

Module de Control de qualité microbiologique

**(Cours+TD +
Corrigés des TD)**

Par M^{me} ADDI N.

Répertoire :

| | |
|--|-----------|
| Cour 1 : Politique de contrôle Microbiologique..... | 3 |
| Cour 2 : Techniques classiques de numération de microorganismes..... | 7 |
| Cour3 : Identification phénotipique des bactéries..... | 11 |
| Cour 4 : Les techniques rapides de détection et Réalisation du control microbiologique..... | 17 |
| TD 4..... | 21 |
| TD 5..... | 22 |
| TD 6..... | 23 |
| TD 7..... | 24 |
| Corrigé des TD..... | 25 |

DR. ADDI N.

Cour 1 : Politique de contrôle Microbiologique

Introduction :

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.

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.

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 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.

4. Méthodes de contrôle

Les méthodes de contrôles sont divisées en deux :

1/ Techniques microbiologiques de culture qui sont longues, coûteuses, 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 coût. 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 tel que : 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 coûteuses et sensibles pour qu'une correction soit, éventuellement, possible dans la fabrication.

5. 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 ($2\sqrt{}$) : pour les lots considérés pas trèsgrands ($2\sqrt{}$ de l'effectif du lot).

Technique de la racine cubique ($3\sqrt{}$) : pour les lots considérés assez grands ($3\sqrt{}$ 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.

5.1 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 : pelle à main, sonde cylindrique.

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.

5.2 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, 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.

5.3 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.

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.

Quant à l'échantillon solide, celui-ci nécessite un broyage dans un diluant stérile à l'aide des broyeurs de laboratoire, cet ensemble (échantillon et diluant) constitue la dilution mère (DM), et si nécessaire d'autres dilutions décimales sont réalisées.

Cour 2 : Techniques classiques de numération de microorganismes

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 mm³. La cellule est formée de seize (16) grands carrés, composés chacun de seize (16) petits carrés (fig.1).

Cellule de MALASSEZ : d'une taille de de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.2 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm³ (Fig.2).

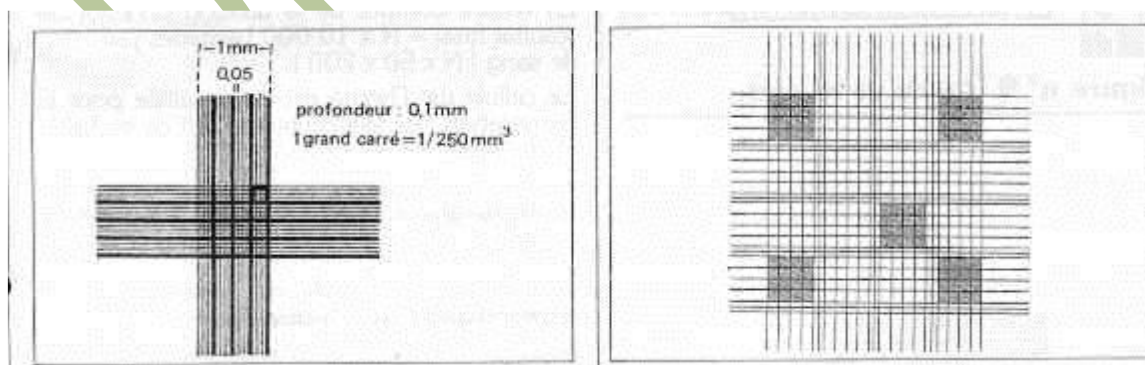


Figure 1 : représentation schématique : (a) quadrillage de la cellule de THOMA (b) cellule de THOMA.

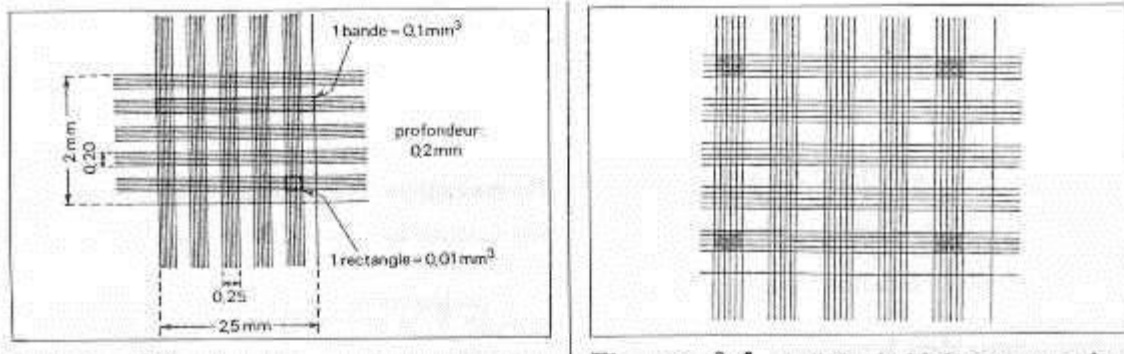


Figure 2 : représentation schématique : quadrillage de la cellule de MALASSEZ.

La méthode de Breed

Cette méthode utilise des lames comportant une zone délimitée de un centimètre cube (1 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.

B. Méthode 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.

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).

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.

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

D. Numération en tubes (*roll tube count*)

À la place des boîtes de Pétri, on emploie des tubes contenant 2 à 4 ml de milieu glosé. 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.

E. 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.

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.

Tableau de Mc Grady :

| 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 | | |

Cour3 : Identification phénotypique des bactéries

Introduction :

De nombreux caractères sont exploités pour identifier une bactérie, déjà isolé 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.

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 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 1).

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.

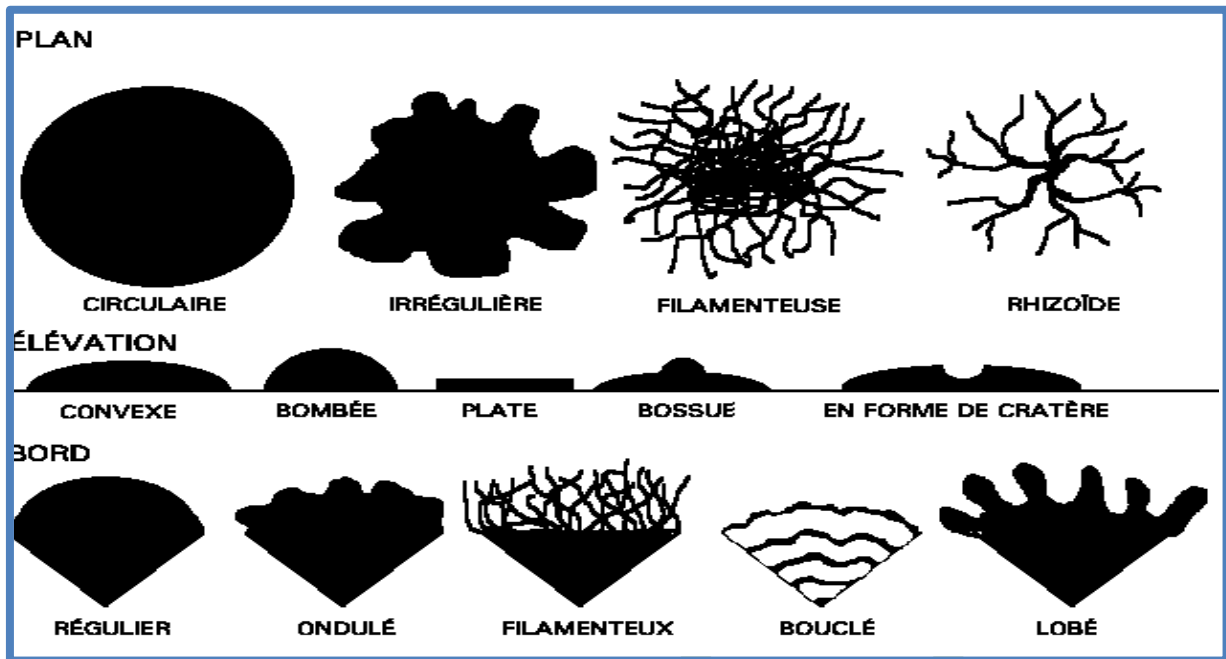


Figure 1 : représentation schématique des caractères fréquemment

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-iode, 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.

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 fuchsine.

Ils sont dits bacilles acido-alcool-résistants (BAAR), exemple : *Mycobacterium tuberculosis*, qui apparaît rose-rouge, souvent parlé et légèrement incurvée.

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*.

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.

3 Caractères biochimiques et physiologiques

a. Demande en O₂

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'O₂ de l'air, exemple : *Pseudomonas aeruginosa* ;

(2) Anaérobie strict : l'accepteur est de nature différente et l'O₂ est toxique ;

(3) Anaérobie aérotolérant : sont capables de croître en présence ou en l'absence d'O₂, l'accepteur est de nature différente et l'O₂ 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'O₂ mais à un niveau acceptable.

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 CO₂ en présence ou en absence d'O₂. 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 CO₂ 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'H₂

La sulfito-réduction : les anaérobies sulfito-réducteurs sont capables d'utiliser les sulfites comme accepteurs d'H₂ 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' H₂S) .

La réduction des nitrates : les anaérobies sont, aussi, capables d'utiliser les nitrates comme accepteurs d'H₂ 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 NiT1 et NiT2. 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 (H₂O₂) 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'H₂ sur L'O₂, 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⁻.

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 (FeCl₃) 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 phényl pyruvique (APP) donne une teinte verte en présence de chlorure de fer.

l'ornithine-décarboxylase (ODC), la lysine-décarboxylase (LDC) et l'arginine-déshydroxylase (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, enanaérobiose, 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 β 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-galactopyranoside (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 piqûre 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.

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.

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 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 α , β et γ : enzymes responsables de la lyse des hématies, ils sont mises en évidence par culture sur gélose au sang.

Hémolysines α (zone verdâtre due à la metmyoglobine, exemple : *S. pneumonia* ; Hémolysines β (auréole claire due à la libération de l'hémoglobine, exemple : *St. aureus*) ; Hémolysines γ (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*+

Cour 4 : Les techniques rapides de détection et Réalisation du control microbiologique

A/ Les techniques rapides de détection

Introduction :

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 » .

4.1 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'oeil 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*).

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 $^{14}\text{CO}_2$ 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 $^{14}\text{CO}_2$. Le temps nécessaire pour détecter le $^{14}\text{CO}_2$ est inversement proportionnel au nombre de microorganismes présents.

7.2 Electrochimique

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, polysides...) 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.

B/ Réalisation du contrôle microbiologique

1 Contrôle des matières premières

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

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.

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...).

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.

5 Contrôle Des Produits finis

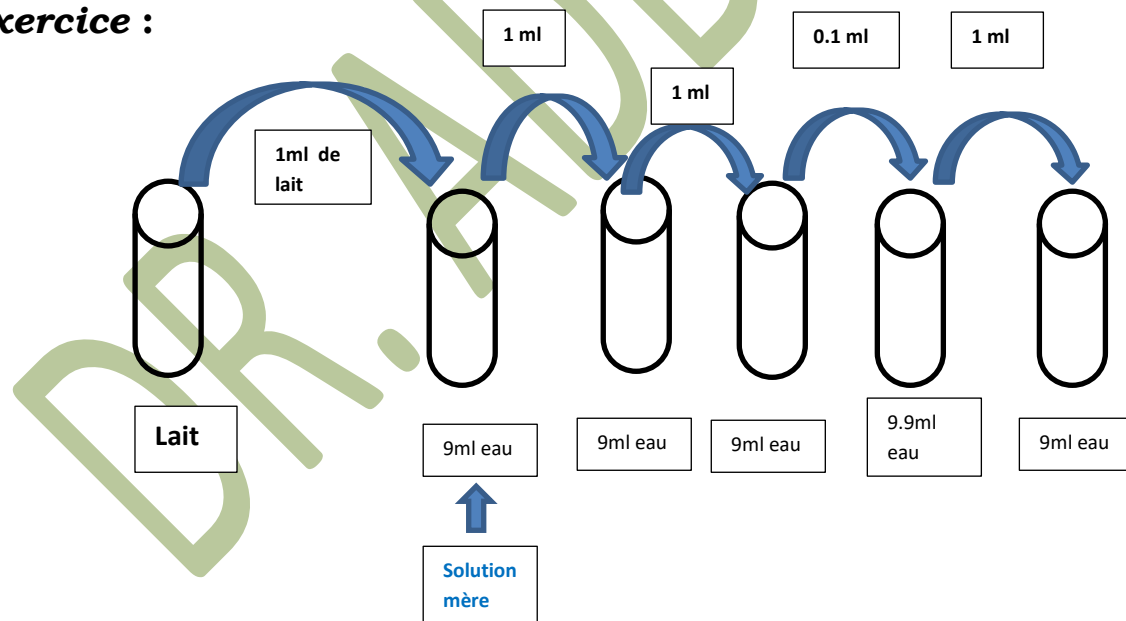
Le contrôle microbiologique des produits finis porte sur leur qualité hygiénique et leur qualité marchande. Ce contrôle consiste à la recherche et au dénombrement des microorganismes potentiellement dangereux (germes aérobies, levures et moisissures, *Clostridium spp.*, *Salmonella spp.*, *Staphylococcus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

TD 4 : CONTROL DE QUALITE

Questions :

- 1/Quels sont les objectifs du control microbiologique ?
- 2/Quels sont les niveaux de control microbiologique ?
- 3/Quels sont les paramètres à contrôler ?
- 4/Quand utilise-t-on les milieux de culture sélectifs ?
- 5/Citez les étapes de la coloration de Gram ?
- 6/Définissez les termes: **Lot, échantillon, produit.**
- 7/Quel sont les sortes d'échantillonnage existants ?

Exercice :



- 1/ Définissez l'étape échantillonnage sur cet exemple ?
- 2/ Quels sont les dilutions trouvés dans cet exemple ?

Par M^{me} ADDI

TD 5 : Control de qualité

I. Rappel sur les méthodes de dénombrement :

- Dénombrement sur milieu Solide
- Dénombrement sur milieu liquide
- Méthode de Breed

Questions :

Quels sont les différentes techniques de control microbiologiques utilisées ?

Quels sont les méthodes de dénombrement classiques ?

EXERCICE 1 :

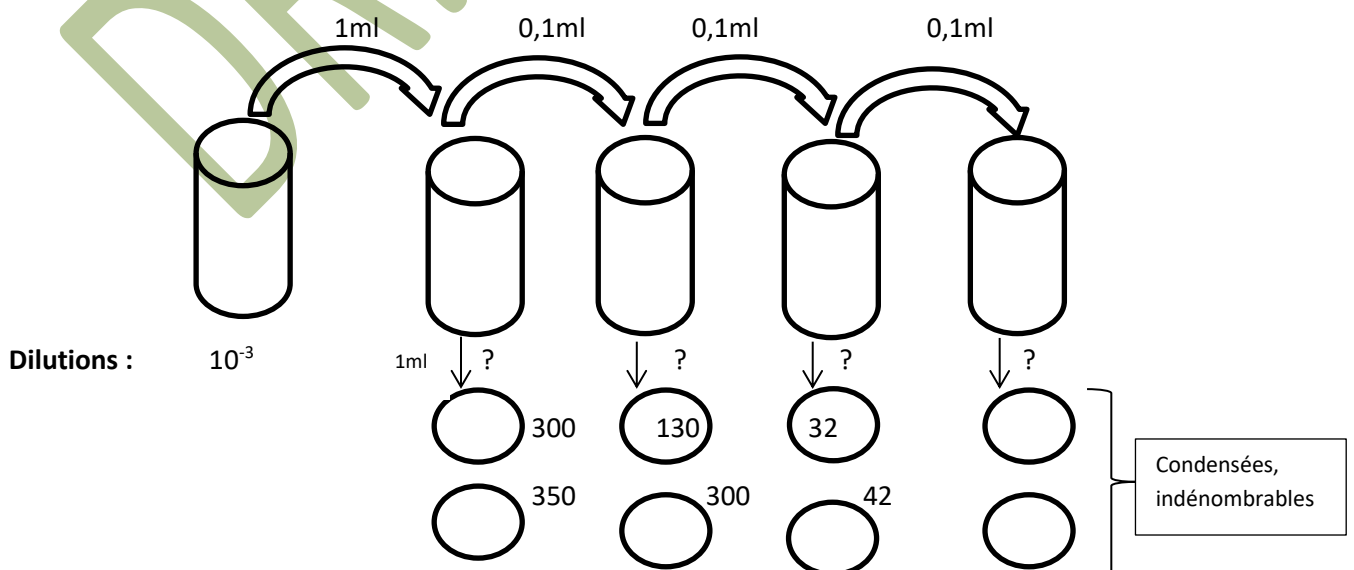
Donnez un schéma pour avoir les dilutions suivantes :

| | | | | |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 10^{-1} | 10^{-2} | 10^{-4} | 10^{-6} | 10^{-7} |
|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|

EXERCICE 2 : Analyse du lait :

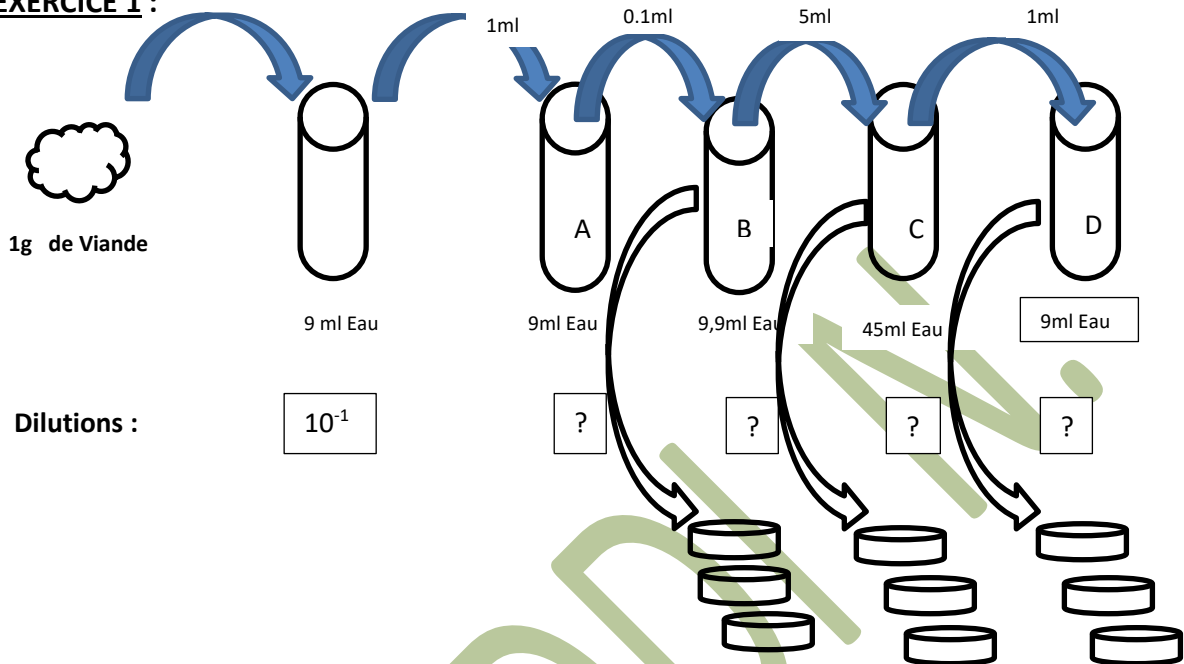
Nous avons un échantillon de lait à analyser,

- 1) Comment procéder à l'Analyse de cet échantillon ?
- 2) Calculez les dilutions et le nombre de microorganismes par « ml » de ce qui suit :



TD 6 : Control de qualité

EXERCICE 1 :



- 1) Donnez les dilutions des tubes A, B, C, D ?
- 2) Le comptage des colonies sur boîtes de pétri, nous a permis de réaliser le tableau suivant :

| TUBES | B | C | D |
|---------------------------------|--------------------------|-------------------|----------------|
| Dilutions | . ? | . ? | . ? |
| Nombre de colonies Par boîte | 245 214 Contaminée | 123 110 100 | 40 23 15 |

- Calculez le nombre de micro-organismes par millilitre ?

EXERCICE 2 :

-Calculez la flore présente dans l'échantillon de lait, selon les résultats du tableau suivant : (on donne le nombre de tubes positifs)

| DILUTIONS | 10^{-3} | 10^{-4} | 10^{-5} | 10^{-6} |
|------------------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| Flore indologène | 3 | 3 | 2 | 1 |
| Flore putride | 3 | 2 | 1 | 1 |

Tableau de Mc Crady :

| NPP | NC |
|-----|-----|
| 322 | 210 |
| 321 | 150 |
| 320 | 93 |

Par Mme ADDI N .

TD 7 : Control de qualité

Exposés sur les thèmes suivants (qui sont les méthodes de fractionnement) :

- La Sédimentation
- La dialyse
- Méthode de filtration
- Méthodes chromatographiques
- Méthodes électrophorétiques

DR. ADDIN.

Corrigés des TD

TD 4 :

- Pour les questions : les réponses sont sur le cours.

EX :

- L'échantillonnage : nous mettons 1ml de lait dans 9ml d'eau distillée stérile.
- les dilutions Trouvés sont :

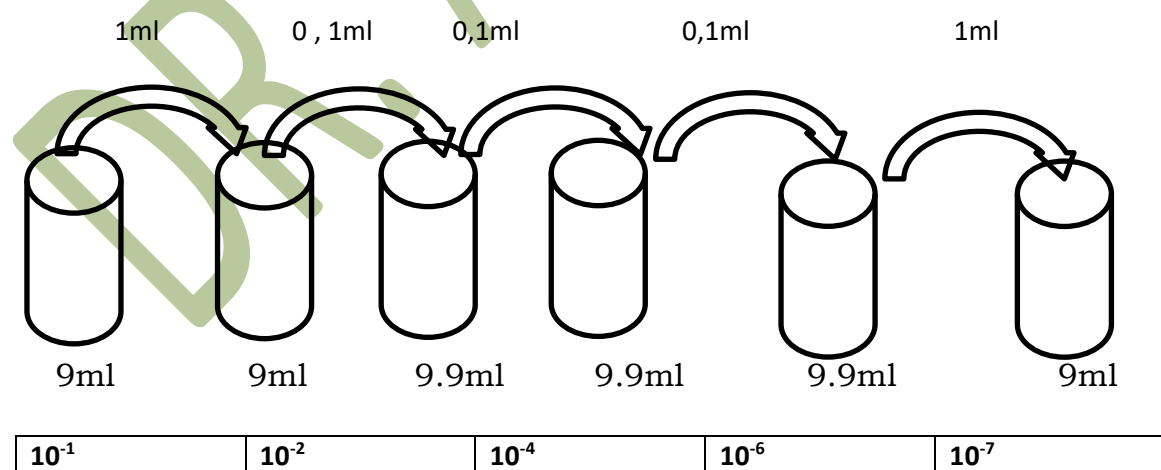
10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-5} , 10^{-6}

TD 5 :

Les rappels et les réponses des questions sont sur le cours.

EX1 :

Schéma pour les dilutions :



EX 2 :

Les dilutions sont : 10^{-4} , 10^{-6} , 10^{-8} , 10^{-10}

Nombre de micro-organismes par millilitre : 17×10^7 UFC/ml .

TD 6 :

EX1 :

1/ Les dilutions sont :

A : 10^{-2} ,

B : 10^{-4} ,

C : 10^{-5} ,

D : 10^{-6}

2/ Le nombre de micro-organismes par millilitre est :

$N = 1,1 \times 10^6$ UFC/ml.

EX 2 :

Le nombre de micro-organismes trouvé :

$N_{\text{flore indologène}} = 15 \times 10^6$ UFC/ml.

$N_{\text{flore putride}} = 21 \times 10^5$ UFC/ml.

TD 7 :

Les exposés par les étudiants pour les thèmes suivants:

- La Sédimentation
- La dialyse
- Méthode de filtration
- Méthodes chromatographiques
- Méthodes électrophorétiques.