

Politique contrôle (suite)

Indices de contrôle microbiologique

Les entérobactéries : le nombre de coliforme total ou le nombre de coliformes fécaux, le nombre d'*Ecoli*, tous ces microorganismes peuvent être utilisés comme indice, la recherche directe d'une *Salmonella* peut être nécessaire pour certain sp.

Les Staphylocoques : le dénombrement des Staphylocoques pathogène est souhaitable et relativement facile.

Il existe une bonne corrélation entre le FAMT, le nombre de coliformes et celui d'*Ecoli*, ces 3 indices peuvent être utilisés pour évaluer le risque sanitaire.

Indice de qualité organoleptique :

La détection des propriétés organoleptiques est un bon indicateur de l'altération de l'aliment. Les FTAM porte des informations sur la qualité organoleptique, par conséquent la durée de limite de consommation. L'altération est observée pour un nombre de flore élevée.

Méthodes de contrôle : Les méthodes de contrôles sont devisées en deux:

(1)Techniques microbiologiques de culture qui sont longues, coûteuses, et demandent un délai de réponse très important;

(2)Techniques microscopiques (état frais, coloration simple: de bleu de méthylène et double de Gram) qui sont simples, rapides, et de faible cout. Toutefois, la sensibilité de ces derniers n'étant pas toujours suffisante, donc il est recommandé de faire, en parallèle, un contrôle par les techniques microbiologiques de culture dites classiques.

CHAPITRE 3 Prélèvement, transport et préparation des échantillons

Pour effectuer une analyse microbiologique, il faut tenir en compte les points suivants :

-Définir le lieu et les conditions de prélèvements.

-Réaliser ces prélèvements et les transmettre dans des bonnes conditions au laboratoire d'analyse.

1-prélèvement :

Dans le nombre cas les prélèvements est un élément indivisible, dans d'autre cas ils doivent s'effectuer sur des produits en vrac.

Il faut tenir en compte quelques conditions dans les prélèvements qui sont la qualité et l'homogénéité, puisque la répartition des micro-organismes dans le produit peut n'est pas être homogène. Donc il pourra être possible d'effectuer plusieurs prélèvements en différents points ou homogénéiser le produit avant de prélever. Le prélèvement doit être réalisé dans des conditions aseptiques.

a- Cas de produits solide :

Le prélèvement est effectué au scalpel, il est fabriqué en verre ou en métal, il doit être stérilisé avant usage. Pour prélever la flore dans une surface, on peut procéder selon la méthode d'écouvillonnage.

b- Cas de produit liquide :

Selon le volume de produit à prélever on utilise une pipette, une louche ou un flacon stérile.

Transport

1-Etiquetage : il doit comporter : le numéro, l'ordre, l'heure, la date, les conditions de prélèvement etc..

2-Stabilité : la composition microbiologique de l'échantillon ne doit pas évoluer entre le moment de prélèvement et celui d'analyse.

3-préparation : pour les produits liquides doivent agiter manuellement, il est possible d'utiliser un agitateur pour les produits visqueux, dans le cas de produits solides, il faut procéder à une opération de broyage couplé à une dilution.

Dilution : en analyse microbiologique, on travaille que dans des gammes réduites de concentration pour le comptage sur gélose.

Concentration : cette technique est utilisée pour séparer et isoler une bactérie à partir d'un grand volume.

Chapitre 4 Techniques classiques de numération

1. Numération microscopique : Les techniques de numération microscopique offrent une possibilité de détecter les microorganismes lors de contrôle de produits, simplement en regardant un échantillon directement sous microscope optique. Bien qu'il soit généralement relativement facile de repérer, avec soin et patience, les bactéries, les levures et les moisissures à l'état frais, il est possible de réaliser des colorations afin de rendre ces microorganismes plus facilement visibles, ainsi les deux colorations couramment employées sont la coloration simple au bleu de méthylène et la coloration complexe (double) de Gram

a. Utilisation des cellules à numération : Les lames type hématimètre comme les cellules de THOMA et de MALASSEZ, pourraient être employées pour le dénombrement des microorganismes. Ces lames sont conçues en verre de 2 à 3 mm d'épaisseur comportant une surface délimitée et quadrillée et recouverte d'une lamelle de sorte qu'elle emprisonne une quantité connue de la solution-dilution de l'aliment à examiner.

b. La méthode de Breed : Cette méthode utilise des lames comportant une zone délimitée de un centimètre cube (1cm²) sur laquelle on dépose 0.01ml de la suspension de l'aliment à examiner. Après séchage, fixation et coloration au bleu de méthylène ou éventuellement la coloration de Gram, les microorganismes sont comptés dans 30 à 50 champs microscopiques.

c. Technique de filtration à épifluorescence directe (DEFT) : C'est une technique de numération microscopique, qui est appliquée pour le dénombrement des microorganismes dans toutes sortes de produits. Elle permet d'obtenir une sensibilité nettement accrue de 10³ à 10⁴ microorganismes par ml, suite à une concentration des microorganismes contenus dans la suspension de l'aliment à examiner sur un filtre à membrane, suivie d'une coloration à orange d'acridine. Les microorganismes retenus sur la membrane sont comptés directement sous le microscope à épifluorescence.

d. Numération après passage sur un milieu d'enrichissement : Cette technique non quantitative est utilisée pour des espèces déterminées (Lactobacilles, Salmonelles, etc.) ou il existe une corrélation entre le nombre de microorganismes au début et à l'issue de l'incubation. Une suspension de l'aliment à examiner dans un milieu d'enrichissement sélectif est réalisée, suivie par une incubation aux temps et température appropriés du microorganisme, puis une numération sur lame au microscope optique.

2. Numération en et sur milieu solide

a. Dans la masse : C'est la méthode standard de numération des germes aérobies, dont l'utilisation nécessite un milieu de croissance claire pour permettre le comptage des colonies au moyen d'un compteur de colonies. Les germes anaérobies ont besoin d'une deuxième couche de gélose qui permet de maintenir un environnement anaérobie (méthode de la double couche).

b. Étalement en surface : Cette méthode est préférable lorsque des milieux sélectifs sont utilisés pour le dénombrement de groupe spécifique de microorganismes aérobies, car elle permet la manifestation de propriétés coloniales de ces microorganismes, telles que: morphologie, pigmentation, hémolyse, halos de précipitation, ou changements de couleur du milieu de culture.

c. Étalement en surface en spirale : Pour cette technique, une machine distribue un petit volume entre 0.05 et 0.4ml de la suspension de l'aliment à examiner, à la surface des boîtes qui sont en rotation, ceci en suivant une distribution spirale à partir du centre vers la périphérie de la boîte.

d. Technique de gouttes : Des gouttes ayant le même volume par exemple 0.02 ml, de la solution-dilution de l'aliment à examiner, sont déposées à la surface d'un milieu gélosé sectorisé au maximum en six secteurs par boîte. Après incubation, le comptage de colonies se fait sur tous les secteurs contenant 30 ou moins de colonies par goutte

e. Numération en tubes : À la place des boîtes de Pétri, on emploie des tubes contenant 2 à 4 ml de milieu gélosé. Ensuite, 0.1ml de la solution-dilution de l'aliment à examiner est inoculé dans le milieu en surfusion. Après incubation les colonies sont comptées.

f. Filtration sur membrane : Cette technique est utilisée pour estimer le nombre de microorganismes lors du contrôle des liquides alimentaires (l'eau, boissons...). Elle consiste à une concentration de microorganismes sur membrane au moyen d'un appareil de filtration mono ou pluri-postes.

3. Numération en milieu liquide : Cette numération en milieu liquide est connue sous le nom de la méthode du nombre le plus probable (NPP) de Mc GRADY, elle est utilisée, généralement, pour la recherche et le dénombrement des coliformes totaux, coliformes fécaux, et Streptocoques fécaux dans l'eau.