



جامعة السلطان مولاي سليمان  
Université Sultan Moulay Slimane

Ecole Supérieure de  
Technologie de Fkih  
Ben Salah

# Microbiologie générale

Filière Industrie Agroalimentaire

Pr. HAMDALI Hanane



18/03/2020

1

# Plan

## I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1 - Prélèvements

#### a) Echantillonnage

- 1) Normes d'échantillonnage
- 2) Méthode d'échantillonnage
- 3) Choix des échantillons

#### b) Fréquence des prélèvements

#### c) Conditions du prélèvement

- 1) Prélèvement en surface
- 2) Prélèvement de produits liquides
- 3) Prélèvement de produits solides

### 2 - Traitement de l'échantillon

#### a) Transfert au laboratoire

#### b) Préparation de l'échantillon

#### c) Les techniques de broyages

### 3- Les voies de bio contamination et techniques d'asepsie

## III- Les milieux de culture

- Composition et classification
- Critères de choix des milieux de cultures
- Principes des réactions révélés par les milieux les plus utilisés
- Préparations et conservation

## IV-GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

## V- PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## Contamination des produits dans l'industrie alimentaire

- La contamination est le terme médical utilisé pour désigner l'envahissement d'un aliment par des micro-organismes pathogènes.



# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

- **Les causes de contamination sont divisées en 5 groupes:**
  - **1- Contamination liée au matériel , aux équipements.**



# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

- **Les causes de contamination sont divisées en 5 groupes:**

- **2- Contamination liée à la méthode.**

La méthode idéale permet :

- ✓ d'éviter les apports microbiens
- ✓ d'éviter la multiplication bactérienne
- ✓ D'éliminer la flore bactérienne existante



# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

- **Les causes de contamination sont divisées en 5 groupes:**
  - **3- Contamination liée à la matière.**





# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

- **Les causes de contamination sont divisées en 5 groupes:**
  - **4- Contamination liée au milieu.**



# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

- **Les causes de contamination sont divisées en 5 groupes:**

- **5- Contamination liée à la main d'œuvre.**

- ✦ Le personnel est le maillon faible de la maîtrise de l'hygiène :
- ✦ il contrôle les matières premières, il nettoie le matériel, il fait les méthodes...
- ✦ Il est la source majeure des germes donc le personnel en industrie agro-alimentaire doit respecter les bonnes pratiques d'hygiène et être en bonne santé.

16/03/2020





# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



La maîtrise de la **qualité microbiologique**



Hygiénique

Obligatoire

Marchande

Souhaitée

Fabricant

consommateur

La maîtrise de la **qualité microbiologique** passe par un ensemble de démarches qui vont du contrôle des matières premières brutes, en cours de transformation ou de l'aliment fini, aux pratiques de bonnes fabrications en passant par l'identification des principaux points critiques du système de production / distribution, le plus souvent par une démarche **HACCP**.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



Ces analyses microbiologiques prennent aujourd'hui largement place dans la plupart des usines et des réseaux de distribution et permettent:

- ✓ une bonne évaluation de la qualité et une mise en évidence d'éventuelles contaminations

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



L'analyse microbiologique traditionnelle des produits **finis** reste encore indispensable car elle permet avec une certaine inertie d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



Ce type de contrôle souvent pratiqué par des laboratoires officiels (Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes « DGCCRF », Laboratoires des Services Vétérinaires, etc.) n'est pas préventif et ne permet pas de maîtriser la qualité microbiologique des produits fabriqués.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



- **Le contrôle microbiologique de routine** d'un produit alimentaire solide ou liquide consiste le plus souvent, en absence d'information sur l'éventuelle implication de ce produit à une maladie infectieuse, une toxi-infection ou une intoxication, en :
  - un **contrôle de stérilité** pour des produits soumis à des traitements antimicrobiens de stabilisation (température, additifs, etc.)
  - une **estimation du nombre des contaminants** (flore aérobie mésophile totale, coliformes, anaérobies sulfito-réducteurs) ou leur détection - identification (*Salmonella*, *Listeria* etc).

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire



- Ce contrôle est actuellement long (plusieurs jours), ce qui implique souvent :
  - de stocker le produit en attendant la réponse (impossible pour les produits très périssables)
  - de diffuser le produit sans connaître sa qualité bactériologique avec tous les risques que cela comporte.



# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## Les risques au laboratoire de Microbiologie

Les risques liés à la manipulation de microorganismes, dont l'identité et le pouvoir pathogène sont souvent inconnus dans les premières étapes de leur analyse doivent être parfaitement maîtrisés par des pratiques et un environnement **sans défaut.**



Il faut que le microbiologiste soit toujours conscient des risques liés à la manipulation de bactéries et à un degré moindre de levures et moisissures, en particulier après leur amplification nécessaire à leur étude.

Rappelons qu'une colonie est constituée d'environ  $10^9$  à  $10^{10}$  cellules.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## Les risques au laboratoire de Microbiologie

- La maîtrise du risque microbiologique passe par la parfaite connaissance :
  - des germes manipulés ou recherchés
  - des voies de “pénétration” de ces germes dans l’organisme
  - des meilleures méthodes de manipulation pour minimiser ce risque.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## Les risques au laboratoire de Microbiologie

- Les microorganismes sont classés en 4 groupes en fonction des risques potentiels qu'ils représentent.

**Le groupe 1:** microorganismes **peu dangereux** pour le microbiologiste et son environnement.

**Le groupe 2:** germes faisant courir des **risques modérés** aux manipulateurs et des risques limités à la communauté.

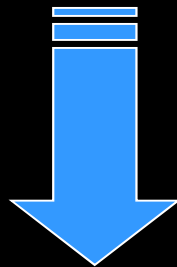
**Le groupe 3:** microorganismes à **haut risque** pour le manipulateur et à risque modéré pour la communauté.

**Le groupe 4:** microorganismes **très dangereux** pour le manipulateur et son environnement.

# I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## Les risques au laboratoire de Microbiologie

- Les voies de l'infection sont essentiellement :
  - **buccale** (ingestion) : pipetage, porté à la bouche des doigts ou d'objets contaminés comme des cigarettes, des stylos, des aliments etc. Ce type de contamination résulte d'un travail "aseptique" incorrect ou encore de projections, renversements ou actions diverses non contrôlés.
  - **aérienne** par des aérosols (particules liquides ou non en suspension dans l'air et porteuses de germes). Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques (homogénéisateur, centrifugeuse, etc.) et leur pouvoir de contamination est très grand.
  - par **contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou encore *Pseudomonas* par exemple) ou au niveau de muqueuses ou d'organes comme les yeux.
  - par **pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au niveau d'une plaie).



- Le laboratoire d'analyse microbiologique doit être à même de réaliser des analyses de routine (contrôle de qualité par rapport à une norme, évaluation de la qualité des matières premières), mais aussi de permettre l'évaluation de la qualité des opérations de transformation ou de préparation, la recherche et maîtrise des éventuels points critiques (HACCP), l'évaluation de l'efficacité des traitements antimicrobiens de conservation, d'emballage ou de nettoyage etc.
- Les microorganismes susceptibles d'être rencontrés appartiennent pour la plupart aux groupes 1, 2 et éventuellement 3.
- Ceci impose donc des règles fondamentales de conception et de fonctionnement du laboratoire d'analyse microbiologique.

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## A- Généralités

L'eau, les matières premières et bon nombre de denrées alimentaires ne sont pas, à quelques exceptions près comme le lait stérilisé, les conserves par exemple, des produits stériles.

La qualité marchande des produits dépend beaucoup du “contrôle “ de la flore présente par des moyens physiques (température, pH, activité de l'eau par exemple) ou chimiques (additifs à effets antimicrobiens) et par des règles de “bonne fabrication”.



# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## A- Généralités

- **Les spécifications microbiologiques** sont des critères applicables pendant et après la préparation afin de s'assurer que l'hygiène et les conditions de production sont satisfaisantes et en accord avec la réglementation.
- **Les normes** sont des spécifications microbiologiques adoptées par la législation qui s'adressent au produit fini et fixent les limites acceptables de présence de microorganismes donnés dans des produits bien définis.

Il existe actuellement de nombreux organismes nationaux ou internationaux (OMS, FAO, ISO, AFNOR, DGCCRF, services vétérinaires, etc.) qui se préoccupent de l'établissement de critères de qualité microbologique de nos aliments.

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### A- Généralités

- La **qualité hygiénique** dépend surtout de **la nature** mais aussi du **nombre de la flore microbienne** présente dans le produit.
- Si cette flore est composée de microorganismes susceptibles d'engendrer des maladies après consommation (maladies infectieuses, toxi-infections, intoxications) le produit est dangereux et ne doit en aucun cas être commercialisé.
- Il appartient alors au microbiologiste **de détecter le ou les points critiques** affectant cette qualité hygiénique pour laquelle **la norme zéro défaut** doit être un objectif prioritaire de l'ensemble du système de production.

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## A- Généralités

### Les microbes recherchés en alimentaire

Au laboratoire, on recherche **4 types** de germes qui sont cultivés dans des boîtes de pétri et identifiés par des techniques de colorimétrie.

#### 1- Microorganismes capables d'altérer la qualité marchande de l'aliment (La Flore totale ou Microorganismes Aérobie à 30°C)

Ils renseignent sur:

- La propreté des manipulations
- Les conditions de conservation
- La fraîcheur du produit
- L'efficacité des procédés de traitement

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## A- Généralités

### 2- Les indicateurs technologiques (Les Coliformes à 30°C)

Ce sont des entérobactéries, c-à-d qu'elles vivent dans les intestins des animaux et de l'homme.

On retrouve également dans le milieu extérieur (eau, sol, végétaux, poils, plumes).

Ils renseignent sur:

- La propreté des manipulations
- L'efficacité des procédés de traitement (Pasteurisation)
- La propreté des locaux et du matériel

Sensibles à la chaleur, leur présence dans les aliments cuits indique une contamination après traitement thermique.

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## A- Généralités

### 3- Les bactéries témoins de contamination fécale (Les coliformes thermo tolérants à 44°C)

Ils sont d'origine fécale, humaine ou animale, et témoignent d'un non respect des règles d'hygiène (Indicateurs d'hygiène).

Ils renseignent sur:

- L'hygiène du personnel (mains sales)
- La propreté des locaux et du matériel

Leur présence implique le risque que des bactéries pathogènes, qui partagent le même environnement, soient également présentes dans l'aliment (=Salmonelles)

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### A- Généralités

4- Les germes potentiellement pathogènes: Responsables de TIAC (Toxi-infection Alimentaire Collective) pouvant entraîner la mort.

Les *Staphylocoques Aureus*

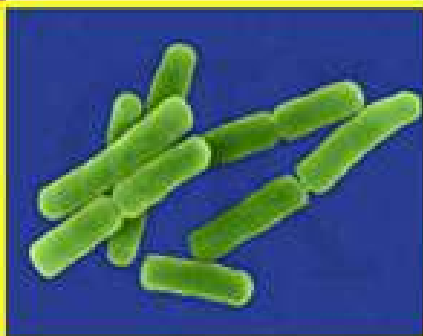
Les *Clostridium perfringens*

Les *Salmonelles*

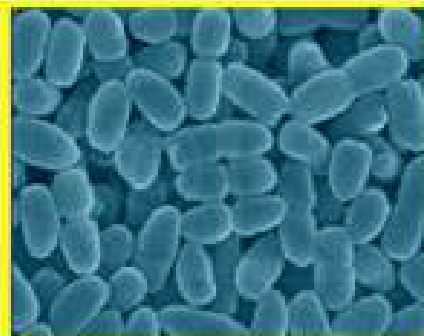
Les *Listéria monocytogenes*



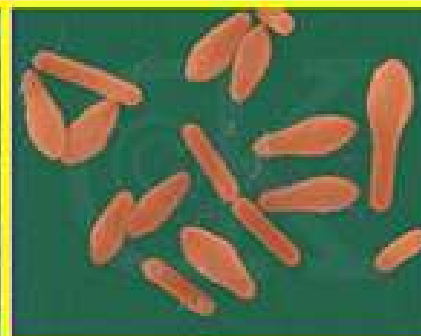
*Bacillus*



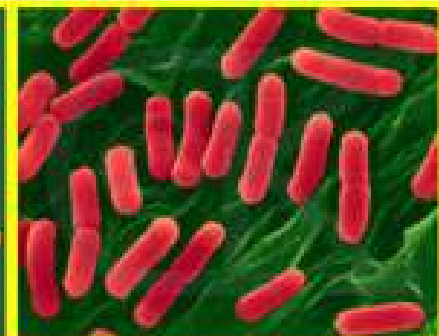
*Bordetella*



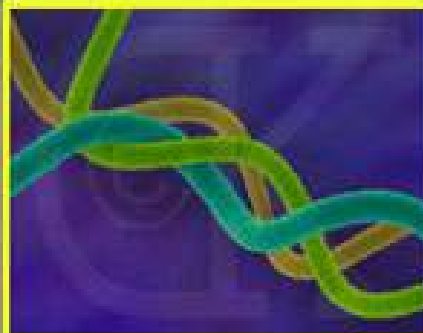
*Clostridium*



*Escherichia*



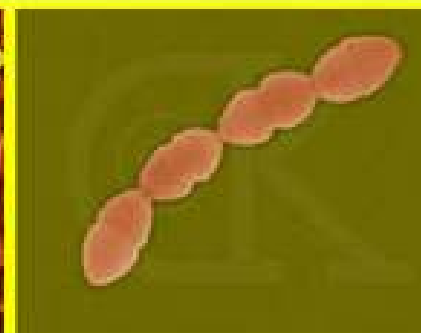
*Spirulina*



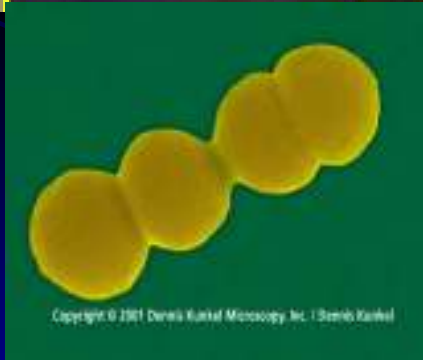
*Staphylococcus*



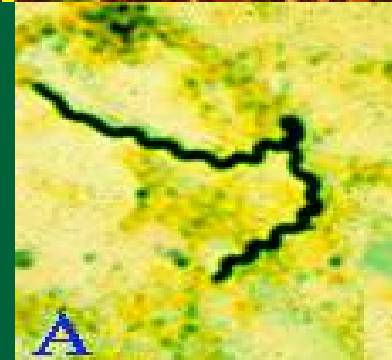
*Streptococcus*



*Salmonella*



*Streptococcus*



*Treponema*



*Vibrio cholerae*

16/03/2020

**Figure : Exemples de formes de microorganismes couramment rencontrées dans la nature**

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

Très schématiquement, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de **5 unités** (lieu de fabrication ou de distribution), de 5 unités pour les conserves.

Le laboratoire doit disposer d'environ **500 g de produits**, soit **5 fois 100 g**, ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces.

Si le prélèvement de 5 échantillons s'avère trop élevé par rapport à la production, il est procédé à un étalement dans le temps des prélèvements.

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

Ces prélèvements doivent avant tout respecter des règles d'**aseptie** et de **représentativité**.

La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre **aux parties superficielles et profondes** notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés par exemple.

<sup>2</sup>Pour **les produits liquides**, elle est effectuée sur le produit "homogénéisé" ou sur les parties superficielles et profondes.

**Dans le cas d'examens microbiologiques faisant suite à une maladie de type TIA**, il faut rechercher **les germes dangereux (pathogènes, toxinogènes)** et leurs toxines aussi bien dans les prélèvements de surface que dans la masse.

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

### a- Echantillonnage

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

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

### a- Echantillonnage

- Un échantillonnage représentatif est essentiel quand l'analyse a pour but de détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines qui peuvent être distribués de façon hétérogènes dans l'aliment ou quand la commercialisation d'un produit dépend de la qualité microbiologique en relation avec les normes imposées par la législation.



- Une nouvelle norme ISO pour renforcer la sécurité sanitaire des aliments (**ISO 2007-09-12**)

Des accidents récents en matière de sécurité des aliments, les conséquences importantes sur la santé et les retraits du marché de certains produits alimentaires assignent les pays à renforcer leurs systèmes de sécurité sanitaire et à se montrer plus vigilants à l'égard des producteurs de denrées alimentaires et de ceux qui en font le commerce.

- L'objet de la Norme internationale **ISO 7218:2007**, **Microbiologie des aliments – Exigences générales et recommandations**, est d'aider à garantir la fiabilité des analyses microbiologiques des aliments, à s'assurer que les méthodes générales utilisées pour effectuer ces examens sont au minimum les mêmes dans tous les laboratoires, à participer ainsi à l'obtention de résultats homogènes dans les différents laboratoires et à contribuer à la sécurité du personnel de laboratoire, en prévenant les risques d'infection.



# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

### a- Echantillonnage

1) *Méthode d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF  
(International Commission on Microbiological Specifications for  
Foods)*

- La Commission Internationale des Normes Microbiologiques relatives aux denrées alimentaires a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires.
- Le principe de base est le suivant : **un échantillon analysé donne des résultats non satisfaisants s'il renferme des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle il devient potentiellement dangereux.**

# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 1- Prélèvements

### a- Echantillonnage

#### 1) *Méthode d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods)*

- Dans cette méthode le symbole **m** représente la limite permettant de répartir les échantillons en 2 groupes: **les acceptables** (valeur **m**) et **les inacceptables** (valeur **M**). Pour certains microorganismes dangereux **m** peut être égal à 0.
- Quand un microorganisme donné est toléré dans un aliment 3 catégories d'échantillons sont définies:
  - catégorie 1 (acceptables sans réserve)
  - catégorie 2 (acceptables mais avec une limite)
  - catégorie 3 (inacceptables).

**m** sépare la 1ère et la 2ème catégories et **M** la 2ème et la 3ème (figure 1).

**1) Méthode d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF  
(Internation Commission on Microbiological Specifications for Foods)**

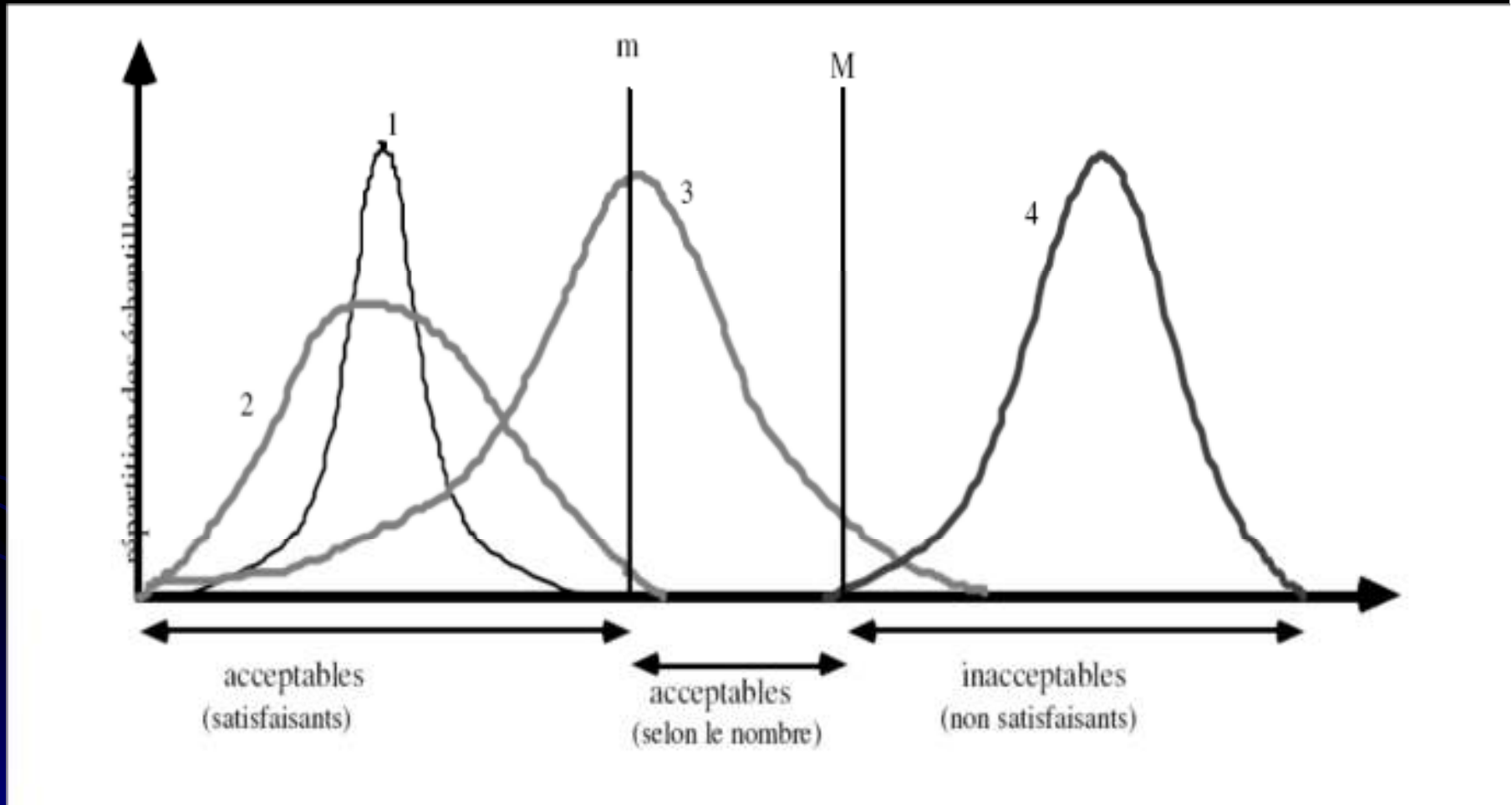


Figure 1: Distribution des échantillons d'après l'ICMSF

## Analyse microbiologique des aliments

### Plan à trois classes



Contrairement au plan a deux classes , le plan a trois classes permet de faire des nuances. La norme en vigueur est défini (ici la lettre m).

- si les résultats de vos test sont  $< m$  , le produit est dit **satisfaisant**.
- si les résultats de vos test **sont compris entre m et M'** le produit est dit **acceptable**
- si les résultats de vos test sont  $> M'$  le produit est dit **non satisfaisant**
- si les résultats de vos test sont  $> M''$  le produit est dit **corrompus**

### 3) Méthode d'échantillonnage pour rechercher un nombre peu élevé de micro-organismes

- On peut déterminer le nombre d'échantillons à analyser dans un lot en fonction du degré de sûreté recherché

$$n = \frac{\log ( 1 - p )}{\log ( 1 - d )}$$

- p est la probabilité de déceler le micro-organisme (en général p = 0,95)
- d est le pourcentage de défauts admis pour le lot entier (souvent inférieur à 0,05).
- On peut également réaliser un échantillonnage satisfaisant au point de vue statistique avec  $n = N$  dans laquelle n est le nombre d'échantillon à analyser et N le nombre total de divisions du produit à analyser.

Cependant cette méthode conduit souvent à un nombre trop élevé d'analyses, en particulier quand n est supérieur à 10.

## 4) Choix des échantillons

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

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1- Prélèvements

#### b. fréquence des prélèvements

L'échantillonnage doit être réparti dans le temps, et ce, en fonction du niveau de production et des risques de contamination.



## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1- Prélèvements

#### c. Conditions du prélèvement



- 1- le respect des règles d'asepsie et la non modification des flores présentes dans le produit.
- 2- les échantillons du produit à analyser doivent être amenés au laboratoire dans leur conditionnement d'origine, ce qui évite certaines contaminations.
- 3- Si le produit se présente sous forme de grands volumes (réservoirs à lait etc...) s'assurer de la bonne homogénéité de la répartition des micro-organismes ; une partie représentative du produit sera prélevée stérilement. Il est parfois nécessaire de réaliser des prélèvements à divers niveaux de l'aliment (surface, profondeur d'un aliment solide) ou après broyage et homogénéisation.





## c. Conditions du prélèvement

4- Certains instruments doivent être stérilisés sur les lieux du prélèvement.



Bec Bunsen mobile



Autoclave

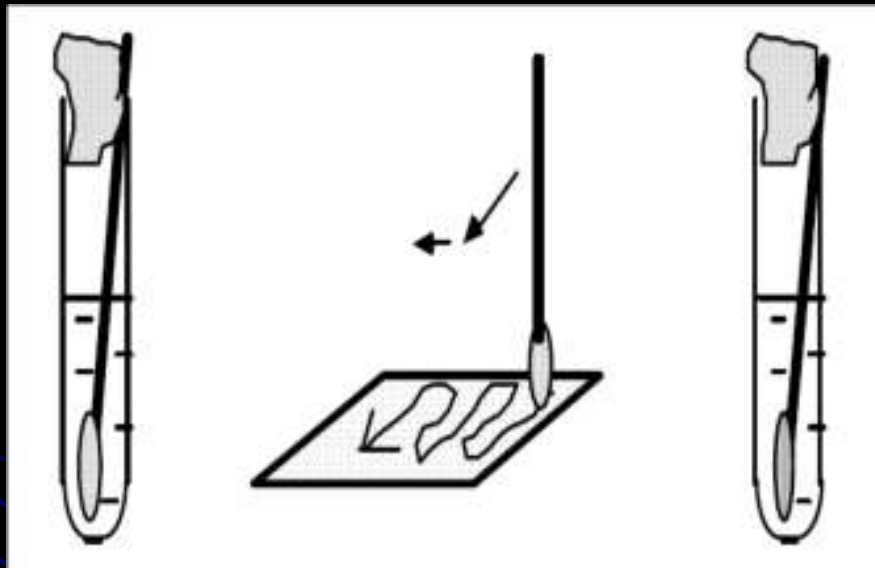


Produit stérilisant

## c. Conditions du prélèvement

### 1- *Prélèvement en surface*

#### 1.1- Ecouvillonnage



Un écouvillon de coton hydrophile est immergé dans une solution stérile de bouillon tryptone-sel additionné de Tween (0,5°/°°).

Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface du produit ; l'écouvillon est alors immergé dans 10 ml de bouillon tryptone-sel.

16/03/2020

L'analyse est réalisée à partir de la suspension ainsi obtenue.

## c. Conditions du prélèvement

### 1- Prélèvement en surface

#### 1.2- Rinçage:

cette méthode est utilisée dans le cas de récipients ou de tuyauteries; un volume connu de solution stérile est introduit dans le matériel à analyser.

Après agitation, le liquide est récupéré et soumis à l'analyse.



## c. Conditions du prélèvement

### 1- *Prélèvement en surface*

#### 1.3- Méthode des empreintes :

un ruban adhésif préalablement stérilisé par les UV est appliqué sur la surface à étudier. Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies.



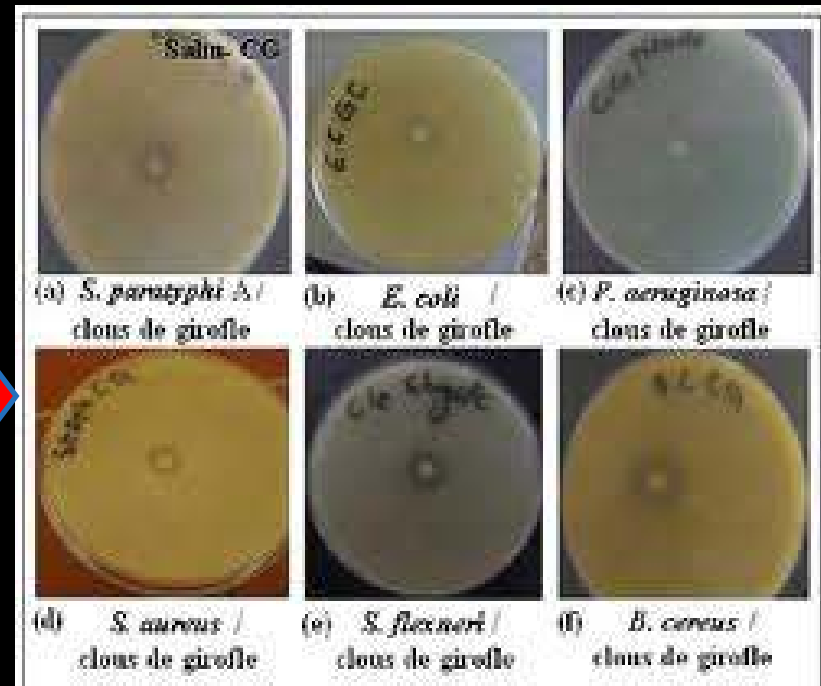
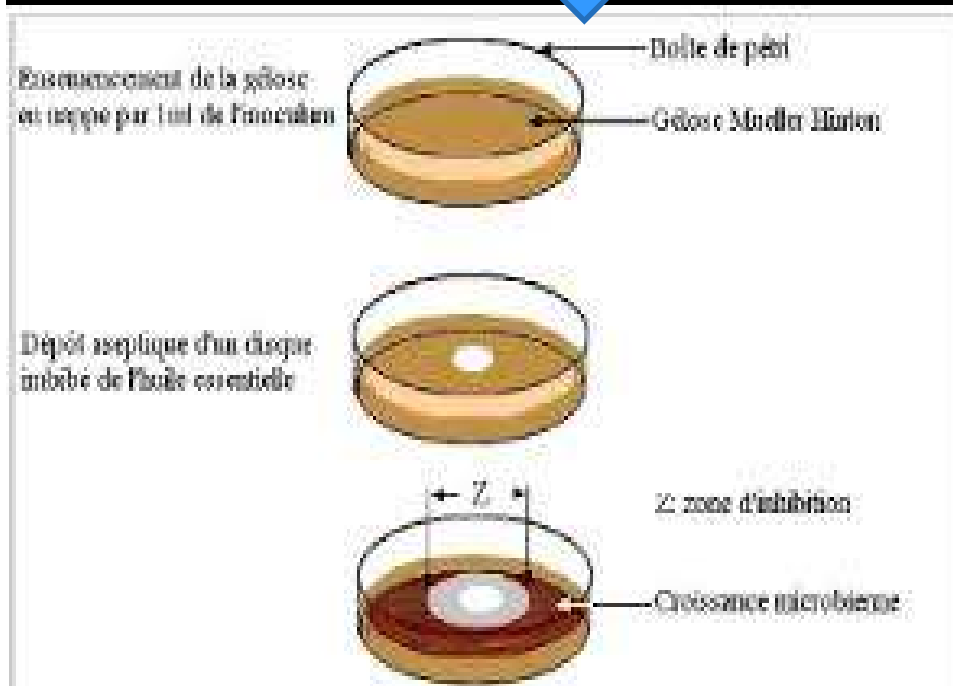
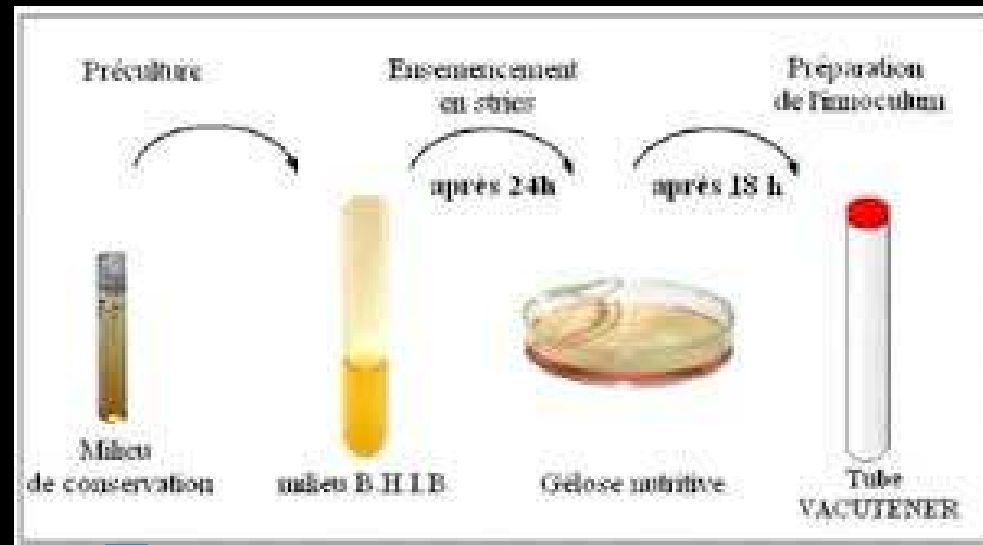
## c. Conditions du prélèvement

### 1- *Prélèvement en surface*

#### 1.4- Méthode du cylindre :

un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé.

# 1.4- Méthode du cylindre :





## c. Conditions du prélèvement

### 2- Prélèvement de produits liquides

La technique varie avec le produit, le volume et la forme du contenant.

Il faut toujours s'assurer de la parfaite homogénéisation du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette (ou avec un flacon lesté stérile ou autre) le volume nécessaire à l'analyse.



16/03/2020



47

## c. Conditions du prélèvement

### 2- Prélèvement de produits solides

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

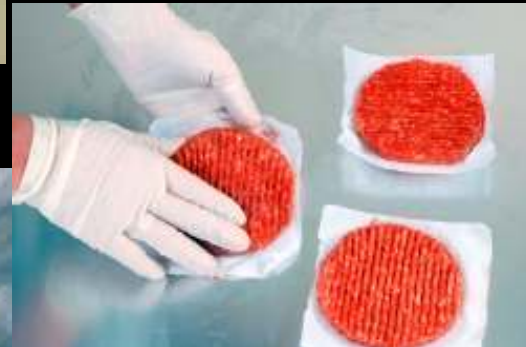




# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 2- Traitement de l'échantillon

### a. Transfert de l'échantillon au laboratoire



# II - Prélèvement et préparation des échantillons

## 2- Traitement de l'échantillon

### a. Transfert de l'échantillon au laboratoire

- Quand le prélèvement aseptique a été réalisé, il faut **identifier immédiatement le produit avec une étiquette** ou **une référence**.
- Noter la **température initiale**, **l'heure du prélèvement**, **la date** et **la température de transport**. Amener alors les échantillons le plus rapidement possible au laboratoire en maintenant les conditions initiales dans lesquelles se trouvait le produit.



## a. Transfert de l'échantillon au laboratoire

- L'analyse devrait être réalisée dans l'heure qui suit le prélèvement. Dès réception au laboratoire l'échantillon accompagné de sa **fiche signalétique** est enregistré (nature, date, heure, provenance du prélèvement, nom du préleveur, analyses demandées, autres indications utiles).



## a. Transfert de l'échantillon au laboratoire

- Si l'échantillon doit être transporté il faut réduire au maximum le délai avant l'analyse. Il est souvent nécessaire de réfrigérer (mais non congeler) le produit au cours de son transport; certains germes fragiles peuvent disparaître au cours de cette réfrigération.
- Si **un produit est déshydraté** ou en **conserves** il ne doit pas être réfrigéré.
- Pour un produit congelé s'assurer qu'il n'y ait pas de décongélation pendant le transport (ce produit peut être gardé pendant **1 mois avant d'être analysé**).

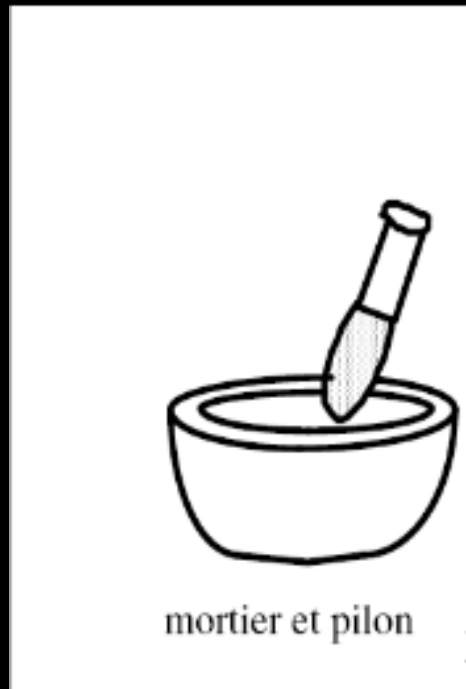
## b. Préparation de l'échantillon & Techniques de broyage

- Les échantillons sont amenés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits finis ou dans des flacons ou récipients stériles s'il s'agit de produits en vrac ou de "prélèvements".
- Quelle que soit la nature initiale du produit, l'analyse microbiologique s'effectue toujours à partir d'une suspension. Après ouverture aseptique, l'échantillon sera "homogénéisé" (liquide) ou broyé dans un volume connu de diluant stérile (solide) ce qui constitue en fait la première dilution.
- Pour les **produits liquides** (ou semi-liquides) une agitation manuelle vigoureuse en présence de billes de verre permet d'obtenir une homogénéité satisfaisante.

## b. Préparation de l'échantillon & Techniques de broyage

- Pour les **produits solides** diverses **techniques de "broyage"** sont utilisables :

1) broyage manuel au Potter ou en en présence de sable stérile ou de billes de verre (mortier)



## b. Préparation de l'échantillon & Techniques de broyage

### 2) broyage mécanique

#### - avec un broyeur électrique à couteaux de type VIRTIS .

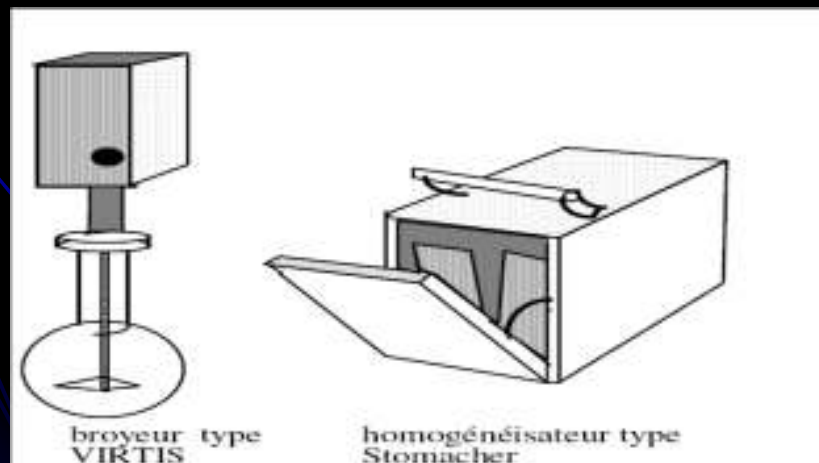
ça permet la dispersion des germes; la température ne doit pas trop s'élever (le récipient peut être placé dans de la glace).

Le broyage s'effectue en général avec 10 volumes (ou 9) de diluant pour 1 "volume" de produit (par exemple 10 g de produit et 100 ml (ou 90) de diluant stérile).

Le diluant peut être de l'eau distillée, de l'eau physiologique, ou une solution tryptone-sel , etc. .

#### - avec un broyeur du type STOMACHER.

Cet appareil permet de disperser dans des conditions relativement douces l'aliment dans le diluant. Le Stomacher (digesteur) utilise des sacs plastiques stériles à usage unique. La prise d'essai est le plus souvent de 10 g (ou 25) d'aliment et de 90 ml (ou 250) de diluant.





## Broyage:

la mise en suspension homogène des microorganismes présents sur ou dans le produit analysé

## Centrifugation:

atteignant 3 à 4000 g permet de décanter les microorganismes présents dans les liquides.



Un très grand nombre *matériels à usage unique*

Un enseigneur spiral et un compteur de colonies laser.

Pour faciliter la numération des colonies dans les boîtes de Pétri il est possible d'utiliser un système du type *stylo-compteur*.

Un enseigneur spiral

compteur de colonies laser





## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 3- Les voies de bio contamination et techniques d'asepsie

#### 3.1. Les voies de bio-contamination :

- **buccale** (ingestion) : pipetage, porté à la bouche des doigts ou d'objets contaminés comme des stylos, des aliments etc.

Ce type de contamination résulte d'un travail "aseptique" incorrect ou actions diverses non contrôlés.

- **aérienne** par des aérosols (particules liquides ou non en suspension dans l'air et porteuses de germes).

Ces aérosols peuvent être générés par des opérations classiques (homogénéisateur, centrifugeuse, etc.)

- **par contact cutané** (*Brucella*, *Staphylococcus* ou encore *Pseudomonas* par exemple) ou au niveau de muqueuses ou d'organes comme les yeux.

**par pénétration sous-cutanée** accidentelle (par piqûre ou au <sup>57</sup> niveau d'une plaie).

## 3.2. Techniques d'asepsie

- **Systemes de stérilisation / désinfection et zones stériles:**
- 1) L'**autoclave** vertical ou horizontal pour la stérilisation en milieu vapeur des milieux, des "déchets" est indispensable. La « stérilisation » est généralement réalisée à 115 ou 120 °C pendant 10 à 30 minutes.



## 3.2. Techniques d'asepsie

- 2) **Le four Pasteur** permet la stérilisation à sec du matériel en verre ou en métal et doit pouvoir atteindre une température de 170 - 180°C.



- 3) **Les système de micro ou ultra filtration à membrane** sont utilisés pour les milieux de culture liquides non autoclavables et pour l'analyse des liquides (eau par exemple).



## 3.2. Techniques d'asepsie

- 4) Les **lampes UV** germicides munies d'une minuterie et installées dans la pièce principale de manipulation ainsi que dans les hottes à flux laminaires. Elles sont efficaces sur les « zones éclairées ».



- 5) Les récipients contenant par exemple de l'hypochlorite de **sodium** pour recueillir les matériels souillés tels que lames états frais, les pipettes, les cônes à usage unique etc.



## 3.2. Techniques d'asepsie

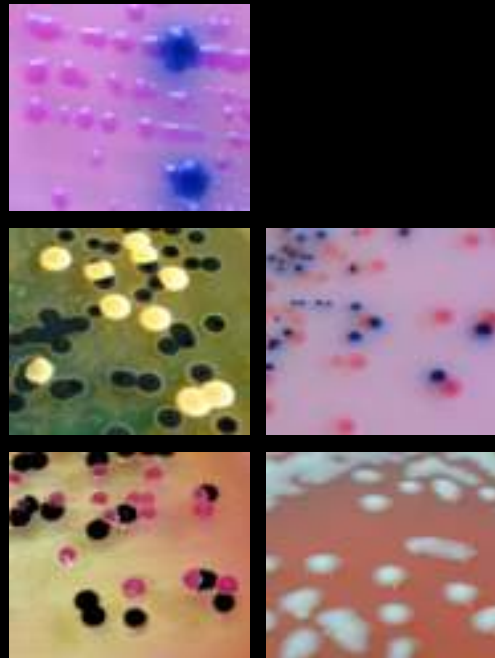
6) **Les zones de travail** sont situées dans la zone de protection de *becs Bunsen* avec déclenchement par bouton "à pied" et/ou dans des *hottes à flux laminaire* qui selon leur fonctionnement "protègent" avec efficacité soit le produit, soit l'opérateur, soit les deux.



### III- Les milieux de culture

- Composition et classification
- Critères de choix des milieux de cultures
- Principes des réactions révélés par les milieux les plus utilisés
- Préparations et conservation

# III- Les milieux de culture



# III- Les milieux de culture

## *Caractéristiques des milieux de culture*

### Composition

- Les milieux de culture doivent pour permettre le développement des micro-organismes réunir certaines qualités. Ils doivent, en particulier:
  - contenir en quantité suffisante tous les aliments et l'eau exigés par leur croissance et leur entretien et respecter leur besoin en oxygène.
  - être ajusté à un pH précis;
  - être porté à la température optimale de croissance.



# III- Les milieux de culture

- Préparation nutritive destinée à la croissance de microorganismes en laboratoire
- Peuvent être liquides ou solides

# III- Les milieux de culture

## Milieux synthétiques

- Milieu qui doit fournir une source d'énergie et des éléments tels que le carbone, l'azote, le soufre, le phosphore et des facteurs de croissance.
- La composition chimique de ce milieu est connue.

# III- Les milieux de culture

## Milieux complexes

- Aussi appelés milieux empiriques.
- Contiennent des ingrédients dont la composition chimique est indéterminée.

# III- Les milieux de culture

- Suivant l'utilisation envisagée, on choisira des milieux de culture liquides ou solides .

## a) Les milieux liquides

Ils permettent une culture plus facile et plus rapide mais les bactéries s'y trouvent dispersées; si des espèces bactériennes différentes sont en présence, leur séparation n'est pas possible.

# III- Les milieux de culture

- b) Les milieux solides

- Ils permettent la séparation des espèces bactériennes: chaque microbe fixé à la surface du milieu donne naissance en peu de temps à une descendance de plusieurs milliards d'individus constituant un amas visible à l'œil nu ou colonie.

La forme, la dimension, la couleur d'une colonie sont caractéristiques de l'espèce bactérienne qui la constitue: la différenciation des espèces bactériennes est donc possible sur ces milieux.

# III- Les milieux de culture

## b) Les milieux solides

- Milieu liquide auquel on ajoute un agent de solidification tel que l'agar-agar
- L'agar-agar est un polysaccharide extrait d'une algue marine.
- C'est un gel qui est à l'état solide à une T° de moins de 60°C et qui se liquéfie à 100°C.
- Permet donc l'incubation à des T° élevées.
- N'est pas une source nutritive pour les bactéries
- Permet d'obtenir des colonies isolées

# III- Les milieux de culture

## Classification des milieux en fonction de leur utilisation

- On peut classer les milieux en 4 catégories:
- 1- milieux usuels dits de base;
- 2- milieux d'isolement;
- 3- milieux d'identification
- 4- milieux de conservation.

# III- Les milieux de culture

## Classification des milieux en fonction de leur utilisation

### 1- Milieux usuels dits de base

- Ces milieux permettent la culture d'une variété de bactéries aussi grande que possible, mais il n'existe pas de milieu universel.

Les milieux les plus utilisés sont le bouillon nutritif et la gélose nutritive (bouillon additionné de gélose à raison de 20 g environ par litre).



# III- Les milieux de culture

## Classification des milieux en fonction de leur utilisation

### 2- Milieux d'isolement

- Ces milieux, qui permettent d'obtenir les bactéries contenues dans un produit naturel à l'état de culture pure, peuvent être:

**A- Les milieux de base usuels** (précédemment cités.)

**B- Les milieux d'enrichissements** par de produits biologiques: ex: sang, ... Ces milieux enrichis facilitent l'isolement des bactéries fragiles et exigeantes.

**C- Les milieux sélectifs** qui favorisent la culture d'une espèce ou d'un groupe d'espèces bactériennes alors que la croissance des autres bactéries est difficile, entravée, ou nulle.

**D- Les milieux différentiels** qui permet le distinction entre la bactérie recherché et les autres bactéries dans le même milieu.

## B- Milieux d'enrichissement

- Milieu **liquide**
- Donne des conditions favorables à la croissance d'un seul microbe donné ce qui en favorise la multiplication

Ex : milieu sélénite utilisé dans les spécimens de selles pour favoriser la croissance des salmonelles et des shigelles au détriment des autres bactéries présentes.

## C- Milieu sélectif

- Inhibe la croissance des bactéries indésirables et stimule celle des microbes recherchés
- Contiennent des agents inhibiteurs ( Ab, sel, colorant)

Ex : cristal violet et sels biliaires dans la gélose

MacConkey

# Milieux spécialisés dans l'isolement des bactéries

## Milieu gélosé de MACCONKEY

- Milieu sélectif pour l'isolement des bacilles Gram-Salmonella et Shigella ainsi que des bactéries coliformes dans les eaux, les produits alimentaires, les produits pharmaceutiques et biologiques .

- **Mode opératoire:**

Isolement par la méthode des cadrans. Incuber 18 à 24 h à 37 °C.

Ce milieu contient deux inhibiteurs de la flore Gram+ :

- les sels biliaires
- le cristal violet

- **Résultat:**

- colonies rouges entourées d'un halo opaque de la même couleur dû à la précipitation des sels biliaires: **lactose+**

- colonies jaunes ou incolores : **lactose-**



## Milieux spécialisés dans l'isolement des bactéries

### Milieu gélosé de CHAPMAN

Le milieu de Chapman est un milieu sélectif, surtout utilisé en microbiologie médicale, **permettant la croissance des germes halophiles.**

#### Mode opératoire:

L'ensemencement doit être massif, en stries serrées ou par inondation

#### Résultat:

Les colonies **mannitol +** sont entourées d'une **auréole jaune.**



*Staphylococcus aureus*

## D- Milieu différentiel



- Facilite la distinction entre les colonies de la bactérie recherchée et les autres colonies présentes sur le même milieu.

# III- Les milieux de culture

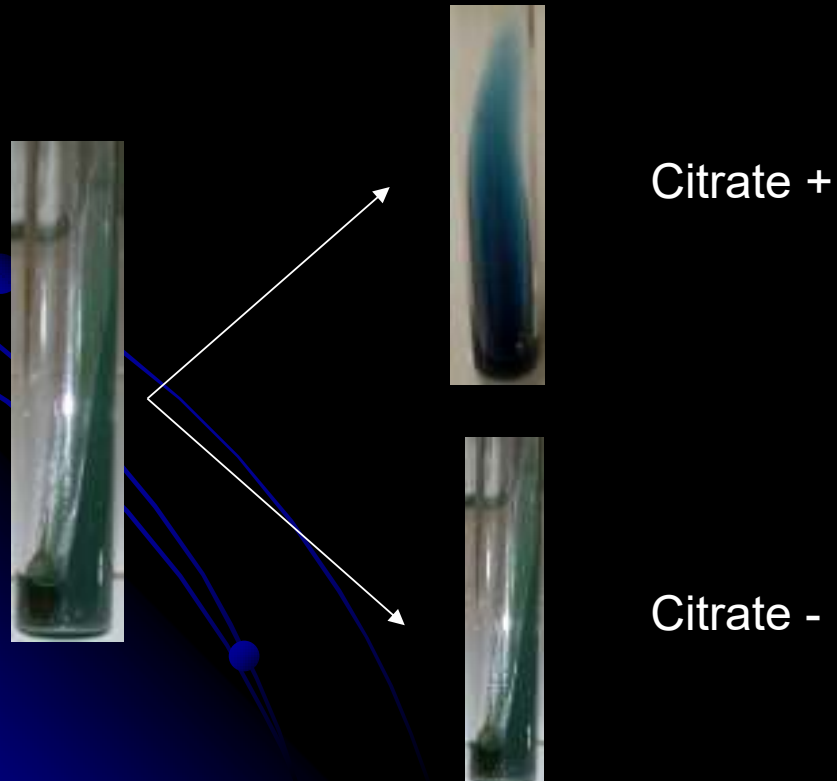
## Classification des milieux en fonction de leur utilisation

### 3- Milieux d'identification

- L'identification des bactéries est surtout basée sur l'étude de leurs propriétés biochimiques. Cette étude est rendue possible par la culture de la souche bactérienne sur un grand nombre de tubes de milieux spéciaux. On observe la modification des milieux soit directement, soit grâce à des indicateurs chimiques, puis on rassemble tous les renseignements obtenus sous forme d'une fiche signalétique qui permet d'établir l'identité de la bactérie.

### 3- Milieux d'identification

- **Milieu au citrate de Simmons**
- Mode opératoire
- La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.





# III- Les milieux de culture

## Classification des milieux en fonction de leur utilisation

### 4- Milieux de conservation

Milieux pauvres qui maintiennent les bactéries dans un état de vie ralentie. .

# III- Les milieux de culture

## Critères de choix des milieux de cultures

- La microbiologie dépend en grande partie de la croissance et du maintien des MO en laboratoire; ceci n'est possible que si des milieux de culture adéquats sont disponibles.
- Un milieu de culture est une préparation solide ou liquide, utilisée pour faire croître, pour transporter et conserver des MO.
- Un bon milieu doit contenir tous les nutriments dont le MO a besoin pour se développer.
- Il faut des milieux spéciaux pour l'isolement, l'identification et la mesure de la sensibilité des MO aux antibiotiques, pour les analyses d'eau et de nourriture, pour la microbiologie industrielles et d'autres activités.

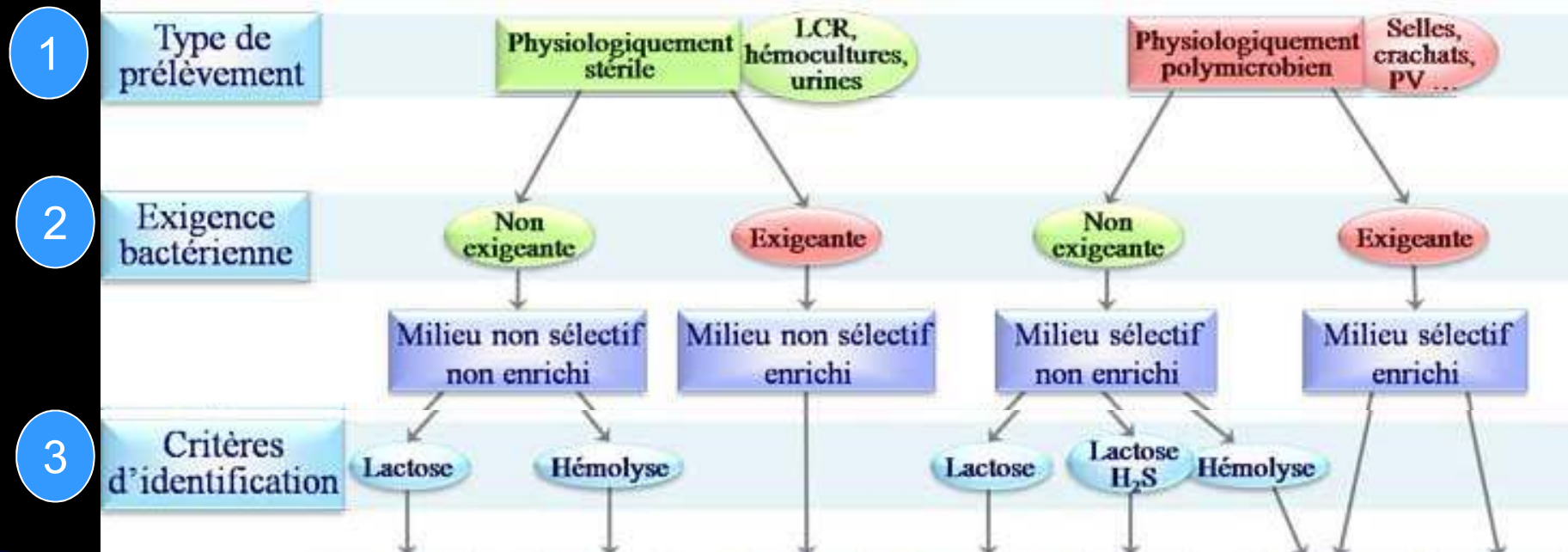
## Critères de choix des milieux de cultures

La composition précise d'un bon milieu de culture dépend de l'espèce à cultiver, car les besoins en éléments nutritifs sont très spécifiques

La connaissance de l'habitat normal d'un MO est très utile dans La sélection d'un milieu de culture approprié, les besoins nutritifs Reflétant les besoins naturels.

La fonction du milieu déterminera sa composition dans le cas de La recherche sélective de certains MO spécifiques ou pour l'identification d'une espèce particulière.

# Choix d'un milieu de culture



Détermination de l'espèce recherchée



# Principes des réactions révélées par les milieux de culture les plus utilisés en Microbiologie alimentaire



# Milieus spécialisés dans l'identification des bactéries

- **Rappels des activités métaboliques**

Les activités métaboliques couramment étudiées pour l'identification des bactéries chimioorganotrophes sont:

## 1.1- Le métabolisme énergétique:

### 1.1.1- Le besoin en oxygène:

Chez les bactéries	L'oxygène est
- Aérobie strictes	Utilisé, indispensable, non toxique
- Aéroanaérobies Anaérobies facultatives	Utilisé, non indispensable, non toxique
Anaérobies aérotolérantes	Non utilisé, non toxique
- Anaérobies strictes	Non utilisé, toxique

# Milieux d'identification

- **Gélose viande-foie (V.F)**

But: Pour l'étude du besoin en O<sub>2</sub> (ce milieu ne contient pas de nitrate)

Mode opératoire:

La gélose V.F est un milieu semi-solide, en tube de Prévot. Avant d'êtreensemencé, le milieu doit être régénéré par séjour d'une demi-heure au bain-Marie bouillant.

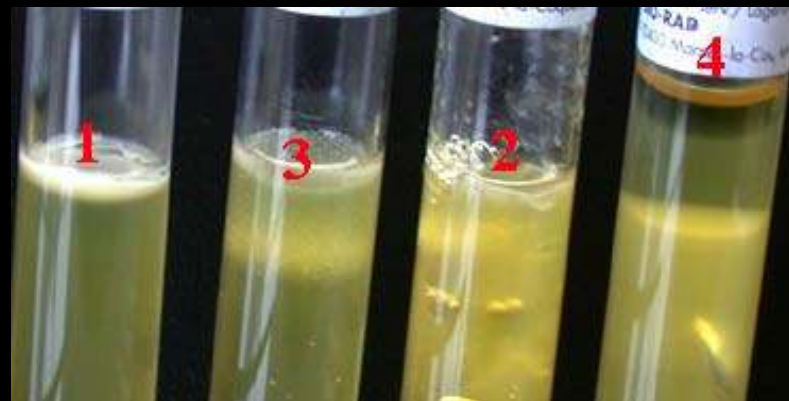
Refroidir à 45°C

Ensemencer à la pipette boutonnée à partir de la culture en bouillon.

L'introduire jusqu'au fond du tube puis remonter en décrivant des tours de spire très serrés.

Refroidir à l'eau courante.

Résultats:



### 1.1.2- La voie d'attaque du Glucose

Chez les bactéries **chimioorganotrophes**, le Glucose est le substrat principal du métabolisme énergétique.

Ce métabolisme est dit oxydatif lorsqu'il nécessite la présence d'O<sub>2</sub> moléculaire: le catabolisme complet du glucose produit du CO<sub>2</sub> et de l'eau.

Le métabolisme est fermentatif lorsqu'il ne nécessite pas l' O<sub>2</sub> : les produits finaux du catabolisme du glucose sont de petites molécules organiques, habituellement des acides organiques.

**NB:** Certaines bactéries sont à la fois oxydatives et fermentatives. D'autres ne sont ni oxydatives ni fermentatives.



# Milieux d'identification

- **Milieu de Hugh et Leifson**

But: l'étude de la voie d'attaque du Glucose

Mode opératoire:

C'est un milieu semi- solide en tube

Faire fondre deux tubes de milieux au bain- Marie bouillant.

Refroidir à 45°– 50°C

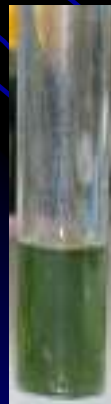
Ajouter aseptiquement quelques gouttes d'une solution stérile concentrée de glucose de façon à obtenir une concentration finale de 1%.

Agiter et solidifier en plongeant le tube dans l'eau froide.

Ensemencer par piqûre centrale à partir de la culture en bouillon.

Recouvrir un tube seulement d'une couche d'huile de paraffine stérile de 1cm d'épaisseur.

Résultats:



= souche fermentative



= souche oxydative



= souche inactive

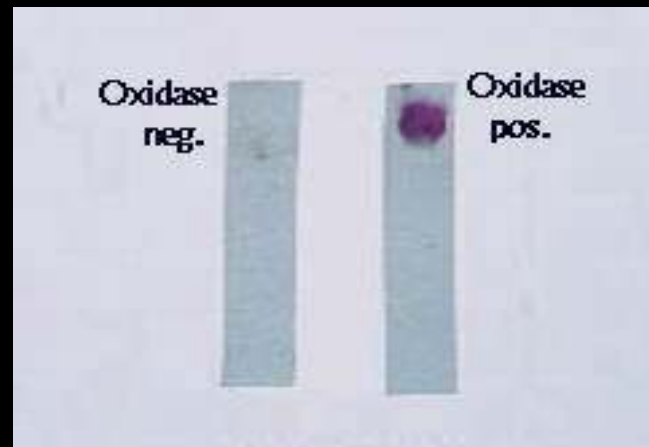
### 1.1.3- Les enzymes respiratoires:

Chez les chimiotrophes, le métabolisme énergétique peut être vu comme une chaîne d'oxydoréductions alimentée par un donneur initial et un accepteur final d' $H_2$  et d' $e^-$ .

→ **Présence de l'oxydase (oxydase +)**

La respiration aérobie utilise l' $O_2$  comme accepteur final d' $e^-$ : Chez certaines bactéries oxydatives les  $e^-$  passent par une cytochrome oxydase avant d'être transférés à l' $O_2$ .

- But : mettre en évidence la cytochrome oxydase
- Principe: Le réactif **TÉTRAMETHYL-P-PHENYLENEDIAMINE DIHYDROCHLORURE** 1% est de couleur pourpre lorsque oxydé
- Technique: Sur papier filtre déposer le réactif et les bactéries
- Résultat:
  - Positif : bleu-pourpre



### 1.1.3- Les enzymes respiratoires:

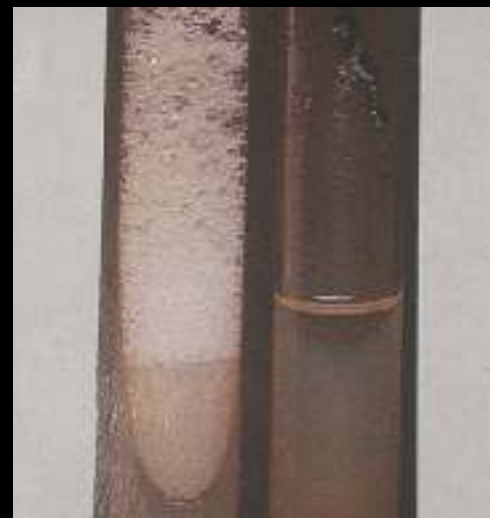
#### → Présence de la catalase (catalase +)

En présence d'O<sub>2</sub>, il se forme dans le cytoplasme bactérien des produits toxiques qui doivent être détruits par des enzymes cellulaires. La présence d'une catalase permet la destruction de l'eau oxygénée formée:



But : mettre en évidence la catalase

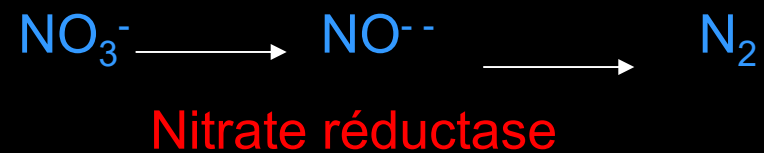
- Principe: Le réactif **PEROXYDE D'HYDROGÈNE** 3% est décomposé en H<sub>2</sub>O + O<sub>2</sub> par l'enzyme
- Technique: Sur une lame de verre déposer les bactéries ajouter le réactif
- Résultat:
  - Positif : présence de bulles



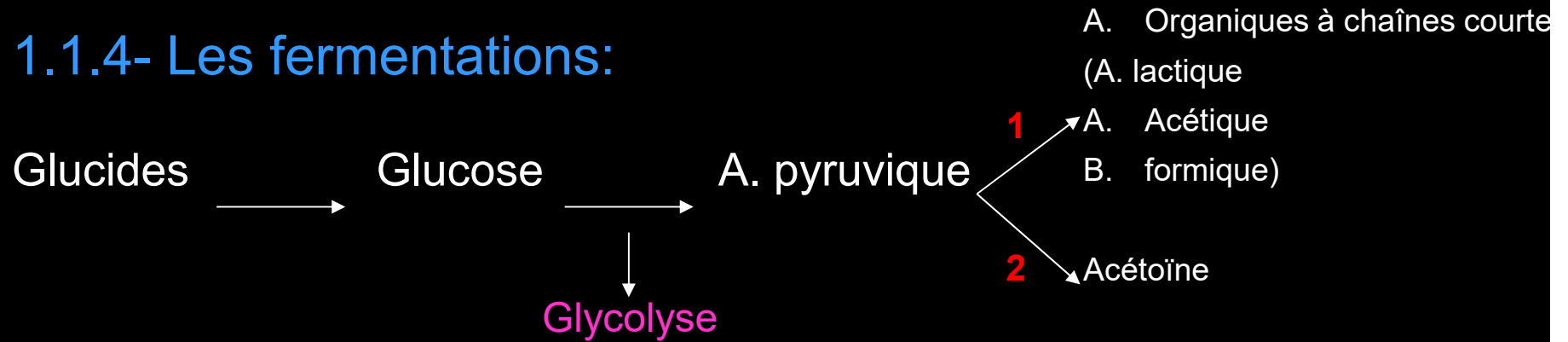
### 1.1.3- Les enzymes respiratoires:

#### Présence de la nitrate réductase (N.R+)

Si l'accepteur final d'électrons est un minéral autre que l'O<sub>2</sub>, on parle de respiration anaérobie.



## 1.1.4- Les fermentations:



**1:** Fermentation acide mixte

**2:** Fermentation butylène-glycol

## 1.2- La prototrophie

Utilisation d'un substrat organique comme seule source de carbone.

Milieu= Le citrate de sodium

## 1.3- Utilisation des polysaccharides

Recherche des enzymes exocellulaires: amylase, cellulase, pectinase

## 1.4- Le métabolisme protidique

- Protéolyse de la gélatine
- Hydrolyse de la caséine
- Recherche des décarboxylases:
  - Ornithine décarboxylase (ODC)
  - Lysine décarboxylase (LDC)
  - Arginine dihydrolase (ADH)
- Recherche d'indole par désamination du Tryptophane
- Recherche de la tryptophane désaminase et de la Phénylalanine désaminase
- Production d'H<sub>2</sub>S par décarboxylation et désamination
- Hydrolyse de l'urée

## 1.5- Le métabolisme lipidique

- Recherche de lipase
- Recherche de la Lécithinase

# Milieux d'identification

- **Eau peptonée lactosée au rouge de phénol**
- But: la mise en évidence de la fermentation du lactose.
- Mode opératoire:

Le milieu contient comme indicateur coloré le rouge de phénol qui vire au **jaune** en milieu acide, donc lorsque le lactose est fermenté. Aux pH alcalins obtenus lorsque la bactérie métabolise les peptones et non le lactose, la couleur est **rouge** sombre.

La cloche de Durham est remplie de gaz lorsque la fermentation du lactose donne des produits gazeux en plus des acides organiques.

## Résultats:



16/03/2020



Lactose -



Lactose + (Gaz -)



Lactose + (Gaz +)

# Milieux d'identification

- **Milieu de Clark et Lubs**

But: l'étude du type de fermentation.

Mode opératoire:

- Ensemencer largement, incuber 24 h à t°C optimale.
- \* test RM (Rouge de Méthyle):
  - ajouter 2 à 3 gouttes de rouge de méthyl,
  - la lecture est immédiate.
- \* test VP (Voges-Proskauer) :
  - - ajouter 10 gouttes d'alpha naphthol et le même volume de soude concentrée (ou de potasse).
  - - incliner le tube pour permettre une bonne oxygénation.
  - - attendre quelques min à 1 heure.

Résultats:



RM

VP



-



-



+



+

= fermentation acide mixte

= fermentation butylène-glycol  
(production d'acétoïne)



# Milieux d'identification

- **Le milieu Kligler Hajna** : test d'auto-évaluation (Métabolisme glucidique)

## Composition :

Extrait de viande de boeuf  
Extrait de levure  
Peptone  
Chlorure de sodium  
Citrate ferrique  
Thiosulfate de sodium  
Lactose  
Glucose  
Rouge de phénol  
Agar (gélose)  
ED

3 g  
3 g  
20 g  
5 g  
0,3 g  
0,3 g  
10 g  
1 g  
0,05 g  
12 g  
qsp 1 L

Source de C et N

Equilibre osmotique

Mise en évidence de la formation H<sub>2</sub>S

Source glucidique majoritaire

Source glucidique minoritaire

Indicateur de pH



pH = 7,4

# Milieux d'identification

- **Milieu de Kligler** (lactose, glucose, H<sub>2</sub>S)
- But: la mise en évidence de:
  - La production de gaz accompagnant ou non la fermentation du glucose.
  - La fermentation du lactose
  - La production d'H<sub>2</sub>S par décarboxylation et désamination des acides aminés.
- Mode opératoire:
- Ensemencer abondamment la surface par stries serrées ou par inondation, puis le culot par simple piqûre, à l'aide de la même pipette boutonnée. **Il est important de ne pas oublier de dévisser partiellement la capsule afin de permettre les échanges gazeux.**  
Mettre à l'étuve 24h à 37°C.

## Résultats:



Souche glucose +  
Lactose –  
H<sub>2</sub>S-  
gaz +



Souche glucose +  
Lactose –  
H<sub>2</sub>S+  
gaz -



Souche glucose +  
Lactose +  
H<sub>2</sub>S-  
gaz -

# Milieux d'identification

- **Milieu au citrate de Simmons**

But: la mise en évidence de l'utilisation du citrate comme seule source de carbone.

- Composition

Sulfate de magnésium  
Phosphate monopotassique  
Phosphate bipotassique  
Citrate de sodium  
NaCl  
Bleu de Bromothymol  
Agar (gélose)  
ED

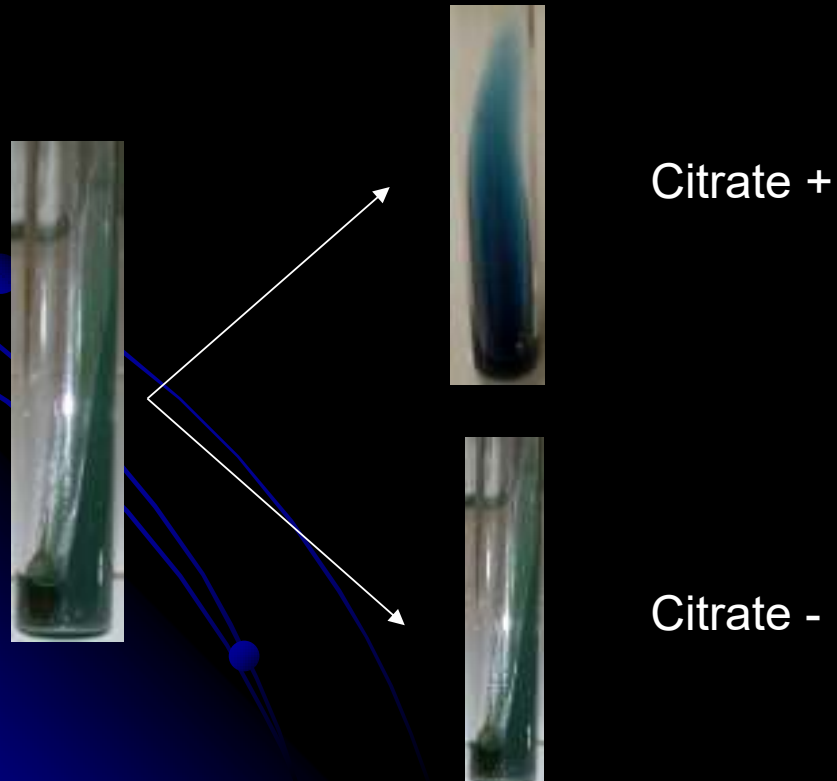
0,2 g	}	<i>Sources minérales</i>
1 g		
1 g		
2 g	→	<i>Seule source de carbone</i>
5 g	→	<i>Equilibre osmotique</i>
0,08 g	→	<i>Indicateur pH</i>
15 g		
qsp 1 L		

*pH = 6,8*



# Milieux d'identification

- **Milieu au citrate de Simmons**
- Mode opératoire
- La pente estensemencée par une strie longitudinale, réalisée à l'anse, à partir d'une suspension de la culture solide en eau distillée stérile.



# Milieux d'identification

- **Gélose à l'amidon:**

But: la mise en évidence de l'amylase

Mode opératoire:

- Ensemencer par une strie à la surface du milieu. Incuber un à huit jours à la température désirée.

Inonder la surface du milieu avec du lugol. En présence d'iode l'amidon prend une coloration violette.

La dégradation bactérienne de l'amidon du milieu de culture par les amylases extracellulaires se traduit par un **halo transparent** autour des colonies.

- Résultats:



Amylase –



Amylase +



# Conservation d'une culture bactérienne



# Conservation d'une culture bactérienne

- Réfrigération
- Surgélation
- Lyophilisation



# Réfrigération

- Méthode qui permet de ralentir le métabolisme bactérien sans tuer les microorganismes.
- Permet de conserver des cultures bactériennes pendant un court laps de temps
- Conservation entre 4 et 7°C (frigo)

# Congélation et surgélation

- Conservation pour une plus longue période
- Conservation des bactéries et des virus
- Culture microbienne pure dans un liquide en suspension
- Refroidir rapidement à des  $T^{\circ}$  entre  $-50$  et  $-95$   $^{\circ}\text{C}$  ( $-18$   $^{\circ}\text{C}$  pour congélation).
- Aucune activité métabolique ; développement totalement bloqué mais la plupart des cellules restent vivantes.
- Permet de décongeler la culture et de la faire croître, même après plusieurs années.



# Lyophilisation ou cryodéshydratation

- Congélation rapide d'une suspension microbienne à des T° entre – 54 et -72°C tout en éliminant l'eau par la création d'un vide ce qui donne une poudre.
- Récipient scellé sous vide.
- Les bactéries sont toujours vivantes mais dépourvues d'activité métabolique.
- Poudre peut être conservée pendant des années.
- Les bactéries peuvent être ranimées en tout temps par hydratation avec un milieu nutritif.



# Plan

## I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1 - Prélèvements

#### a) Echantillonnage

- 1) Normes d'échantillonnage
- 2) Méthode d'échantillonnage
- 3) Choix des échantillons

#### b) Fréquence des prélèvements

#### c) Conditions du prélèvement

- 1) Prélèvement en surface
- 2) Prélèvement de produits liquides
- 3) Prélèvement de produits solides

### 2 - Traitement de l'échantillon

#### a) Transfert au laboratoire

#### b) Préparation de l'échantillon

#### c) Les techniques de broyages

### 3- Les voies de bio contamination et techniques d'asepsie

## III- Les milieux de culture

- Composition et classification
- Critères de choix des milieux de cultures
- Principes des réactions révélés par les milieux les plus utilisés
- Préparations et conservation

## IV-GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

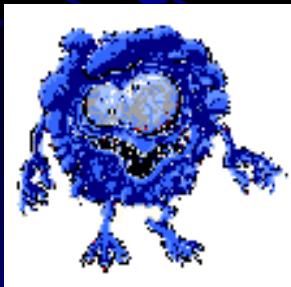
## V- PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

## VI- ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES (EXPOSES)

## IV-GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

Toute présence d'un germe pathogène dans un aliment peut altérer la qualité de cet aliment et pourra ainsi causer des intoxications et/ou des maladies infectieuses graves.

Les germes pathogènes les plus répandus sont les suivants:



# SALMONELLES



- Nombreuses
  - *Salmonella typhimurium*, *Salmonella enteridis*, *Salmonella dublin*...
- Très résistantes et persistantes dans l'environnement
- Obligation réglementaire : Zéro salmonelles dans les fromages (dans 25 g, mélange de 5 échantillons)

Présence  
de  
salmonelles



Interdiction de  
commercialiser  
les fromages

# Salmonelles

## Un enjeu pour la santé publique



- Chez l'adulte bien portant :
  - Symptômes : coliques, diarrhées, vomissements, nausées et fièvres, +/- déshydratation, mal de tête...
  - Apparition : 8 à 48 h 00 après l'ingestion
  - Durée 2 à 4 jours – guérison souvent spontanée
- Taux de mortalité : 0.2 %



### # Intoxications alimentaires collectives à salmonelles 2001 :

- 1 726 cas
- 272 hospitalisations
- 3 décès
- 7.5 % dus à du lait ou des produits laitiers

Source : BEH

# Salmonelles

## Un enjeu pour la santé publique

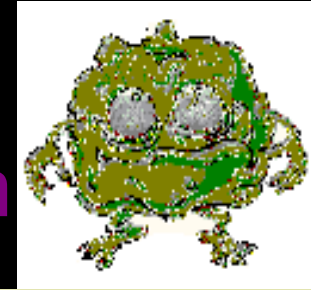


- ✦ Principale cause des TIAC (toxi infection alimentaire collective) – aliments suspectés ou identifiés en 2001

Lait et produits laitiers	14	7,5%
Œufs et préparations à base d'œufs	107	56,6%
Viandes	5	2,6%
Produits de charcuterie	15	7,9%
Volailles	11	5,8%
Poissons et crustacés	3	1,6%
Coquillages	3	1,6%
Autres Aliments	3	1,6%
Eau de boisson	0	0
Aliments non retrouvés	28	14,8%
Total (nb foyers)	189	

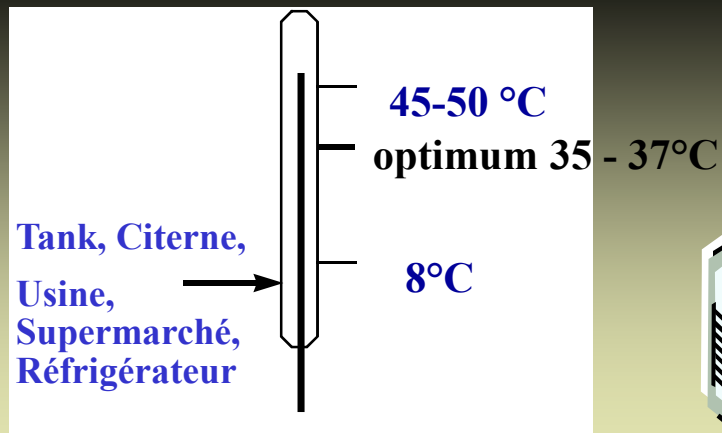


# Salmonelles



## Conditions de survie et de multiplication

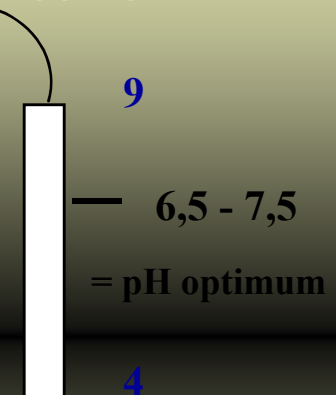
- Pas de croissance si bonne réfrigération du lait
- Survit au froid et à la congélation
- Température de croissance



- Assez sensibles au sel
- pH de multiplication

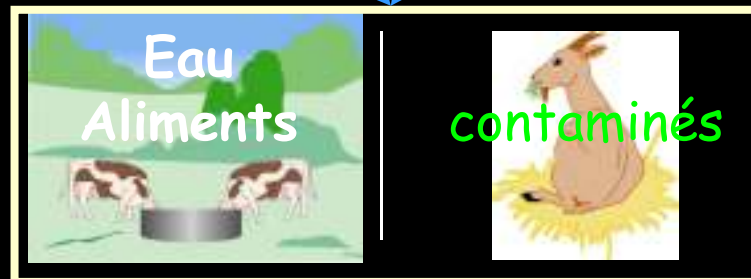
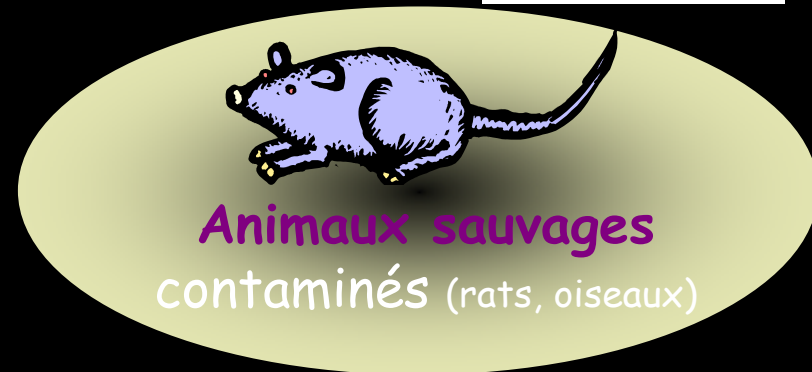
6,6 - 6,8 = pH du  
lait frais

4,0 - 4,3 = pH du  
fromage au  
démoulage



# Salmonelles

## Contamination dans les élevages



**Troupeau avec salmonellose clinique ou porteurs sains**

Classiquement par voie orale

# Salmonelles

## Eviter la contamination du lait



- Isoler les **animaux atteints** cliniquement
- **Préférer un épandage sur les labours** avec enfouissement immédiat ( dans les élevages présentant des cas ou ayant des antécédents de salmonelloses cliniques)
- **Eau** : protection des points d'eau – entretien des abreuvoirs
- Protection des **aliments** des souillures animales
- Entretien des **litières**
- Lutte contre les **rongeurs**, les **pigeons**...
- Hygiène de **traite**

# *LISTERIA MONOCYTOGENES*



- Listeria :

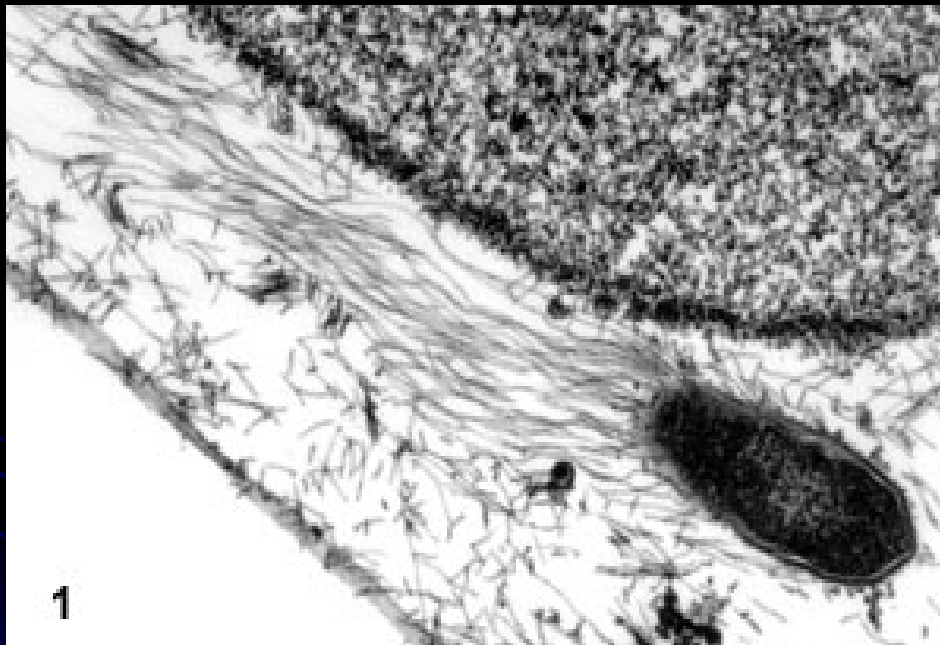
- 6 espèces :

- L. monocytogenes : seule pathogène pour l'homme
- L. ivanovii : avortements chez les ruminants
- 4 autres espèces non pathogènes

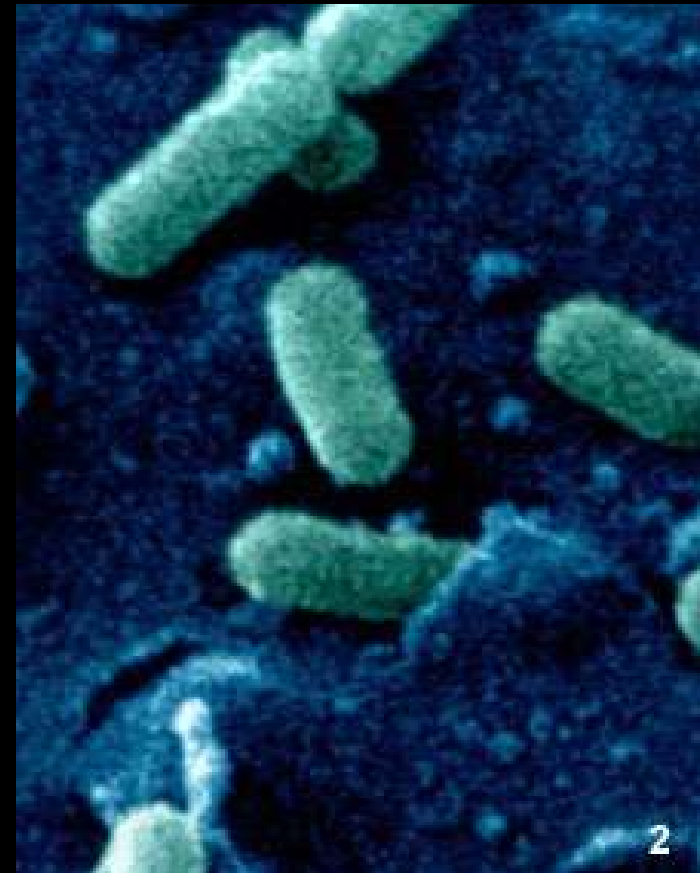
- **Normes :**

- <100 ufc / g si existe test de vieillissement pour le produit
- ou absence dans 25g de produit

# *LISTERIA MONOCYTOGENES*



**Listeria** circulant dans la cellule



**Listeria** pénétrant dans une cellule

# *Listeria monocytogenes*

## La listériose chez les Humains



- Conséquences pour la santé :

- Avortements
- Méningites

Surtout chez les personnes  
immunodéprimées

- Décès dans 30 % des cas chez personnes sensibles



# *Listeria monocytogenes*

## La Listériose chez les ruminants



Méningites

Avortements

Mammites

Affections  
oculaires

- Fréquence de la maladie :

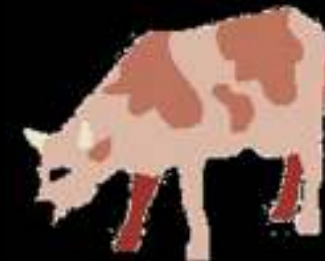
- ovins

>

caprins

>

bovins

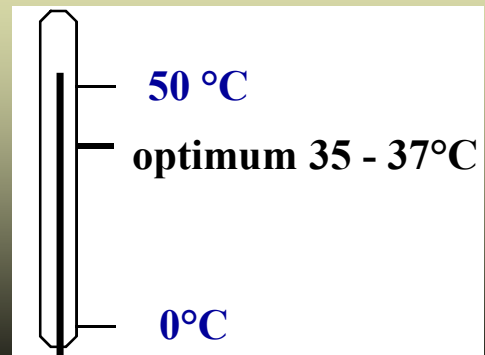
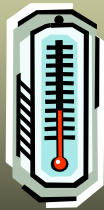


Presque toutes les espèces animales peuvent être porteuses de Listéria

# LISTERIA MONOCYTOGENES



- Température de croissance



- Sensible :

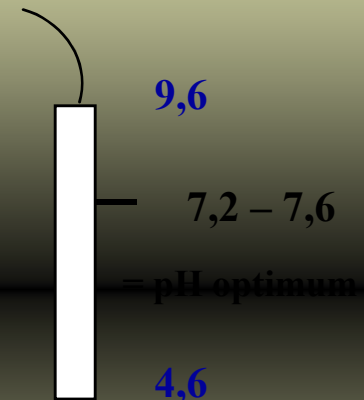
- à la chaleur (> 60° C)
- à la plupart des désinfectants (chlore)

- ✦ pH de multiplication



6,6 - 6,8 = pH du lait frais

4,0 - 4,3 = pH du fromage au démoulage



- ✦ Résiste au sel (saumure)



# LISTERIA MONOCYTOGENES

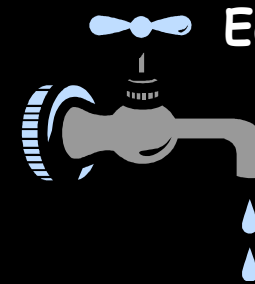


Aliments  
contaminés

Fèces  
contaminés

Environnement  
contaminé

Litière  
contaminée



Eau d'abreuvement ou  
de lavage  
contaminée

Matériel de traite contaminé

Mammites  
à *Listeria*



Lait

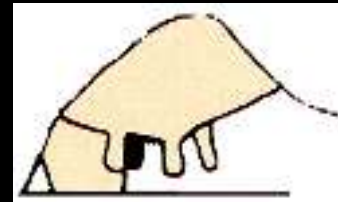
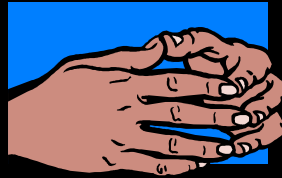


Traite

# STAPHYLOCOCCUS AUREUS



- *S. aureus* est une bactérie mieux connue sous le nom de : **Staphylocoque doré**
- Hôte naturel des muqueuses et de la peau de l'homme et des animaux



- Portage sain possible : intestin, muqueuses, peau, (vêtements) ...

# *Staphylococcus Aureus*

## Conséquences pour la santé



- Chez l'homme
  - (3h après ingestion, pendant 24-48 heures)
    - Toxi-infections alimentaires :
      - nausées, douleurs abdominales, diarrhées, maux de tête, douleurs musculaires, hypertension,...
    - Choc toxinique : rare
  - Chez l'animal
    - Infections mammaires
    - Surinfections de plaies, abcès, dermites, métrites, vaginites, ...



# Staphylococcus Aureus

## Normes



Lait concerné	Normes
Lait cru de vache pour fabrications au lait cru	AUCUN depuis 01/01/06



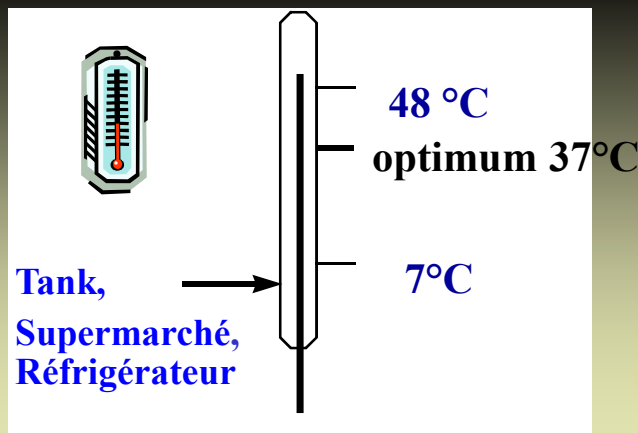
Produit laitier concerné	Normes
Fromages au lait cru	m = 10 000 M=100 000
Fromages avec traitement thermique < pasteur	m = 100 M = 1 000
Fromages au lait pasteurisé	m = 10 M = 100

- En cas de dépassement de M, mise en œuvre des actions correctives du plan de maîtrise et recherche d'entérotoxine sur les produits laitiers

# STAPHYLOCOCCUS AUREUS



- Pas de croissance si bonne réfrigération du lait
- Survit au froid et à la congélation
- Température de croissance



- pH de multiplication



6,6 - 6,8 = pH du  
lait frais

9,8

5,0 - 7,5  
= pH optimum

4,0 - 4,3 = pH du  
fromage au  
Démoulage (lactique)

4,0

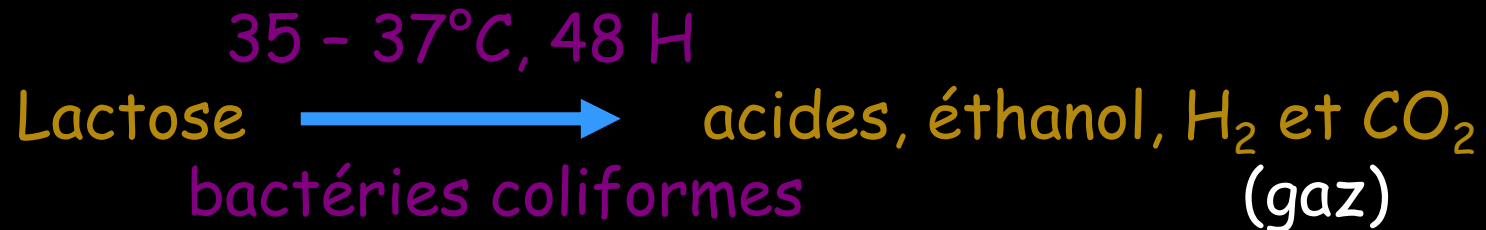
- ✦ Survit à des taux de sel (20 %) et sucre élevés



# ESCHERICHIA COLI



- ***E.coli* est une bactérie coliforme**
  - Peut donner des **caillés ou fromages gonflés**



- Peut entraîner des **altérations du goût**
- ***E.coli* : pathogénicité dépend des souches**  
Ex : O157:H7, une des plus dangereuses

# ESCHERICHIA COLI



4 Types

Entéro-  
pathogènes

Affections  
néonatales

Adultes  
porteurs  
sains

Entéro-  
toxinogènes

Diarrhées  
infantiles

"Tourista"  
adultes

Entéro-  
invasives

Diarrhées  
sanglantes

Dysenteries

Entéro-  
hémorragiques

Diarrhées  
sanglantes

Coliques  
hémorragiques

Infections  
urinaires

# *Escherichia Coli*

## Conséquences pour la santé



- Chez l'homme
  - Infections intestinales :
    - diarrhées du nourrisson, fièvre, diarrhées avec sang, déshydratation
  - Infection du système urinaire
  - Méningites: surtout chez le nourrisson



- Chez l'animal
  - Gastro-entérite
  - Mammites cliniques colibacillaires



# Escherichia Coli

Normes (voir partie réglementation)

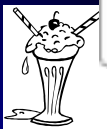


- **E.coli**



Lait ou produit laitier concerné	Normes	
Fromages au lait cru	aucun	
Fromages au lait ayant subi traitement thermique	m = 100	M = 1000

## Coliformes à 30° C



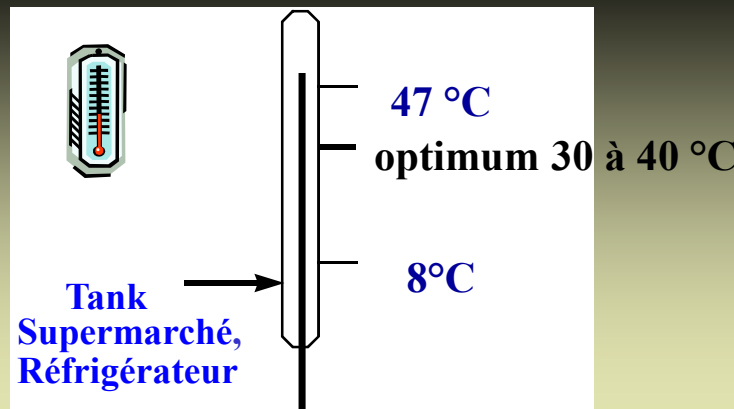
Lait ou produit laitier concerné	Normes	
Beurre et crème au lait cru	m = 10	M = 100

En cas de dépassement de M, mise en œuvre des actions correctives du plan de maîtrise

# ESCHERICHIA COLI



- Pas de croissance si bonne réfrigération du lait
- Survit au froid et à la congélation
- Température de croissance

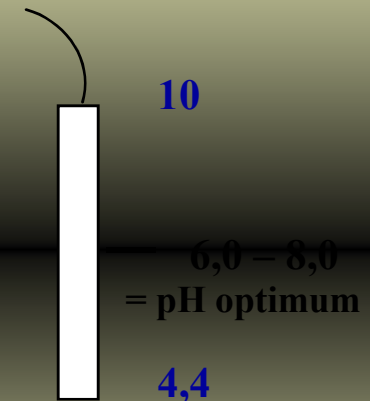


- pH de multiplication



6,6 - 6,8 = pH du  
lait frais

4,0 - 4,3 = pH du  
fromage au  
Démoulage (lactique)



# Peu sensible au sel



# *Escherichia Coli*

## Coliformes : indicateurs d'hygiène



- Les coliformes se différencient en 2 types :
  - Non fécaux (origine environnement), détectés dès 30°C
  - Fécaux (origine tube digestif), plus thermo-tolérants, détectés à 44°C, et dont E.coli fait partie
  - Le ratio E. coli / Coli à 30°C est un bon indicateur de l'origine de la contamination du lait
    - Faible (20 %) : origine matériel, environnement
    - Elevé : origine fécale, hygiène
- Colonisation rapide du matériel (1 à 2 semaine), favorisée par les résidus (lait, tartre) et l'humidité
- Formation de biofilms

# Escherichia Coli

## Moyens de maîtrise en Elevage



Bâtiments : préserver l'état des aires d'exercice, de couchage, litières

Repérer les mammites colibacillaires



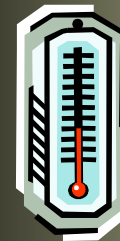
Qualité de l'eau utilisée



Entretien et nettoyage de la machine à traire



Bonne hygiène de traite



Réfrigérer correctement le lait

# Escherichia Coli

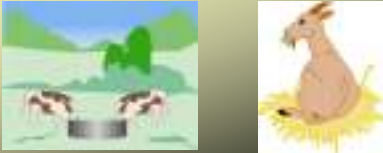



## Bonnes pratiques en fromagerie



- Changer de sérum en cas de gonflement
- Veiller à une bonne acidification (freine la multiplication)
- Qualité de l'eau (tartre)
- Nettoyage et Entretien de la vaisselle laitière
  - Dose, Durée, T°C, Action mécanique
  - Contrôle visuel : rayures, fissures, tartre...
- Locaux : plan de nettoyage (+ désinfection si nécessaire)
- Hygiène du transformateur
  - Lavage des mains
  - Tenue
  - Limiter accès aux visiteurs

# Principales sources de contamination / Elevage

■ Contamination    ✗ Multiplication

			<i>Staph aureus</i>	<i>Listeria mono</i>	<i>E. Coli</i>	<i>Salmonella</i>
	Aliments, eau contaminés			■	■	■
	Litière contaminée, sol boueux, fumier contaminé			■	■	■
Traite 	Mamelle souillée Mamelle infectée Hygiène/technique Machine à traire		■ ■ ■	■ ■ ■	? ■ ■	■ ■ ■
	T°C, vitesse refroidissement Nettoyage, entretien		✗ ■	✗ ■	✗ ■	✗ ■

# Plan

## I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1 - Prélèvements

#### a) Echantillonnage

- 1) Normes d'échantillonnage
- 2) Méthode d'échantillonnage
- 3) Choix des échantillons

#### b) Fréquence des prélèvements

#### c) Conditions du prélèvement

- 1) Prélèvement en surface
- 2) Prélèvement de produits liquides
- 3) Prélèvement de produits solides

### 2 - Traitement de l'échantillon

#### a) Transfert au laboratoire

#### b) Préparation de l'échantillon

#### c) Les techniques de broyages

### 3- Les voies de bio contamination et techniques d'asepsie

## III- Les milieux de culture

- Composition et classification
- Critères de choix des milieux de cultures
- Principes des réactions révélés par les milieux les plus utilisés
- Préparations et conservation

## IV-GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

## V- PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

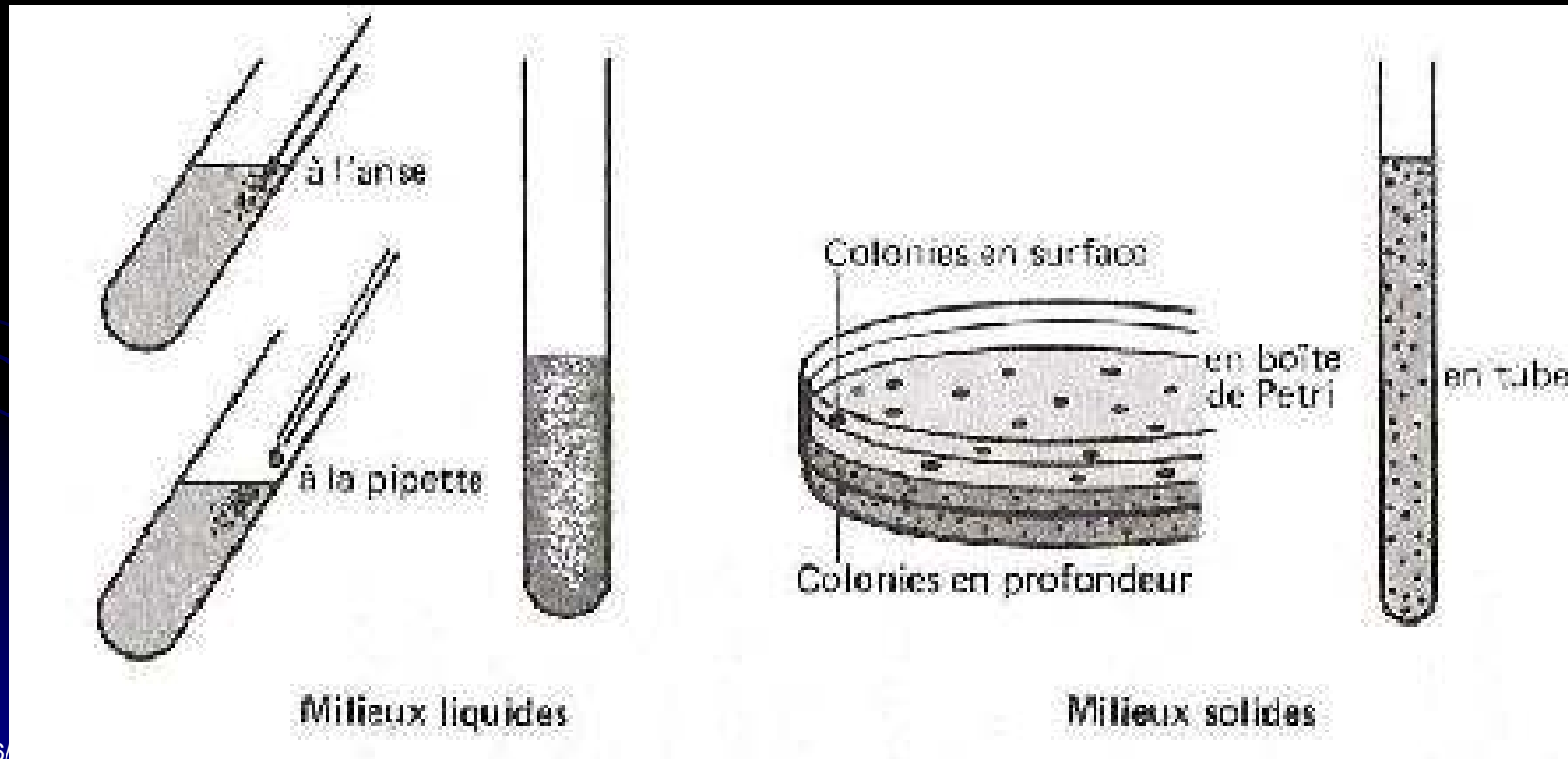
16/03/2020

135

## VI- ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES (EXPOSES)

# Les principaux procédés d'ensemencement:

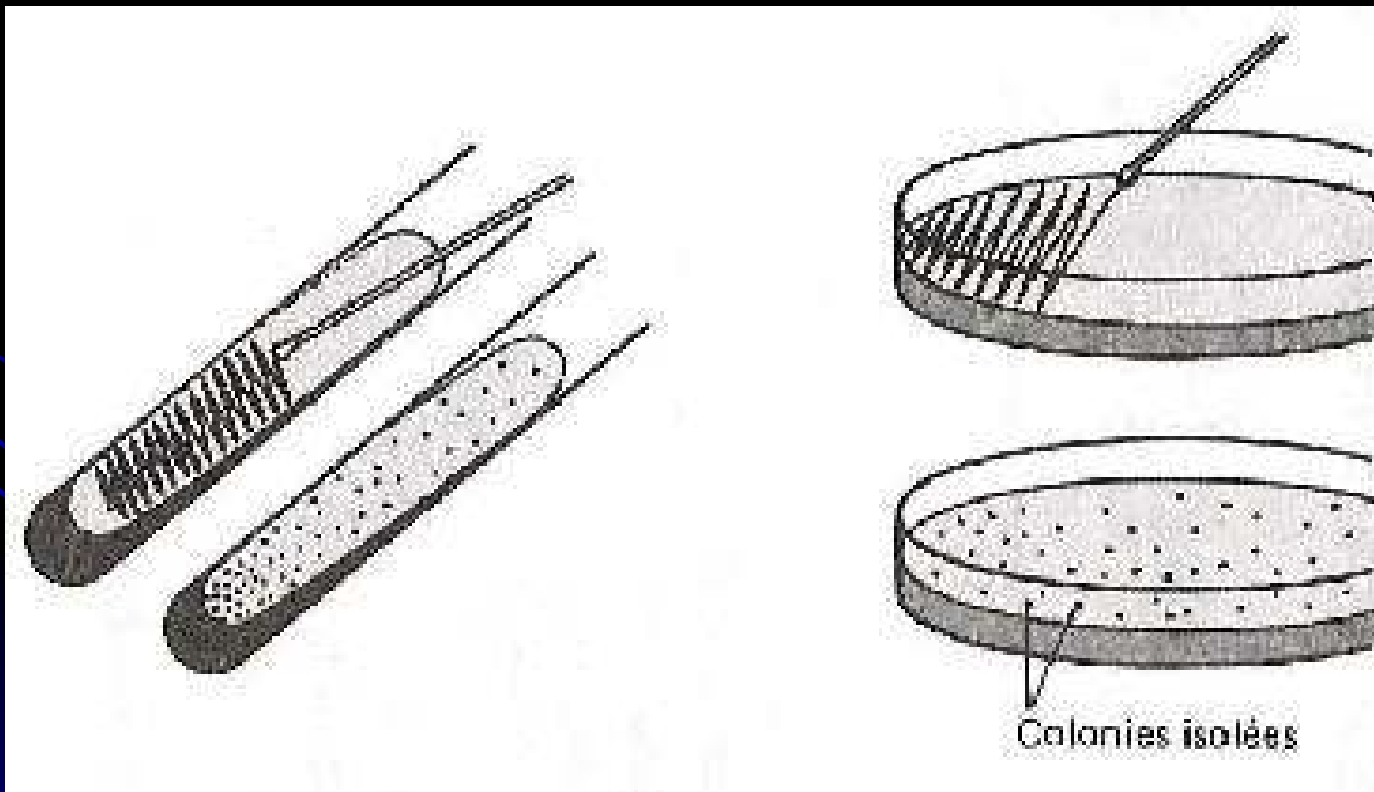
## - ensemencement dans la masse



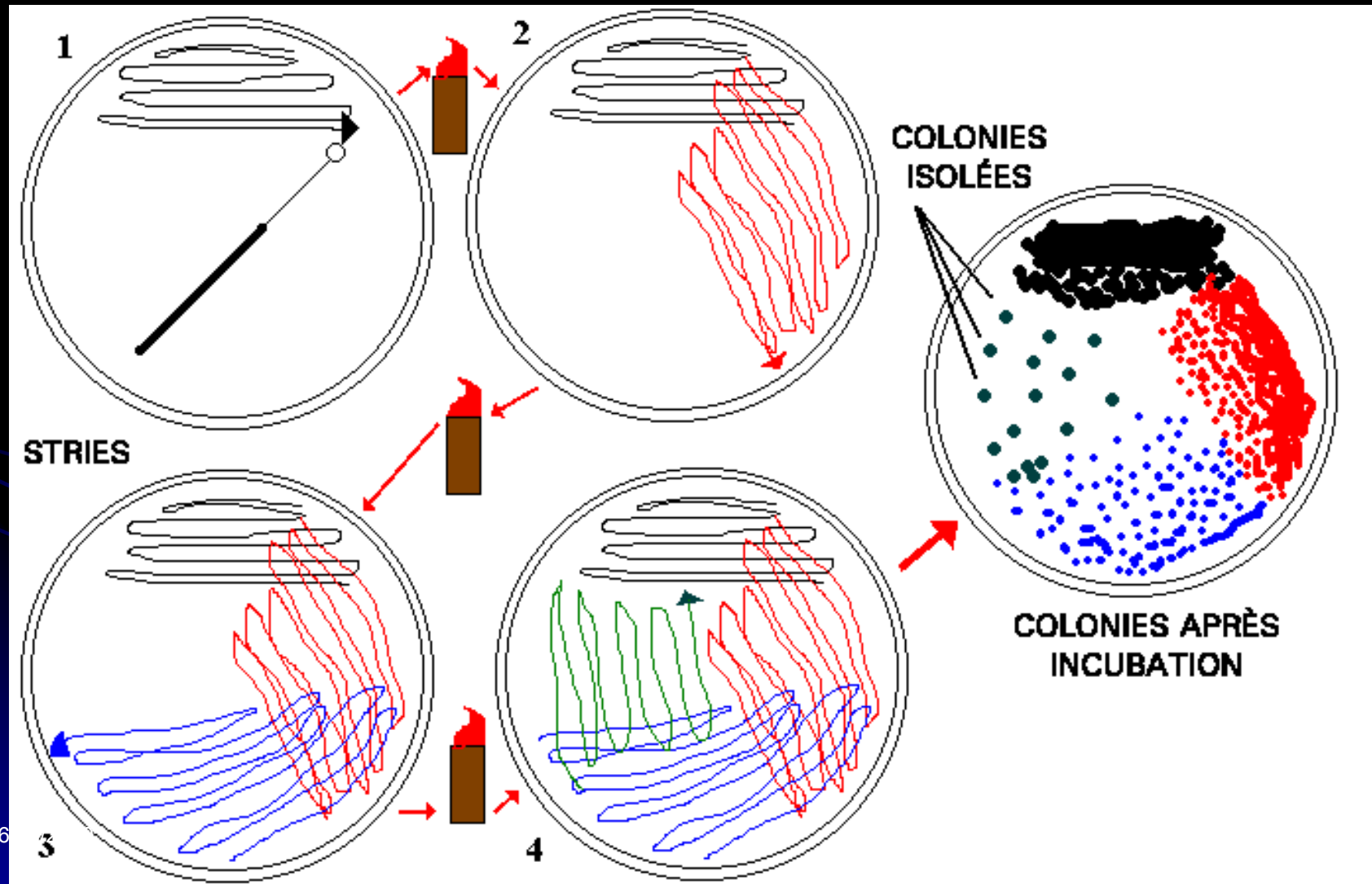


# Les principaux procédés d'ensemencement:

## - ensemencement par stries transversales pour dissémination

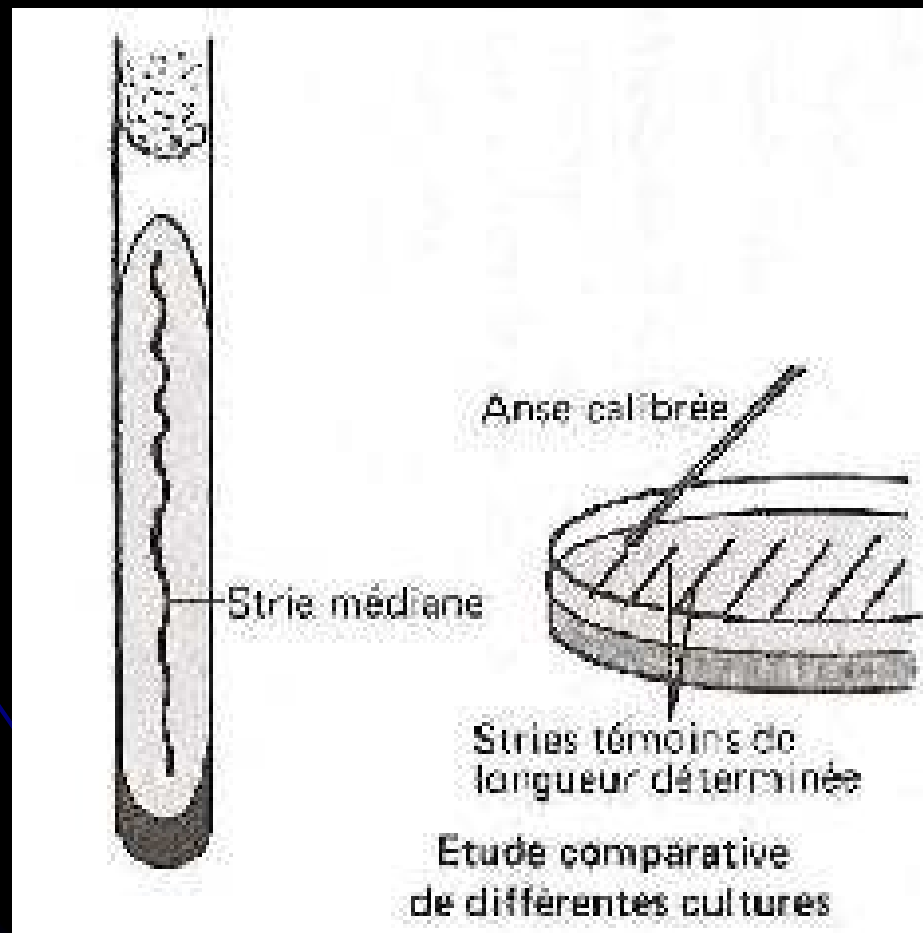


# Technique des stries



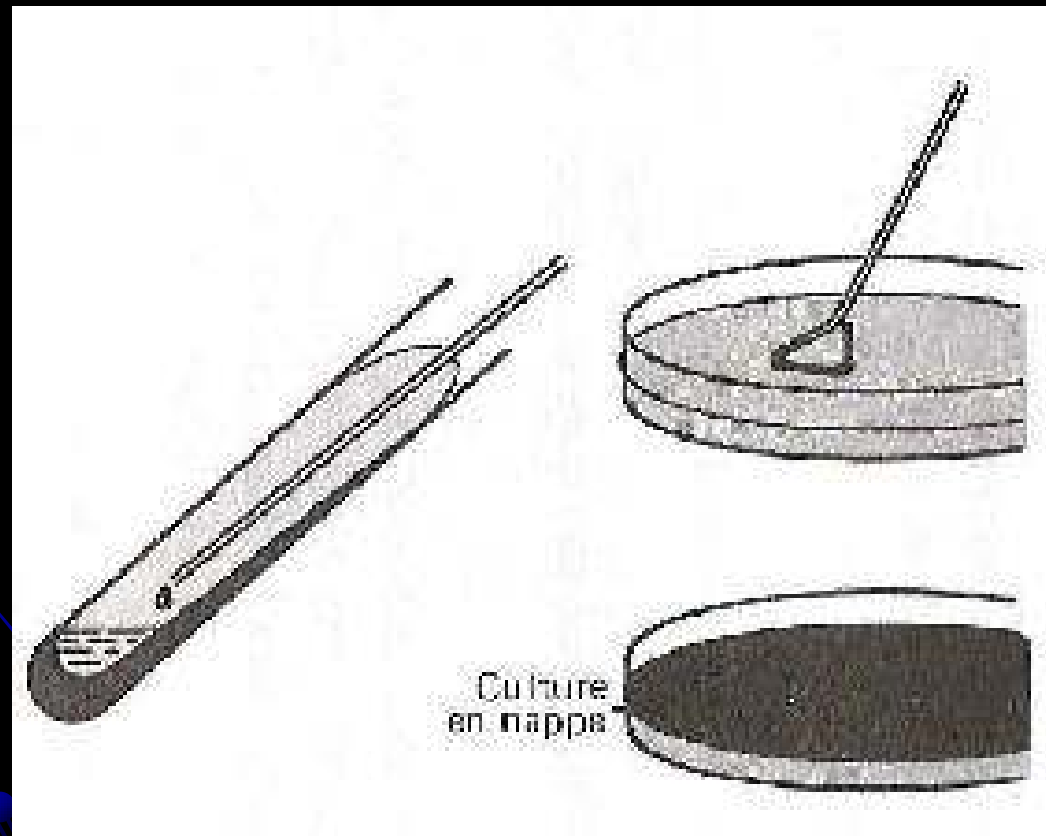
# Les principaux procédés d'ensemencement:

## - ensemencement par stries épaisses



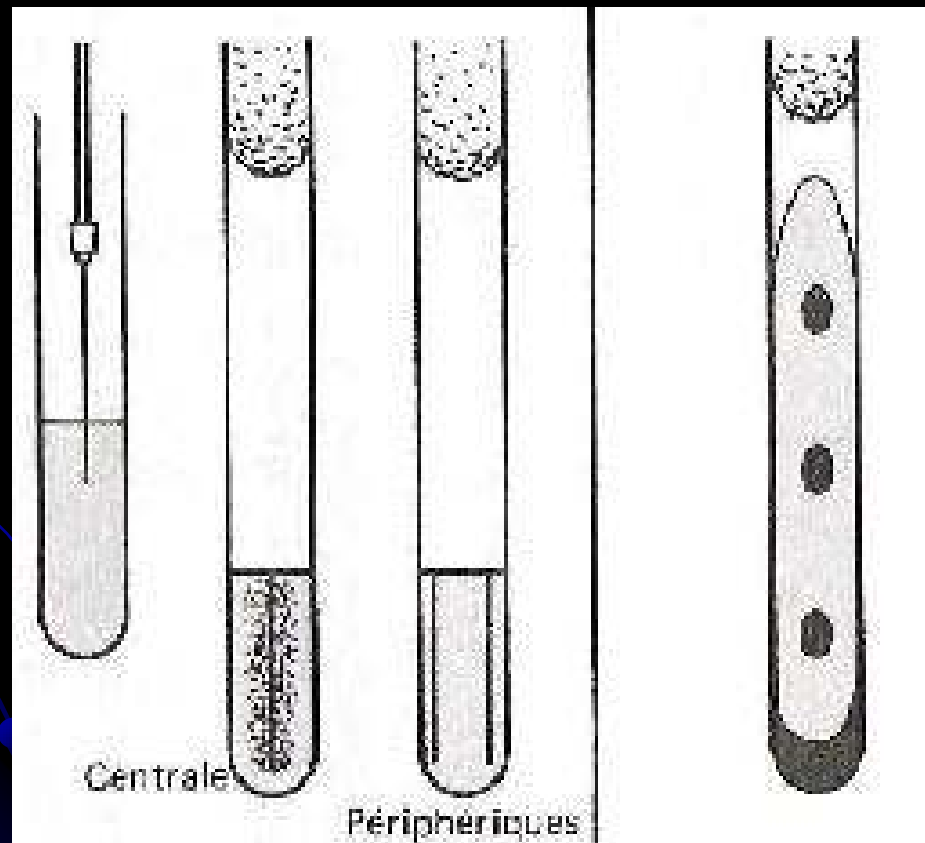
# Les principaux procédés d'ensemencement:

## - ensemencement par inondation



# Les principaux procédés d'ensemencement:

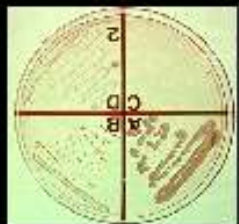
## - ensemencement par piqûre et par touche



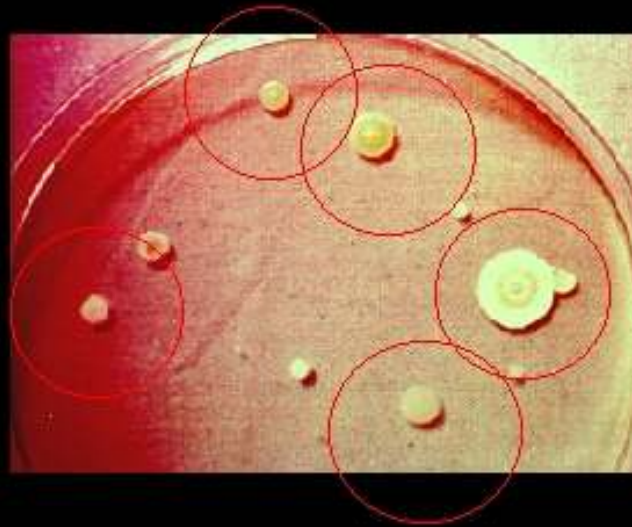
# Examen macroscopique et microscopique des bactéries

# 1) Aspect macroscopique des colonies

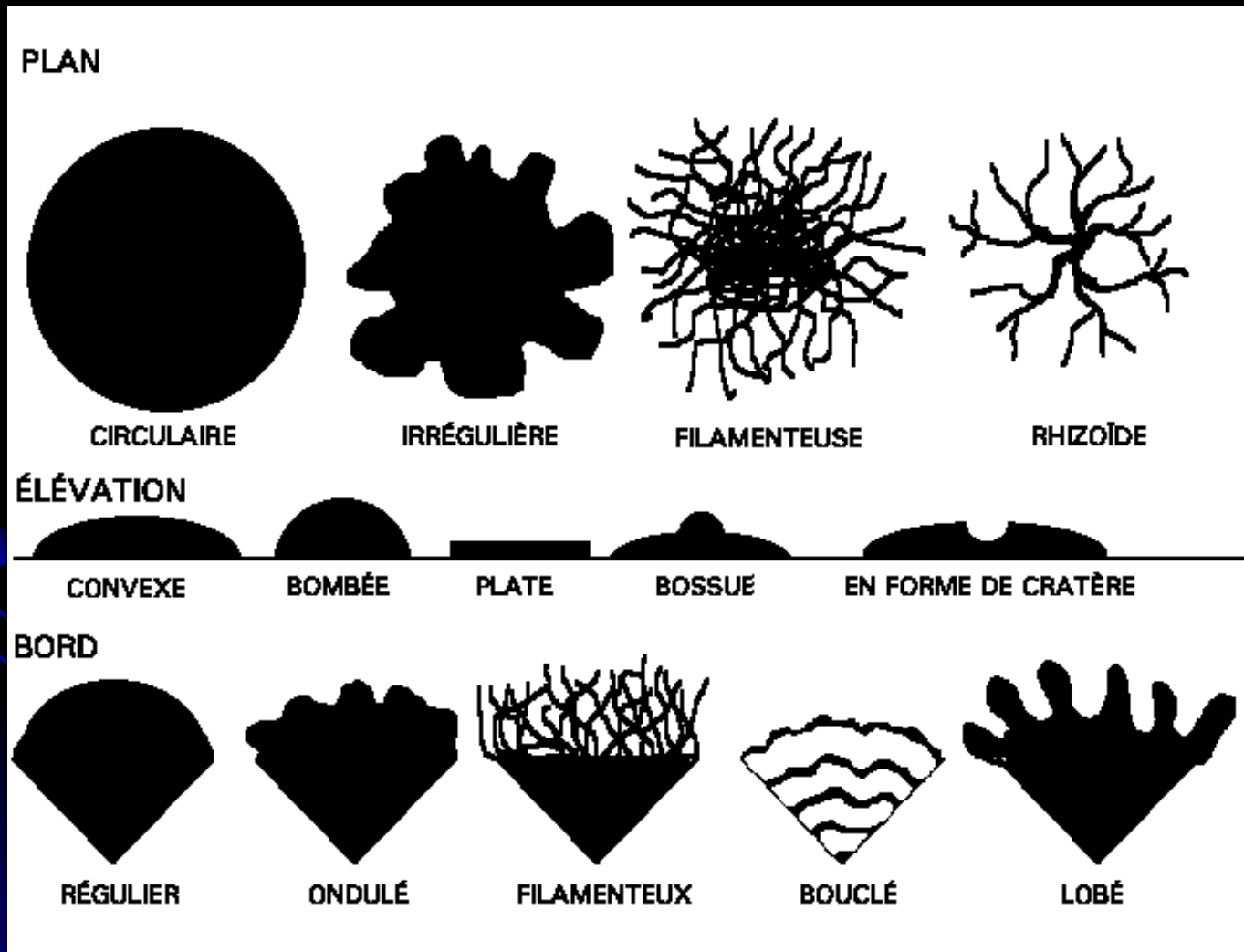
Gélose-sang



Gélose BHI



# Aspect des colonies (macroscopie)





## 2) Examen microscopique des bactéries

### Coloration de Gram

# Coloration de Gram

- *La coloration de Gram doit son nom au bactériologiste danois Hans Christian Gram qui mit au point le protocole en 1884.*
- *C'est une coloration qui permet de mettre en évidence les propriétés de la paroi bactérienne, et d'utiliser ces propriétés pour les distinguer et les classer.*
- *Son avantage est de donner une information rapide sur les bactéries présentes dans un produit ou un milieu tant sur le type que sur la forme.*

La paroi des **bactéries Gram-** est **riche en lipides**, ce qui la rend perméable à l'alcool qui décolore le cytoplasme, alors que la paroi des **Gram+** est imperméable à l'alcool et le cytoplasme reste coloré en violet.

# Réalisation du frottis

- Elle nécessite d'avoir un frottis fixé, soit par l'alcool durant 5 minutes (et rinçage à l'eau), plus classiquement en effectuant **une fixation simple à l'eau** et à la flamme selon les indications suivantes :

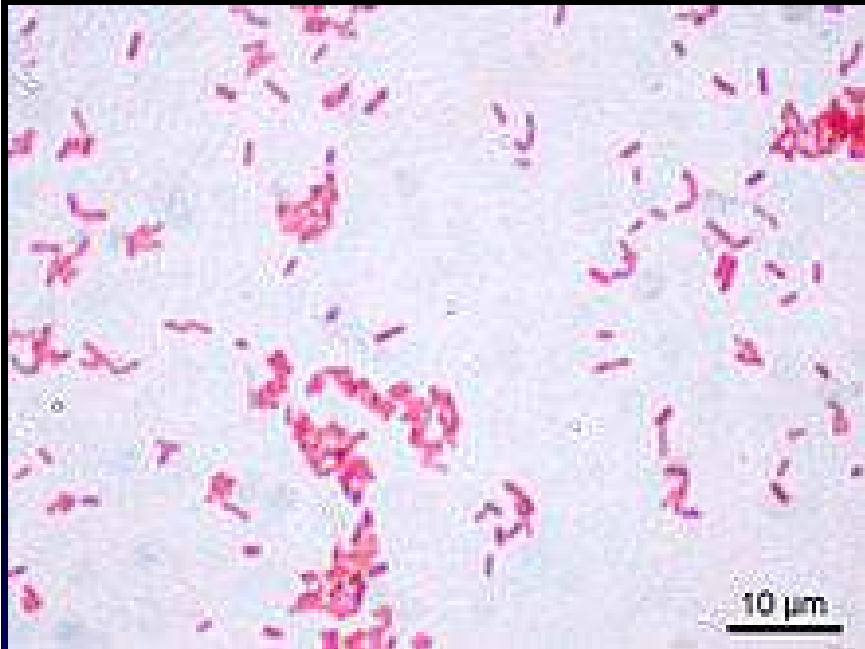
sur une lame, déposer une goutte d'eau stérile. Ajouter à l'anse de platine stérilisée une goutte de la colonie isolée. Étaler et fixer à la chaleur à environ 40°C pendant 10 à 15 minutes. Poser la lame séchée sur le portoir reposant sur un bac de coloration.

# Réalisation de la coloration

- *Voici succinctement les différentes étapes de cette coloration :*
- **1.** Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet.  
Laisser agir de 30 secondes à 1 minute.
- Rincer à l'eau déminéralisée.
- **2.** Mordantage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée): étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée.

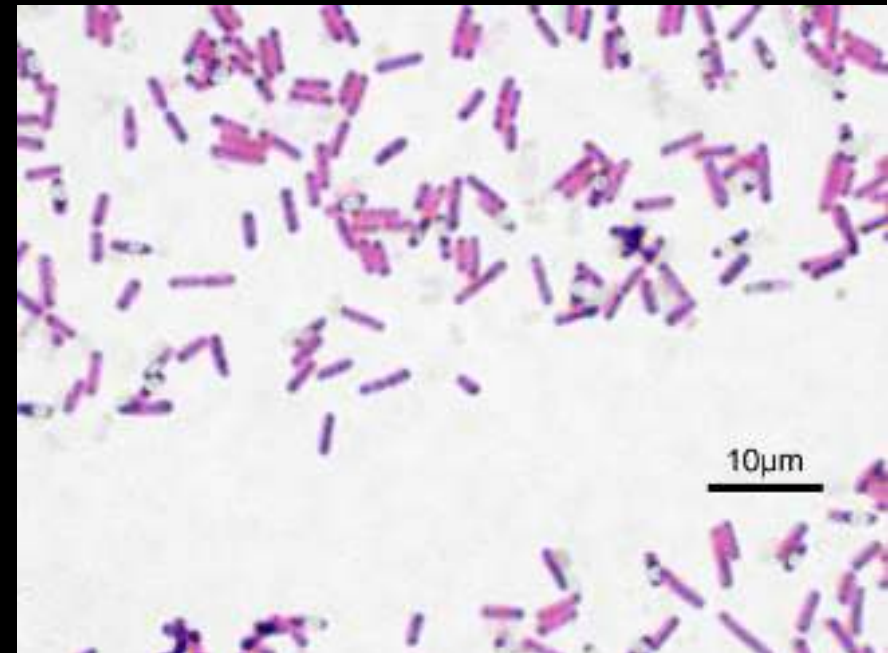
# Realisation de la coloration

- **3.** Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone): verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée ;
- **4.** Recoloration à la safranine ou à la fuchsine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes.
- **5.** Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement ×1000).



Des bactéries à **Gram –**  
(*Escherichia coli*)

16/03/2020



Des bactéries à **Gram +**  
(*Bacillus subtilis*)

151

# Méthodes de dénombrement





# I. Isolement d'une flore microbienne spécifique

## 1- choix du biotope:

**Milieu biologique déterminé offrant des conditions d'habitat stable à un ensemble d'espèces**

Conditions physico -chimique

**biotope**

.pH  
.température  
.lumière  
.eau  
.Source de  
carbone  
.O<sub>2</sub>  
.etc...

## 2- choix du milieu de culture:

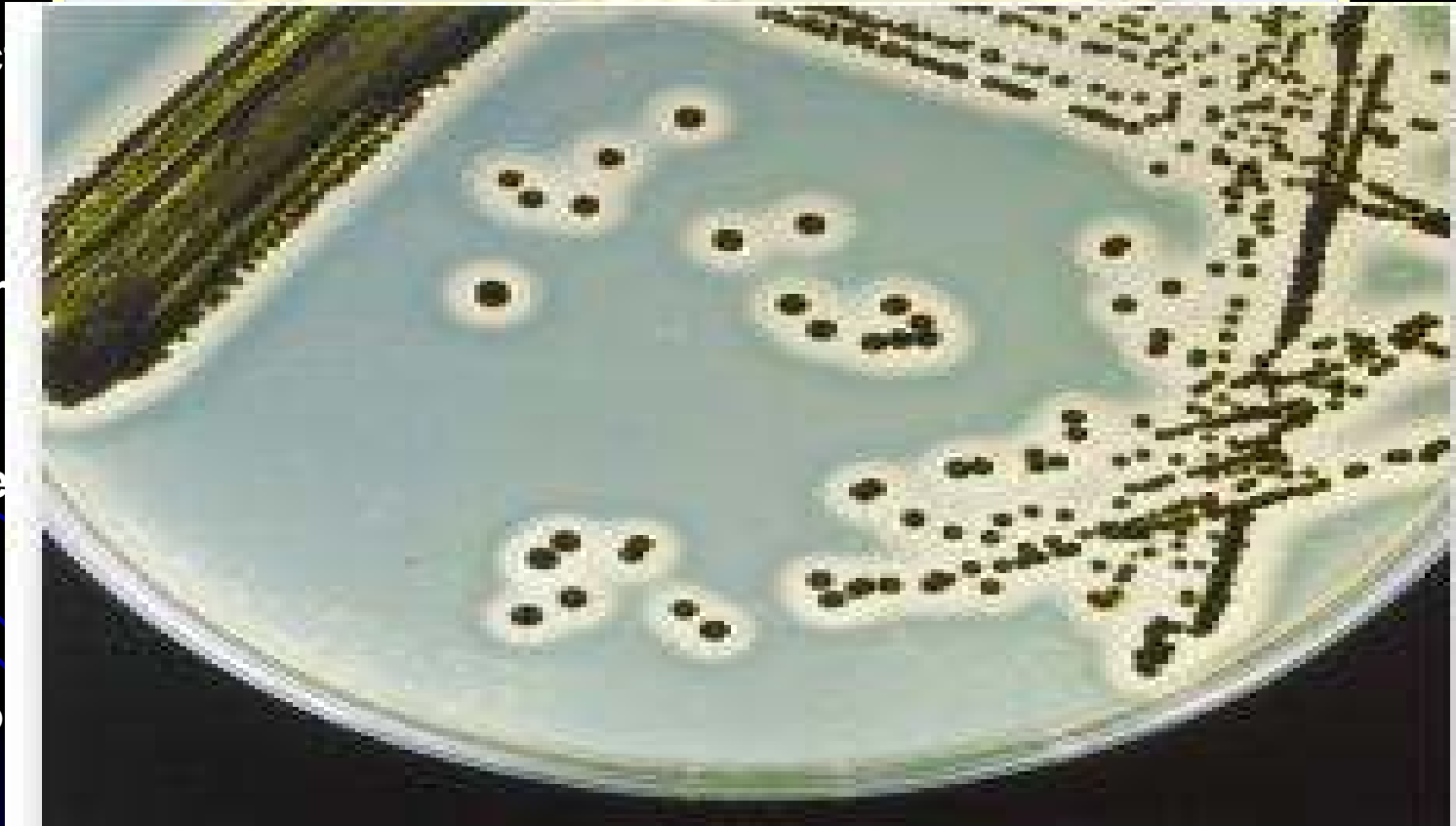
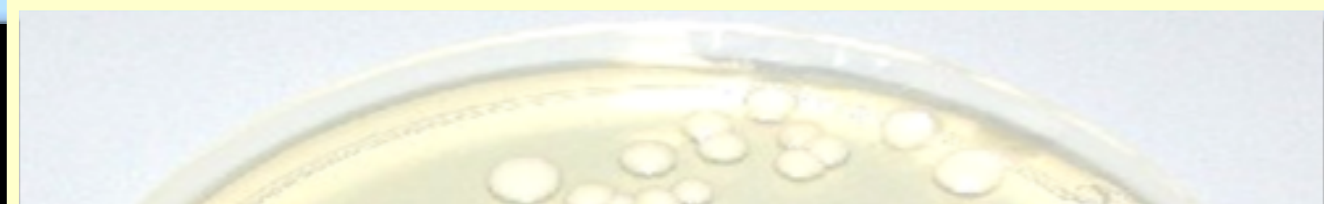
Milieux usuels

Milieux sélectifs

Milieux d'enrichissement

Milieux d'identification

Milieux de conservation



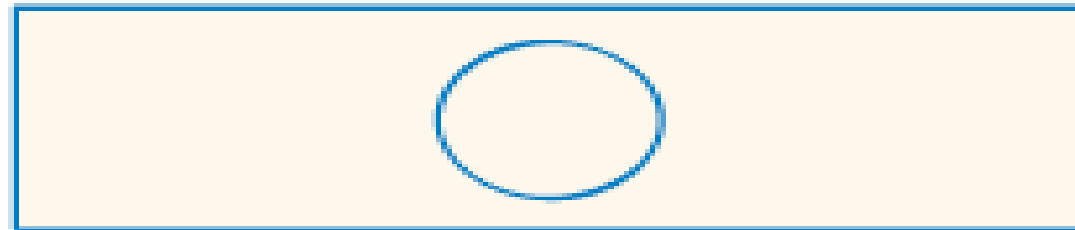
## **II . Dénombrement de la flore microbienne**

# 1- dénombrement direct

hématimètre de Thoma

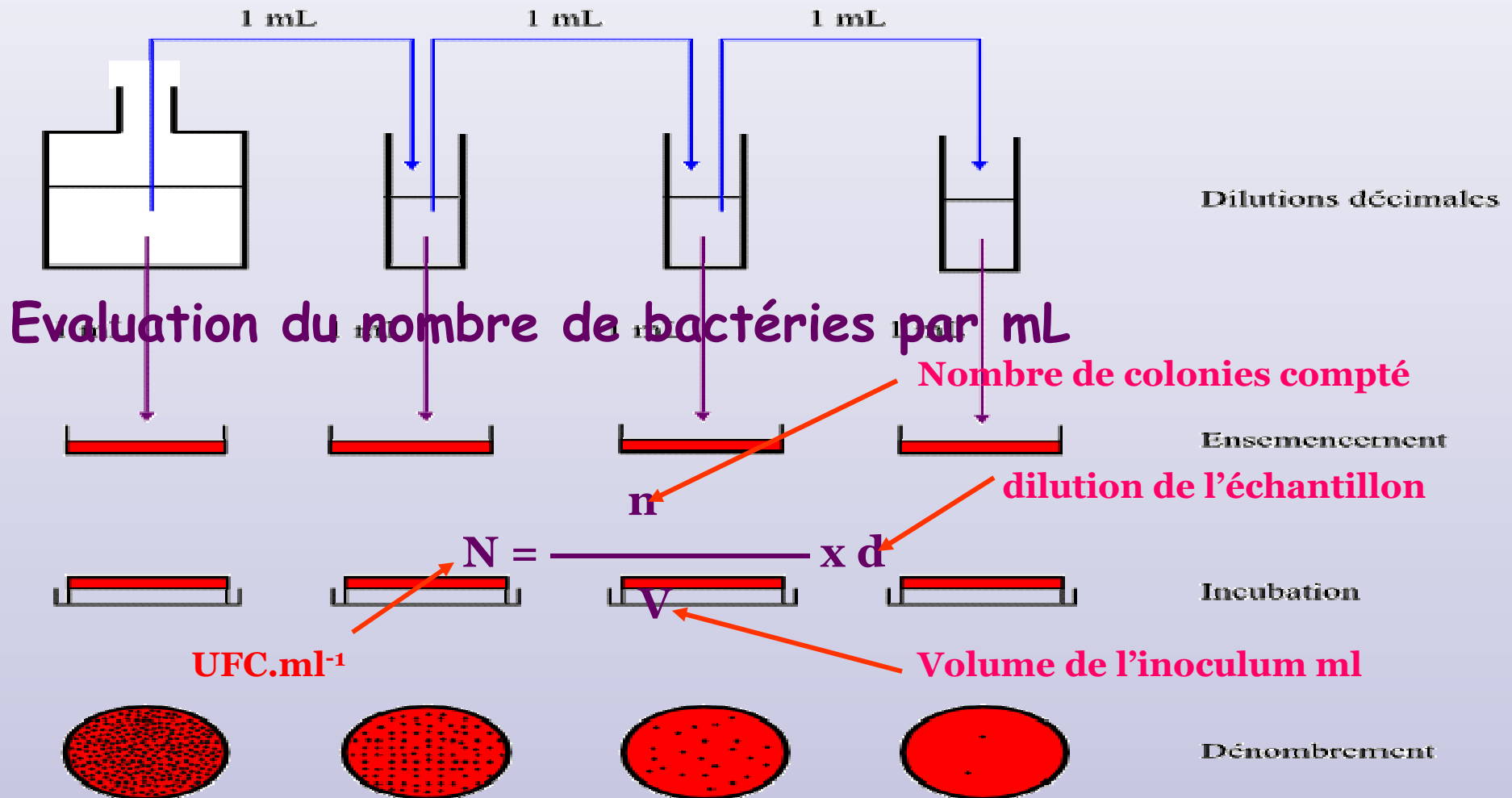


une lame de Breed



# 2- dénombrement indirect

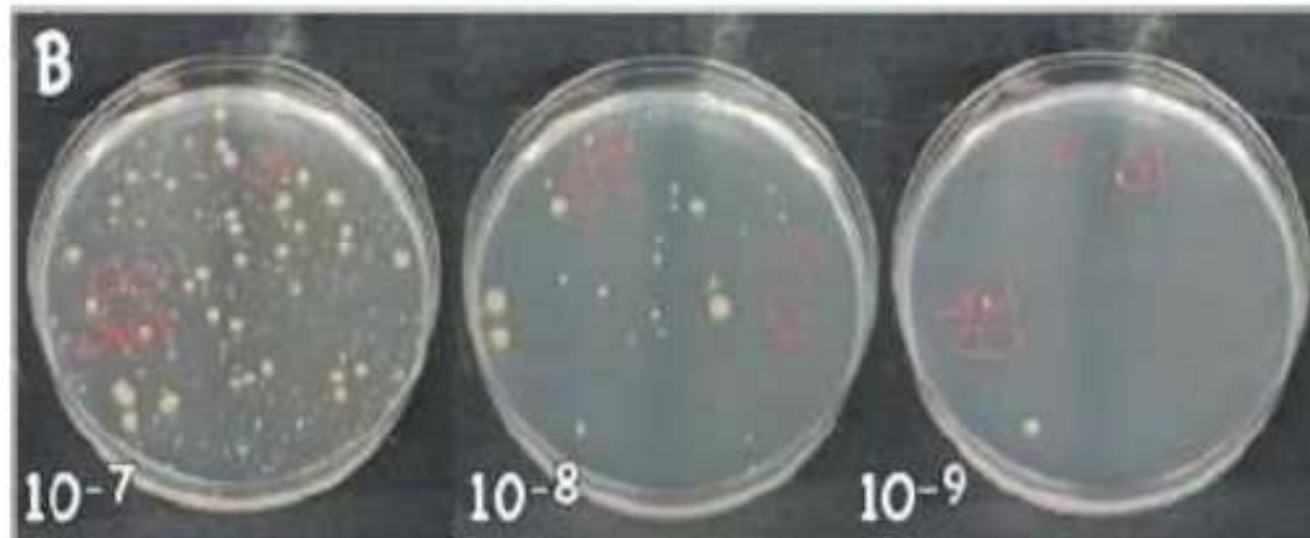
Par comptage des colonies après culture

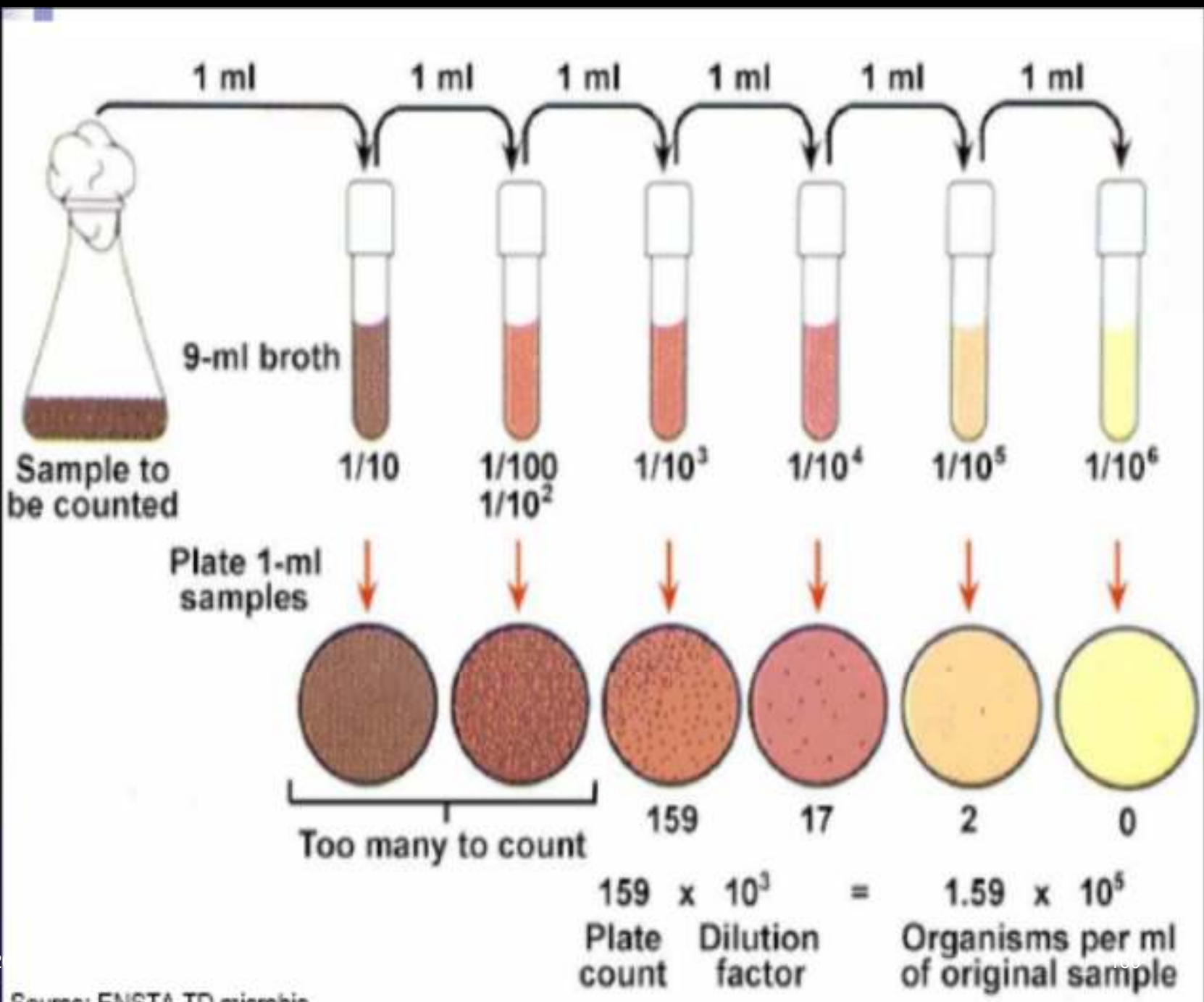


16/03/2020  
L'échantillon est dilué de 10 en 10 et 1 mL de chacune des dilutions est étalé à la surface d'un milieu gélosé ou incorporé au milieu avant sa solidification. Après incubation, on procède au dénombrement en choisissant la boîte qui contient entre 30 et 300 colonies.

# Dénombrement sur milieu solide

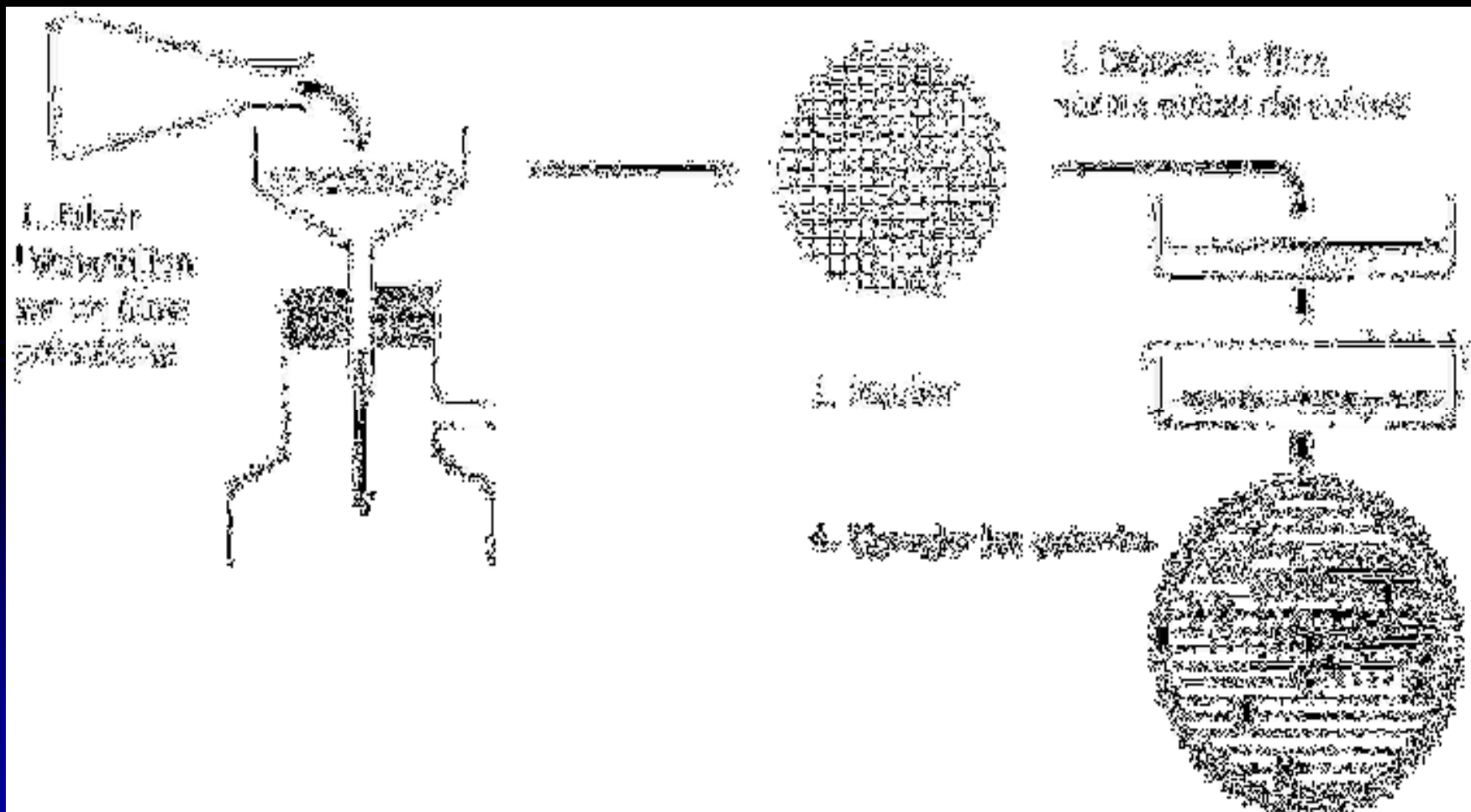
- Une bactérie, placée sur un milieu favorable, donnera naissance à une colonie macroscopiquement visible.  
**UFC** = Unité formant colonie
- Etalement en surface ou en profondeur







# Technique de filtration sur membrane



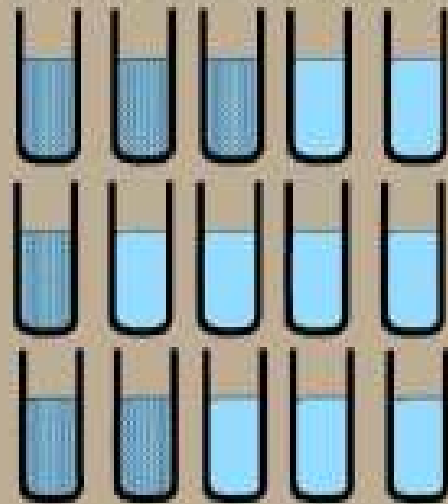
# Dénombrement en milieu liquide

- Pour chaque série de culture issue de la même dilution on compte le nombre de tubes positifs (3 séries identiques)
- On compose le nombre caractéristique, et la lecture de la table de **Mac Grady** nous donne le Nombre le Plus Probable: **NPP**.
  
- Avantages:
  - Mise en évidence d'un caractère particulier
  - Phase de réanimation, enrichissement tout fait pour suite
- Inconvénients:
  - Manque de précision (variabilité de  $\pm 1$  log)
  - Lourde à mettre en oeuvre

## 2.2. CULTURE LIQUIDE

## Estimation statistique

Nombre le plus probable (NPP)



1 ml dans 9 ml

$10^{-2}$	$10^{-3}$	$10^{-4}$	$10^{-5}$	$10^{-6}$
+	+	+	-	-
+	-	-	-	-
+	+	-	-	-
3	2	1	0	0

Table de Mac Grady

NPP

3	2	0	9
3	2	1	15
3	2	2	21

Bactéries/ml =  $15/10^{-2} = 1500$

# Table de Mac Grady pour 3 tubes par dilution

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



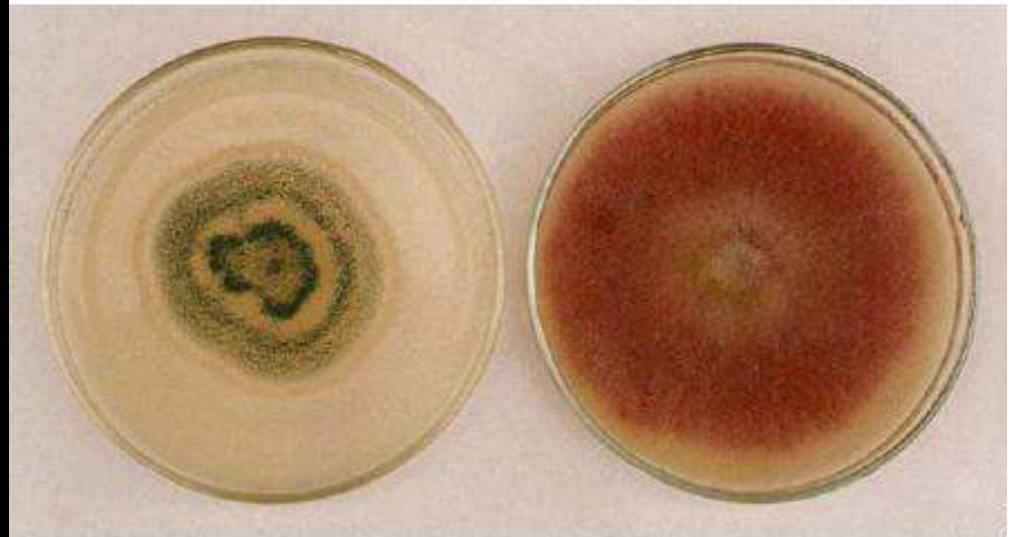
## 2- dénombrement des grands groupes microbiens



## champignon

Colonies obtenues après un premier passage sur le milieu PDA (A) ; les colonies de la boîte de Petri de gauche peuvent être isolées à partir d'un seul repiquage ; du fait d'une sporulation, celles de la boîte de Petri de droite nécessiteront plusieurs repiquages.

Culture d'*Aspergillus clavatus* (B, à gauche) et de *Fusarium camptoceras* (B, à droite) sur milieu PDA.



# Plan

## I – Généralités sur la microbiologie alimentaire

## II - Prélèvement et préparation des échantillons

### 1 - Prélèvements

- a) Echantillonnage
  - 1) Normes d'échantillonnage
  - 2) Méthode d'échantillonnage
  - 3) Choix des échantillons
- b) Fréquence des prélèvements
- c) Conditions du prélèvement
  - 1) Prélèvement en surface
  - 2) Prélèvement de produits liquides
  - 3) Prélèvement de produits solides

### 2 - Traitement de l'échantillon

- a) Transfert au laboratoire
- b) Préparation de l'échantillon
- c) Les techniques de broyages

### 3- Les voies de bio contamination et techniques d'asepsie

## III- Les milieux de culture

- Composition et classification
- Critères de choix des milieux de cultures
- Principes des réactions révélés par les milieux les plus utilisés
- Préparations et conservation

## IV-GERMES IMPORTANTS EN MICROBIOLOGIE ALIMENTAIRE

## V- PRINCIPALES METHODES DE RECHERCHE ET DE NUMERATION DES MICROORGANISMES DANS LES ALIMENTS

16/03/2020

## VI- ANALYSE MICROBIOLOGIQUE DE QUELQUES PRODUITS ALIMENTAIRES (EXPOSES)

167

***Bon courage***

16/03/2020

168



# Exposés à réaliser / Groupe

**Sujet 1:** Gestion de la qualité microbiologique des produits laitiers

**Sujet 2:** Contrôle de Qualité des thés et infusions

**Sujet 3:** Analyses, inspections et audits sur les aliments transformés

**Sujet 4:** Biotechnologies: Contrôle Qualité des Produits Alimentaires et Hygiène