

# **LES TECHNIQUES DU CONTRÔLE MICROBIOLOGIQUE**

**Mr GHOUL Mostefa**

## **Introduction**

Ce cours trace les grandes lignes menant à la réalisation du contrôle microbiologique. Il est fidèle au programme officiel. Dans un premier chapitre, sont exposés les normes microbiologiques, les qualités hygiénique et marchande d'un produit, les plans d'échantillonnage, les critères de qualité et les grands groupes bactériens impliqués dans la contamination des produits (aliments ou autres). Le second chapitre passe en revue les techniques de stérilisation en insistant sur l'essentiel ; une place particulière est, néanmoins, réservée aux antibiotiques. Le dernier chapitre traite des milieux des cultures ; en plus de leur classification selon leur composition ou leur utilisation, il accorde un intérêt particulier aux divers ingrédients les constituant.

Signé : Mr Ghoul, M.

Tout contrôle suppose l'existence de normes et toute expérimentation sera donc interprétée et jugée par comparaison aux exigences inscrites dans les normes. L'objectif est la gestion de la qualité et les résultats seront déclarés conformes ou non.

Il est nécessaire d'harmoniser les contrôles et tout doit être fait selon la réglementation en vigueur.

## **LES NORMES**

On peut aussi parler de **standards**, de **références** ou de **critères**. Ce sont les **règles à suivre**. Les normes sont élaborées par des instances de normalisation officielles, celles-ci sont :

- Internationales : ISO (International Organization for Standardization ou Organisation Internationale de Normalisation) principal organisme mondial de normalisation, OMC, OMS, FAO (le Codex Alimentarius est le système de normalisation pour les produits alimentaires)
- Régionales : CE (communauté européenne), arabes, maghrébines.....
- Locales : CACQ (Centre Algérien du Contrôle de la Qualité), ONSP (Office national de la santé publique). Je citerai, parmi elles, les normes américaines (FDA : Food and Drug Administration) et Françaises (AFSSA, Agence Française pour la Sécurité Sanitaire et Alimentaire ; AFNOR, agence française de Normalisation)....

Les normes constituent un document de référence. Il est établi par consensus et approuvé par un organisme de normalisation reconnu (ex : ISO).

La norme est donc un texte réglementaire qui a valeur légale. Elle définit la méthodologie à suivre afin de réaliser tout type de contrôle. Elle porte, bien sûr, un titre précisant l'objectif, un numéro et une date de parution, elle décrit la méthodologie à suivre, étape par étape. On y retrouve aussi le matériel à utiliser, le consommable, l'expression des résultats et leur interprétation.

Tout ce qui entre dans une norme est considéré comme « normal », alors que ce qui en sort est « anormal ».

Le contrôle microbiologique peut se faire :

- soit **directement** : on recherche le ou les microbes concernés
- ou **indirectement** : certains critères physico-chimiques et autres peuvent déjà renseigner sur le degré de la qualité microbiologique et donc du risque sanitaire ou de la qualité marchande d'un produit quelconque. Le produit est soit déjà contaminé (ses caractéristiques physiques, chimiques et sensorielles ont changé) ou qu'il présente des défaillances pouvant augmenter ses risques de contamination.

Le contrôle microbiologique concerne les aliments, les substances pharmaceutiques et parapharmaceutiques, le matériel médical, les substances cosmétiques, l'emballage et toute autre substance au contact de l'homme.

Trois catégories de microbes sont à considérer :

- les **pathogènes**, ils constituent un danger pour la santé publique.
- les **saprophytes**, ils sont inoffensifs pour l'homme mais sont des agents d'altération du produit. Ils diminuent fortement sa qualité marchande, auquel cas le produit est alors écarté et ne peut être commercialisé.
- Ceux constituant les **ingrédients de base** de l'aliment : produits fermentés, yaourts, fromages, vaccins, médicaments..... Ici, il faut veiller à la pureté de la (ou des) souche(s) et donc à l'absence de microbes allochtones contaminants.

### Critères d'appréciation de la contamination

Il existe des facteurs **intrinsèques** et **extrinsèques** :

Les facteurs intrinsèques ou associés aux produits sont le pH, l'humidité, l'activité ou la disponibilité de l'eau, le potentiel d'oxydo-réduction, la texture (structure physique) du produit, les éléments nutritifs disponibles et la présence possible d'agents antimicrobiens naturels.

Les facteurs extrinsèques ou environnementaux sont la température, l'humidité relative (Hr), les gaz (CO<sub>2</sub> et O<sub>2</sub>), les types et les quantités de microorganismes présents dans l'aliment.

La composition d'un produit est un facteur intrinsèque crucial qui influence la croissance microbienne. Si un aliment consiste essentiellement en glucides, sa détérioration ne produira pas beaucoup d'odeurs. Des aliments comme le pain, les confitures et certains fruits, gâtent d'abord sous l'action des mycètes. Au contraire lorsque l'aliment contient de grandes quantités de protéines et/ou de lipides (ex : viandes et graisses), sa détérioration peut s'accompagner de toute une variété d'odeurs infectes dues aux amines (cadavérique, putrescine), les acides gras à courtes chaînes libérés à partir des lipides rendent le beurre rance).

#### 1/ Les critères organoleptiques et rhéologiques :

Ils constituent d'excellents indices pour déceler une contamination microbienne. La rhéologie d'un produit renseigne sur sa qualité. **Toute modification des paramètres organoleptiques doit attirer l'attention.** Le produit sera écarté à temps.

Parmi les caractéristiques organoleptiques, on peut citer

- l'aspect et la texture (ex : la viande hachée, de par sa structure granuleuse et la libération des constituants cellulaires, est facilement contaminée et devient dangereuse),
- la couleur (une viande bleuâtre...)
- le goût et la saveur (un jus de fruit en phase de fermentation...)
- l'odeur (une viande de poulet avariée...), on parle d'une odeur de moisi (fruits et pâtes), de ranci (graisses)
- L'état du produit (solide, liquide) et sa viscosité sont autant d'éléments à considérer.

#### 2/ Les paramètres physico-chimiques :

a- la température :

- une température élevée favorise la croissance microbienne (l'été est plus favorable aux risques de contamination)

- des températures moyennes (20 à 44°C) sont idéales pour les microbes pathogènes et saprophytes.
- De faibles températures permettent de meilleures conservation et protection du produit. Il est à retenir cependant que le froid ralentit seulement la croissance microbienne, les risques sanitaires sont donc toujours là. En outre les bactéries psychrophiles se développent normalement, la qualité marchande du produit est altérée avec le temps (oubliez un jus d'orange déjà entamé au frigo...). En outre, il est bien établi qu'il ne faut jamais recongeler un produit déjà décongelé : le nombre de germes initialement présent ( $N_0$ ) augmentera de façon significative pendant la phase de décongélation ( $N$ ). L'aliment sera donc remis au congélateur avec une dose de  $N$  germes et après une seconde décongélation donnera  $N_1$  germes. Le risque d'infection lors de l'ingestion de l'aliment est alors énorme, surtout s'il s'agit d'un aliment riche. Une re-congélation modifiera aussi grandement la texture et le goût de l'aliment.

b- le pH :

- Un pH alcalin peut se révéler extrêmement dangereux car favorise la croissance des vibrios (*cholerae* et autres). La protéolyse des viandes, par ex., libère des amines qui augmentent le pH du milieu. Par conséquent la consommation des viandes mérite toute notre vigilance et le contrôle des produits carnés doit être rigoureux.
- La neutralité d'un milieu est propice et favorable à la croissance de l'ensemble des microbes. Les bactéries pathogènes prolifèrent rendant l'utilisation de produits dangereuse.
- Des pH acides (ex. jus de fruits) favorisent la croissance des levures, des champignons et des bactéries lactiques. Ce sont surtout des microbes d'altération de la qualité marchande.

c- l'activité de l'eau (ou activity water =  $a_w$ ) :

C'est une relation englobant l'eau libre et l'eau liée d'une substance. L' $a_w$  est l'eau disponible. Plus l' $a_w$  est élevée, plus les risques de contamination sont grands. Plus elle est faible, plus les atteintes microbiologiques sont minimales et la conservation meilleure. La déshydratation, le séchage et la lyophilisation ne sont-elles pas des méthodes de conservation des aliments et autres milieux (les souches microbiennes lyophilisées sont conservées pendant plus de 20 années). Autres exemples : une fraise, une pêche, gorgées d'eau s'altèrent plus facilement qu'une datte dure, de même qu'un légume frais s'altère plus facilement qu'un légume sec.....

d- la pression osmotique :

Le sucre et le sel sont les ingrédients les plus largement utilisés. A fortes teneurs, ils sont inhibiteurs de la croissance microbienne (ex : la salaison est une technique ancestrale de conservation des aliments, la confiture et les sirops se conservent longtemps.. ) même si certains microbes halophiles ou saccharophiles saprophytes peuvent être retrouvés après une longue exposition de l'aliment. A des teneurs moyennes ou faibles, ils favorisent, par contre, la croissance de l'ensemble des microbes. Les risques sanitaires et d'altération du produit sont grands.

(NB : l'eau physiologique ou sérum physiologique est une eau salée isotonique à 8,5 à 9‰ NaCl pds/vol compatible avec la croissance et la physiologie de toutes les cellules vivantes).

e- la lumière :

La lumière, et surtout à travers sa composante UV, a un fort pouvoir antiseptique. Les UV ( $\lambda = 254 \text{ nm}$ ) sont mutagènes. Comme ils peuvent avoir un effet bénéfique (aseptiser une eau par exemple), ils peuvent cependant constituer un agent d'altération d'un produit à base microbiologique. La lumière favorise la croissance d'algues dans une eau. Dans ces conditions, le produit doit être gardé « à l'abri de la lumière », selon la formule consacrée !

f- l'oxygène :

L'aérobiose favorise la croissance des levures et champignons et de la plupart des bactéries, qu'ils représentent un risque sanitaire ou qu'ils soient des agents d'altération de produits. L'absence d'oxygène doit essentiellement rappeler au consommateur les risques liés à *Clostridium botulinum* retrouvés dans les conserves (ex : charcuterie, cachir).

Maintenant et pour clore ce paragraphe, imaginons une denrée alimentaire que vous avez oubliée dans un sac en plastique dans le coin d'une pailleuse ou même dans un casier du réfrigérateur. Comme vous avez dû le remarquer, le plastique augmente la température interne dans le sac et freine l'arrivée d'air. Le résultat est la transpiration des aliments par exsudation (ex. : fraises, viande hachée). Ceci favorise la croissance microbienne et multiplie évidemment les risques microbiologiques. De basses températures (4°C) et un emballage adéquat permettant la circulation de l'air sont les garants d'une bonne conservation.

3/ Les paramètres biochimiques :

La composition biochimique ou **nutritionnelle** est un facteur essentiel pour la croissance microbienne. Plus le milieu est riche, plus la diversité microbienne est grande et les risques importants. Plus le milieu est pauvre plus il devient sélectif favorisant telle ou telle communauté microbienne.

Produit à base de glucides : Si la teneur en sucres est très élevée (ex. confitures) le risque est absent. Si les teneurs sont moyennes ou basses, le produit devient alors de plus en plus dangereux et s'altère facilement. Plusieurs catégories de microbes sont susceptibles d'être isolées.

Produit à base de lipides : Au fait, les lipides ne constituent pas une source de risques sanitaires. Les risques sont ceux liés au rancissement des graisses par des lipases bactériennes.

Produit à base de protéines : tous les produits riches en protéines (ex. : produits carnés, œufs) sont dangereux, ils constituent de véritables milieux de culture. On retrouve tous les microbes pathogènes (*E. coli*, *Salmonella*, *Clostridium*...). De ce fait, le contrôle microbiologique doit être le plus strict.

4/ Les paramètres toxicologiques :

Il faut toujours avoir à l'esprit les dangers représentés par les toxines bactériennes (exo- et endotoxines), les mycotoxines (aflatoxines) et les phycotoxines (fruits de mer), surtout celles thermostables résistant à la stérilisation.

D'un autre côté, des substances chimiques toxiques, lorsqu'elles sont présentes, peuvent empêcher la croissance microbienne de certains produits tels que les aliments à base microbienne (yaourt, fromage, boissons lactées...), de produits pharmaceutiques (vaccins, médicaments). Ce sont surtout les métaux lourds et le chlore (eau de Javel) les plus évoqués.

5/ Déontologie :

Le contrôleur de la qualité microbiologique suivra scrupuleusement les règles d'éthique et de déontologie qui lui sont dictées par la profession.

## LA REALISATION DU CONTROLE MICROBIOLOGIQUE

Les objectifs du contrôle sont de garantir une bonne qualité hygiénique et une bonne qualité marchande et de minimiser les pertes. Ils doivent permettre d'éviter la présence de microorganismes pathogènes dans les produits afin de ne pas risquer une altération de la qualité hygiénique des produits finis ou, au moins de détecter ces microorganismes s'ils sont présents dans les produits finis avant leur commercialisation. Une altération de la qualité hygiénique met en cause la santé du consommateur (intoxications alimentaires).

Une altération de la qualité marchande modifie les caractéristiques plastiques et organoleptiques du produit. Elle n'est pas dangereuse mais rend le produit non commercialisable. Elle intervient généralement lentement au cours du stockage (levures osmophiles, par ex.).

### A/ Stratégie du contrôle :

Elle doit permettre de localiser le problème, d'agir à temps et d'apporter les correctifs. Elle doit assurer le suivi du contrôle, elle a donc un caractère préventif et curatif.

#### 1/ L'hygiène :

Elle est à la base de tout contrôle microbiologique. Il faut s'assurer de l'hygiène du personnel (corporelle et vestimentaire), des locaux (murs, sol, atmosphère) et du matériel (lavage à la vapeur d'eau et avec des détergents spécifiques).

#### 2/ Les niveaux de contrôle (échantillonnage) :

- matières premières et adjuvants dont **l'eau**.
- le long de la chaîne de fabrication à toutes les étapes, surtout avant et après la pasteurisation pour s'assurer de son efficacité.
- conditionnement.
- stockage et avant commercialisation.
- chez le commerçant.

Le prélèvement des échantillons du produit doit être réalisé selon **un plan d'échantillonnage** bien défini. Il est déterminé par des facteurs tels que l'effectif des lots, les risques sanitaires associés à l'utilisation de produits présentant un degré de contamination non acceptable, les caractéristiques du produit et le degré de contamination présumé.

Ce plan décrit :

- (i) les procédures selon lesquelles les échantillons seront prélevés puis mis en analyse et
- (ii) les modalités selon lesquelles la décision d'acceptabilité ou de rejet sera prise à l'égard du lot dont proviennent les échantillons analysés.



A ce titre tout plan d'échantillonnage faisant partie d'un critère microbiologique comportera nécessairement les 4 éléments suivants :

- Le **nombre** d'échantillons unitaires à prélever à partir de chaque lot (**indice  $n$** ), assorti le cas échéant de l'indication de la technique de prélèvement, du moment ou du lieu de celui-ci.
- La **taille** prescrite pour l'unité d'analyse tirée de chaque échantillon unitaire (par exemple, 25g, 10g, 1g....).
- Les **valeurs microbiologiques de référence** pour le produit considéré. Elles peuvent être exprimées en termes quantitatifs « présence/absence » ou en termes qualitatifs (à titre d'exemple : 1000/g) (**indices  $m$  et  $M$** ).
- Le **nombre** d'unités d'analyse qui doit être **conforme** à ces valeurs (**indice  $c$** ).

Dans la pratique, selon les microorganismes retenus et leur signification, on utilisera l'un des deux types de plans suivants :

\* Un plan dit à **deux niveaux** (ou **classes**), fondé sur la définition d'une **seule** valeur limite de référence, séparant la conformité de la non-conformité. Aucune des unités d'analyse ne doit dépasser la limite indiquée. L'indice  $c$  est par convention égal à 0. Exemple d'expression : absence dans 25g,  $n = 1$  0,  $c = 0$ .

\* Un plan à **trois niveaux** applicable aux produits pour lesquels l'homogénéité de la distribution des microorganismes peut être un problème. Dans ce cas, cinq échantillons sont prélevés dans chaque lot et examinés séparément. On définit **deux** valeurs limites de référence : L'indice  $m$  séparant la **conformité** de la qualité marginale tolérée et l'indice  $M$  séparant la qualité marginale tolérée de la **non-conformité**. Dans ce cas, l'indice  $c$  représente le nombre maximum **acceptable** d'unités d'analyse donnant les valeurs comprises entre  $m$  et  $M$  :

- conformité-  $< m \leq$  - qualité marginale tolérée -  $< M \leq$  - non-conformité.

Exemple d'expression :

$$m = 10/g \quad M = 100/g \quad n = 5 \quad c = 2$$

Les trois niveaux sont définis comme suit :

- (i) échantillons **acceptables**, c'est-à-dire contenant moins de  $m$  UFC (unités formant colonie) par gramme ou par ml,  $m$  étant la limite spécifiée dans la monographie du produit (accepté sans aucune réserve).
- (ii) échantillons **marginiaux**, c'est-à-dire contenant plus de  $m$  UFC mais moins de  $10m$  UFC par g ou par ml (niveau intermédiaire, ni totalement satisfaisant, ni totalement mauvais).
- (iii) échantillons **non conformes**, c'est-à-dire contenant plus de  $10m$  UFC par g ou par ml (à rejeter sans aucune réserve).

3/ La fréquence (ou périodicité) du contrôle:

La périodicité des contrôles peut être quotidienne, hebdomadaire, mensuelle... Elle dépend au fait de plusieurs facteurs : la nature du produit, son degré initial de contamination, sa destinée, les moyens disponibles et la réglementation en vigueur.

#### 4/ Les méthodes de contrôle :

Elles doivent être simples, rapides et fiables pour répondre à une situation immédiate et détecter les germes dans les meilleurs délais. Elles doivent être peu coûteuses pour pouvoir multiplier les contrôles. Elles sont soit directes (techniques microscopiques : observation directe, coloration de Gram, immunofluorescence), kits de détection prêts à l'emploi, comptage sur cellule de Malassez) soit indirectes (bandelettes de pH).

Cependant, certains contrôles de détection périodiques ou spécifiques font appel à des techniques microbiologiques plus lentes mais nécessaires. De plus elles seront réalisées sur les produits finis avant commercialisation.

#### **B : Le contrôle proprement dit :**

Il s'effectuera par rapport aux normes officielles établies pour chaque produit et sa destinée (eau potable, de récréation, de lavage...). Les microorganismes à rechercher varient selon la technologie et les caractéristiques physico-chimiques du produit en cours de fabrication. Chaque fabrication est un cas particulier. Exemple : certains produits, de par leurs propriétés physico-chimiques, (pH,  $a_w$ , teneur en alcool...) ne permettent pas la croissance des coliformes et les staphylocoques. Par contre, ces bactéries sont facilement retrouvées dans les laits fermentés, les yaourts, les additifs alimentaires et produits pharmaceutiques; les coliformes, en particulier, doivent être recherchés dans les produits finis.

La réalisation de dilutions décimales ( $1/10$  ou  $10^{-1}$ ) dans un diluant approprié (ex : eau à 8,5 - 9 g/l de NaCl) est toujours exigée au départ.

On recherchera :

- **la flore totale** (flore aérobie mésophile « FAM » ou viable) à 30°C.

Elle renseigne sur la charge bactérienne globale de la substance. Le milieu le plus utilisé est la gélose PCA. Un excès de FAM est la conséquence d'une pollution (malpropreté générale) ou d'une mauvaise conservation (température de conservation trop élevée ou durée de conservation trop longue).

#### *Interprétation des résultats :*

*Si l'on a choisi un plan d'échantillonnage à trois niveaux, on procédera comme suit :*

*Calculez séparément le nombre de germes aérobies viables totaux pour chacun des 5 échantillons. Le produit satisfait à l'essai si les deux conditions suivantes sont remplies :*

- aucun des résultats individuels obtenus n'est supérieur d'un facteur 10 (ou plus) à la limite prescrite (aucun échantillon « non acceptable »),*
- le nombre de résultats individuels se situant entre la limite prescrite et 10 fois cette limite n'est pas supérieur à 2 (nombre d'échantillons « marginaux » inférieur ou égal à 2*

- **les coliformes** : Ce sont des bacilles non sporulants, à Gram négatif, aérobies ou anaérobies facultatifs, qui produisent du gaz par fermentation en moins de 48h si on le dépose dans un bouillon lactosé maintenu à 35°C (37°C). La plupart des méthodes de détection des coliformes reposent en grande partie sur leur aptitude à fermenter le lactose. LEUR PRESENCE LAISSE SUPPOSER CELLE EVENTUELLE DE PATHOGENES.

La presque totalité de ces bactéries sont non-pathogènes et ne présentent pas de risque direct pour la santé à l'exception de certaines souches de *E. coli* ainsi que de rares bactéries opportunistes

On en distingue les **totaux** et les **fécaux** :

Les coliformes totaux proviennent du sol, des plantes et de l'environnement. Ce ne sont pas exclusivement des entérobactéries. Les sources de contamination sont les végétaux crus mal ou non lavés, une mauvaise hygiène générale (mauvais entretien des plans de travail, du matériel et des instruments, des enceintes froides, de la plonge, des sols ou problème de gestion des déchets et emballages). La prévention consistera donc à laver soigneusement les légumes, vérifier les procédures de lavage des plans de travail, du matériel, la propreté des vêtements de travail et l'évacuation des déchets.

Puisque les coliformes ne sont pas exclusivement des entérobactéries, la plupart des normes exigent la détection des coliformes fécaux.

Les coliformes fécaux ou thermotolérants (cultivent à 44°C), dont l'espèce la plus nombreuse (80 à 90%) est *E. coli*, constituent une large proportion de la flore intestinale humaine. **Ce sont les indicateurs de contamination fécale humaine** (récente). Ce sont aussi des espèces de *Citrobacter*, *Klebsiella*, *Enterobacter*.

Les sources de contamination sont : origine fécale, mauvaise hygiène des mains, manque de désinfection des sanitaires, nettoyage mal fait. La prévention : ils sont détruits par une cuisson traditionnelle, une hygiène adéquate du personnel, l'entretien et la désinfection des sanitaires ; Plusieurs milieux sont utilisés (voir vos TP) : BLBVB, EMB, Drigalsky, MacConkey, Endo. On utilise fréquemment la méthode des tubes multiples et la filtration sur membrane. Récemment une méthode fut mise au point pour la détection, essentiellement, de *E. coli*, qui repose sur l'utilisation de l'ONPG (donne une coloration jaune, c.à.d. présence de coliformes) et la MUG ou 4-méthylumbelliféryle-β-D-glucuronide (*E. coli* donne sous UV une coloration bleue caractéristique). *E. coli* est le seul coliforme qui produise presque toujours la β-glucuronidase (voir plus loin le chapitre sur les milieux de culture)

### **Les entérocoques et streptocoques fécaux :**

Les entérocoques appartenaient initialement au groupe D de la classification des streptocoques. Depuis les années 80 les entérocoques constituent une classe à part entière. Une vingtaine d'espèces ont été décrites, parmi lesquelles *Enterococcus faecalis* (80 à 90%) et *E. faecium* (5 à 10%) sont les principales espèces identifiées chez l'humain. Quant aux streptocoques du groupe D, ils sont typiques des **déjections animales** (*Streptococcus bovis*, *S. equinus*, *S. gallolyticus* et *S. alactolyticus*). Ces espèces colonisent le bétail, les chevaux et la volaille. *S. bovis* peut parfois être présente chez l'humain.

Les entérocoques sont aussi des témoins de contamination fécale et sont donc recherchés, essentiellement s'il s'agit d'eaux souterraines. Leur persistance dans ces eaux est supérieure à celle des autres organismes indicateurs. Ils sont plus résistants aux conditions environnementales difficiles et persistent plus longtemps dans l'eau. De plus ils résistent mieux à la dessiccation.

Leur recherche par filtration sur membrane est la mieux indiquée. Le milieu préconisé est le m-*Enterococcus*, 35°C/48h).

### ***Clostridia* sulfito-réductrices :**

Elles se multiplient dans la profondeur des produits ou sous vide; leur résistance à la cuisson est remarquable. L'exemple-type est *Clostridium perfringens*. (Citons aussi *botulinum* - agent du botulisme -, *difficile*, *tetani*).

Quand elles sont présentes en quantité, les bactéries sulfito-réductrices témoignent d'un dysfonctionnement dans le traitement du produit. Les sources de contamination sont les

denrées souillées et les végétaux mal lavés, les conserves mal stérilisées, réchauffage lent, refroidissement lent. La prévention consiste essentiellement en un refroidissement et un réchauffage rapides des aliments, et le respect de la chaîne du froid. Milieux utilisés : VF et TSC (tryptone sulfite cyclosérine).

### **Staphylocoques :**

Bactéries sécrétant une entérotoxine thermostable. Seules les souches de staphylocoques coagulase+ productrices d'entérotoxine sont impliquées dans les intoxications alimentaires. On les retrouve essentiellement dans les aliments après cuisson, les crèmes glacées et pâtisseries, et les aliments à faibles  $a_w$  (salaisons, laits en poudre)

Les sources de contamination sont le personnel atteint d'affections cutanées purulentes, de maux de gorge ou rhinites et le personnel porteur sain (chevelure, peau). La prévention consiste donc à écarter les personnels à risque, à porter des coiffes et à se laver les mains.

### ***Pseudomonas aeruginosa* :**

C'est une bactérie retrouvée dans l'eau, les sols humides et à la surface des plantes. *P. aeruginosa* est un pathogène opportuniste responsable de graves épidémies. Elle doit être absente de l'eau. Elle est résistante à certains antibiotiques et est difficile à éliminer des installations d'eau.

### ***Salmonella* spp. :**

Bactéries pouvant être à l'origine de toxi-infections alimentaires très graves, elles sont présentes dans le tube digestif des animaux et de l'homme (malades ou porteurs sains). Elles sont détruites par la cuisson. Les sources de contamination : surtout volailles et œufs, faute d'hygiène lors des manipulations. Prévention : veiller à la qualité des matières premières, et nettoyage des mains, des matériels et des surfaces de travail.

### ***Listeria monocytogenes* :**

*Listeria monocytogenes* a été isolée chez de très nombreuses espèces animales. *L. monocytogenes* est une bactérie ubiquiste, tellurique, très largement répandue dans l'environnement où elle résiste grandement.

La bactérie est retrouvée chez toutes les grandes catégories d'aliments. Elle possède l'aptitude particulière à se développer à des températures de réfrigération (+4°C). La contamination d'un produit peut intervenir à tous les stades de la chaîne alimentaire, qu'il s'agisse des matières premières, de la transformation, de la logistique, de la distribution ou encore chez le consommateur. Les infections à *L. monocytogenes* sont sérieuses mais heureusement « rares ». Prévention : bonnes pratiques d'hygiène.

### ***Campylobacter* spp. :**

Il est fréquemment rapporté que les produits à base de volailles contaminés (carcasses et produits de découpe) représentent la principale source d'introduction de *Campylobacter* spp. dans nos cuisines. Les viandes insuffisamment cuites favorisent les risques de campylobactérioses. Il est donc recommandé d'assurer une cuisson suffisante (65°C à cœur) et surtout de manipuler ces viandes dans de bonnes conditions hygiéniques. L'eau et le lait cru

constituent aussi des sources de contamination par *Campylobacter*. Les *Campylobacter* thermotolérants (*C. jejuni* et *coli*) sont reconnus comme étant l'une des premières causes de maladies diarrhéiques chez l'homme.

***Vibrio spp.* :**

*Vibrio cholerae* est transmis par l'ingestion d'eau et d'aliments contaminés et survient dans des situations d'hygiène précaire et des milieux très défavorisés. Le vibrio peut survivre longtemps dans un milieu hydrique et salé.

*Vibrio parahaemolyticus* est retrouvé dans les poissons et produits de mer consommés crus.

Les milieux sélectifs utilisés sont la gélose Thiosulfate, au Citrate, à la Bile et au Saccharose (TCBS), la gélose Cellobiose, Polymyxine B, Colistine, (CPC), et la gélose CPC modifiée (mCPC).

***Bacillus cereus* :**

Présente dans l'environnement, cette bactérie est parfois responsable d'intoxications alimentaires dues le plus souvent à l'ingestion de féculents, tels le riz, à des conditions inadéquates de réfrigération.

***Yersinia* :**

*Yersinia enterocolitica* et *Y. pseudotuberculosis* sont souvent transmis par la viande et le lait. Ils sont capables de croître à de basses températures (4°C).

**Les légionelles :**

*Legionella pneumophila* se développe entre 30 et 45°C. La bactérie est retrouvée essentiellement dans les établissements thermaux et les systèmes de climatisation. Elle est véhiculée et dispersée par l'eau sous forme d'aérosols puis inhalée. C'est un pathogène responsable de graves pneumopathies.

La présence des légionelles est la conséquence d'une mauvaise conception des réseaux, d'un entretien défectueux des canalisations, d'un mauvais nettoyage des appareils (robinets, pommeaux de douche).

Que faire pour surveiller le risque des légionelles ?

- Contrôle de la qualité microbiologique de l'eau par un laboratoire accrédité.
- Entretien hebdomadaire des éléments de robinetterie.
- Purger régulièrement avec de l'eau la plus chaude possible le maximum de points d'usage ou les points les plus éloignés de l'établissement.

**Les endotoxines :**

Une endotoxine est le lipide A du LPS de la membrane externe des bactéries à Gram négatif. Les endotoxines exercent leur action après la mort des bactéries à Gram négatif. La lyse de leur paroi cellulaire libère ensuite l'endotoxine qui provoque, alors, une très forte réaction pyrogène (fièvre).

Leur dosage est réalisé surtout sur les médicaments injectables, les appareils médicaux et dans les liquides organiques (fluides produits par les organismes vivants animaux ou végétaux) qui doivent être exempts de pyrogènes. Elles sont détectées au laboratoire par le test LAL (Limulus Amœbocyte Lysate).

## LA STERILISATION

Quelques définitions de *lutte contre les microbes* :

**Désinfection** : mesure qui vise à détruire, éliminer ou inhiber des microorganismes potentiellement pathogènes et/ou inactiver des virus indésirables.

**Antiseptie** : c'est une désinfection appliquée à un tissu vivant.

**Décontamination** : vise à détruire ou à éliminer les microorganismes, ou à inhiber la croissance microbienne ; des microbes peuvent donc survivre. Elle porte sur les tissus vivants ou supports inertes. (C'est une mesure sanitaire).

**Sepsie** (*sepsis* en grec signifie putréfaction) : infection par des microbes (ex : fosse septique).

**Asepsie** : absence d'une contamination significative.

**Stérilisation** : destruction de toutes les formes de vie microbiennes, y compris les endospores, qui sont la forme la plus résistante.

**Pasteurisation** : élimine les formes végétatives et doit conserver les qualités nutritives et organoleptiques d'un aliment.

**Germicide** ou **biocide** : tue les microorganismes sans les endospores

**Bactéricide** : tue les bactéries

**Bactériostatique** : empêche la multiplication des bactéries mais, si on le retire, la croissance bactérienne reprend.

**Fongicide** : tue les mycètes.

**Virucide** : inactive les virus

Cinq facteurs influencent l'efficacité d'un traitement antimicrobien :

- le type de microorganismes : les espèces microbiennes présentent des sensibilités différentes face aux agents antimicrobiens. Les endospores sont plus résistantes. Les virus sont plus difficiles à traiter.
- le nombre initial de microorganismes : plus il y a de microbes au départ, plus il faut de temps pour détruire la population entière (**effet inoculum**).
- les facteurs environnementaux : la présence de matière organique inhibe l'action des agents antimicrobiens. La constitution en biofilm s'oppose à l'action des désinfectants. Un désinfectant est plus efficace à des températures élevées d'utilisation (eau chaude). La nature du milieu de suspension est aussi un facteur déterminant, En effet les graisses et les protéines jouent un rôle protecteur des microbes (d'où bien laver les ustensiles avant leur autoclavage, par exemple). Un pH acide accentue l'effet de la chaleur.
- La durée d'exposition : la durée d'exposition doit toujours être la plus longue pour éliminer la totalité des microbes et des endospores.
- Les caractéristiques des microbes : Les bactéries à Gram négatif résistent mieux aux germicides chimiques que les bactéries à Gram positif (le LPS des premières détermine cette résistance) Les *Pseudomonas*, par ex., résistent fortement aux antiseptiques et désinfectants (et de nombreux antibiotiques). Les mycobactéries ne produisent pas d'endospores mais leur résistance aux germicides est élevée. Peu de germicides chimiques sont efficaces contre les endospores bactériennes, les spores et les kystes des parasites. Les agents antimicrobiens liposolubles sont en théorie plus efficaces contre les virus à enveloppe.

## A/ La chaleur :

Les conserves et confitures familiales sont stérilisées par la chaleur. C'est ce même procédé qu'on utilise pour stériliser les milieux de culture, le matériel en verre de laboratoire et les instruments médicaux. La chaleur détruit les microorganismes en dénaturant les protéines (enzymes). La résistance à la chaleur varie selon les types de microorganismes. Il existe des normes scientifiques : on parle ainsi de temps de réduction décimale (ou valeur D).

### 1/ La chaleur sèche :

La chaleur sèche détruit les microorganismes par oxydation.

Le **flambage** est le premier geste que le microbiologiste effectue en présentant son anse de platine (plutôt un alliage nickel-chrome) à la flamme d'un bec Bunsen (ou d'un bec Mecker). La température de la flamme bleue atteint 1200°C. La flamme est aussi utilisée pour faire passer les effilures des pipettes Pasteur ou l'extrémité des pinces brucelles. Autour de la flamme se crée une zone de stérilité où l'on peut déboucher les tubes et où l'on place tout instrument devant rester stérile.

Les étuves de stérilisation (ou étuves Poupinel ou encore fours Pasteur) utilisent l'air chaud (200°C max). Elles fonctionnent à des températures de 170 à 180°C en général. A ces températures, et pendant une heure minimum, elles détruisent les microorganismes. On y stérilise les instruments métalliques, en verre (pipettes) ou en porcelaine emballés dans du papier aluminium ou du papier journal.

Les spores et germes sont détruits en chaleur sèche, par un chauffage de :

4 heures à 140 °C ;

2 heures 30 à 160°C ;

1 heure 15 min à 170°C

30 min à 180°C

### 2/ La chaleur humide :

Dans une atmosphère de vapeur d'eau **exempte d'air**, toutes les bactéries y compris les spores sont tuées en 20 min à 121°C. Pour un volume donné, la température est fonction de la pression ; on obtient la température requise de 120°C, très supérieure à la température normale d'ébullition de l'eau, en chauffant en surpression, c'est-à-dire en vase clos. L'appareil utilisé est l'autoclave. Il peut être vertical ou horizontal.

C'est une enceinte métallique fermée, l'eau est chauffée par une résistance électrique. La mise sous pression est réalisée après avoir chassé l'air de l'enceinte par la vapeur sortante. La fermeture du robinet de purge, par la suite, assure la montée de la pression jusqu'à atteindre la valeur désirée. Le décompte du temps commencera à ce moment précis.

La préparation du matériel : la verrerie sera bouchée au coton cardé et recouverte de papier aluminium, les récipients contenant un milieu de culture seront remplis aux 3/4, les instruments métalliques seront bien protégés pour éviter la rouille, sauf s'ils sont en inox....

L'autoclavage ne convient pas pour les produits liquides délicats (solutions concentrées de glucides, milieux albumineux, lait, gélatine ...), il est à utiliser pour les milieux de culture, le matériel en caoutchouc, la verrerie, les instruments de prélèvement et la stérilisation du matériel après son utilisation.

Paramètres utilisés :

- **100°C** pendant plus d'une heure (stérilisation à la **vapeur fluente** : réservée pour les grands volumes de solutions thermosensibles (lait, liquides albumineux, solutions de glucides...)).
- **110°C** (0,5 bar) pendant 20 à 30 min. Réservee pour les solutions sucrées et les solutions thermolabiles. Cette température est aussi celle obtenue en **cocotte-minute**.
- **115°C** (0,75 bar) pendant 15 min. préconisée pour certains milieux de culture et le lait écrémé
- **121°C** (103,42 kPa = 1 bar) pendant 10 à 15 min. Température de stérilisation généralement réalisée en routine dans les laboratoires (verrerie borosilicatée propre et vide, eau stérile, eau physiologique, paraffine, sels minéraux, milieux de culture usuels).
- **133°C** (2 bars) pendant 10 min.

L'autoclavage dépend largement du volume de la solution et de sa consistance. Plus le volume est grand, plus la consistance est ferme et plus le temps de stérilisation doit être augmenté.

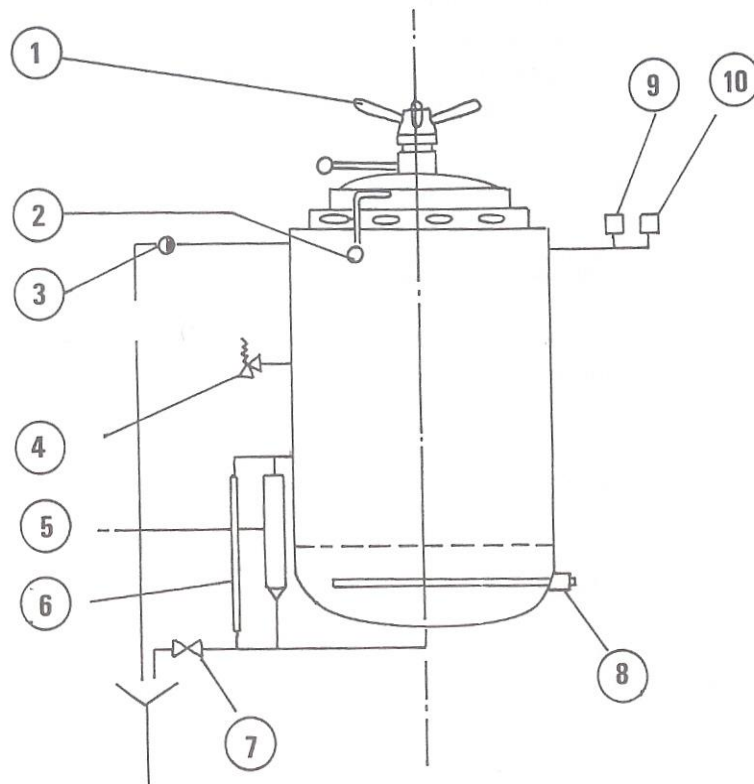


Schéma général d'un autoclave vertical

1- couvercle 2- fermeture de sécurité 3- soupape d'évacuation d'air 4- soupape de sécurité 5- réservoir de sécurité d'eau 6- jauge d'eau 7- robinet de vidange 8- résistance électrique (chauffage) 9- manomètre 10- Thermomètre



### 3/ La tyndallisation :

La tyndallisation consiste en un chauffage entre 70°- 100°C à plusieurs reprises (1 heure tous les jours pendant 3 jours dans un bain-marie thermostaté. Son utilisation est limitée aux substances thermolabiles non filtrables (émulsion de jaune d'œuf, vaccins), préparation de milieux à base de sérum ou de jaune d'œuf.

Exemples :

56-58°C : sang, sérum, émulsion de jaune d'œuf certains vaccins

60°C : liquide d'ascite

70°C : la plupart des solutions hydrolysables

100°C : gélatine, solutions de glucides.

### 4/ La pasteurisation :

La pasteurisation est utilisée essentiellement en industrie laitière et en industrie alimentaire. Elle vise à détruire tous les microbes pathogènes. Elle réduit également le nombre total de microbes, ce qui prolonge la durée de conservation du produit (lait). Les spores bactériennes ne sont pas détruites. Quels que soient les procédés de pasteurisation utilisés tous laissent intactes les propriétés biochimiques, les qualités nutritives et organoleptiques d'un produit. Il existe plusieurs modes de pasteurisation :

- Pasteurisation à basse température : quelques minutes à 60 à 70°C

- Pasteurisation à haute température : 30 secondes à 90°C puis refroidissement brusque à 10°C. (**HTST** – High Temperature Short Time ou pasteurisation rapide à haute température)

- Pasteurisation **UHT** (Ultra Haute Température): quelques secondes (3s) à 140°C puis refroidissement brutal dans une chambre à vide (d'où la vapeur sort très rapidement).

Plus on augmente la température, plus on diminue le temps, les résultats sont similaires.

## **B/ Les rayonnements :**

Les rayonnements ont différents effets sur les cellules selon leur longueur d'onde, leur intensité et leur durée. Les rayonnements stérilisants sont de deux types : **ionisants** et **non ionisants**.

1/ Les rayonnements ionisants : (énergétiques,  $\lambda$  inférieure à 1 nm): rayons gamma ( $\gamma$ ), les rayons X et les électrons accélérés.

Le principal effet est l'ionisation de l'eau qui donne des radicaux hydroxyles lesquels réagissent avec les constituants de la cellule, notamment l'ADN, en provoquant des dommages dans sa structure.

Les rayons  $\gamma$  sont produits à partir du cobalt 60 ; ils sont utilisés pour la radio- stérilisation du matériel médical à usage unique.

Les rayons X ressemblent aux rayons gamma. Les deux types de rayons pénètrent profondément la matière mais mettent des heures à stériliser de grandes masses de matière.

Les électrons accélérés sont produits par un tube cathodique muni d'un filtre laissant passer les électrons du vide vers l'atmosphère. Ils pénètrent faiblement la matière mais stérilisent la matière en 10 min. L'efficacité de la radio-stérilisation se mesure en grays (Gy) qui est la dose de rayonnement absorbée par Kg de matière traitée. Une stérilisation est efficace quand la

dose absorbée est au moins égale à 25 000 Gy qui correspond à une réduction de  $1/1000\ 000^{\circ}$  de la population microbienne.

2/ Les rayonnements non ionisants ( $\lambda$  supérieure à 1 nm) :

Ils sont surtout représentés par les rayons UV. Ils endommagent l'ADN et empêchent sa réplication. Les rayons UV sont très efficaces à une  $\lambda = 254$  nm (*short wave*) (ne pas confondre avec la  $\lambda = 265$  nm ou *long wave* utilisée pour la détection de molécules). En règle générale ils sont utilisés pour la stérilisation de l'air ambiant et des locaux. On les retrouve dans certains appareils (distributeurs automatiques de milieux de culture). Ils servent aussi pour la désinfection des vaccins.

Les UV ont un faible pouvoir de pénétration, les microbes doivent donc être directement exposés. Les UV sont mutagènes et posent problème pour les humains car ils provoquent un cancer de la peau et de graves brûlures aux yeux.

3/ Les micro-ondes :

Les fours à micro-ondes ne peuvent chauffer que les produits qui absorbent les ondes, soit l'eau et les graisses. Par conséquent on ne peut s'en servir pour stériliser du matériel ou des substances sèches. Les micro-ondes réchauffent les aliments humides en activant les molécules d'eau à la température de  $100^{\circ}\text{C}$ , chaleur qui tue habituellement la majorité des agents pathogènes. Toutefois leur effet n'est pas certain car la chaleur n'est pas distribuée uniformément dans les aliments solides ;

Les micro-ondes ont peu d'effet sur les microorganismes, des cas d'intoxication alimentaire ont pu être rapportés suite à la consommation de viande cuite au four à micro-ondes.

4/ Les ultra-sons :

Les ultra-sons tuent les micro-organismes mis en suspension dans un liquide. Le bombardement des cellules microbiennes par les ultra-sons provoque la lyse de la paroi cellulaire.

**C/ La filtration :**

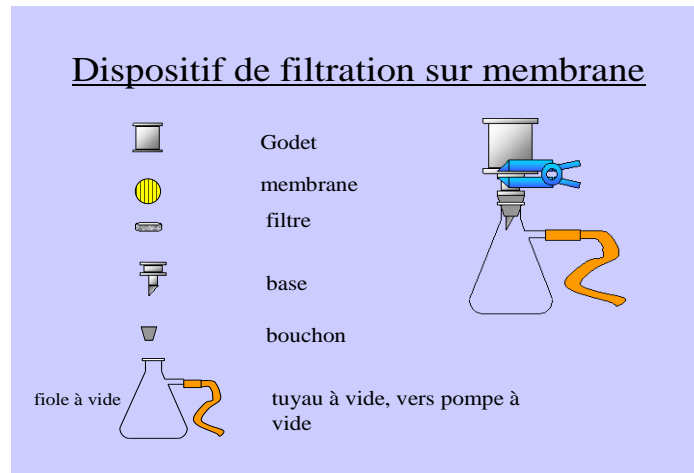
C'est le passage d'un liquide à travers une matière poreuse (membrane) qui retient les microorganismes en raison de la dimension de ses pores.

On s'en sert généralement pour la **détection et le dénombrement bactériens**. Un volume précis (100 ml) d'une solution donnée contenant les bactéries est versé dans un godet stérile puis aspiré (pompe ou trompe à vide) à travers une membrane filtrante (0,22 ou  $0,45\mu\text{m}$ ) et recueilli dans une fiole à vide. Les bactéries ne sont pas filtrées et restent sur la membrane qui est alors déposée à la surface d'une boîte de Pétri. Le filtrat est par contre totalement exempt de bactéries.

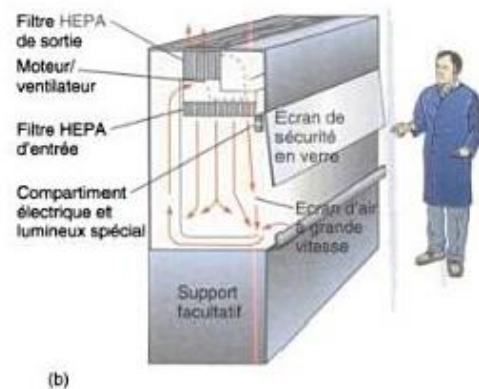
On utilise aussi la filtration sur membrane pour la **stérilisation** de solutions renfermant des substances thermolabiles (enzymes), des milieux de culture, des vaccins, des solutions antibiotiques, de petits volumes (quelques ml). C'est une **stérilisation à froid**. Tout le dispositif de filtration, en aval de la membrane, doit être évidemment stérile. Le diamètre d'une membrane n'est pas un paramètre à considérer, **seule la porosité** de la membrane est prise en compte, les pores de 0,22 et  $0,45\mu\text{m}$  sont ceux utilisés en routine en bactériologie.

Les membranes peuvent être en plusieurs matériaux : mélange d'esters de cellulose, nitrate de cellulose, acétate de cellulose (les plus utilisés pour la stérilisation de solutions),

polycarbonate, en propylène, cellulose régénérée... Plusieurs fournisseurs existent, Whatman®, Millipor®, Sartorius®, Nucléopore®...sont les plus connus.



La filtration est une technique qu'on applique également à la purification de l'air. En laboratoire, les hottes à flux laminaire constituent des surfaces de travail pour éviter la contamination de l'air. Celui-ci passe à travers un filtre HEPA à haute efficacité contre les particules (High Efficiency Particular Air) ; elles sont généralement équipées d'une lampe UV germicide pour stériliser le plan de travail lorsqu'il n'est pas utilisé.



**Une hotte de sécurité biologique à flux laminaire.** (a) Un technicien pipettant un liquide potentiellement dangereux dans une hotte de sécurité. (b) Schéma présentant le trajet du flux d'air.

#### D/ Les méthodes chimiques :

On utilise des agents chimiques pour inhiber la croissance des microbes tant sur les tissus vivants que sur les objets inanimés. Il existe malheureusement peu d'agents chimiques qui

assurent la stérilisation ; la majorité d'entre eux ne font que réduire les populations de microbes à des taux qui ne présentent pas de risques ou éliminent les formes végétatives.

Définitions :

**Désinfectant** : a pour objectif de traiter des surfaces **inertes**. La dose utilisée peut être assez grande.

**Antiseptique** : non irritant et non toxique, il s'applique à des tissus **vivants**.

Un désinfectant peut être un antiseptique, cela dépend essentiellement de la dose utilisée.

Mode d'action :

L'agent antimicrobien peut avoir trois cibles :

- altération de la paroi cellulaire,
- altération de la perméabilité membranaire,
- détérioration des protéines cytoplasmiques et des acides nucléiques.

Evaluation de l'efficacité d'un désinfectant :

Il existe deux méthodes :

- La méthode des porte-germes : des bandelettes de papier ou des anneaux métalliques sont plongés dans une culture bactérienne (*Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*), retirés puis séchés à 37°C pendant un temps très court. La culture ainsi séchée et fixée sur le porte-germe est placée dans une solution du désinfectant à la concentration indiquée par le fabricant pendant 10 min à 20°C. Le porte-germe est finalement transféré dans un milieu de culture favorable à la croissance de la bactérie testée. L'efficacité du désinfectant est mesurée par le nombre de colonies qui se sont développées.
- La méthode des disques (ou de diffusion sur gélose) : un disque de papier filtre imbibé du désinfectant est placé à la surface d'une gélose inoculée au préalable de la bactérie testée (principe de l'antibiogramme). Après incubation, si le désinfectant est efficace, une zone pâle dite d'inhibition apparaît autour du disque.

Les différentes catégories de désinfectants

a- Les agents oxydants :

Le peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) : il est très efficace pour les objets inanimés, il est même sporicide à des températures élevées. Ce n'est pas un antiseptique approprié pour les plaies ouvertes (retarde la cicatrisation) car il se décompose facilement sous l'action de la catalase présente dans les cellules humaines ( $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ). Il est toutefois utilisé pour irriguer les plaies profondes, les molécules d'oxygène inhibant les bactéries anaérobies.

**L'ozone O<sub>3</sub>** : c'est un puissant désinfectant utilisé dans le traitement des eaux.

Le **peroxyde de benzoyle** : il est à la base des médicaments utilisés dans le traitement des plaies infectées par des agents pathogènes anaérobies (acné).

**L'acide peracétique** : sporicide liquide efficace, stérilisant (machines alimentaires et matériel médical).

Le **permanganate de potassium** possède une faible activité antiseptique

b- Les halogènes (iode, chlore et fluor) :

Les halogènes sont des agents antimicrobiens efficaces.

**L'iode I<sub>2</sub>** : agit contre tous les types de bactéries, de nombreuses endospores, des mycètes et certains virus. Elle est utilisée sous forme de teinture (solution alcoolique) comme antiseptique de la peau, elle est cependant irritante pour la peau. Actuellement on lui préfère les **iodophores** (iode + molécule organique). La plus connue est la Bétadine®, c'est une *polyvidone* : iodophore de surface pour le nettoyage antiseptique des plaies, non irritant et ne tache pas.

**Le chlore** : C'est un désinfectant et un antiseptique parmi les plus utilisés ; son action est due à l'hypochlorite d'hydrogène HClO (ou acide hypochloreux) qui se forme lorsque le chlore est combiné à de l'eau. C'est un puissant oxydant.

Le chlore gazeux Cl<sub>2</sub> est utilisé pour désinfecter l'eau d'alimentation, l'eau des piscines et les eaux usées.

L'hypochlorite de calcium (appelé aussi chlorure de chaux) : On en remplit la brique plongée dans les eaux de puits pour leur désinfection.

L'hypochlorite de sodium (**eau de Javel**) est un désinfectant dans les installations de traitement des aliments, les appareils d'hémodialyse et l'eau. C'est aussi un antiseptique de la peau (solution de **Dakin**). Les militaires et les campeurs utilisent des pastilles de dichloroisocyanurate de sodium qui clarifient l'eau par précipitation de la matière organique et la désinfectent en même temps.

Les chloramines : composés très stables, ils sont formés de chlore et d'ammoniac. Ils sont utilisés comme désinfectants, antiseptiques ou agents de nettoyage. Elles sont cependant moins germicides que le chlore.

**Le fluor** : naturellement présent dans des eaux naturelles, à faible dose il inhibe l'activité enzymatique. Il est utilisé dans les dentifrices et les bains de bouche.

c- Les alcools :

Les alcools sont d'une grande efficacité pour détruire les bactéries et les mycètes mais pas les endospores et les virus. L'éthanol et l'isopropanol sont les plus couramment utilisés. Une solution aqueuse d'éthanol (70%) est plus efficace que l'éthanol pur. L'isopropanol donne de meilleurs résultats en tant qu'antiseptique et désinfectant.

d- La chlorhexidine :

La chlorhexidine est une biguanidine. Elle possède un large spectre. Utilisée, très souvent comme antiseptique de la peau et des muqueuses, pour les plaies et les brûlures superficielles. Elle sert aussi comme bain de bouche.

e- Les métaux lourds :

L'argent, le mercure, le zinc et le cuivre ont des propriétés désinfectantes et antiseptiques. L'argent et le cuivre possèdent une action oligodynamique (agissent à faible dose). Les ions métalliques se combinent avec les groupements sulfhydryle (-SH) et dénaturent les protéines.

Le chlorure de mercure est utilisé comme antiseptique depuis très longtemps (mercurochrome). L'oxyde de mercure est utilisé comme pommade ophtalmique.

L'argent est utilisé sous forme de nitrate d'argent à 1%. Actuellement la préparation la plus courante est la sulfadiazine d'argent, crème topique destinée au traitement des brûlures.

Le cuivre et le zinc servent comme pommades topiques et d'onguents pour prévenir l'érythème fessier du bébé. Le sulfate de cuivre (à 1 ppm) sert comme algicide dans les réservoirs d'eau, les aquariums et les piscines. Il est aussi à la base de la *bouillie bordelaise* utilisée en phytothérapie comme fongicide.

f- Les surfactants ou agents de surface :

Les surfactants sont des **tensioactifs**, ils réduisent la tension superficielle entre les molécules d'un liquide. Ils comprennent les **savons** et les **détergents**.

Les savons sont peu efficaces comme antiseptiques, ils éliminent **mécaniquement** les bactéries (émulsification des graisses). Le *triclocarban* est un bon antiseptique, il est incorporé dans les savons, les désodorisants, les lotions et les mousses à raser pour prévenir la prolifération des bactéries à Gram+.

Les détergents se divisent en deux groupes : anioniques et cationiques

- Les détergents anioniques ne sont ni toxiques, ni corrosifs et agissent rapidement. Ils éliminent la plupart des microbes, y compris les bactéries thermorésistantes. Leur activité est renforcée lorsqu'ils sont associés à d'autres antiseptiques (ex : Mercryl laurylé)
- Les détergents cationiques : ce sont les composés **d'ammonium quaternaire (Quats)**. Ils sont les plus utilisés et sont très efficaces contre les bactéries à Gram positif, mais peu sur les bactéries à Gram négatif. Ils sont fongicides mais ne détruisent pas les endospores ni les mycobactéries. La présence de matière organique réduit considérablement leur action. Les deux quats les plus courants sont le chlorure de benzalkonium et le chlorure de cétalpyridinium. (ex : biocidan®, cétavlon® ou cétriminium)

g- Les colorants :

Les colorants sont de faibles antiseptiques. Quelques uns bien connus des bactériologistes sont utilisés dans les milieux de culture : le bleu de méthylène, le vert de malachite, le vert brillant, le violet de méthyle, le violet de gentiane. Ce pouvoir antiseptique est sélectif vis-à-vis des bactéries à Gram positif ou négatif.

Le cristal violet, le vert de malachite et le vert brillant inhibent la plupart des bactéries à Gram+.

L'éthyl violet inhibe les *Bacillus*.

h- Les dérivés phénolés :

Les dérivés phénolés n'ont plus les propriétés irritantes du phénol (n'est plus utilisé), leur action est augmentée lorsqu'ils sont combinés à un savon ou un détergent. Ils sont surtout utilisés comme désinfectants, leur action reste efficace même en présence de matière organique.

Les crésols sont d'usage courant (ex., *o*-nitrophenol), ce sont d'excellents désinfectants de surface.

Parmi les autres dérivés, citons les bisphénols : l'hexachlorophène et le triclosan. Le premier fut longtemps utilisé mais n'est plus d'usage courant. Le triclosan est un ingrédient de savons antibactériens, de dentifrices, de désodorisants...

i- Les additifs de conservation :

Les additifs de conservation sont utilisés en industrie alimentaire. Les acides carboxyliques, le benzoate de sodium, l'acide sorbique et le propionate de calcium, sont d'usage courant et sont sans danger. Les deux premiers préviennent la formation de moisissures dans les aliments acides (fromage, fruits et boissons gazeuses). Le propionate de calcium est fongistatique, il est ajouté au pain pour prévenir la croissance de *Bacillus*.

Le nitrate de sodium et le nitrite de sodium furent longtemps rajoutés aux produits carnés ; leur usage est maintenant règlementé car leur métabolisation dans l'intestin donne des nitrosamines cancérigènes.

j- Les aldéhydes :

Les aldéhydes sont très efficaces comme agents antimicrobiens. Ils inactivent les protéines. Le formaldéhyde dont la solution à 37% est appelée formol et le glutaraldéhyde sont les plus connus. Le formol est un excellent désinfectant (conservation des spécimens biologiques). Le glutaraldéhyde est moins irritant, agit en présence de matière organique et est efficace plus rapidement. Il est utilisé sous forme d'une solution à 2% dans les hôpitaux. Il est bactéricide, virucide et sporicide.

k- Les gaz :

On citera l'oxyde d'éthylène, l'oxyde de propylène et le  $\beta$ -propiolactone. L'oxyde d'éthylène est le plus utilisé car il est très pénétrant. Il élimine tous les microbes et toutes les endospores (4-18h d'exposition). Il est très toxique et doit être utilisé en enceinte fermée (hôpitaux, engins spatiaux, matériel médical en plastique, matériel d'usage unique).

Exemple d'exposition : oxyde d'éthylène :

Pression : 3 à 5 kg.cm<sup>-2</sup>

T° : 50 à 60°C

Temps : 2 à 4 heures

l- Les huiles essentielles :

Les essences naturelles ou huiles essentielles doivent leur pouvoir antiseptique aux composés phénoliques et terpéniques : l'essence d'eucalyptus (voies respiratoires), de girofle, (dentaire), de thym (intestinal et respiratoire), de santal (voies urinaires). On utilise actuellement de plus en plus leurs principes actifs (eucalyptol, eugénol, le thymol).

m- Divers :

Les salicylanilides et les carbanilides (solubacter®), Hexétidine -Hextril®-).

## LES ANTIBIOTIQUES

Les antibiotiques sont des agents antimicrobiens qui servent à traiter les maladies par ingestion ou injection avec des risques secondaires minimes. Ce sont des composés de faibles poids moléculaires qui tuent ou inhibent la croissance des bactéries. Ils sont bactéricides ou bactériostatiques. Contrairement aux antiseptiques et désinfectants, les antibiotiques interfèrent avec une enzyme ou un processus biochimique spécifique. La plupart des antibiotiques sont naturellement produits par des bactéries ou des champignons. Ils existent aussi des antibiotiques semi-synthétiques et synthétiques (sulfamides).

Les antibiotiques peuvent être à large spectre ou à spectre limité ;

Ils sont utilisés à des fins médicales, à deux exceptions : la nisine et la natamycine sont deux bactériocines dont l'ajout aux fromages est autorisé.

### A- Origine des antibiotiques :

#### \* Origine naturelle :

Parmi les 10 000 antibiotiques d'origine naturelle recensés dans le monde :

- 70 % proviennent d'actinomycètes dont le genre *Streptomyces* est un producteur majeur d'antibiotiques : tétracyclines, aminoglycosides. Entre 1992 et 1998, 1000 nouveaux agents anti-infectieux issus des actinomycètes ont été isolés.

- 20 % proviennent de champignons : *Penicillium*, *Cephalosporium*, *Aspergillus*.

- 10 % proviennent des bactéries (non actinomycètes), en particulier des genres *Bacillus* et *Pseudomonas*. La bacitracine utilisée pour certains traitements locaux en est un exemple.

#### \* Antibiotiques semi-synthétiques :

Ce sont des antibiotiques naturels chez lesquels une partie de la molécule est ajoutée de manière synthétique

#### \* Antibiotiques de synthèse :

Sulfamides, métronidazole, isoniazide, acide nalidixique et les fluoroquinolones, les pénèmes.

#### \* Dans le futur :

La biotechnologie permettra l'exploitation des mutations pour une surproduction d'antibiotiques, la génération de nouveaux antibiotiques, l'hybridation par ingénierie génétique et transformation de l'ADN.



MICROORGANISME	ANTIBIOTIQUE
<b>Bacilles à Gram positif</b>	
<i>Bacillus subtilis</i>	bacitracine
<i>Bacillus polymyxa</i>	polymyxine
<b>Actinomycètes</b>	
<i>Streptomyces nodosus</i>	amphotéricine
// <i>venezualae</i>	chloramphénicol
// <i>aureofaciens</i>	chlortétracycline et tétracycline
// <i>erythraeus</i>	érythromycine
// <i>fradiae</i>	néomycine
// <i>griseus</i>	streptomycine
<i>Micromonospora purpurea</i>	gentamycine
<b>Mycètes</b>	
<i>Cephalosporium spp.</i>	céfalotine
<i>Penicillium griseofulvum</i>	griséofulvine
<i>Penicillium notatum</i>	pénicilline

**B- Mode d'action :**

Mode d'action	Antibiotiques
Inhibition de la synthèse de la paroi	* $\beta$ -lactames : pénicillines, céphalosporines, carbapénèmes et monobactames * Phosphomycine et bacitracine
Inhibition de la synthèse des protéines	* Aminoglycosides : kanamycine, gentamycine * Tétracyclines * Macrolides et lincosamides * Streptogramines (ou synergistines)
Inhibition de la répliation de l'ADN	* Les quinolones
Inhibition de la synthèse de l'ARN	* Rifamycines
Inhibition de la synthèse du THF et inhibition compétitive (l'acide para-aminobenzoïque)	* Triméthoprime et sulfonamides
Cassure de l'ADN	* Métronidazole
Altération de la membrane cytoplasmique	* Polymyxine * Amphotéricine B, miconazole, kétoconazole



Démonstration par la méthode des disques de l'efficacité des antibiotiques. Les zones d'inhibition (en clair) peuvent être de différentes tailles, plus celles-ci sont grandes plus l'antibiotique est actif contre la bactérie testée.

### C - Les grandes familles d'antibiotiques:

Ci-dessous, vous trouverez le classement des familles d'antibiotiques, ainsi que leurs principales caractéristiques, les noms commerciaux étant indiqués entre parenthèses.

#### A- Les bêtalactamines:

1 - Les **pénames**: activité bactéricide par inhibition de la synthèse de paroi

• **Groupe G**: (extencilline, oracilline, ospen), pénicilline G,(spécilline G., oracilline) active sur un spectre étroit de *cocci* à Gram+, *cocci* à Gram-, bacilles à Gram+ et tréponèmes.

• **Groupe A**:

Aminopénicillines

- \* ampicilline et dérivés : (totapen)
- \* amoxicilline : (clamoxyl)
- \* amoxicilline + ac.clavulanique : (augmentin)

Carboxypénicillines:

- \* ticarcilline : ticarpen (spectre élargi à *Pseudomonas aeruginosa* + *Proteus*)
- \* ticarcilline + ac.clavulanique : (claventin)
- \* carbénicilline : (pyopen)

Uréidopénicillines :

- \* mezlocilline : (baypen)
- \* azlocilline : (sécuropen)
- \* pipéracilline : (pipérilline), (spectre des carboxypénicillines + entérocoques, *Klebsiella*)

• **Groupe M :**

- Méticilline
- Oxacilline : (bristopen)
- Cloxacilline : (orbénine)
- Dicloxacilline : (diclocil)

• **amidino-pénicillines:**

- \* mécillinam : (selexid) (spectre des entérobactéries)

2 - **Les pénèmes:**

- Imipénème : (tiénam)

3 - **Les céphalosporines:**

- de 1ère génération: céfalotine (kéflin), céfazoline (Kéforal).
  - de 2ème génération: céfamandol (kéfandol), céfoxitine (méfoxin),
  - de 3ème génération: ceftazidime (fortum), céfixime (oroken).
  - de 4ème génération: cefsulodine (pyocéfal)
- Les céphalosporines de 3<sup>ème</sup> et 4<sup>ème</sup> générations sont utilisées dans le traitement des infections sévères à Gram-, y compris *Pseudomonas*.

4 - **les monobactames:**

- Aztréonam: (azactam). Cocci et bacilles à Gram- aérobies, entéobactéries et *Pseudomonas aeruginosa*.

5 - **les inhibiteurs irréversibles des bêtalactamases:** (pas de spectre indicatif, les IIB sont impérativement en association)

- acide clavulanique : donne en association avec l'amoxicilline, l'augmentin  
Donne en association avec la ticarcilline, le claventin.
- sulbactam (+ ampicilline = Unacim)
- tazobactam (+ Piréacilline =Tazocilline)

**B - Les aminosides**

Activité bactéricide par inhibition de la synthèse protéique. Gentalline, Amiklin, Bacilles G- aérobies, Staphylocoques Méti-R, Gonocoques

**C – Les phénicoles** (Chloramphénicol et dérivés)

Activité bactériostatique par inhibition de la synthèse protéique.

Chloramphénicol : (solnicol, tifomycine, cébénicol)

Thiamphénicol : (Fluimucil, thiophénicol)- salmonelles, bacilles G- anaérobies

**D - Les cyclines:** Activité bactériostatique par inhibition de la synthèse protéique.

- tétracycline : (hexacycline)
- chlortétracycline : (auréomycine)
- oxytétracycline : (terramycine)
- doxycycline : (vibramycine)
- minocycline : (mynocine).

**E - Les macrolides:**

\* Macrolides vrais:

- érythromycine : abboticine)
- oléandomycine : (TAO)
- spiramycine : (rovamycine)
- josamycine : (josacine).
- midécamycine : midécacine).

\* lincosamides :

- lincomycine
- clindamycine

\* streptogramines :

- pristinamycine : (pyostacine)
- virginiamycine : (staphylomycine)

**F - Les polypeptides:**

Activité bactéricide par action sur la membrane cytoplasmique.

- bacitracine
- polymyxine B
- colistine

**G - Les sulfamides et associations:**

Bactériostatiques par inhibition de la synthèse de l'acide folique.

- sulfamides
- triméthoprim
- triméthoprim + sulfamides : (bactrim).

**H – Les nitrofuranes :**

- furanes : (ambatrol, ercéfuryl)

**I- Les quinolones:** Activité bactéricide par inhibition de la synthèse de l'ADN bactérien.

- acide nalidixique : (negram)
- acide oxolinique : (urotrate)
- ofloxacin : (oflocet)

**J- Les imidazoles:**

- métronidazole : (flagyl)
- ornidazole :(tiberol)
- tinidazole :(fasigyne)

**K-Divers inclassables:**

- rifampicine :(Rifadine)
- vancomycine : (vancocin)
- acide fusidique: (fucidine)
- fosfomycine: (fosfocine)
- nitroxoline : (nibiol)

**- recommandations diverses:**

- Certains ATB sont toxiques, d'autres sont allergènes.

- Tous les antibiotiques peuvent provoquer des troubles de la digestion par modification de la flore intestinale saprophyte.
- Il existe un risque de destruction brusque des bactéries, avec libération d'endotoxines : c'est le choc toxinique.

## Les milieux de culture

Un milieu de culture est un milieu qui permet la croissance de bactéries, levures, moisissures et cellules en vue de leur étude. Il peut être **liquide** ou rendu **solide** par addition d'agar-agar à raison de 15 g/l (on parle alors de **gélose**). Son utilisation implique une stérilisation préalable. Les milieux de culture sont classés selon leur composition ou selon leur utilisation.

### 1/ Selon la composition :

Les milieux de culture doivent contenir quantitativement et qualitativement les nutriments exigés pour la croissance et l'entretien des bactéries. Leur pH est généralement compris entre 7 et 7,6 ; leur isotonicité correspond généralement à une solution de NaCl à 9 p. 1000 et leur taux d'humidité doit être suffisant pour permettre la croissance de la grande majorité des bactéries.

- Un milieu **minimum** ou **synthétique** est un milieu dont la composition est connue avec exactitude. Utilisé rarement en routine, il est réservé à la recherche fondamentale. En règle générale, il est composé d'une source de phosphore, d'azote, de magnésium, de soufre, de fer, de sodium et de potassium [ $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4$ , NaCl]. Le glucose à de faibles doses (10 mM) peut être ajouté comme source de carbone et d'énergie. Exemple de milieu : le M63, le milieu urée-indole.
- Un milieu **empirique** (ou **naturel, riche, complexe**) est un milieu dont on ne connaît que partiellement la composition car il peut contenir des extraits de viande, de levure, de plantes, des peptones .....et éventuellement des liquides biologiques (sang, sérum).

Les milieux naturels ou empiriques, très utilisés, sont préparés à partir de constituants d'origine animale (macérations ou décoctions de tissus, peptones, œuf, gélatine, lait, ...) ou d'origine végétale (pomme de terre, soja...). Leur composition n'est pas parfaitement définie et, pour un même milieu, elle peut varier d'un lot à un autre.

- Les **macérations** et les **décoctions** sont obtenues en laissant séjourner dans l'eau des tissus tels que du muscle, du foie ou de la cervelle. Au bout de quelques heures on récupère une solution riche en sels minéraux, en vitamines hydrosolubles, en protéines peu dégradées et en glucides. L'extraction aqueuse peut s'effectuer à froid et on parle de macération ou s'effectuer à chaud (100°C) et on parle de décoction. Ces macérations et décoctions sont commercialisées sous le nom d'**extraits de viande**. Les extraits de viandes apportent des sels minéraux, des vitamines, des protéines peu dégradées et des glucides. Les extraits de levure apportent, quant à eux, des acides aminés et des vitamines hydrosolubles.

- Les **peptones** occupent une place très importante dans la préparation des milieux de culture. Ce sont des mélanges de composés solubles dans l'eau et résultant de l'action d'enzymes protéolytiques sur diverses protéines. Leur classification repose sur la nature de l'enzyme protéolytique (peptones pepsiques, pancréatiques, trypsiques, de papaine, etc.) et sur l'origine des protéines (peptones de viande, de caséine, de gélatine, de soja, etc.). Pour désigner une peptone il faut donc indiquer le nom de l'enzyme et celui de la protéine. Par exemple, on parlera de peptone pancréatique de viande, de peptone trypsique de cœur, etc. La composition des peptones est très variable. Ainsi, les peptones pepsiques contiennent des polypeptides complexes dépourvus d'acides aminés libres et ce sont donc des produits très peu dégradés. Inversement les peptones pancréatiques renferment des polypeptides simples avec une forte proportion d'acides aminés libres.

Deux exemples de milieux naturels sont donnés ci-dessous :

- . Gélose nutritive : macération de viande (1 litre), peptone trypsique (15 g), NaCl (5 g), agar-agar (15 à 20 g)
  - . Gélose trypticase-soja : peptone trypsique de caséine (15 g/L), peptone de papaine de soja (5 g/L), NaCl (5 g/L), gélose (15 g/L).
- Du chlorure de sodium (NaCl) est habituellement ajouté à raison de 5 g/l.

## 2 : Selon l'utilisation :

Il n'existe pas de milieu universel, les besoins alimentaires et les habitats naturels diffèrent selon les espèces.

\* Un milieu **basal (non sélectif)**: est réservé pour les bactéries non ou peu exigeantes comme les Enterobacteriaceae. Exemples : le bouillon nutritif, l'eau peptonée, le trypticase soja, LB, BHI, Columbia.

\* Les milieux **enrichis**

Ils sont obtenus en incorporant à un milieu basal adéquat des liquides ou suspensions riches en molécules organiques diverses : du sang, du sérum, du liquide d'ascite, de l'extrait globulaire, des suppléments polyvitaminiques... Les qualités nutritives peuvent être améliorées par dénaturation thermique des constituants, en particulier pour le sang. Ils permettent la croissance de nombreux germes exigeants ou très exigeants. Les plus utilisées sont les géloses au sang frais ou au sang cuit (gélose chocolat).

L'addition de sang au milieu de base peut avoir plusieurs buts :

- apporter des facteurs de croissance nécessaire au micro-organisme étudié
- neutraliser certains inhibiteurs contenus dans les peptones des milieux
- neutraliser, du fait de l'action peroxydasique et catalasique de l'hémoglobine, des ions superoxydés ou des peroxydes toxiques produits par le micro-organisme (intéressant en particulier pour les bactéries catalase – comme les Streptococcaceae)

Par ailleurs, il permet la lecture d'un caractère important lors de la détermination du germe : l'hémolyse.

Le sang peut être d'origines diverses : cheval, mouton, lapin, homme, bœuf (attention certains germes présentent un type d'hémolyse sur un sang et un autre type d'hémolyse avec un autre sang). Il est à ajouter à raison de 5 à 10% au milieu de base (Columbia, Trypticase-soja, Mueller-Hinton, cœur-cerveau). Celui-ci ne doit pas contenir de glucose, car il inhibe les hémolysines

\* Les milieux d'**enrichissement (ou électifs)**: ils permettent de favoriser de **façon préférentielle** la croissance d'une espèce (ou d'un genre) bactérienne donnée. **Enrichir**, c'est augmenter la représentation (proportion) d'un sous-groupe de micro-organismes dans un ensemble plus vaste.

La présence de certaines bactéries à pouvoir pathogène spécifique dans un prélèvement a une signification pathologique indiscutable, même si elles sont peu représentées. C'est le cas par exemple des *Salmonella*, des biotypes entéropathogènes de *Yersinia enterocolitica*, des vibrions cholériques ou encore des *Listeria* ou des entérocoques. Quelquefois, leur proportion peut être **minime** par rapport à celle de la flore commensale et leur présence ne peut être révélée par un isolement sélectif. L'absence de colonies suspectes sur l'isolement sélectif ne suffit pas pour affirmer l'absence de ces bactéries dans le prélèvement. C'est pourquoi un enrichissement est mis en route en même temps que l'isolement sélectif. Exemple : milieu de Muller Kauffmann au tétrathionate et bouillon sélénite pour les salmonelles.

\* Les milieux **sélectifs** :

Les milieux sélectifs présentent l'avantage de permettre la croissance de certaines espèces tout en empêchant le développement d'autres. Ils contiennent une substance inhibitrice. Ils sont utilisés pour l'isolement bactérien dans des produits polymicrobiens. La sélection peut être chimique ou antibiotique. Ce sont des milieux riches ou non et donnant souvent un ou plusieurs caractères biochimiques d'orientations permettant une identification plus simple des germes. On peut jouer sur **(i)** les facteurs physico-chimiques : le pH, la pression osmotique... **(ii)** l'addition de substances bactériostatiques ou bactéricides, de sels minéraux, de substances organiques, de colorants, d'antibiotiques... **(iii)** l'apport d'une **seule** source de carbone et d'énergie assimilable par certaines espèces seulement.

Exemple : le milieu de MacConkey contient deux inhibiteurs : le cristal violet contre les bactéries à Gram + et les sels biliaires qui sélectionnent les entérobactéries.

\* Les milieux **différentiels** :

Les milieux différentiels permettent de distinguer certaines espèces les unes des autres grâce aux différences de mode de croissance qu'elles présentent. Sur gélose MacConkey, les bactéries lac+ comme *E. coli* forment des colonies rouges alors que les bactéries lac – comme *Salmonella* donnent des colonies incolores ou jaunes. Ce milieu est donc à la fois sélectif (entérobactéries) et différentiel (lac+ et lac<sup>-</sup>), le lactose étant le caractère différentiel.

Autres exemples :

- la gélose désoxycholate-citrate inhibe les bactéries à Gram+. *Salmonella* et *Shigella* forment des colonies incolores. Les autres coliformes lac+ croissent sur ce milieu et donnent une coloration rouge. L'indicateur coloré « le rouge neutre » est rouge à pH ≤ 6,8 et jaune à pH ≥ 8  
- la gélose chocolat est « la gélose au sang » chauffée à 70-80°C d'où la coloration brun-chocolat. Elle est plus favorable au développement de *Neisseria gonorrhoeae*. La gélose au sang sert pour la culture de germes exigeants et pour détecter l'hémolyse.

\* Les milieux de **transport** :

Le milieu de transport sert pour l'acheminement d'un matériel biologique contaminé, il doit seulement maintenir les germes contaminants en vie. Il ne doit pas favoriser leur croissance.

Exemple : le milieu de Stuart.

\* Les milieux d'**identification** :

Les milieux d'identification sont des milieux de culture liquides et/ou solides qui permettent de réaliser des tests biochimiques se rapportant au métabolisme respiratoire, glucidique, protéique et lipidique des bactéries. Convenablement choisis et associés, ces milieux de culture en tubes classiques et leurs tests biochimiques forment une **galerie biochimique** d'identification spécifique d'un groupe de bactéries (famille des entérobactéries, espèces des genres *Staphylococcus*, *Micrococcus*...). Ces galeries, constituées de milieux en tubes de culture, présentent toujours un intérêt pédagogique. Dans les laboratoires d'analyses et de contrôle microbiologiques, elles sont remplacées par des microgaleries dont les galeries API bioMérieux®SA.



La galerie API est un système standardisé pour l'identification de bactéries, elle est composée d'un nombre variable de microtubes (10 ou 20 le plus souvent) contenant des substrats déshydratés qui permettent de réaliser des tests biochimiques.

Depuis une quinzaine d'années environ, sont apparus des milieux de culture contenant des substrats synthétiques **chromogéniques** spécifiques d'enzymes bactériennes. Le substrat décomposé libère ses différentes parties (molécules) dont l'une est colorée à l'état libre. Ces milieux sont destinés en microbiologie des aliments et/ou des eaux.

Les milieux **fluorogéniques** sont des milieux nutritifs classiques additionnés d'un substrat fluorogène spécifique d'une enzyme bactérienne ; celui-ci libère un composé qui produit une fluorescence sous UV. Les deux substrats les plus connus sont le **MUG** (4-méthyl-umbelliféryl- $\beta$ -D-glucuronide) et le **MUD** (4-méthyl-umbelliféryl-  $\beta$ -D-glucoside).

Le MUG, sous l'action de l'enzyme  $\beta$ -D-glucuronidase, enzyme spécifique de *E. coli*, libère du 4-méthyl-umbelliféron fluorescent sous UV.

Le MUD, sous l'action de l'enzyme  $\beta$ -D-glucosidase, enzyme spécifique des entérocoques fécaux, libère du 4-méthyl-umbelliféron fluorescent sous UV.

\* Les milieux de **conservation** :

Les milieux de conservation sont des milieux pauvres au sein desquels les bactéries survivent dans un état de vie ralentie.

Exemples : milieu à l'œuf de Coletsos, milieu de conservation pour entérobactéries

### Les colorants inhibiteurs de germes

Colorants	Inhibiteurs des...	Milieux de culture
Bleu de méthylène et éosine	Gram+	Gélose EMB (Agar lactosé selon Lévine)
Cristal violet	Gram+	Gélose de Drigalski Gélose de MacConkey Gélose VRBLG Gélose <i>Yersinia</i>
Ethyl violet	Bacilles sporulés et <i>cocci</i> à Gram+	Milieu de Litsky
Vert brillant (avec sels biliaires ou bile de bœuf suivant concentration)	Bactéries à Gram+ et à Gram- sauf coliformes	Bouillon BLBVB ; bouillon bile et vert brillant
	Bactéries à Gram + et à Gram- sauf entérobactéries	Bouillon Mossel
	Bactéries à Gram+	Bouillon MKTTN
Oxalate de vert de malachite (avec chlorure de magnésium)	Bactéries à Gram+ et à Gram-	Bouillon RVS
Vert malachite (avec irlgasan)	Bactéries à Gram +	Bouillon ITC

\*MKTTN = Müller-Kauffmann au tétrathionate novobiocine

## Quelques indicateurs colorés

La différenciation de plusieurs microorganismes est basée sur la production d'acides à partir de sucres et d'autres sources de carbone ou la décarboxylation d'acides aminés. Les indicateurs colorés permettent la visualisation des **changements de pH** qui sont la conséquence de telles réactions métaboliques.

Exemple : Sur gélose MacConkey, la fermentation du lactose en acide lactique est révélée en présence de rouge neutre par la formation de colonies roses ou rouges (lac+). Les microorganismes lac- présentent des colonies jaunes ou incolores.

Indicateur	forme acide	zone de virage approximative	forme basique
Rouge de crésol (acide - 1 <sup>er</sup> virage)	rouge	0,0-1,0	jaune
Méthyl violet	jaune	0,0-1,6	bleu-violet
Vert malachite (acide - 1 <sup>er</sup> virage)	jaune	0,2-1,8	bleu-vert
Bleu de thymol (acide - 1 <sup>er</sup> virage)	rouge	1,2-2,8	jaune
Jaune de méthyle	rouge	2,9-4,0	jaune
Bleu de bromophénol (BBP)	jaune	3,0-4,6	violet
Rouge congo	bleu	3,0-5,2	rouge
Méthyl orange (Hélianthine)	rouge	3,1-4,4	jaune
Vert de bromocrésol	jaune	3,8-5,4	bleu
Rouge de méthyle	rouge	4,2-6,3	jaune
Pourpre de bromocrésol	jaune	5,2-6,8	violet
Bleu de bromothymol, BBT (2 <sup>e</sup> virage)	jaune	6,0-7,6	bleu
Rouge de phénol (Phénolsulfonephtaléine)	jaune	6,6-8,0	rouge
Rouge neutre	rouge	6,8-8,0	jaune orangé
Rouge de crésol (base - 2 <sup>e</sup> virage)	jaune	7,2-8,8	rouge
Bleu de thymol (base - 2 <sup>e</sup> virage)	jaune	8,0-9,6	bleu
Phénolphtaléine	incolore	8,2-10,0	rose
Thymolphtaléine	incolore	9,4-10,6	bleu
Vert malachite (base - 2 <sup>e</sup> virage)	bleu-vert	11,5-13,2	incolore

## Les systèmes de tampon

Les systèmes de tampon biologiques sont utilisés dans la préparation des milieux de culture. Un tampon est un composé chimique dont la présence dans une solution a pour but de maintenir le **pH stable** quels que soient les ajouts de base ou d'acide auxquels elle est soumise. Les tampons utilisés en microbiologie sont les tampons phosphates ( $\text{HPO}_4^{2-}$  et  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ ), carbonates ( $\text{CO}_3^{2-}$  et  $\text{HCO}_3^-$ ), le Tris et Hepes. En effet, certains microorganismes ne se développent que dans un intervalle étroit de pH, le milieu de culture doit, par conséquent, être tamponné.

Exemple de tampons : Préparez des solutions équimolaires de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  et  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ .

Pour obtenir un pH de ...	Mélanger	
	$\text{Na}_2\text{HPO}_4$ (ml)	+ $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ (ml)
5.4	3.0	97.0
5.6	5.0	95.0
5.8	7.8	92.2
6.0	12.0	88.0
6.2	18.5	81.5
6.4	26.5	73.5
6.6	37.5	62.5
6.8	50.0	50.0
7.0	61.1	38.9
7.2	71.5	28.5
7.4	80.4	19.6
7.6	86.8	13.2
7.8	91.4	8.6
8.0	94.5	5.5

### Sels de sodium inhibiteurs de germes

Sels de sodium	Inhibiteurs de.....	Milieux de culture
Azoture ou azide de sodium	Bactéries à Gram-	Gélose BEA Milieu de Litsky Milieu de Rothe
Chlorure de sodium	De nombreuses bactéries sauf halophiles ou halotolérantes ( <i>Staphylococcus</i> , <i>Vibrio</i> ...) à concentration élevée	Gélose de Chapman, Eau peptonée salée alcaline
Cholate et désoxycholate de sodium	Bactéries à Gram+ (et certaines à Gram-)	Gélose <i>Yersinia</i>
Citrate de sodium	Bactéries à Gram+	Bouillon de Schubert
Désoxycholate de sodium	Bactéries à Gram + (et certaines à Gram- selon concentration)	Gélose Drigalski Gélose XLD
Désoxycholate de sodium, citrate de sodium et citrate ferrique	Bactéries à Gram+, <i>Proteus</i> et certains coliformes	DCL ou gélose désoxycholate citrate lactose
Sélénite de sodium (ou sélénite acide de sodium)	Coliformes à Gram- et entérocoques à Gram+	Bouillon au sélénite Bouillon sélénite-cystine
Tétrathionate de sodium	Bactéries à Gram- autres que <i>Salmonella</i> et <i>Proteus</i>	Bouillon au MKTTn
Thiosulfate de sodium et citrate de sodium	Bactéries à Gram+, limitant la croissance des coliformes et des <i>Proteus</i>	Gélose TCBS Gélose SS

**Substances chimiques diverses, libres ou associées, inhibitrices de germes**

<b>Substances chimiques</b>	<b>Inhibiteurs de....</b>	<b>Milieux de culture</b>
Bile de bœuf ou sels biliaires (d'origine naturelle) suivant concentration)	Bactéries à Gram+ (certaines bactéries à Gram-)	Gélose Coli Bouillon EC VWR Gélose Hektoen Gélose MacConkey Gélose TCBS Gélose VRBLG
Sels biliaires, citrate de sodium et vert brillant	Bactéries à Gram+	Gélose SS
Chlorure de lithium et chlorhydrate d'acriflavine	Bactéries à Gram+ et à Gram-	Bouillon d'enrichissement Fraser
Chlorure de magnésium et tellurite de potassium	Bactéries à Gram+ et à Gram- sauf staphylocoques...	Bouillon de Giolitti-Cantoni Gélose de Baird-Parker
Chlorure de magnésium et vert malachite	Bactéries à Gram+ et à Gram-	Bouillon MKTTn

**Substances chimiques diverses, inhibitrices de germes**

<b>Substances chimiques</b>	<b>Inhibiteurs de....</b>	<b>Milieux de culture</b>
D-cyclosérine	Bactéries à Gram+ et à Gram- autres que <i>Clostridia</i> sulfito-réducteurs	Gélose au tryptose-sulfite à la cyclosérine
Irgasan	Microbes	Gélose <i>Yersinia</i>
Sulfate de lauryle	Bactéries à Gram+	Bouillon au sulfate de lauryle Readycult coliformes
Sulfate de bismuth et vert brillant	Bactéries à Gram+ et à Gram-	Milieu de Wilson-Blair
Tellurite de potassium	Bactéries à Gram+ et à Gram- sauf staphylocoques...	Bouillon de Giolitti-Cantoni Gélose de Baird-Parker
Tergitol 4	Bactéries autres que Salmonelles ( <i>Proteus</i> , <i>Providencia</i> et <i>Pseudomonas</i> )	Gélose XLT4
Tergitol 7	Bactéries à Gram+ et à Gram- ( <i>Proteus</i> )	Gélose lactosée au TTC et au tergitol7

**Antibiotiques antibactériens à spectre large :**

Antibiotiques	Quelques bactéries sensibles....	Milieux de culture et galeries API
---------------	----------------------------------	------------------------------------

**Famille des aminosides ou aminoglycosides**

Néomycine	Entérobactéries, <i>Listeria monocytogenes...</i>	Schaedler Néo. Vanco. (bio Mérieux)
Gentamicine	Entérobactéries, <i>L. monocytogenes</i> , <i>Campylobacter...</i>	Gélose Sabouraud gentamicine chloramphénicol

**Famille des  $\beta$ -lactamines****Céphalosporines de première, deuxième et troisième génération**

Céfazoline (1 <sup>ère</sup> génération)	<i>Staphylococcus</i> , Entérobactéries, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> .... (sauf <i>Pseudomonas aeruginosa</i> )	Api Campy bioMérieux
Céfotétan (2 <sup>ème</sup> génération)	Entérobactéries, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium perfringens</i> .... (sauf <i>Ps. aeruginosa</i> )	Gélose Palcam bioMérieux et Bio-Rad
Ceftazidime (3 <sup>ème</sup> génération)	Entérobactéries, parfois <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>C. perfringens</i>	Gélose Ottaviani ou gélose AL Gélose Oxford
Céfopérazone (3 <sup>ème</sup> génération)	Entérobactéries, <i>Streptococcus</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	<i>Campylobacter</i> selon Karmali Gélose Campyloset
Cefsulodine (3 <sup>ème</sup> génération)	<i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Streptococcus</i> sauf D....	Gélose <i>Yersinia</i> CIN

**Famille des  $\beta$ -lactamines****Pénames : Carboxypénicillines**

Ticarcilline	Streptocoques A, B, C..., <i>Ps. aeruginosa</i> , <i>Clostridium perfringens</i>	Bouillon ITC Bio-Rad
--------------	--	----------------------

**Famille des diaminopyrimidines**

Triméthoprime	Spectre large sauf <i>Campylobacter</i> , <i>Clostridium</i> , <i>Pseudomonas</i> ....	Bouillon et gélose de Preston
---------------	--	-------------------------------

**Famille des nitrofuranes**

Nitrofurantoïne	Bactéries à Gram+ et – du tractus urinaire <i>E. coli</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Staphylococcus</i> ...	Test de différenciation
-----------------	---	-------------------------

**Famille des phénicoles**

Chloramphénicol	Bacilles et <i>cocci</i> à Gram+ et à Gram -	Gélose Sabouraud chloramphénicol Gélose YGC
-----------------	--	--

**Famille des rifamycines**

Rifampicine	Antibiotique antituberculeux ( <i>Mycobacterium tuberculosis</i> ....) ; <i>Staphylococcus</i> ....	Bouillon et gélose de Preston Gélose de Butzler
-------------	--	--

**Antibiotique isolé**

Fosfomycine	Entérobactéries, <i>Staphylococcus</i> .....	Gélose Palcam
-------------	---	---------------

**Antibiotiques antibactériens à spectre étroit :**

Antibiotiques	Quelques bactéries sensibles....	Milieux de culture et galeries API
---------------	----------------------------------	------------------------------------

**Famille des macrolides**

Erythromycine	<i>Campylobacter jejuni</i> , <i>Legionella</i> , <i>Leptospira</i>	Api Campi
---------------	--	-----------

**Famille des polypeptides**

Polymyxine B (sulfate)	Entérobactéries sauf <i>Proteus</i> , <i>Serratia</i> , <i>Providencia</i> , <i>Ps. aeruginosa</i>	Agar sélectif <i>Bacillus cereus</i> Bouillon et gélose de Preston Legionella GVPC Gélose Ottaviani, Gélose ALOA de AES Laboratoires Gélose Oxford
Colistine	Entérobactéries ( <i>E. coli</i> , <i>Salmonella</i> , <i>Shigella</i> ....), <i>Ps. aeruginosa</i>	Gélose Campysel Gélose Palcam

**Famille des quinolones**

Acide nalidixique	Entérobactéries : <i>E. coli</i> , <i>Proteus</i> , <i>Salmonella</i> ... (sauf <i>Providencia</i> , <i>Serratia</i> )....	Api Campy Bouillon Fraser Gélose CN MUD/SF Gélose Ottaviani
Ac. nalidixique et colimycine (= colistine)	Germes à Gram- et <i>Bacillus</i>	Gélose Columbia au sang + ANC bioMérieux

**Famille des glycopeptides**

Vancomycine	<i>Staphylococcus</i> , <i>Enterococcus</i> , <i>Listeria</i>	<i>Campylobacter</i> selon Karmali Legionella GVPC Schaedler Néo. Vanco. de bioMérieux
-------------	--	--

**Antibiotique isolé**

Novobiocine	Cocci à Gram+ ( <i>Staphylococcus</i> ) et bacilles à Gram +...	ID 32 Staph bioMérieux Bouillon MKTTn Gélose <i>Yersinia</i> CIN
-------------	---	--

**Antibiotiques antifongiques et antiseptiques**

<b>Antibiotiques antifongiques</b>	<b>Quelques microorganismes sensibles</b>	<b>Milieux de culture</b>
Amphotéricine (famille des polyènes)	Levures, moisissures....	Gélose Campyloset
Cycloheximide (ou actidione)	Champignons	<i>Campylobacter</i> selon Karmali Legionella GVPC Gélose Ottaviani Gélose Palcam Gélose Sabouraud chloramphénicol actidione Bouillon et gélose de Preston
<b>Antiseptique</b>	<b>Inhibiteurs de....</b>	<b>Milieux de culture</b>
Cétrimide ou bromure de cétyle-triméthylammonium)	Bactéries surtout à Gram+ et à Gram- sauf <i>Pseudomonas</i>	Gélose cétrimide

## Galeries API bioMérieux® SA. et bactéries identifiables

Galeries API	Nombre de tests biochimiques	Temps d'incubation en heures	Bactéries identifiées
api 20 A	20	24	Bactéries anaérobies : <i>Clostridium</i>
Rapid ID 32A	29	4	//
api 20 NE	20	24	Bacilles à Gram- Non Entérobactéries et non fastidieux
api 50 CH	50 cupules 49 sucres	24 à 48	<i>Bacillus</i> et apparentés
api 20 E	21	18 à 24	Enterobacteriaceae et autres bacilles à Gram- non fastidieux
ID 32 E	32	24	//
Rapid ID 32 E	32	4	Enterobacteriaceae
api Campy	20	24	<i>Campylobacter...</i>
api <i>Candida</i>	12	18 à 24	<i>Candida</i> (levures)
api <i>Listeria</i>	10	18 à 24	<i>Listeria</i>
api Staph	20	24	Staphylocoques, microcoques et germes apparentés
api 20 Strep	20	4 puis 24	Streptococcaceae et germes apparentés