

Chapitre V : Microorganismes intervenant dans l'industrie alimentaire

Parmi les germes importants en microbiologie alimentaire on peut citer les germes suivants :

1- Les bactéries lactiques :

Les bactéries lactiques sont des bactéries à Gram positif, aéro-anaérobies partiellement tolérantes à l'oxygène, asporulées, sous forme de coques ou de bâtonnets et capables de fermenter les sucres en acide lactique.

Elles sont présentes dans de nombreux milieux naturels : sol, plantes, animaux (cavités buccales, les fèces et le lait), et accompagnent l'activité humaine en tant que bactéries de la flore commensale des muqueuses et de la flore alimentaire. Le tractus gastro-intestinal des mammifères est colonisé par des bactéries lactiques comme *Bifidobacterium*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*.

Elles sont utilisées pour fabriquer des aliments fermentés. Leur production d'acide lactique permet d'acidifier le substrat et d'inhiber la prolifération de germes pathogènes ou d'agents indésirables provoquant des modifications organoleptiques. On trouve des bactéries lactiques dans les produits laitiers (yaourts, fromages), les légumes fermentés (olives, cornichons, choucroute), la charcuterie (jambon, saucissons) et le pain au levain.

• Aptitudes technologiques des bactéries lactiques :

a. Aptitude acidifiante :

Elle se manifeste par la production de l'acide lactique à partir de la fermentation des sucres au cours de la croissance bactérienne. Les conséquences, d'ordre physico-chimique et microbiologique, peuvent se résumer ainsi :

- Accumulation d'acide lactique participant à la saveur des aliments fermentés;
- Abaissement progressif du pH des milieux de culture et des matrices alimentaires;
- Limitation des risques de développement des flores pathogène et d'altération dans les produits finaux;
- Déstabilisation des micelles de caséines, coagulation des laits et participation à la synérèse.

b. Aptitude protéolytique et lipolytique :

Les bactéries lactiques démontrent des potentialités différentes, liées à leur équipement enzymatique, pour l'utilisation de la fraction azotée. Les lactobacilles présentent généralement une activité protéolytique plus prononcée que les lactocoques.

Les propriétés lipolytiques sont généralement faibles chez les bactéries lactiques, les lactocoques sont considérés comme plus lipolytiques que *Streptococcus thermophilus* et les lactobacilles. Elles peuvent cependant présenter un intérêt pour certaines applications fromagères.

c. Aptitude aromatisante :

Les bactéries lactiques sont capables de produire de nombreux composés aromatiques (tels que : l'a-acétolactate, l'acétaldéhyde, le diacétyl, l'acétoïne, le formiate, etc.). Cette fonctionnalité est particulièrement importante lors de l'élaboration des laits fermentés, des fromages frais, crèmes et beurre, dont l'arôme principal est lié à cette activité microbienne.

d. Aptitude texturante :

La capacité des bactéries lactiques à synthétiser des exopolysaccharides (EPS) joue un rôle important pour la consistance et la rhéologie des produits transformés. Les *Lb. delbrueckii ssp. bulgaricus* et *Streptococcus thermophilus* produisant des EPS sont utilisés dans la fabrication des yaourts, ceci afin d'améliorer la texture, éviter la synérèse et augmenter la viscosité des produits finis.

e. Activité antimicrobienne :

Les bactéries lactiques sont connues et utilisées pour les propriétés antimicrobiennes qu'elles développent. Elles sont dues aux métabolites excrétés : acide lactique et autres acides organiques, diacétyl, peroxyde d'hydrogène et surtout antibiotiques et bactériocines.

2- Les entérobactéries :

Les Entérobactéries (famille des *Enterobacteriaceae*) constituent l'une des plus importantes familles de bactéries, du point de vue quantitatif et qualitatif. Elle regroupe ainsi de nombreux genres ubiquitaires, fréquemment rencontrés en pathologie infectieuse ainsi que dans les bio-industries.

Ce sont des bacilles ou coccobacilles à Gram (-), de taille et de forme variable. Certains possèdent une capsule, aéro-anaérobies facultatifs, attaquant le glucose par voie fermentaire, immobiles ou mobiles par ciliature péritriche, non sporulés, oxydase (-), nitrate réductase (+).

Les entérobactéries sont des bactéries très ubiquitaires, certaines espèces sont seulement saprophytes (sols, eaux, végétaux, produits alimentaires : *Serratia marcescens*), mais la plupart des espèces sont commensales, isolées dans l'intestin de l'homme et des animaux, d'où le nom d'entérobactéries (*Escherichia coli*). Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme et les animaux et provoquent des troubles dont la gravité varie énormément d'une souche à l'autre. Certaines sont responsables de maladies des végétaux (phytopathogènes : *Erwinia*, *Pantoea*).

On appelle « coliformes », les entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C. Il s'agit d'un groupe de genres : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*.

3- Les bactéries saprophytes :

a. *Pseudomonas* et genres voisins :

Ce sont des contaminants fréquents des produits alimentaires. Ce sont des bacilles ou coccobacilles, Gram(-), aérobies strictes. Le genre *Pseudomonas* est le genre type. Ils sont asporulés, oxydase (+) ou (-), mais fermentation du glucose (-). Ils sont mésophiles ou psychrophiles, température optimale entre 20 et 30°C. Les colonies sont fréquemment pigmentées, avec une ciliature variable en fonction des espèces. Ils ont un pouvoir protéolytique et lypolytique.

Les genres les plus fréquents dans les aliments sont : *Pseudomonas*, *Flavobacterium*, *Xanthomonas*, *Acinetobacter*, *Chromobacterium*, *Alcaligees* et *Aeromonas*. L'espèce *Pseudomonas aeruginosa* provoque des gastroentérites à partir des aliments contaminés, ainsi que certains autres genres peuvent aussi donner des troubles digestifs.

b. Les bactéries acétiques :

Ce sont des bactéries à Gram (-), saprophytes, aérobies, asporulés, à métabolisme oxydatif. Ce sont des agents de « fermentation » acétique, leur caractéristique est la production d'acide acétique à partir d'éthanol. On distingue les genres *Acetobacter* (fabrication du vinaigre) et *Gluconobacter* (production d'acide gluconique).

4- Les bactéries sporulées :

a. Le genre *Bacillus* :

Les *Bacillus* appartiennent à la famille des bacillacées (*Bacillaceae*). Ce sont des bactéries à Gram (+), aérobies ou aéro-anaérobies facultatives, et tirent leur énergie par respiration ou fermentation, elles sont sporulés, hétérotrophes, saprophytes et ubiquitaires. Elles sont fréquemment retrouvées dans le sol, terre, poussière, en eau douce et eau de mer, etc.

On peut trouver des *Bacillus* dans des denrées alimentaires. Les espèces saprophytes sont responsables de multiples dégradations de produits alimentaires (sûrissement et caillage du lait, etc.). Ils résistent aux conditions défavorables et dégradent les conserves alimentaires. L'agent d'intoxication alimentaires et *Bacillus cereus*.

b. Le genre *Clostridium* :

Le genre *Clostridium* appartient à la famille des *Clostridiaceae*. Ce sont des bacilles à Gram (+), anaérobies strictes, sporulés, mobiles par ciliature péritriche, catalase (-), oxydase (-). Ce sont des germes saprophytes telluriques intervenant dans la putréfaction des déchets organiques (protéolytiques et saccharolytiques). Ils peuvent aussi se trouver en commensaux dans la flore intestinale.

Ils contaminent plusieurs produits alimentaires (eau, lait, viande, poisson, aliments fermentés et congelés et surtout les conserves). Certaines espèces sont responsables d'intoxications alimentaires comme *Clostridium perfringens*, ou de graves intoxications mortelles comme *Cl. botulinum*.

5- Les staphylocoques :

Ce sont des coques à Gram (+), immobiles, regroupés en amas, catalase (+), aéro-anaérobies facultatifs, pouvant donner des colonies pigmentées en jaune d'or. Ils sont halophiles, protéolytiques. Ce sont des bactéries commensales de la peau et des muqueuses des animaux et de l'homme, où ces bactéries peuvent être à l'origine d'infections cutanées.

Ils contaminent fréquemment les aliments et peuvent entraîner des dégradations et des problèmes sanitaires. L'espèce *S. aureus* produit une coagulase, est pathogène. Elle provoque une intoxication alimentaire qui est due uniquement à l'entérotoxine (de nature peptidique, thermorésistante) et non au pouvoir invasif.

6- Les Vibrio :

Le genre *Vibrio* appartient à la famille des Vibrionaceae. Il regroupe des espèces souvent saprophytes des eaux et quelques espèces très pathogènes transmises par l'eau et les produits en contact avec l'eau. Ce sont des bacilles à Gram (-), en forme de bâtonnets incurvés, asporulés, très mobiles, oxydase (+), catalase (+), aérobies ou anaérobies selon les espèces.

Parmi les espèces pathogènes pour l'homme, le *Vibrio cholerae*, agent de la maladie du cholera, *V. parahaemolyticus* responsable de toxi-infections intestinales.

7- Les actinobactéries :

Ce vaste ensemble regroupe des familles variées de bactéries présentant en général des morphologies particulières. Les « actinobactéries » sont des bactéries à Gram (+), asporulées, de différentes formes : des formes bacillaires irrégulières, des structures de type ou d'apparence mycéliens avec ramifications, certaines espèces forment des conidies. Ces bactéries sont souvent aérobies, quelquefois anaérobies, catalase (+). Un certain nombre d'espèces sont saprophytes, quelques unes sont pathogènes.

Les principales bactéries rencontrées en industrie alimentaire sont :

a. Les bactéries corynéformes saprophytes :

Il s'agit des bactéries présentant des caractères proches du genre *Corynebacterium*. Les germes de ce groupe intéressant l'industrie alimentaire appartiennent aux genres *Arthrobacter*, *Aureobacter*, *Brevibacterium*, *Caseobacter*, *Cellulomonas*, *Coryne-bacterium*, *Microbacterium*, *Rarobacter*, etc. Leurs formes et arrangements sont irréguliers. Il s'agit d'espèces saprophytes fréquentes comme contaminants banaux et habituellement non pathogènes. Certaines espèces jouent un rôle dans l'industrie fromagère, en particulier les genres *Brevibacterium* et *Caseobacter*.

b. *Propionibacterium* :

Les *Propionibacterium* sont des bacilles de formes et d'arrangements irréguliers, à cellules allongées. Les colonies sont parfois pigmentées. Le pH favorable est la neutralité ; toutes les souches se développent à 30 °C. Le métabolisme est de type fermentaire. Ce genre regroupe de nombreuses espèces dont certaines sont parasites, parfois pathogènes et n'interviennent pas dans l'alimentation, et d'autres saprophytes, rencontrées fréquemment dans les produits laitiers. Ces dernières espèces sont utilisées en fromagerie : elles sont responsables de

l'ouverture des fromages à pâte pressée cuite (Gruyère, emmenthal : *Propionibacterium shermanii*).

c. *Streptomyces* :

Quelques espèces du genre *Streptomyces* peuvent intervenir en alimentation. Ce sont des bactéries saprophytes du sol, apparaissant sous forme de filaments ramifiés portant des conidies en chaînes parfois très longues. Les colonies sont de grande taille souvent pigmentées et d'aspect fongique. Les *Streptomyces* peuvent se développer dans certains aliments et causer des odeurs et goûts désagréables. Ils sont faiblement protéolytiques et ne sont pas pathogènes. On les rencontre parfois dans l'eau des citernes ou retenues d'eau d'alimentation, où ils donnent un goût de terre dû à la géosmine ou au méthyl-isobornéol, et quelquefois sur les poissons.

d. Les mycobactéries :

Il s'agit de bactéries appartenant au genre *Mycobacterium*. Ce sont des bacilles avec des éléments renflés et pratiquement jamais de ramification. Il existe des espèces saprophytes n'intervenant pas dans l'alimentation et quelques espèces pathogènes qui peuvent être transmises par certains aliments : viandes, lait cru. Il s'agit essentiellement des espèces *Mycobacterium tuberculosis* et *Mycobacterium bovis*, responsables de la tuberculose, maladie grave atteignant le système lymphatique, pulmonaire et/ou osseux.

8- *Brucella* :

Le genre *Brucella* appartient à la famille des Brucellaceae. Ce sont de très petits coccobacilles à (-), immobile, non encapsulée, non sporulée, flagellée, aérobie stricte, oxydase (+).

Certaines espèces sont pathogènes pour l'homme, elles sont transmises par l'alimentation : lait cru, viande, fromages, etc. Elles provoquent la maladie de la brucellose ou la fièvre de Malte (exemples : *Brucella suis*, *B. melitensis* et *B. abortus*).

9- *Listeria* :

Ce sont des bacilles de petite taille, mobiles, gram (+), catalase (+), non sporulées, anaérobies facultatifs. Ce sont des bactéries ubiquistes qu'on trouve dans le sol, sur les végétaux, dans l'eau, etc. Elle résiste au froid, prolifère dans le réfrigérateur et survit dans le congélateur, mais est tuée par la chaleur.

L'espèce *Listeria monocytogenes* est pathogène et provoque la listériose, qui peut être transmise par les légumes, les viandes et volailles crues, les œufs, le lait et produits laitiers (fromages).

10- Les levures et moisissures :

Les levures et les moisissures, regroupées sous le nom de "Mycètes" ou "champignons", forment, comme les bactéries, un groupe important de micro-organismes.

Les levures sont des mycètes unicellulaires, de formes variées, se reproduisant par bourgeonnement ou par fission. Les moisissures sont des mycètes pluricellulaires, mycéliens, se reproduisant par envahissement ou par spores de reproduction.

Les mycètes sont présents partout, dans le sol (substances organiques en décomposition), dans l'eau, dans l'air (qui véhicule de grandes quantités de spores) et dans les aliments. Les mycètes trouvent dans les aliments les nutriments nécessaires à leur croissance, ce qui entraîne une détérioration rapide du produit.

Les levures sont utilisées dans certaines fabrications comme la panification, production d'alcool industriel, production de levures en tant que source de protéines et de vitamines B, l'affinage de certains fromages et la production d'enzymes et de vaccins.

Les moisissures sont très utiles dans la dégradation de déchets organiques et l'humification des sols. Dans l'industrie, ils sont utilisés dans certains produits laitiers (fromages), production de molécules à activité pharmacologique (antibiotiques, protéines), production d'enzymes industrielles, de métabolites secondaires divers et peuvent contribuer à la valorisation des déchets des industries alimentaires.

Du point de vue sanitaire, les moisissures présentes dans les aliments sont habituellement considérées comme inoffensives, mais certaines souches de moisissures peuvent produire des mycotoxines redoutables, particulièrement dans les céréales, les produits céréaliers et les oléagineux. Les intoxications alimentaires à cause des mycètes sont peu fréquentes.

Chapitre VI : Microorganismes des principaux produits alimentaires

1- Flore microbienne de l'eau :

Les microorganismes rencontrés dans l'eau sont de trois types :

- des germes aquatiques (algues microscopiques, *Vibrio*, *Pseudomonas* ...),
- des germes telluriques (sporulés, *Streptomyces*, spores fongiques),
- des germes de la contamination humaine et animale (liés à la pluie, aux végétaux et animaux et à l'industrie: coliformes fécaux, *E. coli*, *Lactobacillus*, sporulés anaérobies, levures et moisissures ...).

La contamination de l'eau est à l'origine de nombreuses maladies qualifiées de maladies d'origine hydrique (gastro-entérites ou toxi-infections intestinales).

2- Microbiologie du lait :

Le lait contient peu de microorganismes s'il est prélevé dans de bonnes conditions (< 103 germes/mL) : des germes saprophytes du pis et des canaux galactophores (microcoques, streptocoques lactiques ...), ou des pathogènes de vaches malades (streptocoques pyogènes, staphylocoques, *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium* ...).

Le lait peut se contaminer au cours de sa manipulation par : le sol et la peau de l'animal (coliformes, entérocoques, *Clostridium*, *Salmonella*), par le sol (*Streptomyces*, *Listeria*, sporulés, spores fongiques ...), équipement de traite (microcoques, levures, lactobacilles, streptocoques ...) et des manipulateurs (staphylocoques des mains, germes d'expectorations et de contamination fécale).

3- Microbiologie des œufs et ovo-produits :

L'œuf est un bon substrat pour les microorganismes, mais il est protégé de façon efficace par sa structure (coquille), l'intérieur est stérile. La contamination de surface provient du cloaque (coliformes, entérobactéries ...), du sol (sporulés, moisissures), et des manipulations.

La contamination interne provient soit avant la ponte (maladie), soit après la ponte (entérobactéries pathogènes, *Mycobacterium*, *Salmonella*, *Serratia* ...).

4- Microbiologie de la viande :

La chair de l'animal sain vivant est pratiquement stérile. Chez l'animal malade, la contamination peut se faire par le système lymphatique.

La contamination peut avoir lieu au moment de l'abattage par la flore de la peau (microcoques, *Pseudomonas*, staphylocoques, lactobacilles, streptomycètes ...), du tube digestif (*E. coli*, *Clostridium perfringens*, streptocoques fécaux, *Salmonella*), ou par des manipulations et du stockage par l'air, le sol, l'eau de lavage ... (*Pseudomonas*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Salmonella*, *shigella*, *Staphylococcus*) et par des insectes.

5- Microbiologie des poissons et des produits de la mer :

La chair des poissons et des crustacés est stérile. La flore des poissons est influencée par celle du milieu aquatique.

Les régions contaminées sont les branchies, le mucus qui recouvre la peau (flore ± psychrophile : *Pseudomonas*, *Achromobacter*, *Aeromonas*, *Falvobacterium*, *Serratia*, *Proteus*, *Vibrio*, *Bacillus*, *Corynebacterium* ...), et le tube digestif (*Achromobacter*, *Pseudomonas*, *Escherichia*, *Clostridium* ...).

6- Microbiologie des céréales :

La flore des graines est composée de germes parasités (moisissures) ou saprophytes en surface (*Peudomonas*, microcoques, lactobacilles, sporulés, coliformes, levures ...), et certains germes phytopathogènes (charbon, rouille, mildiou, *Claviceps purpura*).

En conditions de stockage, les céréales peuvent être contaminées en anaérobiose par des levures et lactobacilles, ou par des moisissures en aérobiose dont certaines peuvent être toxigènes.

7- Microbiologie des fruits et légumes :

La flore originale est constituée par des saprophytes de l'eau, l'air et le sol (corynéformes, actinomycètes, streptocoques, sporulés, coliformes, levures, moisissures ...), et une flore phytopathogène (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, champignons et quelques virus : mosaïque).

La flore de contamination provient du sol, de l'air, du fumier, de l'eau d'arrosage, des manipulations et des prédateurs (insectes) (germes saprophytes, phytopathogènes, staphylocoques, *Salmonella*, parasites et virus).

Chapitre VII : Techniques de contrôle microbiologique des aliments

Intérêt de la bactériologie alimentaire :

La maîtrise de la qualité microbiologique (*hygiénique* obligatoire et *marchande* souhaitée par le fabricant mais aussi le consommateur) passe par un ensemble de démarches qui vont du contrôle des matières premières brutes, en cours de transformation ou de l'aliment fini, aux bonnes pratiques de fabrication.

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

Les méthodes d'analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans les aliments afin d'en maîtriser leur présence ou absence (dans le cas de germes dangereux responsables de maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas de germes peu dangereux, contaminants ou hôtes normaux des matières premières composant la denrée).

1- But du contrôle microbiologique des aliments :

L'analyse bactériologique des produits alimentaires est indispensable pour :

- Assurer au produit une bonne qualité commerciale et une bonne conservation.
- Garantir la sécurité des consommateurs en par la détection des microorganismes pathogènes et éventuellement de métabolites toxiques.

2- Echantillonnage et prélèvements :

a. Définitions :

- Un « lot » : est une partie d'une même livraison ou d'une même fabrication présentant les mêmes caractéristiques (produits dans des conditions identiques, dans un endroit identique, et une période de production déterminée).
- Un « échantillon » : est un élément ou un ensemble d'éléments, prélevé au sein d'un lot donné.
- Un « prélèvement » : est une quantité aliquote ou un élément indivisible prélevé au sein d'un lot (parfois appelé échantillon élémentaire).

b. Critères d'échantillonnage :

Le prélèvement doit être réalisé selon les critères d'échantillonnage, il doit être statistiquement représentatif du lot étudié, sans modifier la microflore du produit dont il est issu (lot) et sans apporter de microorganismes étrangers (ni changement qualitatif ni quantitatif).

Les échantillons doivent être choisis au hasard, d'une façon homogène, en prélevant un nombre déterminé d'unités, dans des conditions d'asepsie rigoureuse.

c. Techniques de prélèvements :

Produits alimentaires liquides :

Lorsque le liquide est contenu dans un récipient le prélèvement peut être effectué par des instruments stériles (pipette, louche, flacon lesté), après homogénéisation du liquide.

Quand le liquide est prélevé à partir d'un récipient muni d'un robinet, ou d'un réseau (eau par exemple), il faut d'abord prendre le soin de purger le circuit pour éliminer le liquide des zones de stagnation, puis désinfecter le robinet (métallique) à l'aide d'une torche. Le prélèvement sera recueilli dans un flacon stérile et doit être refermé aussitôt.

Produits alimentaires solides :

Selon le produit, et dans le cas de produit de grand volume, le prélèvement sera effectué au scalpel (carcasse de viande), à la sonde (fromages et produits mous) ou à la pipette harpon (produit de consistance solide), ou avec une spatule (produit de consistance molle).

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. Le prélèvement est mis dans un sachet stérile.

Dans le cas où les produits se présentent sous forme d'unités emballées en faible volume, quelques unités seront recueillies en l'état, en s'assurant d'être bien identifié.

Prélèvement en surface :

Ils permettent l'étude de la flore présente sur la surface de l'aliment, le matériel de fabrication, les récipients et emballages, les plans de travail, les murs et sols des locaux et éventuellement les mains du personnel. Il existe plusieurs techniques :

- par écouvillonnage
- par rinçage
- par emploi d'un ruban adhésif
- par impression directe sur milieu gélosé, etc.

d. Conservation et transfert des échantillons :

Les échantillons doivent être étiquetés (numéro d'ordre, date, heure, lieu précis, modalités de prélèvement, température, pH d'un aliment voisin, nom de la personne ayant effectué le prélèvement, ...).

Le temps séparant le prélèvement et l'analyse doit être le plus court possible. Les prélèvements doivent être transférés dans des enceintes isothermes (glacières).

3- L'analyse :

La préparation des échantillons nécessitera l'ouverture aseptique des récipients fermés (produits emballés, bouteilles, conserves) et l'homogénéisation ou la fluidisation des produits non liquides. Cette opération consiste parfois en un broyage couplé à une première dilution.

Pratiquement, toutes les analyses s'effectuent à partir d'une suspension liquide, de concentration connue. Pour les produits solides, ils sont broyés et homogénéisés dans un diluant stérile pour obtenir une première dilution à 10^{-1} (Solution Mère) qui pourra être diluée par la suite.

Les protocoles d'analyses à effectuer diffèrent en fonction de l'aliment et des microorganismes recherchés, en utilisant des techniques spécifiques qui sont précisées par la réglementation.

a. Dénombrement des microorganismes :

Plusieurs techniques sont utilisées pour la numération des microorganismes dans un échantillon d'aliment, parmi lesquels :

- **Méthodes microscopiques directes**, par utilisation des lames de numération (hématimètre, cellules de Thoma et de Malassez, technique de Breed, épifluorescence, ...).
- **Dénombrements après culture** des microbes viables (vivants), ils s'effectuent soit :
 - *en milieu gélosé* : où un volume connu de suspension mère ou des dilutions est incorporé dans la masse d'un milieu gélosé. Après incubation, les colonies sont comptées et les résultats sont exprimés en UFC/ml de l'échantillon.
 - *En milieu liquide* : où une série de tubes contenant un milieu de culture liquide convenable sont inoculés par un volume de solution mère ou des dilutions. Les résultats sont interprétés par la technique du nombre le plus probable NPP.
 - *Dénombrement après filtration* : des membranes sur lesquelles les bactéries ont été retenues sont déposées sur des milieux gélosés adaptés, et les colonies sont comptées comme précédemment.
- **Méthodes d'évaluation et d'estimation** de la population microbienne par la détection de l'activité métabolique des microorganismes : l'activité enzymatique, la concentration des métabolites, modification du milieu, ... (la turbidimétrie, la bioluminescence, mesure de variation du potentiel redox, radiométrie, impédance, ...).

b. Identification microbienne :

L'identification microbienne est une méthode qui permet de reconnaître un microorganisme par l'étude de ses caractères. Elle comporte plusieurs étapes successives et variables selon le microorganisme, chaque résultat oriente vers l'étape suivante, à l'aide de la clé d'identification adéquate. Elle s'effectue sur une souche pure.

L'identification comprend :

- l'étude des caractères cultureux : aspects des colonies sur divers milieux de culture.
- l'étude des caractères morphologiques et structuraux : forme, taille et regroupements des cellules, structure de la cellule microbienne, ...
- l'étude des caractères biochimiques et physiologiques : les aspects du métabolisme microbien (catabolisme et anabolisme) et la présence d'enzymes.
- l'étude des modes de reproduction pour les mycètes (levures et moisissures)
- l'étude des caractères immunologiques (sérologiques) : détection des microorganismes par réaction Ag-Ac.
- l'étude des caractères génétiques : étude du génome microbien (%GC, hybridation ADN-ADN, séquençage des Ac nucléiques, ...),
- l'étude du pouvoir pathogène éventuel.

4- Interprétation des résultats :

a. Le plan à deux classes :

Deux réponses sont possibles :

- 1^{er} cas : présence ou absence d'un microorganisme dans une quantité donnée d'aliment:

Ce type de réponse concerne certaines bactéries très pathogènes, dans le cadre de la sécurité alimentaire. Aucune tolérance, par exemple, n'est acceptée pour *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, pour l'entérotoxine staphylococcique, etc. La qualité d'un aliment ne peut être jugée satisfaisante qu'en absence de ces bactéries pathogènes, ceci dans toutes les unités de l'échantillon.

- 2^{ème} cas : nombre de microorganismes supérieur ou inférieur à une limite :

La qualité est considérée satisfaisante lorsque toutes les valeurs sont inférieures à la limite fixée. Par exemple : la recherche de *Listeria monocytogenes* dans les aliments prêts à être consommés, le nombre d'unités de prélèvement est $n=5$ et la limite fixée de 10^2 ufc/g. si les cinq unités de prélèvement donnent des résultats inférieurs à cette limite, la qualité du produit peut être considérée comme satisfaisante.

b. Le plan à trois classes :

L'interprétation des résultats prend en considération quatre (4) paramètres :

- n , le nombre d'unités de l'échantillon.
- m , et M les limites fixées pour la concentration du microorganisme recherché.
- c , le nombre maximum d'unités de l'échantillon pour lequel la concentration microbienne peut se situer entre m et M .

- 1^{er} cas : toutes les valeurs obtenues sont inférieures ou égales à m :

La qualité de l'aliment est, sur ce critère, satisfaisante.

- 2^{ème} cas : un maximum de c/n valeurs sont comprises entre m et M :

La qualité de l'aliment est considérée comme acceptable.

- 3^{ème} cas : plus de c/n valeurs sont supérieures à M :

La qualité est considérée comme insatisfaisante.

Exemple : numération des staphylocoques à coagulase positive dans les fromages au lait cru.

$N = 5$, $c = 2$, $m = 10^4$ ufc/g, $M = 10^5$ ufc/g.

Qualité satisfaisante : tous les résultats sont inférieurs à 10^4 ufc/g.

Qualité acceptable : un ou deux résultats sont compris entre 10^4 et 10^5 ufc/g.

Qualité insatisfaisante : plus de deux valeurs sont supérieures à 10^5 ufc/g.

----- *** -----

Chapitre VIII : Analyses microbiologiques de quelques aliments

I- Les microflores recherchées :

1- Recherche des germes pathogènes :

La mise en évidence de la contamination par des germes pathogènes (ou généralement pathogènes) permettra de remédier aux défaillances de la préparation de l'aliment.

La recherche de ces germes a lieu directement ou après enrichissement (mettre le germe dans un milieu pour favoriser le développement du microorganisme et augmenter sa population).

Les germes pathogènes généralement recherchés sont : les entérobactéries pathogènes (*Salmonella*, *Shigella*, *E. coli* entérotoxigènes, *Yersinia enterocolitica*), Vibrions pathogènes, *Campylobacter*, staphylocoques entérotoxiques, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*, *Cl. botulinum*, *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium*, etc.

2- Microorganismes pour tester l'hygiène générale :

L'hygiène des procédés peut être contrôlée grâce à la recherche d'indicateurs qui révèlent un défaut des bonnes pratiques de fabrication.

a. Flore totale ou Flore globale ou Flore mésophile totale :

Le dénombrement de cette flore reflète que le produit peut être contaminé par un défaut du procédé, des matières premières, des manipulations ayant apporté de nombreux germes. Cet ensemble de germes risque fort d'altérer l'aliment et signe un grave défaut d'hygiène dans le procédé.

b. Indicateurs de contamination fécale :

Une contamination fécale fait soupçonner la présence possible de *Salmonella* et autres bactéries pathogènes. La contamination d'un aliment par les matières fécales montre qu'il n'est ni préparé ni conservé dans de bonnes conditions d'hygiène.

- Les Entérobactéries, les coliformes, coliformes thermotolérants et *E. coli* :

La numération des entérobactéries est intéressante au niveau industriel comme test de qualité hygiénique globale, ils peuvent être considérés comme germes indicateurs de mauvaises conditions de manipulation de fabrication.

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant le lactose avec production de gaz à 30°C (germes : *Escherichia*, *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*) ou 37°C.

Les coliformes thermotolérants (fécaux) le font aussi à 44 °C, et *E. coli* est un coliforme fécal indole (+) à 44 °C. Ces bactéries sont commensales de l'intestin et survivent en saprophytes à l'extérieur plus ou moins longtemps : *E. coli* ne survit que peu de temps à l'extérieur et sa présence traduit donc une contamination fécale récente. Il en est probablement de même pour les coliformes thermotolérants.

- Les streptocoques fécaux (Entérocoques) :

Les entérocoques sont des streptocoques d'origine fécale, correspondant au genre *Enterococcus* et aux streptocoques du groupe D de Lancefield. Elles résistent mieux aux mauvaises conditions que les entérobactéries, ils ne doivent donc pas être considérés s'ils sont seuls présents comme indicateurs de contamination fécale.

- Clostridium sulfitoréducteurs :

Ce sont des bacilles à Gram (+), anaérobies strictes, sporulés, commensaux de l'intestin, telluriques (sol), réduisant les sulfites en sulfures ; trois dénombrements peuvent être réalisés :

* spores et formes végétatives (contamination fécale, ou par le sol, récente ou ancienne), sur les eaux ;

* dénombrement des anaérobies sulfitoréducteurs à 46 °C pour la mise en évidence de *Cl. perfringens* responsable d'infection d'origine alimentaire ;

* dénombrement spécifique de *Cl. perfringens* comme indicateur d'hygiène du procédé de cuisson ou refroidissement dans les produits à base de viande.

c. Les staphylocoques :

Leur recherche est considérée comme indicateurs de contamination dans les aliments crus, et signalent des contaminations humaines par manipulation ou par voie aérienne, ou une contamination initiale d'un produit animal.

d. Les levures et moisissures :

Ils constituent une bonne flore indicatrice de la qualité générale, essentiellement pour les produits d'origine végétale, ou une contamination environnementale durant le procédé.

II- Analyse microbiologique de quelques aliments : (Voir tableau)

Aliment	Germe recherché / Analyses effectuées
L'eau	Coliformes Coliformes thermo tolérants Streptocoques fécaux Dénombrement des bactéries revivifiables à 22°C et 37°C Spores de bactéries anaérobies sulfite réducteurs
Le lait	Microorganismes aérobies totaux à 30°C - Phosphatase Coliformes à 30°C - Peroxydase Coliformes thermo tolérants - Stabilité à l'ébullition <i>Staphylococcus aureus</i> - Acidité <i>Salmonella</i> - Nombre de cellules <i>Streptococcus</i> β- hémolytiques somatiques
Œufs et Ovoproduits	Dénombrement de la flore aérobie mésophile (Flore totale) Dénombrement des Entérobactéries (Coliformes et E. coli) Recherche et dénombrement de <i>Staphylococcus aureus</i> et/ou <i>Pseudomonas</i> Recherche de <i>Salmonella</i> dans 25 g Recherche de staphylocoques entérotoxiques (pour les ovoproduits)
La viande	Dénombrement de la flore aérobie mésophile (Flore totale) Recherche des indicateurs fécaux (coliformes, coliformes fécaux) Recherche de <i>Staphylococcus aureus</i> Recherche des anaérobies sulfitoréducteurs Recherche de <i>Salmonella</i> Les levures et moisissures
Poissons et produits de la mer	Evaluation de la fraîcheur du poisson par l'inspection des caractères organoleptiques (odeur, aspect général, rigidité, la peau, les écailles, l'œil, ...) Dénombrement de la flore totale à 30 °C ou 37°C Dénombrement de la flore halophile Dénombrement des coliformes (identification de E. coli) ou dénombrement des coliformes fécaux Recherche de germes pathogènes : <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Vibrio</i> Eventuellement, dénombrement des Entérobactéries
Fruits et légumes	Dénombrement de la flore aérobie mésophile (Flore totale) à 30 °C Recherche de la flore fongique Recherche de la flore particulière (pectinolytique), germes pathogènes Recherche de la flore phytopathogène (<i>Xanthomonas</i> , <i>Erwinia</i> , ...) Détection de certaines moisissures