

Université Djilali Bounaama de Khemis Miliana
Faculté des Sciences de la Vie et de la Nature et des sciences de la
Terre
Département de Biologie

Cours Techniques de contrôle microbiologique

DESTINÉ AUX ÉTUDIANTS DE LA LICENCE MICROBIOLOGIE

CHARGÉE DE MODULE : PR. GUETARNI H.

2024-2025

Introduction : rappels de microbiologie générale

- Au début du 18ème siècle, Antonie van Leeuwenhoek fut le premier à observer des « animalcules » grâce à des microscopes de sa fabrication. Il fallut cependant attendre 200 ans pour que la microbiologie connaisse un réel essor, amorcé avec les travaux fondateurs de Louis Pasteur et Robert Koch.
- La microbiologie est une discipline qui étudie les micro-organismes et leurs relations avec l'environnement.
- Les micro-organismes aussi appelés microbes et protistes, forment un ensemble d'organismes vivants microscopiques, invisibles à l'oeil nu. C'est leur seul point commun, car ils diffèrent et varient par leur morphologie, leur physiologie, leur mode de reproduction et leur écologie.

Techniques générales de manipulation : Matériel et techniques microbiologiques de base.

- Le contrôle microbiologique est l'opération de vérification de la qualité intrinsèque des produits alimentaires et non alimentaires, destinés à la consommation et l'utilisation humaine et animale.
- Cette opération est la recherche et le dénombrement des microorganismes d'altération et pathogènes dont la réalisation impose le recours aux méthodes d'analyses en utilisant des milieux de culture, des réactifs et d'autres équipements.
- Le but du contrôle est de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande et de minimiser les pertes. Il permet d'éviter la présence de microorganismes pathogènes dans les produits afin de ne pas risquer une altération de la qualité hygiénique des produits finis ou, au moins de détecter ces microorganismes s'ils sont présents dans les produits finis avant leur commercialisation. Une altération de la qualité hygiénique met en cause la santé du consommateur (intoxications alimentaires).

Le matériel de laboratoire de microbiologie:

- Microscopes et lames :
- On utilise différents types de microscopes pour observer visuellement la morphologie et la motilité des bactéries, ainsi que les réactions de coloration et de fluorescence. Pour ce qui est des lames, les choix sont multiples, selon la fonction endossée par le laboratoire (lames en verre plates classiques, les lames concaves permettant de contenir un échantillon de liquide, et les lames à grilles imprimées permettant de compter les cellules).
- Plaques chauffantes :Elles sont réputées bien plus sûres que les becs Bunsen traditionnels, car elles n'ont pas recours à des flammes nues.
- Réfrigérateur :Les réfrigérateurs servent d'endroit de stockage pour les produits chimiques, solutions, antibiotiques, sérum s et réactifs biochimiques sensibles à la température, lesquels sont conservés à basse température, voire congelés.

- Autoclave :Un autoclave constitue le cœur d'un laboratoire de microbiologie. On l'utilise non seulement pour stériliser des substances liquides, telles que des milieux de culture préparés et des solutions salines, mais aussi pour stériliser de la verrerie, si nécessaire.
- Incubateur microbiologique :La croissance profuse des microbes s'obtient au laboratoire si on les cultive à des températures adaptées à chaque microbe.
- Hottes à flux laminaire :est une station de travail fermée que l'on utilise pour créer un environnement de travail non contaminé grâce à un système de flux d'air filtré HEPA (high-efficiency particulate air ou filtre à particules aériennes à haute efficacité).

TECHNIQUES DE BASE AU LABORATOIRE DE MICROBIOLOGIE

Sécurité au laboratoire

- Installation du poste de travail.
- Alimentation en gaz et en eau du laboratoire.
- Utilisation du Bec Bensen.
- Nettoyage de la paillasse.
- Lavage des mains.
- **Transferts, suspensions et dilutions en série:**
 - **Réalisation d'une suspension microbienne:**

Réalisation de dilutions en série de raison 10 (au 1/10°): La dilution en série est une réduction systématique d'une entité connue ou inconnue (un soluté, un organisme, etc.) par une re-suspension successive d'une solution initiale (solution₀) en volumes fixes d'un diluant liquide (blancs). Ces blancs se composent généralement de 0,45% salin, bien que la composition peut être variée. Bien qu'un expérimentateur puisse choisir n'importe quel volume pour chaque diluant, il s'agit le plus souvent d'un multiple de 10, ce qui facilite la réduction logarithmique de l'échantillon

Techniques microscopiques:

- Etat frais
- Frottis
- Coloration de Gram
- Utilisation du microscope

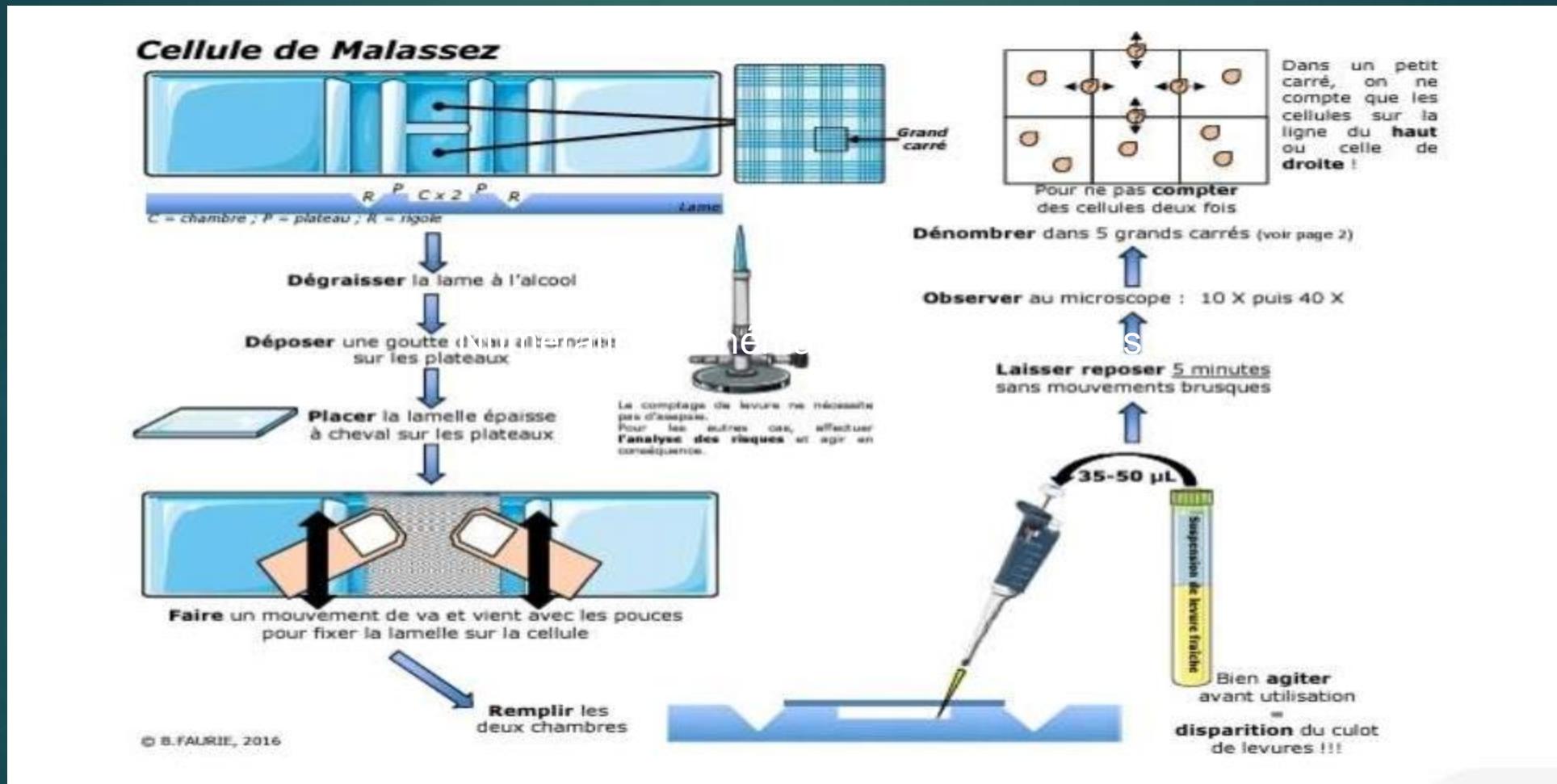
Techniques de culture des micro-organismes:

- Séchage des boîtes
- Isolement

Techniques de quantification des micro-organismes

- Mesure de la densité optique au spectrophotomètre: On se place en mode de mesure appelé "absorbance" (A) ou "densité optique" (OD). L'appareil va mesurer le logarithme décimal du rapport du flux de référence au flux transmis. La valeur ainsi affichée compte 2 composantes additives, l'effet du à la biomasse et l'effet du au milieu de culture. L'effet du au milieu de culture correspond à l'absorbance propre des composants du milieu et un éventuel trouble du milieu. La composante OD due à la biomasse est la conséquence de la turbidité due à la biomasse et aussi éventuellement d'une absorbance de "pigments absorbants" de la biomasse.

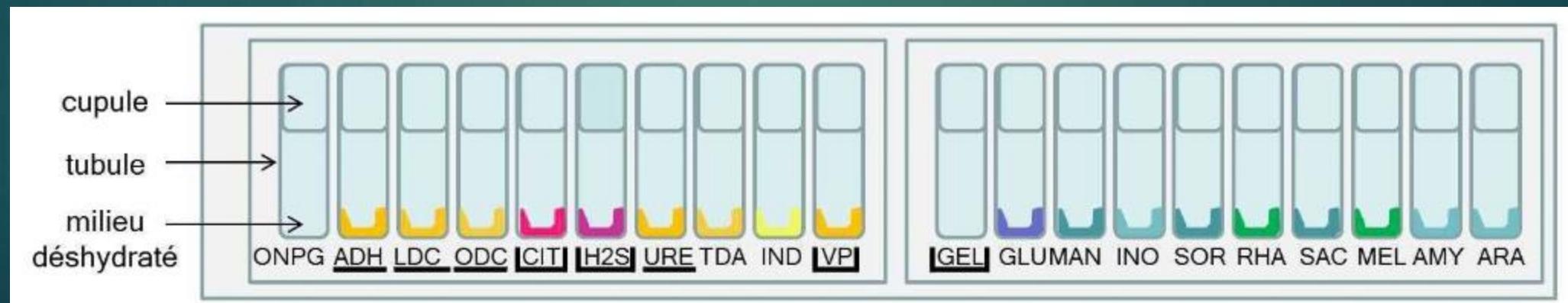
• Numération à l'hématimètre des levures:

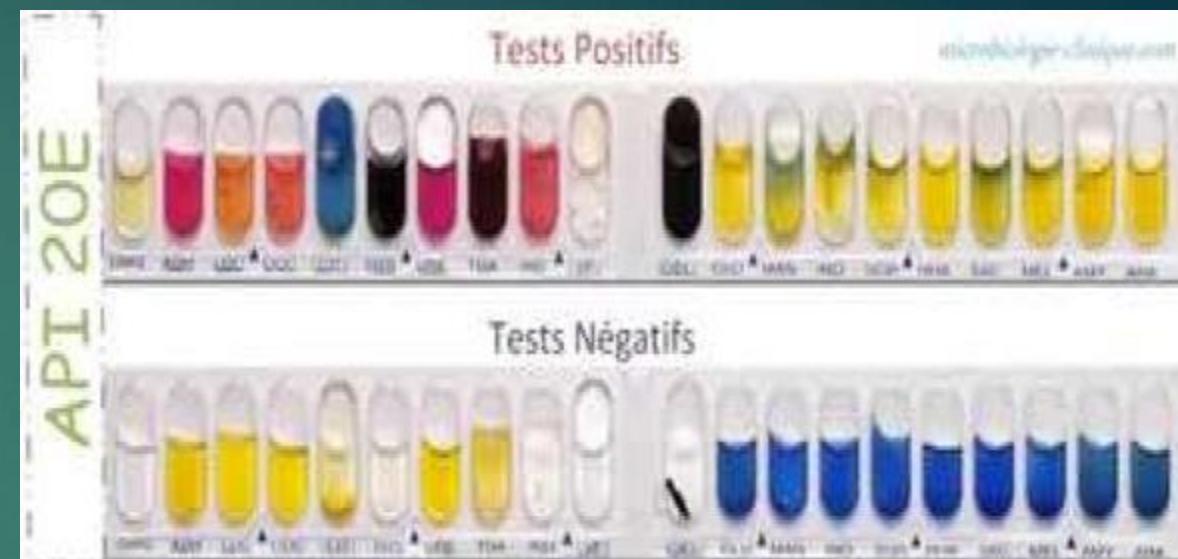
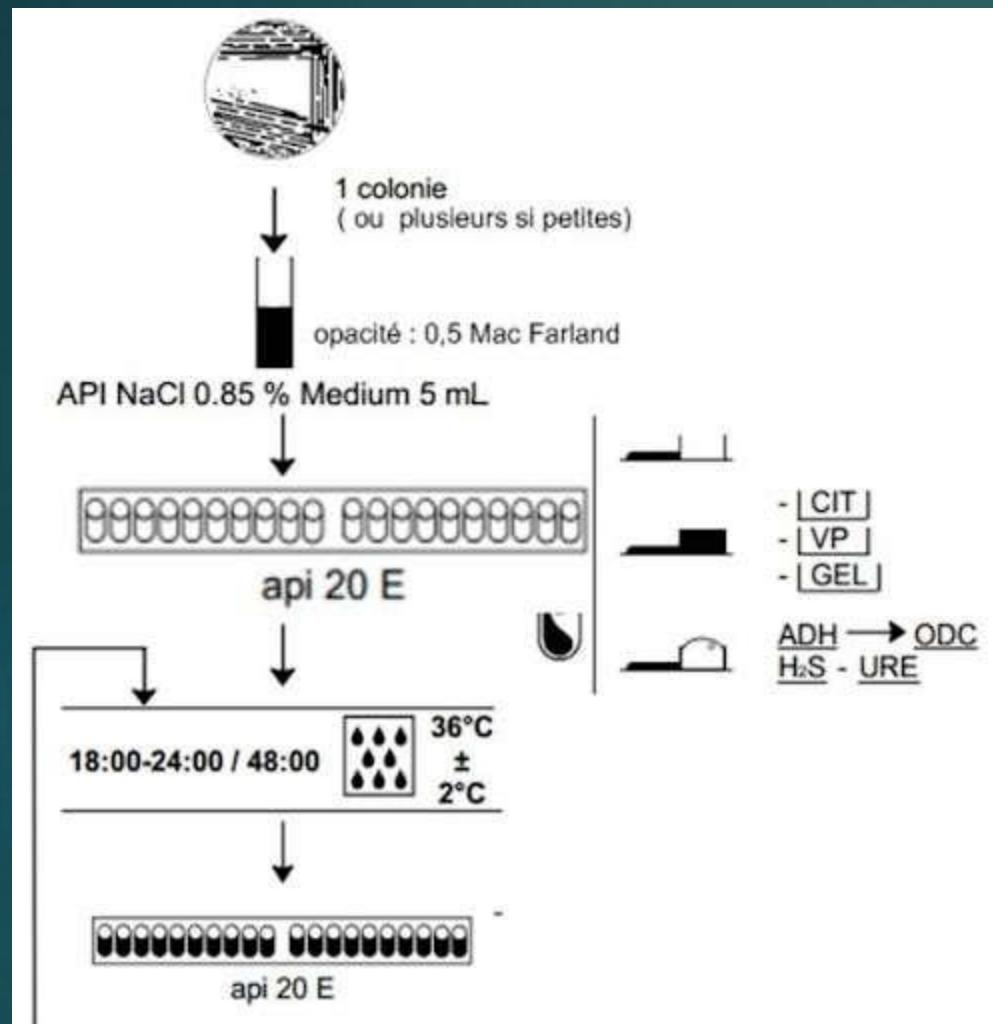


- Dénombrément en surface.
- Dénombrément dans la masse (en boîte).

Techniques d'identification microbienne

- Ensemencement d'une galerie API
- Les galeries API ou également appelées galeries de tests biochimiques miniaturisés se présentent sous la forme d'une série de petits tubes, nommés tubules, correspondant chacun à un test biochimique spécifique. Chaque tubule est ouvert à son extrémité supérieure par une cupule pouvant être remplie, ou non, de liquide afin de placer le tube dans des conditions particulières. Chaque tube contient un substrat défini (ONPG, ADH, GEL...) et avec lequel les micro-organismes réagissent différemment.





Milieux et techniques générales de culture

- Les milieux de cultures sont indispensables à la multiplication bactérienne, ce qui permet par la suite l'identification ainsi que l'étude de la sensibilité aux antibiotiques lorsque la bactérie est isolée en culture pure.
- Un milieu de culture est une préparation qui doit satisfaire les exigences nutritives du micro-organisme étudié et posséder les propriétés physico-chimiques convenant à cette culture:
 - Couvrir les besoins en ions minéraux, en facteurs de croissance, apporter la source de carbone, d'énergie et d'azote.
 - Présenter un pH voisin au pH optimal, une pression osmotique et une viscosité adéquate.
- La plupart de ces milieux microbiologiques sont produits par les principaux fournisseurs de milieux déshydratés, notamment Oxoid, HiMedia, BD Diagnostics et Millipore.

Classification des milieux de culture

Il existe différentes classifications des milieux de culture :

- **Classification selon la composition**

- 1. Milieu complexe empirique (naturel) :**

On retrouve des extraits de viande, des extraits de levure, les peptones. Exemple : Milieu cœur cervelle BHIB (Brain Heart Infusion Broth).

- 2. Milieu semi-synthétique :**

Au milieu complexe sont rajoutées des substances chimiques bien définies, ceci concerne les produits ayant un intérêt pour la bactérie, comme les facteurs de croissance (Exp. Gélose enrichie au sang de mouton).

- 3. Milieu synthétique :**

Ce sont des milieux utilisés dans la mise en évidence d'une réaction enzymatique précise, Exemple : Milieu de Ferguson.

Classification selon la consistance

1. Milieu liquide :

Exemple : Milieu de Clark et Lubs, Bouillon d'enrichissement.

2. Milieu solide ou gélosé :

C'est un milieu liquide solidifié par addition d'Agar à une concentration de 1 à 1.7%.

Exemple : Milieu de Chapman, TSI.

C. Milieu semi-liquide, semi-solide, ou faiblement gélosé :

La concentration en Agar est plus faible que celle du milieu gélosé, elle est comprise entre 0,05-0,075%.

Exemple : Milieu Mannitol mobilité, MEVAG.

Classification selon l'utilisation

1. Milieux usuels ou de base :

Permettent la culture de bactéries non exigeantes. Exemple : Gélose nutritive et bouillon nutritif.

2. Milieux enrichis :

Contiennent les composants indispensables aux bactéries, mais qu'elles ne peuvent synthétiser, on parle de bactéries exigeantes. Exemple : Gélose au sang simple, ou additionnée aux vitamines

3. Milieux d'enrichissement :

Il s'agit de milieux liquides riches permettant le développement d'un maximum de bactéries.
Exemple : Bouillon pour hémoculture, BGT (Bouillon Glucosé Tamponné).

4. Milieux sélectifs :

Permettent la pousse d'un seul type bactérien, pour cela on utilise des inhibiteurs pour réprimer les autres genres, ex : Gélose Hektoen qui permet la culture des BGN, bacilles Gram négatifs non exigeants, la gélose contient la bile inhibitrice des BGP.

5. Milieux électifs :

Permettent la pousse favorable d'un genre bactérien par rapport aux autres sans leur destruction,

ex : Eau peptonée alcaline (EPA), dont l'alcalinité favorise la pousse du *Vibrio* (germe responsable du choléra).

6. Milieux d'identification :

Permettent l'étude du métabolisme biochimique des bactéries, ex : TSI (Tri Sugar Iron.), Milieu de Ferguson.

7. Milieux de conservation :

Selon leur composition, on peut conserver aussi bien les bactéries non exigeantes que les bactéries exigeantes :

-Pour les non exigeantes, on utilise un milieu solide qui est une gélose profonde en capillaires que l'on conserve à température ambiante.

-Pour les bactéries exigeantes, on utilise un milieu liquide qui est du BGT + Glycérol que l'on congèle à -80°C.

8. Milieux de transport :

Il existe plusieurs types en fonction de la bactérie à transporter et de sa fragilité, Exemple : TGV (milieu de transport de germes vivants).

Milieu au charbon pour les bactéries fragiles.

9. Milieux pour antibiogramme :

Exemple : Mueller Hinton simple ou enrichi au sang, dont la composition est proche de celle des liquides biologiques, de ce fait l'activité des antibiotiques *in vivo* est comparable à celle obtenue *in vitro* après diffusion sur la gélose.

10. Milieux chromogènes ou milieux différentiels :

Permettent l'identification directe de certaines espèces bactériennes sans avoir recourt à une galerie biochimique ou l'orientation vers certains groupes bactériens, la gélose renferme des substrats incolores dont la dégradation par les enzymes respectives apportées par des bactéries conduit à des colonies colorées.

Exemple : Milieu uriselect (BioMérieux), qui contient de l'urée comme substrat pour l'uréase.

Classification selon le mode de stérilisation

Il existe 02 types de milieux :

-Milieux autoclavables : milieu de culture dont les composants ne sont pas détruits par la chaleur,

Exemple : milieu gélose nutritive, Mueller Hinton en flacons.

-Milieux non autoclavables : Milieux de culture qui contiennent des produits labiles pouvant être détruit par la chaleur,

Exemple : Loweinstein-Jensen (cultiver les mycobactéries -> Tuberculose).