

# TECHNIQUES DE CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE



RAHMOUN MALIKA

1.0

03.03.2024

# Table des matières

<b>Objectifs</b>	<b>3</b>
<b>I - CHAPITRE II : Techniques classiques de numérations</b>	<b>4</b>
1. Numération microscopique .....	4
2. Exercice .....	6
3. Numération en milieu solide .....	6
3.1. Technique de numération dans la masse de la gélose .....	7
3.2. Technique de numération en surface de la gélose .....	8
3.3. Dénombrement après filtration sur membrane .....	9
4. Exercice .....	10
5. Numération en milieu liquide : .....	10
5.1. Dénombrement à un seul essai .....	11
5.2. Dénombrement à essais multiples «technique du nombre le plus probable NPP» : .....	11
5.3. Mesure de la biomasse des bactéries : mesure du trouble (ou absorbance) .....	13
6. Exercice : Quelle est le principe de la spectrophotométrie ? .....	13

# Objectifs

Les fabrications dans les bio-industries supposent la maîtrise des développements microbiens, aussi bien des souches de cultures utilisées en fermentation, que des micro-organismes contaminants qui peuvent perturber à des degrés divers, le déroulement de la fabrication et mettre en cause la qualité et la conservation du produit final.

Ainsi, les contrôles doivent permettre de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande du produit ; et aussi minimiser les pertes dues à des mauvaises conditions de fabrication, et donc d'avoir le moins possible de produits non conformes.

A l'issu de module, l'étudiant doit

- Pouvoir reconnaître l'importance du contrôle microbiologique pour la santé humaine et animale.
- Savoir estimer la quantité de micro-organismes dans un échantillon.
- Être capable de trancher sur la qualité d'un produit, qu'elle soit microbiologique ou marchande.

# I CHAPITRE II :

## Techniques classiques de numérations

Le terme « dénombrement d'une flore » signifie que l'analyse microbiologique doit permettre de quantifier dans l'échantillon une flore particulière. Le résultat d'une telle analyse quantitative est rendu sous forme d'une concentration en micro-organismes (appartenant à une flore particulière) par unité de masse ou de volume d'échantillon.

Bien que de nombreuses techniques de numération soient utilisables, il n'existe pas à l'heure actuelle de techniques parfaites. Certaines méthodes ne permettent pas de différencier les germes vivants des germes morts, d'autres s'avèrent incapables de compter individuellement les cellules microbiennes lorsque celles-ci sont associées (Staphylococcus, Streptococcus, mycélium, etc) et permettent d'évaluer des unités formant colonies (UFC) ou des unités formant trouble (UFT) [4].

### **1. Numération microscopique**

Il s'agit d'un dénombrement par observation directe ; la numération cellulaire est réalisée par comptage au microscope, à l'aide d'une lame de comptage spéciale ou cellule de numération ou hématimètre (Cellule de Malassez) (figure 1). En effet, Il existe deux grands types principaux de cellules de numération (Cellule de Thoma et la Cellule de Malassez, la plus courante).

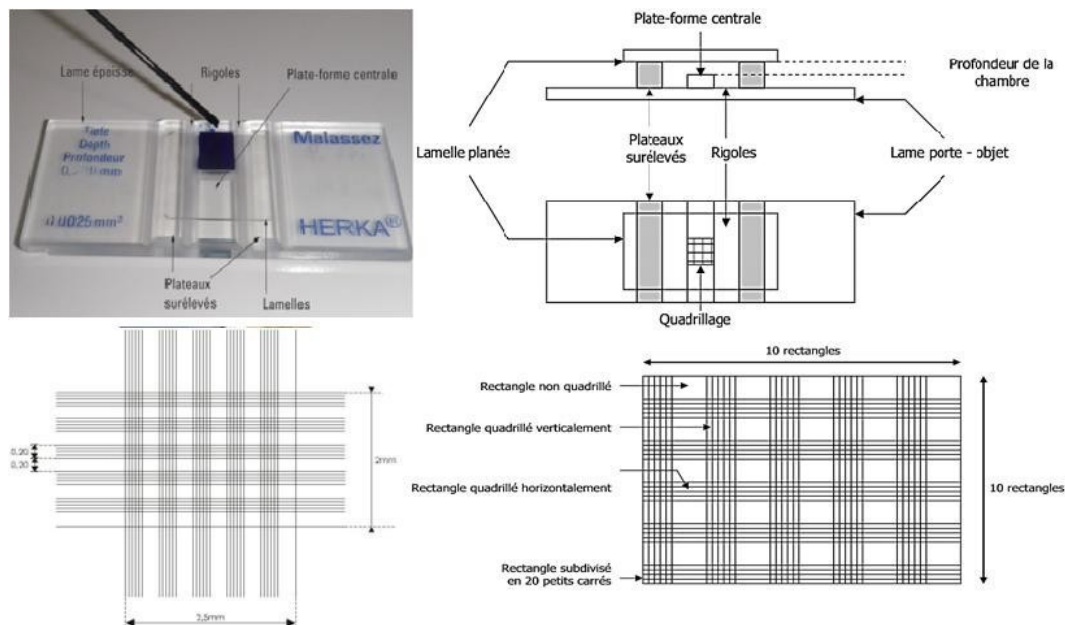


Figure 1. Cellule de Malassez

Vidéo explicative sur l'utilisation de la cellule de Malassez, [ici](#)

## Définition

Une cellule de numération est une lame porte objet dans laquelle est creusée une chambre de comptage de volume connu. C'est une lame épaisse en verre, comportant des rigoles et un quadrillage.

Lorsque la suspension cellulaire est trop concentrée, il est nécessaire de réaliser une dilution préalable de façon à permettre le comptage des cellules au microscope.

Le volume de comptage est déterminé par la surface du quadrillage gravé sur la lame et la profondeur de la chambre. Le volume correspondant au quadrillage total est égal à  $1 \text{ mm}^3 = 10^{-6} \text{ dm}^3$  ( $10^{-3} \text{ cm}^3$  donc  $1 \mu\text{l}$ ), Chaque rectangle correspond à un volume 100 fois plus faible, soit  $0,01 \text{ mm}^3 = 10^{-8} \text{ dm}^3$ .

- Humecter les deux plateaux latéraux. Faire adhérer parfaitement la lamelle aux plateaux latéraux : pour cela placer la lamelle sur ces plateaux, puis à l'aide des pouces posés sur la lamelle, exercer une pression sur la lamelle tout en pratiquant un mouvement de va et vient jusqu'à perception d'une résistance.
- Placer la cellule de comptage sur une surface plane. Homogénéiser la suspension cellulaire, et prélever celle-ci à l'aide d'une pipette Pasteur. Remplir la chambre de comptage par capillarité, en plaçant la pointe de la pipette légèrement inclinée près de la lamelle sur la plate-forme centrale quadrillée. Le remplissage doit être fait en une seule fois, sans bulles d'air, et sans faire déborder le liquide dans les rigoles. Laisser sédimenter les cellules sur le quadrillage quelques minutes, et passer à la numération.
- Observer à l'objectif x10 pour repérer la position du quadrillage, et vérifier l'homogénéité de la répartition des cellules à compter (si la répartition est mauvaise, recommencer).
- Observer ensuite à l'objectif x40 pour réaliser le comptage (1 rectangle par champ).
- Compter les cellules contenues dans 4, 10, 20 ou dans la totalité des 100 rectangles du quadrillage (figure 2).

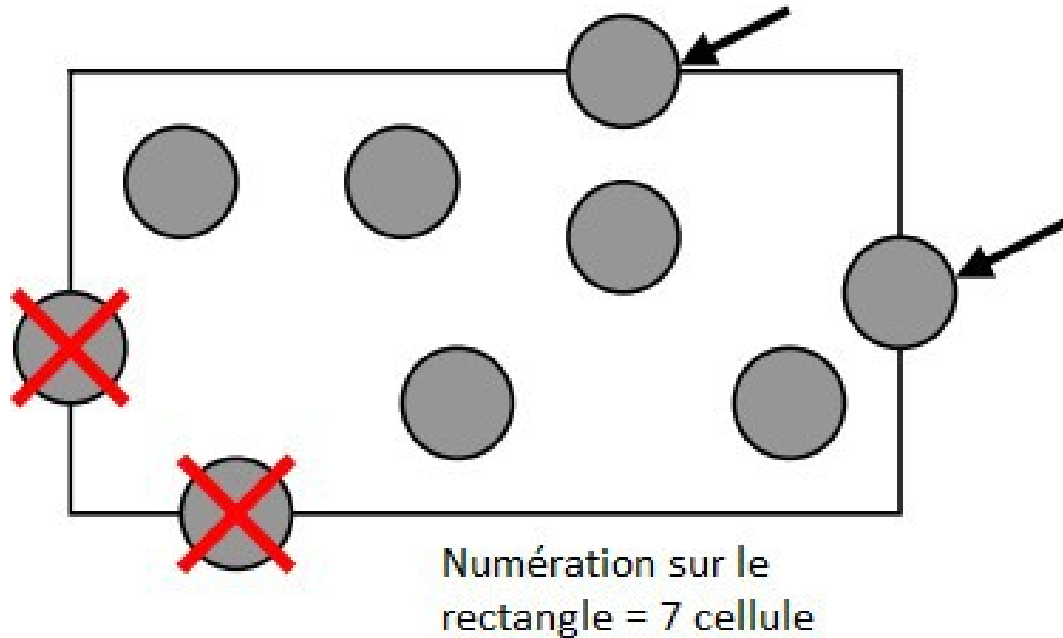


Figure 2. Lecture de la cellule de Malassez

### Remarque

Pour les cellules chevauchant les lignes de quadrillage, compter seulement celles qui chevauchent 2 arêtes du rectangle sur 4 (en pratique, on choisit de prendre en compte les cellules chevauchant la ligne horizontale supérieure, et la ligne verticale droite).

### Complément

Après avoir effectué la manipulation, on calcule la concentration cellulaire de la suspension de cellules étudiée.

$$N = (n / V) \times f$$

- n : nombre de cellules comptées
- V : volume de comptage
- f : facteur de dilution
- N : nombre de cellules par litre

## 2. Exercice

La numération des bactéries en utilisant la cellule THOMA nécessite l'utilisation d'un microscope optique, à quel objectif se fait l'observation ?

## 3. Numération en milieu solide

Cette méthodologie est le plus fréquemment réalisée dans des boîtes de Pétri. Elle repose sur le principe que toute bactérie vivante introduite dans la masse ou en surface d'un milieu gélosé favorable donne en principe naissance après incubation à une colonie macroscopique. Le nombre total de colonies correspond alors au nombre d'UFC présents dans l'inoculum.

### 3.1. Technique de numération dans la masse de la gélose

Les milieux gélosés (répartis en erlenmeyer ou en flacon de 15 ml) sont liquéfiés au bain-marie bouillant ou au four à micro-ondes, puis maintenus en surfusion dans un bain-marie à  $45 \pm 1^\circ\text{C}$ , 1 ml du liquide dans lequel on veut connaître le nombre de micro-organismes est introduit au centre de la boîte de Pétri posée bien à plat dans la zone de protection du bec Bunsen. L'inoculum peut être réparti en gouttes sur le fond de la boîte. Afin de n'utiliser qu'une seule pipette stérile pour toutes ces opérations il est recommandé de commencer l'ensemencement par la dilution la plus grande pour terminer avec le liquide non dilué. Les essais sont pratiqués en duplicata (ou triplicata si possible) pour chaque dilution.

Sur chaque boîte : l'origine de l'analyse, le milieu utilisé et la dilution correspondante sont enregistrés (sur le côté de façon à ne pas être gêné par la suite pour le comptage).

#### Exemple : Dénombrement des germes sulfito-réducteurs

---

**Principe :** Les Clostridium sulfito-réducteurs sont mis en évidence en utilisant la gélose viande foie (VF) à laquelle on ajoute le sulfite de sodium (milieu sélectif des Clostridium qui réduisent les sulfites en sulfures) et l'alun de fer qui permettent la formation d'un complexe noir entre le fer et le sulfite réduit par les Clostridium.

#### **Mode opératoire :**

Fondre un flacon de gélose de VF, le refroidir dans un bain d'eau à  $45^\circ\text{C}$  et ajouter une ampoule d'alun de fer et une ampoule de sulfite de sodium mélanger soigneusement et aseptiquement, le milieu est ainsi prêt à l'emploi, mais il faut le maintenir au bain-marie à  $45^\circ\text{C}$  jusqu'au moment de l'utilisation.

#### **Ensemencement :**

Les tubes contenant les dilutions  $10^{-1}$ ,  $10^{-2}$ ,  $10^{-3}$  seront soumis, d'abord à un chauffage dans un bain-marie à  $80^\circ\text{C}$  pendant 8 à 10 min, puis à un refroidissement immédiat sous l'eau du robinet.

A partir de ces dilutions, porter aseptiquement 1 ml de chaque dilution en double dans deux tubes à vis de 16 mm de diamètre, puis ajouter dans chaque tube environ 15 ml de la gélose VF prête à l'emploi. Laisser solidifier sur la paillasse pendant 30 min puis incubé les tubes à  $37^\circ\text{C}$  pendant 16, 24 et 48 heures.

#### **Lecture :**

La première lecture doit se faire impérativement à 16 h, car :

***Il faut absolument repérer toute colonie noire ayant poussé en masse et d'un diamètre supérieur à 0.5mm (figure 3).***

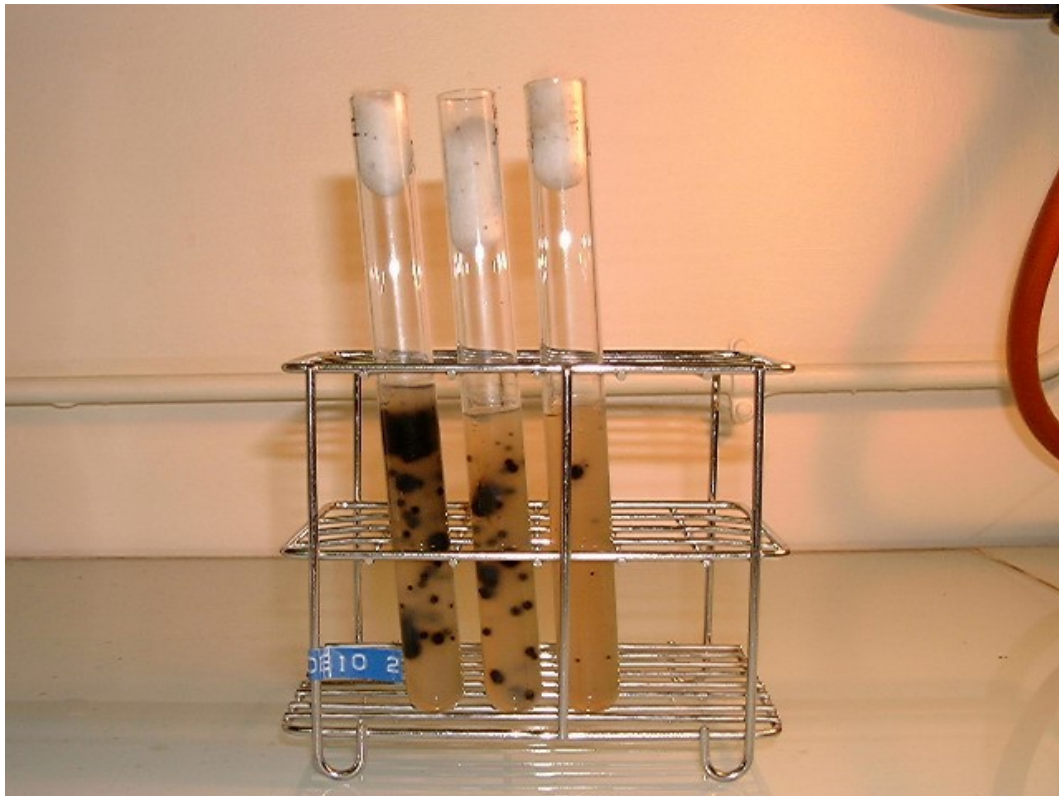


Figure 3. Aspect des spores sur gélose viande foie

### 3.2. Technique de numération en surface de la gélose

1. 100 à 500 microlitres (pipette graduée ou pipette automatique) du milieu à analyser sont déposés à la surface de la gélose et immédiatement répartis de façon uniforme à la surface du milieu au moyen d'un ensemencateur stérile du type pipette râteau. La pipette râteau est «stérilisée» entre deux étalements par immersion dans de l'éthanol, l'éthanol adsorbé sur le verre étant ensuite enflammé.
2. Après la période d'incubation nécessaire, procéder au comptage des colonies pour chaque boîte contenant moins de 300 colonies. Dans le cas de microorganismes donnant des colonies de taille élevée, la valeur 300 paraît très élevée. Il est possible que 2 unités microbiennes ou plus se retrouvent à proximité immédiate lors de l'inoculation et donnent une seule grosse colonie.
3. Le calcul de la concentration en micro-organismes [N] présents dans l'échantillon essai est une moyenne pondérée à partir des résultats de 2 dilutions successives. Pour que le calcul soit valable, il est nécessaire de compter sur au moins une boîte contenant au moins 15 colonies selon la formule suivante :

$$N \text{ ou } UFC = \frac{\Sigma C}{(n_1 + 0,1 n_2) d \cdot V}$$

- $\Sigma c$  : la somme de toutes les colonies comptées sur toutes les boîtes retenues (et tel que au moins une des boîtes comptées contenait au moins 15 colonies).
  - V : le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte (généralement 1ml en masse et 0.1ml en surface)
  - n1 : le nombre de boites retenues à la première dilution (en général 2).
  - n2 : le nombre de boites retenues à la deuxième dilution (en général 2).
  - d : le taux de dilution de la première dilution retenue pour les comptages sur boîte.
- Arrondir le résultat calculé à deux chiffres significatifs.



Si aucune boîte ne contient au moins 15 colonies, faire la moyenne arithmétique des colonies comptées sur les 2 boîtes de la plus petite dilution **d** et tenir compte de cette dilution. Bien préciser dans l'expression du résultat qu'il s'agit alors d'une estimation en rédigeant ainsi : « *nombre estimé de micro-organismes par millilitre = ...* » .

### 3.3. Dénombrement après filtration sur membrane

Dans certains produits liquides (eau, solutés pharmaceutiques buvables ou injectables...), les micro-organismes sont à une concentration très faible (voire nulle si le produit est stérile). Leur dénombrement (en UFC par unité de volume) impose donc de « *concentrer les micro-organismes* » pour pouvoir compter des colonies. Cette méthode consiste à faire passer un certain volume d'échantillon (ou de ses dilutions) au travers d'une membrane filtrante dont la porosité moyenne de **0,45 µm** ou **0,22 µm** sur laquelle sont retenus les micro-organismes recherchés.

Le filtre est alors posé sur la surface d'un milieu gélosé, face portant les micro-organismes vers le haut. Après incubation, les colonies formées à la surface du filtre sont comptées (figure 4) (figure 5).

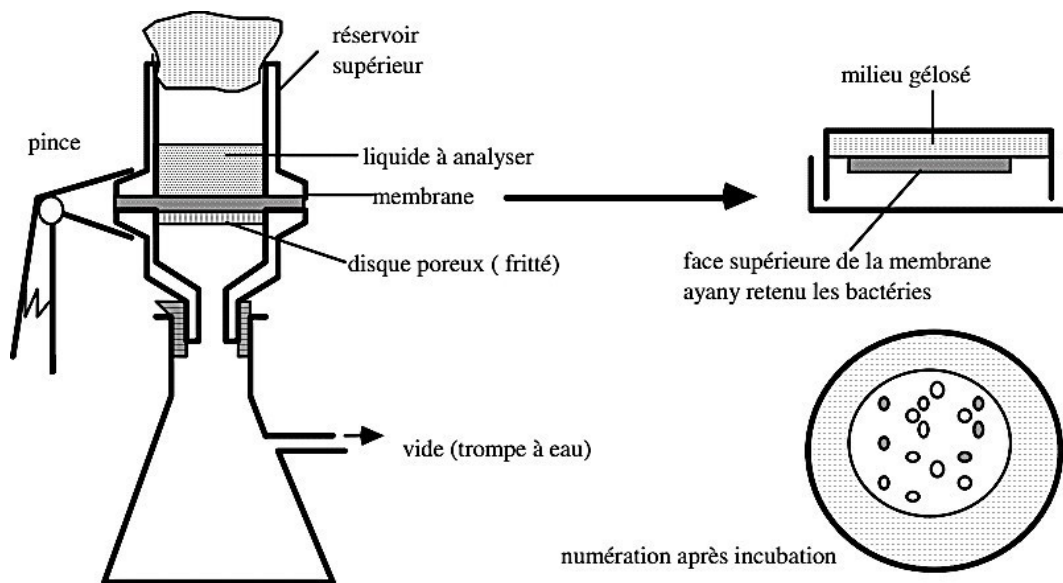


Figure 4. Filtration sur membrane

Le nombre de colonies présentes sur la membrane permet de calculer la concentration bactérienne N : en nombre d'Unités Formant Colonie (UFC) par ml selon la formule :

$$N (UFC/ml) = \frac{n}{v}$$

Où n : nombre d'UFC sur la membrane, V : volume du produit filtré en ml.



Figure 5 : Aspect des colonies sur membranes de filtration après incubation

#### 4. Exercice

La/lesquelles est/sont correcte(s) sur la numération en milieu solide ?

- Les colonies sont comptées pour chaque boîte contenant plus que 300 colonies.
- La bactérie est introduite dans la surface mais pas dans la masse
- Il est nécessaire de compter sur au moins une boîte contenant au moins 15 colonies.
- C'est une technique réalisée sur tubes pas des boites Pétrie.

#### 5. Numération en milieu liquide :

Cette méthode présente certains avantages tels que la possibilité d'étudier un caractère biochimique du germe difficilement mis en évidence sur milieu gélosé comme la production de gaz (cloche) ou encore d'effectuer facilement la numération avec une phase de revivification. Si les conditions optimales de croissance sont réunies, un seul micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans un milieu liquide se développe en y créant un trouble. La lecture des tubes contenant le milieu liquide et ensemencés avec l'inoculum est de **type binaire** :

- Résultat négatif si absence de trouble et/ou de modification du milieu : il y a moins de un micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans le milieu liquide ;
- Résultat positif si présence de trouble et/ou de modification du milieu : il y avait au moins un micro-organisme présent dans l'inoculum introduit dans le milieu liquide.

Le volume de l'inoculum : le plus souvent = **1 ml** (parfois 10 ml).

Le choix des dilutions à tester : dépend de la population estimée, le but étant d'obtenir, pour une analyse statistique optimale des résultats :

- une dilution contenant moins d'un micro-organisme dans l'inoculum utilisé

- une dilution contenant plus d'un micro-organisme dans l'inoculum utilisé

**Le choix du nombre d'essais par dilution dépend de la précision souhaitée pour les résultats en fonction de leur analyse statistique.** En général trois tubes sont ensemencés par dilution, un ou deux tubes sont ensemencés si une précision moins importante est suffisante, cinq tubes ou même plus sont ensemencés si une précision plus importante est demandée.

### 5.1. Dénombrement à un seul essai

Dans ce cas, 1 tube par dilution est ensemencé avec **1 ml** d'inoculum. Exemple de résultats obtenus (tableau 1) :

Dilution	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Résultats	positif	positif	positif	négatif	négatif

- il y a au moins un micro-organisme dans l'inoculum (1 ml) de la plus grande dilution (10<sup>-2</sup>) présentant encore un trouble : la concentration est donc d'au moins 10<sup>2</sup> micro-organismes par ml de produit ou de suspension mère non dilués ;

- il y a moins de un micro-organisme dans l'inoculum (1 ml) de la première dilution (10<sup>-3</sup>) ne présentant plus de trouble : la concentration est donc strictement inférieure à 10<sup>3</sup> micro-organismes par ml de produit ou de suspension mère non dilués.

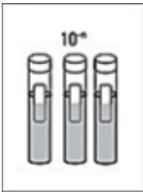

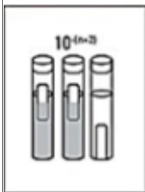

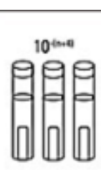
Le résultat peut s'exprimer selon l'intervalle : **10<sup>2</sup> ≤ N micro-organismes/ml < 10<sup>3</sup>**. La concentration du produit analysé est comprise entre 10<sup>2</sup> et 10<sup>3</sup> micro-organismes dans 1 ml.

### 5.2. Dénombrement à essais multiples «technique du nombre le plus probable NPP» :

Cette méthode repose sur une analyse statistique et fournit par calcul des nombres les plus probables (NPP). Ce dénombrement s'effectue en utilisant les tables de Mac Grady, le nombre caractéristique de la série réalisée est une combinaison de trois chiffres (tableau 2) :

- Chaque chiffre correspond au nombre de tubes « positifs » pour une dilution donnée ;
- Les trois chiffres correspondent à trois dilutions successives ;
- Le chiffre des centaines correspond à la plus faible dilution (donc à la plus forte concentration en micro-organismes), celui des dizaines à la dilution intermédiaire et celui des unités à la plus grande dilution.

Parmi les différentes combinaisons, celle correspondant au nombre le plus grand et, si possible, **inférieur à 330** est retenue (correspond à une meilleure répartition des micro-organismes dans les dilutions).

	Résultats (Trois essais par dilution)				
	10 <sup>0</sup>	10 <sup>-1</sup>	10 <sup>-2</sup>	10 <sup>-3</sup>	10 <sup>-4</sup>
Résultats					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de tubes positifs	3	3	2	1	0
Combinaison possible	3	3	2		
Combinaison possible		3	2	1	
Combinaison possible			2	1	0

Exemple (tableau 2) : cinq dilutions ont été ensemencées à raison de trois essais par dilution ; trois combinaisons (de trois chiffres) sont possibles avec les résultats obtenus. Parmi les trois combinaisons de trois chiffres possibles (**332** ; **321** ; **210**), laquelle choisir ? Le nombre le plus élevé et inférieur à **330** est sélectionné ; dans cet exemple, il s'agit de **321**. Si les dilutions sont insuffisantes, on peut utiliser des nombres caractéristiques comme 333, 332 ou 331.

Le nombre caractéristique de la série est reporté dans *une table statistique de Mac Grady* (Figure 6). On y lit le Nombre le Plus Probable (NPP) de micro-organismes présents dans l'inoculum de la dilution correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique. Exemple : **321 correspond au NPP de 15**. Cela signifie qu'il y a *statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution  $10^{-(n+1)}$* .

Deux tubes par dilution		Trois tubes par dilution					
Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP	Nombre caractéristique	NPP
000	0,0	000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,5	001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,5	010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,9	011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,9	020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,6	100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	1,2	101	0,7	221	3,0	321	15,0
110	1,3	102	1,1	222	3,5	322	20,0
111	2,0	110	0,7	223	4,0	323	30,0
120	2,0	111	1,1	230	3,0	330	25,0
121	3,0	120	1,1	231	3,5	331	45,0
200	2,5	121	1,5	232	4,0	332	110,0
201	5,0	130	1,6	300	2,5	333	140,0
210	6,0	200	0,9	301	4,0		
211	13,0						
212	20,0						
220	25,0						
221	70,0						
222	110,0						

figure 6 : Table de Mac Grady

Le résultat est exprimé selon la formule suivante :

$$N = \frac{NPP \times K}{V}$$

**N** : nombre de micro-organismes par ml de produit ; **NPP** : nombre lu dans la table ; **K** : facteur de dilution (inverse de dilution) correspondant au chiffre des centaines du nombre caractéristique (combinaison retenue) ; **V** : volume de l'inoculum (1 ml en général).

Si le produit analysé est solide, on prépare une « suspension mère » de produit en introduisant « x » g de produit dans « 9 x » ml de diluant. Cela correspond à une dilution au 1/10 du produit. Le nombre de micro-organismes par g de produit analysé est donc **N x 10**.

D'autres méthodes préconisent le nombre caractéristique le plus faible portant de préférence «0» dans la colonne des unités (par exemple dans ce cas 210).

### 🔍 Exemple : Recherche des coliformes

Le groupe des coliformes comprend traditionnellement un petit nombre d'espèces appartenant à la famille des Enterobacteriaceae : Escherichia, Citrobacter, Enterobacter, Klebsiella, Yersinia, Serratia.

Ce sont des organismes en bâtonnets, Gram-, oxydase -, aéro-anaérobie facultatifs, fermentent le lactose avec production d'acide et de gaz et sont capables de se multiplier en présence de sels biliaires à 37°C.

Le terme de « *coliformes fécaux* » ou de « *coliformes thermotolérants* » correspond à des coliformes qui présentent les mêmes propriétés des coliformes après incubation à la température de 44 °C.

*Escherichia coli* appartient aux coliformes thermotolérants mais qui présente la particularité de produire l'indole à partir du tryptophane à 44 °C.

#### **Intérêt de recherche**

- La recherche des coliformes totaux à 37 °C : juge l'efficacité de la désinfection d'une eau, intérêt moindre pour déceler une contamination d'origine fécale.
- La recherche des coliformes thermotolérants à 44 °C : la présence de coliformes fécaux indique l'existence quasi certaine de la contamination fécale d'une eau ;
- La recherche des *Escherichia coli* : actuellement, on le considère comme le meilleur indice de contamination fécale récente.

### **5.3. Mesure de la biomasse des bactéries : mesure du trouble (ou absorbance)**

Cette méthode consiste à suivre l'évolution de la population bactérienne en mesurant l'absorbance du milieu de culture grâce à un spectrophotomètre. C'est la méthode la plus utilisée pour évaluer la masse microbienne.

#### **Principe**

C'est une méthode optique fondée sur la propriété que présente toute suspension de diffracter une partie de l'intensité d'un faisceau de lumière qui la traverse en ligne droite. Il existe une relation exponentielle entre la quantité de substance absorbant la lumière et la quantité de lumière absorbée. La quantité de substance absorbante dépend de l'épaisseur de la solution traversée et de la concentration.

**La loi de Beer-Lambert** exprime cette relation à travers la formule suivante :

$$I = I_0 \times 10^{-K \cdot L \cdot c}$$

$I_0$  = intensité de la lumière incidente ;

$I$  = lumière transmise ;

$l$  = épaisseur traversée (soit souvent 1 cm) ;

$K$  = une constante caractéristique de la substance.

$c$  = la concentration en substance.

On appelle absorbance ou densité optique (DO)  $DO = \log (I / I_0) = K \cdot c$

Il suffit de mesurer la DO pour en déduire la concentration  $C$ .

## **6. Exercice : Quelle est le principe de la spectrophotométrie ?**

Lorsque les bactéries sont en suspension dans un milieu liquide traversé par un faisceau lumineux monochromatique, la quantité de lumière absorbée par la suspension est proportionnelle à la concentration des bactéries. La relation entre absorbance de la lumière et la concentration en cellules bactériennes est linéaire dans une gamme de concentrations couvrant environ un ordre de grandeur. En partant d'une suspension de concentration connue (la concentration a été déterminée au préalable avec une lame à numération comme Malassez ou Thoma), une gamme de dilution est réalisée et l'absorbance de chaque suspension est mesurée avec un spectrophotomètre.

Exercice : Quelle est le principe de la spectrophotométrie ?