



République Algérienne Démocratique populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université du 20 aout 1955-Skikda



Techniques de contrôle microbiologiques

3eme année microbiologie

Sciences biologiques

Sciences de la nature et de la vie

Dr. Chekroud Zohra

Avril 2021

Techniques de contrôle microbiologiques

3eme année microbiologie
Sciences biologiques
Sciences de la nature et de la vie

Dr. Chekroud Zohra

Avril 2021

Table des matières

Table des matières	I
Liste des tableaux	IV
Liste des figures	V
I-Introduction	1
II-Définitions et objectifs du contrôle microbiologique	2
1-Définition	2
2- Objectifs du contrôle microbiologique	2
2-1- Sécurité et qualité hygiénique	2
2-2-Qualité technologiques	2
2-3-Qualité nutritionnelle	2
2-4-Qualité organoleptique	3
III- Politique du contrôle de qualité microbiologique	4
1- Les niveaux de contrôle de qualité microbiologique :	4
2-Fréquence de contrôle microbiologique :	4
3-Les paramètres à contrôler :	4
4- Méthodes de contrôle de qualité microbiologiques	5
5- les normes	6
6-Les critères en microbiologie	7
7- Les laboratoires chargés du contrôle de la qualité microbiologique	8
	9
IV- Prélèvement, transport et préparation des échantillons	
1- Conditions du prélèvement	9
2-Echantillonnage :	9
2-1-Méthode d'échantillonnage pour rechercher un nombre peu élevé de micro-organismes	10
2-2- Choix des échantillons	10
2-3-Prélèvement en surface :	10
2-4- Prélèvement de produits liquides	11
2-5- Prélèvement de produits solides :	11
3- Traitement de l'échantillon	12
3-1- Transport des prélèvements:	12
3-2- Les diluants	12

3-3- La revivification	13
V-Techniques classiques de numération	15
1- Les méthodes générales directes	15
1-1- Comptage direct	15
2- Les méthodes générales indirectes	16
2-1-Dosage d'un métabolite primaire synthétisé, ou dosage de la quantité d'un substrat consommé	16
2-2-Réduction d'un colorant	16
2-3-Dilution et culture	16
2-3-1-Numération à partir d'un milieu solide (UFC)	16
2-3-2-Numération en milieu liquide (UFT)	17
2-4-Numération après filtration	18
VI-Techniques récentes de numération	19
1-La cytométrie en flux (CMF):	19
1-1-Définition	19
1-2-Principe	19
1-3-Principales applications	19
2- La spectrophotométrie:	20
2-1-Définition:	20
2-2-Grandeurs spectrophotométriques	21
2-3- Application de la spectrophotometrie en microbiologie	21
	24
VII- Identification, recherche et numération des microorganismes dans les aliments	
1- Identification des germes par techniques classiques	24
2-Galeries miniaturisées	24
3- Identification des bactéries par la technique de spectrometrie de masse (MALDI-TOF-MS)	25
3-1-Principe	25
3-2-Banques de données	25
3-3-Application en microbiologie de routine	25

4-Recherche et numération des microorganismes	26
4-1-Numération des germes totaux	26
4-2 - Recherche d'une contamination d'origine fécale	26
4-2-1-La colimétrie	26
4-2-2-Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield	27
4-3 - Recherche et numération des anaérobies sulfito-réducteurs	28
4-4-Recherche et numération de <i>Staphylococcus aureus</i>	28
4-5- Recherche de <i>Salmonella</i> (et de <i>Shigella</i>)	30
4-6- Recherche des <i>Shigella</i>	31
4-7 - Recherche indirecte de <i>Brucella</i>	31
4-8 - Recherche et/ou numération de <i>Vibrio cholerae</i>	32
4-9- Recherche de <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	32
4-10 - Recherche de <i>Listeria monocytogenes</i>	33
4-11 - Recherche et numération de <i>Bacillus cereus</i> et de <i>Bacillus sp</i>	34
VIII- Réalisation d'un contrôle	35
1-Contrôle de matière première:	35
2- Contrôle des produits finis	38
3- Contrôle de nettoyage et de la désinfection	39
4-Contrôle des levains:	40
5-Interprétation des résultats : Plan à deux et à trois classes	41
TP N1: Numération directe des germes par la cellule de Malassez	43
TP N2: Contrôle bactériologique des eaux destinées à consommation humaine	45
TP N3 Contrôle de la qualité microbiologique de la viande	49
Références bibliographiques	61

Liste des tableaux

Tableau n1 La table de Mac Grady	18
Tableau n2: Les étapes de la coloration de Gram	56

Liste des figures

Figure n1:prélèvement en surface par écouvillonnage	10
Figure n 2: prélèvement de surface par des lames de contact	11
Figure n3: prélèvement des produits solides.	12
Figure n 4: chambre de comptage de Malassez	15
Figure n 5:principe des dilutions pour le dénombrement en milieu solide (ISO 7218)	17
Figure n 6: utilisation de la cytométrie en flux en océanographie	20
Figure n 7: un spectrophotometre	20
Figure n 8: grandeurs spectrophotometriques	21
Figure n 9: Droite d'étalonnage : Absorbance = f [cellules]	22
Figure n 10: détermination graphique de la concentration	23
Figure n 11: Galerie API 20E d' <i>Escherichia coli</i>	25
Figure n 12: aspect des colonies de <i>Clostridium sulfito-reducteur</i> sur gélose viande Foie	28
Figure 13. <i>Staphylococcus aureus</i> sur milieu Chapman	29
Figure 14: Test de coagulation (Plasma de lapin lyophilisé)	29
Figure n 15: la recherche de <i>Brucella</i> dans le lait	32
Figure n16: Observation microscopique des mycobactéries	33
Figure n 17: Observation macroscopique de la levure après incubation 24h à 30°C	40

Figure n 18: Observation microscopique de la levure après incubation 24h à 30°C	41
Figure n19: La galerie API 20CAUX	41
Figure n 20: dénombrement de cellules de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> par la cellule de Malassez	44
Figure n 21: dénombrement des coliformes totaux et fécaux (Colimètrie)	47
Figure n 22: recherche des streptocoques totaux et fécaux	48
Figure n23: photographie des solutions mères (10^{-1}) des échantillons	51
Figure n 24 : Schéma de la préparation de l'échantillon et des dilutions décimales	52
Figure 25: protocole expérimental de recherche et de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile	53
Figure n 26: Protocole expérimental de recherche et de dénombrement des Coliformes	54
Figure n 27: Protocole expérimental de la recherche et du dénombrement des <i>staphylococcus aureus</i>	57
Figure n 28 : Protocole expérimental de recherche des bactéries anaérobie sulfito-Réductrices	58
Figure n 29: Protocole expérimental de recherche et de dénombrement des Salmonelles	60

Partie I: Cours

I-Introduction

Dans de très nombreux domaines, le contrôle microbiologique des produits constitue soit un impératif de sécurité comme dans les domaines pharmaceutiques, médicaux ou hospitaliers, soit plus simplement, un critère de qualité. Les établissements hospitaliers sont tenus de contrôler régulièrement la contamination microbiologique de leur eau ou de l'air. Ils peuvent aussi être amenés à effectuer des analyses microbiologiques de liquides biologiques. De même, dans l'industrie pharmaceutique, la sécurité de la production impose de multiples contrôles bactériologiques dans les différents sites de production, de stockage ainsi que sur les matières premières et les produits finis. Les industries alimentaires doivent aussi faire face aux exigences toujours croissantes du consommateur en matière de qualité et de conservation des denrées alimentaires et des boissons. Ces branches de l'industrie ne peuvent pas se limiter à un contrôle du produit final, c'est-à-dire de la boisson en bouteille ou du plat cuisiné ; au contraire, elles doivent, si elles veulent éviter les pertes financières et les réclamations, soumettre les matières premières à un contrôle constant et surveiller l'ensemble du processus de production. Les examens microbiologiques et hygiéniques jouent alors un rôle prépondérant.

Ce présent document est un amalgame de chapitres et de travaux pratiques. Il s'adresse aux étudiants de troisième année microbiologie, sciences de la nature et de la vie. Il a pour objectif de faire acquérir aux étudiants les connaissances théoriques et pratiques indispensables pour maîtriser les différentes techniques de contrôle d'un produit: le dénombrement et la recherche des germes de contamination/et ou pathogènes selon les critères des normes algériennes et internationales.

II-Définitions et objectifs du contrôle microbiologique

La fabrication de produits alimentaires, pharmaceutiques ou cosmétiques nécessite des contrôles très sévères pour garantir leur qualité microbiologique et leur composition. La rigueur de ces contrôles est un gage de qualité : elle assure la sécurité du consommateur.

1-Définitions

Définition AFNOR: La qualité est l'aptitude d'un produit à satisfaire ses utilisateurs.

Définition ISO complète: Ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites de tous les utilisateurs.

2- Objectifs du contrôle microbiologique

2-1- Sécurité = qualité hygiénique : Qu'est-ce qui peut rendre malade dans un aliment ? Tous les germes pathogènes qui peuvent être transmis par les aliments et les espèces de microorganismes capables d'altérer les aliments sont à considérer. Il en est de même des toxines résultant de la présence des microorganismes (toxines, métabolites toxiques), produits **toxiques** (*ex.: métaux lourds, pesticides*), composants normaux en excès (*ex.: sel, lipides*), composants normaux inadaptés à un consommateur particulier (*ex.: intolérant au lactose, allergique aux arachides*).

2-2-Qualité technologique : Le consommateur n'est pas le seul utilisateur de l'aliment, or la qualité est la satisfaction de **tous les utilisateurs**: les **transformateurs**, artisans et industriels, et les **distributeurs**, magasins et grandes surfaces, attendent eux aussi des caractéristiques précises des produits. Il s'agit des qualités **technologiques**: aptitudes à la transformation et à la distribution. *ex.: qualité boulangère d'une farine, rétention d'eau d'une viande pour la salaison, aptitude au rangement dans un camion, durée de conservation d'un yogourt en grande surface, ...)*

2-3-Qualité nutritionnelle: On veut que l'aliment apporte "du bon", qu'il soit **diététique**, qu'il **maintienne et améliore notre santé**. Il s'agit d'abord des **nutriments** majeurs (lipides, glucides, protides) et mineurs (vitamines & minéraux). Des demandes nouvelles surgissent

concernant des non-nutriments utiles (fibres, AG oméga 3, polyphénols, oligo-éléments), ou supposés bénéfiques (probiotiques, aliments "fonctionnels" ...).

2-4-Qualité organoleptique : On veut satisfaire ses **cinq sens**. La qualité organoleptique a une composante sensorielle majeure, **mesurable par l'analyse sensorielle** (objectivée par un jury), mais a aussi une composante psychologique et sociale

III- Politique du contrôle de qualité microbiologique

1- Les niveaux de contrôle de qualité microbiologique :

La maîtrise de la **qualité microbiologique** (*hygiénique* obligatoire et *marchande* souhaitée par le fabricant mais aussi le consommateur) passe par un ensemble de démarches qui vont du :

- contrôle des matières premières brutes, l'eau
- en cours de transformation
- l'identification des principaux points critiques du système de production / distribution, le plus souvent par une démarche **HACCP**.
- l'environnement de production, air, matériel,..
- l'aliment fini, l'**analyse microbiologique traditionnelle des produits finis** reste encore indispensable car elle permet avec une certaine inertie d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation. Ce type de contrôle souvent pratiqué par des laboratoires officiels (DGCCRF: Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes , Laboratoires des Services Vétérinaires, etc.) n'est pas préventif et ne permet pas de maîtriser la qualité microbiologique des produits fabriqués.
- le contrôle des produits destinés à la consommation en cas d'une intoxication

2-Fréquence de contrôle microbiologique :

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

3-Les paramètres à contrôler :

En bactériologie alimentaire il n'est donc pas nécessaire de rechercher, de compter et d'identifier systématiquement toutes les bactéries, levures et moisissures présentes dans le produit. Il suffit souvent d'effectuer :

a) Une étude quantitative de la flore microbienne :

Soit : - par exemple numération de la *flore aérobie mésophile* revivifiable sur un milieu du type gélose nutritive ordinaire (germes hétérotrophes peu exigeants, mésophiles si la

température d'incubation est voisine de 30°C avec une durée d'incubation généralement inférieure à 72 heures, neutrophiles si le pH est voisine de 7, aérobie ou aéro-anaérobie si l'incubation est réalisée à l'air),

-La numération des *levures et moisissures* -la numération des *anaérobies sulfito-réducteurs* (germes hétérotrophes, réduisant les sulfites en sulfure d'hydrogène, mésophiles, anaérobies stricts).

-La présence de bactéries d'origine fécale ou tellurique témoigne dans nos aliments d'un manque d'hygiène.

Soit: par dénombrement d'un groupe bactérien pouvant correspondre à une contamination déterminée: coliformes thermotolérants et/ou streptocoques du groupe D, staphylocoques,...

b) Une recherche orientée de certaines bactéries pathogènes telles que *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Shigella*, *Mycobacterium*, *Listeria*, *Brucella*, *Campylobacter*, *Yersinia*, etc.... Cette recherche exige l'utilisation de méthodes spécifiques hautement sélectives.

4- Méthodes de contrôle de qualité microbiologique

Il faut choisir une méthode d'analyse qui permet, après interprétation, de réagir sur la fabrication en amont par un véritable "feed-back" quand un défaut d'origine microbienne est détecté. Les méthodes d'analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une **recherche** et/ou une **numération** des principaux germes microbiens rencontrés dans nos aliments afin d'en maîtriser leur présence ou absence (dans le cas de germes dangereux responsables de maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas de germes peu dangereux, contaminants ou hôtes normaux des matières premières composant la denrée).

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

- Un **contrôle de stérilité** pour des produits soumis à des traitements antimicrobiens de stabilisation (température, additifs, etc.)
- Une **estimation du nombre des contaminants** (flore aérobie mésophile totale, coliformes, anaérobies sulfito-réducteurs) ou **leur détection - identification** (*Salmonella*, *Listeria* etc).

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

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

Remarque:

Les techniques microbiologiques de culture peuvent, quelques fois, être remplacées par le contrôle de paramètres physicochimiques liés à la présence de microorganismes à l'instar de: la teneur en eau (H%), la matière sèche (MS%), le potentiel d'hydrogène (pH) et l'acidité (Le cas du lait par exemple).

5- les normes

Les *normes* sont des spécifications microbiologiques adoptées par la législation qui s'adressent au produit fini et fixent les limites acceptables de présence de microorganismes donnés dans des produits bien définis. Il existe actuellement de nombreux organismes nationaux ou internationaux (OMS, FAO, ISO, ICMSF, CEN, AFNOR, CNERNA, DGCCRF, services vétérinaires, etc.) qui se préoccupent de l'établissement de critères de qualité microbiologique de nos aliments.

5-1-Les systèmes de normalisation:

➤ **L'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) :**

Organisation non gouvernementale créée à Londres en 1947. C'est un organisme de normalisation international composé de représentants d'organisations nationales de normalisation de 165 pays (jusqu'à Octobre 2014). Elle a pour but de produire des normes internationales dans les domaines industriels et commerciaux appelées normes ISO. Elles sont utiles aux organisations industrielles et économiques de tout type, aux gouvernements, aux instances de réglementation, aux dirigeants de l'économie, aux professionnels de l'évaluation de la conformité, aux fournisseurs et acheteurs de produits et de services, dans les secteurs tant public que privé et, en fin de compte, elles servent les intérêts du public en général lorsque celui-ci agit en qualité de consommateur et utilisateur.

➤ **L'AFNOR:**

C'est le correspondant français des organismes européens et internationaux, elle édite les normes, gère le certificat NF, recense les besoins nouveaux, coordonne les actions, participe à la formation...

➤ **Le Codex alimentarius :**

La Commission du Codex Alimentarius a été créée en 1963 par la FAO (Food and Agriculture Organisation) et l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) afin d'élaborer des normes

alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages, dans le cadre du programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires.

➤ **Le CEN (Comité européen de normalisation) :**

Installé à Bruxelles, il comprend 17 membres, dont l'AFNOR pour la France, fut créé en 1961 afin d'harmoniser les [normes](#) élaborées en Europe. Tous ses membres nationaux – qu'ils soient membres de plein droit, affiliés ou organismes de normalisation partenaires – sont également membres de l'[Organisation internationale de normalisation](#) (ISO). Les normes européennes (contrairement aux normes ISO) sont reprises systématiquement et sans modifications par tous les pays de la CEE (Communauté Economique Européenne), avec pour conséquence la suppression obligatoire des normes nationales divergentes

➤ **CNERNA : Centre national d'étude et de recommandation sur la nutrition et l'alimentation :**

Ce n'est ni laboratoire officiel ni un organisme doté de pouvoir réglementaire, il dégage les fondements scientifiques des textes qui seront publiés par les organismes habilités à légiférer.

➤ **Institut Algérien de Normalisation (IANOR):**

Il est sous tutelle du Ministère du Développement Industriel et de la promotion de l'investissement. Il est chargé de:

- l'élaboration, la publication et la diffusion des normes algériennes;
- la centralisation et la coordination de l'ensemble des travaux de normalisation entrepris par les structures existantes et celles qui seront créées à cet effet ;
- l'adoption de marques de conformité aux normes algériennes et de labels de qualité ainsi que la délivrance d'autorisation de l'utilisation de ces marques et le contrôle de leur usage dans le cadre de la législation en vigueur.....

➤ **Autres organismes :**

Certains secteurs professionnels éditent des normes en complément des normes générales.
Exemple : la FIL (Fédération Internationale de Laiterie).

6-Les critères en microbiologie

En pratique, un critère est un ensemble de données quantitatives s'appliquant à un germe dans un produit donné, le critère est fixé en fonction d'un niveau de qualité requis. (ex : absence de Salmonella dans 10 g de viande).

7- Les laboratoires chargés du contrôle de la qualité microbiologique

Les entreprises sont amenées à faire appel à divers laboratoires pour effectuer des contrôles à des fins réglementaires (législation) ou volontaires (autocontrôles), en vue d'apporter la preuve de la conformité de leur produits et procédés.

➤ Les laboratoires officiels

Les contrôles officiels (ou réglementaires) interviennent soit suite à une plainte, à une TIAC, soit lors d'enquêtes programmées. Ils interviennent également suite à des demandes d'associations professionnelles ou de consommateurs. Les contrôles sont menés selon des méthodes normalisées.

-Les laboratoires de la répression de fraude: Alger, Annaba, Constantine,...

-Les laboratoires d'hygiène à l'image du laboratoire de la wilaya de Skikda (Sité Merdj Eddib)

-Le laboratoire de la direction générale de la concurrence, de la consommation et de la répression des fraudes (DGCCRF) (France).

-Les laboratoires vétérinaires - la sous-direction de l'Hygiène alimentaire (SDHA) (France): ses activités couvrent le contrôle des établissements de production, du transport, de la conservation, de la transformation et de l'utilisation des denrées en restauration collective.

➤ Les laboratoires chargés des autocontrôles

Pour réaliser des autocontrôles, les entreprises sous assurance qualité ISO 9001 version 2000 font appel à des laboratoires internes ou externes accrédités par le COFRAC.

➤ Le comité français d'accréditation COFRAC

Les laboratoires sont soumis à une démarche de qualité pour obtenir une certification.

IV- Prélèvement, transport et préparation des échantillons

1- Conditions du prélèvement

Les conditions essentielles à respecter pour le prélèvement sont:

a- Le respect des règles d'asepsie et la non modification des flores présentes dans le produit: Les manipulations effectuées au cours du prélèvement ne doivent en aucun cas être à l'origine d'une contamination. Il est donc nécessaire d'utiliser des instruments stériles et de travailler stérilement. Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement.

b-La représentativité de l'échantillon: Il se doit d'être une image fidèle de l'ensemble d'un lot homogène ou hétérogène. Il est parfois nécessaire de réaliser des prélèvements à divers niveaux de l'aliment (surface, profondeur d'un aliment solide) ou après broyage et homogénéisation.

Exemple: La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre aux parties superficielles et profondes notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés. Si le produit se présente sous forme de grands volumes (réservoirs à lait etc...) s'assurer de la bonne homogénéité de la répartition des micro-organismes

c- L'intégrité de l'échantillon: Un échantillon sera intègre si l'état du produit est maintenu du moment de l'échantillonnage jusqu'à son analyse.

2-Echantillonnage :

Il s'agit là d'une **étape fondamentale** souvent délicate. Les ouvrages consacrés à l'échantillonnage sont nombreux et des règles précises par produit ou milieu ont été édictés par l'AFNOR et la DGCCRF; si les échantillons ne sont pas correctement prélevés et manipulés ou ne sont pas représentatifs d'un lot ou d'une production, les résultats d'analyse n'auront aucune signification.

- **Echantillon:** Quantité de produit prélevé d'un lot et soumis à des essais en laboratoire. Un échantillon peut consister en une ou plusieurs unités d'échantillonnage.
- **Unité d'échantillonnage:** Portion ou contenant individuel de produit prélevé au hasard dans un lot. Une unité d'échantillonnage peut correspondre à un échantillon.

2-1-Méthode d'échantillonnage pour rechercher un nombre peu élevé de micro-organismes

On peut déterminer le nombre d'échantillons à analyser dans un lot en fonction du degré de sûreté recherché " $n = \log (1 - p) / \log (1 - d)$ ". **p** est la probabilité de déceler le micro-organisme (en général $p = 0,95$), **d** est le pourcentage de défauts admis pour le lot entier (souvent inférieur à 0,05). On peut également réaliser un échantillonnage satisfaisant au point de vue statistique avec $n = N$ dans laquelle **n** est le nombre d'échantillon à analyser et **N** est le nombre total de divisions du produit à analyser. Cependant cette méthode conduit souvent à un nombre trop élevé d'analyses, en particulier quand n est supérieur à 10.

2-2- Choix des échantillons

- au hasard (tables de nombres)
- on calcule $N/n = a$ et on prélève la $a^{\text{ième}}$ et ainsi de suite
- on calcule $n = b$ et on prélève le $b^{\text{ième}}$, puis le $(b - 1)^{\text{ième}}$ et ainsi de suite

2-3-Prélèvement en surface

- **Écouvillonnage** : Un Écouvillon contenant de l'eau peptonée tamponnée est appliquée par frottement sur la surface du produit pendant 10 secondes. L'écouvillon est alors remis dans son enveloppe. L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

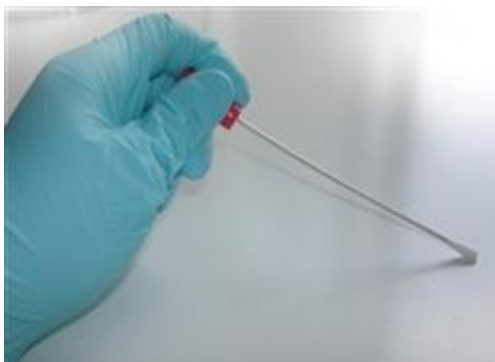


Figure n1: prélèvement en surface par écouvillonnage

(https://www.grosseron.com/ecouvillon-sterile_56-423-1-903-1-585.html)

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

- **Méthode des empreintes** : Un ruban adhésif préalablement stérilisé par les UV est appliqué sur la surface à étudier. Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies.
- **Méthode du cylindre** : Un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé.
- **Au moyen de boîtes de contact ou lames d'immersion remplies du milieu gélosé**, qui est pressée contre la surface à soumettre à l'essai.



Figure n2: prélèvement de surface par des lames de contact
(https://www.hygielim.com/boite-contact-gelosee_70-919-1-1789-1-5018.html)

2-4- Prélèvement de produits liquides

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

2-5- Prélèvement de produits solides :

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



Figure n3: prélèvement des produits solides.

a- une sonde, b- une spatule

(<https://www.hellopro.fr/tarriere-pour-prelevement-fromage-et-beurre-170-mm-2000202-2315204-produit.html>)

3- Traitement de l'échantillon

3-1- Transport des prélèvements:

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé il faut identifier immédiatement le produit avec une étiquette ou une référence: noter la température initiale, l'heure du prélèvement, la date et la température de transport.

-Amener alors les échantillons le plus rapidement possible au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit. Le mode de transport des échantillons ne doit pas avoir de conséquence sur l'intégrité de l'échantillon.

-Dès réception au laboratoire l'échantillon accompagné de sa fiche signalétique est enregistré (nature, date, heure, provenance du prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées, autres indications utiles).

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

-Pour un **produit congelé** s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant 1 mois avant d'être analysé). Il faut veiller à ce que la température du produit prélevé soit au moins égale à -18°C , transporter le produit à cette température et décongeler à l'air ambiant, à température voisine de 20°C pendant un temps inférieur à 3 heures, temps suffisant pour atteindre une texture qui permet le prélèvement.

3-2- Les diluants

Au cours de la préparation des échantillons (et des dilutions) les microorganismes peuvent être inhibés ou même altérés par le changement du milieu lié à l'addition de diluant (changement de pH mais surtout de force ionique). L'effet bactéricide de certains diluants est connu: ainsi *Staphylococcus aureus* est "tué" en quelques heures dans de l'eau distillée de

même que la plupart des entérobactéries (*E.coli*); il en est de même pour *Streptococcus pyogenes* dans du sérum physiologique ou dans du Ringer au 1/4 et pour *Escherichia coli* dans de l'eau salée à 8,5‰. **Actuellement il paraît souhaitable, sauf indication afférente à un type donné d'aliment, de réaliser les préparations et les dilutions des échantillons à analyser dans une solution de tryptone sel.**

Remarque: La technique de dilution nécessite la présence de nombreux tubes à essais contenant le plus souvent 9 ml de diluant stérile et de nombreuses pipettes stériles de 1 et 10ml.

3-3- La revivification: Il est actuellement préconisé (norme AFNOR NF V04-501) de congeler les produits si leur analyse microbiologique ne peut pas être réalisée dans les 24 heures qui suivent leur réception au laboratoire ou leur prélèvement. Cependant, de nombreuses observations expérimentales révèlent l'effet négatif des opérations de congélation et de décongélation qui induisent un état de stress, voire détruisent les micro-organismes présents dans le produit. Les cellules survivant à la congélation ont alors subi un stress. On parlera de cellules viables non cultivables. Ces cellules ne seront donc pas détectables par les techniques classiques d'analyses. Cependant, elles sont capables de restaurer leur activité métabolique dans l'aliment et peuvent donc être à l'origine d'altérations du produit ou d'intoxications alimentaires. La nécessité de faciliter leur revivification, s'impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d'inhibiteurs.

➤ **Revivification en milieu liquide:**

La revivification peut être réalisée dès la première étape de l'analyse au cours de laquelle le produit est additionné de diluant. Il suffit alors de choisir un diluant de composition favorable et d'incuber le tout à la température optimale de croissance du germe à rechercher pendant un temps qui variera en fonction du type d'analyse réalisé, temps qui est le plus souvent voisin du temps de latence du germe "normal".

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

➤ **Revivification sur milieu solide:**

Quand la numération est effectuée sur milieu solide, la revivification peut être obtenue par une pré-culture sur une gélose non sélective favorable avec un temps d'incubation supérieur

au temps de latence, mais ne permettant pas la formation de colonies macroscopiques visibles. Après revivification, la surface de la gélose est recouverte de gélose sélective.

Quand la numération est réalisée après filtration sur membrane, la membrane sur laquelle se trouvent les germes est d'abord placée à la surface d'un milieu de revivification pendant un temps permettant éventuellement plusieurs divisions cellulaires normales puis le filtre est placé à la surface d'un milieu sélectif.

V-Techniques classiques de numération

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

1- Méthodes générales directes

1-1- Comptage direct:

Il consiste à compter directement au microscope optique les cellules formant la population bactérienne de l'échantillon observé. Le dénombrement s'effectue soit sur un échantillon fixé soit sur un échantillon liquide. Dans ce dernier cas, le dénombrement se fait dans des chambres de comptage graduées de volume connu (cellules de Thoma, de Malassez, de Nageotte, de Salimbéni Cloup etc...).

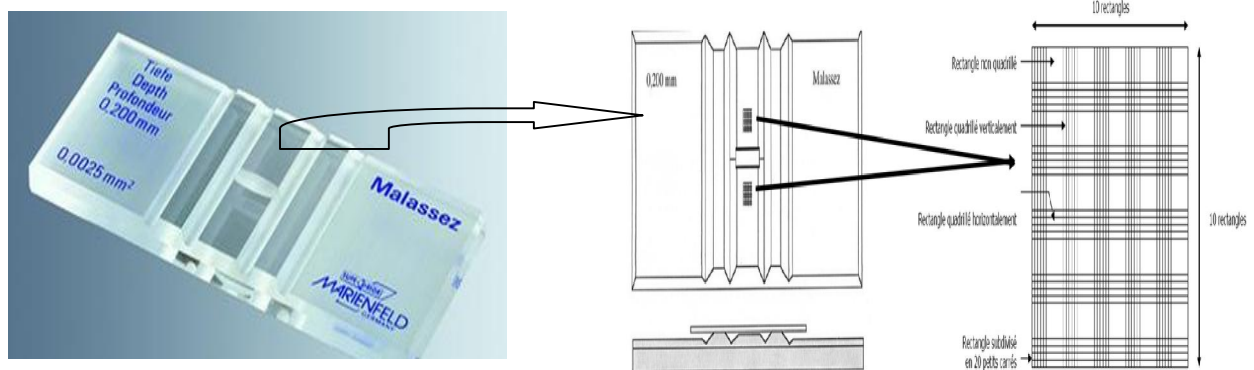


Figure n 4: chambre de comptage de Malassez
(<https://puppy-party.info/cellule-de-malassez-78/>)

Un comptage direct est aussi réalisable après filtration du produit (ou de ses dilutions) sur membrane, coloration de la membrane et observation microscopique. Cette dernière technique permet l'évaluation, après coloration par l'acridine orange et observation en épifluorescence, des micro-organismes vivants et morts (DEFT). Ce colorant est un intercalant des acides nucléiques avec lesquels il forme des complexes fluorescents verts (ADN) ou orange (ARN)

1-2-Détermination du poids sec, ou dosage des protéines microbiennes ou dosage des acides nucléiques (après sonication par exemple et/ou extraction en milieu alcalin)

1-3-Système luciférine - luciférase

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

2- Méthodes générales indirectes

2-1-Dosage d'un métabolite primaire synthétisé, ou dosage de la quantité d'un substrat consommé: Ces méthodes ne sont applicables que dans des conditions bien définies (phase exponentielle de croissance, température, milieu etc...).

2-2-Réduction d'un colorant

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

2-3-Dilution et culture:

Le dénombrement après culture concerne évidemment, les cellules viables de l'échantillon, autrement dit les cellules capables de croissance. La culture est réalisée soit en milieu liquide (1germe ou un groupe de germes donne après inoculation et incubation 1 culture positive), soit en milieu solide (1 germe ou un groupe de germes donne naissance à une colonie). Dans ce dernier cas l'ensemencement peut se faire dans la masse de la gélose ou en surface.

2-3-1-Numération à partir d'un milieu solide (UFC):

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de Pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC présents dans l'inoculum.

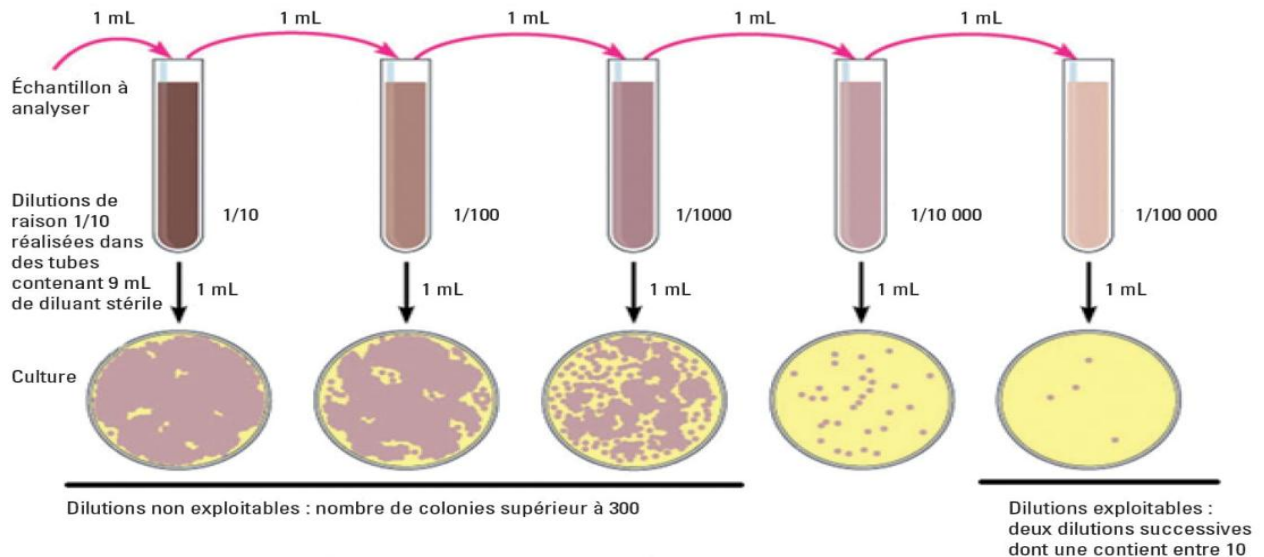


Figure n 5: principe des dilutions pour le dénombrement en milieu solide (ISO 7218)

(<http://www.perrin33.com/tbma/comptages-ufc.html>)

2-3-2-Numération en milieu liquide (UFT):

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification.

Cette technique consiste en l'ensemencement de nombreux tubes de bouillon à partir de dilutions décimales successives de l'échantillon. La présence des micro-organismes recherchés est mise en évidence en général par l'obtention d'un trouble éventuellement associé à des changements du milieu (production de gaz, changement de couleur...) caractéristiques de ce type de microorganismes.

➤ Numération en milieu liquide par fractionnement de grands volumes liquides

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

Si tous les tubes cultivent.....plus de 10 germes/ml

Si 9 tubes cultivent..... plus de 9 germes/ml

.....

Si 1 tube cultive..... plus d'un germe/ml.

➤ **Numération en milieu liquide par la méthode de Mac Grady (technique du nombre le plus probable NPP):**

Cette méthode est **une estimation statistique** du nombre de micro-organismes supposés distribués dans l'eau de manière parfaitement aléatoire. Elle est basée sur l'utilisation de trois tubes de milieu liquide (simple ou double concentration), ensemencés avec (1 ou 10 ml) de trois dilutions décimales de l'aliment ou de l'eau à examiner. Après incubation on compte le nombre de tubes positifs dans chaque série de trois et on détermine le nombre caractéristique formé de trois chiffres qui est ensuite reporté dans la table de Mac GRADY (Tableau n1). La croissance est appréciée par le trouble microbien, par le virage de couleur du milieu, ou par la production de gaz carbonique.

Tableau n1: La table de Mac Grady

2 tubes par dilution		3 tubes par dilution					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

2-4-Numération après filtration:

Dans le cas d'échantillons liquides à la teneur en bactéries trop faible, on a recours à une filtration sur membrane (0,45µ ou 0,22µ) d'un volume conséquent de l'échantillon (au moins 100ml). Les bactéries sont alors retenues à la surface de la membrane qui est directement introduite dans une boîte de Pétri contenant le milieu gélosé adéquat déjà solidifié. Les bactéries présentes se développent et donnent des colonies qui sont dénombrables.

VI-Techniques récentes de numération

1-La cytométrie en flux (CMF):

1-1-Définition:

C'est une technique permettant de faire défiler des particules, molécules ou cellules à grande vitesse dans le faisceau d'un laser, en les comptant et en les caractérisant. C'est la lumière réémise (par diffusion ou fluorescence) qui permet de classer la population suivant plusieurs critères et de les trier.

La cytométrie en flux est définie comme l'étude précise de particules isolées ou de cellules, bactéries, etc. (vivantes ou mortes) entraînées par un flux liquide ou gazeux. C'est une technique de caractérisation individuelle, quantitative et qualitative de particules en suspension dans un milieu liquide.

1-2-Principe:

Il s'agit d'analyser les signaux optiques ou physiques émis par une particule coupant le faisceau lumineux d'un laser ou d'une lampe à arc.

Les signaux mesurés sont essentiellement relatifs :

- aux propriétés optiques intrinsèques des particules.
- aux propriétés optiques induites de fluorescence obtenue par des marquages spécifiques de structures ou de fonctions cellulaires.

1-3-Principales applications:

- L'hématologie a été l'une des premières disciplines médicales à bénéficier des applications cliniques de la cytométrie en flux
- En cancérologie, la détection de la cellule pathologique est l'application la plus développée. Cette détection repose essentiellement sur la mesure d'un contenu anormal d'ADN dans le noyau de la cellule tumorale.
- L'immunologie utilise la CMF pour la détection ou l'identification des sous-types des cellules impliquées dans l'immunité.
- Le cycle cellulaire représente l'intégralité de la période de division, c'est-à-dire l'ensemble des événements biochimiques et morphologiques qui sont responsables de la prolifération cellulaire.

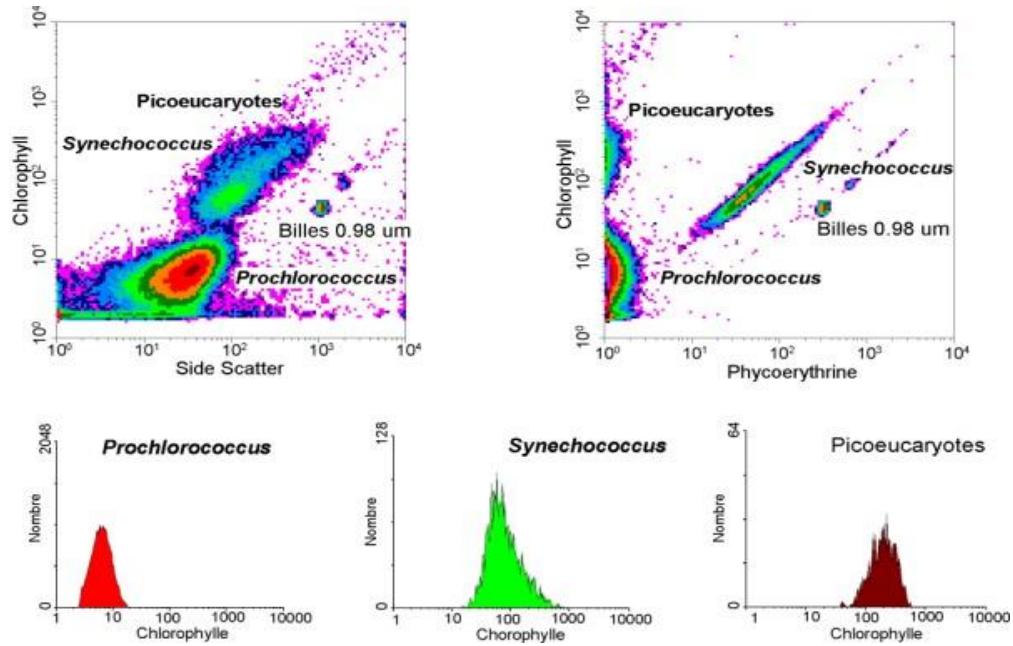


Figure n 6: utilisation de la cytométrie en flux en océanographie (https://fr.wikipedia.org/wiki/Cytom%C3%A9trie_en_flux)

2- La spectrophotométrie:

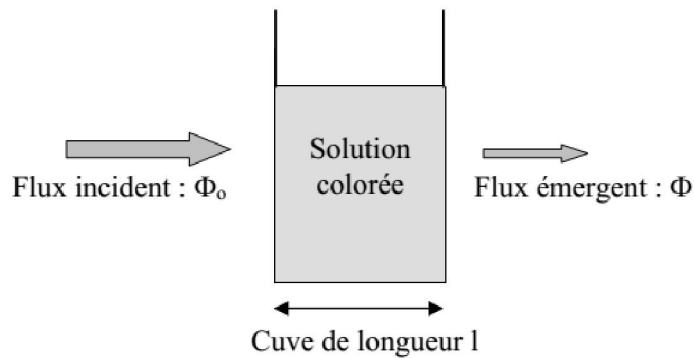
2-1-Définition:

La **spectrophotométrie** est une technique de détection qui consiste à mesurer l'absorption de la lumière à l'aide d'un composé chimique présent dans une solution. L'intensité de l'absorption de la lumière est directement proportionnelle à la concentration du composé et permet de déterminer sa quantité. La spectrophotométrie permet l'étude de solutions colorées dans l'infrarouge (1 100 nm au maximum), dans le visible et dans l'ultraviolet (190 nm).



Figure n 7: un spectrophotomètre (https://fr.wikipedia.org/wiki/Cytom%C3%A9trie_en_flux)

2-2-Grandeurs spectrophotométriques



- **Transmission** : $T = \Phi/\Phi_0$ (%)
- **Opacité** : $O = \Phi_0/\Phi$
- **Absorbance** (ou *densité optique D.O*) : $A = \log_{10} \left(\frac{\Phi_0}{\Phi} \right) = -\log_{10}(T)$

Figure n 8: grandeurs spectrophotométriques (C. Baillet, https://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/baillet/06/tp_spectro.pdf)

2-3- Application de la spectrophotométrie en microbiologie:

Détermination de la concentration en microorganismes dans une culture par spectrophotométrie :

➤ Principe

Lorsque des cellules sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des cellules. En partant d'une suspension de concentration connue, une gamme de dilution est réalisée et l'absorbance de chaque suspension est mesurée avec un spectrophotomètre. La droite **Absorbance = f (concentration en cellules)** est alors construite.

➤ Méthode:

Pour déterminer la concentration en cellules d'une suspension, on utilise une méthode graphique: on mesure l'absorbance d'un échantillon, après dilution si nécessaire, et on reporte la valeur obtenue sur la droite d'étalonnage pour en déduire sa concentration.

a-Construction de la droite d'étalonnage

- Régler le spectrophotomètre sur une longueur d'onde rouge (630 nm par exemple)
- Déterminer le zéro d'absorbance avec une cuve remplie d'eau.
- Réaliser une série de dilutions de la suspension initiale (1, 1/2, 1/4, 1/8, 1/16).
- Mesurer l'absorbance de chaque cuvette.
- Construire le graphique **Absorbance = f [cellules]**

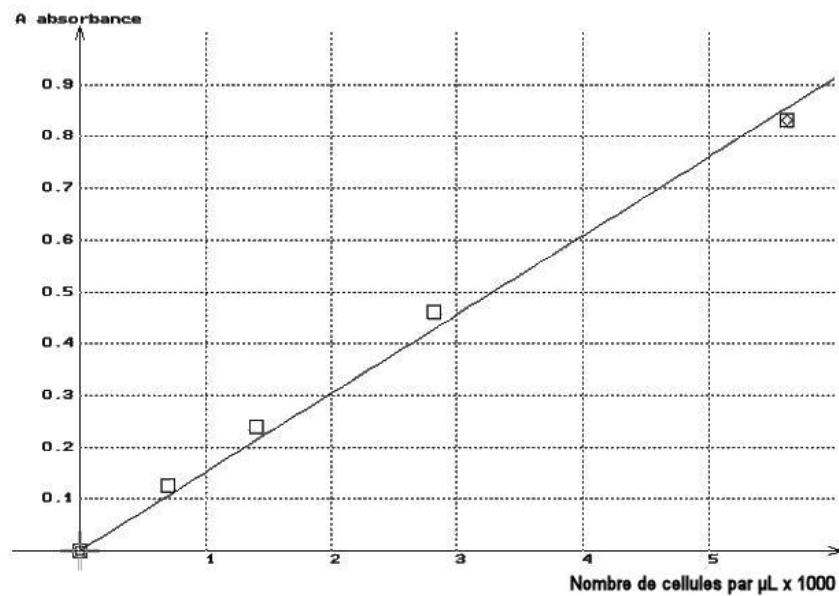


Figure n 9: droite d'étalonnage : Absorbance = f [cellules] (<http://www.didier-pol.net/3num.htm#Construction>)

b-Détermination de la concentration en cellules dans une culture

- Prélever un échantillon de la culture.
- En fonction de son aspect, faire éventuellement une dilution (comparer avec les cuvettes ayant servi à construire la droite d'étalonnage).
- Mesurer l'absorbance de l'échantillon.
- Reporter l'absorbance mesurée sur la droite et lire la concentration sur l'axe des abscisses.
- Corriger la dilution éventuelle du prélèvement.

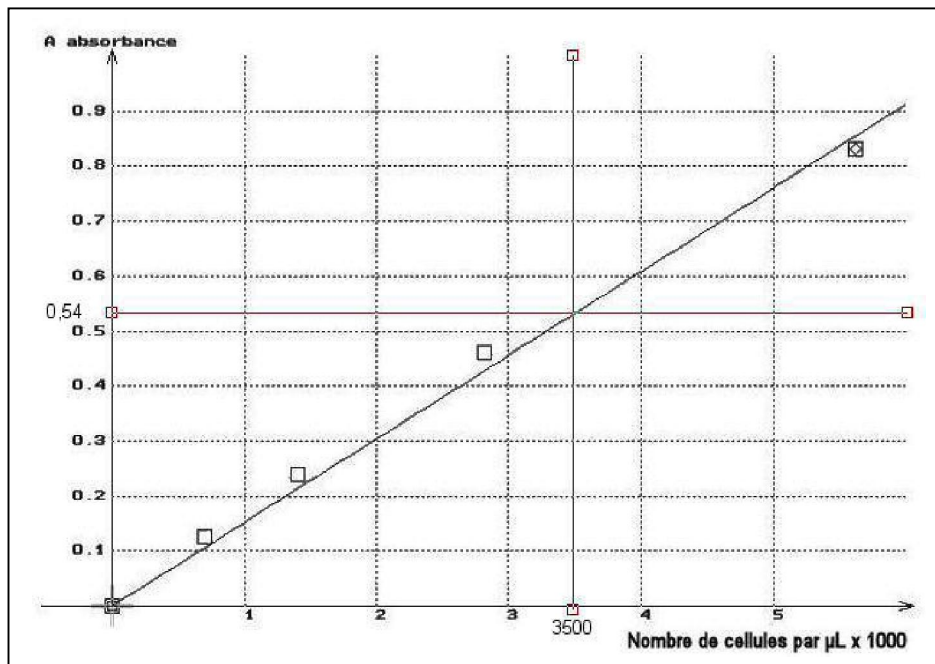


Figure n 10: détermination graphique de la concentration (<http://www.didier-pol.net/3num.htm#Construction>)
Exemple: valeur lue : absorbance = 0,54 correspondant à 3 500 cellules par microlitre

VII- Identification, recherche et numération des microorganismes dans les aliments

1- Identification des germes par techniques classiques

une liste de types de caractères est utilisée pour identifier les bactéries:

- **morphologie de la colonie** : la forme, la texture et la couleur des colonies bactériennes peuvent être caractéristiques.

- **forme, structure cellulaire et réaction aux colorants** : la coloration de gram est l'un des tests diagnostiques les plus importants. Elle apporte des informations concernant la taille, la forme et le mode de regroupement.

* **coloration des spores** : vert de malachite

***coloration de la paroi** : coloration alcool-acide de Ziehl-neelson

***coloration des capsules** : coloration négative

- **caractéristiques de la culture** : la température, le pH, et les besoins en oxygène sont utiles à l'identification bactérienne.

-**tests biochimiques** :

*les sources de C

*les produits finaux de leurs processus métaboliques comme l'acétoïne, mis en évidence par le test de Voges-Proskauer.

* les enzymes que produisent les bactéries comme les décarboxylases et les protéases

2-Galeries miniaturisées:

La première **galerie API** apparue dans le monde de la microbiologie a été la galerie Api 20E destinée à l'identification des entérobactéries. Les tests conventionnels d'identification bactérienne utilisés jusque-là en tubes y sont miniaturisés, l'inoculum bactérien est standardisé. Étendu à l'identification d'autres microorganismes, ce principe a généré toute une gamme de galeries :

- API® 20 NE ou API® 32 GN pour les bacilles à Gram négatif oxydase positif ;
- API® Staph pour les Staphylocoques ;
- API® Listeria pour les Listeria ;
- API® Candida pour les levures ;
- API® NH pour les *Neisseria* et *Haemophilus* ;

- API® 20 A pour les bactéries anaérobies ;
- API® Strep pour les *Streptococcus*



Figure n 11: Galerie API 20E d'*Escherichia coli*
(fr.wikipedia.org/wiki/Galerie_API)

3- Identification des bactéries par la technique de spectrométrie de masse (MALDI-TOF-MS)

La spectrométrie de masse (MS), technique utilisée depuis la fin du XIX^e siècle, a été appliquée dès les années 1970 à l'identification de micro-organismes.

3-1-Principe:

Le principe général du MALDI-TOF-MS est simple : des ions de masse et de charge différentes soumis à un champ électrique se déplacent, et la distance parcourue en un temps donné est fonction du rapport masse sur charge (m/z). L'une des caractéristiques importantes d'une spectrométrie de masse est la finesse des pics, mesurée par la résolution du spectromètre de masse. La résolution est définie comme étant le rapport de la masse m du pic sur la largeur à mi-hauteur Δm . Plus la résolution est élevée, plus les pics sont fins. Il est alors possible de visualiser deux molécules de masses proches.

3-2-Banques de données

L'identification des micro-organismes par cette technique repose sur la constatation que l'empreinte spectrale est différente d'un genre à l'autre et d'une espèce à l'autre .

3-3-Application en microbiologie de routine

Plusieurs laboratoires de microbiologie hospitalière mais aussi d'analyse médicale se sont récemment équipés de MALDI-TOF-MS, faisant le choix d'abandonner les tests phénotypiques classiques. Dans les études analysant les résultats obtenus en routine, le pourcentage d'identification correcte au genre des espèces les plus fréquemment isolées varie de 87 % à 99 % . Les entérobactéries ne posent pas de problème majeur avec une identification correcte de l'espèce dans 97 % à 99 % des échantillons selon les études.

4-Recherche et numération des microorganismes

4-1-Numération des germes totaux (flore totale ou germes aérobies mésophiles hétérotrophes neutrophiles)

Le dénombrement des germes totaux concerne surtout les bactéries aérobies mésophiles revivifiables après 72 h d'incubation à 30°C dans un milieu de culture bien défini ; il est en effet presque impossible de réaliser en un seul test le dénombrement de la flore totale réelle (composition du milieu, température d'incubation, atmosphère etc...).

➤ **Méthodologie**

1 ml de la suspension mère et de ses dilutions estensemencé dans la masse du milieu gélosé de numération (15 ml de milieu en surfusion à 45-47°C , 12 ml suffisent pour le lait). Cette numération peut être réalisée par étalement en surface au moyen d'un râteau, de 100 µl du produit et de ses dilutions;

➤ **Milieu préconisé (PCA)**

➤ **Interprétation des résultats :**

Il ne faut pas perdre de vue que cette numération est faussement qualifiée de totale car les germes anaérobies, les germes thermophiles, cryophiles, acidophiles etc. ne cultivent pas dans les conditions adoptées. Néanmoins, ces conditions permettent la croissance d'un grand nombre de germes dangereux et/ou susceptibles d'induire des dégradations.

On admet généralement qu'une charge microbienne **≥3.10⁸ par g (exception faite des produits fermentés)** caractérise un produit dégradé et impropre à la consommation (la norme AFNOR V 08-011).

4-2 - Recherche d'une contamination d'origine fécale

4-2-1-La colimétrie

Les **coliformes** sont des entérobactéries (bacilles gram -, asporulés, glucose+ (F), oxydase-, nitrate réductase+, aérobies anaérobies facultatifs) qui fermentent le lactose avec production de gaz à 30°C.

Les **coliformes fécaux**, donc d'origine intestinale, sont des coliformes qui fermentent le lactose avec production de gaz à 44°C. On les assimile souvent aux **coliformes thermotolérants**.

Escherichia coli est identifiable dans le groupe des coliformes fécaux par le test de MACKENZIE (production d'indole à 44°C).

➤ **Dénombrement en milieu liquide** (AFNOR, 1974)

La numération des coliformes est réalisée par ensemencement de 1 ml de l'aliment (ou de sa suspension mère) et de ses dilutions dans un bouillon lactosé bilé au vert brillant (BLBVB). Les essais sont effectués en double ou en triple et les résultats analysés par la méthode de Mac Grady.

Après ensemencement, les milieux sont incubés à 30°C pendant 24 h puis 48 h. Sont considérés comme positifs les tubes dans lesquels il y a croissance et une production notable de gaz (1/10 au moins du volume de la cloche).

La numération des coliformes fécaux (ou *E. coli* présomptif) est effectuée avec le même milieu mais après 48 heures d'incubation à 44,5°C.

➤ **Test de MACKENZIE** : une öse d'un tube positif est inoculée dans un tube de BLBVB avec cloche, et une autre dans un tube d'eau peptonée ; si après incubation à 44°C pendant 48h il y a production de gaz (BLBVB) et d'indole (mis en évidence par addition de réactif de Kovacs dans le tube d'eau peptonée) on peut soupçonner la présence d' *E. coli*. Ces recherches peuvent être confirmées par l'isolement et l'identification des bactéries productrices de gaz (isolement sur EMB par exemple).

4-2-2-Numération des streptocoques du groupe D de Lancefield

Les streptocoques du groupe D ou streptocoques fécaux font partie de la flore intestinale de l'homme et des animaux ; leur nombre varie de 10^5 à 10^7 par g de matière fécale. Ces germes sont par ailleurs abondamment répandus dans la nature (végétaux, etc...) et de ce fait leur présence dans un aliment n'indiquera pas forcément une contamination d'origine fécale.

Ces germes ne sont pratiquement recherchés que dans les produits de la pêche et l'eau.

➤ **Numération en milieu liquide** Cette numération se fait en deux étapes :

Test présomptif :

1 ml de la suspension mère (et de ses dilutions) est ensemencé dans 10 ml du milieu Roth. Après 24h (ou 48 h) d'incubation à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien. Ces tubes sont soumis au test confirmatif.

Test confirmatif :

L'addition d'éthyl violet au milieu de Rothe le rend sélectif des seuls streptocoques fécaux (milieu LITZKY) . Ce milieu est ensemencé à partir d'une öse prélevée dans les milieux de Rothe positifs. Après 24 h d'incubation (ou 48 h) à 37°C, on considère comme positif tout tube présentant un louche bactérien` avec parfois formation d'un culot violet (dans le cas où il

se forme un culot violet , le trouble peut être très léger). Pour identifier l'espèce, procéder à un isolement à partir d'une öse prélevée sur milieu de LITZKY ou de Rothe sur un milieu de BARNES.

4-3 - Recherche et numération des anaérobies sulfito-réducteurs

Ces bactéries anaérobies sulfito-réductrices sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux, mais on les rencontre fréquemment dans la nature et en particulier dans le sol (**bactéries telluriques**) et dans les matières organiques en cours de putréfaction. Ils sont souvent les seuls survivants d'une contamination ancienne de l'aliment. Parmi les *Clostridium* sulfito-réducteurs, *C. perfringens* occupe une place très importante: en effet, ce germe est très souvent à l'origine de toxi-infections d'origine alimentaire.

➤ **Technique de recherche:**

La technique de recherche a été inspirée de la **norme XP V 08 -061**. La gélose viande-foie est utilisée pour la recherche et le dénombrement des spores des anaérobies sulfito-réducteurs. La peptone viande-foie présente dans le milieu favorise la croissance des germes anaérobies en profondeur. Ces microorganismes réduisent le sulfite de sodium en sulfure, provoquant avec le citrate ferrique un précipité noir de sulfure de fer autour des colonies. Le milieu contient de l'amidon qui favorise la germination des spores.

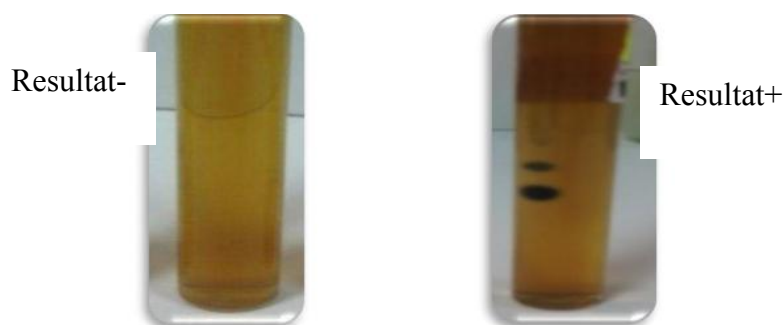


Figure n 12: aspect des colonies de *Clostridium* sulfito-réducteur sur gélose viande Foie (Bouafia et Djerrab, 2017).

4-4-Recherche et numération de *Staphylococcus aureus*

Dans les aliments le risque d'entérototoxicose devient grand quand leur nombre atteint ou dépasse les 10 000 germes/ g.

➤ **Technique de recherche:**

La technique de recherche et de dénombrement des germes est inspirée de la norme **NF V 057-1**. Le milieu liquide **Giolitti Contoni** est très utilisé comme milieu d'enrichissement pour *Staphylococcus aureus*. Il contient de la tellurite (additionnée de potassium), sa réduction en tellure par les staphylocoques se traduit par l'apparition d'une couleur noire. C'est à partir des tubes Giolitti Contoni positifs que peut être réalisé l'isolement du germe sur la gélose Chapman. L'identification finale de *Staphylococcus aureus* repose surtout sur la recherche de l'activité Coagulase (Coagulation du plasma de lapin).

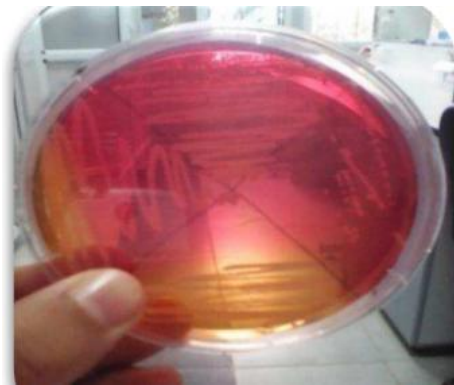
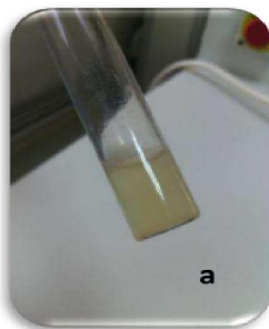
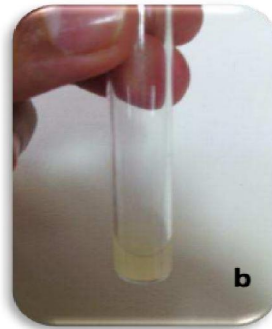


Figure n 13. *Staphylococcus aureus* sur milieu Chapman (Bouafia et Djerrab, 2017)



a- Coagulation du plasma de lapin lyophilisé (coagulase +)



b – Non coagulation du plasma de lapin lyophilisé (caogulase -)

Figure n 14: Test de coagulation (Plasma de lapin lyophilisé) (Bouafia et Djerrab, 2017)

NB: Le nombre des germes recherchés (FAMT, coliformes totaux et fécaux, streptocoques totaux et fécaux, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium* sulfito-réducteurs) est donné par la formule suivante inspirée de **la Norme XPV 08-102:**

$$N = \sum c \cdot v (n_1 + 0,1 n_2) d$$

N = nombre de germes par gramme de l'aliment

C = somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont l'une contient au moins 15 colonies.

n 1 = nombre de boîtes retenues à la première dilution

n2 = nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

d= concentration correspondant à la première dilution

4-5- Recherche de *Salmonella* (et de *Shigella*)

Il s'agit là d'un problème très important en microbiologie alimentaire. Les viandes sont les vecteurs les plus communs mais toutes les variétés d'aliments peuvent être contaminées par ces germes. La recherche de ces germes s'effectue par des tests présence ou absence et la norme est de 0 germe par g.

➤ **Technique de recherche:**

La technique de recherche des salmonelles est réalisée selon la **norme NF V 08 6- 052**. Elle consiste à déterminer la présence ou l'absence du genre *Salmonella* dans 25g de produit. Quatre étapes sont à distinguer:

✓ Enrichissement en milieu non sélectif (pré- enrichissement) :

Ensemencer l'échantillon à analyser dans un milieu liquide non inhibiteur afin de favoriser la récupération et la croissance des salmonelles soumises à un stress dû aux conditions de traitement et de conservation de l'aliment.

✓ Enrichissement en milieu sélectif :

La teneur en sélénite favorise la multiplication de la bactérie au détriment de la flore compétitrice. Les *Pseudomonas* et les *Proteus* ne sont pas totalement inhibés.

✓ Culture sur gélose sélective

Un isolement sur des milieux sélectifs permet de visualiser les colonies caractéristiques.

✓ Confirmation

C'est l'étape de confirmation qui consiste en la sélection d'une ou plusieurs colonies caractéristiques en vue de leur identification biochimique. La recherche du biotype se fait par la méthode classique ou par un mini système de type API.

Le pourcentage de *Salmonella* donnant un caractère + ou - est indiqué ci-dessous:

Caractères biochimiques	% des <i>Salmonella</i>
glucose + avec acidification	100
glucose+ (gaz)	92
lactose-	99
saccharose-	99,5
H ₂ S+	91,5
uréase-	100
LDC+	94,5
β-galactosidase-	98,5
indole-	99
VP-	100

Généralement, la présomption de présence de *Salmonella* suffit pour satisfaire aux buts de l'analyse, et cette présomption est acquise dès la fin de l'isolement sur SS ou autre milieu équivalent.

4-6- Recherche des *Shigella*

Les aliments à suspecter sont ceux qui sont manipulés sans chauffage et dont le pH est compris entre 6,5 et 7,5. La recherche de ces germes est réalisable avec la même méthodologie que celle utilisée avec *Salmonella*.

4-7 - Recherche indirecte de *Brucella*

Cette recherche est effectuée dans le lait (surtout de chèvre) par sérologie (**Ring test ou test de l'anneau**)

➤ Principe:

La réaction à l'antigène au Rose Bengale ou antigène tamponné, est une réaction d'agglutination rapide utilisant comme suspension bactérienne, *Brucella abortus*, colorée au Rose Bengale en milieu acide tamponné. Après mélange à parts égales d'antigène au Rose Bengale et d'anticorps anti-*Brucella* on observe l'apparition d'agglutinats colorés en rose.

➤ Protocole:

1 ml de lait est mélangé avec 1 goutte d'antigène coloré. Si l'échantillon de lait est positif, les germes colorés qui constituent l'antigène sont agglutinés et adhèrent aux globules gras qui, en s'élevant dans le lait, forment un anneau teinté. La rapidité de la réaction est fonction de l'âge du lait testé et de sa teneur en matières grasses. Elle est plus rapide sur un lait frais et est accélérée par incubation à 37°C (lecture en 30 minutes).

Test positif : anneau de crème bleu violet, lait sous jacent blanc

Test négatif : anneau de crème blanc, lait sous jacent bleu violet clair



Figure n 15: la recherche de *Brucella* dans le lait

4-8 - Recherche et/ou numération de *Vibrio cholerae*

La recherche de cette bactérie ne s'effectue que dans des cas bien précis (épidémies, etc...).

➤ **Enrichissement (eau peptonée alcaline)**

1 ml d'eau est additionnée à ce milieu. Après 6 h d'incubation à 37°C, on prélève une öse en surface et on ensemence un second tube qui est à son tour incubé 6 h à 37°C ; l'isolement est réalisé à partir d'une öse prélevée en surface.

➤ **Isolement:**

L'isolement des *Vibrio cholerae* est réalisé sur milieu TCBS. Ce milieu permet la croissance rapide de *V. cholerae* en 15 h à 37°C. *V. cholerae* donne sur ce milieu des colonies jaune brun (saccharose+) de 2 à 3 mm de diamètre.

4-9- Recherche de *Mycobacterium tuberculosis*

M. tuberculosis est recherché directement dans les produits alimentaires (lait) et mis en évidence par la coloration de ZIEHL. La spécificité de la coloration repose sur la propriété d'alcool-acido-résistance du germe (AAR).

Après centrifugation à 3 000 g pendant 10 minutes du produit liquide (lait par exemple) on réalise des frottis à partir du culot et dans le cas du lait de la crème. Après séchage et fixation à l'alcool absolu, on effectue la **coloration de Ziehl**.

➤ **Protocole de la coloration de Ziehl:**

-Réaliser un frottis et le fixer. Ce frottis ne doit être ni trop fin ni trop épais.

-Faire agir à chaud de la fuchsine phéniquée concentrée.

-Le chauffage se fait habituellement sur une platine chauffante pendant 10 minutes à partir de

l'émission de vapeurs blanches. Il est nécessaire de rajouter régulièrement de la fuchsine pour éviter que le frottis se dessèche

-Rincer soigneusement la lame à l'eau.

-Placer le frottis dans un bain d'acide nitrique au 1/3 ou sulfurique au 1/4 pendant 2 minutes.

-Rincer la lame à l'eau.

-Placer le dans un bain d'éthanol à 0.95 pendant 5 minutes.

-Rincer la lame à l'eau et égoutter.

-Colorer au bleu de méthylène phéniqué pendant 1 minute.

-Sécher et rincer à l'eau.

-Observer à l'immersion (objectif X100).

Les bacilles de KOCH (*M. tuberculosis*) se présentent sous forme de bacilles fins et longs colorés en rose sur fond bleu. L'observation de plusieurs dizaines de champs microscopiques est nécessaire avant de conclure.

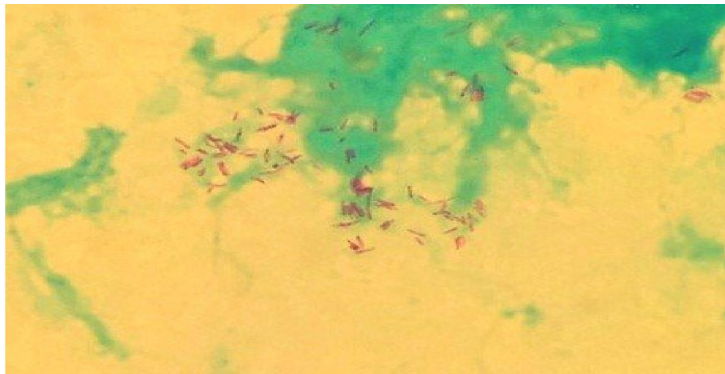


Figure n16: observation microscopique des mycobactéries
(<https://microbiologiemedicale.fr/coloration-mycobacteries-ziehl-auramine/>)

4-10 - Recherche de *Listeria monocytogenes*

Or, cette bactérie étant ubiquitaire, on la retrouve en faible quantité mais dans un très grand nombre d'aliments.

➤ **Protocole de la norme AFNOR V 08-055**

-Deux enrichissements successifs à partir du prélèvement de 25g d'aliment: d'abord en bouillon de Fraser, demi incubé 24h à 30°C, puis en bouillon de Fraser incubé 48h à 37°C.

- Isolements sur milieux sélectifs: les plus courants sont la gélose Oxford et le milieu Palcam: incubation 24 à 48h à 37°C.

- Les colonies suspectes sont identifiées: confirmation du genre *Listeria* puis détermination de l'espèce. La détermination de l'espèce repose sur des caractères cultureux ou biochimiques

(β hémolytique sur gélose trypticase soja au sang de mouton ou de cheval, Camp test positif, fermentation des sucres) ou sur l'ensemencement d'une galerie API *Listeria*

➤ **Méthodes rapides de recherche de *Listeria monocytogenes***

➤ **par hybridation moléculaire:**

– Un échantillon de la culture (suspension des colonies suspectes) est traité au lysozyme puis à la soude afin de libérer l'ARN ribosomal.

– Hybridation en présence d'une sonde dite de détection, marquée à la fluorescéine et d'une autre sonde dite de capture comprenant une queue poly dA du côté 3' de la sonde.

– Capture des hybrides mixtes dans un tube en plastique porteur de séquences poly dT ; lavage

– Le tube est mis en présence d'anticorps anti fluorescéine marqués avec une enzyme de type peroxydase; lavage.

– Les immuns complexes sont révélés grâce à un substrat chromogène de l'enzyme.

➤ **Par PCR:** Probelia (Biorad-Pasteur) commercialise un kit permettant de détecter *Listeria monocytogenes* par amplification génétique : la sonde utilisée est spécifique du gène codant pour l'enzyme listériolysine O (enzyme permettant la survie intracellulaire de la bactérie). La recherche se fait sur le bouillon d'enrichissement.

4-11 - Recherche et numération de *Bacillus cereus* et de *Bacillus sp*

➤ **Numération sur milieu de Mossel**

La numération est réalisée sur le milieu sélectif de Mossel à base de jaune d'œuf, de mannitol et de polymyxine. Inoculer 0,1 ml de la suspension mère et de ses dilutions sur la surface séchée du milieu. Incuber 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 dû à l'activité lécithinolytique.

➤ **Identification**

Les colonies de *B. cereus* sont facilement repérées ; il s'agit de colonies crénelées, de 5 mm de diamètre, de couleur rose à rouge (absence de fermentation du mannitol) et entourées d'un halo de précipité blanchâtre (présence d'une lécithinase). Les colonies suspectes sont dénombrées et identifiées par les techniques classiques de la bactériologie.

VIII- Réalisation d'un contrôle

1-Contrôle de matière première:

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

➤ Exemple 1: Analyse bactériologique de l'eau potable:

L'eau doit présenter également une potabilité du point de vue bactériologique. Ne pas contenir dans le cas d'une eau traitée des coliformes totaux et fécaux ni de *Clostridium* sulfito-réducteur, qui constituent des indicateurs de pollution par les matières fécales. Une analyse complète de l'eau brute s'effectue en se basant sur les paramètres suivants:

- Recherche et dénombrement des germes totaux sur milieu PCA.
- Recherche et dénombrement des coliformes totaux et fécaux par la méthode du nombre le plus probable (NPP), **AFNOR NF T90-413**
- Recherche et dénombrement des Streptocoques fécaux par la méthode du nombre le plus probable (NPP), **AFNOR NF T90-413**.
- Recherche et dénombrement des *Clostridium* sulfito-réducteurs dans la gélose viande foie (VF+, alun de fer et sulfite de sodium) .
- Recherche de *Salmonella* : pré-enrichissement, enrichissement puis isolement et identification.
- Recherche de *Vibrio cholerae* par enrichissement en eau peptonée alcaline et isolement sur milieu TCBS

Les valeurs obtenues sont comparées avec la norme Algérienne NA 6360-1992 inspirée des normes de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS) relatives aux eaux et des normes prescrites dans les directives de la Communauté Économique Européenne (CEE).

➤ Exemple 2: Qualité microbiologique de l'eau dans une "usine agroalimentaire"

Le cahier des charges concernant la qualité de l'eau dans l'usine doit être très rigoureux. Par exemple la présence de germes saprophytes psychrotrophes a une incidence sur la stabilité des aliments réfrigérés. Des germes comme *Sphaerotilus* ou *Leptothrix* peuvent bloquer des transferts d'eau dans les canalisations.

➤ **Exemple 3: Analyse du lait cru**

✓ **Prélèvement des échantillons**

Il est réglementé par arrêté ministériel et peut être effectué à tous les stades depuis la traite jusqu'à la vente. Le volume prélevé est en général de 50 à 100 ml pour les laits liquides. Le nombre de prélèvements pour le contrôle du lait dans un atelier de traitement est au minimum égal à :

2 pour une quantité de lait traitée de 5 m³ par jour

3 pour une quantité de lait traitée comprise entre 5 et 10 m³

5 pour une quantité de lait traitée supérieure à 10 m³ par jour

L'intervalle entre 2 prélèvements doit être supérieur à 15 minutes

✓ **Analyses microbiologiques:**

• **Examens microscopiques**

Ces examens ne sont pas réalisés dans les analyses de routine mais dans le cas de laits anormaux, ils concernent:

***Estimation de la charge microbienne (comptage direct)**

***Etude cytologique:** Cette étude est effectuée à partir de lait cru individuel.

-Le lait est maintenu 5 minutes à 37°C, puis centrifugé stérilement à 3000 g pendant 10 minutes. Le culot de centrifugation est mis en suspension dans le liquide restant après décantation et étalé comme un frottis sanguin (en "tirant" la goutte).

-Après séchage à l'air, le frottis est fixé par immersion dans l'alcool absolu pendant 5 minutes.

-Colorer au bleu de méthylène phéniqué pendant 5 minutes et différencier rapidement par l'alcool à 60°.

-Laver à l'eau et examiner après séchage à l'immersion. Compter alors une centaine d'éléments cellulaires qui seront classés en éléments normaux et éléments anormaux.

-Calculer le rapport suivant:

m/p = nombre de mononucléaires/nombre de polynucléaires

Si m / p est compris entre 0,5 et 1, le lait est "normal".

m/p est inférieur à 0,5 en cas de mammite aigüe et supérieur à 1 en cas d'infection tuberculeuse.

***Etude de la flore bactérienne : orientation morphologique**

Cette étude se fait après coloration de Gram, elle permet de distinguer:

- **Flore normale du lait cru** : surtout des bactéries Gram+ (diplocoques, streptocoques, bacilles, streptobacilles).
- **Flore anormale** : bactéries Gram-, longs streptocoques Gram + (20 à 100 cellules) traduisant une mammite streptococcique (*Streptococcus agalactiae*).

- **Recherche du bacille de KOCH**

Cette recherche se fait après centrifugation du lait pendant 5 minutes à 3000 g.

- **Dénombrement de la flore aérobie (10^{-4})**

Ce dénombrement est réalisé sur gélose au lait papaïné (milieu de CHEVALIER-GUITONNEAU). Le comptage est effectué après 72 h d'incubation à 30°C

- **Numération des indologènes**

Cette numération se fait en eau peptonée après 48 h d'incubation à 37°C (ajouter 2 à 3 gouttes de réactif de Kovacs par tube ; la présence d'indole se traduit par la formation d'un anneau rouge vif en surface). La flore normale du lait est indole négatif; les germes indologènes ont une bonne probabilité de correspondre à des entérobactéries indole + (*Escherichia, Providencia, Proteus, Edwardsiella* ,...)

- **Colimétrie**

Par la recherche des coliformes totaux et fécaux

- **Flore thermorésistante**

Il s'agit de germes résistants à un chauffage de 30 minutes à 63°C (pasteurisation basse). L'importance de cette flore est qu'elle permet d'évaluer la pollution liée à la traite et d'envisager les techniques de pasteurisation adéquates. 10 ml de lait sont chauffés, dans un tube à essai, à 63°C pendant 30 minutes. Après refroidissement procéder comme pour le dénombrement de la flore totale.

- **Recherche des staphylocoques pathogènes après enrichissement**
- **Numération des streptocoques fécaux**
- **Recherche des *Brucella* (Ring test)**
- **Recherche des *Salmonella* et *Shigella* (25 ml)**
- **Recherche des anaérobies sulfito-réducteurs**

✓ **Analyses chimiques et biochimiques associées à l'analyse microbiologique**

La couleur, la saveur, l'odeur et la consistance du lait sont notées.

➤ **Les normes du lait cru**

Acidité titrable < 21°D

Réductase > 3 h

Indologènes m = 100 / ml

Coliformes m = 100 / ml

Anaérobies sulfito-réducteurs m = 50 / ml

2- Contrôle des produits finis

Le contrôle microbiologique des produits finis porte sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande.

➤ **Exemple 1: Analyse des laits fermentés (yaourts, kéfir, etc...).**

La flore normale du yaourt est composée de *Streptococcus thermophilus* (ferment d'arôme) et de *Lactobacillus bulgaricus* (ferment d'acidification). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bifidus* représentent la flore de laits fermentés "Bio". Le kéfir subit une fermentation lactique par *Streptococcus lactis* puis une fermentation alcoolique (*Candida kefir*) et enfin une fermentation par *Lactobacillus acidophilus*.

✓ **Analyse microbiologique des laits fermentés:**

L'analyse microbiologique des laits fermentés concerne les paramètres suivants

1- Flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁸)

2- Coliformes (totaux et fécaux) et *E. coli* (1 ml - 10⁻³)

3- Indologènes (1 ml - 10⁻³)

4- *Salmonella* (/25 ml)

5- Levures et moisissures (1 ml - 10⁻²)

6- Acidité

✓ **Normes** : m = 10 indologènes / ml , m = 10 coliformes / ml, m = 1 coliforme fécal/ 1ml, m = 0 *Salmonella* / 25 ml.

➤ **Exemple 2: Analyse des viandes et produits carnés**

25 g de viande sont broyés dans 225 ml de diluant. L'analyse microbiologique des viandes concerne les paramètres suivants:

1) Flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁵) m = 5.10⁵/g

2) Coliformes fécaux (1 ml - 10⁻³) (m = 10²/g)

- 3) Indologènes (1 ml - 10^{-5})
- 4) Anaérobies sulfite-réducteurs (1 ml- 10^{-2}) après 10 mn à 85°C m = 30/g
- 5) *Staphylococcus aureus* (1 ml - 10^{-1}) m = 10^2 /g
- 6) *Salmonella* (25 g) m = 0/25g
- 7) *Bacillus cereus* (1 ml)

➤ **Exemple 3: Analyse des volailles**

La volaille peut être introduite entière dans un sac stérile en polyéthylène et être soumise à un “massage” en présence d’une quantité donnée de bouillon tryptone-sel. L’analyse sera alors réalisée sur une partie aliquote de la suspension obtenue. Il est possible de procéder à des prélèvements “découpés”.

La flore aérobie mésophile totale, les coliformes, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Clostridium perfringens*, *Streptococcus D* et *Campylobacter* sont soit comptés soit recherchés.

Une FAMT peu nombreuse indique que les contaminants sont peu nombreux et un nombre peu élevé de coliformes fécaux indique une bonne hygiène de préparation alors qu’un nombre peu élevé de Streptocoques D reflète une éviscération correcte et une bonne hygiène .

3- Contrôle de nettoyage et de la désinfection

Ce type d’analyse est nécessaire pour évaluer l’efficacité des procédures de nettoyage/sanitation pour rechercher d’éventuels points critiques et pour contribuer à l’éducation des personnels.

-Les prélèvements sur les surfaces (sols, tables, murs etc...) sont réalisables au moyen de lames ou de boîtes contact avec des milieux adaptés ou par écouvillonnage ou par rinçage.

-Par les **géloses contact** (boîtes ou lames), il est possible d’estimer la flore totale aérobie mésophile, les entérobactéries, les staphylocoques ou encore les levures et moisissures contaminants de surfaces diverses.

-Pour contrôler les **bouteilles en verre** après leur lavage (ou avant leur remplissage par le liquide alimentaire qu’elles sont supposées recevoir), utiliser les milieux solides classiques des flores à rechercher en augmentant leur teneur en gélose de 0,5 %:

PCA (flore totale), Baird Parker (*Staphylococcus*), DCL (coliformes), MRS (*Lactobacillus*), RCM (*Clostridium*), BCP (*Bacillus*).

➤ **L’analyse de l’air** est importante à réaliser car les germes “aériens” sont souvent des germes de contamination de produits . Ce sont surtout des bactéries et des spores de moisissures qui sont en suspension dans l’air, sous forme d’unités individuelles ou de petits

amas. Il est possible de laisser des boîtes de Pétri (contenant les milieux adaptés) ouvertes dans les zones à contrôler pendant des temps variables qui dépendent de la densité de contamination.

4-Contrôle des levains:

On entend par « organismes de contamination » tout micro-organisme autre que ceux responsables de fermentations spécifiques de produits fermentés considérés (Arrêté du 27 mars 2004 publié dans le JORA n° 32 du 23 mai 2004) (des entérobactéries, des entérocoques, des *Staphylococcus aureus* et des levures/moisissures et de la flore totale aérobie mésophile (FTAM)).

➤ Exemple: Contrôle de pureté et de stabilité d'un levain de brasserie

Ces contrôles visent à démontrer l'absence de contamination par des bactéries en montrant la pureté du levain et que celui-ci correspond bien à *Saccharomyces cerevisiae*, en étudiant ses caractéristiques morphologiques et biochimiques.

A partir d'une suspension de levain, on réalise successivement :

- un ensemencement sur gélose Sabouraud (pour vérifier la pureté de la souche),
- un ensemencement d'une galerie API 20C AUX (pour vérifier ses caractéristiques biochimiques),
- une observation au microscope optique du levain (pour vérifier ses caractéristiques morphologiques).

✓ Ensemencement sur gélose Sabouraud :

L'ensemencement est réalisé par isolement sur un milieu gélosé en boîte de Pétri.

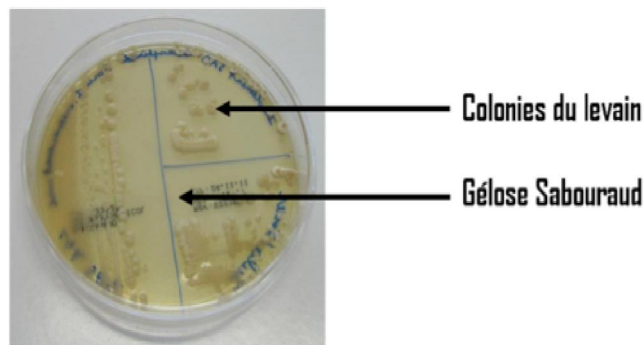


Figure n 17: Observation macroscopique de la levure après incubation 24h à 30°C (<https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article602>)

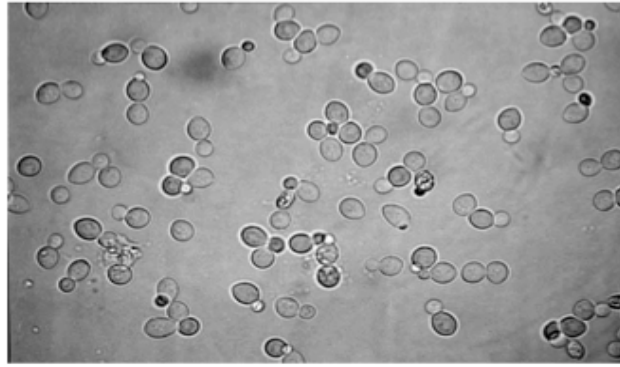


Figure n 18: Observation microscopique de la levure après incubation 24h à 30°C (<https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article602>)

✓ **Ensemencement d'une galerie API 20C AUX:**

La galerie API20C AUX constitue un outil permettant de vérifier l'identité d'une levure en étudiant ses caractères biochimiques.



Figure n19: La galerie API 20CAUX (<http://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spis.php?article602>)

5-Interprétation des résultats : Plan à deux et à trois classes

Il existe deux types de plan d'échantillonnage qui sont applicables à des systèmes aliments – germes - consommateurs bien identifiés.

➤ **Plan à 2 classes**

Ce plan donne des résultats permettant de déterminer 2 classes de contaminations. Il n'accepte aucune tolérance et correspond le plus souvent aux conclusions : *absence dans* (le résultat est bon et le produit jugé satisfaisant) ou encore *présence dans* (le résultat est mauvais et le produit est déclaré impropre à la consommation).

Le symbole **c** représente le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil, nombre qui permet de juger le lot comme satisfaisant.

- ✓ **Exemple** : Pour les viandes de volailles contaminées en surface par *Salmonella*,
 $m = 0, n = 5, c = 1$

Pour la plupart des autres produits on a avec cette bactérie et d'autres microorganismes très dangereux (*Listeria, Brucella*, etc) $m = 0, n = 5$ et $c = 0$.

➤ **Plan à trois classes:** Dans le cas de normes chiffrées, l'interprétation des résultats tient souvent compte de la tolérance analytique :

m		3 m		M = 10 m		S = 10 ³ m		en milieu solide	
		10 m		M = 30 m		S = 10 ³ m		en milieu liquide	
SATISFAISANT		ACCEPTABLE si c/n ≤ 2/5		NON SATISFAISANT		NON SATISFAISANT		NON SATISFAISANT Produit toxique ou corrompu	
		NON SATISFAISANT si c/n > 2/5							

m = critère fixé.

3m est un seuil limite de qualité satisfaisante tenant compte de la tolérance analytique (limite supérieure IC 95%)

M = seuil Maximum ou limite d'acceptabilité:

M = 10 m pour un dénombrement en milieu solide

M= 30 m pour un dénombrement en milieu liquide

n: est le nombre d'unités échantillonnage (en général 5)

c: est le nombre d'unités échantillonnage donnant des résultats compris entre 3 m (10m) et M

S: seuil de toxicité = m.1000

Ce plan se caractérise par l'analyse de plusieurs échantillons provenant d'un lot. La tolérance analytique de 3m (milieu solide) et 10m (milieu liquide) est appliquée.

- ✓ **La qualité du lot est considérée comme satisfaisante:** Lorsque les valeurs observées pour les 5 unités d'échantillon sont < 3m
- ✓ **La qualité du lot est considérée comme acceptable:** Lorsque les valeurs observées sont comprises entre 3 m et 10m (= M) en milieu solide (10 m et 30 m en milieu liquide), avec c/n < 2/5.
- ✓ **La qualité du lot est considérée comme non satisfaisante:**
Dans tous les cas où 01 d'échantillons présente une valeur supérieure à M ou lorsque c/n > 2/5, c'est-à-dire que plus de **c** échantillons sur n donnent un résultat supérieur à 3m (10m).
- ✓ **Le produit doit être considéré comme toxique ou corrompu**
Lorsque la contamination atteint une valeur limite généralement de 10³m.

NB: Pour *S.aureus*, cette valeur ne doit jamais dépasser 5.10⁴ germes par g ou par ml.

Partie II: Travaux pratiques

TP N1 Numération directe des germes par la cellule de Malassez

I. Introduction:

Le comptage cellulaire fait partie du quotidien du biologiste cellulaire. C'est une étape obligatoire, parfois fastidieuse mais incontournable en culture cellulaire. Elle permet d'avoir une information qualitative, et surtout quantitative sur sa culture cellulaire à un temps T.

II. Principe du comptage direct:

La détermination du nombre de cellules contenues dans un volume précis de milieu liquide. On exprime le résultat de la numération en concentration cellulaire, c'est à dire en nombre de cellules par millilitre. Elle est réalisée directement par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale (Cellule de Malassez).

III. Objectif du TP:

C'est de réaliser un dénombrement des cellules de *Saccharomyces cerevisiae* par la cellule de Malassez à partir d'une solution préalablement préparée.

IV. Technique:

IV.1. Dilution:

Une solution de *Saccharomyces cerevisiae* est préparée. Si elle est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable.

IV.2. Remplissage de la cellule:

Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux. Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci (0.01 mm³) à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.

IV.3. Comptage des cellules:

- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage.

IV.4. Calcul de la concentration cellulaire:

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

Soient : -n : nombre de cellules comptées.

-V : volume de comptage.

-f : facteur de dilution.

-N : nombre de cellules par millilitre.

Si on a n cellules dans V millilitre, alors on a N cellules dans un millilitre :

$$N \times V = n \times 1 \quad N = n / V$$

Si la solution avait été diluée : $N = (n / V) \times f$

Mode opératoire

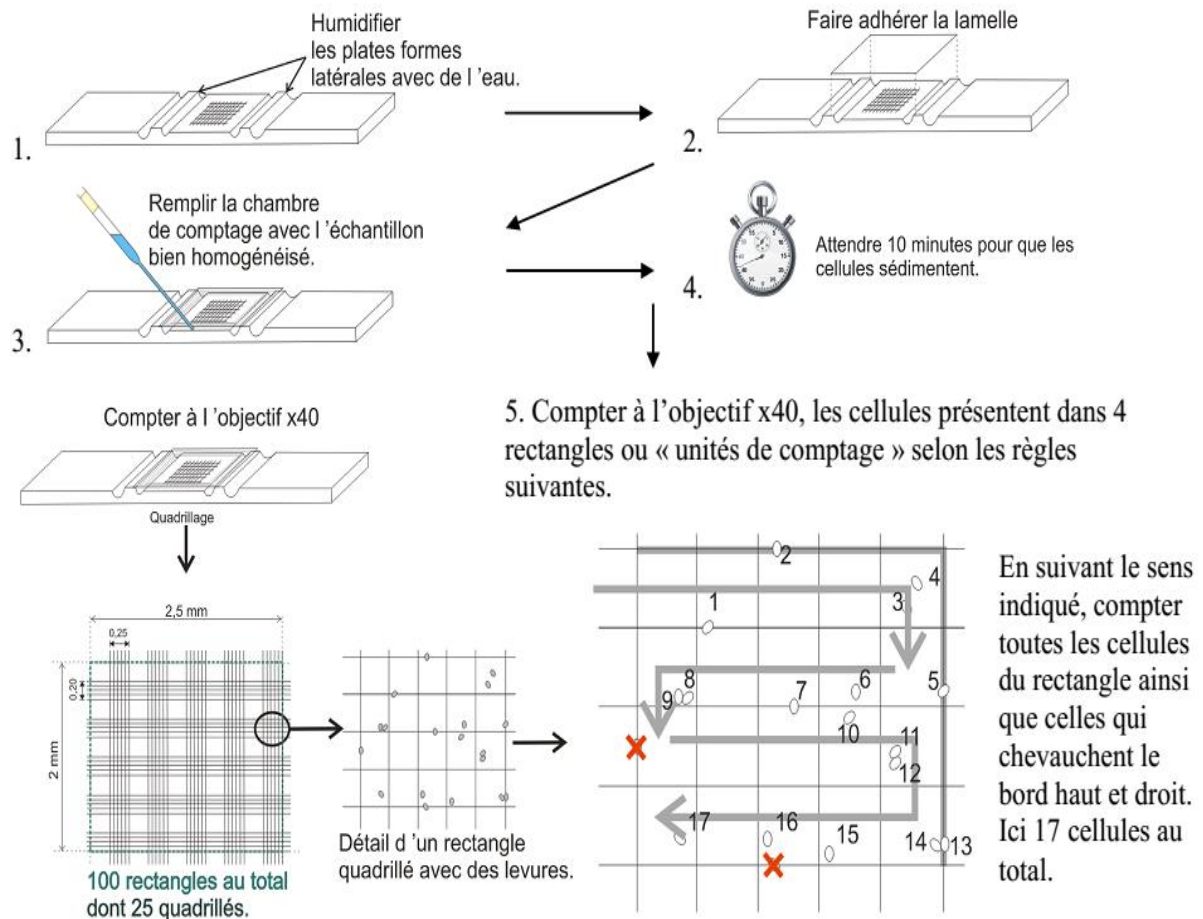


Figure n 20: dénombrement de cellules de *Saccharomyces cerevisiae* par la cellule de Malassez (Moreda, 2013)

TP N2: Contrôle bactériologique des eaux destinées à la consommation humaine

I-Introduction:

L'eau destinée à l'alimentation humaine est prélevée d'eaux brutes naturelles, possédant des qualités intrinsèques définies. Elle est déclarée potable si elle est conforme aux normes c'est à dire qu'elle doit être exempte de tout organisme pathogène.

II-Objectif:

Dans ce TP nous allons essayer de déterminer la qualité bactériologique des eaux de sources, prélevées de différents points de la wilaya de Skikda (Filfila, El Harrouche et Beni Ouelbane) et ce en dénombrant les coliformes totaux, les coliformes fécaux, les streptocoques totaux et les streptocoques fécaux par la méthode du nombre le plus probable (NPP).

III-Prélèvements:

Les prélèvements des eaux potables sont effectués dans des bouteilles en plastique de 250ml. Après le remplissage la bouteille porte le nom de la source du prélèvement.

IV-Matériel utilisé:

Le matériel et les milieux de cultures nécessaires pour la recherche et le dénombrement des germes sont:

- Des portoirs.
- Pipettes pasteur
- Incubateur
- Table NPP de Mac Crady
- Milieu lactosé (BCPL) double concentré (D/C) et simple concentré (S/C) muni de cloche de Durham.
- Milieu indole mannitol (Schubert) muni d'une cloche de Durham.
- Bouillon à l'azide de sodium (Rothe) double concentré (D/C) et simple concentré (S/C)
- Bouillon de l'éthyle violet et de sodium (Eva)
- Réactif d'Erlisch Kovacs

V-Méthode:

La méthode utilisée a été inspirée de la norme **AFNOR NF T90-413**.

V-1-Recherche des coliformes totaux et fécaux: La recherche des coliformes comporte deux tests, l'un présomptif et l'autre confirmatif.

a. Test présomptif :

Pour ce test nous utilisons le milieu BCPL double concentration D/C et simple concentration (S/C) et tous les tubes sont munis de cloches de Durham pour déceler le dégagement éventuel de gaz dans le milieu. Nous avons travaillé avec une série de 3 tubes en commençant par :

- Trois tubes de BCPL D/C avec 10ml de l'échantillon
- Trois tubes de BCPL S/C avec 1ml de l'échantillon
- Trois tubes de BCPL S/C avec 0.1ml de l'échantillon

Les tubes sont agités pour une homogénéisation avec la précaution de ne pas faire pénétrer d'air dans la cloche de Durham. La lecture se fait après 48h d'incubation dans une étuve à 37°C. Tous les tubes présentant un aspect trouble de couleur jaune et du gaz dans la cloche, sont considérés comme positifs, c'est à dire contenant des coliformes totaux. Nous avons noté le nombre de tubes positifs dans chaque série et nous nous sommes reportées à la table du NPP (Annexe.1) pour obtenir le nombre de coliformes totaux présents dans 100ml d'échantillon.

b. Test confirmatif :

A partir de chaque bouillon BCPL positif pour la recherche de coliformes totaux, nous avonsensemencé 5 à 6 gouttes dans un tube de milieu de Schubert muni d'une cloche de Durham. Après incubation de 24h dans une étuve à 44°C, tous les tubes présentant une culture (trouble bactérien), du gaz dans la cloche et une réaction indole positive (anneau rouge cerise en surface) après addition de quelques gouttes du réactif d'Erlich Kovacs, sont considérés comme positifs, c'est à dire comme contenant des coliformes fécaux dans 100ml d'eau et particulièrement comme contenant *E. coli*. Nous avons noté le nombre de tubes positifs dans chaque série et nous nous sommes reportées à la table du NPP pour obtenir le nombre de coliformes fécaux présents dans 100ml d'échantillon.

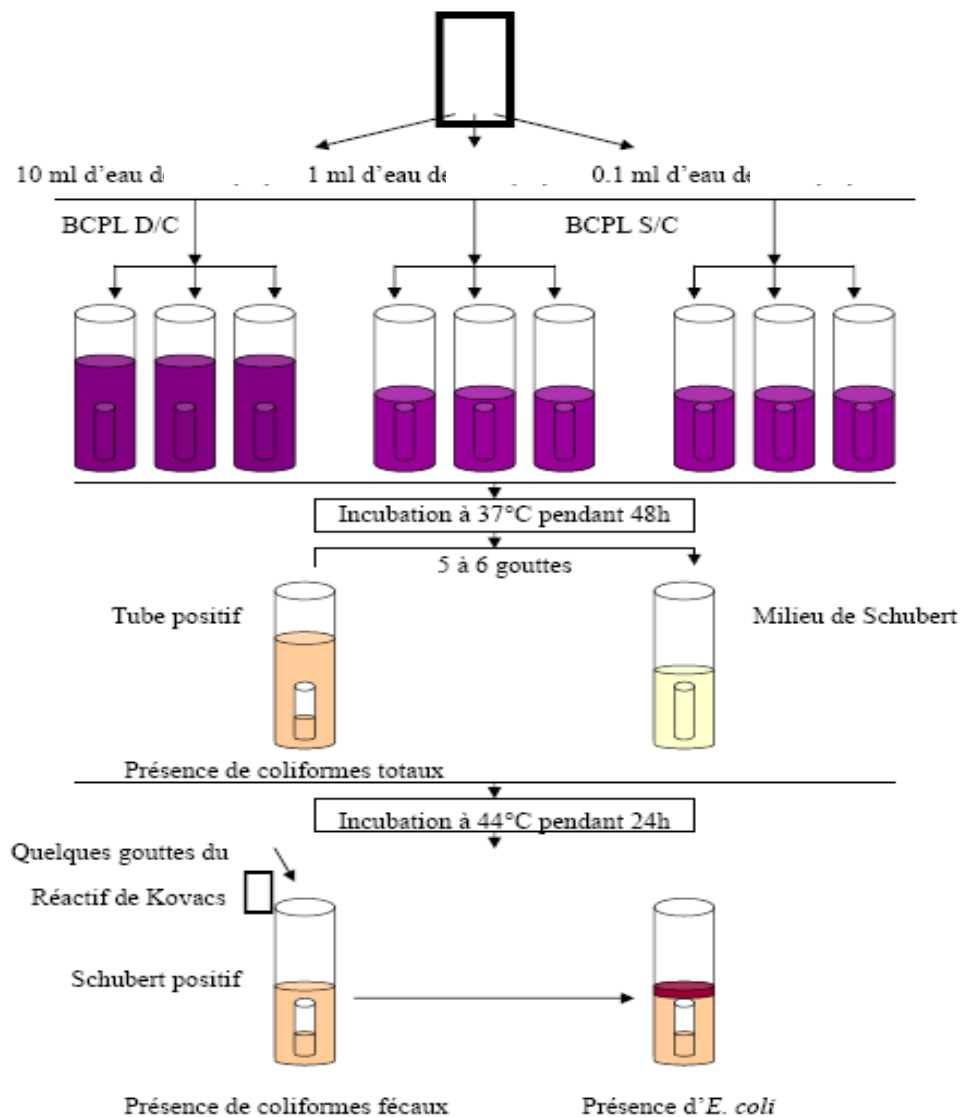


Figure n 21: dénombrement des coliformes totaux et fécaux (Colimétrie)

V-2-Recherche des streptocoques fécaux :

Comme pour les coliformes totaux, la recherche des streptocoques fécaux comporte deux phases de tests ; l'une présomptive et l'autre confirmative

a. Test présomptif :

Pour ce test nous avons utilisé le milieu Rothe D/C et S/C et nous avons travaillé avec une série de 3 tubes. Nous avons ensemencé :

- Trois tubes de Rothe D/C avec 10ml de l'échantillon
- Trois tubes de Rothe S/C avec 1ml de l'échantillon
- Trois tubes de Rothe S/C avec 0.1ml de l'échantillon

Les tubes sont agités pour une homogénéisation. La lecture se fait après 48h d'incubation dans une étuve à 37°C. Tous les tubes présentant un louche microbien sont considérés comme

pouvant contenir des streptocoques fécaux et ils sont obligatoirement soumis au test confirmatif. Nous avons noté le nombre de tubes positifs dans chaque série.

b. Test confirmatif :

Après agitation, à partir de chaque milieu de Rothe positif, nous avons ensemencé 5 à 6 gouttes dans un tube du bouillon Eva. Après incubation de 24h dans une étuve à 37°C, tous les tubes présentant une culture et un jaunissement, sont considérés comme positifs. Nous avons noté le nombre de tubes positifs dans chaque série et nous nous sommes reportées à la table du NPP pour obtenir le nombre de streptocoques fécaux présents dans 100ml d'échantillons. Les valeurs obtenus sont comparés avec la norme Algérienne NA 6360-1

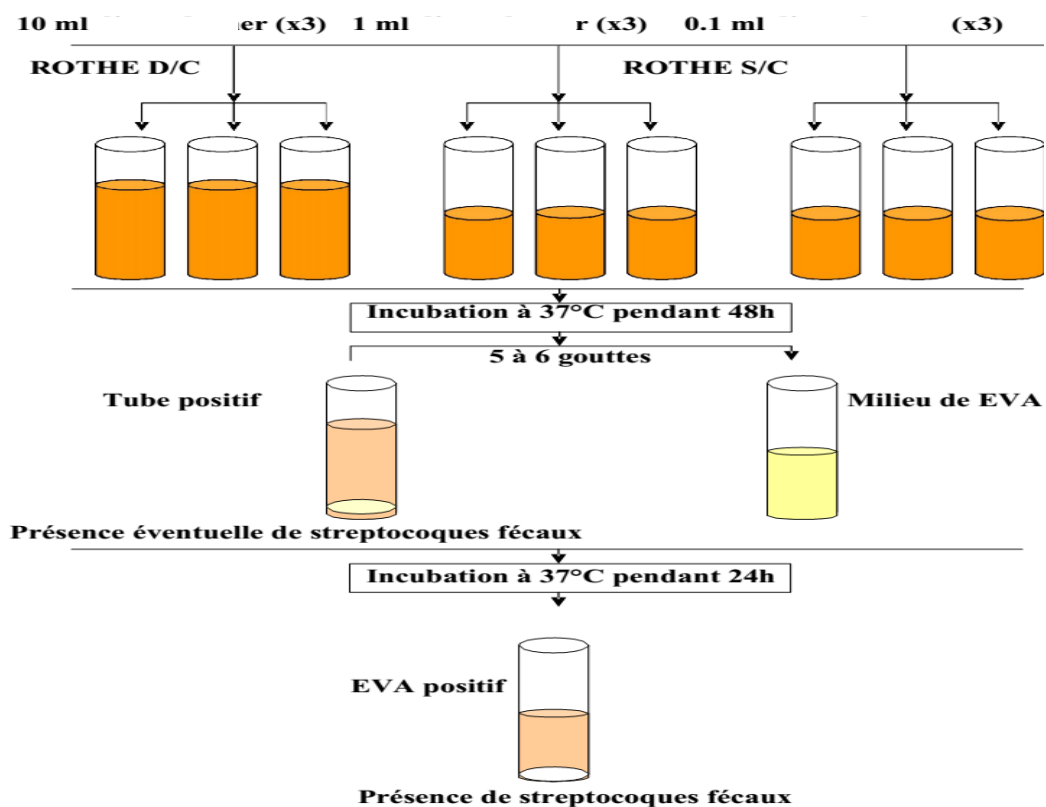


Figure n 22: recherche des streptocoques totaux et fécaux

TP N3 Contrôle de la qualité microbiologique de la viande

I-Introduction:

La viande est la chaire des animaux utilisée pour l'alimentation humaine. Elle doit garantir une totale innocuité et de ce fait préserver la santé du consommateur. De ce fait, il ne doit contenir aucun résidu toxique, aucun parasite, ni être le siège d'un développement bactérien susceptible de produire des éléments nocifs. Cette caractéristique doit satisfaire aux normes sanitaires et règlements en vigueur. Ainsi, ne peuvent être mis sur le marché que des viandes ne présentant aucun risque pour la santé.

II.Objectif du TP:

Dans ce TP nous allons essayer d'évaluer la qualité bactériologique de la viande hachée afin d'estimer les dangers qu'elle peut avoir sur la santé publique. Pour se faire nous avons suivi la démarche suivante:

- 1- Dénombrement de la flore aérobie mésophile totale, des coliformes fécaux, des *Clostridium* sulfito-réducteurs et de *Staphylococcus aureus*.
- 2-Recherche de *Salmonella* sp.
- 3-Comparaison des résultats avec les normes indiquées dans le journal officiel de la république algérienne.

III. Matériel utilisé:

❖ Verrerie:

- Boîtes Pétri** : pour la culture des germes.
- Pipettes Pasteur** : pour l'ensemencement des milieux de culture.
- Pipettes graduées** : pour la réalisation des séries de dilution.
- **Tubes à essais**: pour la préparation des milieux de culture et des dilutions.
- Flacons stériles** : pour la préparation des solutions mères.

❖ Appareils:

- **Stomacher 400 circulateur** : pour l'homogénéisation des échantillons
- **Bain -Marie** : pour liquéfier les milieux de culture
- Autoclave** : afin de stériliser le matériel.
- **Microscope optique** : pour réaliser une observation microscopique.
- **Balance électronique** :afin de peser les échantillons.

❖ Milieux de culture:

- Plate Count Agar (PCA)** : pour le dénombrement de la flore totale mésophile aérobie à 30°C (FTAM).
- Milieu Hektoen** : pour l'isolement des salmonelles.

- Milieu Chapman** : spécifique pour les staphylocoques.
- La gélose viande-Foie additionnée d'Alun de fer et Sulfite de sodium** : est utilisée pour la recherche et le dénombrement des spores des anaérobies sulfito-réducteurs.
- Gélose VRBL (gélose Lactosée Biliée au cristal Violet et au Rouge neutre)** : est utilisée pour la recherche des coliformes fécaux.
- Bouillon urée-indole** : permettant l'identification des germes, par la recherche de l'uréase, le tryptophane désaminase (TDA) et la production d'indole.
- Bouillon SFB D/C (sélénite acide de sodium) additionné de sélénite de sodium** : est utilisé pour l'enrichissement des salmonelles.
- Bouillon de Giolitti Contoni additionné de tellurite de potassium**: pour l'enrichissement des staphylocoques.
- Eau Peptonée Tamponné** : milieu de revivification, utilisé pour le pré-enrichissement des salmonelles.
- TSE (Eau Tryptone Sel)** : diluant destiné à la préparation des solutions mères.
 - ❖ Réactifs et colorants :
 - Violet de gentiane, lugol, alcool, fuschine** : utilisés pour la coloration de Gram.
 - Réactif de Kovacs** : pour la recherche de l'indole
 - Réactifs VP 1 et VP 2** : utilisés dans le test VP (API 20E).
 - L'eau oxygénée** : pour la réalisation du test de catalase.
 - Huile de vaseline stérile** : pour assurer l'anaérobiose (API 20E).
 - Plasma de lapin lyophilisé** : pour la détection de la coagulase libre produite par *Staphylococcus aureus* .
 - ❖ Equipement général de laboratoire de bactériologie:
 - Etuve** : pour l'incubation des germes ;
 - Anse de platine** : pour l'ensemencement des milieux de culture.
 - Eprouvettes graduées** : pour mesurer des volumes de liquides
 - Matériels de découpe** (ciseaux et lames de bistouris...)
 - Sachets de Stomacher et porte sachets Stomacher**
 - Lames et lamelles** : elles sont utilisées pour les observations microscopiques (réalisation des frottis).
 - Porte tubes**

IV- Analyse bactériologique de la viande hachée:

1. Préparation de la suspension mère et des dilutions décimales :

La technique de recherche a été effectuée selon la norme NF V 08- 010.

1.1. Prise d'essai :

Après préparation du poste de travail, 25 g de notre échantillon sont pesés aseptiquement dans un sachet stérile taré.

1.2. Préparation de la suspension mère :

Les 25g de l'échantillon sont introduits aseptiquement dans un sachet stérile de type Stomacher contenant au préalable 225 ml de diluant TSE. Ils sont par la suite broyés et homogénéisés dans un broyeur de type «Stomacher» pendant 1 à 2 minutes. Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 10^{-1}



Figure n 23: photographie des solutions mères (10^{-1}) des échantillons (Kaabach et Berrebi, 2018)

1.3. Préparation des dilutions décimales :

Les dilutions serviront à la recherche de la Flore Aérobie Mésophile Totale (FAMT), des coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium sulfito-réducteurs*.

➤ Mode opératoire:

- Marquer les tubes contenant 9 ml du TSE (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5}).
- Prélever aseptiquement 1ml de la suspension mère à l'aide d'une pipette graduée stérile munie d'une poire à aspiration.
- Transférer le 1ml prélevé dans le 1er tube pour obtenir la dilution (10^{-2}), la pipette ne devrait pas pénétrer dans le diluant.
- Jeter la pipette utilisée dans un conteneur approprié.
- L'homogénéisation se fait par l'utilisation d'un agitateur de type vortex.
- A l'aide d'une nouvelle pipette, après homogénéisation ; prélever 1 ml de la dilution 10^{-2} .
- Transférer le 1 ml prélevé dans le 2ème tube pour obtenir la dilution (10^{-3}).
- L'opération est renouvelée en changeant la pipette et en versant de nouveau 1 ml dans un nouveau tube de TSE, et ainsi de suite, jusqu'à ce que la concentration des bactéries devienne relativement faible (dilution 10^{-5}).

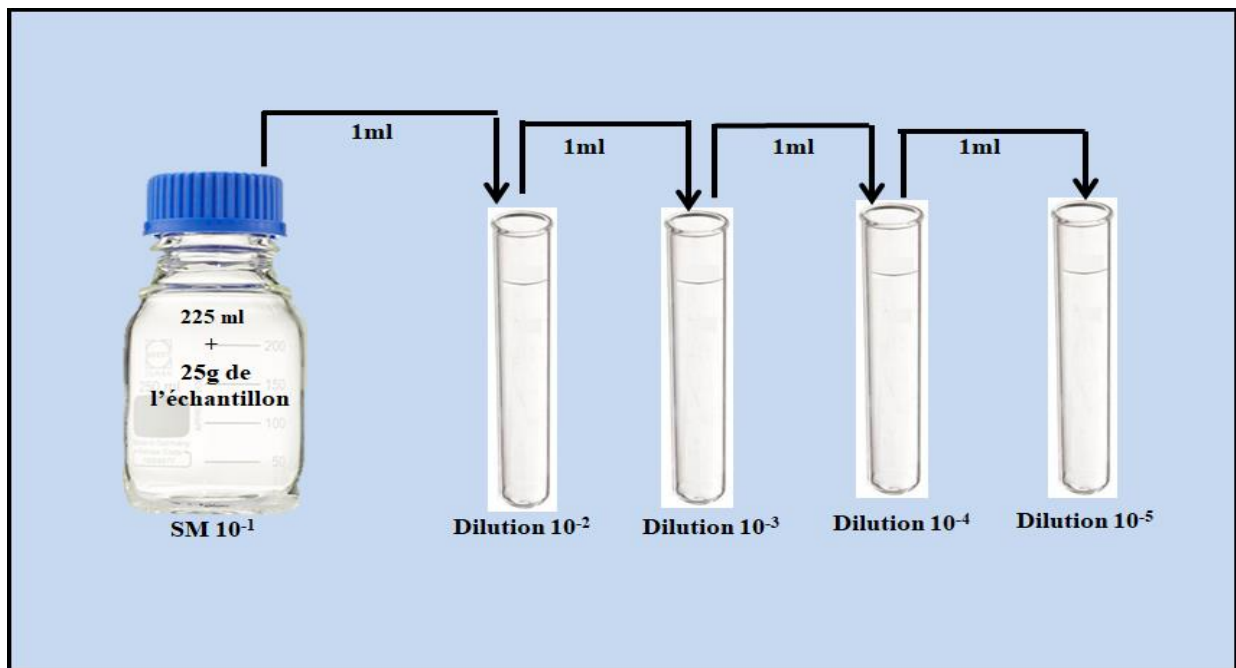


Figure n 24 : Schéma de la préparation des dilutions décimales (Kaabach et Berrebi, 2018).

2. Dénombrement de la FAMT à 30°C :

Ce sont des microorganismes aptes à se multiplier entre 25 et 40°C avec un optimum de 30°C à l'air. Le dénombrement de la FAMT est effectué selon **la norme NF 08 – 051**.

➤ Le mode opératoire

-Le milieu de culture utilisé est la gélose standard pour dénombrement ou Plate Count Agar (PCA).

-Les ensemencements sont effectués avec les dilutions 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} et 10^{-5} de la solution mère de départ.

-1ml de chaque solution est prélevé puis introduit dans une boîte de Pétri stérile. Nous y coulons ensuite 10 à 15 ml de la gélose PCA.

-L'inoculum et le PCA sont alors homogénéisés par des mouvements rotatifs de la boîte de Pétri puis refroidis.

- Après solidification, une deuxième couche de gélose est coulée pour empêcher le développement d'éventuelle flore de contamination superficielle après ensemencement.

- Les boîtes sont ensuite incubées à l'étuve à 30°C pendant 72 heures.

-Les colonies blanchâtres ayant poussées en profondeur sont dénombrées.

➤ Lecture et expression des résultats

La lecture se fait au bout de 72 heures sur les boîtes contenant entre 30 et 300 colonies

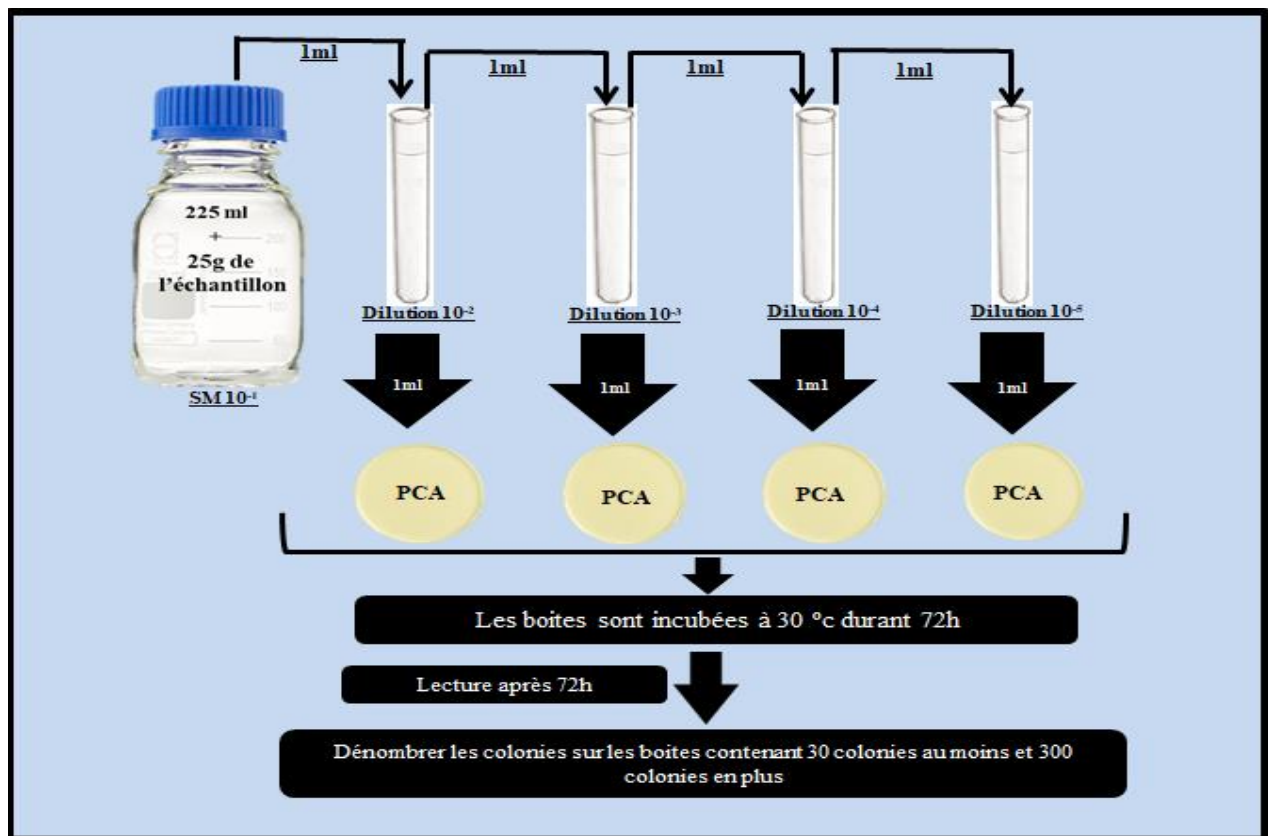


Figure n 25: protocole expérimental de recherche et de dénombrement de la flore totale aérobie mésophile (Kaabach et Berrebi, 2018).

3. Recherche et dénombrement des coliformes thermo-tolérants et *Escherichia coli*:

➤ Mode opératoire :

La technique de recherche et de dénombrement des germes a été inspirée de la norme NF V 08 – 017.

-Après la réalisation d'une série de dilutions, transférer 1 ml de la suspension mère à analyser et de ses dilutions décimales dans des boîtes de Pétri stériles.

-Couler 12 ml du milieu VRBL refroidi à 44-47°C.

-Homogénéiser parfaitement.

-Laisser solidifier sur une surface froide.

-Couler à nouveau 4 ml du milieu de façon à former une deuxième couche et laisser solidifier.

-Incuber à 44°C de 18 à 24 heures.

➤ Lecture :

Coliformes sur gélose VRBL: sont considérées comme caractéristiques, les colonies rouges de diamètre égal ou supérieur à 0,5 mm, après 24 heures d'incubation.

-Toutes les colonies caractéristiques qui poussent à 44°C sont considérées comme **coliformes thermo-tolérants ou fécaux**

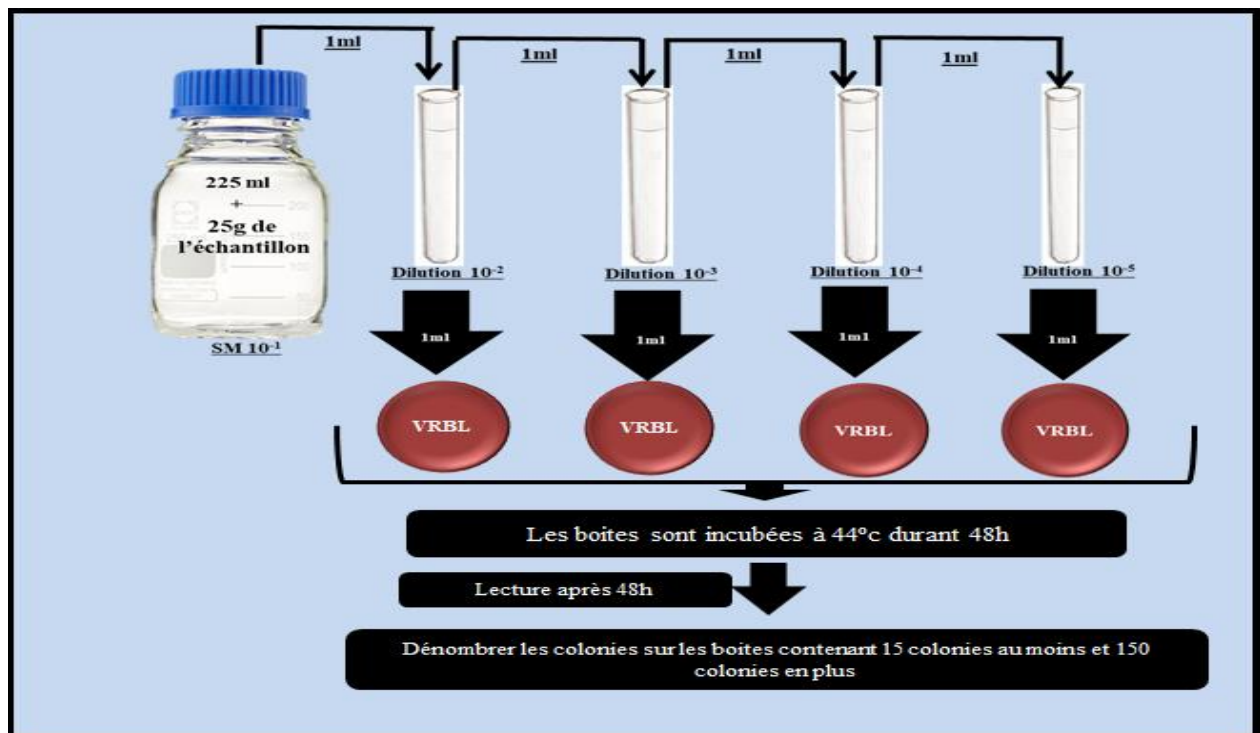


Figure n 26: Protocole expérimental de recherche et de dénombrement des Coliformes (Kaabach et Berrebi, 2018) .

✚ Recherche d'*Escherichia coli* :

✚ Mode opératoire :

-Identifier au moins 3 colonies caractéristiques des coliformes thermo-tolérants sur chaque boîte retenue.

-Aspirer la colonie à l'aide d'une pipette Pasteur munie d'une poire.

-Repiquer séparément chaque colonie et l'ensemencer dans le milieu urée indole.

-Incuber ce milieu 18-24h à 37°C

✚ Lecture :

• Lecture de l'urée : le milieu est considéré négatif s'il garde sa couleur initiale.

• Lecture de l'indole : rajouter 1 à 2 gouttes du réactif Kovacs et voir l'apparition d'un anneau rouge.

4. Recherche de *Staphylococcus aureus* :

➤ Mode opératoire

La technique de recherche et de dénombrement des germes de *Staphylococcus aureus* a été effectuée selon la norme NF V 057.

- Homogénéiser l'échantillon à analyser.
- Transférer 1ml de chacune des dilutions (10^{-2} , 10^{-3} et $10^{-4} \cdot 10^{-5}$) à analyser dans 9 ml du milieu Giliolitti Contoni (Enrichissement).
- Incuber les tubes à 37°C pendant 24 à 48 heures;
- S' il y'a noircissement du tube (tube positif) nous procédons à l'isolement sur milieu Chapman á 37°C pendant 24h.

➤ Lecture

Apparition de colonies bombées de couleur jaune, entourées d'un halo clair indique la Présence de staphylocoques.

-Test confirmatif :

a-Test de catalase :

Ce test permet de différencier les staphylocoques des streptocoques ;

-Prélever une colonie suspecte de *Staphylococcus aureus* avec l'anse de platine stérile et la déposer sur la lame ;

- A l'aide d'une pipette Pasteur ajouter quelques gouttes du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2).

➤ Lecture:

Le dégagement de bulles de gaz (oxygène) indique une réaction positive

b- Test coagulase

Le plasma de lapin lyophilisé est utilisé pour la détection de la coagulase libre produite par *Staphylococcus aureus* qui provoque une coagulation du plasma qui se traduit par la formation d'un caillot de coagulation.

-Dans un tube à hémolyse introduit 0,5ml de plasma et 0,5ml de la suspension bactérienne déjà préparée en bouillon cœur cervelle, puis nous incubons à 37°C pendant 1 à 2 heures voire 24 heures.

➤ Lecture :

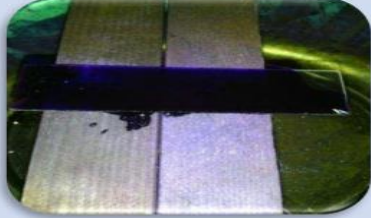




Coagulation du plasma (Coagulase +)

Pas de coagulation du plasma (Coagulase -)

c-La coloration différentielle de Gram :

Les étapes de la coloration de Gram sont indiquées dans le tableau suivant

Tableau n 2: Les étapes de la coloration de Gram

Etapes	Figures correspondantes
<p>1-Coloration primaire (Violet de gentiane) : Couvrir les lames avec le cristal violet. Laisser agir 60 secondes. Rincer à l'eau courante. Enlever le surplus d'eau.</p>	
<p>2-Fixation par le lugol (mordançage) : Couvrir les lames avec la solution de lugol pendant 1 minute. Rincer soigneusement avec l'eau du robinet. Enlever le surplus d'eau</p>	
<p>3-Décoloration à l'alcool: la lame est recouverte avec l'alcool (éthanol à 95%) pendant 10à 15 secondes. Rincer à l'eau courante et enlever le surplus d'eau.</p>	
<p>4-Contre coloration : Couvrir les lames avec la fuschine. Laisser agir 60 secondes. Rincer à l'eau courante. Enlever le surplus d'eau.</p>	
<p>5-Observation : la lame est séchée puis observée au microscope optique à l'objectif x100 avec l'huile d'immersion. Les bactéries Gram positif sont colorées en violet, les bactéries Gram négatif sont colorées en rose</p>	

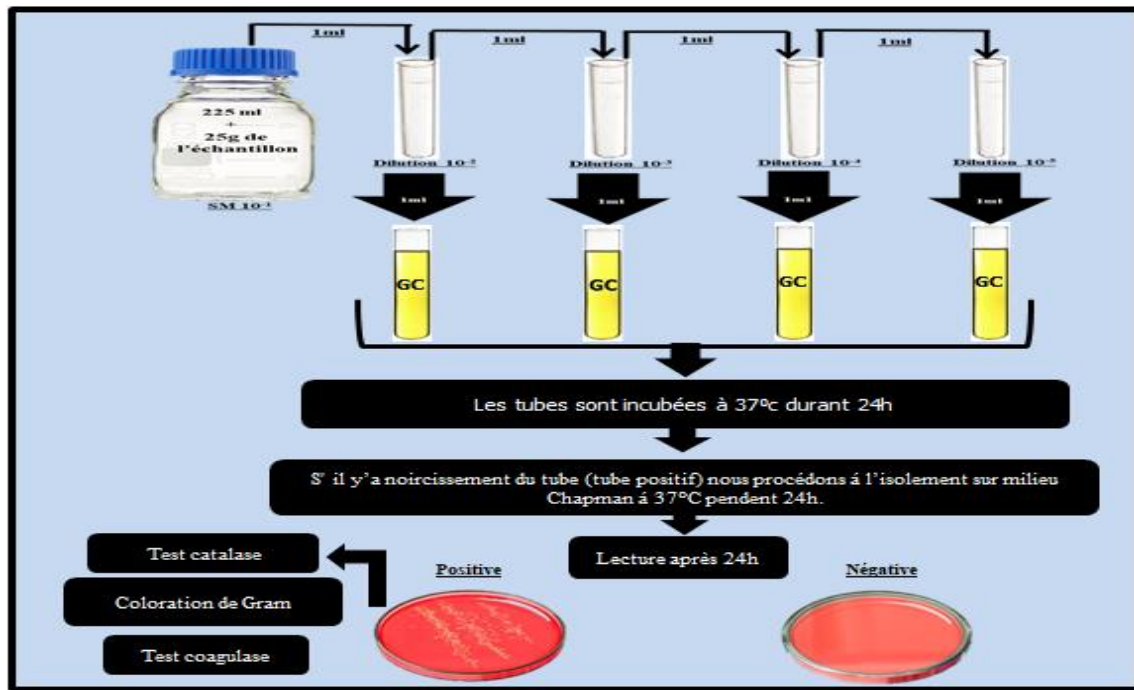


Figure n 27: Protocole expérimental de la recherche et du dénombrement des *staphylococcus aureus* (Kaabach et Berrebi, 2018)

5. Recherche et dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs à 46°C :

➤ Mode opératoire :

La technique de recherche a été inspirée de la norme XP V 08 – 061.

-Les tubes stériles sont annotés et doivent contenir : la dilution utilisée ; la température d'incubation et la durée d'incubation.

-Transférer 1 ml de l'inoculum (dilutions décimales ; 10⁻² ,10⁻³ et 10⁻⁴, 10⁻⁵) dans les tubes stériles, en évitant au maximum d'incorporer de l'air.

-Chauffer le produit à tester (10 min à 80°C) afin de détruire les formes végétatives et d'activer les spores.

-Refroidir rapidement à l'eau de robinet.

-Liquéfier le milieu en bain marie bouillonnant puis refroidir le milieu vers 45 à 47°C.

-Ajouter environ 15 ml de la gélose Viande Foie (VF) additionnée d'une ampoule contenant 5 ml de sulfite de sodium et une ampoule contenant 2 ml d'alun de fer.

- Homogénéiser parfaitement par retournement complet en évitant au maximum d'incorporer de l'air.

- Laisser solidifier sur la paillasse

- Incuber les boites à 46°C pendant 48 heures.

➤ **Lecture :**

-Compter les colonies entourées d'un halo noir qui poussent en profondeur. La taille de la colonie doit être assez grande de 5 mm de diamètre. Les colonies ayant poussé à 1 cm de la surface du tube sont éliminées.

-Noter les dilutions correspondantes.

-Effectuer des lectures après 18, 24 et 48h d'incubation

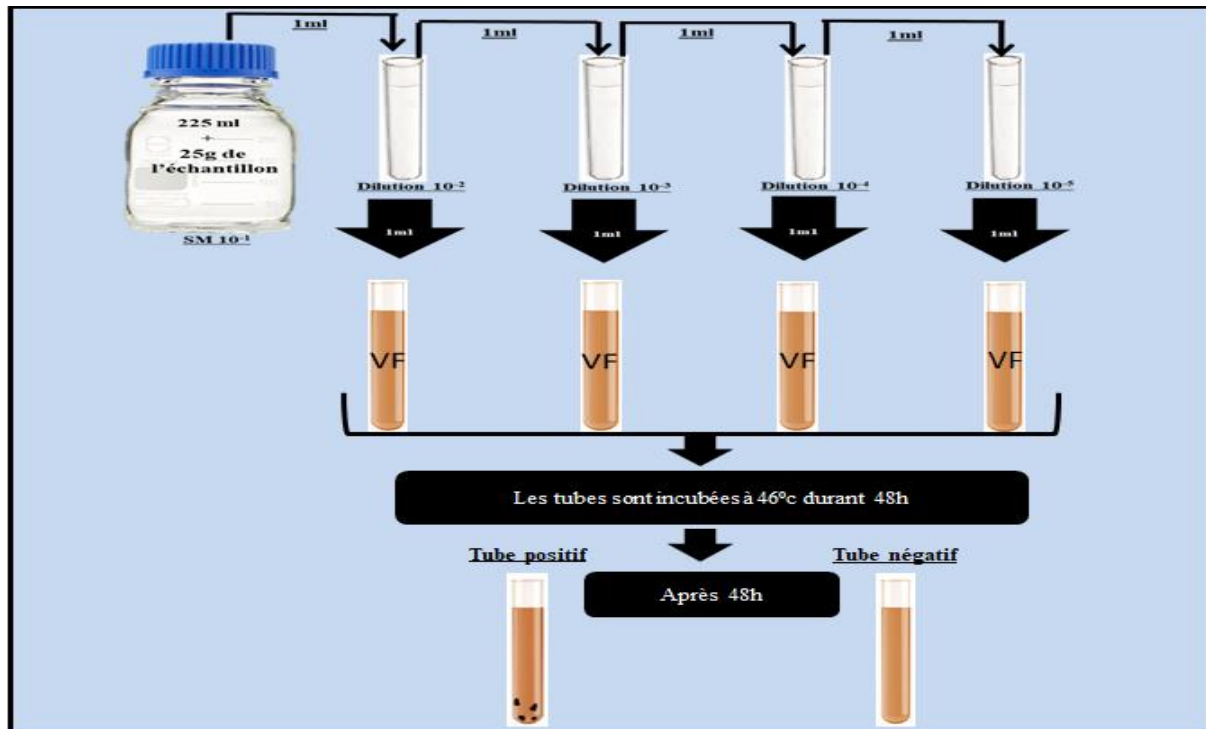


Figure n 28 : Protocole expérimental de recherche des Bactéries anaérobies Sulfito-Réductrices (Kaabach et Berrebi, 2018)

- ✚ Le nombre des germes recherchés (FAMT, coliformes fécaux, *Staphylococcus aureus* et *Clostridium* sulfito-réducteurs) est donné par la suivante formule inspirée de la Norme XP V 08-102:

$$N = \frac{\sum c \cdot v (n_1 + 0,1 n_2)}{d}$$

N = nombre de germes par gramme de viande

C = somme des colonies dénombrées sur toutes les boîtes retenues de deux dilutions successives et dont l'une contient au moins 15 colonies (30 colonies pour la FTAM)

n1 = nombre de boîtes retenues à la première dilution

n2 = nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

V = volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte

d = concentration correspondant à la première dilution

6. Recherche des salmonelles :

➤ Mode opératoire :

La recherche de salmonella a été effectuée selon la norme NF V 08 6- 052.

✓ Préparation de l'échantillon :

Prélever aseptiquement 25 g de l'échantillon dans un sac de plastique et mélanger à l'aide d'un appareil de type Stomacher.

✓ Pré-enrichissement :

-Introduire les 25g de l'échantillon dans 225 ml d'eau peptonée tamponnée.

- Incuber le bouillon 18h à 37°C.

*Si le pH du mélange de pré-enrichissement n'est pas entre 6,0 et 7,0 il faut l'ajuster avec du NaOH 1N ou du HCl 1N de manière aseptique.

✓ Enrichissement :

L'enrichissement est effectué sur le milieu sélectif SFB à partir du milieu de pré enrichissement de la façon suivante :

- 100ml pour le flacon SFB double concentration : D/C.

- 10ml pour le flacon SFB simple concentration : S/C.

L'incubation se fait à 37°C pendant 24h.

* Ne pas dépasser une durée d'incubation de 24 heures en raison de la diminution de l'effet inhibiteur après les 12 premières heures, les salmonelles étant rapidement détruites au delà de cette durée lorsqu'elles se trouvent en présence de puissants compétiteurs comme les *Proteus*.

✓ Isolement sur gélose sélective :

-Chaque flacon fera l'objet d'un isolement en double (02 boîtes pour chaque flacon).

-Ensemencer en stries les bouillons d'enrichissement sur des géloses sélectives et différentielles pour isoler les salmonelles. Nous utilisons comme milieu la gélose Hektoen.

-Toutes les boîtes ainsi inoculées sont incubées à 37°C pendant 24h.

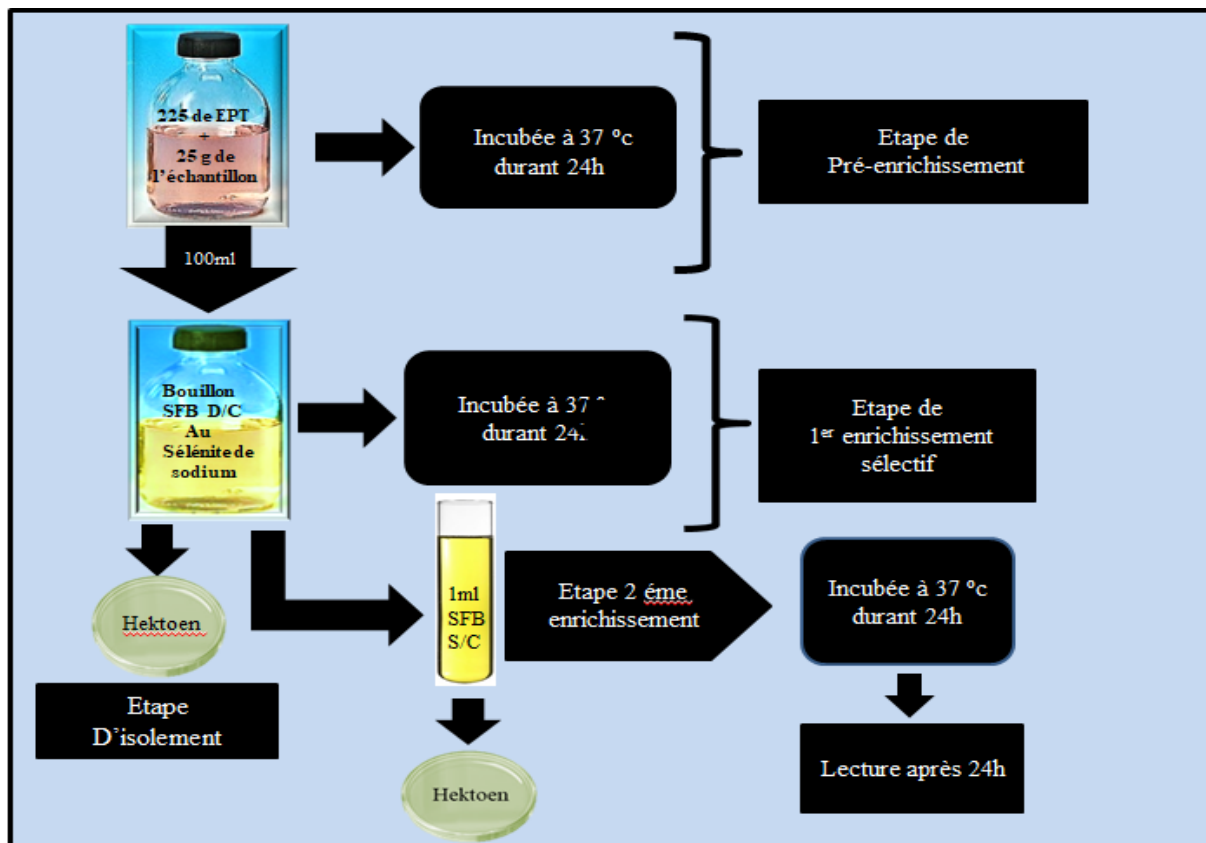


Figure n 29: Protocole expérimental de recherche et de dénombrement des Salmonelles (Kaabach et Berrebi, 2018)

✓ Identification par la galerie API 20E :

Elle est utilisée pour la confirmation de *Salmonella* ou de *Proteus*.

V. Interprétation des résultats :

Les résultats des analyses bactériologiques sont interprétés à partir des critères microbiologiques fixés par des normes Algériennes. Ces critères d'appréciation sont définis par l'arrêté ministériel du 2 juillet 2017 publié dans le Journal officiel de la République Algérienne Démocratique et Populaire N°39.

Références bibliographiques

References bibliographiques

A

1-Anhalt J.P. et Fenselau C. Identification of bacteria using mass spectrometry . Anal Chem. 1975; ; 47 : :219.–225.

B

2-Baillet C. TP Spectrophotométrie.doc -
https://eduscol.education.fr/rnchimie/phys/baillet/06/tp_spectro.pdf

3-Berne. F, Les traitements des eaux dans l'industrie pétrolière, Édition TECHNIP, 1972, 207p.

4-Bessede E , Angla-Gre M , Delagarde Y , *et al.* MALDI Biotyper, experience in the routine of a University hospital . Clin Microbiol Infect. 2011; ; 17 : :533.–538.

5-Bouafia R. et Djerrab L. 2016.Contribution à l'étude de la qualité bactériologique de la viande de poulet de chair (cas de l'abattoir avicole de Hamadi krouma). Memoire de master, université du 20 aout 1955-Skikda

6- Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G et Verne-Bourdaïs E., 2002.Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaire ,Doin ,Aquitaine ,pp83

7-Bousseboua H., 2005. Élément de microbiologie, 2ème éd, édition compus-club, Algérie, p 282-283.

8-Broch-Microbiological-Testing-SM-4017-F[1].PDF.http://www.vep-dz.com/images/products/milieux-de-cultures/Broch_Microbiological_Testing_SM-4017-f%5B1%5D.pdf

C

9-Catalogue des normes algériennes. Institut Algérien de Normalisation.
http://ianor.dz/Site_IANOR/Catalogue.php?id=8

10-Craplet C., 1966.La viande de bovins, de l'étable à l'assiette du consommateur, 2eme édition Vigot frère, Paris159.

11-CUQ J.-L. Microbiologie alimentaire. Contrôle microbiologique des aliments – Manuel technique. Polytech Département STIA. 2007.
https://www.dphu.org/uploads/attachements/books/books_4610_0.pdf

E

12-Equipe Queboise de Santé Porcine (EQSP). Protocole d'échantillonnage d'ingrédients et d'aliments destinés à la consommation des porcspour la détection de nouveaux coronavirus entériques porcins.2014. https://www.agrireseau.net/documents/Document_88824.pdf

13- Carbonnelle É et Nassif X. 2011. Utilisation en routine du MALDI-TOF-MS pour l'identification des pathogènes en microbiologie médicale. Med Sci (Paris). 27(10): 882–888.

D

14-Drieux H., Ferrandor R. et Jacquot R., 1961. Caractéristiques alimentaires de la viande de boucherie, technique systématique de l'inspection des viandes de boucherie. Paris. 408.

F

15-Fanny D. – BTS Bio Analyses & Contrôles.
<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A2/microbiologie/TP/Plan2-3classes.pdf>

16-Faradji-Hamma S. Techniques de contrôle microbiologique des aliments. Université Abderrahmane Mira de Béjaïa

17-FCD-Critères microbiologiques applicables à partir de 2020 aux marques de distributeurs, marques premiers prix et matières premières dans leur conditionnement initial industriel
http://www.fcd.fr/media/filer_public/37/fd/37fd2d16-85a6-4059-acc4-c876bc023dc4/fcd_criteres_microbiologiques_2020_produits_ls_mp_vdef_15112019.pdf

G

18-Garry P. La congélation des produits modifie-t-elle les résultats d'analyses microbiologiques ? Bulletin de liaison du CTSCCV / vol.12 N° 3/2002.

J

19-JORA, 1998. Journal Officiel de la République Algérienne, N°35.

20- JORA, 2017. Journal Officiel de la République Algérienne N39

21-JORA, 2004. Journal Officiel de la République Algérienne N° 32

K

22- Kaabach Y. et Berrebi A. 2018. Contribution à l'étude de la qualité bactériologique du cachir. mémoire de master. université du 20 aout 1955-Skikda

L

23-Laboratoire d'expertises et d'analyses alimentaires. Techniques de prelevement des échantillons pour l'analyse microbiologique des aliments et de l'eau. 2017. LEAA-REF-MIC-540.

24-Leyral. G., Ronnefoy. C. et Guillet. F. Microbiologie et qualité des industries agroalimentaire, Paris, 2002, 245p

M

25- **Moreda R.** Technique de denombrement l'hematimetre de malassez : numeration directe
2013. Lycee docteur lacroix – narbonne -

N

26- **Naimi M.** Cahier technique - 2 : Techniques de contrôle microbiologiques. entre
Universitaire Nour Bachir - El-Bayadh

O

27-OMS (Organisation mondiale de santé), 1994. Protection et amélioration de la qualité de
l'eau.2eme édition. Volume 1.Genève:18.

R

28-**Rodier J., Boiovin C., Biovin M., Brieu, M., Durif F., Roy J. and Prin-Allez L. (ed)** 2009.
Analysis of water,Natural waters, Residual waters, Marine waters. 8Th edition, Dunod, Paris.

S

29- **Seng P. , Drancourt M. , Gouriet F. , et al.** Ongoing revolution in bacteriology : routine
identification of bacteria by matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass
spectrometry . Clin Infect Dis. 2009; ; 49 : :543.–551.

T

30- **Teyssou R., Hance P., Nicand E., Nizou J.Y.et Buisson Y.** Les infections à *Bacillus cereus*: bactériologie, clinique et traitement. La Lettre de l'Infectiologue - Tome XIII - n° 3 - mars 1998.<https://www.edimark.fr/Front/frontpost/getfiles/9830.pdf>

31-**Toraille C.,** 1994. Incidence des caractéristiques musculaires sur les qualités organoleptiques des viandes. Renc Rech. Ruminants. 276

SITES WEB

32-<http://fdanieau.free.fr/cours/bts/A2/microbiologie/TP/RechercheListeria.pdf>

33-https://fr.wikipedia.org/wiki/Cytom%C3%A9trie_en_flux

34-<https://www.aquaportail.com/definition-10718-spectrophotometrie.html>

35-fr.wikipedia.org/wiki/Galerie_API

36-<https://fr.wikipedia.org/wiki/MALDI-TOF>

37-https://fr.wikipedia.org/wiki/Organisation_internationale_de_normalisation#cite_note-1

38-https://www.mapaq.gouv.qc.ca/SiteCollectionDocuments/Laboratoire/Tech_prelevements-echantillons-analyse-microbiologique-aliments-eau.pdf

39-https://www.grosseron.com/ecouvillon-sterile_56-423-1-903-1-585.html

40-<http://www.technobio.fr/2014/11/methode-de-denombrement-des-micro-organismes-en-milieu-liquide-methode-dite-du-nombre-le-plus-probable.html>

41-<https://sms-bse-bgb.discip.ac-caen.fr/spip.php?article602>

42-<http://www.perrin33.com/tbma/comptages-ufc.html>

43- https://www.hygielim.com/boite-contact-gelosee_70-919-1-1789-1-5018.html

44-<https://www.hellopro.fr/tarriere-pour-prelevement-fromage-et-beurre-170-mm-2000202-2315204-produit.html>

45-<https://puppy-party.info/cellule-de-malassez-78/>

Annexes

Annexe1 : Composition des milieux de culture:**Plate Count Agar (PCA) :**

- Peptone de caséine 5g
 - Extrait de levure2,5g
 - glucose 1g
 - Agar 18g
 - Eau distillée 1000ml
- pH: 7.0 ; Autoclaver 15 min à 121°C

Gélose VRBL (gélose Lactosée Biliée au cristal Violé et au Rouge neutre):

- Peptone de viande7 g
 - Extrait de levure3g
 - Lactose10g
 - Sels biliaires.....2g
 - Chlorure de sodium5g
 - Rouge neutre0,03 g
 - Cristal violet18g
 - Agar.....12g
 - Eau distillée.....1000 ml
- pH du milieu : 7,3 ; Autoclaver 15 min à 121°C

Milieux Chapman

- Extrait de viande de boeuf.....5g
 - Peptone10g
 - Chlorure de sodium75g
 - Mannitol10g
 - Rouge de phénol25g
 - Agar15g
 - Eau distillée.....1000ml
- pH : 7.5 ;Autoclaver 15min à 120°C

Milieu Giolitti Cantoni

- Tryptone 10g
- Extrait de levure 5g
- Extrait de viande 5g

-Chlorure de sodium	5g
-Chlorure de lithium	5g
-Mannitol	20g
-Glycine	1.2g
-Pyruvate de sodium	3g

Bouillon SFB S/C(sélénite acide de sodium):

- Peptone.....	5 g
- Tryptone	5g
- Mannitol	4g
- Phosphate disodique	4g
- L-cystine	0,2 g
- Eau distillée	1000 ml

-pH du milieu: $7,0 \pm 0,2$, Autoclaver 15 min à 120°C

Annexe 2: Normes algériennes de potabilité des eaux de consommation (NA 6360-1992)

Paramètres bactériologiques

Paramètres	Unité	Niveau Guide	Concentration max. admissible	Observations
1- Eau traitée à l'entrée du réseau				
Coliformes fécaux	Nbre/100ml	-	0	Turbidité (1NTU), pour la désinfection au chlore, il est préférable que le pH=6,8
Coliformes	Nbre/100ml	-	0	Chlore libre résiduel 2,2 à 0,5mg/l après 30Mn (minimum) de contact
2- Eau de boisson en bouteille				
Coliformes fécaux	Nbre/100ml	-	0	La source doit être exempte de contaminant fécal
Coliformes	Nbre/100ml	-	0	
3- Eau potable de source				
Coliformes fécaux	Nbre/100ml	-	0	Avertir la population de javelliser ou faire bouillir l'eau au cas où l'on n'arrive pas à respecter les valeurs indicatives
Coliformes	Nbre/100ml	-	0	
Germes totaux 37°C /48h	Nbre/ lml	10	-	Pour une eau traitée le dénombrement des «germes totaux effectué à l'extrémité réseau de distribution ne doit pas excéder le taux obtenu en début de réseau dans 90% des échantillons analysés au cours de l'année
22°C/72h	Nbre/ lml	100	-	
Streptocoques	Nbre/100ml	-	0	-
Streptocoques fécaux		0		
Clostridium sulfite réducteurs	Nbre/20ml	-	0	