

CH 5 Les méthodes récentes de détection microbiologiques

Les techniques rapides de détection :

Les méthodes standardisées (ISO, AFNOR, etc.) pour la détection de micro-organismes dans les aliments sont habituellement considérées comme des méthodes classiques, en grande partie parce que l'objectif est de fournir une méthode fiable et reconnue au niveau international qui permette d'obtenir des résultats équivalents dans différents laboratoires. Bien qu'en principe les méthodes standardisées ne servent que de guide pour l'analyse microbiologique des denrées alimentaires, historiquement, les gouvernements de nombreux pays et les sociétés commerciales les recommandaient ou même les acceptaient comme étant les méthodes officielles de détection et dénombrement de micro-organismes dans les aliments. Dès lors, elles ont été considérées comme des « méthodes de référence ». Cependant, au cours des dernières années, de nombreuses méthodes alternatives pour la détection et le dénombrement de micro-organismes dans les aliments ont été développées, suite aux avancées en immunologie, biotechnologie et instrumentation.

Parmi les méthodes rapides de microbiologie alimentaire, on utilise des techniques microbiologiques, chimiques, biochimiques, biophysiques, génétiques, immunologiques et sérologiques pour étudier et améliorer les techniques d'isolement, de détection précoce, de caractérisation et de dénombrement de micro-organismes et de leurs produits, présents aussi bien dans les prélèvements alimentaires que dans les prélèvements industriels ou environnementaux.

L'évaluation de l'activité microbienne est aussi importante que l'évaluation du nombre de microorganismes. Un certain nombre de techniques de détection, relativement récentes, ont été développées, qui visent à donner des réponses plus rapides et ils sont donc souvent dénommées « techniques rapides de détection ».

Avantages

Il s'agit de méthodes rapides qui permettent de traiter un grand nombre d'échantillons à la fois. Elles sont en général faciles à utiliser et même, dans certains cas, automatisées. Elles présentent normalement des limites de détection basses et sont la plupart du temps d'une grande exactitude (sensibilité et spécificité). Elles permettent ainsi des prises de décisions rapides et la prompte application de

mesures correctrices. Dans la plupart des cas, elles contribuent en outre à économiser du matériel et des heures de travail

1. Spectroscopiques

a. **Réduction des colorants** : Le principe repose sur la réponse d'un colorant redox à la présence de microorganismes métaboliquement actifs qui se traduit par un changement de couleur. Deux colorants sont couramment utilisés pour estimer le nombre de microorganismes viables : le bleu de méthylène (passe du bleu au blanc) et la résazurine, qui a été utilisée dans des contrôles des laits et les viandes fraîches et hachées. Ce colorant est réduit et passe du bleu au rose à l'incolore. Le temps nécessaire à la décoloration peut être mesuré pour évaluer le nombre de microorganismes viables. L'appréciation de la décoloration s'effectue généralement à l'œil ou à l'aide d'un spectrophotomètre.

b. **Mesure d'activités enzymatiques** : La technique des colorants redox repose sur l'évaluation de l'activité de la réductase, cependant de nombreux autres enzymes ont été utilisés pour détecter et évaluer la présence des microorganismes, c'était le cas des: phosphatases, estérases (pour évaluer le nombre des bactéries viables dans le lait, viandes et le poissons), et la glutamate décarboxylase (pour évaluer le nombre d'*E.coli* dans le lait).

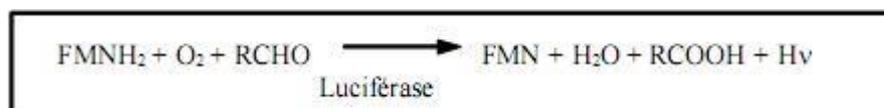
c. **Dosage de coenzymes (réaction de bioluminescence du système ATP-luciférine-luciférase)** : Cette technique (ATP-métrie) utilise le système ATP-luciférine-luciférase. Certains microorganismes peuvent émettre de la lumière en conséquence de l'activité de la luciférase sur la luciférine. La réaction nécessite la présence de Mg^{++} et de l'ATP qui facilite la formation du complexe ATP-luciférine-luciférase, le complexe est oxydé par l'oxygène en donnant l'oxyluciférine dans un état excité. L'état excité de la molécule retourne à l'état stable (fondamental d'énergie inférieure) et libère un photon de lumière (se dissocie et libère à nouveau l'enzyme luciférase). Il est

possible de mesurer soit l'intensité de la lumière émise à son maximum, soit la quantité de la lumière émise. Dans les deux cas, les résultats obtenus sont proportionnels à la concentration d'ATP présente et éventuellement proportionnels au nombre de microorganismes présents. Avant le dosage, une extraction de l'ATP microbienne doit être réalisée par lyse des cellules microbiennes. Cette technique est, cependant, utilisée pour surveiller l'hygiène dans les industries.

La réaction de bioluminescence des bactéries nécessite 4 composés: La luciférase bactérienne, la flavine mono nucléotide réduite ou FMNH₂ qui sert de luciférine, un aldéhyde à longues chaînes carbonnées servant de cofacteur, l'oxygène moléculaire.

Alors que le système de la luciole fonctionne avec l'ATP, celui des bactéries fait appel au NADPH. Ce composé apporte au départ de l'énergie à une enzyme qui facilite la mise en place de la réaction. Les deux substrats, l'aldéhyde et la flavine, sont oxydés. Il s'agit donc d'une oxydation double. L'aldéhyde aurait donc un effet sur le rendement de la réaction.

Schéma de la réaction :



Cette luciférase est considérée comme une oxydase à fonctions multiples. En effet, elle catalyse en même temps l'oxydation de l'aldéhyne et du FMNH₂.

Ainsi, dans les deux cas exposés, la réaction d'oxydation fournit l'énergie chimique nécessaire à un complexe pour qu'il puisse émettre des photons.

d. Marqueurs radiométriques : Cette technique est basée sur l'incorporation des ^{14}C marqué dans un milieu de croissance de sorte que, lorsque les microorganismes utilisent ce métabolite, le $^{14}\text{CO}_2$ est libéré et ainsi il mesuré par utilisation d'un compteur de radioactivité ou par un spectrophotomètre. Le ^{14}C est incorporé en ^{14}C -glucose pour les microorganismes qu'ils utilisent habituellement, sinon il est incorporé en ^{14}C -formate ou ^{14}C -glutamate pour les autres. La technique consiste à réaliser une culture en milieu contenant la molécule marquée et après l'incubation la culture est testée périodiquement pour déterminer la présence de $^{14}\text{CO}_2$. Le temps nécessaire pour détecter le $^{14}\text{CO}_2$ est inversement proportionnel au nombre de microorganismes présents.

2.Électrochimique

a. Impédancemétrie:

Cette technique mesure la baisse de l'impédance dans un milieu pourvu de microorganismes (l'impédance électrique qui est la résultante de la présence et de l'activité des microorganismes) par rapport au même milieu dépourvu de microorganismes (l'impédance électrique du milieu). Au cours du temps les microorganismes présents dans le milieu dégradent de grandes molécules électriquement neutres ou faiblement chargées (protéines, polysides...) et produisent des molécules plus petites ionisées (acides aminés, acides organiques...) conduisant à la diminution de l'impédance du milieu. La technique consiste à réaliser des cultures dans des cuvettes, au fond desquelles sont fixées des électrodes de mesure du bactomètre (appareil qui assure automatiquement l'incubation et la lecture simultanément). Elle est utilisée pour la détection et l'évaluation des principaux contaminants (germes aérobies, Entérobactéries, coliformes, bactéries lactiques, levures et moisissures

Autres Procédés

(Microcalorimétrie) : elle regroupe un ensemble de techniques qui mesurent directement l'enthalpie et les changements de capacité calorifique qui

interviennent lors d'une réaction chimique. En solution aqueuse, le flux de chaleur entrant ou sortant de l'échantillon a presque toujours lieu lors d'une réaction. Ces réactions peuvent impliquer une large variété de situations, par exemple l'interaction entre deux molécules (comme une cyclodextrine et son hôte), les changements dans la conformation de macromolécules complexes (comme les protéines ou l'ADN), ou même des changements dans la structure de systèmes colloïdaux multimoléculaires complexes d'administration de médicaments.

Références bibliographiques

AGROSMART. Méthodes rapides pour le contrôle microbiologique des industries alimentaires 29 mai, 2017.

NAIMI Mostefa, CUNB, El-Bayadh Cahier technique-2: Techniques de contrôle microbiologiques

C.VERNOZY-ROZAND., méthodes de détection rapide en microbiologie alimentaire. Collection série technique de l'ingénieur 1999.

Astrademark of KEP Technologies groupe SETARAM Instrumentation 7, rue de l'Oratoire 69300 Caluire - FRANCE

<http://tpe-bioluminescence.e-monsite.com/pages/content/table-des-matieres.html>