

République Algérienne Démocratique et Populaire
Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche
Scientifique



Université Abderrahmane Mira de Béjaïa
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département de Microbiologie

Techniques de contrôle microbiologique des aliments

Dr. Faradji-Hamma Samia

Année universitaire 2016 /2017

Liste des tableaux

Tableau	Titre	Page
I	Dénombrement sur milieu liquide, Cas de la série de 2 tubes.	29
II	Exemple de résultats de dénombrement sur milieu solide	33
III	Résultats d'un d'encombrement par culture sur milieu solide	34
IV	<i>Composition typique du lait de vache</i>	42
V	<i>Les principaux groupes bactériens du lait</i>	44
VI	<i>Interprétation des résultats obtenus par le comparateur de Lovibond pour le test de la phosphatase</i>	55
VII	Teneur moyenne des différents composants de la viande	57

Liste des figures

Figure	Titre	Page
Fig. 01	Le quadrillage de la la Cellule de Thoma	25
Fig.02	Représentation d'une lame de THOMA	25
Fig.03	Le Compteur de colonies	32
Fig.04	Exemple de culture bactérienne (colonies)	33
Fig.05	Installation pour la <i>Technique DEFT</i>	36
Fig. 06	Principe simplifié d'un cytomètre en flux	37
Fig.07	Exemple de courbe étalon	39
Fig.08	<i>Le Spectrophotomètre</i>	40
Fig.09	<i>Préparation de l'échantillon de lait pour le test de la réductase</i>	47
Fig.10	Schéma du montage de filtration sous vide	48
Fig.11	Test d'ébullition pour le lait	48
Fig.12	Mesure de l'acidité titrable du lait	49
Fig.13	<i>Exemples de résultats de la recherche des antibiotiques dans le lait cru</i>	52
Fig.14	Méthode DELVOTEST	53
Fig.15	Schéma du dosage de l'Azote Basique Volatil Total	62

Liste des Annexes

ANNEXE 1 : Tables DE NOMBRES AU HASARD

ANNEXE 2 : Tables de Mac Grady

ANNEXE 3 : Schémas d'analyse des conserves

ANNEXE 4 : Composition des milieux de culture

Sommaire

Introduction générale	1
Chapitre I : Objectifs et Politique du Contrôle	2
.	
I.1 Objectifs de l'analyse ou du contrôle microbiologique	2
I.2 Politique du contrôle	3
I.2.1 Les niveaux de contrôle.....	3
I.2.2 Fréquence des contrôles.....	4
I.2.3 Paramètres à contrôler.....	5
I.2.4 Les méthodes d'analyses	5
I.2.5 Méthodes d'échantillonnage	6
I.2.6 Fréquence et temps de prélèvement.....	7
Chapitre II Préparation et Analyses des échantillons.....	9
II.1 Préparation des échantillons.....	9
II.1 .1 L'ouverture des récipients et emballages	9
II.1.2 Homogénéisation.....	10
II.1. 3 Préparation des dilutions.....	10
II.1 .4 Méthodes générales d'analyse.....	11
II.1.5 Interprétation des résultats	16
Chapitre III Prélèvement, Transport et Préparation des échantillons.....	19
III.1 Prélèvement	19
III.2 Conditions générales de prélèvement.....	19
III.3 Transport des échantillons.	21
III.4 Méthodes de prélèvement	21
III.4.1 Prélèvements pour le contrôle des surfaces	21
III.4.2 Prélèvement pour le contrôle de l'air	23
Chapitre V Les Méthodes de Dénombrement.....	24
V.1. Introductions.....	24
V.2. Méthodes directes de dénombrement	24
V.2.1. Dénombrement au microscope.....	24

V2.1.1. Comptage à l'hématimètre	24
V.2.1.2 Méthode de Breed	24
V. 2.2 Dénombrement par culture en milieu liquide.....	27
V.2.3. Dénombrement par culture en milieu solide.....	31
V.2.3.2Dénombrement en boîtes de Petri	31
V.2.3.3Les dénombrements en tubes (culot de gélose).....	35
V.2.4 Autres méthodes de comptage cellulaire directes	35
V. 2.4 .1Technique DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique).....	35
V.2.4.2 Cytométrie en flux.....	36
V.3 Méthodes de dénombrement indirecte	38
V.3.1 Détermination néphélogométrique	38
V.3.2 Impédancemétrie	40
V.3.3. Détermination du poids sec.....	41
V.3.4. Détermination du poids humide	41

Chapitre IV Le contrôle microbiologique de certaines denrées

alimentaires.....	49
1. Contrôle microbiologique du lait.....	42
1.1. Introduction.....	42
1.2 Les caractéristiques microbiologiques du lait.....	43
1.3 Prélèvement des échantillons.....	44
1.4 Transport et préparations des échantillons.....	46
1.5 Schémas d'analyse.....	46
1.5.1Lait cru à la production.....	46
1.5.2. Contrôle du lait cru mis en vente en l'état.....	51
1.5.3. Contrôle de lait pasteurisé livré à la consommation.....	54
1.5.4 Normes Sanitaires (JORA, 1913).....	55
2- Contrôle Microbiologique de la Viande Fraiche.....	57
2.1 Introduction.....	57
2.2 Les caractéristiques microbiologiques de la viande.....	58
2.3 Evolution de la dégradation du produit	58
2.4 Prélèvement des échantillons	59

2.5 Schéma d'analyse d'une viande fraîche.....	61
1.6 Normes Sanitaires.....	65
3. Techniques de Contrôle Microbiologique des Conserves.....	66
3.1 Définitions	66
3.2 Caractéristiques microbiologiques des conserves.....	68
3.3 Techniques de prélèvement.....	69
3.5 Schéma d'analyse.....	69
3.6 Les normes.....	71
Conclusion.....	73
Références bibliographiques.....	74
Annexes	

Préambule

La recherche de la qualité au sens large est actuellement une préoccupation fondamentale pour l'industrie agroalimentaire. La qualité se définit à partir de système de référence, exemple : normes, labels, appellation . Elle s'obtient par l'application de procédures bien définies et maîtrisées. Elle se contrôle par des systèmes de vérification, des techniques d'analyses standardisée. Au niveau microbiologique, l'hygiène est une donnée fondamentale. Les objectifs de la sécurité servent à identifier et valider la nature et l'efficacité des suivis de fabrication, tels que surveillance renforcée à certains points critiques de maîtrise, investigations microbiologiques approfondies. L'ensemble de ces activités visant à réduire la variabilité des résultats obtenus et la probabilité de mettre sur le marché des produits non satisfaisants.

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

Ce type de contrôles est souvent pratiqué par des laboratoires officiels

Introduction

Le contrôle de la qualité microbiologique de nos aliments a été pendant longtemps une préoccupation majeure – aussi bien pour les industries agroalimentaires que pour les services de contrôle et d'hygiène. La qualité et la sécurité des aliments sont aujourd'hui clairement revendiquées par les consommateurs. Il comporte même une connotation réglementaire depuis l'apparition du règlement européen 178/2002. Ainsi, il n'est admis de nos jours que l'assurance de la qualité des aliments se conçoit et s'obtient grâce un dispositif global, tout au long de la chaîne de l'alimentation de l'homme, incluant les producteurs, les transformateurs, les distributeurs, les pouvoirs publics et bien évidemment les consommateurs.

L'assurance de la qualité bactériologique, elle, a pour objectifs d'éviter ou de limiter la présence et la prolifération dans les aliments de bactéries pathogènes pour l'homme et de bactéries d'altérations. Elle repose sur un ensemble de mesures de maîtrise et de contrôle dont la conception et la mise en œuvre passent par une connaissance approfondie de la biologie des bactéries concernées. Afin d'éviter tout risque sur la santé du consommateur, les examens microbiologiques et hygiéniques jouent un rôle prépondérant.

Ce cours trace les grandes lignes menant à la réalisation du contrôle microbiologique des produits alimentaires. Il est fidèle au programme officiel. Dans le premier et 2ème chapitre sont exposés les normes microbiologiques, la qualité hygiénique et marchande d'un produit alimentaire, les plans d'échantillonnage, les critères de qualité et les grands groupes bactériens impliqués dans la contamination du produit. Le troisième chapitre passe en revue les techniques de prélèvements, conditions du transport et la préparation des échantillons qui constituent une étape délicate, très importante et cruciale dans le contrôle microbiologique des aliments. Le chapitre 4 traite de tout ce qui concerne les méthodes de dénombrement et les difficultés rencontrées lors du dénombrement qui tiennent surtout aux diverses sources de variation susceptibles d'entacher la fiabilité des résultats (traitement de l'échantillon, modalité de la prise d'essai, mode d'homogénéisation, réalisation des suspensions mères, des dilutions, revivifications des bactéries éventuellement stressées, milieux de cultures utilisés, modalités d'incubations, techniques de

comptages . Pour conclure, dans le dernier chapitre sont exposés des exemples de contrôle microbiologique de certaines denrées alimentaires.

I- Objectifs et Politique du Contrôle

I.1 Objectifs de l'analyse ou du contrôle microbiologique :

Le contrôle microbiologique des aliments a pour objectifs de contrôler les caractères moins apparents mais fondamentaux d'un produit alimentaire.

Il s'agit de la salubrité c'est-à-dire l'absence d'action toxique, de microorganismes pathogènes ou toxigènes ainsi que le niveau des populations des germes d'altération. Par ailleurs, dans le cas des conserves, il contrôle la stabilité des produits c'est-à-dire l'aptitude du produit à ne pas s'altérer trop rapidement si les conditions de stockage sont respectées. (Andrews,1996)

Les produits alimentaires constituent un milieu propice à la prolifération microbienne. Les germes néfastes sont ceux qui sont impliqués dans la détérioration des produits alimentaires. Ils affectent la qualité hygiénique organoleptique et commerciale du produit au niveau de la fabrication ou de la conservation. Ce sont les germes banaux de contamination qui peuvent causer de graves problèmes dans l'industrie.

Les germes banaux de contamination peuvent avoir des actions variées qui affectent la valeur alimentaire et commerciale des produits allant d'une modification de texture, modification de la coloration (apparition d'une couleur parasite), synthèse de produits toxiques ou gonflement des contenants suite à une libération intense de gaz rendant alors le produit alimentaire impropre à la consommation voire même dangereux dans certaines conditions . Les germes banaux de contamination n'agissent sur l'aliment et n'ont de répercussions hygiéniques que s'ils sont en grand nombre. En conséquence, le contrôle vise à déceler les lots de produits alimentaires dont le niveau de populations de la flore de contamination dépasse le seuil toléré par les normes en vigueur. Etant donné que la stérilité biologique est impossible au risque d'altérer les valeurs nutritionnelles du produit, le facteur quantitatif intervient au niveau de l'analyse de cette flore. Le plus souvent, la connaissance qualitative de la composition de la flore est inutile sauf dans les circuits de fabrication pour déceler l'agent responsable de l'accident de fabrication. (Dziezak, 1987;Guiraud, 2004).

La présence de germes pathogènes est totalement indésirée dans les produits alimentaires en raison du risque sanitaire que ce genre de produit pose pour le consommateur. Dans ce cas, c'est l'analyse qualitative qui prime. Et la détection d'un seul germe pathogène, rend le produit impropre à la consommation. (Bourgeois, Mafart , 1991)

1.2 Politique du contrôle

Le contrôle des produits alimentaires nécessite la mise au point d'une stratégie qui varie selon le but attendu. Il tient compte du niveau à contrôler et des paramètres d'étude. (Bourgeois et Mafart , 1991)

1.2.1 Les niveaux de contrôle.

Le contrôle des produits alimentaires peut être effectué à n'importe qu'elle niveau de la chaîne de fabrication ou de transformation ou du traitement. Les chaînes de distribution du produit depuis la sortie de l'usine jusqu'au consommateur peuvent être aussi soumises à un contrôle, ainsi, l'analyse peut être réalisée par le personnel de l'usine sur les matières brutes, les matières en cours de transformation et sur le produits finis. Dans ces conditions, le contrôle de la matière brute, les matières en cours de transformation et sur le produit finis. Dans ces conditions, le contrôle de la matière brute à pour objectif d'accepter ou de refuser le produit avant son achat par l'industriel exemple, le lait. Alors que le contrôle au niveau de la chaîne de transformation permet de déceler les causes et origines des éventuels accidents de fabrication. Le contrôle de produit fin à pour but de vérifier si le produit répond aux normes avant sa commercialisation. (Bourgeois et Mafart, 1991)

Les services de répression des fraudes et du contrôle de la qualité : S'intéressent au contrôle du produit fini. Ils peuvent prélever des échantillons soit à l'usine ou au niveau de n'importe qu'elle étape du circuit de distribution. (Bourgeois et Mafart , 1991)

Les services d'hygiène et d'action sanitaire : Interviennent dans le contrôle des produits livrés à la consommation incriminés dans une intoxication (infection digestive contractée par ingestion d'aliments contaminés par différents micro-organismes, notamment par des bactéries ou par leurs toxines) (Bourgeois et Mafart , 1991)

1.2.2 Fréquence des contrôles.

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.(ISO 9001:2000)

➤ **Exemple1** (Guiraud.2003)

Dans le cas d'une adduction d'eau publique, la fréquence est liée au nombre d'habitants. L'OMS préconise d'effectuer des prélèvements à l'entrée du réseau selon les fréquences suivantes

< de 20000 habitants \implies au moins tous les mois

Entre 20 000 et 50 000 habitants \implies au moins tous les 15 jours

Entre 50 000 et 100 000 habitants \implies au moins tous les 4jours

> de 100 000 habitants \implies tous les jours

Remarque : si l'eau est traitée, les prélèvements doivent être effectués tous les jours avant et après traitement .Dans tout les cas, la fréquence doit être adaptée Au risque et au volume d'eau captée

➤ **Exemple2** (Guiraud.2003) :

Cas des laiteries : le contrôle hygiénique officiel des ateliers de traitement prévoit pour le contrôle du lait selon la quantité de lait traitée et selon les fréquences suivantes

2 fois par jours \implies quantité de lait traitée ≤ 5000 l /j

3 fois par jours \implies quantité de lait traitée comprise entre 5000 et 10 000 l / :

5 fois par jours \implies quantité de lait traitée $\geq 10\ 000$ l /j

Les échantillons doivent être prélevés à des intervalles de temps supérieurs à 15 min.

1.2.3 Paramètres à contrôler.

En vue d'éviter les risques d'accident de fabrication et de situer l'origine de la contamination tous les éléments entrant dans la fabrication du produit doivent être soumis à une analyse microbiologique. Dans l'industrie agro-alimentaire, ce contrôle concerne (Ernoul, 2005) :

- **La matière première** avant son entrée à l'usine voire même l'origine de la matière première par exemple les animaux producteurs du lait.
- **L'eau** utilisée pour le lavage et la transformation des produits. Dans tous les cas, l'eau utilisable en industrie alimentaire doit être obligatoirement potable y compris celle utilisée pour le lavage des locaux, des ustensiles et de la chaîne de fabrication.
- **Les surfaces** des locaux et des ustensiles qui interviennent dans le stockage, la découpe ou tout autre processus de transformation.
- **L'air** ambiant dans les ateliers de transformation de traitement et des hangars de stockage.
- **Le personnel** de l'unité qui intervient depuis la réception de la matière première jusqu'au stockage du produit fini.
- **Le matériel** de conditionnement et **emballage**.

(AFNOR, 1985 ; AFNOR, 1996 ; Ernoul, 2005,)

1.2.4 Les méthodes d'analyses

Les méthodes d'analyses pour être fiable, l'échantillon analysé doit être statistiquement représentatif de la totalité du lot. Ces échantillons doivent être prélevés selon un calendrier de fréquence bien établi. Les prélèvements doivent être préparés avant l'analyse

selon les normes admises et analysés dans un temps relativement courts de sorte que la flore originelle ne subissent aucune modification quantitative ou qualitative.(Mescle et *al.*,1996)

Quant aux méthodes d'analyses, il serait souhaitable pour l'industriel de suivre le schéma établi par les normes en vigueur. Ceci constitue une garantie pour estimer la qualité du produit selon les normes en vigueur. Quant au service de la répression des fraudes et du contrôle de la qualité ainsi que le service d'hygiène et d'action sanitaire leurs méthodes d'analyses doivent être aussi établies selon les normes légales. (**AFNOR, 1996**)

1.2.5 Méthodes d'échantillonnage

L'échantillonnage est la première étape de l'analyse microbiologique .il constitue une opération délicate en raison des considérations économiques et de la fiabilité des résultats. (Guiraud et Rosec , 2004)

Pour cela, l'échantillonnage doit permettre de donner un avis impartial sur un ensemble de produits sans pour autant provoquer une perte considérable. Les échantillons prélevés doivent être prélevé aléatoirement dans un lieu et conditions bien définis.

Deux types de prise d'échantillon sont possibles (Guiraud et Rosec , 2004) :

- Le problème ne se pose pas pour le prélèvement d'éléments apparemment défectueux en vue de mettre en évidence la cause du défaut. Par exemple, rechercher la cause de production de gaz dans les boîtes de conserve bombées ou l'agent pathogène incriminé dans une intoxication alimentaire ;
- Le problème se pose pour le contrôle de la qualité des produits d'apparence normale. Dans ce cas, l'application des méthodes statistiques est impérative pour garantir le hasard et la représentativité des échantillons prélevés.

Définitions de certains termes qui sont utilisés dans les méthodes statistiques (Pasquier, 1969) :

-Lot : partie d'une même livraison ou d'une même fabrication présentant les mêmes caractéristiques.

-Elément : partie indivisible du lot

-Prélèvement : quantité aliquote ou élément indivisible prélevé au sein du lot. Il est appelé échantillon élémentaire.

-Echantillon global : réunion de plusieurs prélèvements issus d'un même lot.

-Echantillon réduit : fraction de l'échantillon global.

-Echantillon pour laboratoire : fraction de l'échantillon global ou réduit destiné au laboratoire d'analyse.

1.2.5 .1 Nombre d'échantillons

L'échantillonnage idéal est un échantillonnage à 100%. Ce type d'échantillonnage est impossible pour des considérations économiques surtout lorsque 'il s'agit d'éléments indivisibles que l'analyse conduit à détruire (conserves). Toutefois, il peut être applicable dans le cas des produits en vrac ou une partie aliquote peut être prélevée sans nuire au reste du lot (exemple, sachet de semoule). (Pasquier, 1969)

- **Echantillonnage satisfaisant :** il est réalisé en prélevant un nombre d'échantillons égal à la V du nombre de divisions élémentaires, du produit à analyser. Exemple pour un lot de 10 000 boîtes de conserves, le nombre d'échantillons est égal à 100. Toutefois, ce nombre demeure toujours excessif. (Guiraud,1998)

1.2.5 .2 Choix des échantillons :

Il s'agit des éléments à prélever dans le lot pour constituer l'échantillon.

.La règle que les échantillons doivent être d'apparence normale et prélever au hasard pour respecter le caractère aléatoire de la prise d'échantillons il est possible de (ISO 7002:1986) :

-faire un prélèvement selon les nombres d'un extrait d'une table des nombres aléatoires (annexe1). Il s'agit d'une succession de nombre déterminés par tirage au sort. Donc compter les éléments du lot et prélever celui correspondant au 1^{er} nombre et ainsi de suite.

- faire un prélèvement selon la périodicité : si N est le nombre d'élément d'un lot et n est le nombre d'échantillons à prélever, $n = N/n$. On compte jusqu'à n on prélève et ainsi de suite. Méthode critiquable.

-Soit $y = \sqrt{N}$ et que n est le nombre d'éléments à prélever. on divise N en y groupes d'éléments, dans le 2eme groupe, on prend y-1^{er} élément ainsi de suite, jusqu'à la prise de n éléments.

Ces méthodes sont applicables aussi bien à des lots en stock ou en livraison qu'à des lots en cours de fabrication (l'usine).

1.2.6 Fréquence et temps de prélèvement

Ce temps est indispensable pour la représentativité des échantillons d'un lot de produit au cours de fabrication. Pour être représentatif de l'ensemble de la production ou du lot.

Les échantillons doivent être prélevés à des intervalles d'au moins 15 minutes.

La fréquence des prélèvements et analyses est fonction du niveau de production et des risques de contamination ou de défauts de fabrication des produits.

La fréquence des analyses de routine doit être régulière. Elle est d'autant plus grande que la production est importante. (Guiraud,1998).

L'analyse s'impose d'elle-même chaque fois qu'une variation survient au niveau de la fabrication :

- Lot différent de matière première
- Mise en service
- Modification ou réparation d'un appareil
- Changement d'un ou de plusieurs paramètres de fabrication.

II Préparation et Analyses des échantillons

II.1 Préparation des échantillons

Les échantillons fournis au laboratoire consistent en des prélèvements de produits liquide, solide ou hétérogène prélevés dans un récipient stérile ou emballés tels qu'ils sont commercialisés.

Les analyses microbiologiques sont faites toujours à partir d'une suspension liquide parfaitement standardisée par rapport au produit de départ. En conséquence, une préparation s'avère indispensable pour ramener les produits sous forme liquide.. La préparation inclut l'ouverture de l'emballage, la prise de la quantité aliquote pour analyse de l'échantillon et l'homogénéisation ou fluidisation du produit couplée ou non au broyage et enfin la préparation des dilutions à partir de la suspension mère. (Joffin et Leyral ., 2006).

II.1 .1 L'ouverture des récipients et emballages

- **Cas des boîtes métalliques :** après homogénéisation du contenu, la partie supérieure de la boîte est nettoyée à l'aide d'un coton imbibé d'alcool puis flambée à l'alcool en évitant un chauffage trop fort au risque de modifier la microflore. La boîte est ouverte en aseptie et avec des outils stériles (poinçon métallique, ouvre boîte..). Si une boîte est bombée, il est impératif de prendre des précautions pendant l'ouverture pour éviter les projections du produit. La boîte est mise sous un entonnoir stérile et une fois que le poinçon a percé le couvercle, il ne doit être retiré qu'après que le gaz responsable du bombage est échappé. Après l'entonnoir et poinçon sont retirés pour continuer l'ouverture comme s'il s'agissait d'une boîte normale. Le prélèvement est retiré selon le cas à l'aide d'une pipette, spatule ou sonde. (Guiraud, 2003)
- **Cas des bouteilles :** les bouteilles sont renversées et sa capsule et goulot sont plongés dans l'alcool puis flambés. Si la bouteille est en plastique, le flambage n'est pas obligatoire ou fait rapidement. Après désinfection, la bouteille est ouverte en enlevant la capsule à l'aide d'un décapsuleur ou en perçant la capsule. (Guiraud, 1988)
- **Autre emballage :** les autres emballages sont ouverts stérilement et la méthode varie selon le type d'emballage.

II.1.2 Homogénéisation

Cette opération a pour but de répartir uniformément les microorganismes présents dans l'échantillon à fin sur la prise de la quantité aliquote soit représentative, de la totalité de l'échantillon. Les produits liquides ou semi- liquides sont agités manuellement ou mécaniquement au vortex ou agitateur.

Les produits solides ou semi- solides doivent faire l'objet d'un broyage dans un volume connu de diluant. Le broyage peut être manuel dans un mortier en verre à pied contenant 5 à 20g de sable de Fontainebleau ou de billes de verres de 0,5 mm de diamètre. Le diluant doit être versé progressivement au cours de l'opération de broyage. Après 5 min de repos du broyat, le surnageant est prélevé pour être analysé. Le broyage peut être réalisé mécaniquement en utilisant des broyeurs au mieux à une vitesse de 45000 rpm / 1min tout en prenant soin de faire le broyage à basse température c'est-à-dire en utilisant des appareils réfrigérés de sorte que l'élévation de température générée par les forces de frottements ne modifient pas qualitativement ni quantitativement les germes présents. (Guiraud et Rosec , 2004)

II.1. 3 Préparation des dilutions

La préparation de la suspension mère et de ces dilutions se fait avec un diluant approprié. Le diluant le plus utilisé en microbiologie alimentaire est la solution de Ringer diluées au (1/4). Toutefois pour maintenir les microorganismes dans un bon état physiologique ou pour les réanimer ou pour les revivifier, il est préconisé d'utiliser comme diluant, l'eau peptonée ou le milieu tryptone- sel. Dans ces conditions, il impératif que les dénombrements s'effectuent dans l'heure qui suit la préparation afin d'éviter la multiplication des germes. Si les germes anaérobies sont recherchés, pour les protéger des effets toxique de l'oxygène atmosphérique, il est préférable que le diluant contienne un agent réducteur comme la vitamine C ou des chlorhydrates de L. cystéine. Dans le cas des produits lipidiques comme

Les huiles et le beurre pour stabiliser l'émulsion, le diluant est additionné de 0,1% de gélose. (Dellaras ., 2007)

La suspension mère est constituée soit par le produit liquide brut lorsque le produit est solide ou semi-solide. Dans le cas des produits non pipetable c'est-à-dire

que la préparation de la suspension mère nécessite une fluidisation ou un broyage, il faut préparer une suspension mère d'une concentration connue. Cela s'effectue en pesant une quantité donnée du produit (10g par exemple) dans le récipient de broyage et d'ajouter un volume connu de diluant de sorte à obtenir une dilution de $1/5^{\circ}$ (40ml) ou de $1/10^{\circ}$ (90ml). Par une question temps, il est possible de peser une quantité de produit sans la fixer au départ puis d'ajouter le volume de diluant nécessaire. Pour obtenir la dilution initiale voulue, la concentration de la suspension mère contient x gramme du produit alimentaire par ml de dilution. Les résultats de l'analyse sont d'abord exprimés en germes /ml puis convertie en germe par grammes d'aliment. (Andrews, 1996 ; Guiraud, 2004)

II.1 .4 Méthodes générales d'analyse

Le contrôle microbiologique fait appel à des techniques rapides pour rechercher des germes ou pour les dénombrer.

II.1 .4 .1 L'étude microscopique

Pearson *et al.* (1970), L'examen microscopique est le plus souvent réalisé sur le prélèvement brut. Il s'effectue à l'état frais et/ou sur des frottis colorés. Les résultats de cette étude ne sont pas très fiables mais pour leur rapidité, ils peuvent être utiles pour (Dasen *et al.*, 1989) :

- l'estimation de la flore totale (viable ou morte si des colorants vitaux sont utilisés comme le bleu méthylène ou le vert Janus) ou de la charge microbienne initiale d'un aliment.
- mettre en évidence des contaminants dans la flore de fabrication par exemple présence de bactéries dans le ferment constitué de levure ou de bactéries Gram- dans les ferments lactiques.
- le dénombrement directe des levures à l'aide d'un hématimètre (exemple, la cellule de Malassez
- la recherche présomptive du bacille tuberculeux par la méthode de Ziehl-Nielson.

- l'étude cytologique du lait pour la détermination de la formule leucocytaire pour avoir une idée sur l'état sanitaire de l'animal dont provient le lait (Bourgeois ,1927 ;Dijkman et *al.*, 1969)

➤ **Méthode** (Bourgeois ,1927)

- Réaliser un frottis à partir du culot de centrifugation du lait.
- Prélever une quantité aliquote et l'étaler sur une lamelle.
- Sécher sans chauffage et fixer à l'alcool absolu.
- Colorer au bleu de méthylène 5 min puis différencier rapidement à l'alcool à 60°.
- Rincer à l'eau et sécher le frottis
- Compter au minimum 100 éléments cellulaires

Le lait normal ne contient pas d'hématies.

$$R = \frac{M}{P} = \frac{\text{leucocytes mononucléaires}}{\text{leucocytes polynucléaires}}$$

R compris entre 0,5 et 1 → lait normal.

R < 0,5 → lait de mammites.

R > 1 → infection tuberculosique probable

- recherche des parasites : elle permet de mettre en évidence les protozoaires (Toxoplasme, amibes) les nématodes (Ascaris) et les cestodes (Taenia) par la préparation de frottis colorés. (Guiraud, 2003)

II.1 .4 .2 Etudes Quantitatives.

Selon Guiraud (1998), l'étude quantitative permet de dénombrer les germes présents dans un produit alimentaire donc de se rendre compte si le produit analysé est conforme aux normes microbiologiques. Cette recherche consiste en une numérotation des germes totaux et de la flore indicatrices de contamination des germes totaux et de la flore indicatrice de contamination. Où la numération doit être précise. La précision est déterminée par ;

- Le milieu et conditions de culture qui doivent être favorables aux germes recherchés ;
- la suspension mère est appelé à subir une préparation dans un diluant revivifiant car les germes sont dans un mauvais état physiologique. Dans ce cas, la revivification ne doit pas affecté le nombre initial de contaminants.
- Le nombre d'expériences et la technique employée.
- Le temps mis pour réaliser la manipulation.

II.1 .4 .2 .1 Flore pathogène.

Le contrôle microbiologique peut aussi impliquer la recherche des germes pathogènes. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire le dénombrement car la présence de ses germes dans les aliments n'est pas tolérée par les normes officielles. En conséquence, les résultats ne peuvent s'exprimer que par l'absence ou la présence du germe. (Brisabois et *al.*, 2000)

La recherche des germes pathogènes dans les produits alimentaires peut être réalisée par culture sur milieu sélectifs après enrichissement ou concentration ou par la recherche de toxines ou d' anticorps spécifiques ou par des techniques de coloration. (Brisabois et *al.* 2000)

➤ **Mise en évidence par culture sur milieu sélectif.**

- Enrichissement ou concentration

Etant donné que les germes pathogènes sont des germes fragiles et qu'ils sont les plus souvent retrouvés en faible nombre dans les produits alimentaires, il est donc important d'augmenter les chances de leur détection. Pour cela, il est possible d'adopter la concentration par centrifugation ou par filtration d'un volume connue. Cette méthode convient aux produits liquides comme le lait et l'eau. (Guiraud, 2003)

L'enrichissement consiste à mettre en contacte l'échantillon avec un milieu de culture qui va favoriser la croissance du germe recherché et augmenter son nombre. L'enrichissement peut être précédé par un pré enrichissement sur un milieu peu sélectif qui est un milieu électif et permet la revivification des germes en mauvais état physiologique.

Contrairement à la concentration, l'enrichissement est une opération qui modifie le nombre initial de germes. (Brisabois et *al.*, 2000)

-Recherche du germe (Brisabois et *al.*, 2000 ; Guiraud,2003)

Le germe est recherché par ensemencement de milieux sélectifs solide à partir du milieu d'enrichissement ou de la suspension concentrée. Le germe est ensuite identifié pour confirmation. Les milieux d'isolement varient selon les germes recherchés.

Les opérations concernent *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*. Pour *E.coli* ,sa caractérisation est basée sur l'incubation à 44° C suivie de la détection de l'indole.

- Recherche de la toxine botulique —→ *C.botulinum*

- Test immunologique (par agglutination antigène-Anticorps) —→ *Brucella*

- Recherche des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) → *M.tuberculosis*
(coloration Ziehl Neelsen)

II.1 .4 .2 .2 Flore totale ou flore mésophile aérobie revivifiable :

Cette recherche constitue une approche quant au niveau global de la contamination du produit. Cette étude n'est qu'approximative car il n'existe pas de milieu de culture universel qui serait favorable à la croissance de tous les germes contaminants. De même ces derniers se distinguent par leurs conditions d'incubation et de pH. L'incubation est faite à 30° C pendant 72 h. (Guiraud, 2003 ; JORA n°70 ,2004)

II.1 .4 .2.3 Flores de contamination ou Indicatrice.

Les flores de contamination sont dites aussi flores tests ou flores indicatrices. La présence de cette flore témoigne d'une mauvaise qualité hygiénique du produit et constitue une présomption de la présence de germes pathogènes. Les études incluent le dénombrement des coliformes et streptocoques fécaux et les *Clostridium* sulfite-réducteurs. Les bactériophages fécaux et les staphylocoques sont parfois inclus. (Guiraud, 2003)

II.1 .4 .2.4 Les coliformes et *Escherichia coli*

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant rapidement le lactose(24h). Selon l'O M S, ce groupe inclut : *Escherichia*, les *Citrobacter* et *Enterobacter* et *Klebsiella*. Ils sont fréquents dans les fèces d'animaux et de l'homme. (Heeschen et Suhren, 1996)

Les coliformes fécaux sont des bactéries produisant du gaz à partir du lactose à 44°C

Remarque. *E.coli* constitue une preuve de contamination fécale du produit analysé. Toutefois, sa résistance relativement faible vis-à-vis de conditions extérieures hostiles conduit parfois à la réduction des chances de sa détection. De plus, les fèces de certains animaux comme le cheval et le porc sont très pauvres en *E.coli*. La présence de coliformes en absence d'*E. coli* signifie soit une contamination fécale ancienne, soit une contamination fécale récente mais d'origine animale, soit une contamination non fécale. Pour confirmer l'origine fécale d'une contamination, il est indispensable de rechercher d'autres germes. (Guiraud, 2003)

II.1 .4 .2 .4 Les streptocoques fécaux :

Les streptocoques fécaux sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils sont très fréquents dans les produits manipulés. Ces germes sont très résistants aux conditions hostiles mieux que les entérobactéries pathogènes et d'altérations. Le dénombrement de ces germes s'avère intéressant s'il est couplé avec celui des coliformes fécaux. Ainsi, la présence simultanée d'*E.coli* et de streptocoques fécaux indique une contamination fécale certaine. Par ailleurs, le rapport coliformes fécaux /streptocoques fécaux permet de situer l'origine de la contamination fécale. En effet, l'homme excrète moins de streptocoques fécaux que les animaux par rapport au nombre de coliformes. En conséquence, lorsque $R > 1$ la contamination fécale est d'origine humaine. Elle est d'origine animale quand $R < 1$. (Guiraud, 1996)

II.1 .4 .2.5 Les *Clostridium* sulfite-réducteurs

Les Clostridium sulfito-réducteurs sont des germes des intestins et du sol et des matières organiques en putréfaction. Du fait, qu'ils sont sporulés, les Clostridium sulfito-réducteurs sont beaucoup plus résistants que les autres germes indicateurs. Leur présence est facile à interpréter, elle témoigne sur une contamination fécale ancienne (s'ils sont seuls). la contamination fécale est confirmée s'ils sont présents à coté des coliforme fécaux et/ou de streptocoques fécaux. la présence des Clostridium sulfito-réducteurs constitue une présomption de la présence de *Clostridium perfringens* qui est l'un des germes les plus fréquents impliqués dans les intoxications alimentaires. (Cerf et Bergere, 1968)

II.1 .4 .2.6 Les staphylocoques

Certains auteurs suggèrent de les considérer comme des germes indicateurs dans les aliments crus. Lorsque leurs présences dans les aliments cuits sont considérés comme des pathogènes. Ces bactéries indiquent une contamination humaine par manipulation ou par voie aérienne.

Les staphylocoques sont très répandus dans la nature ,ils sont saprophytes de la peau et des muqueuses des êtres vivants, ce qui en fait des agents de contaminations par manipulation (*S.epidermidis* et *S.saprophyticus*). Ils ne sont pas pathogènes sauf *S.aureus* qui est entérotoxique. la toxine produite est thermostable .elle est excrété dans l'aliment au cours de la croissance. Les aliments les plus incriminés sont les produits carnés où à base de lait et d'œuf (crème glacées, pâtisserie).

En ce qui concerne les germes indicateurs, l'étude est essentiellement basée sur le dénombrement. C'est une étude quantitative utilisant des milieux de culture plus au moins sélectifs. (Asperger ,1994).

II.1 .5 Exploitation des résultats

Le contrôle microbiologique à pour objectif la qualité. :

- L'absence des germes pathogènes : elle est facile à interpréter lorsque la quantité et bien définie (par exemple absence dans 25g). L'acceptation ou le refus de l'aliment correspond à l'absence ou présence de germes pathogènes.

- Cas des germes indicateurs : les résultats sont difficiles à interpréter car ils dépendent de la précision des méthodes de dénombrement utilisées et de, fluctuations observées lorsque une seule valeur numérique dépasse le standard donné (dans les limites des fluctuations normale des résultats et une absence des pathogènes), il n'y a pas lieu de refuser le produit. Toutefois, ce fait ne doit pas se reproduire au cours des analyses ultérieures. Il est souhaitable d'entreprendre des analyses de confirmation. (Mescle et *al.*,1968)

➤ **Législation et normes** ([ISO](#) ; Codex Alimentarius)

Il existe un ensemble de lois , de décrets et arrêtés destinés à interdire la vente ou la détention de produits toxiques ou corrompus ainsi que de promouvoir la qualité. Par ailleurs, il existe une réglementation sanitaire qui prescrit les règles sur l'hygiène de l'alimentation incluant la propreté du personnel, du matériel, des lieux de fabrication, de stockage ou de ventes, conditions de transports des aliments. (Hatanaka et *al.* , 2005)

III Prélèvement, Transport et Préparation des échantillons

III.1 Prélèvement

Le prélèvement des échantillons en vue d'un contrôle microbiologique nécessite des précautions particulières afin que l'échantillon prélevé reflète fidèlement la flore microbienne du produit dont il dérive. (Guiraud ,1998)

-Lorsque le prélèvement se porte sur des éléments indivisibles (boîtes de conserves, pots de yaourts, bouteilles d'eau, ou de soda, portion de fromages) aucune précaution particulière n'est prise surtout lorsque ces éléments sont emballés individuellement. Le prélèvement est réalisé en le prenant en l'état. (Guiraud ,1998)

– Lorsque le prélèvement porte sur des produits liquide ou solide en vrac (sacs de semoule ou farine, sac de cacao ou d'arachide) ou sur des produits de grande taille (carcasse de viande, cuves de liquide de grand volume, meule de fromage de grande taille) des précautions particulières s'imposent afin d'assurer la représentativité de l'échantillon prélevé et d'éviter les contaminations externes au moment de l'opération de prélèvement. (Guiraud ,1998)

III.2 Conditions générales de prélèvement (AFNOR , 1999 ;Guiraud, 2003)

- **Homogénéité :** les microorganismes ne sont pas répartis d'une manière homogène dans le produit surtout lorsque celui-ci est solide ou de structure hétérogène ou un liquide de grand volume. Lorsque le produit est de structure hétérogène (fromage, carcasse de viande) et solide, un prélèvement composite est effectué. Ce mode de prélèvement pourrait être important si l'opérateur souhaite connaître le niveau de contamination de chaque partie du produit (pour un industriel). En revanche, le mélange des prélèvements composites conduit à une évaluation globale du niveau de la contamination. Ceci est intéressant pour le contrôle de la qualité. Dans le cas des produits alimentaires liquides ou sous forme de poudre, il est possible de faire des prélèvements composites à un niveau ou après homogénéisation en vue d'un prélèvement d'un échantillon unique.

- **Précaution d'aseptie :** pendant l'opération du prélèvement la microflore du produit à analyser ne doit subir aucune modification ni qualitative ni quantitative. En conséquence, les prélèvements doivent être effectués en aseptie avec et dans du matériel préalablement stérilisé au laboratoire. De ce fait le matériel stérile doit être emballé pour éviter les contaminations ultérieures. Les instruments non stériles peuvent être stérilisés sur place à l'aide de la flamme du Bec Bunsen ou au minimum par flambage avec l'alcool éthylique à 70 ° ou par immersion dans de l'eau de Javel.

Le trempage dans l'alcool et le flambage sont parfois insuffisants car la température atteinte n'est pas assez élevée. Il est nécessaire d'utiliser des flacons propres, secs, étanches, à col large stérilisés au four Pasteur (160°C - 10 min) ou par autoclavage à 121°C pendant 30 min ou encore à usage unique et stériles ; leur taille doit être adaptée au volume de l'échantillon. Les récipients peuvent être en verre, en métal ou en matière plastique (polyéthylène, polycarbonate, polypropylène); dans ce dernier cas il s'agit de récipients à usage unique dont la stérilisation est obtenue à froid (radiations gamma ou beta). Dans tous les cas les récipients de prélèvement doivent posséder un système de fermeture hermétique.

Le prélèvement de l'échantillon est réalisé aussi en aseptie en utilisant une lampe à gaz portative en prenant les précautions nécessaires, pour éviter la perturbation dans la zone d'aseptie (éviter les courants d'air, les déplacements, la discussion...).

- **Prélèvement des produits liquides (Guiraud, 2003 ; ISO 7251 : 2005)**

La technique des prélèvements varie selon la nature, le volume et la forme du récipient contenant le produit liquide.

Dans tous les cas il faut faire :

- Une homogénéisation manuellement à l'aide de tige de verre ou d'un agitateur mécanique stérile ou mécaniquement dans des systèmes qui en sont équipés.
- Un prélèvement par une pipette, une louche ou un flacon lesté. Par ailleurs, pour faciliter l'homogénéisation ultérieure, il serait judicieux d'introduire dans les flacons de prélèvement un barreau magnétique ou billes de verre stériles.
- Lorsque le liquide est prélevé à partir d'un réseau public (exemple, l'eau potable), il est indispensable de purger le circuit pour éliminer les zones de stagnation.

- **Prélèvement des produits solides**

Le prélèvement est selon la nature du produit. Le scalpel, la sonde (de fromager par exemple) la pipette harpon ou le myectome sont les instruments les plus utilisés pour les prélèvements des produits solides. Le plus souvent la surface exposée à l'air est éliminée par grattage ou par cautérisation ou flambage. La surface exposée à l'air peut être étudiée par la méthode d'écouvillonnage.

Dans le cas des produits hétérogènes comme les carcasses de la viande ou plats cuisinés, l'échantillon est constitué de prélèvements composites. (Guiraud, 2003 ; ISO 7251 2005)

III.3 Transport des échantillons.

Les échantillons prélevés doivent faire l'objet d'un étiquetage en mentionnent toutes les indications nécessaires à la bonne exploitation des résultats d'analyses. Il est souhaitable de ne pas utiliser de crayons feutres sur des films plastiques (PVC) car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse.

- Numéro d'ordre
- Date, heure, lieu du prélèvement
- Conditions de prélèvement : Température ambiante, température du produit, pH du produit
- Nom de l'opérateur.

Les échantillons doivent alors être acheminés au laboratoire dans des conditions assurant la stabilité de la microflore d'origine. Pour assurer la stabilité jusqu'au moment de l'analyse, les échantillons doivent être transportés et conservés au laboratoire dans des conditions proche de celles du produit d'origine en particulier la température, le temps et la protection des contaminations (Bourgeois et Mafart ,1991)

III.4 Méthodes de prélèvement :

Les méthodes de prélèvement des échantillons varient selon la nature du produit à analyser.

III.4.1 Prélèvements pour le contrôle des surfaces

Le contrôle des surfaces permet d'estimer la qualité microbiologique de la surface des aliments et aussi les surfaces intervenants dans le processus de fabrication du produit alimentaire. Les plans de travail comme les tables de découpes, les murs et emballages et autres.(Guiraud et Galzy 1980 ;Guiraud,1998).

Le prélèvement à partir des surfaces peut être effectué par :

- **Ecouvillonnage :** un écouvillon stérile dont l'extrémité est préalablement trempée au moment du prélèvement dans une solution stérile de tryptone- sel additionnée de 0,05% de tween 80. Le prélèvement est effectué par frottement sur la surface à analyser, puis plongé dans le tube contenant la solution précédente ou de l'eau physiologique en vue de collecter les germes raclés de la surface à analyser. Les analyses sont effectuées à partir de la suspension ainsi réalisée. (ADJIDÉ, 2004)
- **Rinçage :** cette méthode est généralement applicable pour les surfaces inaccessibles comme les récipients ou la tuyauterie. Le rinçage est fait plusieurs fois avec la solution stérile TS + 0,05 % tween 80. Après agitation, le liquide du rinçage (volume connu) est collecté stérilement.(Guiraud,1980)
- **Impression sur gélose :** le prélèvement peut être effectué directement par impression sur milieu gélosé ou indirectement par impression à l'aide d'un ruban adhésif.

-Impression directe sur milieu gélosé : nécessite les boîtes de Petri dont le couvercle est plus haut que la partie destinée à contenir la gélose. Cette partie coulée. Les boîtes de Petri stériles coulées à ras bord de milieu de culture sont appliquées sur la surface à étudier. (Guiraud,1980 ; Guiraud,2004)

- Impression indirect sur ruban adhésif : le ruban adhésif stérilisé au UV (10 min à 20 min sous une lampe UV) est appliqué sur la surface à étudier de façon à ce qu'il adhère parfaitement . Après quelques secondes de contact il est retiré et appliqué sur la surface d'un milieu gélosé approprié. Après quelques heures de contact à la température d'incubation désirée il est retiré et la boîte est incubée jusqu'à apparition des colonies. Cette méthode est préconisée pour les mains et les surfaces rugueuses. (Guiraud,1980 ; Guiraud,2004)

- **Méthode du cylindre :** un cylindre creux de section connue est appliqué sur la surface à analyser; on y introduit alors quelques ml de diluant stérile et après quelques secondes de contact, le diluant est retiré et analysé (Guiraud, 1980)

- **Coulage de milieu gélose :** une gélose en surfusion à 45° C est introduite dans le récipient à étudier, bouteille par exemple puis repartit uniformément par des mouvements de rotation du récipient selon un axe horizontale sous un courant d'eau froide après solidification, le récipient est incubé en l'état. (Guiraud,1980 ; Guiraud et Rosec,2004)

III.4.2 Prélèvement pour le contrôle de l'air

Le contrôle microbiologique de l'air est important en milieu industriel les prélèvements s'effectuent par (Adjidé et Crespin, 2004) :

- exposition de boîtes de Petri coulées avec un milieu de culture solide. Les boîtes sont exposées à différents endroits surtout ceux exposées aux courants d'air.

- utilisation de fiole à vide contenant un milieu de culture liquide isolée du milieu extérieur par un bouchon.
- En aspirant, un certain volume d'air à travers un tube plongé dans le milieu de culture. Celui-ci est ensuite incubé. (Adjidé et Crespin, 2004)

V. Les Méthodes de Dénombrement

V.1. Introduction

Le dénombrement des cellules bactériennes est réalisé par des méthodes directes ou par des méthodes indirectes (Bourgeois et Mafart, 1991 ; Driehuis et Teernstra ,1992)

V.2. Méthodes directes de dénombrement

Les Méthodes directes de dénombrement comptent directement les cellules microbiennes ou leurs colonies. Le dénombrement par comptage des cellules microbiennes et au microscope sur des préparations à l'état frais ou sur des frottis colorés. Le dénombrement par culture utilise des milieux favorables pour dénombrer les colonies ou détermine le nombre le plus probable de germes par unités de volume. (Dziezak, 1987; Bourgeois et Mafart ,1991)

V.2.1. Dénombrement au microscope.

V.2.1.1. Comptage à l'hématimètre :

C'est une numération des cellules sous le microscope utilisant un hématimètre (numération hématimétrique). Il existe deux grands types principaux de cellules de numération. Ils diffèrent par leur quadrillage (Guiraud et Galzy 1980)

-Cellule de Thoma.

-Cellule de Malassez .

La cellule de Thomas est une lame de verre épais portant à sa partie supérieure un réseau de carrés (figure1) qui sont au nombre de 400 dont chacun à 1/20 mm de côté.

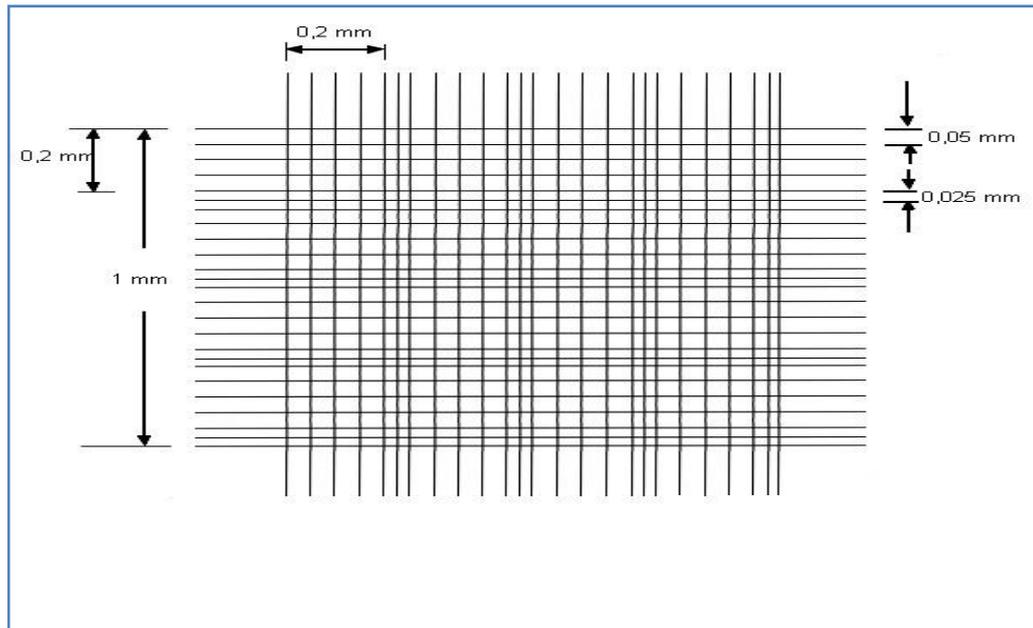


Figure 1: Le quadrillage de la Cellule de Thoma

Une goutte de suspension est placée sur la lame puis recouverte d'une lamelle (figure2). Celle-ci se repose sur 2 renflements de lame ce qui délimite un espace au-dessus du réseau de 1/10 mm. Le volume de chaque cube est donc $\frac{1}{4} \cdot 10^6$ ml.

L'observation est réalisée à l'état frais au microscope au grossissement $\times 40$. Le volume de comptage est déterminé par : -la surface du quadrillage gravé sur la lame. -la profondeur de la chambre.

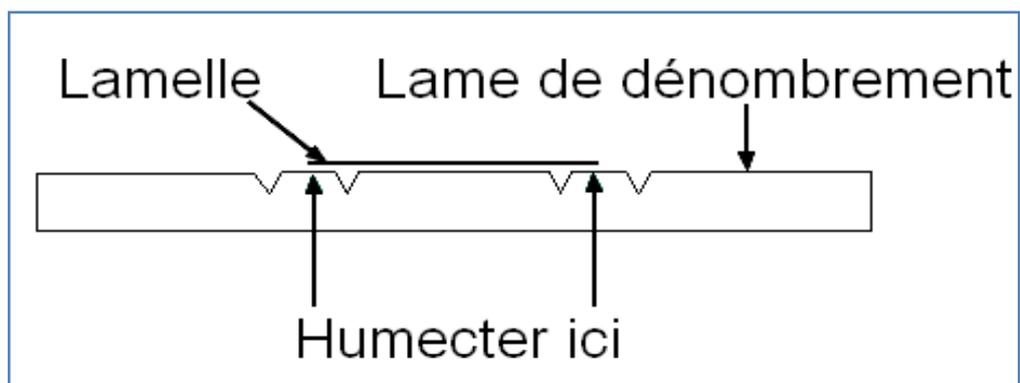


Figure 2 : Représentation d'une lame de THOMA

Compter ni le nombre de cellules dans chaque carré et il faut compter dans P carrés qui est en général = 100. Calculer la moyenne m

$$m = \sum ni/P$$

Déterminer le nombre de germes/ml (N)

$$N (\text{germes / ml}) = m \times 4.10^6 \text{ (l'inverse du volume d'un cube)}$$

➤ **Remarques:**

En utilisant des colorants vitaux comme le bleu de méthylène ou le vert Janus, il est possible de déterminer les ratios de cellules vivantes et des cellules mortes.

– la méthode est initialement conçue pour la numération des cellules du sang. En microbiologie, elle est plutôt applicable pour la numération des levures. Son application aux bactéries est controversé car les bactéries sont de petites tailles et la situation se complique dans le cas où elles sont mobiles.

– la numération est difficile lorsque la suspension contient un nombre de germes/ml assez élevé. Dans ce cas, il faut diluer la suspension bactérienne.

– précision n'est pas satisfaisante car il est difficile de compter les amas et les bourgeons dans le cas des levures.

– applicable en milieu industriel en raison de sa rapidité.

V.2.1.2 Méthode de Breed

Consiste à étaler sur une lame une quantité faible et connue de suspension à dénombrer puis effectuer le comptage des germes après fixation et coloration, en se ramenant aux dimensions du champ microscopique. (Bogdanof, 1930 ; Prescott et Breed ,2003)

➤ **Technique :**

- Nettoyer la lame de BREED à l'alcool puis la sécher ;
- Prélever 0,01 ml de la suspension à dénombrer ou de dilution.
- Les déposer sur une lame au centre de la zone de comptage à l'aide d'une micropipette et les étaler uniformément sur une surface de 1cm². Faire la fixation par

chauffage dans l'étuve à 55°C. Après refroidissement, réaliser la coloration pendant 10 à 12 secondes par du colorant Charlotte- Newman ou 30 secondes par du bleu de méthylène. Après rinçage à l'eau et séchage, examiner à l'objectif à immersion.

Compter les germes dans 20 champs (Compter le nombre de cellules dans dix champs horizontaux et dans dix champs verticaux) de vision (p) dont le diamètre (mm) est initialement fixé à l'aide du micromètre objectif.

Calculer la moyenne m

$$m = \frac{\sum ni}{P}$$

Trouver N le nombre de germes / ml

$$N(\text{germes / ml}) = m \times F$$

$$F = \frac{40.000}{3,1416 \times d}$$

F = facteur de multiplication

d = diamètre

➤ **Commentaire :**

La méthode est rapide et bien adaptée pour le comptage des bactéries. Toutefois, elle ne distingue pas les cellules mortes des cellules vivantes. L'existence des amas de cellules sont comptés comme une seule cellule ce qui diminue de la précision de la méthode.

V. 2.2 Dénombrement par culture en milieu liquide :

2.2.1 Principe : il est supposé qu'après ensemencement d'un milieu liquide, toute croissance microbienne provient au moins d'un germe. (Magniez, 2014)(cas des microorganismes unicellulaires.

2.2.2 Technique,

- Diluer la suspension mère dans la série de dilutions de 10 en 10 (figure3);
- Ensemencer la série de tubes (2,3 ou 5) avec 1 ml de chaque dilution et de suspension mère.

2.2.3 Remarque : le milieu de culture doit être approprié au germe et les tubes contiennent 9 mL. L'incubation doit se faire dans les conditions optimales de croissance du germe.

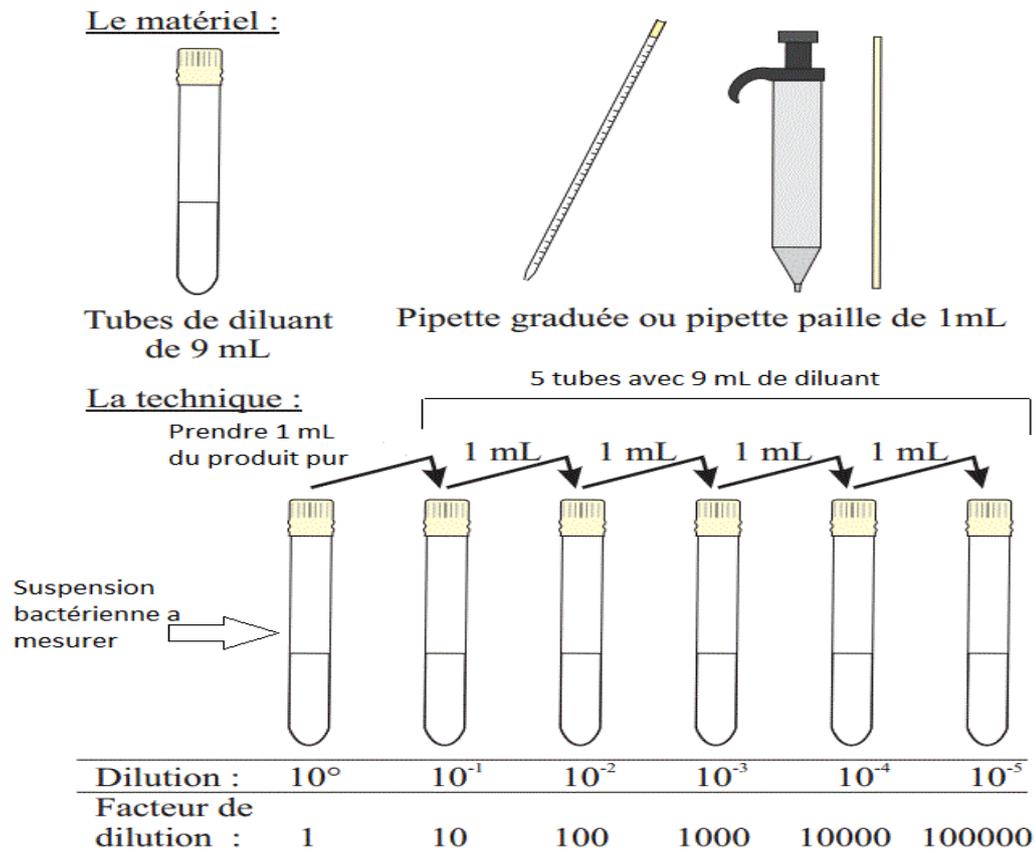


Figure3 : Protocole expérimental d'une dilution successive de facteur 10 (Magniez, 2014)

2.2.4 Lecture

– Faire la lecture des tubes positifs c'est-à-dire ceux qui présentent la ou les signes de croissance (trouble) ou d'une activité biologique (dégagement du gaz dans la cloche de Durham, virage de l'indicateur coloré) et des tubes négatifs.

– Pour chaque série issue de la même dilution, compter le nombre de tubes positifs soit :

0, 1 ou 2 → série de 2 tubes

0, 1, 2 ou 3 → série de 3 tubes

0, 1, 2, 3, 4 ou 5 \longrightarrow série de 5 tubes

- Reporter les résultats dans un tableau et composer le nombre caractéristique. Le nombre caractéristique est composé de 3 chiffres correspondant à 3 dilutions successives. Le premier du nombre caractéristique correspondant à la dilution la plus concentrée qui à donner un résultat positif pour tous les tubes de la série(dans notre exemple c'est 2).

Exemple :

Tableau I : Dénombrement sur milieu liquide, cas de la série de 2 tubes.

Dilution d'ensemencement	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}
Dilution de la culture	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Résultat	+	+	+	+	-	-	-
	+	+	+	-	-	-	-
Nombre de tube positifs	2	2	<u>2</u>	<u>1</u>	<u>0</u>	0	0

Nombre caractéristique à trois chiffres : **210**

2.2.5 Interprétation :

Elle est basée sur des données statistiques. Des tables dites de Mac Grady (Annexe2) donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre le plus probable (NPP) dans 1ml de la dilution qui à servit à ensemencer les tubes correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique.

Dans le présent exemple et selon la table de Mac Grady (annexe2)

210 correspond à 6,0 (NPP)

La dilution utilisée pour ensemercer les tubes correspondant au premier chiffre du nombre caractéristique étant: 10^{-2} .

Donc : la dilution 10^{-2} (d) contient probablement 6 germes/ ml. Déterminer le nombre de germe (N) de la suspension de départ ;

$$N = \text{NPP} \times 1/d = 6 \cdot 10^2 \text{ germes/ml}$$

Remarque : si le produit analysé est solide ou semi-solide, il faut déduire le nombre de germe par gramme de produit selon la concentration initiale du produit en solution mère.

2.2.6 Cas particulier :

Théoriquement, le chiffre correspondant à la dilution suivant la dernière utilisée doit être un zéro. Si ce n'est pas le cas, il faut ajouter la valeur au dernier chiffre du nombre caractéristique.

Exemple ; dans une série de 3 tubes : 3211, le nombre caractéristique est donc $321 + 1 = 322$

Le chiffre maximum de la série n'est pas obtenu dans les premiers tubes : ceci se produit lorsque la suspension de départ est faible en germes. Il faut prendre les chiffres correspondants aux trois premiers tubes quels qu'ils soient. Par exemple 200 dans la série de trois tubes.

Lorsque la suspension de départ contient un nombre excessif de germes et que les dilutions ensemercées sont insuffisantes ce qui a résulté plusieurs chiffres du nombre caractéristique sont aux maximum, il faut prendre les chiffres correspondants aux 3 dilutions les plus fortes.

Exemple : 330 dans la série de trois tubes.

Lorsque des tubes négatifs précèdent des tubes positifs. Dans ce cas il est supposé que dans les dilutions les plus faibles il y a un inhibiteur qui a empêché le germe de se développer et qu'en diluant, l'effet inhibiteur disparaît. Dans ce cas, il ne faut pas tenir compte des tubes négatifs.

Exemple : 0022110 le nombre caractéristique sera 211.

- **Remarque. :** Lorsque on peut composer plus d'un nombre caractéristique, il faut toujours choisir un nombre caractéristique inférieur à 220 (table de deux) et à 330 (table de 3 tubes)

2.2.7 Commentaire

- La méthode NPP est très utilisée en contrôle microbiologique des aliments surtout pour le dénombrement des coliformes et des streptocoques.
- Permet d'étudier un caractère difficilement mis en évidence sur milieu solide comme la production d'un gaz.
- En utilisant des milieux peu sélectifs (présomption), elle permet d'effectuer un dénombrement avec une phase de réanimation, c'est-à-dire que le milieu est favorable pour le développement même des germes en mauvais état physiologique. Les tubes positifs sont alors repiqués sur un milieu plus sélectif (confirmation).
- Ses inconvénients résident dans le fait qu'elle est lourde à mettre en œuvre car elle nécessite beaucoup de matériel. Les résultats ne sont pas précis (manque de fiabilité). Ainsi, des études ont confirmé que les écarts obtenus sont parfois grands. Ils sont estimés à une amplitude de 2 log. Concrètement, un nombre réel de 1000 germes se traduit par un nombre compris entre 100 et 10.000 germes. (Guiraud, 2003)

V.2.3. Dénombrement par culture en milieu solide.

V.2.3.1 Principe

La méthode se base sur le fait que chaque colonie macroscopiquement visible provient d'une cellule microbienne ou UFC (Unité Formant Colonie).

La technique employée est choisie en fonction du rapport du germe à dénombrer avec l'oxygène. Elle peut être réalisée en boîtes de Petri ou en tubes.

V.2.3.2 Dénombrement en boîtes de Petri :

Le dénombrement est réalisé en masse lorsque le germe à dénombrer est aérotolérant ou micro- aérophile et en double couche lorsque le germe est anaérobie strict. Dans ce cas le milieu peut être additionné d'un agent réducteur tel que le chlorhydrate de L cystéine. Dans tous les cas, le milieu gélosé doit être suffisamment mou c'est à dire additionné de 2% d'agar seulement pour permettre aux colonies qui se situent dans la masse d'atteindre leur taille normale.

V.2.3.3 Le mode opératoire

À partir des dilutions et éventuellement de la suspension mère, ensemercer dans la masse, au moins 2 boîtes de Petri par dilution. Mettre 1 ml de la suspension dans une boîte de Petri vide, et ajouter 10 à 15 ml de milieu gélosé en surfusion de 40 à 45 °C. Homogénéiser le mélange par des mouvements circulaires. Laisser le mélange se solidifier à la température du laboratoire. Si le micro-organisme est anaérobie stricte, couler une seconde couche assez épaisse sur la première pour assurer l'anaérobiose.

- Cas où le germe est aérobic strict :

0,1 ml de la suspension mère ou de ses dilutions sont déposés au centre de la boîte de Petri préalablement coulée avec le milieu de culture adéquat et étalés uniformément sur toute la surface de la gélose. L'étalement est réalisé à l'aide d'un râtelier. Cette méthode est bien adaptée pour la numération des aérobies stricts. Toutefois sa précision est faible car il y a un risque que des microorganismes adhèrent au râtelier.

Incuber les boîtes dans les conditions optimales de croissance du germe à dénombrer.

2.3.4 Lecture :

Le dénombrement est réalisé par comptage des colonies à l'aide d'un compteur de colonies (figure 3) .



Figure 3 : Le Compteur de colonies (<http://www.dutscher.com>)

Les boites dénombrables sont celles dont le nombre de colonie est compris entre 15 ou 20 et 300.(figure 4)

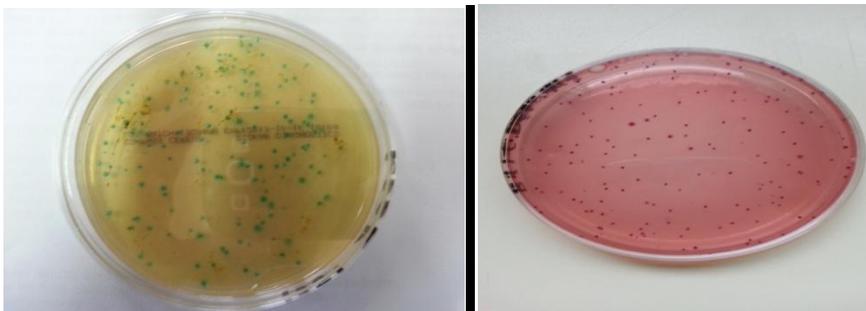


Figure 4 : Exemple de culture bactérienne (colonies)

Déterminer le nombre de cellules vivantes par ml de la suspension mère (CFU/ml) en appliquant la formule suivante :

$$N \text{ (CFU / ml)} = \frac{\sum c}{(n_1 + n_2 * 0,1) d}$$

$\sum c$ = Nombre totale des colonies comptées dans les boites dont le nombre de colonies est compris entre 20 et 300.

n_1 : nombre de boites de Petri comptées de la 1^{ère} dilution

n_2 : nombre de boîtes de Petri comptées dans la seconde dilution.

d : facteur de dilution à partir duquel les 1^{er} comptages ont été fait.

2.3.5 .Exemple de résultats

- **Exemple 1**

Tableau II : Exemple de résultats de dénombrement sur milieu solide

Boîte ensemencées dilution	Boîte1	Boîte 2
10^{-2}	278	290
10^{-3}	33	28

$$N \text{ (UFC/ml)} = \frac{\sum c}{(n_1 + n_2 * 0,1)d} = \frac{278 + 290 + 33 + 28}{(2 + 2 * 0,1)10^{-2}}$$

$$N = 285,91 \cdot 10^2 = 28,59 \cdot 10^3 \text{ UFC/ml}$$

- Quand aucune boîte ne présente de colonies : il faut conclure que la suspension mère contenant moins de 1 germe par ml.
- Quand le nombre de colonies pour les dilutions est inférieur à 20, il faut conclure que le nombre de germes est moins de 20 par ml de la suspension mère.
- Quand le nombre de colonies pour toutes les dilutions est supérieur à 300, il faut conclure que le nombre est supérieur à 300 par ml de la suspension mère.

Dans tous les cas ne pas oublier de multiplier le nombre par le facteur de dilution c'est-à-dire l'inverse de la dilution.

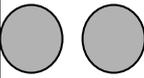
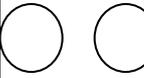
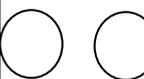
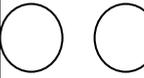
- **Exemple 2 :**

Méthodologie à suivre :

- Examiner bien les boîtes et choisir celles contenant entre 15 et 300 colonies (si possible)
- Compter avec soin les colonies en marquant au fur et à mesure à l'aide d'un marqueur, sur le fond extérieur de la boîte.
- Interpréter les résultats en faisant par exemple la moyenne des résultats obtenus pour les deux boîtes de la même dilution.

- **Exemple de résultats**

Tableau III : Résultats d'un d'encombrement par culture sur milieu solide

boîtes ensemencées dilutions	Boîtes 1 et 2	numération		moyenne	Nombre de bactéries dans le produit pur (en multipliant par l'inverse de la dilution)
Produit pur Dilution 10 ⁰		Boîte 1	boîte 2	-	Résultats non interprétables
		Trop nombreuse			
Dilution 10 ⁻¹		304	287	295 soit=300	300x10=3000
Dilution 10 ⁻²		26	38	32 soit=30	30x100=3000
Dilution 10 ⁻³		6	2	-	Résultats non interprétables (colonies trop rares)

Le résultat final sera donc de 3000 microorganismes par cm³ ou par ml de produit pur.

Le résultat peut être calculé en prenant en compte les boîtes de deux dilutions

successives en utilisant la formule $N \text{ (UFC/ml)} = \frac{\sum c}{(n_1 + n_2 \cdot 0,1)d}$

.

2.3.6 Commentaire :

La numération en boîte de Petri est :

- facile à mettre en œuvre et nécessite moins de matériel ;
- aussi une méthode d'isolement ;
- très utilisée pour la numération de la flore totale ;
- n'est pas une méthode de revivification des germes ;
- plus précise que la méthode N.PP si l'expérience est réalisée en double (série de 2 boîtes), la variabilité est d'une amplitude de 1 logarithme. Concrètement, est traduit par exemple pour une valeur réelle de 100 germes. on peut obtenir entre 32 et 316.

V.2.3.3 Les dénombrements en tubes (culot de gélose).

Méthode, qui suit le même principe que le dénombrement sur boîtes de Petri. Rarement utiliser vu les difficultés rencontrées lors du dénombrement des colonies qui sont difficilement accessibles à l'œil nu.

Néanmoins, cette méthode est très utilisée pour le dénombrement des Clostridium sulfito-réducteurs (anaérobies).

V.2.4 Autres méthodes de comptage cellulaire directes

2.4.1 Technique DEFT (Direct Epifluorescence Filter Technique)

Cette technique utilise la filtration sur membrane et la microscopie en épifluorescence qui permet de mieux discerner les bactéries des particules. Permet la numération de la flore totale en moins de 20 min. les bactéries sont concentrées sur un filtre en polycarbonate puis colorées par l'acridine orange, qui une fois fixés sur les acides nucléiques les rend fluorescent.

Le dénombrement s'effectue sous immersion à l'objectifx100 au microscope muni d'un épi-illuminateur UV (figure5).

30 champs sont pris au hasard sont observés et on compte entre 30 et 100 bactéries par champ.

La concentration en bactéries(CB) est définie comme suit :

$$CB = N \times M \times D \times 1/V$$

N : concentration bactérienne dans un champ

M : nombre total de champs microscopiques occupant la surface filtrable de la membrane

D : dilution éventuelle

V : volume filtré

Cette technique s'applique pour le lait (contenant entre $5 \cdot 10^3$ et $5 \cdot 10^8$ /ml)

ou l'eau. Elle peut être adaptée pour d'autres aliments après filtration appropriée.

Les cellules ayant un haut rapport ARN/ADN seraient orangé-rouge et les cellules inactives ayant un faible rapport ARN/ADN présenteraient une fluorescence verte.

2.4.2 Ses inconvénients : Nécessite une filtration préalable pour les aliments solide, le matériel reste onéreux surtout si elle est reliée à un analyseur d'image.



Figure 5 : Installation pour la **Technique DEFT** (Nagata et *al.* ,2010)

V.2.4 .2 Cytométrie en flux

Cette technique consiste à faire défiler très rapidement (plusieurs milliers /seconde) les une derrière les autres, des cellules en suspension monocellulaire devant un faisceau laser. Pour chaque cellule, sont mesurées très précisément : la fluorescence émise à diverses longueurs d'ondes et la lumière diffusée, recueillie dans deux directions différentes (l'une peut être corrélée avec la taille et la seconde avec la réfringence et granulosité de la cellule (De Blanc et *al.*,1971) (Figure 6).

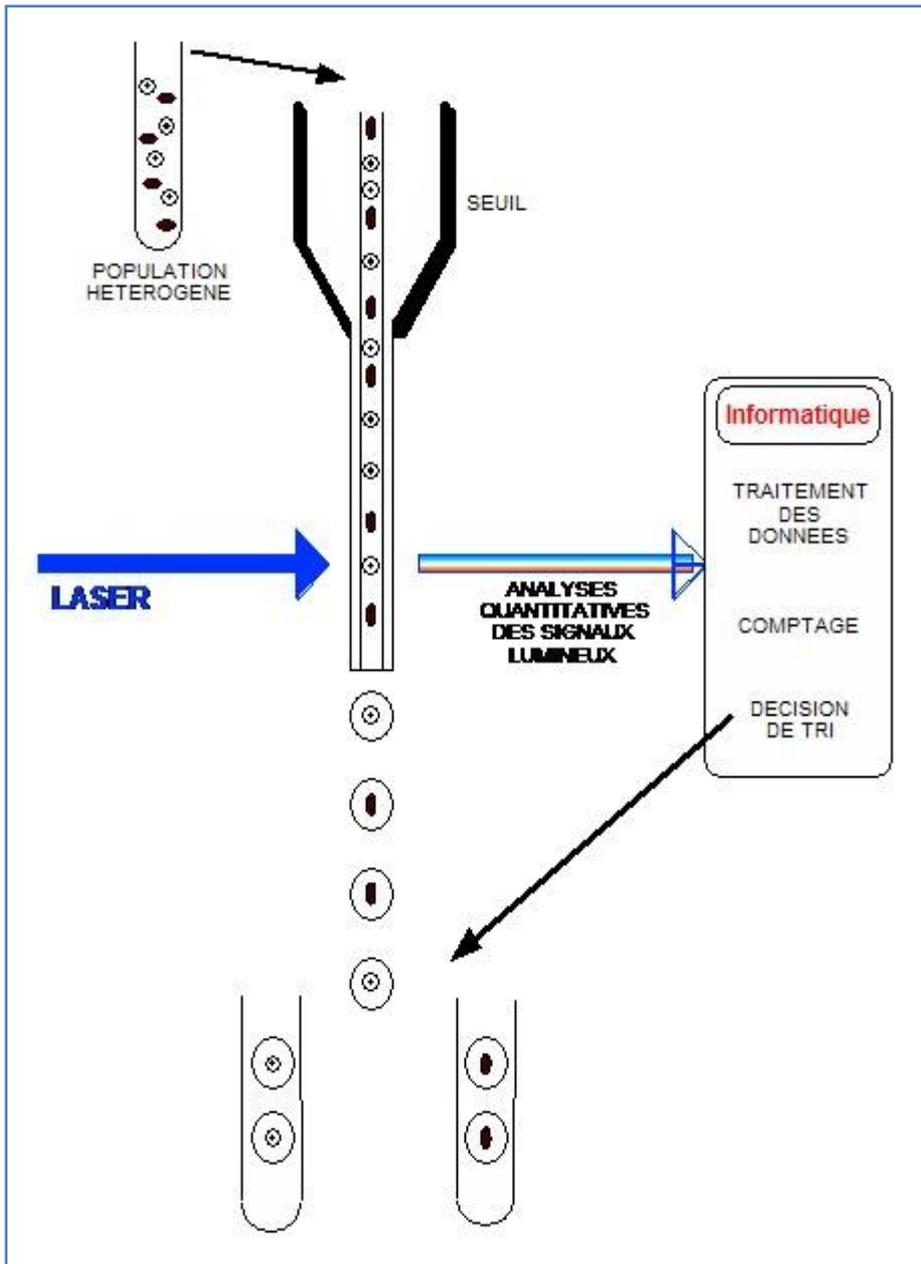


Figure 6 : Principe simplifié d'un cytomètre en flux (Cady et *al.*,1978)

L'appareil peut ainsi analyser les cellules selon plusieurs paramètres, et définir des « sous populations » homogènes pour les regrouper selon des critères choisis. Pour chaque sous population on peut calculer l'effectif, le % qu'il représente par rapport à la population totale, la moyenne de chacun des paramètres ... (Dziezak, 1987)

Dans le cas d'un tri, chaque sous- population peut être séparée physiquement de l'ensemble. (Feng, 1996)

Selon la spécificité des réactifs fluorescents (marqueur de viabilité) utilisés pour colorer les cellules, on a accès à, l'étude quantitative de nombreuses caractéristiques : présence d'un antigène, quantité d'ADN ou d'ARN, activité enzymatique, viabilité, ect.

Les cellules doivent être impérativement mises en suspension .pour envisager une analyse. Leur nombre doit être de quelques centaines de milliers au minimum. De plus, on ne possède pas d'image des cellules analysées (seulement une quantification en unité arbitraire de chaque paramètre mesuré). Enfin, chaque cellule n'étant analysée qu'à un unique instant donné, on ne peut faire de véritable étude cinétique portant sur une même cellule. (Dziezak, 1987)

Les applications sont très diverses en raison de la grande variété de paramètres mesurés.

On citera : détection des contaminants dans les produits laitiers, dérivés des corps gras, jus de fruit, bière. (Barrett et. Swaminathan.1997.).

Dans d'autres domaines : la quantification de l'ADN, activité enzymatique, flux ionique, typage lymphocytaire pour le suivi du sida....

2.4.3 Avantages

Analyse très rapide, permet (Feng ,1992 ; Feldsine et *al.*,1997)

- une mise en évidence très rapide d'une contamination en moins de 24h même lorsque le niveau de contamination est très faible.
- une Quantification précise de la fluorescence.
- de trier les cellules selon plusieurs paramètres simultanément.

2.4.4 Limites

Les cellules doivent être en suspension. Il est nécessaire de disposer d'un grand nombre de cellules. (Dziezak, 1987)

V.3 Méthodes de dénombrement indirecte

V.3.1 Détermination néphélométrique

La méthode décrite est applicable aux alcools et boissons spiritueuses ayant une grande pureté optique ou faiblement chargés en matières suspensoïdes. Son

application présente moins d'intérêt pour les produits chargés (très troubles).
(Boulanger, 1991)

V.3.1.2. Principe

La méthode se base sur la proportionnalité qui existe dans une certaine mesure entre la densité optique (turbidité) de la suspension microbienne et la quantité de la biomasse (Gautier,1984)

V.3.3. Mode opératoire

La relation densité optique $D.O = f(\text{masse cellulaire})$ n'est proportionnelle que dans un intervalle bien définis. Elle est régie par la loi de Beer- Lambert et valable que jusqu'à une certaine valeur de la D.O. En conséquence, il faut déterminer cet intervalle. C'est-à-dire il faut établir la courbe étalon. Pour cela, depuis le temps $t=0$ et à des temps réguliers, il faut mesurer la densité optique à une longueur d'onde bien définie et au même temps mesurer le paramètre étudié (nombre de cellules, le poids de la matière sèche,,). (Nagata et *al.*, 2010)

Après obtention des résultats, tracer le courbe étalon $DO = f(\text{paramètre})$ (voir Figure7.

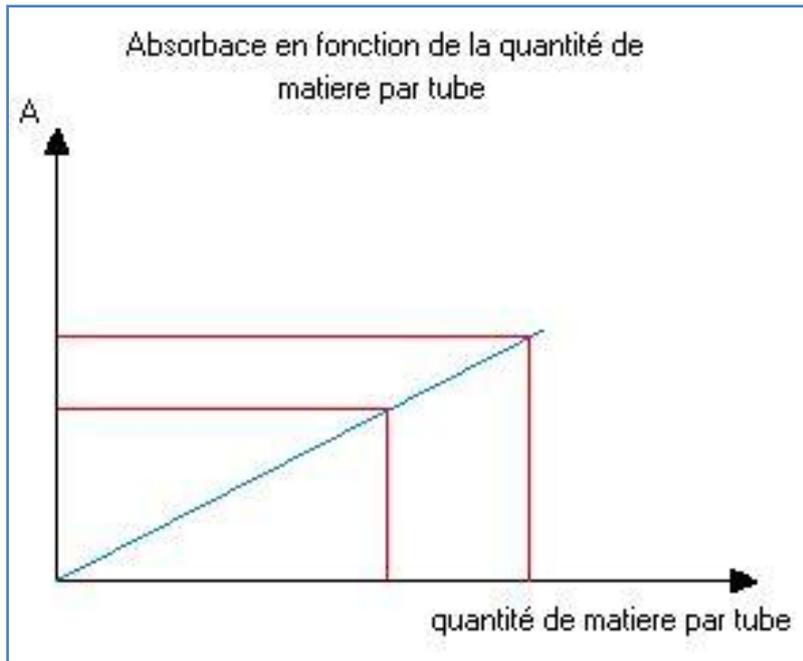


Figure7 : Exemple de courbe étalon (Nagata et *al.*, 2010)

V.3.1.3. Commentaire

- La méthode n'est reproductible que dans les mêmes conditions expérimentales avec la même souche microbienne et appareil de mesure (figure 8).



Figure 8 : Le Spectrophotomètre (<https://www.thermofisher.com/dz/en/home.html>)

- Si dans l'application, c'est-à-dire on veut connaître la valeur du permettre (nombre de germes) d'une suspension et que lors de la mesure de la densité optique, il apparait que la valeur de DO mesurée est en dehors de la zone de mesure, il faut alors diluer la suspension. (Oğuzet *al.*, 2002 ; Chemaly *et al.*, 2003)

– Dans le cas du dénombrement, la méthode n'est pas précise car elle mesure simultanément les cellules vivantes et les cellules mortes. (Sigrist – Gas *et al.*,1976). Cependant, très utilisé en milieu industriel.

V.3.2 Impédancemétrie

Les bactéries cultivant dans le milieu liquide provoquent des modifications chimiques qui perturbent la résistance électrique (impédance). Le laps de temps requis pour mettre en évidence ce changement d'impédance et inversement proportionnel au nombre initial de bactérie. De ce fait, des microorganismes en suspension dans une solution d'électrolytes traversent à débit constant un conduit de faible diamètre (30-500 μm) au bout duquel sont disposées deux électrodes qui mesurent l'augmentation de la résistibilité consécutive au passage d'une cellule microbienne (Cady *et al.*,1978).

Ce procédé est très utilisé en laiterie, il consiste à introduire l'échantillon de lait dans des flacons obturés par des bouchons en caoutchouc munis de deux électrodes reliées au « Bactometer 32 microbial system ». Un témoin de lait stérile mis dans les mêmes conditions est constitué. (Zafari , Martin,1977)

Pour chaque échantillon, le rapport est inscrit en digital toute les 96s :

Impédance dans le lait examiné

Impédance dans le lait stérile

En ajoutant 1% de lait cru au lait stérile, il est possible de détecter 10^3 bactéries /ml en 7 heure.(Silverman et Munoz,1979)

Cette méthode est adaptée pour le dénombrement de la flore totale de l'ordre de 10^5 et plus avec un gain de temps. il est nécessaire parfois de réaliser des dilutions.(Martins et Selby,1980)

Très utilisée pour le contrôle du lait, de l'eau, des boissons alcoolisées, du levain. (De Blanc *et al.*,1971 ; Specteret *al.*,1977)

V.3.3. Détermination du poids sec

Les microorganismes sont récoltés par filtration sur une membrane ou par centrifugation. Les cellules sont rincées et séchées. Le lavage doit éviter toute lyse cellulaire par choc osmotique. Un volume d'échantillon est centrifugé 10min à 12000 g. Le culot est lavé à deux reprises avec l'eau distillée stérile. Ce dernier est remis en suspension dans un ml d'eau distillée et placé dans une capsule tarée est desséchée à 100-105°C jusqu'à poids constant (24h). On l'exprime en gramme de matière sèche.

Cette méthode reste délicate, peu précise et peut conduire à des pertes de 5 à 10% de la matière cellulaire et ne différencie pas entre les cellules mortes et les cellules vivantes. ([Fenech](#) et [Jaffrin](#), 2004)

V.3.4. Détermination du poids humide

Cette méthode est également utilisée mais les résultats sont moins précis que ceux obtenus par le poids sec à cause de l'eau intracellulaire et celle liée aux cellules. Néanmoins, cette méthode reste tout de même plus rapide. (Enjin et *al.*, 2016)

Chapitre IV Le contrôle microbiologique de certaines denrées alimentaires

1. Contrôle microbiologique du lait

1.1. Introduction

Les laits des différentes espèces de mammifères sont constitués des mêmes types de composants; mais leur composition varie d'une espèce à l'autre (Alais ,1975 ; Steijns, 2008).

Dans le codex Alimentarius (Codex Stan 206-1999) , le lait propre à la consommation de l' homme: «est le produit intégral de la traite totale ininterrompue d'une femelle laitière bien portante, bien nourrie et non surmenée. Il doit être recueilli proprement et ne pas contenir de colostrum.»(FAO et OMS 2011).

Néanmoins, le plus répandu est le lait de vache, de part sa composition riche (des graisses, lactose, protéines, sels minéraux et l'eau (tableauIV) et son pH qui est de 6,6. (Vignola, 2002)

Tableau IV: Composition typique du lait de vache (Alais et Liden, 1987).

Constituants	Concentration (g/l)
Eau	905
Glucides : lactose	49
Lipides	35
Matière grasse proprement dite	34
Lécithine (phospholipide)	0,5
Partie insaponifiable (stérols, carotène, tocophérols)	0,5
Protides	34
Caséines	27
Protéines solubles (Globulines, Albumines)	5,5
Substances azotés non protéiques	1,5
Sels	9
l'acide citrique	2

l'acide phosphorique	2,6
Chlorure de sodium (Na Cl)	1,7
Vitamines, enzymes, gaz dessous	Traces
Extrait sec total	127
Extrait sec non dégraissé	92

Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. De ce fait on trouve que le lait comporte une flore originelle et une flore de contamination. (Ngassam-Tchamba, 2007)

1.2. Les caractéristiques microbiologiques du lait

Du fait de sa composition physico-chimique, le lait est un excellent substrat pour la croissance microbienne. (Guiraud, 2003)

Lorsque le lait est prélevé dans de bonnes conditions, à partir d'un animal sain, le lait contient moins de 1000g/ml (10^3 germes /ml), nommée flore originelle. Ce sont essentiellement des saprophytes du pis et des canaux galactophores : microcoques, streptocoques lactiques et lactobacilles. Le lait cru est protégé par des lactenines, des substances inhibitrices d'action de courte durée (1 heure).(Guiraud ,1998)

Le lait se contamine par des germes exogènes provenant des fèces et téguments de l'animal (coliformes et entérobactéries pathogènes, *Clostridium*, *Salmonella*), du sol (Streptomyces, *Listeria*, bactéries sporulés, spores fongiques), de la litière et aliments (clostridium butyriques, flore banale variée) de lait et L'eau , des équipements de la traite et de stockage (levure, flores diverses, bactéries sporulées) , des manipulateurs (germes de contamination fécale et staphylocoques) et de divers vecteurs (flore de contamination fécale).

Si l'animal est malade, le lait peut contenir des germes pathogènes (Streptocoque pyogène, carynebactéries pyogènes, des staphylocoques) qui sont des agents des mammites et peut s'agir aussi de germes d'infection générale : *Salmonella*, *Brucella*, et exceptionnellement *Listeria monocytogenes*, de mycobactéries, de *Bacillus anthracis* et quelque virus (Guiraud, 2003). (voir Tableau V)

La présence de ces microorganismes conduit à des modifications qualitatives du lait (exemple acidification) ou à des risques sanitaires s'ils sont **pathogènes** (Alais, 1984).

Tableau V : Les principaux groupes bactériens du lait (Alais, 1984).

	Groupes	Caractères
-Bactéries «Gram +»	1-Bactéries lactiques	Activité biologique : fermentation du lactose
	2-Microcoques	* Flore banale de contamination du lait *Activité enzymatique réduite
	3-Staphylocoques	*Anaérobies facultatifs, fermentent le lactose exemple : <i>Staphylococcus aureus</i> *Développement dans le lait à 15°C pendant plusieurs heures
	4-Bacillaceae.	*Mésophiles, inhibées à 45°C, * Absentes dans le lait crus et les produits laitiers qui n'ont pas été chauffés, *Responsables des altérations des laits insuffisamment stérilisés.
-Bactéries « Gram-»	1-Entérobactéries.	*Des coliformes, fermentent le lactose *Leur présence est lié à une contamination fécale *Moins abondantes dans le lait par rapport à d'autres Gram (-), *Ces espèces résistent aux antibiotiques, se développent à des températures très différentes.
	2-Achromobactériaceae	*Ces microorganismes forment l'essentiel de la flore psychrotrophe * Ne fermentent pas les sucres.
	3- Bactéries diveres.	Les plus importantes sont les Pseudomonas véhiculés par les eaux non potables et les Brucella pathogènes.

1.3 Prélèvement des échantillons.

Pour un contrôle microbiologique du lait, des échantillons peuvent être prélevés à la ferme, en usine ou à n'importe quel stade de la mise en vente. Chaque échantillon est représenté par un prélèvement dans un récipient stérile si le lait est en vrac. (Guiraud, 1998)

Pour une analyse microbiologique complète, il faut prélever un minimum 10 échantillon à partir des lots importants, de plus un échantillon supplémentaire peut être prélevé par centaine de bidons ou par 2500 bouteilles. (JORA N°70,2004)

Le volume des prélèvements à partir des produits en vac est en moyenne 100 ml.

Les prélèvements doivent être effectués en aseptie et avec un matériel et dans des récipients propres et stériles.

a) Pour des prélèvements effectués à partir de bidons est utilisée une pipette de grands volumes (contenance 100 ml, longueur 60 cm au minimum). Le contenu du bidon est homogénéisé à l'aide de la pipette, des mouvements de rotation pendant 1min environ. L'homogénéisation peut-être réalisée mécaniquement à l'aide d'un agitateur métallique spécial constitué d'une tige métallique à laquelle est fixée une plaque perforée. En utilisant la pipette, il faut prélever après l'avoir vidée de son premier contenu. Il est possible aussi de prélever avec une louche en acier inoxydable. (Guiraud, 1998)

b) Pour des prélèvements à partir de bac, il faut d'abord homogénéiser convenablement à l'aide d'un agitateur mécanique en le déplaçant sur toute la surface puis de faire un prélèvement (à différents endroits) selon contenance du bac. le prélèvement est réalisé à l'aide d'une louche en acier inoxydable. (Guiraud, 1998)

c) A partir d'une citerne équipée d'un agitateur mécanique, le contenu est homogénéisé pendant 15 à 30 mn. Le prélèvement est réalisé à l'aide d'une frêle lestée introduite par des billes de verre de 0.5 cm serviront par la suite pour homogénéiser l'échantillon au laboratoire. Comme il est possible de faire la prise d'échantillon par l'orifice de vidange.

-Si la citerne n'est pas dotée d'un système automatique d'agitation, peut être réalisée à l'aide d'un agitateur mécanique comme de le cas des bacs et de faire des prélèvements en différents endroits avec une louche en acier inoxydable.

-Si la citerne est équipée d'un robinet, il faut laisser couler 25 à 50 L de lait après avoir flambé énergiquement le robinet puis recueillir environ 1 L dans un récipient.

e) A partir de l'animal, il faut faire une traite stérile c'est-à-dire le pis et la mamelle sont nettoyés à l'eau savonneuse, rincés plusieurs fois à l'eau très propre puis essuies à l'aide d'une serviette de papier stérile. la traite est réalisée avec des gants stériles.

La première dizaine de jets et alors éliminée. Les autres sont recueillies dans un récipient stérile.

1.4 Transport et préparations des échantillons.

Le lait cru doit être refroidi et conservé à basse température (0 à 4° C) en utilisant une eau glacée et un caisson isotherme.

Pour les laits destinés à l'étude de l'activité microbienne, les échantillons sont transportés et conservés à une température comprise entre 8 et 13°C

Pour le lait pasteurisé conditionné en emballage individuel, la température ne doit pas dépassé 10°C.

Remarque : le recours à la congélation est à éviter dans tous les cas.

Après prélèvement et conservation dans les conditions indiquées, le contrôle microbiologique doit être effectué dans un délai ne dépassant pas 24h (maximum) quant à l'activité microbienne, le délai doit être ≤ 8 h après prélèvement.

1.5 Schémas d'analyse du lait

1.5.1 Lait cru à la production

1.5.1.1 Etudes des caractères physiques et organoleptiques :

Elle consiste à étudier l'odeur, la couleur et l'aspect général.

Un lait normal est blanc mat ou légèrement jaunâtre homogène au goût agréable et à odeur faible. (Ikhelfen et *al.*, 1999)

1.5.1. 2- Epreuve de la réductase

➤ Principe (Kurmann, 1966)

Grâce à leur réductase la multiplication des bactéries dans le lait conduit à une chute du potentiel redox qui peut être mis en évidence par un indicateur redox.(figure8)

- Bleu de méthylène (BM) → Blanc forme réduite et bleu en forme oxydée.
- Resazurine → Bleu forme réduite et blanc en forme oxydée.

➤ Méthode (Poffé et al., 1996)

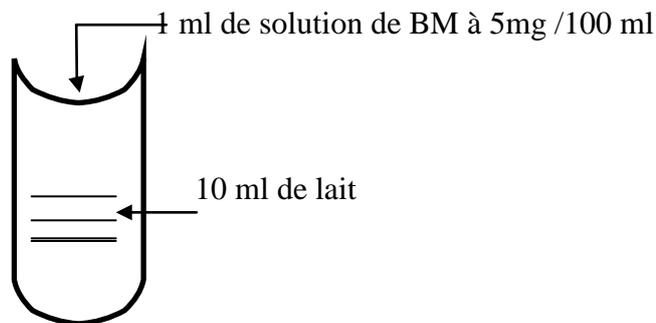


Figure9 : Préparation de l'échantillon de lait pour le test de la réductase

- 1 ml de Bleu de méthylène est ajouté stérilement à 10 ml de lait à analyser (figure8)

- Agitation pour homogénéiser

- Incubation 37° C dans un bain- Marie muni d'un couvercle opaque

- agitation toutes les heures.

➤ Observation

Avant agitation constater la décoloration au bout de 2h puis après 4 heures.

En période chaude (+20°C à midi) au bout de 1h 30 puis 3h.(Dorner ,1933)

➤ Lecture (Dorner ,1933)

- Décoloration dans un temps < à 1h → population $2 \cdot 10^6$ à 10^7 germes /ml

- Décoloration dans un temps < 2h (< 1h 30) → lait contaminé.
- Décoloration dans un temps compris entre 2 et 4h → lait peu contaminé
- Décoloration dans un temps supérieurs à 4h → lait de bonne qualité

➤ **Commentaire.**

- La méthode de mesure de l'activité microbienne par le Bleu de Méthylène est très approximative car l'activité réductrice est régie par le nombre de cellules microbiennes, leur état physiologique et l'espèce.

- Les streptocoques de mammites ne décolorent pas le Bleu de méthylène.

- Le Bleu de méthylène peut être réduit par les cellules somatiques de l'animal.

- La présence de formol dans le lait (pour sa conservation) induit, une décoloration rapide

- La méthode ne s'applique pas à des laits réfrigérer ou congeler. Bien que des auteurs préconisent une pré- incubation de 16 à 18 h à une température allant de 12 à 18 °C.

1.5.1.3 Epreuve de filtration

Pour étudier la propreté du lait. La filtration est réalisée à l'aide d'un lacto-filtreur ou par filtration sous vide (figure10). Après filtration de 500ml de lait, la membrane est séchée puis examinée. (Thieulin, 1944)

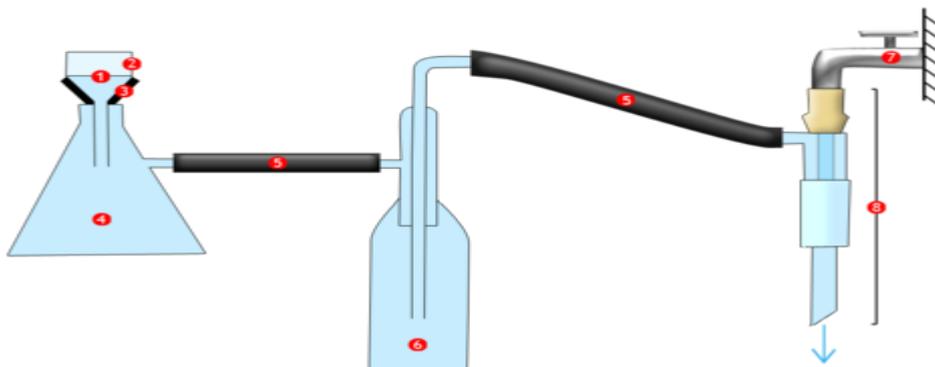


Figure 10 : Schéma du montage de filtration sous vide (Thieulin, 1944)

(1-Filtre,2-Entonnoir Büchner,3-Joint conique,4-Fiole à vide,5-Tuyau à air,6-Flacon laveur,7-Robinet,8-Trompe à eau)

1.5.1.4 Epreuve d'ébullition (Pien, 1971)

Les laits anormaux (lait de mammites ou lactosérum) où les laits acidifiés se coagulent à l'ébullition (Figure 11).

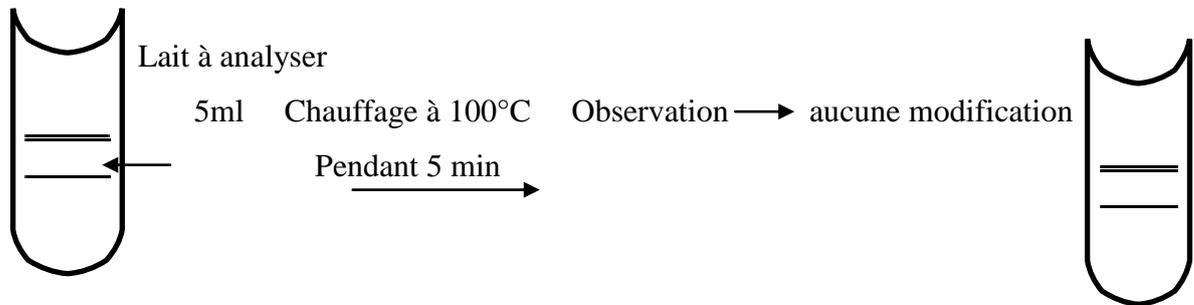


Figure 11 : Test d'ébullition pour le lait

- Chauffage à 100°C pendant 5min, Le lait normal ne se coagule pas.

- Acidité >21°D → coagulation débute.

- Acidité =28°D → le lait prend masse

En absence de coagulation apparente, les tubes sont vidés et rincés à l'eau puis vérifier quant à l'absence de coagulation sur les parois.

1.5.1.5 Test d'acidité

La mesure de l'acidité est le plus souvent réalisée par la soude Dornic.

➤ **Mode opératoire** (Foschini, 1949 ; Guiraud, 1998)

- Introduire dans un Becher 10 ml d'échantillon à analyser, auxquels on ajoute 2 à 3 gouttes de l'indicateur coloré (phénolphtaléine) ;
- Titrer avec la solution NaOH (N/9) jusqu'à l'apparition d'une coloration rose pâle persistante (figure 12).

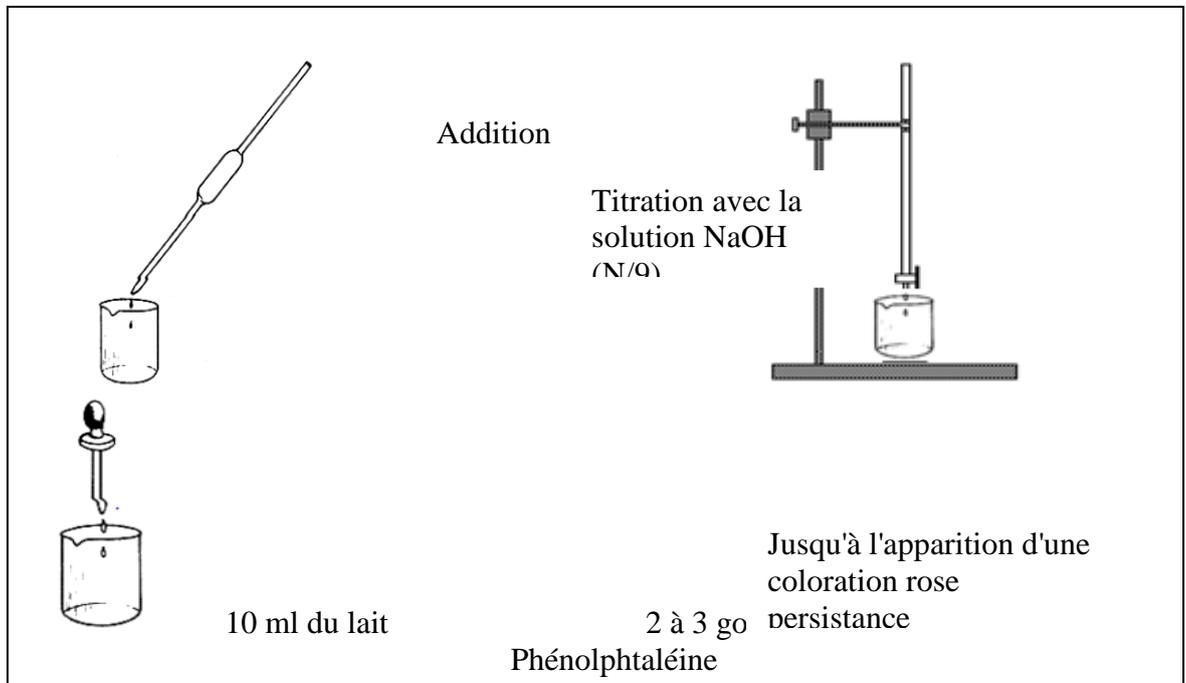


Figure 12 : Mesure de l'acidité titrable du lait

- L'acidité en degré Dornic

Le degré Dornic (°D) correspond au nombre de 1/10^e de millilitres de soude N/9 pour assurer le virage de la phénolphtaléine.

L'acidité du lait est exprimée comme suit : $AT = V \times 10 (D^\circ)$

AT: Acidité titrable

V : le volume en ml correspond à la chute de la burette (volume de NaOH N/9 utilisé)

- **Remarque**

Selon Foschini (1949) et Guiraud (1998), l'**acidité titrable en D° d'un :**

Lait normal = 14-17°D

Lait acidifié coagule au chauffage $\geq 25^{\circ}\text{D}$

Lait acidifié coagule à température ambiante = 70°D

1.5.1.6 Test de triage rapide (Guiraud, 1998)

Le test de triage rapide est basé sur l'acidité Dornic .Pour réaliser ce test il faut :

- Une solution de triage composé de 20ml de soude N/9 et de 2ml de phénolphtaléine à 1% dans 100ml d'eau

- Mélanger un volume de lait et un volume de solution de triage rapide sous agitation

➤ **Lecture**

- Si il y a décoloration => Acidité $> 20^{\circ}\text{D}$

- Pas de décoloration => Acidité $< 20^{\circ}\text{D}$

Ce test permet d'éliminer un lait trop acide soit de l'orienter vers la fabrication de fromage.

1.5.1.7 Dénombrement de la flore totale : l'ensemencement de 1ml dans la masse du milieu gélosé contenant du lait (gélose glucosée au lait écrème, gélose au lait papainé ou du milieu de référence FIL 3/1958 c'est-à-dire le PCA (voir annexe 4) enrichi avec 1% de lait écrémé qui est adapté pour les laits liquides. (JORA n°70 ,2004)

1.5.2 Contrôle du lait cru mis en vente en l'état.

1 - Epreuve de filtration

2- Epreuve de la réductase au bleu de méthylène

3 - Dénombrement de la flore total par culture en boite de Petri à 30 °C (dilutions jusqu'à 10^{-6}) puis ensemencement en masse dans la gélose PCA (JORA n°70 ,2004)

4 - Dénombrement des coliformes à 37°C avec caractérisation d'*Escherichia coli* (dilution jusqu'à 10⁻³) sur gélose au desoxycholate. (JORA n°43 ,2004)

5 - La recherche des germes pathogènes est exceptionnelle. Si celle-ci est faite, il faut rechercher :

- Staphylocoques enterotoxiques coagulase +. (JORA n°70 ,2004)
- BAAR =>*Mycobacterium tuberculosis* (Ziehl Neeelsen) (Smith,2003;ISO21528-2,2004)
- *Brucella* (;ISO21528-2,2004;Ryan et Ray, 2004; Ferooz, 2010; Lopez-Goni et Callaghan, 2012)
- Caractérisation de *C. perfringens* à partir des Clostridium sulfito-réducteur (AFNOR, 2001)

7- Recherche des antibiotiques dans le lait

7.1. But

Le lait ne doit pas contenir de résidus d'antibiotiques ni de sulfamides pour plusieurs raisons :

1. Certaines de ces substances sont néfastes à la santé du consommateur. Un lait contenant de faibles quantités de pénicilline peut par exemple provoquer des réactions allergiques,

modifier la flores saprophytes du lait ou sélectionner des souches résistantes. (Heeschen et Suhren, 1996)

2. De faibles concentrations d'inhibiteurs, tels que les antibiotiques, rendent très difficiles la fabrication de fromages et de yaourts. (Leliiogne et *al.*,1952 ;Jacquet et Steeg,1953)

3. Pour toutes ces raisons, la loi interdit la vente de lait contenant des antibiotiques.

7.2 Principe

La technique utilisée est celle de diffusion sur gélose comme pour l'antibiogramme.

Une souche sensible est ensemencée dans un milieu pour antibiogramme coulé en boîte de Petri. Sur cette gélose, des disques imprégnés d'antibiotiques ou de lait à examiner sont déposés . Après incubation, une zone d'inhibition apparait autour du disque contenant un antibiotique en quantité suffisante pour être actif sur la souche.

7.3 Technique officielle

- Introduire 1ml de culture jeune de la bactérie sensible (*Bacillus stearothermophilus*) au fond d'une boîte de Petri
- Couler par-dessus 5cm³ de milieu spécial (Muller Hinton , annexe4)
- Déposer les disques de lait et les disques témoins
- Incuber 2heurs et 30minute à 55°C , les boîte en position retournée. (Dopter, 1956 ; Dopter,1960)

7.4 Lecture

Observer s'il y a une zone d'inhibition autour des disques de lait et autour des disques témoins ,il est nécessaire de toujours confirmer les conclusions

➤ Exemple de résultats (figure13)

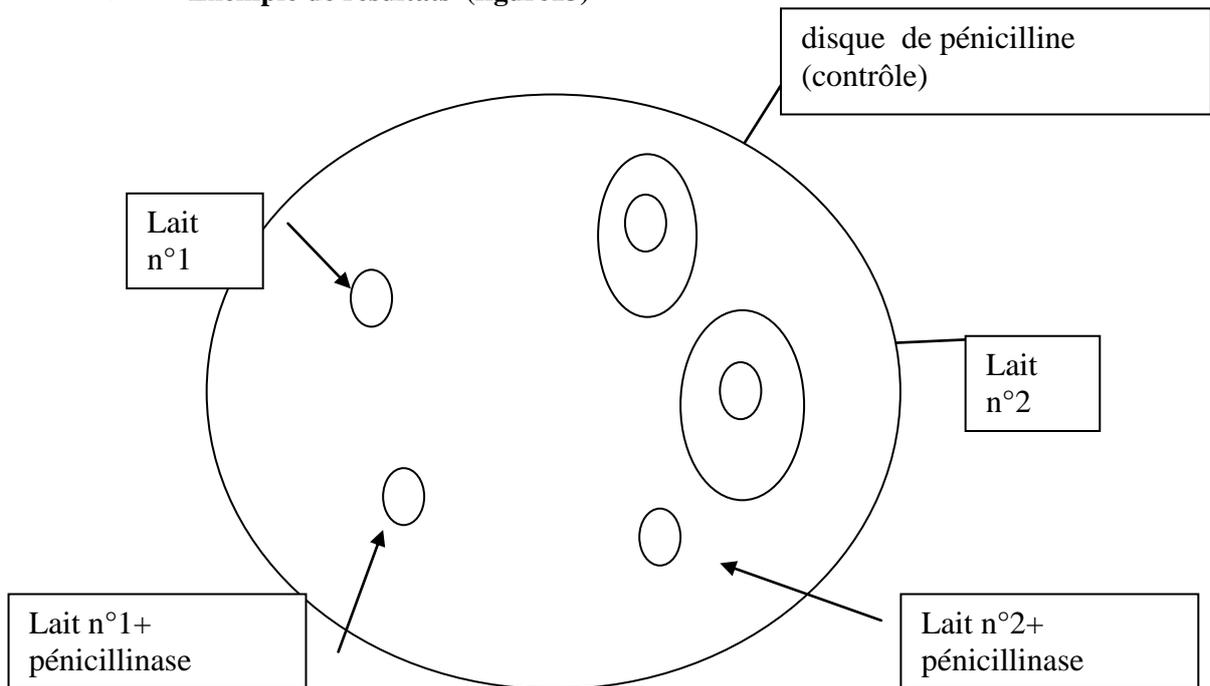


Figure 13: Exemples de résultats de la recherche des antibiotiques dans le lait cru

➤ Conclusion :

- Le lait n°1 ne contient pas d'antibiotique actif sur la souche test
- Le lait n°2 contient comme seul antibactérien actif sur la souche testée, de la pénicilline

- Un troisième résultat serait possible : persistance de l'anneau d'inhibition autour de disque avec pénicilline, il faudrait alors conclure à la présence d'un agent antibactérien non inactivé par la pénicilline ou mélange d'antiseptique (Pien *et al.*, 1953)

Remarque : il est possible d'utiliser une souche de *Micrococcus luteus* avec une incubation de 48 heures (temps optimal de croissance)

- **Autres méthodes**

Des méthodes rapides sont également utilisées pour détecter la présence ou non d'antibiotiques dans le lait : DELVOTEST, qui est un **test microbiologique**.

Il permet de détecter la présence d'antibiotique grâce à une souche bactérienne (*Bacillus stearothermophilus*) qui est inhibée en cas de présence d'un antibiotique dans le lait testé. (Reybroeck, 2013)

Il peut-être utilisé pour le contrôle de tank douteux avant livraison par le producteur.

➤ **Exemple**

DELVOTEST se présente **sous forme d'ampoules** qui contiennent un milieu de culture et des spores de *Bacillus stearothermophilus* (figure14). En présence de lait qui apporte des nutriments aux bactéries et après incubation (la température optimale de multiplication de ce germe est 64°C) les bactéries peuvent germer et se multiplier. Seule la présence de résidus d'antibiotiques dans le lait empêche cette multiplication.



Figure14 : Méthode DELVOTEST

(<http://veterinairesdeleulne.chezmonveto.com/dans-le-lait-5769>)

1.5.3 Contrôle de lait pasteurisé livré à la consommation

1.5.3.1 Le test de la phosphatase (Camus et Alifax, 1975)

Consiste à déterminer l'efficacité du chauffage. Il constitue le test clé du contrôle sanitaire du lait pasteurisé.

➤ **Principe :**

La phosphatase est présente dans le lait cru, elle est inactivée par un traitement thermique de plusieurs min (10min) à 60°C. Cette méthode permet non seulement d'apprécier la qualité du traitement thermique mais aussi de détecter un mélange avec du lait cru. Pour rechercher cette activité, il suffit d'ajouter un substrat incolore qui, après action de l'enzyme, donne un produit coloré. Comme toute activité enzymatique, il est utile de fixer le pH par une solution tampon.

Le réactif utilisé est le 4-nitrophényl phosphate disodique (para-nitro-phényl-phosphate disodique)

➤ **La réaction catalysée est :**

4-nitro-phényl phosphate (**incolore**) + l'eau → 4-nitro-phénol (**jaune**) + hydrogénophosphate

➤ **Technique**

- Réactif 4-nitro-phényl phosphate disodique : 0,15g

- Tampon pH7(

- Mettre dans deux tubes A et B, 5cm³ de réactif, boucher les deux tubes et les porter 2min à 37°C (préchauffage)

- Dans le tube A, 1 cm³ de lait à examiner

- Dans le tube B, 1 cm³ de lait à examiner bouilli (le tube B servira de témoin)

- Mélanger puis étuver. La lecture est réalisée après 30 minutes et après 2 heures.

➤ **Lecture**

L'intensité de la réaction est notée par l'intensité de la coloration. Celle-ci est mesurée par un appareil qui est le comparateur de Lovibond

➤ **Interprétation**

Tableau VI: Interprétation des résultats obtenus par le comparateur de Lovibond pour le test de la phosphatase

Lecture après 30min	Lecture après 2heurs	interprétation
0 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	0 à 10 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	Absence de phosphatase
43 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	72 à 130 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	Réaction douteuse
72 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	Plus de 180 $\mu\text{mol.dm}^{-3}$	Présence de phosphatase

2. Epreuve de filtration (Thieulin, 1944)

3 Dénombrement des germes totaux par culture à 30 C° sur milieu gélosé au lait écrémé (dilution jusqu'à 10^{-3}) (JORA n°70 ,2004) .

4. Colimétrie par culture à 37 °C sur gélose au désoxycholate lactose (dilution jusqu'à 10^{-3}).

5. Recherche des pathogènes exceptionnels

1.5.4 Normes Sanitaires (JORA, 1913)

Sont considérés impropres à la consommation humaine les lait :

- Provenant d'animaux malades
- Contenant du colostrum
- Contenant des antibiotiques ou antiseptiques
- Coagulent à l'ébullition
- Ne satisfaisant pas aux épreuves de dénombrement cellulaire

➤ **Lait cru à la production**

- Doit provenir d'animaux sains
- Doit être propre et exempt d'antibiotiques et germes pathogènes
- Aspect et odeur normaux
- Epreuve de filtration négative

- Epreuve d'ébullition négative
- Acidité Dornic $\leq 21^{\circ}\text{D}$
- Colimétrie < 100 coliformes /ml
- Clostridium sulfito-réducteurs < 50 germes/ml
- Flore totale $\leq 3 \cdot 10^4$ germes/ml

➤ **Lait cru à la vente**

- Absence de bacilles tuberculeux
- Provenance d'étables contrôlées patentées
- Temps de décoloration du bleu de méthylène après au moins 3 heures
- Pas d'*Escherichia coli* ni de staphylocoque enterotoxique dans 0,1 ml de lait

➤ **Lait Pasteurisé en vrac**

- Epreuve de phosphatase négative
- Epreuve de filtration négative
- Exempt de pathogène
- Flore totale $< 3 \cdot 10^5$ germes /ml et 10^5 /ml à la sortie de l'usine

➤ **Lait Pasteurisé conditionné**

- Epreuve de phosphatase négative
- Epreuve de filtration négative
- Exempt de pathogène
- Flore totale $< 3 \cdot 10^4$ germes /ml
- Colimétrie < 10 germes /ml (\leq germes /ml immédiatement après traitement)

2. Contrôle Microbiologique de la Viande Fraiche

2.1 Introduction

La viande est le produit de transformation du muscle après la mort de l'animal. Elle est traditionnellement considérée comme le véhicule de nombreuses maladies d'origine alimentaire chez l'homme à cause des défauts d'hygiène (Dennaï et *al.*, 2001 ; Fosse et *al.*, 2006). Elle est une denrée alimentaire hautement périssable et dont la qualité hygiénique dépend, d'une part de la contamination pendant les opérations d'abattage et de découpe et d'autre part, du développement et de la croissance des flores contaminantes pendant le refroidissement, le stockage et la distribution (Dennaï et *al.*, 2001 ; El Hadeff et *al.*, 2005). Si de nombreux travaux ont été réalisés sur la qualité hygiénique de la viande dans la plupart des continents (Collobert et *al.*, 2007 ; Herau et *al.*, 2007), peu de travaux sont répertoriés dans les pays de l'Afrique Subsaharienne (Wade, 1992).

2.2.1 Définition de la viande

L'arrêté du 3 mars 1981 (JORA du 25.3.1981) , définit la viande comme « toutes les parties des animaux de boucheries et de volailles susceptibles d'être livrées au public en vue de la consommation ». La composition phyco-chimique de la viande rend cette denrée alimentaire hautement périssable (Tableau VII).

Tableau VII : Teneur moyenne des différents composants de la viande (El Hadeff et *al.*, 2005)

constituant	Teneur moyenne (%)
- L'eau	71
- Proteines :(sacroplasmique, myofibrillaires, tissu conjonctif)	21
- Lipides	7
- Glucides (glycogène, glucose, acide lactique)	Traces
- Substance azotées non protéique (phosphocréatine nucléotides,ATP,ADP,peptides,acides aminés libres,...ect)	1 0,2
- Composés minéraux (P, Fe , oligoéléments).	

2.2. Les caractéristiques microbiologiques de la viande

La viande livrée à la consommation provient des animaux divers comme les ovins, les caprins, les porcins et les chevaux. (El Hadeff et *al.*, 2005).

La chair d'un animal sain est stérile. La viande d'un animal malade se contamine directement par le système hépatique. Elle peut alors contenir des germes pathogènes étiologiques de l'infection que l'animal a contracté ; ces germes sont le plus pathogènes pour l'homme. (Dennaï et *al.*, 2001 ; El Hadeff et *al.*, 2005).

La viande, même si elle provient d'un animal exempt de toute maladie, se contamine au moment de l'abattage à partir des flores intestinales, cutanée et des muqueuses. La viande se contamine aussi par des germes extérieurs à l'animal au cours du stockage, des manipulations et de lavage. Les germes sont dans ce cas apportés par l'air, le sol, les manipulateurs, l'eau et le matériel de découpe et de préparation. (Collobert et *al.*, 2007).

Globalement, la viande peut apporter des germes :

- **Pathogène :** incluant des bactéries (*Salmonella*, *Brucella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Bacillus anthracis* [maladie du charbon], *Pasteurella tularensis* [la tularémie :infection transmise par les rangers comme le lièvre surtout à des chasseur , *Clostridium botulinum*], des protozoaires.(*Toxoplasma gondii* [viande de porc] et des parasites (cestode) comme les agents du Ténia , les nématodes comme les agents de la trichinoses (*Trichinella spiralis*) qui se trouve généralement dans la viande de porc.(Fosse et *al.*, 2006)

- **Les germes d'altérations:** incluant des bactéries entériques nom pathogène comme les coliformes, les streptocoques fécaux, des bactéries sporulées comme les *Bacillus*, les levures, des moisissures et les bactéries du genre *Pseudomonas*. (Fosse et *al.*, 2006)

2.3 Evolution de la dégradation du produit

La viande crue possède une structure compacte. Toutefois, sous l'action de ses propres enzymes, elle subit un mûrissement qui engendre son attendrissement du fait de sa structure. Cette modification permet alors aux germes contaminants de se développer facilement (Phillips et *al.*, 2001).

L'invasion des tissus par les germes dépend de plusieurs facteurs (Guiraud,1998) :

- L'état de santé et de fatigue de l'animal ;
- La charge microbienne de l'animal, surtout de ses intestins ;
- La méthode de mort et d'équarrissage ;
- Les conditions d'entreposage de la viande ;

Du fait que la viande est normalement stockée à basse température, ce sont surtout les germes psychrophiles comme les *Pseudomonas* qui causent l'altération du produit. La détérioration peut se traduire par une viscosité remarquable, apparition de pigmentations parasites et modification des caractères organoleptiques .comme le rancissement des graisses. (Bauchart et Aurousseau, 1993)

1.4 Prélèvement des échantillons

1.4.1 Echantillonnage : le prélèvement pour un examen microbiologique des viandes fraîches est réalisé dans les cas suivants :

- Examen macroscopique douteux
- Présomption d'une infection
- Infection de l'appareil digestif ou génital
- Abattage d'urgence

Dans ces cas, il faut prélever obligatoirement un fragment de muscle, la rate, des ganglions lymphatiques, des articulations, des lambeaux des surfaces, un rein et facultativement un os long.

Au niveau de la distribution, pour un contrôle microbiologique, l'échantillon de la viande crue consiste en un prélèvement de 100 g de viande hachée ou de 2 steaks (2 unités).

2.4 Techniques de prélèvement

Le prélèvement à partir d'un muscle est réalisé par plusieurs techniques :

2.4.1 Prélèvement d'un bloc de viande

Il consiste en un cube de viande de 10cm de côté prélevé dans une masse musculaire compte et homogène à l'aide couteau ou scalpel stérile.

L'échantillon est alors placé immédiatement dans un emballage stérile. (ISO 17604 (2003)

2.4.2 Prélèvement au mycétome

La surface du morceau de viande est préalablement cautérisée. Le mycétome (un frocard de gros calibre) stérile et alors enfoncé perpendiculairement sur 10cm, incliné de 45 ° à droite, enfoncé de 1cm, incliné de 45 ° à gauche enfoncé de 1cm, puis retiré et remis dans son étuis protecteur. (ISO 17604 ,2003)

2.4.3 Technique du bloc paraffiné

Le cube de viande est plongé dans un bain de paraffine chaude pendant 3 à 5 min juste après le prélèvement. Il est ensuite refroidi sur une toile métallique et enveloppé dans du papier aluminium.

Le paraffinage constitue une protection contre les contaminants ultérieurs. Il évite l'exsudation de la viande et permet de procéder directement à un enrichissement par étuvage.

Le prélèvement de l'os doit être réalisé après l'avoir débarrassé des éléments musculaires et tendineux tout en gardant intact le périoste.

La rate, les ganglions, le rein, tout prélevés sans traitement préalable (cautérisation) . Ils sont prélevés à l'aide de ciseaux stériles et mis dans un emballage stérile. (ISO 17604 , 2003)

2.4.4 Transport

Les produits crus sont placés dans un emballage industriel stérile dans une boîte isotherme si le transfert au labo ne dépasse pas 2 heures. Sinon, ils sont d'abord refroidis en chambre froide puis transporté dans un système réfrigérant permettant de maintenir la température voisine de zéro 0°C.

2.5 Schéma d'analyse d'une viande fraîche

➤ Analyse d'une Viande fraîche.

- Broyage de 30 g de viande avec 90 ml d'eau peptonée tamponnée ou de tryptone – sel. La suspension contient donc 0,25 g de produit /ml.

- Revivification de 1h à température ambiante. - Mise en évidence des coliformes dans 1g de produit. Ensemencer 4 tubes de BL BVB avec cloche avec 4 fois 1 ml de suspension mère et incubation 48 h à 30°C. Un seul tube positif traduit la présence de coliformes (troubles, virage et dégagement gazeux). *Escherichia coli* est caractérisé par le test de Mackenzie conformément à la norme ISO 7251 (ISO, 2005).

- Mise en évidence des Clostridium sulfito-réducteurs par ensemencement de 4 ml de suspension dans des milieux S P S (sulfite polymyxine sulphadiazine) ou TSN (trypticase sulfite néomoxine) en boîte de Petri avec une incubation en anaérobiose 24 h à 37°C. (ISO7937 : 2005)

- Dénombrement de la flore totale dans 1g de viande par ensemencement de 4 boîtes de Petri avec gélose nutritive ordinaire par 4 fois 1ml de la suspension. Incubation 48 h à 37° C . Le nombre total des colonies donne le nombre de germes /g. ISO 4833 :2003.

Les germes ci-après sont recherchés après pré- enrichissement et incubation à 37° C du mélange :

- Recherche des *Salmonella* par ensemencement des gélose SS (*Salmonella-Shigella*) et DC L (Desoxycholate Citrate Lactose) avec 24 h d'incubation à 37°C . ISO 6579, 2002.
- Recherche des staphylocoques pathogènes sur milieu de Baird – Parker 48 h à 37°C par étalement de 0,1 ml au râteau étaleur ISO 6888-1 : 1999.
- Recherche de *Bacillus anthracis* par son aspect morphologique et cultural. Cette dernière est caractérisée par une spore central, une forme bâtonnet, culture en anaérobiose, cellules immobiles, sensible à la pénicilline et incapable de croître à 45°C. (Phillips et *al.*, 2001)

2.5.1 Analyses complémentaires à l'analyse microbiologique

- **Dosage de l'ABVT (Azote Basique Volatil Total) (Guiraud,1998).**

L'ABVT représente les amines volatils et l'ammoniac. La teneur est proportionnelle au niveau de dégradation des protéines.

- **Principe** : les bases volatiles sont déplacées à l'aide d'une base faible (le carbonate de lithium qui n'hydrolyse ni l'urée ni les protéines) et dosée par l'acide sulfurique en présence de l'indicateur colorée après entrainement de la vapeur.

- **Protocole**

Brayer 10 g de produit dans 100ml d'eau distillée et placer le broyat dans un ballon à distillation de 500 ml. Voir Figure15

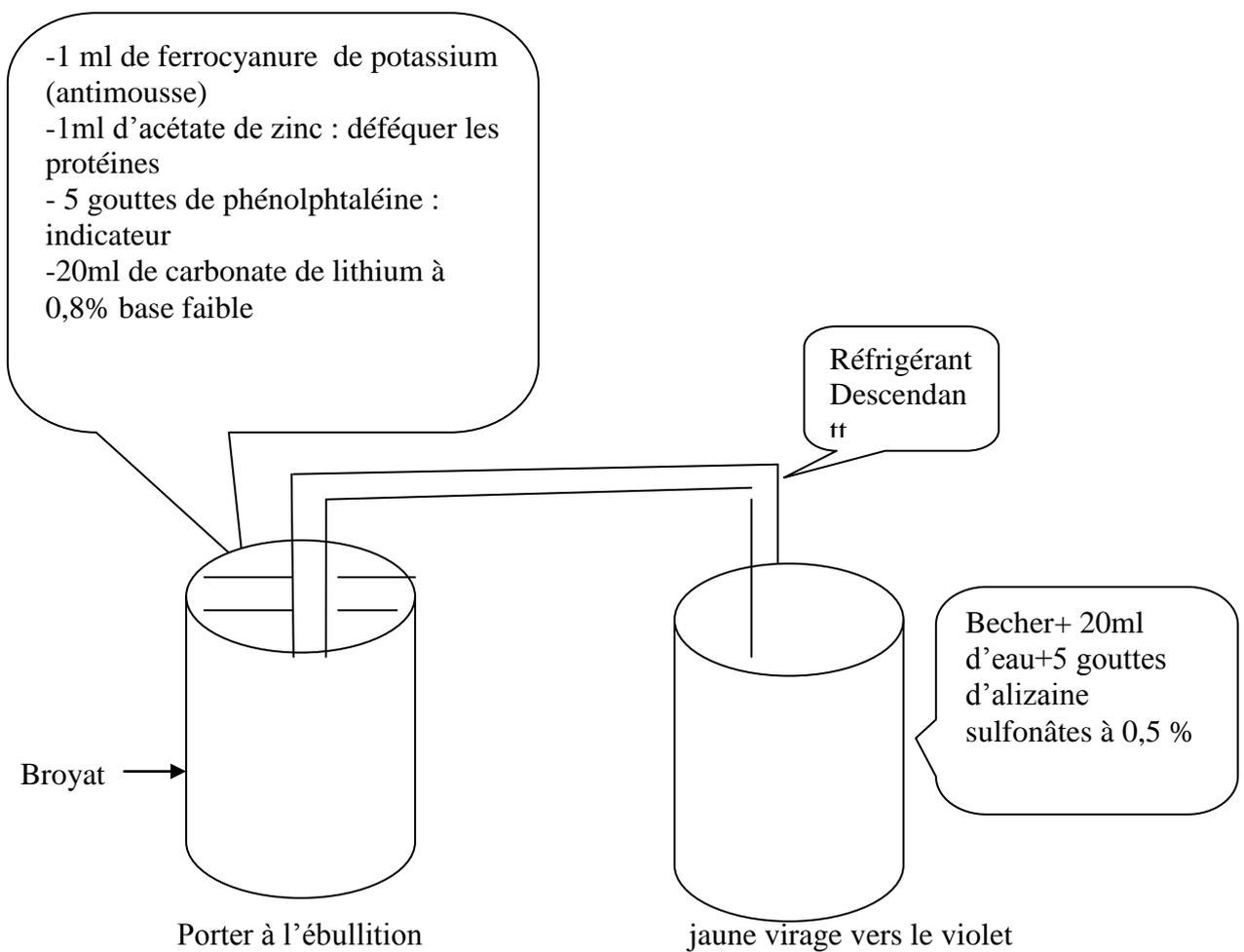


Figure15 : Schéma du dosage de l'ABVT

Après ébullition, les bases volatiles vont se déplacer vers le béccher via le réfrigérant. Leur passage provoque le virage au violet de la solution contenue dans le béccher.

- **Titrage** :

Il est réalisé progressivement avec du H_2SO_4 N/10. Cet acide est ajouté constamment pour ramener la solution à la couleur jaune initiale.

Lorsque la vapeur n'induit plus de virage, le réfrigérant est lavé à l'eau et l'eau de rinçage est versée dans le bêcher pour récupérer les bases volatiles résiduelles dans le réfrigérant.

ABVT (mg d'ammoniac / 100g de viandes) = volume H_2SO_4 N/10 utilisé (ml) x17 (facteur de multiplication).

➤ **Recherche de la cadavérine**

Cette amine non volatile provient de la décarboxylation de lysine sous l'action de nombreux germes putréfiants, le dosage est réalisé de la façon suivante : 10g de produit sont broyés manuellement au mortier en présence de sable ou de billes de verre puis alcalinisés avec 2 à 3 gouttes de soude (N/9), le broyage est poursuivi en présence de 10ml de chloroforme.

Le chloroforme est ensuite recueilli, filtré et additionné de 1ml de réactif à la ninhydrine, la présence de cadavérine est caractérisée par une coloration violette qui apparaît dans les 5 minutes. (Patocka et Kuehn, 2000).

1.5.2 Analyse sanitaire de la viande hachée

La viande hachée est un aliment très périssable. Cette denrée constitue un danger potentiel pour le consommateur du fait qu'elle est souvent consommée insuffisamment cuite et en raison de leur haute teneur en eau et en substances nutritives.

Pour cette raison, des contrôles d'hygiène et de température pendant, le traitement et le pré conditionnement – consistant à garder les outils et équipements propres – sont d'une importance vitale pour minimiser la contamination du produit par les micro-organismes. (Guiraud, 1998)

- **Analyse**

- Broyage de 10g de viande avec 90ml d'eau peptonée tamponnée ou de de typtone – sel revivification de 1heure à température ambiante : chaque ml de suspension contient 0,1g de viande.

- Dénombrement des Clostridiiums sulfito-réducteurs par ensemencement de 1ml en gélose TSN, SPS ou Wilson- Blair. Incubation 24h à 37° C. (ISO7937 : 2005)

- Dénombrement des coliformes et *E. coli* par ensemencement de 1 ml sur gélose au desoxycholate. Incubation pendant 24 h à 37° C et à 44°C respectivement. (ISO7251, 2005).

- Dénombrement des staphylocoques par ensemencement de 0,1ml en surface sur milieu de Baird – Parker par étalement au râteau étaleur . Incubation 48 h à 37°C(ISO 6888-1 , 1999)

- Dénombrement de la flore indologène et putride (indice I+S) : préparer les dilutions jusqu'à 10^{-7} dans l'eau peptonée citratée . incubation pendant 48h à 30° C .
- L'indole (flore indologène est recherchée par le réactif de Kovacs. la présence de l'indole est révélée par la formation d'un anneau rouge quelques secondes seulement après ajout du réactif. (Veillet-Poncet ,1974)

- La flore putride (le dégagement de H₂S) est recherchée par la méthode au papier imprégné d'acétate de plomb. la présence de H₂S est révélée par le noircissement du papier imprégné d'acétate de plomb : (Veillet-Poncet ,1974)

La valeur I+S = nombre de tubes contenant l'indole + nombre de tubes contenant le H₂S.

le nombre de germes est estimé par la méthode de NPP par l'utilisation de la table de Mac Grady (Guiraud, 1998)

- Dénombrement de la flore aérobie mésophile sur PCA et une incubation à 30 ° C.(AFNOR,1999)

- Dénombrement de la flore aérobie psychrophile par l'ensemencement de 1ml en masse dans la gélose PCA suivie de 15 jours d'incubation à 8°C. (Milesi et *al.*, 2008)

1.6 Normes Sanitaires (Brocard et *al.*, 1982 ;Guiraud ,1998. JORA N°27,2006))

➤ **Viande fraîche**

- Absence de germes pathogènes surtout *Salmonella* dans 25g
- Absence de coliformes dans 1g
- Absence de Clostridium sulfito-réducteurs dans 1g
- Flore aérobie totale < 100 germes /g pour la viande fraîchement obtenue est <500 germes / g pour la viande réfrigérée.
- Teneur en ABVT pour 100 g de viande ≤20mg

➤ **Viande hachée**

- Les Clostridium sulfito-réducteurs < 30germes /g.
- Staphylocoques pathogènes <100/g
- *E.coli* <100 germes/g.
- Flore mésophile < 10⁶ germes /g.
- Indice I+S < 6
- Teneur en ABVT pour 100 gramme de viande est < 20mg.

3. Techniques de Contrôle Microbiologique des Conserves.

3.1 Définitions :

Les conserves sont des denrées alimentaires d'origine animale ou végétale, périssables, dont la conservation est assurée par l'usage combiné (Herman, 1992 ; Mougin, 1993) de diverses techniques :

- Conditionnement dans un récipient étanche aux liquides, aux germes et à toute température < 55° C.
- Traitement par la chaleur ou tout autre mode de conservation autorisé par la loi en vigueur. Ce traitement vise la destruction ou l'inhibition totale des enzymes, des microorganismes et de leur toxine dont la présence ou la profération pourrait altérer le produit ou le rendre impropre à la consommation. (Guiraud, 2003)

Les semi-conserves sont des denrées alimentaires d'origine animale ou végétale, périssables,, conditionnées en récipients étanches aux liquides et ayant subi un traitement autorisé pour assurer une conservation plus limitée.

La définition des conserves est ambiguë sur le point de stérilité (détruire ou inhiber totalement). Si les conserves ne doivent contenir aucun germe ; c'est la stérilité biologique. Si les conserves peuvent contenir des germes mais bloqués dans un état qui les rend incapables de croître, de provoquer une altération du produit ou de causer un risque sanitaire, c'est de la stérilité commerciale qu'il s'agit. (Mougin, 1993)

La stérilité biologique est difficile à obtenir sans modifier les qualités organoleptiques de la denrée alimentaire.. (Herman , 1992)

En effet, les conserves ne doivent contenir de pathogènes ni de contaminants. Cependant des spores thermorésistantes peuvent subsister de même que des germes stabilisés par les caractéristiques du milieu comme le pH, la concentration en sel ou

en sucre. En résumé, le plus important est que la conserve ne doit pas contenir des formes végétatives et sporulés de germes pathogènes ou toxigènes ainsi que des microorganismes susceptibles d'altérer le produit dans les conditions de conservation. (Mescle et *al.*, 1996)

La différence entre conserves à stérilité commerciale et « semi-conserve » n'est pas grande, elle réside essentiellement dans les conditions particulières de stockage. (Mescle et *al.*, 1996)

Dans le cas des conserves, leur stabilité est donc régie par la température. Pour cela, les conserves dans les pays tempérés doivent être stable à température 30°C et celles dans les pays tropicaux leur stabilité doit être garantie jusqu'à 55 ° C.

Pour le terme semi-conserve sont désignés les produits alimentaires conditionnés en récipients étanches ayant subi une stabilisation partielle nécessitant un stockage à basse température exemple : les produits de charcuterie en boîtes métalliques ou en emballage en plastiques (stabilité : saumurage + traitement thermique 75° C : Pasteurisation), les anchois (stabilité : sel et l'huile de couverture).(Dellaras, 2007)

En plus de l'emballage (son étanchéité) et la température du traitement thermique et de stockage, les conserves sont aussi régies par le pH du produit, ainsi, on distingue (Guiraud, 2003) :

- **Les conserves à pH acide dont la valeur < 4,6** exemple : les fruits, marinades, choucroute.

La stabilité du produit est assurée par le pH ; il y a une auto-stérilisation. Les germes toxigènes comme *C. botulinum* ne peuvent pas se développer du fait de l'acidité du milieu.

Le traitement thermique appliqué peut être utilisé juste pour détruire les germes acidophiles comme les levures et les bactéries lactiques.

Pour ce type de conserve une stérilité commerciale est suffisante.

- **Les conserves à pH > 4,5** exemple : viande et certains légumes.

Elles sont à craindre car l'acidité du milieu n'assure pas une auto-stérilisation. A cet effet, le traitement thermique doit détruire non seulement les cellules

végétatives mais aussi les spores des bactéries toxigènes. Dans ce cas, une stabilité doit être étudiée de près et la stabilité commerciale doit être sévère. Pour un produit répondant aux normes, le barème de stérilisation, doit être effectué en fonction des facteurs définis (formes de la boîte, le pH, les caractéristiques du produit). Le traitement doit être effectué en autoclave et doit être capable de ramener la population de *C. botulinum* de 10^{12} à 0 germes.

Par ailleurs, il est important de prendre en considération la propreté initiale du produit à stériliser car certaines toxines (comme celles de staphylocoques) sont thermostables et survivent à la stérilisation.(Dellaras, 2007)

La solution est d'éviter la prolifération des germes toxigènes de ce type avant le traitement thermique du produit. L'étanchéité du produit est cruciale pour éviter tout risque de contamination ultérieure du produit..

3.2 Caractéristiques Microbiologiques des conserves

Le traitement appliqué pour la préparation de la conserve permet la sélection d'une flore plus au moins thermorésistante. (Mescle et *al.*, 1996)

➤ **Les causes d'altération des conserves sont :**(Mescle et *al.*, 1996, Dellaras, 2007)

- le traitement thermique insuffisant : ce qui laisse certains contaminants en survie. Dans ce cas on parle de souches thermorésistantes.

- la non conformité du traitement stabilisant : le traitement est toléré par la microflore (des thermorésistants).

- le mauvais sertissage ou perforation de l'emballage ce qui conduit à l'altération rapide de la conserve

- le non respect des conditions de stockage ce qui conduit à prolifération de la flore thermorésistante résiduaire.

➤ **Les altérations des conserves se manifestent par :**

- Bombage ou bris des récipients en raison de la prolifération des germes gazogènes anaérobies producteurs de H_2 , CO_2 ou H_2S .

- Modification du contenu sans bombage : dans ce cas, les qualités organoleptiques et texture du produit sont modifiées. Le plus courant est le flat sour qui est une acidification sans production de gaz.

- Présence de germes ou de toxines sans modification apparente : dans ce cas, le produit est d'apparence normale mais des bactéries toxigènes comme *C. botulinum* produisant leurs toxines ou le produit contient des bactéries pathogènes comme *Salmonella*. (Dubois,2001)

3.3 Techniques de prélèvement.

3.3.3 Echantillonnage (Dellaras ., 2007)

Si la conserve et d'apparence anormale, il suffit de prélever la boîte défectueuse. En revanche pour un contrôle microbiologique de boîtes normales, l'échantillonnage doit être effectué selon les règles statistiques de représentativité du lot (voir chapitreI) et le prélèvement doit être effectué selon le caractère aléatoire. Dans la pratique le nombre d'échantillons est de 1‰ ou de 10 unités peu importe la taille du lot.

Pour une analyse complète, il est préconisé de prélever à partir de chaque lot 2,3 ou 5 boîtes identiques.

Le prélèvement ne nécessite aucune précaution particulière et le transport est aussi effectué dans des conditions normales.

Au laboratoire : l'ouverture doit être effectuée en aseptie.

3.4 Schéma d'analyse (Giraud et Rosec , 2004 ; Joffin et Leyral, 2006) (Annexe3)

3.4.1 Analyse des conserves normales

Prélever au moins 3 boîtes identiques voire même 5 :

- Une boîte est examinée immédiatement ; c'est le témoin
- Une (ou 2 boîtes) est incubée 7 jours à 55 °C puis examinée
- Une (ou 2 boîtes) est incubée 21 jours à 30° C puis examinée.

Pour l'analyse les 3 ou 5 boîtes doivent faire l'objet des examens suivants :

➤ **Examen préliminaire :**

- relever les caractéristiques du produit : nature du contenu, type et forme de l'emballage, étiquetage, inscriptions réglementaires, code et autres .A la fin, les étiquettes sont retirées et les boites marquées.

- Inspecter minutieusement la serti et les joints ainsi que l'aspect général pour noter boite normal, boite flashée ou à bombage déformable, boite bombée ou à bombage indéformable.

- Examiner les fuites pour noter les défauts d'étanchéités.

L'examen préliminaire et pratiqué aussi bien sur la boite témoin que sur les boites incubées.

➤ **Examen microscopique**

Se pratique sur la boite témoin et les boites incubées. Il consiste à examiner un frottis préparé à partir du produit. Dans le cas des produits gras, il faut dégraisser au xylol. .Après coloration de Gram, l'examen microscopique comporte l'examen de la morphologie des germes et le dénombrement dans 20 champs différents puis

calculer : $R = \frac{n}{n_0}$

R= facteur

n= nombre moyen de germes observés dans le produit incubé.

n₀ = nombre moyen de germes observés dans le produit témoin (non incubé)

➤ **Examen macroscopique et organoleptique**

Ils consistent à noter l'aspect, la texture, la couleur et l'odeur du produit sans gouter.

- **Mesure du pH** : Le pH est mesuré après homogénéisation du produit ou en plusieurs endroits s'il est solide. Il est exprimé à 0,1 unité près.(Couvert ., 2002)

- **Démonstration de la stérilité biologique** : se fait en ensemençant pour chaque boite incubée 3 tubes de bouillon DTB (Dextrose Tryptone .Broth ou bouillon glucosé au pourpre de Bromocresol (BCPL) et 3 tubes de milieu Rosenow ou VL avec 72 h d'incubation à 30°C et la même série avec incubation de 72 h 55°C. Les milieux doivent être additionnés de 0,2% d'amidon pour lever la dormance des spores. Le premiers est utilisé pour rechercher les bactéries aérobies

sporulés mésophiles (72h à 30 °C) et Le second est utilisé pour rechercher les bactéries anaérobies sporulés (72h à 30 °C et 48 h à 55 ° C).(Cheftel et al. ;1999)

➤ **Interprétation**

- Si les boîtes incubées montrent des signes d'altérations, il y a lieu d'entreprendre

une série d'analyse pour caractériser le germe en cause.

- Dans le cas des produits acides, l'analyse est complétée par la recherche des lactobacilles (milieu MRS bouillon ou agar), des levures et moisissures sur milieu YM (Yeast Malt) bouillon ou agar (0, 1 ml en surface) et incubation 5 jours à 25°C. (Guiraud, 2004).

- Les pathogènes : *Salmonella* et *Staphylococcus aureus* sont recherchés respectivement sur milieu SS et Baird – Parker. (Delmas et al., 2010)

3.3.2 Analyse des Semi – conserves (Guiraud, 2004).

- Examen préliminaire.
- Examen microscopique.
- Examen macroscopique et organoleptique.
- Mesure du pH.
- Dénombrement de la flore totale mésophile à 30° C sur gélose PCA.
- Recherche des sporulés aéro et anaérobies sur milieu liquide avec traitement thermique et incubation à 30 et 55 ° C.
- Recherche des Salmonelles.

En cas d'altération visible, rechercher l'agent en cause

(ISO 15213,2003)

3.5 Les normes (AFNOR – 1997) applicables aux conserves

➤ **Les conserves**

- Satisfaire au test de stabilité : les conserves destinées aux pays tempérées la stabilité à 30 ° C est suffisante alors que celles destinées aux pays chauds doivent être stables à 30 et 55 °C.

- Absence des germes acidophiles (lactobacille, levures et moisissures)
- Absence de sporulés thermophiles
- Absence de pathogènes (*Salmonella*, *Staphylococcus*)
 - Présence de 1 à 2 germes /g est toléré en ce qui concerne les *Bacillus* inertes (non photogènes, non toxigènes et incapables de se multiplier)
- **Pour les conserves peu acides**, en outre il faut exiger
 - Absence de *Clostridium* toxigènes
 - Absence de toxines
 - Stérilité biologique exigé par certains pays. Dans tous les cas ne pas dépasser 30 bactéries sur 20 champs microscopiques.

Remarque : une conserve donnée est considérée stérile au moins commercialement si :

- Le facteur R < 100 par apport à la boîte témoin
- La différence de pH est < 0,5 unités

➤ **Semi-conserves**

- Absence d'altération de l'emballage et du contenu
- Pas de modifications du pH
- Absence de bactéries pathogènes ou toxigènes et de toxines.
- Flore aérobie et anaérobie inerte < 10⁴ germes /g
- Absence et entérobactéries dans 0,1g.

Conclusion

En l'espace d'une décennie, la méthodologie de l'analyse des risques s'est beaucoup développée en microbiologie. L'appréciation des risques de maladies transmises par les aliments est devenue quantitative.

Il est raisonnable de penser qu'en raison de l'évolution des idées et de la demande de sécurité accrue, un profond remaniement de la finalité de l'analyse microbiologique des produits alimentaires et de l'utilisation des critères microbiologiques est imminent, il est de la responsabilité des microbiologistes spécialisés d'éclairer et d'orienter cette évolution, en aidant les industriels et les hygiénistes dans la prise de décisions parfois lourds de conséquences. Il est également indéniable que l'information, la responsabilisation et l'implication des consommateurs en complément à l'établissement des critères restent encore malheureusement peu investiguées dans le cadre du développement de la sécurité sanitaire des aliments.

Il est à retenir que la fabrication de produits alimentaires sains (conformes) nécessite des contrôles très sévères pour garantir leur qualité microbiologique et leur composition. Ces tests de contrôle microbiologique sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini et permettent par exemple de vérifier :

- La stérilité : aucun micro-organisme ne doit être présent ;
- L'absence de bactéries pathogènes ;
- la non-prolifération d'une bactérie commensale (normalement présente chez l'homme et banale en faible concentration) au-delà d'un certain seuil.

L'environnement de production (air, eau, surfaces) doit être également contrôlé régulièrement par des tests de diagnostic.

En conséquent, le contrôle microbiologique des aliments à un rôle évident à jouer dans la prévention des maladies d'origine alimentaire et éviter des pertes économiques substantielles.

Références bibliographiques

ADJIDÉ Pharm D. et CRESPIER C (2004). Maîtrise du risque infectieux associé aux soins Prélèvements d'air & des surfaces : quand, comment, interprétation et actions correctives. ASPEC CHU Amiens.p :10-15

AFNOR NF 04-282 (1985) .Fromages et fromages fondus, détermination de la matière sèche (méthode de référence). In: Contrôle de la qualité des produits laitiers, analyses physiques et chimiques (S Amariglio, ed). 3e éd Tee & Doc Lavoisier, Paris, 581-585

AFNOR (1996).La métrologie dans l'entreprise, outil de la qualité (ouvrage collectif), éditions, Paris, ([ISBN](#) 2-12-460701-4).

AFNOR (1997). Microbiologie des aliments – Contrôle de la stabilité des produits appertisés – Méthode de référence.

AFNOR (1997). Microbiologie des aliments – Contrôle de la stabilité des produits appertisés – Méthode de routine.,

AFNOR (Association Française de Normalisation). (1999) : Microbiologie alimentaire. Méthodes horizontales. Paris : AFNOR : 663 p.

ANDREWS, W.H. (1996.). International three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. Trend in Food Sci. Technol. **7**:147-151.

BAILLARGEON G. (1984). Méthodes statistiques. édition SMG ,Vol 1. 198p

BAUCHART D., AUROUSSEAU B., (1993) . Digestion et métabolisme des lipides chez le veau de boucherie : conséquences sur la composition en lipides des tissus. VPC, 14(6) : 172-182.

BARUCH DW, MEREDITH P, JENKINS LD, SIMMONS LD (1979) .Starch granules of developing wheat kernels. Gereal Ghem 56, 554-558

BARRETT, T., P. FENG et B. SWAMINATHAN. (1997.). Amplification Methods for Detection of Food borne Pathogens, pp.171-181.

BOGDANOFF W. M.(1934). Une nouvelle méthode de numération directe des microbes du lait (Méthode de Dreyer-Koroleff). *Le Lait*, INRA Editions. 14 (131) :37-48.

BOURGEOIS CM,ET MAFART P (1991). Techniques globales d'évaluation de la microflore. In: *Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire*, vol 3, Le contrôle microbiologique (Bourgeois CM, Leveau JY, eds). Tee & Doc Lavoisier APRIA, Paris, 50-71

BOULANGER P. (2001), American public health association, American water works association and water environment federation, standard methods for the examination of water and wastewater, V O1. n° 903..

BOULEAU N.(1986). *Probabilités de l'ingénieur*. 180p

BROCARD R., DUMONT B L., FROUIN A. JACQUET J R., LEMAIRE J R. et ROSSET R., (1982) . Rapport de la commission « viandes et produits carnés » du CNERNA sur les problèmes de l'hygiène et de la technologie des viandes fraîches. Paris : éd CNRS :331-353.

BORDJAH A.(2001). Analyse physicochimique de lait UHT demi-écrimé.Diplome de Brevet de Technicien Supérieur de contrôle de qualité dans les industries Agroalimentaire. Centre de formation professionnel El-Hidhad.Sétif.77p

BRUGERE H.(2003). Cours sur le lait et les produits .Ecole Nationale Vétérinaire de Toulouse.180p.

LAITIER C.(2011). Microflore du lait cru vers une meilleure connaissance des écosystèmes microbiens de la flore de lait de chèvre. *Industrie d'élevage*.131p

CADY P, DUFOUR SW, SHAW J, KRAEGER SJ.(1978). Electrical impedance measurements: rapid method for detecting and monitoring microorganisms. *J Clin Microbiol*. 7(3):265–272.

CAMUS, R. ET ALIFAX (1951). le test de la phosphatase applique a la recherche ´ de la pasteurisation des laits de fromagerie. *Le Lait*, INRA Editions, , 31 (307) :367-374.

CASTELLANO P, BELFIORE C, FADDA S ET VIGNOLO G (2008). A review of bacteriocinogenic lactic acid bacteria used as bioprotective cultures in fresh meat produced in Argentina *Meat Science* 79 483 Argentina. *Meat Science*. 79:483-499.

CHEMALY RF, HALL GS, KEYS TF, PROCOP GW. (2003) . Evaluation of middle ear fluid in acute otitis media with Gram-stained smear.*Diagn Microbiol Infect Dis*. 46(4):245-8.

CHESWORTH SM, DICKINSON E, SEARLE A, STAINBY G (1985). Properties of oil in water emulsions containing gelatin and caseinate. *Lebensm Wiss u Techno.*18: 230-232

COMELL DG, PALLANSCH MJ (1966). Counting and sizing fat globules electronically. *J Dairy Sci* 49, 1371-1375

COLLOBERT J-F, DOREY F, DIEULEVEUX V. ET QUILLIEN (2002). Qualité bactériologique de surface de carcasses de bovins. *Sciences des aliments.* 22(3) : 327-334.

COLLOBERT J-F, DIEULEVEUX V, THEZE S. ET DOREY F (2007). Évaluation de l'efficacité du nettoyage et de la désinfection d'un atelier de découpe. 21 :24--30.

CHEFTEL J.C., CHEFTEL H. ET BESANÇON P.(1999). Introduction à la biochimie et à la technologie des aliments. Ed. Lavoisier Tec. & Doc : 567p.

COUVERT O.(2002). Prise en compte de l'influence du pH dans l'optimisation des Traitements thermiques. Thèse de Doctorat, Université de Bretagne Occidentale, France : 180p.

Dakar. Thèse de Docteur Vétérinaire, École Inter-état des Sciences et Médecine Vétérinaires de Dakar : 97p.

DASEN A., PITON C., BEUVIER E., GRAPPIN R. (1989). Numération des cellules somatiques du lait cru par la technique DEFT associée à un comptage visuel ou analyse d'image. *Lait.* 69 : 461-477.

DEBLANC HJ, DELAND F, WAGNER HN. (1971). Automated radiometric detection of bacteria in 2,967 blood cultures. *Appl Microbiol.* 22 (5) :846–849.

DELLARAS C. (2007). Microbiologie pratique pour le laboratoire d'analyse ou de contrôle sanitaire. Ed. Lavoisier Tec & Doc. 276p.

DELMAS G., Jourdan da Silva N., Pihier N., Weill F.X., Vaillant V. et de Valk H.(2010). Les toxi-infections alimentaires collectives en France entre 2006 et 2008. *Bulletin Epidémiologique Hebdomadaire.* (31-32) : 344-348.

DENNAÏ N, KHARRATTIB B. ET EL YACHIOUIM A.(2001). Appréciation de la qualité microbiologique des carcasses de bovins fraîchement abattus. *Annales de Médecine Vétérinaire.* 145 : 270-274.

DELUYKER H.A. (1991). Milk yield fluctuations associated with mastitis. *Rijksuniversit Gent* : 207-216.

DOPTER P. (1956). La recherche d'antibiotiques seuls ou associés dans le lait. G. R. Ac. Agric. 42 :519-522.

DOPTER P. (1960). Essais de dosage d'antibiotiques dans le lait. Le Lait, INRA Editions. 40 (393-394) :151-158.

DORNER W. (1968) La durée de la décoloration à l'épreuve de la réductase est-elle fonction de la teneur bactérienne du lait?. Lait. 48 : 31-42

DRIEHUIS F, TEERNSTRA EJM (1992). Method for turbidimetric estimation of lactic acid bacteria in fat-containing milk. Neth Milk Dairy J. 46: 209-215

DIJKMAN A.J., SCHIPPER C.J., BOUY C.J., POSTHUMUS G. (1969). The estimation of the number of cells in farm milk. Ned. Melk Zuiveltijdschr. 23 :168-181.

DUBOIS X. (2001) .La Révolution sardinière. Pêcheurs et conservateurs en Bretagne au XIX^e siècle, Presses Universitaires de Rennes
DUBOIS X. (2001) .La Révolution sardinière. Pêcheurs et conservateurs en Bretagne au XIX^e siècle, Presses Universitaires de Rennes

DZIEZAK, J.D. (1987).. Rapid methods for microbiological analysis of foods. Food Technol. 41(7):56-73.

ENGEL (1990). Les certitudes du hasard ALEAS. Tome 1, Edition CEDIC. 260p
Enjin Anders. Zaharieva, Emanuela E., Frank Dominic D, Mansourian Suzan ., Suh

ERNOUL R(2005). Gestion pratique des contrôles dans l'industrie, publié par l'Afnor dans « certification ISO 9000 » ,

EL HADEF EL, OKKI S, ELGROUD R, KENANA H. ET QUESSY S.(2005). Evaluation de la contamination superficielle des carcasses bovines et ovines provenant de l'abattoir municipal de Constantine en Algérie.10 :10-14.

FAO/OMS (2006). Manuel de bonnes pratiques pour l'industrie de la viande, Rome, 45p.

FELDSINE, P.T., FORGEY, R.L., FALBO-NELSON M.T ET BRUNELLE S.. (1997). *Escherichia coli* O157:H7 Visual Immunoprecipitation assay: a comparative validation study. J. AOAC 80:43-48.

FENG, P. (1992). Commercial assay systems for detecting foodborne *Salmonella*: a review. J. Food Prot. 55:927-934.

FENG. P. (1996). Emergence of rapid methods for identifying microbial pathogens in foods. J. Assoc. Off. Ana

FEINBERG M. (1996). La validation des méthodes d'analyse : une approche chimométrique de l'assurance qualité au laboratoire. Masson : Paris, 397 p.

FENNEL H.,(1972). A single tube confirmatory test For *E. coli* at 44" C. Proc. Soc. Wat. 21 : 13-20.

FEROOZ J. (2010) « Morphological analysis of the sheathed flagellum of *Brucella melitensis*. », *BMC Research Notes*, (3):12-33

FOSCHINI A. (1949). Sur la détermination de l'acidité titrable du lait. Le Lait, INRA Editions. 949 (285- 286) :225-231.

FOSSE J. ET MARGAS C. (2004). Dangers biologiques et consommation des viandes.
Edition Lavoisier, Paris : 220p.

FOSSE J, CAPPELIER J-M, LAROCHE M, FRADIN N, GIRAUDET K. ET MAGRAS C.(2006). Viandes bovines: une analyse des dangers biologiques pour le consommateur appliquée à l'abattoir. Rencontre Recherche Ruminants .13: 411-414.

GAS W. SIGRIST, WASSER, ABWASSER (1976) . "Stray light in turbidity measurements" . Notices techniques de turbidimètres .Ed N° 5 éditée par l'Association Suisse de l'eau et du gaz.

GAUTIER B. (1984) Projet de norme sur la mesure de l'indice de turbidité dans les boissons spiritueuse.

GIARD V. (1995).Statistique appliquée à la gestion Economique. p : 12-45

GINN RE, THOMPSON DR, PACKARD VS (1977) .Collaborative study of the Coulter counter-chemical method for counting somatic cells in raw milk. J Food Prot .40 : 456-458

Guéguen M (1984). Contribution à la connaissance de *Geotrichum candidum* et notamment de sa variabilité. Conséquences pour l'industrie fromagère. Thèse de Doctorat d'état ès sciences, Université de Caen, France. 471 p

GUINGAMP MF, HUMBERT G, CHOUKRI A, LINDEN G (1989). La transparation du lait et des produits laitiers. Tech Lait 1036 : 35-39

GUIRAUD J. ET GALZY P. (1980). L'examen au microscope. Partie 1 Techniques générales de la microbiologie. In: L'analyse microbiologique dans les industries alimentaires. Éditions de l'usine nouvelle, Paris, Collection Génie alimentaire.

GUIRAUD J.P.(1998). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod : 576p.

GUIRAUD J.P.(2003). Microbiologie alimentaire. Ed. Dunod : 651p.

GUIRAUD J.P ET ROSEC J.P.(2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. Ed. AFNOR. 298p.

GRAPPIN R.et JEUNET R. (1971). Essais de l'appareil « Compteur Coulter » utilisé pour la détermination du nombre de cellules totales des laits de troupeaux. Lait. 51 : 273-293.

GIRARD J P., DENOYER C., MAILLARD T. (1988) : Le Hachage grossier, la restructuration des pâtes fines. In : Tech de la Viande et des Produits Carnés, Paris , édition Tec et doc. Lavoisier,350p

GRAPPIN R. et JEUNET R. (1973). Essai d'une chaîne automatique de numération des cellules du lait utilisant le « Compteur Coulter ». Rev. Lait. 313 : 737- 747.

Greg S.B, Gallio Marco et. Stensmyr, Marcus C .« Humidity(2016) Sensing in Drosophila », Current Biology. [03.049](#):15-60

HADLEY WK, WALDMAN F, FULWYLER M (1985). Rapid microbiological analysis by low cytometry. In : Instrumental methods for rapid microbiological analysis (Nelson W, ed). Elsevier, New-York : 67-89

HEESCHEN W.H. et SUHREN G. (1996). Principles of and practical experiences with an integrated system for the detection of antimicrobials in milk. Milchwissenschaft. 51(3) : 154-160

HERMAN E. (1992), L'appertisation, thèse de Doctorat, Université de Lille 2 :200p

HUMBERT G, DESNOUVEAUX R. ET LINDEN G. (1982). Applications de la dissolution totale des éléments colloïdaux du lait à la détermination de son activité protéasique. Lait 62 : 427-434

ISO 13720 (1995). Viande et produits à base de viande. Dénombrement des *Pseudomonas* spp. : 8p.

ISO 6888-1 (1999). Microbiologie des aliments -Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive (*Staphylococcus aureus* et autres espèces) : 11p.

ISO 9001(2000) Système de management de la qualité – Exigences.

ISO 6579(2002). Méthode horizontale pour la recherche des *Salmonella* spp. V08-013 : 1-26.

ISO 4833 (2003). Méthode horizontales pour le dénombrement des micro-organismes. V08- 011 :1-9.

ISO 21528-2 (2004). Méthode horizontales pour la recherche et le dénombrement de Enterobacteriaceae. 08(039-2) :1-10

ISO 6887-2 (2004). Préparation des échantillons, de la suspension mère et des dilutions décimales en vue de l'examen microbiologique. 08(010-2) : 16p.

ISO 7251 (2005). Microbiologie des aliments. Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement d'*Escherichia coli* présumés. Troisième édition : 13p.

ISO7937 (2005). Microbiologie des aliments-Méthode horizontale pour le dénombrement des *Clostridium perfringens* : 16p.

JACQUET J. et STEEG. (1953)Méthode microbiologique de diagnose et de titrage des antibiotiques dans le lait et les produits laitiers. Ann. Fals. 46 : 5-14.

JOFFIN J.N. ET LEYRAL G.(2006). Microbiologie technique, Tome 2: Documentation Technique, Collection Biologie Technique. Ed. Doin, CRDP Aquitaine : 363p

JORA(1993). Arrêté interministériel de 18 aout 199 –relation spécification et à la présentation de certains laits de consommation :16-20.

JORA(1998). Arrêté interministériel de 24 janvier 199 modifiant et complétant l'arrêté de 23juillet 1994 relatif aux spécifications microbiologiques de certaines denrées alimentaires :7-25

JORA N° 43 du 4 juillet 2004-rendant obligatoire une méthode de recherche des coliformes dans les laits fermentés.

JORA N° 70 du 7 novembre 2004-rendant obligatoire une méthode de préparation des échantions pour l'essai et les dillutions en vue de l'examen microbiologique .

JORA N° 32 du 23 mars 2004-rendant obligatoire une méthode de dénombrement des mico-organismes microbiens pour le lait fermenté.

JORA N° 42 du 15juin 2005-rendant obligatoire une méthode de recherche des *Salmonella* dans le lait et les produits laitiers.

KANASAKI M, BREHENY S, HILLIER AJ, JAGO GR (1975). Effect of temperature on the growth and acid production of lactic acid bacteria: A rapid method for estimation of bacterial populations in milk. Aust J Dairy Techno. 30 : 142-144

KENDALL ET SMITH B.(1962). table tirée de Christian Labrousse, Statistique, Tome2, Dunod, Paris,

KENDAL M.G. et STUART A.S.(1990). The advanced theory of statistics. Edition GRIFFIN , Vol 1.342p

KOUOMEGNE R, BRACQUART P et Linden G (1984). Application d'un réactif de transparisation du lait au dénombrement de bactéries. Lait 64 : 418-435

KUBITSCHKE HE, FRISKE JA (1986). Determination of bacterial cell volume with the "Coulter" counter. J Bacterio.168:1466-1467

KURMANN J. A.(1966). L'épreuve de la réductase au bleu de méthylène, un test d'activité simple pour la préparation et l'analyse des levains de streptocoques lactiques dans la fabrication des fromages. Le Lait, INRA Editions. 46 (457) :395-405.

LEE SS, ROBINSON FM ET WANG HY (1981). Rapid determination of yeast viability. Biotechnol Bioeng Symp. 11:641-649

LENOIR J, LAMBERET G, SCHMIDT JL, TOURNEUR C (1985). La maîtrise du bioréacteurfromage. Biofutur. 41 : 23-50

LEHIOIGNE, SANCHEZ G.et GIRARD H. (1952). Caractérisation de la pénicilline et de la streptomycine dans le lait. G. R. Ac. Agric.(39) : 608p.

LERAY O., TROSSAT P.H.(1996). Calibration and quality control of automatic somatic cell counters using recombined milk samples.: 197-200.

LERAY O. et TROSSAT P.H.(2008). Calibration and quality control of automatic somatic cell counters using recombined milk. institut de l'élevage et Maladie des bovins. France Agricole ,Paris: 800 p

LOPEZ-GONI ET'CALLAGHAN D O (2012). *Brucella*: Molecular Microbiology and Genomics. [Caister Academic Press](#) (ISBN 978-1-904455-93-6)

LINDEN G, HUMBERT G, KOUOMEGNE R ET GUINGAMP MF (1987) Réactif pour rendre transparent des milieux biologiques et ses applications analytiques. European Patent Application 0246978.

MACKENZIE E.F.N., TAYLOR E.N. et GILBERT W.E.(1948) .Recent experiences in the rapid identification of Bacterium coli, type 1. Gen. Microbiol.. 2. 197-204.

MACAULEY DM, GINN RE, PACKARD VS (1976). Experience in adaptation and comparative evaluation of the Coulter counter and direct microscopic somatic cell

count (DMSCC) method for determining somatic cell counts in milk. *J Milk Food Technol.*39:250-252

MARTINS SB, SELBY MJ. (1980). Evaluation of a rapid method for the quantitative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Appl Environ Microbiol.* 39(3):518–524.

Mescle J.F., Zucca J. & Bourgeois C.M.(1996). *Microbiologie Alimentaire, Tome 1. Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité des aliments.* Ed. Lavoisier Tec & Doc. 658p

MOUGIN P.(1930). *La fabrication familiale de toutes les conserves et confitures à la portée de tous, 4^e édition.*280p

Miozzari GF, Niederberger P et Hutter R (1978) Permeabilization of microorganisms by Triton X100. *Anal Biochem.* 90: 220-233

MILESI S, SONCIN S, CHIESA LM, CANTONI C (2008). A study on the shelf life of frozen vacuum packaged Argentine meat. *Engineering Food* : 19-23.

MITCHELL W.R., NEWBOULD F.H.S., PLATONOW L.(2007). Electronic and microscopy counts on bulk-milk samples. Ministère de l'Agriculture et du Développement Rural Direction des Services statistiques . *Vet. Rec.*. 81:298-299.

NAGATA K, MINO H, YOSHIDA S.RINSHO BYORI. (2010). Microbiology of liver abscesses and the predictive value of abscess gram stain and associated blood cultures. *58(5):490-7.*

NOTERMANS S, HEUVELMAN CJ, BEUMER RR, MAS R (1986). Immunological detection of moulds in food: relation between antigen production and growth. *Int J Food Microbiol.*3:253-261

Norme NF T 90 - 033 -(1971) . Standards Methods for the examination of water and wastewater 13^{ème} édition -

OGER C. et LECLERC H.,(1977) . Essai de nouveaux tests «haute température» pour la mise en évidence des coliformes fécaux ou des *E. coli* dans les eaux. *Microbia.* 3(1): 47-55.

OĞUZ F, UNÜVAR E, DÜNDAR G. (2002). Essai des eaux. Mesure de l'indice de diffusion, dite mesure de la turbidité. *Pediatr Infect Dis J.* .21(10):986-7.

PAAPE M.J., LILLIUS E.M., WIITANEN P.A., KONTIO M.P. (1996) Intramammary defense against infections induced by *Escherichia coli* in cows. *Am. J. Vet. Res.*:57,477-482.

PASQUIER A.(1969). Eléments de calcul des probabilités et de théories des sondages. Dunod économie .290p

PATOCKA J, KUEHN GD.(2000) . "Natural polyamines and their biological consequence in mammals." Acta medica, , 43(4):119-124,

PEARSON J.K.L., WRIGHT C.L. GREER D.O. (1970).A study of methods for estimating the cell content of bulk-milk. J. Dairy Res..37: 467-80.

PHILLIPS D, SUMNER J, ALEXANDER J. ET DUTTON K(2001). Microbiological quality of Australian beef. Journal of Food Protection. 64: 692–696.

POFFÉ R. WECKX M. et SIMONART P. (1968). Epreuve au bleu de méthylène et qualité bactériologique du lait. Dairy-journal :471-4723

PITON C (1988). Évolution de la flore microbienne de surface de gruyère de Comté au cours de l'affinage. Lait 68 :419-434

PRESCOTT S.C.et BREED R.S. (1910) . The determination of the member of body cells in milk by a direct method. J. Infect. Dis. 7: 632 -640.

PUGSLEY A.P., EVISON L.M. et HAMES A.(1973). A simple technique for the différenciation of *E. coli* in water examination. Water Research. 7. : 1431-1437

PIEN J. (1945). «Le contrôle de la pasteurisation du lait et de la crème». Le Lait ; Dairy Science and Technology : 311-320

PIEN J., LIGNAC J., CLAUDE P.(1953). Détection biologique des antiseptiques et des antibiotiques dans le lait. Le Lait.33 :369-382.

PIEN J. (1971). Définition et contrôle du lait stérilisé. Le Lait, INRA Editions. 51 (503 504) :176-202.

QUINN JP, PATTON AM, MARCHANT R (1981) .Sporulation of *Geotrichum candidum* in submerged culture. Trans Br Mycol Soc .77: 627-635

RAUBERTAS R.F. et SHOOK G.E. (1982). Relationship between lactation measures of somatic cell concentration and milk yield. J. Dairy Sci. 65: 419-425.

READ R.B.Jr, REYERS A.L. et BRADSHAW J. G., PEELER J.T. (1969). Evaluation of seven procedures for detection of abnormal milk due to Mastitis. J. Dairy Sci. 52 : 1359-1367.

RIOLLET C., RAINARD P. et POUTREL B. (1999). Cinétique de recrutement cellulaire et de multiplication bactérienne après infection, cellules somatiques du lait. journées nationales GTVINRA : Nantes :184.

RUPP R. ET BOICHARD D. Evaluation génétique des bovins laitiers sur les comptages de cellules somatiques pour l'amélioration de la résistance aux mammites. In : proceedings des 4e rencontres autour des recherches sur les ruminants, Paris, France, 4 et 5 décembre 1997, 1997, 211-214.

RYAN KJ ET RAY CG (2004., Sherris Medical Microbiology, McGraw Hill, 4^e éd. :280-350

SAUCEDO-CASTENEDA G, LONSANE BK, KRISHNAIAH MM, NAVARRO JM, ROUSSOS S (1992). Maintenance of heat and water balances as a scale-up criterion for the production of ethanol by *Schwanniomyces castellii*. *Process Biotechnol.*27:97-107

SCHALM O.W. et NOORLANDER S. (1957). Experiments and observations leading to development of the California mastitis test. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* .130, 199-204.

Smith I. (2003) . *Mycobacterium tuberculosis* Pathogenesis and Molecular Determinants of Virulence. [Clin Microbiol Rev.](#) 16 (3): 463–496.

Specter S, Throm R, Strauss R, Friedman H. (1971). Rapid detection of bacterial growth in blood samples by a continuous-monitoring electrical impedance apparatus. *J Clin Microbiol.* 6(5):489–493.

STRUNK DH, TIMMEL BM, ANDREASEN AA (1976) .Alcoholic beverages: Clarily evaluation of distilled alcoholic products with a particle counter. *J Assac Off Anal Ghem.*59:671-674

SURAK JG, MATTHEWS RF, WANG V, PADUA HA, HAMILTON RM (1979): Particle size distribution of commercial tomato juices. *Proc Fla State Hart Soc.* 92 : 159-163

SPECTER S, THROM R, STRAUSS R, FRIEDMAN H. (1971). Rapid detection of bacterial growth in blood samples by a continuous-monitoring electrical impedance apparatus. *J Clin Microbiol.* 6(5):489–493.

SILVERMAN MP, MUNOZ EF. (1979). Automated electrical impedance technique for rapid enumeration of fecal coliforms in effluents from sewage treatment plants. *Appl Environ Microbiol.* 37(3):521–526.]

Thieulin G. (1934) . méthode de contrôle hygiénique du lait. *Le Lait*, INRA Editions. (211 213) :.8-21

Vandeville P. (1985). Gestion et contrôlé de la qualité, AFNOR éditions, Paris, ([ISBN 2-12-475-111](#))

Veillet-Poncet L. (1974). La flore bactérienne indologène aéro-anaérobie des laits pasteurisés conditionnés (CAS PARTICULIER D'AEROMONAS). Le Lait, INRA Editions. 54 (537) :409-414.

Wade I. (1992). Contribution à l'Étude de la Qualité bactériologique de la Viande bovine locale au niveau des points de vente de détail et de Consommation de

Wayne V, Peak S (1976). Lemon juice particulates. Some effects of juice processing. J Agric Food Ghem .24: 59-63

YANNEK (2010). Effet des facteurs d'élevages sur la production de lait de vache en régions montagneuse .Mémoire de Magister en Agronomie, Alimentation Animale et Produits Animaux .université de Tizi-Ouzou.83p

ZAFARI Y, MARTIN WJ. (1977). Comparison of the BACTOMETER microbial monitoring system with conventional methods for detection of microorganisms in urine specimens. J Clin Microbiol. **5** (5):545–547.

Annexe 1
Tables DE NOMBRES AU HASARD

EXTRAITS D'UNE TABLE DE NOMBRES AU HASARD (Kendall et Babington, 1962)

02 22 85 19 48 74 55 24 89 69 15 53 00 20 88 48 95 08 85 76 34 51 40 44 62 93 65
99 72 64 09 34 01 13 09 74 00 88 96 79 38 24 77 00 70 91 47 43 43 82 71 67 49 90
64 29 81 85 50 47 36 50 91 19 09 15 98 75 60 58 33 15 94 03 80 04 21 49 54 91 77
85 00 45 68 23 12 94 23 44 42 28 52 73 06 41 37 47 47 31 52 99 89 82 22 81 86 55
09 27 52 72 49 11 30 93 33 29 54 17 54 48 47 42 04 79 54 68 64 07 85 32 05 96 54
79 57 43 96 97 30 72 12 19 25 04 92 29 71 11 64 10 42 23 23 67 01 19 20 58 35 93
28 58 32 91 95 28 42 36 98 59 66 32 15 51 46 63 57 10 64 35 04 62 24 87 44 85 45
68 41 66 19 17 13 09 63 37 61 05 55 88 25 01 15 77 12 90 69 34 36 93 52 39 36 23
98 93 18 93 86 98 99 04 75 28 30 05 12 09 57 35 90 15 61 89 35 47 16 32 20 16 78
52 82 37 26 33 67 42 11 93 94 40 82 18 06 61 54 67 03 66 76 82 90 31 71 90 39 27
54 38 58 65 27 70 93 57 59 00 63 56 18 79 85 52 21 03 63 70 89 23 76 46 97 70 00
62 15 35 97 42 47 54 60 60 61 58 65 62 81 29 69 71 95 53 53 69 20 95 66 60 50 70
51 68 98 15 05 64 43 32 74 07 44 63 52 38 67 59 56 69 59 25 41 48 64 79 62 26 87
86 94 30 43 54 26 98 61 38 85 00 02 24 67 85 88 10 34 01 54 53 23 77 33 11 19 68
01 46 87 56 19 19 19 43 70 25 24 29 48 22 44 81 35 40 42 41 25 10 87 27 77 28 05
90 73 03 95 46 88 82 25 02 03 57 14 03 17 80 47 85 94 49 89 55 10 37 19 50 20 37
18 95 93 40 45 43 04 56 17 03 34 54 83 91 69 02 90 72

Partie de TABLE DE NOMBRES AU HASARD

01581	36001	15892	57621	85239
02972	56177	87580	66794	48123
97022	65380	91304	32853	99729
67583	01277	77815	60558	75920
26935	56306	38710	77239	47139
21201	75983	35695	60517	14579
02628	26124	68322	01436	85994
93635	69404	76323	33459	70041
08984	81320	03226	60959	78246
04415	78662	28295	46513	92889
13070	18401	14382	48262	53177
53531	36891	29620	72532	47368
87733	74995	61843	88472	15736
47619	57452	92819	34401	48782
94060	67951	28895	79309	91897

Suite Annexe 1

Comment utiliser une telle table ?

Selon les auteurs, les méthodes différent. Toutefois la règle générale est la suivante : On choisit, au hasard, un point d'entrée dans la table, puis on choisit un sens de parcours de la table pour prélever les chiffres et on respecte ce sens de parcours. Le sens de parcours peut être :

- soit à partir du point d'entrée, lire les nombres de la gauche vers la droite et du haut vers le bas ;
- soit à partir du point d'entrée, lire les nombres vers le haut et de droite à gauche ;
- soit à partir du point d'entrée, lire les nombres en diagonale, vers le bas et de gauche à droite...

Exemple

On veut tirer 7 nombres au hasard entre 100 et 600. Méthode 1 On prend la ligne 5 (par exemple) et on regroupe le chiffres 3 par 3.

On ne garde que ceux compris entre 100 et 600.

94 03 80 04 21 49 54 91 77 85 00 45 68 23 12 94 23 44 donnera 940 380 042 149 549 177 850 045 682 312.

Méthode 2

On prend la ligne 7 (par exemple) et on regroupe les chiffres 4 par 4 (la table s'y prête mieux que 3 par 3). On ne garde que les 3 premiers chiffres, s'ils forment un nombre entre 100 et 600.

09 27 52 72 49 11 30 93 33 29 54 17 54 48 47 42 04 79 donnera 0927 5272 4911
 3093 3329 5417 5448 4742 0479 On ne gardera que les nombres 527, 491, 309, 332,
 541, 544, 474.

Remarque : On aurait aussi pu utiliser des colonnes ou des diagonales. Cela doit être choisi avant de regarder la table, de manière à ne pas être influencé.

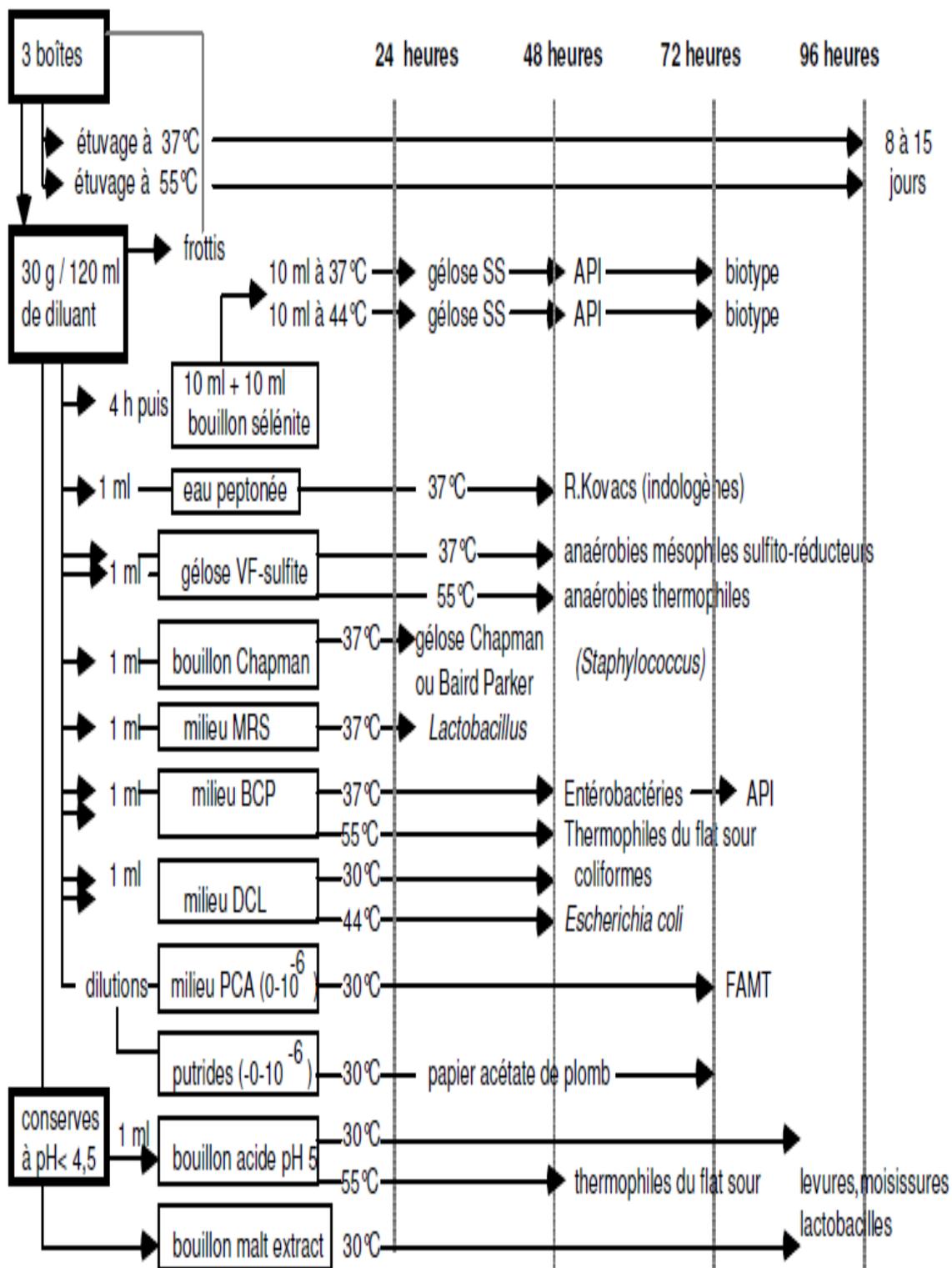
Annexe 2

Tables de Mac Grady (Guiraud, 1998)

<i>2 tubes par dilution</i>		<i>3 tubes par dilution</i>					
Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules	Nombre caractéristique	Nombre de cellules
000	0.0	000	0.0	201	1.4	302	6.5
001	0.5	001	0.3	202	2.0	310	4.5
010	0.5	010	0.3	210	1.5	311	7.5
011	0.9	011	0.6	211	2.0	312	11.5
020	0.9	020	0.6	212	3.0	313	16.0
100	0.6	100	0.4	220	2.0	320	9.5
101	1.2	101	0.7	221	3.0	321	15.0
110	1.3	102	1.1	222	3.5	322	20.0
111	2.0	110	0.7	223	4.0	323	30.0
120	2.0	111	1.1	230	3.0	330	25.0
121	3.0	120	1.1	231	3.5	331	45.0
200	2.5	121	1.5	232	4.0	332	110.0
201	5.0	130	1.6	300	2.5	333	140.0
210	6.0	200	0.9	301	4.0		
211	13.0						
212	20.0						
220	25.0						
221	70.0						
222	110.0						

Nombre caractéristique	Nombre de cellules						
000	0.0	203	1.2	400	1.3	513	8.5
001	0.2	210	0.7	401	1.7	520	5.0
002	0.4	211	0.9	402	2.0	521	7.0
010	0.2	212	1.2	403	2.5	522	9.5
011	0.4	220	0.9	410	1.7	523	12.0
012	0.6	221	1.2	411	2.0	524	15.0
020	0.4	222	1.4	412	2.5	525	17.5
021	0.6	230	1.2	420	2.0	530	8.0
030	0.6	231	1.4	421	2.5	531	11.0
100	0.2	240	1.4	422	3.0	532	14.0
101	0.4	300	0.8	430	2.5	533	17.5
102	0.6	301	1.1	431	3.0	534	20.0
103	0.8	302	1.4	432	4.0	535	25.0
110	0.4	310	1.1	440	3.5	540	13.0
111	0.6	311	1.4	441	4.0	541	17.0
112	0.8	312	1.7	450	4.0	542	25.0
120	0.6	313	2.0	451	5.0	543	30.0
121	0.8	320	1.4	500	2.5	544	35.0
122	1.0	321	1.7	501	3.0	545	45.0
130	0.8	322	2.0	502	4.0	550	25.0
131	1.0	330	1.7	503	6.0	551	35.0
140	1.1	331	2.0	504	7.5	552	60.0
200	0.5	340	2.0	510	3.5	553	90.0
201	0.7	341	2.5	511	4.5	554	160.0
202	0.9	350	2.5	512	6.0	555	180.0

Annexe3
Schémas d'analyse des conserves



Annexe 4
Composition des milieux de culture cités

Bouillon MRS (Man, Rosa, Sharpe)

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1ml
Hydrogenophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05

pH = 6.2

Autoclave à 120°C/20min

Gélose MRS (Man, Rosa, Sharpe)

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	8
Extrait de levure	4
Citrate d'ammonium	2
Tween 80	1ml
Hydrogenophosphate de potassium	2
Sulfate de magnésium	0,2
Sulfate de manganèse	0,05
Agar	10

pH = 6.2

Autoclave à 120°C/20min

Gélose nutritive

Composition	g/l
Peptone	10
Extrait de viande	5
Chlorure de sodium	5
Agar	15

pH = 7,2

Autoclave à 120°C/20min

Eau physiologique

Composition	g/l
NaCl	9

pH = 7.2

Autoclave à 120°C/20min

Bouillon nutritif

Composition	g/l
Extrait de viande	3
Pepton de viande	5

pH = 7,5

Autoclave à 120°C/20min

Gélose Muller Hinton

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Infusion de viande	300 ml
Peptone de caséine	17,5
Amidon de maïs	1,5
Agar	15
Eau distillé	1000ml

pH 7,4

Autoclave à 120°C/20min

Gélose Désoxycholate

Ingrédients	Quantités (g/l)
Peptone	10
Lactose	10

Désoxycholate de sodium	0,5 ou 1
chlorure de sodium	5
Rouge neutre	0,03
Gèlose	12
Eau distillée	1000ml

pH 7,1

Autoclave à 120°C/20min

Gélose Baird Parker

Composition	Quantité (Gramme/Litre)
Peptone	10,0
Extrait de viande de bœuf	4
Pyruvate de sodium	10
Extrait de levure	2
Glycocolle	12
Chlorure de lithium	5
Agar	15
Eau distillée	1000ml
pH 7	Autoclave à 120°C

Gélose Salmonella- Shigella (milieu SS)

Composition	g/l
Peptone	5
Extrait de viande	5
Lactose	10
Citrate de sodium	10
Citrate de fer III	1
Sels biliaires	8,5
Vert brillant	0,33
Rouge neutre	25
Thiosulfate de potassium	8,5
Agar	12

pH=7,3

Autoclave 115°C/20min

Milieu BCPL

Composition	g/l
Peptone	5
Lactose	10
Extrait de viande	3
Pourpre de bromocrésol	25
Agar	15

pH= 6,8

Autoclave 115°C/20min

Milieu Litsky

Composition	g/l
Peptone	20
Glucose	5
azide	0,2
éthyl-violet	0,5
NaCl	5
Hydrogenophosphate de potassium	2,7
dihydrogénophosphate de potassium	2,7

pH=6,8

Autoclave 115°C/20min

Gélose lactosée au désoxycolate

Composition	g/l
Peptone pepsique de viande	10
- Lactose	10
- Désoxycholate de sodium	0.5
- Chlorure de sodium	5
- Citrate de sodium	2
- Rouge neutre	0.03
- Agar agar bactériologique	15

pH = 7

Autoclave 115°C/20min

Gélose PCA

Composition	g/l
Tryptone	5
Extrait autolytique de levure	2,1
Glucose	1
Agar	15

pH = 7,4 ± 0,2.

Autoclave 115°C/20min

