

Chapitre III

I. Le choix des paramètres à mesurer et les niveaux du contrôle

I.1. Le choix des paramètres à mesurer et des critères

Dans le cas de l'autocontrôle industriel, on en vise l'efficacité, il est indispensable de sélectionner un nombre réduit d'analyses, suffisamment informatives pour jouer le rôle d'indice de qualité.

a) Les indices de la qualité hygiénique

- **La flore totale mésophile (FTAM)** (comptage des colonies visibles à 30°C après 3 jours), elle apporte quelques informations sur la salubrité du produit.

- Les entérobactéries

On peut utiliser comme indice le nombre total d'entérobactéries, ou bien le nombre de coliforme, ou encore le nombre de coliforme fécaux, ou plus généralement le nombre d'*Escherichia coli*.

La recherche directe de *Salmonella* peut être nécessaire pour certains produits.

- Les staphylocoques

b) Les indices de la qualité organoleptique et normes de conservabilité

La qualité organoleptique et la durée prévisible de conservation de produits sont déterminées par la flore totale.

L'altération n'apparaît que pour des flores totales élevées d'ordre de 10^6 - 10^8 cellules par g.

L'évaluation globale de la flore doit se faire dans des conditions permettant d'évaluer effectivement la flore d'altération.

Ex : - aliment conservé sous réfrigération (flore psychrotrophe)

- aliment subissant un traitement thermique (dénombrement des anaérobies après chauffage de 10 min à 80°C pour la recherche de *Clostridium*).

I.2. Les niveaux du contrôle

Il existe trois niveaux du contrôle :

- Contrôle de la matière première

- Contrôle au cours la fabrication (toutes les boucles critiques)
- Contrôle du produit fini
-

1.2.1. Contrôle de la matière première

Le contrôle microbiologique des matières premières doit permettre de vérifier que celle-ci ne renferme pas de micro-organismes risquant de gêner le déroulement de la fabrication ou des micro-organismes ne peuvent être éliminés par la technologie mise en œuvre : deux technologies :

- Technologie avec fermentation
- Technologie sans fermentation

a) Biotechnologie avec fermentation

Pour qu'une fermentation se déroule dans de bonne condition, il faut ensemer le levain dans un milieu stérile (production d'antibiotique) sauf dans le cas particulier (ex : Cidrerie (jus fermenté de pomme) ou la fermentation est conduite avec les micro-organismes indigène, le contrôle de la matière première dans les industries de fermentation est donc ramené le plus souvent à un contrôle de stérilité ou un contrôle de propreté microbiologique du milieu).

b) Biotechnologie sans fermentation

La qualité microbiologique doit être maintenue à l'aide des facteurs physico-chimiques habituels (pH, AW, T°), au niveau des matières premières, les contrôles microbiologiques consistent donc à rechercher les micro-organismes potentiellement dangereux contenant dans des conditions technologiques ultérieures.

1.2.2. Contrôle du levain

La majeure partie des levains doit contenir 10^7 - 10^8 germes/g (bactéries) (volume= $1\mu\text{m}^3$) ; 10^6 - 410^7 cellule/g (levures) (levure= 30 - $100\mu\text{m}^3$).

Trois grands types de levains sont utilisés dans l'industrie:

- Levain à *Saccharomyces* (levure) ;
- Levain à moisissures (ATB) ;
- Levain à bactéries.

a) Contaminants microbiens

L'analyse de levain doit permettre d détecter des contaminants présent à des taux souvent très faible par rapport aux cellules de culture.

- Les contaminants les plus fréquents dans les levains à saccharomyces sont les **levures sauvages les bactéries lactiques** ;
- Dans les levains à moisissures sont des **bactéries acétiques** ;
- Dans les levains bactériens d'autres bactéries et des bactériophages.

A coté des contaminants, le contrôle du levain est d'abord un contrôle de viabilité et d'activité physiologique. Pour les levures à Saccharomyces, ce contrôle peut être :

- Un pouvoir fermentaire (cinétique de dégagement de CO₂ ou de consommation de sucre dans des conditions standards) ;
- Dans le levain à bactéries lactiques ce contrôle peut être effectué par l'étude de la cinétique ;

La recherche de contaminant microbien se fait le plus souvent par des technologies microscopiques, d'autres techniques sont plus au moins utilisées :

❖ **Techniques par culture** : des techniques par culture peut utiliser des milieux banaux ou des milieux correspondant aux milieux de fabrication (fermentation) dans ce cas l'aspect des colonies obtenues renseigne sur la présence éventuelle de contaminants.

❖ **Techniques microscopique** : les techniques microscopiques ont l'avantage d'être simple et rapide, mais ne sont pas sensible. Ces observations permettent de mettre en évidence des micro-organismes de morphologie et structure différentes de celle de cellule de levain (coloration de Gram, bleu de méthylène).

Dans le cas de la recherche spécifique des levures contaminants dans un levain à Saccharomyces il est nécessaire d'employer une technique d'**immunofluorescence** (Antigène-Anticorps).

b) Les phages

Les phages peuvent être recherchés dans les levains dans les 1ères étapes de la propagation de culture avant l'incubation de fermenteur industriel. La technique de recherche la plus employée est **la technique de la double couche**, le filtrat de la culture à contrôler est étalé en surface d'une gélose préalablementensemencée avec les cellules bactériennes de levain.

Des zones de lyses indiquent la présence de phages spécifiques aux bactéries étalées. On admet qu'une plage de lyse résulte du développement d'une particule phagique, il est donc possible d'apprécier quantitativement la contamination par les phages.

1.2.3. Contrôle de la fabrication

Dans les industries de fermentation, les contrôles consistent à :

- Apprécier l'évolution de la population dans le milieu au cours du temps (levain) ;
- Contrôler l'apparition et le développement des contaminants

Pour ces contrôles se sont les techniques microscopiques qui sont les plus utilisées :

- **La technique du compte cellule**

Permet de faire une numération approximative de cellule de levain et donc permet de vérifier son développement.

- **Les techniques de coloration (Gram, bleu de méthylène)**

Permettent d'évaluer une contamination bactérienne dans le cas des levains à champignons mais aussi dans le cas des levains bactérien par les différences éventuelle de forme ou de Gram des contaminants par rapport aux bactéries du levain.

- **Technique d'immunofluorescence**

Peut être utilisée pour la recherche de bactéries contaminant dans les moûts de fermentation (jus de raisin ou pomme).

- **La spectrométrie en flux**

Permet de détecter plusieurs types de micro-organismes séparément, par exemple bactéries et levures.

Dans les industries qui utilisent des cultures aériennes des contrôles sur l'efficacité des systèmes de filtration stérilisante de l'air sont nécessaires.

1.2.4. Contrôle des conditions de fabrication

Entre deux fabrications, les locaux et les installations doivent être nettoyés et désinfectés avant d'être réutilisés. Pour le contrôle des surfaces les techniques les plus utilisées sont :

- Les techniques par impression ;
- Les techniques par écouvillonnage ;
- La technique d'ATP métrie.

- **Technique par impression** : elle consiste à prélever les germes de surface par contact direct avec les milieux de culture qui sert à les révéler.

Cette technique peut être mise en œuvre avec des boîtes ou avec des lames gélosées. Ces lames existent avec différents milieux de cultures selon le type de micro-organisme recherché.

- **Technique par écouvillonnage** : pour le contrôle des diapositives moins accessibles (robinet, canules....). Il est recommandé d'utiliser la technique d'écouvillonnage.

L'écouvillon imprégné de liquide stérile est frotté sur le dispositif à contrôler puis émergé et agité dans un liquide stérile.

- **Technique d'ATP mètre** : elle est bien adaptée au contrôle des traitements de nettoyages et de désinfection, dans ce cas un écouvillonnage est effectué sur le matériel ou la surface à contrôler. L'ATP est ensuite mesuré sur la solution de rinçage de l'écouvillon.

La valeur obtenue représente bien l'ATP microbien que l'ATP des cellules animales ou végétales et est donc un indice de propreté de la surface contrôlée.

Il est également intéressant de faire un contrôle microbiologique sur l'air ambiant pour cela, la technique la plus simple consiste à déposer des boîtes de Petri contenant du milieu gélosé ouvert aux endroits que l'on veut contrôler. Le temps d'exposition est fonction de la charge de l'air en micro-organismes.

Des appareils sont maintenant disponibles pour faire ce contrôle de façons rationnelles. Ils sont munis d'une turbine qui aspire l'air avec un débit déterminé.

L'air est projeté sur la surface d'un milieu de culture gélosé sur le quel les micro-organismes se déposent. Après incubation on peut déduire la concentration microbienne de l'air analysé.

1.2.5. Contrôle du produit fini

Les contrôles microbiologiques des produits finis portent sur leur qualité hygiénique et marchande, et sont plus ou moins importants suivant la nature des produits et leur destination.

En effet, dans certains cas le contrôle est ramené à une recherche de quelque micro-organisme dangereux.

Chapitre IV

Le choix de la méthode d'analyse doit tenir compte de la nature de la microflore recherchée. Pour chaque microflore, il existe plusieurs méthodologies possibles.

I. Travail aseptique

Les manipulations des cultures microbiennes ou de produits susceptibles de contenir des microorganismes s'effectuent selon des techniques particulières destinées à éviter deux types de contaminations :

- contamination de la culture ou de produit par le manipulateur ou l'environnement ;
- contamination du manipulateur ou de l'environnement par les microorganismes étudiés.

II. Examen microscopique

Les préparations microscopiques utilisées sont de deux types : état frais et frottis.

II.1. A l'état frais

Cette préparation consiste à examiner le micro-organisme vivant en milieu liquide entre lame et lamelle.

II.2. A l'état sec (Frottis)

Le frottis consiste en un étalement de la substance à étudier, suivi d'un séchage, d'une fixation et éventuellement d'une coloration.

III. Technique de coloration

Les colorations sont utilisées soit pour accentuer le contraste des préparations (colorations simples), soit dans un but de mise en évidence ou d'identifier (coloration différentielle). Il faut faire la différence entre colorants vitaux et non vitaux. Les colorants utilisés sont en général des dérivés d'hydrocarbures aromatiques. On les divise en deux classes :

- Colorants acides (éosine, acide picrique) qui colorent uniformément les germes ;
- Colorants basiques (fuchsine, violet de gentiane) qui ont une affinité pour le cytoplasme.

III.1. Colorations des états frais

Elle nécessite l'utilisation des colorants vitaux : rouge neutre, bleu de méthylène, vert Janus.

III.2. Coloration des frottis

La coloration des frottis peut être simple ou différentielle (tableau I).

III.2.1. Coloration au bleu de méthylène

- Recouvrir le frottis fixé par quelques gouttes de colorant et laisser agir 30 seconde à 2 minutes ;
- Rincer à l'eau ;
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000).

III.2.2. Double coloration de Gram

- Coloration par le violet de gentiane ou cristal violet. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute. Rincer à l'eau déminéralisée ;
- Mordançage au lugol (solution d'iode iodo-iodurée) : étaler le lugol et laisser agir 20 secondes ; Rincer à l'eau déminéralisée. On peut réaliser une deuxième fois l'opération semblablement pour plus de sécurité ;
- Décoloration (rapide) à l'alcool (+acétone) : verser goutte à goutte l'alcool ou un mélange alcool-acétone sur la lame inclinée obliquement, et surveiller la décoloration (5 à 10 secondes). Le filet doit être clair à la fin de la décoloration. Rincer sous un filet d'eau déminéralisée ;
- Recoloration à la safranine ou à la fuchisine. Laisser agir de 30 secondes à 1 minute ;
- Laver doucement à l'eau déminéralisée. Sécher la lame sur une platine chauffante à 40°C, 10 à 15 minutes ;
- Observer avec une goutte d'huile à immersion objectif 100 (grossissement x1000).

III.2.3. Technique de ZIEHL-NELSEN (spécifique aux bactéries acido-alcool-résistantes)

- Colorer 10 min à la fushine de ZIEHL-NELSEN (3 fois à émission de vapeur) ;
- Bien rincer avec de l'eau ;
- Recouvrir avec quelques gouttes de HCL 1% (5min), rincer avec l'eau distillée puis ajouter quelques gouttes d'alcool et rincer à nouveau;

- Recouvrir avec le BM 1% (30 s à 1 min) et laisser agir quelques minutes, rincer avec de l'eau distillée;
 - Observer au microscope ;
- Toutes les bactéries acido-alcoolo-résistantes sont roses (Mycobactéries, Mycoplasmes), les autres bactéries sont bleues.

Tableau I : Principaux colorants utilisés en microscopie et leurs applications

Colorants		Coloration simple	Coloration différentielle	Application
BASIQUE	Bleu de méthylène	oui	Coloration de Koster : safranine et bleu de méthylène phéniqué	Mise en évidence des <i>Brucella</i>
	Fuchsine basique	oui	Coloration de Ziehl Neelsen : fuchsine basique + acide et alcool	Mise en évidence des acido alcoolo résistantes (<i>Mycobacterium</i>)
	Cristal violet	oui	Coloration de Gram : associé à la fuchsine basique ou la safranine	Distinction des Gram + et des Gram -
	Vert malachite	Non	Coloration de Trujillo : associé à la fuchsine basique.	Coloration de spores
	Orange d'acridine	oui	Se fixe sur les acides nucléiques. Fluorescence des ADN en vert et des ARN en orange. Marque aussi les protéines.	Distinction (pas toujours évidente) des bactéries « mortes » (en vert) et des bactéries « vivantes » (en orange).
	Bromure d'éthidium	Oui	Marque les acides nucléiques. Fluorescence orange.	Dénombrement des cellules somatiques du lait.
	DAPI (Diaminophénylindol)	oui	Marque les acides nucléiques, fluorescence bleue avec l'ADN, faible fluorescence avec l'ARN.	Dénombrement des micro-organismes et des cellules somatiques du lait cru. SOMASCOPE
ACIDES	Rose bengale	Non	Méthode à l'antigène tamponnée	Coloration des <i>Brucella</i>
	Nigrosine	Oui	Coloration négative	Mise en évidence des capsules
DIVERS	Encre de chine	Oui	Coloration négative	Mise en évidence des capsules

IV. Technique de culture et de numération

La densité microbienne d'un produit peut s'exprimer par le nombre de micro-organismes présents par ml ou par g.

IV.1. Préparation de dilution

IV.1.1. Principe

On distingue deux types de séries de dilutions :

- **les séries linéaires**, dont les termes sont en progression arithmétique et qui sont peu utilisées ;
- **les séries logarithmique** dont les termes sont en progression géométrique ; par exemple les dilutions décimales : 0,1 (10^{-1}) ; 0,01 (10^{-2}) ; 0,001 (10^{-3}) ; 0,0001 (10^{-4}), etc.

IV.1.2. Choix de diluant

Le diluant doit être « neutre » vis-à-vis des micro-organismes : il ne doit pas être trop riche et permettre la croissance et il ne doit pas non plus les inhiber ou les tuer (par exemple par modification brutale de pression osmotique).

Les diluants le plus souvent utilisés sont :

- eau distillée stérile,
- eau physiologique stérile,
- tryptone-sel stérile,
- eau peptonnée stérile.

IV.1.3. Technique

Matériels

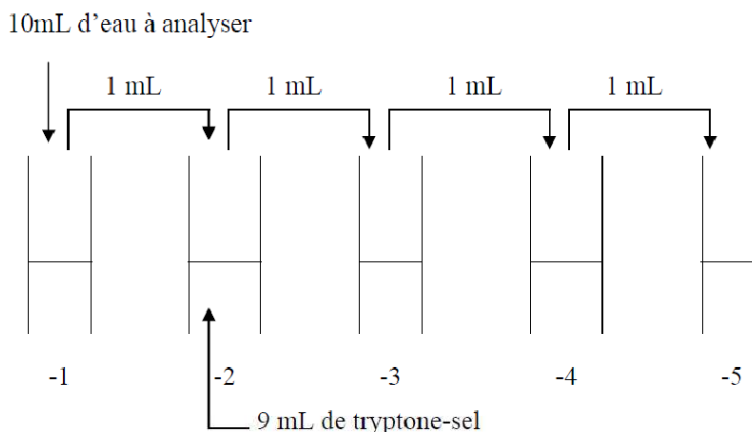
- diluant (en tube de 9ml),
- pipettes Pasteurs,
- broyeur,

homogénéisateur.

Produit liquide

Les dilutions sont toujours effectuées dans des conditions aseptiques. On prépare autant de tubes qu'il y a de dilutions à effectuer en prenant des tubes stériles dans lesquels on pipette aseptiquement **9 ml** de diluant.

Après avoir homogénéisés soigneusement la solution mère (produit liquide ou semi liquide), on prélève 1 ml dans la suspension de départ à l'aide d'une pipette de 1 ml et on le porte dans le premier tube 10^{-1} (agiter à la main) et on ensemence le tube 10^{-2} et ainsi de suite.



Produit solide

Dans ce cas la solution mère constitue la dilution 10^{-1} . Elle se prépare comme suit :

- 9g de produit solide dans 90ml de diluant ;
- 4g de produit solide dans 40ml de diluant ;
- 25g de produit solide dans 225ml de diluant.

NB : il faut changer de pipette pour chaque dilution.

IV.2. Numération sur milieu solide

IV.2.1. Techniques d'ensemencements (figure 01)

- **Inoculation dans la masse** : ce type de numération convient parfaitement aux **germes aéro-anaérobies** ; la faible épaisseur du milieu assure une aérobiose acceptable pour la plupart des germes aérobies mais certains peuvent être gênés ; ces conditions ne conviennent pas pour les germes anaérobies stricts (si l'incubation a lieu à l'air). Une meilleure anaérobiose peut être obtenue en coulant une couche de milieu vierge sur la couche précédente solidifiée (numération en double couche).
- **Inoculation en surface** : elle est bien adaptée à des **germes très aérobies** qui ne peuvent pas se développer ou se développent mal dans la masse.

NB : pour les cultures qui ne tolèrent pas l'aérobiose, on peut faire un ensemencement en surface (par étalement) et mettre les boîtes dans une enceinte munie de bougie allumée.

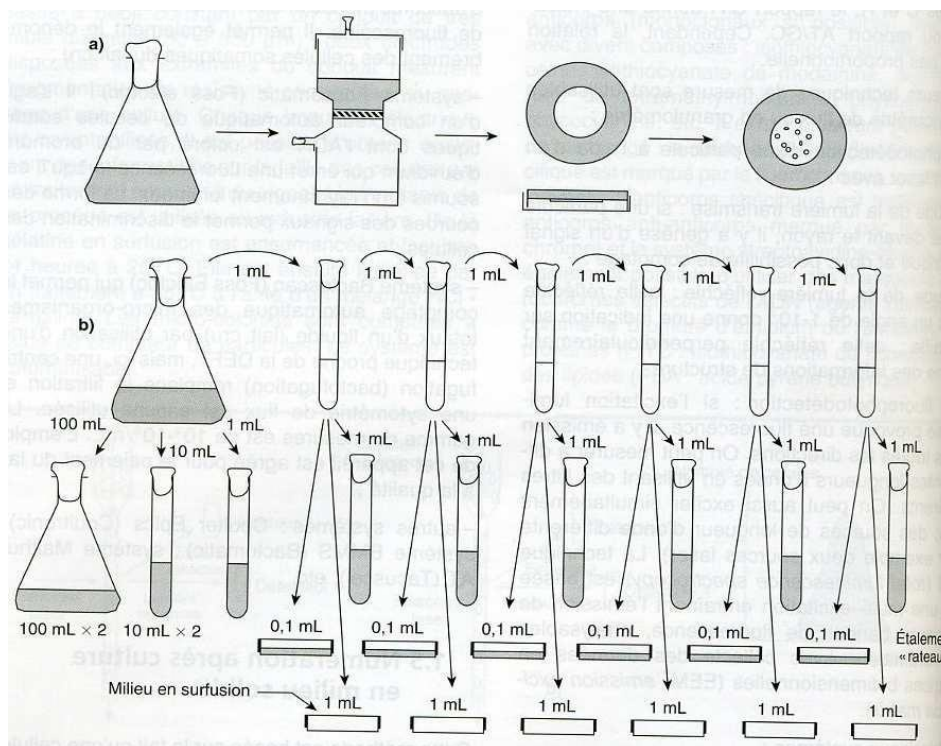


Figure 01: Technique de numération par culture [a) par Filtration ; b) par dilution]

IV.2.2. Lecture et interprétation des résultats

Lorsque le nombre de colonies est compris entre 20 et 300 on applique la formule suivante :

$$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) d$$

$\sum C$: la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes

retenues n_1 : nombre de boîtes retenues à la 1^{ère} dilution

n_2 : nombre de boîtes retenues à la dernière

dilution d : le taux de la dilution de la 1^{ère} dilution

IV.3. Numération après culture en milieu liquide

IV.3.1. Principe

Cette méthode est basée sur le fait qu'après ensemencement d'un milieu liquide, toute croissance microbienne indique la présence d'au moins un germe (UFT : Unité Formant Trouble). Le développement peut être apprécié visuellement, par turbidimétrie, par virage d'un colorant, etc. bien que moins précise, elle présente divers avantages sur la technique en milieu solide :

- à composition de milieu identique, elle facilite le développement des micro-organismes ;
- elle permet d'analyser des quantités élevées de produits, ce qui est important pour la recherche des germes pathogène ;
- elle permet d'étudier plusieurs caractères à la fois (croissance, modification de pH, production de gaz, etc.)

IV.3.2. Application aux fortes concentrations

Une série de dilutions décimales est effectuée à partir de la suspension à dénombrer. Un milieu de culture convenable choisi (BLBVB) est réparti stérilement à raison de 9 ou 10 ml par tube et un, deux, trois ou cinq tubes de ce milieu sont ensemencés par 1 ml de la suspension de départ (dilution 10^0) et de chaque dilution.

Après culture, on procède à la lecture des résultats. Sont comptés positifs les tubes qui présentent une croissance (ou bien les tubes où se manifeste une activité biologique : virage d'indicateur coloré, dégagement de gaz, etc.) et négatifs les autres. Pour chaque série de culture issues de la même dilution, on compte le nombre de tubes positifs soit 0, 1 pour 1 tube ; 0, 1 ou 2 pour 2 tubes ; 0, 1, 2 ou 3 pour 3 tubes ; 0, 1, 2, 3, 4 ou 5 pour 5 tubes, etc.

L'interprétation est basée sur des données statistiques. Des tables élaborées par Mac Grady donnent pour chaque nombre caractéristique le nombre de cellule le plus probable

(NPP) dans 1 mL du tube ayant servi à ensemencer le tube de culture correspond au premier chiffre du nombre caractéristique (tableau II, tableau III).

Tableau II : Détermination du nombre le plus probable par la méthode de *Mac Grady*

Dilution d'ensemencement	1	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	10^{-5}
	+	+	+	+	-	-
	+	+	+	-	-	-
	2	2	2	1	0	0

Le nombre caractéristique sera ici 210.

Tableau III : Tables de Mac Grady pour 2, 3 et 5 tubes

2 Tubes		3 tubes		–		5 tubes		–		–		–	
NC	NPP	NC	NPP	NC	NPP	NC	NPP	NC	NPP	NC	NPP	NC	NPP
000	0	000	0	222	3,5	000	0	203	1,2	400	1,3	513	8,5
001	0,5	001	0,3	223	4	001	0,2	210	0,7	401	1,7	520	5
010	0,5	010	0,3	230	3	002	0,4	211	0,9	402	2	521	7
011	0,9	011	0,6	231	3,5	010	0,2	212	1,2	403	2,5	522	9,5
020	0,9	020	0,6	232	4	011	0,4	220	0,9	410	1,7	523	12
100	0,6	100	0,4	300	2,5	012	0,6	221	1,2	411	2	524	15
101	1,2	101	0,7	301	4	020	0,4	222	1,4	412	2,5	525	17,5
110	1,3	102	1,1	302	6,5	021	0,6	230	1,2	420	2	530	8
111	2	110	0,7	310	4,5	030	0,6	231	1,4	421	2,5	531	11
120	2	111	1,1	311	7,5	100	0,2	240	1,4	422	3	532	14
121	3	120	1,1	312	11,5	101	0,4	300	0,8	430	2,5	533	17,5
200	2,5	121	1,5	313	16	102	0,6	301	1,1	431	3	534	20
201	5	130	1,6	320	9,5	103	0,8	302	1,4	432	4	535	25
210	6	200	0,9	321	15	110	0,4	310	1,1	440	3,5	540	13
211	13	201	1,4	322	20	111	0,6	311	1,4	441	4	541	17
212	20	202	2	323	30	112	0,8	312	1,7	450	4	542	25
220	25	210	1,5	330	25	120	0,6	313	2	451	5	543	30
221	70	211	2	331	45	121	0,8	320	1,4	500	2,5	544	35
222	110	212	3	332	110	122	1	321	1,7	501	3	545	45
		220	2	333	140	130	0,8	322	2	502	4	550	25
		221	3			131	1	330	1,7	503	6	551	35
						140	1,1	331	2	504	7,5	552	60
						200	0,5	340	2	510	3,5	553	90
						201	0,7	341	2,5	511	4,5	554	160
						202	0,9	350	2,5	512	6	555	180

IV.3.3. Cas des numérations réalisées à partir d'une seule dilution

Une seule dilution sert àensemencer n tubes. On applique la formule de $NPP = N \cdot \ln \left(\frac{N}{(N-x)} \right)$, avec N nombre de tubes et x nombre de tubes positifs.

V. Techniques d'identification

L'identification des micro-organismes ne peut être conduite que sur une souche pure. La phase préliminaire obligatoire à toute identification est donc un **isolement** suivi d'une **purification**.

L'identification proprement dite comporte un certains nombre d'étapes, variables suivant les micro-organismes, et à effectuer dans un ordre déterminé. C'est ainsi que l'identification comprend généralement :

- l'étude des caractères cultureux ;
- l'étude des caractères morphologiques et structuraux ;
- l'étude des caractères sexuels pour les champignons ;

- l'étude des caractères biochimiques et physiologiques ;
- l'étude des caractères génétiques ;
- l'étude des caractères immunologiques ;
- l'étude du pouvoir pathogène.

V.1. Etude des caractères cultureux

Il s'agit de noter l'aspect des cultures :

- en milieu liquide (formation de voile, dépôt, gaz,...),
- en milieu solide (la forme, la taille, la couleur et l'aspect des colonies). L'aspect d'une culture sur gélose inclinée donne également des renseignements : culture rectiligne ou envahissante, plus au moins muqueuse...

V.2. Etude des caractères morphologiques et structuraux

Cette étude s'effectue par examen microscopique. Elle permet d'observer la morphologie des cellules, leur taille, leur mode de regroupement, éventuellement leur mode de reproduction végétative ainsi que des caractères structuraux.

V.3. Etude des caractères biochimiques et physiologique

Les testes se ramènent principalement à des recherche d'enzymes.

V.3.1. Type énergétique et nutritionnel (chimiotrophe ou chimio-organotrophe)

V.3.2. Type respiratoire

La recherche du type respiratoire d'un micro-organisme est effectuée en milieu gélosé (viande-levure ou viande-foie) conditionné en tube de Prévost (8X180) en culot (10 à 12 cm de hauteur de gélose). Le type respiratoire du micro-organisme est déduit :

- croissance en surface et sur environ 1 cm : **aérobie** ;
- croissance dans le fond du tube mais absence de colonie dans la zone supérieure : **anaérobie** ;
- croissance dans tout le tube : **aéro-anaérobie facultatifs** ;
- croissance sur environ 1 cm dans une zone intermédiaire : **micro-aérophile** ;
- recherche de l'oxydase ;
- recherche de la catalase ;
- recherche de la peroxydase.

V.3.3. Etude de métabolisme glucidique

A des fins taxonomiques, il est intéressant de tester l'utilisation de divers composés autres que le glucose comme seule source de carbone.

V.3.3.1. Etude du métabolisme oxydatif

Il s'agit d'étudier les possibilités d'oxydation des sources de carbone autres que le glucose. Peuvent ainsi être testés : des hexoses, des pentoses, des di et trisaccharides, des polysaccharides, des alcools, des acides organiques, des hétérosides.

Plusieurs sont utilisables parmi lesquelles :

- Technique de l'auxanogramme

Les cellules microbiennes sont réparties dans un milieu de base sans carbone. Après solidification du milieu, les substrats carbonés sont déposés sur la surface de la gélose, soit quelques cristaux, soit un disque de papier filtre imprégné de la substance (des disques imprégnés de substrats carbonés sont commercialisés). L'assimilation de substrats carbonés se traduit par le développement de colonies dans la zone de diffusion).

V.3.3.2. Etude du métabolisme fermentaire

Cette étude est effectuée, soit milieu liquide contenant éventuellement un indicateur coloré, conditionné en tube avec une cloche pour la mise en évidence de dégagement gazeux, soit en milieu gélosé également conditionné en tube (MEVAG).

V.3.3.3. Recherche d'enzyme (extraction)**V.3.4. Métabolisme des substances azotes****V.3.4.1. Etude des substances utilisables**

Cette étude permet de déterminer quelles sont les formes d'azote assimilables par un micro-organisme : ammonium, nitrite, nitrate, azote aminé,...(méthode d'auxanogramme).

V.3.4.2. Dégradation des acides amines

- Décarboxylation-désamination

La mise en évidence de ces métabolismes est effectuée avec des milieux contenant un seul acide aminé et un indicateur de pH. Le virage de l'indicateur révèle la présence d'un métabolisme acidifiant ou alcalisant.

- Hydrolyse du tryptophane en indole (réactif de Kovacs)
- Dégradation des acides aminés soufrés (milieu contenant des acides aminés soufrés et du sulfate de fer = précipité de sulfure de fer de coloration noire).

V.3.4.3. Dégradation des protéines

- Hydrolyse de la gélatine
- Le milieu à la gélatine nutritive (ensemencement par piqure centrale = liquification)
- Le milieu de Frazier

Ce milieu est un milieu gélosé contenant de la gélatine. Il est utilisé en boîte de Pétri et ensemencement par piqure au centre de la boîte. Après culture, la révélation est effectuée par un réactif du chlorure mercurique. La zone d'hydrolyse de la gélatine reste incolore alors que le milieu non hydrolysé devient opaque.

- Hydrolyse de la caséine (gélose au lait délactosé) : ensemencement au centre de la boîte de Pétri, l'hydrolyse de la caséine se traduit par clarification du milieu.
- Hydrolyse de l'urée (milieu à l'urée)

V.3.5. Métabolisme des lipides

Les réactions du métabolisme lipidique commencent par l'hydrolyse des substances lipidiques (macromolécules). Ce sont les enzymes de ces réactions que l'on recherche généralement sur différents substrats :

- Tween 80 (monooléate de polyoxyéthylène sorbitanne) ;
- Lécithine (milieu au jaune d'œuf) ;
- Différents triglycérides.

L'hydrolyse de ces composés se traduit généralement par une zone d'éclaircissement autour des colonies ou (et) une zone opaque due à la précipitation des sels d'acides gras formés.

V.3.6. Propriétés physiologiques diverses

- Mobilité ;
- Caractère osmophile ;
- Caractère halophile ;

- Température optimale de croissance ;
- Température limite de croissance (minimale et maximale) ;
- La thermorésistance ;
- Comportement vis-à-vis des antibiotiques ou des antiseptiques ;
- Production de composés intéressant : composés aromatiques, enzymes, polysaccharides.

V.3.7. Tests rapides

Ce sont essentiellement le système API ou des galeries de 10, 20 et 50 caractères sont proposées pour différents micro-organismes (entérobactéries, staphylocoques, streptocoques, lactobacille, levure,...) (L'incubation est de 24 h).

Il existe également des galeries API pour la recherche d'activité enzymatique. La lecture est alors effectuée après 4 heures d'incubation. Il s'agit des :

- système « rapid 20 » pour les entérobactéries ;
- système « stap ident » pour les staphylocoques ;
- système « An ident » pour les anaérobies ;
- système ATB 32

VI. Etude des caractères génétiques (ex : PCR)

VII. Etude des caractères immunologiques