûteuses mais nécessitent un délai d'incubation dans un milieu de culture pour la croissance des micro-organismes. À côté des méthodes d'analyse culturales ou conventionnelles, qui restent toujours recommandées, de nouvelles méthodes, dites alternatives sont apparues. Ces méthodes ont fait l'objet de nombreux travaux afin d'améliorer la collecte, la quantification et l'identification des micro-organismes, qui permettent, grâce à des durées plus importantes de recueil des micro-organismes (quelques heures) et une meilleure évaluation de l'exposition humaine ou de produits industriels.

Toutefois, la représentativité des résultats d'analyses passe par un choix judicieux de plan d'échantillonnage, mais suppose aussi des garanties techniques. La démarche progressive d'accréditation des laboratoires doit être complétée par une application rigoureuse de règles de prélèvement ainsi que par une interprétation raisonnée des résultats d'examens, sur la base de la connaissance de la technologie des aliments et de l'écologie microbienne.

## Références bibliographiques

AFNOR, NF V 08-403. Microbiologie alimentaire - Conserves - Recherche de Bacillus thermophiles. NF V08-404 Avril 1986, V08-404.

Agence Fédérale pour la Sécurité de la Chaîne Alimentaire. 2012. Guide d'autocontrôle pour la production et la vente de produits laitiers à la ferme. G-034 version 1 dd 23-07-2012.

Analyse des risques relatifs à la sécurité sanitaire des aliments. Guide à l'usage des autorités nationales responsables de la sécurité sanitaire des aliments Étude FAO Alimentation et Nutrition. Food & Agriculture Org. 2007. 129 pages.

Blan M. 2005. L'échantillonnage : le maillon faible du contrôle de la qualité sanitaire des productions agricoles. Industrie des céréales. 144 : 13 -21.

Bobbia M, Caïni F, Delaunay T, Houdret JL, Malherbe L, Navel V, Penven F, Phillips C, Rebours A, Robic PY, Rosset L. 2009. Surveillance de la qualité de l'air ambiant. Guide d'élaboration de plans d'échantillonnage temporel et de reconstitution de données. 143P.

Bornert G. 2000. La place des analyses microbiologiques de denrées alimentaires dans le cadre d'une démarche d'assurance-sécurité. Revue Méd. Vét.151, 805-812.

Boumendjel M, Houhamdi M, Samar M, Sabeg H, Boutebba A, Soltane, M. 2012. Effet des traitements thermiques d'appertisation sur la qualité biochimique, nutritionnelle et technologique du simple, double et triple concentré de tomate. Sciences et Technologie. 36. 51-59.

Branger A, Roustel S. 2007. Alimentation, sécurité et contrôles microbiologiques. Educagri Editions, 203 pages.

Codex Alimentarius. Résidus de pesticides dans les denrées alimentaires. Volume 2 : Programme mixte FAO-OMS sur les normes alimentaires. Commission du codex alimentarius/ Food & Agriculture Org., 1994. 778 pages.

Coulibaly KJ. 2015. Qualité microbiologique des produits laitiers industriels vendus à abidjan de 2009 A 2012. Revue Bio-Africa. 44-52.

Dauga C, Dore J, Sghir A. 2005. La diversité insoupçonnée du monde microbien. Medecine/Sciences. 21 : 290-6.

De Heather Greenfield D. A. T. 2007. Données sur la composition des aliments : production, gestion et utilisation. 308 pages.

Delarras C. Pratique en microbiologie de laboratoire. 2014. Recherche de bactéries et de levures-moisissures. Lavoisier. 772 pages.

Delarras C. Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux (2e ed.). 2010. Lavoisier. 588 pages.

Denis F, Bactériologie médicale : techniques usuelles. Elsevier Masson, 2007. 573 pages.

Denis F, Bingen E, Martin C, Ploy MC, Quentin R. Bactériologie médicale. 2012. Elsevier Masson, 640 pages.

Descy J, Meex C, Melin P, Hayette MP, Huynen P, De Mol P. Spectrométrie de masse MALDI-TOF en bactériologie clinique ou comment identifier une bactérie en une minute. 2010. Rev Med Liège. 65 : 29-34.

Faffani GL, Kirane-Gacem D. 2012. Les bactéries sporulées dans les conserves de légumes (petits pois) : Recherche et caractérisation phénotypique. Rev. Sci. Technol., Synthèse. 25 : 131- 139.

Farougou S, Kpodékon M, Sessou P, Abdou Karim Y, Boko K, Boniface Y, Sohounhloue D. 2011. Qualité microbiologique du lait cru de vache élevée en milieu extensif au Bénin. 223- 336.

Hamiroune M, Berber A, Boubekour S. 2016. Évaluation de la qualité bactériologique du lait cru bovin à divers stades de la chaîne de production laitière dans des fermes en Algérie. Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz. 35 :1-24.

Journal officiel de la République algérienne n° 32. Méthodes officielles d'analyses Physico-Chimiques et Microbiologiques.

Journal officiel de la République algérienne n° 39. 8 Chaoual 1438. 2 juillet 2017.

Lansing MP, Joanne MW, Sherwood LM, Woolverton CJ. 2018. La Microbiologie de Prescott. De Boeck Supérieur, 1120 pages.

Lee R, Lovatelli A, Ababouch L. Purification des coquillages bivalves : aspects fondamentaux et pratiques. FAO document technique sur les pêches No. 511. Organisation des Nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome, 2010.

Lonvaud-Funel, Renauf, Strehaiano. Microbiologie du vin : bases fondamentales et applications. 2010. Lavoisier, 380 pages.

Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture. Assurance de la qualité dans le laboratoire d'analyse microbiologique des aliments. Volume 12 de Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. Food & Agriculture Org., 1992 ; 156 pages.

Paolozzi L, Liébart JC, Arlat M, Dion M, Rakotoarivonina H. 2019. Introduction à la microbiologie, Microbiologie fondamentale et appliquée. Dunod, 240 pages.

Principes généraux d'hygiène alimentaire CAC/RCP 1-1969. CAC/RCP 1-1969, Rév. 4-2003. 23 P.

Rapport de la Consultation mixte FAO/OMS d'experts Rome, 17 - 21 novembre 2003. L'évaluation de la sécurité sanitaire des aliments issus d'animaux génétiquement modifiés (y compris les poissons).

Salifou CFA, Boko KC, Ahounou GS, Tougan PU, Kassa SK, Houaga I, Farougou S, Mensah GA, Clinquart A, Youssao AKI. 2013. Diversité de la microflore initiale de la viande et sécurité sanitaire des consommateurs. *Int. J. Biol. Chem. Sci.* 7 : 1351-1369.

Systemes de qualité et de sécurité sanitaire des aliments : manuel de formation sur l'hygiène alimentaire et le Système d'analyse des risques - points critiques pour leur maîtrise (HACCP). 2001. Food & Agriculture Org. 232 pages.

Techniques d'emmagasinage des grains : Evolution et tendances dans les pays en développement/ Organisation des Nations Unies pour l'alimentation et l'agriculture/ Food & Agriculture Org. 1995. 265 pages. Volume 109 de Bulletin des services agricoles.

Vaillant J. Initiation à la théorie de l'échantillonnage. 2005. <http://madagascar-interculturel.e-monsite.com/medias/files/theorie-echtage.pdf>.