

Techniques d'analyse en microbiologie alimentaire

Le contrôle microbiologique des aliments constitue une étape fondamentale dans l'évaluation de la sécurité sanitaire et de la qualité des produits destinés à la consommation.

1. Objectifs du contrôle microbiologique des aliments

- Vérifier la conformité réglementaire
- Évaluer l'hygiène des procédés de fabrication
- Identifier les sources de contamination
- Développer des stratégies de maîtrise des dangers biologiques.

2. Cadres réglementaires des analyses microbiologiques des aliments

- Dans le cadre des autocontrôles : directement par les entreprises elles-mêmes (PMS)
- Dans le cadre des contrôles officiels par les autorités sanitaires publiques

3. Prélèvements et échantillonnage

Échantillonnage : processus planifié qui consiste à sélectionner, de manière représentative, une fraction d'un lot (l'échantillon) dans le but de réaliser des analyses dont les résultats seront extrapolés à l'ensemble de ce lot. Cette opération inclut la définition du plan de prélèvement

Prélèvement : Opération technique concrète qui consiste à extraire physiquement une ou plusieurs unités (l'échantillon) du lot. C'est la mise en œuvre pratique de la stratégie d'échantillonnage.

3.1.Principes fondamentaux de l'échantillonnage

Selon l'ISO 7218:2024, le laboratoire doit recevoir un échantillon remplissant trois conditions:

- Représentatif du lot
- Non endommagé
- Non altéré

Le respect strict des conditions d'asepsie pendant toutes les manipulations est impératif pour éviter toute contamination externe susceptible de fausser les résultats.

3.2.Protocole de l'échantillonnage

Plusieurs paramètres essentiels doivent être consignés pour assurer la traçabilité :

- la nature et l'origine précise du produit,
- la date et l'heure exactes du prélèvement,
- le numéro d'identification pour chaque échantillon,
- les coordonnées complètes du demandeur,
- la liste détaillée des analyses requises.
- Conditions de prélèvement

Le nombre d'unités à prélever varie selon la nature du produit alimentaire. La réglementation recommande cinq unités de 100 grammes, formant ainsi un échantillon total de 500 grammes. Cependant, certains produits spécifiques nécessitent des approches différentes en fonction des caractéristiques et des risques microbiologiques particuliers à chaque catégorie de denrées.

3.3. Conditions de conservation et de transport

La livraison au laboratoire doit être rapide, avec un maintien des conditions de stockage d'origine jusqu'à la réception. Les régimes thermiques appliqués sont fonction de la nature du produit :

- Les produits stables peuvent être transportés à température ambiante, entre 18°C et 27°C.
- Les produits périssables nécessitent une conservation entre +0 et +4°C,
- Les produits congelés ou surgelés requièrent une température inférieure à -18°C.

3.4. Réception des échantillons au laboratoire

- Contrôle visuel et documentaire.
- Echantillons périssables : température de réception L'examen microbiologique doit être initié le plus rapidement possible après la réception.
- Echantillons en attente d'analyse doivent être stockés dans des conditions préservant la charge microbienne initiale.
- Le délai maximal pour entamer l'analyse des produits périssables est de 24 heures.

3.5. Manipulation des échantillons

3.6.1 Homogénéisation et préparation de la suspension mère

- Homogénéiser l'échantillon pour assurer une répartition uniforme des micro-organismes dans la matrice alimentaire :
 - ✓ denrées liquides : agitation vigoureuse,
 - ✓ produits solides ou semi-solides : broyage mécanique

À partir de cet homogénat, on prépare systématiquement une suspension mère. Le choix du diluant dépend de la nature du produit et des micro-organismes ciblés.

3.6.2. Préparation des dilutions décimales successives

Cette opération s'effectue dans des tubes contenant 9 mL de diluant stérile, permettant d'obtenir des dilutions successives

4. Analyses microbiologiques

Elles reposent sur deux approches complémentaires : qualitative et quantitative

4.1. Analyses quantitatives : dénombrements microbiens

- Elles visent à déterminer la concentration de micro-organismes viables présents dans un produit alimentaire.
- Elles reposent sur le dénombrement des colonies obtenues après ensemencement sur milieux de culture, fournissant une évaluation numérique précise de la charge microbienne, exprimée en unités formant colonie (UFC) par gramme ou millilitre.
- Le choix des paramètres d'analyses dépend de

- du type de micro-organisme
- de la matrice analysée (grasse, sèche, gluante, fibreuse, liquide) ;
- de la présence éventuelle de flore compétitive ou d'inhibiteurs,
- de la sensibilité du microorganisme à la chaleur ou à l'oxygène ;
- des exigences réglementaires applicables.

Les méthodes de dénombrement microbien reposent principalement sur deux approches de culture :

4.1.1. Dénombrement sur milieux solides

Deux approches principales sont utilisées :

A. Ensemencement en profondeur

- Un volume défini de la dilution est placé dans une boîte de Petri stérile.
- On ajoute 15–20 mL de milieu gélosé fondu, puis on homogénéise soigneusement.

Cette méthode est particulièrement adaptée aux micro-organismes aérobies stricts

B. Ensemencement en surface

- Un volume plus faible (0,1 mL) de l'inoculum est déposé sur la surface d'une gélose préalablement coulée et séchée.
- L'étalement est réalisé à l'aide d'un étaleur stérile, en veillant à une répartition uniforme.
- Cette méthode préserve les micro-organismes sensibles à la chaleur et facilite l'observation de la morphologie coloniale.

4.1.1.1. Calcul et expression des résultats sur milieu solide

Les règles de calcul et d'expression des résultats sont conformes aux normes internationales ISO 7218, ISO 4833-1 et ISO 14461-2

4.1.1.1.1. Règles générales de comptage

- Ne compter que les boîtes contenant entre 15 et 300 colonies pour un dénombrement total, ou entre 15 et 150 colonies pour un dénombrement de colonies caractéristiques

4.1.1.1.2. Calcul standard après simple comptage à partir de deux dilutions successives

Lorsque deux dilutions successives donnent des comptages dans la plage valide, le calcul de la concentration en micro-organismes N présents dans l'échantillon essai est une moyenne pondérée à partir des résultats de 2 dilutions successives.

$$N = \frac{\sum C}{V \times (n_1 + 0.1 \times n_2) \times d}$$

Soit :

- ✓ Σc = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues
- ✓ V = volume inoculum appliqué à chaque boîte (en général exprimé en mL).
- ✓ n_1 = nombre de boites retenues à la première dilution
- ✓ n_2 = nombre de boites retenues à la deuxième dilution.
- ✓ d = taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Retenir comme résultat le nombre de microorganismes par millilitre (produit liquide) ou par gramme (autre produit), exprimé par un nombre entre 1,0 et 9,9 multiplié par la puissance appropriée de 10.

Unité : UFC/g (produits solides) ou UFC/mL (produits liquides).

4.1.1.1.3. Estimation des petits nombres (moins de 15 colonies sur la première boîte retenue)

Exprimer le résultat comme suit:

— pour les produits liquides: nombre estimé de micro-organismes par millilitre: $N = y$

— pour les autres produits: nombre estimé de micro-organismes par gramme: $N = y/d$

où d est le taux de dilution de la suspension mère.

Si les deux boîtes, au niveau de l'échantillon pour essai (produit liquide) ou de la suspension mère (autre produit), ne contiennent aucune colonie, exprimer le résultat comme suit:

- moins de 1 micro-organisme par millilitre (produit liquide)
- moins de $1/d$ micro-organisme par gramme (autre produit)

4.1.1.1.4. Calcul lorsque le comptage est suivi d'une identification

Lorsque la méthode utilisée nécessite une identification, un nombre déterminé A (en général 5) de colonies sont repiquées à partir de chacune des boîtes retenues pour le comptage des colonies. Après identification, on calcule, pour chacune des boîtes, le nombre probable a de micro-organismes identifiés par la formule :

$$a = \frac{b}{A} \times C$$

où :

- A = nombre de colonies sélectionnées pour confirmation ou identification)
- b = nombre colonies répondant aux critères d'identification ou de confirmation.
- C = nombre total de colonies dénombrées

On utilise ensuite la formule générale en remplaçant $\sum C$ par $\sum a$.

$$N = \frac{\sum a}{V(n_1 + 0,1n_2)d}$$

4.1.1.1.5. Cas particuliers

- Dénombrement sur une seule dilution valide : Si une seule dilution donne un nombre valide de colonies (entre 15 et 300), utiliser la formule :

$$N = \frac{C}{V \times d}$$

- Toutes les boîtes ont plus de 300 colonies, on rapporte « $> 300/d$ UFC/g ou mL » où d est la dilution la plus élevéeensemencée.

4.1.1.2. Principales flores évaluées

4.1.1.2.1. Flore aérobie mésophile totale (FAMT)

Elle représente l'ensemble des micro-organismes aérobies capables de se développer à 30°C. Son dénombrement, réalisé selon la norme ISO 4833-1:2013 suit le protocole suivant : après préparation des dilutions décimales, un volume de 1 mL de chaque dilution est incorporé dans des boîtes de Pétri stériles. Le milieu gélosé Plate Count Agar (PCA), maintenu à 47°C, est ensuite ajouté et homogénéisé. Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 72 heures.

Les résultats, exprimés en UFC/g ou UFC/mL, permettent de juger la propreté du procédé de fabrication et la durée de conservation du produit.

4.1.1.2.2. Entérobactéries (*Enterobacteriaceae*)

La méthode de routine est définie par la norme ISO 21528-2:2017.

Le milieu Violet Red Bile Glucose (VRBG) est utilisé avec une incubation à 37°C pendant 24 heures. Les colonies caractéristiques présentent une coloration rouge avec centre violacé. La présence d'un nombre élevé d'entérobactéries indique souvent une contamination croisée ou une maîtrise insuffisante des températures ou de nettoyage-désinfection.

4.1.1.2.3. Coliformes totaux et thermotolérants

Le dénombrement des coliformes totaux et thermotolérants est un indicateur classique de l'hygiène des procédés et de contamination fécale potentielle. La méthode de référence pour le dénombrement par inclusion en gélose est décrite dans la norme ISO 4832:2006.

Le dénombrement s'effectue sur gélose Violet Red Bile Lactose (VRBL) à 30–37 °C pour les coliformes totaux, et à 44 °C pour les coliformes thermotolérants.

Les colonies typiques sont rouges, entourées d'un halo clair. Pour les produits à faible contamination, on utilise la méthode du nombre le plus probable (NPP) dans le bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB).

4.1.1.2.4. *Escherichia coli*

La recherche spécifique d'*Escherichia coli* en tant qu'indicateur de contamination fécale directe revêt un paramètre clé en sécurité alimentaire. La majorité des souches sont commensales, mais certaines, comme *E. coli* O157:H7, sont pathogènes.

Le dénombrement est réalisé sur gélose Tryptone Bile X-glucuronide (TBX) à 44 °C pendant 24 h. Les colonies typiques apparaissent bleu-vert. La méthode est décrite dans la norme ISO 16649-2:2001

4.1.1.2.5. Staphylocoques à coagulase positive

Le dénombrement des staphylocoques à coagulase positive, dominés par *Staphylococcus aureus*, s'effectue selon la norme ISO 6888-1:1999/Amd 1:2003. La méthode utilise la gélose Baird-Parker, avec une incubation à 37°C pendant 24 à 48 heures. Les colonies typiques sont noires, brillantes, entourées d'un halo clair. Une confirmation par test de coagulase est indispensable pour établir la pathogénicité des souches isolées.

La détection de *S. aureus* en nombre significatif révèle généralement des pratiques d'hygiène déficientes du personnel ou un maintien prolongé des produits à température ambiante, conditions favorisant la production d'entérotoxines responsables d'intoxications alimentaires.

4.1.1.2.6. Anaérobies sulfito-réducteurs (ASR)

Les anaérobies sulfito-réducteurs regroupent principalement les bactéries du genre *Clostridium*, dont *Clostridium perfringens*, et constituent des indicateurs précieux de l'efficacité des traitements thermiques et de l'hygiène générale. Ces bactéries sont dénombrées selon la norme ISO 15213:2003 en utilisant la gélose Tryptose Sulfite Neomycin (TSN) incubée à 46°C pendant 48 heures en conditions anaérobies strictes. La réduction des sulfites en sulfures confère aux colonies une coloration noire caractéristique.

4.1.1.2.7. *Pseudomonas* spp.

Leur dénombrement est réalisé selon la norme ISO 13720 par ensemencement en surface sur la gélose sélective CFC (Cétrimide, Fucidine, Céphaloridine) et incubation à 25 °C pendant 48 heures. Les colonies caractéristiques, d'aspect translucide, plates à légèrement convexes et parfois pigmentées, sont soumises à une confirmation par le test à l'oxydase, qui est positif pour *Pseudomonas*.

Un nombre élevé de *Pseudomonas* indique une altération précoce des produits carnés réfrigérés due souvent à des défauts de chaîne du froid ou une contamination post-traitement.

4.1.1.2.8. Dénombrement des levures et moisissures

Les levures et moisissures sont des indicateurs essentiels de l'altération fongique des aliments. Leur dénombrement permet d'évaluer :

- ✓ La qualité microbiologique et la stabilité des produits
- ✓ L'efficacité des procédés de conservation
- ✓ Les risques associés aux mycotoxines (produites par certaines moisissures)
- ✓ La conformité aux critères réglementaires pour certains aliments sensibles

Leur dénombrement se fait selon la norme ISO 21527:2008. **Les mêmes principes que pour les bactéries s'appliquent. L'ensemencement se fait en profondeur ou en surface, en utilisant :**

- Gélose chloramphénicol (Yeast Extract Glucose Chloramphenicol Agar – YGC) : milieu standard.
- Gélose à l'extrait de malt chloramphénicol (MEA) : pour les produits à forte activité en eau

L'incubation se fait à T 25°C pendant 5 à 7 jours. Boîtes incubées à l'endroit (non retournées)

- Levures : Colonies généralement lisses, bombées, crémeuses, de taille réduite
- Moisissures : Colonies duveteuses, aérées, souvent pigmentées, développement mycélien visible

En cas de doute : faire un examen microscopique

4.1.2. Dénombrement en milieu liquide : méthode du Nombre le Plus Probable (NPP)

C'est une technique de dénombrement statistique utilisée lorsque la concentration microbienne est trop faible pour permettre un comptage fiable sur milieu solide

On utilise généralement 3 ou 5 tubes parallèles pour chaque dilution décimale testée. Après l'incubation, on note pour chaque dilution le nombre de tubes positifs. La combinaison obtenue est reportée dans une table de McCrady qui fournit directement la valeur du NPP/gr ou mL.

Exemple: Recherche et confirmation d'*Escherichia coli* par la méthode NPP (ISO 7251: 2005)

Après un dénombrement présomptif des coliformes thermotolérants (incubation à 44 °C), les tubes positifs (production de gaz) sont repiqués dans un bouillon EC (*Escherichia coli* broth). Ce milieu, incubé à 44 °C, permet la croissance sélective d'*E. coli* tout en inhibant la plupart des autres bactéries. La production de gaz dans les tubes de Durham après 24 h confirme la présence d'*E. coli*.

a. **Étape présomptive (coliformes thermotolérants) :**

Ensemencement en NPP dans du bouillon lactosé bilié au vert brillant (BLBVB).
Incubation à 44 C° pendant 24 à 48 h. Tubes positifs : production de gaz

b. **Étape de confirmation (*E. coli*)**

À l'aide d'une anse stérile, prélever une goutte de chaque tube BLBVB positif et l'inoculer dans un tube de bouillon EC. Incuber à 44 °C pendant 24 h ensuite observer la production de gaz.

c. **Interprétation :**

Un tube EC positif confirme la présence d'*E. coli* dans le tube correspondant.
Seuls les tubes EC positifs sont comptabilisés pour le calcul final du NPP.

Le NPP est déterminé à partir de la combinaison des tubes EC positifs (et non plus des tubes BLBVB positifs).

4.2. Analyse qualitative : recherche de germes pathogènes

- Elles ont pour objectif de détecter la présence ou l'absence de micro-organismes pathogènes dans une quantité définie de produit.
- Elles ne fournissent pas d'estimation numérique

4.2.1. Recherche de *Salmonella* spp.

Elle est régie par la norme ISO 6579-1:2017. Le protocole comprend quatre étapes successives :

- ✓ Le pré-enrichissement non sélectif s'effectue dans l'eau peptonée tamponnée (EPT), incubée à 37 °C pendant 18 à 24 heures
- ✓ L'enrichissement sélectif se réalise dans les bouillons Rappaport-Vassiliadis soja (RVS) à 42 °C et Müller-Kauffmann tétrathionate novobiocine (MKTTn) à 37 °C pendant 24 heures.
- ✓ L'isolement sur les géloses sélectives et différentielles telles que Xylose Lysine Deoxycholate (XLD) et Hektoen Enteric (HE). Les colonies suspectes sont rouges à centre noir sur XLD, ou bleu-vert à centre noir sur HE.
- ✓ La confirmation réalisée à l'aide de tests biochimiques et de tests sérologiques

L'absence de *Salmonella* dans 25 g d'échantillon est exigée. Sa présence traduit une contamination d'origine fécale ou une rupture des conditions d'hygiène durant la transformation.

4.2.2. Recherche de *Listeria monocytogenes*

Sa détection suit le protocole de la norme ISO 11290-1:2017 qui comprend :

- Le pré-enrichissement dans le bouillon demi-Fraser incubé à 30 °C pendant 24 heures ;
- L'enrichissement sélectif dans le bouillon Fraser incubé à 37 °C pendant 48 heures ;
- L'ensemencement sur gélose ALOA (Agar Listeria selon Ottaviani et Agosti) et PALCAM permet une identification présomptive grâce à la réaction chromogène : les colonies de *L. monocytogenes* apparaissent bleu-vert entourées d'un halo opaque.
- Confirmation par tests biochimiques et tests sérologiques.

L'absence de *Listeria monocytogenes* dans 25 g est exigée pour les produits prêts à consommer. Sa présence témoigne d'une contamination post-process et d'un défaut de maîtrise de l'environnement industriel.

5. Interprétation des résultats et décision

5.1. Plans d'échantillonnage : principes statistiques d'interprétation

Les plans d'échantillonnage constituent un outil méthodologique essentiel pour l'évaluation de la qualité microbiologique d'un lot alimentaire. Ils sont caractérisés par quatre paramètres fondamentaux :

- **n** : nombre d'unités prélevées et analysées ;
- **c** : nombre maximal d'unités non conformes admises pour que le lot soit accepté ;
- **m** : valeur seuil en dessous de laquelle le résultat est considéré comme conforme ;
- **M** : valeur limite supérieure au-delà de laquelle le lot est automatiquement jugé non conforme.

Deux types de plans sont classiquement distingués

A. Plans à deux classes

Ils sont utilisés pour les critères de sécurité des aliments, notamment la recherche de pathogènes. Ils comportent uniquement deux catégories :

- ✓ Conforme : absence du micro-organisme ou valeur $\leq m$;
- ✓ Non conforme : présence détectée ou valeur $> m$.

B. Plans à trois classes

Ils concernent les indicateurs d'hygiène du procédé. L'évaluation se fait selon 3 niveaux :

- ✓ Satisfaisant : toutes les unités analysées présentent une valeur $\leq m$;
- ✓ Acceptable : lorsqu'un nombre limité d'unités (au plus c) présente des valeurs comprises entre m et M
- ✓ Non satisfaisant : lorsqu'une ou plusieurs unités dépassent la valeur M.

5.2. Critères microbiologiques

A. Critères de sécurité des denrées alimentaires

Ils concernent les microorganismes pathogènes (par ex. *Salmonella spp.*, *Listeria monocytogenes*).

Leur présence est incompatible avec la mise sur le marché

B. Critères d'hygiène du procédé

Ils permettent d'apprécier la maîtrise de la fabrication et du nettoyage (ex. *E. coli*, *Enterobacteriaceae*, *Staphylococcus aureus*).

Cas particulier : Application des techniques de contrôle dans le cadre des TIAC

Les TIAC constituent une urgence sanitaire dans laquelle les techniques d'analyse microbiologique sont appliquées de façon spécifique, dans un objectif d'investigation sanitaire.

L'enquête microbiologique vise ces objectifs principaux :

- Identifier l'aliment incriminé parmi ceux consommés ;
- Isoler et caractériser l'agent pathogène responsable ;
- Relier les souches isolées chez les malades et dans les aliments par des méthodes de typage
- Déterminer l'origine de la contamination

.1. Le rôle des plats témoins

Ce sont des échantillons alimentaires prélevés lors du service et conservés dans le but de permettre une analyse microbiologique en cas d'incident sanitaire. Ils fournissent un échantillon représentatif du repas servi, permettant de vérifier la présence éventuelle d'un agent pathogène et d'établir la responsabilité du repas dans une toxi-infection alimentaire collective.

Cette mesure préventive assure la disponibilité d'un échantillon exploitable plusieurs jours après la consommation.

En l'absence de plats témoins, les analyses portent sur les restes de repas, les matières premières encore disponibles ou les ustensiles ayant servi à la préparation.

Selon la réglementation sanitaire (JORADP n° 43 du 13 Juillet 2025) :

- Chaque plat servi dans un établissement de restauration collective doit être représenté par un échantillon témoin d'environ 150 g ;
- Cet échantillon doit être prélevé au moment du service, étiqueté clairement
- Il est conservé dans un récipient propre et apte au contact alimentaire, à une température comprise entre 0 °C et +4 °C, pendant cinq jours à compter de la date de consommation.

.2. Stratégie d'échantillonnage en situation de TIAC

En cas de suspicion de TIAC, le prélèvement devient ciblé et comparatif.

Les prélèvements doivent être réalisés sur plusieurs matrices :

- les plats témoins ;
- les restes alimentaires suspectés ;
- les matières premières encore disponibles ;
- les surfaces de travail et ustensiles ;

- et, le cas échéant, les mains et tenues du personnel (écouvillonnages).

L'intervention doit être effectuée dans les plus brefs délais, idéalement dans les 24 heures suivant le signalement des cas. Les aliments consommés dans les 72 heures précédant les premiers symptômes sont examinés en priorité, car cette période correspond à l'incubation moyenne de la plupart des agents responsables.

Chaque échantillon est identifié, scellé et accompagné d'une fiche de traçabilité mentionnant la date, le lieu, les conditions de conservation et le nom du préleveur.

Une documentation complète est également établie : description du produit, température de conservation, horaire du repas, symptômes observés et délai d'apparition.

Le respect de ces exigences garantit la valeur scientifique et juridique des résultats d'enquête.

3. Choix des analyses en en laboratoire

L'orientation des analyses dépend du type de symptômes observés et du délai d'apparition après consommation :

Délai d'apparition	Symptômes principaux	Hypothèse microbiologique	Agents fréquemment recherchés
1 – 6 heures	Nausées, vomissements rapides	Intoxication par toxine préformée	<i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Bacillus cereus</i> (toxine émétique)
8 – 24 heures	Diarrhées, crampes, fièvre légère	Germes entérotoxigènes	<i>Clostridium perfringens</i> , <i>B. cereus</i> (toxine diarrhéique)
24 – 72 heures	Fièvre, douleurs abdominales, diarrhée sanglante	Infections invasives	<i>Salmonella spp.</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Campylobacter spp.</i> , <i>E. coli</i> O157:H7

4. Interprétation et conclusion de l'enquête

Les résultats microbiologiques sont ensuite corrélés avec les données cliniques (analyses de selles, vomissures, sang) afin d'établir un lien épidémiologique certain entre l'aliment et les patients. En cas de confirmation, les souches isolées sont typées (phagotypie, antibiogramme, PCR, séquençage) pour démontrer l'identité entre les isolats humains et alimentaires.

Lorsque la même souche est isolée à la fois chez les patients et dans un aliment, la responsabilité du produit est établie.