

REPUBLIQUE ALGERIENNE DEMOCRATIQUE ET POPULAIRE
MINISTRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPERIEUR ET
DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE

UNIVERSITE SAAD DAHLEB DE BLIDA 1



SAHLA MAHLA
CONTRÔLE DE LA QUALITÉ EN
BIOINGENIERIE



Destiné aux étudiants de Master 1, Sécurité agroalimentaire et assurance qualité

AICHA YEFSAH- IDRES
MAITRE DE CONFERENCE A

Faculté des sciences de la nature et de la vie, Département agroalimentaire, Université Blida 1

Intitulé du Master : Sécurité agroalimentaire et assurance qualité

Semestre : S1

Intitulé de l'UE : unité d'enseignement méthodologie

Intitulé de la matière 1 : contrôle de la qualité en bio ingénierie

Crédit : 05

Coefficient : 03

Objectifs de l'enseignement : Cette matière permettra aux étudiants l'acquisition des bases sur les contrôles, sur la qualité des matières premières, les produits finis et sur les équipements.

Connaissances préalables recommandées : notions de microbiologie.

Contenu de la matière :

1. Généralités sur la qualité	2
2. Contrôle microbiologique :	3
• Objectifs du contrôle microbiologique :.....	4
- La qualité hygiénique,	5
- La qualité marchande,	6
- La rentabilité	11
• Politique de contrôle et assurance qualité :	11
- Les niveaux de contrôle,	14
- La fréquence des contrôles,	19
- Les paramètres à contrôler,	16
- Les méthodes de contrôle	17
• Réalisation du contrôle :	36
- Le contrôle des matières premières,	36
- Le contrôle des levains	38
- Contrôle de fabrication	41
- Contrôle des conditions de fabrication,	45
- Contrôle des produits finis	46
• Conclusion	47

Références bibliographiques

Index des tableaux

Index des tableaux

1. Généralités sur la qualité

Lors de ces dernières décennies, les questions liées à la sécurité sanitaire des aliments ont pris une importance croissante dans l'esprit des consommateurs et ceci dans l'ensemble des pays industrialisés. Pour assurer de cette sécurité, les aliments sont produits dans des conditions qui doivent permettre la maîtrise de l'hygiène par les opérateurs économiques. La mise en place de procédures de type HACCP (Analyse des Dangers et Points Critiques pour leur Maîtrise) est un outil fondamental de cette maîtrise. Les matières premières, ainsi que les aliments en cours et après fabrication, sont soumis à des contrôles réguliers pour vérifier la bonne maîtrise de l'hygiène, qui consiste notamment à vérifier que les points critiques d'un procédé sont effectivement maîtrisés (soit la validation des systèmes HACCP). Les résultats de ces contrôles doivent être accessibles à l'ensemble des parties, en particulier lors des contrôles officiels, et reconnus par l'ensemble des parties.

Chacun peut comprendre intuitivement ce qu'est la qualité mais reste toutefois incapable d'en donner une définition précise. Afin de mieux appréhender cette notion, différents aspects de la qualité sont abordés.

La qualité est l'aptitude d'un produit à satisfaire ses utilisateurs [1].

Définition ISO complète : Ensemble des propriétés et caractéristiques d'un service ou d'un produit qui lui confère l'aptitude à satisfaire des besoins exprimés ou implicites de tous les utilisateurs (Norme ISO/Dis 8402(Ic X 50- 120) [2].

La gestion de la qualité n'est pas un nouveau concept ; il a évolué grâce au travail d'innovateurs qui ont défini la qualité pendant plus de 80 ans. La gestion de la qualité s'applique aussi bien aux laboratoires qu'à la fabrication et aux industries.

Dans le domaine alimentaire, la qualité est une préoccupation ancienne et récurrente qui reste toujours au cœur des inquiétudes des consommateurs. Le terme qualité pour les produits alimentaires regroupe différentes composantes : qualité nutritionnelle, sanitaire et organoleptique (goût). Le secteur alimentaire agit donc sur ces trois dimensions essentielles de la qualité. Garfield [3], définit le contrôle de la qualité comme un "système planifié d'activités qui ont pour but de fournir un produit de qualité". Dans le cas d'un laboratoire de contrôle des aliments, ce produit de qualité sera un résultat analytique valable. Le même auteur définit l'assurance de la qualité comme un "système planifié d'activités visant à fournir l'assurance que le programme de contrôle de la qualité est réellement efficace. «Garfield recourt à l'expression "assurance de la qualité" pour recouvrir les deux définitions. C'est l'ensemble de l'organisation,

des responsabilités, des procédures, des processus et des moyens nécessaires pour mettre en œuvre le management de la qualité [4].

2. Contrôle microbiologique

Le contrôle de la qualité microbiologique de nos aliments a été pendant longtemps une préoccupation majeure – aussi bien pour les industries agroalimentaires que pour les services de contrôle et d'hygiène. La qualité et la sécurité des aliments sont aujourd'hui clairement revendiquées par les consommateurs. Il comporte même une connotation réglementaire depuis l'apparition du règlement européen 178/2002, établissant les principes généraux et les prescriptions générales de la législation alimentaire, instituant l'autorité européenne de sécurité des aliments et fixant des procédures relatives à la sécurité des denrées alimentaires. Ainsi, il n'est admis de nos jours que l'assurance de la qualité des aliments se conçoit et s'obtient grâce un dispositif global, tout au long de la chaîne de l'alimentation de l'homme, incluant les producteurs, les transformateurs, les distributeurs, les pouvoirs publics [5] et bien évidemment les consommateurs. Par ailleurs, la surveillance des micro-organismes à différents stades de la chaîne alimentaire humaine et animale (principalement en production primaire, à la transformation et distribution des aliments) représente un outil essentiel pour la maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments, en vue de protéger la santé des consommateurs. Au niveau national, cette surveillance permet en effet d'estimer la contamination (fréquence et niveau) des aliments par des micro-organismes pathogènes pour l'Homme (bactéries, virus et parasites), les sources de cette contamination et les produits les plus contaminés. Pour une entreprise de la chaîne alimentaire, la surveillance est un moyen de maîtrise de la sécurité de son processus de fabrication ou de commercialisation. Deux systèmes principaux de surveillance existent : les contrôles officiels, (Règlement (CE), 2004) no 882/2004 [6], comprenant en particulier les plans de surveillance et de contrôle gérés par les pouvoirs publics, et les autocontrôles effectués par les opérateurs de la chaîne alimentaire [7].

Les contrôles officiels intègrent les contrôles à toutes les étapes de la production et dans tous les secteurs cités ci-dessus, grâce à une approche européenne harmonisée en matière de conception et de mise en œuvre des systèmes nationaux de contrôle. De plus, le règlement [8] (CE) no 854/2004, définit des règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine.

Les professionnels mettent en place des analyses microbiologiques dans le cadre des autocontrôles pour valider leurs mesures de maîtrise de l'hygiène et suivre les tendances vis-à-

vis de certains indicateurs. En effet, ces autocontrôles, ont renforcé la place du système HACCP en rendant obligatoire [5] sa mise en œuvre à tous les maillons de la chaîne agro-alimentaire (production, transformation, distribution des denrées alimentaires - consommation humaine et alimentation animale).

2. 1. Objectifs du contrôle microbiologique

Le contrôle microbiologique des aliments a pour objectifs de contrôler les caractères moins apparents mais fondamentaux d'un produit alimentaire [9,10]. Bouix et Leveau [9], Bourgeois et *al.*, [11], proposent trois niveaux de contrôle microbiologique :

- ✚ Au premier niveau se situent les contrôles préventifs effectués sur les matières premières et les différents adjuvants ;
- ✚ Le second niveau s'occupe des contrôles en cours de fabrication ; ils comprennent les contrôles sur le produit lui-même ainsi que sur les facteurs pouvant avoir une influence sur la qualité du produit (hygiène du matériel, des locaux et du personnel) ;
- ✚ Le troisième niveau, enfin, est constitué par le contrôle sur les produits finis ; ceux-ci sanctionnent la fabrication en déterminant la qualité microbiologique du produit fini et sa conformité aux normes établies par l'usine.

Il s'agit du contrôle du niveau des populations des germes d'altération. Par ailleurs, dans le cas des conserves, il contrôle la stabilité des produits c'est-à-dire l'aptitude du produit à ne pas s'altérer de la salubrité c'est-à-dire l'absence d'action toxique, de microorganismes pathogènes ou toxigènes trop rapidement si les conditions de stockage sont respectées [12].

Les produits alimentaires constituent un milieu propice à la prolifération microbienne. Les germes néfastes sont ceux qui sont impliqués dans la détérioration des produits alimentaires. Ils affectent la qualité hygiénique organoleptique et commerciale du produit au niveau de la fabrication ou de la conservation. Ce sont les germes banaux de contamination qui peuvent causer de graves problèmes dans l'industrie.

Les germes banaux de contamination peuvent avoir des actions variées qui affectent la valeur alimentaire et commercial des produits allant d'une modification de texture, modification de la coloration (apparition d'une couleur parasite), synthèse de produits toxiques ou gonflement des contenants suite à une libération intense de gaz rendant alors le produit alimentaire impropre à la consommation voire même dangereux dans certaines conditions . Les germes banaux de contamination n'agissent sur l'aliment et n'ont de répercussions hygiéniques que s'ils sont en grand nombre. En conséquence, le contrôle vise à déceler les lots de produits

alimentaires dont le niveau de populations de la flore de contamination dépasse le seuil toléré par les normes en vigueur [13].

Etant donné que la stérilité biologique est impossible au risque d'altérer les valeurs nutritionnelles du produit, le facteur quantitatif intervient au niveau de l'analyse de cette flore. Le plus souvent, la connaissance qualitative de la composition de la flore est inutile sauf dans les circuits de fabrication pour déceler l'agent responsable de l'accident de fabrication [14, 15].

A) Qualité hygiénique :

Selon Guiraud et Rosec [5] et Nait Ali et *al.*, [15], la qualité hygiénique est un aspect qui met en jeu la santé des consommateurs. La recherche des causes et des mécanismes de l'altération des produits alimentaires ainsi que la mise au point de méthodes de contrôle de prévention et de lutte contre l'altération constitue pendant longtemps un domaine privilégié de la microbiologie.

Des progrès considérables ont été enregistrés, et ont permis une amélioration spectaculaire de la qualité bactériologique moyenne des produits avec comme conséquence allongement de la durée de vie commerciale. La prévention de l'altération d'origine microbiologique des produits alimentaires reste toujours très importante. En effet les actions préventives qui visent à réduire le niveau de contamination par micro-organismes ou à restreindre leur possibilité d'une efficacité relative. Par ailleurs l'action curative par addition des substances chimiques dans l'usage de plus en plus est remise en question. Normalement les concepts de qualité bactériologique d'un produit s'appliquent à l'ensemble de la flore microbienne à l'exclusion des germes pathogènes.

La frontière entre les micro-organismes utiles et les micro-organismes nuisibles n'est pas non plus très nette [16]. Un dernier élément d'incertitude dans la définition de la qualité microbiologique réside dans l'appréciation de la flore totale laquelle exigeait un niveau maximum indépendamment de toute éventuelle répercussion sur les autres caractéristiques des produits alimentaires (micro-organisme est potentiellement nuisible s'il est placé dans des conditions permettant la croissance, cela provoque une modification apparente des caractéristiques des produits alimentaires). Ainsi l'ensemble des micro-organismes de contamination des produits alimentaires [17], les conditions extérieures constituent un écosystème de développements récents de l'écologie en tant que discipline scientifique, puisse aider les microbiologistes à renouveler le mode d'approche des problèmes soulevés par les produits alimentaires. L'analyse globale des phénomènes microbiologiques qui se déroule dans

un produit alimentaire est reconnue maintenant comme une nécessité et aussi comme la meilleure valorisation de l'analyse préalable des facteurs. Le raisonnement écologique a permis l'identification des niches écologique successive assurant la croissance pour la survie des micro-organismes en lui permettant enfin d'altérer le produit.

B) La qualité marchande

La qualité marchande regroupe l'ensemble des facteurs assurant la commercialisation correcte de ces denrées alimentaires très périssables. Les micro-organismes présents dans les denrées alimentaires peuvent provoquer en effet, des modifications organoleptiques et altérer les qualités marchandes des produits, ou constituer un danger pour la santé publique en raison de leur pouvoir pathogène pour l'homme [18].

Cette qualité marchande concerne essentiellement [19] les caractéristiques organoleptiques et se traduit par un attrait ou une répugnance par les consommateurs. Ses incidences économiques sont déterminantes pour l'industrie alimentaire. Le refroidissement des produits frais et de certains produits transformés à la température proche de leur point de congélation est une pratique ancienne pour assurer une conservation provisoire de quelques jours grâce au ralentissement ou l'arrêt de la multiplication des micro-organismes. Ce qui est nouveau c'est la tendance actuelle à développer les produits dans la durée de conservation se mesure en semaine ou par mois. Les bactéries qui sont capables de se multiplier dans cette zone de températures sont dénommées **psychrotrophes**.

Les psychrotrophes sont présents également chez les bactéries que chez les champignons, le temps de génération augmente quand la température diminue. En principe il est donc exclu de bloquer la croissance aux températures minimum de réfrigération. A une température inférieure ou égale à 2 degrés C, mais cette propriété n'est guère exploitable par la suite de difficultés techniques pour maintenir le produit dans cette zone de température sous risque de congélation local de ce produit. Les bactéries psychotropes ont une particularité métabolique qui présente des inconvénients grave pour la qualité des produits alimentaire maintenu au froid. En effet des métabolites pigment, enzyme comme (la lipase, protéase) sont produit préférentiellement à basse température à cause de l'effet sélectif de basse température. On a très souvent une relation directe entre la concentration de la contamination initiale est la durée de vie du produit.

Le développement des matériaux de l'emballage et de conditionnement ont modifié le transport des produits alimentaires. Les matériaux d'emballage assurent la protection contre la contamination mais peuvent présenter également un effet de barrière différentielle vis-à-vis des

gaz et des vapeurs d'eau et ensuite modifier l'environnement des micro-organismes à la **surface** des produits alimentaires. Pour que le bilan de la protection contre la contamination soit positif il est évident que les matériaux d'emballage doivent-elles être **faiblement contaminé** néanmoins, on peut affirmer qu'en général la contamination apportée par l'emballage est faible par rapport à celle présente dans les produits alimentaires. Pour éviter la recontamination on propose de stériliser le papier de carton par des agents chimiques par exemple du **dioxyde d'éthylène**.

Si l'emballage est perméable à l' O_2 et au polyéthylène donc le polyéthylène ne modifie en rien la microflore des produits.

Si l'emballage est imperméable à l' O_2 , dans ce cas les modifications de microflore dans les produits se réalisent.

Un emballage perméable au gaz permet de placer les produits alimentaires dans une atmosphère artificielle. La présence des micro-organismes dans les produits alimentaires [19] est un phénomène inévitable, même dans le cas des produits de conserves, une contamination accidentelle par les micro-organismes à thermo résistances exponentielles peut conduire à un produit non stérile.

Depuis de nombreuses années, les industries agroalimentaires [11] ont mis en place différents outils pour assurer la mise sur le marché de produits présentant une qualité hygiénique optimale : contrôle des matières premières à réception, en-cours de fabrication, des produits finis, audits des fournisseurs, HACCP (Hazard Analysis and Critical Control Point), bonnes pratiques d'hygiène, systèmes de traçabilité de plus en plus performants, etc. En parallèle, le secteur alimentaire a développé et continue à développer de nombreuses normes dans le domaine de la qualité hygiénique. Il s'agit aussi bien de normes générales, comme par exemple l'ISO 22000 portant sur le "Système de management de la sécurité des denrées alimentaires" que de normes plus techniques portant par exemple sur un mode opératoire pour une analyse de la qualité microbiologique.

C) Qualité organoleptique / goût

Il est difficile de satisfaire tout le monde, l'industriel doit donc cibler son marché pour le produit et déterminer le standard de qualité sensorielle qui lui correspond. Par ailleurs, il faut noter que le terme de qualité technologique peut être assimilé à des qualités d'usage qui s'adressent à un consommateur intermédiaire appartenant à la transformation ou à la distribution. Selon Multon [20], les aspects de ces qualités d'usage sont les suivants :

- « L'aptitude à la conservation » qui est un avantage commercial décisif surtout en matière de produits frais qu'il s'agisse de la durée de vie après achat ou de la durée de vie après ouverture.
 - « La commodité d'emploi du produit » : les facilités de stockage, les temps de préparation ont pris une importance grandissante avec les évolutions sociales de ces dernières années, avec, entre autres, le travail des femmes généralisé aujourd'hui.
- Le goût est un élément important et un prérequis de l'achat des produits, les industries alimentaires accordent une part importante à l'innovation sur ce sujet.

C. 1. La salubrité de l'aliment.

L'insalubrité peut avoir plusieurs origines :

- Physiques : contamination par des éléments radioactifs, présence de corps étrangers.
- Chimiques : pollution par des pesticides, des métaux lourds, résidus de médicaments (hormones, antibiotiques)
- Microbiologiques : contamination par certains microorganismes comme les salmonelles, les staphylocoques, les clostridies et les listéries.

Il n'est pas possible de garantir l'absence de certains de ces agents dangereux mais on peut en limiter la quantité. Les pouvoirs publics ont fixé des taux maximums admissibles ou tolérables.

Depuis la directive 93/43/CEE les professionnels, tout au long des filières agro-alimentaires, de la fourche à la fourchette, de l'étable à la table, et de l'eau à la bouche pour les produits aquatiques, sont responsables de la salubrité. C'est une obligation de résultats [4]. Pour lutter contre les dangers qui menacent la salubrité des aliments, la réglementation préconise la mise en œuvre d'une démarche de type HACCP. En effet le système HACCP intègre un certain nombre d'exigences permettant, grâce à une analyse des dangers, d'identification des points critiques dont la maîtrise concourt à la maîtrise de la sécurité des aliments :

- identification de tout danger qu'il y a lieu d'éviter, d'éliminer ou de ramener à un niveau acceptable ;
- identification des points critiques au niveau desquels une surveillance est indispensable ;
- mise en place de limites critiques au-delà desquelles une action corrective est nécessaire ;
- établissement de procédures d'autocontrôle pour vérifier l'efficacité des mesures prises ;
- établissement d'enregistrements destinés à prouver l'application effective de ces mesures et à faciliter les contrôles officiels par l'autorité compétente.

En effet, les guides de bonnes pratiques hygiéniques existent dans de nombreux domaines. Ils sont établis par les professionnels en se servant de la méthode HACCP. Ils peuvent proposer des procédés différents de ceux décrits par la réglementation. De ce fait ils sont valides (Règlement (CE) no 2073/2005).

1) la denrée : **loyauté** de la marchandise le caractère marchand correspond à l'existence des caractères autorisés ou imposés par la réglementation, relatifs surtout à la composition, la préparation, la présentation et l'étiquetage.

La **loyauté** correspond au fait que la denrée possède les caractéristiques intrinsèque ou extrinsèque définis par le contrat commercial de façon implicite ou explicite.

Les caractéristiques intrinsèques

a) Produits bruts

Les quelques exemples suivants montrent que ces caractéristiques dépendent de la nature du produit.

- Le lait est le produit intégral de la traite totale et ininterrompue d'une vache laitière bien portante. Il peut être cru, pasteurisé ou stérilisé.

- L'œuf en coquille sans autre précision, provient de la poule. Des caractéristiques extrinsèques peuvent être demandées : jour de ponte, catégorie de fraîcheur...

- Les fruits et les légumes rentrent dans ce genre de denrées.

b) Produits transformés

A partir de ces produits bruts l'industrie agro-alimentaire fabrique de très nombreux aliments. Il faut parfois plusieurs transformations faisant appel à des traitements physiques, chimiques ou microbiologiques, voire mécaniques divers.

Le produit obtenu ne ressemble en rien aux matières premières utilisées. C'est le domaine particulier de la salaison, de la charcuterie et des conserves de viande. Les produits, très nombreux, proposés font l'objet d'un code des usages (mis à jour en 1997), qui les définit et donne une référence pour la loyauté des marchandises.

Les caractéristiques extrinsèques

Certaines caractéristiques peuvent s'ajouter aux précédentes. Les unes sont perceptibles comme le conditionnement et l'emballage, les autres non comme la présentation.

D'autres éléments plus difficiles à saisir peuvent entrer en ligne de compte : méthode de fabrication et qualité des ingrédients, l'âge, le sexe, la race des animaux de boucherie et de charcuterie etc...

Les traitements subis peuvent avoir de l'importance : congélation, ionisation... certains de ces traitements ont mauvaise presse.

L'étiquetage ou Traçabilité

La traçabilité est l'aptitude à retrouver l'historique, l'utilisation ou la localisation d'une entité au moyen d'identifications enregistrées [4]. Elle est définie par la norme ISO 8402 1991 «Gestion de la qualité et l'assurance de la qualité » (réactualisée par la norme ISO 9000/2005)

L'étiquetage devrait informer sur les caractéristiques de la denrée. Le Code de la Consommation dans article R112-9 indique les informations devant figurer sur l'étiquette des produits :

- la dénomination de vente
- la liste des ingrédients
- la quantité nette
- le nom ou la raison social
- l'adresse du fabricant ou du conditionneur ou du vendeur
- la date jusqu'à laquelle la denrée conserve ses propriétés spécifiques et les conditions de conservation
- l'indication du lot de fabrication, éventuellement la date
- le mode d'emploi
- la marque de salubrité

L'étiquetage et les modalités selon lesquelles il est réalisé ne doivent pas être de nature à créer une confusion dans l'esprit de l'acheteur.

Les denrées alimentaires pré-emballées destinées à être livrées aux restaurants, hôpitaux, cantines et autres collectivités similaires, les mentions prévues pour l'étiquetage peuvent ne figurer que sur les fiches, bons de livraison ou documents commerciaux lorsque ceux-ci accompagnent les denrées alimentaires auxquelles ils se rapportent [21].

Ces documents doivent être détenus sur les lieux d'utilisation ou de stockage. Dans ce cas les mentions : dénomination de vente, durabilité, température de conservation, identification

du conditionneur ou d'un vendeur sont portées sur l'emballage extérieur dans lesquels lesdites denrées sont présentées lors de la commercialisation.

Rentabilité

La norme de la qualité ISO 9001 a subi une refonte importante en 2015 afin de mieux répondre aux besoins et préoccupations d'organismes de tout type et de toute taille. En particulier :

- Identifier les enjeux internes et externes de l'entreprise, en lien avec sa stratégie et sa performance : la législation, le marché, les brevets, les ressources naturelles.
- Identifier les parties prenantes : au-delà des clients et des prestataires, il peut s'agir de ses salariés, des services internes, du consommateur final, ... Quels sont leurs besoins, leurs attentes ?
- Objectif : faire du système de management de la qualité un vrai outil de pilotage, qui dépasse les frontières de l'entreprise.

Aujourd'hui, ce référentiel permet d'assurer le pilotage managérial de l'entreprise en associant étroitement la satisfaction des clients et la rentabilité des opérations selon les objectifs fixés par l'entreprise en intégrant les notions de parties prenantes et de retour d'expériences.

L'automatisation et l'informatisation croissantes détournent l'attention des techniques de manipulation imposées par des analyses souvent lentes et assommantes pour la porter sur les méthodes [22], d'administration et de gestion requises pour garantir la qualité d'une importante quantité de données.

2. 3. Politique de contrôle et assurance qualité

2. 3.1. Politique de contrôle

La question que se pose le microbiologiste alimentaire est la suivante : comment maîtriser la qualité ?

Le contrôle des produits alimentaires nécessite la mise au point d'une stratégie qui varie selon le but attendu. Il tient compte du niveau à contrôler et des paramètres à étudier [23].

La qualité nécessite un contrôle **adéquat** et appropriée au cours du contrôle du processus de fabrication de conditionnement de stockage et de distribution de différents produits. La maîtrise de la bonne demande une protection contre la prolifération microbienne

et une surveillance constante de la fabrication pour enfin garantir une sécurité hygiénique organoleptique satisfaisante.

Les services opérationnels de base d'un système de contrôle des aliments qui opèrent à niveau minimum regroupent une inspection, un service d'analyses et un service de contrôle du respect de la réglementation [4].

- **L'inspection** vérifie, par ses recherches et investigations, la bonne observance par les industries des exigences officielles de contrôle.
- **Le service d'analyses** effectue les tests et examens des produits afin de déterminer si ils satisfont bien aux dispositions obligatoires de la législation et des réglementations, notamment sur les normes alimentaires obligatoires, sur les limites de qualité et d'innocuité qui ont été fixées pour les contaminants chimiques et biologiques, sur les conditions d'emballage et sur les autres aspects qui doivent être testés.
- **Le service de contrôle** du respect de la réglementation sert d'organe de surveillance des **actions juridiques** qui ont pu être **intentées**.
- D'autres services opérationnels viennent en appui à ces activités, notamment sur le plan **administratif**, de la **planification**, de la **programmation**, de la recherche et de l'information, et de l'éducation et de la formation, afin d'aider les services internes de l'institution et, lorsque les moyens le permettent, les secteurs extérieurs affectés [24].

2.3.1.1. La fiabilité des résultats d'analyse

Doit être formé, sensibilisé et motivé sur l'hygiène [4]. Le rôle des laboratoires est essentiel pour contrôler les aliments. Le personnel de laboratoire est chargé de confirmer ou d'infirmer les craintes des inspecteurs concernant la conformité des échantillons de produits alimentaires.

Le personnel de laboratoire doit aussi confirmer la **qualité** et **l'innocuité** des aliments en vérifiant si les niveaux et seuils obligatoires de contaminants, d'additifs, ou de tout autre produit réglementé, sont atteints et si les produits satisfont bien aux normes alimentaires obligatoires. Les laboratoires recueillent les **données analytiques** liées aux activités de contrôle comme, par exemple, celles qui portent sur les **contaminants alimentaires**, sur les **contaminations biologiques**, sur les critères de qualité et d'innocuité qui sont atteints, etc.

2.3.1.2. La sanction des violations

D'un **pays** à l'**autre**, la fonction **de contrôle du respect de la réglementation** est diversement assumée. L'autorité chargée du contrôle des aliments n'a pas toujours la responsabilité de mener des actions en justice. En conséquence, un bon moyen pour s'assurer

que l'alimentation est saine et de **qualité satisfaisante**, sans pour autant avoir à recourir aux sanctions, consiste à informer **régulièrement** les industries des réglementations et à travailler avec elles afin de les aider à se conformer à ces dernières. Pour cela une politique de contrôle est nécessaire. *Une politique nationale repose d'abord sur un constat de la situation existante.* Le contrôle officiel des aliments requiert un engagement et des ressources. Pour obtenir cet engagement et ces ressources, il est essentiel d'élaborer une politique pertinente quant à ce qui doit être atteint, comment cela **sera fait**, qui **le fera**, et dans **quels délais**. L'élaboration d'une politique nationale est une activité d'intérêt national qui devrait par conséquent engager tous les secteurs impliqués par la qualité et l'innocuité des aliments. Il est souhaitable qu'un comité de travail établisse un constat de la situation existante. Ce comité devrait regrouper des individus ayant des **compétences techniques** (universitaires, scientifiques, juridiques et industrielles), sociales, culturelles et économiques, et une bonne connaissance du plus grand nombre possible des secteurs affectés.

Il est aussi souhaitable que ce comité soit présidé ou placé sous la conduite et la direction d'une personnalité, simple citoyen ou leader politique, bien connue pour son habileté et ses références, et dont le passé et la réputation sont respectés.

Le constat portera sur l'examen du cadre juridique, sur le type de denrées alimentaires produites pour le marché domestique et pour l'exportation, sur les méthodes de transformation, les conditions et usages en vigueur, et sur les pratiques de stockage, de transport et de manutention. Il serait en outre utile, d'une part de savoir quels sont les risques pour la santé provoqués par les aliments [5], par leur transformation et par les pratiques de stockage et de manutention et, d'autre part de disposer d'informations sur les précédentes infections alimentaires ou sur les dommages et maladies qui leur sont rattachés, ainsi que sur les causes qui leur ont été attribuées. Il est enfin essentiel de connaître tous les facteurs culturels, sociaux, religieux, économiques ou autres, qui pourraient avoir un impact sur la qualité et l'innocuité des aliments et sur les activités nécessaires au bon fonctionnement d'un système de contrôle des aliments [25].

L'analyse des informations fournit l'occasion d'ouvrir des débats et discussions sur les éventuels objectifs à moyen et long termes, sur les mesures administratives visant à combler les lacunes au sein du système ou à y éviter les superpositions, et enfin sur la réduction des

faiblesses et la mise en œuvre d'une approche par programme permettant de résoudre les problèmes existants à partir de méthodes fondées sur le risque.

2. 3. 1. 3. Rôle de l'industrie

L'industrie alimentaire participe à la réalisation des objectifs d'une politique nationale de contrôle des aliments et en partage la responsabilité avec les agences nationales. C'est sur elle que repose l'application des codes de bonnes pratiques agricoles (production primaire) et de fabrication (transformation), ainsi que d'un système de qualité et d'innocuité, par exemple le HACCP. Le rôle de l'industrie comprend aussi la formation de tous les employés [4] dans le domaine de la manipulation des aliments et d'un système général de qualité et d'innocuité. L'industrie peut aussi être impliquée dans la recherche pour le développement de techniques ayant une application future dans le contrôle des aliments, et peut donc ainsi être une source d'information et de nouvelles technologies. L'industrie informe aussi le consommateur à travers l'étiquetage et la publicité. En s'assurant que l'industrie est impliquée dans les activités nationales de contrôle des aliments, on peut développer un instrument supplémentaire pour maîtriser certains problèmes, et ceci est un avantage pour tous [25].

2. 3. 2. Assurance qualité

Selon Larpent [4], la qualité dans un laboratoire entraîne tout un environnement de procédures et de moyens. L'expression « "assurance-qualité" » vise les stratégies, les procédures, les actions et les attitudes nécessaires pour garantir un maintien et une amélioration de la qualité [26].

Un « système d'assurance qualité » est un moyen mis en place par une institution dans le but de lui permettre de confirmer à elle-même et d'autres concernés que les conditions nécessaires ont été mises en place pour que les étudiants puissent atteindre les standards que l'institution s'étaient fixés. Pour mettre en œuvre un système d'assurance qualité dans un pays, il est nécessaire d'élaborer et de mettre en place trois types de constructions complémentaires :
Construction N°1 : au niveau politique : objectifs, choix et régulation.

Construction N° 2 : assurance qualité interne : au niveau des établissements d'enseignement ;

Construction N° 3 : Assurance qualité externe : niveau politique.

2.3.2.1. Les niveaux de contrôle

A. le but du contrôle microbiologique des animaux et des produits

1- les produits alimentaires commercialisés contiennent généralement des micro-organismes. Certains sont indispensables, car ils participent à l'élaboration ou transformation de l'aliment et assurent le développement des qualités organoleptiques (saveur, goût....) ou participent à sa conservation. Ils sont souvent issus de la **flore normale** de la matière alimentaire brute. Ce sont des micro-organismes **utiles**.

Mais d'autres germes sont **néfastes** pour la qualité propre de l'aliment, au niveau de la fabrication et de conservation.

2- D'autres germes enfin, sont dangereux du point de vue sanitaire et peuvent causer des troubles graves chez les consommateurs, il s'agit de germes pathogènes.

Remarque : même les germes banaux des contaminations peuvent avoir certaines actions néfastes variées qui affectent la valeur alimentaire et commerciale des produits. Ce qui est très important c'est :

a- la modification de la texture par dégradation des macromolécules par exemple **protéines** et peuvent former des produits indésirables dans le cas des colorants par formations des colorants parasites.

b- Altération de la valeur calorifique et alimentaire par transformation des molécules de hautes valeur énergétique en molécule à faible valeur (eau et CO₂).

c- Altération des qualités organoleptiques par libération des substances organiques volatils ou non qui affecte le goût et l'odeur.

d- Dégradation des conditionnements exemple gonflement des emballages dus aux gaz libérés surtout avec les bactéries anaérobies.

Ces organismes peuvent dans certains cas, se révéler dangereux pour la santé en étant responsables de toxi-infection due à la fabrication des substances toxiques par dégradation d'aliments ou responsables d'infection intestinales bénignes, mais responsables de toxi-infection intestinales. Les germes banaux de contaminations n'agissent sur l'aliment seulement s'ils sont en grandes quantités. Il est donc possible d'en tolérer un certain nombre mais limite selon les normes. Le facteur quantitatif va donc intervenir au niveau de l'analyse pour cette flore. L'analyse des contrôles microbiologiques des aliments peut être réalisée selon les divers niveaux de contrôle :

B. Les différents niveaux de contrôles

1- contrôle industriel des matières alimentaires brutes (matière 1ère)

2- contrôle de la fabrication au niveau d'une chaîne industrielle.

3- contrôle microbiologique des produits fini mais ce contrôle est réalisé par le producteur afin de respecter les dispositions légales.

4- contrôle microbiologique des produits fini mais au niveau des distributions par des services officiels (service de répression des fraudes et de contrôle de qualité ou tout autre services officiel

5- contrôle microbiologique des produits livrés à la consommation, mais incriminés dans une intoxication, et ce contrôle se fait dans un service d'hygiène et contrôle sanitaire.

Remarque : dans le 1er cas, il importe essentiellement de connaitre la charge microbienne globale sans identification et évaluer la valeur sanitaire par recherche des germes pathogènes. Dans le second cas, nous ajoutons l'identification des flores banales ou encore dénombrer certains germes spécifique.

L'analyse et le contrôle microbiologique varie également en fonction du type d'aliment, du danger potentiel qu'il représente, des contaminants possibles et des caractéristiques d'observation.

C- Paramètres à contrôler

Les paramètres à contrôler sont généralement les micro-organismes responsables d'une altération de la qualité hygiénique (germes témoins de contamination fécale, germes pathogènes de contamination des produits manipulés) et les micro-organismes responsables d'une altération de la qualité marchande ou d'une perte de rendement qui doivent être recherchés du début de la fabrication (matières premières) jusqu'au produit fini. En vue d'éviter les risques d'accident de fabrication et de situer l'origine de la contamination tous les éléments entrant dans la fabrication du produit doivent être soumis à une analyse microbiologique. D'après Leclerc et Mossel, [27], les aliments peuvent être les agents de transmission de divers micro-organismes infectieux ou de leurs métabolites susceptibles de provoquer des intoxications chez l'homme. Ces auteurs regroupent ces micro-organismes en fonction de leur origine la plus fréquente. Ces derniers sont soit d'origine endogène, déjà présents dans les aliments avant leur préparation, soit d'origine exogène, contaminant les aliments au cours de la préparation, du transport, de l'industrialisation ou de la onservation, etc ...

Dans l'industrie agro-alimentaire, ce contrôle concerne :

- La matière première avant son entrée à l'usine voire même l'origine de la matière première par exemple les animaux producteurs du lait.
- **L'eau** utilisée pour le lavage et la transformation des produits. Dans tous les cas, l'eau utilisable en industrie alimentaire doit être obligatoirement potable y compris celle utilisée pour le lavage des locaux, des ustensiles et de la chaîne de fabrication.
- **Les surfaces** des locaux et des ustensiles qui interviennent dans le stockage, la découpe ou tout autre processus de transformation.
- **L'air** ambiant dans les ateliers de transformation de traitement et des hangars de stockage.
- **Le personnel** de l'unité qui intervient depuis la réception de la matière première jusqu'au stockage du produit fini.
- **Le matériel** de conditionnement et emballage [28].

D. Les méthodes de contrôle

D1. Échantillonnage et prélèvements en vue de l'analyse microbiologique :

1- Echantillonnage : 2 types de prise d'échantillon est possibles [15].

a- prélèvement d'éléments apparemment défectueux en vue de mettre en évidence la cause du défaut

b- le prélèvement au hasard d'éléments apparemment normaux pour le contrôle de la qualité

Remarque : l'échantillon doit être statistiquement significatif.

2- Le choix des échantillons le nombre et fréquence de prélèvement dépendent de nombreux facteurs :

2. 1- nature du produit :

C'est le nombre d'éléments échantillonnables et sa répartition éventuelle en emballage regroupé en plusieurs éléments (modalité de production).

2. 2- le choix est lié aux caractères à examiner

2. 3- le but d'analyse c'est le contrôle systématique des produits finis, soit un contrôle de routine sur une chaîne de fabrication, soit sur la recherche de la cause d'un accident. Dans le cas des contrôles de routines au cours des fabrications ou à la suite d'un accident de fabrication, **l'échantillonnage doit s'effectuer de manière systématique** tout le long de la chaîne de production, car la comparaison des échantillons entre l'entrée et la sortie d'un appareil peut présenter un grand intérêt surtout si l'on fait confronter les résultats obtenus à des mesures physiques et chimiques. Donc l'échantillonnage fait objet de normes nationales et

internationales. Du point de vue statistique, un échantillonnage satisfaisant est réalisé en prélevant un nombre d'échantillon égal à la racine carré du nombre de division élémentaires du produit à analyser. Mais ce nombre devient rapidement excessif. Certains auteurs recommandent de prélever au moins 10 échantillons élémentaires représentant le nombre d'éléments dans chaque lot [4, 15].

Le nombre d'échantillon à prélever peut être déterminé mathématiquement de façon précise en fonction du degré de sureté voulue en appliquant la formule suivante :

$$n = \text{Log}(1-p) / \text{Log}(1-d)$$

p est la probabilité de déceler un défaut dans les éléments prélevés (en général $p = 0,95$)

d est le pourcentage de défauts admis pour le lot entier (souvent inférieur à 0,05).

n= nombre d'éléments à échantillonner

Les prélèvements doivent être standardisés pour effectuer une étude comparative.

Remarque : cette méthode concerne la recherche d'1 nombre de μ organisme peu élevé

a) choix des échantillons

Dans un lot les échantillons doivent se faire au hasard (tables de nombres outable des normes au hasard). Il existe des tables de prélèvement au hasard. Elles consistent en une succession de nombre généralement déterminés par tirage au sort. Il suffit d'y compter les éléments du lot et de prélever celui correspond au 1^{er} nombre et ainsi de suite pour le nombre successive [15].

Ex : Un lot de 1000 pièces, si l'on désire prélever 10 pièces au hasard, il faut :

07 59 66 97 63 46 18

45 01 64 32 48

32 36 52 26 54

Si l'on fait choisir les 3, 1^{er} chiffres de la 1^{ere} ligne, on aura la pièce **43**

Le 2^{eme} échantillon sera la 2^{eme} ligne **752**, le 3eme est le **503....**continuer jusqu'à 10 échantillons.

Pour être significatif, l'échantillon doit parfois être étalé dans le temps : Un échantillon constitué d'élément exclusivement successifs et peut représentatif de l'ensemble d'une production ou d'un lot. Il est conseillé d'effectuer des prélèvements espaces d'au moins un quart d'heure dans le cas d'échantillonnage limités [15].

Si N est le nombre d'éléments d'un lot et n le nombre des échantillons à prélever. On calcul

$X = N/n$ une autre méthode utilise $x =$ racine de N/n . ces méthodes peuvent être applicables à des lots au niveau du stockage et de livraisons. Dans le cas des lots de fabrication, les prélèvements doivent se faire au fur et à mesure de la chaîne de fabrication.

b) Fréquence de prélèvement et analyses

Ils dépendent essentiellement du niveau de production et des risques de contamination ou défaut de fabrication des produits. La fréquence des analyses de routine doit être régulière. Elle sera d'autant plus grande que la production sera importante [29].

Exemple 1 :

Dans le cas d'une adduction d'eau publique, la fréquence est liée au nombre d'habitants. L'OMS préconise d'effectuer des prélèvements à l'entrée du réseau selon les fréquences [29] suivantes :

- ✚ Moins de 20 000 habitantsau moins tous les mois
- ✚ Entre 20 000 et 50 000 habitants.....au moins tous les 15 jours
- ✚ Entre 50 000 et 100 000 habitantsau moins tous les 4 jours
- ✚ Plus de 100 000 habitantstous les jours.

Remarque : Si l'eau est traitée, les prélèvements doivent être effectués tous les jours avant et après traitement. Dans tous les cas, la fréquence doit être adaptée Au risque et au volume d'eau captée.

Exemple 2 :

Cas des laiteries : le contrôle hygiénique officiel des ateliers de traitement prévoit pour le contrôle du lait selon la quantité de lait traitée et selon les fréquences suivantes :

- ✚ 2 fois par jours quand la quantité de lait traitée est inférieure ou égale à 5000 litre par jour
- ✚ 3 fois par jours quand la quantité de lait traitée est comprise entre 5000 et 10 0000 litre par jour
- ✚ 5 fois par jours quand la quantité de lait traitée est supérieure ou égale à 10 0000 litre par jour.

Les échantillons doivent être prélevés à des intervalles de temps supérieurs à 15 minutes

C. Techniques de prélèvements

Les échantillons sont amenés au laboratoire dans leur emballage d'origine s'il s'agit de produits finis ou dans des flacons ou récipients stériles s'il s'agit de produits en vrac ou de "prélèvements". Dans de nombreux cas, ces prélèvements portent sur des éléments indivisibles dans ce cas la prise d'une partie aliquotée d'1 élément d'une grande partie est désirable.

Les modalités des prélèvements ont fait l'objet d'un arrêté publié au J.O. du 19 janvier 1980. Très schématiquement, la taille de l'échantillon d'un produit de même nature réparti en portions unitaires doit être au moins de **5 unités** (lieu de fabrication ou de distribution), de 5 unités pour les conserves [15].

Le laboratoire doit disposer d'environ **500 g de produits**, soit **5 fois 100 g**, ces 100 g pouvant être fournis par une ou plusieurs pièces. Si le prélèvement de 5 échantillons s'avère trop élevé par rapport à la production il est procédé à un étalement dans le temps des prélèvements. Ces prélèvements doivent avant tout respecter des règles d'**asepsie** et de **représentativité**. La prise d'essai destinée à la préparation de la suspension mère et de ses dilutions doit correspondre aux parties superficielles et profondes notamment pour les produits en tranche, hachés, divisés et les plats cuisinés par exemple. Pour les produits liquides elle est effectuée sur le produit "homogénéisé" ou sur les parties superficielles et profondes [30].

Dans le cas d'examen microbiologiques faisant suite à une maladie de type Toxi infection alimentaire (TIA), il faut rechercher les germes dangereux (pathogènes, toxigènes) et leurs toxines aussi bien dans les prélèvements de surface que dans la masse.

C1. Conditions générales de prélèvement

1- Homogénéisation

La répartition des micro-organismes dans les produits à analyser ne peut pas être homogène et ceci est d'autant plus vrai que l'élément à analyser est volumineux donc la structure est hétérogène. Il pourrait être possible dans certains cas d'effectuer plusieurs prélèvements aux différents endroits de l'aliment. Ceci peut être intéressant du point de vue Industrielle pour bien connaître la position et l'action des différentes flores mais aussi du point de vue analyse de la qualité pour mettre en évidence des zones à forte risque de contamination. Et généralement pour définir la qualité microbiologique d'un aliment, il sera nécessaire homogénéiser le produit en vrac avant de le prélever.

2. Précautions antiseptiques

Il est indispensable qu'aucune contamination externe ne vienne fausser la composition de la flore microbiologique à étudier. Dans ce cas, la réceptionniste destinée à recevoir l'échantillon ainsi que les instruments de prélèvement doivent être stérilisés à l'avance et protégés dans un emballage stérile. En effet l'échantillonnage, peut aussi se faire par la méthode suivante :

Méthodes d'échantillonnage préconisée par l'ICMSF (International Commission on Microbiological specification for foods)

Il s'agit là d'une étape fondamentale souvent délicate. Les ouvrages consacrés à l'échantillonnage sont nombreux et des règles précises par produit ou milieu ont été édictés par l'AFNOR si les échantillons ne sont pas correctement prélevés et manipulés ou ne sont pas représentatifs d'un lot ou d'une production, les résultats d'analyse n'auront aucune signification. Un échantillonnage représentatif est essentiel quand l'analyse a pour but de détecter la présence de germes pathogènes ou de toxines qui peuvent être distribués de façon hétérogènes dans l'aliment ou quand la commercialisation d'un produit dépend de la qualité microbiologique en relation avec les normes imposées par la législation.

Méthode : La Commission Internationale des Normes Microbiologiques relatives aux denrées alimentaires a défini des méthodes d'échantillonnage pour l'analyse systématique des produits alimentaires. Le principe de base est le suivant : un échantillon analysé donne des résultats non satisfaisants s'il renferme des microorganismes dangereux ou s'il contient des germes en nombre supérieur à une limite au-delà de laquelle il devient potentiellement dangereux. Dans cette méthode le symbole **m** représente la limite permettant de répartir les échantillons en 2 groupes : les acceptables (valeur **m**) et les inacceptables (valeur **m**). Pour certains microorganismes dangereux **m** peut être égal à 0. Quand un microorganisme donné est toléré dans un aliment 3 catégories d'échantillons sont définies

- catégorie 1 (acceptables sans réserve)
- catégorie 2 (acceptables mais avec une limite)
- catégorie 3 (inacceptables).

m sépare la 1ère et la 2ème catégorie et **M** la 2ème et la 3ème

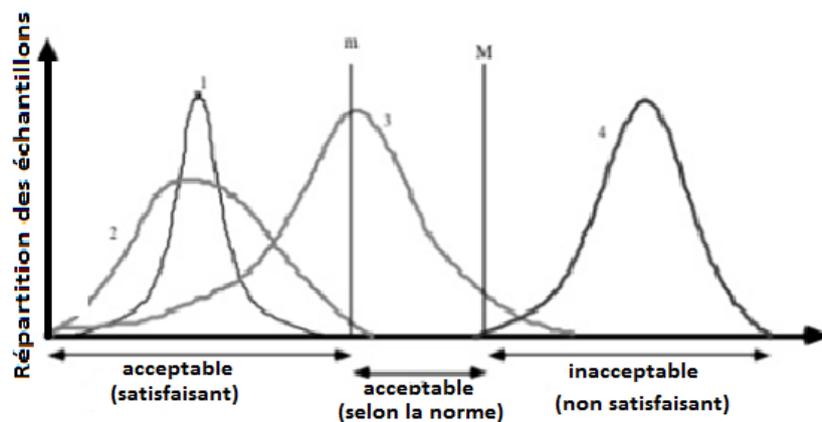


Figure 1 : Distribution des échantillons d'après l'ICMSF 23

Il existe deux types de plan d'échantillonnage qui sont applicables à des systèmes aliments - germes - consommateurs bien identifiés.

✚ Plan d'échantillonnage à 2 classes

Ce plan donne des résultats permettant de déterminer 2 classes de contaminations. Ce type de plan n'accepte aucune tolérance et correspond le plus souvent aux conclusions : *absence dans* (le résultat est bon et le produit jugé satisfaisant) ou encore *présence dans* (le résultat est mauvais et le produit est déclaré impropre à la consommation). Avec un plan d'échantillonnage à 2 classes (catégories 1, 3), n représente le nombre d'échantillons examinés. Il existe deux possibilités pour ce type de plan :

- utiliser la notion de présence ou absence
- déterminer la tolérance ou non des numérations supérieures à la valeur critique m

Le symbole c représente le nombre d'échantillons tolérés au-delà de la valeur seuil, nombre qui permet de juger le lot comme satisfaisant.

Exemple

Pour les viandes de volailles contaminées en surface par Salmonella

$$m = 0 \quad n = 5 \quad c = 1$$

Pour la plupart des autres produits on a avec cette bactérie et d'autres microorganismes très dangereux (Listeria, Brucella, etc.) $m = 0$, $n = 5$ et $c = 0$.

Pour les viandes de boucherie conditionnées sous vide ou non, réfrigérées ou congelées on a pour la Flore Aérobie Mésophile $m = 5.10^4$; $n = 5$; $c = 0$

La rigueur du plan dépend des valeurs de **n** et de **c**. Plus grand est **n** pour une valeur donnée de **c**, meilleure sera la qualité des lots acceptés. A l'inverse, si pour une valeur donnée de **n**, **c** augmente, la rigueur du plan diminue

✚ Plan d'échantillonnage à 3 classes

Ce plan est basé sur la reconnaissance de 3 catégories d'échantillons en fonction de leur niveau et nature de contamination : celle inférieure ou égale à **m**, celle comprise entre **m** et le seuil **M**, celle supérieure à **M**. La valeur **S** constitue le seuil de toxicité. Avec un plan d'échantillonnage à 3 classes (catégories 1, 2, 3), les symboles **n** et **c** ont la même signification mais il existe pour **c** un facteur de précision supplémentaire qui est le nombre d'échantillons tolérés dont les charges microbiennes sont comprises entre **m** et **M**. La présence d'échantillons entre **m** et **M** n'est pas souhaitable mais tolérée. Pour les valeurs supérieures à **M** les lots ne peuvent pas être acceptés pour la commercialisation en l'état. Ce plan à 3 classes permet de déterminer par des calculs appropriés la probabilité selon laquelle un lot sera accepté ou refusé en fonction du nombre d'échantillons défectueux qu'il contient. S'il n'y a pas d'échantillon avec une valeur supérieure à **M** on est ramené au plan à 2 classes. Le plan est choisi en fonction de l'estimation du risque pour la santé et du mode d'utilisation de l'aliment. Les germes sont classés en fonction du risque qu'ils font courir au consommateur en :

- germes entraînant un risque sévère (*Clostridium botulinum*, *Salmonella typhi*, *S. paratyphi*, *Shigella dysenteriae*, *Vibrio comma*, *Brucella melitensis*, *Listeria monocytogenes*,
- **germes entraînant un risque moyen** avec possibilité de large diffusion staphylocoques entérotoxigènes, *Salmonella typhimurium* et les autres sérotypes, autres *Shigella*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Escherichia coli* entéropathogènes, *Streptocoques b hémolytiques*).
- **germes entraînant un risque moyen** sans grande diffusion (*Bacillus cereus*, *Brucella abortus*, *Chlostridium perfringens*, *Salmonella arizonae*, *Francisella tularensis*, *Yersinia enterocolitica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Campylobacters jejuni*, etc...).

Choix du plan : le plan à 3 classes est le plus souvent adopté ; la valeur de **m** est déterminée par les résultats de l'analyse de nombreux échantillons sur des lots jugés satisfaisants. La valeur de **M** est plus difficile à fixer et est fonction du produit, de la bactérie recherchée et de la méthode employée. *Chlostridium perfringens* type C, virus de l'hépatite A.

Les valeurs de **n** et **c** sont choisies en fonction du niveau souhaité d'acceptabilité ou de rejet des lots. Il est évident que plus **n** sera grand et plus **c** sera petit et meilleur sera le contrôle réalisé (tableau suivant)

Choix des valeurs de n et c et du type de plan en fonction des risques sur la santé et les modalités d'utilisation du produit [31].

Tableau 1 : Exemple de plan d'échantillonnage à 3 classes selon Cuq [29].

ALIMENT	BACTERIE	n	c	m	M
cacao	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
chocolat	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
oeufs	<i>Salmonella</i>	10	0	0	0
lait en poudre	flore aérobie mésophile	5	1	$5 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$
crème glacée	flore aérobie mésophile	5	3	$5 \cdot 10^4$	10^5
	coliformes	5	1	10	50
eau minérale	coliformes	10	2	2	10
fromage (past.)	coliformes	5	2	$5 \cdot 10^2$	$1,5 \cdot 10^3$
	<i>Staphylococcus</i>	5	2	10^2	10^3

Lignes directrices pour l'interprétation selon Munch, [31] (2018)

✚ Qualité microbiologique conforme

Le résultat analytique est inférieur à « m ».

✚ Qualité microbiologique médiocre/acceptable

Pour un seul échantillon, le résultat analytique est supérieur à « m » sans dépasser « M ». Si $n > 1$, le nombre d'échantillon supérieur à « m » sans dépasser le « M » doit être inférieur ou égal à « c ». Le profil microbiologique de l'aliment se situe près des critères satisfaisants, mais laisse entrevoir des lacunes à corriger (application des bonnes pratiques de fabrication (BPF)).

✚ Qualité microbiologique insatisfaisante en regard des bonnes pratiques de fabrication

Principalement associés aux critères d'hygiène du procédé (CHP) ou d'altération dans les aliments prêts à consommer, cet énoncé s'applique lorsque le produit n'est pas encore altéré, mais que la valeur « c » ou « M » est dépassée. À ce moment, la signification se rattache aux mauvaises pratiques de fabrication et à une (des) situation(s) non contrôlée(s) de l'établissement.

Critères **CHP** (Critère d'hygiène du procédé) : Germes aérobies mésophiles, bactéries lactiques, coliformes totaux, *enterobacteriaceae*.

✚ Qualité microbiologique non conforme

En présence des microorganismes indicateurs de santé 2, cette conclusion s'applique lorsque le résultat analytique est supérieur à « M » ou si le nombre d'échantillons de qualité médiocre est supérieur à « c ».

Critère de santé 2 : *E. Coli*, *Staphylocoques coagulase positive*, *Bacillus cereus*, *Clostridium perfringens*.

✚ Qualité microbiologique inacceptable avec risque pour la santé humaine

La denrée alimentaire est considérée comme dangereuse.

Présence dans un aliment prêt à consommer, de microorganismes pathogènes primaires, de toxines microbiennes de santé 1 ou de microorganismes pathogènes de santé 2 à des concentrations correspondant aux doses infectantes ou toxigènes.

Par exemple :

Microorganismes pathogènes primaires : *Salmonella*, *Listeria monocytogenes*, *Campylobacter*, *E. Coli* O157 :H7, *Yersinia enterocolitica* (souches pathogènes)

Toxines : Entérotoxines de *Staphylococcus aureus coagulase positive*, toxines de *Bacillus cereus* et de *Clostridium botulinum*.

Les Microorganismes pathogènes de santé 2 à des concentrations correspondant aux doses infectantes ou toxigènes deviennent un niveau de risque de santé 1 [32] :

Staphylococcus aureus : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml

Clostridium perfringens : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml

Bacillus cereus : $\geq 10^5$ UFC/g ou ml

Vibrio parahaemolyticus : $\geq 10^6$ UFC/g ou ml

Définitions :

Santé 1

Le danger indiqué représente un risque direct et élevé pour la santé de la population avec des conséquences imminentes sérieuses. Des mesures appropriées, suivant une évaluation de risque, seront prises à l'égard du produit afin que le consommateur n'y soit pas exposé. Ces interventions assureront que le produit n'est plus vendu et si nécessaire que la population ne le consomme pas [32] (retrait et rappel du produit, voir définition).

Santé 2

Le danger indiqué pour la santé représente un risque pour la santé des êtres humains si les microorganismes sont suffisamment nombreux. Il représente une situation qui pourrait avoir

sur la santé des gens des répercussions indésirables temporaires, sans menacer leur vie. La probabilité de répercussions indésirables graves est jugée éloignée. Le danger peut aussi être associé à la présence d'un indicateur (ex. : *E. coli*). Des mesures nécessaires doivent être mises en place pour identifier les causes de la non-conformité et s'assurer que des mesures correctives appropriées sont mises en place pour garantir l'innocuité du produit.

Différentes situations pourraient justifier d'augmenter le niveau de risque de santé 2 à santé 1 lorsque :

- Les produits constituant un risque « santé 2 » sont associés à une maladie lors d'une épidémie d'origine alimentaire ;
- Les microorganismes pathogènes « santé 2 » sont à des concentrations correspondant aux doses infectieuses ou toxigènes.
- Des produits constituant un risque « santé 2 » pour la population en général sont destinés à des populations sensibles comme les enfants, les personnes âgées ou les personnes dont le système immunitaire est compromis [32].

2) Cas particulier des conserves

Les conserves doivent satisfaire à des épreuves permettant de vérifier leur stabilité / stérilité. Ces épreuves consistent en deux étuvages de 5 échantillons à 37°C pendant 7 jours (ou à 30°C pendant 10 jours) et à 55°C pendant 7 jours. A l'issu de ces épreuves on observe l'éventuel bombage (il faut aussi que le ΔpH entre les unités étuvées et les unités témoins ne dépasse pas 0,5). Par microscopie (après étalement d'un volume donné voisin de 10 μ l de produit puis fixation et coloration au bleu de méthylène par exemple) on compte sur 20 champs le nombre de germes respectivement observés à partir de la boîte incubée (n) et de la boîte témoin (n'). n / n' doit être inférieur à 100.

C2. Méthodes générales de prélèvements.

1- prélèvement pour le contrôle Microbien de surface.

Ces méthodes permettent d'étudier la flore présente sur la surface d'un aliment, surface de matériel de fabrication, de stockage, les récipients, l'emballage, les plans de travail et aussi les mains du personnel.

Il existe plusieurs techniques qui doivent être bien standardisé si on désire obtenir de bons résultats comparables.

a) Ecouvillonnage :

Cette méthode à l'avantage de permettre des prélèvements dans des endroits peu accessible aussi bien que sur les surfaces planes.

b) Rinçage : applicable aux récipients et à la tuyauterie

c) Impression sur gélose

Le prélèvement réalisé par impression direct sur milieu gélose et ou par impression indirect à l'aide de ruban adhésif

d) Méthode de couplage des milieux gélosés

Elle permet l'examen des bouteilles vide. Dans ce cas on va faire couler le milieu gélosé en surfusion (45 degrés) et introduire dans les récipients et répartir uniformément par rotation de la bouteille selon un axe horizontal et sous un courant d'eau froide. Enfin les flacons sont mis à incuber puis voir quelle microflore et quelle quantité ?

2) prélèvement pour le contrôle d'air.

Plusieurs façons existent :

1- Par Exposition dans les salles des boîtes de Pétri contenant un milieu gélosé et quand on ouvre particulièrement aux endroits permettant l'entrée de l'air on a ceux exposés au courant d'air

2) Par utilisation d'une fiole vide contenant un milieu de culture liquide et fermé par un bouchon portant un tube de contamination avec l'extérieur et plonger dans le milieu (l'air est aspiré par le tube de communication)

3) Par filtration sur membrane que l'on dépose ensuite sur un milieu gélosé en boîte de pétri.

3- Prélèvement de produits liquide

Technique variable selon la nature du produit et selon le volume et la forme du récipient. Selon le volume du produit à utiliser, on utilise soit une pipette soit une louche ou un flacon à prélèvement. Le prélèvement et réalisé dans les conditions aseptiques en particulier les instruments et les flacons doivent être stériles.

Remarque : Il faut néanmoins toujours s'assurer de la parfaite homogénéisation du liquide (agitateurs) avant de prélever à la pipette (ou avec un flacon lesté stérile ou autre) le volume nécessaire à l'analyse.

4- Prélèvement des produits solide

Selon la nature du produit Ils sont effectués au scalpel ou à la sonde (fromages et produits mous), à la pipette arpent. Ces derniers appareils sont constitués d'un cylindre de verre ou de métal de pénétration munis d'un piston servant à refouler le prélèvement. La surface est souvent éliminée avant de procéder au prélèvement. Si le produit est hétérogène (plats cuisinés, conserves etc.) il faut s'assurer de la bonne représentativité du prélèvement. Il faut prélever de façon proportionnelle un peu de chaque élément et après une homogénéisation l'ensemble et réalisé laboratoire avant l'analyse

5. Traitements d'échantillons avant l'analyse

1. conditions de conservation et de transport des échantillons.

Quand le prélèvement aseptique a été réalisé il faut identifier immédiatement le produit avec une étiquette ou une référence. Il est souhaitable de ne pas utiliser de crayons feutres sur des films plastiques (PVC) car l'encre peut pénétrer et perturber l'analyse. Les échantillons doivent être soigneusement étiqueter avec :

a- Numéro d'ordre

b- Date, heure et lieu précis

c- Modalités particulières de prélèvement (méthode d'échantillonnage et technique de prélèvement)

d- Indication utile (pH, température)

e- nom de la personne ayant effectué le prélèvement : la composition microbiologique de l'échantillon ne doit pas évoluer entre le moment de prélèvement et celui de l'analyse.

Remarque :

Il faut noter que le mode d'enregistrement des données constitue un facteur important dans l'obtention de résultats fiables. Tous les renseignements concernant les analyses doivent être enregistrés et disponibles afin que la direction du laboratoire puisse démontrer que ses opérations sont contrôlées. Le laboratoire doit avoir un système documenté permettant d'identifier de façon unique les échantillons à analyser, afin qu'il n'y ait à aucun moment de confusion sur l'identité de tels échantillons. Tous les enregistrements manuscrits doivent être faits à l'encre.

2. Les principaux facteurs affectant la stabilité

La température : le temps de la protection par rapport à la contamination extérieure, le temps séparant le prélèvement de l'analyse doit être admissible et variables en fonction du produit à analyser et des conditions de son transport. Généralement le temps de transport ne doit pas dépasser 24 heures. Les variations de température peuvent modifier la microflore.

Exemple : échauffement peut déclencher par une prolifération anormale alors qu'une forte réfrigération peut détruire des germes fragiles [15].

Les variations de température sont limitées par emploi d'enceinte isolante. La conservation aux basses températures négatives à un certain effet bactéricide sélective et par suite elle modifie la microflore qualitativement et quantitativement. Cet effet est moins marqué, quand la congélation et très rapide c'est la surgélation et quand le transport (conservation de l'échantillon) se fait à une température suffisamment basse - 18 degrés Celsius. Il est d'autre part indispensable que les produits en reste congelés jusqu'à l'analyse. C'est ce qui implique le transport en enceinte à basse température [29].

- ils faut remarquer que l'effet du froid sur les bactéries peut sans être l'étale, engendrer un stress bactéricide générateur pour la bactérie d'exigence nutritif particulière peut provoquer une sensibilité particulière aux inhibiteurs de milieu sélectif puis, allongement du temps de latence. Ces effets de stress entraîne pratiquement par le fait que des micro-organismes vivants mais chauffés, capables de se multiplier dans les produits alimentaires après un temps de récupération suffisant qui ne sera cependant pas détecter sur un milieu sélectif qui les détecte habituellement. on peut toutefois se prémunir dans une certaine mesure contre un risque d'erreur on laissant les échantillons mères séjournée à la température ambiante pendant une demi-heure à 1h avant l'analyse ou encore en faisant précédé l'inclusion en milieu sélectif d'une pré-incubations en milieu riche pour enfin on peut choisir un milieu de détection peu sélectif .

- Le milieu de transport

Dans certains cas il est possible ou nécessaire d'utiliser pendant le transport un milieu limitant la mort de bactéries fragiles. Dans ce cas il s'agit des milieux faiblement nutritif, les milieux de ce type sont favorables au métabolisme des germes mais sans permettre une multiplication (cas des germes entérobactéries).

6. préparation des échantillons pour l'analyse en laboratoire.

L'échantillon fourni au laboratoire consiste soit en un produit liquide, solide, hétérogène prélevé dans un récipient stérile soit emballé comme il est commercialisé [4, 29].

-Ouverture des récipients et des emballages :

Exemple 1 : Cas d'une boîte de conserve :

1- la surface supérieure de la boîte doit être nettoyée à l'aide d'un coton imbibé d'alcool puis flambée à l'alcool l'ouverture.

2- L'ouverture de la boîte et réalisé dans les conditions aseptiques classique (bec bunsen) à l'aide de poinçon métallique ou d'un ouvre Boîte stérilisé à la flamme.

3- placer cette boîte dans un cristallisoir puis la surface stérilisée est recouverte d'un entonnoir stérile et obturé par du coton et dans lequel on fait passer une eau-forte et on peut perforer la boîte et les clous ne doivent pas être retiré et doivent servir à la régulation de sortie des gaz contenu dans la boîte exemple bouteille capsules et une boîte de conserve dans ce cas la bouteille auparavant agité et reversé sa capsule et son bouchon sont plongés dans l'alcool flambé. L'ouverture est réalisée aseptiquement, soit en perçant le bouchon à l'aide d'un scalpel soit utilisé décapsuleurs flambés avant l'enlèvement [4].

Exemple 2 : Cas des bouteilles : les bouteilles sont renversée et sa capsule et goulot sont plongés dans l'alcool puis flambés. Si la bouteille est en plastique, le flambage n'est pas obligatoire ou fait rapidement. Après désinfection, la bouteille est ouverte on enlevant la capsule à l'aide d'un décapsuleur ou en perçant la capsule [19].

Autre emballage : les autres emballages sont ouverts stérilement et la méthode varie selon le type d'emballage.

4- Homogénéisation et broyage des produits à analyser

L'homogénéisation doit permettre la répartition homogène dans les micro-organismes des échantillons pour le produit liquide ou semi-liquides il suffit d'agiter mutuellement. Pour les produits visqueux, on peut utiliser un agitateur mécanique et la répartition des micro-organismes sera suffisante. Pour les produits solides ou hétérogènes il faut procéder à une opération de broyage couplet à une dilution. Le broyage efficace et réaliser à 1500 tours par minute pendant une minute avec un volume de produit de 3 à 10 volumes de diluant.

Le diluant de broyage est constitué de l'eau physiologique, du liquide de Ringer dilué au 1/4, de l'eau peptonnée ou le milieu tryptone- sel du (TSE). Il est fondamental que le broyage ait un

effet destructeur de la microflore. Il existe trois techniques utilisées en microbiologie alimentaire.

4.1. Broyeur à Pot : le produit et diluant sont introduits dans un pot spécial pour broyage muni d'une hélice. Le pot est ensuite adapté à un moteur qui actionne l'hélice. Les pots doivent d'être stérilisables ou en acier inoxydable (inox)

4.2. Broyeur à tige : le broyage se fait en introduisant une tige muni d'une hélice dans le mélange du produit diluant mais ici la rotation de l'hélice à grande vitesse peut provoquer un réchauffement du mélange il faut alors, réfrigérée sois travailler pendant des périodes brèves.

4. 3. Broyeur à palettes : à la différence des précédents cet appareil travaille par choc. Le mélange produit- diluant et introduit dans un sac en plastique stérile que l'on selle avant de l'introduire dans l'appareil. Dans l'appareil il est frappé rythmiquement avec des palettes. Les chocs délacèrent les produits et mettent les bactéries en suspension dans la répartition. Cette technique règle le problème de la propreté et stérilité des récipients de broyage.

Le broyats des aliments des produits solides dans un diluant stérile permet d'obtenir une suspension mère qu'on pourra ensuite diluée à volonté pour pouvoir apporter les résultats de numération à un point donné du produit (en gramme ou par millilitre). Il est nécessaire de procéder quantitativement ou préparer généralement des suspensions mère de titre 1/10, 1/ dont le titre de la suspension étant les rapports poids d'aliments sur le volume total (diluant plus produit). Dans le cas des aliments hydraté normalement on considère que la densité est voisine de 1et que 1g de produit représente un volume de 1ml. Ainsi on obtient une suspension mère de 1/5 en ajoutant 50 grammes d'aliments à 200 millilitres de diluant. On calculera alors le résultat par g d'aliment en multipliant le résultat rapporté à 1ml de suspension mère par 5. Dans le cas des aliments hydratés on procède différemment, On pèse un certain poids de produits et on ajuste le volume final pour obtenir le titre voulu.

- Dans le cas des produits lipidiques comme les huiles et le beurre, pour, stabiliser l'émulsion, le diluant est additionné de 0,1% de gélose.

4. 4. La revivification

Les micro-organismes sont souvent "endommagés" mais non tués au cours des traitements technologiques (déshydratation, chaleur, froid etc.) appliqués aux produits alimentaires ou par suite de leur vieillissement. Ces altérations se reflètent dans certaines de

leurs propriétés physiologiques en particulier au niveau de leur phase de latence qui est augmentée ou de leurs besoins nutritionnels ou encore quant à leur sensibilité aux conditions de milieu défavorables (pH, sels biliaires, colorants, sels etc.). La nécessité de faciliter le “rétablissement” des cellules ayant subi des altérations sub-létales, c’est-à-dire leur “réanimation” ou encore leur revivification, s’impose avant de les soumettre à des milieux sélectifs souvent peu favorables à la croissance du fait de la présence d’inhibiteurs. En effet, la présence de cellules endommagées peut entraîner des variations dans les numérations ou porter à croire qu’il n’y a pas ou peu de germes et donc pas ou aucun risque pour le consommateur. Ceci est particulièrement important quand il s’agit de déterminer si des micro-organismes pathogènes ou indicateurs sont présents ou non.

A titre d’exemple, les conditions optimales de revivification par cette méthode de germes stressés [29] sont décrites dans le tableau suivant :

Tableau 2 : Conditions optimales de revivification

Traitement	Germe	Revivification	
		Temps (h)	t° (°C)
Chaleur	Coliformes	5	35
Congélation	Coliformes	4	35
Acide	Entérocoques	4,5	35
	Coliformes	4	35
Séchage	Coliformes	2	25
	Entérocoques	4	25

C3. Méthodes générales de contrôle et d’analyse

Le contrôle microbiologique fait appel à des techniques rapides pour rechercher des germes ou pour les dénombrer.

1. L’étude microscopique

L’examen microscopique est le plus souvent réalisé sur le prélèvement brut. Il s’effectue à l’état frais et/ou sur des frottis colorés. Les résultats de cette étude ne sont pas très fiables mais pour leur rapidité, ils peuvent être utiles pour :

- **L'estimation** de la flore totale (viable ou morte si des colorants vitaux sont utilisés comme le bleu méthylène ou le vert Janus) ou de la charge microbienne initiale d'un aliment.
- **Mettre en évidence** des contaminants dans la flore de fabrication par exemple présence de bactéries dans le ferment constitué de levure ou de bactéries Gram- dans les ferments lactiques.
- **Le dénombrement** directe des levures à l'aide d'un hématimètre (exemple, la cellule de Malassez
- **La recherche** présomptive du bacille tuberculeux par la méthode de Ziehl-Nielson.
- **L'étude cytologique** du lait pour la détermination de la formule leucocytaire pour avoir une idée sur l'état sanitaire de l'animal dont provient le lait.

Méthode selon Bourgeois et al., [9] :

- Réaliser un frottis à partir du culot de centrifugation du lait.
 - Prélever une quantité aliquote et l'étaler sur une lamelle.
 - Sécher sans chauffage et fixer à l'alcool absolu.
 - Colorer au bleu de méthylène 5 min puis différencier rapidement à l'alcool à 60°.
 - Rincer à l'eau et sécher le frottis
 - Compter au minimum 100 éléments cellulaires
- Le lait normal ne contient pas d'hématies.

$$R = \frac{M}{P} = \frac{\text{leucocytes mononucléaires}}{\text{leucocytes polynucléaires}}$$

R compris entre 0,5 et 1 → lait normal.
 R < 0,5 → lait de mammites.
 R > 1 → infection tuberculosique probable

- **Recherche des parasites** : elle permet de mettre en évidence les protozoaires (Toxoplasme, amibes) les nématodes (Ascaris) et les cestodes (Tænia) par la préparation de frottis colorés.

2. Etudes Quantitatives.

Selon Guiraud [19], l'étude quantitative permet de dénombrer les germes présents dans un **produit alimentaire** donc de se rendre compte si le produit analysé est conforme aux normes microbiologiques. Cette recherche consiste en une **numérotation des germes totaux** et de la flore **indicatrices de contamination des germes totaux** et de la flore indicatrice de contamination. Où la numération doit être précise. La précision est déterminée par :

- **Le milieu** et conditions de culture qui doivent être favorables aux germes recherchés ;

- la **suspension mère** est appelé à subir une préparation dans un diluant revivifiant car les germes sont dans un mauvais état physiologique. Dans ce cas, la revivification ne doit pas affecté le nombre initial de contaminants.
- Le nombre d'expériences et la technique employée.
- Le temps mis pour réaliser la manipulation.

2 .1. Flore pathogène.

Le **contrôle microbiologique** peut aussi impliquer la recherche des **germes pathogènes**. Dans ce cas, il n'est pas nécessaire de faire le dénombrement car la présence de ses germes dans les aliments n'est pas tolérée par les normes officielles. En conséquence, les résultats ne peuvent s'exprimer que par l'absence ou la présence du germe.

La recherche des **germes pathogènes** dans les produits alimentaires peut être réalisée par culture sur milieu sélectifs après enrichissement ou concentration ou par la recherche de toxines ou d'anticorps spécifiques ou par des **techniques de coloration**.

- **Mise en évidence par culture sur milieu sélectif.**

- Enrichissement ou concentration

Etant donné que les germes pathogènes sont des germes fragiles et qu'ils sont les plus souvent retrouvés en faible nombre dans les produits alimentaires, il est donc important d'augmenter les chances de leur détection. Pour cela, il est possible d'adopter la concentration par centrifugation ou par filtration d'un volume connue. Cette méthode convient aux produits liquides comme le lait et l'eau.

L'enrichissement consiste à mettre en contact l'**échantillon** avec un **milieu de culture** qui va favoriser la croissance du germe recherché et augmenter son nombre. L'enrichissement peut être précédé par un pré enrichissement sur un milieu peu sélectif qui est un milieu électif et permet la revivification des germes en mauvais état physiologique.

-Recherche du germe

Le germe est recherché par ensemencement de milieux sélectifs solide à partir du milieu d'enrichissement ou de la suspension concentrée. Le germe est ensuite identifié pour confirmation. Les milieux d'isolement varient selon les germes recherchés.

Les opérations concernent *Salmonella*, *Shigella*, *Vibrio*. Pour *E.coli*, sa caractérisation est basée sur l'incubation à 44° C suivie de la détection de l'indole.

- Recherche de la toxine botulique → *C.botilinum*

- Test immunologique (par agglutination antigène-Anticorps) → Brucella
- Recherche des bacilles acido-alcool-résistants (BAAR) → M.tuberculosis
(coloration Ziehl Neelsen)

2.2. Flore totale ou flore mésophile aérobie revivifiable :

Cette recherche constitue une approche quant au niveau global de la contamination du produit. Cette étude n'est qu'approximative car il n'existe pas de milieu de culture universel qui serait favorable à la croissance de tous les germes contaminants. De même ces derniers se distinguent par leurs conditions d'incubation et de pH. L'incubation est faite à 30° C pendant 72 h.

2.3. Flores de contamination ou Indicatrice.

Les flores de **contamination** sont dites **aussi flores tests** ou **flores indicatrices**. La présence de cette flore témoigne d'une mauvaise **qualité hygiénique** du produit et constitue une présomption de la présence de germes pathogènes. Les études incluent le dénombrement des **coliformes** et **streptocoques fécaux** et les **Clostridium sulfito-réducteurs**. Les bactériophages fécaux et les staphylocoques sont parfois inclus.

2.4. Les coliformes et *Escherichia coli*

Les coliformes sont des entérobactéries fermentant rapidement le lactose (24h). Selon l'O M S, ce groupe inclut : *Escherichia*, les *Citrobacter* et *Enterobacter* et *Klebsiella*. Ils sont fréquents dans les fèces d'animaux et de l'homme.

Les coliformes fécaux sont des bactéries produisant du gaz à partir du lactose à 44°C.

Remarque. *E. coli* constitue une preuve de **contamination fécale** du produit analysé.

2.5. Les streptocoques fécaux

Les streptocoques fécaux sont des hôtes normaux de l'intestin de l'homme et des animaux. Ils sont très **fréquents** dans les produits manipulés. Ces germes sont très résistants aux conditions hostiles mieux que les **entérobactéries** pathogènes et d'altérations. Le dénombrement de ces germes s'avère intéressant s'il est couplé avec celui des **coliformes fécaux**. Ainsi, la présence simultanée d'*E.coli* et de **streptocoques fécaux** indique une contamination **fécale certaine**. Par ailleurs, le rapport coliformes fécaux /streptocoques fécaux permet de situer l'origine de la contamination fécale. En effet, l'homme excrète moins de

streptocoques fécaux que les animaux par rapport au nombre de coliformes. En conséquence, lorsque $R > 1$ la contamination fécale est d'origine humaine. Elle est d'origine animale quand $R < 1$.

2.6. Les Clostridium sulfito-réducteurs

Les Clostridium sulfito-réducteurs sont des germes des intestins et du sol et des matières organiques en putréfaction. Du fait, qu'ils sont sporulés, les Clostridium sulfito-réducteurs sont beaucoup plus résistants que les autres germes indicateurs. Leur présence est facile à interpréter, elle témoigne sur une **contamination fécale ancienne** (s'ils sont seuls). La contamination fécale est confirmée s'ils sont présents à côté des **coliformes fécaux** et/ou de **streptocoques fécaux**. La présence des Clostridium sulfito-réducteurs constitue une présomption de la présence de **Clostridium perfringens** qui est l'un des germes les plus fréquents impliqués dans les intoxications alimentaires.

2.7. Les staphylocoques

Certains auteurs suggèrent de les considérer comme des germes indicateurs dans les aliments crus. Lorsque leurs présences dans les aliments cuits sont considérés comme des **pathogènes**. Ces bactéries indiquent une contamination humaine par manipulation ou par voie aérienne.

Les staphylocoques sont très répandus dans la nature, ils sont **saprophytes** de la **peau** et des **muqueuses** des êtres vivants, ce qui en fait des agents de contaminations par manipulation (*S. epidermidis* et *S. saprophyticus*). Ils ne sont pas pathogènes sauf **S. aureus** qui est entérotoxique. La toxine produite est **thermostable**. Elle est excrétée dans l'aliment au cours de la croissance. Les aliments les plus incriminés sont les produits **carnés** ou à base de **lait** et d'œuf (crème glacées, pâtisserie).

2.5. Réalisation des contrôles

1. Contrôle des matières premières

La maîtrise de la qualité microbiologique (*hygiénique* obligatoire et *marchande* souhaitée par le fabricant mais aussi le consommateur) passe par un ensemble de démarches qui vont du contrôle des matières premières brutes, en cours de transformation ou de l'aliment fini, aux pratiques de bonnes fabrications en passant par l'identification des principaux points critiques du système de production / distribution, le plus souvent par une démarche HACCP (cité si dessus). Ces analyses prennent aujourd'hui place dans la plupart des usines et des réseaux de

distribution et permettent, par la réalisation de contrôles judicieux, une bonne évaluation de la qualité et une mise en évidence d'éventuelles contaminations, les actions correctives qui en découlent sans pour autant trop alourdir les charges.

Exemple : Contrôle de la qualité d'un lait en poudre pour la préparation d'un yaourt :

Lait en poudre :

Le lait en poudre est un produit solide obtenu par élimination de l'eau du lait, du lait entièrement ou partiellement écrémé, de la crème ou d'un mélange de ces produits, et dont la teneur en eau n'excède pas 5 % en poids du produit fini.

On distingue les laits en poudre suivants :

- Le lait en poudre riche en matières grasses ou poudre de lait riche en matières grasses : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre entier ou poudre de lait entier : lait déshydraté contenant, en poids, au moins 26 % et moins de 42 % de matières grasses.
- Le lait en poudre partiellement écrémé ou poudre de lait partiellement écrémé : lait déshydraté dont la teneur en matières grasses est, en poids, supérieure à 1,5 % et inférieure à 26 %.

- Le lait en poudre écrémé ou poudre de lait écrémé : lait déshydraté contenant, en poids, au maximum 1,5 % de matières grasses. Il est recommandé de rechercher les microorganismes suivants :

Il faut prendre généralement 10 g de lait en poudre dans 90 ml de diluant TSE (tryptone – sel-eau). Agiter 10 minutes à 45°C pour bien homogénéiser la solution mère. Ensuite procéder à la recherche ou au dénombrement des germes suivants [29].

- a) flore aérobie totale (1 ml dans chaque tubes, réaliser des dilutions jusqu'à environ 10^{-4})
- b) coliformes et E. coli (1 ml dans chaque tubes réaliser des dilutions jusqu'à environ 10^{-4}) sur milieu de culture sélectif lactosé (BCPL ou du le bouillon lactosé au vert brillant et à la bile (BLBVB)
- c) streptocoques fécaux (1 ml dans chaque tubes, réaliser des dilutions jusqu'à environ 10^{-4})
- d) anaérobies SR (1 ml dans chaque tubes, réaliser des dilutions jusqu'à environ 10^{-1})
- e) recherche de Salmonella (5 à 50 ml)
- f) recherche de Staphylococcus (10 ml) sur gélose **Baird Parker** solide ou bien le milieu **Chapman mannité**
- g) levures et moisissures (1 ml ; sur boîte de pétri contenant OGA)

Selon les normes JORA, N° 39 de l'année 2016, les normes microbiologiques pour un lait en poudre sont représentées dans le tableau suivant :

Tableau 3 : Contrôle de la qualité d'un lait en poudre [33]

Catégories des denrées alimentaires	Microorganismes/métabolites	Plan D'échantillonnage		Limites microbiologiques (UFC/g)	
		n	c	m	M
Lait en poudre	Entérobactériaceae	5	2	10	10 ²
	Staphylocoques à coagulase +	5	2	10	10 ²
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25g	

2. Contrôle des levains (ferments lactiques)

1. Définition

Un ferment est une préparation microbienne d'un grand nombre de cellules, d'un seul microorganisme ou plus. Les ferments lactiques constituent un groupe diversifié de bactéries lactiques qui ont néanmoins un certain nombre de caractéristiques communes [34]. Ils sont ajoutés à une matière première pour produire un aliment fermenté en accélérant et en orientant son procédé de fermentation [35]. Aujourd'hui, les producteurs d'aliments fermentés ont le choix d'acheter des levains prêts à l'emploi, sous forme concentrée, ou de procéder eux-mêmes à la propagation des souches dans l'usine. La solution la plus employée reste l'utilisation de levains commerciaux en inoculation directe [36].

On distingue deux catégories principales de ferments :

– Ferments artisanaux

Tous les ferments disponibles, généralement, sont dérivés des starters artisanaux de composition non définie (contenant un mélange de différentes souches et/ou espèces non définies) [37].

La production de telles cultures, aussi définies comme « ferments naturels » est dérivée d'une pratique antique dénommée "back slopping" (l'utilisation d'un vieux batch d'un produit fermenté pour inoculer un produit neuf) et/ou par l'application des pressions sélectives (traitement thermique, température d'incubation, baisse de pH) [38].

– Ferments commerciaux

Les ferments commerciaux sont en général commercialisés sous forme lyophilisée et peuvent être utilisés pour l'inoculation directe de la cuve de fermentation ce qui évite la contrainte de la propagation sur place. Ces ferments sont développés en grands volumes à partir d'une culture initiale définie ou non définie, concentrée et ensuite congelée ou lyophilisée pour le stockage et la distribution [39]. Les ferments lactiques peuvent être classés en se basant sur leur fonction, leur température de croissance, ou leur composition [38].

4. Critères de sélection des ferments lactiques

La sélection de ces ferments s'appuie sur de nombreux critères afin de répondre à la fois aux spécifications demandées par l'utilisateur et aux contraintes imposées par le producteur. Ces critères relèvent éventuellement des fonctionnalités technologiques des souches, de leur performance et de leur sécurité. Ils diffèrent selon le type de produit désiré, les caractéristiques des matières premières à transformer et la technologie appliquée [40].

4.1. Critères de sécurité

Les bactéries susceptibles d'être produites et utilisées comme ferments lactiques ne doivent évidemment pas présenter de caractère pathogène et ne pas générer de substances toxiques. C'est le cas de la plupart des espèces de bactéries lactiques, qui possèdent le statut GRAS (Generally Recognized As Safe) à l'exception de certains entérocoques [41].

En Algérie

Les textes réglementaires algériens contenus dans le journal officiel de la république Algérienne, relatifs au lait et dérivés laitiers, touchent surtout aux aspects relatifs au contrôle de la qualité hygiénique et sanitaire de ces aliments. Actuellement, il n'y a aucune législation algérienne qui spécifie les conditions d'utilisation des ferments lactiques importés, les obligations concernant l'étiquetage et/ ou la composition en souches lactiques. Le Contrôle microbiologique des échantillons de ferments lactiques commerciaux nécessite des techniques classiques de microbiologie pour la recherche des :

- Coliformes totaux et fécaux ;
- Streptocoques fécaux ;
- Staphylococcus aureus ;
- Salmonelle ;
- Levures et moisissures ;

- Flore totale aérobie mésophile.

Le tableau suivant résume les microorganismes recherchés

Tableau 4 : Microorganismes des ferments lactiques

Germes recherchés	Milieu de culture utilisé	Conditions d'incubation	
		Température	Temps
<i>Coliformes totaux</i>	BLBVB liquide	37°C	24 à 48 heures
	- Bouillon VBL + cloche de Durham - Eau peptonée exempte d'indole	44°C	24 heures
<i>Streptocoques fécaux</i>	- Bouillon Rothe	37°C	24 à 48 heures
	- Bouillon Eva Litskey	37°C	24 heures
<i>Levures et moisissures</i>	OGA	30°C	5 jours
<i>Staphylocoques</i>	Gélose Chapman	37°C	24 heures
<i>Salmonelles</i>	- Eau peptonée tamponnée	37°C	16 à 20 heures
	- Bouillon sélénite cystine	37°C et 43°C	24 heures
	- Gélose Hektöen	37°C	24 heures
	- Gélose SS	37°C	24 à 48 heures

Exemple : Analyse de laits fermentés (yaourts)

La flore normale du yaourt est composée de *Streptococcus thermophilus* (ferment d'arôme) et de *Lactobacillus bulgaricus* (ferment d'acidification). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bifidus* représentent la flore de lait fermentés.

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant des billes de verre et 225 ml du milieu de pré-enrichissement et agiter pour disperser.

— Sauf spécifications contraires, contrôler le pH de la suspension et l'ajuster, si nécessaire, à 7,0. Incuber les flacons préparés conformément à jusqu'à, 37° C durant 16 h. à 20 heures.

Réaliser les dénombrements suivants (JORA, N°43, 2004)

- a) Dénombrement de la flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁸)
- b) Dénombrement des coliformes (totaux et fécaux) et *E. coli* (JORA, N°43, 2004)
- c) Staphylocoques à coagulase +
- d) Recherche des *Salmonella* (25 ml)
- e) *Listeria monocytogenes*

Le tableau suivant nous résume l'analyse d'un lait fermenté (yaourts)

La flore normale du yaourt est composée de *Streptococcus thermophilus* (ferment d'arôme) et de *Lactobacillus bulgaricus* (ferment d'acidification). *Streptococcus thermophilus* et *Lactobacillus bifidus* représentent la flore de lait fermentés "Bio".

Peser aseptiquement 25 g de l'échantillon pour essai dans un flacon bouché contenant des billes de verre et 225 ml du milieu de pré-enrichissement et agiter pour disperser.

— Sauf spécifications contraires, contrôler le pH de la suspension et l'ajuster, si nécessaire, à 7,0. Incuber les flacons préparés conformément à jusqu'à, 37° C durant 16 h. à 20 heures.

Réaliser les dénombrements suivants (JORA, N°43, 2004)

- Dénombrement de la flore aérobie totale (1 ml - 10⁻⁸)
- Dénombrement des coliformes (totaux et fécaux) et *E. coli* (JORA, N°43, 2004)
- Staphylocoques à coagulase +
- Recherche des *Salmonella* (25 ml)
- Listeria monocytogenes

Le tableau suivant nous résume le contrôle de la qualité d'un lait fermenté

Tableau 5 : Contrôle de la qualité d'un lait fermenté (Normes JORA, N°43, 2004)

Catégories des denrées alimentaires	Microorganismes/métabolites	Plan D'échantillonnage			Limites microbiologiques (UFC/g)
		n	c	m	
Laits fermentés	Coliformes totaux	5	2	3.10 ⁴	3.10 ⁵
	Coliformes thermotolérants	5	2	30	3.10 ²
	<i>Staphylocoques</i> à coagulase +	5	2	3.10 ²	3.10 ³
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25g	
	<i>Listéria monocytogenese</i>	5	0	100	

3. Contrôle de fabrication

Le contrôle qualité est un ensemble de mesures qui permet de savoir si les produits fabriqués ou vendus par une entreprise sont conformes :

- aux exigences du marché,
- à la demande du client,
- aux législations en vigueur,
- au cahier des charges de l'entreprise.

Le contrôle qualité analyse aussi les conditions de retouche ou de rejet d'un produit

Le contrôle est une opération destinée à déterminer, avec des moyens appropriés, si le service contrôlé est conforme ou non à ses spécifications ou exigences pré-établies par le

référentiel et incluant une décision d'acceptation, de rejet ou de retouche. Le contrôle microbiologique industriel permet de répondre aux exigences de qualité extrêmement élevées des industries alimentaires. La fabrication de produits alimentaires, nécessite des contrôles très sévères pour garantir leur qualité microbiologique et leur composition. Pour cela, des tests de contrôle microbiologique sont réalisés tout au long de la chaîne de production, de la matière première au produit fini et permettent par exemple de vérifier :

La stérilité : aucun micro-organisme ne doit être présent ; l'absence de bactéries pathogènes ; la non-prolifération d'une bactérie commensale (normalement présente chez l'homme et banale en faible concentration) au-delà d'un certain seuil.

L'industrie agroalimentaire nécessite pour garantir et maîtriser la sécurité microbiologique des aliments et prévenir les crises sanitaires alimentaires, la connaissance et la surveillance des microorganismes pathogènes depuis la production primaire jusqu'à la distribution des denrées alimentaires en passant par la transformation, sont indispensables.

Il existe deux systèmes principaux :

Les contrôles officiels (notamment plans de surveillance et plans de contrôle) mis en œuvre par les pouvoirs publics, et les autocontrôles effectués par les opérateurs de la chaîne alimentaire, sont présentés tels qu'ils sont établis au niveau français.

Les évolutions sont ensuite envisagées, avec le lancement de l'Observatoire de l'alimentation.

Ces contrôles se font selon 2 plans :

Les termes « plans de surveillance » et « plans de contrôles » sont à considérer ici selon les définitions suivantes :

- Plan de surveillance (PS) : un plan de surveillance a pour objectif principal l'évaluation globale de l'exposition du consommateur à un risque. Il est toujours fondé sur un échantillonnage réalisé de manière aléatoire au sein d'une population ou d'une sous-population identifiée. Ainsi, du fait de leur représentativité, les résultats de plans de surveillance constituent des valeurs de référence, utiles pour une analyse des risques sanitaires menée à une échelle nationale ;

Plan de contrôle (PC) : un plan de contrôle a pour objectif principal la recherche des anomalies, des non-conformités, voire des fraudes. Il est normalement fondé sur un échantillonnage ciblé ou suspect, c'est-à-dire que les prélèvements sont réalisés sur la base de critères de ciblage prédéterminés.

Les objectifs de ces plans sont :

- d'assurer une pression de contrôle sur les productions nationales ou en provenance de pays tiers ;
 - de constituer un outil de veille sur la fréquence et les niveaux de contamination de certaines catégories d'aliments ;
 - de répondre à des obligations au niveau de l'Union européenne ;
- D'aider à la détermination de critères réglementaires (dans un contexte communautaire, les plans répondent à une demande de contrôles harmonisés et contribuent à assurer un statut sanitaire uniforme de tous les États membres) ;
- De récolter des données pour l'analyse de risques, au niveau national (PS) ou de manière plus ciblée (PC) ;
 - et d'apporter des garanties à l'exportation et à l'importation

Autocontrôles effectués par les exploitants du secteur alimentaire

Les professionnels mettent en place des analyses microbiologiques dans le cadre des autocontrôles pour valider leurs mesures de maîtrise de l'hygiène et suivre les tendances vis-à-vis de certains indicateurs. Il a de plus renforcé la place du système HACCP en rendant obligatoire sa mise en œuvre à tous les maillons de la chaîne agro-alimentaire (production, transformation, distribution des denrées alimentaires - consommation humaine et alimentation animale), à l'exception de la production primaire. HACCP signifie Hazard Analysis Critical Control Point. Le HACCP est une méthode de gestion de la sécurité sanitaire des aliments.

En soi, l'HACCP n'est pas une norme, mais elle sert de référence à la définition de normes comme l'ISO 22000 (norme internationale, relative à la sécurité des denrées alimentaires).

Les 7 principes de l'HACCP pour la sécurité alimentaire

PRINCIPE 1 : Procéder à une analyse des dangers.

PRINCIPE 2 : Déterminer les points critiques pour la maîtrise (CCP - Critical Control Point).

PRINCIPE 3 : Fixer le ou les seuil(s) critiques(s).

PRINCIPE 4 : Mettre en place un système de surveillance permettant de maîtriser les CCP.

Entreprises concernées par la norme HACCP

Depuis 2005, intégrant les principes HACCP, la norme ISO 22000 s'applique à toute la filière agroalimentaire et vise à faciliter le management de la sécurité des denrées alimentaires, grâce

à des guides de bonne pratique concernant l'hygiène. Sont donc concernés : les producteurs d'aliments (y compris ceux qui travaillent pour alimentation des animaux), les professionnels de bouche (restaurants, maraîchers, poissonneries boucheries, épiceries fines...), les entreprises de logistique, de transport, de stockage, de conservation et de distribution, les fournisseurs d'équipement (fabricants de vitrines alimentaires, de réfrigérateurs, de couteaux...) et d'emballage, les entreprises de nettoyage et les fabricants de produits d'entretien, de lutte contre les nuisibles ou de désinfection.

Mise en place de la méthode HACCP

La norme ISO 22000 n'est pas une obligation :

Elle reste basée sur le volontariat, mais témoigne de l'engagement d'une entreprise en matière de santé publique. C'est donc la direction de l'entreprise qui fixe ses propres objectifs et nomme une personne responsable du système de management de l'hygiène. Cependant de nombreuses petites entreprises n'ont pas les moyens financiers ou matériels d'obtenir la norme ISO 22000 : C'est pourquoi l'Union Européenne a ramené le règlement 852/CE à des bases d'hygiène et d'entretien plus accessibles.

Les PME peuvent donc, depuis 2006, bénéficier d'une dispense d'agrément qui prend en compte les dimensions de leur activité. Cela ne les dispense cependant pas des règles sanitaires essentielles, ni d'être soumis à des contrôles réguliers et inopinés des services d'hygiène.

ISO 22000: 2018

Systèmes de management de la sécurité des denrées alimentaires — Exigences pour tout organisme appartenant à la chaîne alimentaire spécifie les exigences relatives à un système de management de la sécurité des denrées alimentaires (SMSDA) pour permettre à un organisme directement ou indirectement impliqué dans la chaîne alimentaire, de :

- a) planifier, mettre en œuvre, exploiter, maintenir et actualiser un SMSDA fournissant des produits et services qui sont sûrs, conformément à leur utilisation prévue ;
- b) démontrer sa conformité aux exigences légales et réglementaires applicables en matière de sécurité des denrées alimentaires ;
- C) évaluer et apprécier les exigences en matière de sécurité des denrées alimentaires établies en accord avec le(s) client(s) et démontrer la conformité à celles-ci ;
- d) communiquer efficacement sur les questions relatives à la sécurité des denrées alimentaires avec les parties intéressées de la chaîne alimentaire ;

- e) garantir la conformité avec sa politique déclarée en matière de sécurité des denrées alimentaires ;
- f) démontrer cette conformité auprès des parties intéressées ;
- g) faire certifier ou enregistrer son SMSDA par un organisme externe, ou effectuer une auto-évaluation ou une auto-déclaration de conformité au présent document.

Contrôle en cours de production

Le contrôle en cours de production doit permettre de déterminer les points critiques. Il faut donc choisir une méthode d'analyse qui permette, après interprétation, de réagir sur la fabrication en amont par un véritable "feed-back" quand un défaut d'origine microbienne est détecté. On comprend donc l'intérêt que portent les microbiologistes aux méthodes d'analyse rapides ou ultrarapides quand on sait que 24 heures à plus de quinze jours sont parfois indispensables pour obtenir des données quant à la qualité du produit ou de ses dérivés [29].

Pendant la production, les méthodes d'analyse mises en œuvre doivent être rapides, fiables, reproductibles et si possible simples (et peu coûteuses) ; elles consistent en une recherche et/ou une numération des principaux germes microbiens rencontrés dans nos aliments afin d'en maîtriser leur présence ou absence (dans le cas de germes dangereux responsables de maladies infectieuses) et leur nombre (dans le cas de germes peu dangereux, contaminants ou hôtes normaux des matières premières composant la denrée).

(ne jamais perdre de vue qu'il faut absolument garantir la sécurité des consommateurs en permettant la détection des microorganismes dangereux ou éventuellement de métabolites toxiques ou de toxines microbiennes et assurer au produit une bonne qualité et une bonne conservation).

4. Contrôle des conditions de fabrication

L'environnement de production (air, eau, surfaces) est également contrôlé régulièrement par des tests de diagnostic. Les réglementations imposent que certains produits, soient stériles lors de leur commercialisation. Cette garantie de stérilité est apportée par des tests sur les matières premières, les produits en cours de fabrication, l'environnement de production et les produits finis. La rigueur de ces contrôles est un gage de qualité : elle garantit la sécurité du consommateur durant les phases de fabrication, de stockage et de transformation.

Il est possible, grâce à des contrôles microbiologiques effectués pendant et après la phase de production, de garantir l'absence de ces germes dangereux. La quantité totale des germes (germes aérobies mésophiles) est, de ce fait, un bon indicateur de la qualité

microbiologique générale, tandis que le nombre d'entérobactéries et de colibactéries donnent des informations sur le respect de l'hygiène durant la phase de transformation des produits alimentaires.

5. Contrôle des produits finis

L'analyse microbiologique des produits finis reste encore indispensable car elle nous permet d'éviter, dans le cas où des produits dangereux ou non conformes seraient fabriqués, leur commercialisation ou leur consommation. Ce type de contrôle souvent pratiqué par des laboratoires officiels (DGCCRF : Direction Générale de la Concurrence, de la Consommation et de la Répression des Fraudes, Laboratoires des Services Vétérinaires, etc.) n'est pas préventif et ne permet pas de maîtriser la qualité microbiologique [29] des produits fabriqués. Utilisé seul, il se révèle sans grand intérêt et souvent même inutile si sa mise en œuvre est longue et sans suite.

L'analyse d'un aliment n'est pas systématique et elle peut reposer sur des présomptions. En effet, le contrôle de la qualité sanitaire est basé sur le dénombrement des germes totaux (flore hétérotrophe aérobie mésophile totale) du produit alimentaire et sur la recherche de germes indicateurs de contamination fécale tels que les coliformes (souvent associés à des flores pathogènes comme les Salmonella ou les Shigella), les entérocoques, de germes indicateurs d'une contamination tellurique comme les anaérobies sulfite réducteurs ou encore et en fonction de la nature du produit sur la recherche de germes ubiquitaires et d'origine humaine ou animale comme les Staphylococcus. Certains germes dangereux appartenant aux genres Salmonella, Vibron, Brucella, Listeria, Campylobacter, Yersinia ou encore Mycobacterium sont parfois recherchés dans des produits à risques. Les résultats obtenus permettent d'éliminer les produits suspects ou contaminés et surtout d'améliorer la qualité de fabrication par élimination des points critiques.

Conclusion

La surveillance des micro-organismes à différents stades de la chaîne alimentaire humaine et animale (principalement en production primaire, à la transformation et distribution des aliments) représente un outil essentiel pour la maîtrise de la sécurité sanitaire des aliments, en vue de protéger la santé des consommateurs.

Au niveau national, cette surveillance permet en effet d'estimer la contamination (fréquence et niveau) des aliments par des micro-organismes pathogènes pour l'Homme

(bactéries, virus et parasites), les sources de cette contamination et les produits les plus contaminés.

Pour une entreprise de la chaîne alimentaire, la surveillance est un moyen de maîtrise de la sécurité de son processus de fabrication ou de commercialisation.

Deux systèmes principaux de surveillance existent : les contrôles officiels, comprenant en particulier les plans de surveillance et de contrôle gérés par les pouvoirs publics, et les autocontrôles effectués par les opérateurs de la chaîne industrielle alimentaire.



Partie TD

TD1 : Comment préparer un échantillon pour analyse microbiologique

I- la prise d'essai

Chaque fois qu'il est nécessaire, il est procédé à une homogénéisation des produits à l'aide de techniques et d'appareils appropriés (Broyeur homogénéiseurs, stomacher)

Les prises d'essais sont effectuées sur l'échantillon homogénéisé en tenant compte de plusieurs facteurs à savoir :

- La nature du produit,
- Le nombre d'échantillons,
- Les opérations analytiques à conduire...

En générale, on prélève deux fois 25g :

- Les premiers serviront à l'analyse courante,
- Les seconds serviront à la recherche de salmonella.

I-2- Suspension mère et dilutions décimales

I-2-a- Cas des produits solides

Exemple : Viande, produits carnés, fromage....

Introduire aseptiquement 25g de produit à analyser dans un flacon préalablement taré ou dans un sachet stérile de type « stomacher » contenant au préalable 225 ml de diluant soit le TSI (tryptone sel eau)

Homogénéiser

Cette suspension constitue alors la dilution mère (DM) qui correspond donc à la dilution 1/10.

Introduire ensuite aseptiquement à l'aide d'une pipette en verre graduée et stérile 1ml de la DM dans un tube à vis contenant au préalable 9ml du même diluant. Cette dilution est alors au 1/100 ... ainsi de suite jusqu'à l'obtention de la dilution 1/100.000 soit 10^{-5} . Voir schéma n°1.

I-2-b- Cas des produits liquides

Exemple : Lait pasteurisé en sachets...

Procéder de façon aseptique au mélange de quelques sachets (5 en moyenne) pris au hasard parmi le lot de lait à analyser, dans un erlen Meyer stérile.

Ce mélange constitue donc la solution mère (SM).

Suivons ensuite les dilutions décimales de la même manière que dans le cas des produits solides, tout en considérant la SM à 1, la première dilution sera donc au 1 /10.

Voir schéma n°2

Remarque :

- 1- Au moment de la réalisation des dilutions décimales, il est impératif de changer de pipette entre chaque dilution
- 2- Contrairement à cela, lors de l'ensemencement, il est recommandé de commencer par la plus haute dilution dans le but justement de ne pas changer de pipettes.

On travaillera alors à l'aide d'une pipette graduée en verre stérile de 5ml.

Schéma 1 : Cas des produits solides

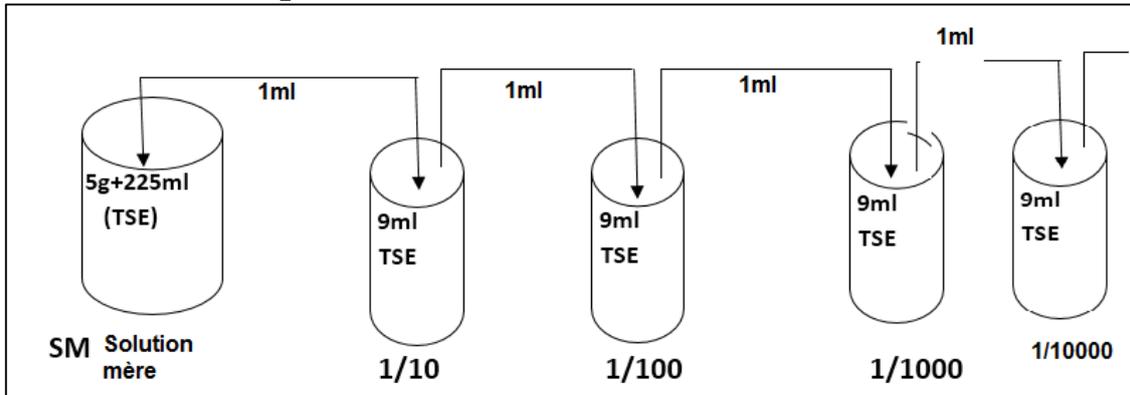


Schéma n°1.

Schéma 2 : Cas des produits liquides

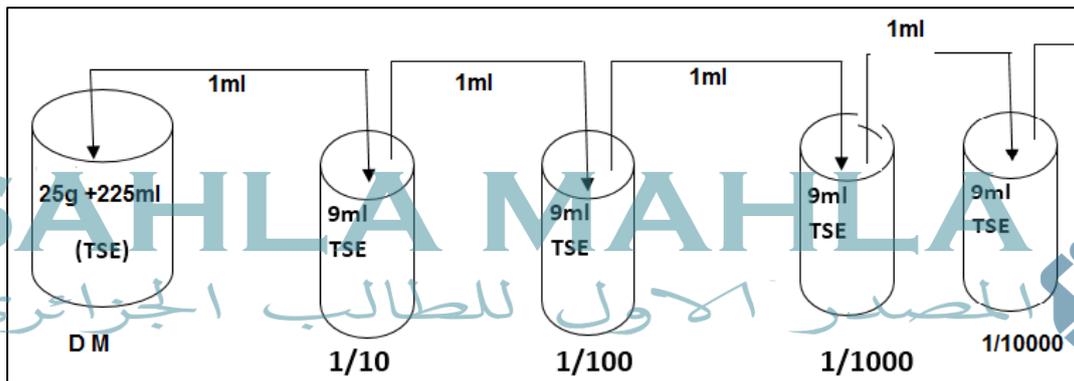


Schéma n°2.

TD2 : Rappel sur les méthodes de dénombrement

- 1) Que signifie le terme Dénombrer ?
- 2) Quelles sont les applications du dénombrement bactérien

Réponses

1) Dénombrer les bactéries = donner le nombre de bactéries par unité de volume, très souvent par ml de culture analysée.

2) -Contrôle de qualité d'un aliment

- Le nombre de bactéries existant dans un échantillon d'un lait est comparé à des seuils à ne pas dépasser (normes de qualité d'un lait).

-Evaluer la fertilité d'un sol : (en se basant sur son activité microbiologique)

Déterminer le nombre de bactéries par gramme de sol peut renseigner sur sa fertilité, spécialement les bactéries intervenant dans les cycles bio-géo-chimiques du carbone, de l'azote, du soufre, etc...

- Diagnostic d'une maladie infectieuse (Le dénombrement des bactéries dans une urine renseigne sur l'infection urinaire ou pas, grâce à une comparaison à des seuils à ne pas dépasser seuils (Tableau de Merlin).

- Degré de pollution d'un milieu aquatique : (Le dénombrement certaines bactéries (coliformes fécaux)) renseigne sur la qualité microbiologique du milieu

- étudié et son degré de pollution.

TD2. Méthodes de dénombrement

1. Méthodes directes :

*Le comptage direct des cellules se fait au microscope à l'aide d'un hématimètre appelé lame de Thoma (c'est une lame munie au centre d'un quadrillage de dimensions bien déterminées), voir exercice I.

* EPI fluorescence :

Les bactéries sont colorées par un fluorochrome (Orange d'acridine ou Erythrosine), puis observées au microscope en lumière UV. Cette méthode permet de compter sélectivement les bactéries vivantes fluorescentes à une couleur différente des cellules mortes. Cette technique a des inconvénients du fait que la couleur des cellules peut changer avec le pH du milieu par exemple.

***Compteur de particules :**

C'est un dénombrement des particules ou des cellules en suspension dans une solution d'électrolyte. Un courant électrique circule et on mesure la résistance entre 2 électrodes. Chaque particule a une résistance caractéristique.

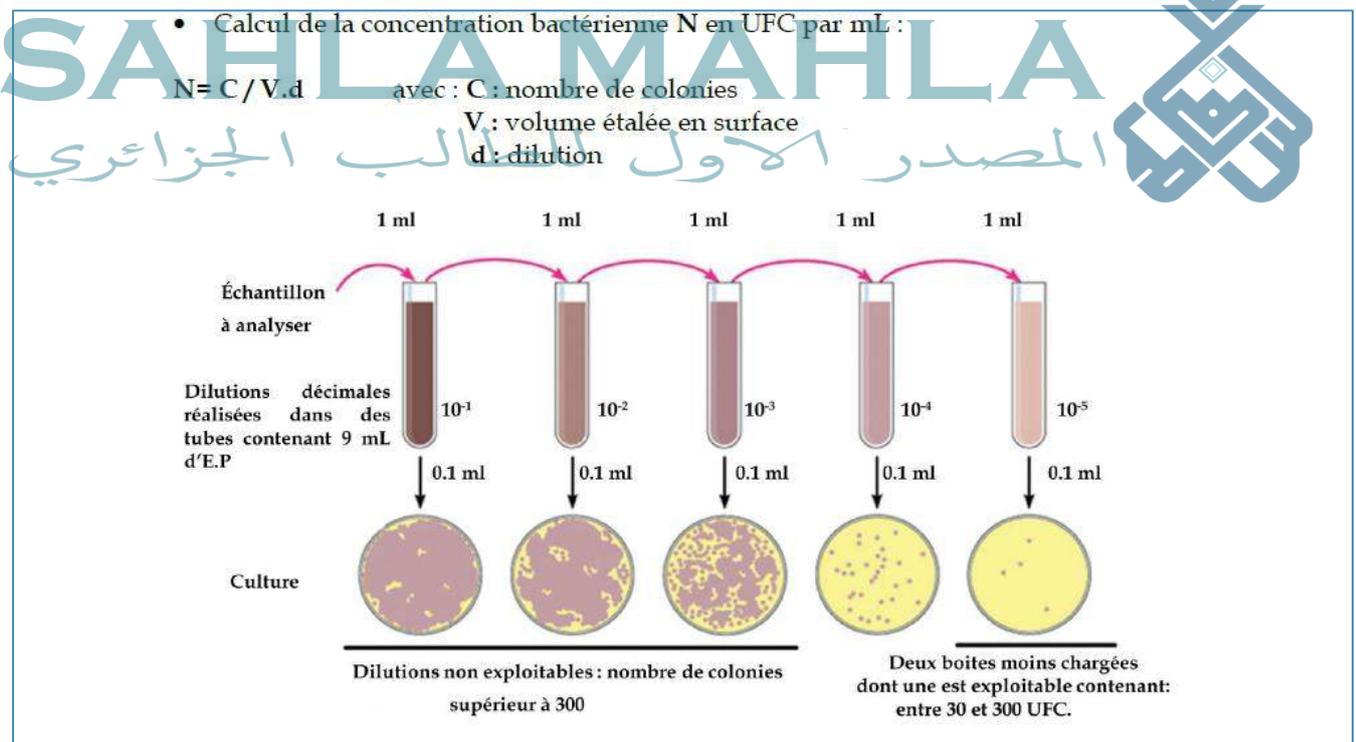
L'inconvénient de cette méthode est qu'elle va compter indistinctement cellule ou particule de même taille donc de même résistance. Le résultat est exprimé en nombre de cellule/ml

2. Méthodes indirectes

***Dénombrement après culture :**

-Sur milieu solide On réalise de dilutions décimales de l'échantillon à dénombrer (1ml de la solution mère + 9ml d'eau physiologique pour préparer la dilution 10^{-1} et ainsi de suite) puis on étale 0.1 ml de chaque dilution à la surface d'un milieu gélosé en boite de Pétri. Après incubation, on prend en comptes que les boites présentant entre (30 et 300 colonies). Les résultats sont exprimés en (UFC: unité formant colonie/ml).

1. Calcul de la concentration bactérienne N en UFC par ml :



- En milieu liquide

On utilise la méthode de Mac-Grady (1918) ou ce qu'on appelle la méthode du NPP (nombre le plus probable) et les résultats seront exprimés en (UFT : unité formant trouble). Les dilutions décimales sont réalisées à partir de la solution mère puis on ensemence pour chaque dilution une série de tubes (par exemple 3) avec 1 mL d'inoculum. Après incubation les résultats présentés ci-dessous seront interprétés comme suit :

Dilutions	10 ⁰	10 ⁻¹	10 ⁻²	10 ⁻³	10 ⁻⁴
Aspect des tubes (BLBVB + cloche)					
Résultats	+ + +	+ + +	+ + -	+ - -	- - -
Nombre de résultats +	3	3	2	1	0

On doit définir « Le nombre caractéristique : NC » de la série réalisée, qui est une combinaison de trois chiffres (correspondants à trois dilutions successives) : avec le chiffre des centaines correspond à la plus faible dilution (donc à la plus forte concentration en micro-organismes), Parmi les différentes combinaisons, on choisit celle correspondant au nombre le plus grand et, si possible, inférieur à 330.

Dans cette exemple, le NC est égale a : **321**. On le reporte le dans une table statistique de Mac Grady et on y lit le Nombre le Plus Probable (NPP) de micro-organismes présents dans l'inoculum de la dilution correspondante au chiffre des centaines du nombre caractéristique (qui est dans notre cas la 10⁻¹)

Exemple : 321 correspond au NPP de 15. Cela signifie qu'il y a statistiquement quinze bactéries dans l'inoculum de la dilution 10⁻¹

Expression du résultat : $N = \text{NPP} / d \cdot V$

Dans notre exemple : $N = 15 / 10 \cdot 1 = 150$ microorganisme par ml

Table de Mac grady

Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

TD3 M1 SAAQ

L'analyse bactériologique d'une urine infectée donne le tableau de résultats suivant, sachant que l'on a ensemencé 0,1 ml de chaque dilution par boîte de milieu de culture.

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}
Essai 1	inc	490	95	2
Essai 2	inc	501	110	0
Essai 3	inc	520	120	5

inc : incomptable

Questions :

- 1- Quelle dilution doit-on utiliser pour réaliser ce dénombrement ?
- 2- Déterminez le nombre de bactéries par ml d'urine.
- 3- Le dénombrement bactérien sur le même échantillon d'urine, par la méthode directe au microscope optique, a donné $15 \cdot 10^5$ bactéries /ml, comparer les deux résultats et interpréter

TD4 : Exercice d'application

Le dénombrement des bactéries telluriques dans des suspensions de trois sols différents a été réalisé dans un milieu liquide par la méthode du NPP.

A partir de chaque sol une suspension de 1g de sol broyé dans 10 ml d'eau physiologique stérile a été préparée. Des séries de dilutions de 10^{-2} à 10^{-7} ont été préparées dans l'eau physiologique à partir de chaque suspension de sol. Ensuite, 1 ml de chaque dilution préparée (10^{-1} à 10^{-7}) a été ensemencé dans un milieu de culture spécifique, à raison de **trois répétitions** pour chaque dilution. Après incubation à 28°C pendant 15 jours, les tubes positifs sont détectés par virage du milieu.

Les résultats obtenus sont représentés ci-dessous :

Dilution	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}	10^{-6}	10^{-7}
Sol 1	+++	+++	+++	+++	+-	+-	---
Sol 2	+++	+++	+-	---	---	---	---
Sol 3	+++	+++	+++	+++	+++	+++	+++

1) Calculez pour chaque type de sol, le nombre de germes par gramme de sol.

2) quel serait le résultat si le volume ensemencé était de 0,1 ml.

Tableau de Mc Crady (3 tubes par dilution)

Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN	Nombre caractéristique	MPN
000	0,0	201	1,4	302	6,5
001	0,3	202	2,0	310	4,5
010	0,3	210	1,5	311	7,5
011	0,6	211	2,0	312	11,5
020	0,6	212	3,0	313	16,0
100	0,4	220	2,0	320	9,5
101	0,7	221	3,0	321	15,0
102	1,1	222	3,5	322	20,0
110	0,7	223	4,0	323	30,0
111	1,1	230	3,0	330	25,0
120	1,1	231	3,5	331	45,0
121	1,5	232	4,0	332	110,0
130	1,6	300	2,5	333	140,0
200	0,9	301	4,0		

Partie Travaux pratique

TP 1 : METHODE DE CONTROLE MICROBIOLOGIQUE POUR LE LAIT PASTEURISE

Introduction

Le lait est un aliment complet, donc un bon milieu pour les microorganismes, c'est ce qui fait qu'il ne se conserve pas. Un des moyens découvert par l'homme pour augmenter sa conservation est de le faire transformer de façon plus ou moins contrôlée par certains microorganismes de façon à éviter toute autre altération. En gros, cette conservation repose sur l'élimination d'une grande partie de l'eau et sur l'acidification qui défavorise le développement des microorganismes. Selon le journal officiel algérien, les norme pour contrôler ce lait sont :

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Lait pasteurisé et autres produits laitiers liquides pasteurisés	Germes aérobies à 30 °C	5	2	10 ⁴	10 ⁵
	Enterobacteriaceae	5	0	10	
	<i>Salmonella</i>	5	0	Absence dans 25 ml	

Art. 8. Les paramètres n, c, m et M utilisés dans ce tableau représentent :

n : nombre d'unité constituant l'échantillon ;

m : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur en dessous de laquelle la qualité du produit est considérée comme satisfaisante ;

M : nombre de germes présents dans un gramme ou un millilitre de produit analysé, qui correspond à la valeur au-dessus de laquelle la qualité du produit est considérée comme inacceptable ;

c : nombre maximal d'unités d'échantillonnage de produit analysé qui peut dépasser « m » tout en étant inférieur à « M » sans que le lot ne soit rejeté.

Les résultats s'expriment de la façon suivante :

Si le résultat de l'analyse est inférieur ou égal à « m », le résultat du critère microbiologique est satisfaisant ;

Si le résultat de l'analyse n'excède pas « M » et si le nombre d'unités de l'échantillon donnant un résultat supérieur à « m » et compris entre « 1 » et « c », le résultat du critère microbiologique est acceptable ;

si le résultat de l'analyse excède « M » ou si le nombre d'unités de l'échantillon donnant un résultat compris entre « m » et « M » est supérieur à « c », le résultat du critère microbiologique est non satisfaisant.

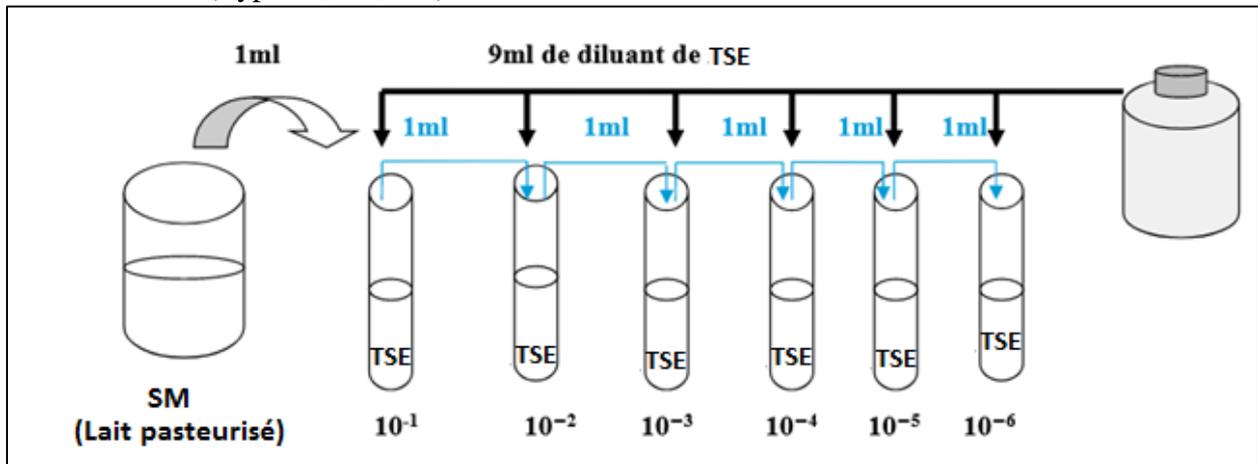
1. Préparation de l'échantillon pour essai

Il est nécessaire de rendre l'échantillon homogène avant chaque analyse, en l'agitant soigneusement en inversant rapidement 25 fois le préemballage,

- Ouvrir aseptiquement le préemballage après avoir nettoyé à l'**éthanol** la surface d'ouverture. Jusqu'au moment de l'analyse, **conserver l'échantillon à 6° C**.

2. Dilutions décimales

La préparation des dilutions décimales est effectuée avec le **diluant** à Température ambiante comme le **TSE** (tryptone, sel, eau).



Mélanger **soigneusement** chacune des **dilutions pendant 5 à 10** secondes au moyen d'un agitateur mécanique à mouvement de rotation excentré au moment de leur préparation et avant les ensemencements.

3. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30° C.

3.1 Mode opératoire (fig suivante)

Transférer en **double** 1 ml des dilutions retenues (2 et 3 ou 3 et 4) dans des boîtes de Pétri stériles. Couler 12 à 15 ml de gélose PCA, fondu au préalable et refroidi dans un bain d'eau à 45 °C ± 0,5.

La gélose PCA : elle permet de dénombrer la flore totale aérobie. Mélanger soigneusement l'inoculum au milieu (dans la masse). Laisser solidifier en posant les boîtes sur une surface fraîche et horizontale. Placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à 30°C ± 1 pendant 72h ± 2 h..

3.2 Expression des résultats

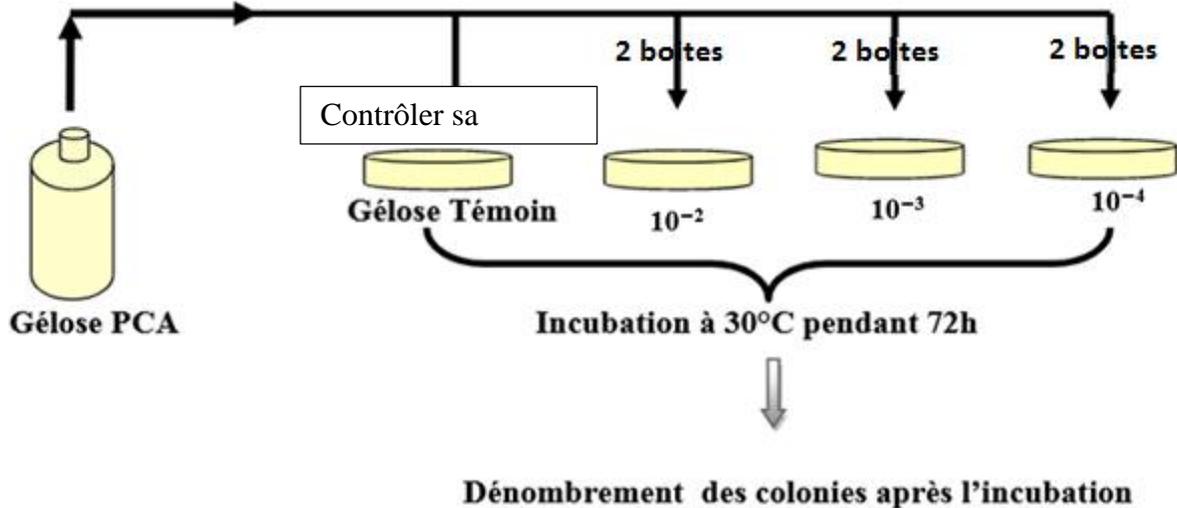
Retenir pour comptage, les boîtes de Pétri contenant un nombre de colonies compris entre **10** et **300**. Utiliser, si nécessaire, une loupe d'un grossissement de 1,5 au maximum.

3.3 Mode de calcul

Calculer le nombre de micro-organismes par millilitre de lait à l'aide de la formule suivante :

$$\text{UFC/ml} = n \times 1/v \times 1/d$$

n est moyenne des colonies sur les boîtes, d= dilution et v= volume ensemencé



4. Dénombrement des coliformes à 30° C et des coliformes fécaux.

Principe

Le dénombrement des coliformes peut se faire soit sur milieu solide tel que le **V.R.B.G** (violet cristal rouge neutre bile glucosée) ; soit sur milieu liquide le bouillon lactosé au vert brillant et à la bile (BLBVB).

Ensemencer les dilutions 10^0 à 10^{-2} en masse dans la gélose VRBL (gélose lactosée biliée au cristal violet et au rouge neutre qui est un Milieu sélectif solide (ou **VRBG**, en double couche, et double essai à l'aide de 1 ml de chaque dilution.

Ensemencer les dilutions 10^0 à 10^{-3} en milieu **BLBVB**, en triple essai. (Milieu de confirmation : bouillon lactosé bilié au vert brillant) :

Les boîtes sont incubées pendant **24 h**, à **30°C** pour les coliformes «**totaux**» et à **44°C** pour les coliformes «**fécaux**».

4.1 Expression des résultats

Dénombrement :

Après la période d'incubation spécifiée sélectionner les boîtes de Petri ayant, si possible, un nombre compris entre 10 et 150 colonies. Procéder au comptage des colonies **violacées** ayant un diamètre minimal de **0,5 mm** (parfois entourées d'une zone **rougeâtre** due à la précipitation de la bile). Ces colonies sont considérées comme des colonies typiques de coliformes et ne nécessitent **pas de confirmation**.

NOTE :

L'aspect de la zone rougeâtre dû à la précipitation de la bile entourant les colonies dépend du type de coliformes et de la qualité du milieu

Confirmation :

Si nécessaire, inoculer cinq (5) colonies atypiques dans des tubes de bouillon lactosé bilié au vert brillant. Mettre les tubes à incuber dans l'étuve réglée à 30 °C ou à 37°C pendant 24 h ± 2 h. Considérer les colonies présentant une formation de gaz dans les cloches de Durham comme des coliformes. Tenir compte de ces résultats dans le calcul.

4.2 Mode de calcul

Donner le résultat des coliformes par millilitre de lait après avoir effectué la moyenne arithmétique des colonies comptées sur boîtes ensemencées par le même volume de l'échantillon.

Les coliformes apparaissent sous forme de colonies de forme lenticulaires, violet avec un anneau rosâtre

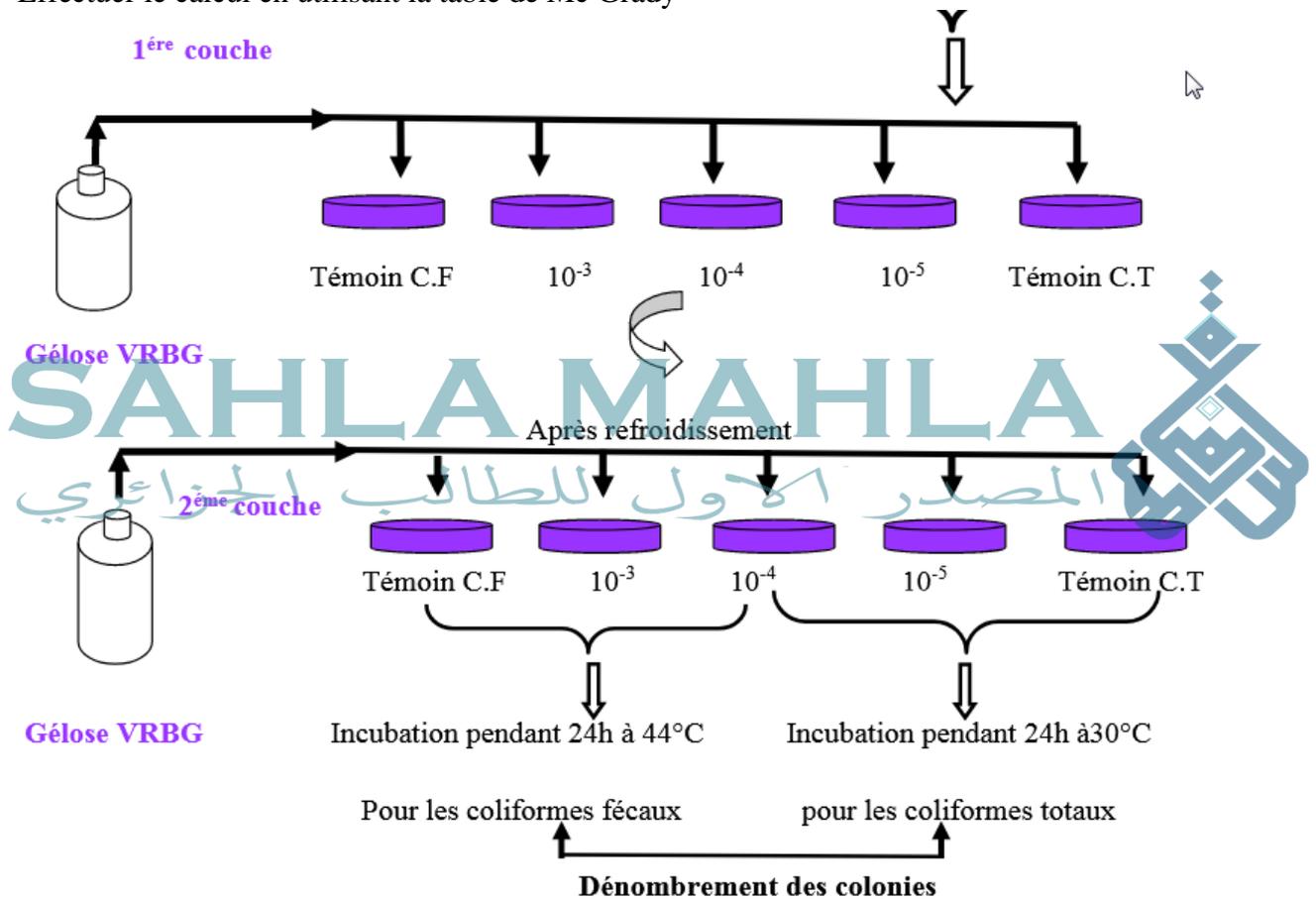
Le résultat peut être obtenu également à partir de la moyenne arithmétique entre les valeurs obtenues par l'examen de 1 ml de lait et dilution décimale, sauf lorsque le rapport de la valeur la plus faible est supérieur à 2; dans ce cas, retenir comme résultat la valeur la plus faible. Si les valeurs sont obtenues depuis une dilution décimale, multiplier par l'inverse du facteur de dilution.

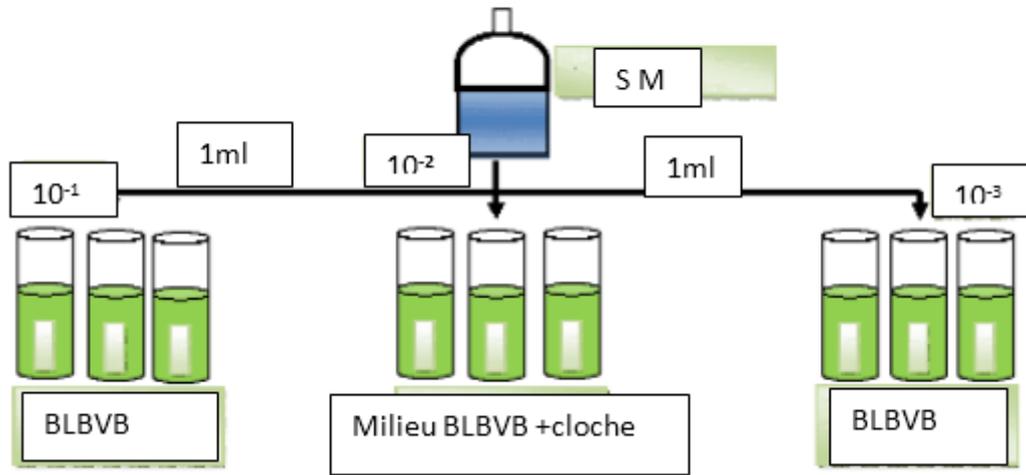
Le résultat peut être exprimé par un nombre compris entre 1 et 9,9 multiplié par 10^x «x» étant la puissance de 10 appropriée.

Question :

Compter les colonies. Présenter les résultats sous forme de tableau.

Effectuer le calcul en utilisant la table de Mc Grady





5. Dénombrement de *staphylococcus*

Principe

On peut utiliser soit le milieu **Baird Parker** solide ou bien le milieu **Chapman mannité** contient une forte teneur en NaCl (7,5%) et inhibe la croissance de nombreuses bactéries autres que les Micrococcus et Staphylococcus.

On a utilisé le milieu **Chapman**, avec ensemencement en stries de 1ml de lait prélevé de la solution mère et l'incubation à 30°C pendant 24h.

Mode opératoire

- Préparer 03 boîtes de pétri stériles.

- Ajouter la gélose Chapman mannité ou baird parker

- Après la solidification, 1 ml de lait sera pratiqué de la manière suivante :

Distribuer 1 ml à la surface du milieu de trois boîtes de Pétri sous forme de trois fractions sensiblement égales, puis étalé en utilisant le même étaleur pour les trois boîtes.

Attendre 15 minutes avant de placer les boîtes de Pétri retournées dans une étuve à $37^{\circ} \pm 1^{\circ} \text{C}$ pendant 24 à 48 heures.

Expression des résultats

5.1 Sélection des boîtes et choix des colonies

Après 24 et 48 heures d'incubation, marquer sur le fond des boîtes les colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques.

Colonies caractéristiques : Colonies noires, brillantes, convexes, entourées d'une zone transparente qui peut être translucide. Après 24 heures, peut apparaître dans cette zone transparente un anneau opalescent immédiatement au contact des colonies.

Colonies non caractéristiques : Colonies noires, brillantes convexes ou gris noirâtre ayant parfois un aspect mat et une texture sèche, dépourvues de zone transparente (excepté certaines colonies gris noirâtre).

Retenir pour comptage, les boîtes contenant moins de **250 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 140 mm; 150 colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques par boîte de 90 ou 100 mm.**

Prélever en vue de l'épreuve de la coagulase un nombre maximum de cinq colonies caractéristiques et/ou non caractéristiques en tenant compte de leur nombre respectif. De manière identique, dix colonies au maximum seront prélevées dans le cas d'un volume réparti en trois fractions ou en double.

5.2 Epreuve de la coagulase

Inoculer la colonie dans un bouillon cœur et incubé dans une étuve à 37° C durant 20 à 24 heures.

Pour l'épreuve de la **coagulase**, utiliser un plasma de lapin contenant de l'E.D.T.A. (acide éthylène diamine tétra-acétique), à défaut ajouter une solution d'E.D.T.A. de sorte que la concentration finale dans le plasma réhydraté soit de 0,1 %.

L'épreuve est reconnue positive lorsque le coagulum occupe plus des trois quarts du volume initial.

5.3 Expression des résultats

Si au moins 80 % des colonies examinées sont coagulase positive, considérer que la totalité des colonies dénombrées correspond à *Staphylococcus aureus*, sinon, exprimer le résultat global en tenant compte des proportions (colonies caractéristiques et colonies non caractéristiques).

6. Recherche des Salmonelles

6.1 Mode opératoire

6.2 Pré enrichissement

Afin de réduire la charge de travail, prélever aseptiquement de chacune des cinq unités, 250 ml de lait et les rassembler dans un récipient stérile de 1,5 à 2 litres.

Abandonner à la température ambiante pendant 1 heure, si nécessaire, ajuster le pH à 6,8 environ.

Introduire aseptiquement 2,25 ml d'une solution aqueuse à 1 % de vert brillant. Mélanger soigneusement.

Incuber à l'étuve à 37° C pendant 20h ± 2 heures.

6.3 Enrichissement

Introduire 10 ml de lait pré enrichi dans 100 ml de bouillon Muller Kauffmann au tétrathionate et au vert brillant ; faire incuber dans un bain d'eau à 43°C± 1 pendant quarante-huit heures. Et dans 100 ml de bouillon au sélénite-cystine, faire incuber à l'étuve à 37°C ± 1 pendant quarante-huit heures.

6.4 Isolement

Après l'incubation, pratiquer à partir de chaque bouillon des isolements. Effectuer les isolements à la surface de deux milieux sélectifs solides coulés de préférence dans des boîtes de Pétri de 140 mm.

Utiliser la gélose au **vert brillant** et au **rouge de phénol**, et la gélose au **sulfate de bismuth**.

En raison de l'existence possible de *Salmonella* atypiques, lactose +, on peut substituer la gélose au vert brillant et au rouge de phénol par un autre milieu sélectif, par exemple : la gélose XLD, la gélose **Hektoen (0,1 ml en surface)**.

Retourner les boîtes à l'étuve à 37° C pendant dix-huit à vingt heures. Si le développement est insuffisant, poursuivre l'incubation.

TP n°2

Contrôle de la qualité microbiologique d'un miel

Le miel se présente sous différentes textures : solide, crémeux, liquide. Une quatrième texture existe, mais elle est particulière à un miel : gélatineux pour le miel de callune.

Remarque :

Les germes mésophiles seront inférieurs à 30 UFC/ g. Il n'y aura pas de germes coliformes fécaux, ni de micro-organismes pathogènes pour l'homme (germes, levures, champignons).

Catégories des denrées alimentaires	Micro-organismes/ métabolites	Plan d'échantillonnage		Limites microbiologiques (ufc/g)	
		n	c	m	M
Miel	Levures et moisissures	5	1	10 ²	10 ³

1- Microbiologie du miel :

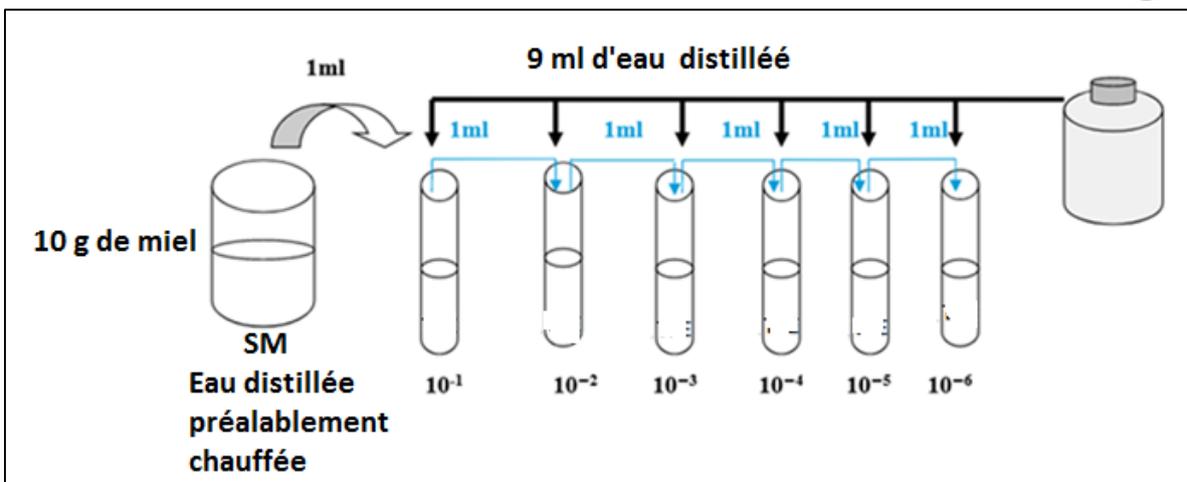
Les microorganismes présents dans le miel sont essentiellement des levures et des bactéries **sporulantes**. Les formes végétatives de ces bactéries sont absentes.

Les levures que l'on peut trouver dans le miel sont **des levures osmophiles**, capables de se multiplier dans des solutions très concentrés en sucre. Elles peuvent être responsables d'une fermentation du miel.

1.1. Effectuer un dénombrement microbien (flore aérobie totale et levures)

Peser 10,0 g de miel dans un sac stomacher. Ajouter 90 mL de diluant (eau distillée stérile préalablement chauffée au bain marie 30°C) et effectuer une gamme de dilution jusqu'à 10⁻⁶.

Variante : Faire stériliser des flacons schott bleus avec 90 ml d'eau stérile, puis ajouter 10 g de miel pour la recherche des levures.

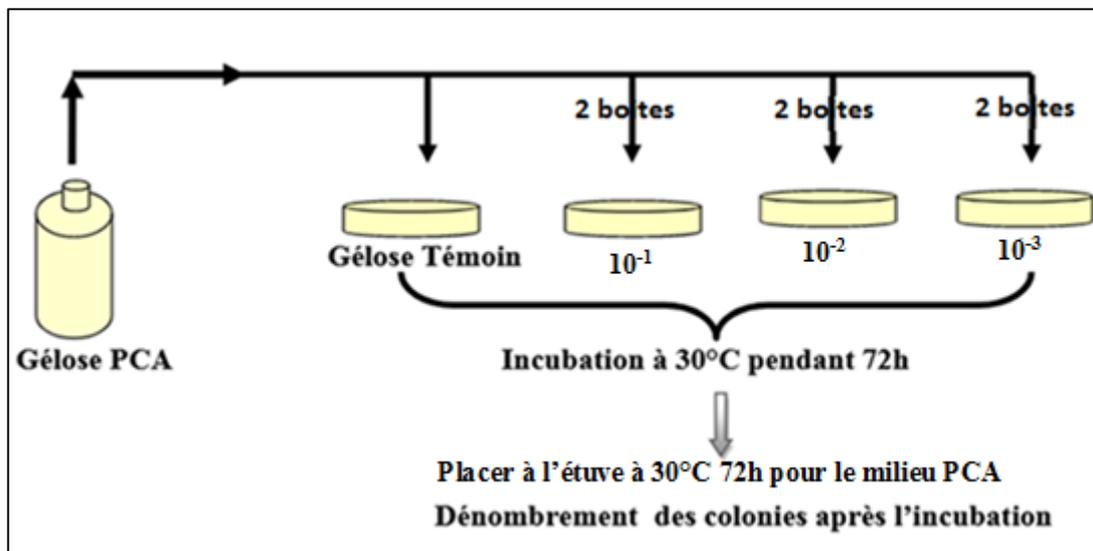


1.2. Dénombrement en milieu solide sur milieu PCA et Sabouraud au chloramphenicol:

- Ensemencer en surface 0,1 mL des dilutions 10⁻¹ 10⁻² sur le milieu Sabouraud (Dénombrement levures)

- Ensemencer en surface 0,1mL des dilutions 10^{-1} 10^{-2} sur le milieu PCA (Dénombrement flore aérobie 30°)

Placer à l'étuve à 30°C pendant 72h pour le milieu PCA
et 25°C pendant 5 jours pour le milieu Sabouraud



Q1 : Déterminer le nombre de microorganisme aérobie et de levures par .mL-1 et le nombre de levures.g-1 de miel analysé.

SAHLA MAHLA

TP n° 3

المصدر الأول للطالب الجزائري
TP 02 : Méthode d'analyse microbiologique de la viande bovine hachée

I. Introduction

La viande et les produits carnés sont particulièrement sensible à la prolifération bactérienne, en raison de leur haute teneur en eau et en substances nutritives, essentiellement des bactéries protéolytiques qui entraînent des modifications néfastes sur l'odeur, la couleur, la texture et produisent des substances toxiques. C'est donc une matière première fragile qui doit être strictement surveillée en raison du danger dû à ces altérations et à la présence éventuelle de germes pathogènes.

La microflore de contamination des viandes et des produits à base de viande comprend essentiellement les germes saprophytes et test d'hygiène et éventuellement une flore pathogène responsable des maladies

Les carcasses des animaux et les viandes découpées sont contaminées par les poils, les fèces des animaux ou les manipulations durant les opérations d'abattage et de traitement des viandes, lors du transport, lors du stockage et la commercialisation, lors de la décongélation, et encore lors du découpage. Les facteurs de contamination de la viande hachée par les germes pathogènes et les bactéries saprophytes sont surtout la mauvaise hygiène du personnel et des manipulations.

L'évolution des germes de contamination sur les viandes hachées est fonction d'un certain nombre de paramètres dont les plus importants sont les nutriments, la contamination initiale, le pH, la température et l'activité de l'eau

Objectif :

Analyser la viande hachée cru en déterminant les microorganismes qu'elle contient et en identifiant leurs différents types

Principe :

Le principe consiste en premier lieu à faire isoler la population bactérienne qui se trouve dans l'échantillon, puis faire étaler les différentes dilutions préparées à partir de la suspension, sur différents milieux de cultures, pour favoriser la croissance de telle ou telle population qui se trouve dans l'échantillon.

II. Types de germes recherchés :

Les germes recherchés dans la viande hachée appartiennent aux groupes des germes suivants : **Germes totaux, Coliformes Fécaux, Clostridium, Staphylococcus aureus et Salmonella.**

III. Mode opératoire :

1- préparation de la suspension mère :

- Pour cette analyse **25g de viande** hachée sont aseptiquement sous la hotte dans un sachet stomacker stérile.
- On ajoutant 225ml de TSE, on met ce sachet stomacker dans un broyeur stomacker pendant 1 à 2 min pour l'homogénéiser.

2- préparation des dilutions décimales :

- à l'aide d'une pipette stérile 1ml de la solution mère est prélevé puis introduit dans un tube contenant 9ml de TSE, c'est la dilution $(1/100)10^{-2}$.
- la dilution $(1/1000)10^{-3}$ sera préparée de la même façon à partir des dilutions précédentes.

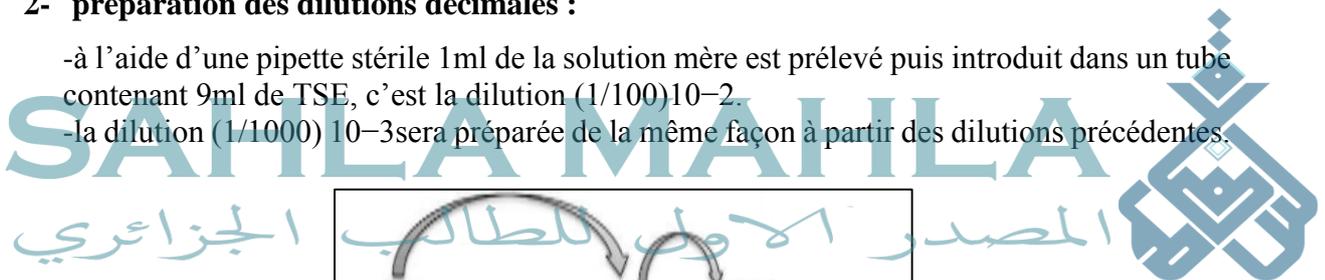


Figure 1 : préparation de la solution mère et des dilutions décimales.

3- Dénombrement des germes totaux :

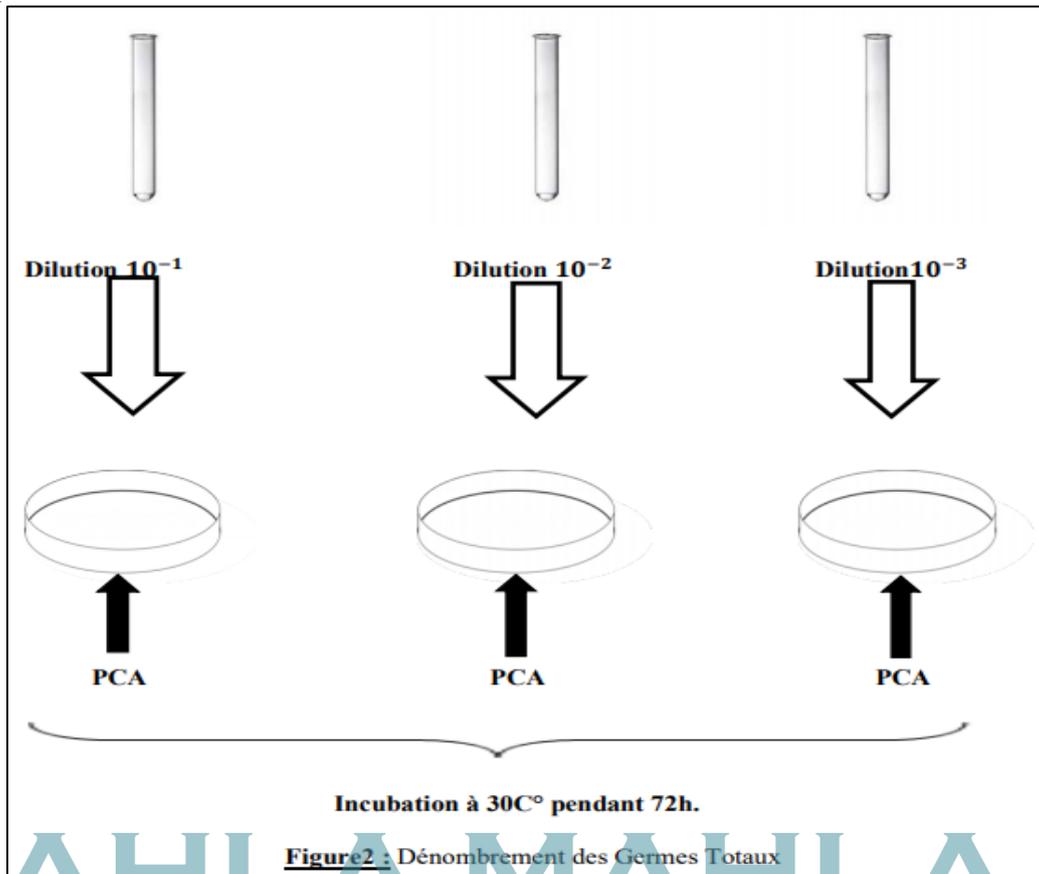
La fore aérobic mésophile totale (FAMT) capable de se multiplier entre +25 et +40°C en aérobiose.

- Leur dénombrement s'effectue sur le milieu PCA (cf TP précédent).

Ensemencement et incubation :

- On ensemence en masse 1ml à partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3}

-après solidification, les boites de pétries ainsi préparées sont incubées dans une étuve réglée à 30C° pendant 72h.



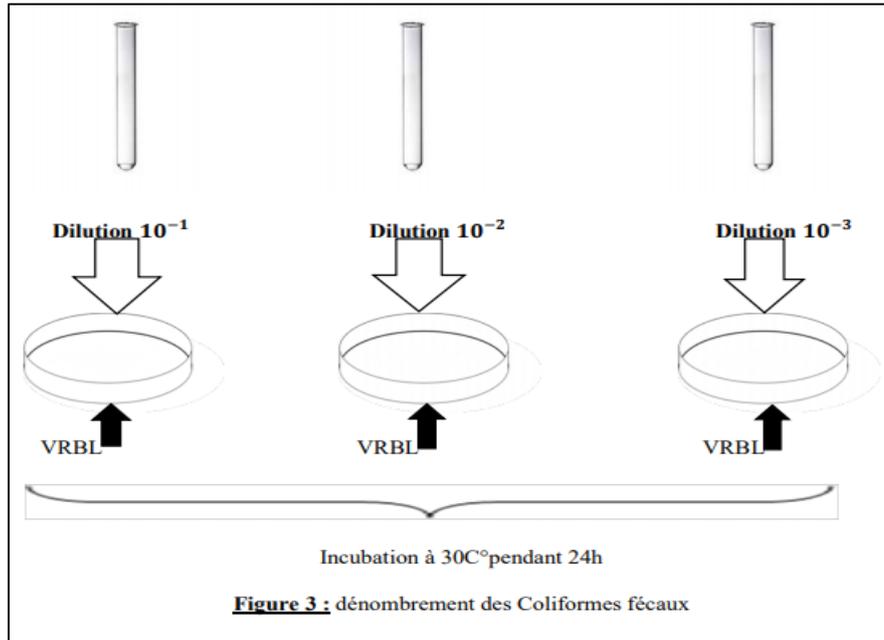
4- Dénombrement des Coliformes Fécaux :

Les Coliformes fécaux sont thermorésistants qui forment des colonies caractéristiques dans la gélose VRBL.

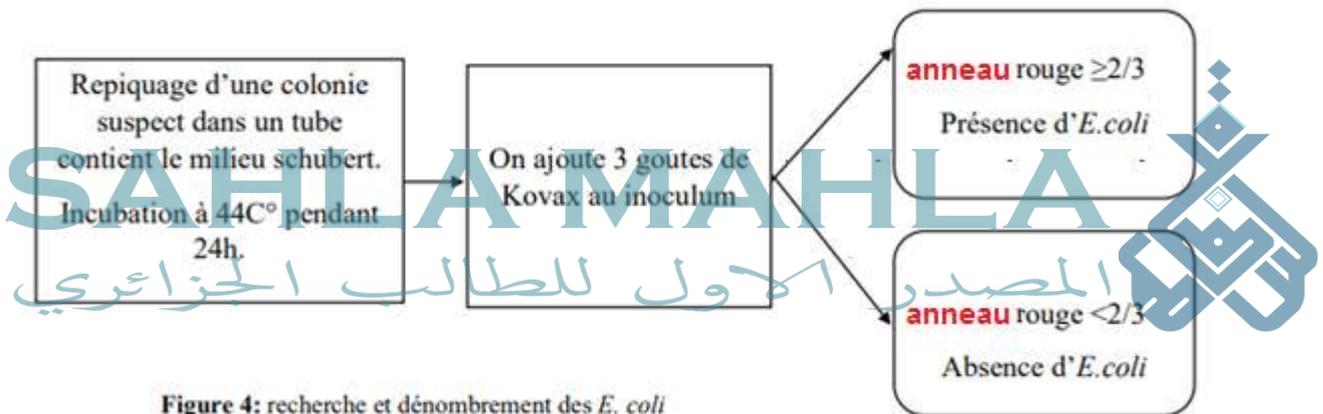
Ensemencement et incubation :

-on ensemence en masse 1ml à partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .

-après solidification les boites de pétries ainsi préparées sont incubées dans une étuve réglée à 30C° pendant 24h.



-Parmi les Coliformes Fécaux on à rechercher les *E. coli*



5- Dénombrement de Clostridium :

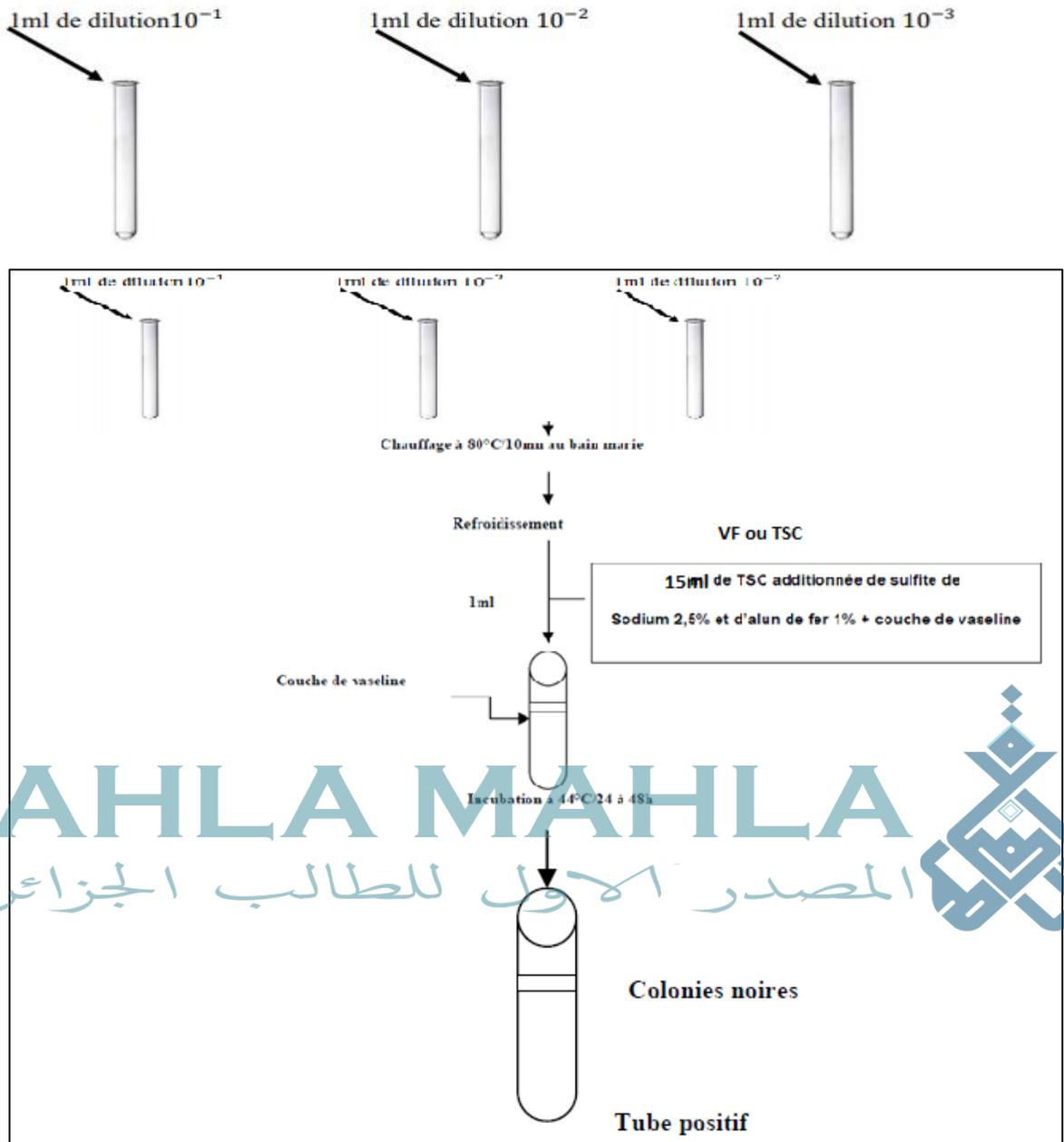
Milieu de culture : - viande-foie / TSN

Ensemencement et incubation :

-Dans des tubes stériles, 1ml des solutions mères ou dilutions décimales est introduit. Ensuite remplir les tubes de gélose VF fondue puis refroidie à 45°C.

-Incuber les tubes à 46°C pendant 72h.

Les colonies caractéristiques sont de couleur noire.



6- Dénombrement de Staphylococcus aureus :

Milieu de culture : le milieu Baird Parker (BP) / Chapman.

Ensemencement et incubation :

- On ensemence en surface 0.1 ml à partir des dilutions 10^{-1} , 10^{-2} et 10^{-3} .
- l'inoculum est étalé et les boîtes sont ensuite incubées à 37°C pendant 48h.

Test de coagulase :

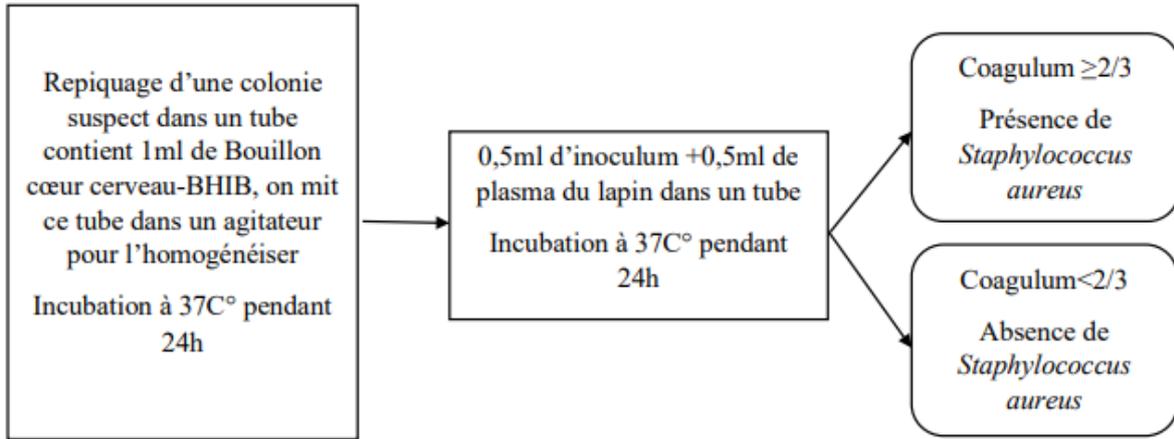


Figure 6 : recherche et dénombrement des *Staphylococcus aureus*

7- Dénombrement de Salmonella :

7.1.pré-enrichissement :

- 25g de viande hachée sont aseptiquement sous la hotte dans un sachet stomacker stérile, on ajoutant 225ml d'eau peptonnée tamponnée. On met le sachet stomacker dans un broyeur stomacker pendant 1à2 minutes pour l'homogénéiser.
- le sachet stomacker est incubé à l'étuve à 37C° pendant 24h.

7.2. Enrichissement :

- après 24h, 0,1ml de ce homogénéisa est prélevé puis introduit dans un tube contenant 10ml de bouillon Rappaport.
- le tube est incubé à 37C° pendant 24h.

7.3. isolement :

- 1goutte de ce tube est prélevé à l'aide d'une anse de platine, et puis étalé sur le milieu héktoine.
- on divise la boîte de pétrie sur 3 et on étale la goutte par des stries séries.
- la boîte est ensuite incubée à 37C° pendant 24h.

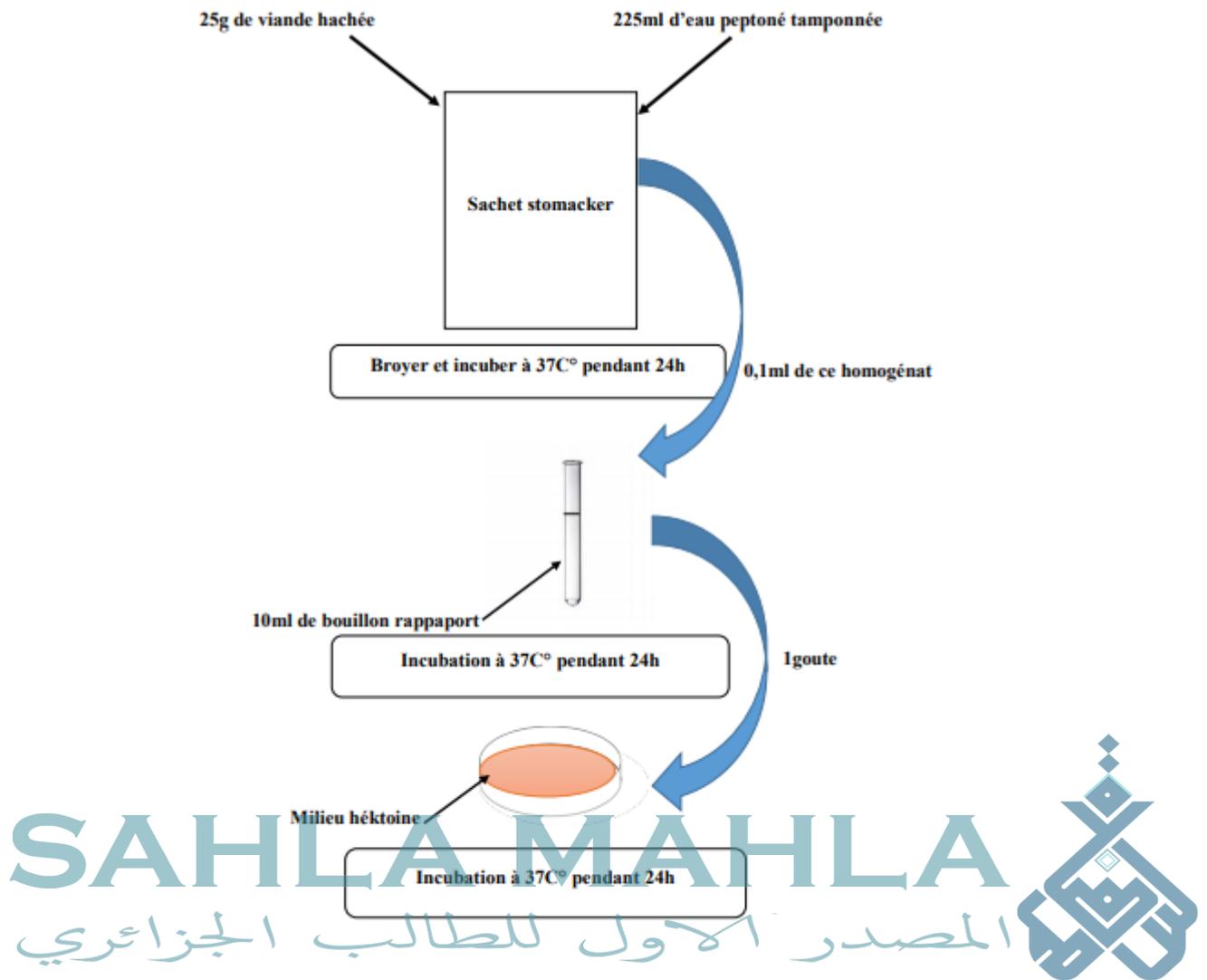


Figure 7: recherche et dénombrement de *Salmonella*

VI. Expression des résultats :

Ce tableau présente les germes recherchés dans la viande hachée et leur seuil toléré selon le journal Officiel Algérien

Les germes recherchés	Le seuil toléré
germes totaux	5.10^5
Coliformes fécaux	10^2
<i>E.coli</i>	50
<i>Clostridium</i>	30
<i>Staphylococcus aureus</i>	10^2
<i>Salmonella</i>	Absence/10g

Tableau 1: types de germe recherchés dans la viande hachée et leur seuil toléré

(JORA.,1998)

Références bibliographiques

- [1]. Juran J.M. (1998). Quality Control Handbook, McGraw-Hill, 4^{ème} édition, 1808 p.
- [2]. Mathieu S., Del Cerro C. and Notis M-H. (1996). Gérer et assurer la qualité, AFNOR, 6^{ème} édition, 703 p.
- [3]. Garfield, F.M. 1984. Quality Assurance Principles for Analytical Laboratories. Association of Official Analytical Chemists, Arlington, VA.
- [4]. Larpent J.P. (1997). Microbiologie alimentaire : technique de laboratoire. Ed, Lavoisier 1073p.
- [5]. Naït Ali M., Laurent Guillier L. and Dubois-Brissonnet F., (2017). Risques microbiologiques alimentaires. Editeur, Lavoisier Tec & Doc. ISBN : 978-2-7430-2106-1 .840p.
- [6]. Règlement (CE) n°882/2004 que dit-il ? Le RÈGLEMENT (CE) n°882/2004 parle des contrôles officiels effectués pour s'assurer de la conformité avec la législation sur les aliments pour animaux et les denrées alimentaires. Cette législation est relative à la santé animale et au bien-être des animaux.
- [7]. Lombard B. (2012). Méthodes d'analyse des aliments : le cas des analyses microbiologiques. Journée « Surveillance de la qualité sanitaire des aliments »,
- [8]. Règlement (CE) no 854/2004 du Parlement européen et du Conseil du 29 avril 2004 fixant les règles spécifiques d'organisation des contrôles officiels concernant les produits d'origine animale destinés à la consommation humaine. JOCE L 139 du 30/04/2004, 206-319
- [9]. Bourgeois C.M. and Cleret J.J. (1980). Principes de base du contrôle microbiologique industriel et de son exploitation in "Bourgeois C.M. et Leveau J.Y. Le contrôle microbiologique. Lavoisier, Paris, 3, 3-11.
- [10]. Bouix M. and Leveau J.Y. (1980). Les levures in tl Bourgeois C.M.et Leveau J.Y. Le contrôle microbiologique". Lavoisier. Paris, 3, 130-144.
- [11]. Bourgeois C.M., Mesle J.F. and Zucca J. (1988). Microbiologie Alimentaire : Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires. Tome 1, Edité par Tec & Doc Lavoisier, *Apria*.419 p.
- [12]. Andrews W.H. (1996). International three validation programs for methods used in the microbiological analysis of foods. *Trend in Food Sci. Technol.* 7:147-151.
- [13]. AFSA, 2007. Agence française de sécurité sanitaire des aliments concernant les références applicables aux denrées alimentaires en tant que critères indicateurs d'hygiène des procédés. Saisine n° 2007-SA-0174.1-21p.
- [14]. Dziezak J.D. (1987). Rapid methods for microbiological analysis of foods. *Food Technol.* 41(7) :56-73.

- [15]. Guiraud J.P and Rosec J.P. (2004). Pratique des normes en microbiologie alimentaire. *Ed. AFNOR*. 298p.
- [16]. Legroux R., Bovet D and Lavaditi J.C. (1947). Présence d'histamine dans la chair d'un thon responsable d'une intoxication collective. *Ann. Inst. Pasteur*, janv. p. 101-104.
- [17]. Guiraud J and Galzy P. (1980). L'analyse microbiologique dans les industries agro-alimentaire, Collection génie alimentaire. Les éditions de l'usine nouvelle, Paris, France, 239 p.
- [18]. Derozier G. (2005). Transformation Carnée à la Ferme, Connaitre Les Différents Processus de la fabrication, *Ed Educugri*, dijon.
- [19]. Guiraud J. and Galzy, (1998). Aspect microbiologique de la sécurité et de la qualité alimentaires » vol 1.
- [20]. Multon J-L. and Davenas J. (1994). Qu'est-ce que la qualité d'un produit alimentaire et quels en sont les opérateurs ? In : Multon J-L, Arthaud J-F, Soroste A., La qualité des produits alimentaires, Tec & Doc, 2e édition, 1994, 753 p.
- [21]. GS1, 2009. Business Process and System Requirements for Full Chain Traceability. *Changes*, (1), pp.1-77.
- [22]. FAO, 1992. Manuels sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires. Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture Rome, 1992. ISBN 92-5-203053-0. 88p.
- [23]. Bougeois C.M and Mafart P., (1991). Techniques globales d'évaluation de la microflore. In: Techniques d'analyse et de contrôle dans les industries agro-alimentaire, vol 3, Le contrôle microbiologique (Bourgeois CM, Leyeau JY, eds). Tee & Doc Lavoisier APRIA, Paris, 50-71.
- [24]. FAO. 1993. Imported food inspection. Food and Nutrition Paper 14/15 - Manuals of food quality control. Rome. Imported food inspection. Food and Nutrition Paper 14/15 - *Manuals of food quality control*. Rome.
- [25]. FAO. 1991. L'administration des programmes de contrôle des aliments. Etudes FAO : Alimentation et nutrition - Manuel sur le contrôle de la qualité des produits alimentaires, n° 14/11. Rome.
- [26]. Woodhouse D., (1999), « Qualité et internationalisation de l'enseignement supérieur », IMHE, OCDE.
- [27]. Leclerc H. and Mossel D.A.A. (1989). Microbiologie : le tube digestif, l'eau et les aliments. Doin. Paris.
- [28]. Ernoul R. (2005). Gestion pratique des contrôles dans l'industrie, publiée par l'Afnor dans « certification ISO 9000 »
- [29]. Cuq J.L., (2007). Contrôle microbiologique des aliments. Manuel technique, Polytech. Département des Sciences et Technologies des Industries Alimentaires, Université Montpellier II, 119 p.

- [30]. Guiraud J. P. (2003). Microbiologie alimentaire. Technique et ingénierie, Dunod, série Agro- alimentaire, Paris, 652 p.
- [31]. Mutsch L. (2018). Critères microbiologiques applicables aux denrées alimentaires. Division de la sécurité alimentaire. Edition Août 2018. 57p.
- [32]. Lignes directrices et normes pour l'interprétation des résultats analytiques en microbiologie alimentaire, sur site internet www.agr.gouv.qc.ca/qasa/cqiasa/dleaa.htm, août 2009, Centre québécois d'inspection des aliments et de santé animale du ministère de l'Agriculture, des Pêcheries et de l'Alimentation, Québec.
- [33]. JORA 2016. Arrêté du 12 Joumada Ethania 1437 correspondant au 21 mars 2016 rendant obligatoire la méthode de contrôle de la stabilité des produits appertisés et des produits assimilés.
- [34]. Lamontagne M., Champagne C.P. and Gardner N. 2010. Microbiologie du lait. Dans : VIGNOLA C.L. Science et technologie du lait. Fondation de technologie laitière. Québec : Presses internationales polytechniques, p.75-153.
- [35]. Leroy F. and De Vuyst L. (2004). Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends Food Science and Technology*, 15:67–78.
- [36]. Hansen E-B. (2002). Commercial bacterial starter cultures for fermented foods of the future. *International Journal of Food Microbiology*, 78:119–131.
- [37]. Brusetti L., Malkhazova I., Mora D., Borin S., Merabishvili M., Zaccaria A., Colnago D., Chanishvili N. and Daffonchio D. 2008. Fluorescent-Box-PCR, an improved tool for resolving bacterial genetic diversity and biogeography studies. *BMC Microbiol*, vol. 8, p. 220-232.
- [38]. Carminati D., Giraffa G., Quiberoni A., Binetti A., Suárez V. and Reinheimer J., 2010. Advances and trends in starter cultures for dairy fermentations. In: *Biotechnology of lactic acid bacteria: Novel Applications* (Mozzi F., Raya R.R. ET Vignolo G. M.). 177-192.
- [39]. Robinson R. K. (2002). Dairy Microbiology Handbook, third Edition, New York USA: John Wiley and Sons, p.764.
- [40]. Béal C., Marin M., Fontaine E., Fonseca F. and Obert J.P. (2008). Production et conservation des ferments lactiques et probiotiques. In : Bactéries lactiques, de la génétique aux ferments (Corrieu G. et Luquet F. M.). *Tec & Doc, Lavoisier*. Paris. 661-765.
- [41]. Ammor S., Tauveron G., Dufor E. and Chevalier I. (2006). Antibacterial activity of lactic acid bacteria against spoilage and pathogenic bacteria isolated from the same meat small-scale facility 1- Screening and characterization of antibacterial compound. *Food Control*. 17: 454-461.

INDEX DES TABLEAUX

Tableau	Titre du tableau	page
1	Exemple de plan d'échantillonnage à 3 classes selon Cuq [29].	25
3	Contrôle de la qualité d'un lait en poudre [33]	39
4	Microorganismes des ferments lactiques	42
5	Contrôle de la qualité d'un lait fermenté (Normes JORA, N°43, 2004)	43

INDEX DES FIGURES

Figure	Titre de la figure	Page
1	Distribution des échantillons d'après l'ICMSF	23

SAHLA MAHLA

المصدر الاول للطالب الجزائري

