



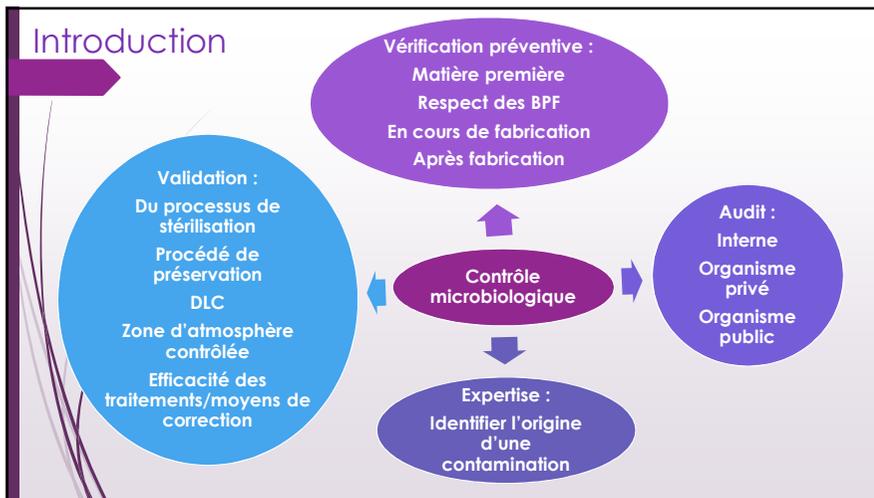
Microbiologie chap 3

Licence Contrôle Qualité et Management des Processus Industriels

Introduction

- La **multiplication** des micro-organismes dans les produits peut
- **Altérer** l'aspect, l'odeur, le goût du produit,
- Produire une **corrosion** bactérienne
- Engendrer un **risque pour la santé**
- **Atténuer la durée de vie** d'un produit, sa stabilité
- Impacter sur le **maintien de la stérilité** d'un produit



Introduction

- Contrôles qualitatifs de la présence de micro-organismes
- Contrôles quantitatifs de la présence de micro-organismes
- Contrôle indirect de la présence de micro-organismes

1. Contrôle qualitatif

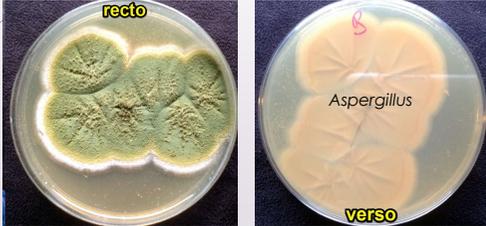
Intérêt :

- Identifier
- l'origine d'une contamination,
- l'origine d'une pathologie

1. Contrôle qualitatif

1.1 Examen macroscopique

- Moississures
- Aspect du thalle : couleur, aspect



1. Contrôle qualitatif

1.1 Examen macroscopique

- Bactéries / levures
- Aspect des colonies
- Similaire à des colonies bactériennes

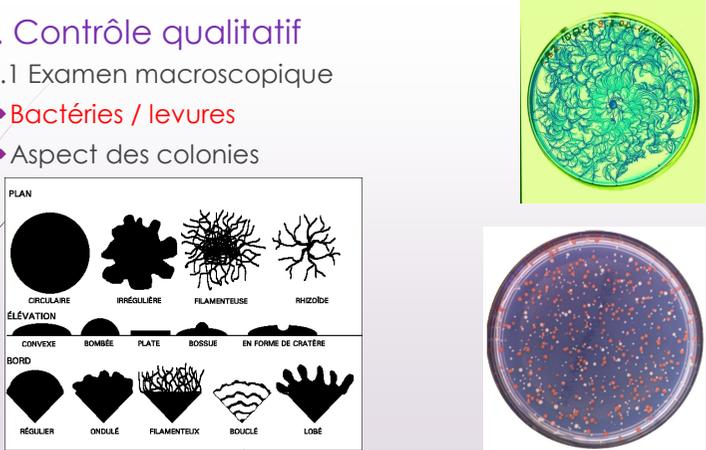


Peu utilisé

1. Contrôle qualitatif

1.1 Examen macroscopique

- Bactéries / levures
- Aspect des colonies



1. Contrôle qualitatif

1.2 Examen microscopique

- Moisissures
- Coloration au bleu coton lactique

Technique du drapeau

Un morceau de cellophane adhésive collé à une de ses extrémités sur une ôse, ou baguette de verre... est appliqué sur la surface de la culture à étudier; il est ensuite examiné entre lame et lamelle, en sandwich entre 2 gouttes de colorants.

1. Contrôle qualitatif

1.2 Examen microscopique

- Moisissures
- Coloration au bleu coton lactique

1. Contrôle qualitatif

1.2 Examen microscopique

- Levures
- État frais

© Georges Dolisi

Levure + eau

Fort grossissement

1 goutte entre lame et lamelle

Noyau

Membrane

Cytoplasme

Observation sans coloration

1. Contrôle qualitatif

1.2 Examen microscopique

- bactéries
- Coloration de Gram → différentielle

LEGENDE

- Violet de cristal
- Iode
- Alcool
- Safranine

1 Application du violet de cristal (colorant)

2 Traitement à l'iode (mordant)

3 Lavage à l'isopropanol acétone (décoloration)

4 Application de la safranine (contre-colorant)

Gram positif

Gram négatif

Bâtonnet (Gram positif)

Coccus (Gram positif)

Vibron (Gram négatif)

5 µm

b) Micrographie de bactéries ayant subi une coloration de Gram. Les bâtonnets et les cocci colorés en violet sont des bactéries à Gram positif; les vibrios colorés en rose, de forme incurvée, sont des bactéries à Gram négatif.

a) Étapes du procédé de coloration

Figure 2.7 Coloration de Gram.

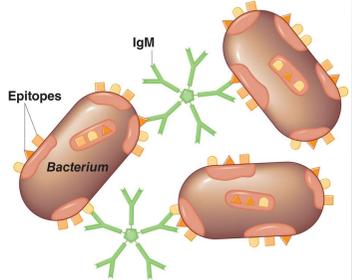
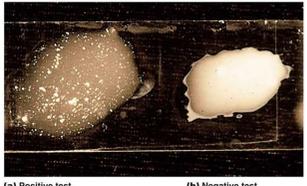
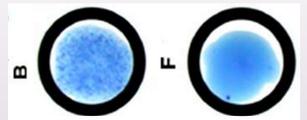
1. Contrôle qualitatif

1.3 Procédure sérologique

Test d'agglutination sur lame

Ag particulaire

Ac pentamérique ou dimérique

1. Contrôle qualitatif

1.4 Procédure microbiologique

- Présomption d'un germe pathogène
- culture sur des milieux différentiels
- = milieux qui



1. Contrôle qualitatif

1.4 Procédure microbiologique

- Présomption d'un germe pathogène
- culture sur des milieux sélectifs
- Milieux qui



1. Contrôle qualitatif

1.4 Procédure microbiologique

- Confirmation d'un germe suspecté comme étant ...
- Galerie d'identification



Résultats reportés sur la fiche d'identification

Code n°: 5 215 773 (55)

Se référer au catalogue pour identifier la souche à l'aide du code

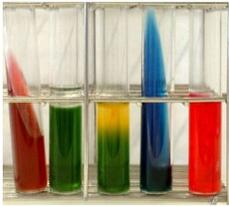
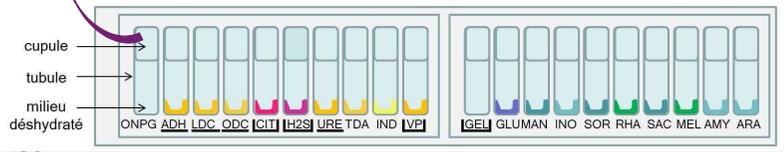
1. Contrôle qualitatif

1.4 Procédure microbiologique

- Repose sur des Tests biochimiques

Oc1ccc(O[C@@H]2O[C@H](O[C@@H](CO)O[C@H]2O)O)cc1[N+](=O)[O-]
 $\xrightarrow[\text{H}_2\text{O}]{\beta\text{-Galactosidase}}$
Oc1ccc(O)cc1[N+](=O)[O-]
 $+$
O[C@@H]1O[C@H](O)[C@H](O)[C@@H](O)[C@H]1O

ONPG ONP (λ-max 420 nm) Galactose

cupule
tubule
milieu déshydraté

ONPG ADH LDC ODC CITI H2S URE TDA IND VPI
GELI GLUMAN INO SOR RHA SAC MEL AMY ARA

1. Contrôle qualitatif

1.5 Test de stérilité

- pour détecter
 - des bactéries
 - ou champignons étrangers
 - ou autres micro-organismes
- dans les matières premières brutes, les lots de semence ou le produit fini
- test de filtration sur membrane
- ou test par inoculation directe.



1. Contrôle qualitatif

1.5 Test de stérilité



- Rincer les membranes.
- Transférer la quantité adéquate du produit à tester.
- Filtrer rapidement le liquide à travers la membrane puis laver la membrane.
- Réitérer l'opération sur une nouvelle membrane.

- Filtrer le bouillon de culture sur l'une des membranes.
- Faire de même avec le second milieu sur la seconde membrane.

- Milieu thioglycolate avec résazurine pour la détection des bactéries anaérobies.
 - Incuber le milieu à 30-35°C pendant 14 jours.
- Milieu trypticase soja pour la détection des bactéries aérophiles.
 - Incuber le milieu à 20-25°C pendant 14 jours.

- Observer les colonies
- Interpréter les résultats

1. Contrôle qualitatif

1.5 Test de stérilité

- 14 jours d'incubation
- Si aucune croissance microbienne décelée
- produit conforme.
- Si croissance microbienne,
 - Deuxième contrôle sur plus de lots
 - si aucune croissance au 14^{ème} jour
 - produit conforme.
 - Si une croissance
 - on ré-effectue un contrôle

1. Contrôle qualitatif

1.5 Test de stérilité

- Absence de culture
- signifie seulement qu'aucun micro-organisme contaminant n'a pu être décelé dans l'échantillon examiné dans les conditions de l'essai.
- Le test n'est pas exigé
- Si le fabricant a des assurances suffisantes du bon fonctionnement de la stérilisation:

Preuves physiques >>> essai de stérilité

Formes pharmaceutiques liquides solides (ovules, sachets) ou reconstituées

❑ PRODUITS QUI DOIVENT ÊTRE STÉRILES:

ESSAI DE STÉRILITÉ:

- Recherche de microorganismes
- Recherche d'endotoxines

❑ PRODUITS NON STÉRILES:

- Dénombrement des germes aérobies viables totaux
- Dénombrement des Levures et moisissures
- Recherche de microorganismes spécifiés:
E. coli, *Salmonella*, *Pseudomonas aeruginosa* et *Staphylococcus aureus*

2. Contrôle quantitatif

2.1 semi-quantitatif

- Lames gélosées, boîtes contact



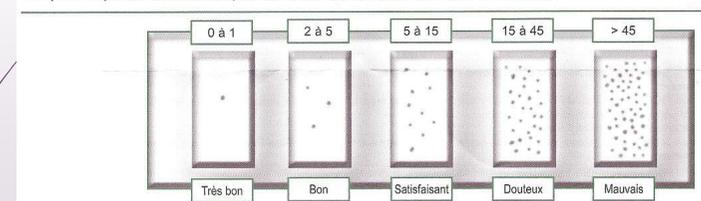
- Contrôle des surfaces, hygiène (personnels, matériels).

2. Contrôle quantitatif

2.1 semi-quantitatif

- Lames gélosées, boîtes contact
- Comparaison à des abaques

Exemple d'interprétation des résultats après désinfection des surfaces de travail pour la Flore Totale.

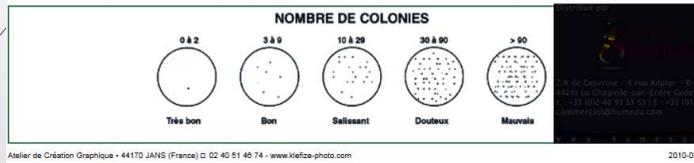


2. Contrôle quantitatif

2.1 semi-quantitatif

- Lames gélosées, boîtes contact
- Comparaison à des abaques

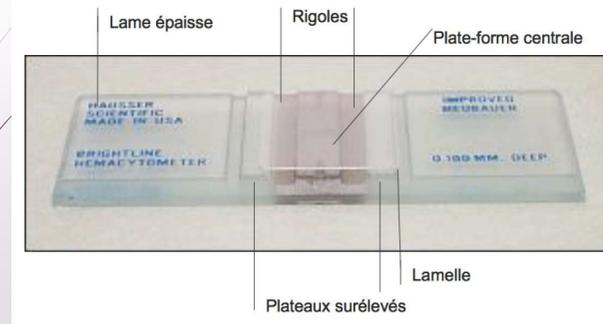
• 9 • Exemple d'interprétation des résultats après désinfection des surfaces de travail pour la Flore Totale



2. Contrôle quantitatif

2.2 dénombrement direct

- Cellules de comptage



2. Contrôle quantitatif

2.2 dénombrement direct

- Cellules de comptage

Grille formée de 25 grands carrés

Figure 4.20 Dénombrement direct de cellules microbiennes à l'aide de la chambre de comptage de Petroff-Hausser. Le produit du nombre moyen de bactéries dans un grand carré et d'un facteur de 1 250 000 est égal au nombre de bactéries par millilitre.

- On place à cet endroit une suspension bactérienne, qui remplit par capillarité la chambre peu profonde située entre la lamelle et la lame.
- Dénombrement des bactéries directement au microscope : on compte toutes les bactéries dans plusieurs grands carrés (lignes en tracé gras), puis on calcule la moyenne par grand carré. Dans le grand carré illustré, il y a 14 cellules bactériennes.
- Le volume connu du liquide recouvrant le grand carré est de 1/1 250 000 mL. Comme il y a 14 bactéries dans le carré illustré, il y a 14 fois 1 250 000 soit 17 500 000 bactéries par millilitre.

1 Lamelle couvre-objet
2 Lame porte-objet
3 Suspension bactérienne
4 Position des carrés

2. Contrôle quantitatif

2.2 dénombrement direct

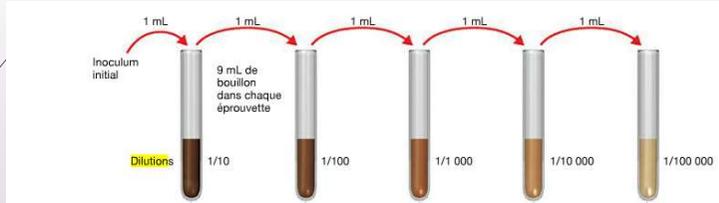
- Turbidimétrie

Figure 4.21 Estimation du nombre de bactéries par turbidimétrie. Dans des conditions normales, la quantité de lumière qui frappe le détecteur photosensible du spectrophotomètre est inversement proportionnelle au nombre de bactéries : plus la quantité de lumière transmise est faible, plus il y a de bactéries dans l'échantillon.

2. Contrôle quantitatif

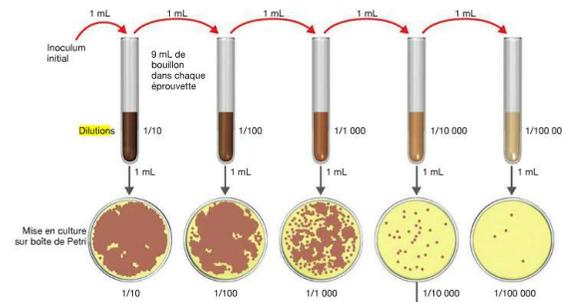
2.3 dénombrement indirect

- Nécessité d'une mise en culture
- Echantillon très concentrés en micro-organismes
- Dilution en série/en cascade



2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect



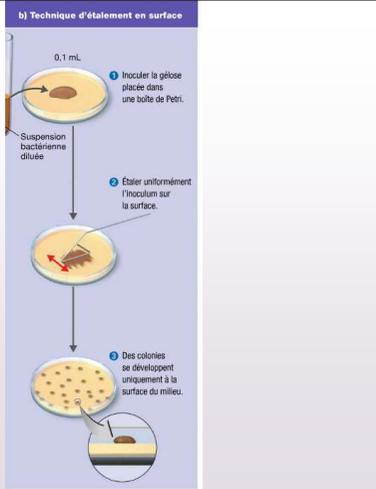
Équation : nombre de colonies sur la boîte \times inverse de la concentration de l'échantillon = nombre de bactéries par millilitre.
 (Par exemple, s'il y a 32 colonies sur la surface d'une boîte inoculée avec une solution diluée à 1/10 000, le nombre de bactéries est de $32 \times 10\ 000 = 320\ 000$ bactéries par millilitre de suspension.)

Figure 4.18 Dénombrement de colonies après culture et dilution en série. La dilution en série consiste à diluer successivement l'inoculum initial dans plusieurs éprouvettes. Dans l'exemple illustré, chaque éprouvette contient seulement un dixième du

2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

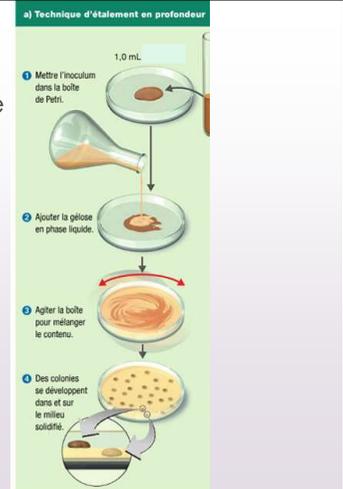
- Dénombrement en surface



2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

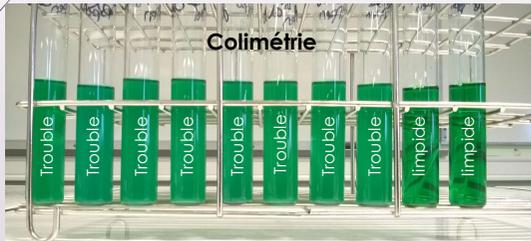
- Dénombrement dans la masse



2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

- Milieux liquides
- Nombre caractéristique
- → table de Mac Grady
- Nombre le plus probable

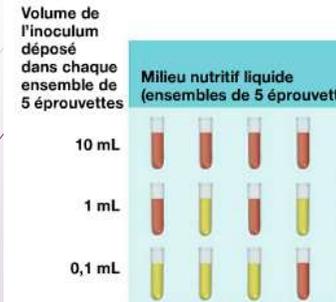


Colimétrie

2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

- Milieux liquides



Combinaison de résultats positifs	Index NPP/100 mL	Limites de confiance de 95 %	
		Inférieure	Supérieure
4-2-0	22	6,8	50
4-2-1	26	9,8	70
4-3-0	27	9,9	70
4-3-1	33	10	70
4-4-0	34	14	100
5-0-0	23	6,8	70
5-0-1	31	10	70
5-0-2	43	14	100
5-1-0	33	10	100
5-1-1	46	14	120
5-1-2	63	22	150
5-2-0	49	15	150
5-2-1	70	22	170
5-2-2	94	34	230
5-3-0	79	22	220
5-3-1	110	34	250
5-3-2	140	52	400

b) À l'aide de la table de détermination du NPP, on peut calculer, pour un échantillon donné, le nombre de microbes pour lequel on devrait statistiquement obtenir de tels résultats. On cherche dans la première colonne la combinaison correspondant aux résultats de croissance positifs obtenus pour les trois ensembles : 5, 3, 1. Dans ce cas, la valeur de l'indice NPP pour 100 mL est de 110, ce qui signifie statistiquement que 95 % des échantillons d'eau pour lesquels les résultats sont 5-3-1 contiennent de 34 à 250 bactéries (dans 100 mL), le nombre le plus probable étant 110.

2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

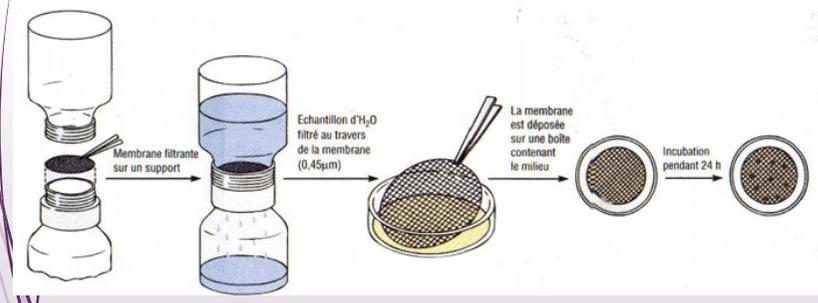
- Echantillon faiblement concentré
- Filtration de volumes ± grands



Figure 1-13 Stérilisation par filtration: appareil filtrant préalablement stérilisé et jetable. On verse l'échantillon dans le récipient du haut, et le liquide est aspiré sous vide à travers la membrane filtrante dans le récipient du bas. Leur taille étant trop grande, les bactéries ne passent pas par les pores du filtre, si bien que le filtrat obtenu est stérile.

2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect



2. Contrôle quantitatif
 2.3 dénombrement indirect

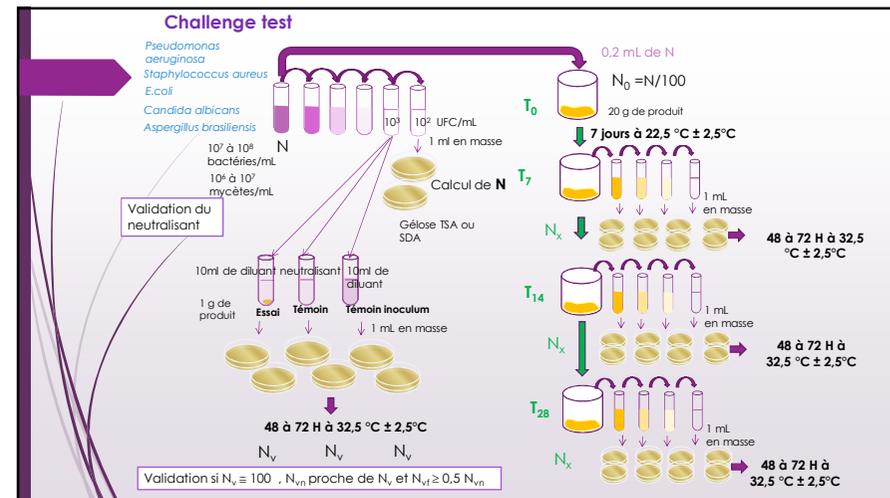
- Applications possibles
- Contrôle de la contamination microbienne
- Contrôle de l'état d'hygiène du produit

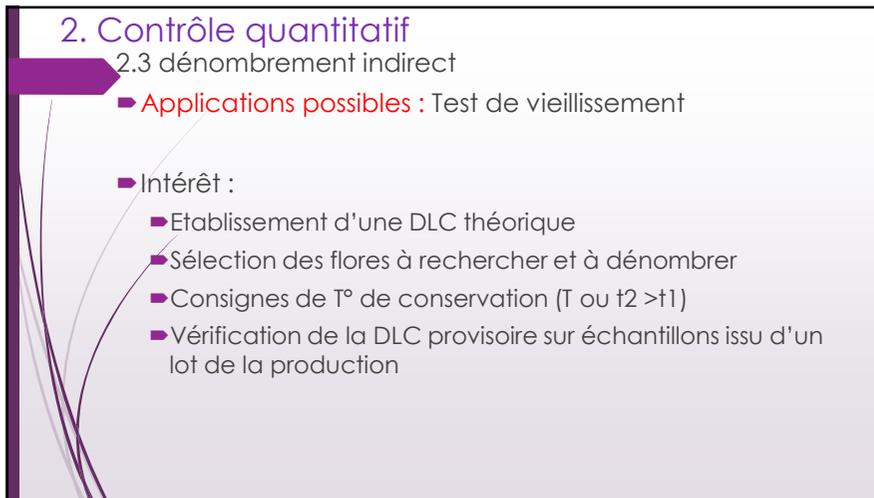
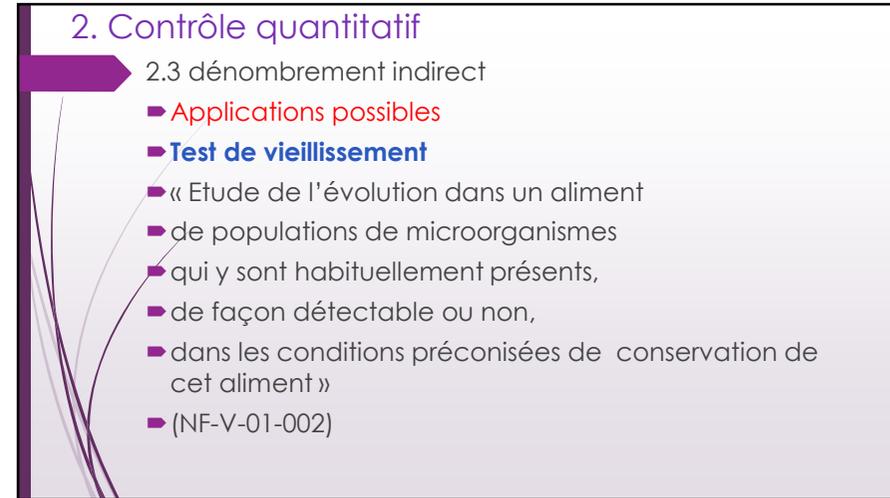
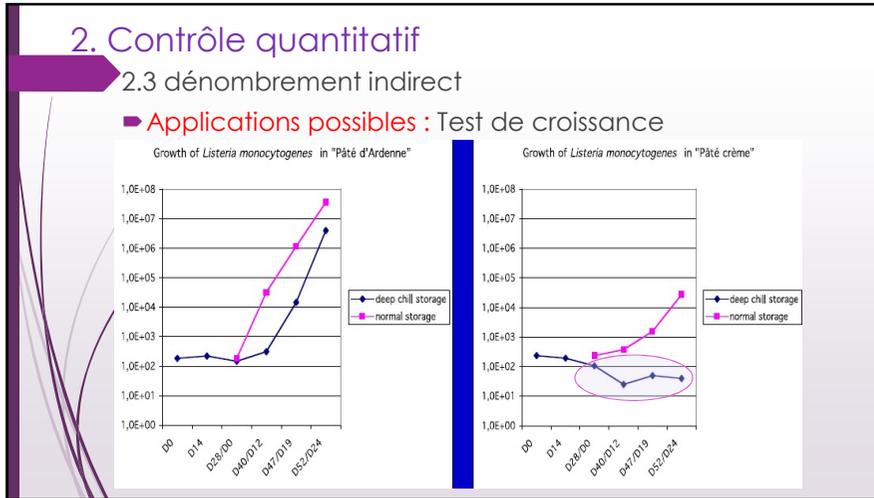
2. Contrôle quantitatif
 2.3 dénombrement indirect

- Applications possibles
- **Challenge test** : contrôle de la croissance d'une population microbienne
- = test de croissance

2. Contrôle quantitatif
 2.3 dénombrement indirect

- Applications possibles : Test de croissance
- Un test d'épreuve microbiologique
- (ou challenge test)
- consiste
- à introduire des bactéries pathogènes
- dans un produit
- et à observer leur croissance,
- leur stabilisation
- ou leur décroissance au sein de ce produit.





2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

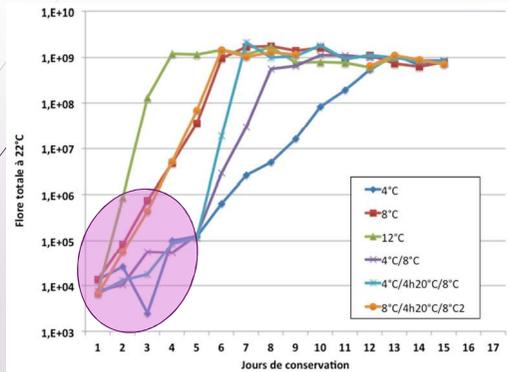
► Applications possibles : Test de vieillissement

PRODUIT CUIT	J0	J7	J14	J21	
	4 °C		8 °C		
dénombrements					
germes totaux aérobies	X	X	X	X	
germes totaux anaérobies	X	X	X	X	
entérobactéries	X	X	X	X	
Escherichia coli	X			X	
staphylocoques	X			X	
		J0	J7	J14	J21
résultats exprimés en cfu/g	4 °C		8 °C		
PRODUIT CUIT	J2	J7	J14	J21	
Germe aérobies totaux	7,30E+02	8,00E+02	1,10E+07	4,50E+07	
Germe anaérobies totaux	1,00E+01	8,00E+01	1,60E+06	1,10E+06	
Enterobacteriaceae	1,00E+01	1,00E+01	1,50E+06	3,40E+06	
Escherichia coli	<10			<10	
Staphylococcus aureus	<10			<10	

2. Contrôle quantitatif

2.3 dénombrement indirect

Applications possibles : Test de vieillissement



2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques

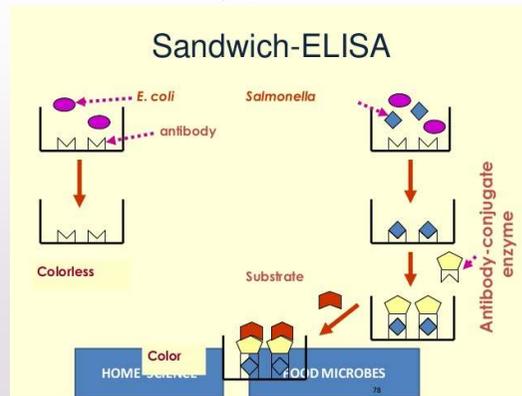
ELISA



2. Contrôle quantitatif

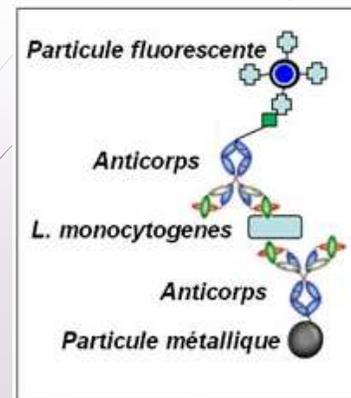
2.4 Techniques immunologiques

ELISA



2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques



2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques

ELFA



VIDAS[®] Campylobacter

Système de détection automatisée des pathogènes alimentaires

- Méthode standardisée et automatisée pour *Campylobacter*
- Détection rapide
- Technologie éprouvée.

2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques

ELFA 1 détection avec VIDAS CAM



Produits carnés ou produits à base de viande

Echantillons d'environnement de production

Bouillon CampyFood

Combibag et GENbox microaer
48 ± 4 h / 41,5 ± 1 °C

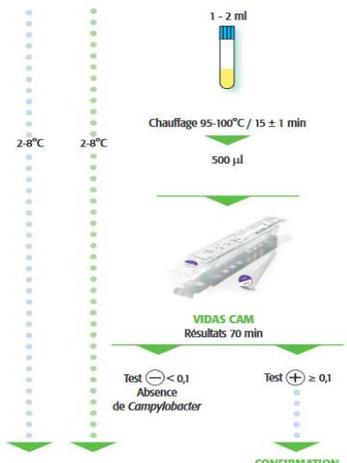
≤ 25 g ou 25 ml

Dilution 1:10

2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques

Couplage ELISA avec un composé phosphorescent bleu



1 - 2 ml

Chauffage 95-100°C / 15 ± 1 min

500 µl

VIDAS CAM
Résultats 70 min

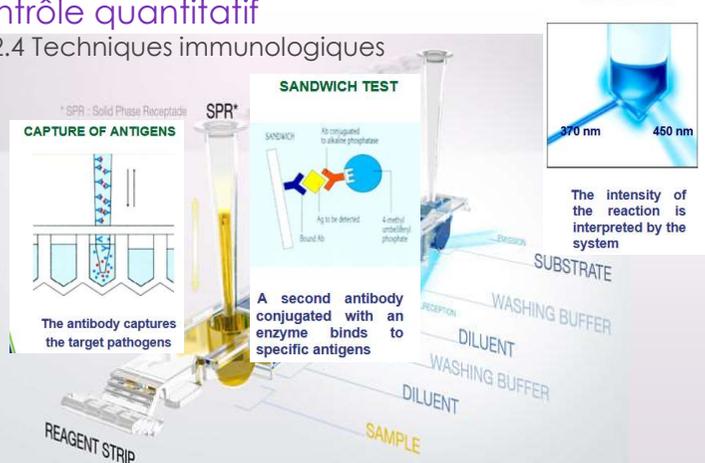
Test ⊖ < 0,1
Absence de *Campylobacter*

Test ⊕ ≥ 0,1
CONFIRMATION

2. Contrôle quantitatif

2.4 Techniques immunologiques

SANDWICH TEST



CAPTURE OF ANTIGENS

SPR* - Solid Phase Receptor

SANDWICH TEST

Ag to be detected

4-methyl umbelliferyl phosphate

REAGENT STRIP

SAMPLE

DILUENT

WASHING BUFFER

DETECTION

370 nm 450 nm

The intensity of the reaction is interpreted by the system

3. Contrôle indirect

3.1 détection par PCR

■ Polymerase chain reaction

1st cycle → **2nd cycle** → **3rd cycle** → **4th cycle** → ... → **30th cycle**

$2^2 = 4$ copies $2^3 = 8$ copies $2^4 = 16$ copies $2^{30} = 2$ billion copies

Exponential Amplification
Process is repeated, and the region of interest is amplified exponentially.

Denaturation
Temperature is increased to separate DNA strands

Annealing
Temperature is decreased to allow primers to base pair to complementary DNA template

Extension
Polymerase extends primer to form nascent DNA strand

3. Contrôle indirect

3.1 détection par PCR

- PCR-TaqMan :
- Vocabulaire qui dérive de Taq polymérase et de PacMan
- technique de PCR quantitative
- par détection en temps réel de la fluorescence

3. Contrôle indirect

3.1 détection par PCR

- obtention d'un signal fluorescent
- à partir d'une sonde bi-marquée
- augmentation de fluorescence (de la sonde) est proportionnelle au produit de PCR.
- la sonde = « sonde Taqman ».

3. Contrôle indirect

3.1 détection par PCR

Etape de polymérisation

quenchin **Sonde TaqMan**

R **Q**

molécule fluo. Reporter excitation 488 émission 520 nm
molécule fluo. Quencher excitation 310-émission 360-

Activité 5'-3' exonucléase de la Taq Polymérase

désintégration de la sonde Taqma
-> augmentation de la fluo. du

3. Contrôle indirect

3.1 détection par PCR

- spectre d'émission de reporter chevauche le spectre d'excitation de quencher.
- L'émission du reporter est atténué par la proximité du quencher.
- Si sonde dégradée
- via exonucléase (Taq)
- fluorophores ne sont plus reliés entre eux
- émission du reporter augmentée.

3. Contrôle indirect

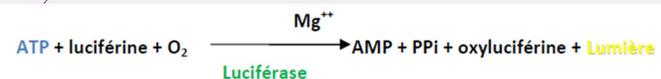
3.2 Mesure ATP-métrique

- permet une mesure rapide
- concentration de la biomasse active
- basée sur
- l'assimilation de l'Adénosine Triphosphate
- molécule essentielle à la vie

3. Contrôle indirect

3.2 Mesure ATP-métrique

- quantifiée par une réaction de bioluminescence.
- L'enzyme luciférase
- réaction entre la luciférine (substrat), l'ATP (cofacteur) et l'oxygène,



- ce qui entraîne une émission de lumière.

3. Contrôle indirect

3.2 Mesure ATP-métrique

- utilise un luminomètre
- quantité de lumière produite
- proportionnelle à la quantité d'énergie biologique présente dans l'échantillon.
- linéaire sur une grande échelle



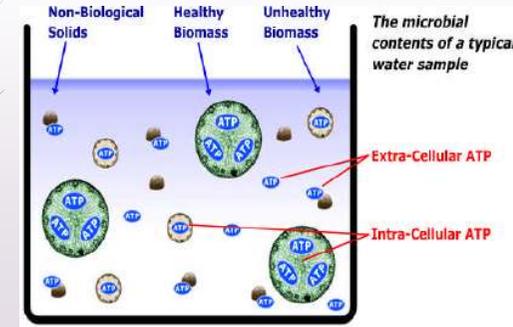
3. Contrôle indirect

3.2 Mesure ATP-métrique

- concentration de la biomasse vivante
- ATP intra-cellulaire (cATP)
- ATP contenu dans les cellules vivantes.

3. Contrôle indirect

3.2 Mesure ATP-métrique



3. Contrôle indirect

3.2 Mesure ATP-métrique

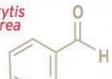
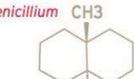
- l'échantillon
- soumis à une lyse bactérienne,
- permet de détruire les membranes cellulaires
- et de libérer le cATP
- Sa surveillance permet
- quantifier en temps réel la biomasse active vivante
- de suivre sa croissance sous des conditions optimales
- détecter en amont les dérives microbiologiques responsables de colmatages ou de corrosion des installations

3. Contrôle indirect

3.3 Recherche d'autres métabolites

- Nécessité de trouver des
- métabolites spécifiques

INDÉSIRABLES Les quatre principales molécules incriminées dans les mauvais goûts lors de vendanges altérées

<p>Benzaldéhydes</p> <p>Botrytis cinerea</p>  <p>Amande amère</p>	<p>Champignon frais</p>  <p>Penicillium + Botrytis</p> <p>1-octen-3-one</p> <p>Odeur caractéristique</p>	<p>Géosmine</p> <p>Penicillium</p>  <p>Betterave rouge</p>	<p>Vinaigre</p>  <p>Acétobacter</p> <p>Acide acétique</p> <p><chem>CC(=O)O</chem></p>
---	--	--	---

3. Contrôle indirect

3.3 Recherche d'autres métabolites

- Exemple : géosmine
- indicateurs de la présence active de moisissures
- Lien avec la biomasse

Conclusion

Nécessité de standardiser les techniques

- Biosécurité
 - Manipulation et inoculation de cultures de germes pathogènes

Permet les comparaisons
(avec des références, entre labo ...)

- Standardisation du protocole
- Choix des souches
- Préparation de l'inoculum (concentration, état physiologique)

Conclusion

Nécessité de standardiser les techniques

- Contrôle des conditions d'inoculation, de conditionnement et de conservation
- Nécessité de méthodes d'analyse, si possible, quantitatives les plus sensibles
- Nombre de répétitions et de lots à tester
- Expertise pour l'établissement du protocole et pour l'interprétation des résultats