

الجمهورية الجزائرية الديمقراطية الشعبية

وزارة التعليم العالي و البحث العلمي

*Mustapha Stambouli University of Mascara*

*Faculty of Nature and Life Sciences*

*Department of Biology*



جامعة مصطفى اسطمبولي معسكر

كلية علوم الطبيعة و الحياة

قسم البيولوجيا

## **Polycopié pédagogique Pour Licence 3 Analyse Biochimique**

---

### **Techniques de Contrôle Microbiologique**

---

**Elaboré par : Dr. AIT ABDESLAM Arezki**

**Année universitaire : 2022/2023**

## **Fiche d'organisation semestrielle des enseignements**

<b>Unité d'enseignement</b>	<b>Méthodologie 2 (UEM 2): Méthodes et techniques d'analyse de la qualité</b>
<b>Intitulé de la matière</b>	<b>Techniques de contrôle microbiologique</b>
<b>Niveau</b>	<b>Licence 3</b>
<b>Intitulé de la Licence</b>	<b>Analyse Biochimique</b>
<b>Nombre de semaines</b>	<b>14-16 sem</b>
<b>Semestre</b>	<b>6</b>
<b>Volume horaire semestriel</b>	<b>67h30</b>
<b>Volume horaire hebdomadaire</b>	<b>1h30 COURS 3h00 Travaux Pratiques 1h30 autres</b>
<b>Crédit</b>	<b>3</b>
<b>Coefficient</b>	<b>2</b>
<b>Mode d'évaluation</b>	<b>Continu (40%) Examen (60%)</b>
<b>Connaissances préalables recommandées</b>	<b>Microbiologie générale, Biochimie générale, biologie moléculaire, Toxicologie, Technologie alimentaire</b>

## **AVANT-PROPOS**

Ce polycopié pédagogique s'adresse aux étudiants de Licence 3 Analyse biochimique, et vise à l'apprentissage des techniques appliquées au contrôle microbiologique et physico-chimique des produits et la maîtrise des concepts théoriques et pratiques sur la gestion hygiénique dans les entreprises.

Il peut aussi être utilement utilisé par les étudiants d'autres paliers aussi bien en Licence et Master en Microbiologie et alimentaire.

Le programme vise à initier les étudiants à maîtriser des protocoles opératoires donnés dans le domaine de la microbiologie, avec l'ensemble des techniques, l'étudiant sera en mesure d'étudier et de contrôler en amont les risques de contaminations, les altérations microbiennes et les intoxications.

L'étudiant sera également initié à la contribution à la définition de la stratégie à suivre pour améliorer et optimiser au maximum l'efficacité de l'entreprise au niveau du contrôle de qualité des produits et des prestations.

A la fin du semestre, les étudiants doivent acquérir la capacité pour mettre en œuvre une démarche expérimentale et une méthodologie adéquate en fonction de l'objectif à atteindre.

## Table des matières

### Fiche d'organisation semestrielle des enseignements

#### Avant-Propos

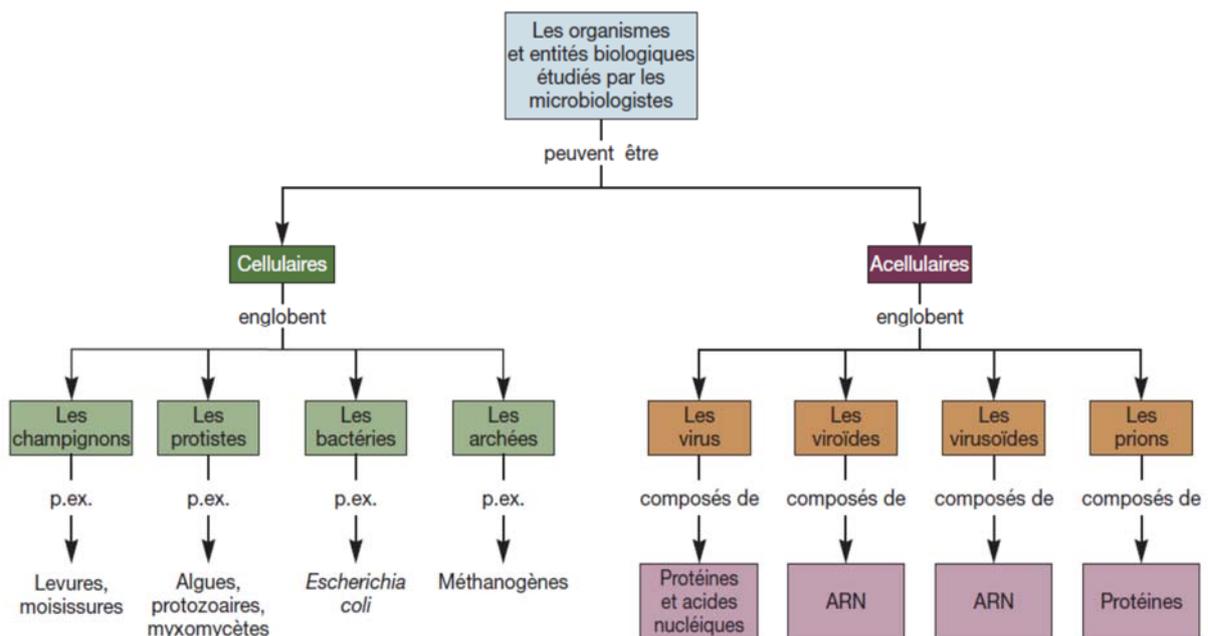
Introduction	01
<b>I. Objectifs du contrôle microbiologique</b>	<b>02</b>
I.1 La qualité microbiologique d'un produit alimentaire	02
I.2 contrôle microbiologique	02
I.3 Origine des microorganismes présents dans les aliments	02
I.4 Catégories de micro-organismes importants dans les aliments	02
<b>II. Politique de contrôle</b>	<b>05</b>
II.1 Introduction	05
II.2 Analyse des risques pour la maîtrise des points critiques : HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)	06
II.3 Niveaux de contrôle	08
II.3.1 Contrôle des matières premières	08
II.3.2 Autocontrôles en cours de fabrication	08
II.3.3 Contrôle du produit fini	09
II.3.4 Contrôle des levains	09
II.3.5 Contrôle de l'hygiène des locaux et du personnel	09
II.4 Fréquence des contrôles	11
II.5 Laboratoires du contrôle de la qualité microbiologique :	11
II.6 Le choix des paramètres à contrôler	12
II.6.1 Indice de la qualité marchande et de la conservabilité	12
II.6.1.1 Flore totale aérobie mésophile	12
II.6.1.2 La flore fongique : les levures et moisissures	12
II.6.1.3 Flore lactique	12
II.6.1.4 Flore acétique	13
II.6.2 Indice de la qualité sanitaire	13
II.6.2.1 Flores indicatrices de contamination fécale	13
Coliformes et coliformes thermotolérants	13
Les streptocoques du groupe D ou streptocoques fécaux :	13
<i>Clostridium</i> sulfitoréducteurs	14
II.6.3 Flores pathogènes	14
II.7. Les méthodes de contrôle	14
II.7.1 Les méthodes normalisées	14
II.7.2 Les méthodes de référence	14
II.7.3 Les méthodes alternatives	14
Les systèmes de normalisation	17
<b>III. Prélèvement, transport et préparation des échantillons</b>	<b>17</b>
III.1. Définition	17
III.2. Echantillonnage	17
III.2.1 Stratégie d'échantillonnage	18
III.2.2 Conditions générales de prélèvement	19
III.2.3 Transport et conservation des échantillons	19
III.3 Prélèvements pour contrôle des surfaces	20
III.3.1 Impression sur gélose	20
Boîtes contact gélosée	20
Petrifilm	20
La lame gélosée	20
III.3.2 Ecouvillonnage	22

<b>III.4 Prélèvements pour le contrôle de l'air</b>	<b>23</b>
<b>III.5 Prélèvements des produits alimentaires</b>	<b>24</b>
<b>III.5.1 Denrées alimentaires à emballage de détail</b>	<b>25</b>
<b>III.5.2 Produits liquides</b>	<b>26</b>
<b>III.5.3 Produits solides</b>	<b>27</b>
<b>III.6 Préparation échantillons pour analyses :</b>	<b>30</b>
<b>III.6.1 Ouverture des récipients et emballages</b>	<b>30</b>
<b>III.6.2 Homogénéisation</b>	<b>30</b>
<b>III.6.3 Standardisation de la suspension mère</b>	<b>30</b>
<b>III.6.4 Préparation des dilutions décimales</b>	<b>31</b>
<b>III.7 Méthodes générales d'analyse</b>	<b>32</b>
<b>III.7.1 Les différents types de méthodes normalisées</b>	<b>32</b>
<b>III.7.2 Interprétation des résultats : plan échantillonnage</b>	<b>32</b>
<b>III.7.2.1 Les symboles et termes utilisés dans les plans et leurs définitions</b>	<b>32</b>
<b>III.7.2.2 plan échantillonnage à deux classes et à trois classes</b>	<b>33</b>
<b>Plan d'échantillonnage à 3 classes</b>	<b>33</b>
<b>Plan d'échantillonnage à deux classes</b>	<b>33</b>
<b>III.7.3 Caractéristiques des risques associés aux différents critères</b>	<b>33</b>
<b>IV. Méthodes de quantification microbiologique</b>	<b>37</b>
<b>IV.1 Méthodes classiques de numérations</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.1 Dénombrement direct des cellules à l'aide d'un microscope (cytométrie)</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.1.1 Les lames de comptage (cellules de numération) (hématimètre)</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.1.2 Comptage et viabilité cellulaire des micro-organismes eucaryotes (levures)</b>	<b>38</b>
<b>IV.1.1.3 Méthode de comptage sur la cellule de Malassez</b>	<b>40</b>
<b>IV.1.1.4 Les avantages et les inconvénients</b>	<b>41</b>
<b>IV.1.2 Dénombrement semi directe des microorganismes après culture</b>	<b>42</b>
<b>IV.1.2.1 Dénombrement en milieu solide (masse, surface)</b>	<b>42</b>
<b>IV.1.2.2 Dénombrement en milieu solide (Méthode avec membrane filtrante):</b>	<b>44</b>
<b>IV.1.2.3 Quantification en milieu de culture liquide</b>	<b>46</b>
<b>IV.2 Techniques récentes (alternatives) de numération</b>	<b>46</b>
<b>IV.2.1 Les techniques indépendantes de la croissance microbienne (direct)</b>	<b>47</b>
<b>IV.2.1.1 Technique DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique):</b>	<b>47</b>
<b>IV.2.2 Les méthodes dépendantes de la croissance microbienne (indirect)</b>	<b>50</b>
<b>IV.2.2.1 Mesure par turbidimétrie</b>	<b>51</b>
<b>V. Identification microbienne</b>	<b>54</b>
<b>V.1 Approche générale de l'identification microbienne</b>	<b>54</b>
<b>V.2 Approche polyphasique à l'identification microbienne</b>	<b>54</b>
<b>V.2.1 Analyse phénotypique</b>	<b>54</b>
<b>V.2.1.1 Caractères morphologiques et structuraux</b>	<b>55</b>
<b>a/ Observation macroscopique des colonies sur gélose</b>	<b>55</b>
<b>b/ Observation microscopique</b>	<b>55</b>
<b>V.2.1.2 Caractères culturels</b>	<b>56</b>
<b>V.2.1.3 Caractères biochimiques</b>	<b>56</b>
<b>V.2.2 Caractères sérologiques (immunologiques)</b>	<b>59</b>
<b>V.2.3 Pouvoir pathogène (pouvoir hémolytique)</b>	<b>60</b>
<b>V.2.4 Méthodes moléculaires</b>	<b>62</b>
<b>a/ Méthodes génotypiques basées sur des modèles et du séquençage</b>	<b>62</b>
<b>b/ Méthodes basées sur les techniques protéomiques</b>	<b>62</b>
<b>Références</b>	<b>63</b>



## Introduction :

Les micro-organismes (du grec micro, petit et bios, vie) sont des êtres vivants invisibles à l'œil nu, unicellulaires ou pluricellulaires mais, dans ce cas, les cellules ne sont pas différenciées en tissu. Sous ce terme sont regroupés virus, bactéries, protistes, algues et champignons microscopiques (figure 1). Ce sont des organismes ubiquitaires qui représentent la biomasse la plus importante de la Terre. L'estimation de la totalité des cellules microbiennes sur la Terre est de l'ordre de  $5 \times 10^{30}$  cellules. Ces microorganismes sont omniprésents dans l'environnement : l'air, terre, eau, aliments, les végétaux, animaux et aussi présents sur notre corps et sur les muqueuses sans provoquer de maladies. Les microorganismes sont souvent considérés comme des germes dangereux. Cependant, beaucoup d'entre eux, nous aident de multiples façon. En effet, en plus d'aider notre digestion (l'intestin humain est le foyer de plusieurs milliards de microbes utiles), ils occupent aussi une place importante dans notre alimentation quotidienne.



**Figure 1. Diagramme de concept montrant les divers types d'entités biologiques (Prescott et al., 2013).**

- viroïdes (est une particule virale simple, composée d'un seul ARN circulaire sans capsid)
- virusoïdes (sont des particules d'ARN circulaire à simple brin dépendants de phytovirus pour leur répllication et encapsidation)
- prions (une protéine qui peut devenir pathogène en changeant sa conformation dans l'espace).

## **I. Objectifs du contrôle microbiologique**

### **I.1 La qualité microbiologique d'un produit alimentaire :**

La qualité est définie comme << L'ensemble des propriétés et caractéristiques d'un produit qui lui confèrent l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites. >> (norme ISO/DIS 8402 - Ic X50-120).

La qualité microbiologique d'un produit alimentaire présente deux aspects :

- La qualité hygiénique qui caractérise le risque pour la santé du consommateur : Présence de microorganisme pathogène ou des toxines.
- La qualité technologique (marchande) qui caractérise le risque d'altération du produit : Présence un nombre de microorganismes d'altération.

### **I.2 contrôle microbiologique**

Le contrôle de la qualité consiste à vérifier l'innocuité des produits finis en conformité avec la législation.

Cet examen est effectué par le fabricant avant la distribution, et, éventuellement, par des laboratoires officiels de contrôle au niveau des détaillants.

### **I.3 Origine des microorganismes présents dans les aliments**

Les microorganismes des aliments ont trois origines possibles :

- Ils préexistent dans la matière brute avant toute manipulation ou transformation : Contact avec l'extérieur (peau, tube digestif...) ou des pathogènes issues des animaux ou plantes malades.
- Ils sont apportés accidentellement lors des manipulations : Matériel, personnel, l'air, les insectes
- Ils sont ajoutés volontairement : ferments lactiques

### **I.4 Catégories de micro-organismes importants dans les aliments**

Il existe quatre catégories de micro-organismes importants dans les aliments :

- Les micro-organismes « **utiles** », qui vont apporter à la denrée des propriétés organoleptiques (arômes, acidité, texture) ou une meilleure conservation ;
- Les micro-organismes « **d'altération** » qui dégradent les propriétés organoleptiques de l'aliment ;

- Les micro-organismes « **indicateurs d'hygiène** », dont le faible niveau de concentration indique l'acceptabilité du procédé de production ;
- Les micro-organismes « **pathogènes** », susceptibles de provoquer une maladie chez le consommateur.

Le pouvoir pathogène des microorganismes peut dépendre de plusieurs facteurs :

- pouvoir infectieux : par envahissement de l'hôte (**infection**) ;
- pouvoir toxigène : par libération des toxines dans l'aliment (**intoxination**) ;
- pouvoir toxi-infectieux : des espèces à caractère mixte (**infection et intoxication**);
- pouvoir d'intoxication : par transformation du substrat qu'elles rendent toxique.

Tableau 1 montre les principaux groupes microbiens recherchés dans les aliments.

<b>Tableau 1 : Groupe microbien d'intérêt alimentaire (Abdelmassih <i>et al.</i>, 2013)</b>			
<b>Groupe microbien</b>	<b>Description</b>	<b>Origine</b>	<b>Intérêt de l'analyse</b>
Germes totaux aérobie mésophiles	Ensemble des micro-organismes se développant à 30°C en présence d'air, sur un milieu nutritif.	L'environnement, les matières premières, les manipulations.	La charge bactérienne présente dans le produit est un indicateur de l'hygiène globale du processus et de l'efficacité des techniques de conservation.
Bactéries lactiques mésophiles	Les bactéries lactiques sont non-pathogènes, mais peuvent provoquer l'altération des denrées	Environnement (végétaux, sols, animaux, eaux, ...).	Indicateur de la fraîcheur du produit (surtout pour les produits laitiers sous-vide). Evaluation de conservation
Entérobactéries	Bactéries du tube digestif de l'homme et des mammifères. Certaines espèces incluses dans la famille des entérobactéries sont des pathogènes alimentaires notoires (par exemple Salmonella).	Denrées souillées par des fèces : viande contaminée lors de l'éviscération ; légumes en contact avec du fumier, eaux souillées ou produits laitiers crus.	Indicateur de décontamination fécale (humaine ou animale). La présence d'entérobactéries laisse suspecter la présence possible de pathogènes alimentaires.
Staphylocoques à coagulase positive	Bactérie capable de produire une entérotoxine provoquant des vomissements violents et un malaise de courte durée (moins de 24h).	Présente sur la peau et les muqueuses de l'homme et des animaux.	Indicateur d'hygiène : trahit une contamination humaine (mains, fosses nasales) ou une contamination par des animaux à sang chaud.
<i>Bacillus cereus</i>	Bactérie sporulée, qui résiste à la cuisson et à la pasteurisation. Certaines souches sont pathogènes (production de toxines). Elles provoquent un	Les spores de <i>B. cereus</i> proviennent de l'environnement (sol, eau, air). Les denrées céréaliers (riz, pâtes), les épices et les	Une concentration de 10 <sup>6</sup> CFU/g, la bactérie peut produire ses toxines et provoquer des vomissements ou de la diarrhée.

	syndrome émétique (vomissements) ou diarrhéique	produits laitiers sont souvent contaminés.	
<i>Clostridium perfringens</i>	Bactérie anaérobie, sporulée (résiste à la cuisson). Présente dans les carcasses, les épices, l'environnement. Elle produit des toxines diarrhéiques induisant des symptômes de gastro-entérite.	Environnement et tube digestif des mammifères.	Le dénombrement de ce pathogène dans les plats préparés vise à s'assurer que la denrée ne contient pas un niveau de <i>C. perfringens</i> susceptible de provoquer une gastro-entérite chez le consommateur.
Levures et moisissures	Micro-organismes capables de croître en conditions adverses (basse température, acidité, faible humidité).	Les levures et moisissures sont presque impossibles à éviter. Les spores de moisissures sont présentes partout dans l'air.	Les levures et moisissures sont des agents importants d'altération.
Salmonelles	Entérobactérie pathogène provoquant la salmonellose : diarrhée, douleurs abdominales, fièvre.	Présente dans l'intestin de l'homme et des animaux (mammifères, oiseaux, reptiles...). L'environnement (eaux, cultures) peut être contaminé par voie fécale.	Les denrées à risque doivent être systématiquement contrôlées pour s'assurer de l'absence de salmonelles.
<i>Listeria monocytogenes</i>	<i>L. monocytogenes</i> est surtout dangereuse pour les sujets fragiles (Provoque la listériose (méningites, septicémies, avortements) avec un taux élevé de mortalité (30%).	On la retrouve dans la plupart des réfrigérateurs ménagers	Analyses pour assurer l'absence de <i>L. monocytogenes</i> dans tous les aliments de type «Ready-To-Eat »
Autres <i>Micro-organismes :</i> <i>Campylobacter,</i> <i>Pseudomonas,</i> <i>Yersinia,</i> <i>Clostridium botulinum,</i> <i>virus entériques, ...</i>	Germes pathogènes ou d'altération, spécifiques à certaines denrées.	Sources de contaminations diverses : matières premières, eaux, environnement, opérateurs.	L'analyse n'est demandée que dans certaines denrées « sensibles » ou « à risque »,

## **II. Politique de contrôle**

### **II.1 Introduction :**

La politique du contrôle de qualité dans une entreprise à un objectif principal est d'assurer un bon fonctionnement de l'entreprise pour construire la qualité d'un produit et satisfaire les besoins du client et de ses attentes.

Pour s'assurer que les clients ont toute confiance des produits proposées, l'entreprise doit impérativement établir un système qualité qui consiste à produire des documents d'organisation de la qualité et s'y référer en permanence : un manuel de qualité, des procédures et des documents d'exécution de la qualité.

Les industries de production désirant assurer la qualité à leurs clients possèdent un service qualité qui met au point le système de management de la qualité. Ce système se réfère aux normes internationales de la série ISO 9001 (2008) (Systèmes de management de la qualité). Ces normes constituent un modèle de système permettant d'assurer que les produits ou les services sont toujours conçus selon les spécifications fixées par l'entreprise. Notamment que les aspects importants de la fabrication sont mis en place et consigné sur des documents.

L'ISO 22000 c'est norme sur le management de la sécurité des denrées alimentaires. Elle permet de démontrer une aptitude à identifier et à maîtriser les dangers liés à la sécurité des aliments, mais aussi à fournir en permanence des produits finis et sûrs.

La norme ISO 22000 mettre en place un système de management de la sécurité des denrées alimentaires conduit à déployer des moyens pour assurer la sécurité de ses produits et services. C'est un outil approuvé de prévention et d'amélioration continue. Le cycle PDCA (Plan, do, check, act : planifier, réaliser, vérifier, agir) est déployé à deux niveaux : le premier s'applique au système de management, le second aux principes HACCP (Afnor, 2023).

Utiliser les normes ISO, c'est se donner l'assurance que les clients obtiennent des produits et services uniformes et de bonne qualité, avec, en retour, de belles retombées commerciales.

D'après l'ISO, International Organization for Standardization, la définition officielle de la norme est la suivante :

« Document établi par consensus et approuvé par un organisme reconnu, qui fournit, pour des usages communs et répétés, des règles, des lignes directrices ou des caractéristiques, pour des activités ou leurs résultats garantissant un niveau d'ordre optimal dans un contexte donné. »

La norme doit impérativement :

- Lister les méthodes pour reproduire un produit ou un service,
- Être reconnue par les professionnels du milieu concerné.

### **Différence entre ISO 9001 et 22000**

La norme ISO 9001 est la norme du système de gestion de la qualité. La norme ISO 22000 est la norme du système de gestion de la sécurité alimentaire. La norme ISO 9001 constitue la base de tous les systèmes qualité et peut être appliquée par un large éventail d'organisations, grandes ou petites.

Norme ISO 9001 couvre les exigences de qualité utilisées pour démontrer qu'une organisation est compétente pour la conception et la production de produits appropriés. Ces conditions visent à prévenir les non-conformités dans tous les processus, de la conception de la production de biens ou de services au service après-vente, et à assurer la satisfaction du client.

### **II.2 Analyse des risques pour la maîtrise des points critiques : HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point)**

Ce système vise à contrôler la fabrication du produit depuis l'achat des matières premières jusqu'à la consommation du produit. Le procédé de fabrication peut mettre en jeu jusqu'à 80 étapes différentes et il est impossible de les contrôler toutes. Il s'agit donc de localiser les étapes les plus dangereuses potentiellement pour pouvoir ensuite les maîtriser.

L'HACCP repose sur sept principes (figure 2) qui ont été publiés dans le Codex Alimentarius en ces termes:

**Principe 1** : identifier le ou les dangers éventuels associés à la production alimentaire... évaluer l'occurrence des dangers et identifier les mesures préventives nécessaires à leur maîtrise. Exemple : contamination par *Salmonella* lors de la fabrication du lait en poudre.

**Principe 2** : déterminer les points, procédures, étapes opérationnelles pouvant être contrôlés pour éliminer ou minimiser les dangers et les CCP (Critical Control Point) définis dans le sens où la perte de la maîtrise entraîne une déviation inacceptable pour la sécurité du produit. Exemple : contamination du lait frais, contamination lors de l'entreposage, contamination lors du transport à la fabrique.

**Principe 3** : établir des limites critiques pour les mesures préventives associées à chaque CCP. Un critère est défini comme limite (de nature physique, chimique ou biologique) ou caractéristique spécifique. Exemple : absence de *Salmonella* dans 100 mL.

**Principe 4** : établir un système de surveillance permettant de s'assurer de la maîtrise des CCP par des tests et observations programmés.

**Principe 5** : établir des actions correctives à entreprendre lorsque la maîtrise d'un CCP n'est plus assurée.

**Principe 6** : établir des procédures spécifiques pour vérifier l'efficacité du système mis en place.

**Principe 7** : établir un système documentaire de procédures et d'enregistrements couvrant l'application des six principes précédents.

## LES 7 PRINCIPES DE LA DÉMARCHE HACCP

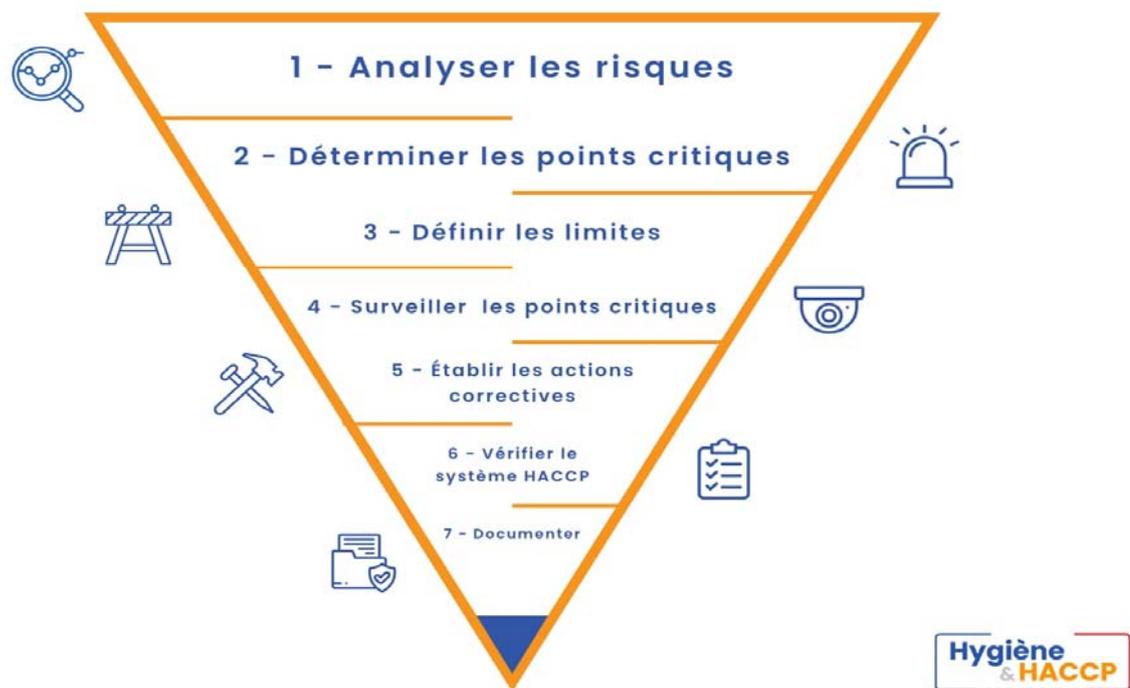


Figure 2. Les 7 principes de la démarche HACCP

Comment garantir la qualité des produits selon la méthode HACCP, l'attention de l'entreprise doit se porter sur 4 critères clés :

- La formation du personnel: les employés doivent être formés sur les règles d'hygiène et porter une tenue de travail réglementaire ;
- L'environnement : les locaux doivent être en conformité avec les règles d'hygiène. Les systèmes de ventilation, de filtration d'air et de climatisation doivent être entretenus régulièrement par un professionnel ;
- Le matériel: tous les ustensiles doivent être parfaitement contrôlés et entretenus avec des produits de nettoyage réglementaires ;
- Les matières premières: il est important de connaître l'origine et la traçabilité des denrées alimentaires, et de mettre en place un contrôle régulier des températures de conservation et de cuisson.

### **II.3 Niveaux de contrôle :**

Les contrôles microbiologiques au cours d'une production industrielle peuvent avoir plusieurs objectifs :

#### **II.3.1 Contrôle des matières premières**

Cet autocontrôle effectué par l'entreprise doit permettre de vérifier le niveau de contamination général et la présence de microorganismes particuliers susceptibles de gêner la fabrication ou d'altérer le produit fini lorsqu'ils ne sont pas détruits lors de la fabrication (cuisson, salage... ).

#### **II.3.2 Autocontrôles en cours de fabrication**

L'objectif est de contrôler le procédé de fabrication du point de vue microbiologique pour mieux le maîtriser. Il faut donc localiser les points de la chaîne où il y a le plus de risques de contamination. Cette analyse des points critiques fait partie de l'étude HACCP conduite pour l'ensemble du procédé de fabrication.

Ces autocontrôles sont un peu comme les capteurs d'une boucle de régulation. Ils doivent permettre de mettre en évidence rapidement un problème de fabrication afin de pouvoir modifier une partie du procédé et d'améliorer les résultats de l'analyse au « point critique ».

Afin que ce système de boucle de régulation puisse fonctionner, il faut que les autocontrôles soient rapides et le moins coûteux possible afin d'être effectués avec une grande fréquence. Ces méthodes rapides peuvent être effectuées par un laboratoire interne ou externe à l'entreprise à l'aide de méthodes d'analyse rapides non officielles.

### **II.3.3 Contrôle du produit fini :**

C'est un contrôle effectuée a posteriori pour évaluer la qualité d'un produit après sa fabrication et avant sa distribution.

### **II.3.4 Contrôle des levains**

Lorsqu'un levain est utilisé pour la fabrication, sa qualité est contrôlée avant l'ensemencement de la cuve de fermentation. On cherche à détecter un contaminant, même présent en faible quantité, car, après ensemencement de la cuve, celui-ci serait susceptible de se multiplier plus rapidement que le ferment sélectionné. Les levures peuvent être contaminées par des levures sauvages ou des bactéries lactiques ou acétiques; les moisissures par des bactéries ; les levains lactiques par des bactéries à développement plus rapide ou par des bactériophages.

### **II.3.5 Contrôle de l'hygiène des locaux et du personnel**

Enfin, les conditions de fabrication elles-mêmes peuvent être contrôlées. Ceci concerne les locaux, dont la conception même doit assurer de bonnes conditions d'hygiène (contrôle de surface, contrôle de l'air ambiant).

La figure 3 montre les niveaux du contrôle microbiologique dans l'industries agroalimentaires.

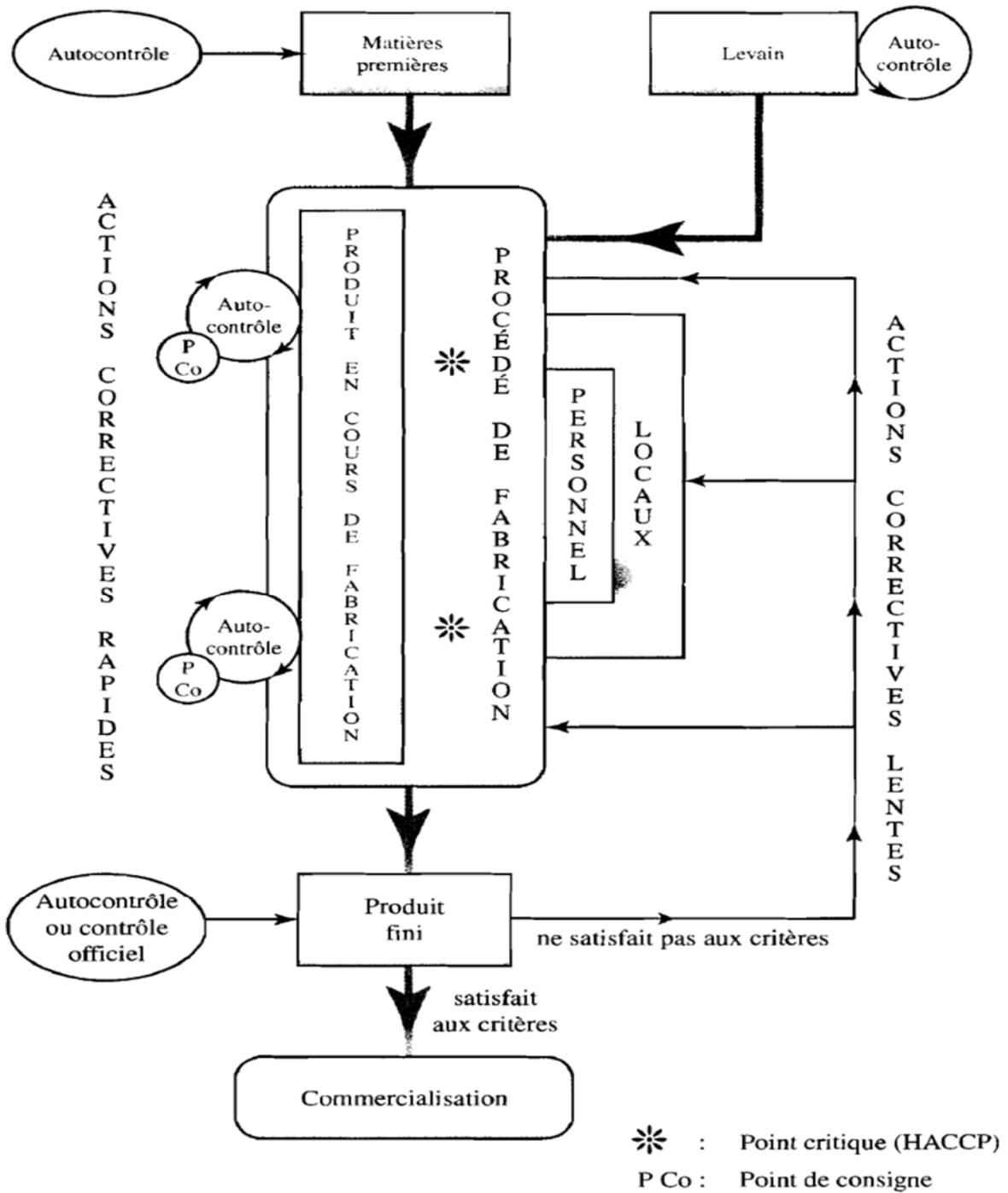


Figure 3. Les niveaux du contrôle dans l'industries agroalimentaires. Le contrôle se fait en boucle toute au long de la chaine d production (Bonnefoy et al., 2002).

## **II.4 Fréquence des contrôles**

L'analyse peut être réalisée de façon systématique (contrôle périodique) ou être réalisé à partir d'un cas précis (accident de fabrication, produit suspect, cas clinique...).

La fréquence des contrôles est déterminée par la capacité de production de l'usine et du niveau ou fluctuation du niveau de contamination. Ces fréquences sont définies par des textes réglementaires propres à chaque pays et à chaque produit. La fréquence est plus ou moins élevées selon la « catégorie » réglementaire dans laquelle entre le produit.

Un produit prêt à l'emploi consommé cru, sans traitement bactéricide (type cuisson), présentera plus de risques microbiologiques qu'un produit peu transformé et nécessitant une cuisson avant sa consommation.

Exemple : (Chambres d'agriculture France, 2019)

Pour les carcasses de volailles, les fréquences d'analyse sont définies réglementairement:

- *Pour les abattoirs agréés abattant plus de 1000 tonnes par an : un échantillonnage par semaine. Le jour de prélèvement doit être modifié chaque semaine de manière à ce que chaque jour de la semaine soit couvert. Pour les établissements ne fonctionnant pas 5 jours par semaine, il peut être envisagé d'effectuer les prélèvements tous les 5 jours d'abattage effectifs.*

- *Pour les abattoirs agréés abattant moins de 1000 tonnes par an : un échantillonnage tous les 20 jours d'abattage. Si l'interprétation des résultats s'avère satisfaisante pendant 30 semaines consécutives pour les salmonelles ou 52 semaines pour Campylobacter, les fréquences pourront être abaissées à une fois tous les 40 jours d'abattage effectifs.*

## **II.5 Laboratoires du contrôle de la qualité microbiologique :**

- Les laboratoires chargés des autocontrôles : laboratoire qui peut être sur le site ou extérieur au site.

- Les laboratoires chargés des contrôles officiels : soit à la suite de plaintes, soit à la suite de toxi-infections alimentaires collectives, soit lors des enquêtes habituelles concernant un produit.

Exemple de laboratoires officiels : Laboratoires de la répression des fraudes (Ministère du commerce) ; Le Centre Algérien du Contrôle de la Qualité et de l'Emballage –CACQE (Ministère du commerce).

## **II.6 Le choix des paramètres à contrôler**

Les microorganismes à contrôler varient suivant la technologie et les caractéristiques physicochimiques du produit en cours de fabrication et du produit fini.

### **II.6.1 Indice de la qualité marchande et de la conservabilité**

#### **II.6.1.1 Flore totale aérobie mésophile :**

Il s'agit de l'ensemble des microorganismes capables de se multiplier en aérobie à des températures optimales de croissance comprises entre + 20°C et + 45°C. Cette microflore peut comprendre des microorganismes pathogènes pour l'homme et l'animal mais aussi des microorganismes d'altération variés. La flore totale est considérée comme flore d'altération car la présence d'une flore mésophile aérobie revivifiables abondante indique un processus de dégradation en cours.

Le dénombrement de la flore totale aérobie mésophile reste la meilleure méthode permettant d'estimer l'indice de salubrité et de qualité des aliments dans le contrôle industriel. Un aliment dont la flore totale est trop élevée montrera de mauvaises conditions de conservation et sera considéré comme impropre à la consommation.

#### **II.6.1.2 La flore fongique : les levures et moisissures :**

Les levures sont des champignons unicellulaires microscopiques. Les aliments à base de végétaux (fruits, jus de fruits, légumes, confitures...) ainsi que les produits sucrés (confiseries, biscuits, miel...) sont particulièrement sensibles à des dégradations par les levures.

Elles peuvent entraîner l'apparition de troubles (développement de levures), d'odeurs ou de goûts anormaux (production d'éthanol, variation de pH), ou le gonflement des produits ou (et) de leurs emballages (libération de CO<sub>2</sub>).

Les moisissures sont des organismes filamenteux eucaryotes. L'hyphe en est l'élément structural. Les moisissures peuvent être des agents actifs de bio-détériorations, d'altérations organoleptiques et de modifications chimiques. Elles tolèrent des pH très acides, se développent à des températures de 0 à +40°C et supportent de très faibles teneurs en eau.

#### **II.6.1.3 Flore lactique :**

Les bactéries lactiques sont capables de produire par fermentation de l'acide lactique D (-), L (+) ou DL. Il s'agit des genres suivants : *Lactobacilles*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Leuconostoc*, *Pediococcus*, *Tetragenus*.

Ces bactéries, n'ayant pas de pouvoir pathogène, En revanche, elles peuvent être des agents d'altération à l'origine de difficultés pour certaines industries.

- Exemple :
- *Lactobacillus viridescens* est responsable du verdissement des viandes.
  - Le surissement des jus de fruits est souvent dû à *Levilactobacillus brevis* ou *Lactiplantibacillus plantarum*.
  - Production de viscosité par le développement de *Leuconostoc (dextranicum et mesenteroides)* dans des laits gélifiés.

#### **II.6.1.4 Flore acétique :**

Les bactéries acétiques sont des bacilles Gram négatif, aérobies stricts, chimio organotrophes. Les genres *Acetobacter* et *Gluconobacter* sont essentiellement rencontrés. Ces bactéries produisent d'acide acétique qui peut conduire à la piquûre acétique au cours de la vinification et à une production d'acétate d'éthyle également nuisible.

### **II.6.2 Indice de la qualité sanitaire**

**II.6.2.1 Flores indicatrices de contamination fécale :** Les flores indicatrices de contamination fécale sont représentées par les microorganismes vivant normalement dans l'intestin de l'homme et des animaux. Leur présence dans un aliment révèle une contamination fécale et la présence éventuelle d'une bactérie pathogène responsable de toxi-infection.

#### **- Coliformes et coliformes thermotolérants**

Selon la norme ISO 4831 de juillet 1991, le terme coliforme correspond à « des organismes en bâtonnets, non sporogènes, à coloration de Gram négative, oxydase négative, aérobies ou facultativement anaérobies, capables de croître en présence de sels biliaires ou d'autres agents de surface possédant des activités inhibitrices de croissance similaires, et capables de fermenter le lactose avec production d'acide et de gaz en 48 heures, à des températures de 35 à 37°C ».

Les coliformes fécaux, ou coliformes thermotolérants, sont un sous-groupe des coliformes totaux capables de fermenter le lactose à une température de 44,5 °C.

L'espèce la plus fréquemment associée à ce groupe bactérien est l'*Escherichia coli* et, dans une moindre mesure, certaines espèces des genres *Citrobacter*, *Enterobacter* et *Klebsiella*.

#### **- Les streptocoques du groupe D ou streptocoques fécaux :**

Cocci Gram positif en chaînettes, catalase négative et possédant l'antigène de groupe D, c'est-à-dire *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, *Enterococcus durans*, *Streptococcus bovis* et *Streptococcus equinus*.

- ***Clostridium sulfitoréducteurs* :**

Les *Clostridium sulfitoréducteurs* sont des bacilles Gram positif anaérobies stricts capables de sporuler, réduisant les sulfites en sulfure. Leurs spores sont recherchées dans l'eau comme indice de contamination fécale ancienne.

**II.6.3 Flores pathogènes :**

Les bactéries pathogènes à retenir sont celles qu'il est possible de rencontrer en pratique dans un aliment, et pouvant devenir le vecteur de maladies transmissibles, en particulier de toxico-infections alimentaires. La liste de ces agents pathogènes peut être longue et elle ne saurait pas être exhaustive, vue de l'émergence de nouveaux agents pathogènes et l'évolution des connaissances. Donc le choix des pathogènes à retenir dépend du type de produit considéré. Le tableau 1 donne quelques exemples d'agents pathogènes recherchés dans le contrôle microbiologique.

**II.7. Les méthodes de contrôle :**

Différentes méthodes existent pour conduire l'analyse microbiologique d'un échantillon alimentaire, basées sur différentes technologies. Ces méthodes permettent de détecter les pathogènes et de dénombrer les microorganismes spécifiques et/ou totaux. Elles s'appuient sur les référentiels afférents à la microbiologie alimentaire (ISO, Codex alimentarius).

On distingue les méthodes normalisées, de référence et alternatives.

**II.7.1 Les méthodes normalisées :**

Une méthode normalisée est décrite par un organisme de normalisation [ISO (Organisation Internationale de Normalisation), Codex alimentarius, CEN (Comité européen de normalisation), AFNOR (association Française de Normalisation)..]. La normalisation implique la description détaillée de toutes les étapes de l'analyse et garantit la validité des résultats obtenus.

**II.7.2 Les méthodes de référence :**

Il s'agit de la méthode prise comme référence; c'est souvent une méthode horizontale et internationale. Elle devra être utilisée lors d'une expertise, ou utilisée pour la validation de méthode alternative par exemple.

**II.7.3 Les méthodes alternatives :**

Des méthodes plus rapides et plus simples d'exécution utilisées dans le cadre d'un autocontrôle et d'analyses de routine.

Il est nécessaire pour les entreprises et laboratoire utilisant ces méthodes de prouver que leurs performances sont les mêmes que les méthodes normalisées. Ainsi, l'AFNOR ou autres organismes de normalisation, ont mis en place des règles de validation de ces méthodes alternatives, comme la norme ISO16140, permettant de satisfaire à la norme de qualité ISO 9001.

Ces méthodes sont rapides. Elles sont basées sur des techniques de PCR, d'impédancemétrie, de détection immunoenzymatique (ELISA), d'ATPmétrie, de cytométrie de flux etc .....

Exemple d'application d'une méthode alternative de confirmation validée : Une méthode alternative de confirmation fondée sur un ELISA a été validée pour remplacer la confirmation biochimique de Salmonella tel qu'il est décrit dans l'ISO 6579-1.

### **Les systèmes de normalisation :**

**L'ISO (Organisation Internationale de Normalisation) :** Organisation non gouvernementale créée à Londres en 1947, le but de coordonner les normes industrielles et de faciliter les échanges internationaux, cette fédération regroupe 147 pays.

Le correspondant français de l'ISO est l'AFNOR.

Le comité technique 34 (CT34) concerne les produits agroalimentaires.

**Le Codex Alimentarius :** La Commission du Codex Alimentarius a été créée en 1963 par la FAO (Food and Agriculture Organisation) et l'OMS (Organisation mondiale de la Santé) afin d'élaborer des normes alimentaires, des lignes directrices et d'autres textes, tels que des Codes d'usages, dans le cadre du Programme mixte FAO/OMS sur les normes alimentaires. Les buts principaux de ce programme sont la protection de la santé des consommateurs, la promotion de pratiques loyales dans le commerce des aliments et la coordination de tous les travaux de normalisation ayant trait aux aliments entrepris par des organisations aussi bien gouvernementales que non gouvernementales.

**Le CEN (Comité européen de normalisation) :** Installé à Bruxelles, il comprend 17 membres, dont l'AFNOR pour la France. Les normes européennes (contrairement aux normes ISO) sont reprises systématiquement et sans modifications par tous les pays de la CEE, avec pour conséquence la suppression obligatoire des normes nationales divergentes. L'AFNOR (association Française de Normalisation). C'est une association « loi 1901 » créée en 1926, contrôlée par le ministère de l'industrie. L'AFNOR est le correspondant français des organismes européens et internationaux, elle édite les normes, gère le certificat NF, recense les besoins nouveaux, coordonne les actions, participe à la formation...

### **The International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF)**

La Commission internationale sur les spécifications microbiologiques pour les aliments (ICMSF) a été créée en 1962 grâce à l'action du Comité international sur la microbiologie et l'hygiène alimentaires, un comité de l'Union internationale des sociétés de microbiologie (IUMS). Par l'intermédiaire de l'IUMS, l'ICMSF est liée à l'Union internationale des sociétés de biologie (IUBS) et à l'Organisation mondiale de la santé (OMS) des Nations Unies. Les activités et le fonctionnement de la Commission sont précisés dans ses statuts.

**AFNOR (Association française de normalisation)** Créée en 1926, AFNOR est une association régie par la loi de 1901, composée de près de 2 500 entreprises adhérentes. Sa mission est d'animer et de coordonner le processus d'élaboration des normes et de promouvoir leur application. Société de service, AFNOR a développé, pour les entreprises en particulier, une gamme de prestations qui - de la diffusion des normes à la certification en passant par la formation - permet de façon concrète l'insertion de la norme dans le développement des entreprises.

**IANOR (Institut Algérien de Normalisation) :** organisme national de normalisation, il est chargé notamment de:

- Veiller à l'élaboration des normes nationales en coordination avec les autres secteurs ;
- Identifier les besoins normatifs nationaux ;
- Veiller à la mise en œuvre du plan national de normalisation ;
- Assurer la diffusion des informations relatives à la normalisation et ses activités connexes
- Gérer le point national d'information sur les Obstacles techniques au commerce (OTC) de l'Organisation Mondiale du Commerce (OMC) ;
- Gérer la marque de conformité aux normes algériennes.

Les normes homologuées sont publiées au JO (Journal officiel).

### **III. Prélèvement, transport et préparation des échantillons :**

Afin d'effectuer une analyse microbiologique, il est important de réunir un nombre de paramètres pour procéder à une série d'opération dont dépend la qualité du résultat de l'analyse. Ces opérations sont appliquées selon les critères établis par les organisations de normalisation (ISO, AFNOR, Codex Alimentarius...).

#### **III.1. Définition :**

**Lot :** est une unité de production (batch) qui peut être identifiée par le même code.

S'il n'y a pas d'identification par code, un lot peut être considéré comme étant :

a) la quantité de produits qui constitue un ensemble distinct: même produit, même étiquette, même type de contenant, même format, fabriqué et/ou emballé dans des conditions identiques, dans le même établissement, et ne représentant pas plus que la production d'une journée; ou

b) la quantité du même produit fabriqué dans le même établissement, disponible lors de l'échantillonnage à un endroit donné.

Si une partie du lot a déjà été distribuée, la quantité résiduelle du lot est considérée comme le lot d'échantillonnage.

**Échantillonnage :** consiste à prélever sur le lot un nombre représentatif d'individus pour les analyser.

**Prélèvement (échantillon élémentaire) :** quantité aliquote ou élément indivisible prélevé en un point du lot.

**Échantillon global :** l'ensemble homogénéisé de plusieurs prélèvements issus du même lot.

**Échantillon réduit :** fraction représentative de l'échantillon global.

**Échantillon pour laboratoire:** Fraction de l'échantillon global ou réduit, de quantité représentative nécessaire pour analyse au laboratoire.

#### **III.2. Echantillonnage :**

Les protocoles d'échantillonnage se doivent d'être conformes aux principes et procédures reconnus scientifiquement. L'échantillonnage devra être réalisé de façon à réduire les risques de contamination et de contamination croisée, de permettre la bonne exécution des analyses de laboratoire et de prendre en compte les précautions sanitaires et de sécurité. Finalement, il faudra éviter que l'échantillon ne soit détérioré à la réception du laboratoire.

### III.2.1 Stratégie d'échantillonnage

Deux types de prise d'échantillon sont possible selon l'objectif du contrôle microbiologique :

- Le prélèvement d'élément apparemment défectueux en vue de mettre en évidence la cause du défaut.
- Le prélèvement au hasard d'élément apparemment normaux pour le contrôle de la qualité. C'est-à-dire que chaque individu d'un lot a la même probabilité d'être prélevé que n'importe quel autre.

En règle générale, prélever dans la racine carrée du nombre d'unités du lot à échantillonner.

Exemple 1 : Un lot de 36 caisses de fromage la vache qui rit, chacune contenant 36 boîtes rondes de 8 portions. En appliquant le principe de la racine carrée de 36, les échantillons doivent donc être prélevés dans 6 des 36 caisses.

- il n'est pas nécessaire de choisir au hasard des boîtes rondes 8 portions dans chacune des caisses.

Exemple 2 : voir tableau 2

**Tableau 2 : exemple du nombre de prélèvement d'échantillons élémentaires (ISSEP, 2014)**

Volume du lot (m <sup>3</sup> )	Nombre d'échantillons élémentaires
10	4
20	5
50	8
200	15
1000	32
5000	42

### III.2.2 Conditions générales de prélèvement :

Dans de nombreux cas, les prélèvements portent sur des éléments indivisibles (boîtes de conserves, bouteilles, produits de petite taille...). Dans ce cas, les recueillir en l'état sans d'autres précautions que de bien les étiqueter. Dans d'autres cas, les produits contrôlés sont déposés en vrac ou bien par prise d'une partie aliquote d'un aliment de grande taille. Dans ce cas, les prélèvements sont effectués en prenant les précautions d'asepsie.

Le prélèvement aseptique consiste à empêcher toute contamination du matériel d'échantillonnage, des échantillons et de l'équipement soumis à l'échantillonnage. Pour ce faire, du matériel propre doit être utilisé et une méthodologie de travail garantissant un prélèvement dans les meilleures conditions d'hygiène possible doit être mise en place.

### III.2.3 Transport et conservation des échantillons :

Les échantillons doivent être soigneusement étiquetés : Noter la température initiale, la date et l'heure du prélèvement, méthode d'échantillonnage...

Les échantillons sont transportés à des températures :

- Ambiance inférieure à 40 °C pour les produits stables.
- Entre 0°C et +4°C pour les produits pasteurisés et similaires.
- Inférieure à -18 °C, pour les produits congelés ou surgelés.
- Entre 0°C et +4°C pour les produits stables et altérés.

La température de stockage doit être atteinte le plus rapidement possible après le prélèvement.

Les prélèvements doivent être acheminés au laboratoire dans les délais les plus brefs, de préférence dans les 24h ou dans un délai maximal de 36h (transport rapide et un stockage bref). Tableau 3 montre les températures de stockage de quelques produits laitiers.

**Tableau 3 : températures de stockage de quelques produits laitiers (Bonnet et al., 2002).**

<b>Produit</b>	<b>Température de stockage avant et durant le transport</b>
Lait non stérilisé	0 à 4 °C
Lait stérilisé, UHT en récipients non ouverts	Température ambiante (25 °C au maximum)
Glace de consommation et produits congelés à base de lait	- 18 °C
Lait sec	Température ambiante (25 °C au maximum)
Beurre	0 à 4 °C à l'obscurité
Fromage	0 à 4 °C

### **III.3 Prélèvements pour contrôle des surfaces :**

Le contrôle des surfaces au cours d'une production industrielle, est un point sensible du procédé HACCP. Cette analyse permet de s'étudier la flore microbienne des surfaces en contact avec les ingrédients, les produits élaborés, les personnels, les équipements, les murs et les sols des locaux.

Le mesurage de la contamination microbiologique des surfaces s'effectue en récupérant les micro-organismes viables, à l'aide de dispositifs de prélèvement, par contact direct ou indirect, ou par dépôt sur une boîte par sédimentation gravitationnelle. Il s'exprime en unités formant colonies par surface échantillonnée.

Il existe plusieurs techniques :

#### **III.3.1 Impression sur gélose :**

##### **Boîtes contact gélosée :**

Des boîtes de contact présentant un ménisque gélosé permettant d'entrer en contact avec la surface à échantillonner. Ces boîtes sont utilisées sur des surfaces lisses et plates. Ces dispositifs permettent d'obtenir, après incubation de milieux de culture appropriés, un dénombrement et une identification de la flore microbienne « détachable et revivifiable ». Pour le prélèvement de surfaces horizontales à l'aide de boîtes de contact, une standardisation est apportée grâce à l'application d'une pression constante et uniforme d'une masse de 25 g/cm<sup>2</sup> pendant 10 s sur une surface gélosée de 20 cm<sup>2</sup>.

La figure 4 montre la technique des boîtes contact gélose pour le contrôle des surfaces.

##### **Petrifilm:**

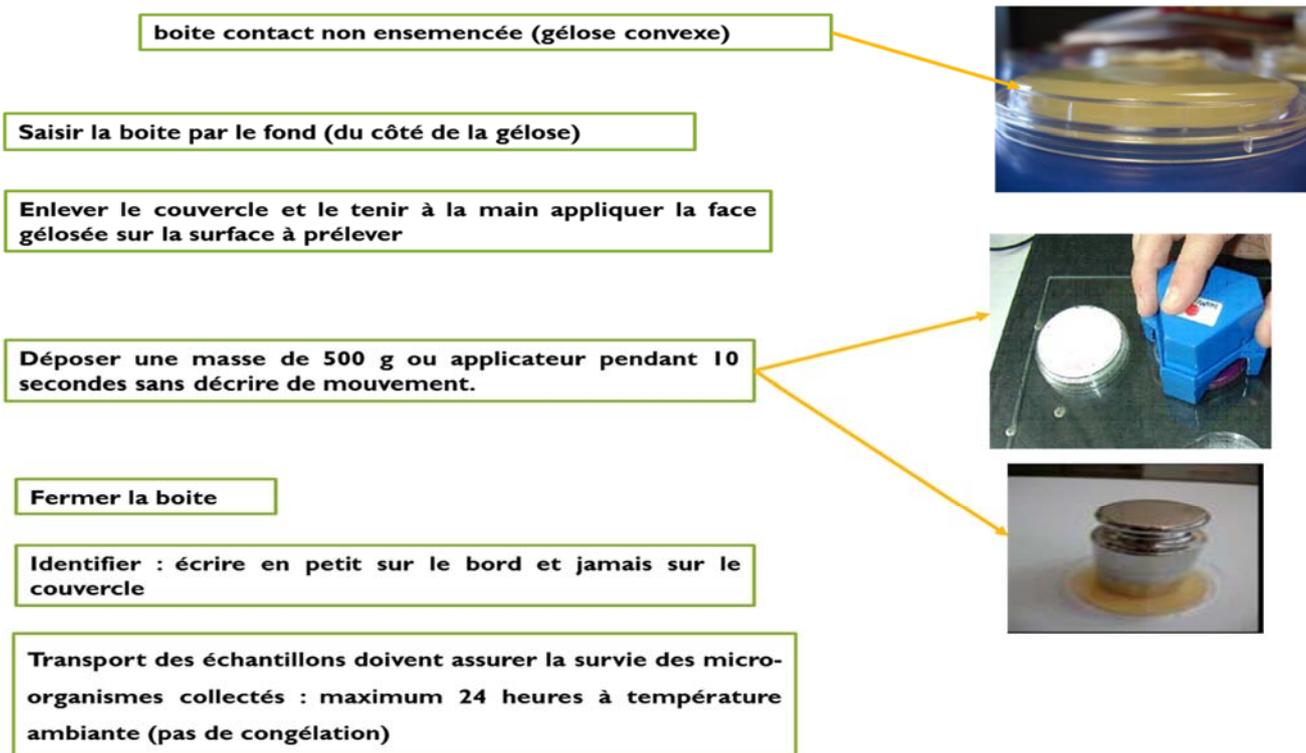
C'est un double film dont la partie inférieure contient un milieu déshydraté et le film supérieur quadrillé contient un gel hydrosoluble (figure 5).

##### **La lame gélosée :**

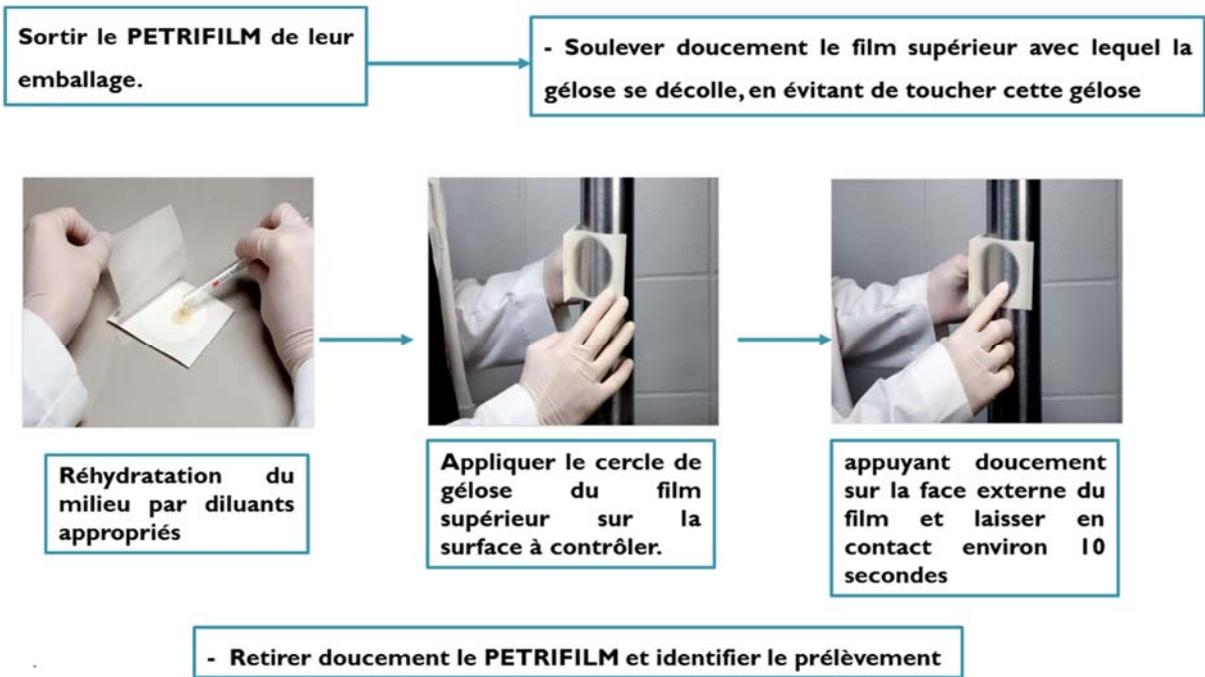
C'est un produit d'autocontrôle microbiologique simple et rapide à mettre en œuvre. Composée de deux faces (figure 6), elle permet de rechercher et d'analyser de manière semi-quantitative la population microbienne.



**Figure 6: La lame gélosée pour contrôle des surfaces**



**Figure 4 : Technique des boites contact gélosée pour le contrôle des surfaces.**



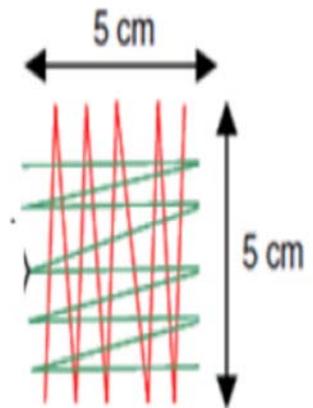
**Figure 5 : Technique Petrifilm pour le contrôle des surfaces.**

### III.3.2 Ecouvillonnage :

L'utilisation d'écouvillons, d'éponges ou de tissus d'essuyage stérilisés humides est particulièrement commode pour le prélèvement par écouvillonnage de surfaces importantes, non-absorbantes, irrégulières et par conséquent non accessibles aux dispositifs de contact. Ces dispositifs ne permettent qu'une analyse qualitative (figure 6).

Humidifier l'écouvillon à l'aide du diluant-neutralisant (eau distillée stérile, sérum physiologique)

Passer l'écouvillon en stries successifs et perpendiculaires sur la surface à échantillonner (une pression constante et un balayage de la surface)



Placer le dispositif dans un volume de liquide de rinçage approprié

Identifier le prélèvement

Transporter au laboratoire à 4°C

Agitation et mise en culture

Figure 6 : Technique Ecouvillonnage pour le contrôle des surfaces.

### III.4 Prélèvements pour le contrôle de l'air :

La contamination microbiologique de l'air est évaluée de façon active à l'aide d'un aérobiocollecteur dont la fonction est d'aspirer l'air et de récupérer les particules viables qui seront mises en évidence par culture (figure 8).

**Placer la gélose ouverte dans son logement sur le biocollecteur et poser le couvercle de la gélose (face externe sur le chariot ou la table)**



**visser la tête d'échantillonnage stérile ou préalablement nettoyées-désinfectées**

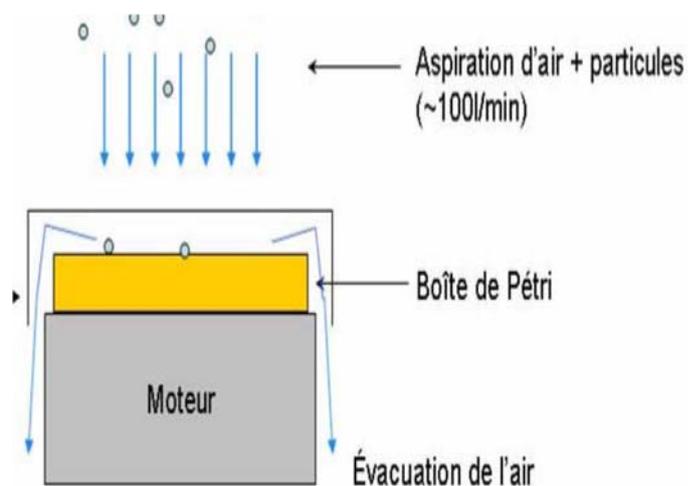


**Mettre en marche l'appareil pour régler le volume d'air à prélever**



**À la fin du prélèvement, retirer la boîte, la refermer ;**

**Identifier le prélèvement et le déposer couvercle vers le bas dans le contenant de transport**



**Figure 8 : Technique de prélèvement pour le contrôle de l'air**

### III.5 Prélèvements des produits alimentaires:

La méthode utilisée pour prélever les échantillons dépend:

- du but de l'échantillonnage;
- du type de marchandises ou de denrées concernées;
- de l'uniformité des marchandises ou des denrées;
- de la taille du lot de marchandises ou de denrées.

La quantité d'échantillons à prélever dépend de l'homogénéité, du type de produit et de l'analyse nécessaire devant être réalisée en laboratoire. Reportez-vous aux fiches d'échantillonnage pour en savoir plus sur la taille d'échantillon minimale à prélever. Pour les marchandises non couvertes par une fiche d'échantillonnage, il est recommandé de prélever pour chaque échantillon final la quantité minimum de 0,5 litre de produit liquide ou 0,5 kg de produit solide.

Si un produit est **homogène**, comme exemples de produits : des solutions claires ou d'autres liquides sans particules en suspension, des poudres ou granulés contenant des particules identiques et de coloration identique et des boîtes métalliques contenant un légume spécifique et présentant toutes le même numéro de production. Dans ces cas, peu importe l'endroit où un échantillon est prélevé; il peut être prélevé à un endroit commode.

Si les produits sont **hétérogènes** par nature, ils doivent être homogénéisés par mélange, agitation ou circulation dans des pompes à liquide, etc. avant leur échantillonnage. Si une homogénéisation n'est pas possible, il convient de prélever un grand nombre d'échantillons élémentaires à différentes profondeurs de manière à garantir l'obtention d'un échantillon représentatif de l'ensemble du lot.

### III.5.1 Denrées alimentaires à emballage de détail:

On considère comme « emballage de détail » tout emballage spécifiquement préparé pour la vente à un particulier, à des fins d'utilisation domestique. En bidons, bouteilles, bocaux et sacs dont le volume individuel, pour le plus petit emballage de l'envoi, ne dépasse en principe pas 5 litres ou 5 kilos (**tableau 4**).

Dans le cas de petits emballages, assurez-vous que l'échantillon final pèse au moins 250 g. Pour les articles, l'échantillon final minimal est une pièce de produit fini et fonctionnel.

#### Procédure d'échantillonnage

Prélevez un nombre approprié de bidons, bouteilles, sacs ou bocaux en guise d'échantillons. Assurez-vous que tous les bidons, bouteilles, sacs ou bocaux représentent le même lot. Choisissez les échantillons globaux du lot qui est principalement le plus important en nombre. Prélevez toujours des emballages intacts qui n'ont pas été ouverts.

<b>Taille du lot (nombre d'emballages)</b>	<b>Nombre recommandé d'emballages à échantillonner</b>
2-100	2
101-1 000	3
1 001-10 000	6
10 001-150 000	9
150 001-500 000	12
> 500 000	17

### III.5.2 Produits liquides :

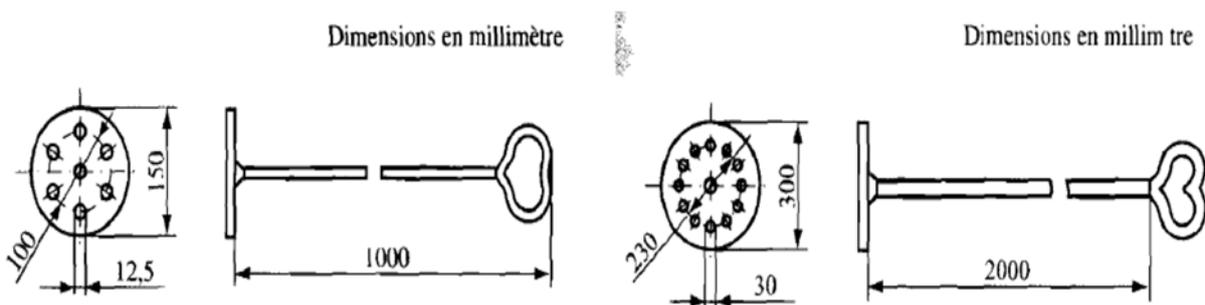
Le technique est variable selon la nature du produit, le volume et le conditionnement (petit volume emballé, grand volume en vrac). Selon le volume du produit, on utilise une pipette, une louche ou un flacon lesté.

Exemple : Prélèvement pour le contrôle du lait

Le prélèvement peut aussi bien être réalisé sur une citerne de stockage de laits, sur un bidon de collecte, ou sur un récipient destiné au commerce de détail. Dans ce dernier cas, c'est le plus souvent le contenu des récipients entiers non ouverts qui constitue l'échantillon. La méthode est la suivante :

- Bien mélanger les liquides en vrac, au moyen du plongeur ou de l'agitateur (instruments destinés à l'homogénéisation...), par agitation mécanique, ou à l'aide d'air comprimé propre, c'est-à-dire filtré.

La taille des plongeurs est évidemment dépendante de la dimension des récipients contenant les laits en vrac (figure 9).



**Figure 9 : Plongeurs pour mélanger les liquides en vrac (lait)**

- Prélever l'échantillon à l'aide d'une louche (figure 10) ou d'un extracteur immédiatement après l'homogénéisation ; la dimension de l'échantillon ne doit pas être inférieure à 500 mL. L'équipement pour prélèvement et les récipients destinés à recevoir les prélèvements doit être propre et stérilisé

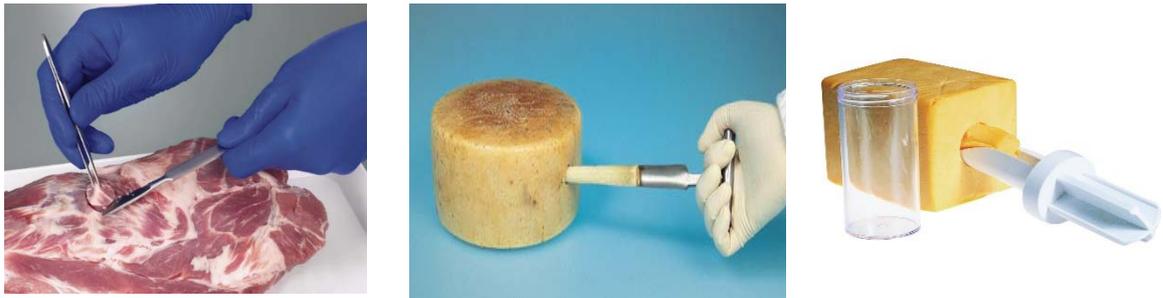


**Figure 10 : L'équipement pour prélèvement et les récipients destinés à recevoir les prélèvements du lait**

- La température de stockage doit être atteinte le plus rapidement possible après le prélèvement, et le délai entre prélèvement et analyse doit être le plus bref possible (de préférence inférieur à 24 h).

### III.5.3 Produits solides :

Selon le produit, le prélèvement est effectué au scalpe, à la sonde à fente, les pelles. La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement (figure 11).



**Figure 11 : L'équipement pour prélèvement des produits solides**

Pour le prélèvement les aliments emballés ou en vrac, des sondes à fente longue ou compartimentée sont utilisées (figure12). Les dimensions de la sonde doivent être adaptées aux caractéristiques de la portion échantillonnée (profondeur du récipient, dimensions du sac, etc.) et à la taille des particules composant l'aliment.



**Figure 12 : L'équipement pour prélèvement manuel et mécanique des produits en vrac**

Exemple de prélèvement pour les sacs des grains empilés (figure13) :

- Choisir au hasard les sacs à échantillonner selon un plan d'échantillonnage bien reparti;
- Commencer l'échantillonnage au bas de la pile de sacs et continuer vers le haut afin d'éviter la contamination croisée des échantillons primaires par les grains s'écoulant des sacs du dessus;
- Il est recommandé de frapper les sacs au bas de la pile avec le gros bout de la sonde pour réduire la pression dans les sacs et les empêcher d'éclater;
- L'échantillonneur doit varier son plan d'échantillonnage d'une palette à l'autre, en prélevant tantôt au bas, tantôt au milieu et tantôt au sommet de la palette;
- veiller à ce que les sacs choisis pour l'échantillonnage ainsi que ceux qui se trouvent au-dessus ou à côté du sac échantillonné soient propres et exempts de débris afin de prévenir la contamination de l'échantillon;
- Enlever ou balayer toute matière étrangère qui se trouve sur le sac ou à proximité avant d'y insérer la sonde;
- Introduire sonde compartimentée. Les dimensions de la sonde doivent être adaptées aux caractéristiques de la portion échantillonnée (dimensions du sac). Utiliser une sonde présente plusieurs orifices, ces derniers doivent être séparés par des compartiments ou répartis de façon séquentielle afin de garantir que l'échantillon est prélevé en divers points autour de la sonde.
- Ne pas introduire de sondes dans l'étiquette ou l'imprimé des emballages;
- Fermer les trous faits par la sonde dans les sacs de jute ou de polyéthylène en passant la pointe de la sonde sur le trou à quelques reprises et dans des directions opposées, de manière à replacer les fibres et fermer le trou. Un trou dans un sac de papier doit être scellé à l'aide d'une étiquette ou d'un ruban-cache adhésif approprié.
- Déposer l'échantillon prélevé dans un récipient et vérifier l'homogénéité des graines.
- Déposer l'échantillon élémentaire dans le récipient de l'échantillon globale.



**Choisir au hasard les sacs à échantillonner selon un plan d'échantillonnage**



**Utiliser une sonde présente plusieurs orifices. La dimension de la sonde doit être adaptée à la dimension du sac**



**Introduire la sonde dans sac**



**Ouvrir les orifices en tournant le bouton situé à l'extrémité du manche pour remplir les compartiments des graines.**



**Fermer les orifices et faire sortir la sonde.**



**Fermer le trou par une étiquette.**



**Déposer l'échantillon prélevé dans un récipient et vérifier l'homogénéité des graines**



**Déposer l'échantillon élémentaire dans le récipient de l'échantillon globale**

**Figure 13 : Méthode de prélèvement pour les sacs des grains empilés**

### **III.6 Préparation échantillons pour analyses :**

#### **III.6.1 Ouverture des récipients et emballages :**

Désinfecter la surface des récipients qui contiennent les échantillons à l'alcool avant l'ouverture.

Ouvrir les récipients dans la zone aseptique du bec Bunsen allumé à la flamme bleu ou sous la hotte flux laminaire.

#### **III.6.2 Homogénéisation**

Pour les produits liquides il suffit d'agiter manuellement.

Pour les produits solides il faut procéder à un broyage couplé à une dilution. Parmi les systèmes utilisés :

- Broyage manuel, on utilise un mortier au sable ou aux billes de verre.
- Broyage mécanique, avec un broyeur électrique à couteaux type VIRTIS, POTTER, STOMACHER...

Le broyage s'effectue en général avec 9 volumes de diluant pour 1 "volume" de produit.

#### **III.6.3 Standardisation de la suspension mère :**

Préparation de la suspension mère, de façon à obtenir une répartition aussi uniforme que possible des micro-organismes contenus dans la prise s'essai (JORA, 2014).

La suspension mère est constituée par le produit brut lorsqu'il est liquide et par le produit de broyage dilué dans les autres cas.

Lorsque le produit est liquide le prélèvement pour la première dilution est effectué à la pipette.

Lorsque le produit est solide, il faut procéder à la préparation de la suspension mère.

Suspension, solution ou émulsion obtenue après qu'une quantité pesée ou mesurée du produit à analyser a été mélangée avec une quantité neuf fois égale de diluant, en laissant se déposer les particules grossières (JORA, 2014).

Deux façons sont possible :

- Peser exactement la quantité donnée de produit dans le récipient de broyage et adjonction de la quantité nécessaire du diluant. Ex. : 10g du produit et 90 ml de diluant.
- Prélever dans le récipient de broyage (la tare du récipient étant déjà connue) d'une quantité approximative du produit et pesée de l'ensemble. L'adjonction du diluant s'effectue ensuite en fonction du poids relevé.

La suspension mère préparée du produit solide est considéré comme dilution mère ( $10^{-1}$ ).

### III.6.4 Préparation des dilutions décimales:

Préparation, si nécessaire, de dilutions décimales en vue de réduire le nombre de microorganismes par unité de volume pour permettre, après incubation, d'observer leur éventuel développement (cas des tubes) ou d'effectuer le dénombrement des colonies (cas des boîtes), comme précisé dans chaque méthode spécifique (JORA, 2014).

Un volume mesuré de la suspension mère est mélangé à un volume neuf fois égal de diluant pour préparer la deuxième dilution  $10^{-2}$  (produit solide) ou première dilution  $10^{-1}$  (produit liquide). En répétant cette opération sur les dilutions suivantes, on obtient une gamme de dilutions décimales appropriée pour l'inoculation des milieux de culture.

Les diluants utilisés pour la préparation de la suspension mère et les dilutions décimales doivent être de qualité analytique reconnue et appropriée pour l'analyse microbiologique (Tableau 5).

Entre la préparation de la suspension mère, ses dilutions et la mise en culture, il ne doit pas s'écouler plus de 45 minutes.

**Tableau 5 : Composition des diluants les plus couramment utilisés dans la préparation des suspensions mère**

<b>Eau physiologique 0,9%</b>	<b>Solution de Ringer 1/4</b>
Chlorure de sodium 9g Eau distillée 1000 ml pH7± 0,2, Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.	Chlorure de sodium. 2,250 g Chlorure de potassium 0,105 g Chlorure de calcium 0,120 g Hydrogénocarbonate de sodium 0,050 g Eau distillée 1000 ml pH7± 0,2, Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.
<b>Eau peptonée tamponnée</b>	<b>Bouillon tryptone-sel</b>
Peptone 10g Chlorure de sodium 5g Phosphate disodique anhydre 3,57 g Phosphate monopotassique anhydre 1,50 g Eau distillée 1000 ml pH7 ± 0,2., Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.	Tryptone 1g Chlorure de sodium 8,5g Eau distillée 1000 ml pH7± 0,2, Stériliser à l'autoclave à 121 °C pendant 15 minutes.

### III.7 Méthodes générales d'analyse

#### III.7.1 Les différents types de méthodes normalisées

Une méthode décrite par un organisme de normalisation est une méthode normalisée.

La normalisation implique la description détaillée de toutes les étapes et garantit la validité des résultats obtenus. Une méthode normalisée peut devenir officielle si elle est publiée au JO.

**Méthodes horizontales :** Ce sont des directives générales constituant souvent des méthodes de référence: certaines sont simplifiées et constituent des méthodes de routine utilisables pour tous les produits.

**Méthodes sectorielles :** Ces normes sont spécifiques à un produit ou un type de produit (produits carnés, produits de la pêche...)

Le choix de la méthode d'analyse doit tenir compte de la nature de la microflore recherchée.

Pour chaque microflore, il existe plusieurs méthodologies possibles:

- Méthodes de quantification des microorganismes: dénombrement sur milieu solide, quantification en milieu liquide.....
- Méthodes qualitatives (recherche des microorganismes): croissance sur des milieux spécifiques

#### III.7.2 Interprétation des résultats : plan échantillonnage

Un plan échantillonnage est la base statistique essentielle sur laquelle repose le jugement d'un lot.

L'échantillonnage microbiologique est exprimé en fonction de plans à deux classes ou à trois classes, selon le niveau de risque (tableau 6).

##### III.7.2.1 Les symboles et termes utilisés dans les plans et leurs définitions

**n** : nombre d'unités d'échantillonnage. Selon le cas, « n » peut être égal à 1, 2, 3, 4, 5

**m** : concentrations acceptables de microorganismes (par g ou ml ou par unité de surface) .

Dans un plan à deux classes, « m » sert à distinguer les unités de qualité **acceptable** de celles qui sont de qualité **inacceptable**, alors que dans un plan à trois classes, « m » sert à distinguer les unités de qualité **acceptable** de celles qui sont de qualité **médiocre**.

**M** : (Plans à trois classes seulement) seuil limite d'acceptabilité, au-delà duquel les résultats ne sont plus considérés comme satisfaisants, **sans que pour autant le produit soit considéré comme toxique**.

Les valeurs de M sont fixées en tenant compte de la variabilité analytique et statistique à :

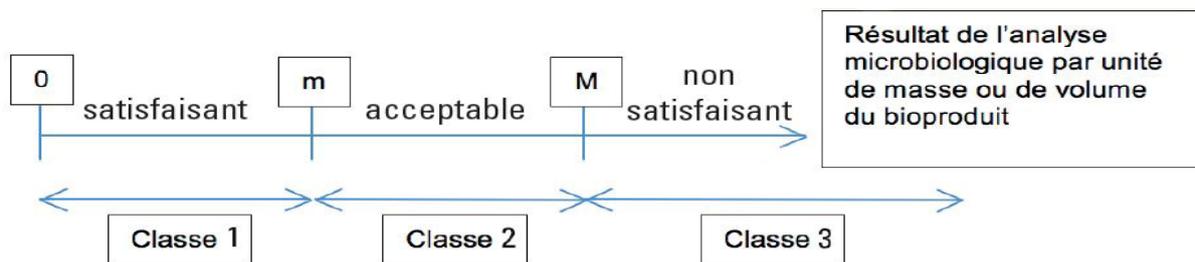
- $M = 10$  m lors du dénombrement effectué en milieu solide ;
- $M = 30$  m lors du dénombrement effectué en milieu liquide.

**c** : Représente le nombre maximal permis d'unités d'échantillonnage de qualité médiocre. Si le nombre d'unités de qualité médiocre est supérieur à « c », le lot d'où provient l'échantillon est inacceptable.

### III.7.2.2 plan échantillonnage à deux classes et à trois classes

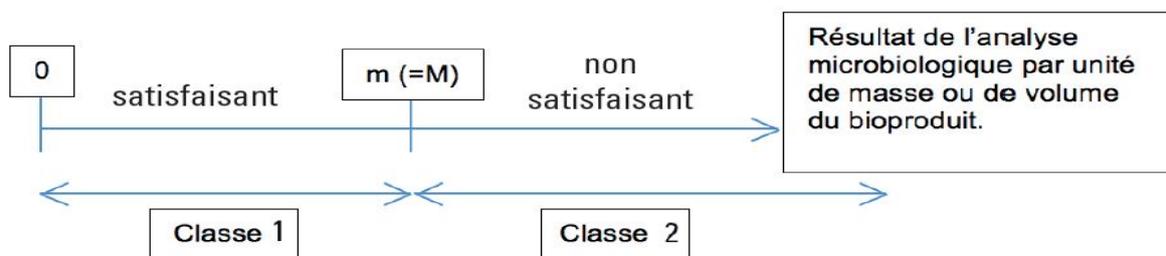
#### Plan d'échantillonnage à 3 classes

Dans un plan d'échantillonnage à trois classes, les échantillons étudiés sont divisés en trois catégories: satisfaisant, acceptable (médiocres) et non satisfaisant.



#### Plan d'échantillonnage à deux classes

Dans un plan d'échantillonnage à deux classes, les échantillons analysés sont divisés en deux catégories: satisfaisant et non satisfaisant, basées sur une valeur limite (un nombre limité d'organismes) «  $m=M$  ».



### III.7.3 Caractéristiques des risques associés aux différents critères

**Santé 1** : entraîne de sérieuses répercussions sur la santé ou causer la mort.

**Virus** : calicivirus, hépatite A, rotavirus, etc.

**Bactéries** : *Salmonella*, *Campylobacter* thermotolérants, *E. coli* O157 :H7, *Shigella*, *Yersinia enterocolitica* (souches pathogènes), etc.

**Protozoaires** : *Cyclospora*, *Cryptosporidium*, *Giardia lamblia*, etc.

**Toxines** : Entérotoxines de *Staphylococcus aureus*, toxines de *Bacillus cereus* et de *Clostridium botulinum*, toxines d'algues dans les produits marins, l'eau embouteillée, etc.

Microorganismes pathogènes de « santé 2 » à des concentrations correspondant aux doses infectantes ou toxigènes = niveau de risque de santé I.

*Staphylococcus aureus* :  $\geq 10^5$  UFC/g ou ml

*Clostridium perfringens* :  $\geq 10^5$  UFC/g ou ml

*Bacillus cereus* :  $\geq 10^5$  UFC/g ou ml

*Vibrio parahaemolyticus* :  $\geq 10^6$  UFC/g ou ml

**Santé 2** : avoir sur la santé des répercussions indésirables temporaires sans menacer la vie.

**Exp.:**

***E. coli*, Enterocoques .....**

*Staphylococcus aureus* :  $< 10^5$  UFC/g ou ml

*Clostridium perfringens* :  $< 10^5$  UFC/g ou ml

*Bacillus cereus* :  $< 10^5$  UFC/g ou ml

*Vibrio parahaemolyticus* :  $< 10^6$  UFC/g ou ml

### **Critère d'hygiène du procédé (CHP)**

Le problème repéré indique une rupture de la pratique d'hygiène. Il faut revoir les bonnes pratiques de fabrication (BPF/HACCP) du fabricant.

Exp. Levures ou moisissures, flore aérobies mésophiles, Coliformes totaux

### **Altération**

Le dépassement du critère indique un processus d'altération microbiologique du produit.  
Exp. Levures ou moisissures, bactéries lactiques

### **La Définition des Bonnes Pratiques de Fabrication (BPF) selon OMS:**

« Un des éléments de l'assurance de la qualité, garantissant que les produits sont fabriqués et contrôlés de façon uniforme et selon des normes de qualité adaptées à leur utilisation et spécifiées dans l'autorisation de mise sur le marché ».

Le tableau 6 donne les risques associés aux différents critères des aliments de nourrissant.

**Tableau 6 : exemple des critères microbiologiques des aliments de nourissant (JORA N° 39, 2017)**

Micro-organismes	Plan d'échantillonnage			Signification	Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
	n	c	classes		m	M
<b>Germes aérobies à 30 °C</b>	5	2	3	CHP	10 <sup>3</sup>	10 <sup>4</sup>
<b>Levures et moisissures</b>	5	2	3	ALTERATION	10 <sup>2</sup>	10 <sup>3</sup>
<i>Bacillus cereus</i>	5	2	3	SANTE 2	50	5x10 <sup>2</sup>
<b>Staphylocoques à coagulase +</b>	5	0	1	SANTE 1	Absence	
<i>Enterobacteriaceae</i>	10	0	1	SANTE 1	Absence dans 10 g	
<i>Cronobacter sp.</i>	5	0	1	SANTE 1	Absence dans 10 g	
<i>Salmonella</i>	5	0	1	SANTE 1	Absence dans 25 g	
<i>Listeria monocytogenes</i>	5	0	1	SANTE 1	Absence dans 25 g	

Exemple d'interprétation des résultats de la quantification de la flore mésophile aérobie totale d'un lait cru et interprétation des résultats selon critères microbiologiques d'un lait cru (JORA N° 39, 2017) (tableaux 7 et 8).

**Tableau 7 : Critères microbiologiques d'un lait cru (JORA N° 39, 2017)**

Micro-organismes	Plan d'échantillonnage			Signification	Limites microbiologiques (ufc/g ou ufc/ml)	
	n	c	classes		m	M
<b>Germes aérobies à 30 °C</b>	5	2	3	CHP	3x10 <sup>5</sup>	3x10 <sup>6</sup>

**Tableau 8 : Interprétation des résultats de 5 exemples du contrôle microbiologique d'un lait cru**

nombre d'essai	Charge bactérienne N (UFC/ml)	Interprétation des résultats
Exp 1	$N_1 = 10^5, N_2 = 10^5, N_3 = 10^4, N_4 = 2 \times 10^5, N_5 = 10^5,$	satisfaisant (Conforme)
Exp 2	$N_1 = 10^5, N_2 = 2 \times 10^5, N_3 = 10^5, N_4 = 2 \times 10^5, \underline{N_5 = 6 \times 10^5},$	Médiocre (acceptable )
Exp 3	$N_1 = 10^5, N_2 = 2 \times 10^5, \underline{N_3 = 10^6}, N_4 = 2 \times 10^5, \underline{N_5 = 6 \times 10^5},$	Médiocre (acceptable )
Exp 4	$N_1 = 10^5, \underline{N_2 = 7 \times 10^5}, \underline{N_3 = 10^6}, N_4 = 2 \times 10^5, \underline{N_5 = 6 \times 10^5}$	Non satisfaisant (Non Conforme)
Exp 5	$N_1 = 10^5, N_2 = 2 \times 10^5, N_3 = 10^5, N_4 = 2 \times 10^5, \underline{N_5 = 6 \times 10^6}$	Non satisfaisant (Non Conforme)

#### IV. Méthodes de quantification microbiologique :

De nombreuses méthodes peuvent être utilisées, leur choix dépend des paramètres suivants :

- Equipement nécessaire
- Rapidité et simplicité de mise en œuvre
- Délai d'obtention des résultats
- Coût de l'analyse

Il existe trois grands groupes de méthodes en microbiologie (figure 14)

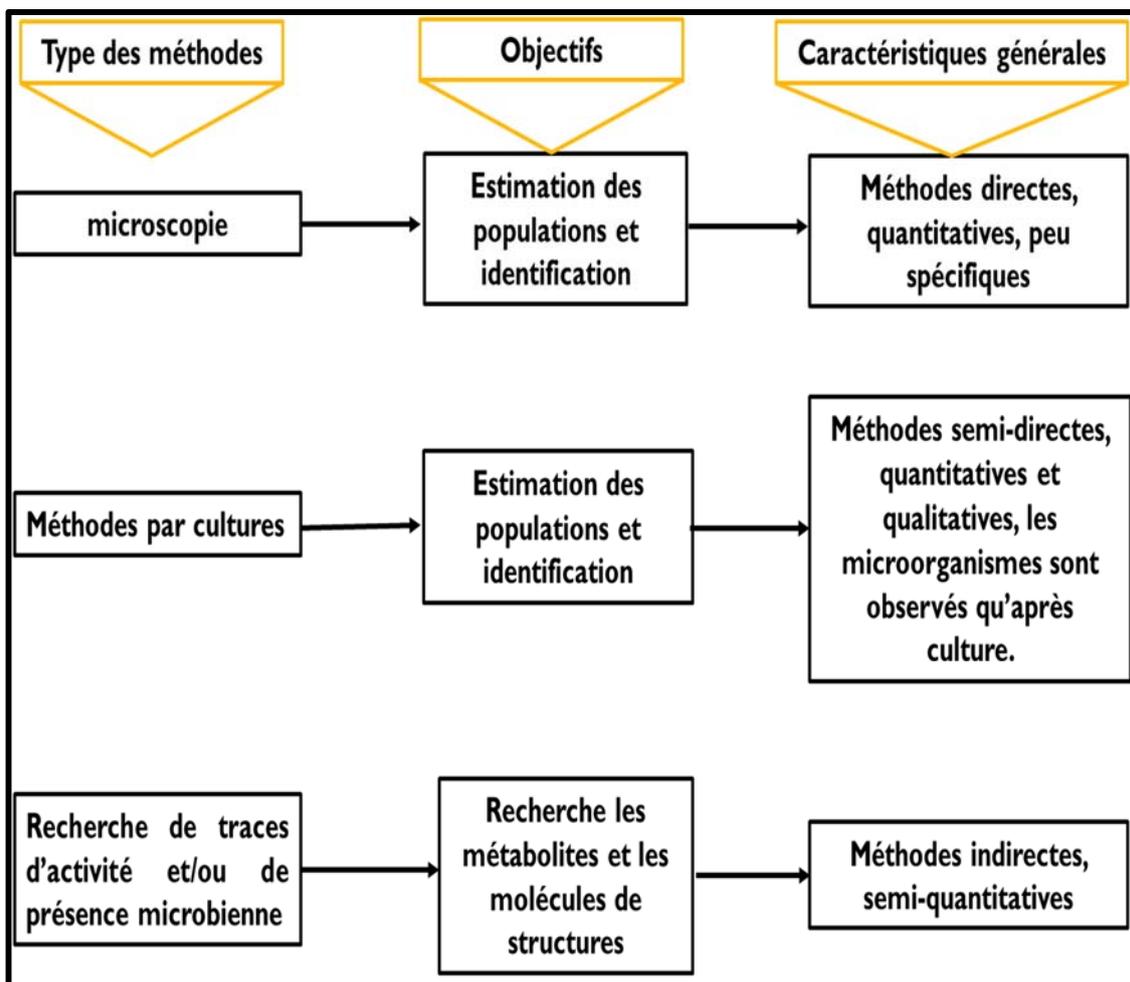


Figure 14 : Présentation des grands groupes de méthodes quantifications microbiennes

## IV.1 Méthodes classiques de numérations

### IV.1.1 Dénombrement direct des cellules à l'aide d'un microscope (cytométrie) :

Les méthodes de cytométrie ont pour finalité de mesurer certaines caractéristiques des cellules vivantes ou mortes et également de les dénombrer.

La cytométrie permet, en particulier, de dénombrer les levures et les bactéries présentes dans une suspension microbienne.

**IV.1.1.1 Les lames de comptage (cellules de numération) (hématimètre) :** est une lame de microscope portant un quadrillage gravé qui facilite le comptage des cellules observées au microscope. Les plus utilisées pour la numération des microorganismes sont la cellule de Malassez et la cellule de Thoma (figure 15).

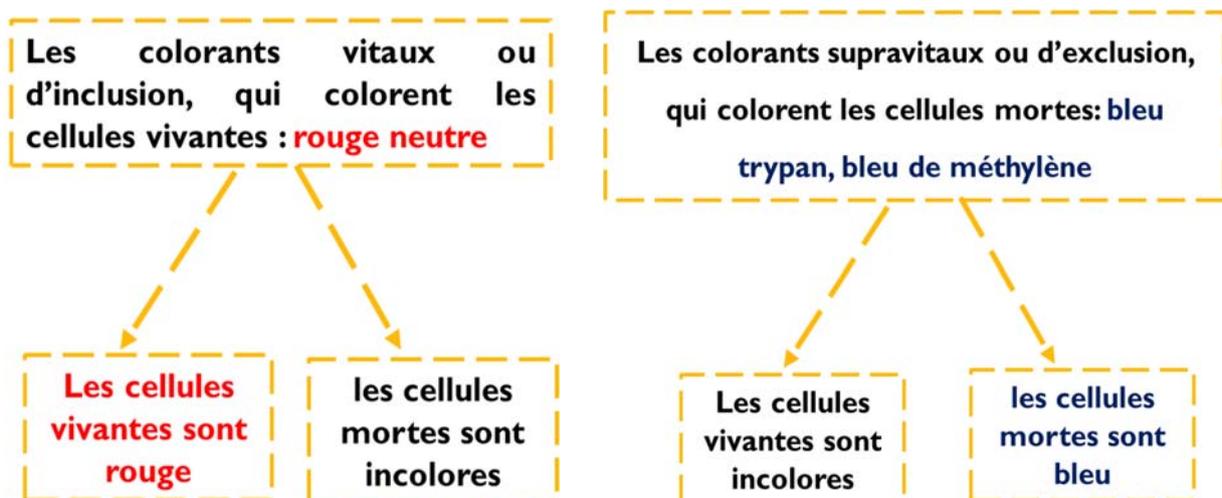
#### IV.1.1.2 Comptage et viabilité cellulaire des micro-organismes eucaryotes (levures)

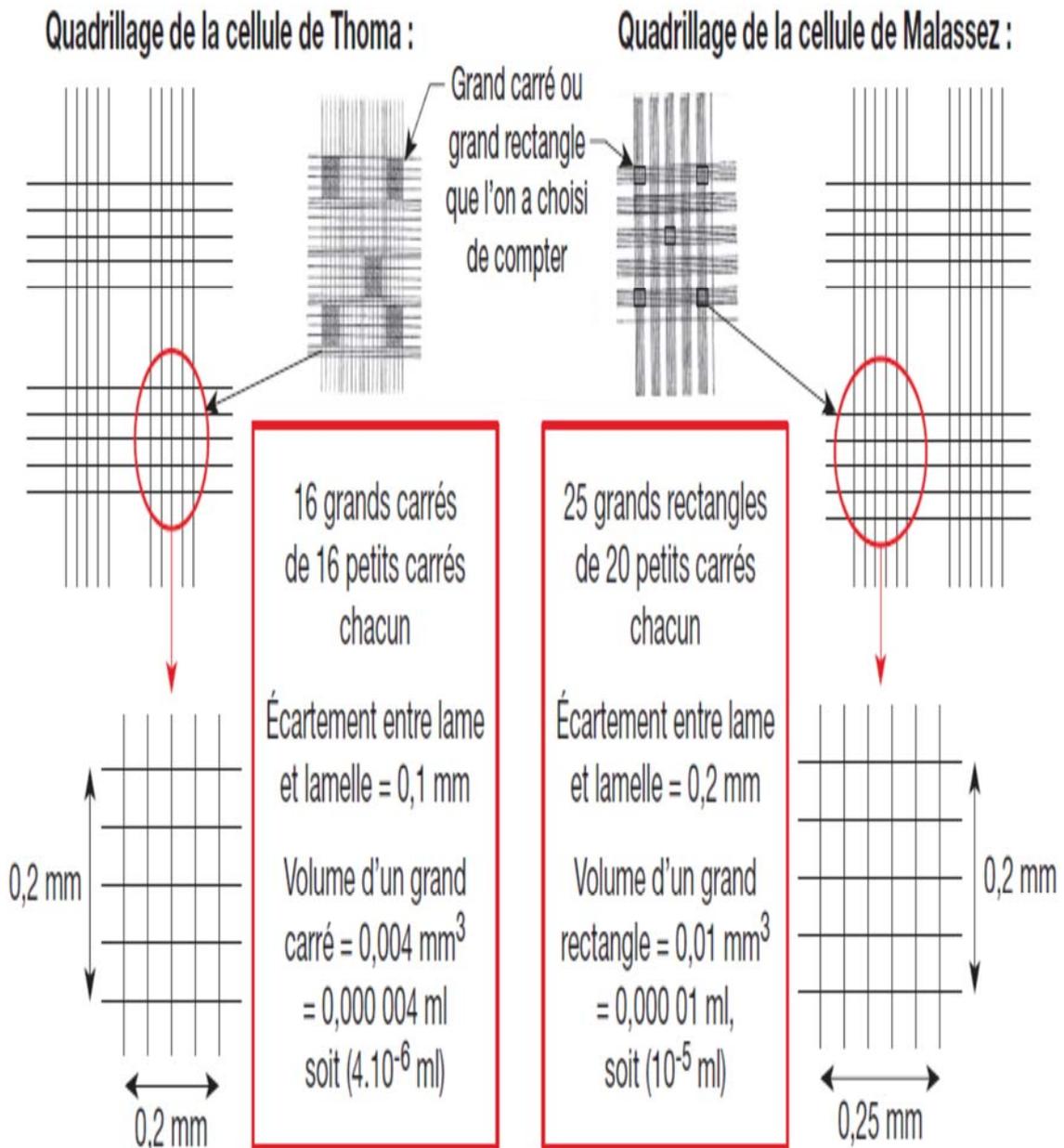
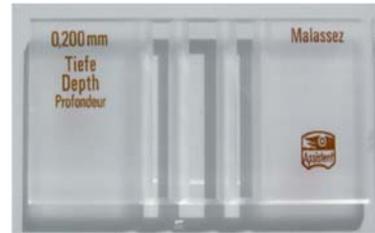
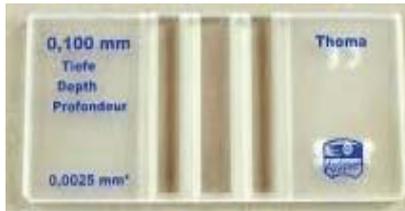
L'industrie agro-alimentaire utilise de nombreuses levures sélectionnées, conditionnées sous forme de levain (ou de ferment).

Ces levures, ajoutées à une matière première, assurent des étapes de la transformation de cette matière première en produit fini.

La viabilité cellulaire des levures peut être analysée lors du comptage en hématimètre grâce à l'utilisation de colorants.

Deux types de colorants utilisables lors d'une recherche de viabilité :

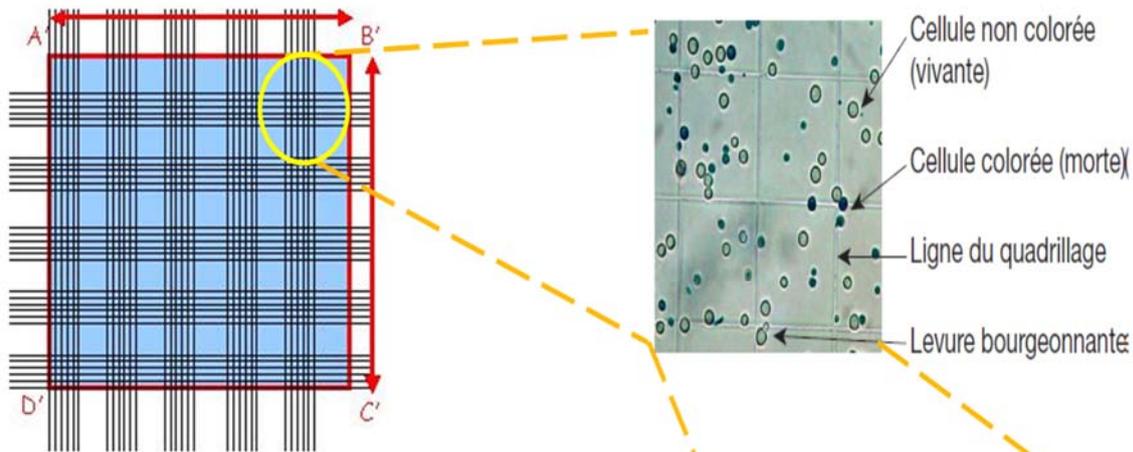




**Figure 15 : Les lames de comptage (cellules de numération) la cellule de Malassez et la cellule de Thoma**

### IV.1.1.3 Méthode de comptage sur la cellule de Malassez :

La figure 16 et le tableau 9 présentent la méthode de numération et du calcul des levures.



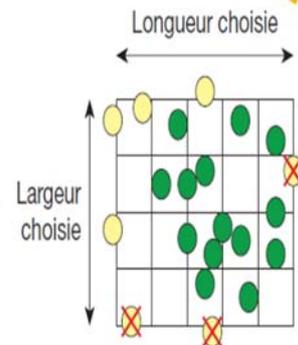
#### Les cellules à dénombrer

• Toutes les cellules à l'intérieur du grand rectangle : **14** ●

• Pour les cellules positionnées sur la limite du grand rectangle, on comptabilise les cellules d'une seule longueur et d'une seule largeur (soit 2 côtés sur 4) : **4** ○

• Les cellules ⊗ ne sont pas comptabilisées

→ Soit au total pour le grand rectangle : **18 cellules**



Pour obtenir un résultat statistique satisfaisant, on compte au moins 10 et au plus 100 cellules par unité de surface n (« rectangle ») sur une dizaine de carrés.

**Figure 16 : Méthode de comptage des levures avec cellule de Malassez**

**Tableau 9 : Dénombrement charge de levure dans une suspension colorée avec du bleu de méthylène et dilué à 1/10.**

Comptage grand rectangle (Malassez)	Levures mortes (coloré)	Levures vivantes (non coloré)
rectangle 1	3	11
rectangle 2	5	21
rectangle 3	15	20
rectangle 4	7	24
rectangle 5	6	19
rectangle 6	2	17
rectangle 7	4	25
rectangle 8	8	23
rectangle 9	12	7
rectangle 10	3	13
$n_{\text{moyen}}$ (total des levures de 10 rectangles / 10)	7	18
Formule de calcul : $N$ (nombre de levures/ml) = $n_{\text{moyen}} \times 10^5 \times \text{FD}$ . FD : Facteur de dilution de la suspension de levure.		
N (nombre de levures/ml)	$= 7 \times 10^5 \times 10 = 7 \times 10^6$ levures/ml	$= 18 \times 10^5 \times 10 = 18 \times 10^6$ levures/ml
Levures totales (mortes + vivantes)	$= 2,5 \times 10^7$ levures/ml	
Taux de viabilité (%) = (levures vivantes $\times$ 100) / levures totales	72%	

#### IV.1.1.4 Les avantages et les inconvénients :

Les inconvénients : Long et fastidieux ;  
 Difficulté de compter les cellules bactériennes (petite taille) ;  
 Difficulté de compter les cellules bactériennes mobiles ;  
 Difficulté de compter les cellules bactériennes forment des amas ;  
 On compte les cellules mortes des cellules vivantes.

Les avantages : Peu cher  
 Apporte des informations sur la morphologie des cellules.  
 Résultats rapide sans incubation.

#### **IV.1.2 Dénombrement semi directe des microorganismes après culture:**

Le dénombrement des micro-organismes viables est une méthode communément utilisée. Il peut s'agir de dénombrement en milieu liquide ou en milieu solide.

Dans la plupart des cas, une série de dilution décimale de l'échantillon à analyser, est réalisée.

##### **IV.1.2.1 Dénombrement en milieu solide (masse, surface):**

Le principe de ces méthodes s'appuie sur le fait qu'un micro-organisme présent dans un produit ou dans une suspension de ce produit, mis en culture dans des conditions optimales, en milieu solide convenable, s'y développe en formant une colonie (figure 16).

Il s'agit de faire correspondre un micro-organisme à une UFC (Unité Formant Colonie).

##### **Comptage des colonies et calcule la concentration microbienne en UFC :**

Pour les bactéries, on retient pour le calcul les dilutions présentant entre 10 et 300 colonies par boîte (JORA N°71, 2019). En présence d'un agent de différenciation, le nombre maximal de colonies caractéristiques ou présumées est de 150 par boîte (JORA N°14, 2015). Pour les levures et les moisissures, on retient pour le calcul les dilutions présentant les boîtes contenant moins de 150 colonies par boîte (JORA N°48, 2015).

Le calcule le nombre N de microorganisme présents dans l'échantillon pour essai, en tant que moyenne pondérée à partir des deux dilutions successives à l'aide de l'équation suivante (JORA N°14, 2015):.

$$N = \frac{\sum \alpha}{V(n_1 + 0,1 n_2) d}$$

Où :

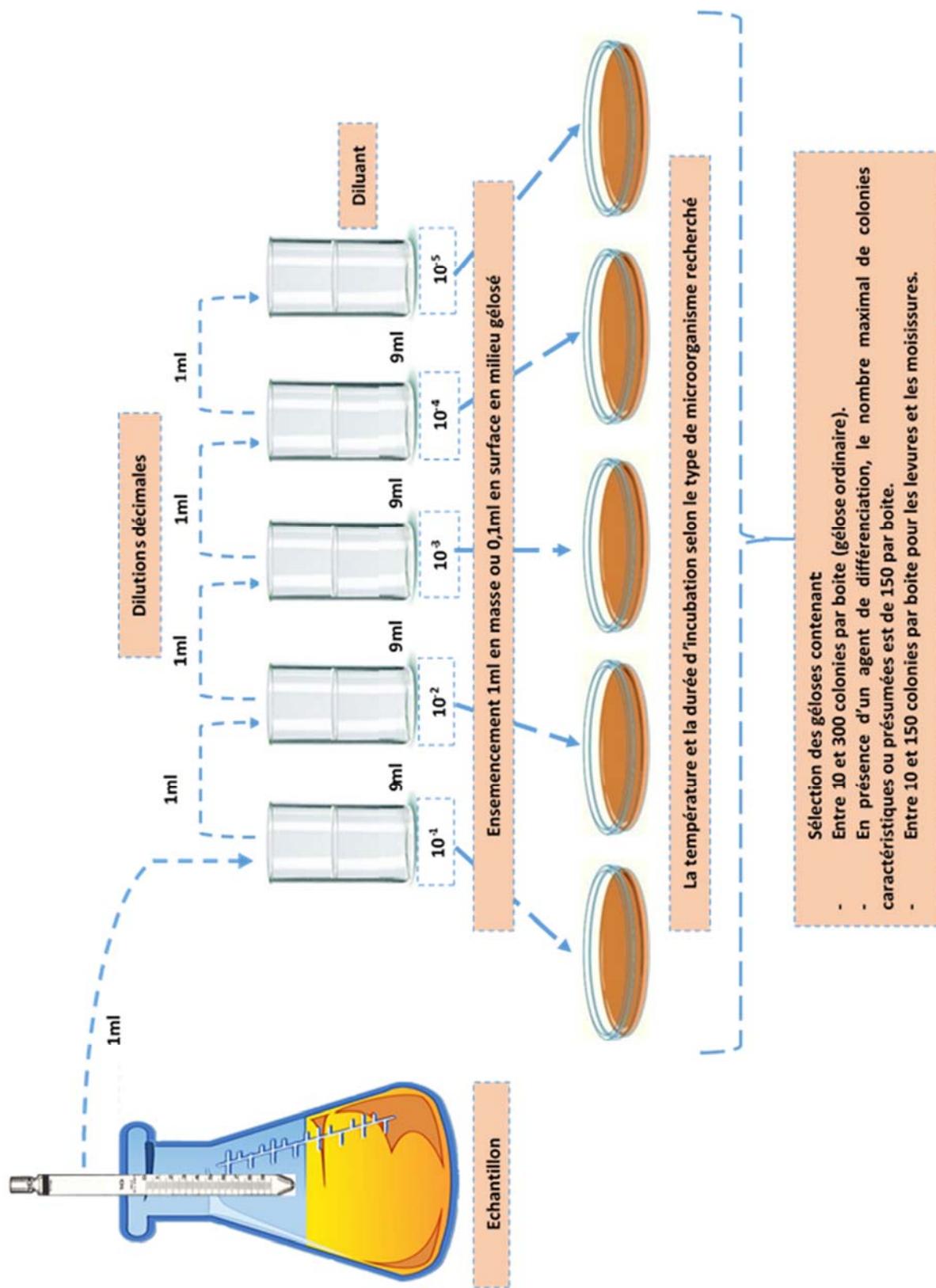
$\sum c$  = nombre total de colonies comptées sur les boîtes retenues.

$n_1$  = nombre de boîtes comptées à la dilution retenue la plus faible

$n_2$  = nombre de boîtes comptées à la seconde dilution retenue.

V = volume de prise d'essai inoculé en mL.

d = facteur de dilution à partir duquel les premiers comptages sont réalisés :dilution la plus faible (la suspension mère est une dilution)..



**Figure 16 : schéma simplifier des étapes de la méthode de dénombrement en milieu solide (masse, surface).**

#### **IV.1.2.2 Dénombrement en milieu solide (Méthode avec membrane filtrante):**

##### **Principe :**

Cette méthode a pour principe la concentration des micro-organismes à partir de volumes d'échantillons importants sur la surface de la membrane filtrante. La culture des germes s'effectue sur des milieux en boîtes.

Le dénombrement microbien par la technique de filtration nécessite l'utilisation d'un matériel spécifique.

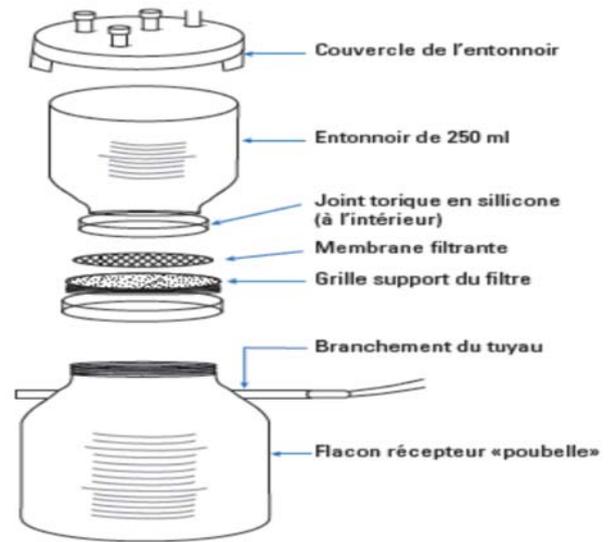
**Unité de filtration :** pour un seul échantillon (figure 17).

L'unité comprend :

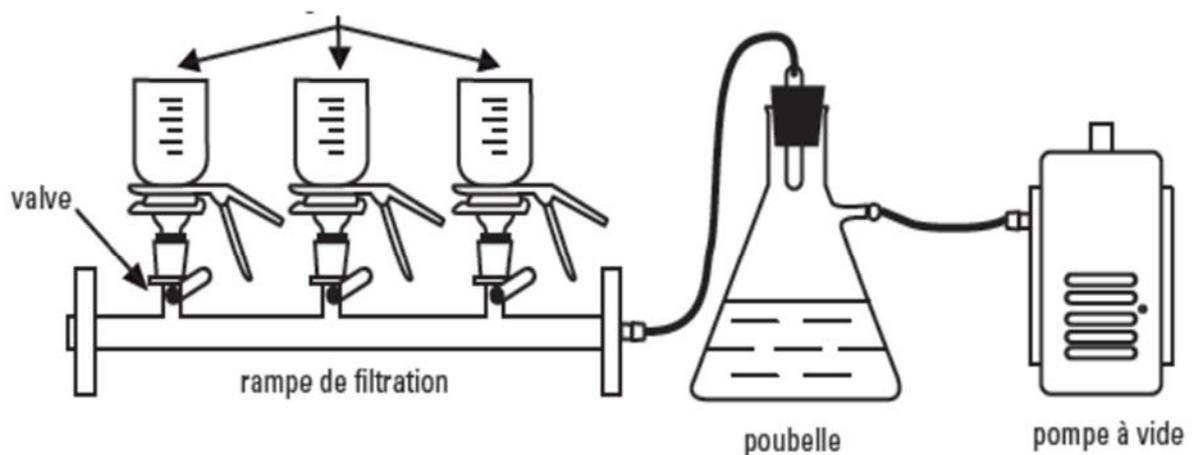
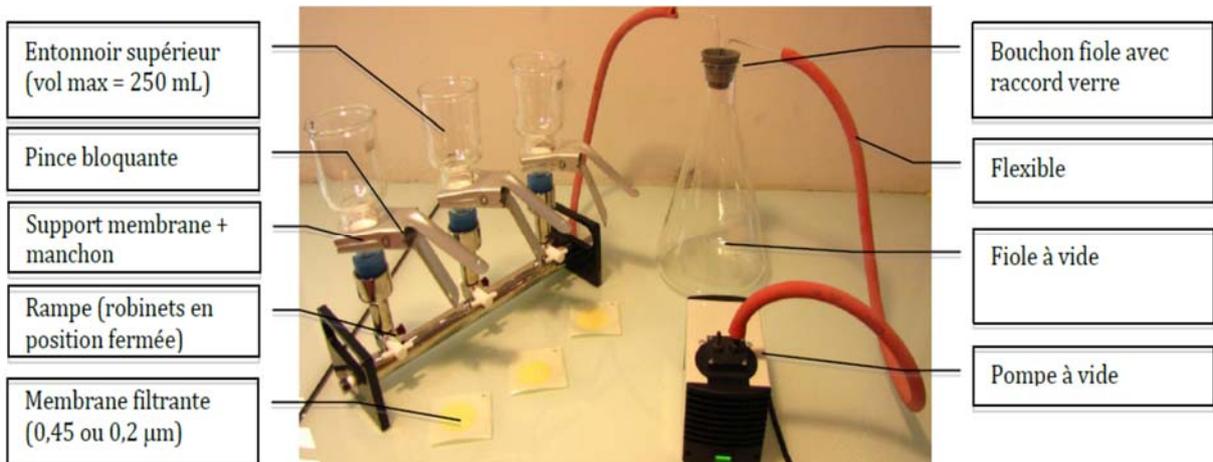
- Un récipient supérieur et un récipient récepteur en polysulfone autoclavable et réutilisable.
- Membrane filtrante en acétate de cellulose de 47 mm de diamètre à des pores d'un diamètre de 0,22  $\mu\text{m}$  et 0,45  $\mu\text{m}$ . Se fixe sur une plaque-support amovible située entre deux récipients.
- Deux joints toriques de la plaque-support doivent être correctement positionnés assurer l'étanchéité du système : 1 des joints doit être positionné dans la rainure du dessous du récipient supérieur et l'autre joint se place sur le dessous de la plaque-support.
- L'anneau de verrouillage serré à la main comprime les joints.
- L'échantillon liquide à analyser est déposée dans le récipient supérieur (50 à 250 mL).
- L'aspiration de L'échantillon liquide à analyser et son passage à travers le filtre est assurée par une pompe à vide manuelle branchée au récipient récepteur.
- Le filtrat est récupéré dans le récipient récepteur.

Après la filtration de l'échantillon liquide, le filtre est retiré à l'aide d'une pince désinfectée à l'éthanol et le poser sur le milieu adéquat dans une boîte de Pétri de 5 cm de diamètre, quadrillage vers le haut, sans laisser de bulles d'air entre le filtre et le milieu de culture pour que tout le filtre soit au contact du milieu de culture. Incuber à la température choisie.

**Rampe de filtration :** Permet une analyse simultanée de plusieurs échantillons ou plusieurs recherches sur un même échantillon (figure 18).



**Figure 17 : Unité de filtration: dispositif pour le contrôle microbiologique des liquides grâce à une membrane de filtration.**



**Figure 18 : Rampe de filtration : dispositif pour le contrôle microbiologique des liquides grâce à une ou plusieurs membranes de filtration.**

### **IV.1.2.3 Quantification en milieu de culture liquide :**

#### **Principe :**

Dans les conditions optimales de croissance, un seul micro-organisme présent dans un milieu de culture liquide se développe en y créant un trouble ou virage de couleur d'indicateur de pH ou autres signes (une modification visible du milieu).

Il s'agit de faire correspondre un micro-organisme à une UFT (Unité Formant Trouble).

#### **Méthode du nombre le plus probable (NPP) :**

La méthode repose sur une série d'au moins trois dilutions successives du produit réalisées au 1/10. Trois fois 1 ml de chaque dilution seront transférés dans trois tubes contenant chacun 10 ml d'un milieu de liquide approprié pour le microorganisme recherché (exemple : bouillon LBVB pour les coliforme, bouillon de Rothe pour les entérocoques). Les tubes sont ensuite incubés à température et durée adéquate au microorganisme recherché. Pour chaque dilution, on groupera le nombre de résultats positifs pour donner un chiffre total des résultats positifs. Ensuite, regrouper en nombre de 3 chiffres la suite de chiffres obtenue en commençant par le chiffre obtenu par la plus faible dilution. A la fin, lire la valeur du NPP dans la table de Mac Grady et en déduire la concentration des bactéries (N) dans l'échantillon avec l'application de la formule :

$$N = \frac{NPP}{V_{ensemencé}} \times Fd$$

Où : NPP : le nombre le plus probable dans la table de Mac Grady.

FD : Facteur de dilution : la dilution la plus faible des 3 chiffres regroupés.

V : volume ensemencé (1ml ou 10ml).

### **IV. 2 Techniques récentes (alternatives) de numération:**

Les méthodes classiques des tests de dénombrement des germes détectent uniquement les microorganismes cultivables.

Les résultats des tests sont obtenus en 5 à 14 jours, et dépendent du milieu de culture utilisé. Il n'est pas toujours possible de détecter tous les problèmes de contamination, ou la détection ne se fait pas assez tôt dans la chaîne de production.

Les méthodes alternatives qui ont pour principe de diminuer le délai nécessaire pour obtenir un résultat d'analyse.

Ces méthodes sont classées selon le principe technologique :

- les techniques indépendantes de la croissance microbienne (direct),

- les techniques dépendantes de la croissance microbienne (indirect).

#### **IV. 2.1 Les techniques indépendantes de la croissance microbienne (direct)**

Les technologies reposant sur la viabilité cellulaire sont souvent utilisées par les industriels.

Elles permettent de différencier les cellules mortes des cellules vivantes, et déterminent les caractéristiques morphologiques et/ou physiologiques des cellules par mesure de leurs propriétés optiques.

La détection et le dénombrement des microorganismes viables sont réalisés à l'aide d'un marqueur de viabilité fluorescent, sans qu'une étape de croissance microbienne soit nécessaire.

##### **IV. 2.1.1 Technique DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique):**

###### **Principe :**

Cette technique permet de détecter et de dénombrer les micro-organismes viables (cultivables et non cultivables) en temps réel : en quelques heures voire en quelques minutes dans un produit filtrable.

C'est une méthode rapide de comptage des cellules microbienne sur lame mais plus améliorée :

- d'une part par une filtration d'un volume de suspension plus important sur membrane (1 à 5 ml)
- d'autre part l'utilisation d'un fluorochrome et l'observation au Microscopie optique à fluorescence.

###### **Le matériel nécessaire pour Technique DEFT :**

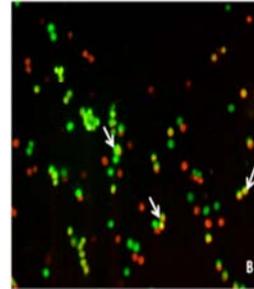
La figure 19 montre le matériel pour la technique DEFT. Les membranes utilisés dans cette technique doivent être en polycarbonate et non en acétate de cellulose. Sur Les membranes en polycarbonate, les cellules microbiennes restent en surface et sont facile à observer. Par contre les membranes en acétate de cellulose les microorganismes se répartissent dans l'ensemble du volume. La figure 20 présente l'utilisation de la technique pour l'analyse du lait cru.

Membrane en **polycarbonate** d'un diamètre de 0,6  $\mu\text{m}$  de porosité et d'un diamètre de 25 mm

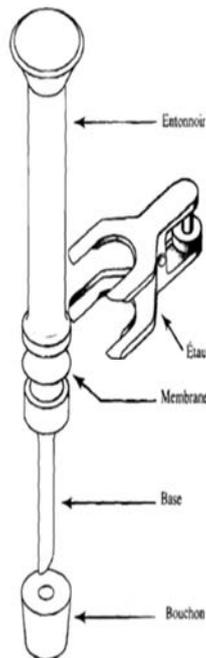


Fluorochrome pour la coloration les cellules microbiennes (solution orange d'acridine):

- les cellules inactives ou mortes en vert
- les cellules en croissance ou vivantes en orange



Appareil de filtration pour DEFT Nucléopore®



Microscope EPI fluorescence

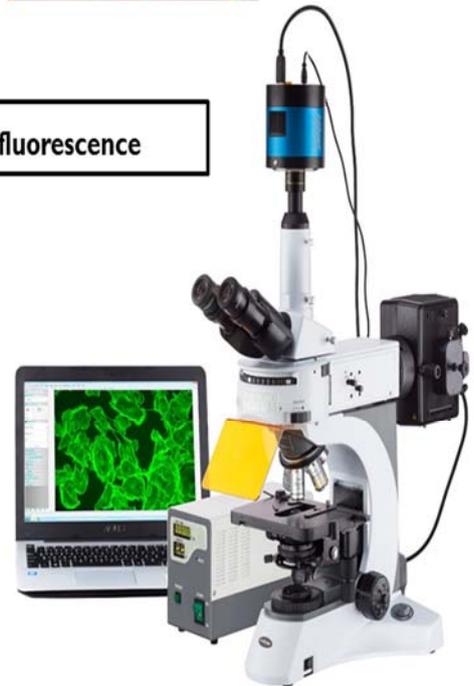
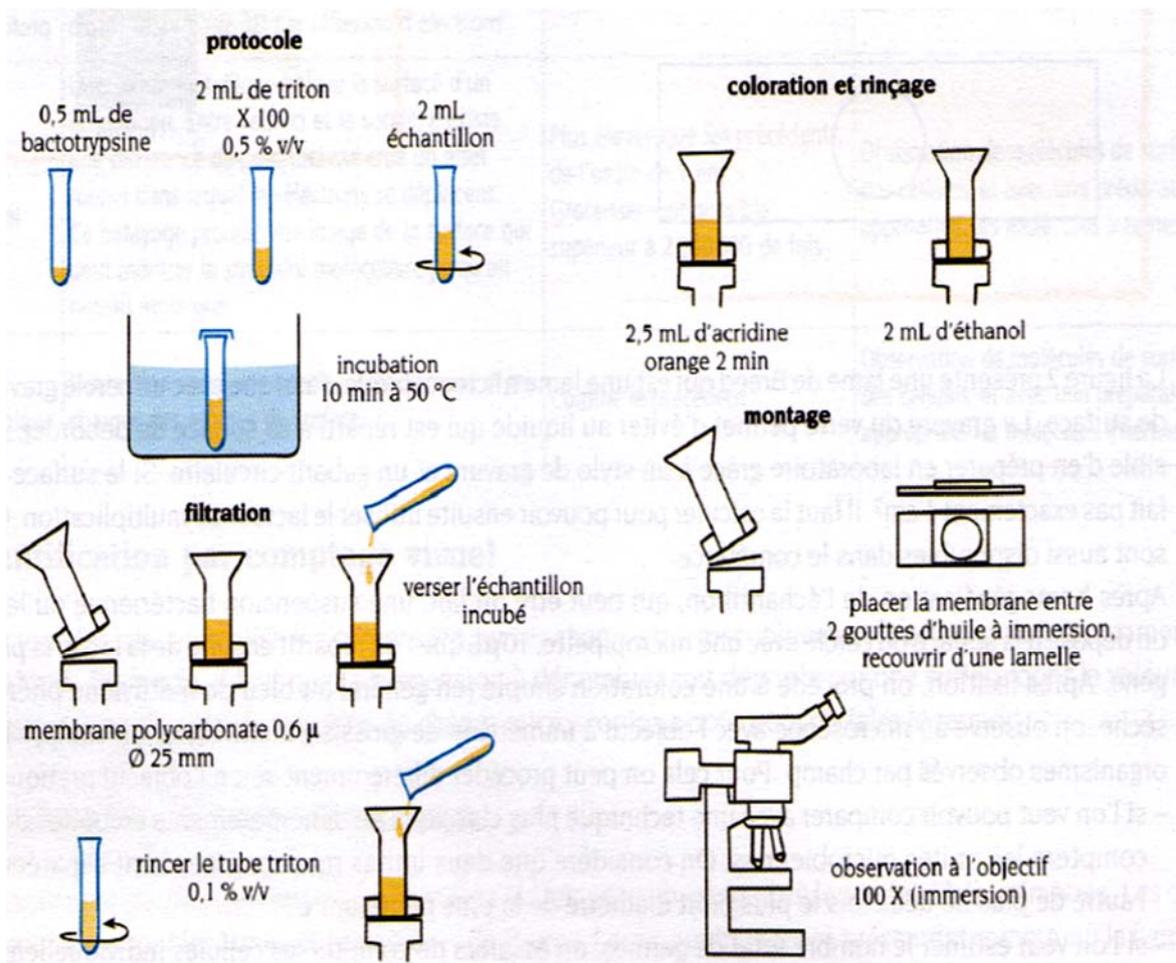


Figure 19 : Le matériel nécessaire pour la Technique DEFT



**Figure 20 : L'analyse du lait cru par la Technique DEFT (Branger, 2007)**

#### Les avantages et les inconvénients :

Les inconvénients :

- Onéreux;
- Le marquage est transitoire;
- Difficulté de compter les cellules bactériennes forment des amas ;
- Ne permet pas d'évaluer les populations inférieures à  $10^5$  levures/ml ou  $10^6$  bactéries/ml.

Les avantages :

- Permet de différencier les cellules mortes des cellules vivantes ;
- Résultats du comptage des cellules est rapide comparant aux méthodes démembrements sur milieu solide.
- Permet d'énumération des microorganismes non revivifiables et non cultivables.

#### IV. 2.2 Les méthodes dépendantes de la croissance microbienne (indirect)

Ces techniques nécessitent la croissance microbienne mais avec un moyen de détection plus rapide que le trouble microbien ou la formation de colonie visible à l'œil nu (tableau 10).

**Tableau 10 : Principaux techniques utilisées pour mesurer indirectement l'activité et la présence microbienne (Branger, 2007).**

Groupes de méthodes	Techniques	Immuno- logie	Potenti- ométrie	Colori- métrie	Lumi- nescence	Photo- métrie	Electrique	Chromato- graphie	Enzymo- logie
<b>Traces d'activité biochimique</b>	Dosage d'ATP				X				
	Dosage de NAD			X	(X)	X			X
	Dosage de pyruvate					X			X
	Enzymes	X		X		X			X
	Toxines	X				X			X
<b>Molécules de structure</b>	Spectre infrarouge IRTF					X			
	Acides nucléiques marqueurs génomiques	X		X	X	X		X électrophorèse	X
	Antigènes et anticorps	X				X			X
<b>Variations physicochimiques du milieu</b>	pH		X	X					
	Potentiel d'oxydo- réduction		X	X					
<b>Variations de la composition chimique du milieu</b>	Production d'acides		X	X		X		X	X
	Production de gaz	X						X	
	Protéolyse	X		X				X	X
	Production d'ammoniac		X						
	Dosage de glucides			X		X		X	X
<b>Variations physiques du milieu</b>	Impédance (conductance)						X		
	Trouble					X			

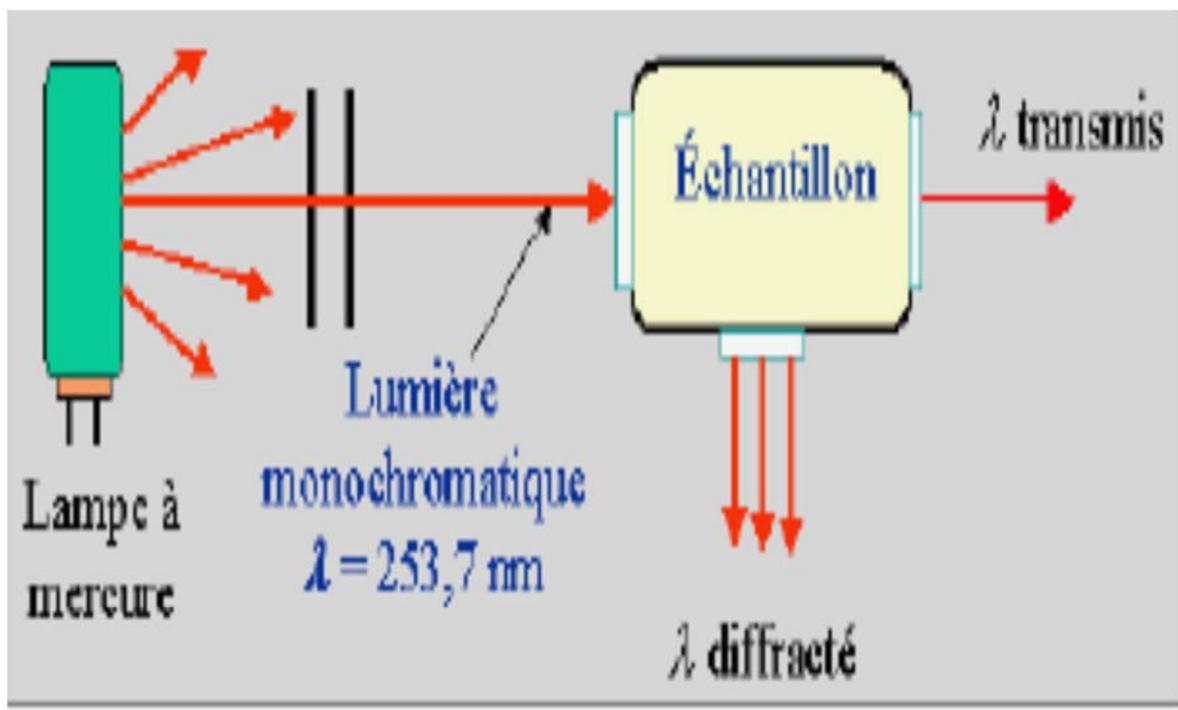
#### IV. 2.2.1 Mesure par turbidimétrie :

La turbidité se définit comme « la réduction de la transparence d'un liquide due aux matières non dissoutes » (NF EN ISO 7027, 2000).

Dans un milieu trouble, chaque particule se comporte comme une source secondaire de lumière.

Au sein d'un milieu trouble, la lumière subit trois catégories de phénomènes principaux (figure 21) :

- Des diffusions fonctions de la forme, la taille, la composition des particules ;
- Une absorption selon le taux d'opacité des particules.
- Le reste de la lumière est simplement transmis dans l'axe de la lumière incidente.



$$I_{\text{incidente}} = I_{\text{absorbée}} + I_{\text{transmise}} + I_{\text{diffusée}}$$

Figure 21 : comportement de la lumière incidente au sein d'un milieu trouble (Collin, 2015)

Sur la base des interactions entre la lumière et les molécules qui constitue le milieu trouble (les phénomènes de diffusions, d'absorption et transmise), deux méthodes élaboré pour la mesure et la quantification de la turbidité :

- Spectrophotométrie qui mesure de l'intensité de la lumière transmise, une fois celle-ci passée à travers un récipient transparent (cuvette dont la matière doit être adaptée à la longueur d'onde), contenant la suspension à étudier. Cette méthode permet de déterminer le taux d'absorbance des molécules non dissoutes (figure 22).

- Néphélométrie, qui consiste à mesurer la lumière diffusée à 90° d'angle par rapport à la lumière incidente (figure 22).

La néphélométrie est fréquemment utilisée pour contrôler la qualité de l'eau, par exemple dans le traitement des eaux. L'unité de mesure de la turbidité par la technique néphélométrique est l'UTN (Unité de Turbidité Néphélométrique).

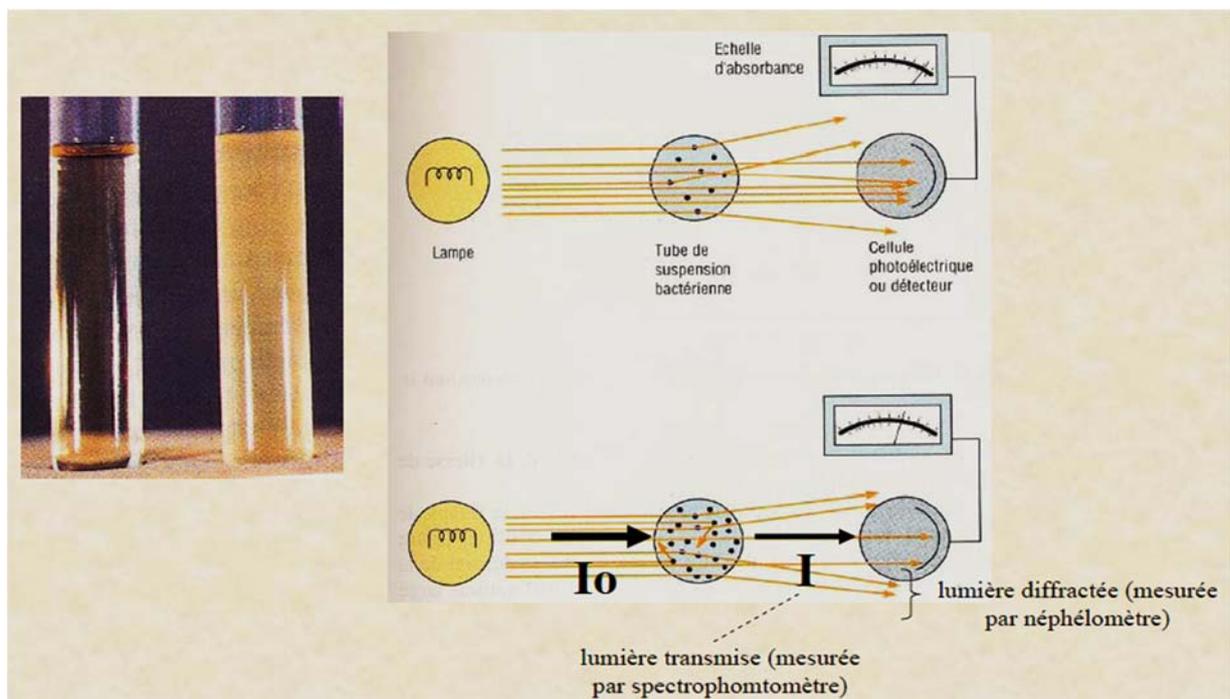
Dans le domaine de l'eau, on trouve également des FNU (Formazine Nephelometric Unit) ou FTU (Formazine Turbidity Unit), car la référence-étalon était la formazine (substance synthétique).

Classes de turbidité usuelles :

NTU < 5 → eau claire

5 < NTU < 30 → eau légèrement trouble

NTU > 50 → eau trouble



**Figure 22 : Schéma simplifié du principe de mesure des molécules dans un milieu trouble par spectrophotomètre et néphélomètre**

**Les avantages et les inconvénients :**

Les inconvénients :

- Pas applicable pour les milieux de culture très colorés.
- Ne permet pas de différencier les cellules mortes des vivantes.
- Cette méthode ne peut pas être utilisée si la concentration en microbienne est supérieure à une aberrance  $> 0,8$ . Il faut faire des dilutions

Les avantages :

- Peu onéreux.
- Simple et Rapide.

## **V. Identification microbienne**

La connaissance des caractéristiques phénotypiques, génotypiques et biologiques d'un micro-organisme est essentielle pour le différencier des organismes pathogènes et toxigènes apparentés ou des autres organismes nuisibles.

Les conclusions relatives à l'innocuité du produit ou à ses répercussions sur la santé humaine ou sur l'environnement sont valides seulement si les micro-organismes actifs sont identifiés correctement.

L'identification inexacte d'un micro-organisme peut fausser la détermination du niveau de danger lié à celui-ci. Ce qui pourrait donner lieu à des mesures de gestion des risques insuffisantes pour un micro-organisme présent qui va avoir des répercussions néfastes sur la santé humaine, ou des mesures de gestion des risques inutiles pour des micro-organismes peu dangereux.

### **V. 1 Approche générale de l'identification microbienne**

Le choix de la ou des méthodes utilisées pour l'identification microbienne dépend du type et de la nature du micro-organisme.

Les méthodes choisies doivent être bien décrites dans la littérature scientifique et conformes à celles qui sont actuellement utilisées dans le domaine de l'identification et de la classification taxonomique microbienne. Ces méthodes doivent aussi permettre l'identification des organismes au niveau du genre, des espèces et, si possible, de la souche.

La précision et la validité des méthodologies utilisées pour identifier le micro-organisme constituent des caractéristiques cruciales dans l'évaluation de l'innocuité du produit.

### **V. 2 Approche polyphasique à l'identification microbienne**

Le principe de polyphasie utilise plusieurs éléments des données issus d'une combinaison de différentes méthodes. Il est possible d'utiliser une combinaison de méthodes moléculaires, biochimiques et microbiologiques.

#### **V. 2.1 Analyse phénotypique**

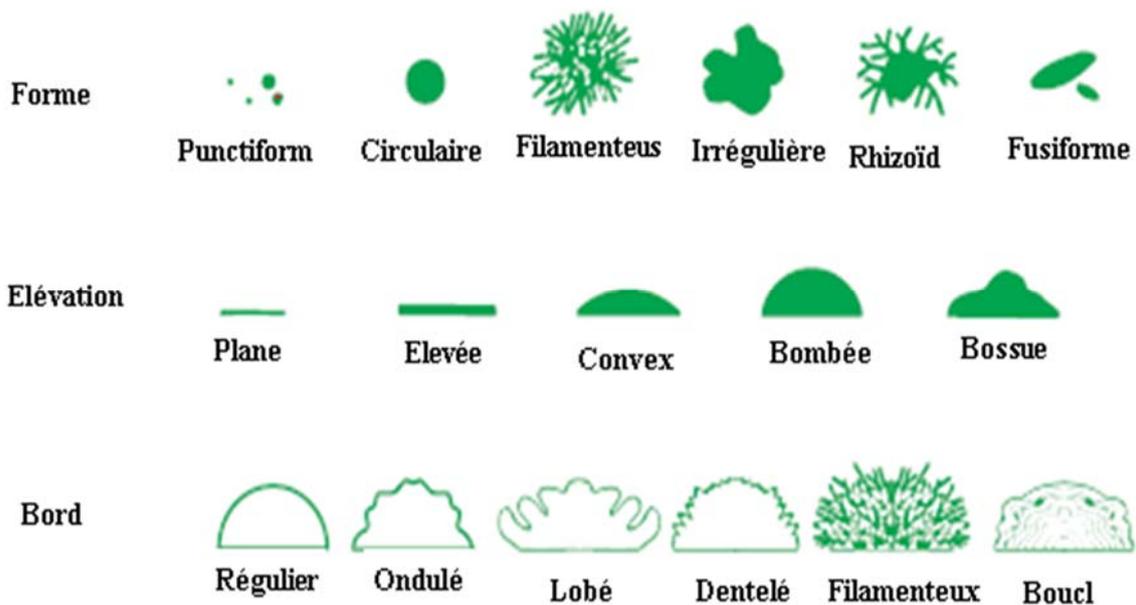
Les méthodes phénotypiques conviennent aux micro-organismes cultivables et revivifiables qui peuvent croître en culture pure sur un milieu artificiel, et dont les paramètres de croissance ainsi que les profils physiologiques et biochimiques sont bien établis.

### V. 2.1.1 Caractères morphologiques et structuraux

La morphologie de la colonie et des cellules permet d'obtenir une identification initiale relativement à un micro-organisme. Cela s'effectue par des méthodes simples d'isolation et de culture du micro-organisme et par l'observation visuelle suivant par observation au microscope.

#### a/ Observation macroscopique des colonies sur gélose

Les propriétés macroscopiques comprennent: La taille, La forme, L'opacité, La consistance, pigmentation (figure 23).



**Figure 23 : Caractères d'identification macroscopiques des colonies microbiennes sur milieu gélosé**

#### b/ Observation microscopique

L'observation microscopique des cellules microbiennes est un paramètre crucial d'identification. Ce test nous permet, par l'utilisation des techniques spécifiques, d'observer la forme des cellules et

- L'observation la forme cellulaire : coque, coccobacille, bacille, bacille incurvé, bacille de forme irrégulière, bacille, filamenteux...
- Différentiation entre les bactéries Gram+ (violet) et les bactéries Gram- (rose) avec le test de Gram

- Observation et identification des bactéries BAAR (bacille acido-alcool-résistant) par la coloration de Ziehl ou Kin Youn : BAAR (rose), ou non BAAR (bleu)
- Coloration au vert de Malachite (Schaeffer-Fulton) pour la présence d'endospores. Les spores apparaissent vertes sur fond rosé.
- Coloration au l'encre de chine pour les capsules. La capsule apparaît alors sous la forme d'un halo clair.
- Mettre en évidence la présence des flagelles par l'observation de la mobilité des bactéries à l'état frais.

Ces tests sont considérés comme la phase d'orientation pour les tests biochimiques à réaliser pour la deuxième phase d'identification.

### **V. 2.1.2 Caractères culturels**

L'étude des caractères culturels sur différents milieux de cultures et conditions physicochimiques permet de différencier le type de microorganisme caractérisé.

- Culture en présence ou absence d'air (dioxygène) à la pression partielle « normale » (21,3 kPa ou 0,213 Bar): Aérobie stricte, Aéro-anaérobie facultative, Anaérobie stricte et Micro-aérophile.
- Températures possibles de culture et températures optimales: Thermophile, Mésophile psychrophile.
- Exigence de la culture : on peut considérer comme non exigeante une bactérie se développant sur un milieu dit ordinaire (gélose ordinaire, eau peptonée, gélose trypticase-soja...). Une bactérie exigeante ne cultive que sur milieu enrichi (gélose au sang, gélose chocolat enrichie).

### **V. 2.1.3 Caractères biochimiques :**

Les tests biochimiques utilisent des milieux de croissance, des nutriments, des produits chimiques ou des conditions de croissance particuliers afin d'obtenir une réponse biochimique observable et mesurable du micro-organisme, permettant ainsi son identification et sa caractérisation. Ces tests comprennent:

- Présence d'enzymes : catalase, oxydase...
- Capacité de métaboliser une molécule: sucres, acides aminés, lipides
- Capacité de cultiver en présence d'un inhibiteur : diverses concentrations d'NaCl, antibiotiques, antiseptiques, antifongiques, antiviraux....
- Capacité de synthèse à partir de sources de carbone données.

Le tableau 11 englobe une liste non exhaustive des caractéristiques biochimiques d'un micro-organisme pouvant être utilisées dans une approche d'identification.

**Tableau 11 : Liste non exhaustive des caractéristiques biochimiques utilisés dans une approche d'identification.**

Caractéristiques		Tests	Résultats
Présence d'enzymes	<i>Catalase</i>	Dégradation du peroxyde d'hydrogène (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ).	Résultat + : formation rapide de bulles
	<i>cytochrome oxydase</i>	Disques Oxydase (OX) (N,N,N',N'-Tetramethyl-p-phenylenediamine dihydrochloride)	Résultat + : coloré en bleu
	<i>β-galactosidase</i>	Hydrolyse du substrat 2-nitrophényl-β-D-galactopyranoside (ONPG)	Résultat + : couleur jaune
	<i>nitrate réductase</i>	Bouillon nitraté ensemencé + réactif Griess (phase 1) + poudre de zinc (phase 2).	Phase 1 : résultat + : coloration rose (transformer les nitrates en nitrites). Phase 2 : si l'absence de coloration rose phase 1, ajouter poudre de zinc, résultat +: incolore (nitrates ont été réduits au stade azote).

**Tableau 11 : Liste non exhaustive des caractéristiques biochimiques utilisés dans une approche d'identification (suite)**

Caractéristiques		Tests	Résultats
Capacité de métaboliser une molécule	Étude du métabolisme glucidique	Étude de la voie d'attaque des glucides MEVAG (milieu de Hugh et Leifson)	Bactéries fermentatives: 2 milieux deviennent jaunes. Bactéries oxydatives : tube fermé pas de culture, tube ouvert acidification à la surface.
		La gélose TSI (Triple Sugar Iron)	-Fermentation de glucose: Culot jaune. - Fermentation du lactose et/ou du saccharose: Pente jaune. -Production de gaz : Apparition de gaz dans le culot. - Formation d'H <sub>2</sub> S: Formation d'une coloration noire
	Étude du métabolisme protéique	Recherche de décarboxylases (LDC, ODC, ADH) (milieu Møller)	Résultats +: pourpre
		Recherche de désaminases :	
		tryptophane désaminase, (milieu Urée indoleensemencé + réactif perchlorure de fer )	Résultats +: coloration vert
		Recherche de tryptophanase (milieu Urée indoleensemencé + réactif Kovacs)	Résultats +: coloration rouge
		Recherche de désulfhydrases (gélose Kligler-Hajna)	Résultats +: Taches noires
	Recherche d'une uréase (milieu Urée indole)	Résultats +: coloration rose-rouge	

**Tableau 11 : Liste non exhaustive des caractéristiques biochimiques utilisés dans une approche d'identification (suite)**

Caractéristiques		Tests	Résultats
<b>Capacité de métaboliser une molécule</b>	<b>Étude du métabolisme lipidique</b>	La recherche d'une lipase sur milieu au Tween 80	Résultats+: opacification du milieu
	<b>Utilisation du citrate comme unique source de carbone</b>	Le milieu au citrate de Simmons contient du citrate de sodium et du sel d'ammonium ainsi que du bleu de bromothymol.	Résultats +: virage de la couleur de la gélose de vert en bleu.

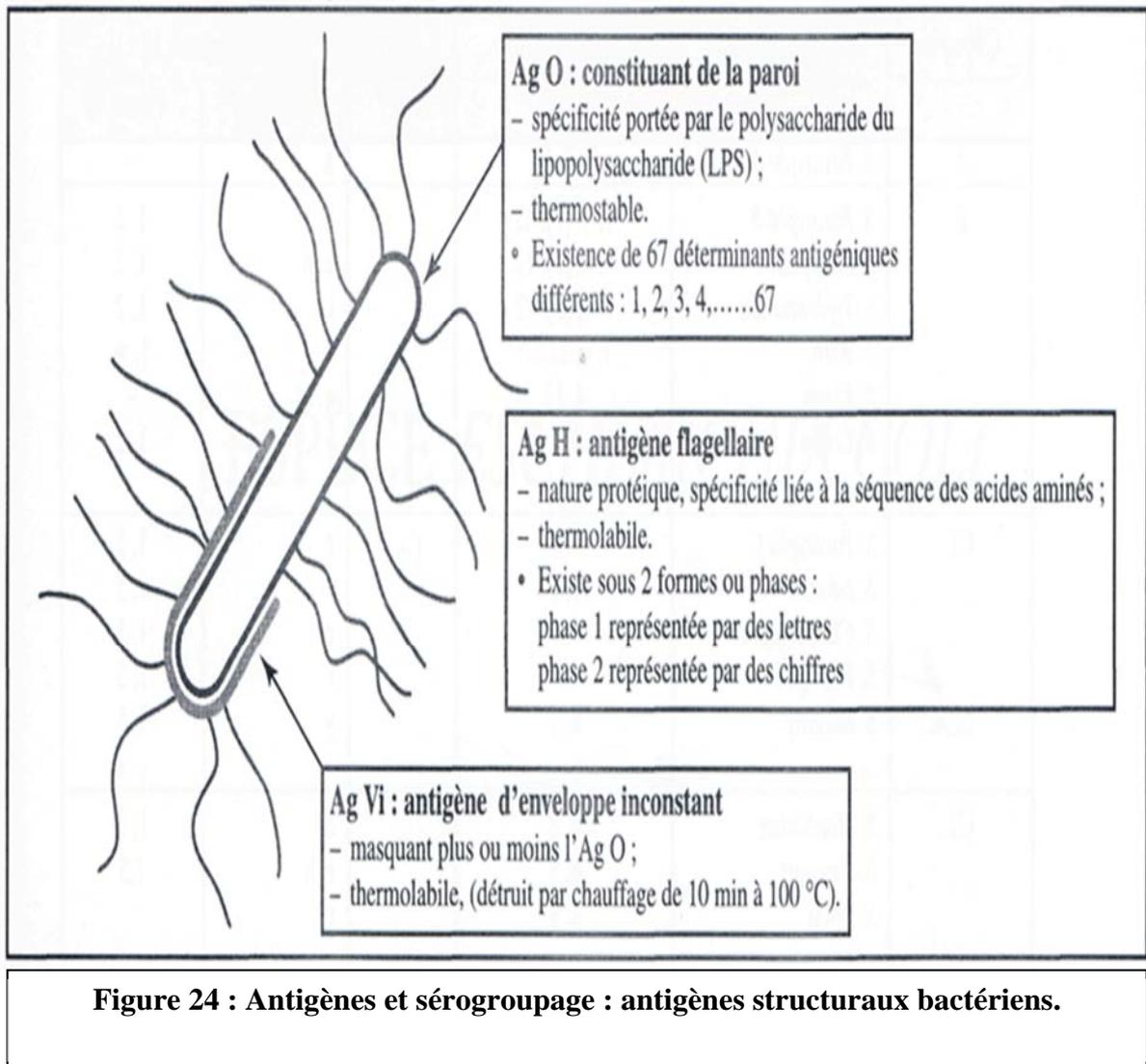
### V. 2.2 Caractères sérologiques (immunologiques)

L'identification des sérotypes bactériens fait appel aux méthodes d'agglutination, fondées sur l'utilisation d'immunsérums polyvalents et monovalents reconnaissant des antigènes bactériens.

Les méthodes sérologiques, comme le transfert de type Western, l'immunoprécipitation (IP) et la méthode immunoenzymatique ELISA, utilisent des anticorps pour déceler des protéines précises (antigènes) qui sont uniques ou caractéristiques à un microorganisme.

#### Antigènes et sérogroupage

- L'antigène somatique O, définissant le sérotype, est contenu dans les lipopolysaccharides présents sur la paroi bactérienne des souches à gram négatif.
- L'antigène flagellaire H est de nature protéique entrant dans la structure du flagelle (cil péritriche) permettant la mobilité de la bactérie.
- L'antigène K de surface n'est pas toujours présent mais s'il est présent, il bloque l'agglutinabilité de l'antigène O (figure 24).



### V. 2.3 Pouvoir pathogène (pouvoir hémolytique) :

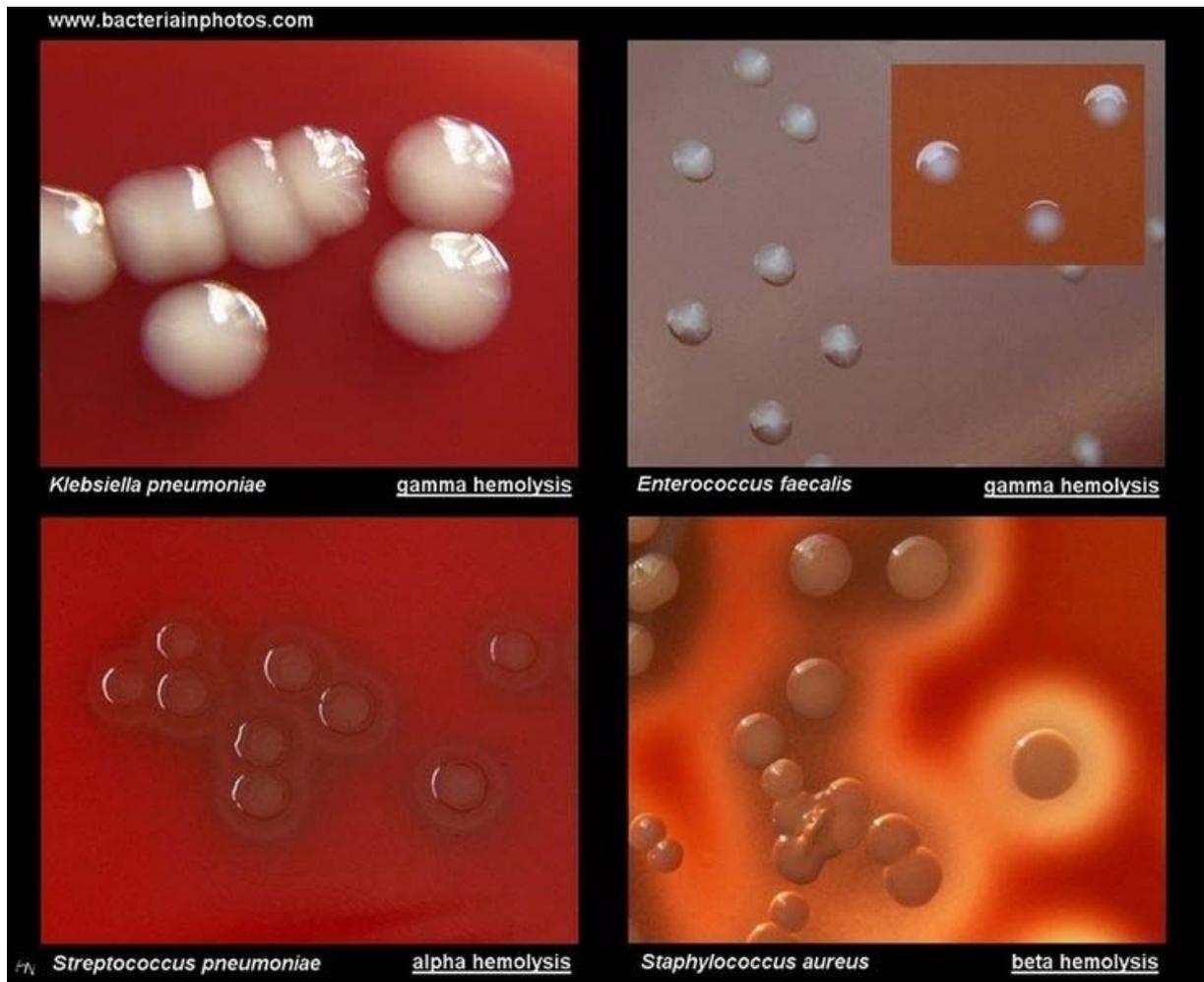
Le caractère hémolytique est particulièrement utile dans la démarche d'identification certaines espèces bactériennes.

La gélose Columbia au sang de mouton défibriné, est utilisé pour la détection des réactions hémolytiques.

La lyse des hématies par les toxines bactériennes donne 2 aspects ( $\alpha$  et  $\beta$ ) :

- L'hémolyse  $\alpha$  est une hémolyse partielle avec une dégradation incomplète de l'hémoglobine. Le milieu autour de la colonie n'est pas transparent et présente une couleur verdâtre. Cette zone d'hémolyse est généralement étroite et à bords flous

- L'hémolyse  $\beta$  est une hémolyse totale avec une digestion complète de l'hémoglobine. Le milieu autour de la colonie est transparent et présente la couleur de la base nutritive (jaune clair). Cette zone d'hémolyse est assez souvent large et à bords nets.
- L'hémolyse gamma: absence d'hémolyse (figure 25).



**Figure 25 : les aspects d'hémolyse de différentes souches bactériennes sur gélose au sang**

## **V. 2.4 Méthodes moléculaires**

Les méthodes moléculaires permettent d'identifier et de détecter les plus petites variations parmi les espèces microbiennes et les souches.

L'identification, par les méthodes moléculaires, s'appuie sur la comparaison de séquences d'acides nucléiques (ADN, ARN) ou de profils protéiques d'un micro-organisme avec les données documentées d'organismes connus.

### **a/ Méthodes génotypiques basées sur des modèles et du séquençage**

Le principe consiste à amplifier un gène entier ou non avec des amorces spécifiques (PCR) qui peut être ultérieurement révélé par électrophorèse sur gel, ou par hybridation ou encore séquencé et comparé avec ceux déposés dans des Gene banques (EMBL, NCBI).

### **b/ Méthodes basées sur les techniques protéomiques**

Les outils protéomiques offrent un excellent complément aux techniques classiques fondées sur la génomique ou phénotypique.

Les techniques prédominantes

1. La désorption-ionisation par impact laser assistée par matricespectrométrie à temps de vol (technologie MALDI-TOF-MS).
2. La spectrométrie de masse à ionisation par électronébulisation (technologie ESI-MS).
3. La désorption-ionisation laser assistée par surface (technologie SELDI).
4. L'électrophorèse sur gel de polyacrylamide au dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE) à une ou deux dimensions.

## Références :

- Abdelmassih, M., Mahillon, J., Goffaux, M-J., Ferber, F. et Planchon V. (2013). Guide pratique de microbiologie alimentaire à l'usage des producteurs. Requasud, <https://www.requasud.be/publications/> (consulter le 25/012023 à 10h:08min )
- Bonnefoy C., Guillet F., Leyral G. et Verne-Bourdais E. (2002). Microbiologie et qualité dans les industries agroalimentaires. Biosciences Et Techniques.
- Canon K. (2008). Plan de maîtrise sanitaire et HACCP. Technique De l'Ingénieur. Article | Réf : F1113 v1.
- Chambres d'agriculture France (2019). Les autocontrôles dans les ateliers de transformation carnée à la ferme <https://chambres-agriculture.fr/> (consulter le 28/012023 à 12h:22min)
- Collin G, (2015). Cours physique-chimique. UQAC Université du Québec à Chicoutimi. [http://www.uqac.ca/chimie\\_ens/Chimie\\_physique/cadres/Cadre\\_chap\\_1.htm](http://www.uqac.ca/chimie_ens/Chimie_physique/cadres/Cadre_chap_1.htm)
- Foucaud-Scheunemann C. et Helinck S., (2009) Caractéristiques générales des micro-organismes Les micro-organismes au cœur des biotechnologies. Technique de l'ingénieur. Article de référence | Réf : BIO550 v1
- Guiraud J.P. (1998). Techniques d'analyse microbiologique. In : Microbiologie alimentaire. Paris : Dunod. p. 168-333.
- ISSEP (2014). Définition d'une méthodologie d'échantillonnage des déchets. <https://www.issep.be/wp-content/uploads/21-P-21-M%C3%A9thodologie-d%C3%A9chets.pdf>
- Joffin J.N. et Leyral G. (2006). Microbiologie technique : dictionnaire de techniques. 4 ème éd. Espagne: Centre régional de documentation pédagogique.
- Madigan M. et Martinko J. (2007). Biologie des micro-organismes 11e édition, BROCK
- Prescott, L. M., Willey, J. M., Sherwood, L. et Woolverton, C. J. (2013). Microbiologie. De Boeck 4 ème édition
- Squinazi F. (2023) : Analyses en microbiologie Environnement microbien (air, surfaces, eau) Technique De l'Ingénieur. Article | Réf : P 3 355 v 1.

## Sites Web

- <https://chambres-agriculture.fr> ;
- <https://www.requasud.be/publications/> ;
- <https://www.techniques-ingenieur.fr/> ;
- <https://www.afnor.org/> ;

<https://www.joradp.dz/HFR/Index.htm>;

<https://www.commerce.gov.dz>

<https://www.iso.org/fr/home.html>