

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE

MINISTERE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE ABOUBAKR BELKAID TLEMCEN

Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie et Science de la Terre et de l'Univers

Département de Biologie



**TECHNIQUES DE CONTRÔLES ET D'ANALYSES
MICROBIOLOGIQUES DES DENREES ALIMENTAIRES**

Cours des 1^{ères} années Master Microbiologie Fondamentale

Préambule

Le module : «Techniques de contrôles et d'analyses microbiologiques des denrées alimentaire » permet d'assurer à l'étudiant une très bonne formation dans l'analyse des produits alimentaires qu'ils soient solides ou liquides.

En effet, cette matière montre et explique à l'étudiant toutes les étapes à suivre pour analyser un aliment, de l'échantillonnage et transport jusqu'à l'identification du microorganisme d'altération ou de contamination trouvé.

Plusieurs méthodes classiques et récentes, lentes et rapides d'ensemencement, de numération, de dénombrement et d'identification, ou tout simplement de détection des microorganismes sont cités et expliqués dans ces cours.

Le dernier chapitre permet de montrer à l'étudiant comment contrôler une industrie agro-alimentaire, à savoir, ses locaux, ses équipements, son personnel, etc.afin de connaître l'origine de la contamination d'une denrée alimentaire.

Les séances théoriques de ce module sont accompagnées de plusieurs travaux pratiques permettant à l'étudiant de mieux assimiler les cours.

Avec ce module, l'étudiant aura acquis beaucoup de connaissances et de compétences dans le domaine du contrôle et des analyses des produits alimentaires. Ces compétences lui seront utiles dans l'avenir, dans le cas où il choisira d'intégrer sa vie professionnelle dans le monde de « l'agro-alimentaire » et « le contrôle de la qualité des aliments ».

Ce module ou cette unité est enseignée aux étudiants de 1^{ère} année Master Microbiologie Fondamentale.

Il est souhaitable de l'intégrer dans d'autres formations en :

Science Biologiques : comme le Master « Microbiologie et Contrôle de Qualité »

Sciences alimentaire comme :

- La licence « Alimentation Nutrition et Pathologie »
- Master « Techniques des industries agro-alimentaires »
- Master « Nutrition et pathologie »
- Master « Nutrition et Diététique»
- Master « Biologie de la nutrition »
- Master « Sécurité agro-alimentaire et contrôle de la qualité »

TABLE DES MATIERES

	Pages
Chapitre I Contrôle et qualité	1.
I-1-Définition d'un contrôle :	1
I-2-Objectif d'un contrôle	2
I-2-1-Qualité hygiénique	2
I-2-2-Qualité technologique	2
Chapitre II Analyse d'un produit alimentaire	3
II-1-Prélèvement et échantillon.....	3
II-1-2-Aliment solide.....	3
II-1-3-Aliment liquide.....	3
II-2-Transport	4
II-3-Préparation de l'échantillon.....	5
II-3-1-Prise d'essa	5
II-3-2-Pesée.....	5
II-3-3-Broyage	6
II-3-4-Dilution.....	7
II.4.Méthodes classiques de dénombrement	8
II-4-1.-Numération microscopique.....	8
II-4 -1-1 Les cellules à numération.....	8
II -4-1-2-Méthode de Breed:	8
II-4-1-3-Microscopie par épi-fluorescence	9
II 4-2-Numération en milieu gélosé	9
II-4-2-1-Technique Standart	9
II-4-2-2-Cultures en gouttelettes d'agar..	11
II-4-2-3-Dénombrement en surface sur milieu gélosé	11
II-4-2-4-Méthode des gouttes	12

II-4-3-Dénombrement en milieu liquide.....	13
-La Méthode NPP	13
-Membrane filtrante	15
Chapitre III : Techniques récentes de détection des microorganismes.....	17
III-1-La Spectrophotométrie	17
III-2-Potentiométrie	17
III-3- Mesure de l'activité enzymatique	17
III-4 – ATPmétrie	18
III-5-Les méthodes Radiométriques	19
III-6- L'électrochimie.....	19
III-6-1-Mesure du pH	19
III-6- 2-Titration	19
III-6-3-Concentration de certains ions	20
III-7-Ampérométrie.....	21
III-8-Conductancemétrie	21
III-9-Chromatographie.....	22
Chapitre IV Identification des bactéries	23
IV-1- Etudes des caractères culturaux.....	23
IV-2-Etude des caractères morphologiques.....	23
IV-3-Etudes des caractères biochimique.....	24
IV-3-1-Type énergétique	24
IV-3-2-Type respiratoire.....	24
IV-3-3-Etude du métabolisme glucidique	24
IV-3-3-1-Métabolisme oxydatif.....	25
IV-3-3-2-Métabolisme fermentaire.....	26
IV-3-4-Métabolismes des substances azotées.....	26
IV-3-4-1-Etude des substances utilisables.....	26

IV -3-4-2--Dégradation des acides aminé	26
IV-3-5-Dégradation des protéines.....	27
IV-3-6-Hydrolyse de l'urée	27
IV-3-7-Utilisation du citrate	27
IV-3-8-Production des acides mixtes et d'acétoine.....	28
IV-3-9-Production d'indole	28
IV-3-10-Métabolisme des lipides	28
V-3-11- Croissance sur milieu salé.....	29
IV-3-12-Test de la catalase.....	29
IV-3-13- Hydrolyse de l'arginine	29
IV-4-Etude des caractères physiologiques.....	29
IV-4-1-Etude de la thermorésistante.....	30
IV-4-2 -Etude de l'antibiorésistance	30
I V-4-3 -Etude de la production de substances utiles en biotechnologie.....	31
V-Test IMVIC.....	32
VI-Galerie API	32
Chapitre V : Contrôle au niveau d'une entreprise Agro-agro-alimentair.....	33
V-1-Contrôle de la matière première.....	34
V-2- Contrôle de la fabrication	34
V-3-Contrôle des conditions de fabrication.....	34
V-4-Contrôle des locaux	35
V-5-Contrôle de l'air ambiant des locaux	36
V-6-Controle du matériel et des installations	36
V-7-Le personnel	37
V-8- Contrôle du produit fini	38
Références bibliographiques.....	39-40
Annexes	

I-1-Définition d'un contrôle :

Le contrôle est une opération destinée à analyser le produit et voir s'il est conforme aux normes indiquée par une législation afin de pouvoir déterminer sa qualité . Chaque produit alimentaire fabriqué est analysé après production.Sa matière première aussi est analysée avant la production

I-2-Objectif d'un contrôle

C'est de rechercher la qualité hygiénique et la qualité technologique de l'aliment après sa production

I-2-1-Qualité hygiénique

Si la qualité hygiénique est mauvaise, l'aliment est dangereux puisqu'il est contaminé par des bactéries pathogènes contenant des toxines ex : Salmonella, Staphylococcus etc....

I-2-2-Qualité technologique

La qualité technologique est mauvaise si l'aliment est contaminé par des bactéries d'altération de la qualité organoleptique ex : Pseudomonas, bactéries acétiques, levures etc.

Pour maîtriser les deux qualités il faut appliquer à l'usine les bonnes pratiques de fabrication (BPF = GMP : Good Manufacturing Practice)

Appliquer les BPF veut dire construire la bonne qualité du produit au cours de sa fabrication et non pas se contenter d'analyser le produit fini

Pour cela il faut

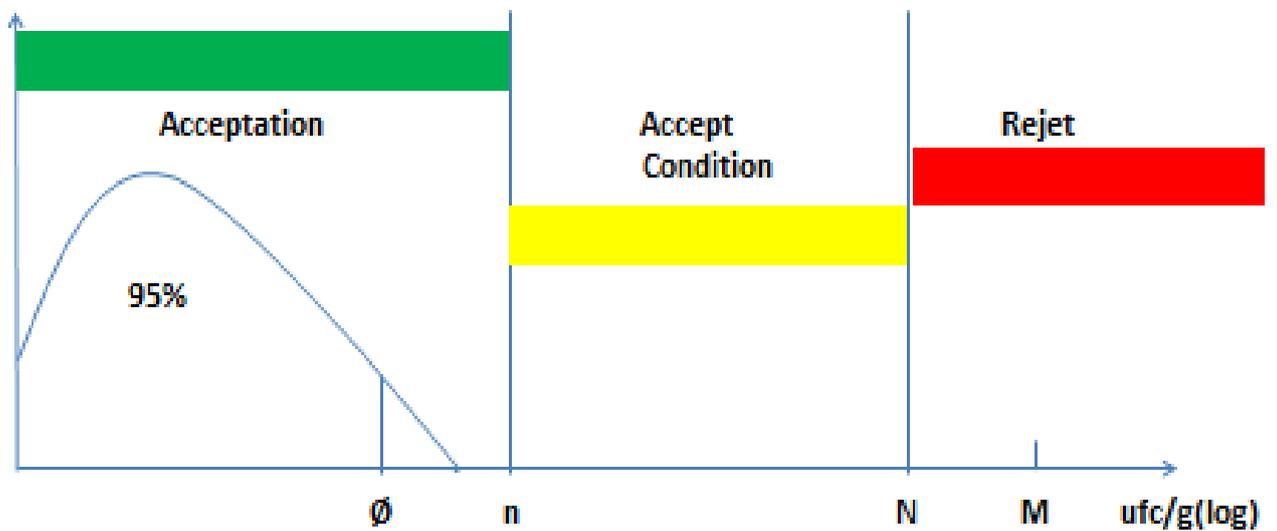
- le bon choix et l'analyse de la matière première
- Une surveillance constante et un contrôle rigoureux des opérations de transformations pendant la fabrication
- Réagir rapidement s'il y a un problème pour corriger toute anomalie

Malheureusement les analyses ont les inconvénients suivants :

- Une application lente, d'où il faut s'orienter vers les techniques nouvelles
- Le coût élevé des analyses
- Une sécurité limitée

Au niveau d'une unité , l'objectif d'un contrôle n'est donc pas de contrôler la qualité de l'aliment fini mais plutôt de contrôler sa pratique de fabrication

Conditions des bonnes pratiques de fabrication



Les limites d'un système à trois zones

- Ø : Nombre de colonies bactérienne /g pour une confiance de 95% dans les conditions BPF
- n: seuil maximale de contamination souhaitée
- N: seuil maximale de contamination tolérable
- M: seuil d'inocuité

Figure 1 : Positionnement des limites d'un système à trois zones (Modifié par Mossel, 1974)

II-1-Prélèvement et échantillonnage

II-1-2-Aliment solide :

Prendre un produit pour l'analyser veut dire prélever un échantillon

Il existe plusieurs types d'aliments : aliment très volumineux, aliment en vrac, petit échantillon ect....

Ex 1: un pot de yaourt, une boîte de fromage, une boîte de conserve ect.....représentent



chacun échantillon

Les échantillons sont laissés dans leurs emballages d'origine jusqu'au laboratoire d'analyse.

Ex 2: Aliment très volumineux : carcasse de viande

Selon AFNOR : Découper au scalpel une tranche de viande en suivant le contour d'un cadre métallique d'une surface de 25 cm²

Ex 3 : Aliment en vrac : A l'aide d'une louche stérile remplir un sac pour prélèvement

Ex 4 : Echantillonnage en surface : peut se faire :

- * Par écouvillonnage :

- *En jetant un liquide à la surface du produit puis le récupérer pour l'analyser

- *A l'aide d'un boudin de gélose, la surface du produit est frottée et le boudin de gélose est incubé à l'étuve

- *Utilisation d'une membrane imbibée qui sera appliquée sur le produit puis sur la gélose

II.1 . 3-Aliment liquide

Ex1: une bouteille d'eau minérale , de boisson gazeuse, de jus , ou de lait représente un



échantillon .Une boîte de jus ou de lait aussi .

Ex2: -Eau de robinet:

-Lait des citernes

Nettoyer le robinet, laisser couler quelques ml du liquide puis remplir une bouteille stérile
Le prélèvement doit se faire devant une flamme.

Ex 3: -Eau de mer, des barrages , des rivières et des lacs,

Si on veut connaître la qualité de l'eau des rives, on peut faire le prélèvement suivant :

Faire rentrer le flacon dans l'eau, l'ouvrir dans l'eau, le laisser remplir dans l'eau, puis le fermer dans l'eau

Si on veut connaître la qualité des profondeurs on utilise un plongeur

II.2-Transport

-Le transport doit se faire dans une glacière. Il doit être rapide. Le stockage doit être bref pour ne pas modifier la flore présente dans l'aliment

-Si l'analyse ne peut pas se faire dans les délais prévus, il faut laisser l'échantillon au réfrigérateur

-Il est préférable de ne pas congeler l'échantillon afin d'éviter l'effet bactéricide d'où la modification de la flore

-Dans la mesure où l'échantillon doit être congelé, dans ce cas il faut une surgélation à -18°C avec un bref délai.

II.3-Préparation de l'échantillon

II.3.1-Prise d'essai ;

- La fraction prélevée doit être représentative
- Si l'aliment est composé de plusieurs éléments, il faut dans les mêmes proportions :
 - *des parties superficielles
 - * et des parties profondes
- Le prélèvement doit être effectué aseptiquement près d'une flamme si c'est possible, et selon la nature du produit
- Le manipulateur doit utiliser des pinces, scalpel, spatules etc. ... selon la nature du produit.
- Ces outils doivent être inoxydables et stérilisables par flambage ou au four pasteur.

II.3.2-Pesée

- On peut peser de deux façons :
 - * mettre la tare, régler la balance à zéro, introduire l'aliment ou une bonne partie de l'aliment, peser en enlevant le surplus jusqu'à avoir la quantité voulu.
 - *Mettre la tare, régler la balance à zéro, ajouter petit à petit l'aliment jusqu'à avoir la quantité voulu

II.3.3-Broyage

Est une étape fondamentale qui permet l'homogénéisation des aliments

Il existe plusieurs types de broyeur

-*Broyeur à pot* : On introduit ensemble l'aliment et le diluant dans un pot spécial muni d'une hélice actionné par un moteur. Les pots doivent être stérilisables (en acier inoxydables, ou en pyrex).

-*Broyeur à tige* : Une tige munie d'une hélice est introduite dans un pot spécial ou non, contenant un diluant.

-*Broyeur à palette (type Stomâcher)* : A la différence des autres, cet appareil ne travaille pas par cisaillement mais par choc, le mélange aliment diluant est introduit dans un sac en plastique stérile que l'on ferme puis on l'introduit dans l'appareil, puis le sac est frappé rythmiquement par deux palettes, le choc dilacèrent le produit et mettent les bactéries en suspension

Le Stomâcher a les avantages suivants :

- *Règle le problème de la propreté et la stérilité
- *Entraine une économie de temps
- *Le bruit engendré est faible
- *l'élévation de la température est négligeable

Il existe des sacs Stomacher modifié : le sac est séparé en deux compartiment par une membrane en téflon, l'aliment est le diluant sont mis dans le grand compartiment, après broyage un liquide claire et homogène est prélevé du petit compartiment

II.3. 4-Dilution

-Ne doit pas induire une variation qualitative ni quantitative de la flore présente dans l'aliment.

-Le diluant doit assurer la survie de tous les microorganismes

-Ne doit pas favorisé la multiplication des microorganismes

Les diluants les plus utilisés sont :

*TSE : solution tryptone sel

*Solution de Ringer

*Eau peptonnée tamponnée

Plusieurs dilutions décimales peuvent être faites au 1/10, 1/100, 1/1000

1ml du produit est mis dans 9ml de diluant, c'est la dilution 1/10 ou 10^{-1}

Puis de cette solution 1ml est pris et mis dans 9ml de diluant il s'agit de la dilution 1/100 ou 10^{-2} , ainsi de suite jusqu'à la dilution voulu

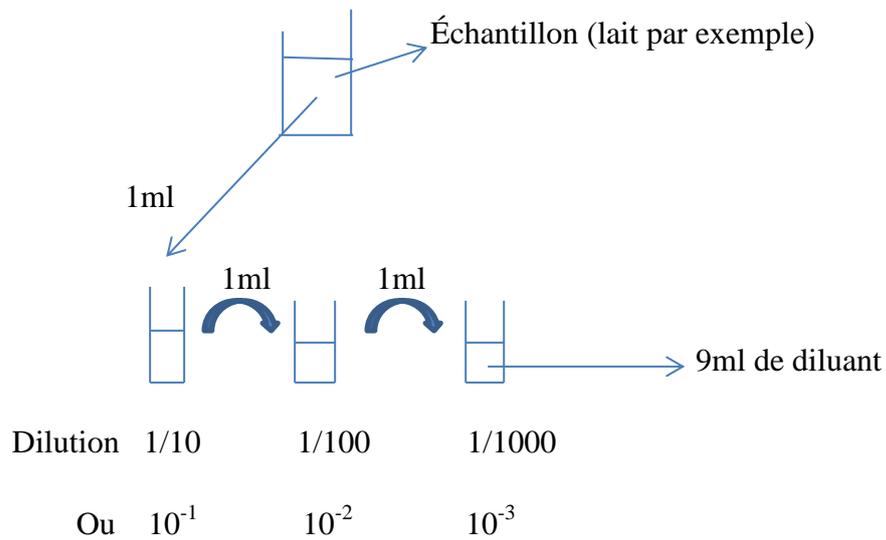


Figure 2 : Méthode de dilution d'un échantillon

II-4-Méthodes classiques de dénombrement

II-4-1- Numération microscopique

-Les microorganismes ne sont pas visibles à l'œil nu, seul le microscope permet leur observation directe.

-On peut les rendre plus visibles en utilisant des colorations comme :

*la simple coloration : la coloration au bleu de méthylène

*la double coloration : coloration de Gram

Pour faire une numération ou un dénombrement on peut utiliser des cellules ou des lames

II-4-1-1-Les cellules à numération

Cellules de Thomas et cellule de Malassez

Ce sont des lames en verre de 2 à 3 mm d'épaisseur, elles comportent une cavité de 0,1mm de profondeur et 1cm² de surface, le fond est quadrillé et divisé en 400 carrés

Elle s'utilise de la façon suivante :

-Mettre une ou deux gouttes de la suspension ou de sa dilution au milieu de la cavité

-Examiner au microscope et compter les microorganismes dans 50 à 100 carrés pris au hasard

-Faire la moyenne par carré puis multiplier par 400 puis par la dilution

II-4-1-2-Méthode de Breed

Il s'agit d'une lame comportant une cavité de 1cm² dont laquelle il faut mettre 0,01ml de liquide à examiner.

Les microorganismes sont comptés dans 30 à 50 champs microscopiques. Le diamètre du champ étant connu (déduit du grossissement ou mesuré au moyen d'un micromètre-objectif).

le nombre de germes par ml est calculé selon la formule :

$$N = nxS/sxv$$

n : le nombre moyen de cellules par champs

S : la surface totale de l'échantillon : soit 1 cm²

s : la surface du champ

v : le volume de l'échantillon : soit 0.01ml

Si n=1 et s= 10⁻³ cm², N est le seuil de détection

II-4-1-3-Microscopie par épi-fluorescence

C'est l'utilisation des colorants appelés fluorochromes en présence des rayons ultraviolets (UV). Le principe c'est que les microorganismes qui sont sur un fond noir seront visibles et apparaissent colorés grâce à la lumière émise par les rayons UV.

Les colorants fluorochromes utilisés sont :

- Le jaune d'acridine donne les meilleurs résultats
- l'orange d'acridine est le plus utilisé
- La primuline
- L'auramine

II-4- 2-Numération en milieu gélosé

II-4-2-1-Technique Standard

Pour faire un dénombrement sur une boite gélosé il s'agit de suivre le protocole suivant :

- Marquer les boites
- Déposer 1ml du produit ou de sa dilution dans la boite de pétri à l'aide d'une pipette stérile
- Verser stérilement 15 ml de la gélose en surfusion (45°C).

-Fermer la boîte et mélanger tout doucement en faisant des cercles sans faire des éclaboussures

-Laisser refroidir jusqu'à solidification puis incuber à l'étuve, boîte renversée

-Faire le dénombrement après incubation.

Remarque :

*La température et la durée d'incubation du type de germe recherché

Ex : 25°C pour les champignons pendant 3 à 5 jours

30°C pour les bactéries lactiques pendant 18 h jusqu'à 48h

37°C pour les mésophiles pendant 18h jusqu'à 48h

*On peut faire deux essais pour la même dilution en utilisant deux boîtes de gélos. Dans ce cas si les deux chiffres trouvés s'approchent, on fait la moyenne puis on multiplie par la dilution. Si un chiffre est beaucoup plus grand que l'autre on prend en considération le plus petit.

* Il existe des compteurs de colonies

*Si on veut éviter le développement des colonies en surface on utilise la technique de la double couche qui consiste à

-Couler dans un premier temps 10 ml de gélose qu'il faut mélanger avec l'inoculum

- Laisser refroidir et se solidifier

-Couler de nouveau 5 à 6 ml de gélose à la surface de la première couche

II-4-2-2-Cultures en gouttelettes d'agar

Dénombrement en micro-colonies

- Un broyat de produit est dilué dans l'agar fondu et refroidi à 45°C.
- Après plusieurs dilutions, à l'aide d'un diluteur-distributeur, sont distribuées des gouttelettes de 0,1 ml au fond de la boîte de pétri (0,1ml : produit + gélose)
- Il est possible de déposer 20 gouttelettes de chaque dilution
- A l'aide d'un projecteur, le diamètre des colonies est agrandi pour permettre le comptage des petites colonies

* Il existe un projecteur spécial appelé Droplette.

Remarque

Cette technique a l'avantage d'économiser la gélose et les boîtes de pétri

II-4-2-3-Dénombrement en surface sur milieu gélosé

-Étalement en surface

- *Un inoculum de 0,1ml est étalé à la surface d'une gélose avec un étaleur en verre
- *Un inoculum de 35µl est déposé au milieu de la surface d'une gélose, un système semi-automatique constitué d'un canal distributeur s'écarte progressivement du centre vers la périphérie et dépose les microorganismes suivant une spirale. L'espacement progressif au fur et à mesure qu'on s'écarte du centre joue le rôle d'une dilution.



Figure 3 : Ensemencement en spirale

Remarque :

Cette méthode peut avoir un inconvénient dans le blocage du canal par des particules dans le produit, ainsi on peut faire une filtration avant.

II-4-2-4-Méthode des gouttes

Des petites gouttes sont délivrées par une pipette pasteur qui donne 50 gouttes/ml. Il est possible de déposer 5 gouttes de chaque dilution sur chaque boîte

Après incubation, il faut choisir une boîte montrant de 10 à 20 colonies par goutte, les compter et faire la moyenne puis multiplier le nombre obtenu par 50 pour le rapporter à 1ml et par la dilution .

Plusieurs dilutions peuvent être utiliser :

- Plaques de micro-titration



Figure 4 : Plaques de micro-titration à 96 alvéoles

Se sont des plaques de 96 alvéoles permettant de faire 8 dilutions pour 12 échantillons.

Dans chaque alvéole un volume de 0.225ml de milieu de culture ou de diluant est déposé, dans la première alvéole, puis 0,025 ml de produit à analyser, il s'agit de la dilution 1/10. Le contenu est homogénéisé, puis 0,025ml de cette dilution sont transféré dans une autre alvéole pour obtenir la dilution 1/100, ainsi de suite jusqu'à la 8ème dilution

Sur un milieu gélosé sont déposés deux gouttes de chaque dilution (des gouttes de 0,025 ml) à raison de 4 à 8 gouttes par boîte. Après 20h d'incubation à 32°C. Les colonies sont comptées sous microscope au Gross X 10 en choisissant les gouttes contenant 10 à 100 colonies

II-4-3-Dénombrement en milieu liquide

II-4-3-1-Recherche du NPP (Nombre le Plus Probable).

Cette méthode est appliquée en utilisant généralement le bouillon BLBVB (bouillon lactosé bilié au vert brillant), de couleur verte avec cloche de Durham pour la recherche des coliformes dans le lait et les produits laitiers. Ou le BPCL (bouillon lactosé bilié au pourpre de bromocrésol) de couleur pourpre avec cloche de Durham pour la recherche des coliformes dans l'eau .

-Technique

Trois dilutions du produit sont préparées. Chaque dilution estensemencée dans trois tubes de bouillon BLBVB ou BPCL (composition en annexe) à raison de 1ml par tube. Après 24 h à 48 h d'incubation à 37 °C, la présence de gaz, ainsi que le virage au jaune des tubes confirment la présence des coliformes dans l'échantillon. Le nombre de tubes positifs pour chaque dilution est compté, on obtient un nombre de trois chiffres qui correspond au nombre caractéristique.

Tableau 1: Détermination du nombre caractéristique en fonction du nombre de tubes positifs /3

Tubes par dilution

ex	Nombre de tubes positifs pour chaque dilution					Nombre caractéristique	
	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴	10 ⁻⁵		
A	3	3	3	3	3	333	
	3	3	3	3	1	331	
	3	3	2	1	0	320	
	3	2	1	0	0	321	
	3	0	1	0	0	301	
	3	3	2	2	+	1	323
B	3	2	1	+	1	0	322
C	2	2	2	2	0	222	
D	0	1	0	0	0	100	

A : Prendre la plus grande dilution pour laquelle tous les tubes sont positifs et les deux suivantes

B : Si un résultat positif est noté pour une dilution plus grande que la dernière, il faut l'ajouter à celle-ci

C : Si aucune des dilutions ne fournit trois tubes positifs prendre les 3 dernières

Chaque nombre caractéristique correspond à un nombre le plus probable Le résultat est exprimé dans la table de Mac Credy (en annexe) par le nombre le plus probable (NPP) de coliformes dans un millilitre ou 1 gramme de produit.

-La membrane filtrante

Cette méthode s'applique aux membrane à grille hydrophobe = HGMF: Hydrophobic grid membrane filter . Ce sont des membranes en acétate de cellulose sur laquelle il y a un quadrillage hydrophobe qui délimite à la surface de la membrane de nombreux compartiments ou cases. A prés filtration, les cases peuvent contenir ou non des bactéries, pour cela le nombre de bactéries retenu est le nombre le plus probable

$$NPP=N \log_e N/ (N-x)$$

N : Nombre de cases

x : Nombre de cases contenant un dépôt bactérien

Remarque: Les membranes commercialisées actuellement comportent 1600 cases=N correspondant à des tubes positifs

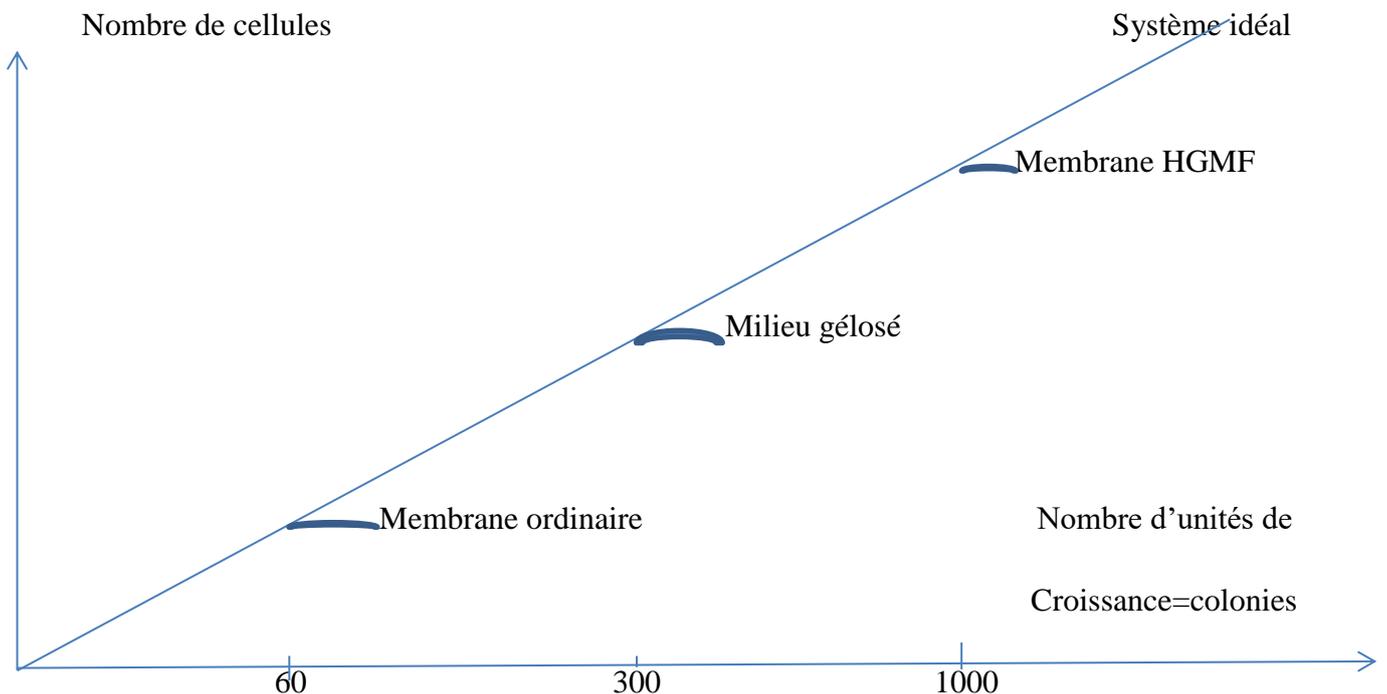


Figure 5 : Relation entre nombre de cellules et nombre d'unité de croissance (colonies) dans différents systèmes

- Sur une membrane ordinaire, la perte de linéarité a lieu vers 60 à 80 colonies
- Sur une gélose, la perte de linéarité est vers 300 colonies par suite de chevauchements
- Sur une membrane HGMF, la perte de linéarité est beaucoup plus tardive par rapport à la membrane ordinaire et ceci d'autant plus que le nombre de cases positive est plus grand
- Sur un système idéal permettant de détecter chaque colonie, la relation reste linéaire définitivement

Chapitre III : TECHNIQUES RECENTES ET RAPIDES DE DETECTION DES MICROORGANISMES

III-1-La spectrophotométrie

L'examen visuel du virage d'un réactif, est un procédé très employé en microbiologie pour évaluer l'importance des populations microbiennes. Cet examen peut être rendu plus objectif et plus quantitatif par l'utilisation d'un spectrophotomètre, qui permet la colorimétrie, c'est-à-dire la mesure de la concentration des substances colorées, doù la densité optique.

La Densité Optique est mesurée par un appareil appelé spectrophotomètre



Figure 6 : Spectrophotomètre pour mesurer la densité optique

C'est une méthode analytique quantitative et qualitative qui consiste à mesurer l'absorbance ou la densité optique des microorganismes présents dans un échantillon. Plus l'échantillon est concentré, plus il absorbe la lumière dans les limites de proportionnalité énoncées par la loi de Beer-Lambert.

La densité optique des échantillons est déterminée par un spectrophotomètre préalablement étalonné sur la longueur d'onde d'absorption de la substance à étudier.

Lorsqu'une lumière passe à travers une solution, une partie de celle-ci est absorbée par les microorganismes. L'intensité de la lumière transmise diminue donc

La relation de Beer-Lambert décrit que, pour une longueur d'onde donnée, l'absorbance d'une solution est proportionnelle à sa concentration. Cette absorbance est appelée aussi

Turbidimétrie .

L'absorbance $A = I_0 / I$ I_0 : lumière incidente I : lumière émergente

Potentiométrie

Le développement microbien est détecté par la mesure potentiométrique du dégagement d'hydrogène ou de l'absorption d'oxygène

Les microorganismes en se multipliant dans un milieu absorbent l'oxygène et rejettent des substances réductrices qui abaissent le potentiel d'oxydo-réduction

Exemple : En laiterie ou à la ferme, l'observation du virage de la résazurine, du bleu de méthylène ou du pourpre de bromocrésol est un procédé très employé pour apprécier la qualité bactériologique du lait

Le principe du procédé consiste à mettre quelques gouttes du colorant à la surface. Une décoloration rapide du lait nous enseigne sur sa mauvaise qualité. Plus le lait est très contaminé plus les colorants disparaissent très rapidement

III-3- Mesure de l'activité enzymatique

De nombreuses enzymes sont des révélateurs de la présence des microorganismes

Ex 1 : * le dosage de l'activité de **la phosphatase alcaline** est très utilisé en laiterie pour vérifier si la pasteurisation a été bien faite.

Ex2 : * Dosage des coenzymes :

- ATPmétrie

Il s'agit du dosage de l'ATP présente dans toutes les cellules bactériennes :

L'ATP est la première source d'énergie de toutes les cellules vivantes et l'on considère que chaque bactérie en contient environ 1 femtogramme. Il est alors possible grâce à cette méthode d'avoir une estimation instantanée de la biomasse totale contenue dans un échantillon en mesurant l'ATP intracellulaire. Il faut alors filtrer l'échantillon et lyser les bactéries pour libérer leur ATP et la mesurer grâce à des Kit disponible dans le marché .Ces kits de mesure, nouvelle technique d'analyse appelée l' « ATP-métrie quantitative » permettent de quantifier dans un échantillon d'eau par exemple la charge microbiologique présente par dosage de l'ATP.

Le type de protocole appliqué se décompose en quatre étapes principales

1. La filtration : l'échantillon liquide est filtré au travers d'une membrane de porosité 0,45µm qui permet de concentrer les microorganismes
2. L'extraction : une solution de lyse est mise en contact avec les microorganismes retenus sur la membrane afin d'en extraire les molécules d'ATP. L'extrait est déposé dans un tube de mesure
3. La quantification : l'extrait d'ATP est mis en contact avec une solution enzymatique
4. La calibration : un ajout dosé est introduit dans le milieu réactionnel afin de « calibrer » la réaction. Le résultat est rendu en picogramme d'ATP par millilitre (pgATP/ml) ou en équivalent bactérie par millilitre (eq.bact/ml). Soit : 1pgATP \approx 1 000 bactéries

III-4-Les méthodes radiométriques

Il s'agit d'évaluer l'activité microbienne par une mesure radiométrique

-Exemple 1 : la méthode au $^{14}\text{CO}_2$

Elle consiste à mettre l'aliment à analyser en présence d'un sucre, le plus souvent le glucose, dont le carbone est marqué au ^{14}C . Le $^{14}\text{CO}_2$ qui se dégage après respiration ou fermentation possède un carbone marqué. Il est piégé dans une solution basique pour mesurer la radioactivité .

-Exemple 2 : La méthode par absorption des composés marqués

De nombreux microorganismes concentrent dans leurs cellules des substances importantes pour leur fonctionnement. Ces substances sont marqués, parmi elles, un acide aminé radioactif ,en général la lysine

III-5- L'électrochimie :

III-5-1-pH

Un développement microbien de quelques heures permet de diminuer le pH confirmant la contamination du produit

La baisse du pH est détecté à l'œil nu grâce au virage du colorant, ou en utilisant les bandelettes de pH ou en mesurant le pH avec un pH-mètre.

III-5- 2-Titration

Les microorganismes s'ils sont présents dans un produit, ils utilisent le sucre du produit et produisent des acides après fermentation.

Il est intéressant de faire une titrimétrie qui permet de connaître le taux d'acide produit après contamination



Figure 7 : Burette pour titration

1ml de NaOH=10°D

1°D = 0,01% d'acide lactique

III-5-3-Concentration de certains ions

Certains ions rejetés dans l'aliment par les microorganismes peuvent constituer des indicateurs de la nature et de l'importance de la contamination

Ex : le dosage des ions ammonium et de l'ammoniac par des méthodes chimiques

III-6-Ampérométrie

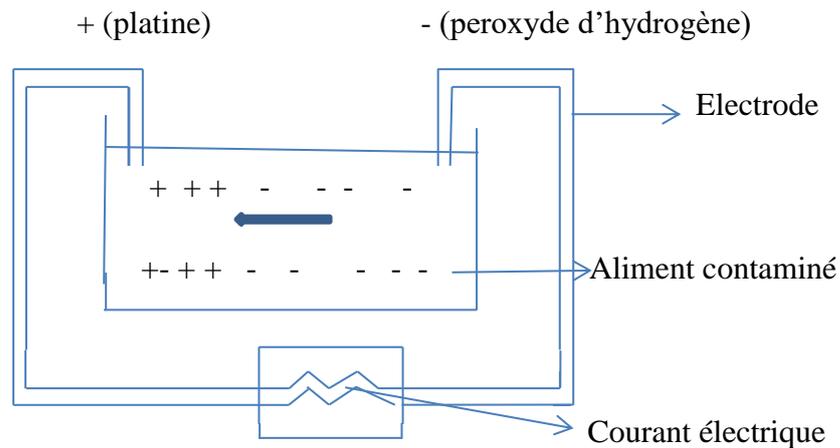


Figure 8 : Dispositif montrant le passage d'un courant si l'aliment est contaminé

L'échantillon à analyser est mis dans un milieu en contact d'une anode en platine et une cathode en peroxyde d'hydrogène. Si l'échantillon est contaminé, les microorganismes sont chargés négativement, au contact d'une anode ils régénèrent leurs charges à partir des composants du milieu et deviennent chargés positivement. Ce changement de charge donne un courant électrique mesuré en Ampère

III-7-Conductancemétrie

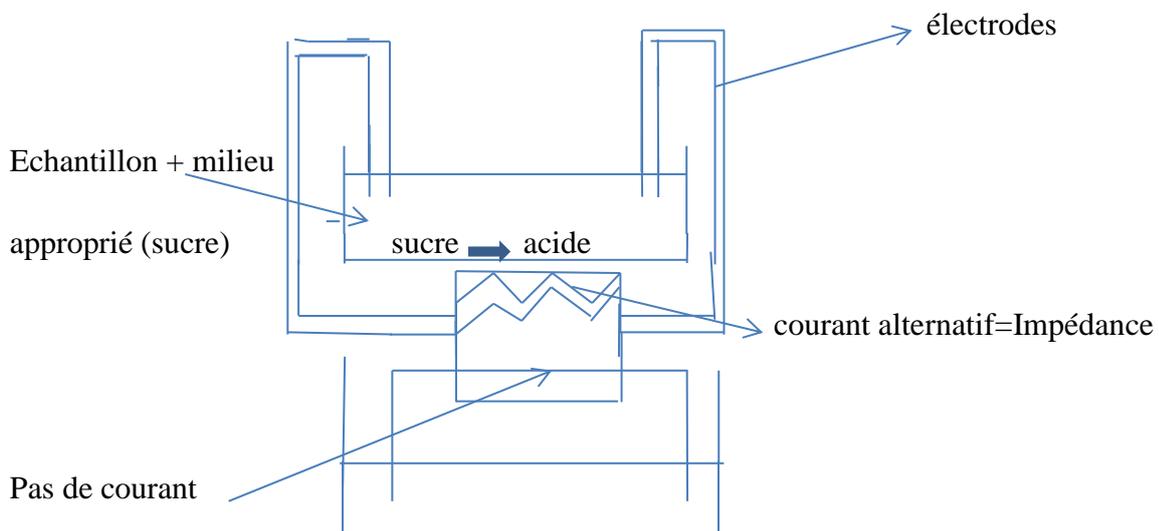


Figure 9: Dispositif montrant le passage d'un courant alternatif dans un aliment contaminé

L'échantillon à analyser est mis dans un milieu approprié contenant un sucre. Ce milieu est relié à deux électrodes, s'il y a présence des microorganismes dans l'aliment, ils vont libérer des enzymes pour dégrader le sucre en acide. La transformation sucre en acide libère un courant alternatif appelé Impédance

Les deux électrodes sont reliées aussi à un milieu témoin stérile. L'absence de courant nous renseigne sur l'absence des microorganismes dans le milieu

III-8-Chromatographie

Par exemple le spectre des acides gras détecté par chromatographie nous renseigne sur la présence des microorganismes qui ont dégradé un produit riche en matière grasse

Chapitre IV **IDENTIFICATION PHENOTYPIQUES DES MICRORGANISMES**

L'identification des microorganismes ne peut se réaliser que sur des souches pures .Pour cela il faut un isolement suivi d'une purification

L'identification comprend plusieurs étapes qui se suivent et qui sont variables suivant le microorganisme, Les différentes étapes sont :

IV-1- Etudes des caractères cultureux

Il s'agit de noter l'aspect des cultures :

*Sur un milieu liquide : formation de voile, dépôt, gaz, etc.....

* Sur milieu solide : en boîte de pétri ou sur gélose en tube (culot ou incliné) apparait la forme (ronde, longitudinale, ovale), la taille (grande ;petite), la couleur et l'aspect (brillant, mat, muqueux).

IV-2-Etude des caractères morphologiques

Cette étude s'effectue par observation microscopique. Elle permet de voir la forme des microorganismes, leur taille, leur mode de groupement et parfois leur mode de reproduction (s'il s'agit de champignons par exemple)

Une observation microscopique comprend

*Un état frais : c'est-à-dire les microorganismes sont observés vivants

Elle est utilisée pour voir surtout la mobilité en utilisant le grossissement 100 avec immersion

* Après coloration d'un frottis fixé

Plusieurs colorations peuvent être utilisées : coloration au bleu de méthylène, double coloration de Gram ou coloration spécifiques comme la coloration des spores, des cils, des capsules etc... Puis observation au microscope optique au grossissement 100 avec immersion.

IV-3-Etudes des caractères biochimiques

C'est l'étude du métabolisme des microorganismes

IV-3-1-Type énergétique

La plus part des microorganismes tirent leur énergie de la dégradation des composés chimiques se sont des chimiotrophes. Parmi eux, certains utilisent des substances minérales se sont des chimio-lithotrophes. D'autres des substances organiques se sont des chimio-organotrophes

Pa ailleurs pour leur synthèse, ces microorganismes utilisent des substances organiques se sont des hétérotrophes. La plus part des microorganismes impliqués dans l'agro-alimentaire sont des chimio-organotrophes hétérotrophes

IV-3-2-Type respiratoire

Un microorganisme peut être

- ***Aérobic** si sa croissance se fait à la surface d'un milieu
- ***Anaérobic** si sa croissance se fait en profondeur du milieu
- ***Aéro-anaérobic** : si sa croissance se fait dans tout le milieu
- ***Micro-aérophile** : si la croissance se fait à 1cm de la surface du milieu

La recherche du type respiratoire est effectué sur milieu VF (viande-foie) ou VL (viande – levure), type : tube Prévost (9x180) (10 à 12ml de gélose). Après avoir liquéfié la gélose dans un bain-marie le milieu est ensuite refroidie à 45°C estensemencé puis incubé.

A: aéro-anaérobie,

B: aéro bie,

C: micro-aérophile,

D: anaérobie

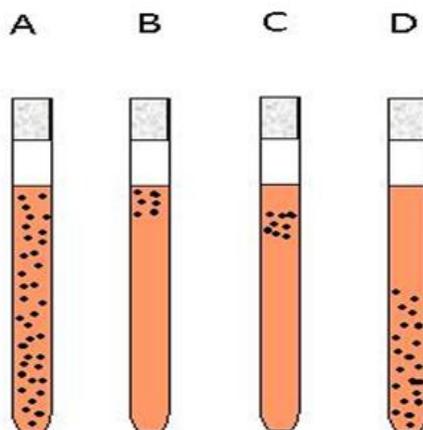


Figure 10 : Modes de respiration chez les microorganismes

IV-3-3-Etude du métabolisme glucidique

Il s'agit de tester l'utilisation de divers sucres qui sont la source de carbone.

IV-3-3-1-Métabolisme oxydatif:

C'est l'oxydation des sucres. Plusieurs techniques peuvent être testés

*Technique de l'auxanogramme:

La bactérie estensemencée à la surface d'un milieu de culture spécifique mais sans carbone, quelques cristaux ou des disques de papiers filtre imprégné de la substance sucrée sont déposés à la surface de la gélose. Après incubation le développement microbien dans la zone où les sucres ont été déposés traduit son utilisation

*Utilisation du TSI : C'est un milieu gélifié en tube, il contient trois sucres à identifier (TSI), le glucose et le saccharose existent dans le culot, le lactose dans la pente. L'utilisation des sucres se traduit par le virage au jaune. S'il y a production de gaz, il y a présence de trous dans la gélose. Le milieu peut devenir noir suite à un dégagement de H₂S

IV- 3-3-2-Métabolisme fermentaire

Il s'agit de tester la possibilité d'utilisation des substrats carbonés en absence d'oxygène et identifier les produits formés qui caractérise le type de fermentation.

Cette étude peut être réalisée en utilisant un milieu liquide contenant la cloche de Durham qui peut être le milieu de Schubert, le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLVVB) ou le bouillon lactosé au pourpre de bromocrésol (BPCL). Après ensemencement de la colonie bactérienne et incubation pendant une nuit, la remontée de la cloche traduit la fermentation du sucre par la bactérie avec dégagement gazeux, c'est-à-dire production d'acide et de CO₂. La bactérie est alors hétérofermentaire . L'absence de gaz dans la cloche traduit un métabolisme homofermentaire.

Le bouillon peut être remplacé par un milieu solide soit une gélose contenant un indicateur coloré. Le virage du milieu traduit la fermentation du sucre.

IV-3-4-Métabolismes des substances azotées

IV-3-4-1- Etude des substances utilisables

Cette étude permet de déterminer les formes d'azotes assimilables par un micro-organisme : ammonium, nitrite, nitrate etc....

Ce test se pratique avec la méthode de l'auxanogramme. Les substances azotées remplacent les sucres

IV-3- 4-2-Dégradation des acides aminés : décarboxylation ou désamination

Certains microorganismes peuvent dégrader des acides aminés à l'aide d'enzymes appelée soit des décarboxylases ou soit de désaminases

-La décarboxylation d'un acide aminé donne une amine

-La désamination conduit à la formation d'un acide

La mise en évidence de ces métabolismes est effectuée avec des milieux contenant un seul acide aminé et un indicateur de pH. Le virage de l'indicateur révèle la présence d'un métabolisme acidifiant ou alcalinisant

Les principales enzymes recherchées sont : LDC (lysine décarboxylase), ODC (ornithine décarboxylase), la lysine désaminase, la tryptophane désaminase et la phénylalanine désaminase

-Autres réactions

La dégradation des acides aminés soufrés se traduit par la formation d'H₂S (précipité noir)

IV-3-5-Dégradation des protéines

Pour mettre en évidence la dégradation des protéines on applique le procédé de l'hydrolyse de la caséine

Le test s'effectue avec un milieu gélosé au lait dé lactosé . Ce milieu est coulé en boîte de pétri etensemencé au centre de la boîte. L'hydrolyse de la caséine se traduit par la clarification du milieu

IV-3-6-Hydrolyse de l'urée

Certains microorganismes possèdent une uréase. Cette enzyme est mise en évidence sur un milieu contenant de l'urée avec indicateur coloré. L'hydrolyse de l'urée se traduit par la libération d'ammoniac, soit le virage de l'indicateur coloré qui est le rouge de phénol

IV-3-7-Utilisation du citrate

Le test est étudié sur milieu citrate de Simmons, c'est un milieu gélosé en tube incliné de couleur verte .Après ensemencement de la bactérie par des stries à la surface du milieu puis incubation pendant 24h , le virage du milieu vers la couleur bleu traduit la dégradation du citrate par la bactérie .

IV-3-8-Production des acides mixtes et d'acétoïne

Un enrichissement est réalisé dans un bouillon Clark et Lubs. Après incubation pendant 24h, le bouillon est partagé en deux tubes. Dans le premier tube sont introduit trois ou quatre gouttes de rouge de méthyle (RM), le virage du tube traduit la production des acides mixtes par la bactérie. Dans le deuxième tube sont introduit une goutte de Voges Proskauer VP1 (KOH) et VP2 (α -naphthol). L'apparition d'un anneau rose à la surface du bouillon traduit la production de l'acétoïne qui est un précurseur des composés aromatiques soit le diacéthy et l'acétaldéhyde .

Une bactérie est capable de produire soit les acides mixtes ou l'acétoïne pour cela elle est ou : RM(+) VP(-) ou RM(-)VP(+), jamais les deux tests positifs ou les deux tests négatifs en même temps

IV-3-9-Production d'indole

La bactérie est ensemencée dans un bouillon appelé « Eau peptonnée exempt d'indole »Après une incubation à l'étuve pendant 24 h, quelques gouttes du réactif de Kovacs sont introduit. L'apparition immédiate d'un anneau violet à la surface du bouillon traduit la production de l'indole par la bactérie après utilisation du tryptophane présent dans l'eau peptonnée exempt d'indole

IV-3-10-Métabolisme des lipides

Il s'agit de rechercher les enzymes capables de dégrader les substances lipidiques

Pour étudier ce métabolisme , des milieux contenant les substrats suivants sont utilisés:

- * Tween 80 : La réaction positive se traduit par une zone claire autour des colonies.
- * La lécithine (présente dans le milieu au jaune d'œuf). L'hydrolyse de la lécithine se fait par une lécithinase. La réaction positive montre une zone claire autour des colonies
- * Différents triglycérides : La dégradation des triglycérides par une enzyme montre une zone opaque due à la précipitation des sels d'acides gras formés

IV-3-11- Croissance sur milieu salé

Il s'agit de détecter si la bactérie a la capacité de croître sur des milieux salés à différentes concentrations de NaCl : 2,5 %, 3,0 %, 4 % et 6,5 % (p / v). Les milieux sont ensemencés en stries puis incubés en aérobiose à 30 °C pendant 48 h avec une lecture à 24 h. La lecture des résultats consiste à détecter la présence ou l'absence de colonies à la surface des géloses

IV-3-12-Test de la catalase

La dégradation du peroxyde d'hydrogène en eau et oxygène par la catalase peut être testé en mettant en contact une colonie bactérienne ayant poussé sur un milieu gélosé avec une goutte d'eau oxygénée (0,02 ml). La présence de bulle de gaz traduit la présence de la catalase secrétée par la bactérie.

IV-3-13- Hydrolyse de l'arginine

Ce test peut être réalisé par ensemencement en stries d'une colonie sur le milieu solide M16BCP et incubation en aérobiose à 30 °C pendant 24 h. Les colonies qui se distinguent par leur couleur blanche utilisent l'arginine

IV-4-Etude des caractères physiologiques

IV-4-1-Mobilité

La mobilité d'un micro-organisme peut être étudiée lorsqu'il est à l'état frais (IV-2) ou en utilisant le milieu Mannitol-mobilité : C'est un milieu semi solide de couleur rouge. L'ensemencement se fait en piqure centrale. Après incubation pendant 24h, s'il y a une colonie sur tout le long de la piqure, cela veut dire que les micro-organismes sont mobiles.

IV-4-2 -Recherche de la température optimale de croissance des microorganismes :

C'est-à-dire ensemencement en stries et incubation des boîtes en aérobiose pendant 24h dans plusieurs étuves réglées à différentes températures : 10 °C, 25 °C, 30 °C, 37 °C et 40°C. La lecture des résultats consiste à observer à l'œil nu la présence ou l'absence (résultat négatif) de colonies à la surface des géloses.

IV-4-3-Etude de la thermorésistance:

Deux méthodes peuvent être testées :

* Incubation à température 45°C ou 50°C : Présence de colonies dans le milieu de culture après 24h , ex : E .coli

*Chauffage à 80°C pour tuer la forme végétative des Clostridium, puis ensemencement de la gélose VF (viande-foie) liquéfiée et refroidie, puis additionné d'alun de fer et de sulfite de potassium . Après incubation à 37°C pendant 24h, l'apparition de taches noires dans la gélose traduit la présence des spores.

IV-4-4 -Etude de l'antibiorésistance : Test d'antibiogramme.

Ce test pratiqué dans tous les laboratoires d'analyses médicales consiste à rechercher si la bactérie est sensible ou résistante à tel et tel antibiotique. Il consiste à distribuer des disques antibiotiques à l'aide d'un distributeur de disques à la surface d'une gélose Muller Hinton préalablement ensemencée en nappe par une bactérie .Après une nuit d'incubation, la présence ou non de zones d'inhibitions autour du disque antibiotique révèle la sensibilité ou la résistance de la bactérie à l'antibiotique .



Figure 11 : Antibiogramme

IV-4-5 -Etude de la production des substances utiles en biotechnologie

IV-4-5-1-Antibiotiques : Industries pharmaceutiques

IV-4-5-2-Bactériocines : Industries agro-alimentaires

Les Bactériocine sont des substances de natures protéiques secrétées généralement par des bactéries lactiques .Elles ont le rôle d'inhiber les bactéries indésirables. Elles sont utilisées dans les industries agro-alimentaires comme conservatrices des produits alimentaires notamment les fromages. C'est surtout la Nisine,, une bactériocine secrétée par une bactérie lactique *lactococcus lactis* qui est la plus employé sous le code de « E234 ».

IV-4-5-3-Composés aromatiques : Industrie agro-alimentaire

Certaines bactéries produisent des substances aromatiques après utilisation des sucres ou des protéines du milieu .Parmi ces substances le diacétyle produit par la bactérie appelée *Lactococcus lactis subsp lactis biovar diacétylactis* et l'acétaldéhyde produit par d'autres bactéries .

IV-4-5-4-Polysaccharides : Industrie agro-alimentaire.

Il existe des micro-organismes qui produisent des polysaccharides comme le cas de la bactérie lactique appelée *Leuconostoc dextranicum* qui forme le dextrane .La bactérie estensemencé en strie sur milieu gélosé. Après 24h d'incubation en aérobiose, les colonies apparaissent avec un aspect muqueux qui traduit la production du dextrane

IV-4-Test IMVIC

Le test IMVIC consiste à identifier la sous famille .des coliformes appartenant à la famille des entérobactéries en utilisant quelques tests biochimiques

Tableau 2 : Identification des coliformes par le test IMVIC (Leveau et Bouix, 1993)

Microorganismes	Lactose	Glucose	H2S	Indole (I)	Rouge de méthyle (M)	Acétoine (VI)	Citrate (C)	Mobilité
<i>E .coli</i>	±	+	-	±	+	-	-	±
<i>Citrobacter</i>	+	+	±	±	+	-	+	+
<i>Klebseilla</i>	+	+	-	±	-	+	+	-
<i>Enterobacter</i>	+	+	-	±	-	+	+	+

I : Indole ; M : Rouge de métyle ; V :Voges Proskawer ; C :Citrate

Les techniques d'ensemencements et les résultats positifs ou négatifs obtenus des différents milieux cités dans le tableau sont expliqué ci- dessus

IV-5-Galerie API

La galerie classique peut être remplacé par une galerie plus rapide appelée : plaques « API »Appareil et Procédé d'Identification .Il existe des « API 20 E pour Entérobactérie, API Staph , API Strept , API Lactobacilles ect...

Exemple API 20^E



IV-5-1-Technique d'utilisation de la galerie API 20E

Tout d'abord quelques gouttes d'eau distillée sont déposées au fond de la plaquette pour créer une atmosphère humide.

A l'aide d'une anse de platine, une colonie bactérienne est prélevée d'un milieu de culture solide puis mélangé à 10 ml d'eau distillée pour obtenir une suspension bactérienne homogène

IV-5-2-Inoculation de la galerie

La suspension bactérienne est introduite dans les microtubes de la galerie à l'aide de la même pipette. Pour les tests : CIT(citrate), VP(Voges Proskawer) et GEL(gélatine), microtubes et microcupules sont rempli. Pour les autres tests, uniquement les microtubes (et non les cupules). Pour les tests : ADH (arginine dihydrolase), LDC (lysine décarboxylase), ODC(ornithine décarboxylase) et les tests H₂S et URE (uréase) ,une anaérobiose est créé en remplissant leurs microtubules d'huile de paraffine .Puis la boîte est fermée et incubé à 37°C pendant 24h.

IV-5-3-Lecture et interprétation :

Dans le microtube ONPG (Ortho Nitro Phényl Galactopyranoside) pour la recherche de la β -galactosidase ou ONPG hydrolase , est introduit un disque ONPG. Une légère coloration jaune traduit une réaction positive

Les tests suivants nécessitent l'addition des réactifs après 24h d'incubation :

TDA : une goutte du réactif TDA (tryptophane désaminase). Du perchlorure de fer est ajoutée. Une couleur marron rougeâtre indique une réaction positive doù la présence d'acide indol pyruvique

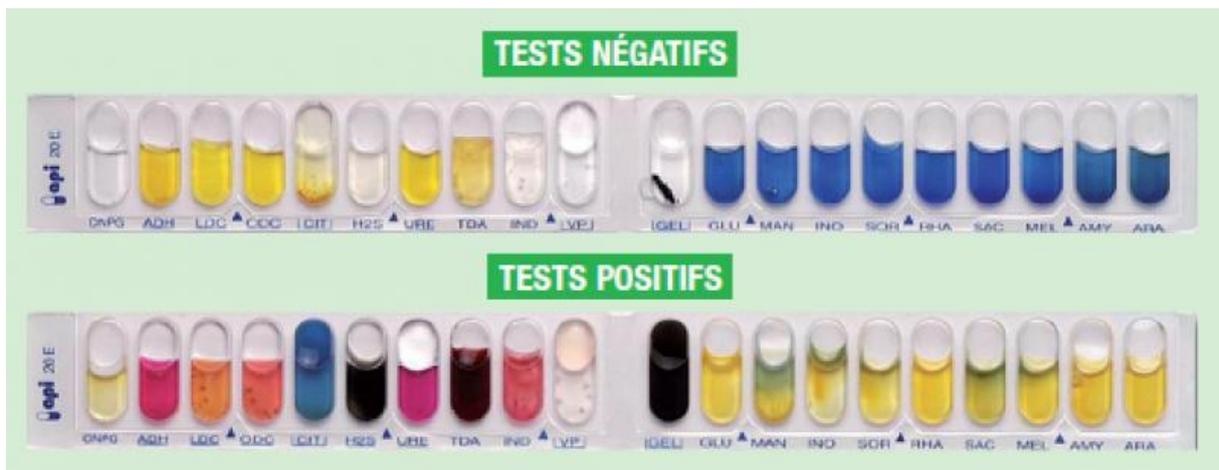
IND : une goutte du réactif de KOVACS est ajoutée. Une couleur rose diffusant dans toute la microcupule indique une réaction positive qui confirme la présence d'indole.

VP : une goutte des réactifs VP1 (KOH) et VP2 (α -naphtol) est ajouté. Une couleur rose indique une réaction positive qui déduit la présence d'acétoïne.

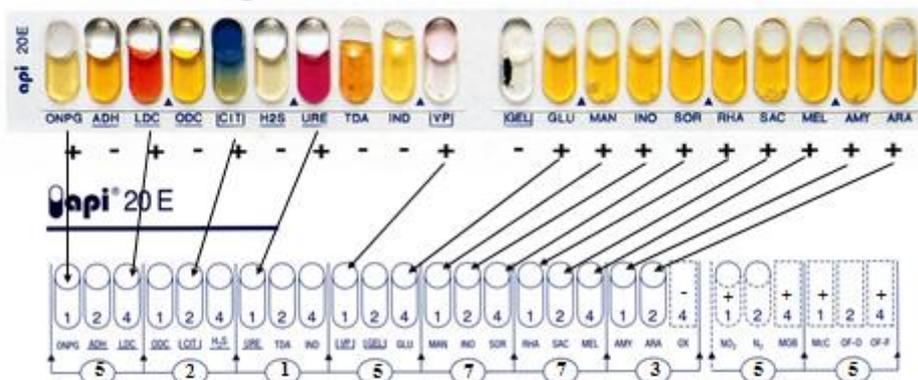
Réduction des *nitrates en nitrites* (NO₂) et en azote (N₂) : est ajouté une goutte des réactifs NR1 (acide sulfanilique) et NR2 (α -naphtylamine). Après 2 à 5 minutes, une coloration rouge indique une réaction positive qui montre la présence de NO₂ issu de la réduction des nitrates par une nitrate réductase bactérienne. Une réaction négative c'est-à-dire une coloration jaune peut être due à la production d'azote (N₂) à partir des nitrites

GLU : 2 à 3 mg de réactif Zn (poudre de zinc) sont ajoutés dans la cupule. Après 5 minutes, si le tube reste jaune ceci indique une réaction positive soit la présence de N₂. Si la cupule est orange-rouge, la réaction est négative c'est-à-dire les nitrates encore présents dans le tube ont été réduits en nitrites par le Zinc.

Les cupules restantes sont des sucres à dégrader par le micro-organisme, dans ce cas, les tubes virent vers le jaunâtre, si la coloration bleu persiste le résultat est négatif



Résultats de la galerie:



Résultats reportés sur la fiche d'identification

Code n°: 5 215 773 (5)	Ident.
------------------------	--------

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

Les galeries API sont accompagnées d'une fiche technique et d'un tableau de lecture .

CONTRÔLE AU NIVEAU D'UNE ENTREPRISE AGRO-ALIMENTAIRE

V-1-Contrôle de la matière première

La matière première doit être contrôlée et analysée pour vérifier si sa qualité microbiologique est conforme aux normes

Si la matière première est contaminée, les microorganismes présents sont capables de gêner le déroulement de la fabrication. Si ces microorganismes ne peuvent pas être éliminés par des traitements (comme les bactéries sporulées) ou autres au cours de la fabrication, le produit fini sera altéré. Les microorganismes dangereux doivent être recherchés.

V-2- Contrôle de la fabrication

-Si la fabrication ne demande pas de fermentation, la qualité microbiologique est maîtrisée à condition que les paramètres suivants soient contrôlés : pH, température, activité de l'eau etc.

-Si la fabrication demande une fermentation les ferments doivent être contrôlés ou analysés avant de les ensemercer dans un milieu stérile.

V-3- Contrôle des locaux :

Les différents ateliers de l'usine doivent être répartis selon leur fonction dans la chaîne de fabrication et suivant le principe de la marche en avant : Atelier de stockage de la matière première, atelier de fabrication, atelier de conditionnement, atelier de stockage du produit fini ou chambre froide et à la fin l'atelier de stockage des déchets.

Les locaux doivent être propres pour que ceci soit réalisé :

-Les revêtements doivent être compatibles avec les produits de nettoyage.

-Les sols doivent être en pente pour permettre l'évacuation rapide de l'eau

-Sols, murs et plafonds doivent être les plus lisses possibles et non poreux.

-Tous les ateliers doivent être éclairés. Le système d'éclairage doit être choisi pour pouvoir le démonter pour des rechanges et pour le nettoyage aussi.

Le contrôle microbiologique des locaux est le contrôle des surfaces se fait par écouvillonnage ou en appliquant des lames gélosés

V-4-Contrôle de l'air ambiant des locaux

Il contient des particules, se sont des poussières qui peuvent contenir des microbes (bactéries, levures et moisissures qui peuvent être à l'état de spores)

Différents phénomènes sont à l'origine de la contamination de l'air :

*Matière première (graines, poussières,...)

*Emballage

*Personnel de l'unité

*Eviter les prises d'air fréquentes (portes, et fenêtres doivent rester fermées, surtout au printemps (poussières et graines maintiennent les microbes)

Pour contrôler l'air ambiant :

-On laisse ouvert une boîte gélosé

- Des techniques sont utilisées, comme l'aspiration de l'air avec une turbine puis l'air est projetée sur une boîte gélosé

Pour désinfecter l'air ambiant , des produits antiseptiques et antimicrobiens sont pulvérisés

V-5-Contrôle du matériel et des installations

Parfois le matériel est relié à un équipement de nettoyage automatique. Le matériel qui ne le possède pas, doit être facilement démontable pour être nettoyé et désinfecté.

Le contrôle des dispositifs moins accessibles (robinets, canules...) doit se faire par écouvillonnage.

Dans les industries de boissons il existe des laveuses de bouteilles. A la sortie des laveuses ces bouteilles doivent être contrôlées.

Les paramètres de fonctionnement du nettoyage doivent être surveillé et contrôler comme :

- *la qualité des bains de nettoyage

- *la température de l'eau utilisée pour le nettoyage

Le matériel de fabrication doit être choisi en fonction de ses caractéristiques techniques et performantes.

Le matériel doit être conçu avec le souci d'éviter le maximum une contamination et un développement microbien, pour cela il faut :

- *Réduire le maximum les angles morts (vannes)

- *Une bonne qualité des soudures etc...

Le matériel doit offrir des garanties suffisantes sur le plan de l'hygiène.

V-6-Le personnel

Les industries fond appel à l'homme pour faire marcher les machines et la chaîne de fabrication dont les principales causes de contamination sont :

V-6-1-La chevelure : Les cheveux sont un réservoir de microbes, ils doivent être recouvert afin d'éviter une dissémination des microorganismes

Le contrôle se fait en disposant un cheveu ou un poil sur une boîte contenant un milieu gélosé

V-6-2-les mains

Les mains en contact permanent avec l'environnement sont le support de nombreux microorganismes qui sont plus concentrés au niveau des bouts des doigts et, entre les doigts, sous les ongles et sur le bord cubital de la main.

Les ongles doivent être coupés, les mains doivent être lavées puis essuyés avec un essuie main en papier jetable.

Le contrôle microbien des mains peut se faire par empreinte des doigts sur un milieu gélosé

Les bijoux comme les bagues et les bracelets constituent un gîte microbien, ainsi il faut éviter de porter des bijoux

V-6-3-La bouche

La cavité oropharyngée abrite de nombreux microorganismes. Parler, siffler, tousser, éternuer, provoque une dissémination des microbes qui sortent de la bouche

V-6-4-Les vêtements

Les vêtements sont à l'origine des contaminations, ils doivent être changés souvent, lavés et désinfectés en deux utilisations

Eviter de porter des vêtements avec des manches larges et longues dont les extrémités peuvent contenir des microorganismes

Le contrôle microbiologique se fait par empreinte des vêtements ou par écouvillonnage

V-7- Contrôle du produit fini

-L'analyse et le contrôle du produit fini permet de déterminer la qualité hygiénique et la qualité marchande

-Les contrôles sont plus ou moins importants selon la nature des produits et leur destination

-Dans certains cas, les contrôles sont beaucoup plus nombreux et plus sévères surtout quand le produit alimentaire est ramené à rechercher les germes pathogènes.

-Les contrôles permettent de vérifier si les résultats sont conformes aux normes et à des critères de qualité.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- 1-Badis, A., Laouarbdia, Selami, N., Guetarni, D., Kihal, M., et Ouzrout, R., (2005).
Caractérisation phénotypique des bactéries lactiques isolées à partir du lait cru de chèvre de deux populations caprines locales « Arabia et Kabile ». *Sciences et Technologie*. 23: 30-37.
- 2-Bauer, R., Bekker, J.P., du Toit, N.W.C., Dicks, L.M.T., et Kossmann, J., (2009).
Exopolysaccharide production by lactose-hydrolyzing bacteria isolated from traditionally fermented milk. *International Journal of Food Microbiology* 131: 260–264.
- 3-Benayed, B., (2014) . *Contrôle de la qualité et analyse* .2^{ème} édition. Office des publications universitaires .ISBN 1392.2
- 4-Bendimerad, N., (2013). *Caractérisation phénotypique technologique et moléculaire d'isolats de bactéries lactiques de laits crus recueillis dans les régions de l'Ouest Algérien. Essai de fabrication de fromage frais type «Jben »*. Thèse de doctorat en microbiologie alimentaire. Université de Tlemcen. Algérie .
- 5-Bendimerad, N., Kihal, M., et Berthier, F., (2012). *Isolation identification and technological characterization of wild leuconostocs and lactococci for traditional Raib type milk fermentation*. *Dairy Science and Technology* 92: 249–264.
- 6- Carip, C., Salavert, M-H., Tandau, A., (2015) . *Microbiologie hygiène et droit alimentaire. Le manuel* 2^{ème} Éd. Coll. Réussir son BTS Diététique 323 p.
- 7- Delarras, C., (2012). *Surveillance sanitaire et microbiologique des eaux : réglementation, micro-organismes, prélèvements, analyses etc...*. Lavoisier-Tec & Doc.
- 8- De Man, J.C., Rogosa, M; Sharpe, M.E., (1960). *Un milieu pour la culture des Lactobacilli* ; *Journal de bactériologie appliquée* .Vol 23 .N°1. pp 130-135
- 9-Delves-Broughton, J., (2005). *Nisin as a food preservative*. *Food Australia* 57(12) : 525-527.
- 10-Didier, L. C., (2012) .*Les bonnes pratiques alimentaires. Le guide complet de la nutrition*.

- 11-**Dunham et Schoenlein., 1926. Manuel de milieux de culture in Admin, M., Milieux de culture. Microbiologie Alimentaire. <http://microbioalimentaire.dynamicforum.net/t2-b>.
- 12-**Kempler, G.M., et McKay, L. L., 1980. Improved medium for detection of citrate – fermenting *Streptococcus lactis subps diacetylactis*. Journal of Applied and Environmental Microbiology 39: 926-927.
- 13-**Le Manuel., (2015). Microbiologie, hygiène et droit alimentaire. Lavoisier-Tec 219 p.
- 14-**Leveau, J.I ., et Bouix,M . , (1993) .Les micro-organismes d'intérêt industriels Microbiologie industrielle. Collection sciences et techniques agro-alimentaire .Adria
- 15-** Mayeux,J.,Sandine, W., et Elliker,P., 1962. A selective medium for detecting Leuconostoc organism in mixed strain cultures. Journal Dairy Sciences 45: 655-656.
- 16-**Ministère du commerce. , (2016).Méthodes officielles d'analyses physico-chimiques et microbiologiques. Journal Officiel de la République Algérienne
- 17-**Mossel.D.A.A., (1974). Meat. Edited by D.J.A. Cole and R.A.Lawrie.Library of congress calalog card Number, 75-895.ISBN 0-87057-184-1
- 18-** Murat, M.,(2009). Nutrition humaine et sécurité alimentaire Coll. BTS ESF. 688 p.
- 17-** Paolozzi,L., Liébart,,J.C.,Bauda,P .,(2015).Microbiologie. Dunod
- 18-** Prieur, D.,Geslin,C . ,Payan C . , (2015). Mini manuel de microbiologie. Dunod
- 19-**Terzaghi, B.E., et Sandine, W.E .,(1975) .Milieu amélioré pour les streptocoques lactiques et leurs bactériophages ;Applied Microbiology .American society for microbiology 29(6) . 807-813
- 20-**Thomas, T., 1973. Agar medium for differentiation of *Streptococcus cremoris* from other bacteria. New Zealand Journal of Dairy Science 8: 70-71.
- 21-**Thomas,,L .,et Dubeuf ,,J.P., 1995. Les perspectives de développement de la filière lait chèvre dans le bassin méditerranéen. Etude FAO production et santé animales

ANNEXES

ANNEXE I

TABLE DE MAC GRADY POUR 2 TUBES PAR DILUTION

Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions reternus			NPP	Nombre de tubes positifs au niveau de trois taux de dilutions reternus			NPP
0	0	0	< 0,5	1	2	1	3,0
0	0	1	0,5	2	0	0	2,5
0	1	0	0,5	2	0	1	5,0
0	1	1	0,9	2	1	0	6,0
0	2	0	0,9	2	1	1	13,0
1	0	0	0,6	2	1	2	20,0
1	0	1	1,2	2	2	0	25,0
1	1	0	1,3	2	2	1	70
1	1	1	2,0	2	2	2	> 70
1	2	0	2,0				

TABLE DE MAC GRADY POUR 3 TUBES PAR DILUTION

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

ANNEXE II

MILIEUX DE CULTURES

I-GÉLOSES/BOUILLONS correspondant

Les bouillons contiennent les mêmes quantités de tous les ingrédients, sauf l'agar –agar.

Gélose/Bouillon MRS : « De Man-Rogosa-Sharpe (1960) »

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en grammes</i>
Extrait de viande	10
Extrait de levure	5
Peptone	10
Acétate de sodium	5
Citrate de sodium	2
Glucose	20
MgSO ₄	0,25
MnSO ₄	0,05
KH ₂ PO ₄	2
Agar-agar	15 (uniquement gélose)
Tween 80	
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH= 6,8	

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn

Gélose/Bouillon M17 (Terzaghi et Sandine, 1975)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Tryptone	5
Peptone papainique	2,5
Peptone pepsique de viande	5
Acide ascorbique	0,5
Lactose	5
Glycérophosphate de sodium	19
Mg SO ₄	0,25
Agar-agar	15 (uniquement gélose)
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH =7,1	

Le mélange est mis dans des flacons stériles puis autoclavé à 121 °C pendant 15 mn

Gélose YMA (Yeast-Milk –Agar (1960)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
--------------------	----------------------------

Extrait de levure	3
Peptone	5
Lait déshydraté	10
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH = 7,0 Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn.

Gélose MSE (Mayeux, Sandine et Elliker, 1962)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Tryptone	10
Extrait de levure	5
Saccharose	100
Citrate de sodium	1
Glucose	5
Gélatine	2,5
Azothyrate de sodium	0,075
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH 6,5

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

Gélose ME (milieu pour entérocoques)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
Tryptone	20
Extrait de levure	5
Dextrose	2
Dipotassium phosphate	4
Azide de sodium	0,4
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
Agar	10
2.3.5 Triphenyl Tetrazolium chloride	0,1

pH 7,2 ± 0,2 Autoclaver à 121°C pendant 15mn

Gélose M16 BCP (Thomas , 1973)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Extrait de levure	2,5
Extrait de viande	5
Peptone papainique de soja	5
Bi-polytone	5
Acide ascorbique	0,5
Lactose	2
L-arginine	4
Pourpe de bromocresol	0,5
Agar-Agar	15

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

pH= 6,8

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

Gélose KMK (Kempler et Mac Kay ,1980)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités</i>
Poudre de lait écrémé	10
Biopolytone	2,5
Glucose	5
Agar-Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH= 6,6

Le milieu est réparti à raison de 100 ml par flacon puis autoclaver à 121 °C pendant 15 mn.

Au moment de son utilisation on ajoute :

1 ml de solution aqueuse de ferricyamide de potassium à 10 % (P/V)

1 ml de solution aqueuse de citrate ferrique à 2,5 % (P/V)

1 ml de citrate de sodium 2,5 % (P/V)

Ces solutions sont stérilisées par filtration (Membrane millipores 0,22 µm) avant leur utilisation et doivent être conservées à l'obscurité à 4 °C.

Gélose NUTRITIVE

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
Peptone	5
Extrait de viande	1
Extrait de levure	2
Chlorure de sodium	5
Agar	15
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH =7,1	

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

Gélose MAC CONKEY

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Peptone de caseine	17
Peptone de viande	3
Lactose	10
Mélange des els biliaires	1,5
Chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,03
Crystal violet	0,001
Agar –Agar	13,5
Eau distillée q.s.p. 1000ml	
pH 7,1	Autoclaver à 110 °C pendant 30 mn

Gélose SS (Salmonella, Shigella)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Extrait de viande de boeuf	5
Polypeptone	5
Lactose	10
Sels biliaires	8,5
Citrate de sodium	10
Thiosulfate de sodium	8,5
Citrate ferrique	1
Rouge neutre	0,025
Vert brillant	0,00033(qqs traces)
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7,0	

Ne pas autoclaver, porter à ébullition pendant 1 ou 2mn en agitant fréquemment

Milieu CHAPMAN

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Peptone	11
Extrait de viande	1
Chlorure de sodium	75
Mannitol	1
Rouge de phénol	0,025
Agar-Agar	15

Eau distillée q.s.p. 1000 ml

pH 7.4 à 7.5

Autoclaver à 110 °C pendant 30 mn.

Gélose Viande – Foie (VF)

Ingrédients

Quantités en gramme

Base VF déshydraté

20

Glucose

2

Amidon

2

Aga-Agar

11

Eau distillée q.s.p.

1000 ml

pH 7,2

Autoclaver à 115 °C pendant 30 mn

Gélose à trois sucres et au fer (TSI)

Ingrédients

Quantités en gramme

Extrait de viande

3

Extrait de levure

3

Peptone

15

Lactose

10

Saccharose

10

Glucose

1

Chlorure ferrique d'ammonium

0,5

Chlorure de sodium

5

Rouge de phenol	0,024
-----------------	-------

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantité en gramme</i>
--------------------	---------------------------

Agar	12
------	----

Thiosulfate de sodium	0,3
-----------------------	-----

Eau distillée q.s.p.	1000 ml
----------------------	---------

pH 7,5

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

Milieu CITRATE DE SIMMONS

<i>Ingrédients</i>	<i>quantités en grammes</i>
--------------------	-----------------------------

Sulfate de magnésium	0,2
----------------------	-----

Phosphate de mono -ammoniaque	1
-------------------------------	---

Phosphate bipotassique	1
------------------------	---

Citrate de sodium	2
-------------------	---

Chlorure de sodium	5
--------------------	---

Bleu de Bromothymol	0,08
---------------------	------

Agar	15
------	----

Eau distillée q.s.p.	1000 ml
----------------------	---------

pH 6,8

Autoclaver à 121 °C pendant 15 mn

II-BOUILLONS

Bouillon BLBVB (Bouillon lactosé bilié au vert brillant) (Dunham et Schoenlein,1926)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Lactose	10
Peptone	10
Bile déshydratée	20
Vert brillant à 1%	1,3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7,2	

Autoclaver à 115 °C pendant 20 mn

Milieu ROTHE (S/C) (bouillon glucose à l'azide de sodium)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Tryptone	20
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate di potasique	2,7
Phosphate monopotassique	2,7
Azothydrate de sodium	0,2
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH 7,2

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

Milieu EVA Litsky (bouillon glucosé à l'éthyle violet et azide de sodium)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Tryptone	20
Glucose	5
Chlorure de sodium	5
Phosphate di potassique	5
Phosphate monopotassique	2,7
Azohydrate de sodium	0,3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

Solution à 0,01 g d'éthyle Violet dans 100 ml d'H₂O 5 ml

pH 7,2

Autoclaver r à 121 °C pendant 20 mn

Bouillon au sélinite (SFB)

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Sélinite de sodium	5
Peptone trypsine de caseine	4
Lactose	4
Phosphate disodique	40
Cystine	0.02
Eau distillée q.s.p.	1000 ml

pH 7,0 ± 0.2

Stériliser à 115 °C pendant 20 mn

Bouillon de GIOLITTI et CANTONI

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en gramme</i>
Tryptone	10
Extrait de viande	5
Extrait de levure	5
Chlorure de lithium	5
Mannitol	20
Chlorure de sodium	5
Glycine	1.2
Pyruvate de sodium	3
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 6,8 à 7,0	

Autoclaver pendant 20 mn à 115 °C

Milieu CLARCK ET LUBS

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en grammes</i>
Peptone trypsique	5
Glucose	2
Phosphate bipotassique	10
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7,5	

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

EAU PEPTONNEE EXEMPTÉ D'INDOLE

<i>Ingrédients</i>	<i>Quantités en grammes</i>
Peptone	20
Chlorure de sodium	20
Phosphate dissodique	9
Eau distillée q.s.p.	1000 ml
pH 7,5	

Autoclaver à 121 °C pendant 20 mn

CONCLUSION

Le présent cours est un outil très important pour pouvoir travailler dans un laboratoire d'analyses des denrées alimentaires ,et pour pouvoir contrôler les produits alimentaires fabriqués et mis à la disposition du consommateurs dans les marchés , les restaurants etc..en collaboration avec les organismes de la répression et des fraudes.

Mots clés

Aliments, analyses, échantillons, contrôles, contaminations, bactéries, laboratoire.