

## 2- 2- Homogénéisation

- Cette opération a pour but de répartir uniformément les micro-organismes présents dans l'échantillon à fin sur la prise de la quantité aliquote soit représentative, de la totalité de l'échantillon.
- Les produits liquides ou semi- liquides sont agités manuellement ou mécaniquement au vortex ou agitateur.
- Les produits solides ou semi- solides doivent faire l'objet d'un broyage dans un volume connu de diluant.



**Vortex**



**Mortier en verre**

- Le broyage peut être manuel dans un mortier en verre à pied contenant 5 à 20g de sable ou de billes de verres de 0,5 mm de diamètre.
- Le diluant doit être versé progressivement au cours de l'opération de broyage.
- Après 5 min de repos du broyat, le surnageant est prélevé pour être analysé.

## 2- 3- Préparation des dilutions

- La préparation de la suspension mère et de ces dilutions se fait avec un diluant approprié.
- Le diluant le plus utilisé en microbiologie alimentaire est la solution de Ringer diluées au (1/4).
- Pour maintenir les microorganismes dans un bon état physiologique, il est préconisé d'utiliser comme diluant, l'eau peptonée ou le milieu tryptone- sel.
- Dans ces conditions, il impératif que les dénombrements s'effectuent dans l'heure qui suit la préparation afin d'éviter la multiplication des germes.



Si les germes anaérobies sont recherchés, pour les protéger des effets toxique de l'O<sub>2</sub> atmosphérique => le diluant contienne un agent réducteur comme la vitamine C ou des chlorhydrates de L. cystéine.

- Dans le cas des produits lipidiques (huiles et beurre) pour stabiliser l'émulsion, le diluant est additionné de 0,1% de gélose.
- La suspension mère est constituée par le produit liquide lorsque le produit est solide ou semi-solide.
- Dans le cas des produits non pipetable (solides) : la préparation de la suspension mère nécessite une fluidisation ou un broyage => préparer une solution mère d'une concentration connue.

## Préparation d'une solution mère

Peser une quantité donnée du produit (10g par exemple)

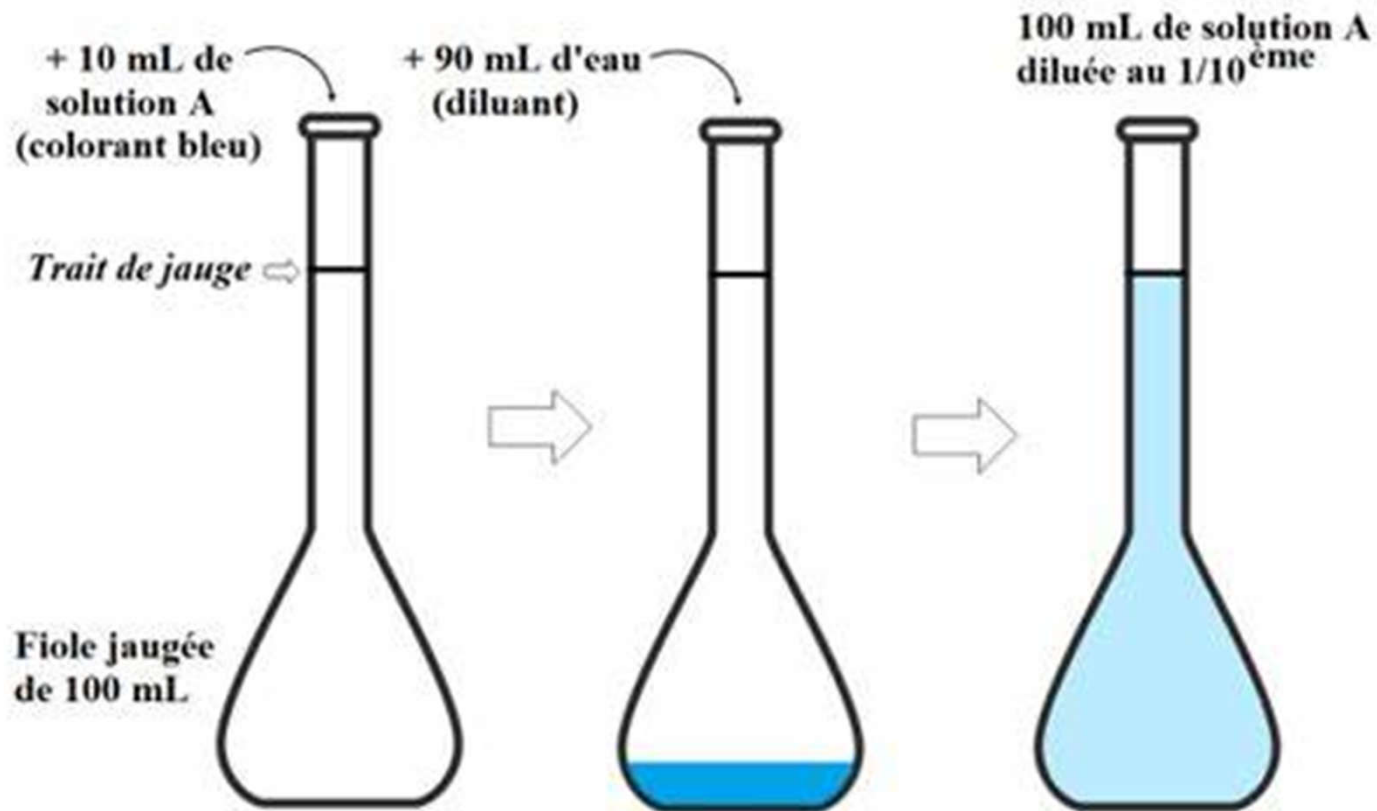


Mettre le produit dans le récipient de broyage



Ajouter un volume connu de diluant de sorte à obtenir une dilution de  $1/5^e$  (40ml) ou de  $1/10^e$  (90ml).

Pour obtenir la dilution initiale voulue, la concentration de la solution mère contient **x** gramme du produit alimentaire par **ml** de dilution.



Les résultats de l'analyse sont d'abord exprimés en **germes /ml** puis convertie en germe par **grammes** d'aliment.

# **MÉTHODES D'ESTIMATION DES POPULATIONS MICROBIENNES**

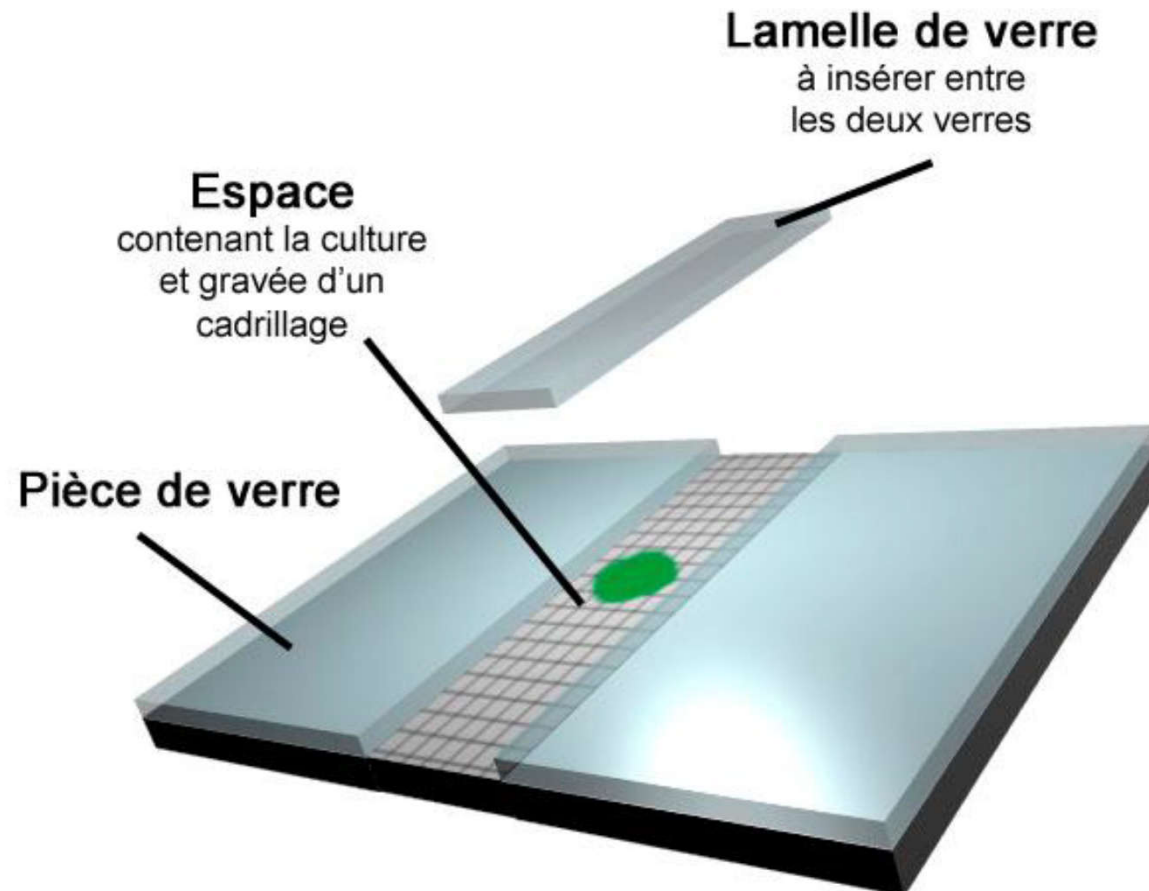
# I- méthodes microscopiques

## 1- Dénombrement microscopique

- L'échantillon à être énuméré est appliqué sur une lame d'**hématicimètre**
  - qui retient un **volume fixe** dans une cellule de comptage.
- Le nombre de cellules est compté :
  - nombre de cellules dans le volume donné est déterminé

## Hématimètre

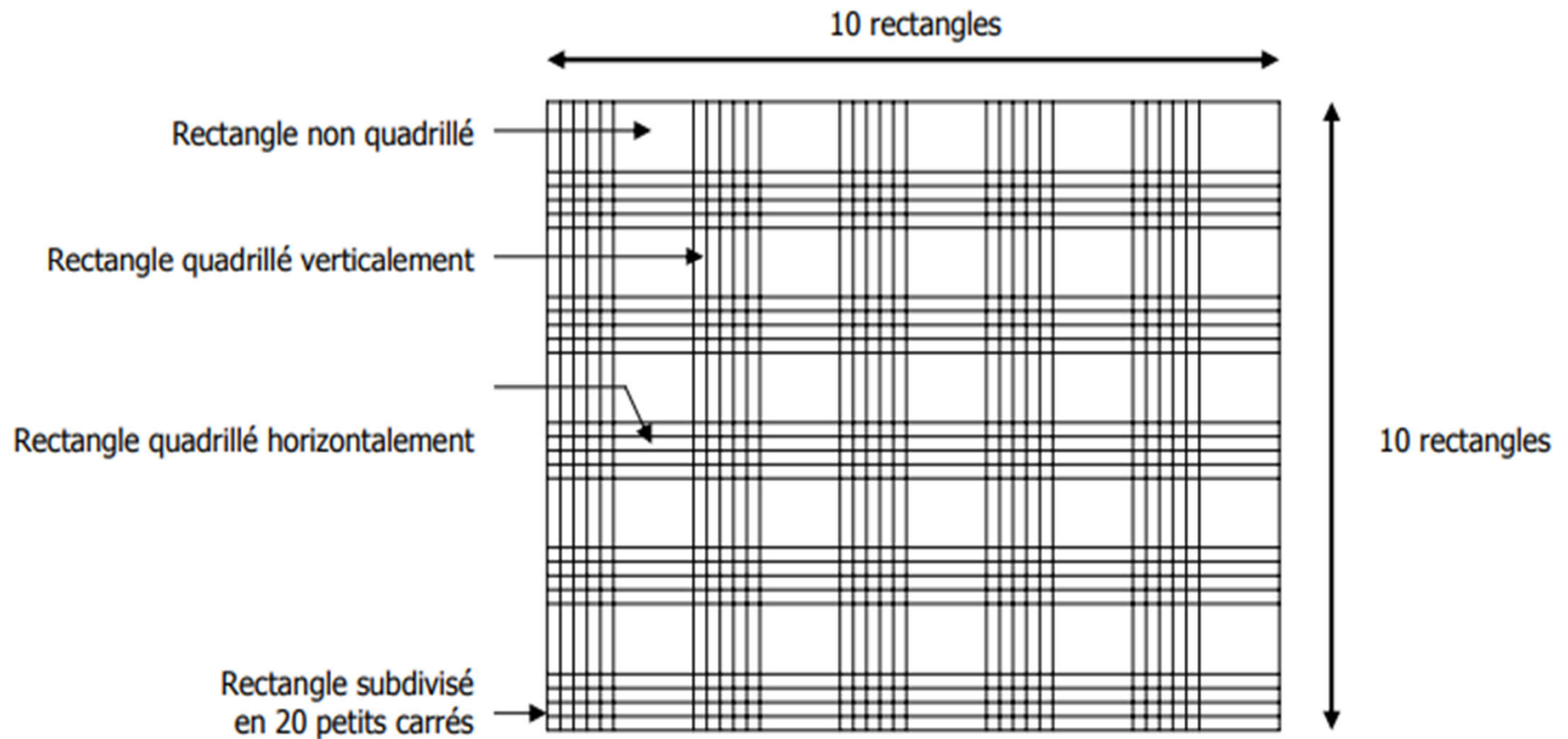
- Cette lame possède 2 cellules de comptage indépendante

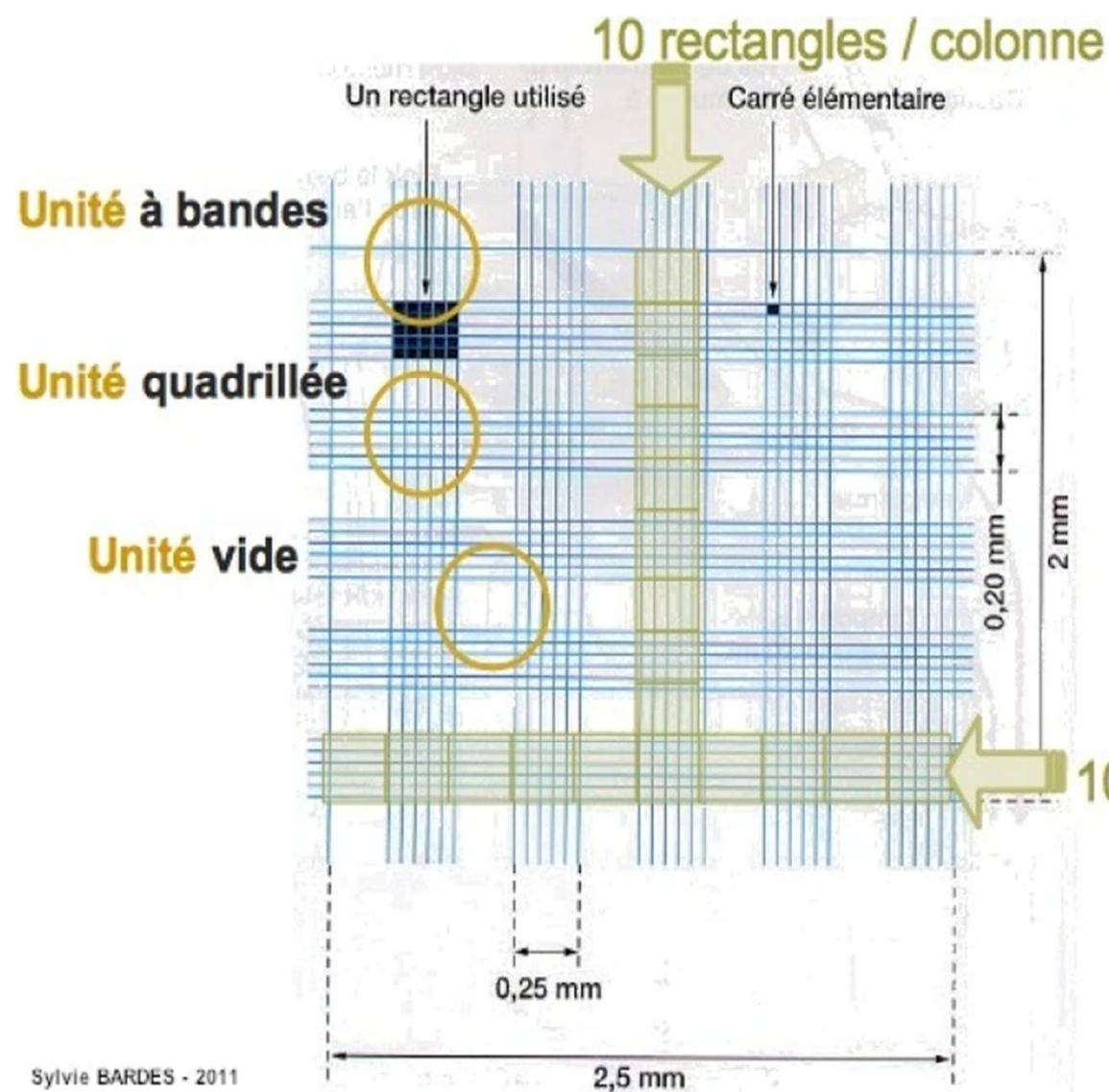




## Cellule de Malassez

La cellule de Malassez possède un quadrillage spécifique comportant 100 rectangles :





**Cellule de Malassez :**

**100 unités rectangulaires**

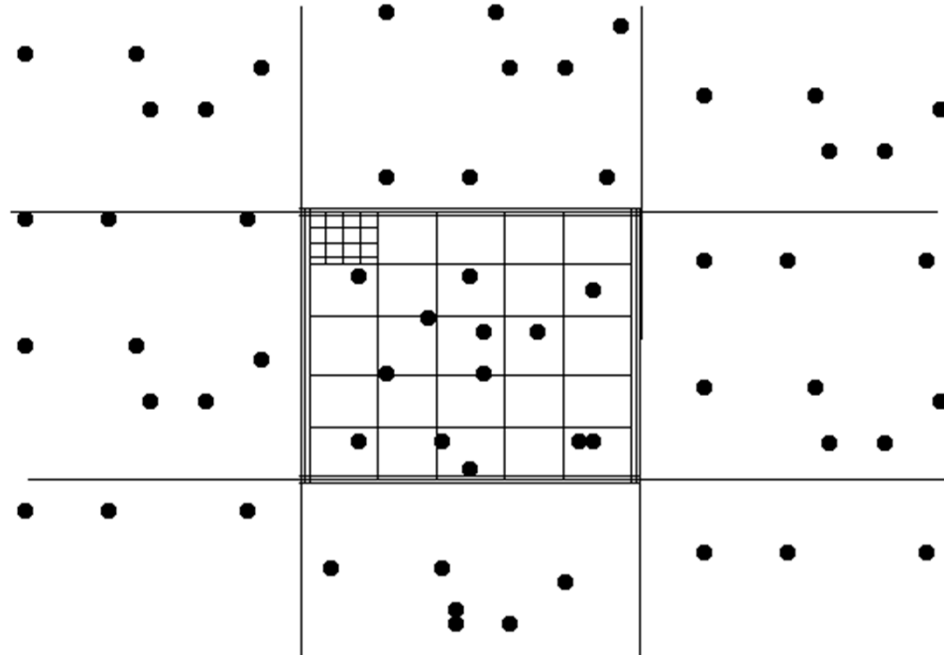
Profondeur : 0.2 mm


Surface :  $2,5 \times 2 = 5 \text{ mm}^2$

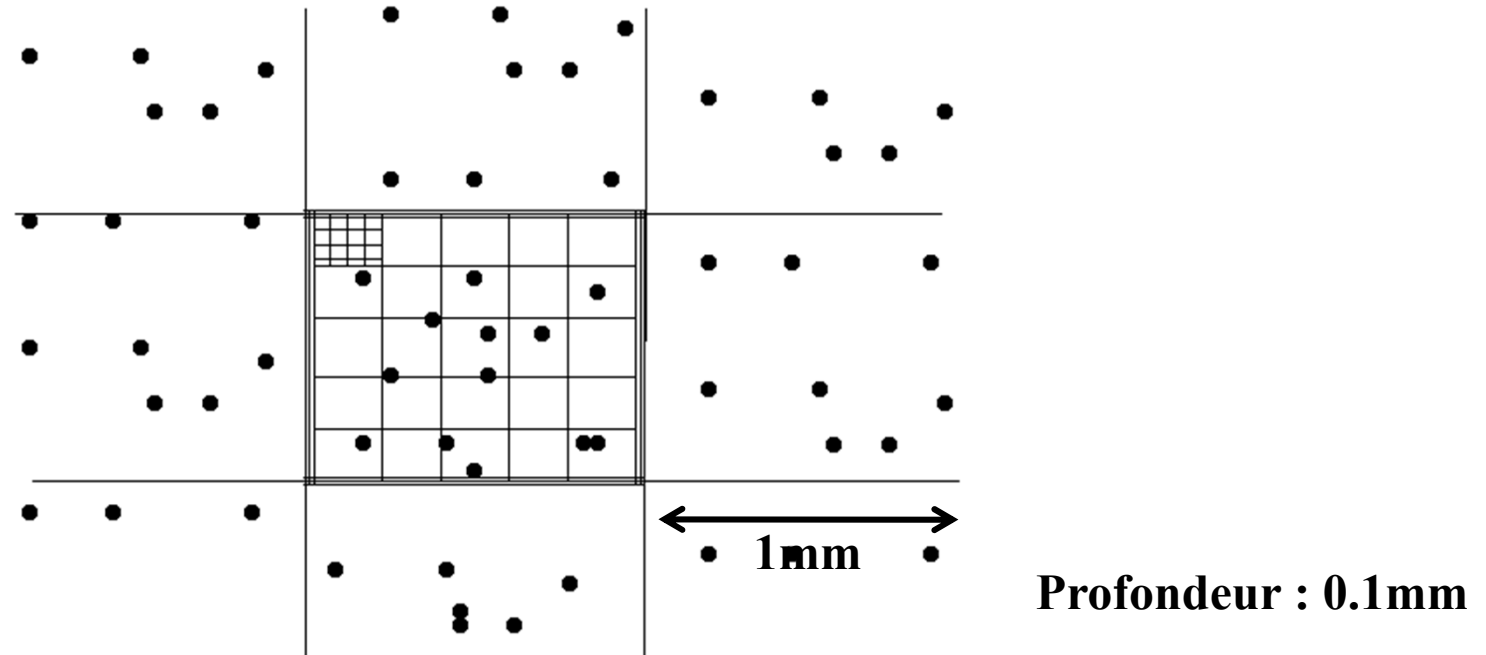
**Volume =  $0,2 \times 5 = 1 \text{ mm}^3 = 1 \mu\text{L}$**

**1 unité rectangulaire**

Volume =  $0,01 \mu\text{L}$



- **Compter le nombre de cellules dans trois carrés indépendant**  
(prendre 3 carrés au hasard) : **8, 8 et 5**
- **Déterminer la moyenne**  
 **$(8 + 8 + 5)/3 = 7$**   **Donc 7 cellules/carré**



- **Calculer le volume d'un carré:**  
 $= 0.1\text{cm} \times 0.1\text{cm} \times 0.01\text{cm} = 1 \times 10^{-4} \text{ cm}^3 \text{ ou ml}$
- **Diviser le nombre moyen de cellules par le volume d'un carré:**  
 $\text{Donc } 7 / 1 \times 10^{-4} \text{ ml} = 7 \times 10^4 \text{ cellules/ml}$

### ☐ **Avantages:**

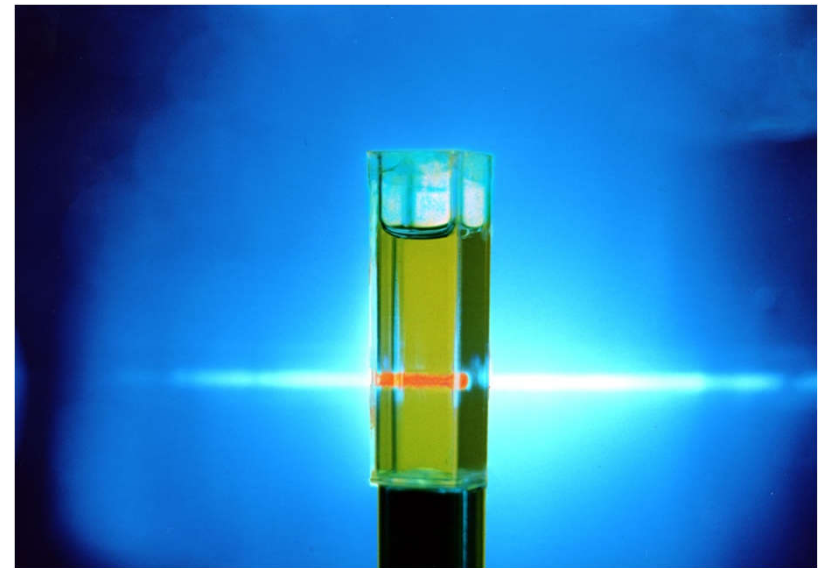
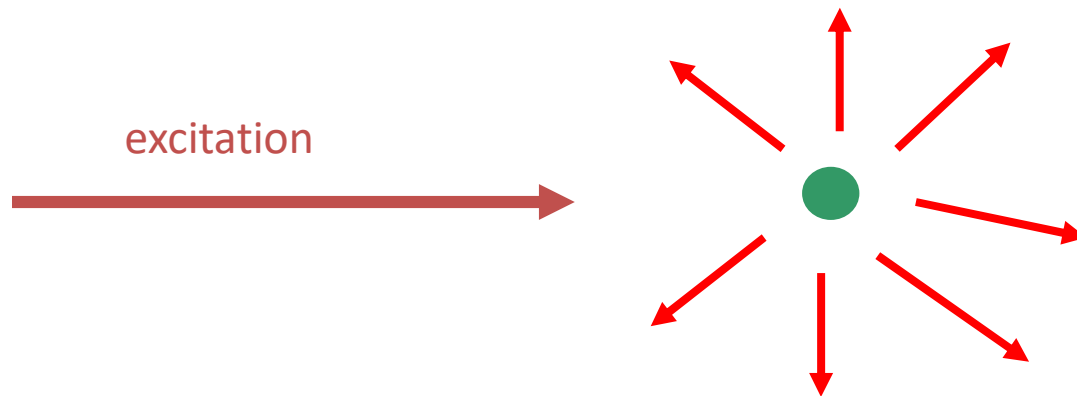
- ☐ Rapide
- ☐ Aucune croissance requise

### ☐ **Désavantages:**

- ☐ Ne différencie pas entre vivant et mort
- ☐ Peut être difficile de différencier entre les bactéries.
- ☐ Peut être difficile de différencier entre les bactéries et les détritits.

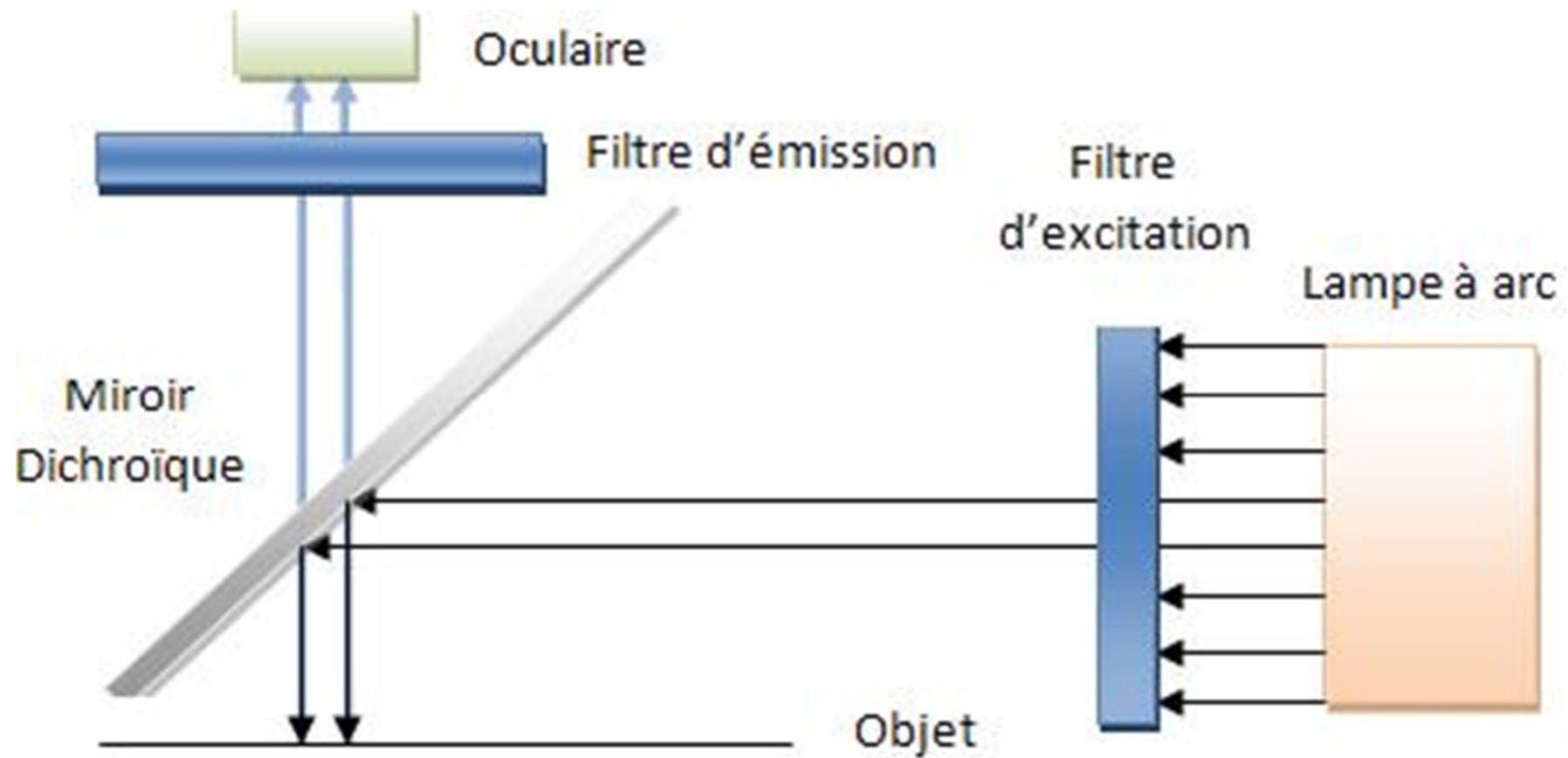
## 2- Microscopie de fluorescence

Certains systèmes (atomes, molécules, cristaux,...) lorsqu'ils sont dans un niveau excité, peuvent se désexciter en émettant des photons.



**La fluorescence** (cf. Méthodes de marquage)  
→ microscopie de fluorescence

## Microscopie de fluorescence



Il s'agit donc d'une détection sur  
fond noir

## Les biomolécules en fluorescence

- En général, les molécules biologiques (protéines, acides nucléiques,...) ne sont pas fluorescentes dans le visible (quelques exceptions : flavines, NADH,...). Certains acides aminés ont néanmoins des propriétés de fluorescence dans l'UV (tryptophane).
- On attache spécifiquement des marqueurs fluorescents :
  - Couplage covalent (liaison chimique)
  - Marquage d'affinité: on utilise une molécule fluorescente qui vient s'attacher spécifiquement (anticorps, toxines,...)
  - Clonage d'une protéine fluorescente