

Méthodes d'analyses

1-Techniques d'énumération Microscopiques

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.

Les résultats ne sont pas très fiables mais pour leur rapidité, ils peuvent être utiles pour l'estimation de la charge microbienne initiale d'un aliment, mettre en évidence des contaminants dans la flore de fabrication (exp : la présence de bactéries dans le ferment constitué de levure ou de bactéries Gram- dans les ferments lactiques), la recherche présomptive du bacille tuberculeux par la méthode de Ziehl Nielson. Pour avoir une idée sur l'état sanitaire de l'animal dont provient le lait, on fait appel à l'étude cytologique du lait pour la détermination de la formule leucocytaire.

1-2 Comptage à l'hématimètre

C'est une numération des cellules sous le microscope utilisant Les lames type hématimètre comme les cellules de THOMA et de MALASSEZ;

- ✓ Cellule de THOMA : d'une taille de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.1 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm³. La cellule est formée de seize (16) grands carrés, composés chacun de seize (16) petits carrés.
- ✓ Cellule de MALASSEZ : d'une taille de de 0.2 x 0.2 mm, une profondeur de 0.2 mm et elle emprisonne un volume de 1 mm³. Elle possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles. on trouve 25 rectangles qui sont divisés en 20 petits carrés afin de faciliter le comptage.

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

1-2 Technique de filtration à épi fluorescence directe (DEFT) :

La technique DEFT (Direct Epifluorescent Filter Technique) est une méthode rapide de dénombrement des bactéries, elle utilise la filtration sur membrane et la microscopie en épifluorescence. Elle consiste à faire une concentration des microorganismes contenus dans la suspension du produit à examiner sur un filtre à membrane, suivie d'une coloration à l'orange d'acridine. Les microorganismes retenus sur la membrane sont comptés directement sous le microscope à épifluorescence.

2-Techniques d'énumération Macroscopiques

2.1 Numération en /sur milieu solide

➤ Numération dans la masse (*pour plate count*)

C'est la méthode standard d'énumération 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).

➤ Numération par étalement en surface (*spread plate*)

Cette méthode est utilisable pour le dénombrement de groupe spécifique de microorganismes aérobies sur des milieux sélectifs, 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.

➤ Technique de gouttes (*drop plate*)

Des gouttes ayant le même volume par exemple 0.02 ml, de la solution-dilution de l'échantillon 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, de la manière suivante :

N : nombre de UFC / g ou ml d'échantillon :

$$N = C / x v d$$

- Avec **C** : est la somme des colonies,
x : est le nombre de gouttes utilisées,
v : est le volume de la goutte,
d : est la dilution utilisée.

➤ **Technique de Numération en tubes (*roll tube count*)**

À la place des boîtes de Pétri, on emploie des tubes contenant 2 à 4 ml de milieu glosé. 0.1 ml de la solution-dilution est inoculé dans le milieu en surfusion, et les tubes sont ensuite inclinés. Après incubation les colonies sont comptées.

➤ **Technique de filtration sur membrane**

Cette technique est utilisée pour estimer le nombre de microorganismes lors du contrôle des liquides alimentaire. Elle consiste à une concentration de microorganismes sur membrane au moyen d'un appareil de filtration. Le nombre de colonies N par ml d'échantillon est calculé selon la formule :

$$N = n / v,$$

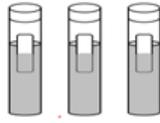
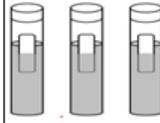
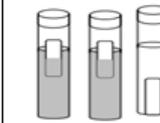
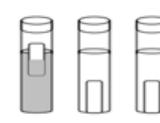
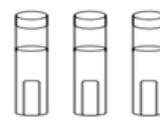
Avec : **n** nombre de colonies, **v** est le volume de l'échantillon qui est égal, généralement, à 100ml.

2.2 Numération en milieu liquide

Cette numération 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. C'est une estimation statistique de la densité des microorganismes. Elle consiste à ensemencer (1ml) plusieurs tubes par dilution (2, 3, 4 ou 5), Après incubation on compte le nombre de tubes positifs dans chaque série et on détermine le nombre caractéristique formé de trois chiffres qui est ensuite reporté dans la table de Mc GRADY.

Exemple : On réalise une gamme de dilution d'un échantillon X, 1ml de chaque dilution est ensemencé dans des tubes (3 tubes) contenant un

milieu de culture approprié. Après incubation à une température adéquate on note dans un tableau le résultat + ou - sous chaque tube. On regroupe le nombre de résultats positifs par dilution. Ensuite, on regroupe en nombre de 3 chiffres la suite de chiffres obtenue en commençant par le chiffre obtenu par la plus faible dilution

Dilutions	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Aspect des tubes					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nbr de tubes +	3	3	2	1	0
Regroupement	332	321	210		

Choix de la dilution pour le calcul, 2 méthodes sont possibles :

- ✓ choisir la dilution qui possède le regroupement le plus grand tout en étant inférieur à 330 pour la méthode à 3 tubes / dilution (dans l'exemple, on a 321 et 210)
- ✓ choisir la plus forte dilution contenant tous ces tubes positifs (dans l'exemple, c'est 10⁻¹ avec le regroupement 321)

- Choix de la dilution : 10⁻¹ d'où un Fd =facteur de dilution= 10¹

Se reporter à la table de Mac Grady pour 3 tubes de dilution afin de trouver le NPP correspondant au nombre 321: le NPP est 15.

Calcul se fait selon l'équation :

$$N = \frac{NPP}{v} \times Fd$$

Donc :

$$N = \frac{15}{1} \times 10^1 = 150 = 1,5 \times 10^2 \text{ germe/ml}$$

Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP	Nombre de tubes positifs au niveau des 3 taux de dilution retenus	NPP
000	<0,3	230	2,9
001	0,3	300	2,3
010	0,3	301	4
020	0,6	302	6
100	0,4	310	4
101	0,7	311	7
110	0,7	322	12
111	1,1	320	9
120	1,1	321	15
121	1,5	322	21
200	0,9	323	29
201	1,4	330	20
210	1,5	331	50
211	2,0	332	110
220	2,1	333	>110
221	2,8		

2.3 Détermination du poids sec (PS)

Chez les bactéries l'augmentation de la masse et l'apparition d'un trouble sur milieu liquide se traduisent par l'augmentation du nombre des microorganismes. Les cellules sont récupérées par centrifugation ou par filtration (0,45 ou 0,22 μm de diamètre). Elles sont ensuite séchées à 80 - 100°C, refroidies à température ambiante la biomasse cellulaire est pesée jusqu'à ce que le poids devienne constant. Le PS est exprimé en gramme par litre.

2-4 Détermination de la turbidité

On utilise un spectrophotomètre à une longueur d'onde de 600 nm. Cette méthode est simple, rapide et efficace. C'est la plus utilisée. Elle consiste à soumettre une suspension cellulaire à un faisceau de lumière. Les cellules absorbent de la lumière et la lumière réfléchie est mesurée. On mesure la turbidité qui est exprimée en Densité optique (DO) ou absorbance. Plus il y a de cellule, plus le milieu est trouble et plus la DO est élevée. Pour des valeurs de DO > 0,8, il faut faire des dilutions de la suspension cellulaire.

2- Les techniques rapides de détection

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 ».

2-1 Techniques Spectroscopiques

- **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'oeil ou à l'aide d'un spectrophotomètre.

- **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*).

- **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.

- **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 $^{14}CO_2$ est libéré et ainsi il est 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.

2-2 Techniques électrochimique

- **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).