



République Algérienne Démocratique Populaire
Ministère de l'enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ahmed DRAIA -Adrar-
Faculté des Sciences de la Nature & de la Vie
Département des Sciences Biologiques



Attestation de production pédagogique

Nous, Présidente du Comité Scientifique du Département des Sciences Biologiques,
attestons que l'enseignante :

Dr. HADEF Khawla Zahra
Grade : Maître de Conférences Classe A

A élaboré un polycopié pédagogique intitulé « *Techniques de Contrôle Microbiologique Alimentaire* ». Destiné aux étudiants du niveau : 1^{ère} année Master Microbiologie Appliquée du département des Sciences Biologiques.

Le présent document a été soumis à une expertise sous l'égide du CSD du département, lequel a émis un avis favorable à son édition et à sa diffusion.

Fait à Adrar le 28/04/2026

La Présidente du CSD



En foi de quoi, la présente attestation est délivrée pour servir et valoir ce que de droit

Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche Scientifique
Université Ahmed DRAIA, Adrar
Faculté des Sciences de la Nature et de la Vie
Département des Sciences Biologiques



Polycopié pédagogique

Titre

**Polycopié pédagogique de Techniques de
contrôle microbiologiques alimentaire**

Préparé par : *Dr. HADEF KH. Z.*

Cours destiné aux étudiants de

Licence (spécialité et niveau) : 1^{ère} année Master Microbiologie Appliquée

Année Universitaire : 2025/2026

AVANT-PROPOS

Le présent polycopié pédagogique intitulé « Techniques de contrôle microbiologique des aliments » a été élaboré dans le cadre de l'enseignement visant à former les étudiants aux méthodes de contrôle de la qualité microbiologique des aliments et des surfaces.

L'évolution constante des exigences en matière de sécurité alimentaire et la diversité des matrices alimentaires nécessitent une maîtrise précise des méthodes microbiologiques, tant pour la protection du consommateur que pour le respect des normes en vigueur.

Ce polycopié a pour objectif de fournir aux étudiants les connaissances théoriques et pratiques indispensables à l'évaluation de la qualité microbiologique des aliments, ainsi que la mise en œuvre correcte des protocoles normalisés.

Les prérequis recommandés pour une bonne compréhension de cette matière incluent des notions de biochimie générale et structurale, permettant de mieux appréhender les mécanismes biologiques des micro-organismes et leur interaction avec l'environnement alimentaire.

Le contenu de ce polycopié couvre l'ensemble des techniques de contrôle microbiologique, allant de l'évaluation des surfaces et contacts alimentaires à l'identification et au dénombrement des principales familles de micro-organismes présentes dans les aliments, conformément aux normes françaises et internationales (NF ISO, NF V, EN ISO, BKR). Parmi les sujets abordés, on retrouve :

- Le contrôle microbiologique des surfaces par boîte contact et écouvillons.
- Le dénombrement des microorganismes aérobies, de la flore lactique, des levures et moisissures, des coliformes, d'*Escherichia coli*, des Entérobactéries et des staphylocoques coagulase positive.
- La recherche et l'identification de Salmonelles selon les méthodes classiques et rapides.
- Le dénombrement de micro-organismes spécifiques tels que *Clostridium perfringens*, *Bacillus cereus* et les anaérobies sulfito-réducteurs.

Ce polycopié se veut un outil pédagogique pratique et synthétique, permettant aux étudiants de développer une compréhension complète et appliquée des techniques de contrôle microbiologique, tout en facilitant l'acquisition de compétences professionnelles dans le domaine de la sécurité alimentaire.

Liste de figures

Figure 1. Présentation officielle de la norme ISO 18593:2018 (ISO 18593, 2018)	6
Figure 2. Présentation schématique de l'ISO 18593, 2018 (Photo originale)	10
Figure 3. Présentation officielle de la norme ISO 4833:2013 partie 1 et 2 (ISO 4833, 2013a ; 2013b)	12
Figure 4. Dénombrement des bactéries après dilutions et culture (Photo originale)	14
Figure 5. Comptage des colonies par ensemencement en surface en profondeur (ISO4833, 2013a ; 2013b)	15
Figure 6. Schéma qui résume la méthode de Dénombrement des microorganismes aérobies 30°C (ISO4833, 2013a ; 2013b)	16
Figure 7. Présentation officielle de la norme ISO 18593:1998 (ISO 18593,1998)	17
Figure 8. Schéma qui résume la méthode de dénombrement de la flore lactique (ISO 15214, 2019).	19
Figure 9. Colonies issues du dénombrement sur échantillon de fromage (Photo originale)	20
Figure 10. Présentation officielle de la norme NF V08-059 et la norme de référence NF ISO 7954, 1988 (NF ISO 7954, 1988).	22
Figure 11. Dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059 ; 2014)	23
Figure 12. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059, 2014).	25
Figure 13. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des coliformes 30°C (NF V 08-050, 2015).	28
Figure 14. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060, 2009).	31
Figure 15. Exemple de dénombrement des coliformes thermotolérants selon la norme (NF V 08-060, 2009).	33
Figure 16. Schéma qui résume la méthode NF ISO 16649-2 pour le dénombrement <i>d'Escherichia coli</i> β -glucuronidase positive (NF ISO 16649-2, 2001).	36

Figure 17. Schéma qui résume le dénombrement des Entérobactéries (NF ISO 21528-2, 2017).	38
Figure 18. Schéma qui résume la méthode de recherche de Salmonelles (ISO 6579-1, 2017)	40
Figure 19. Schéma qui résume la méthode de recherche de Salmonelles méthode rapide (BKR 23/04-12/06)	42
Figure 20. Schéma récapitulatif de dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (NF V 08-061, 2009).	44
Figure 21. Schéma récapitulatif de <i>Clostridium perfringens</i> (ISO 7937, 2004).	46
Figure 22. Schéma qui résume la méthode de recherche et de dénombrement des <i>Bacillus cereus</i> (NF EN ISO 7932, 2000).	48
Figure 23. Schéma qui résume le dénombrement des staphylocoques coagulasse positive (NF EN ISO 6888-1, 2000).	50

Liste de tableau

Tableau 1. Facteurs de contrôle pour la prolifération des microorganismes	3
Tableau 2. Comparaison des Méthodes de Dénombrement Microbiologique selon les Normes NF EN ISO 4833-1 et 4833-2 (ISO4833, 2013a ; 2013b)	13
Tableau 3. Synthèse des principales différences entre NF V04-503 et NF ISO 15214 (NF V04-503, 2026 ; ISO 15214, 2019)	21
Tableau 4. Récapitulatif de Synthèse des cours de Contrôle Microbiologique des Aliments	51
Tableau 5. Synthèse des Travaux Pratiques en Contrôle Microbiologique des Aliments	65

Liste des abréviations

Abréviation	Signification
CFU	Colony Forming Unit (Unité Formant Colonie)
PCA	Plate Count Agar (Milieu pour le dénombrement total des bactéries aérobies)
VRBA	Violet Red Bile Agar (Milieu sélectif pour coliformes)
Sab. Agar	Sabouraud Agar (Milieu pour levures et moisissures)
MRS	De Man, Rogosa & Sharpe Agar (Milieu pour bactéries lactiques)
TSC	Tryptose Sulfite Cycloserine Agar (Milieu pour <i>Clostridium perfringens</i>)
MYP	Mannitol Egg Yolk Polymyxin Agar (Milieu pour <i>Bacillus cereus</i>)
XLD	Xylose Lysine Deoxycholate Agar (Milieu sélectif pour Salmonelles)
RVS	Rappaport Vassiliadis Soya Broth (Bouillon d'enrichissement pour Salmonelles)
NF	Norme Française
ISO	International Organization for Standardization
BKR	Méthode rapide Salmonelles (BKR 23/04-12/06)
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>

<i>Cl. perfringens</i>	<i>Clostridium perfringens</i>
<i>B. cereus</i>	<i>Bacillus cereus</i>
Coliformes	Bactéries indicatrices d'hygiène (Gram négatif)
Coliformes thermotolérants	Coliformes résistants à la chaleur, souvent d'origine fécale
Entérobactéries	Famille de bactéries Gram négatif indicatrices d'hygiène
Flore lactique	Bactéries lactiques présentes dans les produits fermentés
Flore totale	Ensemble des micro-organismes cultivables d'un échantillon
Boîte contact	Méthode de prélèvement des surfaces pour contrôle microbien
Écouvillon	Méthode de prélèvement des surfaces par frottis stérile

Sommaire

AVANT-PROPOS	I
Liste des figures	III
Liste des tableaux	V
Liste des abréviations	VI
Sommaire	VII
Introduction général	1
I. Généralités sur contrôle microbiologique des aliments	2
I.1. Introduction	2
I. 2. Paramètres à contrôler	3
I. 3. Facteurs de contrôles des micro-organismes	3
I. 4. Principaux groupe microbiens d'altération alimentaire	4
II. Dénombrement de la flore totale (ISO 18593:2018)	5
II.1. Principe général	5
II.1.1. Choix des surfaces	6
II.1.2. Matériels et dispositifs de prélèvement	7
II.2. Contrôle microbiologique des surfaces sur boîte contact (flore totale)	7

II.2.1. Procédure de prélèvement sur surface	7
II.2.2. Stockage, transport et analyse	7
II.2.3. Utilisation typique en pratique	8
II.3. Contrôles microbiologiques des surfaces par écouvillons (flore totale)	8
II.3. 1. Procédure de prélèvement sur surface	8
II.3.2. Stockage, transport et analyse	8
II.3.3. Utilisation typique en pratique	9
III. Dénombrement des microorganismes aérobies 30°C (NF EN ISO 4833)	12
III.1. Préparation des échantillons	14
III.2. Ensemencement	14
IV. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214) et NF VO4-503	17
IV. 1. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214)	17
IV.1.2. Préparation de l'échantillon	17
IV.1.3. Ensemencement	18
IV.2. Norme NF VO4-503: Norme spécifique en microbiologie alimentaire	20
V. Dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059)	22
V.1. Préparation de l'échantillon	22
V.2. Ensemencement et incubation	23
V.3. Lecture et interprétation	23
VI. Dénombrement des coliformes 30°C (NF V 08-050)	26

VI.1. Préparation de l'échantillon	26
VI.2. Ensemencement et incubation	26
VI.3. Lecture et interprétation	27
VII. Dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060)	29
VII.1. Préparation de l'échantillon	29
VII.2. Ensemencement et incubation	29
VII.3. Lecture et interprétation	29
VII.3. Exemple de dénombrement des coliformes thermotolérants	31
VIII. Dénombrement de <i>l'Escherichia coli</i> beta glucuronidase positive (NF ISO 16649-2)	34
VIII.1. Préparation de l'échantillon	34
VIII.2. Ensemencement et incubation	34
VIII.3. Lecture et interprétation	35
IX. Dénombrement des Entérobactéries (NF ISO 21528-2)	37
IX.1. Préparation de l'échantillon	37
IX.2. Ensemencement et incubation	37
IX.3. Lecture et interprétation	37
X. Recherche de Salmonelles (NF EN ISO 6579)	39
X.1. Préparation de l'échantillon	39
X.2. Ensemencement et incubation	39
X.3. Lecture et interprétation	39

XI. Recherche de Salmonelles méthode rapide (BKR 23/04-12/06)	40
XI.1. Préparation de l'échantillon	41
XI.2. Ensemencement et incubation	41
XI.3. Lecture et interprétation	41
XII. Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (NF V 08-061)	43
XII.1. Préparation de l'échantillon	43
XII.2. Ensemencement et incubation	43
XII.3. Lecture et interprétation	43
XIII. Dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i> (NF EN ISO 7937)	45
XIII.1. Préparation de l'échantillon	45
XIII.2. Ensemencement et incubation	45
XIII.3. Lecture et interprétation	45
XIV. Dénombrement des <i>Bacillus cereus</i> (NF EN ISO 7932)	47
XIV.1. Préparation de l'échantillon	47
XIV.2. Ensemencement et incubation	47
XIV.3. Lecture et interprétation	47
XV. Dénombrement des staphylocoques coagulasse positive	49
XV.1. Préparation de l'échantillon	49
XV.2. Ensemencement et incubation	49
XV.3. Lecture et interprétation	49
XVI. Conclusion	53

Travaux pratique	54
Fiche TP 1. Contrôle microbiologique des surfaces par boîte contact(flore totale)	55
Fiche TP 2. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30°C (NF EN ISO 4833)	56
Fiche TP 3. Dénombrement des coliformes à 30°C (NF V 08-050)	57
Fiche TP 4. Dénombrement des levures et moisissures (NF V08-059)	58
Fiche TP 5. Recherche rapide de Salmonelles (BKR 23/04-12/06)	59
Fiche TP 6. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214)	60
Fiche TP 7. Dénombrement des Entérobactéries (NF ISO 21528-2)	61
Fiche TP 8. Dénombrement des staphylocoques (coagulase positive)	62
Fiche TP 9. Dénombrement de Clostridium perfringens (NF EN ISO 7937)	63
Fiche TP 10. Dénombrement de <i>Bacillus cereus</i> (NF EN ISO 7932)	64
Références	66

Introduction général

La qualité microbiologique des aliments est un enjeu majeur pour la sécurité sanitaire, la santé publique et la confiance des consommateurs. Les aliments peuvent être contaminés par une grande diversité de micro-organismes, certains inoffensifs, d'autres pathogènes, pouvant provoquer intoxications ou maladies d'origine alimentaire (**ICMSF, 2020; Jay, Loessner & Golden, 2005**).

Le contrôle microbiologique des aliments permet d'évaluer leur sécurité et leur qualité, de détecter la présence de micro-organismes indésirables, et de prévenir les risques sanitaires. Il constitue également un outil essentiel pour l'industrie alimentaire afin d'assurer la conformité aux normes nationales et internationales et d'optimiser les procédés de production et de conservation (**FDA, 2021; ISO 4833-1, 2017**).

Ce cours a pour objectif de présenter aux étudiants les principes et méthodes de contrôle microbiologique appliqués aux aliments et aux surfaces en contact avec ceux-ci. Il couvre à la fois les méthodes de dénombrement des micro-organismes, la recherche de bactéries pathogènes comme Salmonelles, et le suivi de micro-organismes indicateurs tels que les coliformes ou la flore lactique. Les techniques abordées reposent sur les normes reconnues (NF, ISO, BKR) et combinent rigueur scientifique et application pratique (**NF V08-059,2010 ; NF ISO 4833, 2013 ; BKR 23/04-12/06, 2006**).

À l'issue de ce cours, l'étudiant sera capable de mettre en œuvre des analyses microbiologiques fiables, d'interpréter les résultats et de contribuer au maintien de la sécurité et de la qualité des aliments, en respectant les bonnes pratiques de laboratoire et les réglementations en vigueur (**Jay et al., 2005; ICMSF, 2020**).

I. Généralités sur contrôle microbiologique des aliments

I.1. Introduction

Le contrôle de la qualité des aliments est un fondement de la sûreté sanitaire et de nutrition. Il fait référence à toutes les méthodes, normes et procédures utilisées pour évaluer si un aliment répond à des normes d'hygiène, de composition et de conservation acceptables ou non. Ceci est non seulement utilisé pour protéger les consommateurs des risques biologiques, chimiques et physiques, mais également pour régler la fréquence et la quantité de production et de compétitivité sur le marché en tant qu'aliment, en raison du risque que certains contaminants puissent attaquer la sécurité et la qualité de ses produits.

L'objectif du contrôle microbiologique des aliments est de déterminer l'absence de toute toxicité, de tout micro-organisme pouvant entraîner la pathologie, de tout micro-organisme de l'altération dans un produit alimentaire. Il est réalisé à la demande des autorités, du législateur, des industriels ou de la restauration collective. Il Consiste à mesurer la charge microbienne en unité formant colonie UFC d'un produit et de comparer les résultats aux seuils réglementaires en vigueur.

- **Qualité:** ensemble des caractéristiques d'un produit ou service qui va déterminer leur aptitude à satisfaire des besoins explicites ou implicites (**ISO9000, 2015a**).
- **AFNOR :** (Association Française de Normalisation) organisme officiel français en charge de l'élaboration, homologation et diffusion des normes nationales et internationales (**AFNOR, 2020**).
- **Sécurité:** état dans lequel les risques physiques, chimiques et biologiques sont bien maîtrisés permettant la protection. Dans le domaine alimentaire, il s'agit de la qualité hygiénique, qui assure l'absence du produit fini de microorganismes pathogènes ou de leurs toxines (**Codex 2020 ; ISO22000, 2018 ; WHO, 2022**)
- **Santé:** selon l'OMS, la santé est un état de complet bien-être physique, mental et social. Sur le plan nutritionnel, l'aliment fournisse les nutriments essentiels (lipides, glucides, protides), les micronutriments (vitamines, minéraux, fibres, polyphénols, oligo-éléments) ainsi que, le cas échéant, des composants bénéfiques tels que les probiotiques ou les aliments fonctionnels (**WHO, 2022**)

- Saveur: ensemble des sensations gustatives perçues lors de l'ingestion d'un aliment. C'est une qualité organoleptique goût, odeur, couleur etc., qui est mesurée par un panel d'appareils récepteurs (Kilcast, 2013; Lawless & Heymann, 2010).
- Qualité d'usage: dimension pratique du produit qui se rapporte à sa disponibilité, commodité de préparation, capacité de stockage et accessibilité économique. Un aliment peut être très sain et nutritif, mais sa qualité d'usage est limitée si, pour prendre lui-même ou s'il coûte inappropriées (AFNOR, 2004 ; ISO9001, 2015b).
- Normes ISO: normes internationales élaborées par l'Organisation internationale d'analyse, normalisation, et élaboration de normes (ISO, 2022).

I. 2. Paramètres à contrôler

Le contrôle microbiologique en industrie agroalimentaire est effectué au niveau de:

- La matière première: elle doit être analysée avant son admission dans l'usine;
- L'eau utilisée pour le lavage et la transformation des produits: elle doit être potable même pour le nettoyage des locaux, des ustensiles et de l'usine de fabrication;
- Les surfaces des locaux d'ustensiles engagées dans le processus de stockage, découpe ou tout autre processus de transformation;
- L'air ambiant des ateliers de transformation, des zones de traitement, et des hangars de stockages (environnement, personnel, surface, matériels);
- Le personnel de l'unité: depuis la réception des matières premières jusqu'au stockage du produit fini;
- Le matériel de conditionnement et d'emballage pour le transport et la commercialisation (Codex, 2020).

I. 3. Facteurs de contrôles des micro-organismes

Les facteurs qui contrôlent généralement la prolifération des microorganismes et doivent être contrôlés sont résumés dans le tableau suivants (Jay *et al.*, 2005) :

Tableau 1. Facteurs de contrôle pour la prolifération des microorganismes

Facteurs intrinsèques	
pH	Ph faible favorise le développement des levures et de moisissures

	pH neutre favorisé les bactéries pH alcalin favorisé les bactéries
AW	Facteurs très important, favorise la prolifération des microorganismes
Potentiel d'oxydoréduction	Aérobie strictes : se développe en présence d'O ₂ Aérobie facultative : peuvent se développer en présence et en absence d'O ₂ Anaérobie strictes : se développe en absence d'O ₂
Structure physique de l'aliment	Certaines pelures des aliments agissent comme des barrières Broyage et hachage des aliments augmentent le risque des microorganismes
Présence de substance inhibitrice	Inhibe la croissance des microorganismes, ex : l'allicine dans l'ail qui possède des propriétés antimicrobiennes
Facteurs extrinsèques	
Humidité	Favorise la croissance et la multiplication des
Température	Psychotrope et psychrophile (0°C à 20°C) Mésophile (20°C à 45°C) Thermophile (45°C à 65°C)
Présence de gaz	Présence en accès de CO ₂ abaisse le pH ce qui réduit la libération des agents antimicrobiens

I. 4. Principaux groupe microbiens d'altération alimentaire

- **Microorganismes utiles** : sont bénéfiques et utilisés dans la fabrication de l'alimentation (pain, yaourt) pour des propriétés organoleptique (ex : levures, bactéries lactiques).
- **Microorganismes d'altération** : modifient l'aspect, l'odeur et le goût des aliments, les rendant impropres à la consommation (ex: Pseudomonas, moisissures).
- **Microorganismes indicateurs d'hygiène** : signalent une mauvaise hygiène ainsi que le degré de contamination de l'aliment (ex: coliformes, entérobactéries).
- **Microorganismes pathogènes** : sont nocifs, provoquant des maladies chez l'homme, les animaux ou les plantes (ex: Salmonella, virus) (**Doyle et al., 1013**).

Les aliments altérés vont subir des transformations qui se traduisent par :

- Modification des **qualités organoleptiques** (goût, odeur, aspect)
- Perte des **qualités nutritionnelles** (aliments moins digestes, moins riches en vitamines et minéraux)
- Perte des **qualités sanitaires**, avec un aliment présentant des risques pour la santé (**Jay et al., 2005**)

II. Dénombrement de la flore totale (ISO 18593:2018)

Le contrôle microbiologique des surfaces en contact avec les aliments vise à garantir à la fois la qualité hygiénique et la qualité technologique des produits. Tout d'abord, la qualité hygiénique signifie l'absence de micro-organismes pathogènes qui peuvent être dangereux pour les consommateurs. En outre, la qualité technologique est l'absence de microflore altérée responsables de modifications organoleptiques ou de la dégradation des aliments et permet de garantir la marchandise en bon état (**Doyle et al., 1013**).

La norme ISO 18593 décrit des méthodes horizontales de prélèvement sur surfaces (boîtes de contact, écouvillons, éponges, lingettes) dans l'environnement de la chaîne alimentaire pour détecter et/ou dénombrer des microorganismes cultivables (bactéries, levures, moisissures). Elle précise notamment: les principes, le choix des points/aire et moment de prélèvement, matériel requis, procédures de prélèvement, transport des échantillons, analyses microbiologiques et expression des résultats (**ISO 18593, 2018**).

NORME
INTERNATIONALE

ISO
18593

Deuxième édition
2018-06

**Microbiologie de la chaîne
alimentaire — Méthodes horizontales
pour les prélèvements de surface**

*Microbiology of the food chain — Horizontal methods for surface
sampling*

iTeh STANDARD PREVIEW
(standards.iteh.ai)

ISO 18593:2018
<https://standards.iteh.ai/catalog/standards/sist/9761e123-92e6-4707-bba3-9d7a08bc53a/iso-18593-2018>

Figure 1. Présentation officielle de la norme ISO 18593:2018 (ISO 18593, 2018)

II.1. Principe général

Elle permet d'évaluer la contamination microbiologique des surfaces à contact direct ou indirect des aliments équipements, plans de travail, convoyeurs, gants,..Etc.

L'objectif : dispose de prélèvements comparables dans le temps, à des fins de surveillance hygiénique, vérification du nettoyage-désinfection ou suivi de microorganismes pathogènes ou indicateurs bactéries, levures, moisissures.

II.1.1. Choix des surfaces

La norme recommande une approche basée sur le risque. Cela consiste à choisir les points à échantillonner en ciblant notamment les zones humides, difficiles à nettoyer, recoins ou surfaces où des débris alimentaires peuvent s'accumuler. Les surfaces cibles peuvent être soit visuellement propres ou sales. La présence de zones difficiles d'accès rouleaux creux, joints, cavités est également un point caractéristique de préférence d'échantillonnage. Le moment du prélèvement avant production, en cours de production, après nettoyage-désinfection et la fréquence sont définis en fonction de l'objectif validation, routine, investigation d'un problème.

II.1.2. Matériels et dispositifs de prélèvement

ISO 18593:2018 couvre quatre grandes familles d'outils:

- Boîtes de contact (contact plates) pour des surfaces planes, généralement sur une zone standardisée (environ 25 cm²), avec un milieu gélosé convexe.
- Écouvillons sur support rigide (stick swabs) pour des petites zones ou des zones difficiles d'accès, utilisés secs ou humidifiés selon que la surface est humide ou sèche.
- Éponges et lingettes/cloths pour de grandes surfaces, souvent pré-humidifiées dans un diluant approprié (ex.: eau peptonée tamponnée), parfois avec neutralisants de désinfectants (**ISO18593, 2018**).

La norme précise le recours à des diluants conformes à ISO 7218 et ISO 11133, ainsi que l'usage éventuel de neutralisants listés en annexe pour inactiver les résidus de désinfectants lors du prélèvement.

II.2. Contrôle microbiologique des surfaces sur boîte contact (flore totale)

Est une méthode utilisée pour le contrôle microbiologique des surfaces est l'utilisation de boîtes contact. Il s'agit d'une manière simple d'évaluer la charge microbienne totale des plans de travail, du matériel ou de l'équipement de production. Cette méthode est couramment invoquée dans les industries agroalimentaires, pharmaceutiques et hospitalières. Il sert à confirmer que le nettoyage et la désinfection sont efficaces (**ISO18593, 2018 ; Jay et al., 2005**).

II.2.1. Procédure de prélèvement sur surface

Pour les boîtes de contact, la surface de gélose est appliquée sur la surface à analyser avec une pression contrôlée, maintenue quelques secondes, puis la boîte est refermée et incubée ultérieurement.

II.2.2. Stockage, transport et analyse

Une fois prélevés, les échantillons doivent être conservés au froid et acheminés rapidement au laboratoire pour prévenir la prolifération ou la mort des microorganismes d'ici à l'analyse.

Les boîtes de contact sont incubées directement dans le laboratoire, pour ensuite être analysés en fonction des normes de qualité sanitaires fixées à l'encontre de la *Listeria*, *Salmonella*,

flores totales, etc. Les résultats peuvent alors être exprimés en UFC par unité de surface (par exemple UFC/cm²) ou rapportés à la zone prélevée, selon la technique utilisée (**ISO18593, 2018**).

II.2.3. Utilisation typique en pratique

En pratique, pour un plan de surveillance environnementale d'atelier, on définit une liste de surfaces à haut risque, le type d'outil boîte de contact pour chaque surface, la taille de la zone à prélever et la fréquence (jour, semaine, mois), en se basant sur ISO 18593:2018. Les résultats servent à:

- Vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage/désinfection.
- Détecter des niches de contamination ou la présence persistante de pathogènes (**ISO18593, 2018**).

II.3. Contrôles microbiologiques des surfaces par écouvillons (flore totale)

Une autre méthode utilisée pour le contrôle microbiologique des surfaces est l'utilisation d'écouvillons.

II.3.1. Procédure de prélèvement sur surface

En général, il faut connaître la surface exacte, et il faut frottée de manière systématique pour couvrir toute la zone. Cette norme implique également de standardiser le mouvement aller-retour et perpendiculaire et la pression pour optimiser la récupération, en changeant de face d'éponge ou en tournant l'écouvillon.

II.3.2. Stockage, transport et analyse

Une fois prélevés, les échantillons doivent être conservés au froid et acheminés rapidement au laboratoire pour prévenir la prolifération ou la mort des microorganismes d'ici à l'analyse.

Les écouvillons sont homogénéisés dans un volume déterminé de diluant, pour ensuite être analysés en fonction des normes de qualité sanitaires fixées à l'encontre de la *Listeria*, *Salmonella*, flores totales, etc. Les résultats peuvent alors être exprimés en UFC par unité de surface (par exemple UFC/cm²) ou rapportés à la zone prélevée, selon la technique utilisée.

II.3.3. Utilisation typique en pratique

En pratique, pour un plan de surveillance environnementale d'atelier, on définit une liste de surfaces à haut risque, le type d'outil écouvillon pour chaque surface, la taille de la zone à prélever et la fréquence (jour, semaine, mois), en se basant sur ISO 18593:2018. Les résultats servent à:

- Vérifier l'efficacité des procédures de nettoyage/désinfection.
- Détecter des niches de contamination ou la présence persistante de pathogènes **(ISO18593, 2018)**.

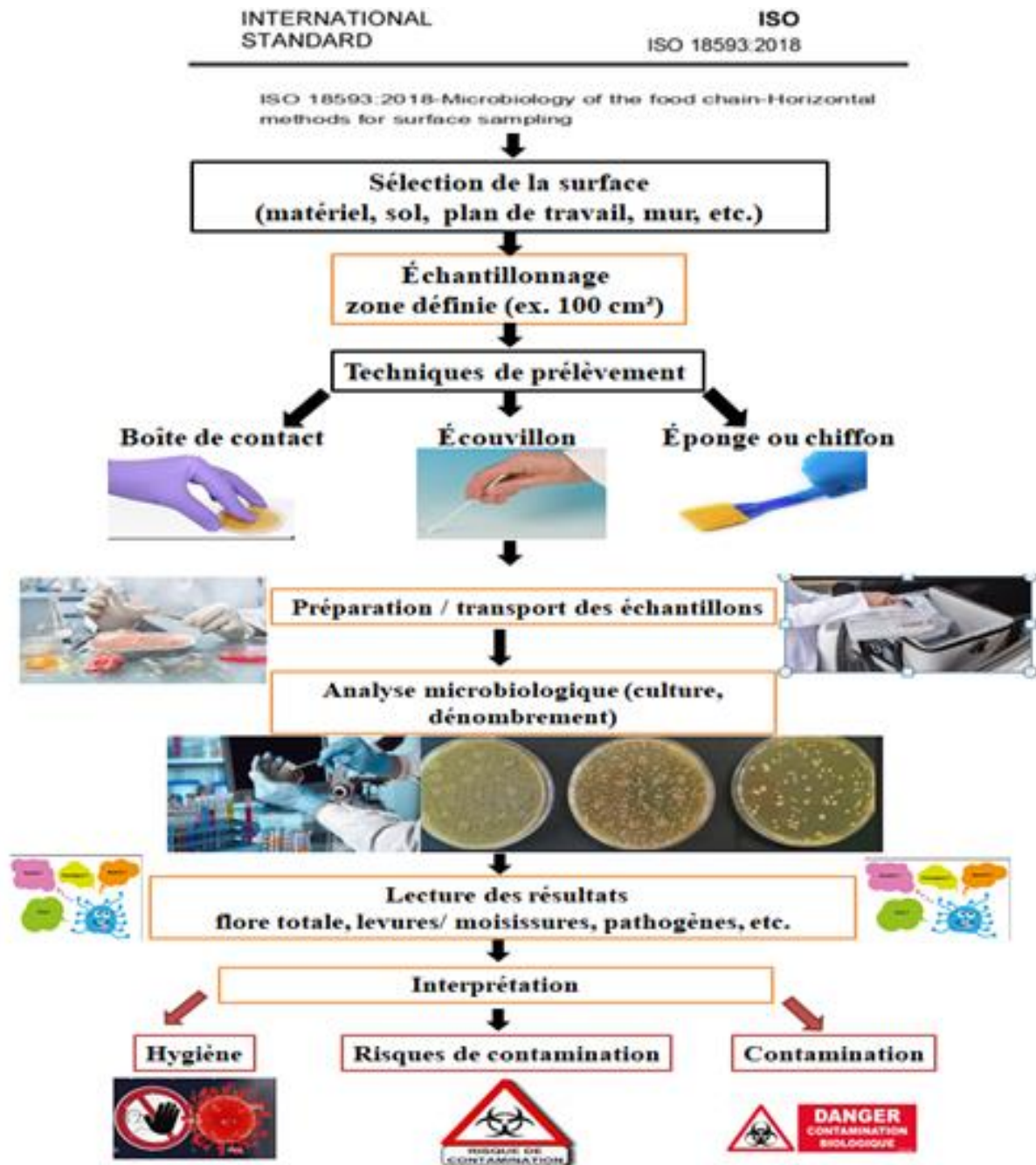


Figure 2. Présentation schématique de l'ISO 18593, 2018 (Photo originale)

Pour conclure le contrôle microbiologique des surfaces consiste à détecter, isoler et quantifier les micro-organismes viables présents. Comme déjà dit précédemment deux grands types de germes sont recherché dans les aliments : les germes indicateurs de contamination et les germes pathogènes. Donc 'objectif principal est de :

- Vérifier l'hygiène et la salubrité des environnements de travail (agroalimentaire, médical, pharmaceutique).



- Évaluer la flore totale aérobie cultivable (micro-organismes viables et détachables).
- Contribuer à une démarche qualité et à la maîtrise des risques microbiologiques.

III. Dénombrement des microorganismes aérobies 30°C (NF EN ISO 4833)

C'est une méthode normalisée de dénombrement des microorganismes aérobies revivifiables à 30°C qui permet d'estimer la charge microbienne totale d'un aliment ou d'un échantillon environnemental. Cette technique repose sur l'ensemencement en profondeur sur un milieu gélosé approprié, suivi d'une incubation à 30°C sur milieu PCA pendant 72 heures. Elle est utilisée comme indicateur global de l'hygiène, de la qualité microbiologique et de l'efficacité des procédures de nettoyage dans les industries agroalimentaires (**ISO4833, 2013a ; 2013b**). Cette première édition, conjointement avec l'ISO 4833-2 (2013), annule et remplace l'ISO 4833:2003.

L'ISO 4833 comprennent les parties suivantes, présentées sous le titre général Microbiologie de la chaîne alimentaire, Méthode horizontale pour le dénombrement des micro-organismes:

- Partie 1: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur
- Partie 2: Comptage des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en surface (tableau 2).



Figure 3. Présentation officielle de la norme ISO 4833:2013 partie 1 et 2 (**ISO 4833, 2013a ; 2013b**)

Tableau 2. Comparaison des Méthodes de Dénombrement Microbiologique selon les Normes NF EN ISO 4833-1 et 4833-2 (**ISO4833, 2013a ; 2013b**)

Normes	NF EN ISO 4833-1:2013-Méthode d'ensemencement en profondeur (30 °C)	NF EN ISO 4833-2:2013-Méthode d'ensemencement en surface
Définition	Cette méthode décrit le dénombrement des microorganismes aérobies mésophiles à 30 °C en utilisant la technique d'ensemencement en profondeur (Plate Count Agar – PCA).	Cette méthode est une alternative plus rapide et plus fiable pour certains produits, basée sur un ensemencement en surface.
Principes	<ul style="list-style-type: none"> -Un volume mesuré (1 mL) de l'échantillon ou d'une de ses dilutions est déposé au fond d'une boîte de Pétri. -Du milieu PCA fondu et refroidi à environ 45 °C est versé avant de mélanger. -Les colonies se développent dans toute l'épaisseur du milieu (surface + profondeur). -Incubation à 30 °C pendant 72 h. -Les colonies sont comptées et exprimées en UFC/g ou UFC/mL. 	<ul style="list-style-type: none"> -Un volume mesuré (0,1 mL) de l'échantillon ou d'une dilution est déposé sur la surface d'un milieu PCA solidifié. -L'échantillon est étalé à l'aide d'un étaleur stérile pour assurer une bonne répartition. -Incubation à 30 °C pendant 72 h. -Les colonies apparaissent uniquement en surface, facilitant le comptage.
Avantages	<ul style="list-style-type: none"> -Adaptée aux produits contenant de nombreux microorganismes. -Colonie bien séparées dans l'agar. 	<ul style="list-style-type: none"> -Moins agressive pour les microorganismes sensibles. -Colonies plus faciles à compter. -Recommandée lorsque la méthode en profondeur donne des résultats trop élevés ou difficiles à lire.
Limites	<ul style="list-style-type: none"> -Stress thermique possible lors du mélange (45 °C). -Plus long et moins adapté aux microorganismes thermosensibles. 	<ul style="list-style-type: none"> -Volume ensemencé plus faible (0,1 mL), donc sensibilité plus faible pour les échantillons peu contaminés.

III.1. Préparation des échantillons

Pour un échantillonnage solide il faut Peser 10 g d'échantillon et ajouter à 90 mL de diluant (peptone saline ou eau peptonée). Bien homogénéiser et passé par des série de dilution.

Pour un Échantillons liquides, on homogénéiser directement le prélèvement déjà trouvé dans un liquide et on l'utilise tel quel comme dilution 10^0 , puis réaliser les dilutions décimales. Préparer une série de tubes contenant chacun 9 mL de diluant stérile. Prélever 1 mL de la dilution précédente → dilution 10^{-2} , 10^{-3} , etc (figure 2) (ISO4833, 2013a ; 2013b).

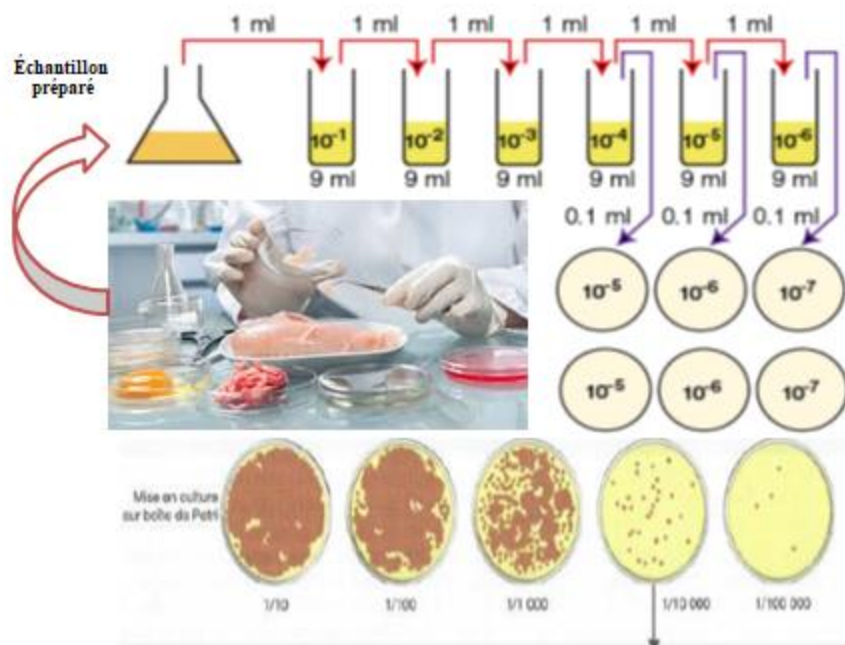


Figure 4. Dénombrement des bactéries après dilutions et culture (Photo originale)

III.2. Ensemencement

Le comptage des colonies bactériennes peut se faire selon deux techniques principales : l'ensemencement en surface **et** l'ensemencement en profondeur. Ces méthodes sont utilisées pour déterminer la charge microbienne d'un échantillon alimentaire selon les normes ISO, notamment l'ISO 4833 (figure 3).

Pour chaque dilution on dépose 1 mL de l'échantillon ou de la dilution choisie au centre d'une boîte de Pétri vide. On ajoute 15-20 mL de PCA fondu (à 45 °C). On mélange délicatement

en effectuant des mouvements circulaires et on laisse solidifier. On peut appliquer éventuellement une couche de recouvrement (overlay) avec 3-4 mL de PCA pour éviter le dessèchement. Et on incube les boîtes à l'envers à une température de 30 ± 1 °C pendant 72 ± 3 heures. La lecture se fait par comptage de colonies entre 15 à 300 colonies de deux boîtes d'une même dilution puis on calcule la moyenne (ISO4833, 2013a ; 2013b).

La formule utilisé pour calculer les résultats est UFC/g ou $mL=N/V \times d$ Avec :

- **N** = nombre moyen de colonies
- **V** = volumeensemencé (1 mL)
- **d** = facteur de dilution

Le résultat est exprimé en UFC/g (solides) ou UFC/mL (liquides).

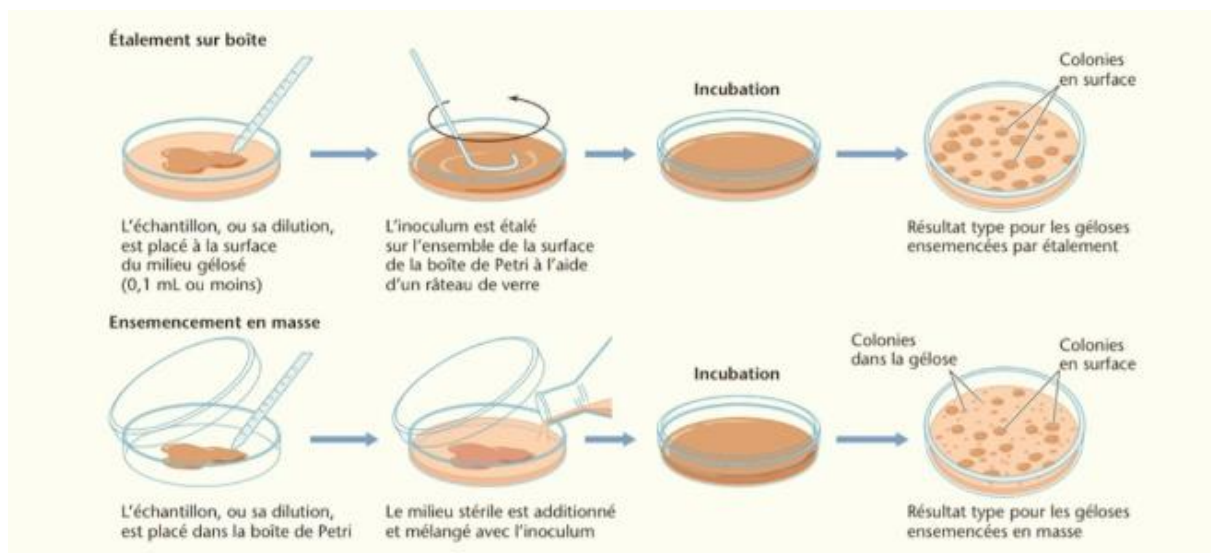


Figure 5. Comptage des colonies par ensemencement en surface en profondeur (ISO4833, 2013a ; 2013b)

En réalité, le choix entre les deux méthodes dépend de la nature de l'échantillon et de l'objectif du dénombrement. L'ensemencement en surface est privilégié lorsqu'un comptage précis des colonies visibles est recherché, notamment pour les microorganismes sensibles à la chaleur, car la technique ne nécessite aucune exposition thermique. À l'inverse, l'ensemencement en profondeur est recommandé pour les échantillons présentant une charge microbienne élevée ou lorsqu'une sensibilité accrue est nécessaire, puisqu'il permet

d'ensemencer un volume plus important de l'échantillon et d'obtenir un dénombrement plus représentatif (Jay *et al.*, 2005).

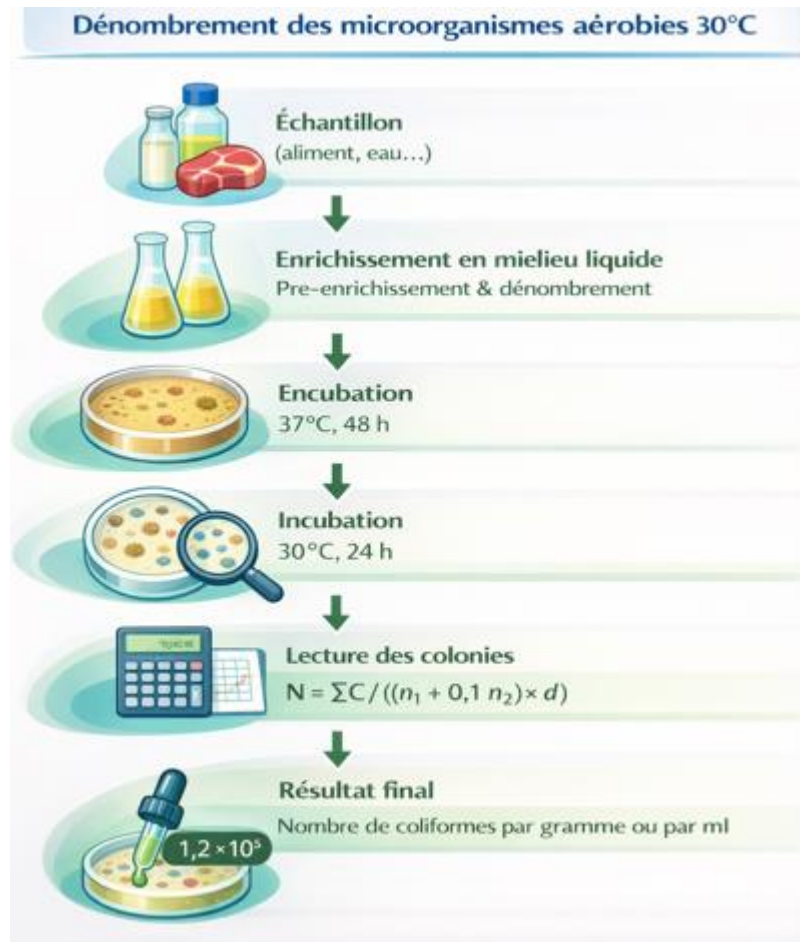


Figure 6. Schéma qui résume la méthode de Dénombrement des microorganismes aérobies 30°C (ISO4833, 2013a ; 2013b)

Pour conclure, cette méthode garantit une reproductibilité et une comparabilité des résultats entre laboratoires. Elle joue ainsi un rôle essentiel dans l'évaluation de l'hygiène des procédés, la surveillance de la qualité microbiologique et la conformité réglementaire des produits alimentaires. Son utilisation contribue à assurer la sécurité des consommateurs et le respect des bonnes pratiques de fabrication au sein de la filière agroalimentaire.

IV. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214) et NF VO4-503

IV. 1. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214)

Cette norme NF ISO 15214 décrit le dénombrement des bactéries lactiques mésophiles (Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Pediococcus...) dans les aliments par technique de comptage sur milieu solide, après incubation en conditions anaérobies ou microaérophiles. Des milieux sélectifs ont été utilisés : gélose MRS ou gélose M17, selon la flore à analyser. La gélose MRS est utilisée pour la plupart des bactéries lactiques, et parfois la gélose M17 pour les streptocoques lactiques (NF ISO 15214, 1998).

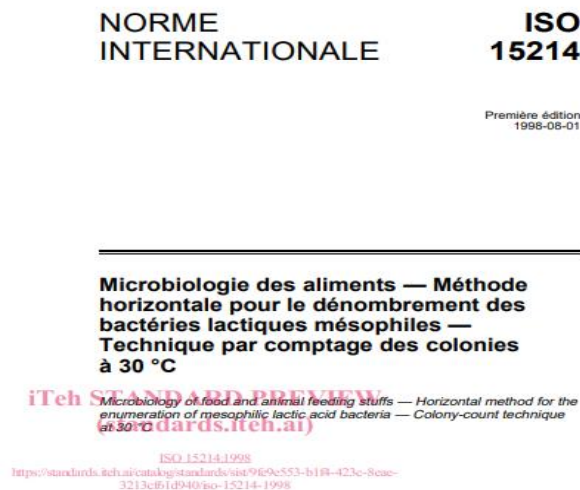


Figure 7. Présentation officielle de la norme ISO 18593:1998 (ISO 18593,1998)

IV.1.2. Préparation de l'échantillon

On applique la norme ISO 7218 pour garantir les pratiques de laboratoire et pour respecter les exigences de qualité et de sécurité internationales. Le diluant, généralement utilisé est l'eau peptonée tamponnée (Voir l'ISO 6887-1), qui sert à préparer l'échantillon pour l'ensemencement. La préparation de l'échantillon se fait come suite :

1. Prélever 10 g ou 10 mL d'échantillon.
2. Ajouter dans 90 mL de solution peptonée → dilution 10^{-1} .
3. Réaliser les dilutions décimales successives jusqu'à 10^{-6} ou selon besoin.

IV.1.3. Ensemencement

L'ensemencement se fait selon la méthode décrite dans la norme NF ISO 15214 :

➤ Ensemencement en profondeur

- Déposer 1 mL de chaque dilution.
- Ajouter ~15 mL de milieu MRS à **pH 5,7** fondu et refroidi à 45-50 °C.
- Homogénéiser en mouvements circulaires.
- Laisser solidifier.

➤ Ensemencement en surface

Pour cela on dépose 0,1 mL sur la surface de la gélose MRS puis on étale avec une spatule stérile. Cette technique est moins utilisée dans la norme mais parfois accepté.

Les boîtes sont ensuite incubées à une température comprise entre 30 °C et 37 °C pendant 72 ± 3 h heures. Cela permet aux bactéries lactiques de se développer en colonies (**ISO 15214, 2019**).

➤ Conditions : Anaérobies ou microaérophiles

- Anaérojar + sachet générateur de CO₂/H₂
- Alternatives : incubation en jarre avec bougie (microaérophilie).

➤ Calcul des UFC

Après incubation, les bactéries lactiques donnent des colonies généralement : petites, rondes, blanc crème et parfois légèrement convexes. Le nombre de colonies obtenues sur les boîtes de Petri est comptabilisé de 15 à 300 colonies et exprimé en unités formant colonies (UFC), souvent en UFC par gramme ou par millilitre d'échantillon. Cela donne une idée de la concentration de bactéries lactiques dans l'échantillon. La détermination du nombre de bactéries lactiques mésophiles (**N**) présentes dans l'échantillon d'essai en calculant la moyenne pondérée obtenue à partir des résultats de deux dilutions consécutives, selon l'équation suivante :

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

$\sum C$: est la somme des colonies comptées sur toutes les boîtes de deux dilutions successives et dont une au moins contient au moins 15 colonies;

V est le volume de l'inoculum appliqué à chaque boîte, en millilitres;

n_1 est le nombre de boîtes retenues à la première dilution;

n_2 est le nombre de boîtes retenues à la seconde dilution;

d est le taux de dilution correspondant à la première dilution retenue.

Arrondir les résultats calculés à deux chiffres significatifs (voir l'ISO 7218) (**ISO 15214, 2019**).



Figure 8. Schéma qui résume la méthode de dénombrement de la flore lactique (**ISO 15214, 2019**).

➤ **Colonies issues du dénombrement sur échantillon de fromage**

L'image qui suit (figure 9) montre les colonies microbiennes développées après inoculation d'un échantillon de fromage sur un milieu de culture approprié. Le dénombrement permet d'estimer la charge microbienne présente, ce qui est essentiel pour évaluer la qualité microbiologique et la sécurité du produit. L'observation des colonies donne également des indications sur la diversité des micro-organismes présents.

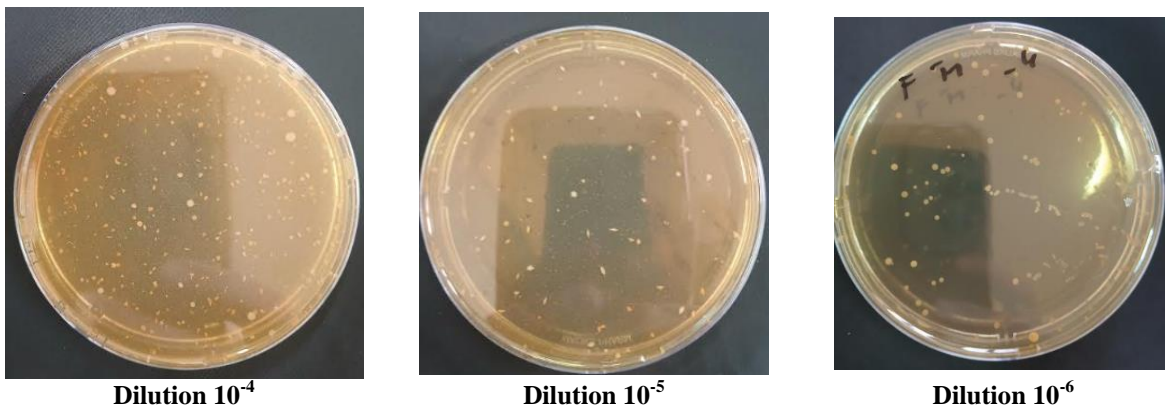


Figure 9. Colonies issues du dénombrement sur échantillon de fromage (Photo originale)

IV.2. Norme NF V04-503: Norme spécifique en microbiologie alimentaire

C'est une norme française spécifique dans le domaine de la microbiologie alimentaire, qui décrit les règles générales de dénombrement des micro-organismes par la technique des ensemencements en profondeur ou en surface (méthodologie générale). La NF V04-503 précise la technique d'ensemencement. Elle décrit :

- les étapes de préparation des dilutions,
- les volumes à ensemercer,
- les conditions d'incubation générales,
- l'expression des résultats (UFC/g),
- les règles d'acceptation des boîtes (entre 15–300 colonies),
- les corrections selon les dilutions (NF V04-503, 2026).

Ce sont des règles obligatoires pour n'importe quel dénombrement microbiologique.

Tableau 3. Synthèse des principales différences entre NF V04-503 et NF ISO 15214 (NF V04-503, 2026 ; ISO 15214, 2019)

Élément comparé	NF V04-503 (Méthode générale)	NF ISO15214 (Méthode spécifique)
Nature de la norme	Norme générale décrivant les règles pour le dénombrement des micro-organismes	Norme spécifique pour le dénombrement des bactéries lactiques
Objectif principal	Cadre technique : dilutions, ensemencement, incubation, lecture et calcul	Comptage spécifique des bactéries lactiques mésophiles
Champ d'application	Toutes les analyses microbiologiques sur milieux gélosés	Flore lactique dans les aliments et produits fermentés
Type d'ensemencement	Décrit les méthodes générales : surface et profondeur	Généralement ensemencement en surface sur milieu MRS
Milieu de culture	Non spécifique, dépend de la méthode ciblée	MRS agar standardisé
Conditions d'incubation	Règles générales (température, durée, atmosphère)	30 °C ± 1, 72 h ± 3 h, atmosphère microaéroophile facultative
Critères d'acceptation des boîtes	Définit les plages acceptables : 15–300 colonies, lecture des duplicatas	Renvoie aux règles générales (souvent NF V04-503)
Expression des résultats	UFC/g ou UFC/mL selon les dilutions	UFC/g ou UFC/mL pour la flore lactique
Utilisation en laboratoire	Toujours utilisée comme référence technique de base	Appliquée en complément, pour une finalité ciblée

V. Dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059)

Cette norme fait partie de la série des normes AFNOR sur le contrôle microbiologique des aliments et est utilisée aussi bien en industrie qu'en laboratoire d'analyse officiel de contrôle; elle a été homologuée le 12 mars 2002 et confirmée jusqu'en 2009. Elle a été abrogée et remplacée ou complétée depuis lors par rapport à la méthode de référence (NF ISO 7954) pour le dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies obtenues en milieu solide après incubation en aérobiose à 25 °C (NF V08-059, 2014).

Elle définit le dénombrement des levures et des moisissures par comptage des colonies à 25°C et complète ainsi la norme de référence NF ISO 7954, 1988. La présente méthode, de routine, vise à simplifier les conditions d'analyse de la contamination fongique d'un produit (NF ISO 7954, 1988).

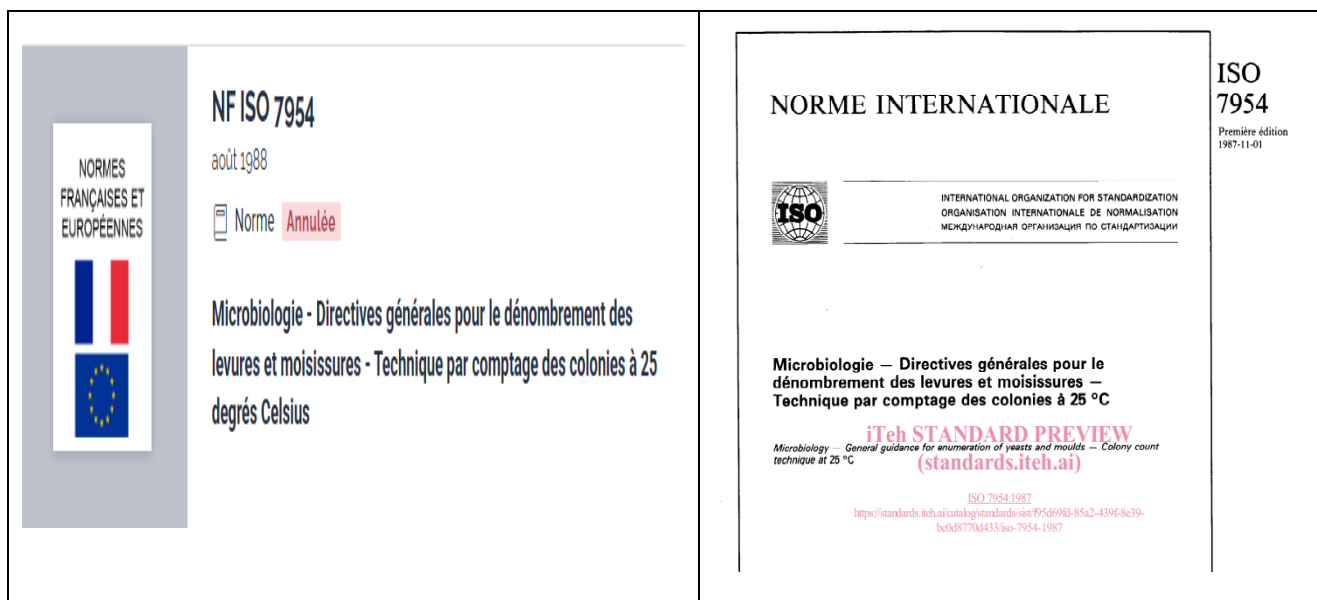


Figure 10. Présentation officielle de la norme NF V08-059 et la norme de référence NF ISO 7954, 1988 (NF ISO 7954, 1988).

V.1. Préparation de l'échantillon

Il faut tout d'abord homogénéiser soigneusement l'échantillon alimentaire. Préparer une suspension mère (habituellement 10 g ou 10 mL de l'échantillon dans 90 mL de diluant stérile; par exemple, eau peptonée tamponnée). Réaliser une série de dilutions décimales ; 10^{-1} , 10^{-2} , ... selon la charge microbienne attendue (NF ISO 7954, 1988).

V.2. Ensemencement et incubation

Prélever 1 mL de chaque dilution et le déposer dans une boîte de Petri stérile puis ajouter 15 à 20 mL de gélose Sabouraud glucosée à 4 %, fondue et refroidie à 45 °C, gélose facultativement supplémentée en chloramphénicol ou gentamicine pour la rendre sélective;

Homogénéisez doucement pour assurer une répartition égale des micro-organismes puis laissez la gélose solidifier. On peut réaliser aussi des ensemencements par râteau stérile. Les boîtes sont incubées en aérobiose à (25 ± 1) °C pendant 5 jours. Pour éviter la prolifération excessive d'un groupe de micro-organismes au détriment des autres, les colonies de levures et de moisissures levure sont initialement contrôlées quotidiennement (NF V08-059, 2014 ; Lebres *et al.*, 2002).

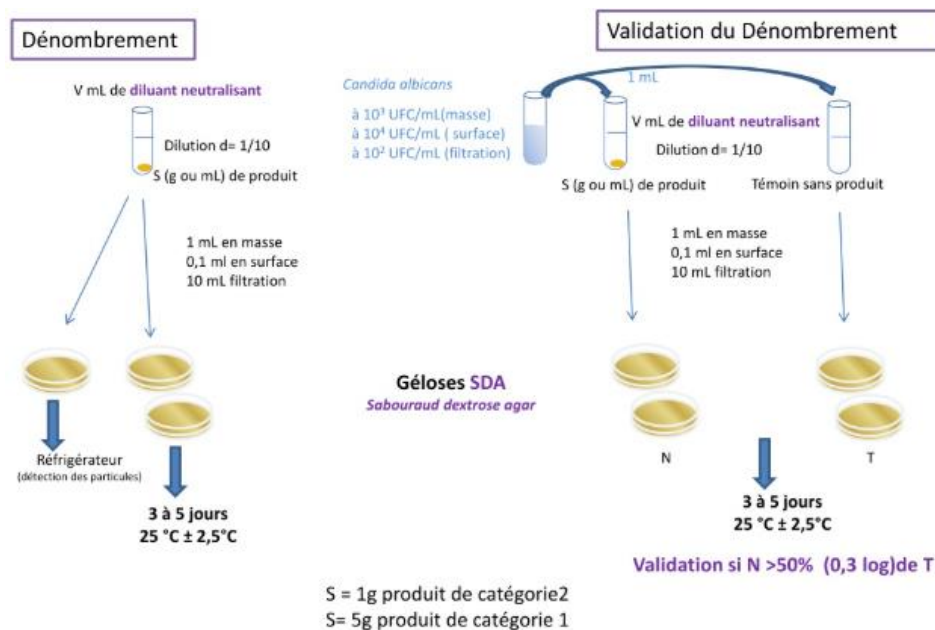


Figure 11. Dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059 ; 2014)

V.3. Lecture et interprétation

Incuber les boîtes en position inversée couvercle en bas à 25 ± 1 °C. Durée : 3 à 5 jours, prolongée jusqu'à 7 jours si la croissance est lente. L'incubation se fait en aérobiose à l'air libre, sans atmosphère spéciale. La température d'incubation peut être de 20°C ou 22°C, dans le cas de dénombrement de moisissures supposées connues, après accord entre les parties.

Pour l'isolement et le dénombrement des souches probiotiques de levures, la norme NF EN 15789 préconise l'incubation à 35 ± 1 °C pendant 2 jours (**NF EN 15789, 2009**).

Pour le dénombrement: compter les colonies visibles:

- Colonies de levures : généralement lisses, brillantes, de couleur blanche à crème;
- Colonies de moisissures : duveteuses, pigmentées, à bords irréguliers.
- Choisir les boîtes contenant 15 à 150 colonies pour un dénombrement fiable.
- Calcul de la moyenne pondérée si plusieurs dilutions ont été faites (**ISO 6611, 2004**).
- Pour l'expression des résultats:

Le résultat est exprimé en nombre de colonies par gramme ou par millilitre de produit. Les résultats permettent d'évaluer la qualité hygiénique du produit. Un nombre élevé de levures ou de moisissures peut révéler une contamination durant la production ou le stockage; un problème de conservation; un produit altéré (**NF V08-059, 2014**).

➤ **Calcul des UFC**

Après incubation, seules les boîtes présentant un nombre de colonies compris entre 10 et 150 colonies sont retenues pour le dénombrement. Les colonies typiques de levures et de moisissures sont comptées séparément ou globalement selon l'objectif de l'analyse.

Le nombre de levures et moisissures est exprimé en unités formant colonies par gramme (UFC/g) pour les échantillons solides ou en unités formant colonies par millilitre (UFC/mL) pour les échantillons liquides. Le calcul est effectué selon la formule suivante :

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

où :

- N : nombre de micro-organismes (UFC/g ou UFC/mL)
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur les boîtes retenues
- n_1 : nombre de boîtes comptées à la première dilution retenue
- n_2 : nombre de boîtes comptées à la dilution suivante
- d : dilution correspondant à la première dilution retenue (**NF V08-059, 2014**).

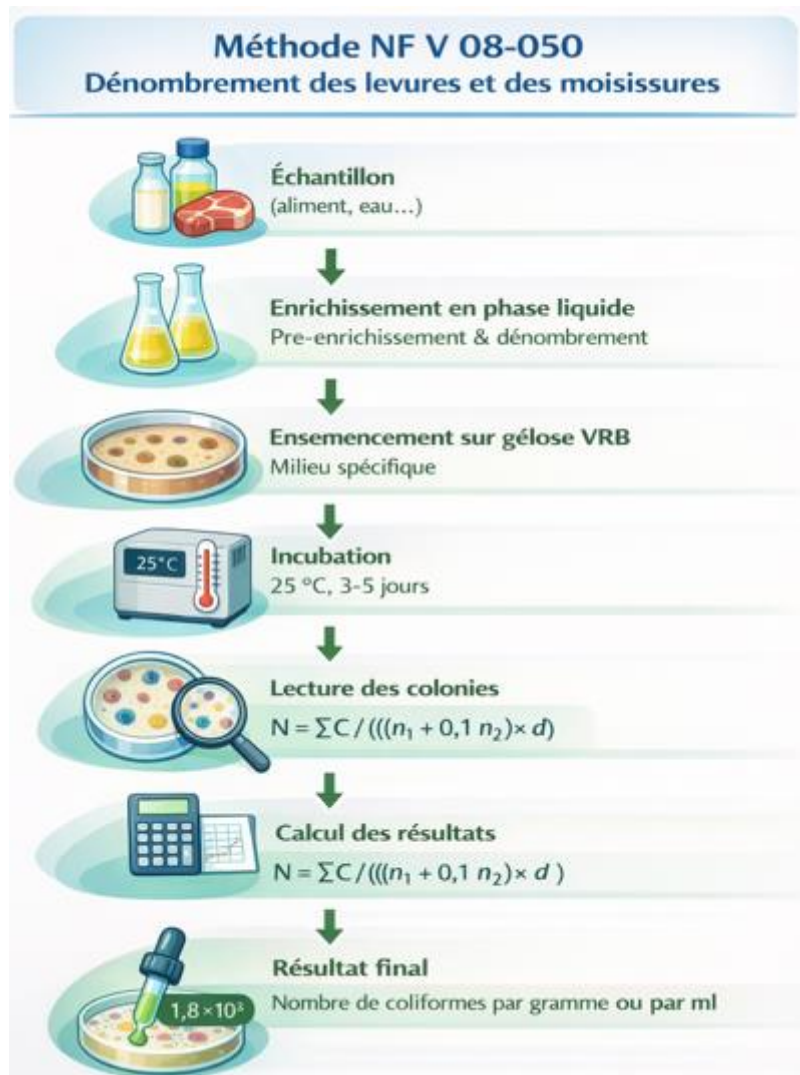


Figure 12. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des levures et des moisissures (NF V08-059, 2014).

Les levures et les moisissures sont des micro-organismes capables de proliférer dans des conditions environnementales néfastes basse température, pH bas ou élevé, faible teneur en eau, etc. Certaines moisissures présentent un risque toxicologique : en effet, elles peuvent produire des mycotoxines, des composés dommageables pour la santé humaine pouvant présenter un effet cancérigène. À l'inverse, des levures comme *Saccharomyces cerevisiae* utilisée en panification, brasserie, etc. sont des micro-organismes d'intérêt technologique large utilisé lors de procédés de fermentation alcoolique. Cependant, les levures et moisissures demeurent des agents potentiellement pathogènes responsables de la détérioration de nombreux aliments du quotidien. Certaines de ces moisissures sont des moisissures

productrices de mycotoxines: L'accumulateur auprès du consommateur final en cas de éclosion d'une intoxication alimentaire (NF EN 15789, 2009).

VI. Dénombrement des coliformes 30°C (NF V 08-050)

C'est une méthode de microbiologie alimentaire utilisée pour évaluer l'hygiène générale d'un produit (eau, aliment, surface, etc.). Les coliformes sont des bactéries indicatrices d'une possible contamination et de mauvaises conditions sanitaires. L'objectif de cette méthode est de déterminer le nombre de coliformes totaux capables de se développer à 30 °C dans un échantillon donné. Le champ d'application concerne les produits destinés à la consommation humaine ainsi qu'à l'alimentation animale. La méthode est applicable aussi bien aux autocontrôles qu'aux contrôles officiels, dès lors que la norme est reconnue comme en vigueur par les autorités compétentes. Elle est fréquemment mentionnée conjointement avec la norme ISO 4832 pour le dénombrement des coliformes à 30 °C dans les plans d'analyses microbiologiques et les référentiels sectoriels (NF V 08-050, 2015).

VI.1. Préparation de l'échantillon

La préparation de l'échantillon est réalisée conformément à la norme NF V 08-050. Un échantillon représentatif de 10 g pour les matrices solides (ou 10 mL pour les échantillons liquides) est prélevé aseptiquement et introduit dans un sachet ou un flacon stérile contenant 90 mL de diluant stérile (eau peptonée tamponnée). Cette étape permet d'obtenir une suspension mère correspondant à une dilution 10^{-1} . L'ensemble est homogénéisé pendant 1 à 2 minutes à l'aide d'un homogénéisateur de type stomacher ou par agitation vigoureuse, afin d'assurer une répartition uniforme des micro-organismes. À partir de cette suspension mère, des dilutions décimales successives (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , etc.) sont préparées en transférant 1 mL de la dilution précédente dans 9 mL de diluant stérile, en utilisant du matériel stérile pour chaque étape. Les dilutions obtenues sont ensuite utilisées pour l'ensemencement sur milieu sélectif approprié au dénombrement des coliformes, en vue de l'incubation et du comptage des colonies (NF V 08-050, 2015 ; ISO 4832, 2006).

VI.2. Ensemencement et incubation

À partir des dilutions décimales appropriées de la suspension mère, un volume de 1 mL de chaque dilution est prélevé aseptiquement et déposé dans des boîtes de Pétri stériles. Environ 15 à 20 mL de milieu VRBL (Violet Red Bile Lactose agar) fondu et maintenu à 44–

47 °C sont ensuite ajoutés dans chaque boîte. Le contenu est homogénéisé par agitation douce afin d'assurer une répartition uniforme de l'inoculum dans le milieu.

Après solidification du milieu, une surcouche de quelques millilitres de VRBL peut être ajoutée afin de limiter le développement de colonies superficielles indésirables. Les boîtes sont ensuite laissées à solidifier complètement puis retournées.

L'incubation est réalisée à 30 ± 1 °C pendant 24 ± 2 heures. À l'issue de l'incubation, seules les boîtes présentant entre 15 et 150 colonies sont retenues pour le comptage. Les colonies typiques de coliformes apparaissent sous forme de colonies rouges à rosées, parfois entourées d'un halo de précipitation biliaire (NF V 08-050, 2015).

VI.3. Lecture et interprétation

Après incubation, les boîtes contenant entre 15 et 150 colonies sont sélectionnées pour le dénombrement. Les colonies typiques de coliformes sont identifiées par leur coloration rouge à rosée, souvent associée à un halo de précipitation autour de la colonie sur milieu VRBL. Le nombre de coliformes est exprimé en unités formant colonies par gramme (UFC/g) pour les échantillons solides ou en unités formant colonies par millilitre (UFC/mL) pour les échantillons liquides. Le calcul est effectué selon la formule suivante :

$$N = \frac{\sum C}{(n1 + 0.1n2) \times d}$$

où :

- N : nombre de micro-organismes (UFC/g ou UFC/mL),
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur les boîtes retenues,
- n1 : nombre de boîtes à la première dilution retenue,
- n2 : nombre de boîtes à la dilution suivante,
- d : dilution correspondant à la première dilution retenue (NF V 08-050, 2015).

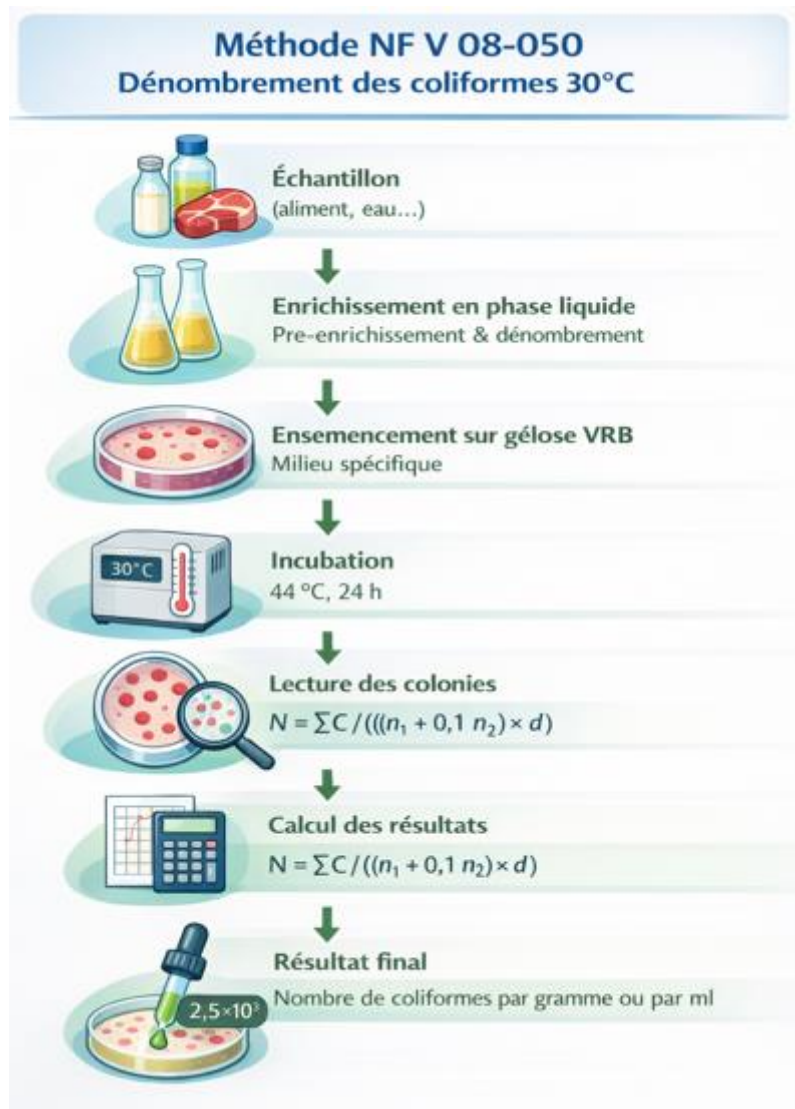


Figure 13. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des coliformes 30°C (NF V 08-050, 2015).

VII. Dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060)

Elle méthode microbiologique pour détecter et compter les coliformes thermotolérants dans les eaux. Cette famille bactérienne inclut notamment *Escherichia coli* et est utilisée comme indicateur de contamination fécale.

VII.1. Préparation de l'échantillon

L'objectif de cette méthode est d'obtenir un échantillon représentatif et prêt à être analysé. A propos du prélèvement l'eau à analyser doit être prélevée dans des conditions stériles. L'échantillon doit être conservé à une température contrôlée (entre 2 °C et 8 °C) et analysé dans un délai défini pour éviter une croissance bactérienne in vitro. Selon la turbidité et la concentration attendue de bactéries, on prélève un volume précis (souvent 10 mL, 100 mL, etc.). Si l'eau est très chargée, on réalise parfois des dilutions stériles (NF V 08-060, 2009).

VII.2. Ensemencement et incubation

Pour permettre la croissance des coliformes thermotolérants sur un milieu qui les favorise on suit les étapes suivantes :

- 1. Milieu de culture spécifique** : un milieu sélectif/différentiel adapté aux coliformes thermotolérants (souvent à base de lactose avec indicateurs). Ce milieu favorise leur croissance tout en inhibant d'autres microbes.
- 2. Ensemencement** : L'échantillon ou ses dilutions sont déposés sur ou dans le milieu. On utilise des techniques aseptiques pour éviter toute contamination externe.
- 3. Incubation à température contrôlée** : La norme utilise une température de 44 °C $\pm 0,5$ °C pour distinguer les coliformes thermotolérants des coliformes classiques. La durée d'incubation est fixée par la norme (souvent 18 – 24 h) (NF V 08-060, 2009).

VII.3. Lecture et interprétation

Après incubation, on observe les colonies qui ont poussé. Les colonies typiques de coliformes thermotolérants ont des caractéristiques définies (couleur, forme) selon le milieu utilisé. Pour le dénombrement le résultat est exprimé en nombre de coliformes thermotolérants par volume d'eau (ex. : UFC/100 mL). Si des dilutions ont été faites, on

utilise les facteurs de dilution pour calculer la concentration réelle selon l'accréditation et les règles ISO 7218.

La formule que vous donnez pour le dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060) est :

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

Voici la signification des symboles :

1. **N** : le nombre de coliformes thermotolérants par gramme ou par millilitre (selon le type d'échantillon).
2. $\sum C$: la somme des colonies observées dans toutes les tubes positifs.
3. **n₁** : le nombre de tubes testés à la plus faible dilution.
4. **n₂** : le nombre de tubes testés à la dilution suivante (plus concentrée).
5. **d** : le facteur de dilution correspondant à la plus faible dilution testée.

Pour l'interprétation la norme donne des critères pour dire si l'eau est conforme ou non selon les limites réglementaires. Par exemple, pour certaines eaux destinées à la consommation, on s'attend à absence de coliformes thermotolérants dans 100 mL d'eau (**NF V 08-060, 2009**).

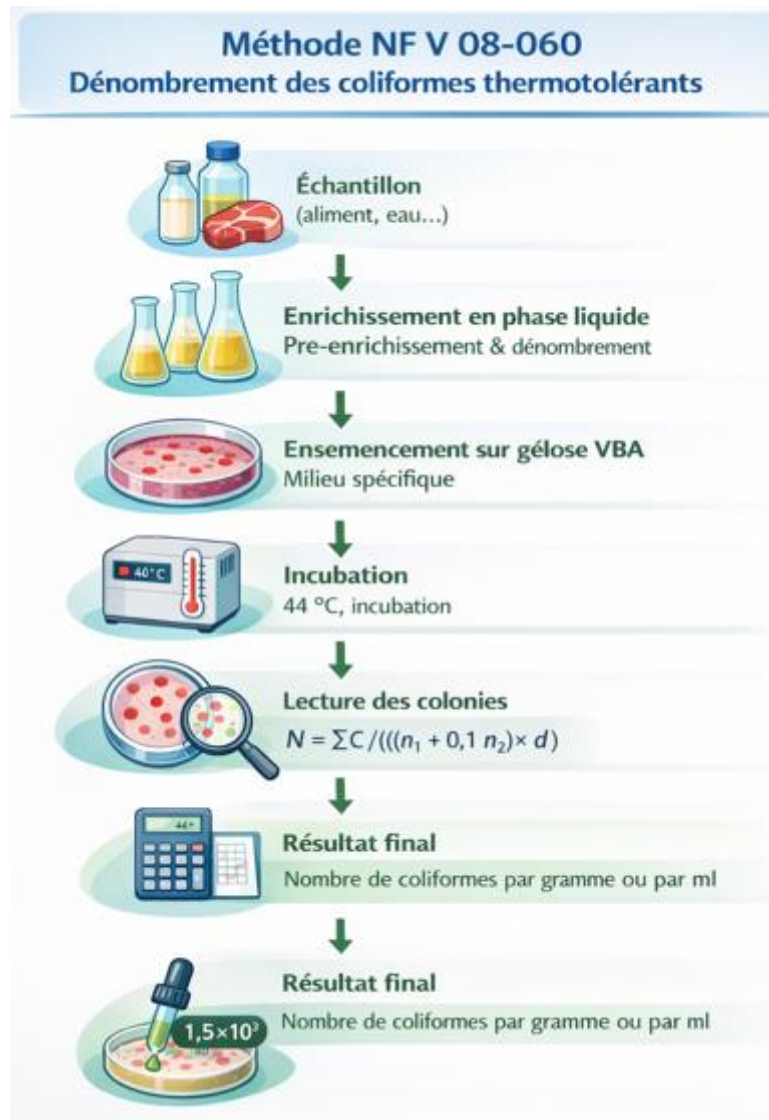


Figure 14. Schéma qui résume la méthode de dénombrement des coliformes thermotolérants (NF V 08-060, 2009).

VII.3. Exemple de dénombrement des coliformes thermotolérants

Supposons qu'on teste un échantillon d'eau avec la méthode des tubes multiples (NF V 08-060) :

- **Dilution 1 (10^{-1})** : 5 tubes → 3 tubes positifs, colonies observées : 23, 25, 22
- **Dilution 2 (10^{-2})** : 5 tubes → 2 tubes positifs, colonies observées : 4, 5
- **Dilution 3 (10^{-3})** : 5 tubes → 0 tubes positifs (on ne les utilise pas dans la formule)

Étape 1 : Calcul de $\sum C$

On ne prend que les tubes positifs des deux premières dilutions :

- Dilution 1 : $23 + 25 + 22 = 70$
- Dilution 2 : $4 + 5 = 9$

Donc : $\sum C = 70 + 9 = 79$

Étape 2 : Identifier n_1 et n_2

- n_1 = nombre de tubes testés à la première dilution = 5
- n_2 = nombre de tubes testés à la deuxième dilution = 5

Certains protocoles utilisent seulement le nombre de tubes *positifs* dans les calculs, mais la NF V 08-060 précise le nombre de tubes testés à chaque dilution.

Étape 3 : Identifier d

- d = facteur de dilution de la première série = $10^{-1} = 0,1$

Étape 4 : Appliquer la formule

$N = \sum C / (n_1 + 0,1n_2) \times d$ Remplaçons : $N = 79 / (5 + 0,1 \times 5) \times 0,1 = 143,63$

Résultat : Le nombre de coliformes thermotolérants est ≈ 144 par mL d'eau.

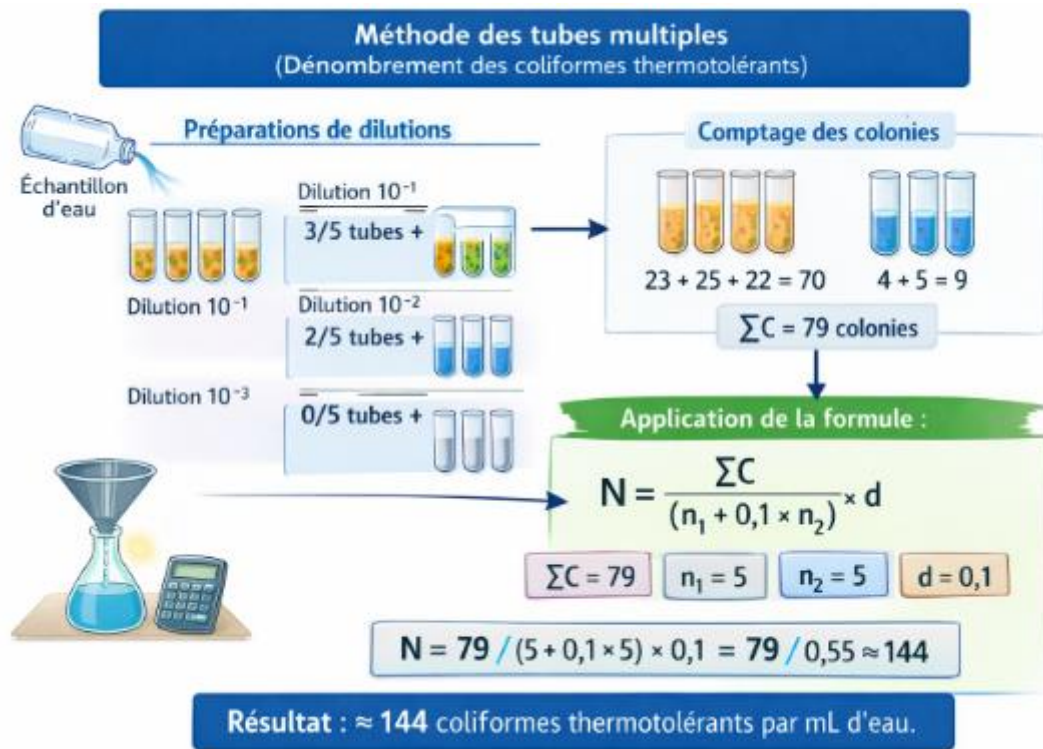


Figure 15. Exemple de dénombrement des coliformes thermotolérants selon la norme (NF V 08-060, 2009).

VIII. Dénombrement de l'*Escherichia coli* beta glucuronidase positive (NF ISO 16649-2)

La NF ISO 16649-2 définit une méthode pour détecter et dénombrer *Escherichia coli* dans les aliments ou les eaux destinées à la consommation humaine. Se concentrer sur les souches qui produisent l'enzyme bêta-glucuronidase, car la plupart des *E. coli* d'origine fécale possèdent cette enzyme. Elle est très utilisée pour le contrôle de qualité microbiologique des aliments. Pour les analyses officielles par les laboratoires agréés. Et aussi pour la vérification de la sécurité sanitaire des produits alimentaires.

Cette norme est appliquée dans plusieurs domaines, notamment : les aliments prêts à la consommation, les produits alimentaires pour animaux, ainsi que l'eau potable et les eaux utilisées dans l'industrie alimentaire.

Elle présente de nombreux avantages : elle est spécifique aux *E. coli* d'origine fécale, ce qui en fait un bon indicateur d'hygiène, c'est une méthode rapide et reproductible pour les laboratoires, et elle est reconnue au niveau international (ISO), facilitant ainsi les contrôles et les comparaisons entre laboratoires.

Cependant, cette norme comporte également certaines limites : elle ne permet pas de détecter les *E. coli* ne produisant pas la bêta-glucuronidase (bien que ces souches soient très rares) et elle exige une maîtrise rigoureuse des dilutions et de l'ensemencement pour garantir des résultats fiables (NF ISO 16649-2, 2001).

VIII.1. Préparation de l'échantillon

Pour la préparation de l'échantillon on réalise des dilutions et homogénéisation pour avoir un échantillon représentatif.

VIII.2. Ensemencement et incubation

L'échantillon est placé sur un milieu spécifique favorisant la croissance des *E. coli* bêta-glucuronidase positive. L'incubation des boîtes se fait à une température précise (souvent 44 °C) pendant un temps donné (NF ISO 16649-2, 2001).

VIII.3. Lecture et interprétation

La lecture des colonies exprimant la bêta-glucuronidase apparaissent avec une couleur spécifique (souvent bleue ou fluorescente selon le milieu utilisé). Pour le dénombrement, le nombre de colonies est compté et le calcul du nombre de bactéries par gramme ou par ml se fait avec la formule :

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

Voici la signification des symboles :

1. **N** : le nombre de coliformes thermotolérants par gramme ou par millilitre (selon le type d'échantillon).
2. $\sum C$: la somme des colonies observées dans toutes les tubes positifs.
3. **n₁** : le nombre de tubes testés à la plus faible dilution.
4. **n₂** : le nombre de tubes testés à la dilution suivante (plus concentrée).
5. **d** : le facteur de dilution correspondant à la plus faible dilution testée (**NF ISO 16649-2, 2001**).



Figure 16. Schéma qui résume la méthode NF ISO 16649-2 pour le dénombrement d'*Escherichia coli* β-glucuronidase positive (NF ISO 16649-2, 2001).

IX. Dénombrement des Entérobactéries (NF ISO 21528-2)

C'est une méthode horizontale destinée au dénombrement des entérobactéries dans les produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale. Elle repose sur l'ensemencement en milieu sélectif suivi d'une incubation dans des conditions contrôlées, permettant l'obtention de colonies caractéristiques (NF ISO 21528-2, 2017).

IX.1. Préparation de l'échantillon

Un échantillon représentatif est prélevé aseptiquement. Une prise d'essai de 10 g (ou 10 mL) est homogénéisée dans 90 mL de diluant stérile afin d'obtenir une dilution mère (10^{-1}). Des dilutions décimales successives sont ensuite préparées selon les besoins, en utilisant le même diluant stérile.

IX.2. Ensemencement et incubation

À partir des dilutions appropriées, un volume déterminé est ensemencé sur gélose sélective appropriée (ex. gélose VRBG). L'ensemencement est réalisé en surface ou par incorporation selon le protocole. Les boîtes sont incubées à $37\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$ pendant 24 ± 2 heures. Après incubation, les colonies typiques d'entérobactéries (généralement roses à rouges, parfois entourées d'un halo de précipitation) sont sélectionnées pour le dénombrement (NF ISO 21528-2, 2017).

IX.3. Lecture et interprétation

Les boîtes contenant un nombre de colonies compris dans l'intervalle recommandé (généralement 15 à 150 colonies) sont retenues. Les colonies caractéristiques sont comptées et, si nécessaire, confirmées par des tests biochimiques appropriés.

Le résultat est exprimé en unités formant colonies par gramme (UFC/g) ou par millilitre (UFC/mL). Le calcul est effectué selon la formule suivante :

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

Où :

- N : nombre d'entérobactéries par g ou mL d'échantillon,
- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes retenues,

- n_1 : nombre de boîtes comptées à la première dilution retenue,
- n_2 : nombre de boîtes comptées à la dilution suivante,
- d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue. (NF ISO 21528-2, 2017).

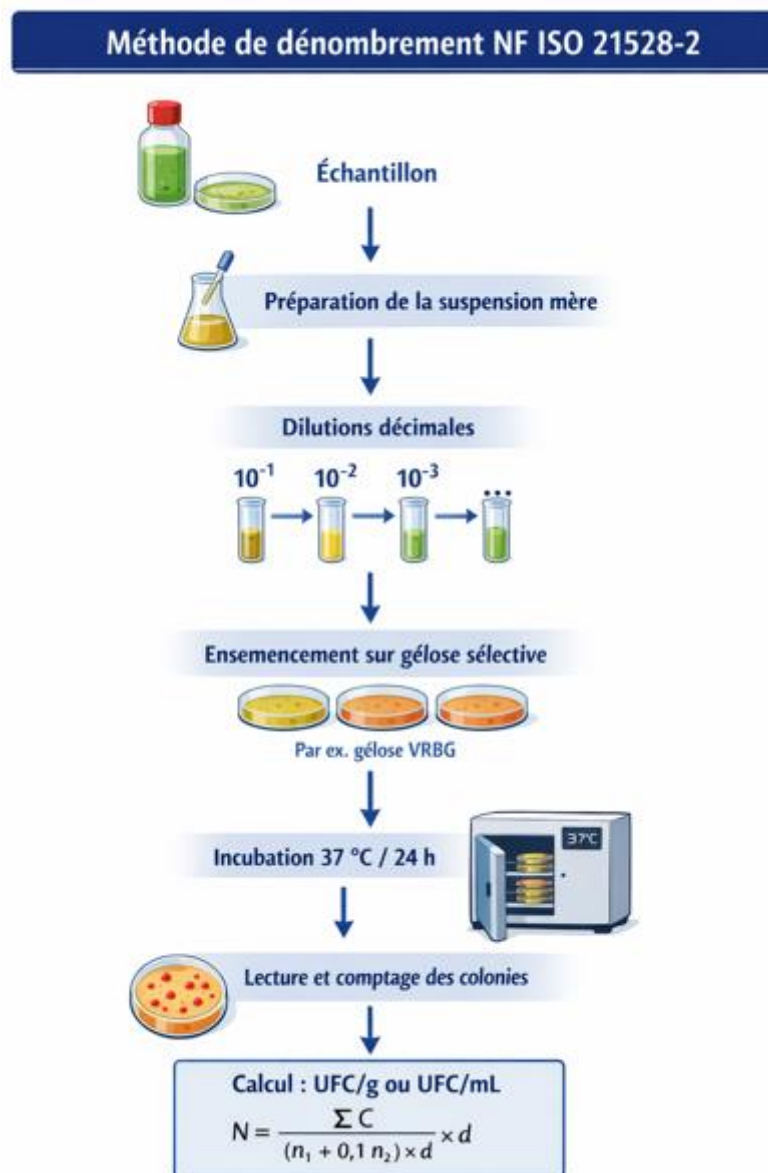


Figure 17. Schéma qui résume le dénombrement des Entérobactéries (NF ISO 21528-2, 2017).

X. Recherche de Salmonelles (NF EN ISO 6579)

Les Salmonelles sont des bactéries pathogènes responsables de toxi-infections alimentaires. Leur détection est essentielle dans le contrôle microbiologique des aliments.

X.1. Préparation de l'échantillon

On prélève 10 g ou 10 mL d'échantillon, que l'on ajoute ensuite à 90 mL de bouillon peptoné stérile (ou à un autre milieu pré-enrichissant recommandé par la norme). Le mélange est homogénéisé afin d'obtenir une dilution initiale de 10^{-1} . Si nécessaire, des dilutions décimales successives peuvent être effectuées (ISO 6579-1, 2017)

X.2. Ensemencement et incubation

Réaliser un pré-enrichissement de l'échantillon dans un bouillon non sélectif (par exemple, l'eau peptonée) à 37 °C pendant 18 à 24 heures. Transférer ensuite dans un milieu sélectif d'enrichissement, tel que Rappaport-Vassiliadis ou Selenite-Cystine, à la température spécifiée par la norme. Cette étape permet de favoriser la croissance des Salmonelles tout en inhibant les autres micro-organismes. Enfin, ensemercer sur des milieux sélectifs solides (XLD, Hektoen) et procéder aux incubations appropriées (ISO 6579-1, 2017).

X.3. Lecture et interprétation

- ✓ Les colonies typiques de Salmonelles sur milieux sélectifs sont rouges avec un centre noir (XLD) ou selon le milieu utilisé.
- ✓ Vérifier la morphologie et réaliser si nécessaire des tests biochimiques et sérologiques pour confirmation.

Le calcul est effectué selon la formule suivante :

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

Avec :

- $\sum C$: somme des colonies comptées sur deux dilutions successives
- n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution
- n_2 : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution

- ddd : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue (ISO 6579-1, 2017).

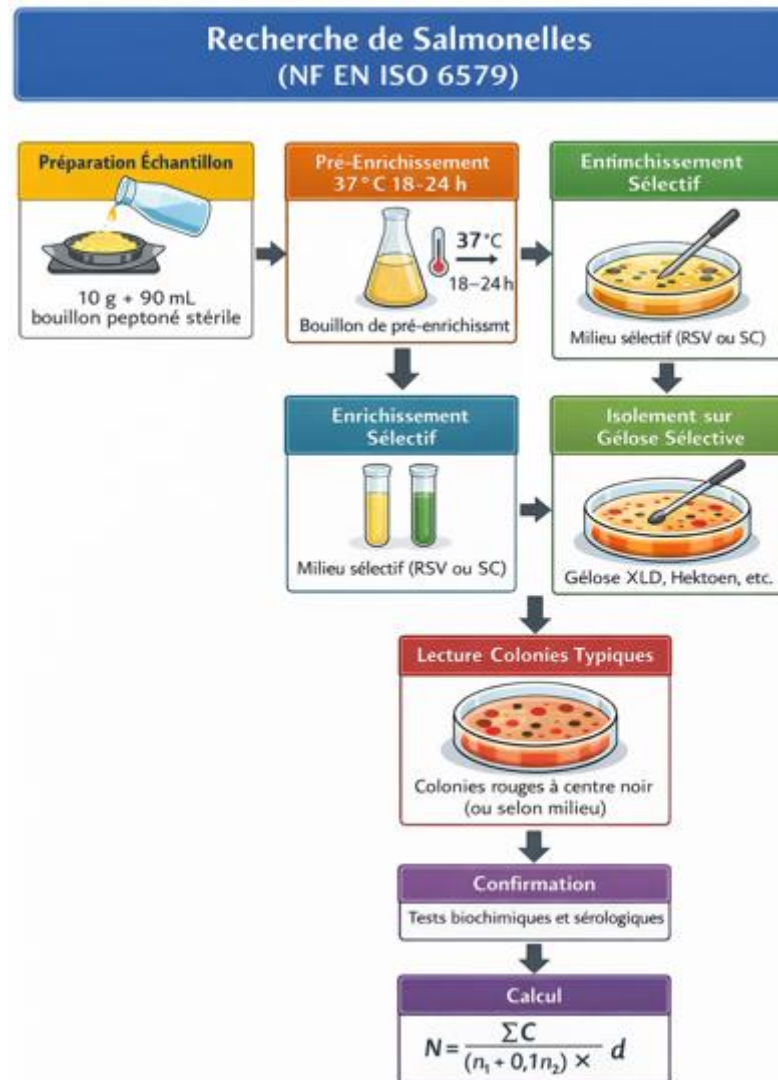


Figure 18. Schéma qui résume la méthode de recherche de Salmonelles (ISO 6579-1, 2017)

XI. Recherche de Salmonelles méthode rapide (BKR 23/04-12/06)

C'est une méthode horizontale pour la détection des *Salmonella spp.* dans les produits destinés à la consommation humaine et à l'alimentation animale. La méthode repose sur une succession d'étapes comprenant un pré-enrichissement non sélectif, un enrichissement sélectif, un isolement sur milieux sélectifs solides et une confirmation biochimique et sérologique. Contrairement aux méthodes de dénombrement, la recherche de *Salmonella* est

une méthode qualitative (présence/absence dans une quantité donnée d'échantillon). Il n'y a donc pas de formule de calcul de type N comme pour les dénombrements (**BKR, 2006**).

XI.1. Préparation de l'échantillon

Une prise d'essai de 25 g (ou 25 mL) de l'échantillon est prélevée aseptiquement et ajoutée à 225 mL d'eau peptonée tamponnée (EPT). Le mélange est homogénéisé afin d'obtenir une suspension représentative, puis incubé à 37 °C pendant 18 à 24 h pour le pré-enrichissement (**BKR, 2006**).

XI.2. Ensemencement et incubation

Après pré-enrichissement, des aliquotes sont transférées dans des milieux d'enrichissement sélectifs, tels que :

- Bouillon Rappaport-Vassiliadis soya (RVS), incubé à 41,5 °C pendant 24 h,
- Bouillon Muller-Kauffmann tétrathionate-novobiocine (MKTTn), incubé à 37 °C pendant 24 h.

À partir de ces bouillons, un ensemencement est réalisé sur milieux sélectifs solides (par exemple gélose XLD, gélose Hektoen ou gélose SS). Les boîtes sont incubées à 37 °C pendant 24 ± 3 h (**BKR, 2006**).

XI.3. Lecture et interprétation

Les colonies suspectes de *Salmonella* (souvent incolores ou à centre noir selon le milieu) sont sélectionnées. Elles sont soumises à des tests de confirmation biochimiques (ex. galerie API 20E) et, si nécessaire, à une confirmation sérologique.

Présence ou absence de *Salmonella spp.* dans 25 g (ou 25 mL) d'échantillon (**BKR, 2006**).



Figure 19. Schéma qui résume la méthode de recherche de Salmonelles méthode rapide
(BKR 23/04-12/06)

XII. Dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (NF V 08-061)

Les anaérobies sulfito-réducteurs (ASR), notamment du genre *Clostridium*, sont des indicateurs importants d'hygiène et de contamination fécale ou tellurique, surtout dans les aliments traités thermiquement.

XII.1. Préparation de l'échantillon

On commence par peser 10 g d'échantillon (ou prélever 10 mL lorsqu'il s'agit d'un échantillon liquide), puis on l'introduit dans 90 mL d'eau peptonée tamponnée stérile. Le mélange est ensuite homogénéisé soigneusement afin d'obtenir une suspension correspondant à la dilution 10^{-1} . À partir de cette suspension mère, des dilutions décimales successives sont réalisées selon les besoins de l'analyse (NF V 08-061, 2009).

XII.2. Ensemencement et incubation

Prélever 1 mL de chaque dilution et l'ensemencer dans une boîte de Pétri stérile, puis verser le milieu TSC (Tryptose Sulfite Cycloserine) préalablement fondu et tempéré. Mélanger délicatement afin d'assurer une répartition homogène de l'inoculum, puis recouvrir d'une fine couche du même milieu. Les boîtes sont ensuite incubées en conditions d'anaérobiose à 37 °C pendant une durée de 24 à 48 heures (NF V 08-061, 2009).

XII.3. Lecture et interprétation

- ✓ Les colonies typiques d'ASR apparaissent noires ou gris-noires, dues à la réduction du sulfite en sulfure de fer.
- ✓ Sélectionner les boîtes contenant entre 10 et 150 colonies.
- ✓ Compter uniquement les colonies caractéristiques.

Le calcul est effectué selon la formule suivante :

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

Avec :

- $\sum C$: somme des colonies comptées sur deux dilutions successives
- n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution
- n_2 : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution
- d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue

Expression du résultat : N en UFC/g ou UFC/mL d'échantillon (NF V 08-061, 2009).

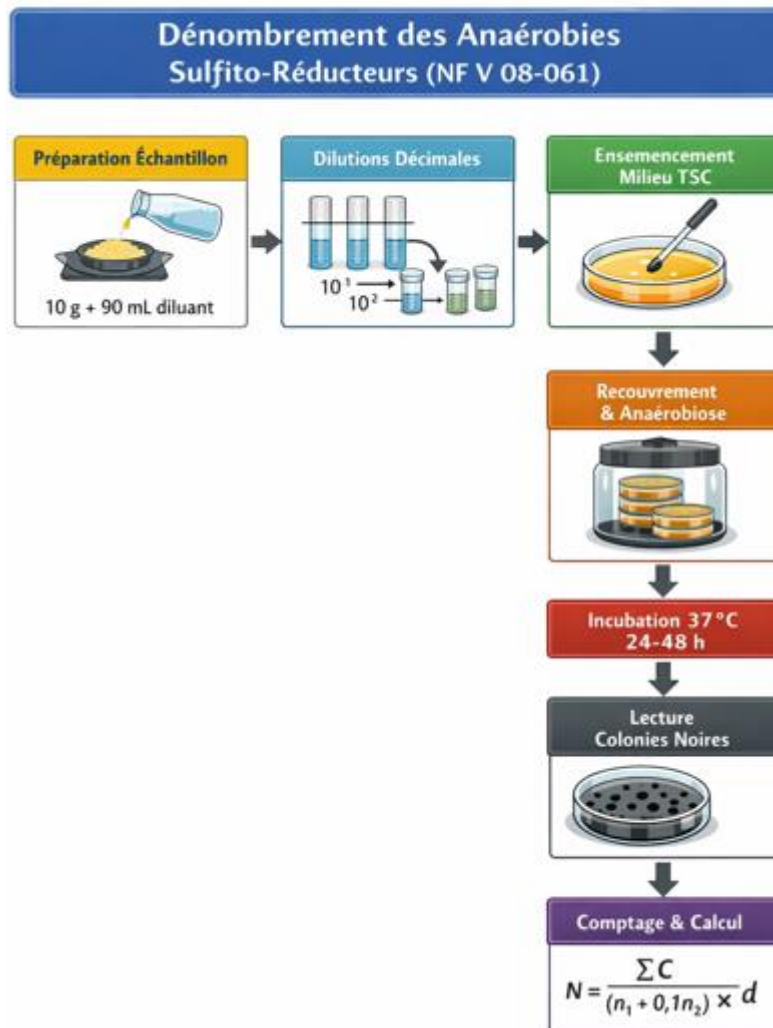


Figure 20. Schéma récapitulatif de dénombrement des anaérobies sulfito-réducteurs (NF V 08-061, 2009).

XIII. Dénombrement de *Clostridium perfringens* (NF EN ISO 7937)

Clostridium perfringens est une bactérie anaérobie sporulée souvent impliquée dans les toxi-infections alimentaires. Son dénombrement est essentiel pour évaluer la qualité microbiologique des aliments (ISO 7937, 2004).

XIII.1. Préparation de l'échantillon

Prélever 10 g ou 10 mL d'échantillon, puis l'ajouter à 90 mL d'eau peptonée stérile (ou à un autre diluant conforme à la norme). Homogénéiser soigneusement afin d'obtenir la dilution initiale de 10^{-1} . Si nécessaire, réaliser ensuite des dilutions décimales supplémentaires (ISO 7937, 2004).

XIII.2. Ensemencement et incubation

Ensemencer l'échantillon sur un milieu spécifique pour *C. perfringens* (par exemple, le TSC – Tryptose Sulfite Cycloserine Agar). Recouvrir le milieu si nécessaire afin de favoriser les conditions d'anaérobiose. Incuber ensuite à 37 °C en anaérobiose pendant 24 à 48 heures (ISO 7937, 2004).

XIII.3. Lecture et interprétation

Les colonies caractéristiques se présentent en noir sur le TSC, en raison de la réduction du sulfite. Choisir les boîtes contenant entre 10 et 150 colonies pour procéder au comptage. L'identification peut être confirmée, si nécessaire, par des tests biochimiques ou sérologiques.

Le calcul est effectué selon la formule suivante :

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

Avec :

- $\sum C$: somme des colonies comptées sur deux dilutions successives
- n_1 : nombre de boîtes retenues à la première dilution
- n_2 : nombre de boîtes retenues à la deuxième dilution
- d : facteur de dilution correspondant à la première dilution retenue

Les résultats sont exprimé en UFC/g ou UFC/mL (ISO 7937, 2004).

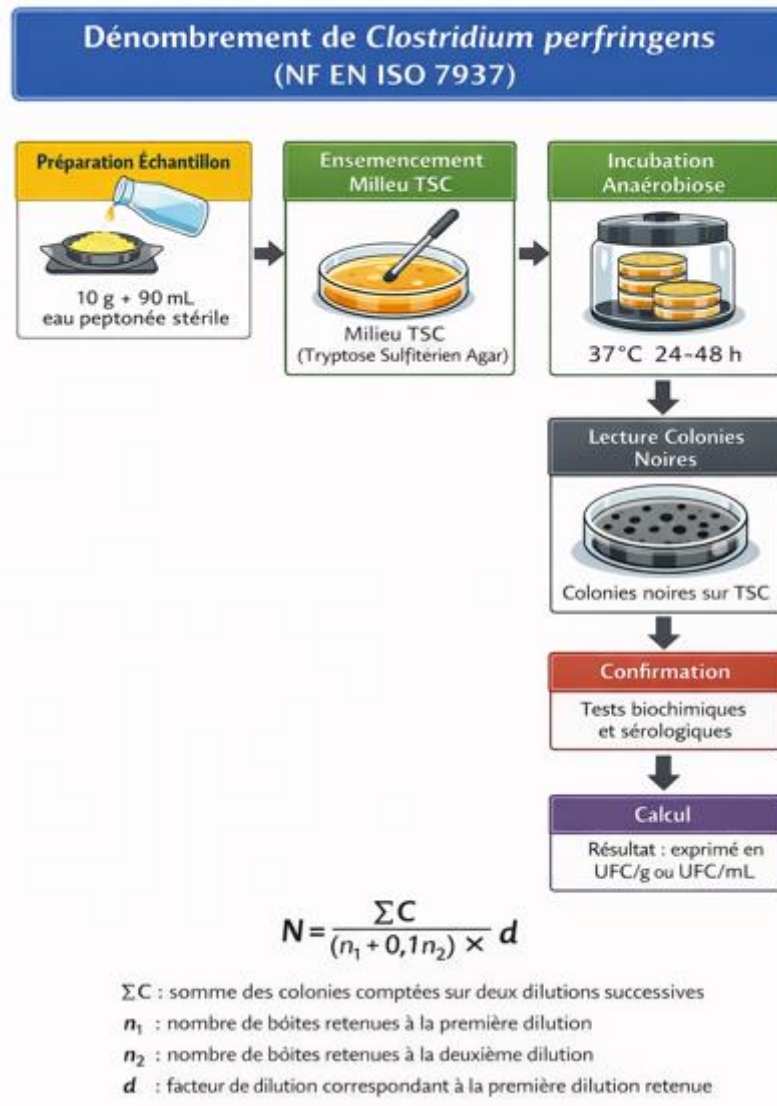


Figure 21. Schéma récapitulatif de *Clostridium perfringens* (ISO 7937, 2004).

XIV. Dénombrement des *Bacillus cereus* (NF EN ISO 7932)

XIV.1. Préparation de l'échantillon

Préparer l'échantillon selon les recommandations de la norme, en réalisant les dilutions appropriées pour le dénombrement (NF EN ISO 7932, 2000).

XIV.2. Ensemencement et incubation

Ensemencer sur le milieu spécifique recommandé par la norme et incubuer dans les conditions appropriées pour permettre la croissance de *Bacillus cereus* (NF EN ISO 7932, 2000).

XIV.3. Lecture et interprétation

Compter les colonies caractéristiques et interpréter les résultats conformément aux critères de la norme. Le calcul du nombre de bactéries est effectué selon la formule suivante :

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

où :

- $\sum C$ = somme des colonies comptées sur toutes les boîtes prises en compte
- n_1 = nombre de boîtes dans la première série de dilution
- n_2 = nombre de boîtes dans la deuxième série de dilution
- d = facteur de dilution correspondant à la première série (NF EN ISO 7932, 2000).

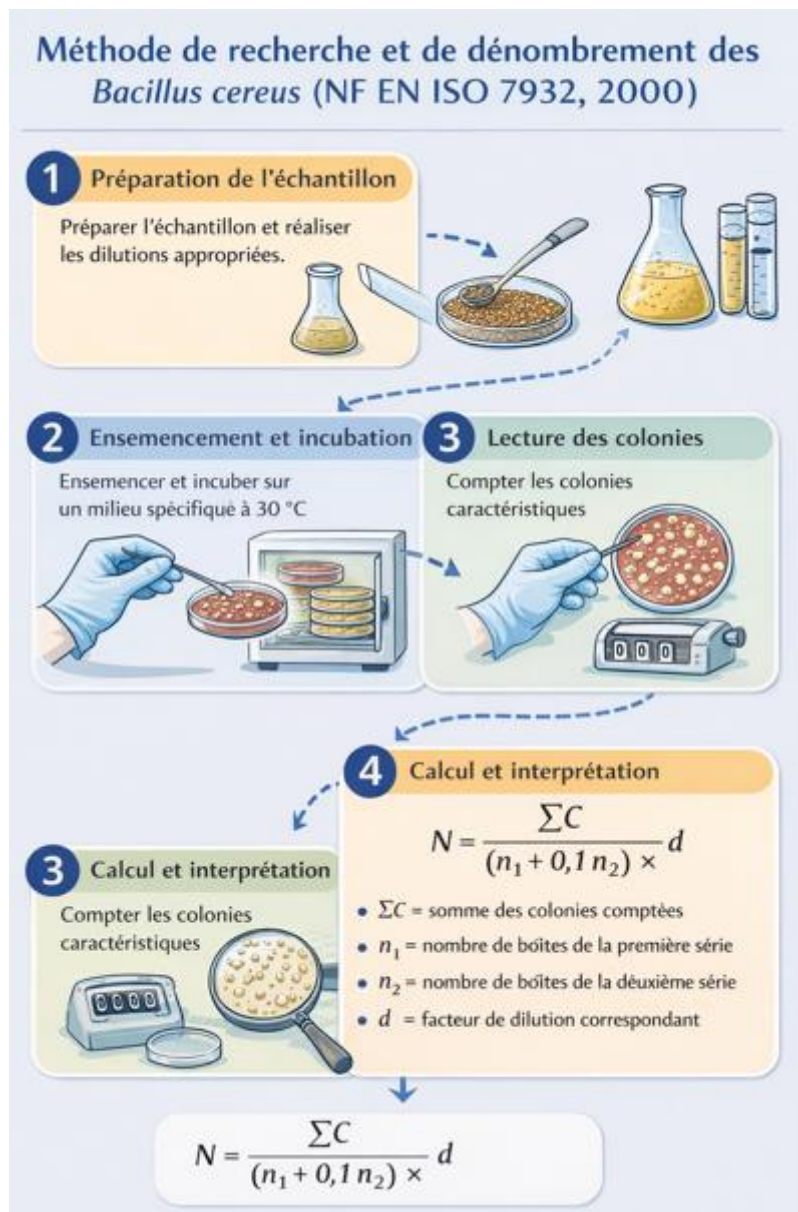


Figure 22. Schéma qui résume la méthode de recherche et de dénombrement des *Bacillus cereus* (NF EN ISO 7932, 2000).

XV. Dénombrement des staphylocoques coagulase positive

XV.1. Préparation de l'échantillon

Préparer l'échantillon conformément aux recommandations de la norme, en réalisant les dilutions appropriées pour le dénombrement.

XV.2. Ensemencement et incubation

Ensemencer sur le milieu spécifique recommandé pour les staphylocoques coagulase positive et incubuer dans les conditions appropriées afin de permettre la croissance des colonies caractéristiques (NF EN ISO 6888-1, 2000).

XV.3. Lecture et interprétation

Compter les colonies caractéristiques et interpréter les résultats selon les critères de la norme. Le calcul du nombre de bactéries est effectué selon la formule suivante :

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

où :

- $\sum C$: somme des colonies comptées sur toutes les boîtes prises en compte
- n_1 : nombre de boîtes de la première série de dilution
- n_2 : nombre de boîtes de la deuxième série de dilution
- d : facteur de dilution correspondant à la première série (NF EN ISO 6888-1, 2000).

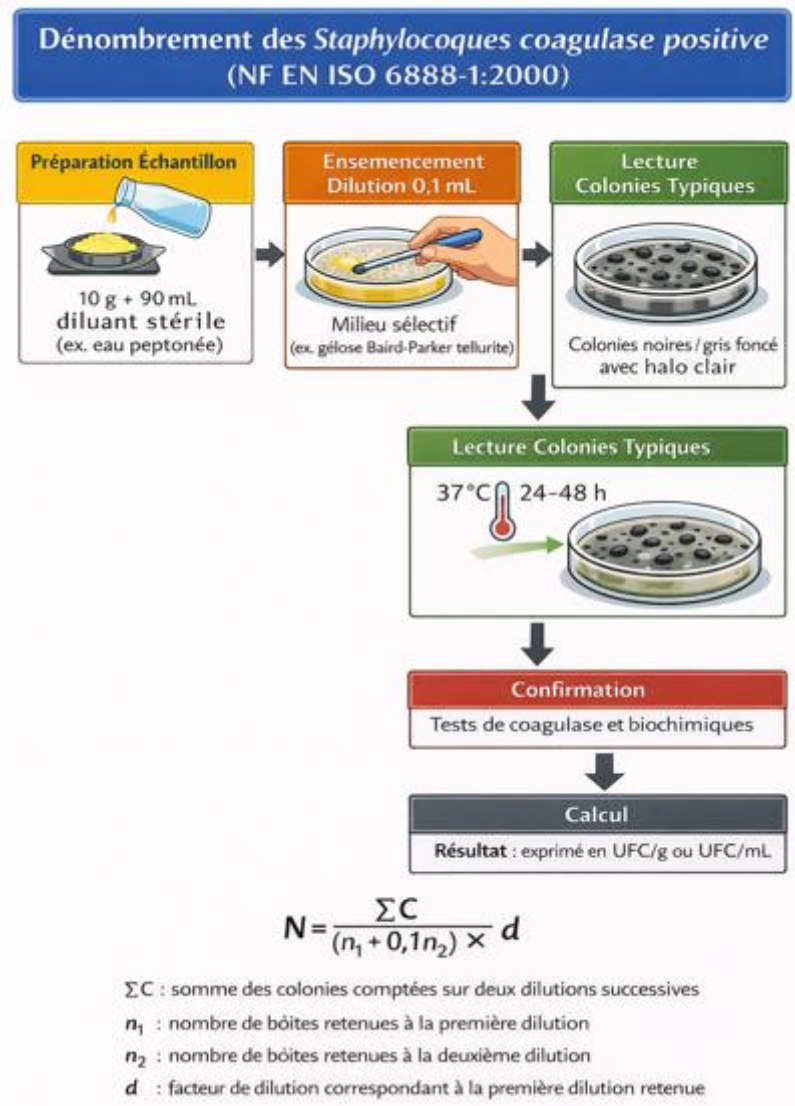


Figure 23. Schéma qui résume le dénombrement des staphylocoques coagulase positive (NF EN ISO 6888-1, 2000).

Tableau 4. Récapitulatif de Synthèse des cours de Contrôle Microbiologique des Aliments

N°	Titre de cours	Objectif	Matériel / Milieux	Méthodologie / Étapes clés	Résultat attendu
1	Contrôle microbiologique des surfaces par boîte contact	Évaluer la contamination microbienne des surfaces en contact avec les aliments	Boîtes contact, PCA, gants, désinfectant	Presser la boîte contact sur la surface, incubé 24–48 h à 30°C, observer et compter les colonies	Quantification de la flore totale sur la surface
2	Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30°C (NF EN ISO 4833)	Évaluer la charge microbienne totale d'un échantillon alimentaire	Échantillons alimentaires, PCA, pipettes, tubes à dilution, incubateur	Préparer des dilutions décimales, ensemercer sur PCA, incubé 48 h à 30°C, compter colonies	Estimation quantitative de la flore totale
3	Dénombrement des coliformes à 30°C (NF V 08-050)	Identifier et quantifier les coliformes pour évaluer la qualité sanitaire	Échantillons alimentaires ou eau, VRBA, pipettes, incubateur	Préparer des dilutions décimales, ensemercer sur VRBA, incubé 24–48 h à 30°C, identifier colonies caractéristiques	Quantification des coliformes présents
4	Dénombrement des levures et moisissures (NF V08-059)	Détecter et quantifier la flore fongique d'un échantillon	Échantillons sucrés, Sabouraud Agar, pipettes, incubateur 25°C	Préparer des dilutions décimales, ensemercer sur Sabouraud, incubé 3–5 jours, identifier colonies levures et moisissures	Quantification et identification morphologique des levures et moisissures
5	Recherche rapide de Salmonelles (BKR 23/04-12/06)	Détecter la présence de Salmonelles dans les aliments	Échantillons alimentaires (poulet, œufs, lait), milieux sélectifs (RVS, XLD), pipettes, incubateur 37°C	Enrichir l'échantillon, incubé 18–24 h, transférer sur XLD, incubé 24 h, observer colonies caractéristiques	Détection qualitative de Salmonelles
6	Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214)	Évaluer la population de bactéries lactiques dans un produit laitier	Échantillon laitier, MRS Agar, pipettes, incubateur 30°C	Préparer dilutions décimales, ensemercer sur MRS, incubé 48–72 h, compter colonies	Quantification de la flore lactique
7	Dénombrement des	Identifier et quantifier	Échantillons alimentaires,	Préparer dilutions, ensemercer	Quantification des

	Entérobactéries (NF ISO 21528-2)	les Entérobactéries indicatrices	VRBG Agar, pipettes, incubateur 37°C	sur VRBG, incubé 24 h, identifier colonies caractéristiques	Entérobactéries présentes
8	Dénombrement des staphylocoques coagulase positive	Détecter et quantifier <i>Staphylococcus aureus</i> dans les aliments	Échantillons alimentaires, Baird Parker Agar, pipettes, incubateur 37°C	Préparer dilutions, ensemercer sur Baird Parker, incubé 24–48 h, observer colonies caractéristiques	Détection et estimation de <i>S. aureus</i>
9	Dénombrement de <i>Clostridium perfringens</i> (NF EN ISO 7937)	Identifier et quantifier <i>C. perfringens</i> dans un échantillon	Échantillon alimentaire, milieu TSC, incubateur anaérobie 37°C	Préparer dilutions, ensemercer sur TSC, incubation anaérobie 24 h, identifier colonies	Quantification des <i>C. perfringens</i>
10	Dénombrement de <i>Bacillus cereus</i> (NF EN ISO 7932)	Détecter et quantifier <i>B. cereus</i> dans les aliments	Échantillons alimentaires, MYP Agar, incubateur 30°C	Préparer dilutions, ensemercer sur MYP, incubé 24–48 h, observer colonies caractéristiques	Quantification de <i>B. cereus</i>

XVI. Conclusion

Le contrôle microbiologique des aliments constitue un pilier fondamental de la sécurité alimentaire et de la protection de la santé publique. Il permet non seulement de détecter et de quantifier les micro-organismes présents dans les aliments et sur les surfaces de contact, mais également de prévenir les risques sanitaires liés aux bactéries pathogènes et aux micro-organismes indicateurs.

À travers l'étude des différentes techniques normalisées, dénombrement des micro-organismes aérobies, flore lactique, coliformes, levures et moisissures, recherche de Salmonelles, ou encore dénombrement de bactéries spécifiques comme *Clostridium perfringens* et *Bacillus cereus*; l'étudiant acquiert une compréhension complète des méthodes microbiologiques appliquées au contrôle alimentaire.

La maîtrise de ces techniques, combinée à l'application rigoureuse des bonnes pratiques de laboratoire et au respect des normes NF, ISO et BKR, permet de garantir la fiabilité des analyses et d'assurer la qualité et la sécurité des produits alimentaires.

Globalement, ce cours fournit les bases nécessaires pour que l'étudiant devienne un acteur compétent du contrôle microbiologique, capable d'évaluer, d'interpréter et de contribuer efficacement à la sécurité sanitaire dans le domaine alimentaire.

Travaux pratique

Fiche TP 1. Contrôle microbiologique des surfaces par boîte contact (flore totale)

Titre : Évaluation de la contamination microbienne des surfaces alimentaires

Objectif : Déterminer la charge microbienne totale sur les surfaces en contact avec les aliments afin d'évaluer leur niveau d'hygiène.

Matériel et réactifs :

- Boîtes de Petri contenant un milieu nutritif pour flore totale (PCA)
- Boîtes contact stériles
- Gants, désinfectant, matériel de protection individuelle

Méthodologie :

1. Presser la boîte contact stérile sur la surface à analyser (plan de travail, ustensile, table).
2. Refermer immédiatement la boîte et incuber à 30°C pendant 24 à 48 heures.
3. Examiner la croissance microbienne et compter les colonies apparentes.
4. Décrire les caractéristiques morphologiques des colonies (forme, couleur, taille).

Résultat attendu :

Visualisation et quantification de la flore totale présente sur la surface analysée, permettant une évaluation de la propreté.

Fiche TP 2. Dénombrement des micro-organismes aérobies à 30°C

(NF EN ISO 4833)

Titre : Quantification des micro-organismes aérobies dans un échantillon alimentaire

Objectif : Évaluer la charge microbienne totale d'un échantillon alimentaire selon la norme NF EN ISO 4833.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires (fromage, yaourt, jus de fruits)
- Milieu nutritif PCA
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 30°C

Méthodologie :

1. Préparer une série de dilutions décimales de l'échantillon.
- 2.ensemencer 1 mL de chaque dilution sur PCA en utilisant la technique appropriée (p. ex. méthode des plaques).
3. Incuber à 30°C pendant 48 heures.
4. Compter les colonies et calculer le nombre de micro-organismes par gramme ou millilitre selon la formule standard.

Résultat attendu : Obtention d'une estimation quantitative fiable de la flore microbienne totale de l'échantillon.

Fiche TP 3. Dénombrement des coliformes à 30°C

(NF V 08-050)

Titre : Détection et quantification des coliformes dans un échantillon alimentaire ou d'eau

Objectif : Identifier et quantifier la population de coliformes pour évaluer l'hygiène et la qualité sanitaire d'un produit ou d'un milieu aqueux.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires ou d'eau
- Milieu sélectif VRBA (Violet Red Bile Agar)
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 30°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
2. Ensemencer les dilutions sur VRBA.
3. Incuber 24 à 48 heures à 30°C.
4. Identifier et compter les colonies caractéristiques (rouges entourées d'un halo clair).

Résultat attendu : Détermination quantitative de la population de coliformes présents, indicatrice de contamination fécale ou hygiénique.

Fiche TP 4. Dénombrement des levures et moisissures

(NF V08-059)

Titre : Quantification des levures et moisissures dans les aliments

Objectif : Détecter et évaluer la charge de levures et de moisissures afin d'apprécier la qualité microbiologique et la durée de conservation d'un produit alimentaire.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires (confiture, jus de fruits, pain)
- Milieu Sabouraud Agar
- Boîtes de Petri, pipettes stériles
- Incubateur à 25°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
2. Ensemencer sur le milieu Sabouraud Agar.
3. Incuber à 25°C pendant 3 à 5 jours.
4. Observer et compter les colonies :
 - Levures : colonies lisses, rondes
 - Moisissures : colonies filamenteuses, duveteuses

Résultat attendu : Quantification et identification morphologique de la flore fongique de l'échantillon.

Fiche TP 5. Recherche rapide de Salmonelles

(BKR 23/04-12/06)

Titre : Détection de Salmonelles dans les aliments

Objectif : Détecter la présence de Salmonelles dans un échantillon alimentaire pour évaluer le risque sanitaire.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires (poulet, œufs, lait)
- Milieux sélectifs pour Salmonelles (RVS, XLD)
- Pipettes et tubes stériles
- Incubateur à 37°C

Méthodologie simplifiée :

1. Enrichir l'échantillon dans un bouillon sélectif adapté.
2. Incuber 18 à 24 h à 37°C.
3. Transférer sur milieu sélectif (XLD) et incuber 24 h.
4. Identifier les colonies caractéristiques de Salmonelles (rouges avec centre noir).

Résultat attendu : Détection qualitative de Salmonelles, indicatrice de contamination alimentaire.

Fiche TP 6. Dénombrement de la flore lactique (NF ISO 15214)

Titre : Quantification des bactéries lactiques dans les produits laitiers

Objectif : Évaluer la population de bactéries lactiques présentes dans un produit laitier pour suivre la qualité microbiologique et le bon déroulement de la fermentation.

Matériel et réactifs :

- Échantillons laitiers (lait, yaourt, fromage)
- Milieu MRS Agar (pour bactéries lactiques)
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 30°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
- 2.ensemencer 1 mL de chaque dilution sur MRS Agar.
3. Incuber à 30°C pendant 48 à 72 h.
4. Compter les colonies et décrire leur morphologie.

Résultat attendu : Estimation quantitative de la flore lactique, indicatrice de la qualité et de la fermentation du produit.

Fiche TP 7. Dénombrement des Entérobactéries

(NF ISO 21528-2)

Titre : Identification et quantification des Entérobactéries dans les aliments

Objectif : Déterminer la présence et la densité des Entérobactéries, indicatrices d'hygiène et de contamination alimentaire.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires
- Milieu sélectif VRBG Agar
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 37°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
- 2.ensemencer les dilutions sur VRBG Agar.
3. Incuber 24 h à 37°C.
4. Identifier et compter les colonies caractéristiques des Entérobactéries.

Résultat attendu : Quantification des Entérobactéries présentes, permettant d'évaluer la qualité hygiénique de l'échantillon.

Fiche TP 8. Dénombrement des staphylocoques (coagulase positive)

Titre : Détection et quantification de *Staphylococcus aureus*

Objectif : Déterminer la présence et la charge de staphylocoques coagulase positive dans un aliment afin de prévenir le risque d'intoxication alimentaire.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires (produits laitiers, viande, charcuterie)
- Milieu Baird Parker Agar
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 37°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
- 2.ensemencer sur Baird Parker Agar.
3. Incuber 24 à 48 h à 37°C.
4. Identifier les colonies caractéristiques (noires avec halo clair).

Résultat attendu : Détection et estimation de la charge de *S. aureus* dans l'échantillon.

Fiche TP 9. Dénombrement de *Clostridium perfringens*

(NF EN ISO 7937)

Titre : Quantification des bactéries anaérobies sulfite-réductrices

Objectif : Déterminer la charge de *Clostridium perfringens* dans les aliments afin de prévenir les intoxications alimentaires d'origine bactérienne.

Matériel et réactifs :

- Échantillons alimentaires (viandes, produits cuits)
- Milieu TSC Agar (pour *Clostridium*)
- Incubateur anaérobie à 37°C
- Pipettes stériles, tubes à dilution

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
2. Ensemencer sur TSC Agar en conditions anaérobies.
3. Incuber 24 à 48 h à 37°C.
4. Identifier et compter les colonies caractéristiques.

Résultat attendu : Quantification des *Clostridium perfringens* présents dans l'échantillon, indicateur de sécurité alimentaire.

Fiche TP 10. Dénombrement de *Bacillus cereus*

(NF EN ISO 7932)

Titre : Détection et quantification de *Bacillus cereus*

Objectif : Identifier et mesurer la population de *Bacillus cereus* dans les aliments, bactéries sporulantes responsables de certaines intoxications alimentaires.

Matériel et réactifs :










- Échantillons alimentaires (riz, lait, produits cuits)
- Milieu MYP Agar (Mannitol Egg Yolk Polymyxin)
- Pipettes stériles, tubes à dilution
- Boîtes de Petri, incubateur à 30°C

Méthodologie :

1. Préparer des dilutions décimales de l'échantillon.
2. Ensemencer sur MYP Agar.
3. Incuber 24 à 48 h à 30°C.
4. Identifier et compter les colonies caractéristiques de *B. cereus* (jaunes avec halo clair).

Résultat attendu : Quantification de *Bacillus cereus*, permettant d'évaluer le risque microbiologique de l'aliment.

Tableau 5. Synthèse des Travaux Pratiques en Contrôle Microbiologique des Aliments

N°	TP	Objectif	Matériel / Milieux	Méthodologie / Étapes clés	Résultat attendu
1	 Contrôle des surfaces par boîte contact	Évaluer la contamination microbienne des surfaces	Boîtes contact, PCA	Pression sur la surface, 24–48h à 30°C	Flore totale sur surface
2	 Dénombrement aérobie 30°C (ISO 4833)	Évaluer la charge microbienne totale	Échantillon, PCA	Dilutions, ensemencement 48h à 30°C	Flore totale de l'échantillon
3	 Dénombrement des coliformes (NF V 08-050)	Quantifier les coliformes	Échantillon, VRBA	Dilutions, ensemencement 24–48h à 30°C	Coliformes présents
4	 Levures et moisissures (NF V08-059)	Détecter levures et moisissures	Échantillon sucré, Sabouraud Agar	Dilutions, ensemencement, 3–5j à 25°C	Levures & moisissures
5	 Recherche de Salmonelles (BKR)	Détecter Salmonelles dans aliments	Échantillon, RVS, XLD	Enrichissement, transfert XLD, 37°C	Présence de Salmonelles
6	 Flore lactique (ISO 15214)	Évaluer bactéries lactiques	Échantillon laitier, MRS Agar	Dilutions, ensemencement, 48–72h à 30°C	Bactéries lactiques
7	 Dénombrement des Entérobactéries (ISO 21528-2)	Identifier les Entérobactéries	Échantillon, VRBG Agar	Dilutions, ensemencement, 24h à 37°C	Entérobactéries présentes
8	 <i>Staphylocoques coagulase +</i>	Détecter <i>S. aureus</i>	Échantillon, Baird Parker Agar	Dilutions, ensemencement, 24–48h à 37°C	Staphylococcus aureus
9	 <i>Clostridium perfringens</i>	Quantifier <i>C. perfringens</i>	Échantillon, TSC, Anaérobiose 37°C	Dilutions, ensemencement, 24–48h à 30°C	Clostridium perfringens
10	 <i>Bacillus cereus</i> (ISO 7932)	Quantifier <i>B. cereus</i>	Échantillon, MYP Agar	Dilutions, ensemencement, 24–48h à 30°C	Bacillus cereus

Références

1. AFNOR. (2001). *Microbiologie des aliments - Numération d'Escherichia coli - Partie 2 : Méthode par ensemencement sur milieu gélosé (NF ISO 16649-2)*. AFNOR. <https://www.iso.org/standard/24801.html>
2. AFNOR. (2006). NF V04-503: Microbiologie des aliments- Ensemencement en surface et en profondeur pour le dénombrement des micro-organismes. Association Française de Normalisation.
3. AFNOR. (2009). *NF V 08-060: Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes thermotolérants par comptage des colonies obtenues à 44 °C* [Norme française]. Association Française de Normalisation. https://www.boutique.afnor.org/fr-fr/norme/nf-v08060/microbiologie-des-aliments-denombrement-des-coliformes-thermotolerants-par-fa160465/33001?utm_source=chatgpt.com
4. AFNOR. (2009). *NF V 08-061 - Microbiologie des aliments : Dénombrement en anaérobiose des bactéries sulfite-réductrices par comptage des colonies à 46 °C*. Association Française de Normalisation.
5. AFNOR. (2014). *Microbiologie des aliments - Dénombrement des levures et moisissures — Méthode de routine (NF V 08-059)*. Association Française de Normalisation.
6. AFNOR. (2015). *Microbiologie des aliments - Dénombrement des coliformes - Méthode de routine (NF V 08-050)*. Association Française de Normalisation.
7. Association française de normalisation (AFNOR). (2017). *Microbiologie de la chaîne alimentaire - Méthode horizontale pour la recherche et le dénombrement des Entérobactéries - Partie 2 : Méthode de comptage des colonies (NF ISO 21528-2)*. AFNOR.
8. Association Française de Normalisation. (2000). *Microbiologie des aliments - Méthode horizontale pour le dénombrement de Bacillus cereus - Technique de comptage des colonies (NF EN ISO 7932)*. AFNOR.
9. Association Française de Normalisation. (2000). *Microbiologie des aliments — Méthode horizontale pour le dénombrement des staphylocoques coagulase positive (NF EN ISO 6888-1)*. AFNOR.
10. Association Française de Normalisation. (2004). *Management de la qualité : Concepts et outils*. AFNOR Éditions.
11. Association Française de Normalisation. (2020). *Guide de la normalisation et de la certification*. AFNOR Éditions.
12. BKR 23/04-12/06. (2006). *Méthode rapide de recherche de Salmonelles*.

13. Bundesverband der Hersteller von Lebensmitteln und Futtermitteln (BKR). (2006). *BKR 23/04-12/06 : Méthode rapide pour la détection de Salmonella spp. dans les produits alimentaires*. Berlin, Allemagne : BKR.
14. Codex Alimentarius Commission. (2020). General principles of food hygiene (CXC 1-1969, Rev. 2020). FAO/WHO.
15. Codex Alimentarius Commission. (2020). *General principles of food hygiene (CXC 1-1969, Rev. 2020)*. FAO/WHO.
16. Doyle, M. P., Beuchat, L. R., & Montville, T. J. (2013). *Food microbiology: Fundamentals and frontiers* (4th ed.). ASM Press.
17. FDA (Food and Drug Administration). (2021). *Bad Bug Book: Foodborne Pathogenic Microorganisms and Natural Toxins Handbook* (2nd ed.).
18. ICMSF (International Commission on Microbiological Specifications for Foods). (2020). *Microorganisms in foods 9: Microbiological testing in food safety management* (2nd ed.). Springer.
19. International Organization for Standardization. (2006). *Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coliforms - Colony-count technique (ISO 4832)*. ISO.
20. International Organization for Standardization. (2015a). ISO 9000:2015. Quality management systems: Fundamentals and vocabulary. ISO.
21. International Organization for Standardization. (2015b). ISO 9001:2015 - Quality management systems: Requirements. ISO.
22. International Organization for Standardization. (2018). ISO 22000:2018 - Food safety management systems: Requirements for any organization in the food chain. ISO.
23. International Organization for Standardization. (2022). About ISO: What we do. ISO.
24. ISO (International Organization for Standardization). (2017). *ISO 4833-1:2013 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of microorganisms - Part 1: Colony-count technique at 30 degrees C*.
25. ISO 18593:2018. *Microbiology of the food chain - Horizontal methods for surface sampling*. International Organization for Standardization (ISO).
26. ISO 6611. Octobre 2004. Lait et produits laitiers. Dénombrement des unités formant colonie de levures et/ou moisissures. Comptage des colonies à 25°C.
27. ISO. (2004). *ISO 7937:2004 - Microbiology of food and animal feeding stuffs: Horizontal method for the enumeration of Clostridium perfringens - Colony-count technique*. International Organization for Standardization.

28. ISO. (2013a). *NF EN ISO 4833-1:2013- Microbiologie de la chaîne alimentaire- Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes-Partie 1 : Dénombrement des colonies à 30 °C par la technique d'ensemencement en profondeur.* Organisation internationale de normalisation.
29. ISO. (2013b). *NF EN ISO 4833-2:2013 -Microbiologie de la chaîne alimentaire- Méthode horizontale pour le dénombrement des microorganismes- Partie 2 : Méthode par comptage des colonies dans des conditions spécifiées.* Organisation internationale de normalisation.
30. ISO. (2017). *ISO 6579-1:2017 - Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of Salmonella - Part 1: Detection of Salmonella spp.* International Organization for Standardization.
31. ISO. (2019). *ISO 15214: Microbiology of the food chain - Horizontal method for the enumeration of mesophilic lactic acid bacteria - Colony-count technique at 30 °C.* International Organization for Standardization.
32. Jay, J. M., Loessner, M. J., & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology* (7th ed.). Springer.
33. Kilcast, D. (2013). *Instrumental assessment of food sensory quality.* Woodhead Publishing.
34. Lawless, H. T., & Heymann, H. (2010). *Sensory evaluation of food: Principles and practices* (2nd ed.). Springer.
35. NF EN 15789. Décembre 2009. *Aliments des animaux. Isolation et dénombrement de souches probiotiques de levures (Saccharomyces cerevisiae).*
36. NF V08-059. (2010). *Microbiologie des aliments. Dénombrement des levures et moisissures par comptage des colonies à 25°C. Méthode de routine.*
37. World Health Organization. (2022). *Food safety: Key facts.* WHO.