

République Algérienne Démocratique et Populaire  
Centre Universitaire Nour Bachir - El-Bayadh  
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique



**Cahier technique - 2 :**  
**Techniques de contrôle microbiologiques**



À l'usage de :  
Étudiants des Sciences de la nature et de  
la vie

**Mostefa NAIMI**  
Maître-Assistant A, CUNB, El-Bayadh

**Cahier technique - 2 :**  
**Techniques de contrôle microbiologiques**



À l'usage de :  
Étudiants des Sciences de la nature et de  
la vie



## Table des matières

<b>Table des matières</b>	<b>I</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>III</b>
<b>Liste des figures</b>	<b>IV</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>V</b>
<b>1. Introduction</b>	<b>1</b>
<b>2. Nécessité et objectifs du contrôle microbiologique</b>	<b>3</b>
2.1 Définition de la Qualité	3
2.2 Qualité hygiénique	4
2.3 Qualité technologique	5
<b>3. Politique de contrôle</b>	<b>6</b>
3.1 Niveaux de contrôle	6
3.2 Fréquence de contrôle	6
3.3 Paramètres de contrôle	6
3.4 Méthodes de contrôle	7
<b>4. Prélèvement, transport et préparation des échantillons</b>	<b>8</b>
4.1 Cas des aliments solides	9
4.2 Cas des aliments liquides	9
4.3 Echantillonnage en surface	11
4.4 Techniques de dilution	11
<b>5. Techniques classiques de numérations de microorganismes</b>	<b>13</b>
5.1 Numération microscopique	13
5.2 Numération en milieu solide	15
5.3 Numération en milieu liquide	19
<b>6. Identification des phénétique des bactéries</b>	<b>22</b>
6.1 Caractères culturels	22
6.2 Caractères Morphologiques et structuraux	24
6.3 Caractères biochimiques et physiologiques	26
6.4 Caractères immunologiques	30
6.5 Pouvoir pathogène	30
<b>7. Techniques rapides de détection</b>	<b>32</b>
7.1 Spectroscopiques	32
7.2 Electrochimique	33
7.3 Autres procédés	34
<b>8. Réalisation du contrôle</b>	<b>35</b>
8.1 Contrôle des matières premières	35





8.2	Contrôle des levains	
8.3	Contrôle de la fabrication	
8.4	Contrôle de nettoyage et de la désinfection	
8.5	Contrôle des produits finis	36
9.	Caractérisation et évolution de l'analyse microbiologique	37
10.	Critères réglementaires et normalisation	37
11.	Fascicule des travaux pratiques	40
	Milieux de culture, préparation et stérilisation	
	Techniques de dilution et transferts aseptiques	
	Numération directe des microorganismes par techniques microscopiques	
	Numération des microorganismes en milieu solide (masse, surface)	
	Contrôle de l'efficacité de l'opération du nettoyage et de la désinfection	
	Contrôle microbiologique de l'eau (eau d'adduction et eau embouteillée)	
	Contrôle microbiologique du lait (lait de sachet et lait déshydraté)	
	Contrôle microbiologique des céréales (semoule et farine)	
	Contrôle microbiologique des viandes (viande hachée et merguez)	
	Annexes	48
	Références bibliographiques	50





## Liste des tableaux

tableau 5.1      Tableau 5.1 : table de Mac Grady (méthode de 3 tubes)

Page 20



## Liste des figures

		Page
<b>Figure 4.1</b>	(a) grande pelle et pelle à main (b) et (c) sonde cylindrique (d) (e) échantillonneur de fond ou à soupape.	10
<b>Figure 4.2</b>	(a) boîtes de contact, (b) et (d) lames d'immersion (c) écouvillons.	11
<b>Figure 4.3</b>	(a) broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur électrique à pédale type stomacher, (c) broyeur électrique type mortier et pilon, (d) broyeur électrique type à couteaux.	12
<b>Figure 5.1</b>	représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de THOMA (b) cellule de THOMA.	14
<b>Figure 5.2</b>	représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de MALASSEZ (b) cellule de MALASSEZ.	14
<b>Figure 5.3</b>	(a) vue d'une boîte après culture Figure 5.6 : table de Mac Grady (méthode de 3 tubes). (b) grille de comptage	17
<b>Figure 5.4</b>	(a) montage de filtration sur membrane, (b) filtre membrane après culture.	18
<b>Figure 5.5</b>	(a) bandes à immerger après culture (b) représentation schématique d'une lecture des bandes à immerger.	19
<b>Figure 6.1</b>	représentation schématique des caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne.	23
<b>Figure 6.2</b>	technique d'observation de l'aspect d'une colonie bactérienne : transparence, réflexion ou t ransillumination oblique.	23
<b>Figure 9.1</b>	représentation schématique du plan à deux (2) classes.	39
<b>Figure 9.2</b>	représentation schématique du plan à trois (3) classes.	39



## Liste Des Abréviations

<b>AFNOR</b>	Association française de normalisation
<b>ISO</b>	Organisation internationale de normalisation
<b>NA</b>	Norme algérienne
<b>H%</b>	Teneur en eau
<b>MS%</b>	Matière sèche
<b>pH</b>	Potentiel d'hydrogène
<b>2√</b>	Racine carrée
<b>3√</b>	Racine cubique
<b>SM</b>	Solution mère
<b>DM</b>	Dilution mère
<b>g</b>	Gramme
<b>ml</b>	Millilitre
<b>mm</b>	Millimètre
<b>mm<sup>3</sup></b>	Millimètre cube
<b>cm<sup>2</sup></b>	Centimètre cube
<b>min</b>	Minute
<b>s</b>	Seconde
<b>DEFT</b>	Direct Epi- fluorescent Filter Technique
<b>UFC</b>	unité formant colonie
<b>NPP</b>	Nombre le plus probable
<b>BAAR</b>	acido-alcool-résistants
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	L'eau oxygénée
<b>O<sub>2</sub></b>	Oxygène
<b>CO<sub>2</sub></b>	Dioxyde de carbone
<b>C</b>	Carbone
<b>TSE</b>	Tryptone sel eau
<b>VF</b>	Gélose viande foie





# 1. Introduction

Et voilà entre vos mains, chers étudiants lecteurs, le deuxième manuscrit de la série cahier technique, cette fois-ci nommé : *cahier technique-2 : techniques de contrôle microbiologiques*. Qu'il est préférable de le commencer par que veut dire contrôle microbiologique ? Ainsi il est à dire que le contrôle microbiologique est l'opération de vérification de la qualité intrinsèque des produits alimentaires et non alimentaires, destinés à la consommation et l'utilisation humaine et / ou animale. Cette opération est la recherche et le dénombrement des microorganismes altérants et / ou pathogènes dont la réalisation impose le recours aux méthodes d'analyses en utilisant des milieux de culture, des réactifs et d'autres équipements.

Ce présent *cahier technique-2* est un amalgame de cours, de travaux pratiques et dirigés, de même des contrôles continus et des examens de la matière, de quatre années universitaires, depuis l'année universitaire 2014-2015 jusqu'à l'année en cours.

Il s'adresse aux étudiants de la troisième année des sciences de la nature et de la vie, spécialité Microbiologie. Il a pour objectif de faire acquérir aux étudiants les connaissances théoriques et pratiques indispensables en Microbiologie, mais aussi de maîtriser le contrôle de qualité microbiologique selon les critères de la norme algérienne (à défaut la norme internationale). Il est conçu pour une lecture assez simple et facile, mais aussi il est riche en astuces de paillasse.

À la fin de chaque section, la fiche en couleur verte rassemble des questions à réponse nécessitant quelques mots et d'autres questions sous forme des cas pratiques, ces derniers aident les étudiants de tester leurs acquis afin de mieux se



préparer à l'interrogation de travaux pratiques et dirigés, et à l'examen. La fiche en bleu expose les protocoles les plus pratiqués sous une forme simplifiée. La fiche en gris, concluant le manuscrit, expose les travaux pratiques réalisés au niveau du laboratoire de Microbiologie (analyse des denrées alimentaires de nature liquides et solides).

Ce manuscrit débute par une introduction, ensuite il traite la notion qualité et ses deux composantes (hygiénique et marchande), ainsi que la politique qualité. Après, il décrit le prélèvement, le transport et la préparation des échantillons, une fois terminée, une section est consacrée aux techniques classiques de numération (microscopiques, en milieux solides et en milieux liquides), mais aussi aux techniques de détection rapide, cette dernière est non parfaite sans la section ultérieure traitant l'identification phénétique des microorganismes en rassemblant les caractères cultureux, morphologiques, biochimiques et physiologiques. Après cela une autre section dévoile le contrôle des matières premières, des levains, de la fabrication, de nettoyage et de la désinfection et des produits finis. Enfin, une section fait aperçu sur la caractérisation et l'évolution de l'analyse microbiologique.



# 2

## Nécessité et objectifs du contrôle microbiologique

### 2. Nécessité et objectifs du contrôle microbiologique

#### 2.1 Définition de la qualité

La notion du mot qualité est subjective, ainsi on a plusieurs définitions, qui sont soit repérées dans le langage courant ou dans les dictionnaires, soit données par les leaders de la qualité ou de point de vue statistique, soit employées par les entreprises, où bien d'autres mises par les organismes de normalisation telles que l'association française de normalisation (AFNOR), et l'organisation internationale de normalisation ou bien de standardisation (ISO) :

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

Donc l'utilisateur d'un aliment (le consommateur), on attend plusieurs satisfactions (besoins, exigences), d'où on a plusieurs composantes (aspects) de la qualité d'un produit alimentaire, qui sont en nombre de 8 principales composantes :

- ✚ Les 4 S (Sécurité : hygiénique, Santé : nutritionnelle, Saveur : organoleptique et Service : usage) ;





- ✚ Les 2 R (Régularité et Rêve);
- ✚ La T et la E (Technologique et Etique).

Dans le présent manuscrit, deux aspects de la qualité (hygiénique et technologique) vont être discutés puisque font l'objet du contrôle microbiologique afin de garantir, au consommateur, des produits alimentaires sains et stables (salubrité et sécurité).

## 2.2 Qualité hygiénique

La qualité hygiénique d'un produit alimentaire est l'absence de microorganismes pathogènes ou leurs toxines susceptibles de nuire à la santé du consommateur. La présence de tels microorganismes et de ses composés toxiques conduit à des maladies de type alimentaire. Suivant la nature de microorganismes en cause, trois cas de maladie peuvent se présenter :

- ✚ **Infections alimentaires** : ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de microorganismes altérants vivants dans le produit alimentaire ou dans l'eau. C'est le cas par exemple des Entéropathogènes ou virus : *Salmonella enterica* (salmonellose), *Shigella spp.* (dysenterie bacillaire), *Yersinia enterocolitica* (yersiniose), *E. coli* entéropathogène, et infections virales.
- ✚ **Toxi-infections alimentaires** : ensemble des symptômes après ingestion d'une quantité de microorganismes pathogènes vivants dans le produit alimentaire et la sécrétion après ingestion d'une toxine. C'est le cas par exemple de : *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus* (gastro-entérite) et *Vibrio cholerae* (choléra).

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

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

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



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

### 2.3 Qualité technologique (marchande)

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

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

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



1. Qu'entendez-vous par contrôle microbiologique ?
2. Qu'est-ce que la qualité selon la norme ISO ?
3. Citez les huit composantes de la qualité d'un produit alimentaire.
4. Citez les deux aspects de la qualité microbiologique d'un produit alimentaire.
5. Que signifient les initiales : NA, ISO et AFNOR ?
6. Citez les trois cas de maladies de type alimentaire.





## Politique de contrôle

### 3. Politique de contrôle

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

#### 3.1 Niveaux de contrôle

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

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

#### 3.2 Fréquence des contrôles

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

#### 3.3 Paramètres à contrôler

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





- (1) Microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique :
  - ✚ Bactéries pathogènes : *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *St. aureus*, *Streptocoques fécaux*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*.
  - ✚ Bactéries témoins de contamination : *St. aureus* (témoin d'une contamination cutanéomuqueuse, *Streptocoques fécaux*, coliformes et coliformes fécaux (témoins d'une contamination fécale).
- (2) Microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande :
  - ✚ Levures dans les produits sucrés ou les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés, bactéries lactiques et acétiques dans les produits acides.

### 3.4 Méthodes de contrôle

Les méthodes de contrôles sont devisées en deux :

- (1) Techniques microbiologiques de culture qui sont longues, couteuses, et demandent un délai de réponse très important ;
- (2) Techniques microscopiques (état frais, coloration simple : de bleu de méthylène et double de Gram) qui sont simples, rapides, et de faible cout. Toutefois, la sensibilité de ces derniers n'étant pas toujours suffisante, donc il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par les techniques microbiologiques de culture dites classiques.

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

D'une façon générale, lors du contrôle microbiologique, les méthodes employées doivent être, simples, rapides, moins couteuses et sensibles pour qu'une correction soit, éventuellement, possible dans la fabrication.



1. Qu'est-ce qu'un contrôle en cour de fabrication ?
2. Qu'entendez-vous par points critiques ?
3. Répartissez en deux groupes les microorganismes visés par le contrôle des produits alimentaires ?
4. Rangez en catégories les germes témoins de contaminations fécales



- (1) Microorganismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique :
  - ✚ Bactéries pathogènes : *Clostridium* spp., *Salmonella* spp., *St. aureus*, *Streptocoques fécaux*, *Escherichia coli*, *Shigella*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus* spp., *Yersinia enterocolitica*, *Campylobacter jejuni*.
  - ✚ Bactéries témoins de contamination : *St. aureus* (témoin d'une contamination cutanéomuqueuse, *Streptocoques fécaux*, coliformes et coliformes fécaux (témoins d'une contamination fécale).
- (2) Microorganismes responsables d'une altération de la qualité marchande :
  - ✚ Levures dans les produits sucrés ou les produits acides, moisissures dans les produits peu hydratés, bactéries lactiques et acétiques dans les produits acides.

### 3.4 Méthodes de contrôle

Les méthodes de contrôles sont devisées en deux :

- (1) Techniques microbiologiques de culture qui sont longues, couteuses, et demandent un délai de réponse très important ;
- (2) Techniques microscopiques (état frais, coloration simple : de bleu de méthylène et double de Gram) qui sont simples, rapides, et de faible cout. Toutefois, la sensibilité de ces derniers n'étant pas toujours suffisante, donc il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par les techniques microbiologiques de culture dites classiques.

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

D'une façon générale, lors du contrôle microbiologique, les méthodes employées doivent être, simples, rapides, moins couteuses et sensibles pour qu'une correction soit, éventuellement, possible dans la fabrication.



1. Qu'est-ce qu'un contrôle en cour de fabrication ?
2. Qu'entendez-vous par points critiques ?
3. Répartissez en deux groupes les microorganismes visés par le contrôle des produits alimentaires ?
4. Rangez en catégories les germes témoins de contaminations fécales





## Prélèvement, transport et préparation des échantillons

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

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

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

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

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





- ✦ **Technique de la racine cubique ( $3\sqrt{v}$ ) :** pour les lots considérés assez grands ( $3\sqrt{v}$  de l'effectif du lot).

Le prélèvement de l'échantillon global se fait d'une façon systématique ou aléatoire, à partir des endroits différents du lot. Le prélèvement de l'échantillon pour laboratoire est la dernière étape de l'échantillonnage, il est effectué à partir de l'échantillon global.

Cependant les produits ne sont pas toujours contenus dans leurs emballages, ils peuvent se présenter en vrac de nature solide ou liquide : le blé dans les silos ou dans des bateaux, l'huile dans les citernes.

#### 4.1 Cas des aliments solides

Pour mieux expliquer la procédure d'échantillonnage des produits en vrac solide on prend l'exemple des grains, dont l'échantillonnage se fait avec le matériel suivant : grandes pelle et pelle à main (Figure 4.1 : (a et b)), sonde cylindrique (Figure 4.1, c).

- ✦ **Prélèvement en bateau :** se fait pendant l'opération de déchargement en plusieurs endroits et à des intervalles de temps déterminés, ainsi à partir de l'échantillon global, on réalise l'échantillon de laboratoire.
- ✦ **Prélèvement dans les citernes (Wagons ou dans des camions) :** se fait dans toute la hauteur de la couche à l'aide d'une sonde cylindrique, et à des endroits de prélèvement au centre et à environ 50 cm des parois (5, 8, 11 points de prélèvements).

#### 4.2 Cas des aliments liquides

La procédure d'échantillonnage des produits en vrac liquides se fait à l'aide d'un échantillonneur de fond ou à soupape (Figure 4.1 : (d et e)), à partir de :

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

Remarque :

- ✦ L'échantillonnage doit être effectué, aseptiquement, avec les mains propres, ou avec des gants propres en latex, en se servant des récipients propres et stériles ou des sachets stériles ;



- ✦ Les échantillons doivent être identifiés clairement et intégralement ;
- ✦ Les échantillons doivent avoir un transport rapide et un stockage bref ;
- ✦ Les températures suivantes sont recommandées durant le transport :
  - Produits stables : température ambiante (inférieure à 40 °C) ;
  - Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;
  - Autres produits non stables à température ambiante : de 1 °C à 8 °C.
- ✦ Les températures suivantes sont recommandées durant le stockage :
  - Produits stables : température ambiante (de 18 °C à 27 °C) ;
  - Produits congelés ou surgelés : de préférence inférieure à -18 °C ;
  - Autres produits non stables à température ambiante : 3 °C ± 2 °C.

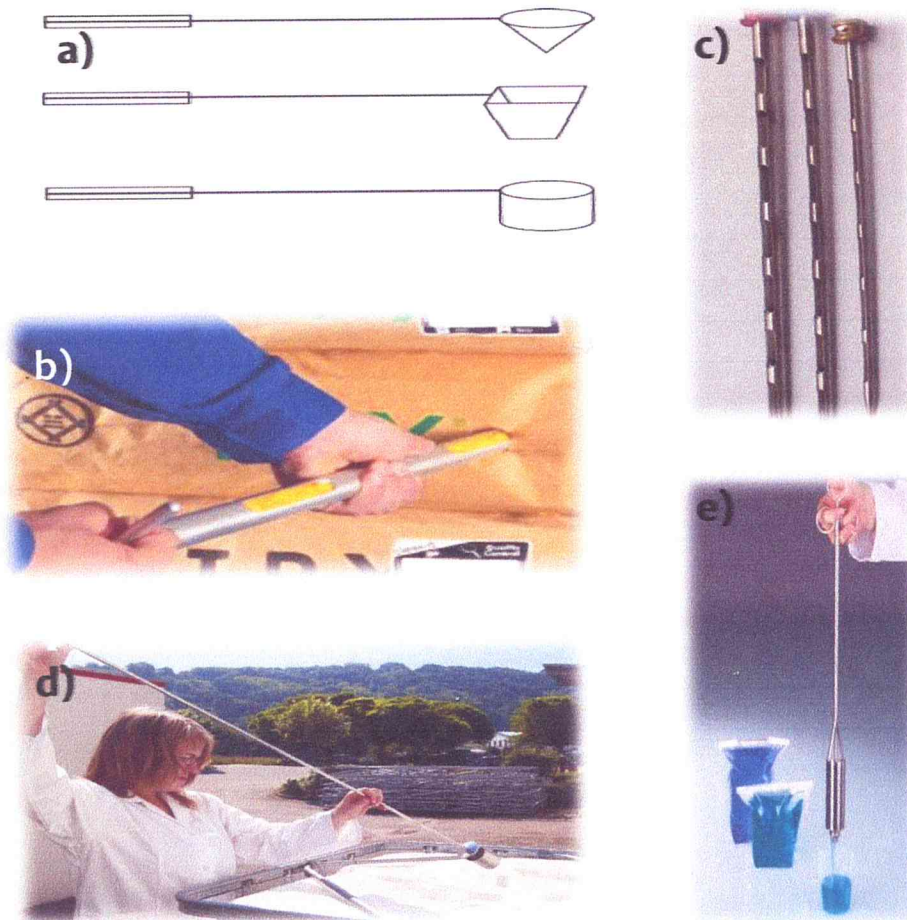


Figure 4.1 : (a) grande pelle et pelle à main (b) et (c) sonde cylindrique (d) et (e) échantillonneur de fond ou à soupape.





### 4.3 Échantillonnage en surface

Dans certains cas, on réalise un échantillonnage en surface :

- ✚ En règle générale on met la surface à analyser en contact avec un diluant stérile, puis on prélève la suspension microbienne ;
- ✚ Par écouvillonnage de la surface, à l'aide d'un écouvillon qui est ensuite mis en suspension dans un diluant stérile, ou directement étalé sur un milieu gélosé ;
- ✚ Au moyen de boîtes de contact ou lames d'immersion remplies du milieu gélosé, qui est pressée contre la surface à soumettre à l'essai.

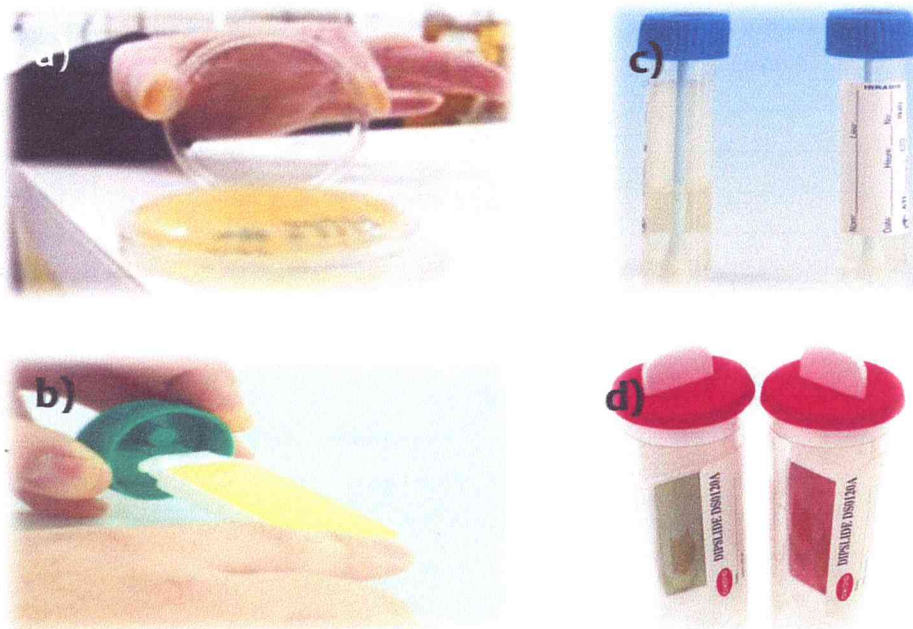


Figure 4.2 : (a) boîtes de contact, (b) et (d) lames d'immersion (c) écouvillons.

### 4-4 Techniques de dilution

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

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





Quant à l'échantillon solide, celui-ci nécessite un broyage dans un diluant stérile à l'aide des broyeurs de laboratoire (Figure 4-3), cet ensemble (échantillon et diluant) constitue la dilution mère (DM), et si nécessaire d'autres dilutions décimales sont réalisées. Le titre des dilutions est calculé de la manière suivante :  $T = P / V$ , avec P est le poids et/ou le volume de l'aliment, V est le volume total de l'aliment plus le diluant.

Dans les deux cas (solide et liquide) plusieurs rapports de dilution sont pratiqués (25 : 225, 10 : 90, 5 : 45, 3 : 27, 1 : 9, 0.5 : 4.5), dont le principe est le rapport 1 : 9. Une partie de l'échantillon, neuf parties de diluant.



1. Qu'est-ce qu'un échantillon de laboratoire ?
2. Qu'est-ce qu'un produit ? Combien d'unités faut-il prélever de ce dernier pour une analyse microbiologique ?
3. Citez au moins trois moyens pour faire un échantillonnage en surface.
4. Donnez les températures de transport et de stockage des produits non stables à température ambiante ?
5. Donnez la température recommandée pour le transport de ces échantillons.

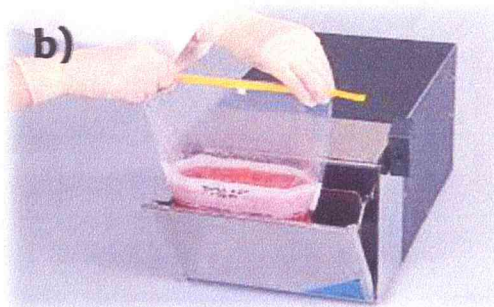
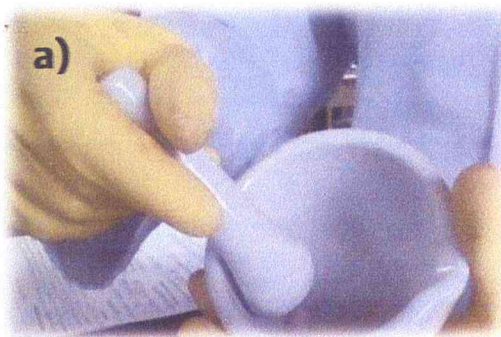
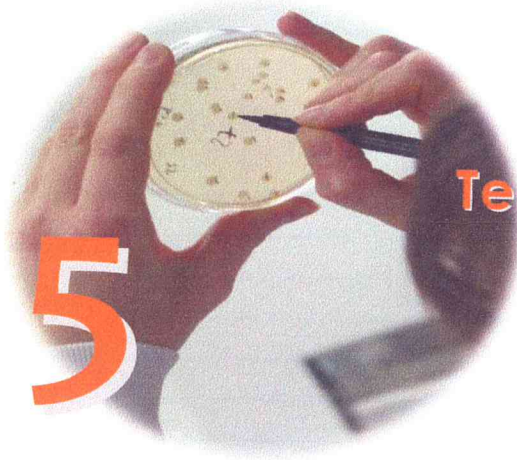


Figure 4.3 : (a) broyeur à main (mortier et pilon), (b) broyeur électrique à pédale type stomacher, (c) broyeur électrique type mortier et pilon, (d) broyeur électrique type à couteaux.



## Techniques classiques de numération de microorganismes

### 5. Techniques classiques de numération de microorganismes

#### 5.1 Numération microscopique

Les techniques de numération microscopique offrent une possibilité de détecter les microorganismes lors de contrôle de produits, simplement en regardant un échantillon directement sous microscope optique. Bien qu'il soit généralement relativement facile de repérer, avec soin et patience, les bactéries, les levures et les moisissures à l'état frais, il est possible de réaliser des colorations afin de rendre ces microorganismes plus facilement visibles, ainsi les deux colorations couramment employées sont la coloration simple au bleu de méthylène et la coloration complexe (double) de Gram.

Dans le cas de certains produits liquides (lait, yaourt, et jus de fruits), il est nécessaire de diluer l'échantillon ce qui permettra de réduire la concentration de microorganismes et de constituants supplémentaires.

#### a. Utilisation des cellules à numération

Les lames type hématimètre comme les cellules de THOMA et de MALASSEZ, pourraient être employées pour le dénombrement des microorganismes. Ces lames sont conçues en verre de 2 à 3 mm d'épaisseur comportant une surface délimitée et quadrillée et recouverte d'une lamelle de sorte qu'elle emprisonne une quantité connue de la solution-dilution de l'aliment à examiner.

- ✚ Cellule de THOMA : d'une taille de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.1 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm<sup>3</sup> (Figure 5.1). La cellule est formée de seize (16) grands carrés, composés chacun de seize (16) petits carrés (application 5.1).
- ✚ Cellule de MALASSEZ : d'une taille de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.2 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm<sup>3</sup> (Figure 5.2). La cellule





comporte cinq (5) bandes horizontales de cinq (5) lignes chacune et cinq (5) bandes verticales de six (6) lignes chacune (application 5.2).



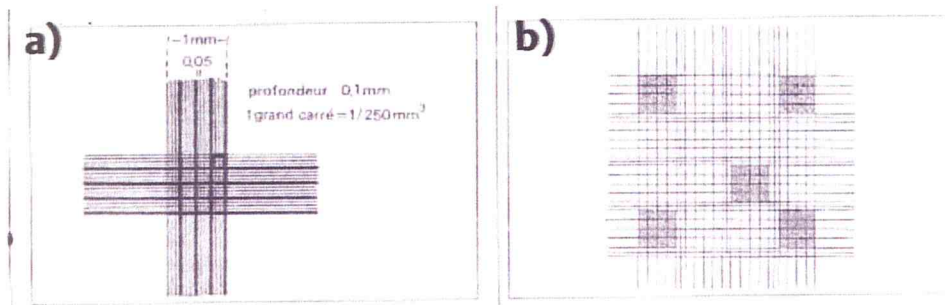
**Application 5.1 :**

- Diluer l'aliment à examiner avec de l'eau formolée à 10 % (on peut ajouter quelques gouttes de bleu de méthylène) ;
- Déposer la suspension de façon à éviter le débordement et la création de bulles d'air ;
- Laisser sédimenter horizontalement pendant 10 minutes, après repérage des limites de la cellule à l'objectif x10, les microorganismes sont comptés dans 4 carrés à l'objectif x40 ;
- Calculer avec la formule suivante :  $N \times 2.5 \times 10^5 \times \text{l'inverse } d$  (si besoin), avec N est le nombre de cellules bactériennes comptées dans un grand carré,  $2.5 \times 10^5$  est 1/ le volume d'un grand carré, et le d est la dilution en question.

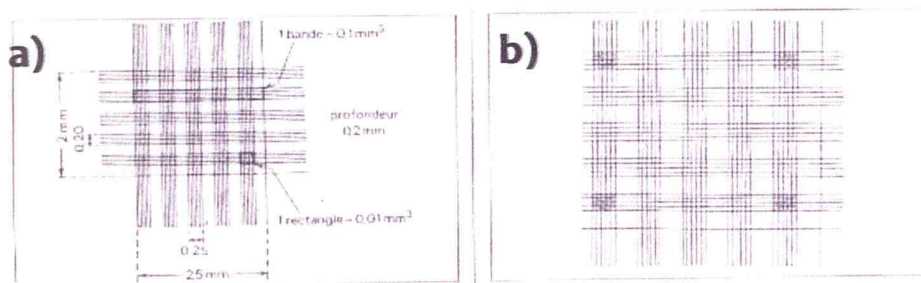


**Application 5.2 :**

- (cf. application 5.1).
- Compter les microorganismes dans 5 bandes horizontales ;
- Calculer avec la formule suivante :  $N \times 2 \times 10^6 \times \text{l'inverse } d$  (si besoin), avec N est le nombre de cellules bactériennes comptées dans 5 bandes horizontales,  $2 \times 10^6$  est 1/ le volume de 5 bandes horizontales, et le d est la dilution en question.



**Figure 5.1 : représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de THOMA (b) cellule de THOMA.**



**Figure 5.2 : représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de MALASSEZ (b) cellule de MALASSEZ.**





### b. La méthode de Breed

Cette méthode utilise des lames comportant une zone délimitée de un centimètre cube ( $1 \text{ cm}^3$ ) sur laquelle on dépose 0.01 ml de la suspension de l'aliment à examiner. Après séchage, fixation et coloration au bleu de méthylène ou éventuellement la coloration de Gram, les microorganismes sont comptés dans 30 à 50 champs microscopiques (application 5.3).



#### Application 5.3 :

- Déposer 0.01 ml de la suspension de l'aliment à examiner, sur la zone délimitée ;
- Sécher, fixer et colorer (si besoin) ;
- Calculer avec la formule suivante :  $N \times S / s \times v$ , avec N est nombre moyen de cellules bactériennes par champs, S est la surface totale de l'échantillon par  $\text{cm}^2$ , s est la surface du champ microscopique qui est égale à  $10^{-4}$ , v est le volume de l'échantillon qui est égal à 0.01 ml.

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

C'est une technique de numération microscopique, qui est appliquée pour le dénombrement des microorganismes dans toutes sortes de produits. Elle permet d'obtenir une sensibilité nettement accrue de  $10^3$  à  $10^4$  microorganismes par ml, suite à une concentration des microorganismes contenus dans la suspension de l'aliment à examiner sur un filtre à membrane, suivie d'une coloration à orange d'acridine. Les microorganismes retenus sur la membrane sont comptés directement sous le microscope à épifluorescence.

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

Cette technique non quantitative est utilisée pour des espèces déterminées (Lactobacilles, Salmonelles, etc.) ou il existe une corrélation entre le nombre de microorganismes au début et à l'issue de l'incubation. Une suspension de l'aliment à examiner dans un milieu d'enrichissement sélectif est réalisée, suivie par une incubation aux temps et température appropriés du microorganisme, puis une numération sur lame au microscope optique.

## 5.2 Numération en et sur milieu solide

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

C'est la méthode standard d'énumération des germes aérobies, dont l'utilisation nécessite un milieu de croissance claire pour permettre le comptage des colonies au moyen d'un compteur de colonies. Les germes anaérobies ont besoin d'une deuxième couche de gélose qui permet de maintenir un environnement anaérobie (méthode de la double couche) (application 5.4).



**Application 5.4 :**

- Déposer à l'aide d'une pipette 1 ml de la solution-dilution dans deux boîtes de pétri ;
- Verser environ 15 ml de la gélose en surfusion ;
- Mélanger chaque boîte par mouvement de cinq fois dans un sens : vertical, horizontal, horaire et antihoraire ;
- Laisser solidifier ;
- Incuber au temps / température approprié au microorganisme (boîtes renversées) ;
- Compter les colonies dans les boîtes contenant entre 10 et 300, et le nombre UFC / ml ou par g d'échantillon est calculé de la manière suivante :  
 $N = C / v (n_1 + 0.1 n_2) d$  : cas de deux boîtes par dilution ;  
 $N = C / 2 v d$  : cas de deux boîtes d'une seule dilution ;  
 $N = C / v d$  : cas d'une seule boîte d'une seule dilution.  
 Avec C est la somme des colonies, v est le volume qui est égal à 1 ml,  $n_1$  et  $n_2$  est le nombre de boîtes comptées à la première et la deuxième dilution, respectivement, et le d est la dilution en question.

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

Cette méthode est préférable lorsque des milieux sélectifs sont utilisés pour le dénombrement de groupe spécifique de microorganismes aérobies, car elle permet la manifestation de propriétés coloniales de ces microorganismes, telles que : morphologie, pigmentation, hémolyse, halos de précipitation, ou changements de couleur du milieu de culture (application 5.5).

**Application 5.5 :**

- Verser environ 15 ml de la gélose en surfusion par boîtes de Pétri (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- Laisser solidifier ;
- Transférer, à l'aide d'une pipette ou à l'anse calibrée, 0,1 ml de la solution-dilution à la surface de la gélose solidifiée ;
- Étaler l'inoculum uniformément sur toute la surface à l'aide d'un étaleur ;
- Incuber au temps / température approprié au microorganisme (boîtes renversées) ;
- Compter les colonies dans les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies ou bien entre 15 et 150 (pour la formule de calculer cf. application 5.4).

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

Pour cette technique, une machine distribue un petit volume entre 0.05 et 0.4 ml de la suspension de l'aliment à examiner, à la surface des boîtes (à contenu uniforme en milieu de culture) qui sont en rotation, ceci en suivant une distribution spirale à partir du centre vers la périphérie de la boîte, ou bien dans d'autres cas dans le sens inverse à partir de la périphérie vers le centre de la boîte. Après incubation, le comptage de colonies se fait à l'aide d'un compteur de colonie muni



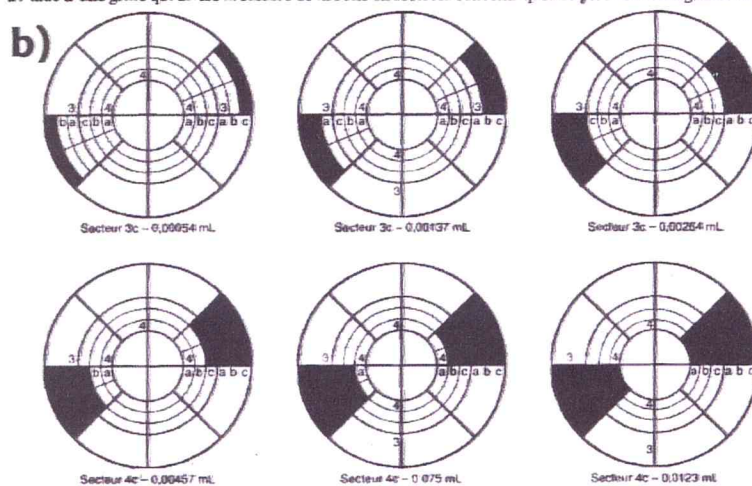
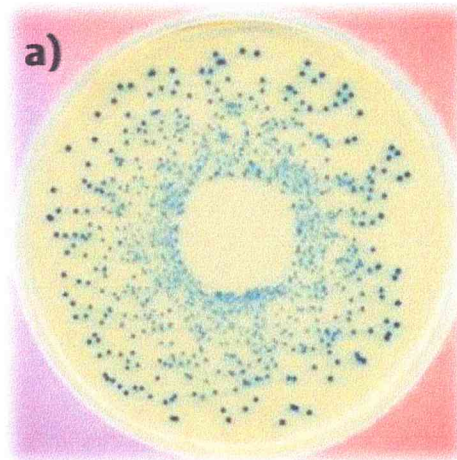


d'une grille de visualisation ou avec un compteur de colonies à laser (Figure 5.3 : a et b) (application 5.6).



**Application 5.6 :**

- Si pour le secteur 3c on dénombre  $N = 28$  colonies, ces colonies proviennent de  $v = 0.45 \mu\text{L}$ .  
Le nombre de microorganismes par ml d'échantillon  $N$  est calculé de la manière suivante :  
$$N = n / v$$
  
avec  $n$  est le nombre de colonies comptées dans secteur,  $v$  est le volume du secteur.
- Si pour le secteur 3c on dénombre  $N = 15$  colonies, en poursuit la numération sur le secteur 3b : on dénombre alors 15+19 colonies provenant de  $v = 1.37 \mu\text{L}$ .  
Le nombre de microorganismes par ml d'échantillon  $N$  est calculé de la manière suivante :  
$$N = (n_1 + n_2) / v$$
  
avec  $n_1$  est le nombre de colonies comptées dans le premier secteur,  $n_2$  est le nombre de colonies comptées dans le deuxième secteur,  $v$  est le volume des deux secteurs.



**Figure 5.3 : (a) vue d'une boîte après culture en spirale  
(b) grille de comptage.**





#### d. Technique de gouttes (drop plate)

Des gouttes ayant le même volume par exemple 0.02 ml, de la solution-dilution de l'aliment à examiner, sont déposées à la surface d'un milieu gélosé sectorisé au maximum en six secteurs par boîte. Après incubation, le comptage de colonies se fait sur tous les secteurs contenant 30 ou moins de colonies par goutte, de la manière suivante :

- nombre moyen de colonies par goutte :  $C / x$ .
- nombre de UFC / g ou ml d'échantillon :  
 $N = C / x \times v \times d$  (si besoin) ; ou  
 $N = C / x \times (1.1 \times v) \times d$  (si besoin), cas de plusieurs dilutions utilisées.  
Avec C est la somme des colonies, x est le nombre de gouttes utilisées, v est le volume de la goutte, d est la dilution utilisée.

#### e. Numération en tubes (roll tube count)

À la place des boîtes de Pétri, on emploie des tubes contenant 2 à 4 ml de milieu gélosé. Ensuite, 0.1 ml de la solution-dilution de l'aliment à examiner est inoculé dans le milieu en surfusion, et les tubes sont roulés horizontalement sous l'action de l'eau froide. Après incubation les colonies sont comptées.

#### f. Filtration sur membrane

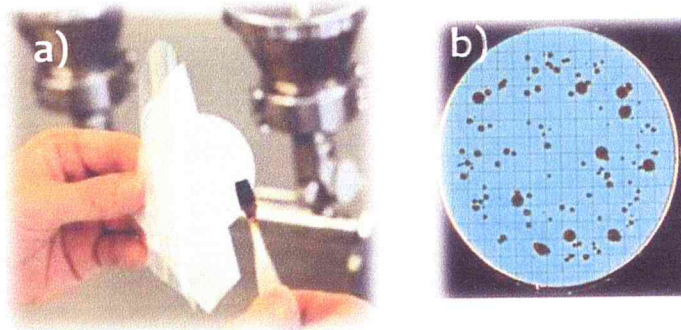
Cette technique est utilisée pour estimer le nombre de microorganismes lors du contrôle des liquides alimentaire (l'eau, boissons...). Elle consiste à une concentration de microorganismes sur membrane au moyen d'un appareil de filtration mono ou pluri-postes. Les filtres utilisés sont conçus à partir de :

- ✚ mélange d'esters de cellulose ;
- ✚ de polymères similaires (nitrate de cellulose, acétate de cellulose) ;
- ✚ à partir d'autres polymères : polyamide, polypropylène, polycarbonate, polytétrafluoroéthylène (PTFE)).

Le nombre de colonies N par ml d'échantillon est calculé de la manière suivante :  $N = n / v$ , avec n nombre de colonies, v est le volume de l'échantillon qui est égal, généralement, à 100ml.

#### a. Lames et bandes à immerger (dip slides)

Lors du contrôle des produits alimentaires et / ou les surfaces, les lames et bandes à immerger sont utilisées pour estimer le nombre de microorganismes (Figure 5.5) (application 5.7).



5.4 : (a) montage de filtration sur membrane, (b) filtre membrane après culture.

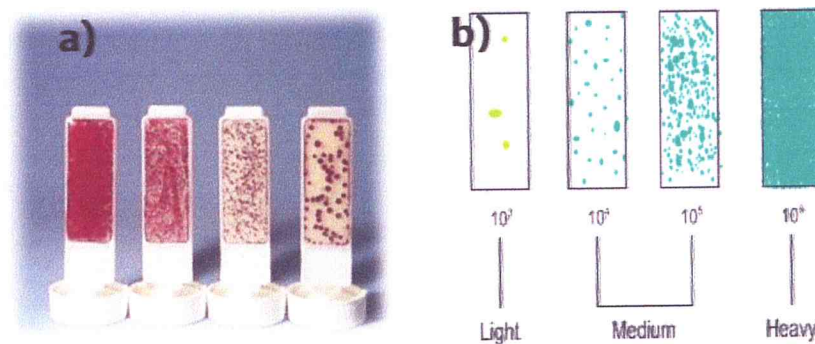


Figure 5.5 : (a) bandes à immerger après culture (b) représentation schématique d'une lecture des bandes à immerger.



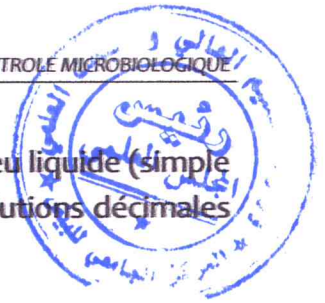
#### Application 5.7 :

- Retirer la lame à immerger de son récipient et la plonger dans solution-dilution de l'aliment à examiner ;
- Égoutter la lame ;
- Replacer la lame dans son récipient ;
- Incuber au temps / température approprié au microorganisme ;
- Compter les colonies et calculer avec la formule suivante :  
 $N = C / A \cdot 10^3$ , avec C est le nombre de colonies sur la lame, A est la surface en  $\text{cm}^2$  de la gélose ;  
 $N = C / A$ , avec C est le nombre de colonies sur la lame, A est la surface en  $\text{cm}^2$  de l'échantillonnage qui est égale à  $4 \text{ cm}^2$ .

### 5.3 Numération en milieu liquide

Cette numération en milieu liquide est connue sous le nom de la méthode du nombre le plus probable (NPP) de Mc GRADY, elle est utilisée, généralement, pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux, et Streptocoques fécaux dans l'eau.





Cette technique est basée sur l'utilisation de trois tubes de milieu liquide (simple ou double concentration), ensemencé avec (1 ou 10 ml) de trois dilutions décimales de l'aliment à examiner (méthodes de 3).

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 Mc GRADY. La croissance est appréciée par le trouble microbien, par le virage de couleur du milieu, ou par la production de gaz carbonique.



**Application 5.8 :**

- à la dilution  $10^{-1}$  : 3 tubes sur 3 sont positifs, à la dilution  $10^{-2}$  : 2 tubes sur 3 sont positifs et à la dilution  $10^{-3}$  : 1 tube sur 3 est positif.  
Le nombre caractéristique est donc : 321, ce qui correspond sur la table de Mc GRADY au nombre de 15. Alors il y a 15 coliformes totaux par ml à la dilution  $10^{-1}$ , et 150 coliformes totaux par ml de produit à analyser.

**Tableau 5.1 : table de Mac Grady (méthode de 3 tubes)**

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP	Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	< 0,3	230	2,9
001	0,3	300	2,3
010	0,3	301	4
020	0,6	302	6
100	0,4	310	4
101	0,7	311	7
110	0,7	322	12
111	1,1	320	9
120	1,1	321	15
121	1,5	322	21
200	0,9	323	29
201	1,4	330	20
210	1,5	331	50
211	2,0	332	110
220	2,1	333	>110
221	2,8		



1. Suite à une intoxication alimentaire due à une consommation de blé lors de la célébration de la fête Yennayer, un laboratoire de contrôle a réceptionné cet aliment, incriminé, pour l'analyser. L'analyse microbiologique a débuté par un broyage de blé et une préparation des dilutions décimales dans un diluant. Après quoi une numération des microorganismes, selon la technique de Breed, a été réalisée, aussi un ensemencement dans la masse, en double couche, sur milieu





ordinaire PCA et un autre en surface sur milieu sélectif OGA, ont été réalisés.

- Qu'entendez-vous par le terme intoxication alimentaire ? Quel est l'équipement de laboratoire utiliser pour le broyage. Donnez au moins deux noms ? Quel est le diluant utilisé ? Comment peut-on calculer le titre de la première dilution ? Qu'appelle-t-on cette dernière ? Donnez le volume de l'inoculum dans les deux cas d'ensemencement ? Pourquoi réalise-t-on la double couche ?
  - La numération a donné une moyenne de 3 cellules sur 30 champs microscopiques. Calculer le nombre de germes / g d'échantillon ?
  - Le dénombrement de deux boîtes OGA à la dilution  $10^{-2}$  et  $10^{-3}$  a donné, respectivement, 310 et 210 colonies. Calculez le nombre d'UFC / g d'échantillon ?
1. Suite à un ensemencement en double couche d'une petite aliquote de la dilution de la viande hachée, sur milieu ordinaire, à raison de deux biotes par dilution, le dénombrement des germes aérobies a donné : à la dilution  $10^{-1}$  (309 et 321 colonies), à la dilution  $10^{-2}$  (314 et 310 colonies), à la dilution  $10^{-3}$  (247 et 233 colonies).
    - Pourquoi réalise-t-on la double couche ?
    - Quel est le volume de cette petite aliquote ?
    - Calculez le nombre d'UFC / g d'échantillon ?
    - Qu'appelle-t-on la première dilution dans ce cas ?
  2. Le genre *Salmonella* est à l'origine d'une infection alimentaire. Une numération de ce genre à partir d'un lait acidifié réalisée sur une cellule de Thoma a donné zéro cellule. Tandis que, son dénombrement réalisé après ensemencement en surface sur milieu sélectif SS a donné, une colonie à la dilution  $10^{-1}$  et zéro colonie à la dilution  $10^{-2}$ .
    - Définissez le terme infection alimentaire.
    - Citez deux autres microorganismes incriminés dans les infections alimentaires.
    - Décrivez la procédure de calcul utilisé dans le cas de la cellule de Thoma.
    - Comment peut-on exprimer le résultat de dénombrement sur la gélose SS ?
  3. Lors d'un contrôle en cours de fabrication, un échantillonnage a été effectué sur un produit et les surfaces de travail, en vue d'une analyse microbiologique. Le dénombrement des Coliformes et Coliformes fécaux a été réalisé sur le milieu BCPL avec cloche de Durham. La recherche de certains *Clostridium sulfito-réducteurs* (CSR) et de *Pseudomonas* a été faite sur milieu VF et cétrimide, respectivement. Le résultat obtenu est donné dans le tableau (cf. annexe 2).
    - Que signifient BCPL et VF ?
    - Qu'est-ce qu'un tube positif ?
    - Comment peut-on donner le nombre de coliformes et coliformes fécaux ?
    - Comment peut-on vérifier la présence du coliforme *Escherichia coli* ?
    - Quel est l'aspect des colonies suspectes CSR ? Justifiez. Calculez leur nombre par produit et par surface d'échantillonnage.
    - Calculez le nombre de *Pseudomonas* par produit et par surface d'échantillonnage.
  4. Lors d'une étude de fin de cycle, portée sur un contrôle microbiologique, douze échantillons ont été prélevés et transportés aussitôt au laboratoire : surfaces (du 1 au 8), eau (9 et 10) et riz (11 et 12). L'écouvillonnage des surfaces a été effectué selon NA 15177 sur des zones de 20 cm<sup>2</sup>. L'échantillonnage de l'eau et de riz a été réalisé conformément à l'ISO. Les analyses ont été portées sur la recherche et le dénombrement des germes suivants : germes aérobies, coliformes et coliformes fécaux, et *Staphylococcus* à coagulase positif (cf. annexe 3).
    - Que signifient : SM et DM ?
    - Donnez les noms des milieux utilisés pour ces germes.
    - D'où vient l'appellation du germe *Staphylococcus*.
    - Quel est l'aspect des colonies de ces germes sur chaque milieu ? Justifiez.
    - Calculez le nombre de germes dans l'eau, le riz et les surfaces.





5. Une unité de production cherche à contrôler la qualité de son produit (lait) depuis la matière première jusqu'au produit fini. Ce contrôle a été réalisé selon la norme ISO au moyen de l'ensemencement automatique en spirale, et par dénombrement des germes aérobies sur gélose PCA, des staphylocoques sur gélose BP et des coliformes thermotolérants sur gélose BCP. Après incubation la grille a donné les résultats reportés dans le tableau (cf. annexe 4) :
- Que signifient ISO, PCA, BP et BCP ?
  - Qu'est-ce que la qualité selon l'ISO ?
  - Donnez le rapport temps / température d'incubation pour les coliformes thermotolérants.
  - Citez au moins deux avantages pour cette technique de numération.
  - Calculez le nombre des germes aérobies, des staphylocoques et les coliformes thermotolérants par millilitre d'échantillon. Justifiez les calculs.





## Identification phénétique des bactéries

### 6. Identification phénétique des bactéries

De nombreux caractères sont exploités pour identifier une bactérie, déjà isolée à l'état pur. Dans ce manuscrit, que la catégorie de caractères phénotypique ou phénétique (culturels, morphologiques, biochimique et physiologiques, immunologique, et de pouvoir pathogène) sera discutée.

#### 6.1 Caractères culturels

La taille, la forme, la couleur, l'opacité, la surface, la consistance, l'odeur, et évidemment tout changement produit à la surface du milieu solide, sont les caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne (amas de cellules) (Figure 6.1).

À l'œil nu ou à l'aide d'une loupe binoculaire, les colonies sont observées par transparence, réflexion ou transillumination oblique, ceci en lumière naturelle et / ou artificielle (Figure 6.2).

- ✚ **La taille ou le diamètre :** peut-être mesurée à l'aide d'une règle millimétrique graduée ;
- ✚ **L'aspect de la surface :** peut-être lisse ou rugueux ;
- ✚ **La forme :** (plan, relief, bord) centre parfois surélevé, ombiliqué en creux ;
- ✚ **L'opacité :** les colonies sont décrites comme : opaques (ne laissent pas passer la lumière) ; translucides (laisse passer la lumière mais on ne voit pas les formes au travers, comme le verre dépoli) ; transparentes (laissent passer la lumière et voir les formes au travers, comme le verre) ;
- ✚ **La consistance :** au moment du prélèvement il est possible d'apprécier si les colonies sont : grasses / crémeuses (on obtient facilement des suspensions homogènes) ; sèches / muqueuses (on obtient difficilement des suspensions homogènes) ;



- ✚ **La couleur (pigmentation) :** sur des géloses ordinaires, les colonies sont habituellement crème, alors que sur des milieux sélectifs, les colonies, sont d'une couleur différente, ceci est due à divers pigments de couleur jaune, rouge, orange, violet, etc. ;
- ✚ **Odeur :** une odeur caractéristique peut être présente (*Pseudomonas aeruginosa*, odeur fruitée associée à celle des pommes vertes).

En rassemblant les caractères dessus, trois types de colonies peuvent être distingués :

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

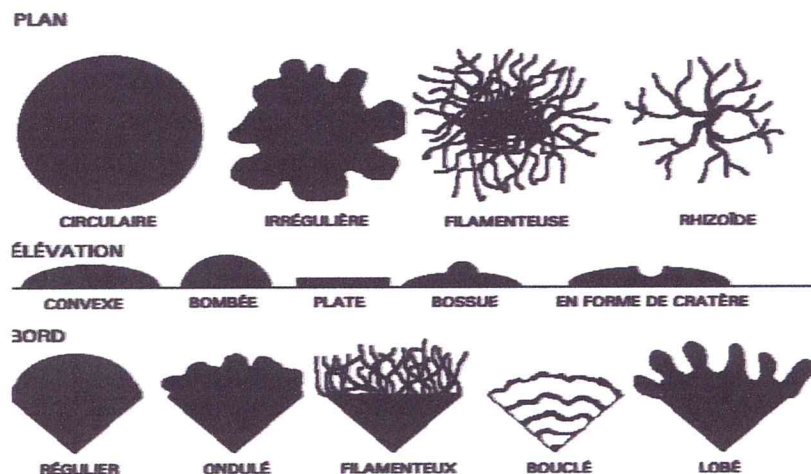


Figure 6.1: représentation schématique des caractères fréquemment utilisés pour caractériser macroscopiquement une colonie bactérienne.

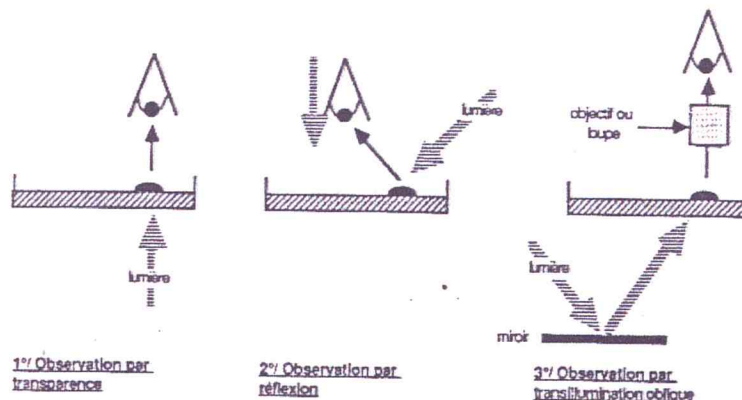


Figure 6.2: technique d'observation de l'aspect d'une colonie bactérienne : transparence, réflexion ou transillumination oblique.





## 6.2 Caractères morphologiques et structuraux

### a. Coloration de Gram

La coloration de Gram (le premier test à réaliser) permet de diviser les bactéries en deux grands groupes : celles à paroi type Gram+ (qui retiennent le violet de gentiane) et celles à paroi type Gram- (qui prennent la couleur de la safranine après lavage par l'alcool).

Cette méthode est basée sur la structure et la composition de la paroi. Les lipides assez forts chez les Gram- que les Gram+, sont extraits par l'action de l'alcool entraînant, ensuite, une augmentation de la perméabilité et l'extraction du complexe violet de gentiane-iodé, ceci lui permettant de prendre la couleur de la safranine (fuschine).

Aussi, ce test permet de diviser les bactéries selon leurs forme en deux grands groupes : cocci et bacille, et il fournit de précieuses informations en ce qui concerne le mode de groupement qui peut être en : diplocoques, chainettes, tétrades, amas, et palissades. Il est à noter que même sans ce type de coloration (coloration complexe et / ou double), à l'état frais la forme, le groupement et la mobilité pouvons être observés. (Application 6.1).



#### Application 6.1 :

- Étaler aseptiquement la suspension bactérienne sur 2 cm<sup>2</sup> environ d'une lame propre, sèche et stérile ;
- Fixer de la suspension par passage au-dessus de la flamme du bec Mecker (pendant quelques minutes) ;
- Placer la lame sur le bac de coloration ;
- Inonder le frottis par le violet de gentiane (1 min) ;
- Laver avec de l'eau distillée stérile ;
- Additionner lugol (1 min) ;
- Laver avec de l'eau ;
- Décolorer pendant 15 secondes par de l'éthanol à 95° ;
- Inonder par la fuschine de Ziehl diluée au 15<sup>ème</sup> pendant (1 min) ;
- Laver avec de l'eau ;
- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x100 (à immersion).

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

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



**Application 6.2 :**

- Étaler aseptiquement la suspension bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;
- Sécher et fixer la suspension bactérienne au-dessus de la flamme du bec ;
- Placer la lame sur le bac de coloration ;
- Inonder la suspension bactérienne par de la fuchsine phéniquée et chauffer jusqu'à émission (5 min) de vapeur, laisser pendant (10 min) ;
- Laver avec de l'eau distillée stérile ;
- Double décoloration par addition d'acide nitrique dilué au 1/3 (30 s), rinçage, ensuite addition d'alcool éthylique à 95° (30 s) ;
- Laver avec de l'eau ;
- Inonder par le bleu de méthylène (2 min) ;
- Laver avec de l'eau ;
- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x 100 (à immersion).

**c. Coloration de la capsule**

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

**Application 6.3 :**

- Déposer aseptiquement la culture bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;
- Laissez la lame sécher à l'air libre ;
- Placez la lame sur une grille de coloration ;
- Inonder la suspension bactérienne par le cristal violet ;
- Laisser reposer environ 7 min ;
- Rincer soigneusement la suspension bactérienne avec du sulfate de cuivre à 20% ;
- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grandissement x100 (à immersion).

**Interprétation**

Les capsules apparaissent comme de légers halos autour des cellules bactériennes.

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

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





#### Application 6.4 :

- Déposer aseptiquement la culture bactérienne sur la lame propre, sèche et stérile ;
- Laissez la lame sécher à l'air libre, puis fixer à la chaleur au-dessus de la flamme du bec ;
- Placer la lame sur le bac de coloration (équipé d'un bain-marie) ;
- Couvrir la lame avec du papier ;
- Inonder la lame avec le vert de malachite à 5% ;
- Chauffer pendant environ 6 min ;
- Retirez le papier à l'aide d'une pincette ;
- Laissez la lame refroidir et rincer là avec de l'eau pendant 30 s ;
- Inonder la lame avec de la safranine ou au mercurochrome à 5% pendant 1 min ;
- Laver la lame avec de l'eau pendant 30 s ;
- Sécher la lame avec du papier absorbant et examiner au grossissement x100 (à immersion).

#### Interprétation

Les spores (que ce soit endospores ou libres) se colorent en vert, alors que les cellules bactériennes (végétatives) se colorent en rouge.

### 6.3 Caractères biochimiques et physiologiques

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

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

- (1) **Aérobie strict** : l'accepteur final de l'hydrogène est obligatoirement l'O<sub>2</sub> de l'air, exemple : *Pseudomonas aeruginosa* ;
- (2) **Anaérobie strict** : l'accepteur est de nature différente et l'O<sub>2</sub> est toxique ;
- (3) **Anaérobie aérotolérant** : sont capables de croître en présence ou en l'absence d'O<sub>2</sub>, l'accepteur est de nature différente et l'O<sub>2</sub> n'est pas toxique, exemple : *Campylobacter jejuni* ;
- (4) **Anaérobie facultatif (aéroanaérobie)** : la bactérie se développe indifféremment dans des conditions d'aérobie ou d'anaérobiose mais se développe mieux en sa présence, exemple : Entérobactéries ;
- (5) **Microaérophile** : ont besoin d'O<sub>2</sub> mais à un niveau acceptable.



#### Application 6.5 :

- Régénérer la gélose viande foie (VF) par ébullition au bain-marie ;
  - Ensemencer, à l'aide de la pipette Pasteur boutonnée, la gélose suffusion (45°C) ;
  - Ensemencer en introduisant la pipette Pasteur au fond du tube et en remontant en spirale ;
  - Refroidir à l'eau courante ;
  - Placer ensuite le tube à l'étuve (à 37°C) pendant 24 heures.
- Interprétation**  
Croissance : en surface (aérobie strict), sur toute la gélose (anaérobie aérotolérant, aéroanaérobie), en bas de la gélose (anaérobie strict), en dessous de la surface (microaérophile).





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

La détermination de l'oxydation-fermentation et la possibilité que d'autres sucres soient assimilés comme seule source de carbone sont importantes à des fins taxinomiques.

Les bactéries assimilent le (s) sucre (s) en produisant de l'acide et fréquemment du  $\text{CO}_2$  en présence ou en absence d' $\text{O}_2$ . L'acidification du milieu est détectée par changement de couleur du milieu dû à la présence d'un indicateur coloré (BCPL, rouge de phénol, bleu de bromothymol, etc.). Le  $\text{CO}_2$  est révélé par l'élévation de la cloche du durham car il est libéré au fond du tube (cas de la voie oxydative il est produit en surface donc n'y a pas élévation de la cloche). Plusieurs techniques utilisant différents milieux (MEVAG, TSI, bouillon divers...) sont pratiquées.

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

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

### **d. Accepteurs de l' $\text{H}_2$**

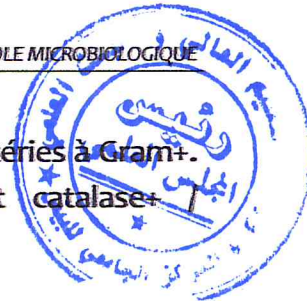
✚ **La sulfito-réduction** : les anaérobies sulfito-réducteurs sont capables d'utiliser les sulfites comme accepteurs d' $\text{H}_2$  en les réduisant en sulfures. Ce test est réalisé sur milieux solides (VF) ou bien semi-solide contenant de sulfite de sodium et l'alun de fer. Après incubation la réduction se traduit par un noircissement (la production d' $\text{H}_2\text{S}$ ) ;

✚ **La réduction des nitrates** : les anaérobies sont, aussi, capables d'utiliser les nitrates comme accepteurs d' $\text{H}_2$  en les réduisant en nitrites. Ce test est réalisé sur milieux solides ou bouillons à 1 % de nitrate de potassium. Après incubation, la réduction nitrates en nitrites est révélée par l'ajout de 0.1 ml du réactif  $\text{NiT}_1$  et  $\text{NiT}_2$ . Une coloration instantanée rouge ou rose indique la réduction des nitrates. Un résultat négatif doit être vérifié par l'addition de poudre de zinc.

### **e. Enzymes respiratoire**

✚ **Catalase** : une enzyme qui hydrolyse le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) en eau et en oxygène (un dégagement de bulles d'air, instantanément, indique sa présence). Ce test réalisé, généralement par deux techniques, constitue un bon élément de différenciation et divise les bactéries en deux groupes celles à catalase+ et à celles catalase-. La catalase est un





test clé communément utilisé pour l'identification des bactéries à Gram+.  
Exemple : Staphylocoques ; *Listeria monocytogène* sont catalase+  
Streptocoques est catalase- ;

- ✚ **Cytochrome oxydase** : la dernière enzyme de la chaîne respiratoire, elle catalyse le transfert de l' $H_2$  sur l' $O_2$ , elle est mise en évidence par la réaction d'oxydation de l'oxalte de diméthyl-paraphénylène-diamine, ce substrat est incolore sous forme réduite est rouge sous forme oxydée. Inversement à son précédent, l'oxydase est un test clé communément utilisé pour l'identification des bactéries à Gram-. Exemple : *Pseudomonas* spp. et *Neisseria* spp. sont oxydase+ / *Acinetobacter* spp. est oxydase-.



#### Application 6.3 :

- Mettre en contact la colonie bactérienne avec de l'eau oxygénée 10V ( $H_2O_2$ ) sur une lame ; ou
- Ajouter à une culture bactérienne jeune quelques gouttes de l'eau oxygénée 10V (culture dans un tube à essai) ;
- La réaction est positive si on observe un dégagement gazeux dû à la libération de l'oxygène ( $O_2$ ).

Interprétation

catalase+ : effervescence / catalase- : pas d'effervescence.



#### Application 6.3 :

- Déposer un disque d'oxydase imprégné de diméthyl-para-phénylène-diamine sur un papier-filtre stérile ;
- Humidifier le disque avec quelques gouttes d'eau distillée stérile ;
- Déposer une suspension bactérienne sur le disque.

Interprétation

oxydase+ : coloration rouge / oxydase- : incolore.

## f. Dégradation des acides aminés

- ✚ **TDA, Tryptophanase et PDA** : enzymes utilisées en identification bactérienne. Le tryptophane-désaminase (TDA) catalyse la réaction de la désamination du tryptophane en acide indole-pyruvique et ammoniac. Tandis que la tryptophanase catalyse la réaction de dégradation du tryptophane en indole, acide pyruvique, et ammoniac. L'addition de chlorure de fer III ( $FeCl_3$ ) réagit avec l'acide indole-pyruvique en donnant un précipité de couleur marron et l'addition de réactif de Kovacs réagit avec l'indole en donnant un anneau rouge en surface. Exemple : *E. coli* est Indole+. Alors que, la phényl-alanine-désaminase (PDA) catalyse la réaction de la désamination de la phénylalanine en acide phénylpyruvique et ammoniac. L'activité de la phényl-alanine-désaminase





(PDA) est réalisée sur gélose inclinée à la phényl-alanine. L'acide phénylpyruvique (APP) donne une teinte verte en présence de chlorure de fer III.

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

### g. Dégradation du lactose

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

### h. Dégradation de l'urée

- ✚ **Uréase :** hydrolyse l'urée en ammoniac et carbonate d'ammonium aboutit à l'alcalinisation du milieu, qui est décelable par changement de couleur du milieu dû à la présence d'un indicateur coloré (généralement le rouge de phénol). Ce test permet d'identifier certaines espèces d'entérobactéries, *Corynebacterium urealyticum*, et *Helicobacter pylori*.

### i. Caractères biochimiques et physiologiques divers

- ✚ **Mobilité :** est recherchée sur milieu semi-solide (en culot). L'ensemencement est réalisé par piqure centrale, après incubation la mobilité se traduit par l'envahissement du milieu.
- ✚ **Températures de croissance, halophilie-osmophilie et pH :** l'évaluation de l'habilité de croissance dans des conditions hostiles, présente parfois un grand intérêt en identification. L'habilité à croître à différentes températures, à différentes concentrations en NaCl ou en saccharose et à différentes valeurs de pH est réalisée sur milieux liquides ou solides.
- ✚ **Résistance aux antibiotiques et aux inhibiteurs :** l'habilité à croître en présence de certains antibiotiques ou agents inhibiteurs est largement





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

#### 6.4 Caractères immunologiques (sérologique)

- ✚ **Les réactions sérologiques :** de type bactérie-anticorps (réaction d'agglutination) ou de type antigène-anticorps (réaction de précipitation) sont utilisées en taxinomie essentiellement pour les Entérobactéries dont contiennent trois types d'antigènes : H, O, et K ; et les streptocoques dont le plus important est le type C : A, B, C, D, N. Ces tests sérologiques se font principalement suivant la technique de Lancefield basée sur l'utilisation de polysaccharides (notamment la polyside C) de l'enveloppe cellulaire en tant qu'antigène.

#### 6.5 Pouvoir pathogène

- ✚ **Coagulase :** ce caractère permet seul d'affirmer la présence de *St. aureus* qui est coagulase+ des autres *Staphylococcus* qui sont à coagulase- (*St. epidermidis*, *St. saprophyticus*). *St. aureus* produit deux types de coagulase : (1) coagulase libre (enzyme extracellulaire) et (2) la coagulase liée (protéine associée à la paroi). Les deux enzymes sont capables *in vitro* de coaguler le plasma de lapin (la formation d'un caillot de fibrine insoluble).
- ✚ **Hémolysines  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  :** enzymes responsables de la lyse des hématies, ils sont mises en évidence par culture sur gélose au sang. Hémolysines  $\alpha$  (zone verdâtre due à la metmyoglobine, exemple : *S. pneumonia* ; Hémolysines  $\beta$  (auréole claire due à la libération de l'hémoglobine, exemple : *St. aureus*) ; Hémolysines  $\gamma$  (pas de modification, pas d'hémolyse autour des colonies, exemple : *E. faecalis*).
- ✚ **ADNase :** enzyme qui détruit le noyau des cellules, elle est mise en évidence sur milieux contenant de l'ADN. L'hydrolyse de l'ADN est caractérisée par une zone claire, exemple : *St. aureus*+ et *St. epidermidis*-



1. La catalase est utilisée communément pour identifier quel groupe bactérien ?
2. Expliquez le principe du test catalase ?
3. Le test oxydase est utilisé communément pour identifier quel groupe bactérien ?
4. Quelle est l'élément distinctif lors de la coloration de Gram ?
5. Pourquoi une bactérie type Gram se colore en bleu lors de la coloration de Ziehl-Neelsen ?
6. Comment définissez-vous le terme aérobie ?
7. Quelles sont les deux principales formes bactériennes que vous connaissez ?
8. Classez les bactéries, selon leurs réponses de croissance en présence et en absence d'oxygène, en donnant la différence entre elles.
9. Comment peut-on réaliser le test coagulase ?
10. Certains tests réalisés pour la confirmation au niveau du genre ont donné les résultats suivants :  
bacille mobile aéroanaérobie, à Gram-, TDA-, indole-.
  - Comment définissez-vous le terme aéroanaérobie ?
  - Sous quelle couleur apparaissent les Gram- ? Quel est le constituant qui joue le rôle déterminant au cours de la coloration de Gram ?
  - Quelle différence existe entre ces deux tests : TDA et indole ?





## Les techniques rapides de détection

### 7. Les techniques rapides de détection

L'évaluation de l'activité microbienne est aussi importante que l'évaluation du nombre de microorganismes. Un certain nombre de techniques de détection, relativement récentes, ont été développées, qui visent à donner des réponses plus rapides et ils sont donc souvent dénommées « techniques rapides de détection » :

#### 7.1 Spectroscopiques

##### a. Réduction des colorants

Le principe repose sur la réponse d'un colorant redox à la présence de microorganismes métaboliquement actifs qui se traduit par un changement de couleur. Deux colorants sont couramment utilisés pour estimer le nombre de microorganismes viables : le bleu de méthylène (passe du bleu au blanc) et la résazurine, qui a été utilisée dans des contrôles des laits et les viandes fraîches et hachées. Ce colorant est réduit et passe du bleu au rose à l'incolore. Le temps nécessaire à la décoloration peut être mesuré pour évaluer le nombre de microorganismes viables. L'appréciation de la décoloration s'effectue généralement à l'œil ou à l'aide d'un spectrophotomètre.

##### b. Mesure d'activités enzymatiques

La technique des colorants redox repose sur l'évaluation de l'activité de la réductase, cependant de nombreux autres enzymes ont été utilisés pour détecter et évaluer la présence des microorganismes, c'était le cas des : phosphatases, estérases (pour évaluer le nombre des bactéries viables dans le lait, viandes et le poissons), et la glutamate décarboxylase (pour évaluer le nombre d'*E. coli* dans le lait).





### c. Dosage de coenzymes (réaction de bioluminescence du système ATP-luciférine-luciférase)

Cette technique (ATP-métrie) utilise le système ATP-luciférine-luciférase. Certains microorganismes peuvent émettre de la lumière en conséquence de l'activité de la luciférase sur la luciférine. La réaction nécessite la présence de  $Mg^{++}$  et de l'ATP qui facilite la formation du complexe ATP-luciférine-luciférase, le complexe est oxydé par l'oxygène en donnant l'oxyluciférine dans un état excité. L'état excité de la molécule retourne à l'état stable (fondamental d'énergie inférieure) et libère un photon de lumière (se dissocie et libère à nouveau l'enzyme luciférase). Il est possible de mesurer soit l'intensité de la lumière émise à son maximum, soit la quantité de la lumière émise. Dans les deux cas, les résultats obtenus sont proportionnels à la concentration d'ATP présente et éventuellement proportionnels au nombre de microorganismes présents. Avant le dosage, une extraction de l'ATP microbienne doit être réalisée par lyse des cellules microbiennes. Cette technique est, cependant, utilisée pour surveiller l'hygiène dans les industries.

### d. Marqueurs radiométriques

Cette technique est basée sur l'incorporation des  $^{14}C$  marqué dans un milieu de croissance de sorte que, lorsque les microorganismes utilisent ce métabolite, le  $^{14}CO_2$  est libéré et ainsi il mesuré par utilisation d'un compteur de radioactivité ou par un spectrophotomètre. Le  $^{14}C$  est incorporé en  $^{14}C$ -glucose pour les microorganismes qu'ils utilisent habituellement, sinon il est incorporé en  $^{14}C$ -formate ou  $^{14}C$ -glutamate pour les autres. La technique consiste à réaliser une culture en milieu contenant la molécule marquée et après l'incubation la culture est testée périodiquement pour déterminer la présence de  $^{14}CO_2$ . Le temps nécessaire pour détecter le  $^{14}CO_2$  est inversement proportionnel au nombre de microorganismes présents.

## 7.2 Électrochimique

### a. Impédancemétrie

Cette technique mesure la baisse de l'impédance dans un milieu pourvu de microorganismes (l'impédance électrique qui est la résultante de la présence et de l'activité des microorganismes) par rapport au même milieu dépourvu de microorganismes (l'impédance électrique du milieu). Au cours du temps les microorganismes présents dans le milieu dégradent de grandes molécules électriquement neutres ou faiblement chargées (protéines, polyosides...) et produisent des molécules plus petites ionisées (acides aminés, acides organiques...) conduisant à la diminution de l'impédance du milieu. La technique consiste à réaliser des cultures dans des cuvettes, au fond desquelles sont fixées des électrodes de

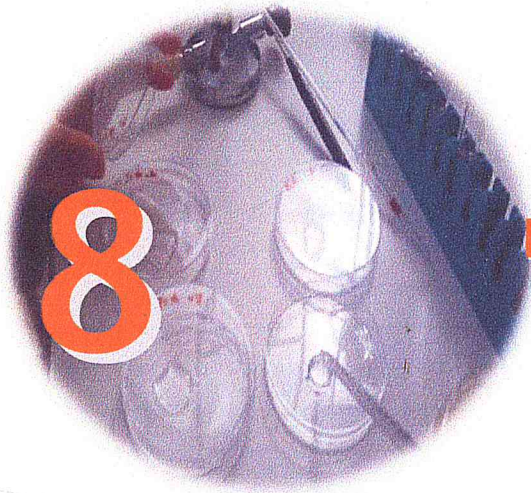




mesure du bactomètre (appareil qui assure automatiquement l'incubation et la lecture simultanément). Elle est utilisée pour la détection et l'évaluation des principaux contaminants (germes aérobies, Entérobactéries, coliformes, bactéries lactiques, levures et moisissures).

### **7.3 Autres Procédés (Microcalorimétrie)**

Cette technique repose sur la mesure des faibles variations de chaleur (mesure de l'enthalpie impliquée dans la dégradation de substrats de croissance). La production de chaleur mesurée, au moyen de microcalorimètres, est étroitement liée aux activités cataboliques des microorganismes.



## Réalisation du contrôle

### 8. Réalisation du contrôle

#### 8.1 Contrôle des matières premières

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

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

#### 8.2 Contrôle des levains

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

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





- (3) Les levains bactériens : les contaminants sont fréquemment d'autres bactéries et bactériophages.

### 8.3 Contrôle de la fabrication

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

- ✚ Les industries de fermentation, où le contrôle consiste essentiellement à suivre, aussi bien le développement du levain que l'apparition et le développement des contaminants (les techniques microscopiques les plus utilisées : technique de numération et technique de coloration) ;
- ✚ Les autres industries, où le contrôle consiste essentiellement à surveiller les paramètres de transformations, mais aussi de rechercher et dénombrer les microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux, etc...).

### 8.4 Contrôle de nettoyage et de la désinfection

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

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

### 8.5 Contrôle Des Produits finis

Le contrôle microbiologique des produits finis porte sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande. Ce contrôle consiste à la recherche et au dénombrement des microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, Coliformes, Coliformes fécaux, Streptocoques fécaux...) et porte pour conclure la conformité de produit vis-vis les normes (critères ou spécifications microbiologiques).



مواصفة جرائد  
NORME ALGERIENNE

ICS: 07.100

9

MICROBIOLOGIE DES ALIMENTS

Exigences générales et recommandations

## Caractérisation et évolution de l'analyse microbiologique

### 9. Caractérisation et évolution de l'analyse microbiologique

#### 9.1 Critères réglementaires et normalisation

##### a. Qu'est-ce qu'un critère ?

Un critère microbiologique est une valeur de référence permettant de déterminer l'acceptabilité d'un aliment vis-à-vis les normes nationales ou à défaut international, compte tenu de l'absence ou de la présence du nombre de certains microorganismes et / ou de la quantité de leurs toxines, dans des conditions déterminées d'analyse.

##### b. Importance

Un critère microbiologique est de grande importance, il nous permet de faire une interprétation des résultats d'analyses microbiologiques, ceci afin de :

- ✚ Porter un jugement sur la qualité des produits alimentaires ;
- ✚ Révéler les fraudes d'hygiène ;
- ✚ Suivre une chaîne de fabrication (de production).

##### c. Caractéristiques

Un critère, doit être actualisé, en tenant compte des progrès de la technologie et des méthodes d'analyses, de ce fait il doit :

- ✚ Être précisé par produit ou famille de produits alimentaires ;
- ✚ Le nombre d'échantillons unitaires à prélever (indice n) ;
- ✚ Le nombre de microorganismes, leurs toxines, quantité des antibiotiques, ainsi que leurs tolérances autrement dit la valeur microbiologique de référence exprimée en termes qualitatifs (absence, présence) ou bien en termes quantitatifs (indice m est M) ;





- ✚ La quantité prescrite pour l'analyse tirée de chaque échantillon unitaire (25g, 10g, 1g,...);
- ✚ Le nombre d'unités d'analyse max acceptables donnant des valeurs situées entre  $m$  et  $M$  (indice  $c$ );
- ✚ Les méthodes d'analyses permettant la détection et/ou le dénombrement.

#### d. Plans à deux (2) et à trois (3) classes

Les deux plans (à 2 et à 3 classes) fixent des classes ou bien des niveaux de contamination. Celui à 2 classes est fondé sur l'utilisation d'une seule valeur limite de référence ( $m$ ) séparant la conformité de la non-conformité de produit vis-à-vis des normes nationales et / ou internationales (Figure 9.1). Pour ce plan, il faut noter que :

- ✚ Il n'y a pas de tolérance ;
- ✚ Résultat exprimé par absence ;
- ✚ Résultat  $< m$  : le résultat est considéré comme conforme (satisfaisant, acceptable propre à la consommation) ;
- ✚ Résultat  $> m$  : le résultat est considéré comme non conforme (non satisfaisant, inacceptable, impropre à la consommation) ;
- ✚  $c$  sera noté par un par un zéro (0).

Alors que celui à trois classes est fondé sur l'utilisation de 2 valeurs limites de référence ( $m$  et  $M$ ), séparant la conformité de la qualité marginale tolérée, de la non-conformité (Figure 9.1). Pour ce plan, il faut noter que :

- ✚ Résultat  $\leq m$  : le résultat est considéré comme satisfaisant (acceptable, propre à la consommation) ;
- ✚ Résultat compris entre  $m$  et  $M$  : le résultat est toléré, il est de qualité médiocre (toujours acceptable, toujours propre à la consommation) ;
- ✚  $M = 10 m$  cas de dénombrement effectué sur milieu solide ;  $M = 3.10 m$  cas de dénombrement effectué sur milieu liquide)
- ✚  $c$  est le nombre max acceptable d'unités d'analyse donnant des valeurs situées entre  $m$  et  $M$ .
- ✚ Résultat  $\geq M$  : le résultat est considéré comme non satisfaisant (inacceptable, impropre à la consommation, voire toxique, ou corrompu lorsque la contamination se limite à  $S = 10^3 m$ ).





m	
acceptable	inacceptable

Figure 9.1 : représentation schématique du plan à deux (2) classes.

m		M
acceptable	médiocre	inacceptable

Figure 9.2 : représentation schématique du plan à trois (3) classes.



1. Qu'est-ce qu'un critère microbiologique ?
2. Expliquez le plan à trois classes.
3. L'isolement des *Salmonelles* sur gélose SS, lors d'une analyse d'une viande rouge, précédée par une étape de pré-enrichissement puis d'enrichissement, a donné 2 UFC / g.
  - Quels est le rôle précis du pré-enrichissement et l'enrichissement ? Citez un milieu possible pour chacun d'eux.
  - Quel est l'aspect des colonies suspectes *Salmonella* sur cette gélose ? Justifiez.
  - Étant donné que l'interprétation de ce résultat est sous la forme d'un plan à deux classes avec l'indice m = absence. Donnez la conclusion attendue.
4. La recherche et le dénombrement de *Staphylococcus aureus* sur gélose Baird-Parker, lors d'une analyse de deux aliments, a donné les résultats suivants :
 

Poisson : 90 ; 140 ; 130 ; 120 ; 110 (UFC / g)

Beurre cru : 80 ; 70 ; 120 ; 90 ; 110 (UFC / g)

  - Quel est l'aspect des colonies suspectes *Staphylococcus aureus* sur cette gélose ? Justifiez.
  - Étant donné que l'interprétation de ce résultat est sous la forme d'un plan à trois classes. Quelle sera la conclusion rendue pour les deux aliments ? Justifiez.

On rappelle que, pour le cas de poisson les indices sont :  $n = 5$ ,  $c = 3$ ,  $m = 10^2$  et pour le cas de beurre cru sont  $n = 5$ ,  $c = 2$ ,  $m = 10^2$ .
5. Suite à un prélèvement sur trois lots suspectés contaminés. Le dénombrement des *Staphylocoques* pathogènes en milieu Chapman a donné les résultats suivants :
 

a) 160 ; 40 ; 170 ; 200 ; 50 (UFC / g)

b) 220 ; 140 ; 600 ; 150 ; 100 (UFC / g)

c) 110 ; 40 ; 30 ; 50 ; 20 (UFC / g)

Les critères sont  $n = 5$  ;  $c = 2$  ;  $m = 50/g$  ;  $M = 500/g$ .

  - Quel est l'aspect des colonies de *Staphylocoques* sur un tel milieu ? Justifiez.
  - Quel est le résultat rendu pour les trois lots a, b et c ? Justifiez.



# 10



## Fascicule des travaux pratiques

### 2. Fascicule des travaux pratiques

Fiche 10. 1: milieux de culture, préparation et stérilisation

#### 1. objectif :

L'objectif de cette première fiche est de donner exemple de préparation de milieu de culture et du diluant stérile, le tryptone sel eau (TSE), ainsi que de résumer une classification simple de ces milieux qui peuvent : (1) selon la consistance répertoriée en milieux liquides, solide et semi-solide ; (2) selon leur composition, en milieu complexe et synthétique ; et (3) selon leurs utilisations, en milieu d'isolement électif, isolement sélectif, isolement sélectif différentiel et en milieu d'enrichissement.

#### 2. Etapes de préparation d'un milieu de culture :

- ✚ Peser le milieu déshydraté ;
- ✚ Dissolution de la pesée dans un minimum d'eau distillée environ la moitié (dans certains cas on utilise l'eau de robinet) pour un double objectif : (1) pour que la solution nécessite un léger chauffage et (2) pour qu'on puisse ajuster le potentiel d'hydrogène au  $\text{pH} \pm 0.2$ , ceci parce que lors de la stérilisation du milieu et à cause de l'évaporation de l'eau il y a abaissement de pH avec une valeur de 0.2 ;
- ✚ Stérilisation du milieu à l'autoclave à  $120^\circ\text{C}$  pendant 15-20 min (selon le cas), bouchons moitié serrés.  
L'autoclavage peut causer des destructions des facteurs de croissance, pour éviter de tels inconvénients certains milieux ne subissent pas la stérilisation.

#### 3. Préparation de diluant (TSE) :

- ✚ Peser 1 g de tryptone et 8.5 g de Na Cl ;
- ✚ Dissolution de la pesée dans un minimum d'eau distillée ;
- ✚ Agiter avec chauffage ;
- ✚ Distribuer dans des tubes à essai, à raison de 9 ml, et autoclaver 15 min à  $121^\circ\text{C}$ .  
Le pH du milieu est ajusté à  $7.5 \pm 0.2$  à  $25^\circ\text{C}$ .

#### 4. Matériel :

- ✚ Matériel courant de laboratoire (verrerie, balance analytique, agitateur chauffant pH-mètre et autoclave).





Fiche 10.2 : Techniques de dilution et transferts aseptiques

1. Objectif

Il s'agit d'exposer les différentes techniques de dilution utilisées lors des pratiques de laboratoire de Microbiologie, notamment lors du contrôle microbiologique.

2. Matériels

- + Balance, agitateur, micropipettes et embouts stériles ;
- + Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ;
- + Papier hygiénique, tubes à essai de 9 ml de TSE et tubes à essai stériles ;
- + Eau distillée stérile, NaCl, ampicilline ;
- + Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt, levure panaière.

3. Dilutions en série

3.1 Série linéaire

Ce sont des dilutions dont la progression est arithmétique par exemple les dilutions ayant un facteur de progression de 2 (1/2, 1/4, 1/16, 1/32, etc.) ou de 5 (1/5, 1/10, 1/20, 1/40, etc.)

Réalisation

- + Préparer deux séries de tubes à essai stérile, l'une avec 2, 4 et 16 ml (facteur de 2) de diluant stérile et l'autre avec 5, 10, et 20 ml du même diluant (facteur de 5) ;
- + Ajouter à chaque tube à essai 1ml d'échantillon de départ, à l'aide de micropipette munie d'un embout stérile, après l'avoir homogénéisé soigneusement.

3.2 Série logarithmique

Ce sont des dilutions dont la progression est géométrique par exemple les dilutions dites décimales 0.1 (10<sup>-1</sup>), 0.01 (10<sup>-2</sup>), 0.001 (10<sup>-3</sup>), 0.0001 (10<sup>-4</sup>), 0.00001 (10<sup>-5</sup>), etc.

Réalisation

- + Préparer des tubes à essai stériles avec 9ml de diluant stérile ;
- + Ajouter 1ml d'échantillon de départ au premier tube. Avec la micropipette munie d'un nouvel embout stérile, on homogénéise par aspiration et soufflage le contenu du premier tube (par ailleurs mélangé à la main) et on rajoute 1ml au deuxième tube et ainsi de suite en changeant à chaque fois l'embout.

4. Solution diluée :  $C_1V_1 = C_2V_2$ , cette formule est une approche rapide de calculs de dilutions.

Réalisation

- + Vous disposez de 5 ml d'une solution de 100 mg / ml d'ampicilline et vous voulez préparer 200 µl de solution ayant 25 mg / ml.

5. Pourcentage (%) ou bien rapport :  $v / v, m / v, m / m, \% (g / ml ; ml / ml) \times volumes (qu'on veut préparer) = masse ou bien volume (à utiliser).$

Réalisation

- + Vous disposez du NaCl à l'état solide et vous voulez préparer 200 ml de NaCl à 3%.

6. Gestion des déchets

- + Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;

7. Rangement des paillasse en fin de séance

8. Lecture suggérée dans le cours : section 3, Prélèvement, transport et préparation des échantillons.





Fiche 10.2 : Numération directe des microorganismes par techniques microscopiques

1. Objectif

Il s'agit de dénombrer les microorganismes, de différents échantillons alimentaires, directement au moyen de lames et de microscopie optique à fond clair.

2. Matériels

- ✚ Micropipettes et embouts stériles ;
- ✚ Microscope optique et bac de coloration ;
- ✚ Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ;
- ✚ Réactifs : bleu de méthylène et l'huile d'immersion ;
- ✚ Papier-filtre, papier hygiénique, lame en verre, bécher ;
- ✚ Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt, levure panaière.

3. Comptage sur lame au microscope

Réalisation

- ✚ Délimiter une surface  $S$  de  $1\text{cm}^2$  sur la lame ;
- ✚ Réaliser une série de dilution de facteurs de 5 ( $1/5$ ,  $1/10$ ,  $1/20$ ) de l'échantillon de départ, ceci au moyen de micropipette munie d'un embout stérile ;
- ✚ Filtrer la solution du colorant bleu méthylène, conserver là à l'obscurité ;
- ✚ Préparer, pour chaque dilution, une solution  $v/v$  ( $1\text{ml}$  de la dilution +  $1\text{ml}$  du colorant), dans des tubes à essai ;
- ✚ Homogénéiser et attendre 10 minutes ;
- ✚ Déposer un volume  $v = 0,01\text{ml}$  (soit  $10\mu\text{l}$ ) de la solution dilution de l'échantillon coloré au centre de la lame, prélevé avec micropipette munie d'un embout stérile ;
- ✚ Étaler de manière uniforme sur la surface précisément délimitée ;
- ✚ Recouvrir la lame par une lamelle placée à  $45^\circ$ , puis lâchée (cela permet d'éviter la formation de bulles d'air) ;
- ✚ observer au microscope au grandissement  $\times 100$ .
- ✚ Effectuer la numération en calculant le nombre de germes colorés  $n$  présents sur 10 champs microscopiques (la surface d'un champ est donnée  $10^{-3}\text{cm}^2$ )
- ✚ Exprimer le nombre de germes par millilitre  $N$ , qui est en fonction de  $S$ ,  $V$ ,  $n$ ,  $s$  est éventuellement  $d$ , en appliquant la formule de calcul suivante :  $N = n \times S / s \times v$ .

Interprétation

Comparer le nombre de germes par millilitre ou par gramme des différents échantillons.

4. Gestion des déchets :

- ✚ Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;
- ✚ Matériel contaminé : embouts, pipettes Pasteur, lames, etc. dans les béciers remplis de l'eau de javel.

5. Entretien des microscopes et rangement des paillasse en fin de séance

6. Lecture suggérée dans le cours : section 4, techniques classiques de numération.





Fiche 10.3 : Numération des microorganismes en milieu solide (masse, surface)

1. Objectif

Il s'agit d'ensemencer et de compter les microorganismes vivants présents dans différents échantillons alimentaires. Aussi d'apprendre les différentes techniques d'ensemencement en milieux solides que ce soit dans la masse ou bien en surface.

2. Matériels

- ✚ Micropipettes et embouts stériles, pipette Pasteur ;
- ✚ Incubateurs réglés à 30 et à 44 °C, réfrigérateur réglé à 7 °C, compteur de colonies, microscope optique et bac de coloration ;
- ✚ Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ;
- ✚ boîtes de Pétri, milieu de culture : gélose PCA, gélose sélective VRBG, gélose sélective MRS ;
- ✚ Papier hygiénique, béccher, tubes à essai (9ml de TSE) ;
- ✚ Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt.

3. Comptage sur boîte de Pétri

3.1 Germes aérobies mésophile et thermophile (thermotolérants)

Réalisation

- ✚ Préparer des dilutions décimales des échantillons jusqu'à  $10^{-3}$  ;
- ✚ Déposer, à l'aide d'une micropipette, 1 ml de la solution-dilution dans les boîtes de pétri (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- ✚ Verser environ 15 ml de la gélose PCA en surfusion (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- ✚ Verser environ 15 ml de la gélose VRBG en surfusion (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- ✚ Mélanger chaque boîte par mouvement de cinq fois dans un sens : vertical, horaire, horizontal et antihoraire ;
- ✚ Laisser solidifier ;
- ✚ Incuber les boîtes renversées. Boîte PCA pendant 72 h à 30 °C, en aérobiose et les boîtes VRBG 24h à 44°C ;
- ✚ Compter les colonies dans les boîtes contenant entre 10 et 300, et le nombre UFC / ml ou par g d'échantillon est calculer de la manière suivante :  $N = C / v (n1 + 0.1 n2) d$  ;  $N = C / 2 v d$  ; ou  $N = C / v d$ .

Interprétation

- ✚ Comparer le nombre de germes par millilitre d'échantillon des différents échantillons.

Germes psychrotrophes

Réalisation

- ✚ Verser environ 15 ml de la gélose MRS en surfusion dans les boîtes de Pétri (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- ✚ Laisser solidifier ;
- ✚ Transférer, à l'aide d'une micropipette ou à l'anse calibrée, 0,1 ml de la solution-dilution à la surface de la gélose solidifiée (2 boîtes pour chaque dilution à tester) ;
- ✚ Étaler l'inoculum uniformément sur toute la surface à l'aide d'un étaleur ;
- ✚ Incuber 72 h à 7 °C ; et enfin comptage des colonies dans les boîtes contenant entre 10 et 300 colonies ou bien entre 15 de 150 et le nombre UFC / ml ou par g d'échantillon est calculer de la manière suivante :  $N = C / v (n1 + 0.1 n2) d$  ;  $N = C / 2 v d$  ; ou  $N = C / v d$ .

Interprétation

Comparer le nombre de germes par millilitre d'échantillon des différents échantillons.

4. Gestion des déchets

- ✚ Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;
- ✚ Matériel contaminé : embouts, pipettes Pasteur, lames, etc. dans les bécchers remplis de l'eau de javel.

5. Entretien des microscopes et rangement des paillasse en fin de séance

6. Lecture suggérée dans le cours : section 4, techniques classiques de numération





Fiche 10.4 : numération des microorganismes en milieu solide (masse, surface)

1. Objectif

Il s'agit de dénombrer les microorganismes, de différents échantillons alimentaires, directement au moyen de lames et de microscopie optique à fond clair.

2. Matériels

- ✚ Micropipettes et embouts stériles, pipette Pasteur ;
- ✚ Microscope optique et bac de coloration ;
- ✚ Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ;
- ✚ Réactifs : bleu de méthylène et l'huile d'immersion ;
- ✚ Papier filtre, papier hygiénique, lame en verre, bécher ;
- ✚ Échantillons : lait UHT, lait cru, yaourt, levure panais.

3. Comptage sur lame au microscope

Réalisation

- ✚ Délimiter une surface  $S$  de  $1\text{cm}^2$  sur la lame ;
- ✚ Réaliser une série de dilutions de facteur de 5 ( $1/5$ ,  $1/10$ ,  $1/20$ ) de l'échantillon de départ, ceci au moyen de micropipette munie d'un embout stérile ;
- ✚ Filtrer la solution du colorant bleu méthylène, conserver la à l'obscurité ;
- ✚ Préparer, pour chaque dilution, une solution v/v (1ml de la dilution + 1ml du colorant), dans des tubes à essai ;
- ✚ Homogénéiser et attendre 10 minutes ;
- ✚ Déposer 0,01ml (soit 10 $\mu$ l) de l'échantillon coloré au centre de la lame, prélevé avec micropipette munie d'un embout stérile ;
- ✚ Étaler de manière uniforme sur la surface précisément délimitée ;
- ✚ Recouvrir la lame par une lamelle placée à  $45^\circ$ , puis lâchée (cela permet d'éviter la formation de bulles d'air) ;
- ✚ Placer sur le microscope et observer au grossissement  $\times 100$ .
- ✚ Effectuer la numération en calculant le nombre de germes colorés  $n$  présent sur 10 champs microscopiques (la surface  $s$  a un champ est donné). Exprimer  $N$  en fonction de  $S$ ,  $V$ ,  $n$ ,  $s$  et éventuellement  $d$ .

Interprétation

Comparer le nombre de germes par millilitre des différents échantillons.

4. Gestion des déchets :

- ✚ Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;
- ✚ Matériel contaminé : embouts, pipettes Pasteur, lames, etc. dans les béciers remplis de l'eau de javel.

5. Entretien des microscopes et rangement des paillasse en fin de séance

6. Lecture suggérée dans le cours : section 4, techniques classiques de numération.





Fiche 10. 5 : Contrôle de l'efficacité de l'opération du nettoyage et de la désinfection

1. Objectif

Il s'agit de pratiquer la technique de prélèvement sur des surfaces au moyen d'écouvillons, afin de contrôler le niveau d'hygiène des laboratoires, après une opération de nettoyage et de désinfection.

2. Matériels

- ✚ Agitateur, micropipettes et embouts stériles ;
- ✚ Boîtes de Pétri stériles ;
- ✚ Pissette : eau distillée, eau de javel et alcool ;
- ✚ Papier hygiénique, tubes à essai de 6ml de TSE ;
- ✚ Écouvillons stériles (bâtonnets sécables comprenant une extrémité en coton) ;
- ✚ Milieux de culture : gélose nutritive (GN), gélose Violet Rouge Bile Agar avec Glucose (VRBG).

3. Échantillonnage

- ✚ Écouvillonnage d'une zone spécifiée de la surface à étudier délimitée (20 cm<sup>2</sup>) ;
- ✚ Humidifier l'extrémité et ensuite presser l'extrémité de l'écouvillon contre la paroi du tube pour éliminer l'excès (en faisant tourner l'écouvillon entre le pouce et l'index) ;
- ✚ Les écouvillons sont introduits dans un tube contenant un diluant stérile (6 ml TSE).

4. Recherche des germes aérobies

- ✚ Mélanger le contenu des tubes qui contiennent les écouvillons au moyen d'un agitateur pendant 30 s en réglant la vitesse de telle sorte que la paroi du tube soit humidifiée jusqu'à une hauteur de 2 cm à 3 cm en partant du haut ;
- ✚ A partir de la suspension mère, ensemencement dans la masse (1ml) de la gélose GN, en doubles boîtes ;
- ✚ Incubation des boîtes pendant 72h à 30°C en aérobiose.

Le nombre d'unités formant colonie des germes aérobies par centimètre carré est calculé à partir du nombre de colonies (boîtes dénombrables) de la manière suivante :  $N = C / A$ .

5. Recherche des coliformes et coliforme fécaux

- ✚ Mélanger le contenu des tubes qui contiennent les écouvillons au moyen d'un agitateur pendant 30 s en réglant la vitesse de telle sorte que la paroi du tube soit humidifiée jusqu'à une hauteur de 2 cm à 3 cm en partant du haut ;
- ✚ A partir de la suspension mère, ensemencement dans la masse (1ml) de la gélose VRBG, en doubles boîtes ;
- ✚ Incubation double des boîtes pendant 24 h à 37 °C, et 24h à 44 °C.

Le nombre d'unités formant colonie de coliformes et coliformes fécaux par centimètre carré est calculé à partir du nombre de colonies (boîtes dénombrables) de la manière suivante :  $N = C / A$ .

6. Gestion des déchets :

- ✚ Matériel non contaminé : papier, etc. dans la poubelle ;
- ✚ Matériel contaminé : embouts, pipettes Pasteur, lames, etc. dans les béciers remplis de l'eau de javel.

7. Rangement des paillasses en fin de séance

8. Lecture suggérée dans le cours : section 4, techniques classiques de numération.





Fiche 10. 7 : contrôle microbiologique de l'eau (eau d'adduction et eau embouteillée)

1. **Dénombrement des germes aérobies**
  - ✚ Régénérer une gélose élective ordinaire (gélose nutritif (GN), gélose pour dénombrement (PCA), la gélose glucose tryptone (TGEA)), pendant 30 minutes au bain-marie bouillant ;
  - ✚ Ensemencer 1 ml en profondeur à partir de la prise d'essai (dilution mère) ou des dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) ;
  - ✚ Après refroidissement à 45°C, couler la gélose BP (environ 15 ml) dans deux boîtes de pétri ;
  - ✚ Laisser prendre en masse (solidification) ;
  - ✚ Placer la boîte de pétri couvercle en bas dans l'incubateur pendant 37 °C/24 h et à 22°C/72 h, en aérobiose (ce double dénombrement permet la culture d'une gamme plus étendue de microorganismes) ;
  - ✚ Noter la taille, la forme et la couleur des colonies ;
  - ✚ Calculer le nombre de microorganismes par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Pétri retenues (les boîtes contenant au moins 300 colonies au niveau de deux dilutions successives. Il faut qu'une boîte renferme au moins 15 colonies.)
2. **Dénombrement des germes de contamination fécale**
  - ✚ Ensemencer 1 ml dans un tube de bouillon lactosé au bromocrésol (BCPL), puis incubation à 37 °C pendant 24 h ou 48 h, à partir de l'échantillon pour essai (solution mère) ou des dilutions décimales ;
  - ✚ Ensemencement par transfert (repiquage avec une anse) dans le milieu de confirmation à partir de la culture obtenue quand un trouble et/ou du gaz apparaissent (1/10), puis incubation à 37 °C pendant 24 h ou 48 h, et le test d'indole.
  - ✚ La présence de coliformes est confirmée dans le cas où un trouble ou la formation de gaz apparaissent dans les tubes obtenus.
  - ✚ Dénombrement NPP.

Fiche 10. 8 : contrôle microbiologique du lait (lait de sachet et lait déshydraté)

1. **Dénombrement des germes aérobies (cf. fiche 10.7)**
2. **Dénombrement des germes de contamination fécale**
  - ✚ Ensemencer 1 ml en profondeur de milieu sélectif gélose lactosée bilée au cristal violet et au rouge neutre (VRBG environ 10 ml) ;
  - ✚ La gélose est coulée dans deux boîtes de Petri, à partir de l'échantillon pour essai (dilution mère) ou les dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) ;
  - ✚ Ajouter une deuxième couche de 5 ml de la même gélose ;
  - ✚ Incuber les boîtes pendant 24 h à 37 °C est 24h à 44 °C ;
  - ✚ Calculer le nombre de microorganismes par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Pétri retenues (10 et moins de 150 colonies).
3. **Dénombrement des germes sulfite réducteurs**
  - ✚ Ensemencer 1ml dans la masse de deux tubes de milieu viande foie (VF) au sulfite de sodium et alun de fer, à partir de l'échantillon pour essai (dilution mère) ou des dilutions décimales ( $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ) ;
  - ✚ Eviter la formation de bulles d'air ;
  - ✚ Incuber en anaérobiose à 37° C pendant 24 h à 48 h, éventuellement à 50 °C si l'on suspecte la présence de bactéries thermophiles.
  - ✚ Dénombrer les colonies caractéristiques de bactéries sulfite-réductrices par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues sur tubes.





Fiche 10.09 : contrôle microbiologique des viandes (viande hachée et merguez)

1. Dénombrement des germes aérobies (cf. fiche 10.7)
2. Dénombrement des staphylococcus
  - ✚ Régénérer la gélose Baird Parker (BP) pendant 30 minutes au bain-marie bouillant ;
  - ✚ Après refroidissement à 45°C, couler la gélose BP (environ 15 ml) dans deux boîtes de pétri ;
  - ✚ Laisser prendre en masse (solidification) ;
  - ✚ Étaler 0.1 ml en surface (ou bien le contenu de l'anse chargée sur la boîte en réalisant des stries serrées), à partir de l'échantillon pour essai (dilution mère) ou des dilutions décimales ;
  - ✚ Placer la boîte de pétri couvercle en bas dans l'incubateur à 37°C pendant 24 h ;
  - ✚ Noter la taille, la forme et la couleur des colonies ;
  - ✚ Calculer le nombre de microorganismes par gramme d'échantillon, à partir du nombre de colonies obtenues dans les boîtes de Pétri retenues (les boîtes contenant 10 et moins de 150 colonies).
3. Dénombrement des sulfito-réducteurs (cf. fiche 10.8)





## Annexe 1 : Guide de prononciation de quelques noms de microorganismes cités dans le manuscrit

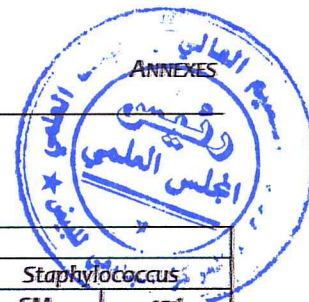
- *Aspergillus flavus* (s-per-JIL-us)
- *Bacillus cereus* (bah-SIL-lus SEE-ree-us)
- *Campylobacter jejuni* (am'pi-lo—bak-te'r je—ju-'ne)
- *Clostridium perfringens* (klos-STRID-ee-um per-FRIN-jens)
- *Corynebacterium urealyticum* (koh-rye-neeback- TIR-ee-um)
- *Escherichia coli* (esh-er-I-ke-a KOH-lee)
- *Neisseria* spp. (nis-SE-re-ah)
- *Penicillium* spp. (pen-a-SIL-ee-um)
- *Pseudomonas aeruginosa* (soo-do-MO-nas a-ruh-jin-OH-sah)
- *Salmonella enterica* (sal-mon-EL-ah)
- *Salmonella Typhimurium* (sal-mon-EL-ah tie-fee- MUR-ee-um)
- *Shigella* spp. (shi-GEL-la)
- *Staphylococcus epidermidis* (staf-il-oh-KOK-kus e-pee-DER-meh-diss)
- *Staphylococcus saprophyticus* (staf-il-oh-KOK-kus sa-pro-FIT-e-kus)
- *Staphylococcus aureus* (staf-il-oh-KOK-kus ORE-ee-us)
- *Streptococcus pneumoniae* (strep-to-KOK-us new-MOH-nee-eye)
- *Vibrio cholerae* (VIB-ree-o col-ER-AE)

## Annexe 2 :

Dilutions		CSR			Pseudomonas			Dilutions		Coliformes			Coliformes fécaux		
		10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-1</sup> 1	10 <sup>-2</sup> 2	10 <sup>-3</sup> 3			10 <sup>-1</sup> 1	10 <sup>-2</sup> 2	10 <sup>-3</sup> 3	10 <sup>-1</sup> 1	10 <sup>-2</sup> 2	10 <sup>-3</sup> 3
Nombre de Colonies	Produit	322	228	110	03	-	-	Nombre de Tubes+	Produit	3	2	1	2	1	0
		310	199	98	05	-	-			3	2	1	2	1	0
	Surfaces	386	312	267	09	08	-		Surfaces	3	3	2	3	2	1
		377	303	288	48	07	-			3	3	2	3	2	1



### Annexe 3 :



Echantillons	Nombre de colonies par boîte															
	Germes aérobies				coliformes				coliformes fécaux				Staphylococcus			
	SM		10 <sup>-1</sup>		SM		10 <sup>-1</sup>		SM		10 <sup>-1</sup>		SM		10 <sup>-1</sup>	
1	101	86	18	60	185	175	155	145	125	120	103	100	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
3	90	88	64	49	248	233	78	73	14	14	2	4	0	0	0	0
4	33	40	0	0	132	122	9	19	0	0	0	0	0	0	0	0
5	52	262	16	50	115	90	0	0	60	64	4	8	280	277	242	233
6	69	97	5	9	111	70	0	0	56	56	0	0	0	0	0	0
7	107	132	93	144	288	290	214	200	143	144	61	66	0	0	0	0
8	202	194	74	154	160	123	50	66	131	133	78	70	0	0	0	0
	DM		10 <sup>-2</sup>		DM		10 <sup>-2</sup>		DM		10 <sup>-2</sup>		DM		10 <sup>-2</sup>	
11	77	75	38	34	239	244	160	170	167	177	30	40	0	0	0	0
12	29	36	18	0	60	76	0	0	5	3	1	2	0	0	0	0

Nombre de colonies par boîte											
Echantillons	Germes aérobies				coliformes*			Staphylococcus			
	SM		10 <sup>-1</sup>		SM	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	SM		10 <sup>-1</sup>	
9	0	200	0	0	-	-	-	0	0	0	0
10	103	47	71	33	-	-	-	11	12	18	19

\* : dans l'eau, - : tube négatif

### Annexe 4 :

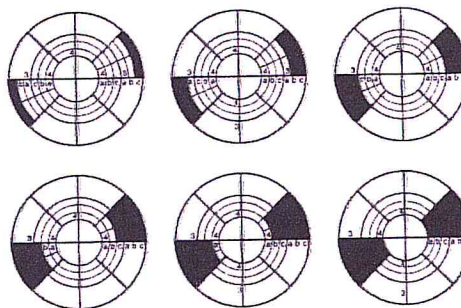
Nombre de colonies	Secteur 3c	
Germes aérobies	28	
	Secteur 3c	Secteur 3b
Staphylocoques	15	19
Coliformes thermotolérants	15	28

Grille de comptage

Secteur 3c - 0,00054 mL

Secteur 3b - 0,00137 mL

Secteur 3a - 0,00264 mL



Secteur 4c - 0,00457 mL

Secteur 4b - 0,075 mL

Secteur 4c - 0,0123 mL



## Références bibliographiques

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

C. M. BOURGEOIS., J. F. MESCLE., J. ZUCCA., microbiologie alimentaire, tom 1 : aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments. TEC & DOC.11, Lavoisier, (1996).

C. M. BOURGEOIS., J. Y. LEVEAU., techniques d'analyse et de contrôle dans les industries Agro-alimentaires : le contrôle microbiologique. Ed. Technique et Documentation, (1980).

C. VERNZOY-ROZAND., méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire. Collection série technique de l'ingénieur.

**D.** ROBERTS., M. GREENWOOD., *practical food microbiology, third edition*, (2003).

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

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

**F.** BALEDENT., les cellules hématimètres Biologiste, hôpital de Saint-Denis, France.

**H.** PRESCOTT., *laboratory Exercises in Microbiology, fifth Edition*, 2002., 449 pp.

**J.** GUIRAUD., P. GALZY., l'analyse Microbiologique dans les industries alimentaires, l'usine, (1980).

J. Y. LEVEAU., J. P. LARPENT., M. BOUIX., sécurité microbiologique des procédés alimentaires. Collection série technique de l'ingénieur.

**N**orme CAQCE., guide d'inspection sur échantillonnage.

Norme ISO 6888-1., microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques a coagulase positive (*staphylococcus aureus* et





autres espèces). Partie 1 : technique utilisant la gélose Baird- Parker, référence de la technique.

Norme Ministère de commerce., arrêté du 23 juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires.

Norme NA 1207., microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes, technique par comptage des colonies à 30°C, référence de la technique.

Norme NA 15177., microbiologie des aliments – méthodes horizontales pour les techniques de prélèvement sur des surfaces, au moyen de boîtes de contact et d'écouvillons. 2006.

Norme NA 6803 / ISO 4832., microbiologie des aliments. Méthodes horizontales pour le dénombrement des coliformes, technique par comptage des colonies, référence de la technique.

Norme NA ISO 7218., microbiologie des aliments exigences générales et recommandations.

Norme NA 15176., Microbiologie des aliments, méthode horizontale pour le dénombrement des bactéries sulfito-réductrices se développant en conditions anaérobies, référence de la technique.

Norme NF ISO 17025., relative aux prescriptions générales concernant la compétence des laboratoires d'étalonnage et d'essais.

Norme Pour la recherche et le dénombrement des coliformes et des streptocoques. Technique du nombre le plus probable, référence de la technique : guide pratique d'analyses des denrées alimentaire de l'institut Pasteur

Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture (FAO)., manuel sur le contrôle de qualité des produits alimentaires, assurance de la qualité dans les laboratoires d'analyse microbiologique des aliments, (1992).

Service d'accréditation suisse (SAS)., guide pour la validation de méthodes d'essais microbiologiques et l'évaluation de leur incertitude de mesure dans les domaines de la microbiologie alimentaire et de l'environnement, (2013)